

POLITECNICO DI MILANO

Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria
Biomedica



**OTTIMIZZAZIONE DI UN SISTEMA PER LA
DECELLULARIZZAZIONE AUTOMATICA DI
TESSUTI BIOLOGICI**

Relatore: Prof. Sara Mantero

Correlatore: Ing. Alessandro PELLEGGATA

Autore:

Filippo Maria Ballo

Matricola 783265

Anno accademico 2012-2013

INDICE

INDICE DELLE FIGURE.....	I
INDICE DELLE TABELLE E DEI GRAFICI.....	IV
SOMMARIO.....	V
ABSTRACT.....	XVI
Capitolo 1: INTRODUZIONE.....	1
1.1 L'INGEGNERIA DEI TESSUTI.....	2
1.1.1 CELLULE.....	3
1.1.2 SCAFFOLD.....	6
1.1.3 BIOREATTORE.....	7
1.2 ANATOMIA FUNZIONALE DEI VASI SANGUIGNI.....	10
1.3 IMPIANTI PER LE PATOLOGIE CARDIOVASCOLARI.....	13
1.3.1 IMPIANTI VASCOLARI DI ORIGINE SINTETICA.....	15
1.3.2 IMPIANTI VASCOLARI DI ORIGINE BIOLOGICA	16
1.4 LA DECELLULARIZZAZIONE.....	19
1.4.1 INTRODUZIONE.....	19
1.4.2 DECELLULARIZZAZIONE DI VASI SANGUIGNI.....	21
1.4.3 AUTOMAZIONE DEL PROCESSO DI DECELLULARIZZAZIONE.....	23
1.5 OBIETTIVI DEL LAVORO.....	25
Capitolo 2: PROGETTAZIONE DEL DISPOSITIVO.....	26
2.1 REQUISITI GENERALI DEL DISPOSITIVO.....	27
2.2 SOLUZIONE PROGETTUALE INIZIALE.....	29
2.3 SOLUZIONI PROGETTUALI	40
2.3.1 CIRCUITO IDRAULICO.....	40
2.3.2 SISTEMA DI TERMOREGOLAZIONE.....	46
2.3.3 SISTEMA DI CONTROLLO.....	51
2.3.3.1 HARDWARE.....	51
2.3.3.2 SOFTWARE.....	60

Capitolo 3: PROVE SPERIMENTALI E RISULTATI.....	70
3.1 PROVE SU BANCO.....	71
3.1.1 CALIBRAZIONE DELLE POMPE.....	71
3.1.2 VALIDAZIONE DEL CIRCUITO IDRAULICO E DEL SISTEMA DI TERMOREGOLAZIONE.....	74
3.2 PROVE IN LABORATORIO.....	76
3.2.1 QUANTIFICAZIONE DEL DNA.....	76
3.2.2 ANALISI ISTOLOGICA IN EMATOSSILINA-EOSINA E MARCATURA DAPI.....	78
3.2.3 DECELLULARIZZAZIONE DI VASI SANGUGNI E PROVA DI STERILITÀ.....	78
3.2.4 DECELLULARIZZAZIONE DI UN TESSUTO RENALE.....	86
3.2.5 VALUTAZIONE DEL DISPOSITIVO.....	92
Capitolo 4: CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI.....	94
BIBLIOGRAFIA.....	100
APPENDICI	
Appendice 1: Datasheet LCD Keypad Shield.....	105
Appendice 2: Datasheet Elettrovalvole.....	106
Appendice 3: Datasheet Pompe WPX1.....	107
Appendice 4: Datasheet Pompe WPM2.....	109
Appendice 5: Datasheet Cella di Peltier.....	111
Appendice 6: Codice di Controllo.....	113

INDICE DELLE FIGURE

- Fig.1:** Sinistra: esempi di varie dimensioni di piastre di Petri. Destra: flasks.....3
- Fig.2:** Incubatore.....4
- Fig.3:** Cappa a flusso laminare.....5
- Fig.4:** Immagine illustrativa dell'approccio dell'ingegneria dei tessuti: le cellule, ottenute dal paziente, vengono coltivate in vitro, quindi vengono fatte aderire ad un supporto tridimensionale (scaffold), ottenendo un graft che viene impiantato nello stesso paziente.....10
- Fig.5:** Rappresentazione schematica degli strati che costituiscono le arterie, le vene e i capillari...12
- Fig.6:** Stenosi dell'arteria carotide interna.....14
- Fig.7:** Aneurisma cerebrale.....14
- Fig.8:** A sinistra: esempi di connessioni Luer-lock (1) e connettori barbed (2) necessari per la divisione del circuito in differenti linee. A destra: dettaglio di connettori barbed e Luer-lock di varie dimensioni.....30.
- Fig.9:** A sinistra: tappo GL45 modificato per consentire l'ingresso dei tubi mantenendo la sterilità ; si può notare il particolare del filtro dell'aria 0.22 micron. A destra: reservoir con tappo GL45 (destra).....31
- Fig.10:** Immagine illustrativa dei componenti della pompa. Partendo da destra è visibile il motore, che può essere disassemblato dalla parte restante in polisulfone e dunque autoclavabile costituita da una parte rotante, il ferma-tubo, il sottopompa e il case.....32
- Fig.11:** Sinistra: in alto elettrovalvola a due vie, in basso: elettrovalvola a tre vie. Destra: in alto schema di funzionamento elettrovalvola a due vie, in basso schema di funzionamento elettrovalvola a tre vie.....33
- Fig.12:** A sinistra: afferraggio prossimale realizzato in POM in cui si può notare il connettore barbed per connessione con il resto del circuito idraulico (3), il filetto per connetterlo al coperchio della camera (2) e la flangia necessaria per l'ancoraggio del vaso (1). Al centro: particolare che evidenzia le modalità di fissaggio del vaso, che viene calzato sulla flangia e assicurato con un filo di sutura (4). A destra: afferraggio distale: anche in questo caso si può vedere la flangia per l'ancoraggio con l'altra estremità del vaso (5) e uno dei due fori (6) per permettere la fuoriuscita del liquido durante il riempimento (l'altro si trova in posizione diametralmente opposta).....34
- Fig.13:** Schema che mostra il condizionamento longitudinale (freccie rosse) garantito dal peso dell'afferraggio distale (3), il condizionamento radiale (freccia gialla) garantito dalla geometria dello stesso afferraggio. Le freccie blu suggeriscono il flusso del fluido all'interno del sistema, con il passaggio attraverso l'afferraggio prossimale (1), il vaso (2) e la fuoriuscita dai due fori presenti nell'afferraggio distale.....35
- Fig.14:** Immagine della camera di decellularizzazione: si nota il foro necessario per l'inserimento del sensore di temperatura (1), il tappo con l'afferraggio assemblato (3) e il connettore (2) per la connessione della camera con il circuito idraulico.....36.

-Fig.15: Immagine che illustra il sistema di termoregolazione nella configurazione iniziale, montato direttamente sul tappo della camera. Si nota l'elemento in metallo(1), la cella di Peltier (2) e il dissipatore(3).....	37
-Fig.16: In alto: schema della soluzione progettuale iniziale in cui sono visibili i tre reservoir, le valvole (E1,E2,E3,Ep), il waste, le due pompe di immissione (P1) e aspirazione (P2) del fluido, il filtro (F) per lo svuotamento della linea, il sistema di controllo (SC), il modulo Peltier (Pe), il sensore (Se), il dissipatore (D) ed il vaso (V). In basso: immagine del dispositivo nella configurazione iniziale. Si notano i reservoir (1), i tubi Pharmed per il circuito (2), le pompe (3), le elettrovalvole (4), il sistema di controllo (5), la camera di decellularizzazione (6) ed il waste (7).....	38
-Fig.17: Schema del nuovo circuito idraulico. Si nota il nuovo tratto di ricircolo del fluido, le due nuove valvole (V4 e V5) , lo scambiatore di calore (SC), la camera (C) con il vaso e l'afferraggio all'interno, le pompe (P1 e P2)	40.
-Fig.18: Sezione dell'afferraggio distale più piccolo. In blu è indicata la sezione "a T" all'interno della quale scorre il fluido. Le misure riportate sono in mm.....	42
-Fig.19: Sopra: immagine illustrativa del funzionamento di una cella di Peltier. Sotto.: dettaglio della cella di Peltier utilizzata nello scambiatore.....	47
-Fig.20: Dissipatore Northbridge della Xilence.....	48
-Fig.21: A sinistra: parte inferiore dello scambiatore, in cui si nota il dissipatore tagliato per consentire l'inserimento dei tubi in acciaio. A destra: parte superiore, in cui il dissipatore non ha subito lavorazioni. Si notano i connettori barbed (1 e 2) per la connessione con il circuito, la cella di Peltier (3) tra i due componenti metallici, la ventola (4) che incrementa la dissipazione del calore, il connettore a 3 pin (5) per la connessione con il Tank e il connettore (6) per la connessione al dispositivo.	49
-Fig.22: In alto: dettaglio del sensore Dallas. In basso: connessione del sensore con il dispositivo	50
-Fig.23: Arduino Mega ADK.....	52
-Fig.24: Esempio di duty cycle con modulazione τ su periodo T.....	53
-Fig.25: Sinistra: Motor Shield. Destra: Motor shield montato a castello su Arduino Mega ADK (destra).....	53
-Fig.26: Relay shield: sono evidenziate le porte di ingresso (IN) e di uscita (OUT) dell'integrato.....	54
-Fig.27: Relay Module a quattro canali alimentato a 12 V.....	55
-Fig.28: Ponte H LMD18200 montato su Tank 3A Hp.....	56
-Fig.29: LCD Keypad shield.....	57
-Fig.30: Tastierino a 12 tasti con connettore a 7 pin per l'interfaccia con Arduino.....	57
-Fig.31: Sinistra: pompe WPX1 (1) connesse dal case al dispositivo (2) tramite cavo. A destra: switch per l'attivazione delle pompe (1) Spostando la levetta a sinistra si attiva la pompa P2, nel nostro caso la pompa che verrà adattata al sistema, spostandola a destra si attivano invece le pompe WPM2, già contenute nel case del sistema di controllo. Nell'immagine sono visibili anche gli switch per l'accensione del dispositivo (2).....	58.

- Fig.32:** Schema dell'hardware in cui vengono mostrati i vari collegamenti e il numero di connessioni coinvolte.....59
- Fig.33:** Immagine illustrativa del menu principale: tramite i tasti "su" e "giù" è possibile muoversi all'interno del menù e selezionare tramite il tasto "select" la specifica voce.....60
- Fig.34:** Esempio di controllo a due soglie in cui $t_{max}=t_{inserita}+0.2$, $t_{min}=t_{inserita}-0.2$68
- Fig.35:** Dispositivo montato su banco. Sono visibili la camera di decellularizzazione (1), le valvole (2,3), i reservoir (4), le pompe (5), il sistema di controllo (6), il sistema di termoregolazione costituito da sensore (7) e scambiatore di calore (8), ed infine il waste (9).....74
- Fig. 36:** Schema che mostra l'aggancio del vaso nelle prove senza afferraggio distale (sinistra) e con afferraggio distale (destra).....79
- Fig.37:** Sopra: montaggio del vaso sugli afferraggi con filo di sutura in seta di tipo 4-0. Sotto: montaggio del circuito idraulico sotto cappa a flusso laminare.....80
- Fig.38:** Immagine del dispositivo durante la prova di decellularizzazione. Da sinistra a destra i reservoir (1), le valvole (2), una scatola contenente le due nuove valvole (3), il sistema di controllo (5), la camera di decellularizzazione (4) ed il waste (6)82
- Fig.39:** Piastra multipozzetto: si notano i sei pozzetti contenenti i dischetti di tessuto e la sospensione cellulare.....83
- Fig.40:** A sinistra: In alto immagine istologica del tessuto nativo. In basso: immagine istologica del tessuto decellularizzato. A destra: In alto immagine a fluorescenza DAPI del tessuto nativo. In basso immagine a fluorescenza DAPI del tessuto decellularizzato.....84
- Fig.41:** Immagine del reservoir utilizzato per alloggiare il rene. La perfusione è stata ottenuta incannulando l'organo con un vein flow.....87
- Fig.42:** Schema della connessione del rene con il circuito di perfusione. La cannula (1) è inserita lungo il tratto aortico precedente alla biforcazione con l'arteria renale (3). Il flusso (in blu) avviene attraverso l'arteria renale grazie all'occlusione (2) a valle della biforcazione e, una volta perfuso il rene (4), fuoriesce attraverso la vena renale (5).....88
- Fig.43:** Sinistra: tappo della camera con afferraggio montato "normalmente" per le prove di decellularizzazione di vasi sanguigni. Destra: tappo con afferraggio montato con il connettore rivolto verso l'interno della camera per prove di decellularizzazione di rene.....89
- Fig.44:** Immagini del rene durante la decellularizzazione. Sono mostrate delle fasi temporali differenti in cui si nota la progressiva riduzione della componente cellulare dalla stato nativo (in alto) a quello decellularizzato (in basso) e il mantenimento della morfologia e della rete vascolare nativa.....90
- Fig.45:** A sinistra: in alto, istologia E-E del tessuto renale nativo. In basso, istologia E-E del tessuto renale decellularizzato. A destra: in alto, immagine a fluorescenza DAPI del tessuto renale nativo. In basso, immagine a fluorescenza DAPI del tessuto renale decellularizzato.....9

INDICE DELLE TABELLE E DEI GRAFICI

<i>-Tab. 1: Metodi ed agenti comunemente utilizzati per la decellularizzazione di organi e tessuti.....</i>	<i>21</i>
<i>-Tab. 2: Protocolli di decellularizzazione di vasi sanguigni presenti in letteratura.....</i>	<i>23</i>
<i>-Tab.3: Tabella riassuntiva delle varie fasi in sono indicati i componenti attivi e inattivi.....</i>	<i>46</i>
<i>-Tab.4: Schema dei parametri presi in considerazione per la valutazione delle corrette tempistiche e portate del processo.....</i>	<i>71</i>
<i>-Graf.1: Sopra: Curva di taratura pompe WPX1 (in rosso). Sotto: curva taratura pompe WPM2. Nel grafico è mostrata anche l'equazione della retta di taratura, utilizzata nel codice per l'impostazione delle portate.....</i>	<i>72</i>
<i>-Tab.5: Parametri impostati nella simulazione della prova di decellularizzazione.....</i>	<i>75</i>
<i>-Tab.6: Protocollo di decellularizzazione per vasi sanguigni.....</i>	<i>80</i>
<i>-Graf.2: Risultati delle prove di decellularizzazione con afferraggio (CA) e senza afferraggio (SA) che riportano la quantità di DNA (in ng) per mg di campione e relativa rappresentazione grafica.....</i>	<i>85</i>
<i>-Tab.7: Protocollo di decellularizzazione utilizzato per il rene.....</i>	<i>89</i>

SOMMARIO

INTRODUZIONE

Le patologie vascolari rappresentano una tra le maggiori cause di decesso a livello globale. Ad oggi le soluzioni proposte prevedono, in caso di sostituzione del vaso, l'utilizzo di graft di diversa tipologia che presentano delle problematiche differenti. I graft *sintetici*, principalmente realizzati in Dacron e Goretex, nonostante abbiano dimostrato ottime proprietà meccaniche, sono responsabili di reazioni infiammatorie da parte dell'organismo ospite oltre a presentare, soprattutto per graft di piccolo calibro (<6mm), diverse problematiche dal punto di vista meccanico portando alla formazione di coaguli o trombi con conseguente occlusione dell'impianto. I graft *biologici* sono invece ottenuti da tessuto dello stesso ricevente (autograft), di un altro soggetto umano (homograft) o di un organismo di un'altra specie (eterograft). Ad oggi la soluzione più adottata è quella dell'utilizzo di autograft dato che non presentano alcun pericolo di rigetto per l'organismo ospite e presentano proprietà meccaniche compatibili con il ricevente. Questi impianti non sempre sono disponibili al trapianto, in quanto spesso degradati e dunque non efficienti dal punto di vista funzionale. La ricerca si è dunque spinta verso nuove promettenti soluzioni, prima fra tutte l'ingegneria dei tessuti, che prevede un approccio differente che consiste nella completa rigenerazione in vitro di un tessuto vascolare. Tale approccio prevede l'utilizzo di tre componenti principali, ovvero *cellule, bioreattori e scaffold*. Il bioreattore garantisce adeguate condizioni ambientali e adeguati stimoli per favorire la proliferazione cellulare. Lo scaffold, invece, fornisce una struttura tridimensionale specifica per il tessuto da rigenerare e in grado di promuovere la crescita e il differenziamento cellulare. Gli scaffold possono essere realizzati con materiale sintetico, con il vantaggio di presentare un'elevata riproducibilità a livello industriale, o in materiale biologico, con un vantaggio in termini di biocompatibilità, ma uno svantaggio in termini di proprietà meccaniche e riproducibilità. Con l'intento di creare uno scaffold in grado di superare gli svantaggi imposti dalle soluzioni attuali è stata introdotta la tecnica della *decellularizzazione*: tale tecnica consiste nell'eliminazione della componente cellulare di un tessuto preservando esclusivamente la matrice extracellulare (ECM), ovvero la struttura di sostegno del tessuto composta per la maggior parte di collagene, insieme ad altre proteine come fibrina ed

elastina. Il tessuto privato della componente cellulare può essere utilizzato come uno scaffold con ottima biocompatibilità e con proprietà meccaniche molto simili a quelle dei tessuti nativi. In letteratura esistono diverse tipologie di protocolli che variano a seconda del tessuto da decellularizzare: essi prevedono l'utilizzo combinato di metodi chimici, fisici ed enzimatici. La maggior parte dei protocolli di decellularizzazione sono svolti manualmente e prevedono l'intervento dell'operatore in diverse fasi: ciò aumenta le sorgenti di errore e le possibilità di contaminazione del costrutto. Automatizzare il processo rappresenta un'ottima soluzione per ridurre il più possibile tale problematica limitando le operazioni svolte dall'operatore. Scopo della presente tesi è stata l'ottimizzazione di un sistema per la decellularizzazione automatica di tessuti biologici. Tale sistema è costituito da un circuito idraulico gestito da un sistema di controllo ed in grado di eseguire un protocollo di decellularizzazione su vasi sanguigni. Tre parti del dispositivo sono state prese in considerazione:

