

POLITECNICO DI MILANO

Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria
Biomedica



**HOMOGRAFT VASCOLARI:
VALUTAZIONE DI UN NUOVO PROTOCOLLO DI
DECELLULARIZZAZIONE MEDIANTE UN PROTOTIPO
AUTOMATIZZATO**

Relatore: Prof. Sara MANTERO

Correlatore: Ing. Alessandro PELLEGGATA

Tesi di Laurea di
Salvatore Paiano
Matricola 771497

Anno Accademico 2012-2013

INDICE

INDICE DELLE FIGURE	<i>I</i>
INDICE DELLE TABELLE	<i>III</i>
SOMMARIO	<i>IV</i>
ABSTRACT	<i>XVI</i>

Capitolo 1: INTRODUZIONE..... ***I***

1. L'ingegneria per le Patologie Vascolari	2
2. Anatomia e Fisiologia del Vaso.....	7
3. L'Ingegneria dei Tessuti.....	11
4. Scaffold Decellularizzati	16
5. Automazione del processo di decellularizzazione.....	20
6. Obiettivi del Lavoro	23

Capitolo 2: LA DECELLULARIZZAZIONE ***25*** |

1. Stato dell'arte della decellularizzazione	26
2. Protocolli di Decellularizzazione per Tessuti Vascolari	31
3. Nuovo Protocollo di Decellularizzazione.....	36

Capitolo 3: PROGETTAZIONE DEL DISPOSITIVO ***39*** |

1. Introduzione al Dispositivo	40
2. Soluzioni Tecnologiche	47
2.1 Circuito Idraulico	50
2.2 Gestione delle Elettrovalvole	58
3. Sistema di Controllo Centrale	65
3.1 Progettazione Hardware e Software.....	70
4. Validazione del Sistema	73

Capitolo 4: PROVE SPERIMENTALI E RISULTATI..... ***76*** |

1. Materiali e Metodi	78
1.1 Setup Sperimentale e Protocollo	78
1.2 Quantificazione del DNA.....	83
1.3 Prove meccaniche.....	85

1.4 Analisi Istologiche.....	92
1.5 Test Statistici.....	93
2. Risultati.....	94
Capitolo 5: CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI.....	101
BIBLIOGRAFIA.....	107
APPENDICI.....	113
Appendice1: Codice di Controllo.....	114
Appendice2: Datasheet Elettrovalvole.....	126
Appendice3: Datasheet Relay Shield.....	128

INDICE DELLE FIGURE

<i>Fig.1 - Rappresentazione schematica degli strati che costituiscono le arterie, le vene e i capillari</i>	8
<i>Fig.2 - Sistema costituito dai 3 elementi fondamentali dell'Ingegneria dei Tessuti</i>	11
<i>Fig.3 - Principali tipi di bioreattore: Bioreattore Mixed Flasks(1), Bioreattore Rotating-Wall Vessels (2) e il Bioreattore a Perfusion Confinata (3)</i>	13
<i>Fig.4 - Ruolo degli Scaffold nell'Ingegneria dei Tessuti</i>	18
<i>Fig.5 - Esempi di differenti protocolli di decellularizzazione per (A) tessuti quali il pericardio, (B) il derma, (C) tessuti amorfi adiposi, (D) tessuti compositi come la trachea e (E) organi vitali interi</i>	29
<i>Fig.6 - Schematizzazione del sistema progettato: (1) la camera di decellularizzazione nel quale si trovano il vaso fissato agli afferraggi, il dissipatore ed il sensore; (2) sistema di controllo a cui sono collegati sia la cella di Peltier (3) che le due pompe(4). Il circuito idraulico invece è caratterizzato dalla linea che dal reservoir (5) arriva al waste (6), passando per le pompe e la camera</i>	41
<i>Fig.7 - A sinistra è raffigurato l'afferraggio distale ed il particolare del foro responsabile della perdita di carico e a destra l'afferraggio prossimale con il filetto che permette il fissaggio al coperchio della camera e il collegamento per il tubo del circuito idraulico</i>	42
<i>Fig.8 - Circuito idraulico realizzato nel precedente lavoro di tesi caratterizzato da un'unica linea idraulica per il riempimento e per lo svuotamento</i>	43
<i>Fig.9 - Schematizzazione del sistema sviluppato in questo lavoro. Oltre agli elementi raffigurati precedentemente sono presenti le due linee aggiuntive del circuito (1), l'elettrovalvole (2) ed i rispettivi collegamenti con il sistema di controllo(3).</i>	49
<i>Fig.10 - Circuito idraulico: (1) connessioni Luer-Lock e (2) connettori barbed necessari per la divisione del circuito in differenti linee</i>	52
<i>Fig.11 - Il circuito in questo schema rappresenta la soluzione finale dove si può notare la presenza di un filtro d'aria</i>	54
<i>Fig.12 - Circuito idraulico completo costituito dai reservoir in Pyrex®, dai tubi Pharmed BPT®, dall'elettrovalvole, dalle pompe, dalla camera di decellularizzazione e il waste</i>	56
<i>Fig.13 - Tappo GL45 usato sia per i reservoir che per il waste con cui assicuriamo la tenuta e la sterilità dei componenti, si può notare il particolare del filtro d'aria 0.22 micron</i>	57
<i>Fig.14 - Elettrovalvole Sirai a 2 vie (1) ed a 3 vie (2). Per entrambi i dispositivi si possono notare le connessioni elettriche ad innesto rapido, l'organi di pinzaggio, un'apertura nella parte superiore che consente il controllo visivo della posizione e la staffa di fissaggio</i>	60
<i>Fig.15 - Parti costituenti di un relè: la bobina (Avvolgimento), l'astina mobile di metallo ed i contatti (NC, Comune,NA)</i>	61
<i>Fig.16 - Diagramma del circuito che costituisce la Relay Shield. Ogni linea è caratterizzata da un'ingresso derivante dal pin di Arduino e da un'uscita che è collegata all'elettrovalvola, Tra ingresso ed uscita si nota la serie tra transistor e relè</i>	62

<i>Fig.17 - Simbologia di un generico transistor costituito dal collettore (C), dalla base (B) e dall'emettitore (E).....</i>	<i>62</i>
<i>Fig.18 - Relay Shield costituita da una porta d'ingresso IN della tensione, dai 4 relè e dalle rispettive porte di uscita OUT.....</i>	<i>62</i>
<i>Fig.19 - Disegno tecnico dell'elettrovalvola e della staffa di fissaggio in cui sono stati evidenziati l'interasse tra i fori per le viti di fissaggio (a), il diametro della rondella (b) e il diametro del foro per la vite (c).....</i>	<i>63</i>
<i>Fig.20 - Unità per il fissaggio e la disposizione delle elettrovalvole in cui sono stati effettuati 4 fori in posizioni sfalsate e ugualmente distanziate tra di loro.....</i>	<i>64</i>
<i>Fig.21 - Esempio di duty-cycle con modulazione τ sul periodo T.....</i>	<i>65</i>
<i>Fig.22 - Piattaforma hardware Arduino programmabile con microcontrollore controllore dalla ATMEL che nel nostro caso è costituito da un ATmega328.....</i>	<i>66</i>
<i>Fig.23 - Sistema di controllo costituito dalla Board Arduino REV 3 su cui è montato a castello sia il Motor Shield che il Relay Shield, dal Tank 3° HP, da 2 motori per le pompe, dagli switch di accensione, dai cavi di collegamento per l'elettrovalvole e dalle elettrovalvole.....</i>	<i>68</i>
<i>Fig. 24 - Schema a blocchi del sistema di controllo centrale.....</i>	<i>69</i>
<i>Fig. 25 - Rappresentazione della nuova geometria studiata per il dissipatore di calore.....</i>	<i>75</i>
<i>Fig. 26 - Cappa a flusso laminare del laboratorio BioCell.....</i>	<i>78</i>
<i>Fig.27 - Tessuto di controllo all'interno della Falcon durante il processo di decellularizzazione manuale...80</i>	<i>80</i>
<i>Fig. 28 - Tessuto dell'esperimento fissato agli afferraggi su telo sterile sotto cappa.....</i>	<i>81</i>
<i>Fig. 29 - Circuito idraulico durante il montaggio sotto cappa.....</i>	<i>81</i>
<i>Fig. 30 - Dimensioni dei provini analizzati.....</i>	<i>85</i>
<i>Fig. 31 - (a) Fotografia della macchina Synergie 200h e (b) schematizzazione degli afferraggi.....</i>	<i>85</i>
<i>Fig. 32 - Rappresentazione della configurazione iniziale del vaso nel set-up sperimentale.....</i>	<i>86</i>
<i>Fig.33 - Configurazione tramite la quale è stato calcolato l_0 (mm).....</i>	<i>87</i>
<i>Fig. 34 - Grafico dell'andamento sforzo-deformazione ottenuto ad ogni ciclo di prova.....</i>	<i>89</i>
<i>Fig. 35 - Grafico dell'andamento sforzo- deformazione ottenuto durante la prova a rottura.....</i>	<i>90</i>
<i>Fig.36 – Immagini istologiche ottenute attraverso la colorazione con EE e DAPI del tessuto nativo e dell'EXP.....</i>	<i>95</i>
<i>Fig.37 - Grafico dei risultati statistici dei valori della quantificazione del DNA per le prove 2 e 3 in cui sono evidenziati la mediana e i quartili (25% e 75%) rispetto al tessuto nativo.....</i>	<i>96</i>
<i>Fig.38- Grafico dei risultati statistici dei valori della compliance e della burst pressure calcolate nella prova 3 in cui sono evidenziati la mediana e i quartili (25% e 75%).....</i>	<i>98</i>
<i>Fig.39 - Grafico dei risultati statistici dei valori della quantificazione del DNA per le prove 2 e 3 in cui sono evidenziati la mediana e i quartili (25% e 75%).....</i>	<i>99</i>
<i>Fig.40 - Grafico dei risultati statistici dei valori della quantificazione del DNA per le prova 4 in cui sono evidenziati la mediana e i quartili (25% e 75%).....</i>	<i>100</i>
<i>Fig.41- Grafico dei risultati statistici dei valori della quantificazione del DNA per la prova 5 in cui sono evidenziati la mediana e i quartili (25% e 75%).....</i>	<i>100</i>

INDICE DELLE TABELLE

<i>Tab.1- Principali vantaggi e svantaggi delle protesi vascolari di origine biologica.....</i>	<i>4</i>
<i>Tab.2 - Principali vantaggi e svantaggi delle protesi vascolari di origine sintetica.....</i>	<i>5</i>
<i>Tab.3 - Principali agenti chimici, fisici e biologici utilizzati per la decellularizzazione dei tessuti biologici e gli effetti dimostrati che hanno su di essi.....</i>	<i>27</i>
<i>Tab.4 - Riassunto dei più diffusi protocolli di decellularizzazione e dei risultati ottenuti durante la loro sperimentazione.....</i>	<i>32</i>
<i>Tab.5 - Protocollo di Decellularizzazione utilizzato nel precedente lavoro di tesi.....</i>	<i>36</i>
<i>Tab.6 - Nuovo Protocollo di Decellularizzazione sviluppato in questo lavoro di tesi.....</i>	<i>38</i>
<i>Tab.7 - Principio di funzionamento del ricambio delle 3 sostanze presenti all'interno dei reservoir durante un generico protocollo di decellularizzazione.....</i>	<i>55</i>
<i>Tab.8 - Simulazione del processo in cui si è impostato 130 sec per il riempimento della camera, 10 sec per lo svuotamento della linea e 150 per quello della camera. Lo stand-by del sistema che simula l'azione della sostanza sul tessuto è stato realizzato con un tempo simbolico minimo per l'osservazione di 10 sec.....</i>	<i>74</i>
<i>Tab.9 - Valori calcolati per l_0 (mm).....</i>	<i>87</i>
<i>Tab.10 - Valori ottenuti dal test statistico per la quantificazione di DNA degli esperimenti EXP-2, EXP-3 e quelli del tessuto nativo.....</i>	<i>96</i>
<i>Tab.11 - Valori della mediana calcolati per la compliance e la burst pressure calcolati nella prova 3.....</i>	<i>97</i>
<i>Tab.12 – Valori ottenuti dal test statistico sui risultati delle prove meccaniche dell'EXP-3.....</i>	<i>98</i>

SOMMARIO

1- INTRODUZIONE

Gli scaffold decellularizzati sono tessuti biologici trattati con particolari agenti chimici, biologici e fisici in grado di eliminare la componente cellulare presente nel tessuto e produrre una struttura costituita dalla sola matrice extracellulare ECM, che rappresenta un supporto ideale alla crescita e alla proliferazione cellulare sia in funzione della sua struttura tridimensionale e sia in funzione delle caratteristiche meccaniche che possiede.

La necessità di realizzare questa tipologia di scaffold nasce dalle difficoltà che le tradizionali protesi incontrano nell'interazione con l'organismo biologico.

In questo lavoro di tesi è stato ottimizzato e sviluppato un dispositivo per la decellularizzazione automatica dei tessuti vascolari, già realizzato in un precedente lavoro di tesi, ed è stata verificata l'efficacia di un nuovo protocollo sperimentale in funzione dei suoi effetti sui tessuti trattati.

Le patologie legate al sistema cardiocircolatorio, in particolare la stenosi e l'aneurisma, sono tra le principali cause di morte nei paesi occidentali e secondo uno studio effettuato in America, l'incidenza di queste sulle morti, ha raggiunto il suo massimo storico.

L'apporto dell'ingegneria alla cura di queste patologie è la progettazione di protesi vascolari. Attualmente, esistono molte tipologie di protesi che possono essere sia di origine biologica che sintetica. In entrambi i casi però sono ancora numerose le problematiche che portano al fallimento dell'impianto o a reazioni indesiderate all'interno dell'organismo ospite.

In particolare, le protesi di origine biologica, soprattutto gli autograft, risultano avere degli ottimi effetti sul paziente per quanto riguarda l'integrazione con l'organismo in cui sono impiantate e le proprietà meccaniche che le caratterizzano. L'aspetto che ne limita l'utilizzo sono i problemi degenerativi riscontrati durante l'impianto e il mismatch dimensionale che è stato dimostrato essere spesso causa del fallimento della protesi stessa. Le protesi di origine sintetica sono delle strutture in grado di risolvere queste problematiche in considerazione della grande evoluzione dei materiali biocompatibili. Ad oggi, si ha un largo utilizzo di queste protesi per la sostituzione di vasi di grosso calibro in cui gli effetti trombogenici del materiale, se limitati, sono trascurabili. Questo non vale per

le protesi di piccolo calibro per cui l'uso di biomateriali è considerato ancora ad alto rischio di stenosi.

Oggi, l'alternativa all'utilizzo di queste protesi, è l'impianto di tessuti ingegnerizzati.

L'ingegneria dei tessuti è un campo interdisciplinare in cui si sfruttano le conoscenze di ingegneria e quelle delle scienze della vita, per creare sostituti biologici tramite la semina di cellule specifiche, differenziate e indifferenziate, su opportune strutture tridimensionali porose, definite scaffold, in grado di guidare l'adesione, la proliferazione e la crescita cellulare nello sviluppo del nuovo tessuto.

Sono stati progettati nel corso degli anni differenti tipologie di scaffold, di origine sintetica o biologica. L'uso di materiali sintetici permette la produzione di scaffold le cui caratteristiche meccaniche e superficiali possono essere facilmente adattabili alle necessità delle cellule che deve supportare e dell'organismo in cui deve essere impiantato. Il problema principale rimane la reazione infiammatoria da corpo estraneo che questa struttura induce a seguito dell'impianto. Gli scaffold di origine biologica non provocano questa reazione infiammatoria. In questo caso però, l'organismo biologico riconosce il differente patrimonio genetico attivando il sistema immunitario e causando il rigetto del costruito.

La realizzazione di scaffold decellularizzati potrebbe eliminare definitivamente i problemi dovuti alle reazioni che i materiali, sintetici o biologici, inducono all'interno dell'organismo umano. I tessuti decellularizzati sono infatti tessuti che subiscono un processo chimico-fisico in grado di rimuovere tutte le componenti cellulari creando una matrice acellulare biologica. Quando parliamo di matrice acellulare, intendiamo un materiale completamente privo di cellule e che quindi non può essere riconosciuto dal nostro organismo come un sistema estraneo. Uno dei principali compiti del sistema immunitario infatti è quello di attivare una serie di meccanismi per espellere un qualunque elemento riconosciuto come tale. Inoltre la decellularizzazione è una tecnica con la quale si ottiene una struttura costituita da matrice ECM. In questo modo, quindi, oltre a non provocare reazioni infiammatorie, presenta le stesse caratteristiche meccaniche del tessuto sostituito favorendo l'interazione con l'organismo stesso.

Attualmente, esistono differenti tessuti ingegnerizzati prodotti con la tecnica della decellularizzazione come la vescica, le valvole aortiche e polmonari, la trachea e anche i vasi sanguigni. Sono stati condotti molti studi sulla decellularizzazione dei vasi sanguigni

che hanno portato alla definizione di differenti protocolli basati sull'utilizzo e la combinazione di particolari agenti chimici, fisici e biologici.

Un protocollo di decellularizzazione può essere definito efficace solo se si dimostra capace di rimuovere completamente le cellule presenti sul tessuto senza modificare la struttura e la morfologia della matrice ECM causando la perdita delle proprietà meccaniche necessarie alla sua applicazione.

Per la realizzazione di un tessuto funzionale, quindi, è necessario definire protocolli che siano validati in tutti gli aspetti che lo caratterizzano sia in funzione dell'azione decellularizzante che di un'eventuale azione degradativa sul tessuto. L'uso di particolari agenti decellularizzanti dipende, oltre che dal tipo di tessuto, anche dalle sue caratteristiche quali spessore o densità, dal tipo di azione ed effetto che ognuno di questi agenti causa e dal fine ultimo per il quale il tessuto è stato decellularizzato.

Inoltre è importante che si stabiliscano i tempi, le temperature, i carichi e le modalità di svolgimento di tutte queste tecniche o comunque di quelle adottate per ottenere l'obiettivo prefissato.

Gli agenti comunemente impiegati nella decellularizzazione dei tessuti vascolari sono i seguenti: a) sodio dodecil solfato (SDS); b) sodio deossicolato (SC); c) Triton X-100; d) enzimi quali tripsina, endonucleasi. Molti gruppi di ricerca hanno, inoltre, ottenuto ottimi risultati attraverso la combinazione di questi detergenti.

In questo ambito, è stato svolto da Pellegata et al. uno studio per l'ottimizzazione di un protocollo di decellularizzazione per vasi arteriosi in grado di realizzare un costrutto costituito da matrice ECM ma che presenti, allo stesso tempo, proprietà meccaniche simili a quelle del tessuto nativo. Dall'analisi dei risultati ottenuti si sono tratte conclusioni importanti. In particolare, nei protocolli in cui è stato utilizzato il siero fetale bovino, si è ottenuta una maggiore efficacia del processo nei tessuti esposti al siero per una durata di 48 ore rispetto a quelli soggetti ad un'azione di sole 24 ore. Inoltre si è determinato che un protocollo così definito è sufficiente ad ottenere una decellularizzazione ottimale con un processo della durata di 3 o 4 giorni.

Alla luce di questi aspetti e considerando i risultati derivanti dai vari esperimenti di decellularizzazione presenti in letteratura si è deciso di validare un nuovo protocollo sperimentale:

AGENTE	AZIONE
- Acqua milliQ con aggiunta di soluzione antibiotica e antimicotica dell' 1%;	24 ore con ricambio ogni 2 ore;
- Sodio Deossalato (DCA)	24 ore con ricambio ogni 6 ore;
- Siero Fetale Bovino (FBS)	48 ore con ricambio ogni 6 ore;

Tab.1 - Nuovo Protocollo di Decellularizzazione sviluppato in questo lavoro di tesi

2- PROGETTAZIONE

Il primo obiettivo di questa tesi è stato ottimizzare il prototipo per la decellularizzazione automatica dei tessuti, realizzato nel precedente lavoro di tesi. Dall'attenta analisi delle caratteristiche del prototipo, si sono evidenziati infatti alcuni aspetti per i quali non si aveva un'effettiva corrispondenza tra le specifiche di progetto ed il reale funzionamento del dispositivo.

In particolare è stato sviluppato il circuito idraulico ed il sistema di controllo centrale al fine di correggere meccanismi inadeguati quali:

- ✓ Linea idraulica realizzata per il ricambio automatico di una sola sostanza;
- ✓ Cambio della sostanza all'interno del reservoir effettuato manualmente;
- ✓ Codice di controllo del sistema non versatile a differenti protocolli di decellularizzazione;

L'ottimizzazione del dispositivo è stata effettuata considerando la necessità di realizzare un sistema in grado di svolgere il processo di decellularizzazione in maniera totalmente automatica. L'automazione è un obiettivo fondamentale per l'ottenimento di tessuti acellulari sterili e per il rispetto di requisiti importanti quali la ripetibilità e la riproducibilità, come stabilito dalle norme Good Manufacturing Practice (GMP) per la realizzazione di un prodotto di ingegneria tissutale.

Il primo passo nello sviluppo del sistema è stato riprogettare il circuito idraulico per permettere il ricambio di differenti sostanze durante il processo, senza la necessità dell'intervento dell'operatore.

Il circuito è stato modificato attraverso opportune connessioni creando tre linee idrauliche convergenti nel tubo presente all'interno della pompa di riempimento. Questo ha permesso di realizzare una linea idraulica per ogni sostanza necessaria al protocollo senza riprogettare la parte del circuito che caratterizza il collegamento tra la pompa e la camera di decellularizzazione. In questo modo, oltre ad ottenere l'automazione completa per il ricambio di tre sostanze, si sono ridotti al minimo gli ingombri.

Dopo aver realizzato questo tipo di circuito, è stato necessario studiare una soluzione tecnologica in grado di assicurare il corretto funzionamento di queste linee. In particolare, per la completa automazione del dispositivo, è importante che il sistema non permetta il miscelamento della differenti sostanze all'interno del circuito stesso e che sia capace di operare in funzione della sostanza specifica e della quantità da prelevare, dei tempi di azione della sostanza e dei tempi di riempimento e svuotamento del circuito.

Per la gestione delle diverse linee idrauliche sono state utilizzate delle elettrovalvole. Nello specifico sono state utilizzate delle particolari valvole in cui l'organo di pinzaggio intercetta il fluido premendo o rilasciando il tubo dall'esterno senza quindi imporre un contatto diretto tra il liquido e la valvola, come comunemente avviene invece per le altre tipologie. Queste elettrovalvole, definite pinza-tubo, oltre ad essere facilmente controllabili tramite il sistema di controllo progettato, sono in grado di effettuare la regolazione del flusso all'interno di ogni linea, preservando il fluido da qualunque tipo di contaminazione.

L'uso delle elettrovalvole ha permesso l'occlusione delle linee non responsabili del prelievo della sostanza imposta dal protocollo ed inoltre, tramite l'introduzione di un'opportuna presa d'aria con filtro da 0.22 micron, si è potuto sviluppare un processo di svuotamento delle linee idrauliche durante l'azione della sostanza senza svuotare la camera di decellularizzazione.

Il sistema di controllo del dispositivo, costituito da una scheda elettronica Arduino UNO, ha permesso la gestione delle elettrovalvole tramite l'introduzione di una scheda aggiuntiva, Relay Shield, compatibile con la piattaforma Arduino.

L'apertura e la chiusura delle valvole, grazie a questa scheda, è determinata da segnali di tipo HIGH e LOW inviati dal sistema e che sono rispettivamente segnali che attivano o

disattivano l'azione della valvola. Le valvole, per un corretto fissaggio sono state montate in un'unità esterna a quella contenente il sistema centrale e che permette la facile disposizione del circuito idraulico.

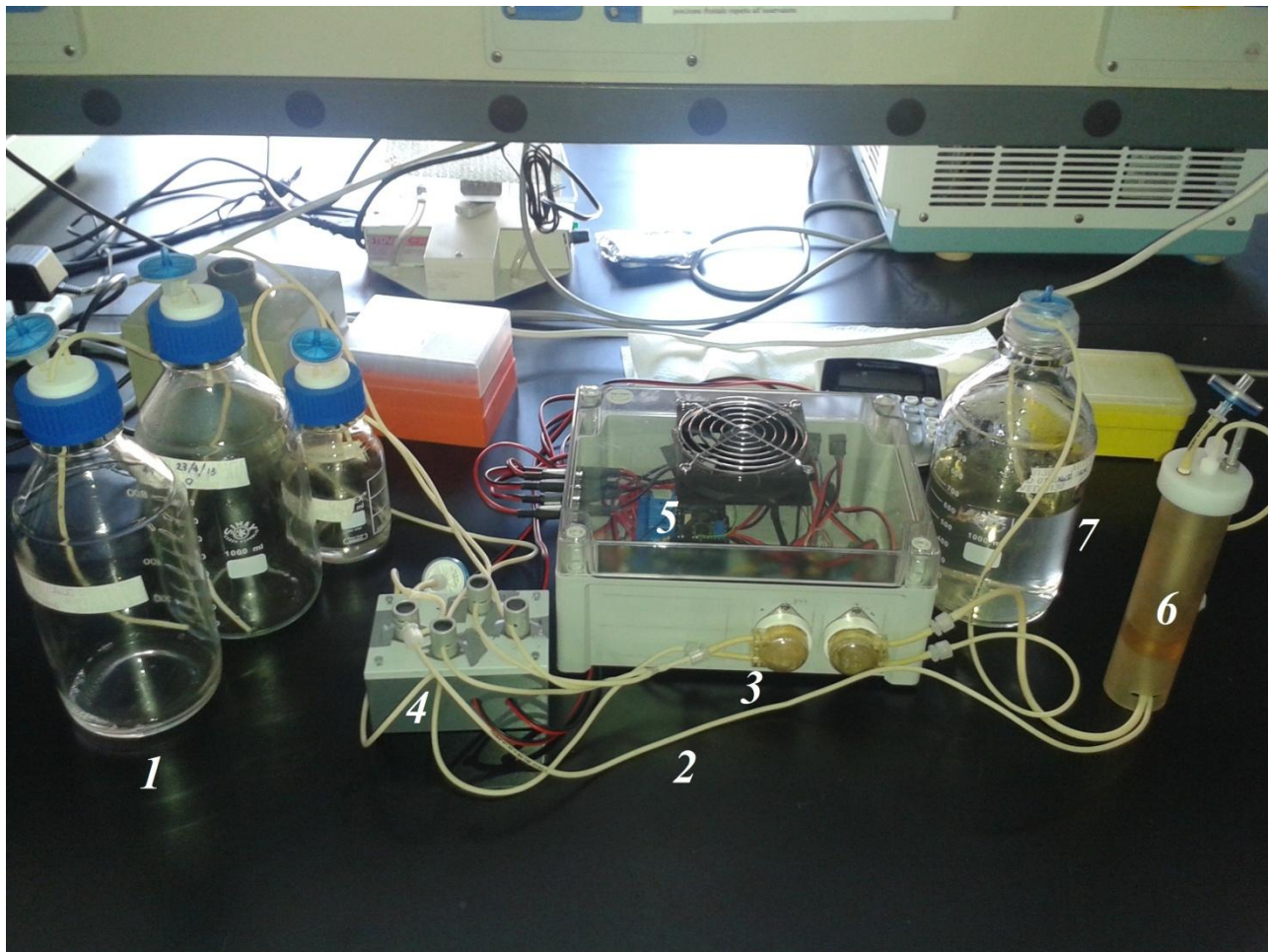


Fig.1 – Dispositivo per la decellularizzazione automatica costituito da 3 reservoir(1), un circuito idraulico a 3 linee per il riempimento della camera(6) e una linea per lo svuotamento nel waste(7), due pompe peristaltiche (3), le elettrovalvole per il controllo delle linee (4) e il sistema di controllo centrale(5).

Il sistema è stato riprogrammato attraverso l'implementazione di un nuovo codice di funzionamento per assicurare l'automazione di tutte le funzioni per cui è stato progettato e per una maggiore versatilità al possibile utilizzo di protocolli differenti.

In particolare, è stata definita una funzione che permette di modificare in modo semplice, intuitivo ed immediato i parametri principali che caratterizzano il protocollo di decellularizzazione quali il numero di sostanze agenti, il tempo necessario ad ogni specifica sostanza per il trattamento del tessuto e il range di temperature alle quali bisogna mantenere l'ambiente.

Infine sono state effettuate numerose prove di validazione del sistema su banco prova per determinare il corretto funzionamento del sistema di elettrovalvole, la reale capacità nel prelevare la sostanza specifica prevista dal protocollo, l'eventuale presenza di perdite nel circuito e per verificare i tempi di riempimento e svuotamento del sistema o delle componenti di interesse.

In questo modo è stato realizzato un sistema versatile e di semplice utilizzo che sia, in completa sterilità, capace di gestire:

- Apertura e chiusura delle elettrovalvole;
- Verso di rotazione delle pompe;
- Attivazione e disattivazione delle pompe;
- Sensore di temperatura;
- Attivazione e disattivazione della cella di Peltier
- Verso della corrente nella cella di Peltier;
- Interfaccia con l'utente.

3- MATERIALI E METODI

La fase sperimentale di questo lavoro di tesi è stata svolta all'interno del laboratorio biologico BioCell. In particolare sono state effettuate 4 prove di decellularizzazione dividendo in due ogni vaso da trattare e sottoponendo una delle due parti al processo manuale (CTRL) e l'altra (EXP) al trattamento con il dispositivo di decellularizzazione automatica.

Le caratteristiche e la composizione dei tessuti ottenuti da entrambe le tipologie di sperimentazione sono state in seguito analizzate tramite differenti tecniche:

- Immagini istologiche, tramite le quali si è potuto determinare in modo qualitativo l'efficacia del protocollo nella rimozione della componente cellulare e l'invasività nei confronti della struttura e morfologia della matrice;
- Quantificazione del DNA, processo chimico che ha permesso una misurazione quantitativa del contenuto di DNA all'interno dei tessuti decellularizzati;

- Test meccanici con cui è stato possibile verificare l'eventuale variazione di comportamento meccanico dei vasi trattati ed in particolare sono stati messi a confronto i valori calcolati per la compliance e la burst pressure del tessuto.

Dai dati ottenuti si sono potute trarre conclusioni importanti tramite il confronto tra le mediane di tali valori, con test statistici non parametrici quali il test di Mann-Whitney, utilizzando il software Graphpad Prism 6. Sono state considerate significative le differenze per cui si è verificato un p-value minore di 0.05.

4- RISULTATI

Per ottenere dei risultati che potessero portare a delle conclusioni importanti sono stati effettuati due tipi di confronti. In un caso sono stati analizzati i risultati relativi ai tessuti decellularizzati EXP e CTRL in relazione ai dati caratteristici del tessuto nativo (Native). Nell'altro caso sono stati invece confrontati i risultati ottenuti dalle prove fatte sul CTRL e quelli fatti sull'EXP in modo da poter valutare, oltre all'efficacia del protocollo, anche il funzionamento del dispositivo.

Le analisi istologiche effettuate sui tessuti decellularizzati e sul tessuto nativo hanno evidenziato come il protocollo utilizzato sia capace di rimuovere con un'alta percentuale i nuclei e i detriti nucleari preservando la struttura e la morfologia della matrice.

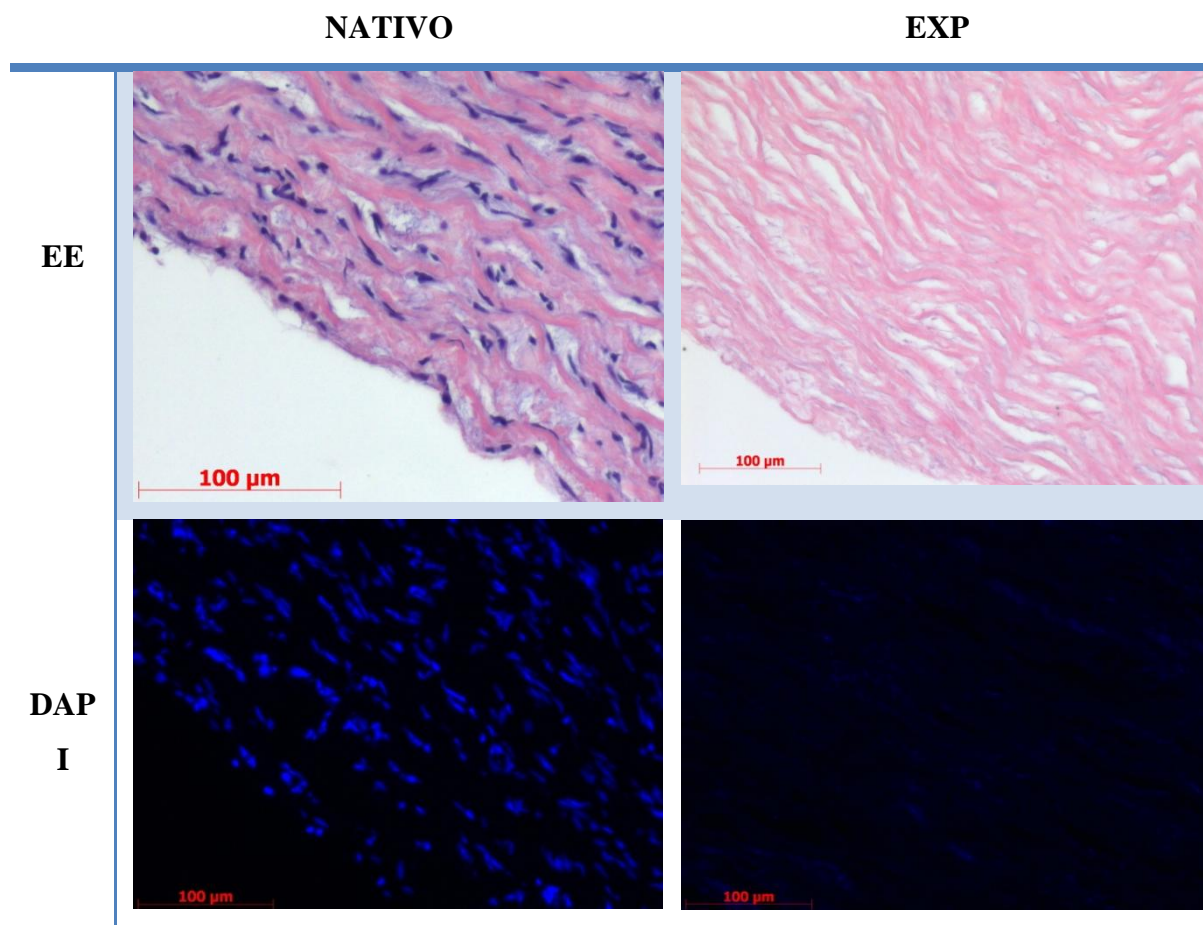


Fig.2 – Immagini istologiche ottenute attraverso la colorazione con EE e DAPI del tessuto nativo e dell'EXP

Questo aspetto è stato testimoniato anche dalle prove di quantificazione di DNA effettuate sul tessuto nativo e sull'EXP. Il valore della mediana calcolato per la quantità di DNA del tessuto decellularizzato infatti era molto minore rispetto a quello del Native e inoltre i test statistici hanno evidenziato differenze significative tra i due campioni.

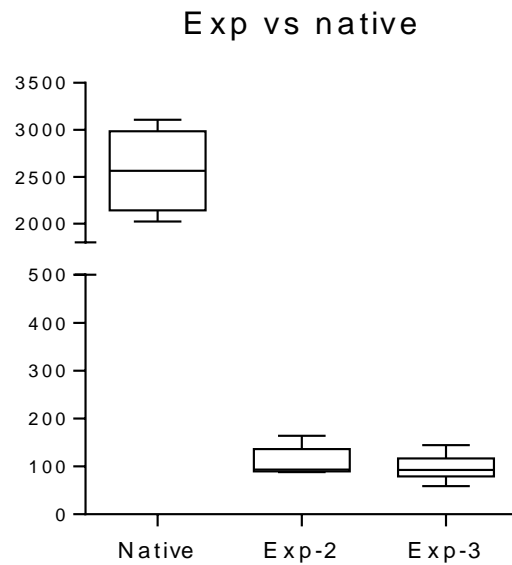


Fig.3 - Grafico dei risultati statistici dei valori della quantificazione del DNA per le prove 2 e 3 in cui sono evidenziati la mediana e i quartili (25% e 75%) rispetto al tessuto nativo

Allo stesso modo, dal confronto con i valori medi presenti in letteratura per i tessuti nativi, i test statistici e il confronto tra le medie dei valori ottenuti dalle prove meccaniche, hanno confermato caratteristiche molto simili per la compliance e la burst pressure del tessuto decellularizzato.

Gli stessi risultati sono stati ottenuti dal confronto della caratteristiche meccaniche del CTRL e quelle dell'EXP. in questo caso come in quello precedente infatti sia i valori della mediana che quelli dei quartili sono molto simili.

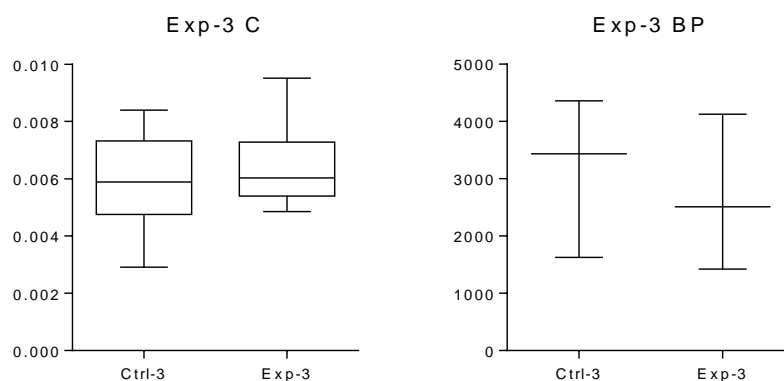


Fig.4- Grafico dei risultati statistici dei valori della compliance e della burst pressure calcolate nella prova 3 in cui sono evidenziati la mediana e i quartili (25% e 75%)

Si è riscontrata, invece, una differenza significativa tra i valori della quantità di DNA presente all'interno del CTRL rispetto a quella del tessuto decellularizzato in maniera automatica. In particolare, al contrario delle aspettative, l'EXP conteneva una quantità di DNA maggiore.