- Circuito idraulico
- Sistema di termoregolazione
- Sistema di controllo

Una volta completata la fase di progettazione si è passati a quella di validazione del dispositivo nella nuova configurazione eseguendo diverse tipologie di prove:

- *Prove su banco*: il dispositivo è stato testato facendo circolare dell'acqua distillata all'interno del circuito e valutando l'effettivo funzionamento dell'intero sistema.
- *Prove sperimentali di decellularizzazione di vasi sanguigni*: sono state effettuate decellularizzazioni di aorte addominali porcine e i risultati sono stati valutati tramite specifiche tecniche di analisi quantitative sul DNA e analisi istologiche in ematossilina-eosina e marcatura DAPI.
- *Prova di decellularizzazione su rene*: per testare la versatilità del dispositivo è stata effettuata una prova di decellularizzazione di un rene di ratto. Per valutare l'efficacia del processo sono state effettuate analisi in ematossilina-eosina e marcatura DAPI.

PROGETTAZIONE DEL DISPOSITIVO

Il lavoro di tesi ha avuto come punto di partenza un dispositivo sviluppato al Politecnico di Milano e già utilizzato nella decellularizzazione di vasi sanguigni. Il dispositivo è in grado di gestire un circuito idraulico connesso ad una camera all'interno della quale viene posizionato il vaso da decellularizzare tramite appositi afferraggi. È costituito principalmente da due pompe e quattro elettrovalvole pinza-tubo tramite cui consente la circolazione delle sostanze previste dal protocollo.

E' previsto anche un sistema di termoregolazione in grado di raffreddare o scaldare il fluido tramite un dissipatore in acciaio all'interno della camera. Nonostante la globale efficienza della configurazione iniziale sono state riscontrate alcune problematiche da cui si è partiti per lo sviluppo di componenti aggiuntivi:

- *Mancanza di un circuito di ricircolo del fluido:* Durante la fase di attività della sostanza all'interno della camera il fluido rimane fermo senza rimescolarsi, diminuendo teoricamente l'efficacia del processo
- *Efficacia del sistema di termoregolazione:* i test effettuati sulla configurazione iniziale del dispositivo testimoniano una bassa efficienza in termini di calore scambiato tra dissipatore e fluido.
- *Mancanza di un'interfaccia utente:* l'impostazione dei parametri per l'esecuzione del protocollo avviene esclusivamente attraverso la modifica del codice di programmazione. Tale aspetto è fortemente limitante per quanto concerne la semplicità di utilizzo del dispositivo.
- *Dimensioni della camera e afferraggi:* le dimensioni della camera potrebbero essere ulteriormente ridotte in modo tale da ridurre il volume di priming del circuito, mentre gli afferraggi potrebbero essere riprogettati per consentire un aggancio più semplice del tessuto alla camera.

Le soluzioni progettate si sono concentrate in particolar modo su tre aspetti del dispositivo:

- *Circuito idraulico*

- *Sistema di termoregolazione*
- *Sistema di controllo*

Per quanto riguarda il *circuito idraulico* è stata progettata una linea aggiuntiva per permettere il ricircolo del fluido durante la decellularizzazione in modo tale da sfruttare i vantaggi derivanti dalla perfusione continua del vaso: la perfusione garantisce infatti un miglior rimescolamento delle sostanze decellularizzanti, migliorando l'efficacia del processo. La soluzione progettata è mostrata nello schema seguente (fig.2).

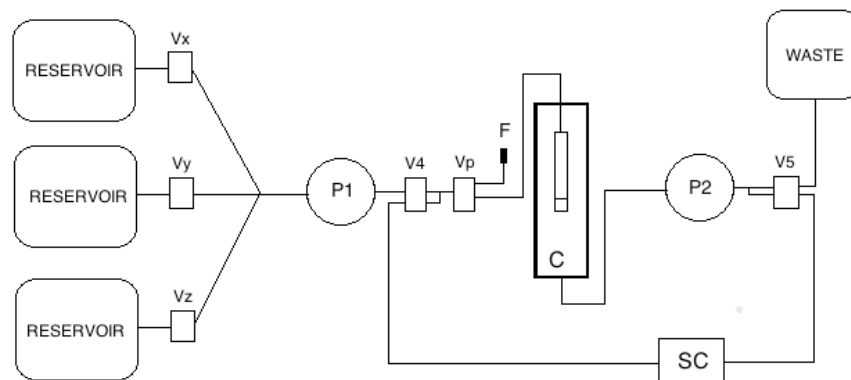


Fig.2: Schema del nuovo circuito idraulico. Si nota il nuovo tratto di ricircolo del fluido, le due nuove valvole (V4 e V5), lo scambiatore di calore (SC), la camera (C) con il vaso e l'afferraggio all'interno, le pompe (P1 e P2)

Il *sistema di termoregolazione* è costituito da quattro elementi:

- *1 cella di Peltier*
- *2 dissipatori*
- *1 sensore di temperatura*

La *cella di Peltier* costituisce la fonte di calore del sistema: essa è connessa al sistema di controllo e si attiva in base al dato in ingresso dal sensore di temperatura. Dei due *dissipatori* uno è stato lavorato in modo tale da alloggiare dei tubi in acciaio aisi 316L in modo da utilizzare un materiale Medical Grade a contatto con il fluido. L'altro dissipatore non ha invece subito alcuna lavorazione ed è dotato di una ventolina che garantisce un flusso d'aria costante migliorando la dissipazione del calore. La cella di Peltier è inserita

tra i due dissipatori con una clip a molla in modo da consentire il trasferimento di calore per contatto (fig.3)

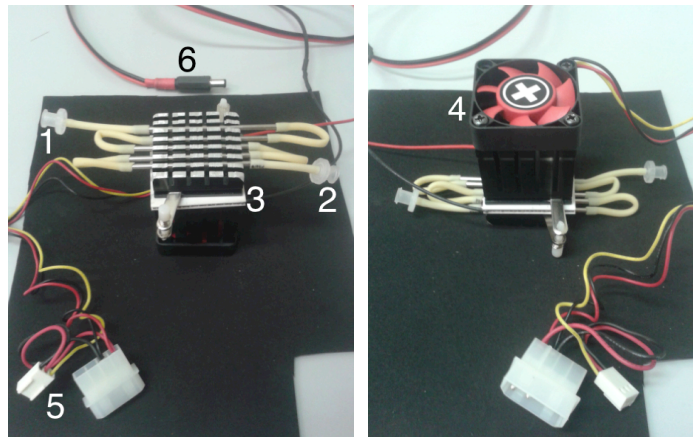


Fig 3: A sinistra: parte inferiore dello scambiatore, in cui si nota il dissipatore lavorato per consentire l'inserimento dei tubi in acciaio. A destra: parte superiore, in cui il dissipatore non ha subito lavorazioni. Si notano i connettori barbed (1 e 2) per la connessione con il circuito, la cella di Peltier (3) tra i due componenti metallici, la ventola (4) che incrementa la dissipazione del calore, il connettore a 3 pin (5) per la connessione della ventola con il Tank e il connettore (6) per la connessione al dispositivo.

Il *sensor* rileva la temperatura all'interno della camera: il dato viene inviato al sistema di controllo e utilizzato per controllare la Peltier. Il *sistema di controllo* è gestito tramite microcontrollore atmega 128 montato su piattaforma ARDUINO MEGA ADK. Tramite opportuno codice è stato impostato un programma di funzionamento delle pompe e delle elettrovalvole in grado di gestire tre diverse sostanze come richiesto dal protocollo di decellularizzazione che verrà utilizzato. Ogni sostanza subisce un processo suddiviso in varie fasi, in cui possono essere impostate portate e tempistiche da un'interfaccia utente gestita tramite LCD keypad shield e un tastierino a 12 tasti (fig.4)

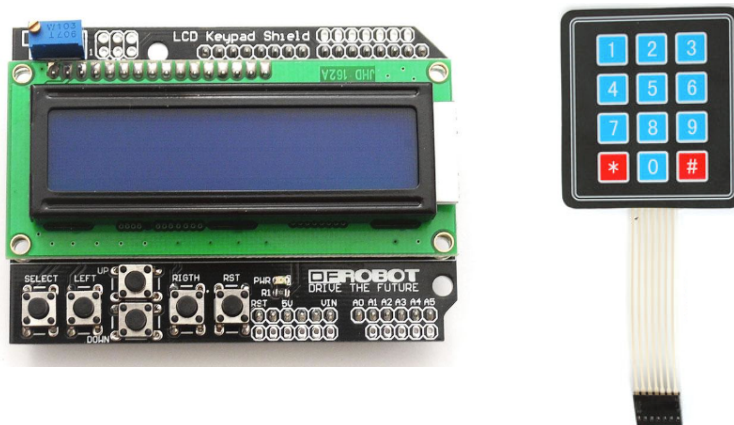


Fig. 4: A sinistra: LCD keypad shield. Tramite i sei tasti presenti nella shield è possibile muoversi all'interno del menù creato tramite codice di programmazione. A destra: tastierino a 12 tasti tramite cui è possibile impostare i valori dei parametri .

Tramite interfaccia possono essere selezionate due funzioni principali:

- void impostazioni()
- void avvio()

tramite le quali è possibile impostare i vari parametri della prova di decellularizzazione e avviare il programma impostato.

PROVE SPERIMENTALI E RISULTATI

Le prove sperimentali sono state utili per valutare l'efficacia del dispositivo e i vantaggi apportati dalle modifiche realizzate. Sono state eseguite numerose prove preliminari su banco per verificare l'effettivo funzionamento del circuito idraulico, del sistema di termoregolazione e dell'interfaccia utente. Il dispositivo è stato quindi testato con prove di decellularizzazione di diverso tipo:

- Decellularizzazione di un vaso porcino con afferraggio distale e prova di sterilità
- Decellularizzazione di un vaso porcino senza afferraggio distale
- Decellularizzazione di un rene di ratto

L'efficacia del protocollo e delle soluzioni progettate sono state valutate tramite analisi di quantificazione del DNA ed analisi istologiche in ematossolina-eosina e marcatura con DAPI per avere delle indicazioni sia sulla rimozione cellulare che sulla struttura del tessuto decellularizzato. Le prove di decellularizzazione di vasi porcini sono state eseguite presso il laboratorio Biocell del Politecnico di Milano. Si sono voluti valutare eventuali effetti della perfusione accoppiata al sistema con afferraggio e senza afferraggio utilizzando il dispositivo di automazione. Per entrambe le prove si è utilizzato il protocollo seguente:

SOSTANZA	AZIONE
Acqua milliQ con soluzione antibiotica e antimicotica all'1%	24 ore con ricambio ogni 6 ore
Sodio Deossicolato (DCA) al 4%	24 ore con ricambio ogni 12 ore
Siero Fetale Bovino (FBS) al 10% in NaCl 0.9%	48 ore con ricambio ogni 6 ore
Tampone fosfato salino (PBS) (in statica)	48 ore

Fig.5 Protocollo di decellularizzazione per vasi sanguigni

Il dispositivo ha eseguito correttamente tutti i ricambi completando il protocollo di decellularizzazione con le tempistiche impostate. Parallelamente alla prova con afferraggio si è valutata anche la sterilità degli scaffold decellularizzati utilizzando il sistema: sono state prelevate delle porzioni di vaso decellularizzato che sono state incubate a 37 °C per tre giorni a contatto con una sospensione cellulare: non è stata visualizzata alcun tipo di formazione di muffe o contaminazione. I risultati hanno inoltre mostrato attività cellulare a conferma del fatto che il tessuto ottenuto non causa effetti negativi sulle cellule. L'efficacia delle decellularizzazioni è stata valutata tramite analisi in ematossilina-eosina e marcatura DAPI e tramite quantificazione del DNA. Di seguito sono mostrato i risultati delle analisi istologiche (fig.6):

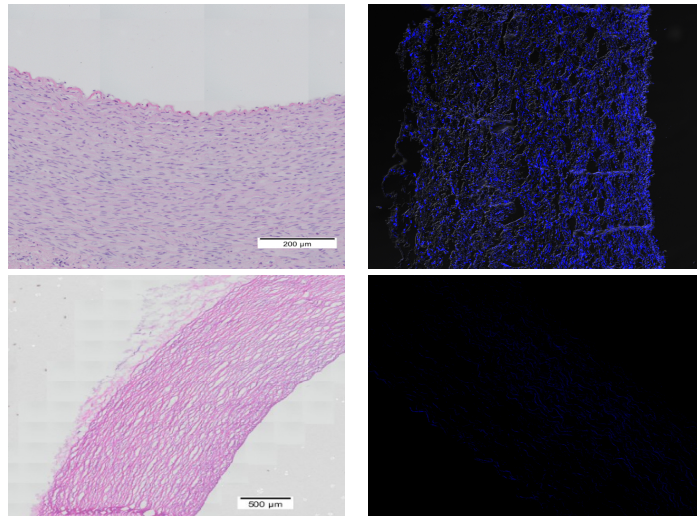


Fig.6: Immagini istologiche e marcatura DAPI ottenute dalle prove di decellularizzazione di vasi sanguigni

Le analisi confermano l'eliminazione di gran parte della componente cellulare del tessuto e il mantenimento della struttura dell'ECM. Per quanto riguarda le quantificazioni del DNA sono stati ottenuti i risultati mostrati in figura, in cui è stata fatta un'analisi statistica calcolando mediana e quartili dei valori ottenuti (fig.7):

	Prova con afferraggio (CA)	Prova senza afferraggio (SA)
Minimo	65	387.8
Primo Quartile	73.04	498.04
Mediana	109.9	574.86
Terzo Quartile	160.4	692.10
Massimo	183.4	778.71

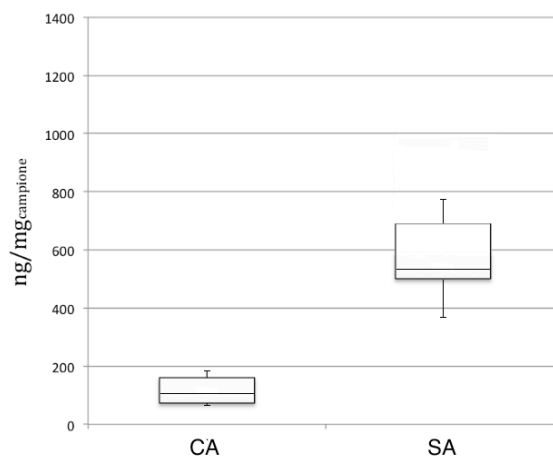


Fig.7: Risultati delle prove di decellularizzazione con afferraggio (CA) e senza afferraggio (SA) che riportano la quantità di DNA (in ng) per mg di campione e relativa rappresentazione grafica

Il confronto tra le due prove ha evidenziato una migliore efficacia del processo nella prova con afferraggio rispetto a quella senza afferraggio. Si ritiene che il condizionamento imposto dall'afferraggio distale, unito al sistema di perfusione che è stato aggiunto in questo lavoro di tesi, migliori la permeazione delle sostanze decellularizzanti lungo lo spessore del tessuto aumentando l'efficacia globale del processo. Per quanto riguarda i valori ottenuti, invece, questi sono sensibilmente maggiori rispetto alla media, tendenza che è stata però osservata anche in prove di decellularizzazione manuale: ciò porta ad ipotizzare un problema che non riguarda l'esecuzione del protocollo con il dispositivo ma piuttosto un problema relativo ad aspetti diversi: sono tuttora in svolgimento dei test per validare statisticamente i risultati ottenuti. Il confronto tra le due prove conferma comunque l'osservazione sulla maggior efficacia della prova CA rispetto alla SA.

L'applicazione del dispositivo è stata estesa anche a una prova di decellularizzazione di un intero organo, un rene di ratto Sprague-Dawley, eseguita in collaborazione con il Laboratorio di chirurgia sperimentale e microchirurgia dell'Università degli studi di Pisa e il laboratorio di Biologia delle beta-cellule dell'Ospedale San Raffaele di Milano. Il sistema è stato adattato alla configurazione necessaria per questa prova connettendo delle pompe in grado di garantire portate molto basse come richiesto dal nuovo protocollo, riportato nella figura seguente (fig.8):

SOSTANZA	AZIONE
Triton X-100 al 1%	4 Ore
SDS al 0.5%	4 Ore
PBS	12 Ore

Fig.8: Protocollo utilizzato per la decellularizzazione del rene

anche in questo caso il protocollo è stato portato a termine e sono state fatte delle analisi in ematossilina-eosina per valutare lo stato dell'organo. Il rene ha mostrato un'effettiva eliminazione della componente cellulare e un mantenimento dell'ultrastruttura e dell'ECM

(fig.9). È stato anche notato visivamente un mantenimento della rete vascolare nativa del tessuto, così come evidenziato in diversi lavori presenti in letteratura.

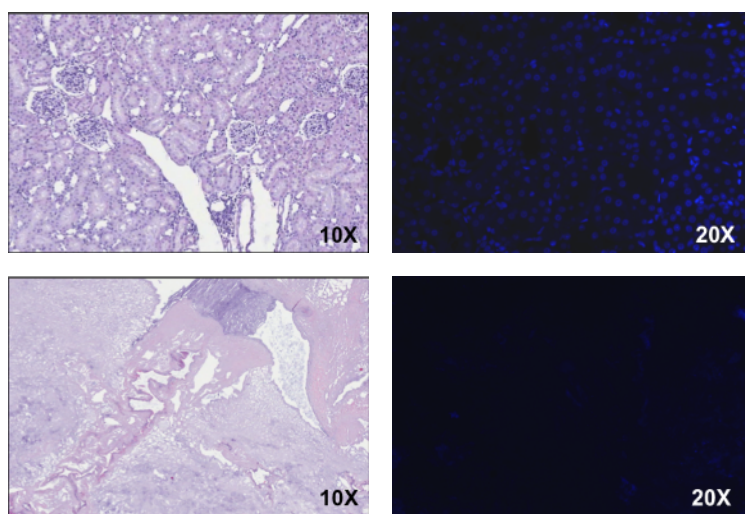


Fig.9: Immagini istologiche e marcatura DAPI ottenute dalle prove di decellularizzazione su rene

Le prove effettuate hanno consentito di valutare vari aspetti del dispositivo e la realizzazione dei requisiti proposti in fase di progettazione. Il sistema è stato in grado di mantenere la sterilità, di eseguire l'automazione del processo, si è dimostrato molto versatile in quanto utilizzato anche su un organo e un protocollo diverso rispetto alla configurazione iniziale, infine ha semplificato di molto le operazioni di impostazione dei parametri fornendo all'utente un'interfaccia semplice e funzionale.

CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI

Il dispositivo nella nuova configurazione ha apportato diverse modifiche e miglioramenti al sistema di partenza. L'aggiunta di un circuito di ricircolo del fluido si è dimostrata molto efficace e adatta al sistema progettato in quanto ha permesso di introdurre un condizionamento meccanico ciclico durante tutto il processo e di migliorare l'efficienza della decellularizzazione. I risultati sulla quantificazione del DNA mostrano un maggior livello di decellularizzazione nelle prove effettuate con l'afferraggio e ciò è dovuto agli effetti che il condizionamento ha sulla diffusione delle sostanze. L'aggiunta di un'interfaccia utente ha reso il dispositivo completamente indipendente dal computer e

L'inserimento dei parametri può ora avvenire senza intervenire con modifiche dirette sul codice di programmazione. È stata garantita una grande versatilità utilizzando il dispositivo per applicazioni differenti dalla decellularizzazione di vasi sanguigni. Il sistema di termoregolazione è stato modificato garantendo un rendimento maggiore rispetto alla soluzione precedente, anche se sarebbero necessarie ancora modifiche aggiuntive. Sarà necessario progettare afferraggi che consentano un aggancio più veloce e meno complesso del tessuto al sistema e alla progettazione di una camera di decellularizzazione dai volumi ridotti in modo da ridurre ulteriormente il volume di priming del circuito. La configurazione attuale, in conclusione, rappresenta un ulteriore passo del sistema verso un suo possibile utilizzo in ambito clinico.

ABSTRACT

INTRODUCTION

Vascular diseases represent the leading cause of death in western countries. Nowadays, in the need for a substitution, the solution consists in synthetic and biological grafts. *Synthetic* grafts, mainly made of Dacron and Goretex, can elicit an adverse inflammatory reaction and they can cause blood clot or thrombosis resulting in graft occlusion especially for small caliber prostheses. *Biological* graft can be obtained from the same recipient (autografts), from an other human being (homografts) or from an animal (eterograft). Nowadays the first choice is represented by autograft because they are immune-matched with the recipient and have good mechanical properties. These vessels are sometimes not available for the transplant because they are sick and not functionally efficient. Research is focusing on new promising solutions, such as tissue engineering, which provide a different approach that consists in an in-vitro vascular tissue regeneration. This approach exploit *cells, bioreactors and scaffolds*. Bioreactors provides adequate conditions and adequate stimulations to promote cell proliferation. Scaffolds offer a 3D tissue-specific structure. They can be either synthetic or biological. The synthetic ones have great mechanical properties but, on the other and, they lack of biocompatibility. The biological ones have great biocompatibility but lower mechanical properties in respect to the former. To overtake both the disadvantages presented from these two solutions, *decellularization* technique can provide a completely biological scaffold with functional mechanical properties. Decellularization consists in the complete removal of the cellular components of a tissue, only preserving the extracellular matrix (ECM). ECM is mainly made of collagen, fibrin and elastin. Decellularized scaffolds represent an ideal scaffold, as they do not elicit any inflammatory response and they show good mechanical properties. Different protocols for decellularization of tissues exist: they can use chemical, physical or enzymatic methods. Most of this protocols are executed manually with an high risk of errors. Automated process could represent an optimal solution to reduce this problem, limiting manual activities. The aim of this work is the optimization and validation of an automated system for biological tissue decellularization. This device can control an

hydraulic circuit and can execute a decellularization protocol for blood vessel decellularization. Three parts of the device have been considered:

- Hydraulic circuit
- Termoregulation system
- Control system

The device was validated with bench tests and experimental tests, which comprised:

- *-Decellularization of blood vessels*
- *Decellularization of a kidney*

DEVICE DESIGN

The previous configuration consisted of an hydraulic circuit connected to a chamber in which the blood vessel is inserted. Pumps can pump fluid from a reservoir to the chamber and electrovalves control the fluid in the circuit. In order to develop new solutions for the device, we started from the initial configuration issues:

- *Lack of a recirculation line*
- *Termoregulation system efficiency*
- *Lack of a user-interface*
- *Chamber dimensions*

A new line for perfusion was designed, in order to exploit the advantages given by perfusion decellularization, improving the overall process efficiency. The solution designed is shown in the scheme (fig.1)

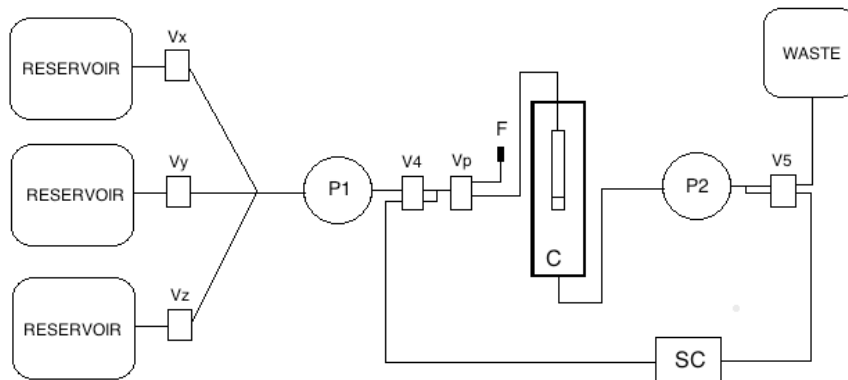


Fig.1: Scheme of the hydraulic circuit: valves (V4, V5), heat exchanger (SC), chamber (C), and pumps (P1,P2) can be seen.

The termoregulation system is composed by:

- 1 Peltier cell
- 2 heat sinks
- 1 temperature sensor

The Peltier cell is the heat pump of the system: it is connected to the control electronic and it activates depending on the feedback signal given by the sensor. One of the two heat sinks is used with steel tubes connected to the hydraulic circuit to transfer heat from the Peltier cell to the fluid. The system is driven by microcontroller ARDUINO, which can be programmed with a C++ code. From user-interface two main functions can be selected:

- `void impostazioni()`
- `void avvio()`

with which it is possible to set the parameters for the decellularization protocol.

EXPERIMENTAL TESTS AND RESULTS

Experimental tests were conducted to evaluate the efficiency of the protocol and the advantages given by the new solution designed. Different types of tests were carried on to assess the validity of the device and the efficiency of the decellularization protocol. The results were analyzed with histological analysis in hematoxylin-eosin and with DNA quantification. Three types of test were carried on:

- *Blood vessel decellularization with mechanical stimulation*
- *Blood vessel decellularization without mechanical stimulation*
- *Kidney decellularization*

For the decellularization of blood vessels this type of protocol was used:

SUBSTANCE	ACTION
milliQ water with antibiotic and antimicotic solution 1%	24 hours with every 6 hours exchange
Deoxycholate Sodium (DCA) 4%	24 hours with every 12 hours exchange
Bovine Fetal Serum(FBS) 10% in NaCl 0.9%	48hours with every 6 hours exchange
Phosphate buffer saline(PBS) (static)	48 hours

Fig.2: Protocol used for blood vessel decellularization

The device operation matched the timeline set. Moreover sterility was evaluated seeding the decellularized scaffold with HeLa cells and incubating it at 37°C for three days. No bacterial infection was assessed.

The results have been analyzed with hematoxylin-eosin and DAPI staining. The results are showed in this figure (fig.3):

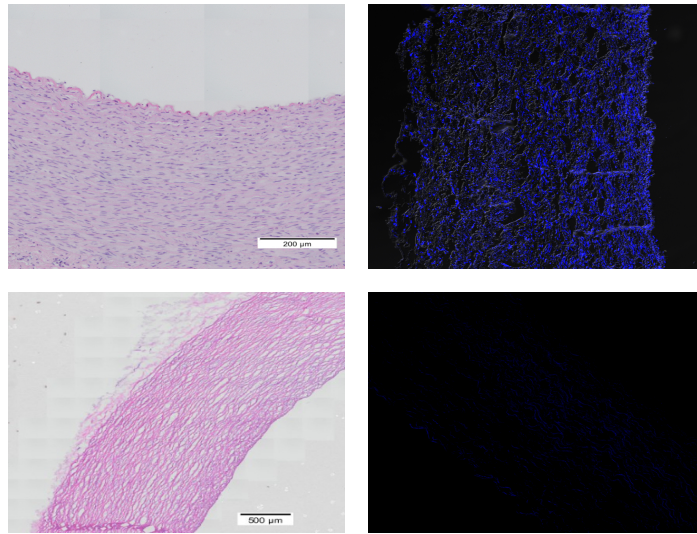


Fig. 3: Hematoxylin-Eosin analysis and DAPI marking of blood vessels.

The results showed a complete decellularization and a preservation of the ECM of the native tissue.

These results have been confirmed by the DNA quantification shown in figure 4:

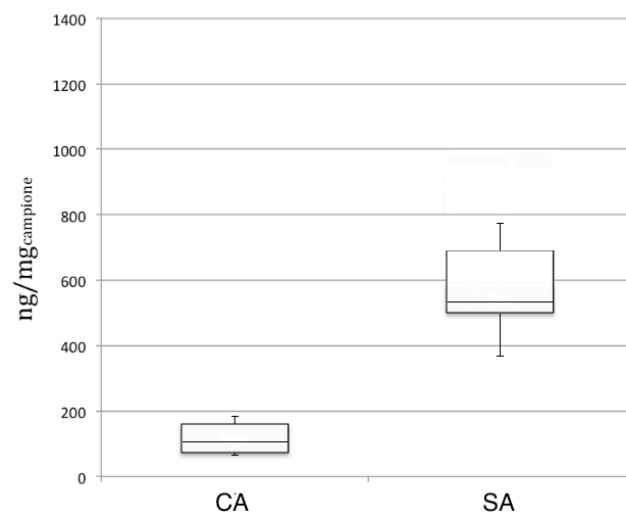


Fig.4: DNA quantification for blood vessel decellularization

The results reported a significant difference between the test made with the mechanical stimulation provided by the distal holding (CA) and the test made without mechanical stimulation (SA). This confirmed that perfusion was a key factor to stimulate the vessel during decellularization, and to facilitate solutions permeation in the tissue. The device was also used for the decellularization of a rat kidney. For this purpose, the device was adapted using a new type of pumps. The decellularization protocol used in this case was (fig.5):

SUBSTANCE	ACTION
Triton X-100 1%	4 hours
SDS 0.5%	4 hours
PBS	12 hours

Fig. 5: Decellularization protocol for the kidney

The results of this test were evaluated with hematoxylin-eosin histology.(fig.6)

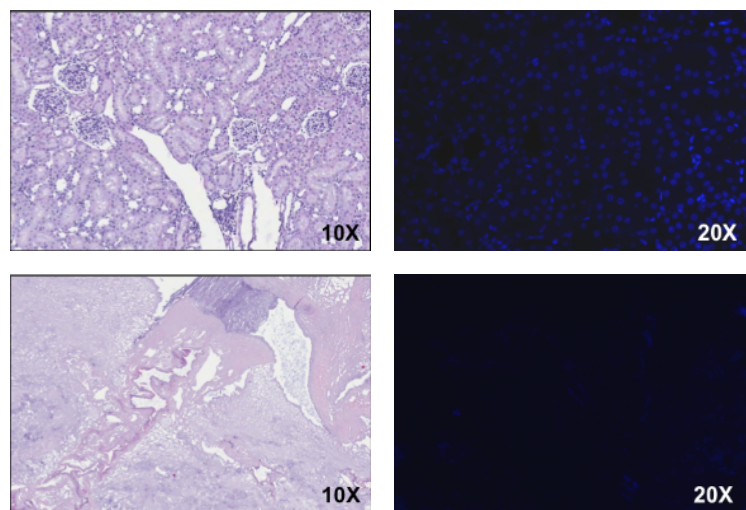


Fig.6: Hematoxylin-eosin analysis for kidney decellularization

The results confirm a complete decellularization of the organ and a preservation of the ECM. The tests made allowed to evaluate the different features of the device and the fulfillment of the requirements defined in the design phase. The system was able to keep sterility, to automate the process and it proved to be versatile when used for the

decellularization of a whole organ processed with a protocol different from the one used for blood vessels. Moreover the parameters setting has become more user-friendly.

CONCLUSIONS AND FUTURE DEVELOPMENTS

The new configuration of the device brought various improvements in respect to the former one. The recirculation circuit was functional and it allowed a cyclic strain exerted on the vessel in order to ameliorate the decellularization outcome. The DNA quantification results resulted in a better decellularization for the test driven with the distal holding in respect to test performed without it, probably this is due to the mechanical conditioning that promotes an improved diffusion of decellularization solutions. The user interface made the system independent from the computer and the parameter setting can be made directly without acting on the microcontroller code. The versatility was tested by processing a rat kidney, bringing the system to whole organ level. The thermal part was modified in order to reach a better yield in respect to the old configuration, even if it will need further improvements. New holdings will allow a faster and less complex clamping of the vessel, moreover it will be necessary to shrink the chamber dimensions in order to lower priming volumes. In conclusion, the new configuration of the device represent a further step toward the clinical use of the system.