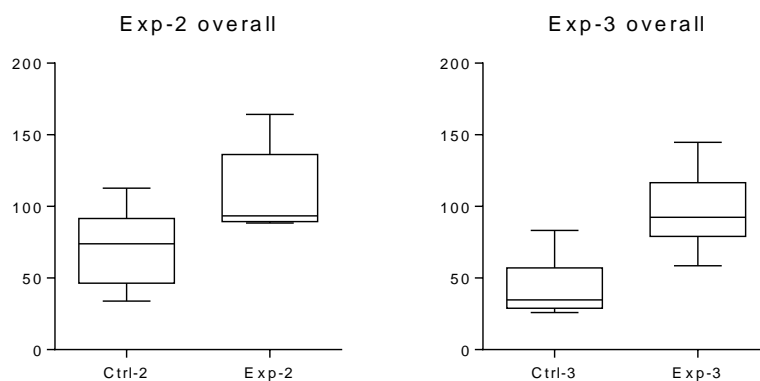


Fig.5 - Grafico dei risultati statistici dei valori della quantificazione del DNA per le prove 2 e 3 in cui sono evidenziati la mediana e i quartili (25% e 75%)

Al fine di confermare l'ipotesi che questo risultato fosse dovuto alla perdita di carico generata dall'afferraggio e responsabile di un effetto di limitazione dei fenomeni diffusivi, sono stati effettuati due ulteriori prove in cui si è usato in una un vaso di diametro maggiore e nell'altra è stato rimosso l'afferraggio distale lasciando libera una delle due estremità del vaso.

I risultati hanno dimostrato un effettivo decremento della quantità di DNA presente nel tessuto decellularizzato non evidenziando alcuna differenza significativa tra CTRL e EXP.

5- CONCLUSIONI

In conclusione di questo lavoro di tesi si può affermare che sia il dispositivo che il protocollo hanno dimostrato un'ottima efficacia nel trattamento del tessuto. La decellularizzazione dei vasi, infatti, si è dimostrata ottimale sia in funzione della rimozione della componente cellulare che nel preservare la struttura della matrice ECM.

Le prove di validazione hanno dimostrato l'effettiva automazione del processo sia nel ricambio della sostanza all'interno della camera di decellularizzazione sia nel pescaggio

della corretta sostanza prevista dal protocollo, senza evidenziare cedimenti delle connessioni o perdite da parte del circuito. Durante la fase sperimentale, invece, è stato possibile verificare l'effettiva versatilità e semplicità di utilizzo del sistema, requisiti che insieme alla riproducibilità, ripetibilità e sterilità, hanno confermato come il funzionamento del dispositivo avvenga nel rispetto delle norme di Good Manufacturing Practice (GMP) per un prodotto dell'ingegneria dei tessuti.

Considerando tutti questi aspetti e l'effettiva affidabilità del dispositivo si può affermare che il progetto realizzato in questo lavoro di tesi si è dimostrato un ottimo punto di partenza per la costruzione di un sistema multi-linea, adatto a future applicazioni cliniche.

I risultati delle analisi effettuate sui tessuti decellularizzati hanno evidenziato l'efficacia del protocollo di decellularizzazione nel confronto tra i vasi nativi e quelli trattati con il dispositivo. Le quantità di DNA e le caratteristiche di questi tessuti infatti possono essere considerate ottimali in relazione ai risultati visibili negli studi di decellularizzazione dei vasi sanguigni presenti in letteratura.

I test statistici condotti sui dati relativi ai tessuti decellularizzati, hanno evidenziato differenze significative tra la quantità di DNA presente nel CTRL e nell'EXP. Nello specifico, il test ha evidenziato una minore efficacia del protocollo nel trattamento dei tessuti con il dispositivo automatico. Da ulteriori prove, in cui questa differenza non si è verificata, si è potuto concludere che la limitazione del processo automatico potrebbe essere riferita ad un decremento degli effetti diffusivi all'interno del vaso generato dalla perdita di carico dovuta all'afferraggio distale.

A tal fine, è importante che venga effettuato un'ulteriore progettazione del dispositivo per ridurre o compensare questa perdita di carico. Si potrebbe rivedere il sistema di perfusione creando un flusso all'interno del vaso anche durante la fase di decellularizzazione in cui il sistema idraulico è statico. Sarebbe, inoltre, utile pensare di realizzare una camera di decellularizzazione disposable, aspetto fondamentale per l'utilizzo clinico del dispositivo come anche la progettazione di un sistema multi-linea in grado di decellularizzare un numero maggiore di tessuti contemporaneamente. Infine, è possibile migliorare ancora l'interfaccia utente attraverso la connessione del sistema di controllo ad un display LCD, grazie al quale sarebbero visibili tutti i parametri di impostazione del dispositivo e le informazioni necessarie durante il processo di decellularizzazione.

ABSTRACT

1 INTRODUCTION

Decellularized scaffolds are biological tissues treated with special chemical, biological and physical agents that remove the cellular component within the tissue leaving an intact structure That consist of the extracellular matrix (ECM) which represents the ideal support for the cell growth and proliferation, since its three-dimensional geometry and its mechanical properties.

The need for this type of scaffold arises from the difficulties encountered within the interaction of traditional implants and biological organisms.

In this thesis work, a device for the automatic decellularization of vascular tissues, developed previously, has been optimized and the efficacy of a new experimental protocol, in terms of its effects on treated tissues, has been tested.

Cardiovascular system related diseases, in particular stenosis and aneurysm, are among the leading causes of death in Western countries and according to a study carried out in the US, the estimated death rate, in the past years, reached its maximum.

The contribution of engineering to the treatment of these diseases is the design of vascular prostheses. Currently, there are many types of these prostheses that can be either of organic or synthetic origin. In both cases, however, there are still many problems that lead to failure of the implant such as unwanted graft-host reactions.

In particular, implants of biological origin, especially autografts, having ideal mechanical properties, tend to integrate with the hosting organism. The principal drawbacks, limiting their use and often leading to failure, are the degradation of the living tissue during the implantation and the dimensional mismatch with the patient's blood vessel. In the last decade, it has been shown that synthetic materials are a valid alternative to overcome the previously described problems. In fact, synthetic prostheses have been largely used to replace large caliber blood vessels in which the effects arising from a potentially thrombogenic material, if limited, are negligible. This does not apply to small-caliber implants for which the use of biomaterials leads to thrombogenesis and ultimately to the occlusion of the *lumen*. Today, the alternative to these prostheses is the implantation of engineered tissues.

Tissue engineering is an interdisciplinary field which exploits the knowledge of engineering and life sciences to create biological substitutes through the seeding of specific cells, differentiated and undifferentiated, appropriate three-dimensional porous structures referred as scaffolds that ultimately could drive the adhesion, proliferation and growth of cells resulting in a viable tissue.

The use of synthetic materials allows the fabrication of highly tunable scaffolds with appropriate mechanical and surface properties for the cells that they must support and the hosting organism. The main problem remains the inflammatory reaction that this structure induces following the implantation. On the other hand a biological scaffold will not cause this inflammation. In this case, however, the biological organism recognizes the different genetic origin, activating the immune system and causing the rejection of the construct.

The realization of decellularized scaffolds could overcome these problems related to the inflammatory reaction triggered by the synthetic or the organic material. In fact, decellularized tissues undergo a physical-chemical process that removes all cellular components by creating a biological acellular matrix defined as a material completely free of living cells and therefore not recognizable by the body as a foreign object. In addition, the resulting ECM structure has the same mechanical and physical features that foster the integration in the organism.

Currently, several tissue engineered grafts such as the bladder, the aortic and pulmonary valves, the trachea and the blood vessels have been obtained with the decellularization protocols. An effective decellularization protocol can be defined as such only if it completely removes the cellular component within the tissue without changing the structure and the morphology of the ECM.

It is thus necessary to validate the technique investigating both the decellularizing and the degradative effects. The choice of special decellularizing compounds depends, not only on the tissue's origin, but also on its density, thickness and the hosting organism. In addition, it is important to establish times, temperatures, loads and the methods of implementation of all the techniques used to achieve the desired result.

The agents commonly used in the decellularization of vascular tissues are the following: a) sodium dodecyl sulfate (SDS); b) sodium deoxycholate (SDC); c) Triton X-100; d) enzymes such as trypsin, endonuclease. Many research groups have also obtained excellent results through the combination of these detergents. For example Pellegata et al. in carried out a

study for the optimization of a decellularization protocol for arterial vessels and described how they realized a vessel made from ECM matrix with, at the same time, mechanical properties similar to those of the native tissue. Analyses of the results have led to important conclusions. In particular, these protocols in which the fetal bovine serum was used, 48 hours of exposure was more effective than 24 hours. Furthermore, it has been demonstrated that this protocol allows obtaining an optimal decellularization process in just 3 or 4 days. Taking together all the existing data and considering the common drawbacks of the protocols described in the existing literature, in this thesis a new experimental protocol has been validated:

AGENTE	AZIONE
- milliQ water with antibiotic and antimicotic (1%);	24 hours; every 2 hours replacement;
- Sodium deoxycholate (DCA)	24 hours; every 6 hours replacement;
- Fetal bovine serum (FBS)	48 hours; every 6 hours replacement;

Tab.1 - Decellularization protocol developed in this thesis.

2 - DESIGN

The first objective of this thesis was to optimize the first prototype of an automatic decellularization device developed previously. In particular the hydraulic circuit and the central control system have been developed in order to correct inadequate operational mechanisms such as:

- ✓ Hydraulic line for the automatic replacement of one compound;
- ✓ Manual change of the compound from the reservoir;
- ✓ Control code not versatile fo different decellularization protocols;

The optimization of the device was conducted by considering the need to provide a system capable of performing the process of decellularization in a completely automatic way. The automation is in fact, a key objective to achieve sterile and acellular tissues compliant with

important requirements defined by the Good Manufacturing Good Practice (GMP) for the construction of a tissue engineered construct.

The first developmental step of the system has been to redesign the hydraulic circuit in order to have a completely automatic loop. The circuit then has been modified through appropriate connections creating three hydraulic lines converging in the tube inside the filling pump. This solution results in a hydraulic line for each substance used in the protocol. Moreover, after achieving the complete automation of the replacement process of the three substances, the overall dimensions have been reduced to their minimum. In addition it has been necessary to study a technology solution capable of ensuring the correct functioning of these lines. In particular, for the complete automation of the device, it is important that the system does not allow the mixing of different substances within the circuit and that it is capable of operating depending on the specific type of substance, its amount, its time of action and the time of filling and emptying the circuit.

Electric valves have been used to control the different hydraulic lines. Briefly, particular valves have been used in which a gripping part intercepts the fluid by pressing or releasing the tube from the outside without a direct contact between the liquid and the valve as commonly happens instead for the other types. These electric valves, defined as tube-gripping, in addition of being easily controlled through the custom designed control system, are able to make flow adjustments for each line, preserving the fluid from any type of contamination.

The use of electric valves not only allows the occlusion of the lines not dedicated for the removal of the substance defined by the protocol but, through the introduction of an appropriate air inlet filter (0.22 micron), it permits to empty the hydraulic lines during the action of the substance without emptying the chamber of decellularization.

The control system of the device, consisting of an electronic card (Arduino UNO), allows the communication with the valves by means of an additional piece of circuitry: a relay shield.

Thanks to this solution the opening and closing of the valves, is determined by typing the command HIGH or LOW into the system and that are respectively signals that enable or disable the action of the valve. Finally, the valves were mounted in an external enclosure containing the central system which allows an easy disposal of the hydraulic circuit.

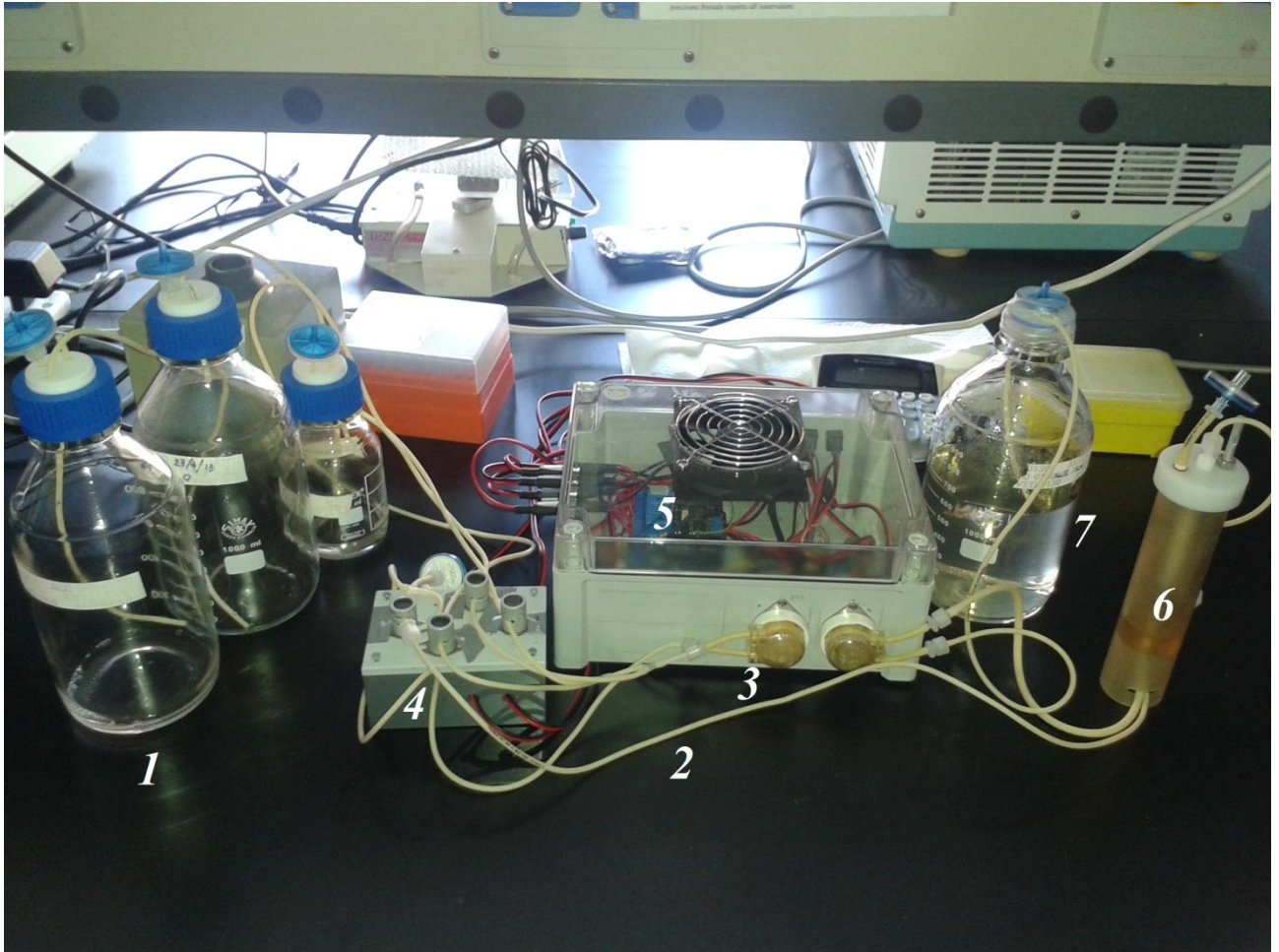


Fig.1 – Device for the automatic decellularization consists of 3 reservoir (1), a hydraulic circuit to 3 lines for filling the chamber (6) and a line for emptying the waste (7), two peristaltic pumps (3), the solenoid valves for the control lines (4) and the central control system (5)

The system has been reprogrammed through the implementation of a new operating code ensuring the automation of all functions for which it was designed for its versatility and the possible use of different protocols.

In particular, it has been defined a function that allows modifying in a simple, intuitive and immediate way the main parameters that characterize the decellularization protocol such as the number of substances, the time required for each specific substance and the range of temperatures at which they must maintain the environment.

Finally, numerous tests have been carried out for the validation of the system to determine the correct operation of the valves, the presence of leaking and to verify the time of filling and emptying of the system.

Thus a versatile, sterile and easy to use system has been developed, capable of handling:

- Opening and closing of the valves;
- Rotation control of the pumps;
- Activation and deactivation of the pumps;
- Temperature sensors;
- Activation and deactivation of the Peltier cell;
- Current direction in the Peltier cell;
- User interface.

3 MATERIAL AND METHODS

The experimental part of this thesis was carried out in the biological laboratory BioCell. In particular, 4 decellularization tests were performed dividing into two each vessel and by applying to one of the two halves to the manual process (CTRL) and the other half (EXP) to the treatment with the automatic device.

The characteristics and the composition of both control and sample were analyzed with different techniques:

- Histological analysis, that made it possible to determine in a qualitative way the removal efficacy of the protocol and the invasiveness on the structure and the morphology of the matrix;
- Quantification of DNA, the chemical process that allowed a quantitative measurement of DNA content in the tissues;
- Mechanical testing with which it was possible to check for any change in the mechanical behavior of the treated vessels and in particular were compared to the values calculated for the compliance and burst pressure of the tissue.

From the obtained data, important conclusions could be drawn by comparing the medians of these values, with a non-parametric statistical test such as the Mann-Whitney test, using the software Graphpad Prism 6. Were considered significant differences for which there was a p-value less than 0.05.

4 RESULTS

In order to obtain results that could lead to significant conclusions two types of comparisons were made. In the first case, the results were analyzed for decellularized tissues EXP and CTRL in relation with the characteristics of the native tissue (Native). In the second case instead, the results obtained from the tests made on the CTRL and those made on the EXP were analyzed in order to evaluate, in addition to the effectiveness of the protocol, also the functioning of the device. The histological analysis performed on the decellularized tissues and on the native tissue has shown how the protocol used is capable of removing, with a high percentage, the cell nuclei and nuclear debris while preserving the structure and morphology of the matrix. This result was also confirmed by DNA quantification of the native tissue and the EXP group. The average value of the amount of DNA of the decellularized tissue in fact was much lower than that of the Native and also statistical tests showed significant differences between the two groups.

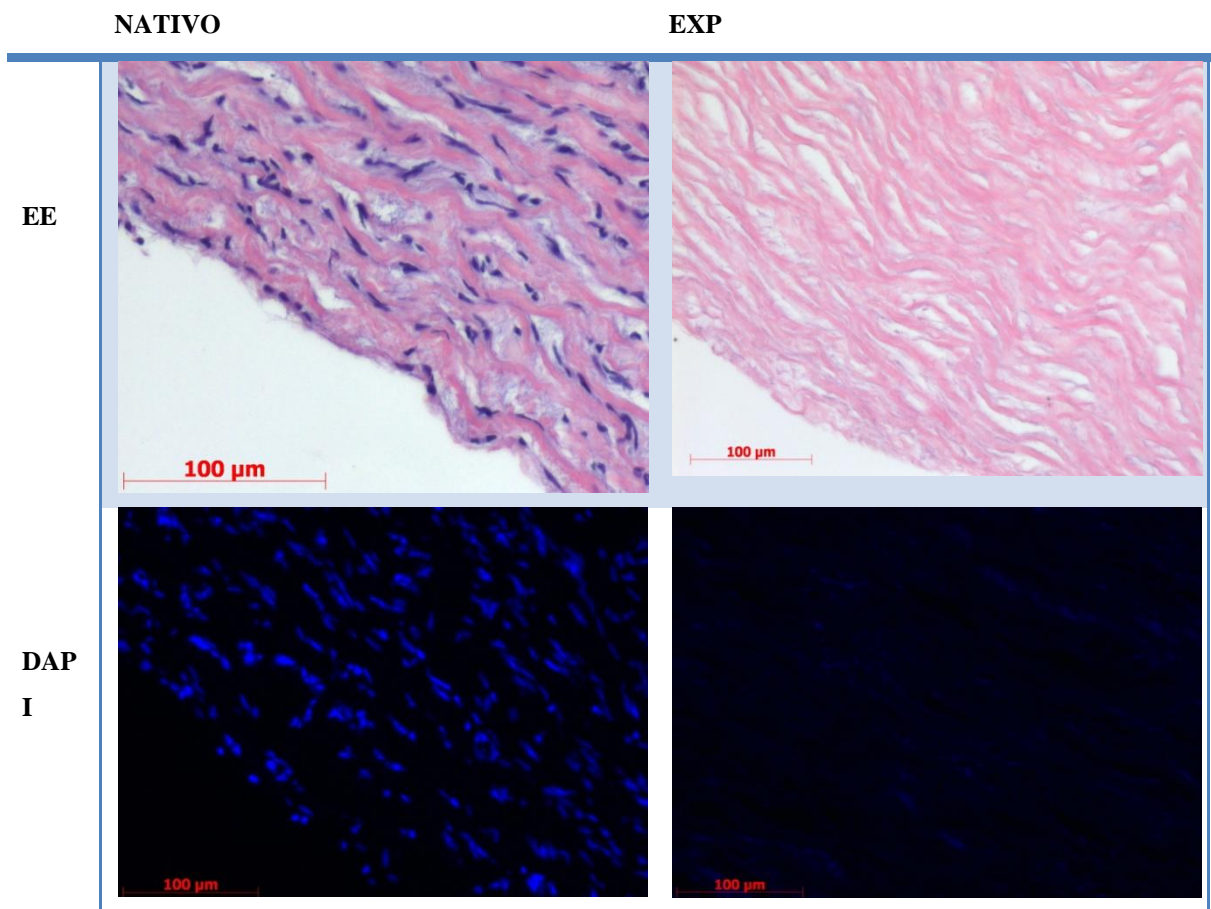


Fig.2 – Histological photos obtained by staining with DAPI and EE

Similarly, from a comparison with the average values reported in the literature for native tissues, statistical tests and the comparison between the averages of the values obtained by the mechanical tests, have confirmed very similar characteristics for compliance and burst pressure of the decellularized tissue.

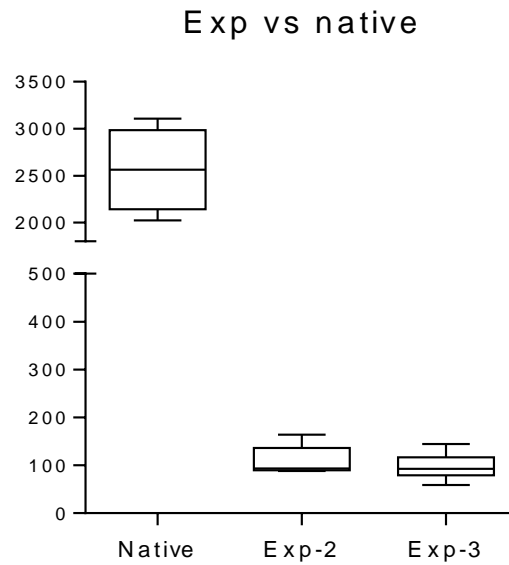


Fig.3 - Graph of the statistical results of the values of the quantification of DNA for tests 2 and 3 which are highlighted the median and quartiles (25% and 75%) compared to native tissue

The same results were obtained from the comparison of the mechanical characteristics of the CTRL and those of the EXP. In this case as in the previous one in fact both the median values and quartiles are very similar.

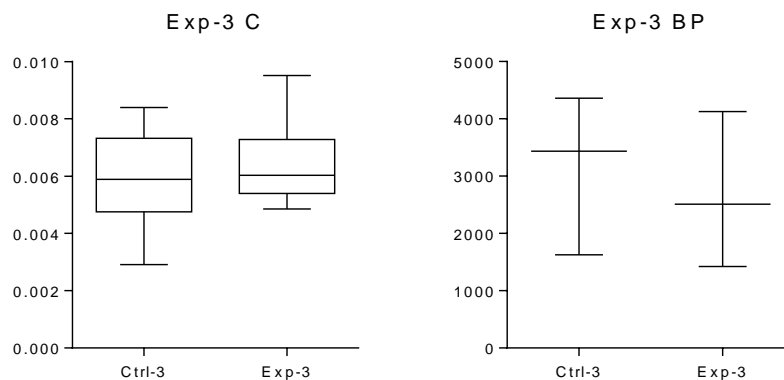


Fig.4- Graph of the statistical results of the values of compliance and burst pressure measured in the test 3, which highlighted the median and quartiles (25% and 75%)

It was found, however, a significant difference between the values of the amount of DNA present within the CTRL compared to that of the automatically decellularized tissue. In particular, the EXP contained a greater amount of DNA.

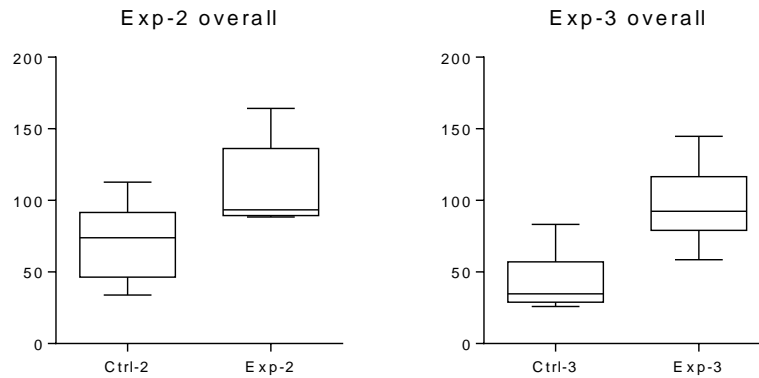


Fig.5 - Graph of the statistical results of the values of the quantification of DNA for tests 2 and 3 which are highlighted the median and quartiles (25% and 75%)

In order to confirm the hypothesis that this result was due to the limited diffusion caused by the friction loss of the distal holding, two additional tests were carried out. In the first one a vessel of a larger diameter was used and in the second, one of the two ends of the vessel has been freed by distal gripping.

The results have showed an effective decrease of the amount of DNA present in the decellularized tissue showing no significant difference between CTRL and EXP.

5 CONCLUSIONS

In conclusion of this thesis it can be stated that both the device and the protocol showed excellent efficacy in the treatment of the tissue. The decellularization of the vessels, in fact, has proved to be optimal according to the removal of the cellular component and in the preservation of the ECM structure.

Validation tests have demonstrated the effective automation of the process, both in replacement of the substance within the chamber of decellularization and in suction of the correct substance expected by the protocol, without highlighting failures or loss of connections by the circuit. During the experimental phase, instead, it was possible to verify

the actual versatility and ease of use of the system that may already be a good basis for a multi-line system to be used in clinical applications.

The results of the analysis carried out on tissues have shown the effectiveness of the decellularization protocol comparing the native vessels and those treated with the device. The amount of DNA and the characteristics of these tissues in fact can be considered optimal in relation to the results seen in studies found in the literature.

Statistical tests conducted on the tissues, showed significant differences between the amount of DNA present in the CTRL and in the EXP group. Specifically, the test showed a lesser efficacy of the protocol in the treatment of the tissues with the automatic device. From further tests, in which this difference has not occurred, it could be concluded that the limitation of the automatic process could be related to a decrease of diffusive effects within the vessel generated by the loss of load due to distal gripping.

Capitolo 1:

INTRODUZIONE

1. L'ingegneria per le Patologie Vascolari

Le patologie del sistema cardiovascolare, soprattutto l'aneurisma e la stenosi, rappresentano una delle principali cause di decesso nei paesi occidentali. Negli ultimi anni, lo studio sulle possibili cure si è intensificato a causa dell'insorgenza sempre più frequente di queste malattie. Negli Stati Uniti, secondo uno studio dell'American Heart Association [1] la diffusione di patologie cardiovascolari ha raggiunto il suo massimo storico. La ricerca ha dimostrato che le persone affette da queste problematiche superano gli 81,1 milioni di persone ogni anno.

Per più di 40 anni sono stati oggetto d'indagine molteplici materiali per la realizzazione di protesi in grado di ripristinare la funzionalità del tratto vascolare. Le protesi artificiali sono state introdotte in chirurgia cardiovascolare nel 1952 quando Hufnagel effettuò il primo impianto di una valvola cardiaca artificiale, e nello stesso anno, Voorhees introdusse la prima protesi vascolare [2].

Le protesi progettate, fino ad oggi, hanno visto lo sviluppo di differenti soluzioni ricostruttive con l'obiettivo di incrementare la biocompatibilità dell'impianto, sia con l'utilizzo di materiali di origine biologica che di origine sintetica. Tuttavia, nonostante i significativi progressi nella tecnologia di queste protesi, l'esperienza clinica ha rivelato la necessità di ulteriori sviluppi delle protesi per il sistema cardiovascolare. Le cause di fallimento di questo tipo di protesi sono ancora molteplici e riguardano l'antigenicità, il rigetto, le infezioni, la perdita delle proprietà meccaniche, le difficoltà relative alla scarsa disponibilità o la difficoltà di reperimento delle protesi biologiche.

I requisiti fondamentali che devono caratterizzare una protesi vascolare sono:

- avere una durata maggiore dell'aspettativa di vita del paziente;
- l'impianto non deve creare reazioni che il paziente non riesce a contrastare.

Le protesi vascolari sono definite protesi di piccolo calibro se il diametro interno è minore di 6mm e protesi di medio-grosso calibro se il diametro interno è maggiore di 6-7 mm.

La progettazione di protesi di piccolo calibro è la più complessa perché le dimensioni ridotte impongono due caratteristiche fondamentali per la protesi:

- deve avere una superficie liscia che riduca al massimo l'attrito e quindi la trombogenicità. Questo aspetto è legato al fatto che una resistenza frizionale del vaso provocherebbe degli sforzi di taglio nel flusso ematico che possono indurre

un'alterazione e quindi un disturbo del flusso. Questo disturbo a sua volta potrebbe essere causa di aggregazione piastrinica e trombosi poiché lo strato limite del flusso a contatto con la parete è proporzionalmente molto spesso e quindi i disturbi sarebbero amplificati. Un'aggregazione piastrinica in un lume così piccolo porterebbe ad una stenosi completa.

- caratteristiche meccaniche molto simili al tessuto nativo per una corretta trasmissione del flusso pulsatile. I materiali usati devono essere caratterizzati dalla stessa elasticità e compliance del vaso naturale.

I tipi di protesi principalmente usate in questo caso sono gli autograft e gli allograft:

- gli autograft sono vene e arterie ricavate da un tessuto sano dello stesso paziente:
 - o la vena safena usata per bypass arteriosi di diametro minore di 6mm, comprese arterie distali e coronariche. Questa soluzione, essendo caratterizzata dallo stesso materiale biologico del tessuto sostituito, ha il grande vantaggio di promuovere il lining di cellule endoteliali, ha proprietà meccaniche molto simili e non favorisce la colonizzazione batterica. Il più grande svantaggio rimane il sito reperibilità'.
 - o le arterie autologhe si sono verificate ottime per bypass di arterie cardiache e quelle distali. Hanno eccellenti proprietà di healing a lungo termine, ottima flessibilità', vitalità' e stabilità'. Il loro utilizzo è limitato dalle dimensioni non adeguate che portano spesso al fallimento della a livello dell'anastomosi.
- gli allograft sono, invece, tessuti prelevati da un paziente donatore e possono essere sia venosi che arteriosi:
 - o gli allograft arteriosi sono stati i primi usati per protesi vascolari. In genere, vengono recuperati dai tessuti di un cadavere e, successivamente, crioconservati. I risultati sul loro utilizzo sono stati molto discordanti per i fenomeni degenerativi a cui vanno incontro.
 - o gli allograft venosi sono usati principalmente per la riparazione di arterie periferiche, bypass aorto-coronarici e come accesso ematico secondario durante l'emodialisi.

I risultati della loro applicazione sono controversi. Il metodo di conservazione della vena influisce spesso sulla pervietà a lungo termine e presentano evidenti problemi di rigetto anche in seguito a crioconservazione.

Il principale problema di questi graft è in ogni caso l'imprevedibilità delle loro proprietà fisiche e meccaniche.

- Tra gli allograft si possono menzionare anche protesi ricavate da tessuti di un'altra specie, definiti xenograft, ma che hanno prodotto risultati insoddisfacenti sia per quanto riguarda i problemi di biocompatibilità che per incongruenza di dimensioni e proprietà meccaniche.

ORIGINE BIOLOGICA

	AUTOGRAFT		OMOGRAFT/ ETEROGRAFT
	ARTERIOSI	VENOSI	ARTERIOSI-VENOSI
VANTAGGI	<ul style="list-style-type: none"> - Congruenza di diametro; - Buone proprietà meccaniche; 	<ul style="list-style-type: none"> - Affidabilità e versatilità; - Relativa disponibilità; 	<ul style="list-style-type: none"> - Alta disponibilità; - Resistenza alle infezioni;
SVANTAGGI	<ul style="list-style-type: none"> - Bassa disponibilità; - Vasospasmo; - Danneggiamento sito donatore; 	<ul style="list-style-type: none"> - Bassa disponibilità; - Difficile prelievo; 	<ul style="list-style-type: none"> - Rigetto cronico; - Alta probabilità di occlusione; - Perdita delle proprietà meccaniche; - Antigenicità;

Tab.1 - Principali vantaggi e svantaggi delle protesi vascolari di origine biologica

Le protesi vascolari di grosso calibro hanno limitazioni minori soprattutto per quanto riguarda i fenomeni trombotici. Nei vasi di grosso calibro infatti la velocità del flusso ematico è molto elevata e lo strato di fluido a contatto con la parete è, in proporzione, molto sottile per cui in questi vasi la formazione trombotica è meno gravosa.

I principali materiali utilizzati per le protesi vascolari di grosso calibro sono:

- Dacron® (polietilentereftalato) è il polimero più utilizzato per la sostituzione di arterie periferiche di medio-grosso calibro. L'uso del Dacron® ha portato a produrre protesi con affidabilità di circa 15-20 anni e una percentuale di successo del 90%. Nonostante le differenti tecnologie di lavorazione però non si possono ancora produrre protesi di diametro inferiore agli 8 mm per la facilità con cui questo materiale può provocare trombi.

Il Dacron ® è un materiale che può essere prodotto secondo diverse lavorazioni:

- woven, tessuto intrecciato regolare, ha una bassa porosità e quindi alta rigidità e ciò porta al cedimento a livello dell'anastomosi;
 - knitted-warp, lavorazione in senso longitudinale, presenta un'alta densità e alta capacità di non sfilacciarsi;
 - knitted weft lavorazione in senso radiale, è meno denso e più estensibile del warp ma prevede pre-coagulazione.
- PTFE (politetrafluoroetilene) può essere in due forme:
- Goretex®, forma espansa del PTFE che è il più usato per la sostituzione di protesi di medio calibro tra i 6-7 mm. È molto usato per gli ottimi risultati nella pervietà a lungo termine e biostabilità. Viene prodotto con un rivestimento esterno che migliora la meccanica ma diminuisce la permeabilità. Presenta però diversi svantaggi quali la scarsa compliance, assenza di lining endoteliale, trombogenicità in caso di scarso flusso.
 - teflon in forma tessuta, non ha dato risultati in forma woven in cui non si registra formazione di neointima, al contrario, il teflon warp-knitted presenta grande stabilità e resistenza allo sfilacciamento.

ORIGINE SINTETICA

	PET Dacron®		PTFE	
	Knitted	Woven	Teflon®	Goretex®
VANTAGGI	-Alta porosità; -Maggiore distensibilità radiale; -Promuove crescita di nuovo tessuto;	-Alta stabilità; -Bassa permeabilità; -Pochi casi di emorragia;	-Buona bistabilità; -Comportamento meccanico adeguato; -Resistente allo sfilacciamento;	-Ottima biostabilità; -Buona biomeccanica;
SVANTAGGI	-Eccessiva dilatazione; -Rischio di infezione	-Scarsa compliance; -Difficile integrazione con il tessuto; -Non poroso; -Rischio di infezioni;	-Bassa formazione di neointima; -Formazione di stroma;	- Scarsa compliance; - Baso lining cellulare;

Tab.2 - Principali vantaggi e svantaggi delle protesi vascolari di origine sintetica

La nuova frontiera le cui potenzialità potrebbero risolvere la maggior parte delle problematiche relative alle protesi vascolari è l'ingegneria dei tessuti. Questa disciplina si occupa della crescita in vitro di strutture biocompatibili caratterizzate da adeguate proprietà meccaniche e con un potenziale di crescita proprio dei vasi naturali. La

realizzazione di questi sostituti biologici è possibile tramite processi di coltura cellulare che permettono, grazie ad opportuni supporti, la formazione di nuovo tessuto biologico.

2. Anatomia e Fisiologia del Vaso

I vasi sanguigni sono organi cavi la cui funzione principale è quella di trasportare il sangue all'interno del nostro organismo per permettere il corretto scambio di gas e altri nutrienti necessari al sostentamento delle cellule, le quali costituiscono i tessuti del corpo umano.

Il sangue scorre all'interno dei vasi grazie all'azione di pompa del cuore. In particolare, i vasi si distinguono in vene e arterie, che portano il sangue dal cuore ai tessuti e viceversa. Esiste un'ulteriore tipologia di vasi, i capillari che rappresentano il condotto di giunzione tra una terminazione venosa ed una arteriosa.

In particolare si definiscono:

- Arterie, i vasi che portano il sangue dal cuore al resto dell'organismo;
- Vene, i vasi che portano il sangue dai tessuti periferici al cuore;
- Capillari, piccoli vasi che permettono gli scambi di gas e nutrienti, tra il sangue e i vari tessuti.

Questa loro caratteristica implica determinate funzioni e di conseguenza anche diverse caratteristiche anatomiche che mettono in evidenza un altro aspetto di differenziazione, la dimensione nominale. Infatti, il diametro medio di un'arteria è di 25-50 mm, quello di una vena varia dai 2 ai 9 mm fino ad arrivare ai 25 mm per quelle di più grande calibro, mentre i capillari sono caratterizzati da dimensioni che variano tra i 5 e i 10 μm .

In genere, però, sia le vene che le arterie hanno in comune il fatto di essere formate da 3 strati concentrici che sono rispettivamente dall'esterno:

- tonaca avventizia, lo strato più esterno composto prevalentemente da tessuto connettivo e fibroblasti;
- tonaca media, che caratterizza strutturalmente e funzionalmente il vaso ed è costituita da tessuto connettivo elastico e, per le arterie, da cellule muscolari lisce;
- tonaca intima, la parete interna costituita da un singolo strato di cellule endoteliali che sono a contatto con il sangue e da un sottile strato subendoteliale contenente fibre di collagene.