CAPITOLO I: INTRODUZIONE

1.1 L'INGEGNERIA DEI TESSUTI

L'ingegneria tissutale è una scienza multidisciplinare che include medicina, biologia ed ingegneria che ha avuto un grandissimo sviluppo negli ultimi anni. Essa si propone di sviluppare terapie innovative ed avanzate mirate alla ricostruzione di tessuti ed organi danneggiati da malattie, traumi o dal semplice invecchiamento, offrendo una nuova filosofia di approccio alla malattia: la rigenerazione biologica del tessuto o organo danneggiato anziché la sua sostituzione con una protesi o tramite trapianto. I primi anni dell'ingegneria tissutale si basarono su approcci di coltura cellulare. In un lavoro di W.T Green del 1977 furono effettuati esperimenti per generare un tessuto cartilagineo utilizzando una coltura di condrociti in combinazione con uno "scaffold" osseo [1]. Nonostante l'insuccesso del tentativo, Green pose le basi teoriche e pratiche per l'interazione tra cellule e scaffold. Innovazioni in questo ambito vennero apportate da studi di Burke e Yannas con l'obiettivo di generare un tessuto epiteliale tramite una coltura di fibroblasti e cheratinociti su uno scaffold proteico ed utilizzarlo per rigenerare tratti di pelle danneggiati a seguito di ustione [2]. Negli anni '90 le scoperte sulle cellule staminali formarono le basi della moderna ingegneria tissutale [3]. Dal 1998 la ricerca si è concentrata sulle modalità di differenziamento cellulare e su come influenzare questo differenziamento. Per farlo l'ingegneria tissutale sfrutta tre componenti fondamentali:

- *Cellule*
- *Scaffold*
- *Bioreattore*

1.1.1 CELLULE

L'utilizzo del corretto tipo di cellule è fondamentale per garantire la crescita del tessuto di interesse. Per rigenerare un tessuto si possono utilizzare:

- *Cellule primarie differenziate*
- *Cellule staminali indifferenziate*

Esse possono essere ottenute da apposite “banche” cellulari oppure prelevate da tessuti umani ed animali. Una volta estratte, vengono congelate e conservate in azoto liquido per essere utilizzate quando necessario. Al momento del loro impiego, le cellule vengono scongelate e inserite in appositi contenitori, ad esempio piastre di Petri o flask (fig.1) insieme ad una sostanza, detta *terreno di coltura* o *medium*, caratterizzata da una composizione chimica ideale per la proliferazione cellulare.

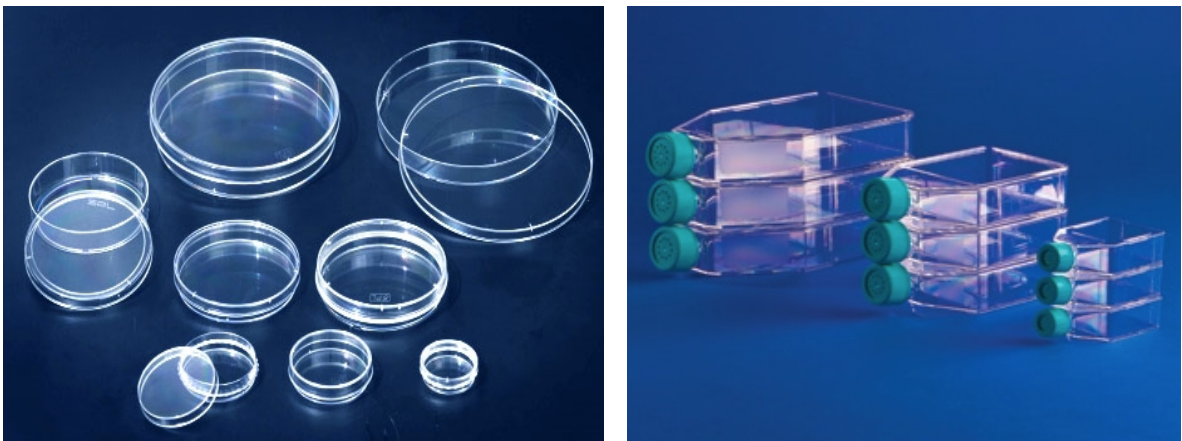


Fig.1: Sinistra: esempi di varie dimensioni di piastre di Petri. Destra: flasks

Il medium include componenti essenziali per la crescita cellulare, tra cui amminoacidi, necessari per la sintesi proteica, carboidrati, che forniscono energia e nutrimento, sali organici, che garantiscono un ambiente isotonico, vitamine, utilizzate come catalizzatori per reazioni metaboliche. Agli elementi di base vengono successivamente aggiunti antibiotici, glutammina e in alcuni casi un siero che fornisce fattori di crescita, lipidi e ormoni. Le cellule all'interno del medium vengono poi trasferite all'interno di un

incubatore (fig.2) ovvero uno strumento in grado di garantire la temperatura (37 gradi) e la concentrazione di anidride carbonica (5%) ideale.



Fig.2: Incubatore

In questo modo si dà la possibilità alle cellule di proliferare all'interno dello spazio consentito, ovvero fino al raggiungimento della *confluenza*: una volta raggiunta la confluenza le cellule, non avendo più lo spazio per crescere, vanno incontro alla morte. Per garantire l'avanzamento della crescita, è necessario effettuare un'operazione detta *espansione* o *splitting*: le cellule vengono trasferite all'interno di un altro contenitore dove hanno nuovamente lo spazio per proliferare. Tutte le operazioni che coinvolgono le cellule devono essere effettuate in condizioni di assoluta sterilità: con questo obiettivo vengono svolte all'interno di appositi macchinari dette *cappe a flusso laminare* (fig.3).



Fig.3: Cappa a flusso laminare

Le *cellule primarie* sono delle cellule ottenute direttamente dal tessuto e che conservano dunque i parametri di differenziamento tipici del tessuto da cui provengono. Presentano lo svantaggio di poter essere espanse solo per un numero finito di passaggi. Le *cellule staminali* sono invece cellule non differenziate; possono dividersi senza limite e hanno la possibilità di differenziarsi oppure rimanere al loro stato indifferenziato. Si distinguono in *cellule staminali embrionali* o *adulte*: le prime vengono prelevate dalla blastocisti embrionale, possono proliferare indefinitamente oppure essere indotte a differenziare in vari tipi cellulari (vedremo in seguito che garantire una determinata stimolazione è fondamentale per indurre le cellule a differenziare nel tipo cellulare desiderato). Le seconde, invece, si ottengono da alcuni tessuti come midollo osseo, sangue, tessuto adiposo, presentano una capacità proliferativa e una capacità di differenziarsi minore rispetto a quelle embrionali.

1.1.2 SCAFFOLD

Avere a disposizione una determinata tipologia di cellule non basta per rigenerare il tessuto di interesse: è anche necessario un elemento che fornisca la struttura bidimensionale o tridimensionale ideale a promuovere la crescita e il differenziamento. Tale elemento è lo *scaffold*, ovvero una struttura tridimensionale sulla quale le cellule proliferano secondo una determinata forma e dimensione. Con il passare degli anni, gli scaffold sono diventati sempre più sofisticati in termini di materiali, geometria e trattamenti superficiali, in modo da migliorare lo sviluppo del tessuto e renderlo sempre più vicino a quello naturale [4]. Gli scaffold utilizzati attualmente possono essere suddivisi in due famiglie: quelli di origine *sintetica* e quelli di origine *biologica*. Fanno parte dei sintetici scaffold realizzati con materiale non naturale, come PGL, PLA, lattoni, poliortoesteri. La grande varietà di materiali permette di variare molto le caratteristiche dello scaffold in modo tale da adattarlo al tessuto di interesse: in particolare, a seconda del tipo di materiale utilizzato, è possibile prevedere il tempo di degradazione dello scaffold e le sue caratteristiche meccaniche e in questo modo capire se può essere utilizzato per quel tipo di applicazione. Gli scaffold sintetici hanno inoltre il vantaggio di avere una riproducibilità molto elevata a livello industriale. Il problema di una soluzione di questo tipo sta nel fatto che l'organismo, entrando in contatto con un materiale sintetico, scatena una reazione da corpo estraneo che può provocare il fallimento dell'impianto. Per questo sono state sviluppate delle tecniche che consentono di rivestire lo scaffold con materiali biocompatibili che permettano di migliorare l'interfaccia tra impianto e organismo ospite [5]. Per quanto riguarda quelli biologici, essi sono realizzati principalmente con polimeri naturali quali il collagene, l'acido ialuronico o il chitosano, che presentano livelli di biocompatibilità molto più elevati rispetto a quelli sintetici. Sono state però dimostrate delle limitazioni dal punto di vista anatomico e biomeccanico, nonché difficoltà nel creare un prodotto ripetibile e con un preciso controllo della biodegradabilità [6]. Con l'obiettivo di creare uno scaffold che sia in grado di riunire le caratteristiche dell'una e dell'altra tipologia, in particolare delle buone proprietà meccaniche e una buona biocompatibilità, molti studi si stanno concentrando su una tecnica alternativa chiamata *decellularizzazione*: tale tecnica consiste in un processo di rimozione della componente cellulare del tessuto con l'obiettivo di eliminarne il potenziale immunogenico e mantenere l'integrità strutturale. Una volta

terminato il processo, il tessuto così ottenuto è costituito esclusivamente da matrice extracellulare (ECM) e presenta delle buone proprietà meccaniche nonché un'ottima biocompatibilità: l'ECM è infatti costituita da molecole quali proteine, collagene, elastina e proteoglicani, che garantiscono proprietà meccaniche funzionali allo specifico tessuto. In generale la composizione della matrice varia da tessuto a tessuto solo in funzione del rapporto quantitativo tra questi elementi, e dunque non rappresenta una sorgente immunogenica per l'organismo ospite [7]. Un tessuto decellularizzato rappresenta, in sostanza, un possibile scaffold ideale.

1.1.3 BIOREATTORE

Un *bioreattore* è un dispositivo in grado di fornire le condizioni ideali per la crescita di un tessuto, sia dal punto di vista biochimico fornendo il corretto apporto di nutrienti e sostanze alle cellule, sia dal punto di vista biomeccanico fornendo sollecitazioni che riproducano il più fedelmente possibile quelle fisiologiche. E' importante fornire tali condizioni per garantire la proliferazione ma anche il differenziamento nel tipo cellulare specifico per quel determinato tessuto. Con questo obiettivo è altrettanto importante garantire la crescita di matrice extracellulare: l'ECM, infatti, oltre ad essere responsabile del supporto meccanico e strutturale del tessuto, è coinvolta in un complesso sistema di signalling tramite il quale comunica con le cellule influenzandone la crescita [8]. Questa interazione avviene attraverso specifiche proteine come le integrine o attraverso molecole come i fattori di crescita prodotte a livello della matrice cellulare. Controllando questi diversi aspetti si vuole quindi ottenere un tessuto dalla funzionalità e dalla morfologia il più simile possibile a quella del tessuto nativo. Il bioreattore deve garantire al tessuto il giusto microambiente durante la maturazione, in particolare:

- *Stimolazione fisica*: necessaria per ottenere un tessuto funzionale. Il tipo di sollecitazione differirà in base al tessuto che si vuole ottenere;
- *Sterilità*: all'interno il bioreattore deve creare un ambiente completamente isolato dall'esterno, evitando in questo modo l'ingresso di qualsiasi agente patogeno o qualsiasi forma di contaminazione

- *Controllo della temperatura:* la temperatura va mantenuta attorno ai 37°C; le cellule possono infatti sopportare l'ipotermia ma non l'ipertermia ($T > 43^\circ\text{C}$)
- *Controllo dell'umidità relativa:* occorre limitare l'evaporazione dei terreni di coltura per non provocare un aumento della pressione osmotica; il valore di umidità solitamente è del 95%
- *Controllo della composizione atmosferica:* oltre all'ossigenazione, occorre garantire alle cellule una concentrazione di anidride carbonica del 5% in modo da mantenere il pH intorno a 7.2-7.4

Ad oggi esistono diversi esempi di bioreattori che si differenziano in relazione al tipo di tessuto da decellularizzare. I bioreattori a *perfusione* ad esempio forniscono un flusso costante del medium attraverso il costruito da ingegnerizzare: tale tipologia viene utilizzata soprattutto su vasi sanguigni e valvole cardiache che in questo modo subiscono un condizionamento fisiologico durante la maturazione in-vitro [9]. La perfusione svolge un ruolo importante nella ricellularizzazione del tessuto in quanto tramite il flusso si generano shear stress che attivano i meccanotrasduttori presenti sulla membrana cellulare, promuovendo la produzione di ECM, la rigenerazione del tessuto e il differenziamento [10]; favorisce inoltre l'eliminazione dei prodotti di scarto e l'ossigenazione del medium stesso creando un ambiente di coltura più favorevole alla crescita cellulare [11]. All'interno della categoria dei bioreattori a perfusione si distinguono quelli a perfusione *convettiva* e *confinata*. Per quanto riguarda i bioreattori a perfusione convettiva si riportano brevemente tre soluzioni esemplificative: i *rotating-wall vessels*, i *rotating-bed bioreactor* e gli *spinner flask*. Nei rotating-wall vessels i costrutti 3D sono coltivati in presenza di un costante flusso del mezzo di coltura, generato da una rotazione continua dell'intero dispositivo attorno ai campioni, che determina condizioni di micro-gravità. In un rotating bed-bioreactor, invece, gli scaffold stessi vengono fatti ruotare all'interno di un dispositivo fermo. Negli spinner flask, infine, il flusso è generato mediante un'agitazione diretta del mezzo. La perfusione confinata (o diretta) viene invece attuata vincolando lo scaffold e forzando il mezzo di coltura ad attraversarne i pori: questo meccanismo consente la perfusione anche nelle zone più interne del costruito e non limitatamente alla superficie esterna; si rivela particolarmente efficace per tessuti in cui la tridimensionalità è rilevante, come quello cartilagineo e quello osseo, e per tessuti con necessità metaboliche

particolarmente elevate come il tessuto cardiaco. In base alla tipologia di tessuto da ingegnerizzare esistono anche bioreattori in grado di applicare determinati stimoli in modo tale da ottenere un costrutto funzionale. La *sollecitazione meccanica a trazione*, ad esempio, si è dimostrata particolarmente efficace per lo sviluppo di quei tessuti che in vivo sono sottoposti a tale tipo di stimolo, come il tessuto muscolare scheletrico [12], il tessuto cardiaco [13], tendini e legamenti [14]. Un discorso simile può essere fatto per tessuti sottoposti in vivo a stimoli di *compressione*, come quello cartilagineo e quello osseo, che si sono dimostrati molto sensibili a sollecitazioni di questo tipo applicate mediante bioreattori [15]. Un altro esempio di stimolo fisico che determina notevoli risposte nei tessuti coltivati, sia a livello strutturale che a livello funzionale, è la *stimolazione elettrica*. Tale stimolazione può determinare la proliferazione e l'allineamento cellulare soprattutto su cellule naturalmente eccitabili come i miociti, garantendo una più efficace funzionalità del tessuto risultante [16]. Con lo sviluppo della tecnica della *decellularizzazione*, di cui si parlerà in seguito, sono stati ideati anche bioreattori in grado di decellularizzare un tessuto e di garantire dei requisiti del tutto simili a quelli dei bioreattori precedentemente elencati, in particolare temperatura, sterilità e stimolazione fisica. Sono stati sviluppati anche dispositivi in grado di eseguire entrambe le fasi di decellularizzazione e ricellularizzazione, ad esempio, tra quelli disponibili sul mercato, il bioreattore ORCA prodotto dalla Harvard apparatus, adattabile a diverse dimensioni e tipologie di organi.

L'ingegneria dei tessuti si avvale dunque di queste tre componenti, cellule, scaffold e bioreattori, di differenti tipologie a seconda del tipo di tessuto che si desidera rigenerare. L'idea di base è quella di approcciarsi al trapianto in un modo che non prevede l'impianto di tessuti allogenici seguito da un'intensa terapia anti-rigetto, o l'impianto di protesi sintetiche con le problematiche dovute a questo tipo di soluzione, bensì l'ottenimento in vitro di un tessuto completamente compatibile con l'organismo ricevente in quanto costituito da cellule prelevate dal paziente stesso (fig.4).