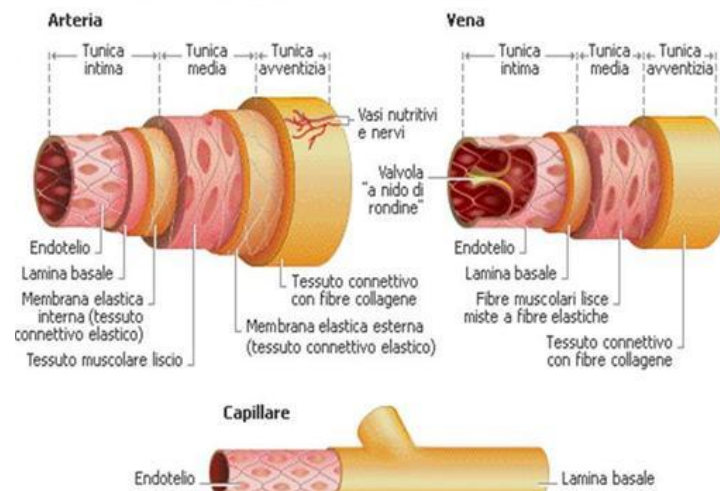


Fig.1 - Rappresentazione schematica degli strati che costituiscono le arterie, le vene e i capillari.

Le principali caratteristiche meccaniche dei singoli componenti sono:

- l'elastina ha basso modulo elastico, comportamento lineare, bassa isteresi e basso rilassamento;
- il collagene ha una risposta elevata a piccoli incrementi di sollecitazione, un comportamento non lineare, moderata isteresi e moderato rilassamento;
- il muscolo liscio ha bassa risposta alle sollecitazioni, un loop isteretico molto elevato in condizioni di carico ciclico ed una caratteristica di rilassamento che tende a zero se il tempo è sufficientemente elevato.

La conoscenza della composizione di un vaso sanguigno è importante perché ogni singolo vaso è caratterizzato da proprietà meccaniche dipendenti dalla specifica proporzione, in termini di quantità, presente tra tessuto connettivo elastico e cellule muscolari lisce, in particolare, nella tonaca media. Oltre a questo, è importante notare la varietà di tipi cellulari presenti in ogni tonaca. Questi due aspetti infatti ci danno la consapevolezza di quanto sia difficile realizzare una protesi artificiale per la sostituzione di un vaso con le opportune caratteristiche meccaniche e soprattutto la difficoltà nel renderlo biocompatibile a contatto con i tessuti biologici.

In generale, la matrice che costituisce i vasi è comparabile, in funzione delle sue caratteristiche meccaniche, ad un tessuto molle e quindi il suo comportamento non segue la

Legge di Hooke. Ciò significa, che la relazione sforzo-deformazione ha un andamento non lineare.

Le arterie, soprattutto quelle di grande diametro, sono costituite da una quantità di tessuto elastico relativamente grande dovuto ad uno strato medio molto spesso, responsabile del mantenimento della pressione sanguigna e della continuità del flusso. Questi vasi, subiscono uno stiramento durante la sistole mentre si ritraggono in diastole imprimendo una forza di compressione sul sangue. Uno dei compiti dell'arteria è quello di agire come un accumulatore di sangue in sistole e di espellerlo nella successiva fase di diastole smorzando la pulsatilità del flusso creato dal cuore.

Questo effetto di rimbalzo elastico presente nel comportamento delle arterie crea inoltre una spinta nei confronti del sangue favorendone il movimento. Un altro elemento di regolazione del flusso sanguigno è la compressione generata dalle vene, dovuta in realtà al movimento dei muscoli scheletrici. In particolare, il flusso all'interno delle vene che si trovano ad un livello superiore a quello del cuore è generato dalla forza di gravità mentre per quelle che si trovano sotto l'altezza del cuore, il ritorno venoso si sviluppa contro gravità.

La forza che spinge il sangue dalle regioni inferiori fino al cuore è appunto la compressione che agisce sulle vene, legata alla contrazioni dei muscoli.

Le vene possiedono una quantità di tessuto elastico e muscolare inferiore a quello delle arterie, ma sono costituite da strati più sottili che permettono una sezione più ampia per il passaggio del sangue, in questo modo viene minimizzata la resistenza al flusso. All'interno delle vene il flusso è lento e la pressione del sangue è minore rispetto a quella presente nelle arterie. Questi vasi possiedono importanti caratteristiche di compliance che permettono di accumulare determinate quantità di sangue, agendo da riserva di sangue per l'intero sistema.

Lo strato endoteliale che costituisce tutte le tipologie di vaso, riveste invece molteplici ruoli. Innanzitutto, costituisce una barriera selettiva e controlla l'attivazione, l'adesione e la conseguente aggregazione delle piastrine. Le cellule che costituiscono questo strato inoltre hanno una specifica sensibilità alle variazioni di pressione presenti all'interno del vaso che consente all'endotelio di adattare le proprie funzioni alle esigenze del sistema.

Le cellule muscolari lisce, infine, che costituiscono il tessuto muscolare dei vasi sono in grado di promuovere la formazione di neointima nell'eventualità di un danno al tessuto. Il

tessuto muscolare ha la capacità inoltre di secernere fibre di collagene, quelle elastiche e i proteoglicani responsabili del mantenimento dell'elasticità e della compliance del vaso.

Risulta evidente come la parete che costituisce i vasi sanguigni sia un tessuto connettivo dalla particolare struttura complessa e diversificata in funzione delle specifiche caratteristiche anatomiche e fisiologiche richieste.

3. L'Ingegneria dei Tessuti

L'ingegneria tissutale è un campo interdisciplinare in cui si uniscono conoscenze di ingegneria a quelle delle scienze della vita, per creare sostituti biologici che consentono di migliorare, di riparare o di curare tessuti patologici di un organismo vivente (ad esempio, nelle ossa, cartilagini, vasi sanguigni, vescica, ecc.).

La strategia di base è quella di isolare le cellule da una sorgente nativa ed espanderle in vitro, al fine di disporre di numerose cellule che possono essere successivamente seminate su un scaffold poroso di forma e architettura definita.

L'obiettivo di questa scienza è infatti sfruttare dispositivi chiamati bioreattori in grado di riprodurre le condizioni ambientali necessarie a determinati processi biologici, in particolare la coltura cellulare, monitorando costantemente i principali aspetti del processo.

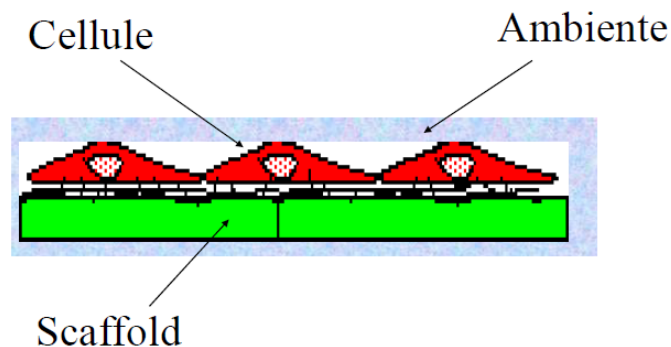


Fig.2 - Sistema costituito dai 3 elementi fondamentali dell'Ingegneria dei Tessuti

Per la realizzazione di un tessuto funzionale tramite questa tecnica sono necessari tre elementi: bioreattore, cellule e scaffold.

I bioreattori infatti rappresentano un potente strumento tecnologico per supportare e dirigere la crescita in vitro di tessuti viventi funzionali ma anche un sistema per la coltura dinamica e lo studio di meccanismi dello sviluppo cellulare in particolari condizioni fisiologiche [3].

Questi dispositivi sono responsabili del controllo delle condizioni dell'ambiente di coltura e, quindi, della concentrazione dei nutrienti e dei prodotti di scarto durante il processo, per questo hanno funzioni sia nel mantenere adeguati trasporti di massa nel costruito seminato sia nel condizionamento fisico del tessuto in sviluppo. Il livello di controllo,

riproducibilità, e automazione di un sistema come il bioreattore è essenziale per produrre tessuti nel rispetto di regole specifiche e criteri che riguardano l'efficacia, sicurezza e qualità di quest'ultimo, senza dimenticare la sostenibilità economica.

Per ottenere un buon tessuto ingegnerizzato è necessario ottimizzare l'interazione tra i tre elementi di base e cioè le cellule da sviluppare, lo scaffold, sintetico o biologico, su cui effettuare la semina e un ambiente di coltura che possa riprodurre al meglio le condizioni caratteristiche del sistema biologico di destinazione [4].

Quando parliamo di ambiente di coltura ci riferiamo a tutti quei parametri chimico-fisici necessari per la crescita e lo sviluppo e a cui le cellule sono molto sensibili. Quasi tutti questi parametri sono regolarizzati e mantenuti costanti tramite particolari mezzi di coltura la cui composizione varia in funzione sia del tipo di cellula di partenza sia di quella che si vuole ottenere. Nello specifico il medium svolge importanti funzioni atte a mantenere le cellule in condizioni chimiche simili a quelle fisiologiche, apportare i nutrienti necessari alla proliferazione cellulare, agendo anche da mezzo di trasporto per metaboliti e cataboliti cellulari, è il principale responsabile del controllo e della regolazione del pH e della temperatura nell'ambiente di coltura e fornisce anche un'indicazione visiva dello stato di salute delle cellule. In molte situazioni, inoltre, il costrutto di crescita deve essere stimolato da opportuni condizionamenti fisici che possono essere deformazioni cicliche, trazioni mono o bi-assiali, campi elettrici o magnetici o altri tipi di forze, che sempre più evidentemente, si sono dimostrate essere importanti modulatori della fisiologia cellulare oltre ad aumentare l'attività biosintetica delle cellule nella matrice bioartificiale e lo sviluppo o rigenerazione del tessuto in vitro [5].

Tra le varie tipologie di bioreattori, i primi sistemi usati, sono stati i Flask System che permettono sia una coltura in condizioni statiche che dinamiche nel caso delle Mixed Flasks. La coltivazione di costrutti biologici all'interno di questi sistemi di coltura dinamica produce tessuti ingegnerizzati con caratteristiche migliori rispetto a quelli coltivati in ambiente statico. Il motivo che sta alla base di questo aspetto è che il sistema di agitazione permette il rimescolamento del medium in cui avviene la crescita cellulare. Questi sistemi però generano un flusso turbolento e un conseguente sforzo di taglio sul tessuto troppo elevato, inoltre la semina risulta poco uniforme. [6]

Un differente tipo di bioreattore sviluppato per ridurre queste limitazioni è il Rotating-Wall Vessels. Questo bioreattore si basa su un flusso laminare dinamico che viene generato da

un sistema rotante. In questo modo si ha una distribuzione uniforme dei nutrienti producendo bassi shear stress. I costrutti cellulari all'interno di questi bioreattori si trovano in una condizione di microgravità che induce una sospensione dei costrutti stessi all'interno del medium. Un aspetto negativo però rimane quello della crescita non uniforme del tessuto [7] a causa di una bassa migrazione cellulare all'interno dello scaffold.

Il bioreattore, che ad oggi ha dato migliori risultati, è quello basato sulla perfusione confinata, un sistema in grado di forzare il passaggio del medium all'interno dello scaffold. Questo presenta molti vantaggi.

Il flusso del medium attraverso lo scaffold, oltre a permettere una distribuzione uniforme dei nutrienti, permette, tramite opportuni sforzi di taglio generati dal fluido stesso, l'attivazione dei meccanotrasduttori presenti sulle membrane cellulari promuovendo la produzione di matrice ECM e il differenziamento cellulare. Inoltre, in questo modo si favorisce l'eliminazione dei prodotti di scarto e l'ossigenazione del medium stesso creando un ambiente di coltura più favorevole alla crescita cellulare [8,9].

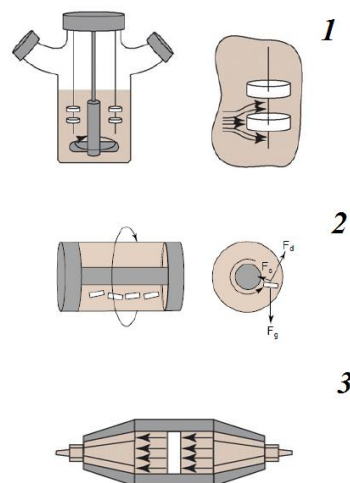


Fig.3 - Principali tipi di bioreattore: Bioreattore Mixed Flasks(1), Bioreattore Rotatin-Wall Vessels (2) e il Bioreattore a Perfusione Confinata (3)

La scelta delle cellule è un punto molto delicato di questa disciplina e deve tener conto di caratteristiche precise ed essenziali in funzione del differenziamento e del fenotipo cellulare che si vuole ottenere.

In particolare si possono avere due possibilità per lo sviluppo di una coltura cellulare:

- Usare cellule differenziate del paziente;
- Usare cellule staminali;

Le cellule differenziate sono cellule prelevate direttamente da tessuti espianati di un organismo umano o anche animale, e sono cellule specializzate, cioè cellule che possiedono già caratteristiche funzionali e morfologiche specifiche del tipo di tessuto da cui sono state prelevate. Queste cellule durante la coltura, proliferano andando incontro inizialmente ad un processo di de-differenziazione a seconda delle condizioni fisico-chimiche riprodotte all'interno dell'ambiente di coltura.

Le problematiche riscontrate nell'uso di queste cellule, riguardano la possibilità di reperire cellule sane all'interno di tessuti patologici del paziente, l'eventuale danneggiamento del sito di donazione e la frequente perdita del fenotipo. Il problema principale rimane però la loro limitata capacità di espansione. Le cellule primarie infatti non si replicano indefinitamente ma vanno incontro a senescenza dopo un numero limitato di passaggi.

Tramite l'alterazione del codice genetico si può ovviare a questo inconveniente creando delle cellule di linea immortalizzate, definite cellule di linea primarie, che sono in grado di crescere rapidamente e di replicarsi all'infinito in vitro. La coltura di cellule di linea primarie però è limitata alla sola ricerca scientifica in quanto è stato dimostrato che queste cellule, se impiantate, possono essere causa di tumori nell'organismo ospite [10].

Le cellule staminali invece sono cellule non differenziate, in grado di replicarsi per lunghi periodi e che possono essere indotte, tramite opportuni stimoli fisici o chimici, a differenziarsi in cellule con funzioni specifiche. Le cellule staminali di un tessuto possono dare origine a cellule di un altro tessuto secondo un fenomeno definito plasticità, questo perché segnali biologici interni ed esterni alla cellula possono modulare il differenziamento e promuovere la crescita di cellule altamente differenziate. In questo caso è necessaria però una conoscenza approfondita ed adeguata di tutti i fattori che ne causano il processo.

Le cellule staminali si dividono in cellule staminali embrionali e cellule staminali adulte che differiscono principalmente per i tessuti da cui possono essere isolate. Le prime vengono prelevate dalla blastociste, un embrione di poche settimane che viene distrutto durante il prelievo. Questo aspetto è stato nel corso degli anni il primo limite all'utilizzo delle cellule embrionali in considerazione di motivazioni etiche nei confronti della morte dell'embrione considerato una forma di vita a tutti gli effetti.

Le cellule staminali adulte possono essere isolate da tessuti quali il midollo osseo. Il tessuto adiposo, il sangue o altri tessuti in cui però la quantità relativa presente è molto bassa per realizzare una corretta semina cellulare. Inizialmente, l'uso di cellule staminali adulte era molto limitato perché erano considerate cellule in grado di dare origine solo a cellule di un dato tessuto. Negli ultimi anni invece è stato dimostrato che le cellule staminali presenti nel cervello, nel midollo osseo e nel mesenchima di vari tessuti possono dare origine a differenti tipi cellulari come ad esempio cellule ematiche, nervose e muscolari [11].

Oltre a questo però, la loro particolare caratteristica di totipotenza o multi-potenza, cioè la capacità di dividersi e produrre tutte le cellule differenziate di un organismo oppure uno qualsiasi dei tre strati germinali, rappresenta la principale difficoltà di coltura delle staminali. Questo aspetto infatti rende complicato l'induzione del differenziamento [12] nella direzione del tipo cellulare che si vuole ottenere.

In ogni caso, la possibilità di sfruttare le cellule staminali adulte invece di quelle embrionali si prospetta come una strada sicura per un valido progresso nella caratterizzazione dei sistemi necessari all'ottenimento di cellule e tessuti per numerose applicazioni terapeutiche.

4. Scaffold Decellularizzati

Per la realizzazione di un tessuto ingegnerizzato, che presenti caratteristiche meccaniche e funzionali del sistema biologico che si vuole riparare o sostituire, è importante l'uso di un substrato su cui effettuare la semina cellulare, lo scaffold.

Gli scaffold sono delle matrici porose che, grazie alla loro particolare struttura tridimensionale e alle caratteristiche superficiali del materiale, rappresentano un supporto per l'adesione, la proliferazione e la differenziazione cellulare. All'interno di questa struttura, le cellule producono infatti la matrice extracellulare ECM necessaria all'integrità e alla funzionalità del tessuto stesso. Lo scaffold in funzione del design con cui viene progettato è in grado inoltre di promuovere il trasporto delle cellule, dei fattori di crescita ed di altri segnali biomolecolari. In questo modo rappresenta un elemento importante nella riproduzione delle condizioni di crescita presenti in un tessuto umano e per indirizzare i processi macroscopici della formazione di quello ingegnerizzato [13].

Lo scaffold ideale dovrebbe possedere le seguenti caratteristiche:

- ✓ un'estesa rete di pori interconnessi per la migrazione, moltiplicazione e adesione al suo interno;
- ✓ dei canali attraverso i quali possa avvenire il passaggio dei metaboliti e dell'ossigeno necessari alle cellule e per l'eliminazione dei cataboliti prodotti da queste;
- ✓ biocompatibilità con un'alta affinità per la crescita cellulare;
- ✓ proprietà meccaniche e anatomiche appropriata per il corretto sviluppo delle cellule e per la formazione del tessuto;
- ✓ biodegradabilità controllata che possa avvenire senza prodotti di scarto.

In funzione dei biomateriali usati nell'ingegneria dei tessuti per la fabbricazione degli scaffold, questi possono essere raggruppati in due grandi categorie, quelli di origine biologica e quelli di origine sintetica [14]. Entrambe le tipologie godono di un ampio utilizzo e si sono dimostrate largamente funzionali per la realizzazione di diversi tipi di tessuto, da quello per valvole cardiache a quello nervoso, ma ciò nonostante hanno dimostrato anche alcuni limiti per cui la ricerca ha costantemente lavorato per la realizzazione di nuove strutture che possano svolgere questa funzione.

Gli scaffold di origine sintetica sono quelli realizzati con polimeri di sintesi tra i quali i più comuni includono i poliesteri quali l'acido poliglicolico (PGA), l'acido polilattico (PLA) e l'acido poli (lattico-co-glicolico) (PLGA) che è un copolimero costituito dai primi due, i poliortoesteri come il policaprolattone (PCL) e i policarbonati. I biopolimeri sintetici offrono grandi vantaggi rispetto ai materiali naturali.

I materiali sintetici infatti possono essere soggetti a numerosi processi o tecniche di lavorazione in grado di variare la composizione e la struttura chimico-fisica che sta alla base della loro sintesi. Questo permette di ottenere una vastissima gamma di proprietà meccaniche che possono essere modificate e controllate in funzione delle necessità e delle caratteristiche del tessuto che si vuole rigenerare. Allo stesso modo possono essere modificati e controllati sia i tempi che i prodotti di degradazione di questi polimeri. Inoltre, le sempre più sviluppate tecniche di lavorazione, quali solvent casting, particulate leaching, membrane lamination o melt molding, permettono la realizzazione di forme e strutture interne nonché di porosità del supporto che inducono una più facile adesione cellulare e una maggiore produzione di matrice ECM. Infine, non meno importante è l'elevata riproducibilità di queste strutture dovuta al fatto che ci troviamo di fronte a produzioni di livello industriale [15].

Il principale ostacolo all'uso di strutture di origine sintetica nasce dall'interazione con il sistema biologico. Spesso infatti le caratteristiche sintetiche del materiale inducono, una volta a contatto con il tessuto vivente, una risposta infiammatoria, che può portare al fallimento della rigenerazione del tessuto stesso [16]. Tecniche di lavorazione e di coating superficiale hanno ridotto notevolmente queste reazioni e hanno permesso di migliorare l'interfaccia tra il biomateriale ed il tessuto senza comunque variare le caratteristiche meccaniche del materiale stesso [17]. I risultati incoraggianti di queste soluzioni però non fanno trasparire la possibilità di bloccare totalmente questo tipo di fenomeno, motivo per il quale è nota la necessità di valutare il possibile utilizzo di materiali capaci di interagire con il tessuto vivente [18].

L'induzione della risposta immunitaria è uno dei motivi per cui gli scaffold di origine biologica vedono un loro scarso utilizzo in applicazioni di questo tipo rispetto agli scaffold di origine sintetica. La capacità di distinguere le molecole estranee (non-self) da quelle proprie (self), infatti, è uno dei principali compiti del nostro sistema immunitario che attiva

tutti i suoi meccanismi per distruggere o espellere quelle molecole che considera potenzialmente dannose.

Questi scaffold biologici sono realizzati principalmente da polimeri naturali quali il collagene, la proteina naturale più diffusa nell'organismo ottenibile mediante estrazione e purificazione con processi enzimatici, l'acido ialuronico o il chitosan, un altro importante biopolimero naturale che è stato segnalato per essere particolarmente emostatico e osteoconduttivo e promuovere la guarigione delle ferite.

Questi materiali, oltre alle problematiche riscontrate nell'integrazione con l'organismo ospite, hanno anche caratteristiche limitative da un punto di vista anatomico e biomeccanico. L'utilizzo di scaffold di origine naturale, di fatto, non assicura dati certi sulle caratteristiche meccaniche del costrutto, non permette una sua ripetibilità della struttura interna ed esterna ed, infine, non prevede un preciso controllo della biodegradabilità e dei suoi tempi [19].

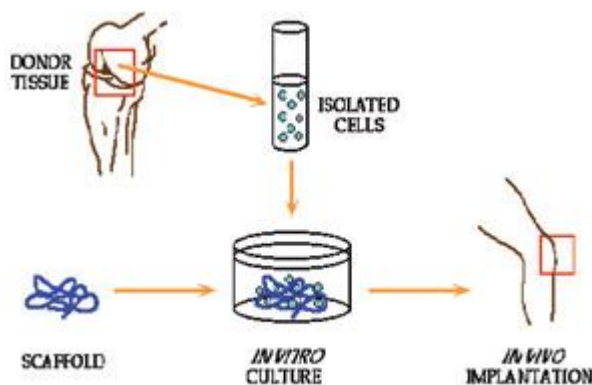


Fig.4 - Ruolo degli Scaffold nell'Ingegneria dei Tessuti

In funzione di questo, sono stati studiati diversi grafts xenogenici e allogenici che hanno dimostrato risultati più promettenti di alcuni polimeri sintetici biodegradabili e biopolimeri naturali. In uno di questi studi [20] dei ricercatori hanno provato ad isolare il tessuto primario e a rimuovere tutti i suoi componenti cellulari con l'obiettivo di produrre un materiale con le stesse caratteristiche di quello naturale. Questo processo di rimozione cellulare è noto come "decellularizzazione".

In parole più semplici potremmo definire la decellularizzazione di un tessuto biologico come una tecnica con cui andiamo a *depersonalizzare* il tessuto stesso utilizzata per sviluppare un supporto capace di mantenere la sua integrità strutturale senza perdere le sue componenti biologiche native. Quest'idea nasce ovviamente dalla convinzione che in

questo modo si possono ottenere risultati importanti risolvendo allo stesso tempo il problema del rigetto del costrutto all'interno dell'ambiente biologico. Il vantaggio principale della decellularizzazione non è solo il potenziale per creare uno scaffold con microstruttura ideale e le proprietà meccaniche adeguate, ma anche la riduzione delle componenti biologiche di base, limitando in tal modo gli effetti immunogenici di un impianto, aumentando le fonti potenziali per il tessuto.

L'uso di tessuti primari come scaffold è stato sviluppato nel 1960, quando dei ricercatori hanno pensato che mediante reticolazione del tessuto [21], gli effetti immunogenici si sarebbero ridotti sufficientemente per creare un costrutto funzionale. La riduzione della risposta immunitaria è stata ottenuta attraverso reticolazione, ma le proprietà meccaniche, in conseguenza a questo processo, sono state perse nonostante sia stata verificata la morte cellulare. Laka et al. nel 1989 hanno deciso, quindi, di utilizzare un detergente in grado rompere i legami cellulari dalla ECM in modo da ottenere un innesto biologico acellulare. Questo processo chimico ha fornito risultati sulle proprietà meccaniche molto positivi [22]. Quindi l'idea che sta alla base della decellularizzazione è quella di mantenere intatte le proprietà del tessuto producendo uno scaffold fisiologicamente funzionale. L'aspetto che rende l'utilizzo di questi scaffold molto promettente è il fatto che nonostante la vasta gamma di tipologie di tessuto presenti nel nostro organismo, la matrice extracellulare è costituita da molecole molto simili quali proteine, collagene, elastina e proteoglicani, noti come elementi critici per l'integrità strutturale e per il profilo biomeccanico.

In generale queste proteine variano da tessuto a tessuto prevalentemente solo in funzione della quantità relativa presente e questo induce il nostro organismo ad "accettare" questi costrutti senza reagire con una risposta infiammatoria o immunitaria[23].

Anche in questo caso, però, dobbiamo considerare alcuni svantaggi quali le tempistiche del processo, anche se non risultano molto più lunghe di quelle di lavorazione di un polimero sintetico dalle proprietà simili, e la possibilità di trovare tracce di sostanze chimiche sulla struttura che potrebbero influenzare l'adesione cellulare [24]. Mentre questi sono alcune potenziali limitazioni, i vantaggi di adeguate caratteristiche meccaniche e componenti strutturali biologici, rendono questi materiali altamente promettenti.

5. Automazione del processo di decellularizzazione

Il processo di decellularizzazione fa parte di una categoria di Terapie Avanzate che rappresentano, oggi, una frontiera scientifica di enorme interesse dove la ricerca degli ultimi anni può trovare un'applicazione clinica reale e diventare un beneficio per il paziente e per progresso il della sanità mondiale.

Con la pubblicazione in Gazzetta Europea il 10 dicembre 2007, dopo un lungo iter legislativo iniziato nel 2001, è stato emanato un unico quadro normativo integrato (Regolamento n.1394/2007) [25] per tutti i prodotti per terapie avanzate, destinati all'immissione in commercio negli Stati membri della UE e preparati industrialmente o nella cui fabbricazione interviene un processo industriale. Esso è applicato dal 30 dicembre 2008. In questa legislazione viene data, anche, una definizione del *Prodotto di Ingegneria Tissutale*: "contiene o consiste di cellule o tessuti prodotti dall'ingegneria cellulare o tessutale, ed è presentato come avente proprietà atte a rigenerare, riparare o sostituire un tessuto umano oppure viene utilizzato o somministrato ad esseri umani a tal fine". La normativa di base è supportata da una serie di linee guida. Tali linee guida fanno parte di una collezione chiamata Eudralex. Le norme che regolano le attività legate ai prodotti di ingegneria tissutale sono le "Good Laboratory Practice" (GLP, Buone Pratiche di Laboratorio), che si riferiscono alle procedure organizzative delle prove non cliniche di laboratorio, e le "Good Clinical Practice" (GCP, Norme di Buona Pratica Clinica), che definiscono le procedure da seguire nella conduzione degli studi clinici e i ruoli e le responsabilità. Le GMP definiscono, quindi, i requisiti che devono essere soddisfatti durante le fasi di sviluppo, produzione e controllo dei prodotti biomedici al fine di garantirne la qualità e quindi la sicurezza e l'efficacia. Aspetti fondamentali [26] contenuti all'interno di questi manuali si possono riassumere nei seguenti punti:

- Lavorazioni in ambienti e/o stanze adeguati e sterili;
- Procedure operative standard;
- Tracciabilità dei prodotti e dei reagenti;
- Controlli di qualità;
- Requisiti strutturali ed ambientali ben precisi.

L'obiettivo della Commissione Europea, con la stesura di un regolamento sui medicinali per le terapie avanzate, evidenzia la necessità di diminuire il livello di rischio associato alla

produzione di tessuti biologici e, nello stesso tempo, aumentarne gli standard di qualità ed efficacia.

Studiando attentamente queste norme ci si rende conto che gli aspetti fondamentali che devono caratterizzare un prodotto quale può essere un sostituto vascolare, al di fuori di quelle che sono le caratteristiche fisiologiche, sono i requisiti di ripetibilità, riproducibilità, sicurezza e sterilità. Questi requisiti, nonostante l'attento e preciso svolgimento delle operazioni del processo di lavorazione, possono spesso venire meno a causa di diversi aspetti.

Anche se, infatti, tutte le sperimentazioni di decellularizzazione o coltura cellulare avvengono seguendo le norme GLP (Good Laboratory Practice), sotto la cappa a flusso laminare e utilizzando strumenti in grado di garantire la sterilità, il costante intervento dell'operatore e l'esposizione all'aria, presentano continuamente una possibile sorgente di contaminazione e di variabilità.

L'automazione del processo di decellularizzazione, obiettivo di questa tesi, è una soluzione definitiva all'intervento dell'operatore e alle sue possibili conseguenze. In questo contesto l'operatore si limiterebbe a programmare il dispositivo e ad inserire il tessuto all'interno dello stesso. L'uso di un prototipo con queste caratteristiche, quindi, oltre a minimizzare le possibilità di contaminazione, ridurrebbe sprechi di tempo dovuti alle operazioni manuali ma soprattutto comporterebbe un costante monitoring di parametri importanti quali il valore del PH, la temperatura, i condizionamenti fisici e il ricambio dei fluidi dell'ambiente di coltura o di decellularizzazione.

L'automazione è una soluzione che, oltre a diminuire drasticamente le possibilità di contaminazione, permette una maggiore ripetibilità del processo stesso che in questo modo non prevede interventi manuali. Inoltre, un simile dispositivo, permette di controllare i fattori che hanno incidenza sul livello di ripetibilità del processo aumentando il grado di riproducibilità di tutto il sistema poiché le condizioni che caratterizzano l'ambiente di lavoro sono controllate e determinate dal sistema progettato.

In questo lavoro di tesi, quindi, è stato sviluppato un prototipo per la decellularizzazione automatica. Questo dispositivo è in grado di gestire l'intero processo senza la necessità dell'intervento di un operatore. Il processo che avviene in una condizione che minimizza i rischi di contaminazione, è condotto dal dispositivo mantenendo durante tutto il tempo un ambiente controllato e ideale per l'ottenimento del tessuto finale. Questa rappresenta una

possibile soluzione per la produzione di prodotti di ingegneria tessutale che rispettino tutti i requisiti necessari per l'applicazione clinica.

6. Obiettivi del Lavoro

L'obiettivo di questo lavoro di tesi è stato lo sviluppo di un dispositivo per la decellularizzazione automatica e successivamente la validazione di un nuovo protocollo per la realizzazione di un tessuto decellularizzato utilizzando il dispositivo.

La prima fase di questo lavoro di tesi è stata quella di progettare un sistema con lo scopo di ottenere un dispositivo che garantisca, in totale sterilità, un processo automatico ripetibile e riproducibile, nel rispetto quindi delle norme GMP.

Il progetto è stato pensato in funzione delle criticità individuate nel funzionamento del dispositivo del precedente lavoro di tesi. In particolare, al fine di automatizzare completamente il processo, il circuito idraulico è stato ridisegnato con differenti linee in parallelo in grado di effettuare il ricambio automatico di un numero maggiore di sostanze all'interno della camera di decellularizzazione evitando in questo modo la necessità di interventi manuali.

Per rendere versatile il dispositivo e assicurare la completa automazione, anche con utilizzando numerosi reagenti, è stato ideato un sistema di elettrovalvole per il controllo della linea idraulica. Il ricambio quindi può essere modificato in funzione del protocollo di decellularizzazione e delle sostanze necessarie alla decellularizzazione.

La semplicità di utilizzo è una prerogativa importante per una futura applicazione in ambito clinico. Per garantire questo requisito mantenendo la condizione di versatilità del dispositivo, è stato riprogrammato il microcontrollore tramite una funzione con l'intento di permettere variazioni del protocollo in maniera immediata ed intuitiva. La progettazione è stata conclusa effettuando le prove di calibrazione e validazione necessarie a confermare l'affidabilità e il corretto funzionamento.

La seconda fase invece è stata caratterizzata dalla validazione di un nuovo protocollo di decellularizzazione con l'intento di produrre una matrice completamente acellulare e caratterizzata da proprietà meccaniche il più possibile simili a quelle del tessuto di origine.

Il protocollo è stato sperimentato su vasi porcini sia attraverso un processo manuale che automatico.

Per evidenziare gli effetti negativi e positivi dovuti sia al protocollo usato che al tipo di processo, i tessuti decellularizzati sono stati valutati tramite differenti tecniche quali analisi istologiche, quantificazione del DNA e test meccanici.

Dalle istologie e dalla quantità di DNA residuo si può infatti valutare l'efficacia del protocollo e determinare gli effetti del processo automatico rispetto alla decellularizzazione manuale.

I test meccanici invece sono stati effettuati con l'obiettivo di confrontare l'invasività del protocollo e del dispositivo sulle proprietà meccaniche del tessuto.

Capitolo 2:

LA DECELLULARIZZAZIONE

1. Stato dell'arte della decellularizzazione

Negli ultimi anni, si sta diffondendo sempre di più l'utilizzo di scaffolds biologici costituiti da matrice extracellulare (ECM) in processi di medicina rigenerativa per la sostituzione di tessuti o organi. La matrice ECM è un insieme di proteine, glicoproteine e proteoglicani che costituisce la più completa unità di organizzazione fisica di un tessuto, una rete di macromolecole la cui disposizione tridimensionale rappresenta un'impalcatura capace di sostenerne la struttura stessa.

L'uso sempre più diffuso della matrice ECM come scaffold è dovuto al fatto che questa impalcatura è in grado di agire come substrato su cui qualunque tipo di cellula che caratterizza il tessuto umano può aderire, proliferare, migrare e differenziarsi [27]. Inoltre, in applicazioni quali la rigenerazione dei tessuti, la matrice ECM si è dimostrata un ottimo "trasduttore" degli stimoli fisici necessari per influenzare la sopravvivenza della cellula ma anche soprattutto la sua forma e funzione[28].

Con queste premesse appare abbastanza chiaro quanto i processi di decellularizzazione debbano essere poco invasivi. Risulta di fondamentale importanza, infatti, preservare la composizione e la struttura altamente tridimensionale della matrice, sia nella sua architettura che nella caratterizzazione e composizione superficiale. Oltre alla facilità che la matrice presenta nel supportare la crescita cellulare, è importante che questo tessuto naturale decellularizzato mantenga, anche, la capacità di essere rimodellato per incorporare la protesi nel tessuto vivente.

Inoltre, un altro aspetto da tener conto è che residui di materiale cellulare all'interno della matrice possono attenuare o definitivamente eliminare i vantaggi che l'uso di questo scaffold comporta nello sviluppo del tessuto in vivo [29]. La risposta del tessuto ospitante dipende, di fatto, dall'efficacia della decellularizzazione e dalla rimozione di tutti i residui cellulari.

In funzione di questo, sono stati sviluppati differenti metodi di decellularizzazione. Tali metodi si basano fondamentalmente sul trattamento dei tessuti tramite esposizione ad agenti chimici e biologici non fisiologici, come detergenti o enzimi, o tramite l'applicazione di forze fisiche. La scelta dei metodi di decellularizzazione può essere effettuata nel modo migliore solo attraverso una conoscenza approfondita sia delle

caratteristiche del tessuto, quali densità, spessore, tipo di cellule, contenuti lipidici ecc., sia del meccanismo di azione degli agenti usati [30].

Nel corso delle varie sperimentazioni effettuate sulle pratiche di decellularizzazione è emerso che l'ottimizzazione di un protocollo di decellularizzazione che prevede l'uso combinato di queste tecniche è la strada giusta per risultati soddisfacenti e per ottenere un tessuto biologico in cui la parte cellulare sia stata completamente rimossa e in cui la matrice mantenga intatte tutte le sue caratteristiche biomeccaniche.

Le tecniche frequentemente usate nei diversi protocolli di decellularizzazione sono riassunti all'interno della seguente tabella:

	TECNICA	AZIONE	EFFETTI
AGENTI CHIMICI	Acidi e Basi	<ul style="list-style-type: none"> • Catalizzano degradazione idrolitica biomolecole. • Solubilizzano componenti citoplasmatiche • Distruggono acidi nucleici denaturando le proteine. 	<p>Acidi</p> <ul style="list-style-type: none"> • Danneggiano e rimuovono collagene, causando perdita delle proprietà meccaniche • Non influenzano la struttura dei glicosamminoglicani. <p>Basi</p> <ul style="list-style-type: none"> • Rimuovono fattori di crescita e distruggono fibrille e crosslinks del collagene.
	Soluzioni Ipotoniche e Iperotoniche	<ul style="list-style-type: none"> • Il tessuto è immerso alternativamente nelle due soluzioni causando lisi cellulare. 	<ul style="list-style-type: none"> • Cambiano le molecole e l'architettura della matrice • Non rimuovono del tutto i residui cellulari.
	Detergenti Non-ionici • Triton x-100	<ul style="list-style-type: none"> • Rimuovono residui cellulari di tessuti molto spessi. • Distrugge l'interazione DNAproteina, lipide-lipide e proteina-lipide. 	<ul style="list-style-type: none"> • Causano perdita di proteine dell'ECM e diminuzione risposta immunitaria in vivo.
	Detergenti Ionici • SDS • Sodium deoxycholate • Triton X-200	<ul style="list-style-type: none"> • Solubilizzano la membrana citoplasmatica e nucleare • Tendono a denaturare le proteine. 	<ul style="list-style-type: none"> • Rimuovono i residui nucleari e le proteine citoplasmatiche dai tessuti. • Tendono a distruggere l'ultrastruttura della ECM. • Rimuovono i GAG e i fattori di crescita.
	Detergenti Zwitterionici • CHAPS • Sulfobatanina 10-16	<ul style="list-style-type: none"> - Permettono la rimozione di cellule da tessuti meno spessi. 	<ul style="list-style-type: none"> • Provoca effetti sull'ECM simile a quelli del Triton-100
	Solventi • Alcool • Acetone • TBP	<ul style="list-style-type: none"> • Permettono decellularizzazione per deidratazione e lisi cellulare. • Rimuovono dei lipidi. 	<ul style="list-style-type: none"> • Possono fissare da un punto di vista isologico il tessuto. • Causano danni all'ultrastruttura dell'ECM.

AGENTI BIOLOGICI	Agenti Chelanti		<ul style="list-style-type: none"> • EDTA • EGTA 	<ul style="list-style-type: none"> • Legano gli ioni metallici proibendo l'adesione alla ECM. • Sono associati a metodi enzimatici perchè inefficaci se utilizzati da soli 	<ul style="list-style-type: none"> • Rimozione dei GAG dell'ECM
	Enzimi	Nucleasi (DNasi, RNasi)	<ul style="list-style-type: none"> • Agiscono sulle sequenze degli acidi nucleici • Aiutano la rimozione di nucleotidi dopo lisi cellulare. • Endonucleasi è più efficace dell'esonucleasi perché crea una più efficace frattura del DNA. 	<ul style="list-style-type: none"> • Difficile da rimuovere dal tessuto • Causa risposta immunitaria 	
		Tripsina	<ul style="list-style-type: none"> • Rompe i legami peptidici interrompe l'ultrastruttura della matrice. • Favorisce la penetrazione di altri agenti. 	<ul style="list-style-type: none"> • È più lenta nel rimuovere le cellule. Conserva meglio i GAG. • Una prolungata esposizione provoca danni alla ECM. 	
AGENTI FISICI	Temperatura		<ul style="list-style-type: none"> • Congelamento/ Scongelo 	<ul style="list-style-type: none"> • Producono un'efficace lisi cellulare • Non rimuovono i residui stessi. 	<ul style="list-style-type: none"> • Un singolo ciclo del processo può ridurre la risposta immunitaria. • Cicli multipli sono efficaci per la decellularizzazione senza provocare perdita delle proteine dell'ECM. • I cristalli di ghiaccio possono fratturare la matrice.
	Pressione			<ul style="list-style-type: none"> • È efficace nella rimozione dei residui cellulari. 	<ul style="list-style-type: none"> • La formazione di cristalli di ghiaccio a basse temperature può danneggiare l'ultrastruttura dell'ECM.
	Elettroporazione			<ul style="list-style-type: none"> • I campi elettrici pulsati inducono la formazione di micropori nella membrana cellulare dovuta alla destabilizzazione dell'equilibrio elettrico. 	<ul style="list-style-type: none"> • I micropori causano morte cellulare. • I campi elettrici possono distruggere la matrice.
	Perfusione			<ul style="list-style-type: none"> • Facilita l'esposizione chimica e la rimozione cellulare. 	<ul style="list-style-type: none"> • La pressione associata alla perfusione può distruggere la ECM.
	Agitazione Meccanica			<ul style="list-style-type: none"> • Può causare la lisi cellulare • Facilita l'esposizione chimica e la rimozione del materiale cellulare. 	<ul style="list-style-type: none"> • Un'agitazione aggressiva può distruggere la ECM.

Tab.3 - Principali agenti chimici, fisici e biologici utilizzati per la decellularizzazione dei tessuti biologici e gli effetti dimostrati che hanno su di essi.[31]

Per un utilizzo funzionale, è necessario sviluppare un protocollo di decellularizzazione che stabilisca tempi, temperature, carichi e modalità di svolgimento di tutte queste tecniche o comunque di quelle adottate per ottenere l'obiettivo prefissato. L'applicazione degli agenti che caratterizzano la decellularizzazione, infatti, dipende, oltre che dal tipo di tessuto, anche dalle sue caratteristiche quali spessore o densità, dal tipo di azione ed effetto che

ognuno di questi agenti causa e dal fine ultimo per il quale il tessuto è stato decellularizzato.

Esempi di protocolli di decellularizzazione usati in alcuni ambiti di questa disciplina sono riportati nella seguente figura:

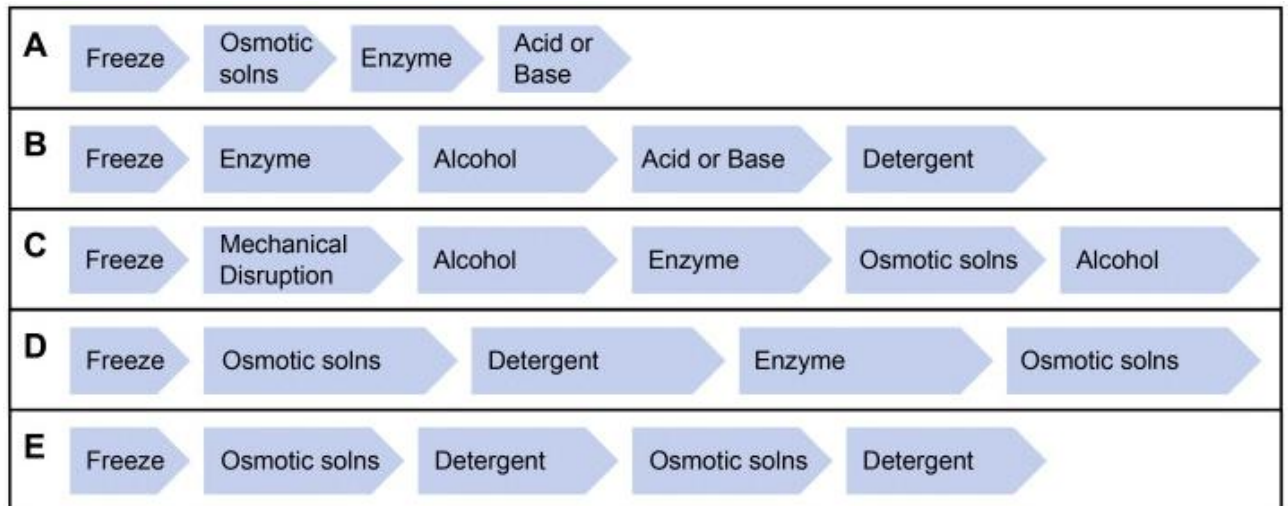


Fig.5 - Esempi di differenti protocolli di decellularizzazione per (A) tessuti quali il pericardio, (B) il derma, (C) tessuti amorfî adiposi, (D) tessuti compositi come la trachea e (E) organi vitali interi.

Molti studi sulle tecniche di decellularizzazione, ad oggi, hanno dimostrato che l'uso di matrici acellulari, nello sviluppo di un tessuto ingegnerizzato in vivo, possono portare a risultati importanti anche clinici.

La SIS (small intestinal submucosa) è una matrice acellulare eterologa che deriva dalla decellularizzazione della tonaca sottomucosa contenuta nell'intestino del maiale. Questo tipo di supporto è stato già sperimentato sull'uomo, Palminteri e il suo gruppo di ricerca nel 2006 infatti hanno effettuato l'innesto della matrice SIS in 21 pazienti affetti da stenosi dell'uretra anteriore con l'81% di successo.

Tra gli studi sulla decellularizzazione di lembi valvolari aortici e polmonari richiedono particolare attenzione gli studi condotti da Spina e il suo gruppo di ricerca [32]. I risultati ottenuti in questi lavori hanno portato alla definizione di un protocollo di decellularizzazione che si è dimostrato efficace sia in funzione della rimozione cellulare che delle caratteristiche biologiche della matrice. La procedura generale adottata consiste in una sequenza di passaggi che prevede la lisi ipotonica della componente cellulare, la digestione degli acidi nucleici e successivi lavaggi per la rimozione dei detriti cellulari.

Sulla base di questi studi sono state prodotte differenti matrici decellularizzate di valvole umane e animali. La CryoValve SGTM è stato il primo allograft di valvola polmonare decellularizzato, con approvazione FDA.

Le analisi MEC effettuate sul tessuto hanno evidenziato una rimozione cellulare e degli acidi nucleici superiore al 99%. In vitro la valvola ha dimostrato di possedere ottime caratteristiche meccaniche ed idrodinamiche. Queste proprietà sono state confermate al momento anche dall'uso clinico in cui non si è registrata alcuna risposta immunitaria [33]. Nel 2008 è stato effettuato il primo trapianto di trachea ingegnerizzata su una donna di 30 anni affetta da una grave stenosi del bronco principale.

La matrice, realizzata da Macchiarini et al. [34], è stata ottenuta con un protocollo di decellularizzazione multi-ciclo sulla trachea di un donatore di 51 anni, ottenendo un supporto decellularizzato per il trapianto. Le analisi istologiche e biologiche infatti hanno dimostrato la completa rimozione cellulare e del materiale nucleare all'interno della matrice. Tecniche SEM hanno evidenziato una struttura gerarchica simile a quella del tessuto nativo, mentre test biomeccanici hanno escluso importanti influenze del protocollo sulle proprietà morfologiche e meccaniche.

Dopo essere stata ricellularizzata con cellule autologhe, la trachea è stata impiantata dimostrando attualmente ottimi risultati. Le analisi fatte dopo il trapianto, non hanno evidenziato alcuna risposta immunitaria nonostante il paziente non sia sotto effetto di farmaci immunosoppressori, e inoltre si è potuto valutare un comportamento attivo della matrice nei confronti della rivascolarizzazione del tratto del tessuto sostituito.

2. Protocolli di Decellularizzazione per Tessuti Vascolari

Molti studi scientifici hanno discusso la potenziale importanza del ruolo dei tessuti naturali in applicazioni cardiovascolari come graft vascolari.

I tessuti decellularizzati, compresi i vasi sanguigni, dovrebbero mantenere in seguito al processo di decellularizzazione stesse proprietà meccaniche e strutturali del tessuto nativo.

Gli effetti dei trattamenti di decellularizzazione su proprietà meccaniche, biologiche e chimiche dei tessuti possono portare ad importanti variazioni delle caratteristiche del tessuto in funzione degli agenti responsabili del processo stesso.

In questi studi sono state valutate le conseguenze della decellularizzazione con particolare attenzione ad aspetti quali la calcificazione, l'immunogenicità e la citotossicità.

Nella maggior parte dei casi, i tessuti vascolari acellularizzati ottenuti mantengono proprietà meccaniche naturali e promuovono il *remodeling* [35] della protesi attraverso neovascolarizzazione e ricellularizzazione da parte dell'organismo ospite.

Dall'analisi dei protocolli di decellularizzazione per i vasi sanguigni maggiormente usati e ampiamente testati e valutati si evince che i principali elementi sono gli agenti chimici, in particolare i detergenti ionici e non-ionici.

I detergenti comunemente impiegati [36] sono i seguenti: a) sodio dodecil solfato (SDS); b) sodio deossicolato (SC); c) Triton X-100; d) enzimi quali tripsina, endonucleasi. Diversi gruppi di ricerca hanno inoltre sviluppato specifici protocolli di decellularizzazione combinando due o più agenti, con lo scopo di rimuovere tutte le cellule rimaste con il minimo danno alla matrice [37].

In particolare, le principali differenze tra gli effetti sui tessuti provocati da questi trattamenti variano in funzione del tipo di detergente e dalla quantità percentuale utilizzata nella soluzione.

DETERGENTE	PROTOCOLLO	ASPETTI
Triton x-100 [24] [27]	<ul style="list-style-type: none"> • Si utilizza una soluzione di 1% Triton X-100 e 0,02% di EDTA in soluzione tampone di PBS. • I campioni sono agitati in questa soluzione per 24 ore a 37°C con RNasi A e DNasi I prima del risciacquo in PBS. 	<ul style="list-style-type: none"> • Triton X-100 interrompe le interazioni lipidi-lipidi e lipidi-proteine. • EDTA rimuove il materiale cellulare legandosi ai cationi bivalenti delle integrine.
SDS [25]	<ul style="list-style-type: none"> • Si utilizza 0,075% SDS in PBS. • I campioni sono agitati in questa soluzione per 15 ore a 37°C prima di 15 cicli di risciacquo in PBS a 37°C. 	<ul style="list-style-type: none"> • Moderato cambiamento nelle proprietà meccaniche del tessuto • Le proprietà idrofiliche, idrofobiche e ioniche di SDS possono alterare le interazioni proteina-proteina, aprendo la struttura molecolare di elastina e creando squilibrio nel legame idrogeno del collagene.
Triton x-100 & Sodium Deoxycholate [24]	<ul style="list-style-type: none"> • Si usa 0,25% Triton X-100 e 0,25% di sodio-deossicolato in PBS. • I campioni sono agitati in soluzione per 24 ore a 37°C prima di un ciclo di lavaggio di 72 ore INM-199 medium tenuto a 4°C. • Dopo il ciclo di lavaggio, i campioni marcati sono trattati con RNasi A e DNasi I in PBS per 24 ore a 37°C. 	<ul style="list-style-type: none"> • Causa da moderati a gravi cambiamenti nelle proprietà meccaniche, poichè l'acido desossicolato è un detergente ionico più dirompente rispetto di SDS. • Diminuisce la compliance elastica, causando cambiamenti significativi delle proprietà meccaniche, ma la decellularizzazione è più efficace.
SDS [25, 26]	<ul style="list-style-type: none"> • I campioni sono incubati in soluzione ipotonica di 10 mM Tris Buffer con 0,1% di EDTA. • I campioni sono agitati a temperatura ambiente in una soluzione di 0,1% SDS con tampone Tris, insieme a RNasi e DNasi per 48 h. 	Rimuove la componente cellulare e mantiene intatta sia l'alta struttura dell'elastina che la rete di collagene del tessuto.
Tripsina [27, 28]	<ul style="list-style-type: none"> • I campioni di tessuto sono incubati in una soluzione di 0,5% di tripsina e 0,2% di EDTA con RNasi e DNasi a 37°C per 48 h. 	<ul style="list-style-type: none"> • Ottima rimozione delle cellule. • Comporta la distruzione della matrice ECM e conseguente perdita delle proprietà meccaniche del tessuto.
Triton x-100	<ul style="list-style-type: none"> • I campioni sono agitati in una soluzione di 1% Triton X-100 con 0,2% EDTA in soluzione ipotonica (10 mM Tris, pH8.0), con RNasi e DNasi a 37°C per 48 h. 	<ul style="list-style-type: none"> • Ha un comportamento simile a SDS. • Rimuove la componente cellulare e mantiene intatta sia l'alta struttura dell'elastina che la rete di collagene del tessuto.
Triton x-100 & SDS [29,30].	<p>Questo protocollo comprende tre fasi:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Sospensione in soluzione ipotonica con inibitori di proteasi 2. Estrazione attraverso Triton X-100, DNasi, e RNasi. 3. Trattamento con SDS. 	Questo processo produce un materiale costituito da elastina, collagene insolubile e glicosaminoglicani strettamente legati.

Tab.4 - Riassunto dei più diffusi protocolli di decellularizzazione e dei risultati ottenuti durante la loro sperimentazione [38,39,40]

In letteratura si possono trovare molti studi sul confronto di vari protocolli di decellularizzazione col fine di evidenziarne le principali differenze e ricavare delle relazioni assolute tra gli agenti utilizzati e gli effetti che questi provocano sul tessuto.

In uno studio interessante, di C. Fitzpatrick et al del 2010, [38] sono stati confrontati tre protocolli molto usati per la realizzazione di tessuti vascolari ingegnerizzati. Il primo si basa sull'uso di SDS mentre gli altri due sulla combinazione, di TritonX-100 , RNase A e DNase I con, rispettivamente, EDTA e Sodio Deossicolato.

La decellularizzazione è stata effettuata su segmenti di aorta porcina sezionata longitudinalmente per ottenere coppie di provini da testare uno come tessuto nativo e l'altro come matrice acellulare.

I tessuti trattati con TritonX-100 \EDTA e con 0,0075% SDS hanno mostrato una variabilità statisticamente significativa delle proprietà meccaniche senza provocare una completa lisi delle cellule muscolari lisce VSMCs del tessuto aortico.

I dati ottenuti dalle analisi della matrice ottenuta con TritonX-100/Sodio Deossicolato dimostrano una decellularizzazione più efficace per l'ottenimento di xenograft o allograft aortici. Si è potuto verificare infatti una effettiva lisi delle cellule VSMCs senza una diminuzione così accentuata della compliance meccanica rispetto al caso precedente.

Questo è dovuto al fatto che l'SDS per le sue proprietà idrofobiche-idrofiliche e ioniche può alterare le interazioni proteina-proteina, aprendo la struttura molecolare di elastina e creando uno squilibrio del legame idrogeno del collagene.

In un altro studio invece [39] sono state analizzate le matrici prodotte tramite tre differenti protocolli di decellularizzazione su aorta discendente toracica porcina. In particolare sono stati valutati gli effetti di un detergente anionico quale è l'SDS, di uno non-ionico come il TritonX-100 e di un detergente enzimatico, la Tripsina.

Le analisi istologiche e le tecniche SEM hanno mostrato in tutti e tre i casi una rimozione cellulare molto efficace. I test meccanici effettuati per caratterizzare i comportamenti elastici e viscoelastici della matrice invece hanno evidenziato differenze importanti. La struttura della matrice trattata con SDS e TritonX-100 è risultata quella maggiormente preservata, inoltre l'uso di questi detergenti ha permesso di ottenere un costrutto dalle proprietà elastiche molto simili a quelle del tessuto nativo. I vasi trattati con Tripsina

presentano una matrice seriamente deteriorata in cui le proprietà meccaniche sono molto inferiori a quelle del tessuto aortico iniziale. Per tutti i casi, la rimozione cellulare ha portato una diminuzione di proprietà meccaniche in termini di stress relaxation.

In alcune ricerche, inoltre, sono stati sviluppati protocolli multistep che si basano sull'alternanza di diversi agenti decellularizzanti. Nello studio condotto da Schmidt et al. [40] è stato testato l'uso di un protocollo di estrazione sequenziale basato sull'uso di detergenti chimici e una tecnica multistep enzimatico-detergente.

Nel primo caso si prevede una fase *non-denaturing* in cui il tessuto è sottoposto a TritonX-100 seguita da una fase successiva *denaturing* in cui si sfrutta l'azione dell'SDS. Nel secondo caso invece il protocollo si sviluppa in 3 fasi principali, la prima consiste nell'immersione del tessuto in una soluzione ipotonica contenente inibitori di proteasi, poi si effettua un'estrazione attraverso TritonX-100, DNase I e RNase ed infine un trattamento con SDS.

L'uso di detergenti chimici ha prodotto una matrice composta da collagene, elastina, fibronectina e laminina mentre l'azione enzimatica ha portato alla realizzazione di un materiale costituito fondamentalmente da elastina, collagene insolubile e glicosamminoglicani strettamente legati. Entrambe le matrici hanno dimostrato un alto tasso di pervietà dopo il trapianto allogenico in un modello canino.

Per la prima si è potuto osservare una pervietà dell' 80% per 90 giorni mentre la seconda è stata impiantata per 6 anni mantenendo un pervietà del 94%. In tutti e due i casi inoltre non si sono verificati fallimenti dovuti a particolari reazioni infiammatorie o a cedimenti della struttura. L'aspetto più positivo dell'impianto è stato la ri-endotelizzazione del tessuto vascolare ingegnerizzato.

Un altro studio importante è stato effettuato per determinare la concentrazione minima di SDS necessario per raggiungere una completa rimozione cellulare.

La decellularizzazione è stata eseguita ponendo i campioni in SDS a 37 ° C in un bagno di acqua in agitazione per 15 ore. Le vene sono state successivamente lavate per 5 volte in tampone fosfato salino (PBS) per periodi di 10 minuti ciascuno. A questo scopo sono state testate concentrazioni di 0,01, 0,05, 0,025, 0,075 e 0,1% SDS in PBS.

I risultati hanno dimostrato che la rimozione delle cellule è stata significativa per tutti i gruppi di trattamento e che questa era correlata alla concentrazione, con una decellularizzazione quasi totale (> 94%) a concentrazioni SDS \geq 0,075%.

In generale quindi possiamo dire che l'efficienza del metodo utilizzato è fortemente influenzato dal tipo di tessuto su cui si lavora: le caratteristiche fisiologiche, l'origine e la densità della sua struttura, il contenuto lipidico e lo spessore stesso sono i principali responsabili del successo della rimozione cellulare durante questo tipo di processi.

Ad esempio, la valvola aortica di topo è risultata poco sensibile a protocolli di decellularizzazione basati sul solo utilizzo della tripsina [41] mentre lo stesso metodo ha garantito una rimozione completa della componente cellulare di una valvola polmonare porcina [42].

Raramente la decellularizzazione va a buon fine con metodi che si basano su un solo agente, nella maggior parte dei casi, il protocollo è una combinazione di differenti agenti sia chimici che fisici [31], anche nei casi dei tessuti più semplici e sottili.

In uno studio di Pellegata et al. [43] per la decellularizzazione è risultata molto efficace la combinazione di diversi agenti quali l'acqua distillata, il successivo uso di sodio deossicolato e infine l'azione della DNase.

Come visto nel confronto tra alcuni dei principali metodi trovati in letteratura, il Sodio Deossicolato risulta efficace in funzione della grandezza dello spessore del vaso. L'acido deossicolato è considerato un detergente ionico più dirompente rispetto al SDS, provoca un'ottima rimozione cellulare ma anche distruzione dell'ultrastruttura i cui danni strutturali, però, possono essere diminuiti da un protocollo che preveda tempi di decellularizzazione ridotti.

3. Nuovo Protocollo di Decellularizzazione

La grande varietà di agenti decellularizzanti e il risultato delle loro combinazioni può portare ad innumerevoli protocolli che possono essere più o meno efficaci in base al tipo di tessuto che si vuole trattare.

Non è, quindi, così immediato riuscire a definire il giusto metodo da utilizzare per gli obiettivi che si sono prefissati e per avere, con buona approssimazione, un'idea sulla validità del metodo e i suoi effetti sul tessuto sono necessarie numerose prove e analisi.

Il protocollo utilizzato nel precedente lavoro di tesi si basa sull'utilizzo di:

AGENTE	AZIONE
- Acqua milliQ con aggiunta di soluzione antibiotica e antimicotica dell' 1%;	3 giorni per 8 ore con un ricambio ogni 2 ore
- Sodio Deossicolato	4 ore in agitazione su piastra orbitale
- Deossiribonucleasi I	3 ore in agitazione su piastra rotante

Tab.5 - Protocollo di Decellularizzazione utilizzato nel precedente lavoro di tesi

Il processo, come si evince dai risultati ottenuti, portava ad una completa decellularizzazione del vaso solo al termine di 4 cicli di ripetizione. Questo metodo ha dimostrato una buona efficacia di decellularizzazione e una bassa influenza sulle proprietà meccaniche della matrice che nonostante tutto non sono ancora quelle ottimali.

Se da una parte la progettazione di dispositivi di automazione del processo possono ovviare al problema del continuo monitoraggio che l'operatore deve sostenere durante tutta la durata dei 4 giorni per ogni ciclo, dall'altra rimane la necessità di diminuire la durata, ancora troppo elevata, del procedimento.

A tal proposito è stato svolto uno studio [44] per la determinazione di un protocollo che sia in grado di produrre un tessuto vascolare decellularizzato che presenti proprietà meccaniche, simili a quelle del tessuto nativo, e che non provochi immunogenicità o trombogenicità all'interno dell'organismo ospite.

Per ottenere risultati soddisfacenti, sono stati testati 3 diversi protocolli che differivano tra di loro sia per tempistiche che per i reagenti utilizzati. I campioni ottenuti poi sono stati

valutati in funzione dei risultati istologici, delle quantificazioni del DNA e delle analisi meccaniche effettuate.

Nei differenti protocolli sono stati combinati i seguenti agenti decellularizzanti:

- Acqua distillata con aggiunta di antibiotici e antimicotici;
- Buffer detergente (BD: NaOH 0,3M, CHAPS 8mM, NaCl 1M, EDTA 25mM, HCl 37%)
- Siero fetale bovino (FBS) al 10% in soluzione fisiologica;
- Siero porcino (PS) a 10% in soluzione fisiologica;
- Sodio deossicolato (DCA) al 4% in acqua distillata sterile;

I 3 metodi sono stati testati per verificare separatamente l'influenza di questi agenti durante il processo. Nel primo si è valutata l'azione dell'acqua distillata e quella dell'FBS, nel secondo quella del siero bovino e di quello porcino e nell'ultimo l'influenza del DCA e del BD.

Nonostante questo studio abbia dimostrato l'equivalente efficacia di tutti i protocolli analizzati da un punto di vista della rimozione cellulare, sono state evidenziate importanti differenze utili nel determinare un protocollo migliore:

- in funzione dei risultati della quantificazione del DNA, il siero fetale bovino si è dimostrato più efficace su una durata di 48 ore rispetto a 24, mentre in entrambi i casi risulta migliore del siero porcino;
- sia dai risultati istologici, dalle quantificazioni del DNA che dalle analisi meccaniche non si sono evidenziate differenze significative sull'utilizzo del Sodio Deossicolato e del Buffer Detergente;
- una durata del protocollo di 3 o 4 giorni è sufficiente ad ottenere una ottimale decellularizzazione del tessuto.

Alla luce di queste considerazioni il protocollo di decellularizzazione utilizzato in questo lavoro di tesi prevede l'utilizzo di:

- 1- Acqua milliQ, purificata e deionizzata ad un alto livello, con aggiunta di antibiotici e antimicotici all'1%. L'acqua distillata si comporta come un agente ipotonico che è

in grado di provocare uno shock osmotico sulle cellule. In questo modo si favorisce la naturale eliminazione di tutta la componente cellulare.

- 2- Sodio Deossicolato (DCA, sale sodico dell'acido deossicolico), è un detergente chimico ionico che lisa le cellule attraverso la solubilizzazione delle membrane, sia quelle cellulari che quelle nucleari, è ottenuto dalla “bile di bestiame” ed ha la tendenza a provocare la denaturazione delle proteine.
- 3- Siero Fetale Bovino (FBS), liquido derivato dalla frazione di plasma che si forma dopo la coagulazione del sangue, in soluzione fisiologica è utilizzato per la distruzione degli acidi nucleici.

AGENTE	AZIONE
- Acqua milliQ con aggiunta di soluzione antibiotica e antimicotica dell' 1%;	24 ore con ricambio ogni 2 ore;
- Sodio Deossicolato (DCA)	24 ore con ricambio ogni 6 ore;
- Siero Fetale Bovino (FBS)	48 ore con ricambio ogni 6 ore;

Tab.6 - Nuovo Protocollo di Decellularizzazione sviluppato in questo lavoro di tesi

Capitolo 3:

PROGETTAZIONE DEL
DISPOSITIVO

1. Introduzione al Dispositivo

Il processo di decellularizzazione di un tessuto biologico può essere definito ottimale se è in grado di promuovere la completa rimozione della componente cellulare e nucleare senza intaccare la fondamentale struttura tridimensionale della matrice extracellulare che determina le proprietà biomeccaniche e biologiche del tessuto stesso.

Come mostrato nel capitolo 2, esistono molteplici soluzioni che attraverso azioni enzimatiche, chimiche o fisiche portano all'ottenimento di un costrutto con caratteristiche adatte alla funzione fisiologica e che non provocano una risposta immunologica in seguito ad un impianto all'interno di un organismo vivente.

Lo sviluppo di un sistema in grado di effettuare questo processo in modo totalmente automatico è un obiettivo fondamentale per la produzione di tessuti acellulari sterili e che possano essere ripetibili e riproducibili, così come previsto dalle norme Good Manufacturing Practice (GMP) per la realizzazione di un prodotto di ingegneria tissutale.

Progettare un sistema per la completa automazione del processo, dove l'unico compito dell'operatore sia quello di collocare il vaso nel dispositivo, rappresenterebbe un'evoluzione importante e significativa.

L'eliminazione dell'intervento manuale infatti andrebbe a ridurre i rischi e gli svantaggi che potrebbero influenzare il corretto risultato dell'operazione.

Le operazioni manuali necessarie al processo, infatti, sono causa di possibili contaminazioni e della scarsa riproducibilità del processo.

Il dispositivo che è stato progettato nel precedente lavoro di tesi, similmente ad un bioreattore finalizzato alla crescita cellulare, deve rispondere a specifici requisiti nel rispetto di prerogative fondamentali per il tipo di applicazione per cui è stato pensato.

Partendo dalle caratteristiche di questo dispositivo e dai risultati delle prove di decellularizzazione automatica effettuate, sono state valutate le seguenti specifiche:

- Automazione;
- Perfusion;
- Condizionamento fisico;
- Versatilità;
- Sterilità;
- Termoregolazione;

- Modularità;
- Autoclavabilità;
- Semplicità di utilizzo;
- Camera di decellularizzazione;

Durante l'analisi, sono stati evidenziati, differenti aspetti per i quali non si aveva una effettiva corrispondenza tra alcune di queste specifiche ed il reale funzionamento durante il processo di decellularizzazione automatica:

Il dispositivo di partenza è costituito da una camera di decellularizzazione, un circuito idraulico e un sistema di controllo.

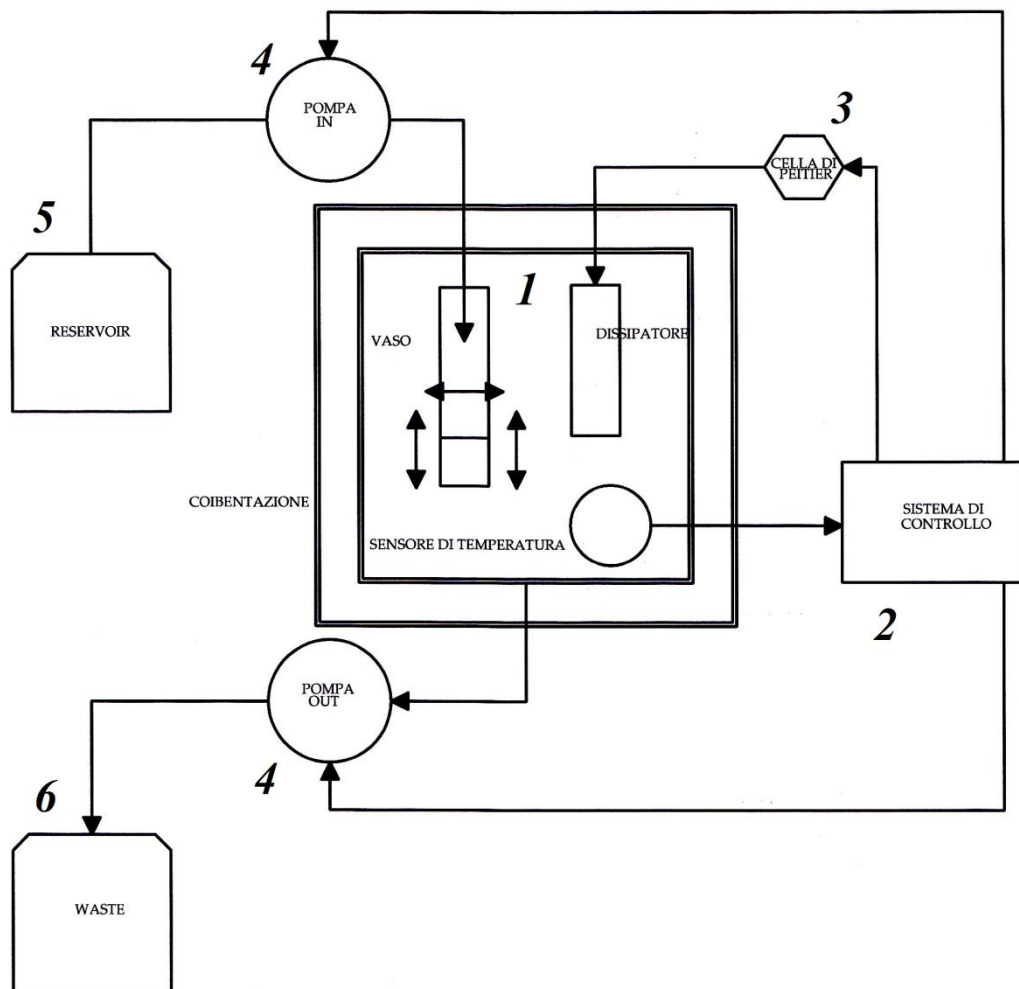


Fig.6 - Schema del sistema progettato: (1) la camera di decellularizzazione nel quale si trovano il vaso fissato agli afferraggi, il dissipatore di calore ed il sensore; (2) sistema di controllo a cui sono collegati sia la cella di Peltier (3) che le due pompe(4). Il circuito idraulico invece è caratterizzato dalla linea che dal reservoir (5) arriva al waste (6), passando per le pompe e la camera.

La camera di decellularizzazione, realizzata in polisulfone, ha una caratteristica forma cilindrica cava che permette l'alloggiamento del tessuto tramite opportuni afferraggi, i quali oltre a permettere il fissaggio del vaso, sono responsabili della perfusione durante il processo di decellularizzazione. Gli afferraggi sono di due tipi: uno prossimale, responsabile del fissaggio e della perfusione, e uno distale, responsabile del condizionamento meccanico ciclico.



Fig.7 - A sinistra è raffigurato l'afferraggio distale ed il particolare del foro responsabile della perdita di carico e a destra l'afferraggio prossimale con il filetto che permette il fissaggio al coperchio della camera e il collegamento per il tubo del circuito idraulico

La camera presenta due fori: uno nella parte terminale in basso che favorisce lo svuotamento e uno sulla parete laterale, all'interno del quale è inserito il sensore di temperatura. Nella camera, oltre al sensore di temperatura necessario per il monitoraggio costante durante i protocolli che prevedono un ambiente termostato, è presente anche un dissipatore di calore fissato all'interno attraverso il coperchio.

Il dissipatore di calore che trasmette il calore all'interno della camera è collegato ad una Cella di Peltier, una pompa di calore, che riscalda o raffredda il dissipatore in funzione della tensione che agisce ai capi dei semiconduttori che costituiscono la cella.

Il circuito idraulico preposto al ricambio delle sostanze decellularizzanti è costituito da un sistema di tubi collegati a due pompe peristaltiche. La prima permette il riempimento della camera tramite un tubo che collega il reservoir con la camera, mentre lo svuotamento, attuato dalla seconda pompa, avviene tramite un tubo che collega la camera con il waste.



Fig.8 - Circuito idraulico realizzato nel precedente lavoro di tesi caratterizzato da un'unica linea idraulica per il riempimento e per lo svuotamento

Questo sistema non è ottimale in protocolli in cui il ricambio della sostanza è molteplice e frequente e in cui si vuole sfruttare l'azione di un numero maggiore di sostanze. In questo caso, l'operatore sarebbe obbligato ad un monitoraggio costante del dispositivo per provvedere sia alla sostituzione del reservoir contenente la sostanza desiderata, sia all'attivazione del dispositivo nel momento in cui è necessario lo svuotamento e il conseguente riempimento della camera.

Questo aspetto contrasta con le caratteristiche del dispositivo che si vuole progettare e che nasce con l'obiettivo principale di rendere automatico l'intero processo di decellularizzazione che alternativamente deve essere svolto in maniera manuale.

L'aspetto importante è quello di produrre un circuito idraulico, guidato da un sistema di controllo, in grado di effettuare il ricambio all'interno della camera delle diverse sostanze a

cui il campione deve essere sottoposto in funzione di quello che viene stabilito dal protocollo e delle caratteristiche del sistema stesso.

Il ricambio deve avvenire in maniera completamente automatica per tutte le sostanze che caratterizzano il protocollo di decellularizzazione. Inoltre, è necessario che queste operazioni vengano svolte in funzione di tutti quei parametri di controllo che stanno alla base del funzionamento del sistema.

Uno dei principali aspetti per l'ottimizzazione del dispositivo è stato quindi lo sviluppo di un circuito idraulico costituito da 3 linee in grado di riempire la camera con 3 diversi agenti decellularizzanti senza intervento dell'operatore.

Il progetto consiste in un sistema di tubi in parallelo, ognuno dei quali inserito nel rispettivo reservoir, che preleva la sostanza specifica in funzione del processo di decellularizzazione scelto, lasciando un'unica linea di svuotamento che raccoglie le sostanze di scarico nel waste.

È stato realizzato, con questo obiettivo, un sistema di elettrovalvole comandate dall'unità di controllo, in grado di attivare la linea idraulica responsabile del flusso della sostanza desiderata.

Nel precedente lavoro di tesi il cambio di sostanza è stato effettuato tramite una siringa. Il circuito idraulico era fornito di particolari rubinetti a tre vie dotati di accessi a membrana che permettono l'inserimento dell'ago. Il rubinetto è stato usato per creare un'accesso al circuito preservando la condizione di sterilità.

Nonostante questa precauzione, che comunque non elimina definitivamente la possibilità di un contatto con l'esterno, l'intervento dell'operatore rimane una limitazione del funzionamento del sistema soprattutto nei confronti delle norme GMP. In questo modo, il prodotto finale non sarebbe realizzato con un processo completamente automatico non rispettando i requisiti di ripetibilità e riproducibilità, oltre a quello di sterilità, richiesti al sistema.

Il rispetto di questi requisiti di fatto è fortemente dipendente dalle manipolazioni svolte dall'operatore.

Qualsiasi contatto con l'ambiente esterno o con elementi infetti può essere fonte di contaminazione in virtù del fatto che spesso i costrutti rappresentano un buon supporto per la contaminazione batterica.

Creare un sistema in cui si assicura la completa sterilità durante tutto il processo porta a ridurre notevolmente questo rischio con risultati più soddisfacenti. Per ottenere questo è necessario che il dispositivo possa essere utilizzato in condizioni sterili e che venga mantenuta questa sterilità nel tempo, evitando contatti diretti e indiretti con l'ambiente circostante durante tutto il tempo di utilizzo.