Basic principles of Tissue engineering

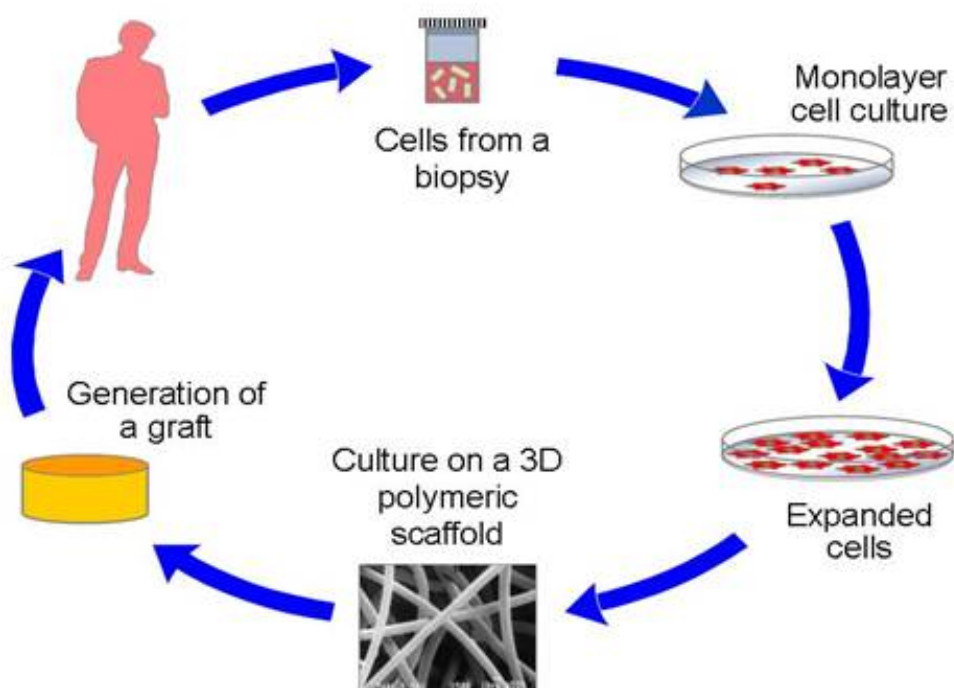


Fig.4: Immagine illustrativa dell'approccio dell'ingegneria dei tessuti: le cellule, ottenute dal paziente, vengono coltivate in vitro, quindi vengono fatte aderire ad un supporto tridimensionale (scaffold), ottenendo un graft che viene impiantato nello stesso paziente.

Questa tipologia di approccio trova grande applicazione anche nell'ingegnerizzazione di *tessuti vascolari* per la sostituzione di vasi danneggiati a seguito di traumi o patologie. Si darà un'introduzione descrittiva sull'anatomia e fisiologia di questo tessuto, si tratterà delle diverse soluzioni attualmente disponibili e delle problematiche ad esse annesse che hanno spinto la ricerca verso l'ingegneria dei tessuti e alle soluzioni da essa proposte.

1.2 ANATOMIA FUNZIONALE DEI VASI SANGUIGNI

I vasi sanguigni sono organi la cui funzione principale è quella di trasportare il sangue all'interno dell'organismo e fornire il corretto apporto di nutrienti e ossigeno ai tessuti. Come noto, esistono tre tipologie di vasi sanguigni, ognuna con un'anatomia differente

corrispondente alla differente funzione: *arterie*, *vene* e *capillari*. Nel caso dell'ingegnerizzazione di vasi sanguigni è importante riprodurre le proprietà anatomiche e meccaniche del tessuto, in quanto il costrutto deve essere in grado di sopportare in vivo le stesse tipologie di sollecitazioni del tessuto nativo. In genere vene ed arterie sono caratterizzate da tre strati concentrici:

-tonaca avventizia

-tonaca media

-tonaca intima

La *tonaca avventizia* costituisce lo strato più esterno del vaso ed è formato da tessuto connettivo e fibroblasti. La *tonaca media* è lo strato intermedio costituito da muscolatura liscia organizzata in fasci concentrici al lume del vaso e fibre elastiche. La *tonaca intima*, infine, è lo strato interno costituito dall'endotelio e dal sottostante tessuto connettivo (fig.5)

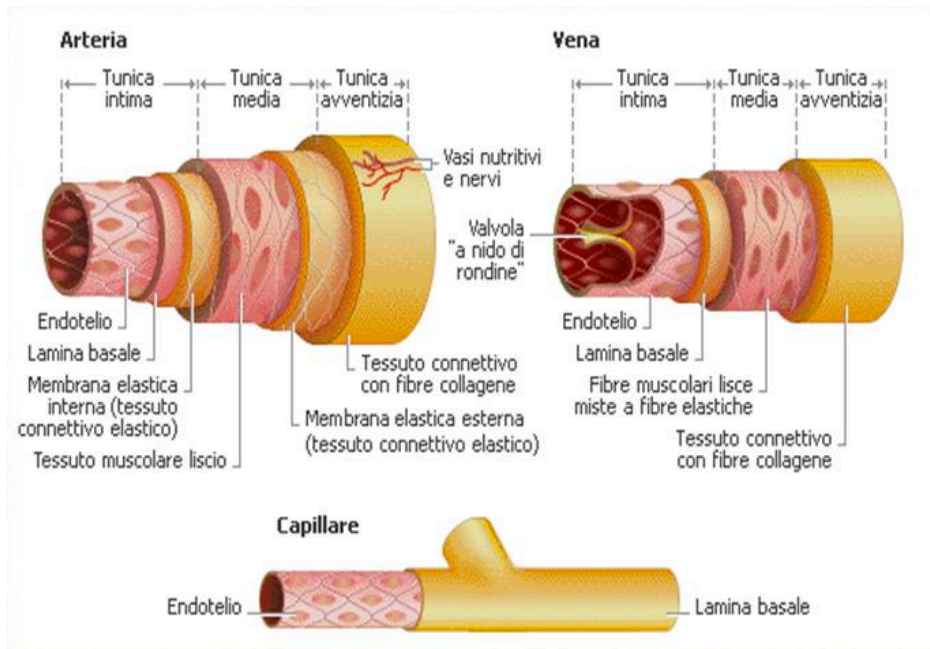


Fig.5: Rappresentazione schematica degli strati che costituiscono le arterie, le vene e i capillari

I capillari mettono invece in collegamento arterie e vene e sono composti esclusivamente da uno strato endoteliale; in questo modo rendono possibile lo scambio di sostanze nutritive, CO₂, ormoni e prodotti di rifiuto tra il sangue ed i tessuti adiacenti.. Le *cellule endoteliali* sono sensibili ai cambiamenti nella pressione sanguigna, nella pressione parziale di ossigeno e nel flusso ematico in generale; presentano una forma poligonale o allungata e si dispongono generalmente in modo parallelo all'asse longitudinale del vaso e orientate secondo la direzione del flusso sanguigno. L'endotelio è lo strato a diretto contatto con il sangue e dunque fondamentale nel determinare l'interfaccia con il fluido: la superficie liscia che lo contraddistingue evita turbolenze nel flusso e dunque l'insorgere di fenomeni trombotici. E' importante mantenere questa peculiarità nei costrutti ingegnerizzati per garantirne l'antitrombogenicità. Nella tonaca media si trovano invece le *cellule muscolari lisce* (SMC). Il tessuto muscolare secerne fibre e lamelle elastiche, fibre di collagene e proteoglicani, permettendo al vaso di mantenere elasticità e compliance radiale. Le cellule muscolari lisce sono inoltre coinvolte nei fenomeni di vasocostrizione o di vasodilatazione: a seconda del grado di contrazione di tali cellule, infatti, il lume del

vaso viene aumentato o ridotto controllando il flusso di sangue nella zona di competenza. Componente fondamentale della parete vascolare, così come nella maggior parte dei tessuti biologici, è la *matrice extracellulare* (ECM): essa è caratterizzata da *elastina*, una proteina fibrosa principalmente responsabile del comportamento elastico del tessuto, caratterizzato da basso modulo elastico, linearità, bassa isteresi e rilassamento, e da *collagene*, che ne costituisce circa il 90% [17] e conferisce elevate proprietà meccaniche, con un comportamento non lineare, moderata isteresi e rilassamento. La varietà di tipi cellulari presenti in ogni tonaca testimonia la complessità nella composizione di un vaso sanguigno e ci suggerisce dunque quanto sia difficile realizzare una protesi per la sostituzione di un vaso con le opportune caratteristiche meccaniche e la difficoltà nel renderlo biocompatibile a contatto con i tessuti biologici.

1.3 IMPIANTI PER LE PATOLOGIE CARDIOVASCOLARI

Le malattie cardiovascolari (MCV) rappresentano oggi la più comune causa di morte in tutto il mondo. Esse causano approssimativamente il 30% degli eventi fatali: quasi il 40% nei paesi ad alto reddito e intorno al 28% in quelli a reddito medio e basso. Le patologie più critiche sono quelle che interessano i tratti arteriosi in quanto la pressione presente al loro interno è maggiore e questo aumenta l'insorgere di danni vascolari. Tra queste quelle che si presentano maggiormente sono la *stenosi* e *l'aneurisma*. Un'arteria è stenotica (fig.6) quando si ha un restringimento del lume con conseguente impedimento del flusso a valle dell'occlusione, che a sua volta provoca ischemia nei tessuti interessati. Le due cause più comuni di stenosi sono dovute ad *aterosclerosi* e *iperplasia dell'intima*. L'aterosclerosi è una patologia caratterizzata da anomalie intimali dette ateromi (o placche aterosclerotiche) che protrudono all'interno del lume vasale. Oltre ad ostruire il flusso ematico, le placche possono rompersi, causando trombosi dei vasi. L'iperplasia dell'intima è invece dovuta a lesioni vascolari con perdita di cellule endoteliali; quest'ultima stimola la crescita delle cellule muscolari lisce e la sintesi di matrice che determina l'ispessimento dell'intima.



Fig.6: Stenosi dell'arteria carotide interna

L'*aneurisma* (fig.7) invece è un allargamento patologico dell'arteria causato dal cedimento della parete. Può verificarsi quando la struttura o il funzionamento del tessuto connettivo all'interno della parete sono compromessi a seguito di un indebolimento dovuto alla perdita di cellule muscolari lisce o da una sintesi inadeguata di ECM non collagena o non elastica. Le possibili conseguenze possono essere la rottura del vaso, la compressione di siti adiacenti all'aneurisma o l'insorgenza di trombosi dovuta ad anomale condizioni fluidodinamiche.



Fig.7: Aneurisma cerebrale

Altre problematiche vascolari comuni sono dovute a patologie come il diabete, che aumenta il rischio di aterosclerosi. Ad oggi l'approccio risolutivo a questo tipo di

problematiche consiste nella sostituzione del tratto di vaso “malato” con una *protesi vascolare* che presenta caratteristiche strutturali e biologiche compatibili con il tessuto sostituito. In particolare si distinguono:

- protesi vascolari di origine sintetica
- protesi vascolari di origine biologica

In generale il supporto deve garantire alcune specifiche per poter essere utilizzato per scopi clinici [18]:

- 1) *Biocompatibilità*, cioè la capacità di un materiale di non determinare reazioni in seguito ad impianto all'interno di un organismo ospite.
- 2) *Macrostruttura* in grado di promuovere l'adesione e la proliferazione cellulare.
- 3) *Facile processabilità*, ovvero deve essere disponibile in varie dimensioni e lunghezze e non deve necessitare di particolari lavorazioni prima del suo utilizzo.
- 4) *Deformabilità radiale (compliance)*, il più simile possibile a quella dei vasi naturali.
- 5) *Compatibilità meccanica*, la protesi deve poter sopportare le sollecitazioni a cui è sottoposta a seconda del sito di impianto.
- 6) Deve essere prevista una *vita media* della protesi maggiore di quella dell'organismo ospitante.

1.3.1 IMPIANTI VASCOLARI DI ORIGINE SINTETICA

L'utilizzo di graft di origine sintetica ha dimostrato risultati positivi soprattutto con vasi di grande diametro. I principali materiali utilizzati per questo tipo di applicazione 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 realizzare protesi con grande affidabilità e una percentuale di successo di circa il 90%. Tuttavia non si è ancora in grado di realizzare protesi di diametro inferiore agli 8mm per la facilità con cui questo materiale può provocare trombi.

- Goretex®, forma espansa del PTFE (politetrafluoretilene), è il più usato per la sostituzione di protesi di medio calibro tra i 6-7mm. Presenta ottima pervietà a lungo termine e buona biostabilità. Presenta qualche svantaggio quale la scarsa compliance e la trombogenicità in caso di scarso flusso.

In generale le protesi sintetiche hanno il grande vantaggio di essere disponibili in grandi quantità e con risultati ripetibili poiché vengono prodotte a livello industriale. Lo svantaggio di questo tipo di soluzione è invece rappresentato dalle proprietà meccaniche, che non riproducono fedelmente quelle del tessuto nativo [19,20]. Questo discostamento dal comportamento fisiologico porta ad un rimodellamento in vivo dell'impianto che consiste nell'ispessimento della parete (iperplasia) con conseguente restringimento del lume. Si può inoltre creare una fluidodinamica non fisiologica all'interno del vaso con conseguente formazione di trombi o aneurismi. Queste problematiche rendono le protesi sintetiche molto valide soprattutto per applicazioni di grande calibro ma rendono anche difficile prevederne il comportamento e i conseguenti effetti sull'organismo ospite.

1.3.2 IMPIANTI VASCOLARI DI ORIGINE BIOLOGICA

Gli impianti vascolari di origine biologica consistono in segmenti vascolari prelevati dal paziente stesso o da un altro soggetto umano. Si distinguono protesi realizzate con tessuto umano dello stesso ricevente (*autograft*), di un altro soggetto umano (*homograft*) o di un organismo di un'altra specie (*eterograft*). I casi più comuni di impianto autologo, in particolare per innesti di bypass coronarico, riguardano l'uso della *vena safena* e dell'*arteria mammaria*. La vena safena è un condotto venoso degli arti inferiori, mentre l'arteria mammaria origina dall'arteria succlavia a livello del torace. L'arteria mammaria possiede una pervietà maggiore a lungo termine rispetto alla vena safena (>95% contro il 50-60% a 10 anni): ciò è legato alle sue caratteristiche istologiche, in quanto la tunica media dell'arteria è costituita principalmente da una lamina interna elastica con poche cellule muscolari, così da avere una bassa vasocostrizione. A questo si aggiunge una modesta tendenza all'iperplasia e a fenomeni aterosclerotici rispetto alla vena safena. Gli impianti di origine biologica presentano il vantaggio di fornire vasi sanguigni già con le

giuste caratteristiche anatomiche e soprattutto senza nessun pericolo di rigetto per l'organismo ospite. Di contro questi impianti non sempre sono disponibili al trapianto, in quanto spesso affetti da anomalie aterosclerotiche o semplicemente degradati e dunque non efficienti dal punto di vista funzionale. Altro aspetto negativo è rappresentato dall'invasività dell'operazione, che prevede il prelievo di un tratto di vena o arteria da un sito sano. Per quanto riguarda gli allograft vengono utilizzati tratti arteriosi o venosi prelevati da donatore oppure prelevati da cadavere e criopreservati a -80°C . Tale soluzione può presentare il rischio di una risposta immunitaria dovuta all'incompatibilità del tessuto donatore con quello ospite, portando nella maggior parte dei casi a fenomeni di calcificazione con conseguente fallimento dell'impianto. Una terapia immunosoppressiva e il congelamento dei tessuti prima dell'impianto possono ridurre sensibilmente la risposta immunologica al trapianto. Per quanto riguarda gli impianti eterologhi, due esempi comuni di segmenti vascolari sono la *carotide bovina* e l'*arteria mammaria interna bovina*. Come nel caso di allograft, il problema principale per gli impianti eterologhi è dovuto alla reazione immunogenica dell'organismo ospite, che anche in questo caso può portare a fallimento dell'impianto.

Le soluzioni ad oggi disponibili in ambito protesico hanno mostrato una buona efficacia per impianti di vasi soprattutto di medio e grosso calibro, pur evidenziando problemi dovuti a risposte infiammatorie o immunologiche da parte dell'organismo ospite. Tuttavia esistono ancora numerose limitazioni per quanto riguarda le protesi di piccolo calibro, per le quali i requisiti definiti precedentemente sono ancora più stringenti. Per impianti inferiori a 6mm, infatti, si registrano condizioni molto più critiche rispetto a quelle che si verificano in vasi di largo diametro: il sangue scorre più lentamente prolungando il tempo di contatto con la parete e dunque la formazione di coaguli o trombi, che portano con molta probabilità all'occlusione dell'innesto e dunque al fallimento precoce della protesi. Ad oggi le soluzioni per sostituzioni di vasi di piccolo calibro comprendono esclusivamente l'utilizzo di autograft, che presentano le problematiche definite precedentemente. La ricerca si è dunque spinta verso nuove promettenti soluzioni, prima fra tutte l'ingegneria dei tessuti, che propone un approccio differente che consiste nella completa rigenerazione in vitro di un tessuto vascolare. Dai lavori presenti in letteratura si possono individuare due orientamenti principali:

- *Non Scaffold based TEBV (tissue-engineered blood vessel)*
- *Scaffold based TEBV*

La prima tipologia prevede l'utilizzo di "cellular sheets", ovvero di veri e propri fogli cellulari che vengono arrotolati su un supporto cilindrico per riprodurre l'organizzazione fisiologica a strati concentrici [21]. Questo tipo di approccio non prevede quindi l'utilizzo di scaffold o di qualsiasi altro tipo di materiale: il TEBV ottenuto è completamente biologico. La seconda tipologia presenta un'applicazione più ampia e prevede l'utilizzo di scaffold tridimensionali, che possono essere di tipo *sintetico, naturale* o *decellularizzati*. Si intendono di origine sintetica tutti quelli realizzati con polimeri di sintesi, ad esempio l'acido poliglicolico (PGA), l'acido polilattico (PLA), l'acido poli (lattico-co-glicolico) (PLGA), ottenuto dalla copolimerizzazione dei primi due, il policaprolattone (PCL) e i policarbonati. Il vantaggio di queste tipologie di scaffold sta nella grande lavorabilità e nella possibilità sottoporre i materiali a diversi processi o tecniche di lavorazione che consentono di modificare una vasta gamma di parametri meccanici a seconda del tipo di tessuto che si vuole riprodurre. Inoltre queste strutture presentano un'alta riproducibilità dato che vengono prodotte a livello industriale [22]. Il principale aspetto limitante degli scaffold sintetici va ricercato nell'interazione con il sistema biologico. Le caratteristiche del materiale possono infatti portare ad una risposta infiammatoria con conseguente fallimento dell'impianto [23]. Gli scaffold di origine naturale sono stati studiati con l'intento di risolvere le problematiche relative agli scaffold sintetici. Essi sono costituiti da polimeri naturali come collagene, glicosamminoglicani, chitosano, che simulano molto bene l'ambiente cellulare. Tuttavia la diversità e la complessità degli stimoli che producono non consentono di avere il pieno controllo sullo sviluppo e sul differenziamento cellulare, inoltre le scarse proprietà meccaniche ne hanno limitato l'uso per la produzione di scaffold. Con l'obiettivo di superare le problematiche di entrambe le soluzioni, una terza tipologia è costituita dai tessuti decellularizzati. Per *decellularizzazione* si intende la completa rimozione delle componenti cellulari e nucleari di un tessuto preservando la matrice extracellulare; essa può essere eseguita tramite agenti fisici, chimici od enzimatici [24]. Gli scaffold acellulari così ottenuti rappresentano un ottimo substrato in grado di promuovere l'adesione, la differenziazione e la proliferazione cellulare grazie alle

componenti e alla struttura della specifica matrice extracellulare. In aggiunta, gli scaffold decellularizzati hanno mostrato delle proprietà meccaniche simili a quelle dei tessuti nativi [25] e questo rappresenta un elemento fondamentale nell'ingegnerizzazione di vasi sanguigni.

1.4 LA DECELLULARIZZAZIONE

1.4.1 INTRODUZIONE

La decellularizzazione è una tecnica tramite la quale si ottiene un tessuto o un intero organo in cui viene preservata esclusivamente la componente extracellulare, ovvero la struttura di sostegno composta per la maggior parte di collagene, insieme ad altre proteine come fibrina ed elastina. Il tessuto decellularizzato è teoricamente privo del patrimonio genetico del donatore e dunque inerte dal punto di vista immunologico: da questo punto di vista presenta dunque le caratteristiche ideali per essere utilizzato come scaffold. Ad oggi la decellularizzazione è stata sperimentata su varie tipologie di tessuti ma anche su organi interi: in questo senso è possibile distinguere due tecniche differenti che prevedono un approccio di tipo *statico* ed uno di tipo *dinamico* allo stesso modo della semina cellulare. La decellularizzazione statica segue il protocollo standard che prevede "l'immersione" dell'organo o del tessuto di interesse all'interno di una camera che viene riempita con vari agenti decellularizzanti. Quella di tipo dinamico invece prevede la perfusione delle sostanze attraverso il tessuto e dunque il continuo ricircolo del fluido. Alcuni lavori disponibili in letteratura hanno dimostrato una maggior efficacia in alcuni casi della seconda tecnica nella rimozione del contenuto cellulare tramite la valutazione della quantità di DNA (rispetto al peso) nel tessuto decellularizzato. In letteratura l'approccio dinamico è stato valutato su varie tipologie di tessuti (sia di animali che di umani) con risultati incoraggianti: tra i tanti si riportano sperimentazioni su trachea [26], rene [27], polmoni [28], fegato [29], cuore [30]. Un'ampia sperimentazione include inoltre i vasi sanguigni, di cui si parlerà più ampiamente nel paragrafo seguente. Una caratteristica fondamentale di un processo di decellularizzazione è la bassa invasività: le sostanze e gli agenti utilizzati devono preservare la struttura tridimensionale e le proprietà meccaniche

della matrice senza eliminare i vantaggi che l'utilizzo di uno scaffold di questo tipo comporta [31]. In letteratura sono riportate differenti tecniche utilizzate per la decellularizzazione di organi e tessuti. Generalmente si fa una distinzione tra metodi *fisici*, *chimici* ed *enzimatici*: nella maggior parte dei casi i tre metodi vengono combinati insieme per ottenere un miglior effetto decellularizzante. Nella tabella seguente sono riassunti i vari metodi, di cui viene riportata la modalità di azione e gli effetti sulla matrice extracellulare.

METODO	MODALITA' DI AZIONE	EFFETTI SULLA ECM
Fisici		
<u>Congelamento/scongelamento</u>	Rottura della membrana cellulare tramite la formazione di cristalli di ghiaccio intracellulari	Se il congelamento è troppo repentino la ECM può essere danneggiata
<u>Pressione</u>	La pressione esercitata sulle membrane provoca la rottura delle stesse e facilita la rimozione del materiale cellulare	Possibile danneggiamento se la pressione esercitata è troppo elevata
<u>Agitazione meccanica</u>	Il moto provocato dall'agitatore può portare a lisi cellulare. Il suo utilizzo non è molto comune per questo tipo di applicazione	Un'agitazione troppo vigorosa può portare a danneggiamento
<u>Elettroporazione</u>	Distruzione della membrana tramite trattamento con campi elettrici pulsati	Possibile danno all'ECM da parte del campo elettrico

Chimici		
<u>Acidi e basi</u>	Solubilizzazione delle componenti citoplasmatiche delle cellule, distruzione degli acidi nucleici e denaturazione delle proteine	Possibile danno al collagene e rimozione dei GAG
<u>Soluzioni ipertoniche e ipotoniche</u>	Provocano una lisi cellulare tramite shock osmotico. Rottura delle interazioni DNA-proteina	Rimozione non totale dei residui cellulari dalla ECM
<u>Detergenti non ionici:</u> - <u>Triton X-100</u>	Rottura delle interazioni DNA-proteina, lipide-lipide e proteina-lipide. Lascia intatto il legame proteina-proteina	Danni all'ultrastruttura della ECM e del collagene. Rimozione dei GAG e dei fattori di crescita (GF)
<u>Detergenti ionici:</u> - <u>Sodio dodecil solfato (SDS)</u> - <u>Sodio deossicolato</u> - <u>Triton X-200</u>	Solubilizzano la membrana citoplasmatica e nucleare. Tendono a denaturare le proteine.	Possibile danneggiamento della struttura dell'ECM e del collagene.
<u>Detergenti zwitterionici:</u> - <u>CHAPS</u> - <u>Sulfobetaina 10 e 16(SB-10, SB-16)</u>	Proprietà comuni sia a detergenti ionici che a detergenti non ionici. Ottima capacità di rimozione cellulare	Danni simili a quelli provocati dal Triton X-100
<u>Tri(n-butil)fosfato (TBP)</u>	Solvente organico che distrugge le interazioni proteina-proteina	Perdita di collagene
<u>Agenti chelanti:</u> - <u>EDTA</u> - <u>EGTA</u>	Agenti che si legano agli ioni metallici proibendo l'adesione cellulare alla ECM. Tipicamente associati a metodi enzimatici	Rimozione dei GAG nell'ECM

Enzimatici		
<u>Tripsina</u>	Rompe i legami peptidici dell'Arg e della Lys a livello del terminale C	Un contatto prolungato può distruggere la ECM e le proteina a essa annesse
<u>Endonucleasi</u>	Catalizza l'idrolisi dei legami interni delle catene dei (deossi)ribonucleotidi	Difficile da rimuovere dai tessuti
<u>Esonucleasi</u>	Catalizza l'idrolisi dei legami terminali delle catene dei (deossi)ribonucleotidi	Difficile da rimuovere dai tessuti

Tab. 1: Metodi ed agenti comunemente utilizzati per la decellularizzazione di organi e tessuti

1.4.2 DECELLULARIZZAZIONE DI VASI SANGUIGNI

La decellularizzazione di un vaso sanguigno permette di ottenere uno scaffold tridimensionale di forma cilindrica le cui proprietà meccaniche siano riconducibili a quelle del tessuto nativo [32]. Esistono in letteratura vari protocolli di decellularizzazione che sfruttano più o meno tutte le tecniche precedentemente riassunte. L'efficacia del protocollo dipende dal tessuto che viene decellularizzato e dalle tipologie di detergente con cui quest'ultimo viene combinato. A seconda del tipo di procedura, infatti, varia l'effetto del processo sul tessuto, come evidenziato in letteratura [33]. Diversi studi sono stati portati avanti per valutare tali effetti su tessuti vascolari, con particolare attenzione agli effetti sul contenuto cellulare e sulle proprietà meccaniche del costruito. Alcuni di questi sono riportati nella tabella seguente, in cui viene riportato autore, descrizione del protocollo e risultati ottenuti in termini di effetti sul tessuto.

AUTORE/ANNO/JOURNAL	PROTOCOLLO	RISULTATI
Patrick J, Schaner et al., 2004, Journal of vascular Surgery [34]	-Incubazione in SDS a 37 °C per 15 ore -Risciacqui di 10 minuti in PBS per cinque volte	-Raggiungimento di un livello di decellularizzazione >94% -Preservata gran parte della ECM, in particolare fibre di collagene ed elastina
John C. Fitzpatrick et al., 2010, International Journal of Biomaterials [33]	-Agitazione a 37°C per 24h in una soluzione all'1% di Triton X-100 e 0.02% di EDTA in PBS, insieme a RNase A(20µg/mL) e DNase I(0.2mg/mL)	-Non vi è stata effettiva decellularizzazione del tessuto. - Leggera variazione nelle proprietà meccaniche (diminuzione della compliance).
Clay Quint et al. , 2011, PNAS[35]	-Immersione in una soluzione di PBS contenente 8mM CHAPS, 1M NaCl, 25mM EDTA -Mescolamento per 1h a 37°C -Immersione in soluzione contenente 1.8mM SDS, 1M NaCl, 25mM EDTA -Risciacquo in EBM-2 con 10%FBS	-Riduzione radicale del contenuto di DNA -Contenuto di collagene invariato -Perdita di proteine cellulari
A.Pellegata et al. ,2013, Biomed Research International[25]	-Risciacquo di 24h con acqua distillata e PBS contenente 1% penicillina, 1% streptomicina e 1% anfotericina B(soluzione AA) a 4°C. -Immersione per 4h in Sodio Deossicolato seguito da tre lavaggi in acqua distillata con soluzione AA -Immersione in una soluzione di Cloruro di Sodio 0,001 M contenente DNase per 3 ore -Immersione in PBS tutta la notte	-Assenza di nuclei e residui nucleari. -Assenza di significative modifiche strutturali
Liqiong Gui et al., 2009, Tissue Eng Part A [36]	-Incubazione in soluzione di mM CHAPS, 1M NaCl, 25mM EDTA in PBS per 22h, seguito da due giorni di lavaggio in PBS. -Incubazione per due giorni in EGM-2 a 37°C	-Mantenimento del collagene nella matrice extracellulare -Completa rimozione del materiale nucleare -Mantenimento della compliance nativa
C.Grandi et al., 2011, International Journal of Molecular Medicine [37]	-Trattamento con acqua distillata per 72h a 4°C -Incubazione in Sodio Deossicolato al 4% per 4h a temperatura ambiente -Trattamento con DNase I in NaCl 1M per 2h a temperatura ambiente	-Significativa riduzione del contenuto cellulare -Mantenimento della maggior parte delle proteine dell'ECM, come collagene e lamine elastiche
Xiu-Fang Xu et al., 2013, International Journal of Clinical and Experimental Medicine [38]	-Immersione in una soluzione di EDTA allo 0.25% per 36h ad una temperatura di 37°C -Lavaggio in PBS e agitazione in una soluzione di Triton X-100 all'1% a temperatura ambiente -Trattamento in una soluzione di RNase (20mg/L) e DNase (200mg/L) a 37°C per 24h	-Completa eliminazione della componente cellulare -Struttura lassa, con alto contenuto di acqua -Perdita di resistenza a trazione rispetto al tessuto nativo

Zhang Hong-xia et al. ,2012, Journal of East China Normal University [39]	-Trattamento con tripsina -Cicli ripetuti di congelamento/ scongelamento	-La ECM ha conservato la propria struttura ottimale, le fibre sono risultate dense ed ordinate.
Yu Zou et al.,2012, Journal of Surgical Research [40]	Protocollo 1: -Incubazione in una soluzione ipotonica Tris 10mM con 0.1% di EDTA per 1h -Agitazione a temperatura ambiente in una soluzione di 0.1% di SDS con Tris 10mM, insieme ad RNase (20µg/mL) e DNase (0.2mg/mL) per 48h. Protocollo 2: -Incubazione in una soluzione di 0.5% di Tripsina, 0.2% EDTA in un buffer ipotonico di Tris 10mM, con RNase e DNase a 37°C per 48h	-Efficace rimozione cellulare -Danni alla ECM nel protocollo che utilizza tripsina: rottura dei crosslink tra le fibre.

Tab. 2: Protocolli di decellularizzazione di vasi sanguigni presenti in letteratura

Come si evince dalla tabella, la maggior parte dei trattamenti decellularizzanti sfruttano una combinazione di agenti chimici, fisici ed enzimatici. Altri studi, dagli obiettivi differenti rispetto a quelli precedentemente riassunti, rappresentano comunque degli ottimi esempi di protocolli di decellularizzazione per tessuti vascolari. E' il caso del lavoro di A.Azhim et al. [41] in cui si propone un metodo che combina sonicazione ad utilizzo di SDS con l'obiettivo di valutare i parametri ideali, in termini di PH e quantità di ossigeno, per massimizzare l'efficacia nella decellularizzazione di un tessuto vascolare.

1.4.3 AUTOMAZIONE DEL PROCESSO DI DECELLULARIZZAZIONE

Gli studi esposti nel paragrafo precedente vengono nella maggior parte dei casi eseguiti in maniera manuale, ovvero prevedono in molte fasi l'intervento di un operatore e questo aumenta le sorgenti di errore durante il processo. Sarebbe utile quindi sviluppare un prodotto in grado di eseguire in maniera automatica la decellularizzazione, limitando il più possibile l'intervento dell'utente. In genere un prodotto di terapia avanzata, così come viene classificato un prodotto dell'ingegneria tissutale, segue delle linee guida dettate dal quadro normativo integrato (regolamento n.1394/2007) [42] pubblicato in Gazzetta europea il 10 dicembre 2007. Tale regolamento comprende le norme GMP (Good

Manufacture Practice), attraverso le quali si definiscono i requisiti che devono essere soddisfatti durante le fasi di sviluppo, produzione e controllo dei prodotti biomedici in modo da garantirne la qualità, la sicurezza e l'efficacia. Le GMP si distinguono in particolare in GLP (Good Laboratory Practice), che normano le attività di laboratorio, e le GCP (Good Clinical Practice), che normano invece gli studi clinici. Una componente estremamente importante delle GMP è la necessità di documentare ogni aspetto del processo, ogni attività ed ogni operazione. Se la documentazione non è corretta ed in ordine, se non evidenzia il modo in cui il prodotto è stato fabbricato e verificato, permettendo la rintracciabilità e il ritiro dal mercato in caso di problemi futuri, allora il prodotto viene considerato "contaminato". Oltre a questo, requisiti fondamentali per un prodotto biomedico sono la riproducibilità, la ripetibilità, la sicurezza e la sterilità. La *riproducibilità* riguarda il tipo di processo eseguito per ottenere il prodotto: tale processo è riproducibile nel momento in cui sono stati documentati con chiarezza le modalità con cui sono stati eseguiti i vari passaggi del protocollo in modo tale da essere per l'appunto riproducibili in qualsiasi laboratorio. La *ripetibilità* di un processo implica che il risultato finale sia ripetibile, ovvero che i prodotti ottenuti, nel nostro caso i vasi decellularizzati, abbiano tutti le stesse caratteristiche. La *sicurezza* di un prodotto previene invece da possibili danni associati al suo utilizzo: nel nostro caso è necessario garantire che l'impianto di un sostituto vascolare non provochi danni nell'organismo impiantato. La *sterilità*, infine, impone di limitare il più possibile il contatto tra il vaso e gli agenti esterni onde evitare fenomeni di contaminazione. Nonostante i protocolli manuali di decellularizzazione seguano le "buone pratiche di laboratorio", è chiaro che ridurre al minimo l'attività dell'operatore diminuirebbe di molto il rischio di errore. Questo si può ottenere automatizzando il protocollo di decellularizzazione, cioè progettando un dispositivo che esegua automaticamente i ricambi delle varie sostanze e che sia in grado anche di monitorare alcuni parametri che nel processo manuale sarebbe impossibile controllare. A quel punto l'operatore si limiterebbe esclusivamente a inserire il vaso all'interno del dispositivo e a far partire il programma di decellularizzazione, in modo tale da limitare al massimo le possibili fonti di errore umano.