Durante la progettazione delle componenti idrauliche si è prestata molta attenzione a questo aspetto. Per la realizzazione delle differenti linee del circuito sono stati sfruttati dei connettori di tipo Luer-Lock e Barbed che costituiscono dei raccordi in grado di assicurare la completa tenuta del sistema. Per le elettrovalvole invece sono state effettuate delle scelte costruttive in modo da svolgere l'azione di pinzaggio all'esterno del tubo senza entrare in contatto con il fluido.

Lo sviluppo di un sistema completamente automatico affiancato all'uso di componenti sterilizzati e montati sotto cappa a flusso laminare ridurrebbe notevolmente il rischio di eventuali colonizzazioni batteriche.

Per questo è necessario che si prevedano il minor numero di manovre manuali possibili. Inoltre, il completo isolamento del sistema dall'esterno, permette il mantenimento della sterilità durante lo svolgimento di tutta l'operazione.

La realizzazione del sistema di elettrovalvole ha permesso di non introdurre ulteriori pompe all'interno del circuito. Questo ha ridotto il numero di tubi necessari a creare un ricambio automatico di differenti sostanze diminuendo di conseguenza anche il numero di connessioni necessarie per l'assemblaggio dei vari condotti.

È necessario, inoltre, che la progettazione del sistema venga fatta scegliendo materiali a cui è facilmente applicabile un qualunque processo di sterilizzazione. Per la semplicità di utilizzo e la sua efficacia si è deciso di usare la sterilizzazione in autoclave e quindi i materiali sono stati valutati in funzione di questo.

Nella definizione delle scelte costruttive per la realizzazione del circuito idraulico inoltre si è tenuto conto del rispetto del requisito di modularità del sistema, prerogativa importante sia in fase di progettazione che di utilizzo.

Un sistema modulare infatti permette la semplice sostituzione o lo sviluppo di specifici componenti escludendo la completa riprogettazione del sistema nella sua interezza, permettendo anche l'immediata risoluzione di problemi dovuti al danneggiamento di alcune parti del dispositivo.

Durante lo sviluppo, infatti, sia le linee idrauliche che quelle elettriche sono state progettate in modo da poter funzionare in parallelo, cioè in modo indipendente dalle altre. La costruzione ha previsto connessioni e interruttori utili sia a prevenire possibili danneggiamenti dei componenti che a rendere semplice l'eventuale sostituzione all'interno del sistema.

Il circuito idraulico e il sistema di termoregolazione, che si basa sul funzionamento del modulo di Peltier, sono controllati da un microcontrollore, ARDUINO UNO, opportunamente programmato.

La gestione dell'intero sistema, nel lavoro di tesi precedente, è stata realizzata tramite un codice di programmazione statico in grado di eseguire il ricambio della sostanza ogni due ore e di mantenere la temperatura entro un intervallo stabilito. Questo aspetto presenta una limitazione importante nell'utilizzo del dispositivo e della sua applicabilità in ambito clinico, in cui sarebbe prevista una riprogrammazione per ogni modifica del protocollo.

La progettazione, invece, deve essere effettuata con l'obiettivo di realizzare un dispositivo in grado di condurre il processo indipendentemente dal tipo di protocollo stabilito per la decellularizzazione.

Questo implica considerazioni importanti per la modifica delle impostazioni di base.

Il sistema di controllo quindi è stato riprogrammato in modo da permettere ad un operatore la modifica del tipo e il numero dei reagenti, nonché delle tempistiche e delle temperature di lavoro. È stato realizzato un sistema che permette la semplice modifica dei parametri di funzionamento senza la necessità di implementare, per ogni protocollo sperimentale, nuovi codici di programmazione.

Il microcontrollore è stato riprogrammato tramite un codice dinamico in grado di permettere all'operatore di variare il numero di sostanze agenti, le tempistiche di azionamento delle pompe e l'intervallo di temperature all'interno del quale si deve mantenere il sistema.

In questo modo è stata creata una funzione dalle caratteristiche semplici e intuitive che favorisce l'adattabilità di questo dispositivo a qualsiasi protocollo di decellularizzazione.

È importante aver un sistema "user-friendly" che rende l'utilizzo e l'impostazione dei parametri di funzionamento d'immediata interpretazione, soprattutto nell'eventualità di una futura applicazione clinica.

2. Soluzioni Tecnologiche

Lo sviluppo del dispositivo si è concentrato su aspetti che sono stati valutati come elementi di limitazione del corretto funzionamento del dispositivo realizzato nel lavoro di tesi precedente.

- ✓ Linea idraulica realizzata per il ricambio automatico di una sola sostanza;
- ✓ Cambio della sostanza all'interno del reservoir effettuato manualmente;
- ✓ Codice di controllo del sistema non versatile a differenti protocolli di decellularizzazione;

L'obiettivo finale è stato quello di sviluppare ulteriori sistemi di controllo e gestione per aumentare le capacità di automazione del processo e di modificare o sviluppare le componenti già presenti al fine di ottenere un dispositivo in grado di produrre un costrutto biologico nel rispetto di tutte le norme e le specifiche richieste al sistema.

Il primo passo è stato quello di realizzare un circuito idraulico costituito da differenti linee di flusso che permettessero al dispositivo di lavorare con più sostanze, senza che fosse necessario l'intervento dell'operatore nel ricambio della sostanza.

La progettazione del circuito è stata effettuata dividendo la linea idraulica tramite opportune connessioni in modo da creare una triforcazione a monte della pompa di riempimento. In questo modo si è realizzato un sistema con un solo tubo nel tratto del circuito tra la pompa e la camera, e tre tubi nel tratto che collega i tre reservoir con la pompa stessa.

La scelta di utilizzare solo tre linee idrauliche è stata considerata adeguata in funzione del tipo di protocollo con cui sarebbe stata effettuata la sperimentazione.

Questa scelta comunque è sembrata un buon compromesso tra le necessità del processo e la semplicità di realizzazione, in considerazione del fatto che in letteratura non sono stati trovati protocolli di decellularizzazione che sfruttassero un numero maggiore di sostanze.

La triforcazione permette un collegamento diretto tra la camera e i diversi reservoir in cui sono presenti le sostanze necessarie alla decellularizzazione. Di conseguenza, la sostanza usata per il riempimento della camera varia a differenza del singolo tubo da cui questa viene prelevata.

Il riempimento della camera con una specifica sostanza è determinato da singole elettrovalvole situate su ogni tubo e comandate dal sistema di controllo cui sono a loro volta collegate. Ogni elettrovalvola è quindi azionata in base al processo di decellularizzazione e alle relative impostazioni del software. Il sistema, infatti, segue questo processo in base ai parametri definiti in ingresso alla funzione che governa il microcontrollore. L'azionamento dell'elettrovalvola, tramite la sua apertura, determina la pervietà del tubo che si inserisce nello specifico reservoir e contenente la sostanza stabilita dal protocollo.

Inoltre, per permettere il corretto funzionamento del sistema, senza che un continuo intervento dell'operatore sia necessario, è stato sviluppato un codice di programmazione in grado di guidare tutti gli elementi del dispositivo in completa autonomia.

Il software utilizzato è in grado di determinare l'azionamento delle pompe in funzione ai tempi di riempimento e svuotamento della camera, di attivare l'elettrovalvola specifica in base alla sostanza necessaria ad ogni step e di controllare contemporaneamente la temperatura della camera attivando, quando serve, il sistema di raffreddamento o di riscaldamento generato dalla cella di Peltier.

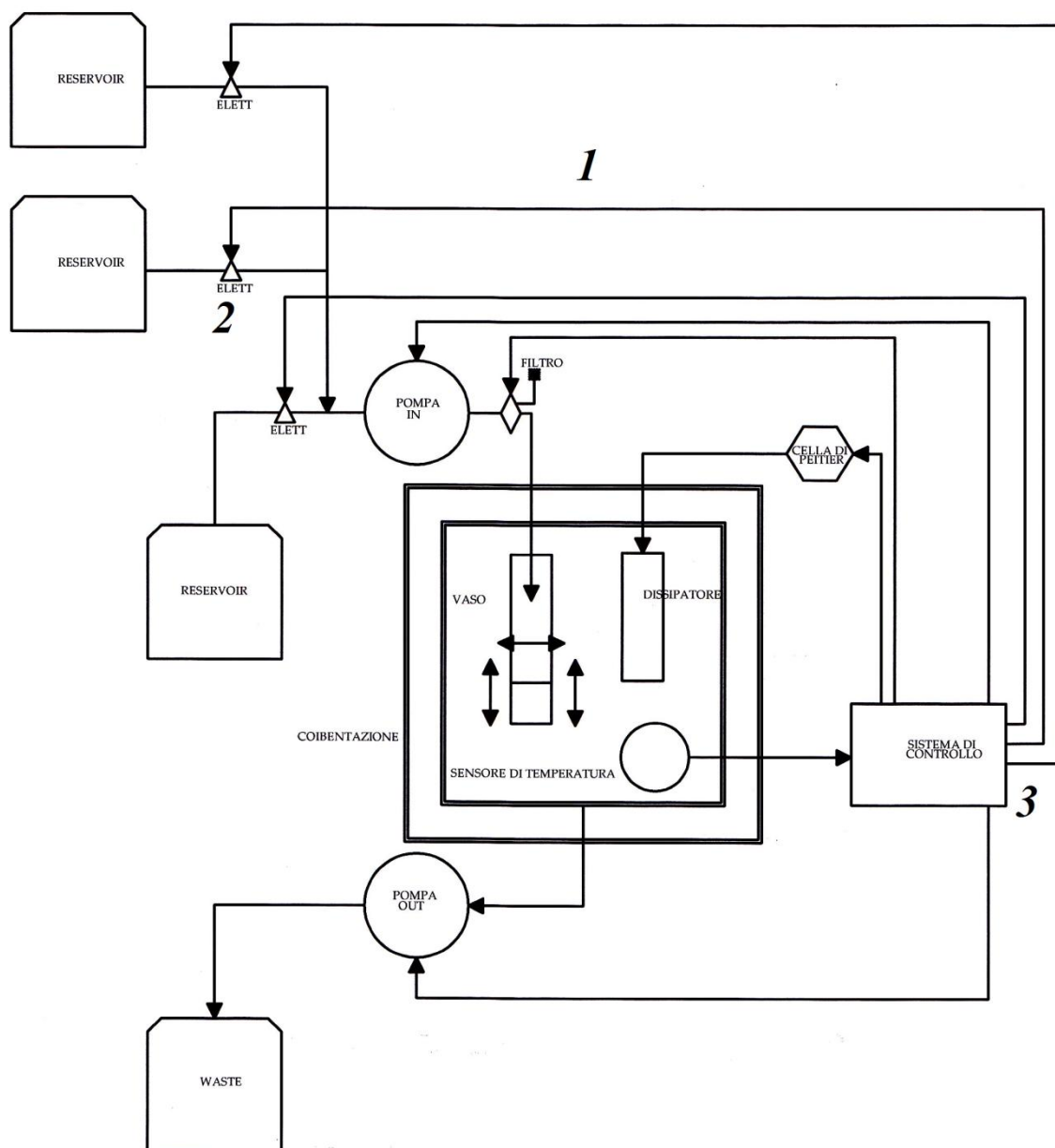


Fig.9 - Schematizzazione del sistema sviluppato in questo lavoro. Oltre agli elementi raffigurati precedentemente sono presenti le due linee aggiuntive del circuito(1), l'elettrovalvole (2) ed i rispettivi collegamenti con il sistema di controllo (3).

2.1 Circuito Idraulico

L'obiettivo fondamentale del dispositivo realizzato è quello di eseguire il ricambio della sostanza decellularizzante all'interno della camera in cui è contenuto il tessuto da trattare.

Per realizzare ciò è necessario prelevare la corretta quantità di una determinata sostanza, la quale è poi immessa nella camera e lasciata agire secondo i tempi previsti dal protocollo. Terminata la sua funzione, la sostanza deve essere rimossa e smaltita nel waste.

Il dispositivo precedentemente progettato prevedeva già il processo base per il riempimento e lo svuotamento del sistema. Questo avviene mediante l'utilizzo di due pompe uguali, delle quali una riempie il sistema prelevando la sostanza dal reservoir e mandandola nel tubo collegato alla camera, mentre la seconda permette lo smaltimento dell'agente decellularizzante all'interno di un waste, elemento terminale del circuito stesso.

Si utilizzano pompe peristaltiche WPM2 prodotte dall'azienda WELCO con tubi PHARMED BPT® con diametro interno di 1.6 mm e diametro esterno di 3.2. Ogni pompa è azionata grazie ad un motore in corrente continua (DC) collegato al sistema di controllo, una soluzione semplice e che permette di mantenere la sterilità del sistema, grazie al fatto che le pompe sono sterilizzabili e non vengono mai a contatto con il liquido.

Questa soluzione tuttavia permette il passaggio automatico di una sola sostanza e per l'uso di un altro agente è necessario il ricambio del reservoir, in quanto questo sistema idraulico è costituito da un'unica linea che collega il reservoir con la pompa di riempimento, successivamente con la camera ed infine con il waste. Questo circuito quindi non permette di prelevare automaticamente altre sostanze che non sia quella presente nel reservoir collegato al momento dell'assemblaggio.

Il nuovo progetto è incentrato sulla realizzazione di un circuito idraulico costituito da un maggiore numero di reservoir, a seconda del numero delle sostanze previste dal protocollo, e da un numero maggiore di linee del circuito stesso.

L'idea di partenza è stata quella di costruire un circuito idraulico completo per ogni sostanza necessaria alla decellularizzazione del tessuto, collegato singolarmente alla camera.

Questa soluzione sarebbe stata realizzata utilizzando un sistema di pompaggio specifico per ognuno dei circuiti necessari. Sia l'idea che la realizzazione di questo sistema sono

inizialmente sembrati idonei sia per la semplicità di progettazione che per efficacia nel funzionamento del dispositivo.

Tuttavia, l'uso di una pompa diversa per ognuno dei circuiti realizzati non è stato sostenibile all'interno del nostro sistema. Il problema della gestione di un numero elevato di motori da parte del microprocessore è stato impraticabile considerando il numero limitato di collegamenti possibili con le porte di INPUT e OUTPUT della scheda. Ogni pompa infatti riceve in ingresso due segnali in grado di gestirne l'attivazione e il senso di rotazione. Questo significa che per sfruttare 4 pompe sarebbe stato necessario avere a disposizione 8 porte di connessione con il microcontrollore. Questa necessità va oltre le capacità della scheda elettronica usata per il sistema di controllo considerando anche che il segnale di attivazione della pompa (PWM) può essere generato solo da pochi pin tra quelli presenti. Il PWM è un particolare tipo di segnale Pulse-Width Modulation che è un tipo di modulazione in grado di produrre una tensione media variabile necessaria a non sovraccaricare i motori. Infine, il sistema di tubi complessivo risulterebbe molto lungo, andando ad aumentare notevolmente il volume di priming, gli ingombri e le operazioni di montaggio sotto cappa.

Per risolvere i problemi riscontrati, la progettazione ha seguito un'altra direzione di sviluppo. La soluzione costruttiva pensata, prevede un circuito costituito da un'unica pompa nella quale si inseriscono, tramite una specifica connessione, i tubi costituenti la linea idraulica di ogni reservoir. Il lavoro si è quindi concentrato sulla creazione di un sistema di valvole in grado di selezionare la sostanza necessaria al corretto svolgimento del processo di decellularizzazione, utilizzando una sola pompa di pescaggio.



Fig.10 - Circuito idraulico: (1) connessioni Luer-Lock e (2) connettori barbed necessari per la divisione del circuito in differenti linee.

In questo modo, è stato possibile risolvere efficacemente sia il problema degli ingombri che quello della gestione delle pompe con il solo microcontrollore.

Per realizzare un sistema idraulico caratterizzato da un numero maggiore di linee è stato necessario trovare una configurazione adeguata in cui il funzionamento delle valvole permettesse il corretto svuotamento della linea e, contemporaneamente, potesse evitare il miscelamento delle singole sostanze nei tratti in cui le diverse linee si uniscono tra di loro all'interno della pompa di pescaggio.

Sono state valutate differenti opzioni al fine di ottenere l'obiettivo preposto, tra le quali si è scelta quella che dava maggiori garanzie sul corretto funzionamento dei vari elementi.

La configurazione del circuito è stata pensata in modo tale da poter effettuare lo svuotamento pompando la sostanza all'interno del reservoir con un flusso.

Il circuito ideato (fig.11) seguendo questo concetto di partenza si è dimostrato efficace in tutti gli aspetti e di più semplice realizzazione.

Per la progettazione sono state utilizzate:

- Quattro valvole per l'apertura e la chiusura di ogni tratto del circuito;
- Una presa d'aria, introdotta tra la pompa e la camera, per permettere il flusso all'interno della linea anche durante la chiusura della valvola;

Durante il riempimento, sia la valvola responsabile della selezione della sostanza che quella posizionata a valle della pompa, sono aperte permettendo il passaggio diretto verso la camera, mentre le altre sono chiuse impedendo il flusso delle altre sostanze. In questo modo durante il funzionamento della pompa si crea un flusso diretto tra il reservoir e la camera di decellularizzazione.

Lo svuotamento è realizzato tramite l'azionamento della stessa pompa in direzione contraria a quella di riempimento, in questo modo è possibile far fluire la sostanza nel verso opposto, facendola tornare nello specifico reservoir di origine. Durante lo svuotamento, infatti, la pompa relativa al reservoir di origine rimane aperta mentre quella presente sul tratto di circuito tra la pompa e la camera si chiude.

L'attivazione della pompa nella direzione opposta spingerà la sostanza presente nelle linee all'interno del circuito riempiendole di aria. L'aria introdotta non è quindi a carico della camera e di conseguenza del tessuto, ma del reservoir capace di espellerla attraverso il filtro presente sul tappo del contenitore.

La possibilità di creare un reflusso della sostanza all'interno delle altre linee è impedito dalle valvole che, essendo disattivate, si trovano in configurazione chiusa. In questo modo, anche durante il riempimento, si crea una resistenza al flusso nelle linee in cui non si vuole avere il passaggio della sostanza. La chiusura dell'elettrovalvola infatti si traduce all'interno del condotto in una resistenza infinita che impone una direzione preferenziale verso la linea su cui agisce l'elettrovalvola aperta. Questo meccanismo è ottimizzato inoltre posizionando le valvole il più vicino possibile al punto in cui convergono le 3 linee.

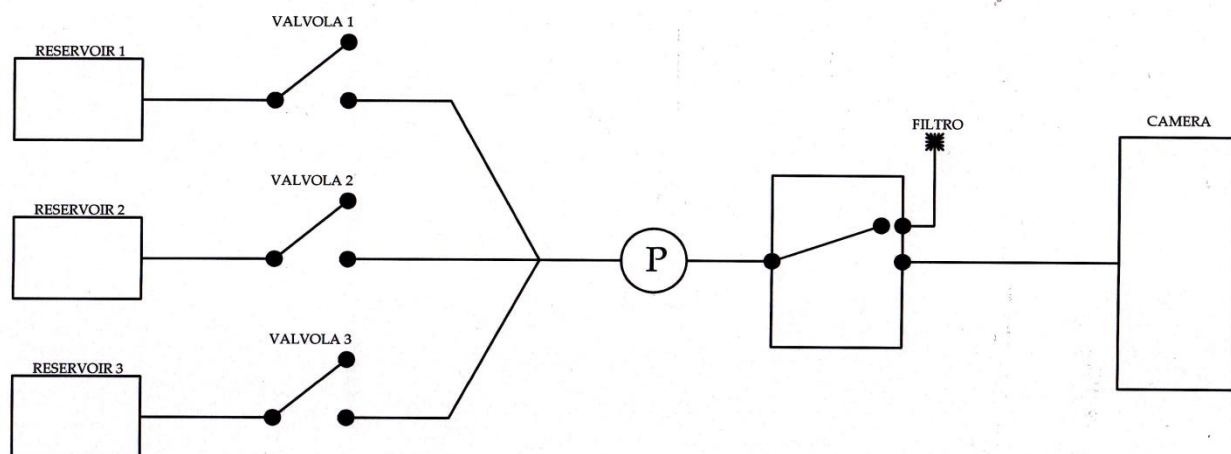


Fig.11 - Il circuito in questo schema rappresenta la soluzione adottata dove si può notare la presenza di un filtro d'aria.

		RIEMPIMENTO	SVUOTAMENTO LINEA	SVUOTAMENTO CAMERA
SOSTANZA 1	Valvola1	ON	ON	OFF
	Valvola2	OFF	OFF	OFF
	Valvola3	OFF	OFF	OFF
	ValvolaP	OFF	ON	OFF
	Pompa1	ORARIO	ANTIORARIO	OFF
	Pompa2	OFF	OFF	ORARIO
SOSTANZA 2	Valvola1	OFF	OFF	OFF
	Valvola2	ON	ON	OFF
	Valvola3	OFF	OFF	OFF
	ValvolaP	OFF	ON	OFF
	Pompa1	ORARIO	ANTIORARIO	OFF
	Pompa2	OFF	OFF	ORARIO
SOSTANZA 3	Valvola1	OFF	OFF	OFF
	Valvola2	OFF	OFF	OFF
	Valvola3	ON	ON	OFF
	ValvolaP	OFF	ON	OFF
	Pompa1	ORARIO	ANTIORARIO	OFF
	Pompa2	OFF	OFF	ORARIO

Tab.7 - Principio di funzionamento del ricambio delle 3 sostanze presenti all'interno dei reservoir durante un generico protocollo di decellularizzazione

Il ciclo descritto rappresenta la fase di ricambio per una specifica sostanza che viene ripetuta in funzione del numero di sostanze impostate nel software di controllo.



Fig.12 - Circuito idraulico completo costituito dai reservoir (1) in Pyrex®, dai tubi (2) Pharmed BPT®, dalle pompe (3), dalla camera di decellularizzazione (4) e il waste (5).

Il circuito idraulico è stato costruito utilizzando tubi Pharmed BPT® che possiedono la certificazione medical Grade, mentre bottiglie in vetro Pyrex® sono state usate per realizzare il waste e il reservoir. Le bottiglie sono chiuse con tappi GL45 modificati in grado di permettere una connessione sterile con i tubi. Su questi tappi sono presenti tre ingressi che sotto cappa, in totale sterilità, permettono l'inserimento del tubo della linea idraulica, di un filtro che permette lo scarico d'aria durante lo svuotamento del circuito e di un tappo.

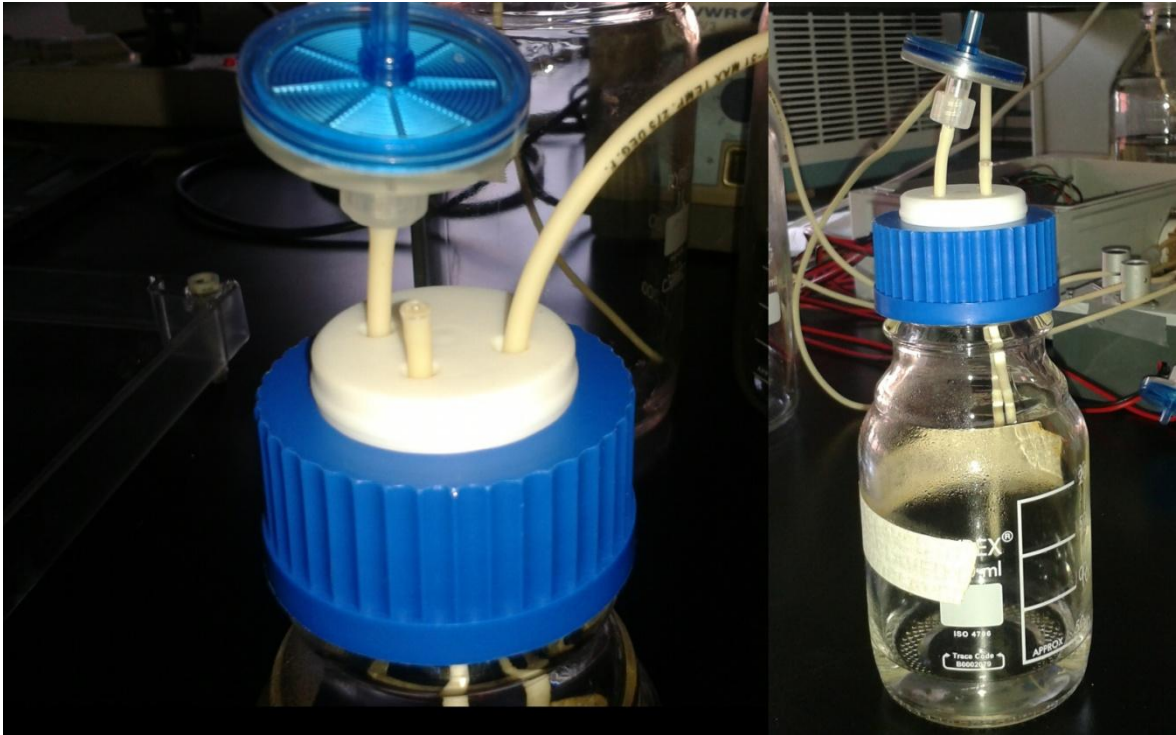


Fig.13 - Tappo GL45 usato sia per i reservoir che per il waste con cui assicuriamo la tenuta e la sterilità dei componenti, si può notare il particolare del filtro d'aria 0.22 micron

2.2 Gestione delle Elettrovalvole

Il circuito idraulico è stato progettato per effettuare il ricambio del reagente in modo completamente automatico, anche qualora il protocollo di decellularizzazione preveda l'utilizzo di differenti reagenti all'interno dello stesso processo.

Nella configurazione progettata, le valvole costituiscono un elemento fondamentale, dal momento che sono le principali responsabili sia della corretta selezione della sostanza da prelevare sia del completo svuotamento del circuito. Per raggiungere l'obiettivo preposto in questa progettazione si è scelto di usare delle elettrovalvole.

L'elettrovalvola svolge la stessa azione di un rubinetto che consente, in base al suo stato, il passaggio di un generico fluido all'interno del tubo attraverso il varco determinato dalla stessa valvola. Questa valvola si distingue dalle altre per il tipo di attuatore dell'azionamento meccanico che sta alla base della valvola, che solitamente è rappresentato da un operatore umano o da un rinvio meccanico predisposto mentre in questo caso è sostituito da un attuatore elettrico, comunemente costituito da un solenoide che può essere azionato da un semplice segnale elettrico.

Usando valvole ad attuatore elettrico è stato possibile gestire, tramite il sistema di controllo già presente all'interno del dispositivo, la loro azione e, con essa, il ricambio automatico delle sostanze,.

La scelta del tipo di elettrovalvola è stata svolta tenendo conto dei requisiti necessari al suo utilizzo:

- Utilizzo in ambiente sterile. A tal proposito sono state prese in considerazione le elettrovalvole pinza-tubo. Queste valvole presentano un organo di pinzaggio che viene azionato da un attuatore di tipo elettromagnetico che intercetta il fluido premendo o rilasciando il tubo morbido inserito al suo interno. Non si ha, in questo modo, nessun contatto diretto tra liquido e valvola. Con questo meccanismo il flusso può avvenire indistintamente nelle due direzioni con alti coefficienti di efflusso, senza eccessive perdite di carico, turbolenze o spazi morti che sono spesso causa di fenomeni di ristagno della sostanza. Queste valvole sono in grado di eseguire il controllo di tutti i fluidi necessari e compatibili con il materiale usato per il tubo, preservandoli da qualunque tipo di contaminazione. In aggiunta, la facilità di inserimento e di sostituzione del tubo, conferisce a questa valvola le

caratteristiche ideali per applicazioni delicate, quali quella necessaria al dispositivo in oggetto.

- Dimensioni ridotte. Dimensioni eccessive del dispositivo determinano un aumento considerevole dell'ingombro complessivo del sistema andando ad inficiare la sua versatilità e semplicità di utilizzo, prerogative importanti per il suo sfruttamento in applicazioni cliniche.
- Assorbimento di potenza. La potenza assorbita dalle singole elettrovalvole è fondamentale perché in funzione di questo si deve svolgere una serie di scelte costruttive che permettono l'interfaccia con ARDUINO. I pin del microcontrollore usato in questo lavoro, configurati come OUTPUT, sono in grado di fornire ad altri dispositivi o circuiti una corrente di 20 mA che non è sufficiente a pilotare una qualunque elettrovalvola. È necessario, pertanto, considerare un elemento che trasformi il basso amperaggio in uno maggiore in grado di generare una potenza adeguata al funzionamento del sistema.

Le elettrovalvole utilizzate sono una delle versioni prodotte dall'azienda italiana SIRAI (Datasheet in appendice), le elettrovalvole pinza-tubo, che a differenza delle altre valvole, sono capaci di controllare l'erogazione e l'intercettazione di un fluido senza un contatto diretto. Il tubo infatti è il solo materiale a contatto con il fluido stesso. Questa particolarità rende, quindi, possibile l'utilizzo delle elettrovalvole pinza tubo in applicazioni sterili.

Questo modello è adatto in particolare per l'uso di tubi morbidi in Silicone o altri equivalenti come elasticità o durezza. Le pressioni sono collegate alla natura stessa del tubo scelto, allo spessore della parete del tubo e alle potenze degli elettromagneti che costituiscono l'elettrovalvola. Dall'analisi delle caratteristiche tecniche si è evidenziato che le potenzialità di questo dispositivo erano adeguate al sistema idraulico.

La struttura portante è in alluminio anodizzato mentre l'organo di pinzaggio è in POM (poliossimetilene), un polimero termoplastico che è stato rinforzato con fibra di carbonio.

Inoltre, la casa costruttrice assicura una lunga durata dei tubi morbidi, poiché l'organo di pinzaggio è stato studiato e realizzato per operare dolcemente e con uno sforzo equilibrato.

In particolare, sono stati usati due modelli differenti di elettrovalvole pinza-tubo:

- 3 ELETTRIVALVOLE 2/2 NC, sono elettrovalvole a 2 vie normalmente chiuse e utilizzate per aprire o chiudere il passaggio nel tratto idraulico tra il reservoir e la pompa;
- ELETTRIVALVOLA 2/3 NA, è un'elettrovalvola a 3 vie normalmente aperta e in grado di permettere o impedire il passaggio di due differenti flussi. In questo lavoro si è usata questa valvola per regolare il flusso nella parte del circuito tra la pompa, la camera e il rispettivo filtro d'aria.

Entrambi i dispositivi sono costituiti da un corpo della valvola di 16 mm di diametro in grado di lavorare con tubi di diametro interno ed esterno compresi rispettivamente tra un minimo di 1.98 mm e un massimo di 3.18 mm, grandezze congruenti con quelle degli elementi usati per il circuito idraulico. In queste condizioni il magnete può generare una forza di pinzaggio pari a 0.18 Kg per un assorbimento complessivo di 6 W.

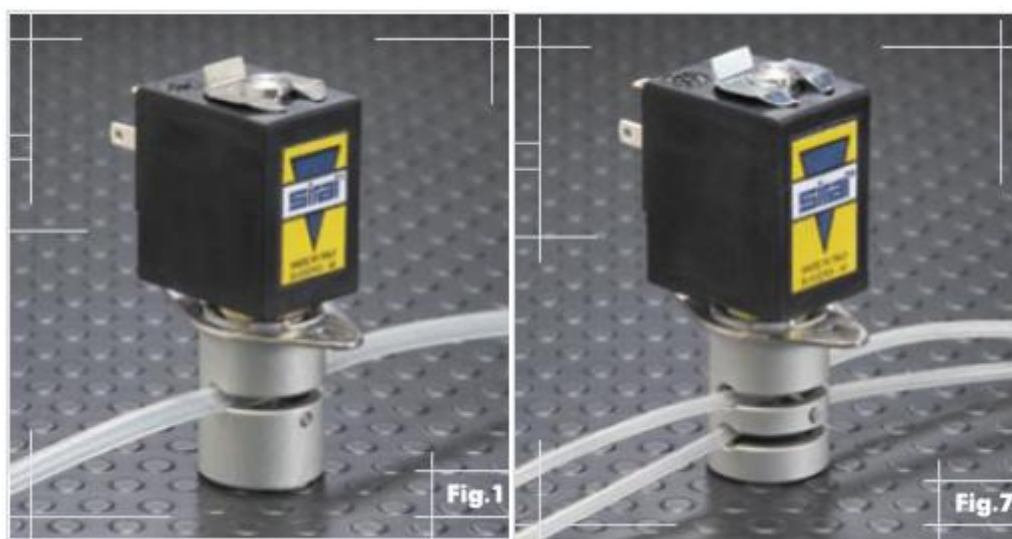


Fig.14 - Elettrovalvole Sirai a 2 vie (1) ed a 3 vie (7). Per entrambi i dispositivi si possono notare le connessioni elettriche ad innesto rapido, l'organo di pinzaggio, un'apertura nella parte superiore che consente il controllo visivo della posizione e la staffa di fissaggio.

Per quanto riguarda la connessione delle elettrovalvole con il microcontrollore la scelta è ricaduta su una scheda elettronica, Relay Shield, compatibile con il processore Arduino e capace di pilotare, carichi in tensione elevata grazie a 4 canali indipendenti costituiti da altrettanti relè elettromeccanici protetti con foto accoppiatore. Il controllo dei 4 canali è guidato tramite i pin 5,6,7 e 8 di Output/Input digitali della scheda Arduino.

Lo shield è una scheda simile a quella che caratterizza il microcontrollore, ma rappresenta un'espansione del sistema centrale stesso e permette di svolgere funzioni aggiuntive senza

dover progettare un ulteriore circuito elettrico. Esistono diverse shield come, ad esempio, quella usata nel lavoro precedente che regolava i motori necessari al funzionamento delle pompe.

Il relè è un dispositivo elettromeccanico costituito da un avvolgimento di rame e da uno o più contatti meccanici. L'avvolgimento è costituito da una bobina che, se alimentata, spinge verso il basso un'astina metallica presente sulla bobina. L'astina è a sua volta collegata al contatto (C) chiamato solitamente "comune", mentre gli altri due sono definiti "normalmente aperto" (NA) e "normalmente chiuso" (NC). Quando la bobina è alimentata si comporta come un elettromagnete che spinge verso il basso l'astina spostando il contatto C verso destra. In questo modo C non è più a contatto con NC, ma entra in contatto con NA, permettendo il passaggio di corrente tra i due elementi metallici. Quando la bobina non è più alimentata, il sistema torna nella configurazione iniziale, impedendo il passaggio di corrente. Il sistema è normalmente regolato da dispositivi che generano segnali a bassa tensione e i suoi contatti metallici sono collegati ad un circuito di utilizzazione.

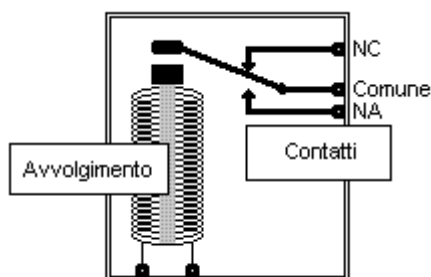


Fig.15 - Parti costituenti di un relè: la bobina (Avvolgimento), l'astina mobile di metallo ed i contatti (NC, Comune,NA).

Il relè può essere visto come un interruttore che, attraverso un comando elettrico, permette di chiudere o aprire un circuito in grado di generare voltaggi e correnti più alte di quelle che Arduino può gestire. Il relè è attivato quando l'input raggiunge i 5V, segnale output del microcontrollore, e si disattiva nel momento in cui l'input è 0V.

Il sistema di attivazione dell'elettrovalvola è guidato dalla Relay Shield tramite un circuito di pilotaggio costituito da un transistor che lavora in commutazione, come un interruttore ON/OFF. Il suddetto circuito è riportato nel diagramma della scheda:

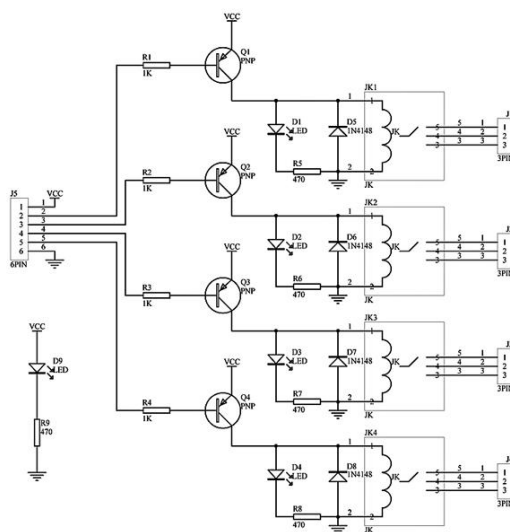


Fig.16 - Diagramma del circuito che costituisce la Relay Shield. Ogni linea è caratterizzata da un'ingresso derivante dal pin di Arduino e da un'uscita che è collegata all'elettrovalvola, Tra ingresso ed uscita si nota la serie tra transistor e relè.

Il transistor è un componente elettrico costituito da 3 terminali: il collettore, la base e l'emettitore. I transistor di bassa potenza hanno il principale scopo di interruttori ON/OFF o di amplificatori di segnale.

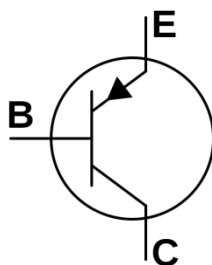


Fig.17 - Simbologia di un generico transistor costituito dal collettore (C), dalla base (B) e dall'emettitore (E).

Il segnale che riceve il transistor della Relay Shield al momento della chiusura è un segnale con una tensione di 5V a bassa corrente, circa 8 mA. Attraverso la resistenza R1, R2, R3 o R4, una debole corrente, circola all'interno del circuito di base (B).

Se questa corrente fosse nulla, anche la corrente nel collettore (C) e quella uscente dall'emettitore (E) sarebbero nulle. Quando la corrente nella base è diversa da zero e sufficiente a portare in conduzione il transistor, si innesca il passaggio di una corrente più grande attraverso il circuito di collettore dovuta alla tensione di ingresso della scheda stessa (VCC).

Si osserva, quindi, come con una corrente di pochi milliampere si può generare una corrente molto più grande che è mandata in ingresso al relè.