1.5 OBIETTIVI DEL LAVORO

Scopo di questo lavoro di tesi è stata l'ottimizzazione di un sistema per la decellularizzazione automatica di tessuti biologici. Si è partiti da un'analisi della configurazione iniziale del dispositivo per valutare gli aspetti più critici su cui operare possibili modifiche. In particolare si è agito su tre aspetti:

- Circuito idraulico
- Sistema di termoregolazione
- Sistema di controllo

Una volta completata la fase di progettazione e realizzazione delle modifiche si è passati alla validazione del dispositivo nella nuova configurazione. La validazione è stata caratterizzata da differenti tipologie di prove:

- *Prove su banco*: il dispositivo è stato testato facendo circolare dell'acqua distillata all'interno del circuito e valutando l'effettivo funzionamento dell'intero sistema
- *Prove sperimentali di decellularizzazione su vasi*: sono state eseguite due differenti prove di decellularizzazione di vasi sanguigni porcini, i cui risultati sono stati ottenuti tramite specifiche tecniche di analisi quantitative sul DNA ed analisi istologiche in ematossilina-eosina e marcatura DAPI.
- *Prova di decellularizzazione su rene*: per testare la versatilità del dispositivo, quest'ultimo è stato utilizzato per una prova di decellularizzazione su rene di ratto. Per valutare l'efficacia del processo sono state effettuate analisi in ematossilina-eosina (EE) e marcatura DAPI.

**CAPITOLO II:
PROGETTAZIONE DEL
DISPOSITIVO**

Nel seguente capitolo verranno descritti in maniera approfondita i vari componenti del dispositivo di decellularizzazione. Durante la progettazione si è tenuto conto di alcuni requisiti ritenuti fondamentali per la realizzazione di un sistema automatizzato e si è partiti dalle problematiche e dalle mancanze riscontrate nel dispositivo allo stato iniziale, cercando di garantire all'utente un numero di azioni il più ridotto possibile per limitare le fonti di errore durante l'esecuzione del protocollo, scopo principale dell'automazione di un processo.

2.1 REQUISITI GENERALI DEL DISPOSITIVO

I requisiti principali di cui si è tenuto conto durante la progettazione sono i seguenti:

- *Automazione*: il dispositivo deve consentire di automatizzare le attività del protocollo di decellularizzazione, che normalmente sono eseguite in maniera manuale. Garantire un processo completamente automatizzato è fondamentale soprattutto per garantire altri importanti requisiti come la *riproducibilità*, la *memorizzazione*, la *sicurezza*.
- *Riproducibilità*: Un sistema completamente automatizzato deve essere in grado di garantire prodotti il più simile possibile tra loro, riducendo quindi le variabili associate alla lavorazione, le uniche controllabili in quanto sono comunque presenti dei limiti dovuti alla variabilità biologica.
- *Sicurezza*: Il dispositivo deve poter limitare l'attività dell'utente e di conseguenza ogni possibile situazione di pericolo dovuta a contatti con reagenti o sostanze utilizzate nel processo. Nel caso in questione le sostanze utilizzate non rappresentano una particolare fonte di pericolo ma è comunque importante garantire tale requisito nel caso si volesse estendere l'utilizzo del dispositivo a protocolli differenti.
- *Stimolazione*: il dispositivo deve esercitare delle sollecitazioni sul vaso durante la decellularizzazione così da migliorare l'efficacia del processo: le modalità con cui questo aspetto viene garantito verranno descritte successivamente in questo capitolo.

- *Termoregolazione*: il dispositivo deve poter controllare e gestire la temperatura del fluido circolante in modo da massimizzare l'efficienza degli agenti decellularizzanti.
- *Semplicità di utilizzo*: garantire tale requisito è fondamentale per ridurre il più possibile le fonti di errore; questo lo si può ottenere fornendo un sistema che limiti l'attività dell'utente all'impostazione di comandi semplici ed intuitivi.
- *Versatilità*: il dispositivo deve potersi adattare il più possibile a protocolli e tipologie di tessuto differenti in termini di geometrie e dimensioni. Nel nostro caso deve poter essere utilizzato su vasi sanguigni di differente diametro e lunghezza e, come sarà approfondito in seguito, verrà utilizzato anche per la decellularizzazione di un rene.
- *Sterilità*: è necessario ridurre il più possibile il rischio di contaminazione del tessuto dall'esterno sia il rischio per l'utente di entrare in contatto con sostanze potenzialmente dannose utilizzate durante il protocollo.
- *Autoclavabilità*: i vari componenti del sistema devono poter essere sterilizzati in autoclave (120 °C) prima del loro utilizzo, così da poter essere riutilizzati in successivi protocolli evitando cross-contaminazioni.
- *Memorizzazione*: E' importante poter risalire a tutte le fasi del processo e a tutte le sostanze utilizzate per l'ottenimento del prodotto finale. Un sistema automatizzato utilizza le stesse sostanze nella stessa quantità garantendo una standardizzazione del processo.

2.2 SOLUZIONE PROGETTUALE INIZIALE

Questo lavoro di tesi ha avuto come punto di partenza un dispositivo sviluppato al Politecnico di Milano e già utilizzato nella decellularizzazione di vasi sanguigni. Il funzionamento di base prevede l'utilizzo di due pompe per permettere la circolazione delle sostanze decellularizzanti all'interno di un circuito idraulico, una camera all'interno della quale viene posizionato il vaso da decellularizzare tramite appositi afferraggi e quattro elettrovalvole per la gestione di tre differenti tipologie di sostanze previste dal protocollo utilizzato. Un sistema di controllo della temperatura permette inoltre di scaldare o raffreddare il fluido mantenendolo alla temperatura desiderata. Un microcontrollore Arduino gestisce le tempistiche di attivazione delle pompe e delle elettrovalvole, nonché il sistema di termoregolazione. Del dispositivo si è mantenuto lo schema principale apportando le dovute modifiche che verranno approfondite successivamente. Tale schema prevede l'utilizzo di componenti di seguito elencati:

- Circuito idraulico
- 3 Reservoir + 1 Waste
- 2 Pompe
- 4 Elettrovalvole
- Camera di decellularizzazione
- Sistema di termoregolazione
- Sistema di controllo

Il *circuito idraulico* è realizzato con tubi PharMed® BPT, biocompatibili ed autoclavabili. In particolare sono stati utilizzati tubi dal diametro interno di 1.58mm. Le connessioni tra i vari tratti del circuito sono state eseguite tramite connettori Luer-Lock e Barbed (fig.8) tramite i quali è stato possibile suddividere la tuberia in differenti linee.

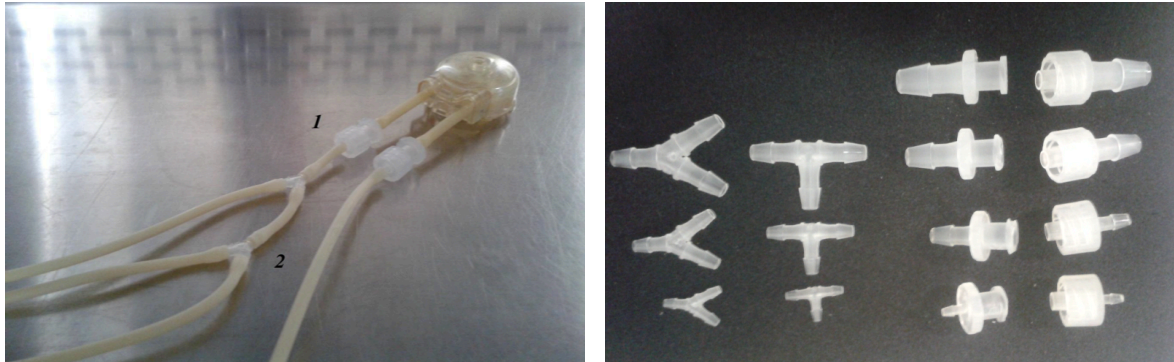


Fig.8:A sinistra: esempi di connessioni Luer-lock (1) e connettori barbed (2) necessari per la divisione del circuito in differenti linee. A destra: dettaglio di connettori barbed e Luer-lock di varie dimensioni.

I *reservoir*, realizzati in vetro Pyrex®, sono in numero necessario a gestire i fluidi all'interno del circuito: il protocollo utilizzato, di cui si parlerà nel capitolo successivo, prevede infatti l'utilizzo di tre differenti soluzioni, contenute in tre reservoir differenti, e di un waste in cui vengono raccolte le varie sostanze dopo aver eseguito la loro funzione. Per evitare contaminazioni con l'esterno, i contenitori sono dotati di tappi GL45 modificati in modo da essere adattati alla nostra applicazione, che consentono di connettere il reservoir in sterilità con il resto del circuito (fig.9).

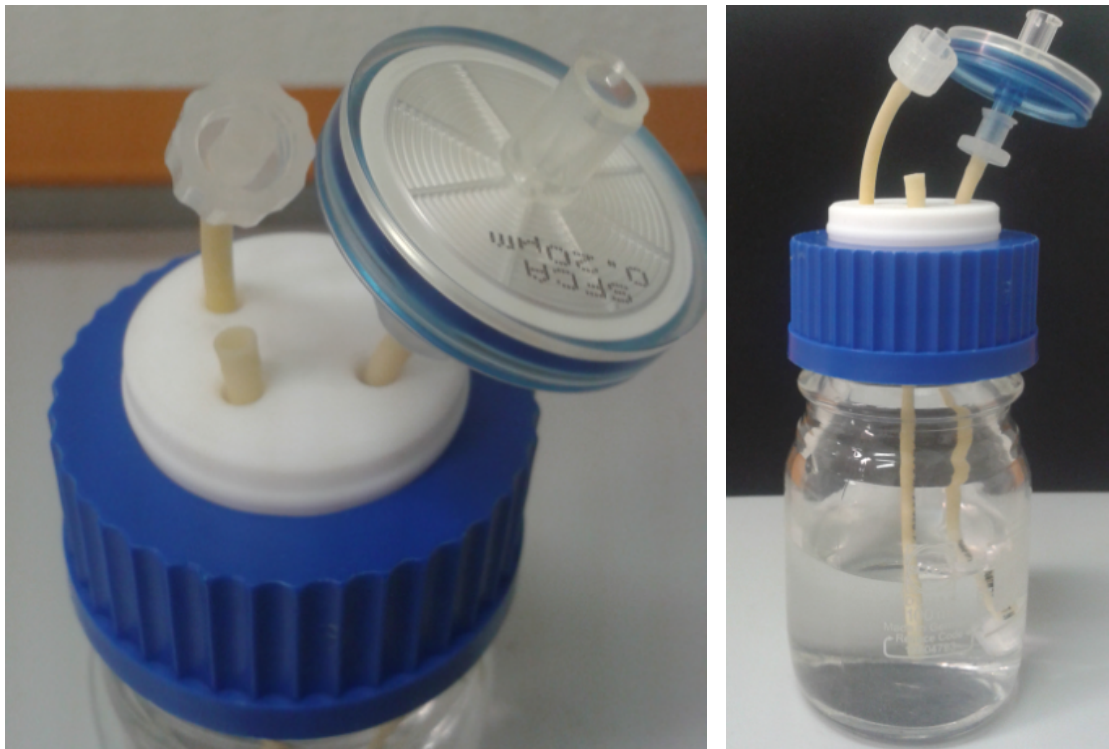


Fig.9: A sinistra: tappo GL45 modificato per consentire l'ingresso dei tubi mantenendo la sterilità ; si può notare il particolare del filtro dell'aria 0.22 micron. A destra: reservoir con tappo GL45 (destra).

Le pompe utilizzate sono delle pompe peristaltiche WPM2 prodotte dall'azienda WELCO, compatibili con tubi di tipo PharMed. Esse vengono attivate tramite motori in corrente continua. Il vantaggio di questo tipo di pompe è la possibilità di disassemblare dal blocco motore la parte rotante, in polisulfone, che può essere autoclavata (fig.10).

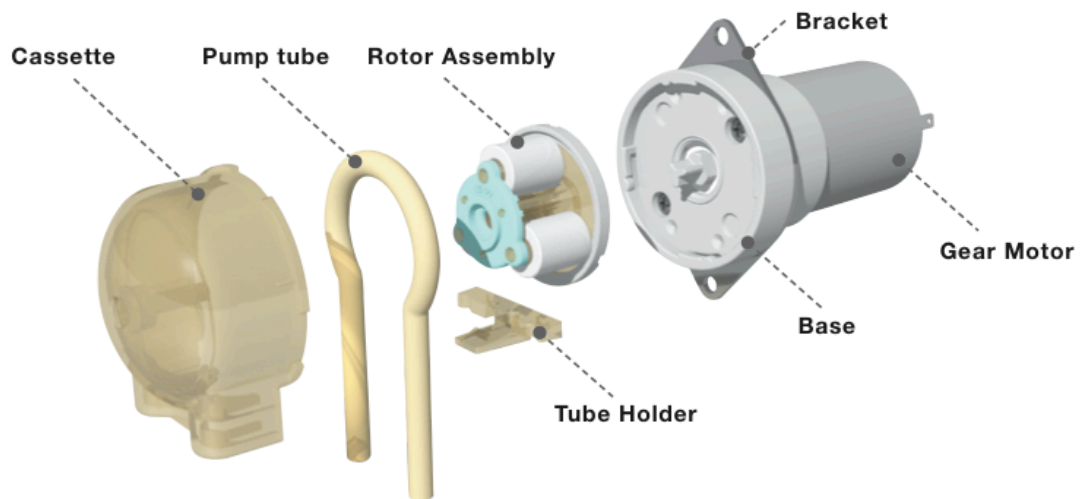


Fig.10: Immagine illustrativa dei componenti della pompa. Partendo da destra è visibile il motore, che può essere disassemblato dalla parte restante in polisulfone e dunque autoclavabile costituita da una parte rotante, il ferma-tubo, il sottopompa e il case.

Le *elettrovalvole* (fig.11) sono delle valvole pinza-tubo, prodotte dall'azienda SIRAI, caratterizzate da un organo di pinzaggio in POM (poliossimetilene) rafforzato in carbonio. Esse sono state scelte in quanto compatibili con il tipo di tubo utilizzato e con la nostra applicazione. In particolare il dispositivo è dotato di:

- elettrovalvole 2/2 NC: elettrovalvole a due vie normalmente chiuse per aprire o chiudere un unico flusso
- 1 elettrovalvola 2/3: elettrovalvola a tre vie in grado di aprire o chiudere il passaggio di due differenti flussi. Queste valvole sono realizzate in maniera tale che, nel momento in cui sono attive, uno dei due tubi viene pinzato mentre l'altro viene lasciato aperto, viceversa nel momento in cui sono inattive.