Il diodo D5, D6, D7 e D8 messo in antiparallelo alla bobina del relè è definito *diodo di circolazione* ed è usato sempre in circuiti che pilotano carichi induttivi. Quando il segnale di ingresso alla scheda si porta a livello basso, infatti, la corrente nel collettore che attraversa la bobina del relè subisce una brusca diminuzione. La bobina in questo caso tende ad impedirla attraverso un aumento della tensione ai capi dell'avvolgimento. Questo significa che si crea un aumento della tensione che agisce su collettore, essendo il transistor spento come una resistenza elevata in cui il relè cerca di far passare una corrente. Questa tensione, senza il diodo che costituisce un percorso di scarica, potrebbe danneggiare il transistor stesso.

La Relay Shield ha una particolare struttura che permette il montaggio a castello sulla scheda principale, creando un collegamento elettrico diretto, anche se è necessaria una sorgente esterna a 12VDC per l'alimentazione corretta delle bobine che costituiscono i relè. Questo tipo di connessione, che condivide i pin con Arduino, ha reso possibile anche l'ottimizzazione dello spazio e delle connessioni necessarie al corretto funzionamento del dispositivo.

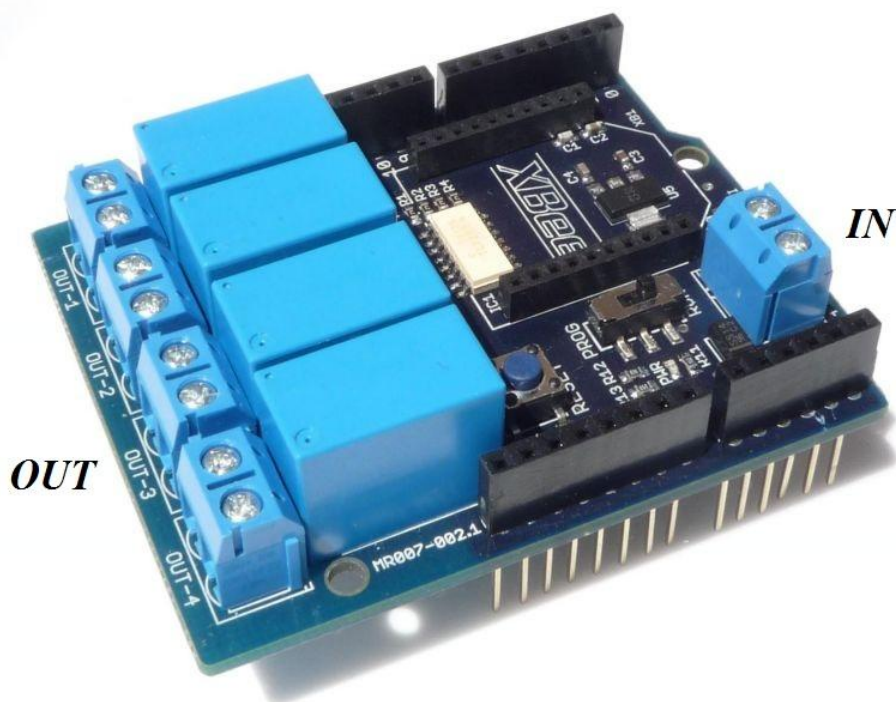


Fig.18 - Relay Shield costituita da una porta d'ingresso IN della tensione, dai 4 relè e dalle rispettive porte di uscita OUT.

Infine, per disporre le elettrovalvole, si è utilizzata un'unità esterna separata da quella contenente il sistema di controllo. Il fissaggio è stato possibile sfruttando delle particolari staffe già presenti alla base della valvola. Per la realizzazione di questo elemento è stata misurata la distanza (a) tra i centri dei due fori per il fissaggio e il diametro (b) della rondella che rappresenta il supporto circolare tra il corpo della valvola e il magnete.

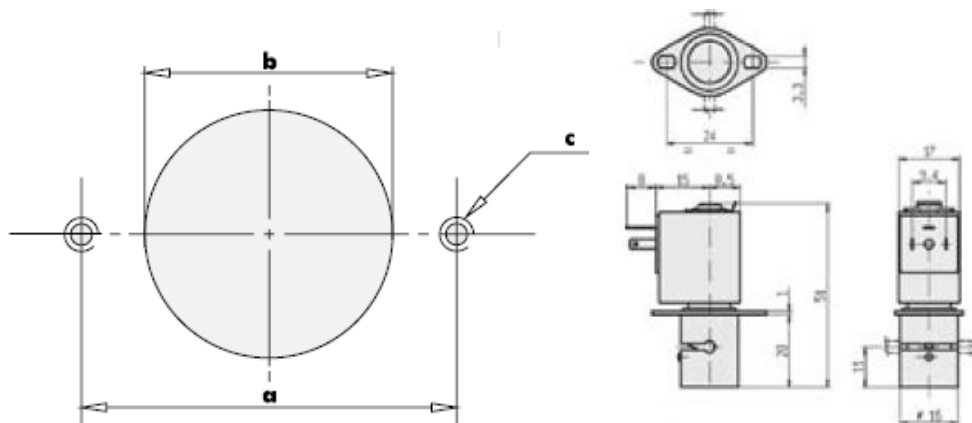


Fig.19 - Disegno tecnico dell'elettrovalvola e della staffa di fissaggio in cui sono stati evidenziati l'interasse tra i fori per le viti di fissaggio (a), il diametro della rondella (b) e il diametro del foro per la vite (c).

L'elettrovalvola è stata disposta con il corpo all'esterno della scatola mentre il magnete rimane all'interno. Questo sistema ha permesso di evitare la dissipazione del calore generato dal magnete nei confronti dei tubi del circuito e quindi la loro eventuale degradazione.

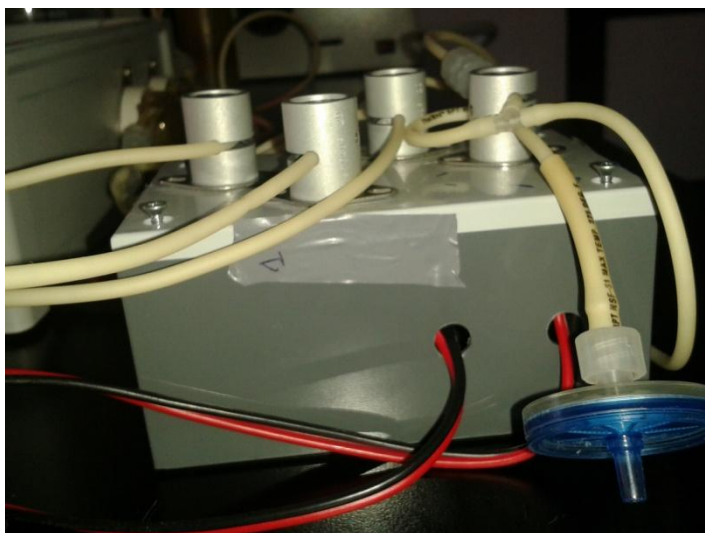


Fig.20 - Unità per il fissaggio e la disposizione delle elettrovalvole in cui sono stati effettuati 4 fori in posizioni sfalsate e ugualmente distanziate tra di loro.

3. Sistema di Controllo Centrale

L'obiettivo di questo lavoro è stato quello di progettare un sistema in grado di ridurre al minimo gli interventi manuali durante il processo di decellularizzazione di un tessuto biologico.

Per la realizzazione del sistema di automazione è stata usata una scheda elettronica costituita da un microcontrollore e della circuiteria necessaria per permettere la semplice costruzione di prototipi elettronici.

La scheda Arduino usata per il controllo dell'intero circuito elettrico, è l'ultima versione rilasciata con microcontrollore ATmega328, Arduino REV 3. Questa scheda è caratterizzata da PIN, connessi a delle porte di input/output, che permettono la gestione di componenti elettronici in base al segnale generato in ingresso o in uscita.

Tutte le schede Arduino sono costituite da 14 pin digitali, questi pin possono essere usati sia in modo INPUT, per l'acquisizione di un determinato segnale, sia in modo OUTPUT per l'invio di un segnale logico ad un determinato componente. Sia in ingresso che in uscita, un valore LOW (0) equivale ad affermare che il pin è controllato da un segnale logico basso 0V, mentre il valore HIGH (1) equivale ad un segnale logico alto 5V.

Alcuni PIN, invece, come quelli usati per la gestione delle pompe, sono caratterizzati da segnali PWM e accettano valori compresi tra 0 e 255. In base a questi valori si modifica il duty-cycle generato. Il duty-cycle è il rapporto che si definisce tra il tempo in cui l'onda del segnale assume il valore alto e il periodo T del segnale stesso.

Questo sistema di modulazione a larghezza di impulso permette di regolare la velocità dei motori in continua, ossia il valore 0 determinerà un duty-cycle dello 0% quindi l'impulso sarà di durata nulla mentre il valore 255 indica un impulso con un duty-cycle del 100% cioè un impulso che viene interrotto solo nel momento in cui inizia quello successivo.

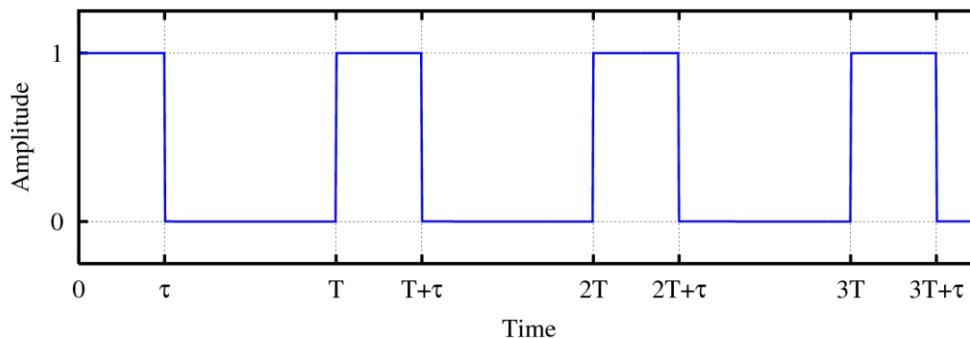


Fig. 21 Esempio di duty-cycle con modulazione τ sul periodo T

Infine, esistono 6 pin dedicati esclusivamente a segnali analogici in input che solitamente vengono sfruttati per acquisire segnali analogici derivanti da particolari sensori.

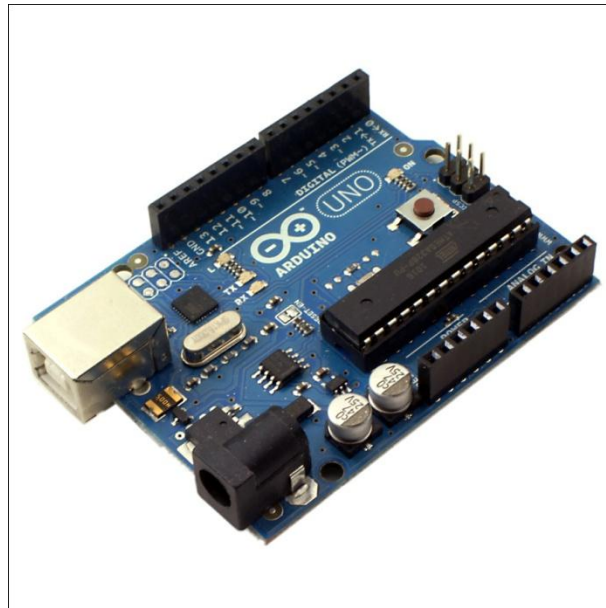


Fig.22 - Piattaforma hardware Arduino programmabile con microcontrollore controllore dalla ATMEL che nel nostro caso è costituito da un ATmega328.

La gestione del sistema di automazione è determinata da uno specifico codice di programmazione che viene implementato sul microcontrollore tramite la connessione USB presente sulla scheda e che connette il computer con Arduino.

L'hardware di controllo del dispositivo di partenza è costituito dal microcontrollore, due schede aggiuntive, una scheda Arduino Motor Shield e un integrato di potenza Tank 3 A Hp oltre ad un sensore di temperatura.

Il Motor Shield è un doppio driver full-bridge progettato per pilotare carichi induttivi. È gestito tramite l'invio di segnali PWM, che regolano l'accensione e lo spegnimento della pompa, e segnali direzionali DIR che determinano il senso della rotazione. La direzione della pompa è importante a differenza che si sviluppi la fase di riempimento o svuotamento della camera. In particolare, è usato il segnale HIGH per la direzione oraria e LOW per quella opposta.

L'integrato di potenza Tank 3 Hp è un sistema H-Bridge ideale per l'uso con controlli retroazionati. È comandato, anch'esso, dagli stessi segnali che regolano, in questo caso, sia

l'accensione che il verso della corrente che scorre nella cella di Peltier responsabile del riscaldamento o del raffreddamento.

Il sensore invece è collegato direttamente al microcontrollore a cui invia un flusso unidirezionale d'informazione.

La Relay Shield, compatibile con la piattaforma Arduino, introdotta per il controllo delle elettrovalvole si è dimostrata una scelta adeguata in tutti gli aspetti, sia perché costituita da 4 relè che possono pilotare carichi fino a 250VAC e 300W di potenza e sia perché questi relè erano in numero sufficiente a controllare l'elettrovalvole necessarie al funzionamento del circuito.

Lo shield infatti condivide con Arduino alcuni PIN prestabiliti, che non si sovrapponevano con quelli condivisi dal Motor Shield, creando una comunicazione diretta tra i due componenti.

Il controllo dei 4 canali, di fatto, è guidato tramite i pin 5,6,7 e 8 di Output/Input digitali della scheda Arduino. L'apertura e la chiusura delle valvole è determinata da segnali di tipo HIGH e LOW in funzione dei parametri impostati nel sistema.

Ogni elettrovalvola è collegata ad una delle 4 uscite presenti sulla scheda, per cui un segnale HIGH ad uno dei PIN suddetti comporterà l'eccitazione della corrispondente uscita OUT e, conseguentemente, l'apertura della valvola nel caso questa fosse normalmente chiusa oppure la chiusura nel caso questa fosse normalmente aperta.

Per la sorgente esterna di 12VDC necessaria all'alimentazione delle bobine dei relè è stata sfruttata una delle uscite del Tank non utilizzate, per il quale il circuito di alimentazione era già stato previsto nel lavoro precedente.

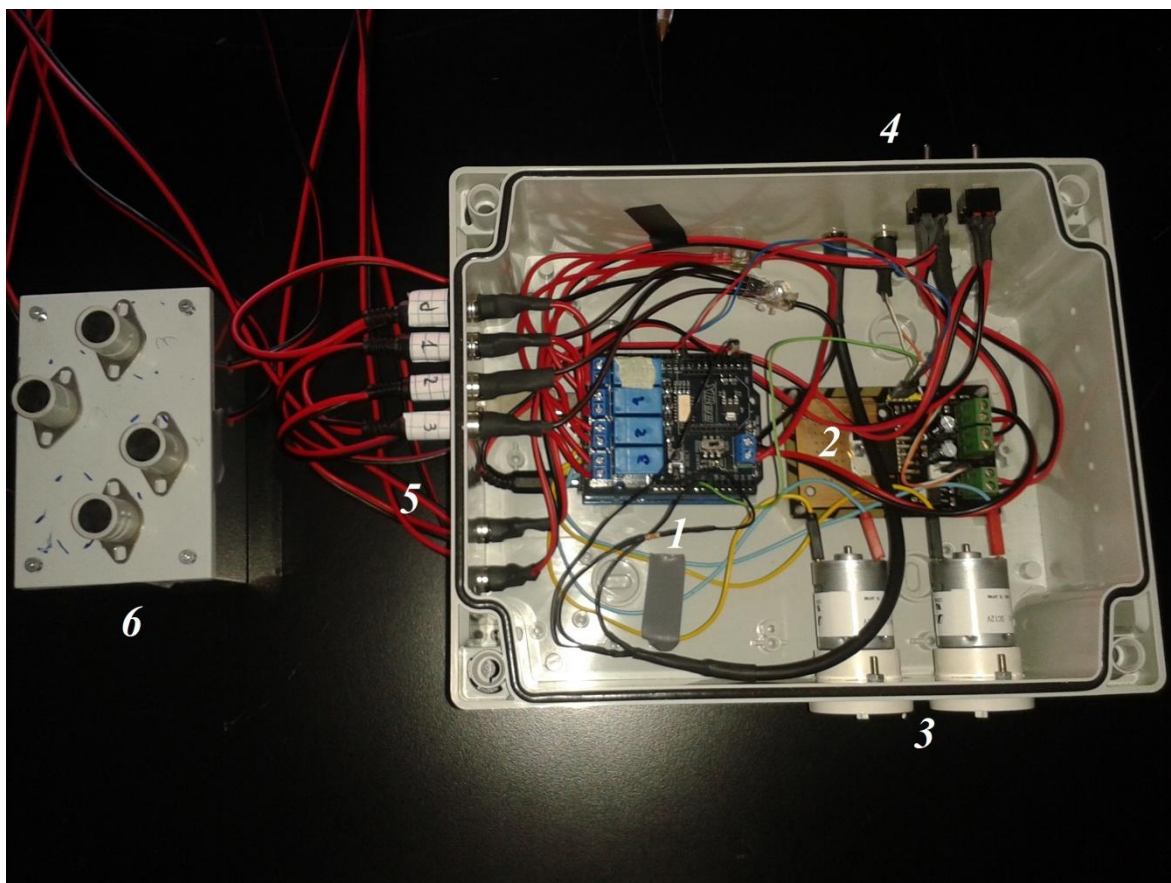


Fig.23 - Sistema di controllo costituito dalla Board Arduino REV 3 su cui è montato a castello sia il Motor Shield che il Relay Shield, (1) dal Tank 3° HP (2), da 2 motori per le pompe (2), dagli switch di accensione (2), dai cavi di collegamento per l'elettrovalvole (5) e dalle elettrovalvole (6).

I collegamenti elettrici necessari al corretto funzionamento del circuito sono stati realizzati con componentistica di facile reperibilità e saldati manualmente in laboratorio.

In conclusione il sistema di controllo è in grado di occuparsi di:

- Apertura e chiusura delle elettrovalvole;
- Verso di rotazione delle pompe;
- Attivazione e disattivazione delle pompe;
- Sensore di temperatura;
- Attivazione e disattivazione della cella di Peltier
- Verso della corrente nella cella di Peltier;
- Interfaccia con l'utente.

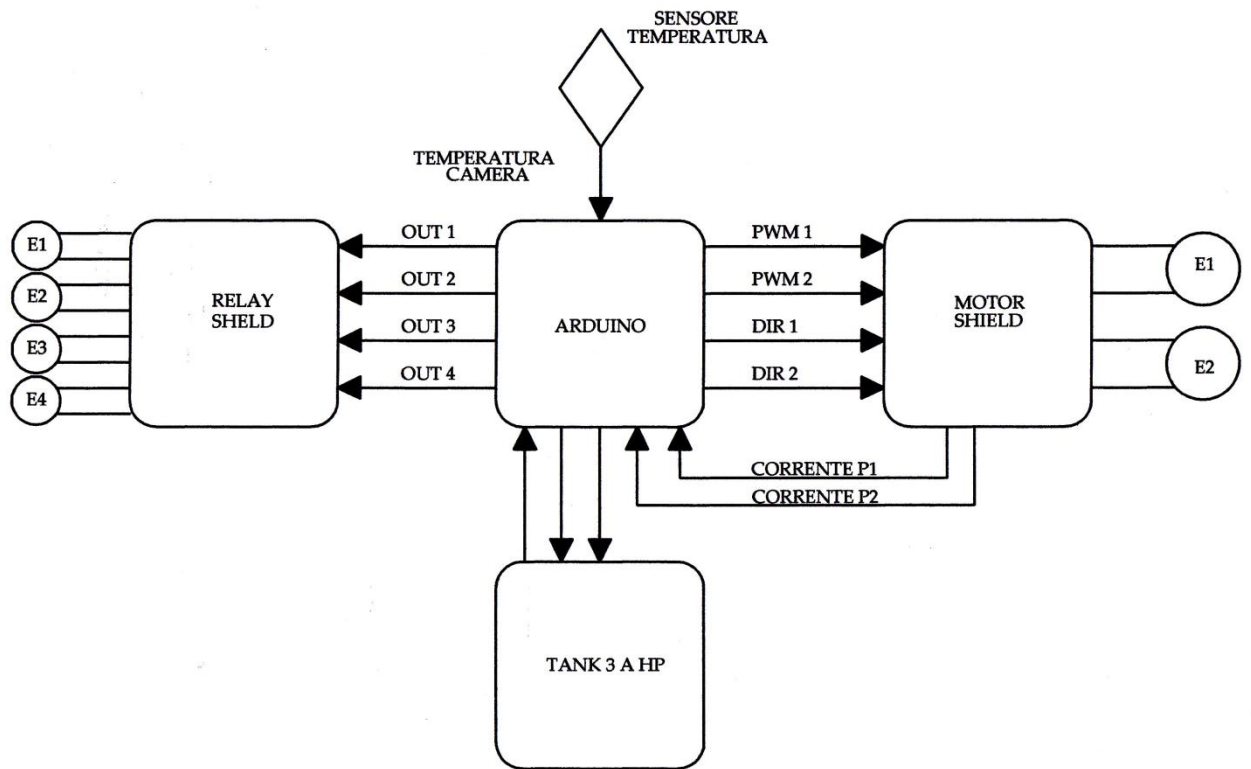


Fig.24 - Schema a blocchi del sistema di controllo centrale

3.1 Progettazione Hardware e Software

La completa automazione del processo, importante per gli obiettivi prefissati, si basa sulla scrittura di un codice di programmazione in grado di far eseguire al dispositivo progettato tutte le operazioni previste da un qualunque protocollo di decellularizzazione a prescindere dall'intervento o il monitoraggio di un operatore.

Come già visto, la soluzione precedente permetteva il ricambio automatico di una sola sostanza e prevedeva l'impegnativa presenza dell'operatore per lo svolgimento di due step fondamentali, l'attivazione del ricambio e la sostituzione della sostanza da introdurre all'interno della camera.

Il nostro lavoro ha risolto questo problema attraverso un più complesso codice (visibile in appendice) che ha permesso anche la creazione di una funzione semplice ed intuitiva con cui l'operatore può cambiare in maniera immediata i parametri che definiscono il protocollo, operazione che deve essere effettuata solo nel momento iniziale in cui si avvia il dispositivo.

Il primo passo è stato quello di creare una funzione che gestisse il ricambio della singola sostanza.

Void setPump (nomeSostanza, tempo, tmin, tmax)

I parametri di ingresso della funzione indicano rispettivamente il reservoir dal quale si vuole prelevare la sostanza che caratterizza quello specifico passaggio, il tempo in cui la sostanza deve rimanere all'interno della camera per effettuare la sua azione, la temperatura minima e la temperatura massima di funzionamento.

In primo luogo, tramite l'operatore *SWITCH*, si determina il circuito da cui la pompa preleverà la sostanza. Il parametro "nomeSostanza" infatti andrà a determinare l'elettrovalvola coinvolta in questo passaggio mentre il "tempo" definirà quanto questa sostanza sarà lasciata all'interno della camera.

Una volta stabiliti questi elementi di base, lo svolgimento del processo si basa esclusivamente sui tempi di riempimento e svuotamento preventivamente calcolati e impostati all'interno della funzione. Gli step eseguiti sono:

- Al l'istante "zero" si attiva, cioè si apre, l'elettrovalvola scelta nello *SWITCH* e si accende la pompa di riempimento che gira nel verso opportuno andando ad immettere la sostanza all'interno della camera;
- Dopo il tempo necessario al riempimento, si attiva la valvola che si trova a valle della pompa che blocca, a sua volta, il flusso all'interno del tubo e apre il condotto che conduce al filtro d'aria. A questo punto la pompa di riempimento viene fatta girare in verso opposto agendo come una pompa di svuotamento del circuito idraulico;
- Dopo il tempo necessario allo svuotamento del circuito, vengono spenti tutti i componenti e si lascia agire la sostanza all'interno della camera. La sostanza rimane in azione in base al valore stabilito inizialmente per la variabile "tempo" ;
- Passato il tempo dell'azione decellularizzante, viene azionata la pompa di svuotamento in modo tale che il fluido possa essere scaricato nel waste.
- Durante tutto lo svolgimento della funzione il sensore di temperatura è attivo ed invia la temperatura misurata al microcontrollore. Questa misura è comparata al range di valori impostati "tmax" e "tmin" impostati in ingresso. Se la temperatura è superiore o inferiore ai valori rispettivamente di massimo e di minimo definiti, allora il sistema andrà ad accendere la cella di Peltier provocando il raffreddamento o il riscaldamento del diffusore riportando la camera alla temperatura adeguata. Il funzionamento del sistema di termostatazione però è regolato da una fascia di tolleranza di temperature all'interno del quale non si ha l'attivazione della cella di Peltier, limitanto allo stesso tempo sia gli sprechi che le sollecitazioni sul sistema termico.

Questo processo vale per un solo ricambio e per una sola sostanza. Per rendere automatizzato tutto l'intero processo, la funzione creata è stata inserita in un'altra funzione che rappresenta un ciclo di ripetizione che dipende esclusivamente dal numero di ricambi necessari per ogni sostanza e dal numero di sostanze:

```
for(int ora=0; ora=ntot; ora++){
    if (ora<n1){
```

```

    setPump(nomeSostanza, tempo,tmin,tmax);
    Serial.println(ora);
    delay(2000);    }
if (ora>n2 && ora<n3){
    setPump(nomeSostanza, tempo,tmin,tmax);
    Serial.println(ora);
    delay(2000);    }
    else if (ora>n3){
    setPump(nomeSostanza, tempo,tmin,tmax);
    delay(2000);
    }    }

```

In questa funzione il “ for” permette un numero di cicli di ricambio determinato dal numero totale di cambi necessari. Per ogni sostanza si imposta il numero di ricambi voluti che saranno svolti in base ai parametri impostati in ingresso nella funzione setPump.

In questo modo una volta inseriti i dati necessari tramite l’IDE (integrated development environment), che è l’ambiente di sviluppo con cui Arduino comunica con il computer, il processo inizia e termina in modo completamente automatico svolgendo l’intero protocollo di decellularizzazione.

4. Validazione del Sistema

Per concludere la realizzazione del dispositivo è stata prevista una fase di validazione con l'obiettivo di definire una corrispondenza tra le specifiche di progetto stabilite in partenza ed i risultati ottenuti. In particolare per la validazione sono state effettuate delle prove di calibrazione delle pompe e del circuito idraulico, riguardo le relative perdite di carico dovute alle pompe e alle elettrovalvole, ed infine, una valutazione su banco di prova dell'intero sistema.

Inizialmente, quindi, abbiamo verificato e valutato il comportamento del circuito idraulico e la tenuta degli accoppiamenti tra i vari componenti, nonché l'efficacia delle connessioni introdotte.

L'uso delle pompe peristaltiche, l'introduzione di ulteriori linee di ricambio con le relative connessioni e la presenza dell'elettrovalvole ha reso necessario un test di calibrazione delle portate medie in funzione, anche, delle perdite di carico generate da questi elementi.

A tal fine, è stato pensato un codice di programmazione in grado di gestire un'azione di riempimento e di svuotamento per ogni linea. In questo modo si è potuto calcolare la variazione di portata in base alle perdite di carico e della frequenza del segnale PWM tramite il quale vengono azionate le pompe.

Ogni reservoir è stato provvisto di 250 ml di acqua distillata e sfruttando un cronometro è stato registrato il tempo con cui, per ogni linea, si otteneva il completo e corretto riempimento della camera di decellularizzazione.

Tenendo conto del volume della camera 90 mL e dei tempi registrati, 135 sec. si è osservata una portata media di 40 mL/min, con segnale PWM massimo (PWM=255).

In seguito, considerando il diametro dei tubi usati per la realizzazione delle linee idrauliche ed in funzione della portata media, sono stati calcolati i tempi minimi per lo svuotamento della linea idraulica. I risultati ottenuti sono stati confermati dalla misurazione cronometrica effettuata poi su banco di prova.

Per lo svuotamento della camera, invece, è stato usato un periodo temporale con un margine di sicurezza superiore rispetto al tempo di riempimento in modo da eliminare qualunque residuo della sostanza decellularizzante.

La seconda ed ultima parte della fase di validazione è stata eseguita effettuando una simulazione dell'intero sistema.

Per il prima cosa è stato previsto un processo che potesse simulare un lo svolgimento completo del ricircolo, dell'azione e della sostituzione delle sostanza, impostando tempi minimi che ci consentissero di valutare il funzionamento.

Usando il software di compilazione della piattaforma Arduino, quindi, è stato definito un codice di programmazione con cui il sistema era in grado di effettuare diversi cicli di ricambio della sostanza per ogni reservoir come riportato in Tab.7.

Temp o (sec)	Pompa (Riempiment o)	1 Pompa (Svuotament o)	1 Pompa (Svuotament o)	2 Pompa (Svuotament o)	Elettrovalvol a linea	Elettrovalvol a camera
0-130	ON	OFF	OFF	OFF	ON	OFF
130- 140	OFF	ON	OFF	OFF	ON	ON
140- 150	OFF	OFF	OFF	OFF	OFF	OFF
150- 300	OFF	OFF	ON	OFF	OFF	ON

Tab.8 - Simulazione del processo in cui si è impostato 130 sec per il riempimento della camera, 10 sec per lo svuotamento della linea e 150 per quello della camera. Lo stand-by del sistema che simula l'azione della sostanza sul tessuto è stato realizzato con un tempo simbolico minimo per l'osservazione di 10 sec.

Questa simulazione, quindi, è stata svolta dal sistema per un numero totale di 18 cicli in modo completamente automatico e, nello specifico, i ricambi effettuati sono stati 12 per il primo reservoir e 4 per il secondo e per il terzo, per un funzionamento continuo di circa un'ora e mezza in cui non si sono verificate perdite, sovraccarico delle pompe, eccessivo riscaldamento dell'elettrovalvole e kinking dei tubi.

In questo modo si è potuto verificare sia il corretto funzionamento e tenuta del circuito sia la bontà del codice di programmazione pensato per il processo di decellularizzazione.

Con questa prova, inoltre, abbiamo potuto valutare il sistema di termostatazione e l'efficacia della nuova progettazione del dissipatore che ha dimostrato una velocità di variazione di temperatura di 0,004 °C/sec.



Fig.25 - Rappresentazione della nuova geometria studiata per il dissipatore di calore

Infine, è stato implementato sul microcontrollore il reale programma di decellularizzazione sia per quanto riguarda i tempi che l'alternanza delle sostanze. La simulazione prevedeva quindi 12 cicli di ricambio ogni 2 ore per la sostanza 1, 2 cicli ogni 12 ore per la sostanza 2, e 4 cicli ogni 12 ore per la sostanza 3.

Il processo automatico è stato monitorato per tutto il tempo verificando che il ricambio avvenisse alle ore stabilite dal tipo di protocollo, confermando il corretto funzionamento del sistema.

Capitolo 4:

PROVE SPERIMENTALI E
RISULTATI

Durante la fase sperimentale, sono state effettuate quattro prove di decellularizzazione con l'obiettivo di valutare sia l'efficacia nell'automazione del processo svolto dal dispositivo progettato sia la bontà del protocollo stesso.

Per ogni esperimento sono stati decellularizzati contemporaneamente due pezzi dello stesso vaso, uno in maniera manuale e l'altro con il processo automatico, che per le analisi finali sono stati definiti rispettivamente controllo (CTRL) ed esperimento (EXP).

In questo modo si sono potuti confrontare, tramite specifici test, gli effetti determinati dal processo sul provino trattato. Il confronto, infatti, ha reso possibile la valutazione di quelli che sono stati gli effetti, positivi o negativi, dovuti esclusivamente al protocollo e quelli dovuti al tipo di processo usato, manuale o automatico.

1. Materiali e Metodi

Lo svolgimento e il controllo della decellularizzazione manuale ed automatica sono stati effettuati all'interno del laboratorio biologico BIOCELL del Dipartimento di Chimica, Materiali e Ingegneria Chimica "Giulio Natta". Questa fase ha permesso di avere dei riferimenti grazie ai quali si è potuto fare delle importanti considerazioni sullo specifico protocollo usato e sulle problematiche legate alla manualità dell'operatore.

1.1 Setup Sperimentale e Protocollo

Nel rispetto della totale sterilità dei vari componenti, precedentemente autoclavati, tutti i passaggi necessari alla preparazione di entrambi gli esperimenti sono stati effettuati utilizzando particolari cappe a flusso laminare. Le operazioni inoltre sono state condotte con telo e guanti chirurgici sterili per avere uno spazio privo di qualsiasi contaminazione.



Fig.26 - Cappa a flusso laminare del laboratorio BioCell

Il protocollo di decellularizzazione usato, è lo stesso sia per la prova manuale che quella automatica. Prima di ogni esperimento, sono stati preparati i reagenti e le relative soluzioni che costituiscono gli elementi decellularizzanti:

- 1- Acqua distillata

La preparazione, avvenuta sotto cappa, ha previsto l'uso di acqua distillata e deionizzata sterile in cui abbiamo inserito antibiotici e antimicotici con concentrazione dell'1%, dopo averli lasciati scongelare nel bagno termostato a temperatura ambiente. La soluzione è stata poi conservata in frigo a 4°C.

2- Sodio Deossalato

In questo caso abbiamo inserito del sodio deossalato al 4% in acqua distillata sterile, conservando il preparato a temperatura ambiente. Questa preparazione è stata effettuata sotto cappa chimica e conseguentemente la soluzione è stata filtrata tramite un sistema costituito da un filtro 0.22 micron.

3- Siero

L'agente decellularizzante costituito da siero fetale bovino è stato preparato all'intero di una soluzione fisiologica. Per la soluzione fisiologica si è usata dell'acqua deionizzata in cui è stato miscelato NaCl al 0.9% W/V (9 g/L). In seguito, dopo aver aggiunto il siero fetale bovino, la preparazione è stata sterilizzata sotto cappa tramite un opportuno sistema di filtraggio e poi conservata a 4° C.

Il trattamento è stato effettuato su tessuti vascolari arteriosi (aorte addominali) derivanti da maiali di 25 Kg. Per ogni prova di decellularizzazione, si è scelto un vaso che poi è stato tagliato in due parti uguali destinate una alla prova manuale e l'altra a quella automatica.

I tessuti usati, sono conservati all'interno di una cella frigorifera a -80°C in modo tale da non alterarne le caratteristiche fisiologiche, quindi, è stato necessario un processo di scongelamento a temperatura ambiente che è stato effettuato in una falcon con soluzione di 40 ml di PBS per l'eventuale eliminazione di residui chirurgici.

Gli esperimenti effettuati durante questa fase sono stati svolti sia in maniera totalmente manuale sia utilizzando il dispositivo progettato.

La prova di decellularizzazione manuale è stata svolta in funzione del seguente protocollo:

- **Giorno 1**

Il campione viene inserito in una falcon contenente 40 mL di Acqua milliQ con aggiunta di soluzione antibiotica antimicotica all' 1%. L'azione di questo reagente dura 24 ore senza alcun ricambio .

- **Giorno 2**

L'acqua viene sostituita con 40 mL di soluzione di Sodio Deossicolato. Le Falcon viene capovolta per un miscelamento adeguato ed omogeneo della soluzione. Il vaso subisce nuovamente un'azione statica del reagente della durata di 24 ore.

- **Giorno 3 e giorno 4**

Si preleva dalla Falcon la soluzione di Sodio Deossicolato e si inserisce la soluzione fisiologica con FBS al 10%. In questo caso, la durata di azione del reagente è di 48 ore e prevede un ricambio dopo le prime 24 ore.



Fig.27 - Tessuto di controllo all'interno della Falcon durante il processo di decellularizzazione manuale

Contemporaneamente a quella manuale, si è svolta anche la decellularizzazione dei tessuti vascolari sfruttando il dispositivo progettato per l'automazione del processo.

Non potendo valutare in anticipo il diametro del vaso, la misura adeguata per l'afferraggio da utilizzare è stata definita solo in itinere, motivo per il quale sono stati preparati in anticipo differenti taglie di afferraggi. In particolare sono stati sterilizzati afferraggi di 3,5 e 7 mm di diametro e 20 e 50mm di lunghezza.

Una volta stabilita la taglia necessaria, il tessuto è stato calzato sulle parti terminali degli afferraggi e fissato ad essi tramite un filo di sutura con si effettua un triplo nodo che assicura la tenuta del vaso.

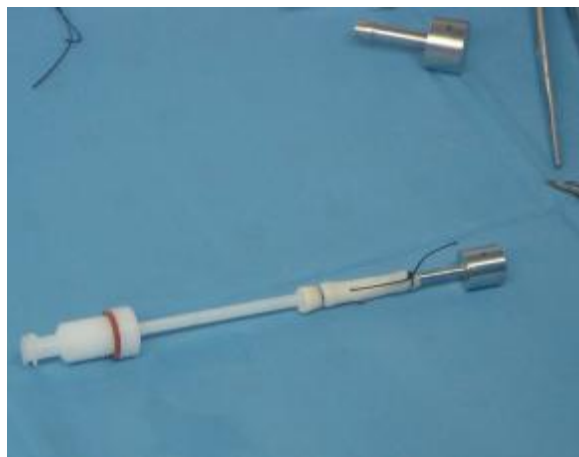


Fig.28 - Tessuto dell'esperimento fissato agli afferraggi su telo sterile sotto cappa

La preparazione dell'esperimento si conclude col montaggio del dispositivo. Sotto la cappa a flusso laminare si è provveduto all'assemblaggio del circuito idraulico, per il quale è importante mantenere la sterilità. Il vaso e gli afferraggi sono stati inseriti all'interno della camera che è stata collegata al relativo circuito e alle pompe. Prima di estrarre il circuito dalla cappa, i tubi sono stati inseriti all'interno dei corrispettivi tappi che conseguentemente sono stati avvitati ai reservoir contenenti le soluzioni preparate. Tutte le prese d'aria sono state provviste di filtro da 0.22 micron mentre i fori rimanenti sul tappo sono stati chiusi con un adatto tubo sterile dotato di tappo.



Fig.29 - Circuito idraulico durante il montaggio sotto cappa

Una volta terminato il montaggio del circuito idraulico e assicurato il completo isolamento dall'esterno, si è provveduto a collegare le pompe con il sistema di controllo.

Il sistema di controllo è stato precedentemente programmato con il codice sviluppato durante la progettazione per lo svolgimento automatico del seguente protocollo di decellularizzazione:

- **Giorno 1**

La camera viene riempita con 70 ml di Acqua milliQ con aggiunta di soluzione antibiotica antimicotica all' 1%. Durante queste 24 ore è previsto un ricambio automatico con la stessa soluzione ogni 2 ore.

- **Giorno 2**

Trascorse le prime 24 ore, il dispositivo preleva la sostanza numero 2 e immette, quindi, nella camera 70 ml di soluzione di Sodio Deossicolato. Nelle successive 24 ore si hanno due ricambi a distanza di 12 ore ognuno.

- **Giorno 3 e giorno 4**

Terminato il secondo giorno, la sostanza prelevata dal sistema è quella contenuta nel reservoir numero 3 contenente la soluzione fisiologica con FBS al 10%. Questa agisce sul tessuto per 48 ore subendo un ricambio automatico ogni 12 ore per un ciclo complessivo di 4 cambi di 70 ml ogni volta.

Durante la perfusione il vaso subisce una stimolazione meccanica dovuta alla particolare costruzione dei due afferraggi. Il vaso è condizionato ciclicamente tramite uno stress longitudinale e uno stress radiale, in funzione della massa e delle perdite di carico legate alla geometria dell'afferraggio distale.

La decellularizzazione può essere definita ottimale quando alla fine di tale processo si può verificare la completa assenza di materiale cellulare e il mantenimento delle caratteristiche biologiche e meccaniche del tessuto nativo.

Gli effetti del processo di decellularizzazione sul tessuto, sia per quello automatico che manuale, sono stati valutati tramite differenti tecniche di analisi.

1.2 Quantificazione del DNA

Per ottenere una misura della quantità di DNA residua presente, sono stati tagliati, dai tessuti trattati, due anelli per il controllo (CTRL) e due per l'esperimento (EXP). Ognuno di questi anelli è stato diviso a sua volta in tre parti il più possibile simili tra loro e poi pesati su una bilancia di precisione. I 12 pezzi di tessuto sono stati posizionati all'interno di appositi contenitori, provette eppendorf, ciascuna delle quali è stata marcata con un numero di riconoscimento.

Prima di iniziare il processo di estrazione del DNA si è provveduto a preparare i seguenti reagenti e soluzioni:

- Buffer di lisi contenente 10mM NaCl, 10mM TRIS (pH 8.0), 10mM EDTA (pH 8.0) e 0.5% SDS;
- Proteinase K;
- Sodio Acetato (pH 5.2) 3M;
- Etanolo al 70% e al 98%;

Terminata la preparazione, si è inserito all'interno di ogni provetta 500 μ L di Buffer di lisi e 2.5 μ L di Proteinasi K. Le provette sono state incubate a 55°C per tutta la notte, circa 12 ore. Dopo l'incubazione, le provette sono state prima miscelate tramite il Vortex e poi centrifugate alla massima velocità a 4°C per due minuti. In conclusione di questo primo step è stato prelevato all'interno di ogni provetta il surnatante, la fase liquida, facilmente distinguibile da quella solida ad occhio nudo.

Il secondo step, è stato necessario per la precipitazione sia delle proteine che di eventuali residui cellulari. A tale scopo si è aggiunto alla fase liquida prelevata una soluzione di 1/10 di Sodio Acetato 3M in relazione al volume. Dopo averle capovolte, le provette eppendorf sono state incubate per 15 minuti a -20°C e conseguentemente centrifugate a 4°C per 20 minuti alla massima velocità. A questo punto, prestando molta attenzione alla fase solida sempre meno visibile, il surnatante è stato trasferito in nuove eppendorf usate per terminare il processo.

L'ultima fase è stata caratterizzata dalla precipitazione degli acidi nucleici. Per iniziare, sono stati aggiunti due volumi di etanolo al 98% all'interno delle provette che sono state

poi capovolte e incubate a -20°C per 15 minuti, dopo di ciò, sono state centrifugate per 20 minuti alla massima velocità alla temperatura di 4°C .

Il surnatante, ottenuto in questo modo, è stato infine prelevato ed eliminato. Conseguentemente, è stato aggiunto al Pellet rimasto all'interno della provetta, 1 mL di etanolo al 98% miscelato per pochi secondi tramite il Vortex. Dopo aver centrifugato la soluzione per 5 minuti a 4°C , è stato nuovamente eliminato il surnatante, operazione che a questo punto diventa più difficile in quanto la fase solida è sempre meno visibile.

A questo punto, è stato aggiunto 1 mL di etanolo al 70%, la provetta è stata, quindi, passata sul Vortex per pochi secondi, centrifugata alla massima velocità per 5 minuti a 4°C e privata nuovamente del surnatante.

Per terminare il processo si è lasciato ogni pellet ad asciugare sotto cappa.

La quantificazione è stata effettuata risospendendo i pellet asciutti in $100\ \mu\text{L}$ di Tris-EDTA (TE) e usando come colorante il SYBRGreen, un composto organico dotato di una particolare attività fluorofora in grado di colorare gli acidi nucleici.

In questo modo si è potuto analizzare il pellet tramite lo spettrofotometro Tecan Genios e misurare l'assorbanza a $460\ \text{nm}$.

1.3 Prove meccaniche

I tessuti sono stati sottoposti a delle prove meccaniche per valutare eventuali differenze tra il comportamento del tessuto decellularizzato manualmente, quello trattato con il dispositivo e quello nativo.

Da entrambi i vasi soggetti (CTRL e EXP), sono stati prelevati 4 anelli di uguale grandezza con larghezza (w) pari a 5 mm.

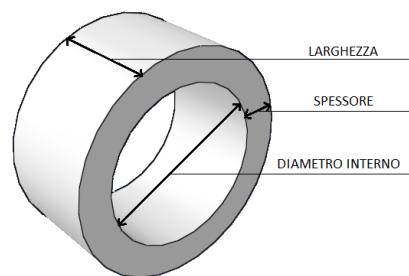


Fig.30 - Dimensioni dei provini analizzati

Per l'analisi della risposta meccanica dei tessuti è stata usata una macchina di prova uniassiale, la SYNERGIE 200H prodotto da MTS. Questo modello è un Material Testing System dotato di un software TestWork™ che permette una facile gestione della procedura di prova e dell'acquisizione dei dati. I test si sono svolti all'interno del Laboratorio di Meccanica delle Strutture Biologiche del Politecnico di Milano (LaBS).

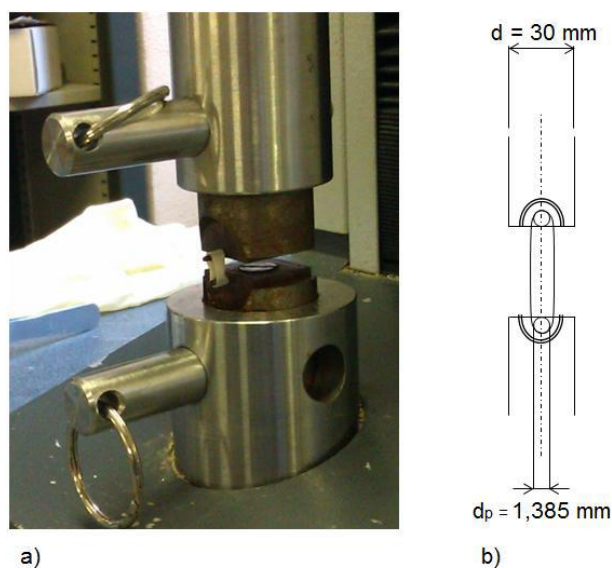


Fig.31 - (a) Fotografia della macchina Synergie 200h e (b) schematizzazione degli afferraggi

Il provino durante la prova è fissato a degli afferraggi costituiti da due perni cilindri in acciaio inossidabile di diametro pari a 1.385 mm. Durante la prova, l'afferraggio inferiore resta fisso mentre quello superiore si sposta in modo solidale con la traversa mobile, con una velocità imposta dalla macchina. In questo modo si sono misurate la forza applicata al provino e lo spostamento della traversa mobile.

La frequenza di acquisizione è stata impostata al momento della definizione dei parametri necessari al funzionamento della macchina.

I dati acquisiti e disponibili per la valutazione delle caratteristiche del vaso sono:

- F , valori di forza (N) imposti dal dispositivo;
- Δl , grandezza che rappresenta lo spostamento della traversa mobile, definita anche crosshead;
- l_0 , lunghezza iniziale misurata nella configurazione di riferimento.

Prima di iniziare la prova, è stata calcolata la lunghezza iniziale l_0 del provino, valutata come la lunghezza corrispondente ad un precarico di 0.01 N.

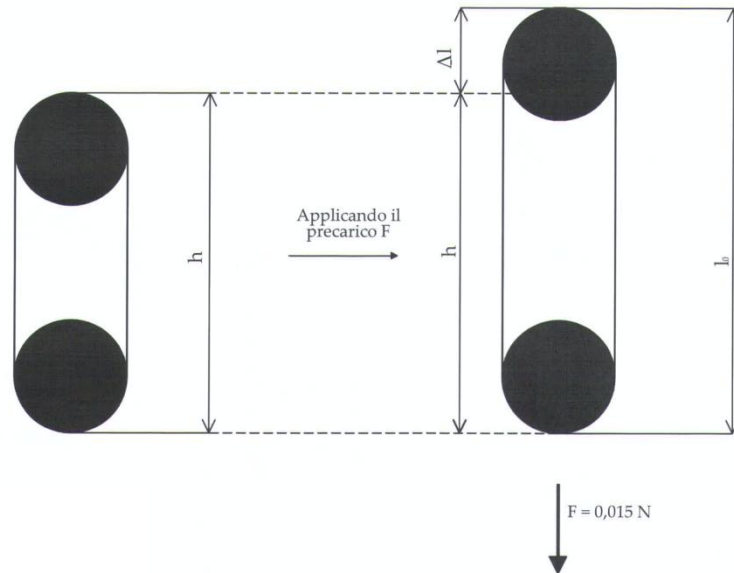


Fig.32 - Rappresentazione della configurazione iniziale e finale del vaso nel set-up sperimentale

La lunghezza di riferimento l_0 si ottiene sommando la distanza h (3.5 mm) tra i due perni e il valore di cross head Δl che rappresenta la deformazione legata al precarico:

$$l_0 = h + \Delta l \quad (1)$$

PROVA 3

N	PROVINO	l_0 (mm)
1	CTRL 1	3.707
2	CTRL 2	2.516
3	CTRL 3	3.015
4	CTRL 4	3.762
5	EXP 1	3.962
6	EXP 2	3.042
7	EXP 3	3.858
8	EXP 4	4.293

Tab.9 - Valori calcolati per l_0 (mm)

Per l'analisi dei dati ottenuti durante le prove meccaniche è stato necessario definire un tratto utile del provino. Data la particolare configurazione assunta dal provino sulla macchina, si è adottata una conversione capace di mettere in relazione la geometria che il vaso presenta quando è fissato agli afferraggi e quella cilindrica naturale del tessuto.

Innanzitutto, è stata calcolata la lunghezza di riferimento utile l'_0 del provino sottraendo ad l_0 il diametro medio (d_p) dei perni di afferraggio.

$$l'_0 = l_0 - d_p$$

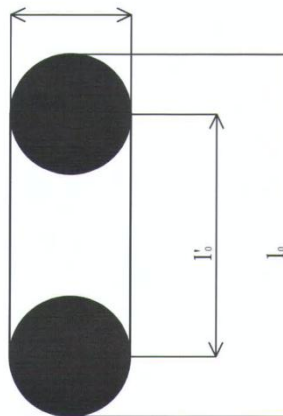


Fig.33 - Configurazione tramite la quale è stato calcolato l'_0 (mm)

La relazione di equivalenza tra le due geometrie si basa sull'assunzione di due ipotesi:

- a- Il tratto del provino che è soggetto a deformazione durante le prove è pari a $2 * l'_0$;

- b- Potendo descrivere il provino con il modello di vaso a parete sottile, si considera trascurabile lo spessore della parete e si assume uno sforzo uniforme sulla parete.

Definiamo con P_0 la misura del perimetro del vaso nella configurazione deformata assunta sulla macchina a riposo e con Γ_0 la lunghezza della circonferenza nella normale geometria del tessuto. In questo caso D_0 vale:

$$\Gamma_0 = P_0$$

quindi per l'ipotesi (a) :

$$\pi D_0 = 2l'_0$$

per cui:

$$D_0 = \frac{2l'_0}{\pi} \quad (2)$$

Per il calcolo della compliance supponiamo che sia P la misura del perimetro del vaso nella configurazione deformata durante la prova di trazione e che Γ sia la lunghezza della circonferenza del tessuto in un'ipotetica prova di gonfiaggio, il cui diametro istantaneo si D . In questo caso l'equivalenza si esprime come:

$$d\Gamma = dP$$

che per l'ipotesi (a) diventa:

$$d(\pi D) = d [2(l'_0 + \Delta l)]$$

per cui:

$$dD = d \frac{2}{\pi} (\Delta l) \quad (3)$$

Le due relazioni ottenute (2) (3) possono essere combinate in modo da esprimere il valore del diametro D della configurazione deformata:

$$D = \frac{2}{\pi} (l'_0 + \Delta l) \quad (4)$$

Inoltre, per l'ipotesi (b) applicando il modello di vaso a parete sottile si può definire la pressione come:

$$p = \frac{F}{w * D} \quad (5)$$

dove F = forza in Newton,

P = pressione in Pa,

w = larghezza dei campioni in metri

D = diametro dell'anello legato all'applicazione di tale forza.

Il tessuto che vogliamo analizzare è costituito da materiale molle viscoelastico che necessita di una procedura di preconditionamento che renda la risposta alla sollecitazione il più ripetibile possibile. L'acquisizione dei dati di interesse quindi è avvenuta solo dopo un determinato numero di cicli.

La prova è stata eseguita utilizzando il sistema meccanico in controllo di forza. In questo modo sono stati effettuati per ogni provino, 16 cicli imponendo una rampa da 0.01 N a 0.16 N ad una velocità di 1 mm/s.

Dagli andamenti dei grafici forza-deformazione, il numero di cicli effettuati si è dimostrato sufficiente affinché il comportamento del vaso andasse a regime. Per gli ultimi 6 cicli, sono state registrate le deformazioni prodotte dall'applicazione di una forza corrispondente alle pressioni di 80 mmHg e 120 mmHg.

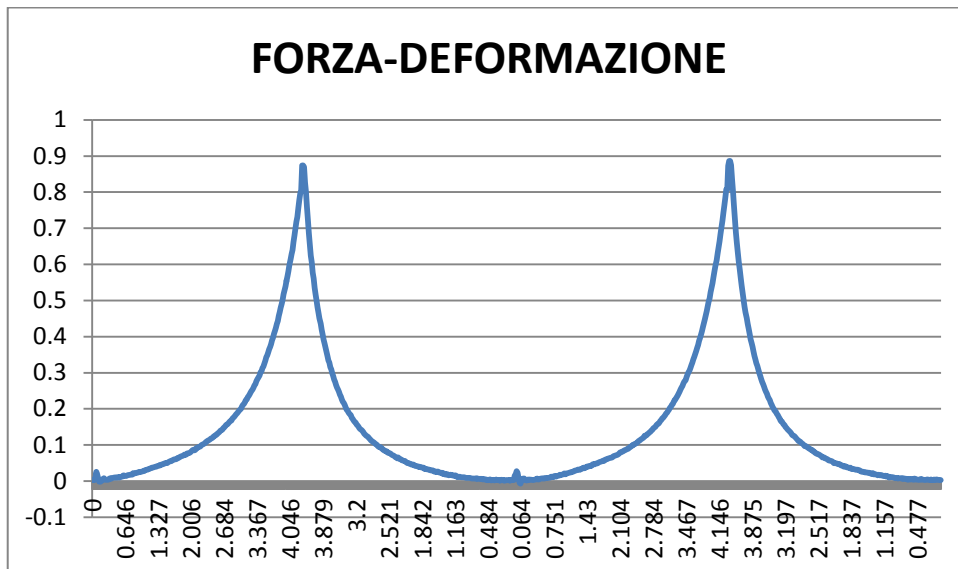


Fig. 34 - Grafico dell'andamento sforzo - deformazione ottenuto ad ogni ciclo di prova

Le suddette forze sono state calcolate a partire dalle misure iniziali del diametro dell'anello testato.

$$F = P * w * D_0 \quad (6)$$

dove F= forza in Newton,

P= pressione di 10665 Pa e 15998 Pa (equivalenti ad 80 mmHg e 120 mmHg)

w= larghezza dei campioni in metri

D_0 = diametro iniziale dell'anello in metri.

Una volta calcolati le forze di interesse è stato possibile trovare tra i dati prodotti dalla Testing Machine i corrispondenti valori di allungamento e/o deformazione.

In questo modo, si è potuto calcolare la compliance tramite la relazione:

$$C = \frac{\frac{\Delta L_{120} - \Delta L_{80}}{D_0}}{120 - 80} \quad (7)$$

in cui sostituendo la relazione $D = \frac{2}{\pi}(l'_0 + \Delta l)$, si ottiene:

$$C = \frac{\frac{\Delta l_{120} - \Delta l_{80}}{l'_0}}{120 - 80} \quad (8)$$

Al termine del 16° ciclo, è stata imposta una rampa di forza prolungata fino alla rottura del provino stesso in modo da poter valutare la Burst Pressure.



Fig. 35 - Grafico dell'andamento sforzo- deformazione ottenuto durante la prova a rottura

Dai dati acquisiti è stato possibile calcolare la pressione massima sopportata dal tessuto. Il calcolo è stato effettuato tenendo conto della relazione:

$$p = \frac{F}{w * D} \quad (9)$$

In cui però sono stati inseriti il valore di forza massimo F_{lim} raggiunto dalla macchina e il diametro massimo relativo all'applicazione della forza massima registrata:

$$D_{lim} = \frac{2}{\pi} (l'_0 + \Delta l_{lim}) \quad (10)$$

1.4 Analisi Istologiche

Le analisi istologiche sono state effettuate per valutare l'efficacia dei differenti processi di decellularizzazione condotti.

Le istologie sono state ottenute includendo, in un primo momento, i tessuti in paraffina e successivamente colorando sezioni di 4 mm con:

- Ematossilina-eosina (EE)

L' EE è un colorante vegetale. Il preparato è stato immerso in una soluzione di ematossilina e mordente, dopo il lavaggio, invece, in una soluzione di eosina. L'ematossilina è in grado di colorare in blu violetto i componenti carichi negativamente quali gli acidi nucleici mentre l'eosina colora di rosso rosato i componenti carichi positivamente, come le proteine cellulari e le fibre di collagene.

- DAPI (4',6-diamidin-2-fenilindolo)

Il DAPI è un colorante organico fluorescente che si lega fortemente a regioni di DNA con un numero elevato di sequenze A-T. Questo colorante è molto usato nella microscopia a fluorescenza essendo caratterizzato da un assorbimento massimo di $\lambda = 385$ nm e un'emissione massima di $\lambda = 461$ nm.

Questa tecnica rende possibile, tramite osservazioni al microscopio, una misura qualitativa dell'eventuale presenza di nuclei o residui nucleari all'interno del tessuto trattato.

1.5 Test Statistici

I valori ottenuti dai test meccanici e dalle prove di quantificazione del DNA residuo sono stati confrontati tramite test statistici utilizzando il software Graphpad Prism 6.

Sono stati eseguiti sui valori ottenuti nelle differenti prove, dei t-test non parametrici, il test di Whiteny-Mann. Sono state considerate significative le differenze per cui si è verificato un p-value minore di 0.05.

Il test di Mann-Whitney è l'analogo non-parametrico del t- test di Student per campioni indipendenti. Questo test è in grado di trarre allo stesso modo, valide conclusioni in modo indipendente dal tipo di distribuzione che caratterizza la popolazione. Come molti test non-parametrici si basa cioè solo sull'ordine di grandezza dei dati trascurando i valori stessi.

I dati analizzati in questo lavoro, come spesso accade per lo studio dei fenomeni biologici, non si adattano alla distribuzione normale quindi è preferibile usare un test non parametrico. Infatti così come la media rappresenta un dato parametrico, la mediana è l'analogo nel campo non-parametrico ma mentre il calcolo della media può essere disturbato da valori molto piccoli o molto grandi, la mediana, come i quartili, è del tutto stabile rispetto ai cosiddetti outliers.

2. Risultati

I test descritti nel paragrafo precedente sono stati utilizzati per l'elaborazione di dati che caratterizzano le proprietà di base che si richiedono ad un tessuto decellularizzato. Nello specifico, lo studio dei risultati ci ha permesso di trarre conclusioni importanti per quanto riguarda l'efficacia del protocollo.

In questo modo si sono evidenziati aspetti importanti in relazione alla capacità di eliminare tutte le componenti cellulari presenti nel tessuto senza avere un'azione degradativa della struttura della matrice e quindi una perdita delle proprietà meccaniche funzionali all'applicazione in vivo della matrice acellulare.

Inoltre, è stato effettuato un confronto tra le caratteristiche dei tessuti decellularizzati manualmente (CTRL) e quelli trattati con il dispositivo automatico (EXP) al fine di valutare il reale funzionamento del sistema.

Le analisi istologiche sono state effettuate tramite colorazione con Ematossilina-Eosina (EE) e DAPI sia su campioni di tessuto nativo che di quello decellularizzato (EXP). Le immagini istologiche sono state osservate al microscopio ottico tramite il quale si sono tratte delle indicazioni qualitative sia sulla rimozione cellulare che sulla struttura della matrice del tessuto decellularizzato.

In particolare, dalle colorazioni con EE è stata riscontrata l'assenza di nuclei o residui di materiale nucleare e si può affermare, osservando le fibre di collagene ed elastina, che la morfologia del tessuto è stata preservata.

La completa rimozione dei nuclei è testimoniata anche dalle immagini del microscopio a fluorescenza con cui sono stati osservati i campioni soggetti a colorazione DAPI.

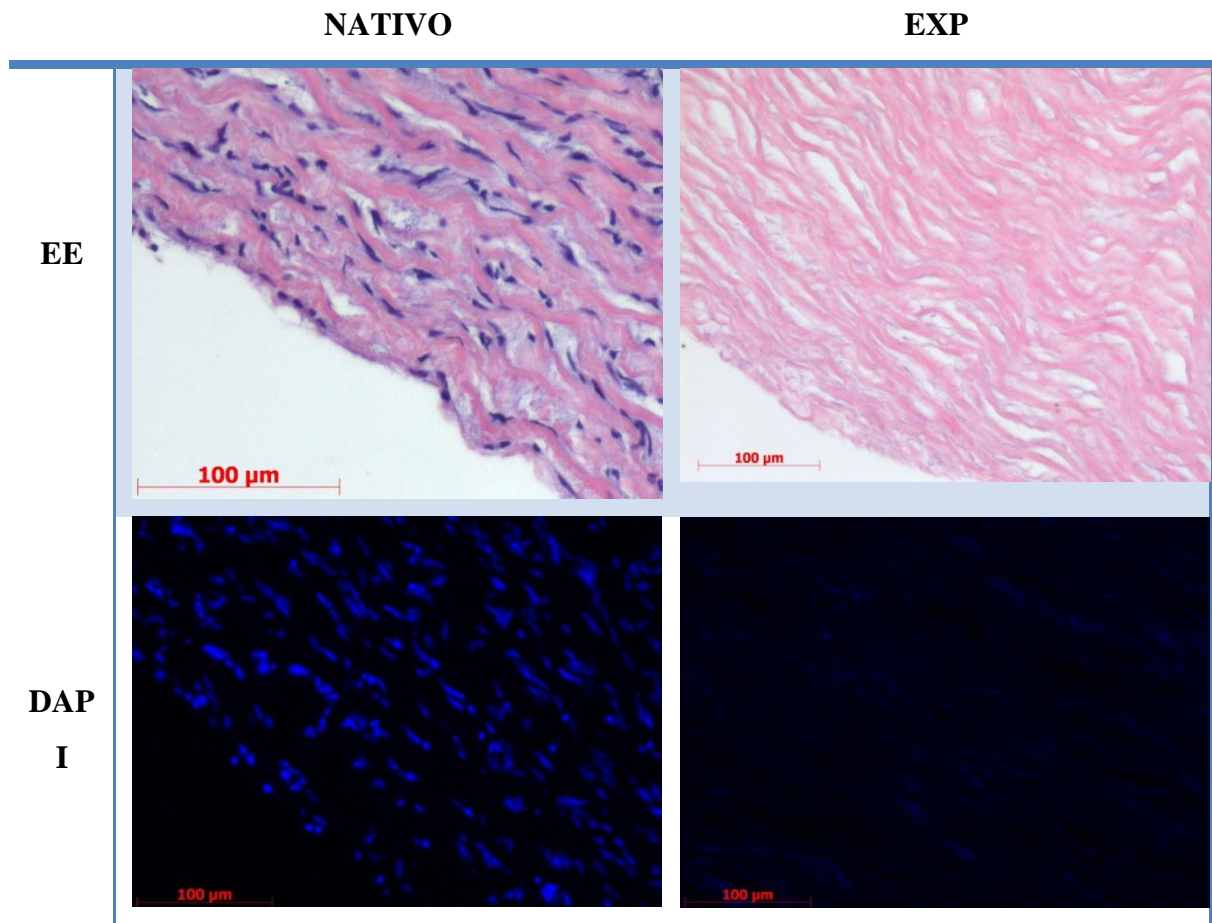


Fig.36 – Immagini istologiche ottenute attraverso la colorazione con EE e DAPI del tessuto nativo e dell'EXP

Il processo di quantificazione di DNA è stato effettuato per tutti i tessuti decellularizzati. In questo modo è stato possibile determinare la quantità di DNA presente nelle matrici ottenute e confrontarla con quella misurata sul tessuto nativo. L'analisi e il confronto tra le medie calcolate per i diversi provini permettono di trarre conclusioni importanti sia sull'efficacia del protocollo che degli effetti del dispositivo sulla decellularizzazione.

Dalle diverse misurazioni effettuate sono stati calcolati i parametri statistici di interesse, la mediana ed i quartili, oltre alle medie di confronto delle differenti misurazioni.

Le quantità di DNA presenti nel tessuto nativo e quelle misurate sul tessuto decellularizzato con il dispositivo (EXP) sono stati analizzati statisticamente e mostrano una differenza significativa tra le due misurazioni. In particolare, la quantità di DNA presente sul tessuto decellularizzato (EXP) è di circa 90 ng/mg.

	Native	Exp-2	Exp-3
Minimum	2025	88.46	58.65
25% Percentile	2144	89.40	79.08
Median	2564	93.37	92.44
75% Percentile	2987	136.2	116.6
Maximum	3106	164.3	144.7

Tab.10 – Valori ottenuti dal test statistico per la quantificazione di DNA degli esperimenti EXP-2, EXP-3 e quelli del tessuto nativo

Questo valore, sia in funzione della quantità presente nel tessuto nativo sia in funzione dei valori presenti in letteratura, può essere considerato un dato che dimostra una decellularizzazione efficiente.

Questa differenza è visibile anche dai grafici ottenuti dal test di Mann-Whitney effettuato con il software.

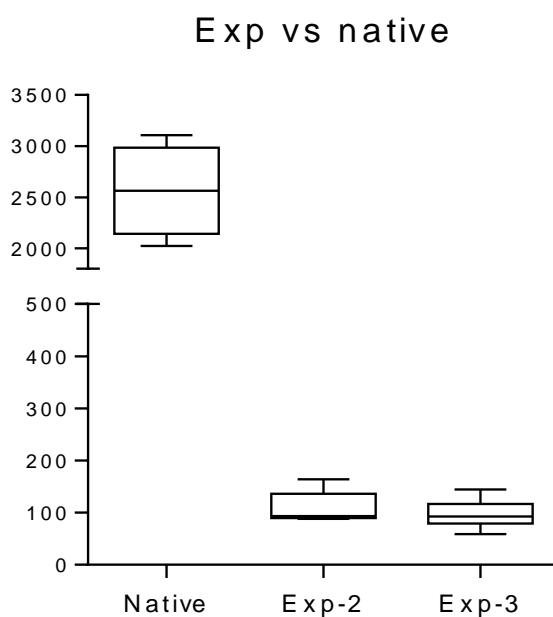


Fig.37 - Grafico dei risultati statistici dei valori della quantificazione del DNA per le prove 2 e 3 in cui sono evidenziati la mediana e i quartili (25% e 75%) rispetto al tessuto nativo

Le prove meccaniche descritte in questo capitolo sono state effettuate solo sui campioni decellularizzati. Dai dati di cross-head ottenuti durante l'azione della forza generata dalla macchina sono stati calcolati i valori di compliance e di burst pressure di tutti i provini testati.

La compliance rappresenta la variazione del diametro in relazione alla variazione del volume mentre la burst pressure è un indice della resistenza massima della matrice.

Anche in questo caso sono state calcolate le mediane di tutti i valori per un confronto diretto. I risultati sono riportati in tabella:

	EXP-3
Compliance	0.006031 (1/mmHg)
Burst Pressure	2508 (mmHg)

Tab.11 - Valori della mediana calcolati per la compliance e la burst pressure calcolati nella prova 3

Da un confronto con i valori medi presenti in letteratura [46] si può affermare che i valori calcolati per i provini decellularizzati dimostrano che il processo a cui sono stati sottoposti non ha portato importanti variazioni nelle proprietà meccaniche del tessuto. Questo significa che sia il protocollo che il dispositivo effettuano la decellularizzazione nel totale rispetto della struttura della matrice e dei legami dei suoi costituenti.

Per ulteriori considerazioni sugli effetti del dispositivo sul tessuto decellularizzato sono stati fatti dei test di confronto tra i campioni decellularizzati manualmente e con il dispositivo, per valutare le caratteristiche meccaniche del tessuto di CTRL in relazione a quelle dell' EXP.

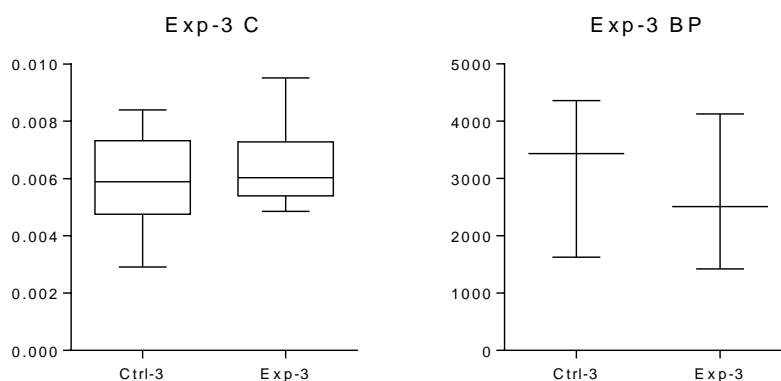


Fig.38- Grafico dei risultati statistici dei valori della compliance e della burst pressure calcolate nella prova 3 in cui sono evidenziati la mediana e i quartili (25% e 75%)

Come è possibile osservare infatti, non si sono verificate differenze significative tra i due tipi di campioni decellularizzati sia per quanto riguarda la compliance che per la resistenza massima i cui valori di mediana e percentili sono molto simili.

	COMPLIANCE		BURST PRESSURE	
	CTRL-3	Exp-3	CTRL-3	Exp-3
Minimum	0.002910	0.004852	1627	1424
25% Percentile	0.004755	0.005395	1627	1424
Median	0.005884	0.006031	3435	2508
75% Percentile	0.007323	0.007278	4360	4129
Maximum	0.008400	0.009509	4360	4129

Tab.12 – Valori ottenuti dal test statistico sui risultati delle prove meccaniche dell'EXP-3

Invece, si sono verificate delle differenze significative nella quantità di DNA presente all'interno dei tessuti decellularizzati secondo le due diverse tecniche. In particolare, sono stati effettuati dei test statistici sui valori ottenuti dalla quantificazione del DNA e, come si evince dal grafico (fig.39), in questo caso, la quantità di DNA risulta maggiore per i tessuti decellularizzati con il dispositivo.

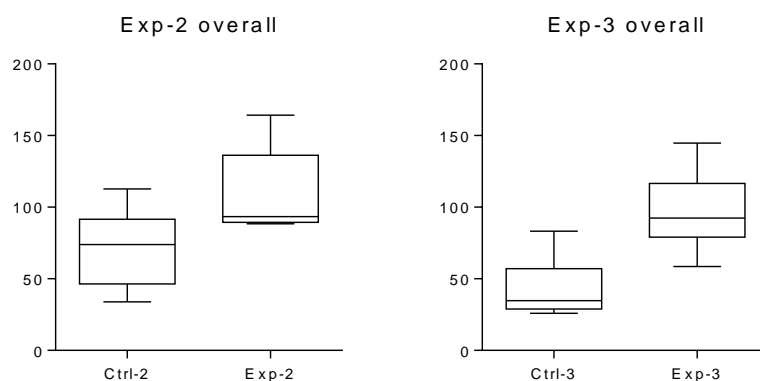


Fig.39 - Grafico dei risultati statistici dei valori della quantificazione del DNA per le prove 2 e 3 in cui sono evidenziati la mediana e i quartili (25% e 75%)

Questo risultato ha reso necessaria un'ulteriore prova sperimentale in funzione di una validazione finale del dispositivo. Ottenere un tessuto decellularizzato in maniera automatica in cui la quantità di DNA supera quella presente in un tessuto decellularizzato manualmente contrasta con gli obiettivi preposti durante la progettazione del dispositivo stesso. In seguito ad alcune osservazioni, infatti, si è ipotizzato che la causa di questa lacuna del sistema sia dovuta ad un effetto di ristagno che si crea all'interno del vaso. Dopo il riempimento della camera, infatti, la perfusione termina e il vaso che è collegato ai due afferraggi si comporta come una gabbia per la sostanza che non subisce un rimescolamento adeguato e costante perdendo progressivamente la sua azione. Questo effetto potrebbe essere dovuto quindi al fatto che la perdita di carico generata dagli afferraggi limita gli effetti diffusivi.

Questa considerazione è stata confermata durante due diversi tipi di prova di decellularizzazione effettuati allo scopo di valutare questo aspetto EXP-4 e EXP-5

Nella prima prova (EXP-4/CTRL-4) la decellularizzazione è stata svolta su un tessuto vascolare con un diametro maggiore rispetto a quelli utilizzati nella prova precedente. In questo modo, si è voluto verificare se l'aumento di sostanza presente nella parte interna del vaso avrebbe compensato questa limitazione degli effetti diffusivi. I test statistici effettuati sui dati riguardanti la quantità di DNA presente nell'EXP e quella presente nel CTRL non ha evidenziato alcuna differenza significativa confermando al momento l'ipotesi di partenza.

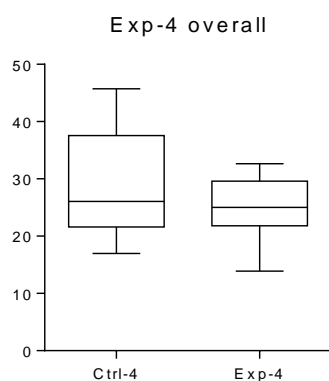


Fig.40 - Grafico dei risultati statistici dei valori della quantificazione del DNA per le prova 4 in cui sono evidenziati la mediana e i quartili (25% e 75%)

Per un ulteriore conferma di questa ipotesi è stata svolta prova (EXP-5/CTRL-5) in cui il tessuto è stato fissato al solo afferraggio prossimale lasciando l'altra estremità libera dall'afferraggio distale, permettendo così un maggior rimescolamento della sostanza all'interno del vaso. I test effettuati dopo questa prova non hanno evidenziato una differenza significativa tra la quantità del CTRL e quella presente nel tessuto dell'EXP provando che l'ipotesi della limitazione degli effetti diffusivi potrebbe essere la causa effettiva di questo risultato.

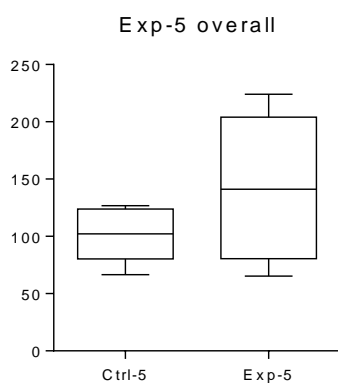


Fig.41- Grafico dei risultati statistici dei valori della quantificazione del DNA per la prova 5 in cui sono evidenziati la mediana e i quartili (25% e 75%)

Capitolo 5:

CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI

Negli ultimi anni, nei paesi occidentali, si è registrata un'insorgenza sempre più frequente delle patologie cardiovascolari e, malattie quali la stenosi e l'aneurisma sono spesso causa di decesso.

L'ingegneria dei tessuti può essere considerata oggi una soluzione alle problematiche che caratterizzano le protesi vascolari. Questa disciplina si serve di conoscenze ingegneristiche e biologiche per lo sviluppo di tessuto biologico in vitro. Il tessuto viene ottenuto attraverso la semina di specifiche cellule, differenziate o indifferenziate, su una struttura porosa tridimensionale definita scaffold, che ha il ruolo di supporto per l'adesione, la proliferazione e la crescita delle cellule nella produzione di un tessuto dalle caratteristiche simili a quello biologico.

L'utilizzo di scaffold di origine sintetica o biologica ha portato risultati soddisfacenti nella realizzazione di tessuti ingegnerizzati presentando però numerosi problemi relativi all'integrazione di queste strutture con l'organismo ospite quali reazioni infiammatorie o immunitarie.

La possibile alternativa alle problematiche riscontrate potrebbe essere la decellularizzazione. Questa tecnica consiste in un processo di rimozione cellulare attuato attraverso agenti chimici, fisici e biologici con cui si cerca di ottenere una struttura costituita da matrice ECM, riconosciuta come non estranea dal nostro sistema immunitario e che possiede le caratteristiche meccaniche adeguate allo scopo prefissato.

La problematica principale nell'ottenimento di scaffold acellulari è la definizione di protocolli di decellularizzazione in grado di rimuovere completamente la componente cellulare senza produrre azioni degradative della struttura e quindi delle proprietà meccaniche della matrice stessa.

In questo senso è importante valutare attentamente quali sono gli effetti dei differenti agenti usati per il processo di decellularizzazione ed ottimizzare il protocollo per produrre uno scaffold che possa guidare la crescita cellulare e supportare lo sviluppo del tessuto senza indurre una risposta immunitaria all'interno dell'organismo.

Attualmente i protocolli, che si sono dimostrati efficaci, prevedono la combinazione e l'uso sequenziale di differenti agenti chimici e biologici in ambienti controllati che permettono anche la stimolazione fisica o l'azione termica sul tessuto stesso. Lo svolgimento manuale di questi processi sembra essere, oggi, un limite nella produzione di una struttura

completamente acellulare e nel rispetto di requisiti quali la ripetibilità, la riproducibilità e la sterilità, fondamentali nell'ingegneria dei tessuti come previsto dalle norme GMP.

Un protocollo di decellularizzazione svolto in maniera manuale, oltre a richiedere il continuo monitoraggio e impegno da parte di un operatore e quindi anche costi elevati, è un processo ad alto rischio di contaminazione e scarsa ripetibilità e riproducibilità.

In questo ambito l'obiettivo del seguente lavoro è stato la progettazione e lo sviluppo di un prototipo per la decellularizzazione automatica e la validazione di un nuovo protocollo di decellularizzazione in funzione della sua capacità di rimuovere le cellule e di mantenere intatta la struttura e la morfologia della matrice.

Lo sviluppo del dispositivo è stato incentrato sugli aspetti che si sono dimostrati incongruenti con le specifiche di progetto stabilite in partenza. In particolare, l'analisi del funzionamento, ha evidenziato una limitazione nella completa automazione del processo e una scarsa versatilità del sistema nell'utilizzo di differenti protocolli di decellularizzazione.

A tale scopo innanzitutto, è stato modificato il circuito idraulico per permettere il ricambio di differenti sostanze decellularizzanti all'interno della camera. Il circuito è stato progettato con 3 linee idrauliche indipendenti in parallelo, gestite da un sistema di elettrovalvole, che si sono rivelate efficaci per il riempimento della camera con le diverse sostanze previste dal protocollo. Il circuito è stato testato su banco prova prima di essere usato per la decellularizzazione e si è dimostrato affidabile, i tempi di riempimento e svuotamento sono stati rispettati e non si sono verificate perdite o cedimenti a livello delle connessioni.

Durante questa fase è stato verificato che il ricambio di ogni sostanza rispettasse i tempi prestabiliti e che il riempimento della camera avvenisse, effettivamente, dal reservoir contenente la sostanza richiesta. Il sistema progettato quindi ha permesso l'automazione completa del processo grazie al quale, durante le prove di decellularizzazione, il compito dell'operatore si è ridotto al solo montaggio e smontaggio del dispositivo.

Le prove di validazione sono state effettuate simulando ogni volta un differente tipo di protocollo. In questo modo è stata valutata anche la versatilità e la semplicità di utilizzo del sistema determinata dalla nuova progettazione dell'hardware e del software. La funzione, ideata per la modifica immediata dei parametri che costituiscono il protocollo di decellularizzazione, ha permesso effettivamente di programmare il dispositivo senza apportare modifiche al codice implementato ma solo attraverso l'inserimento dei parametri necessari alla funzione per il corretto svolgimento del processo. A questo proposito, uno

sviluppo importante per la realizzazione di un'interfaccia utente ancora più semplice ed intuitiva, potrebbe essere l'inserimento nell'unità del sistema di controllo, di uno schermo LCD sul quale poter leggere le informazioni legate al funzionamento del dispositivo senza la necessità di collegare il PC.

In particolare, il nuovo codice progettato è in grado di fornire informazioni sui parametri impostati, quali il numero di sostanze, il numero di ricambi per ogni sostanza, il tempo necessario all'azione decellularizzante e il range di temperature alla quale deve essere mantenuta la camera.

Inoltre, con l'ausilio del display LCD, sarebbe visibile, durante il processo, il tipo di sostanza presente nella camera e il numero di ricambi effettuati fino a quel momento per quella sostanza specifica.

Le prove di decellularizzazione effettuate con il dispositivo hanno confermato l'efficacia delle scelte costruttive adottate durante la progettazione ma hanno evidenziato un aspetto negativo riguardante il numero di manipolazioni necessarie al montaggio dei componenti sotto la cappa a flusso laminare. Il problema principale è stato quello di assemblare le varie parti del circuito idraulico, questo però può essere risolto semplicemente realizzando il circuito con un unico tubo senza la necessità di tutte le connessioni utilizzate in questo lavoro. Inoltre, sarebbe necessario la realizzazione di un sistema di afferraggi che permetta una più semplice sistemazione del vaso.

La seconda fase di questo lavoro di tesi ha previsto una serie di esperimenti di decellularizzazione svolti sia in maniera automatica che manuale. L'obiettivo della sperimentazione è stato quello di determinare gli aspetti positivi e negativi del processo sul tessuto trattato. In particolare i risultati ottenuti sono stati elaborati in modo tale da poter trarre conclusioni sia sull'efficacia del protocollo sia sull'influenza che il dispositivo aveva sulla decellularizzazione stessa.

Per l'analisi dei tessuti sono state utilizzate differenti tecniche quali lo studio delle immagini istologiche, i test meccanici e la quantificazione di DNA.

Per la valutazione dei risultati sono state messe a confronto le mediane dei valori ottenuti e sono stati svolti test statistici non parametrici in cui sono state considerate significative le differenze con un p-value minore di 0.05.

Il protocollo di decellularizzazione e i suoi effetti sul tessuto sono stati valutati confrontando indipendentemente il CTRL e l'EXP con il tessuto nativo.

Le immagini istologiche hanno permesso di verificare l'assenza di nuclei o residui di materiale nucleare in tutti i tessuti trattati senza evidenti variazioni della struttura e della morfologia della matrice.

Infatti, la quantità di DNA presente nelle matrici, confrontata con quella del tessuto nativo, è risultata relativamente molto bassa. I valori di compliance e di burst pressure, ottenuti dalle prove meccaniche, non hanno subito variazioni significative dimostrando che il processo non ha influenzato le proprietà meccaniche del tessuto.

Da questi risultati possiamo concludere che il protocollo di decellularizzazione utilizzato in questo lavoro di tesi è un protocollo efficace e permette un'ottima rimozione cellulare rispettando la struttura della matrice ECM e dei legami dei suoi costituenti senza comprometterne la biomeccanica.

Infine, per confrontare i differenti effetti della decellularizzazione manuale rispetto a quella automatica sono stati effettuati dei test statistici sui valori ottenuti dalla quantificazione del DNA e durante le prove meccaniche.

Per quanto riguarda il comportamento meccanico non si sono riscontrate differenze significative tra i risultati della compliance e quelli della burst pressure che caratterizzano le diverse matrici decellularizzate confermando quindi un buon lavoro del dispositivo.

Le quantità di DNA misurate sono risultate invece significativamente differenti. In particolare è stata calcolata una quantità relativa di DNA maggiore per i tessuti che sono stati trattati con il dispositivo.

Questo è indice di una minore efficacia del processo di decellularizzazione attuato con il dispositivo rispetto a quella manuale. Da alcune osservazioni si è concluso che la causa di questa inefficienza potrebbe essere causata dalla perdita di carico, generata dagli afferraggi e che provoca una limitazione degli effetti diffusivi della sostanza decellularizzante all'interno del vaso.

Allo scopo di valutare questa ipotesi sarebbe opportuno effettuare dei test di analisi dei tessuti trattati separatamente per la parete interna ed esterna del vaso.

In attesa di risultati che confermino questa ipotesi, potrebbe essere un ulteriore sviluppo del dispositivo la realizzazione di un sistema che permetta la continua perfusione del vaso durante l'azione decellularizzante e che, invece, attualmente termina con il riempimento della camera. Si potrebbe, a tal proposito, creare un by-pass cioè un sistema che permetta il ricircolo della sostanza a livello della camera, permettendo una perfusione continua del

vaso. Un'altra possibilità sarebbe quella di riprogettare il sistema di controllo per creare un'azione alternata delle pompe in modo da svuotare e riempire la camera di pochi mL per tutto il tempo della decellularizzazione portando ad un maggiore rimescolamento del volume di fluido presente all'interno del vaso.

Durante la sperimentazione, si è evidenziata anche la necessità di diminuire il più possibile il volume della camera in modo da ridurre conseguentemente il volume dei reservoir e del waste necessari, ciò permette di evitare una loro eventuale sostituzione e quindi assicurare la completa automazione del sistema. Inoltre, la riduzione del volume di riempimento ridurrebbe anche i costi del consumo delle sostanze chimiche utilizzate, soprattutto alla luce del fatto che si è dimostrato, durante le prove manuali all'interno delle Falcon, che 50 ml di sostanza sono sufficienti per ottenere una decellularizzazione efficace.

Gli afferraggi per il fissaggio del vaso all'interno della camera potrebbero essere riprogettati con un meccanismo di aggancio automatico che renda più semplice questa operazione che attualmente viene effettuata con un filo di sutura.

Da un punto di vista dell'applicazione clinica è importante, anche, riuscire a progettare la camera di decellularizzazione con un materiale disposable oltre a valutare la possibilità di creare un sistema multi-linea per la decellularizzazione di un numero maggiore di tessuti con lo stesso processo.

Infine, per aumentare la semplicità di utilizzo del sistema, sarebbe importante prevedere l'inserimento di un piccolo schermo LCD sul quale possano essere visualizzate le informazioni sul sistema e sviluppare una specifica interfaccia software per ottenere un dispositivo user-friendly, migliorare cioè la facilità e l'intuitività di utilizzo favorendo il lavoro di un qualunque operatore.

Alla luce dei risultati ottenuti e dalle osservazioni effettuate durante la fase sperimentale è possibile concludere che il progetto realizzato svolge il proprio compito nel totale rispetto dei requisiti definiti in partenza. Il dispositivo ed il protocollo utilizzato si sono dimostrati efficaci sia nella realizzazione di un tessuto decellularizzato dalle ottime proprietà meccaniche sia nell'automazione di questo processo. Il prototipo quindi, in seguito a piccole ulteriori modifiche, può essere considerato, in funzione della grande versatilità, adatto all'utilizzo in un più ampio sistema per la decellularizzazione contemporanea di un numero maggiore di tessuti e quindi alla conseguente applicazione in abito clinico.

BIBLIOGRAFIA

1. Lloyd-Jones D, Adams RJ, Brown TM, Carnethon M, Dai S, De Simone G, et al.
“Heart disease and stroke statistics--2010 update: a report from the American Heart Association.”
Circulation.121:e46-e215.
2. Schmidt CE, Baier JM.
“Acellular vascular tissues: natural biomaterials for tissue repair and tissue engineering”
Biomaterials. 2000 Nov;21(22):2215-31
3. D. Wendt, S. A. Riboldi, M. Cioffi, and I. Martin
“Bioreactors in Tissue Engineering: Scientific Challenges and Clinical Perspectives”
Adv Biochem Eng Biotechnol. 2009;112:1-27. doi: 10.1007/978-3-540-69357-4_1.
4. Clemens van Blitterswijk, Peter Thomsen, Anders Lindahl, Jeffrey Hubbell, David F. Williams, Ranieri Cancedda, Joost D. de Bruijn and Jérôme Sohier
Tissue Engineering
ISBN: 978-0-12-370869-4
5. Butler DL, Goldstein SA, Guilak F.
“Functional tissue engineering: the role of biomechanics”
J Biomech Eng. 2000 Dec;122(6):570-5
6. Freed LE, Vunjak-Novakovic G.
“Cultivation of cell-polymer tissue constructs in simulated microgravity”
Biotechnology and Bioengineering, 1995; 46 (4): 306-313.
7. Wendt D, Marsano A, Jakob M, Heberer M, Martin I.
“Oscillating perfusion of cell suspensions through three-dimensional scaffolds enhances cell seeding efficiency and uniformity.”
Biotechnology and Bioengineering, 2003; 84: 205-214.
8. Davisson T, Kunig S, Chen A, Sah R, Ratcliffe A.
“Static and dynamic compression modulate matrix metabolism in tissue engineered cartilage. Journal of Orthopaedic Research, 2002; 20: 842-848”
9. Zhao F, Ma T.

- “Perfusion bioreactor system for human mesenchymal stem cell tissue engineering: dynamic cell seeding and construct development.”
Biotechnology and Bioengineering, 2005; 91: 482-493.
10. G.R. Martin
“Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells”
Proc Natl Acad Sci U S A. 1981 December; 78(12): 7634–7638.
 11. Alhadlaq A, Mao JJ.
“Mesenchymal Stem Cells: Isolation and Therapeutics”
Stem Cells Dev. 2004 Aug;13(4):436-48.
 12. Bianco P, Robey PG.
“Stem cells in tissue engineering.”
Nature. 2001 Nov 1;414(6859):118-21.
 13. C. Mauli Agrawal*, Robert B. Ray
“Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering”
Journal of Biomedical Materials Research Volume 55, Issue 2, pages 141–150, May 2001
 14. Linda G. Griffith
“Emerging Design Principles in Biomaterials and Scaffolds for Tissue Engineering”
Annals of the New York Academy of Sciences
Volume 961, REPARATIVE MEDICINE: GROWING TISSUES AND ORGANS pages 83–95, June 2002
 15. Hutmacher DW.
“Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues--state of the art and future perspectives.”
J Biomater Sci Polym Ed. 2001;12(1):107-24.
 16. Liu, C., Xia, Z. & Czernuszka, J.T.
“Design and development of three-dimensional scaffolds for tissue engineering”
Chemical Engineering Research & Design, vol. 85, no. A7, pp. 1051-1064.
 17. Yun HS, Kim SH, Khang D, Choi J, Kim HH, Kang M.
“Biomimetic component coating on 3D scaffolds using high bioactivity of mesoporous bioactive ceramics.”
Int J Nanomedicine. 2011;6:2521-31. doi: 10.2147/IJN.S25647. Epub 2011 Oct 21.

18. Franz S, Rammelt S, Scharnweber D, Simon JC.
 “Biomaterials Immune responses to implants
 Biomaterials. 2011 Oct;32(28):6692-709. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.05.078.
 Epub 2011 Jun 28.

19. Causa F, Netti PA, Ambrosio L.
 “A multi-functional scaffold for tissue regeneration: the need to engineer a tissue analogue.”
 Biomaterials. 2007 Dec;28(34):5093-9. Epub 2007 Aug 6.

20. Gui L, Muto A
 “Development of Decellularized Human Umbilical Arteries as Small-Diameter Vascular Grafts”
 Tissue Engineering.15:12. 2009

21. Lalka SG, Oelker LM, Malone JM, Duhamel RC, Kevorkian MA, Raper BA, et al.
 “Acellular vascular matrix: a natural endothelial cell substrate”
 Ann Vasc Surg.3:108-17. 1989

22. Conklin BS, Wu H, Lin PH, Lumsden AB, Chen C
 “Basic fibroblast growth factor coating and endothelial cell seeding of a decellularized heparin-coated vascular graft”
 Artif Organs.28:668-75. 2004.

23. Tu, Q.; Zhang, Y.; Ge, D.; Wu, J.; Chen, H.
 “Novel tissue-engineered vascular patches based on decellularized canine aortas and their recellularization in vitro”
 APPLIED SURFACE SCIENCE; 255, 2; 282-285

24. Nagatomi J, Toosi KK, Chancellor MB, Sacks MS
 “Contribution of the extracellular matrix to the viscoelastic behavior of the urinary bladder wall”
 Biomech Model Mechanobiol.7:395-404. 2008.

25. Regolamento n. 1394/07/CE del 13 novembre 2007 sui medicinali per terapie avanzate recante modifica della direttiva 2001/83/CE e del Regolamento 726/04/CE

26. Mantero S., Remuzzi A., Raimondi M. T., Ahluwalia A.
 “Fondamenti di ingegneria dei tessuti per la medicina rigenerativa”
 Bologna: Pàtron Editore, Sett 2009.

27. Vorotnikova, dewilde, zhang.
“Extracellular matrix-derived products modulate endothelial and progenitor cell migration and proliferation in vitro and simulate regenerative healing in vivo.”
Matrix Biol 2010
28. P. Bornstein, E.H. Sage
“Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function”
Curr Opin Cell Biol, 14 (5) (2002), pp. 608–616
29. H. Xu, H. Wan, M. Sandor, S. Qi, F. Ervin, J.R. Harper *et al.*
“Host response to human acellular dermal matrix transplantation in a primate model of abdominal wall repair”
Tissue Eng Part A, 14 (12) (2008), pp. 2009–2019
30. J.E. Reing, B.N. Brown, K.A. Daly, J.M. Freund, T.W. Gilbert, S.X. Hsiong *et al.*
“The effects of processing methods upon mechanical and biologic properties of porcine dermal extracellular matrix scaffolds”
Biomaterials. 2010 Nov;31(33):8626-33. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.07.083.
Epub 2010 Aug 21.
31. Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF.
“An overview of tissue and whole organ decellularization processes.”
Biomaterials. 2011 Apr;32(12):3233-43. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.01.057.
Epub 2011 Feb 5.
32. Bertipaglia B, Ortolani F, Petrelli L, Gerosa G, Spina M, Pauletto P, Casarotto D, Marchini M, Sartore S;
“Cell characterization of porcine aortic valve and decellularized leaflets repopulated with aortic valve interstitial cells: the VESALIO”
Vitalitate Exornatum Succedaneum Aorticum Labore Ingenioso Obtenibitur Project.
33. Knight RL, Wilcox HE, Korossis SA, Fisher J, and Ingham E.
“The use of acellular matrix for the tissue engineering of cardiac valves.”
Proc Inst Mech Eng H, 222:129 { 143, 2008.
34. Baiguera S, Jungebluth P, Burns A, Mavilia C, Haag J, De Coppi P, Macchiarini P.
Tissue engineered human tracheas for in vivo implantation.
Biomaterials. 2010 Dec;31(34):8931-8. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.08.005.
Epub 2010 Aug 25.
35. E. Rieder, G. Seebacher, M.-T. Kasimir, *et al.*

- “Tissue engineering of heart valves: decellularized porcine and human valve scaffolds differ importantly in residual potential to attract monocytic cells”
Circulation, vol. 111, no. 21, pp. 2792–2797, 2005.
36. A. Bader, T. Schilling, O. E. Teebken, et al.
 “Tissue engineering of heart valves—human endothelial cell seeding of detergent acellularized porcine valves”*European Journal of Cardio- Thoracic Surgery*, vol. 14, no. 3, pp. 279–284, 1998.
37. P. J. Schaner, N. D. Martin, T. N. Tulenko, et al.
 “Decellularized vein as a potential scaffold for vascular tissue engineering”
Journal of Vascular Surgery, vol. 40, no. 1, pp. 146–153, 2004.
38. Zou Y, Zhang Y.
 “Mechanical evaluation of decellularized porcine thoracic aorta.”
J Surg Res. 2012 Jun 15;175(2):359-68. doi: 10.1016/j.jss.2011.03.070. Epub 2011 Apr 21.
39. Schmidt CE, Baier JM.
 “Acellular vascular tissues: natural biomaterials for tissue repair and tissue engineering.”
Biomaterials. 2000 Nov;21(22):2215-31.
40. Fitzpatrick JC, Clark PM, Capaldi FM.
 “Effect of decellularization protocol on the mechanical behavior of porcine descending aorta.”
Int J Biomater. 2010;2010. pii: 620503. doi: 10.1155/2010/620503. Epub 2010 Jul 4.
41. R.W. Grauss, M.G. Hazekamp, F. Oppenhuizen, C.J. Van Munsteren, A.C. Gittenberger-de Groot, M.C. DeRuiter.
 “Histological evaluation of decellularized porcine aortic valves: matrix changes due to different decellularization methods.”
Eur J. Cardiothorac Surg, 2005, vol.27, p.566-571.
42. K. Schenke-Layland, O. Vasilevski, F. Opitz, K. Konig, I. Riemann, K.J. Halbhuber.
 “Impact of extracellular matrix integrity for tissue engineering of heart valves.”
J. Struct Biol, 2003, vol.143, p.201-208.
43. S. Mantero, A.F. Pellegata.
 “Dispense del corso di Bioingegneria Chimica –Decellularizzazione”. 2012.

44. A.F.Pelletata

“Ottimizzazione del processo di decellularizzazione di vasi arteriosi per l’ingegneria dei tessuti”

45. E.M. Campell, P.A. Cahill, C. Lally.

“Investigation of a small-diameter decellularised artery as a potential scaffold for vascular tissue engineering; biomechanical evaluation and preliminary cell seeding”. Elsevier, 2012. Journal of the mechanical behavior of biomedical materials, vol.14, 2012, p.130-142.

APPENDICI

Appendice1: Codice di Controllo

```
#include <OneWire.h>
```

```
OneWire ds(2);
```

```
//dichiarazione delle variabili
```

```
int evp=5;
```

```
int evu=6;
```

```
int evd=7;
```

```
int evt=8;
```

```
int ev=0;
```

```
int pwma=11;
```

```
int pwmb=3;
```

```
int csec= 0;
```

```
int temporcl=110;
```

```
int temposl=10;
```

```
int temposc=110;
```

```
int tempoa=0;
```

```
int tempotot=0;
```

```
int dira=13;
```

```
int dirb=12;
```

```
int peltier=10;
```

```
int direzione=9;
```



```
// funzione che modifica i registri del microcontrollore per i timer
void setPwmFrequency (int pin, int divisor)
{
    byte mode;
    if(pin==5 || pin ==6 || pin==9 || pin ==10)
    {
        switch (divisor)
        {
            case 1:
                mode=0x01;
                break;
            case 8:
                mode=0x02;
                break;
            case 64:
                mode=0x03;
                break;
            case 256:
                mode=0x04;
                break;
            case 1024:
                mode=0x05;
                break;
            default:
                return;
        }
    }
}
```

```

if (pin == 5 || pin ==6)
{
    TCCR0B= TCCR0B & 0b1111100000 | mode;
}
else
{
    TCCR1B= TCCR1B & 0b1111100000 | mode;
}
}
else if (pin == 3 || pin ==11)
{
    switch (divisor)
    {
        case 1:
            mode=0x01;
            break;
        case 8:
            mode=0x02;
            break;
        case 64:
            mode=0x03;
            break;
        case 256:
            mode=0x04;
            break;
        case 1024:

```

```

    mode=0x05;

    break;

    default:

    return;

}

TCCR2B= TCCR2B & 0b1111100000 | mode;

}

}

void setup () {

    Serial.begin(9600);

    pinMode(pwma, OUTPUT);

    pinMode(pwmb, OUTPUT);

    pinMode(dira, OUTPUT);

    pinMode(dirb, OUTPUT);

    pinMode(peltier, OUTPUT);

    pinMode(direzione, OUTPUT);

    pinMode(evu, OUTPUT);

    pinMode(efd, OUTPUT);

    pinMode(evt, OUTPUT);

    pinMode(esp, OUTPUT);

    digitalWrite(esp, LOW);

    digitalWrite(evu, LOW);

    digitalWrite(efd, LOW);

    digitalWrite(evt, LOW);

    digitalWrite(dira,LOW);

    digitalWrite(dirb,LOW);

```

```
setPwmFrequency(pwma,8);
setPwmFrequency(pwmb,8);
setPwmFrequency(10,8);
delay(3000);
}
void loop() {
for(ora=0; ora <18; ora++){

if (ora<12){
    setPump(3,2,20,24);
    delay(2000);

}

if (ora>11&&ora<14){
    setPump(2,6,20,24);
    delay(2000);

    }

    else if (ora>13){
    setPump(1,10,20,24);
    delay(2000);

}

}
```

```

    } //chiudo for
} //chiudo loop

// funzione di comando del circuito idraulico

void setPump ( int nomeSostanza, int tempo, int tmin, int tmax){

//funzione acquisizione temperatura

byte i;
byte present=0;
byte type_s;
byte data [12];
byte addr [8];
float celsius, fahrenheit;
if(!ds.search(addr))
{
    Serial.println ("No more addresses.");
    Serial.println();
    ds.reset_search();
    delay(250);
    return;
}

if (OneWire::crc8(addr, 7) != addr[7])
{

```

```
Serial.println ("CRC is not valid");  
  
return;  
  
}  
  
Serial.println();  
  
// il primo ROM indica il tipo di chip usato  
  
switch (addr[0])  
{  
  
  case 0x10:  
  
    Serial.println("chip = DS18S20");  
  
    type_s = 1;  
  
    break;  
  
  case 0x28:  
  
    Serial.println("chip = DS18B20");  
  
    type_s = 0;  
  
    break;  
  
  case 0x22:  
  
    Serial.println("chip = DS1822");  
  
    type_s = 0;  
  
    break;  
  
  default:  
  
    Serial.println("Device in not a DS18x20 family device.");  
  
    return;  
  
}
```

```
ds.reset();

ds.select(addr);

ds.write(0x44,1); //start conversion

delay(1000);

present = ds.reset();

ds.select(addr);

ds.write(0xBE);

Serial.print( " Data= ");

Serial.print( present, HEX );

Serial.print( " ");

for ( i= 0; i < 9; i++)

{

    data[i]= ds.read();

    Serial.print(data[i], HEX);

    Serial.print( " ");

}

Serial.print( " CRC= ");

Serial.print(OneWire::crc8(data, 8), HEX);

Serial.println();
```

```

//conversione dei dati nella temperatura attuale

unsigned int raw= (data[1]<<8) | data[0];

if (type_s)
{
    raw=raw<<3;

    if (data[7]== 0x10)
    {
        raw = (raw & 0xFFF0) +12- data [6];
    }
}

else
{
    byte cfg = (data[4] & 0x60);

    if ( cfg== 0x00) raw= raw<<3;

    else if (cfg== 0x20) raw= raw<<2;

    else if (cfg== 0x40) raw= raw<<1;

}

celsius = (float) raw / 16.0;

Serial.print(" Temperature= ");

Serial.print(celsius);

Serial.print(" Celsius, ");

Serial.println();

Serial.print(csec);

Serial.print(" Time ");

float tmisurata = celsius;

```



```
//controllotemperatura

if (tmin<tmisurata<tmax)
{
    analogWrite(peltier,0);
}

if (tmisurata<tmin)
{
    digitalWrite(direzione, HIGH);
    analogWrite(peltier,90);
}

if (tmisurata>tmax)
{
    digitalWrite(direzione, LOW);
    analogWrite(peltier,90);
}

//fine controllo

switch ( nomeSostanza ){

    case 1:
        tempoa=tempo;
        ev=evu;
        break;
```

case 2:

```
tempoa=tempo;
```

```
ev=evd;
```

```
break;
```

case 3:

```
tempoa=tempo;
```

```
ev=evt;
```

```
break;
```

```
}
```

```
tempotot=temporcl+temposl+tempoa+temposc;
```

```
for (csec=0; csec<tempotot; csec++)
```

```
{
```

```
if(csec==0 ){
```

```
    digitalWrite(ev, HIGH);        //apro elettrovalvola 1 che è normalmente chiusa
```

```
    analogWrite(pwma,255);        //aziono la pompa di riempimento in direzione oraria
```

```
    digitalWrite(dira,LOW);
```

```
    analogWrite(pwmb,0);
```

```
}
```

```
if (csec==temporcl ) {
```

```
    digitalWrite(dira,HIGH);      //aziono la pompa di riempimento in direzione antioraria
```

```

        digitalWrite(ev, HIGH);    //chiudo elettrovalvola pompa che è normalmente aperta
    }

    if (csec==temporcl+temposl){    // azionamento

        analogWrite(pwma,0);    //fermo pompa di riempimento
        digitalWrite(ev, LOW);    //chiudo elettrovalvola 1 che è normalmente chiusa
    }

    if (csec==temporcl+tempoa+temposl) {

        digitalWrite(ev, LOW);    //apro elettrovalvola pompa che è normalmente aperta
        analogWrite(pwmb,255);
        digitalWrite(dirb,HIGH);    //aziono pompa di svuotamento per tempo di svuot camera
    }

    delay(1000);

}

}

```

Appendice2: Datasheet Elettrovalvole

ELETTROVALVOLE 2/2-NC (NORMALMENTE CHIUSE)

ELECTROVANNES 2/2-NF (NORMALEMENT FERMEES)



Corpo valvola Corps vanne	Tubi - Tubes		Minimo spessore di parete del tubo Epaisseur minimum de paroi du tube (mm)	Forza di pinzaggio Force de pincement (Kg)	Assorbimento Absorption (W)	VALVOIA VANNE	ELETTRIMAGNETE BOBINE	Note Notes	Peso Poids (Kg)	Fig.
	Ø interno Ø intérieur (mm)	Ø esterno Ø extérieur (mm)								
Ø 16 mm	0,76	1,65	0,4	0,180	4	S104-07	Z031A	-	0,050	1
	1,02	2,16	0,5	0,220	4	S104-08	Z031A	-	0,050	1
	1,57	3,18	0,7	0,280	4	S104-09	Z031A	-	0,050	1
	1,98	3,18	0,5	0,250	4	S104-10	Z031A	-	0,050	1
Ø 25 mm	1,5	3,9	-	0,650	9	S105-08	Z530A	1	0,270	2
	2,5	4,1	-	0,650	9	S105-07	Z530A	-	0,270	2
	2,7	4,9	-	0,650	9	S105-06	Z530A	-	0,260	2
	3,4	4,7	-	0,650	9	S105-06	Z530A	-	0,260	2
Ø 30 mm	4,8	7,9	-	1,100	13	S106-08	Z130A	-	0,440	3
	6,4	9,5	-	1,400	13	S106-09	Z130A	-	0,440	3

- Se i tubi morbidi sono diversi da quelli indicati, è importante che lo spessore minimo della parete del tubo sia quello riportato in tabella

- L'elettrovalvola potrebbe non operare correttamente a tubo disorientato

- Per l'utilizzo di tubi con Ø esterno minore di 2,2mm (S104) - 3,5mm (S105)

- 6mm (S106) occorre montare il dispositivo guidatubo (vedere pag. 11)

1 - Esecuzione con silenziamento speciale

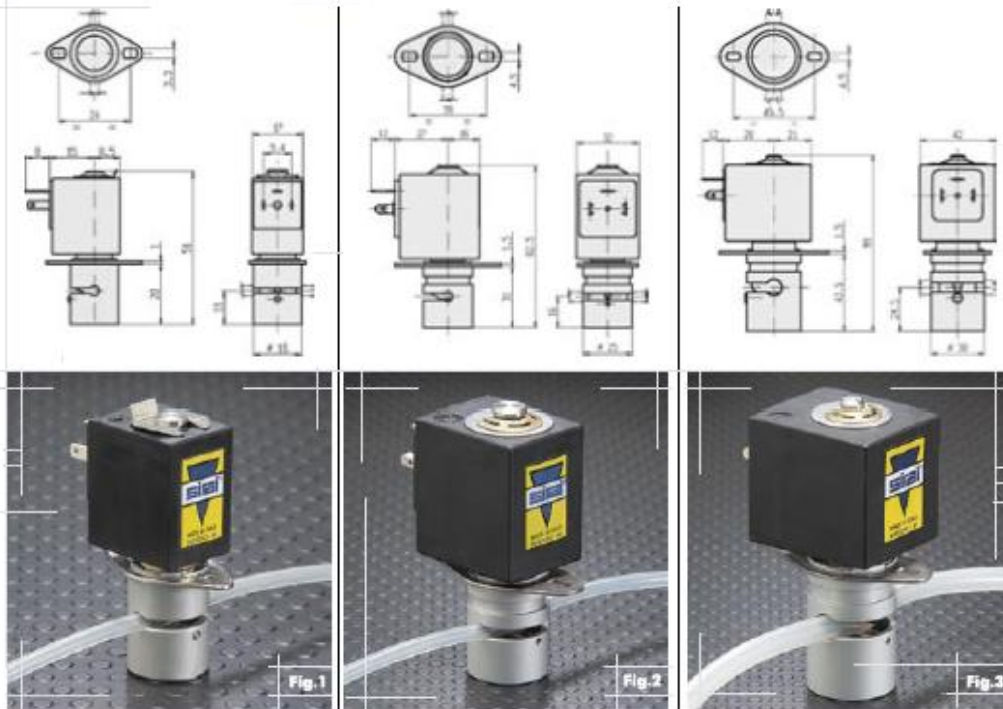
- Si les tubes souples sont différents de ceux indiqués, il est important que l'épaisseur minimum de paroi du tube soit celui indiqué dans la table

- L'électrovanne ne pourrait pas opérer correctement si le tube n'est pas placé dans son logement

- Pour utiliser tubes avec Ø extérieur inférieur à 2,2mm (S104) - 3,5mm (S105)

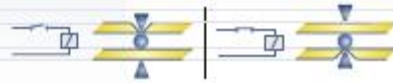
- 6mm (S106) il faut monter le dispositif guidetube (voir page 11)

1 - Modèle spéciale silencieuse



ELETTROVALVOLE 3/2

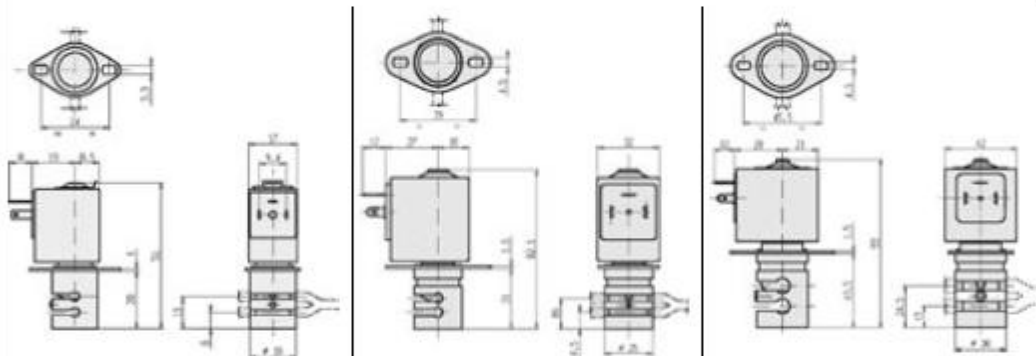
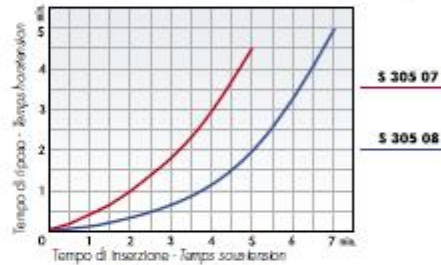
ELECTROVANNES 3/2



Corpo valvola Cops vanne	Tubi - Tubes		Minimo spessore di parete del tubo Épaisseur minimum de paroi du tube (mm)	Forza di pinzaggio Força de pincement (Kg)	Assorbimento Absorption (W)	VALVOLA VANNE	ELETTRIMAGNETE BOBINE	Note Notes	Peso Poids (Kg)	Fig.
	∅ interno ∅ intérieur (mm)	∅ esterno ∅ extérieur (mm)								
∅ 16 mm	0,76	1,65	0,4	0,120	4	S305-09	Z031A	-	0,050	7
	1,02	2,16	0,5	0,180	4	S305-06	Z031A	-	0,050	7
	1,57	3,18	0,7	0,220	8	S305-07	Z031H	1	0,050	7
	1,98	3,18	0,5	0,180	6	S305-08	Z031F	1	0,050	7
∅ 25 mm	3,4	4,7	-	0,400	9	S306-02	Z530A	-	0,280	8
∅ 30 mm	4,8	7,9	-	0,850	13	S307-05	Z130A	-	0,420	9
	6,4	9,5	-	1,100	13	S307-06	Z130A	-	0,420	9

- Se i tubi morbidi sono diversi da quelli indicati, è importante che lo spessore minimo della parete del tubo sia quello riportato in tabella
- L'elettrovalvola potrebbe non operare correttamente a tubo disinserto
- Per l'utilizzo di tubi con ∅ esterno minore di 2,2mm (S305) - 3,5mm (S306) - 6mm (S307) occorre montare il dispositivo guidatubo (vedere pag. 11)
- 1 - Per servizio discontinuo: vedere il diagramma a lato.

- Si les tubes souples sont différents de ceux indiqués, il est important que l'épaisseur minimum de paroi du tube soit celui indiqué dans le tableau
- L'électrovanne ne pourrait pas opérer correctement si le tube n'est pas placé dans son logement
- Pour utiliser tubes avec ∅ extérieur inférieur à 2,2mm (S305) - 3,5mm (S306) - 6mm (S307) il faut monter le dispositif guidetube (voir page 11)
- 1 - Pour service intermittent: voir le diagramme à côté



Appendice3: Datasheet Relay Shield

Microbot – Relay Shield

!!! CAUTION !!!

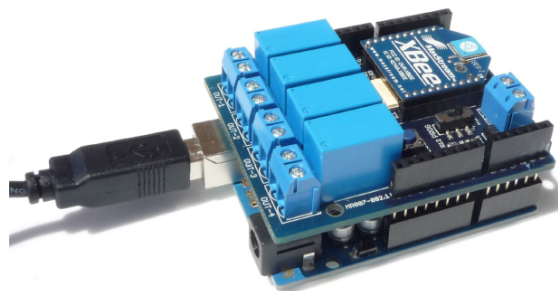
This device can carry high voltages and can therefore be deadly if incorrectly used

CHARACTERISTICS

Name	Description
OUT-1 control pin	Arduino pin 5
OUT-2 control pin	Arduino pin 6
OUT-3 control pin	Arduino pin 7
OUT-4 control pin	Arduino pin 8
Supply voltage	12VDC
Supply current	200mA (max.)
Dimensions	2.7" x 2.2" (69 x 55 mm)
Weight	1.73 oz / 49 gr
Operating temperature	-30°C to +70°C

SPECIFICATIONS (each channel)

Name	Description
Rated voltage	30VDC, 250VAC
Rated current	10A
Coil voltage	12VDC
Coil resistance	320 Ω \pm 10%
Electrical Life Expectancy	100000 operations
Mechanical Life Expectancy	10000000 operations
Operate time max.	10ms
Release time max.	4ms



2

MICROBOT di Prosseda Mirko – Via della Stazione 288, 04013 Latina Scalo (LT), Italy
web: <http://www.microbot.it> email: info@microbot.it tel: +39-347-8684579