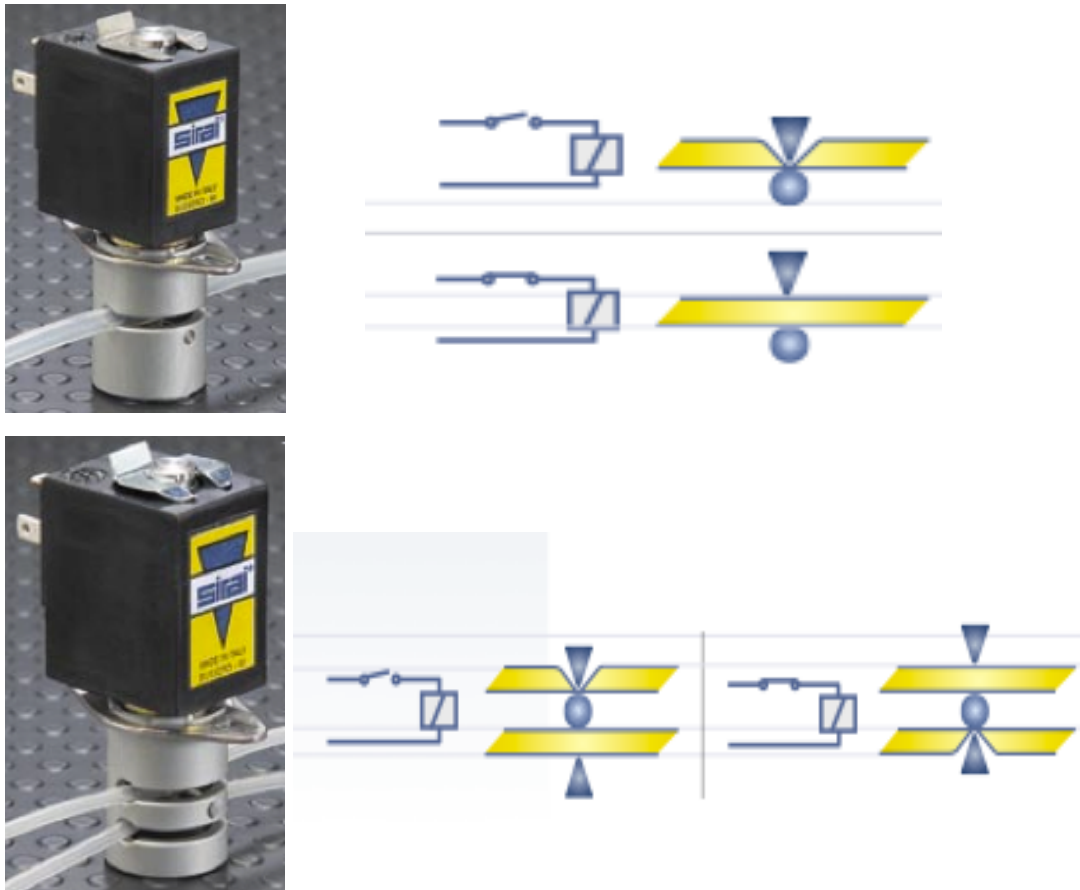


Fig.11: Sinistra: in alto elettrovalvola a due vie, in basso: elettrovalvola a tre vie. Destra: in alto schema di funzionamento elettrovalvola a due vie, in basso schema di funzionamento elettrovalvola a tre vie.

Entrambe le tipologie di valvole sono costituite da un corpo di 16mm di diametro in cui possono essere inseriti tubi che vanno da 1.98mm a 3.18mm di diametro esterno. In queste condizioni il magnete può generare una forza di pinzaggio di circa 0.18Kg e un assorbimento di 8W.

La *camera di decellularizzazione* connette il circuito idraulico con il tessuto da decellularizzare, e nel nostro caso è stato ottimizzato per accogliere un vaso sanguigno. E' stata realizzata in polisulfone con una forma cilindrica cava e permette l'alloggiamento del tessuto tramite opportuni afferraggi (fig.12), i quali consentono anche la perfusione del vaso durante la decellularizzazione. Si distinguono afferraggi prossimali, in POM,

responsabili della perfusione, e afferraggi distali, in acciaio AISI 316L, responsabili del condizionamento ciclico del vaso.

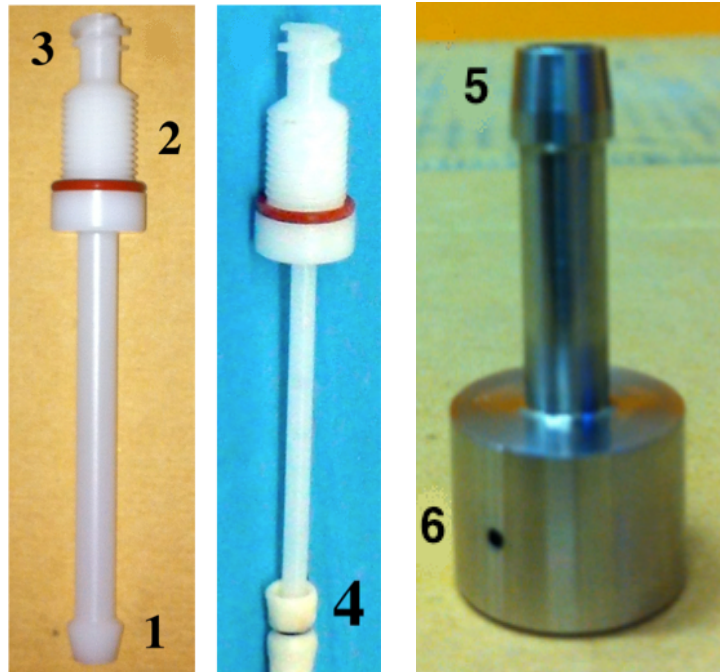


Fig.12: A sinistra: afferraggio prossimale realizzato in POM in cui si può notare il connettore barbed per la connessione con il resto del circuito idraulico (3), il filetto per connetterlo al coperchio della camera (2) e la flangia necessaria per l'ancoraggio del vaso (1). Al centro: particolare che evidenzia le modalità di fissaggio del vaso, che viene calzato sulla flangia e assicurato con un filo di sutura (4). A destra: afferraggio distale: anche in questo caso si può vedere la flangia per l'ancoraggio con l'altra estremità del vaso (5) e uno dei due fori (6) per permettere la fuoriuscita del liquido durante il riempimento (l'altro si trova in posizione diametralmente opposta).

Sia l'afferraggio prossimale che quello distale sono presenti in diverse dimensioni a seconda delle dimensioni del vaso da decellularizzare: sono stati progettati con tre diametri differenti, da 3,5 e 7mm e permettono di calzare vasi di tale diametro con una tolleranza di ± 1 mm. Il condizionamento avviene durante la perfusione sia in direzione longitudinale che in direzione radiale: lo stress in direzione longitudinale è garantito dal peso dell'afferraggio distale, mentre lo stress in direzione radiale dalla geometria dello stesso afferraggio (fig.13)

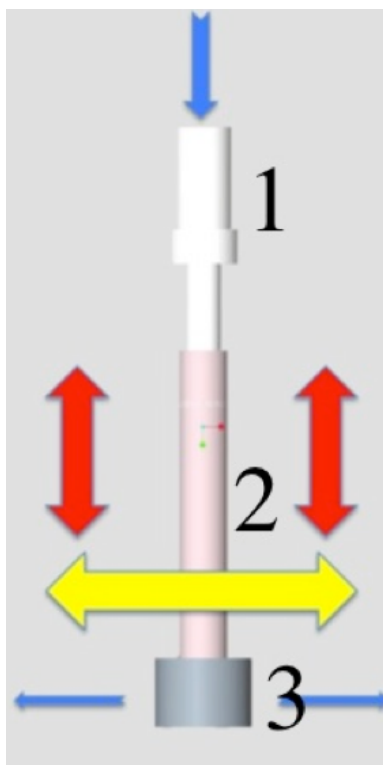


Fig.13: Schema che mostra il condizionamento longitudinale (freccie rosse) garantito dal peso dell'afferraggio distale (3), il condizionamento radiale (freccia gialla) garantito dalla geometria dello stesso afferraggio. Le freccie blu suggeriscono il flusso del fluido all'interno del sistema, con il passaggio attraverso l'afferraggio prossimale (1), il vaso (2) e la fuoriuscita dai due fori presenti nell'afferraggio distale.

L'afferraggio distale presenta infatti una geometria progettata in modo tale da generare una perdita di carico a valle del vaso. Tale perdita di carico è stata dimensionata in fase di progettazione del circuito idraulico, aspetto che sarà approfondito successivamente in questo capitolo. La camera è quindi sigillata tramite un coperchio in POM costituito da tre fori: uno per l'assemblaggio con l'afferraggio prossimale, uno per il filtro dell'aria, uno per connettere il sistema di termoregolazione di cui si parlerà successivamente. La camera è invece caratterizzata da due fori, uno nella base inferiore del cilindro, connesso con il circuito idraulico e utilizzato per svuotare la camera, l'altro in posizione laterale per inserire il sensore di temperatura necessario per il controllo in retroazione della temperatura (fig. 14)

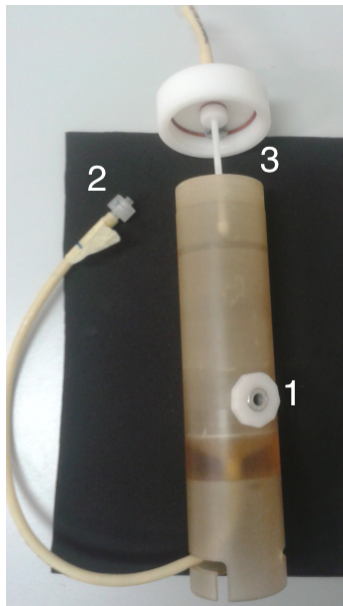


Fig.14: Immagine della camera di decellularizzazione: si nota il foro necessario per l'inserimento del sensore di temperatura (1), il tappo con l'afferraggio assemblato (3) e il connettore (2) per la connessione della camera con il circuito idraulico.

Il sistema di termoregolazione si basa invece sull'utilizzo di un dissipatore in metallo che viene inserito all'interno della camera a contatto con il fluido: esso è connesso a una cella di Peltier che scalda o raffredda il dissipatore a seconda della tensione che riceve ai capi dei semiconduttori che costituiscono la cella. Il dissipatore è a sua volta immerso all'interno del fluido che riempie la camera e dunque trasferisce il calore acquisito dalla cella di Peltier (fig.15).

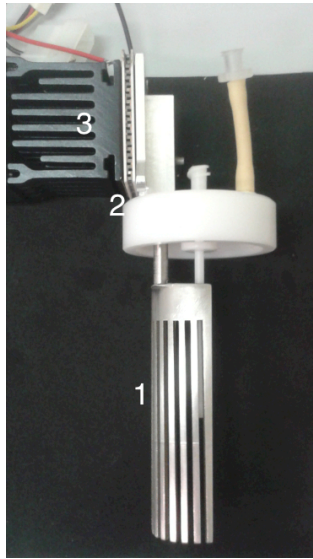


Fig. 15: Immagine che illustra il sistema di termoregolazione nella configurazione iniziale, montato direttamente sul tappo della camera. Si nota l'elemento in metallo (1), la cella di Peltier (2) e il dissipatore (3).

Le pompe, le elettrovalvole e il sistema di termoregolazione vengono gestiti tramite un *sistema di controllo* pilotato da microcontrollore atmega 128 montato su piattaforma ARDUINO UNO, opportunamente programmato per eseguire il ricambio delle sostanze a intervalli di tempo stabiliti dall'utente. Il sistema di controllo si occupa dunque di gestire le pompe, le elettrovalvole e il sistema di termoregolazione. L'attività delle pompe e delle elettrovalvole è regolata rispettivamente tramite un motor shield ed un relay shield montati a castello su Arduino. Oltre a motor shield e relay shield un ulteriore componente è il ponte H LMD18200, montato su integrato Tank 3A Hp e utilizzato per gestire carichi ad alto assorbimento, nel nostro caso la cella di Peltier. Approfondimenti sul funzionamento e sulle modalità di comunicazione tra i vari componenti verranno illustrati insieme alle nuove modifiche apportate nella sezione dedicata al sistema di controllo. Il dispositivo nel suo complesso è mostrato nell'immagine seguente con relativo schema (fig.16).

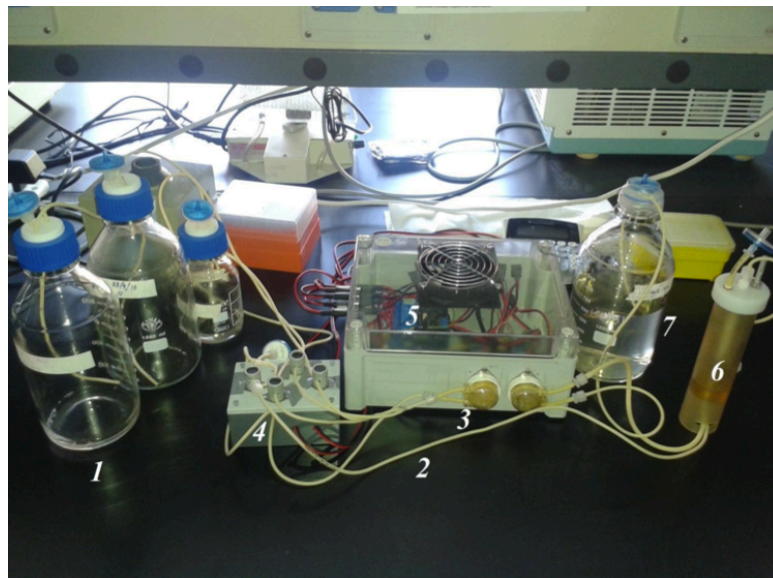
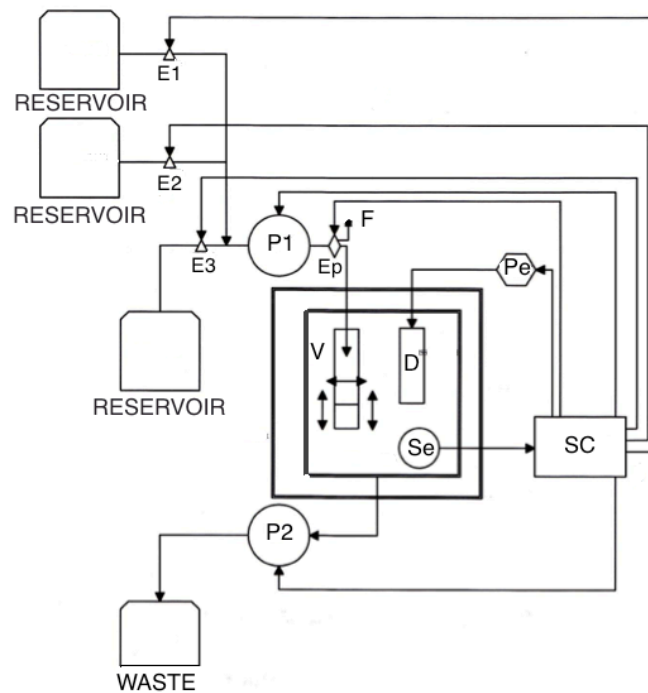


Fig.16: In alto: schema della soluzione progettuale iniziale in cui sono visibili i tre reservoir, le valvole (E1,E2,E3,Ep), il waste, le due pompe di immissione (P1) e aspirazione (P2) del fluido, il filtro (F) per lo svuotamento della linea, il sistema di controllo (SC), il modulo Peltier (Pe), il sensore (Se), il dissipatore (D) ed il vaso (V). In basso: immagine del dispositivo nella configurazione iniziale. Si notano i reservoir (1), i tubi Pharmed per il circuito (2), le pompe (3), le elettrovalvole (4), il sistema di controllo (5), la camera di decellularizzazione (6) ed il waste (7)

Tramite la pompa P1 si aspira una delle tre sostanze in base all'apertura o meno dell'elettrovalvola che si trova sulla linea, quindi si va a riempire la camera. Segue una fase statica in cui il vaso viene lasciato immerso all'interno della sostanza per un lasso di tempo impostato dall'utente tramite codice. Successivamente tramite la pompa P2 la camera viene svuotata all'interno del waste. Nonostante la globale efficienza del sistema descritto sono state riscontrate alcune problematiche da cui si è partiti per lo sviluppo di componenti aggiuntivi:

- *Mancanza di un circuito di ricircolo del fluido:* durante la fase di attività della sostanza il fluido rimane “fermo” all'interno della camera senza rimescolarsi, diminuendo teoricamente l'efficacia del processo (la reale efficacia di tale soluzione verrà valutata nella sezione dedicata ai risultati delle prove sperimentali).
- *Efficacia del sistema di termoregolazione:* i test effettuati sul dispositivo allo stato iniziale riportano un gradiente di temperatura medio di circa 0,004 °C/sec, il che testimonia una bassa efficienza in termini di calore scambiato tra dissipatore e fluido; tale aspetto è probabilmente dovuto al fatto che il dissipatore scambia calore con un mezzo fermo e dunque il coefficiente di scambio termico non è ottimale.
- *Mancanza di un'interfaccia utente:* l'impostazione dei parametri e delle portate necessarie per l'esecuzione del protocollo avviene solo tramite la modifica del codice di programmazione. Ogni volta è dunque necessario eseguire opportune modifiche tramite pc e caricare il programma sul microcontrollore: tale aspetto è fortemente limitante per quanto concerne la semplicità di utilizzo del dispositivo, che rappresenta uno dei requisiti fondamentali tra quelli elencati precedentemente.
- *Dimensioni della camera e afferraggi:* le dimensioni della camera potrebbero essere ulteriormente ridotte in modo tale da ridurre il volume di priming del circuito, mentre gli afferraggi potrebbero essere riprogettati per consentire un aggancio più semplice del tessuto alla camera.

2.3 SOLUZIONI PROGETTUALI

Le soluzioni progettuali proposte si sono concentrate in particolar modo su tre aspetti del dispositivo:

- *Circuito idraulico*
- *Sistema di termoregolazione*
- *Sistema di controllo*

2.3.1 CIRCUITO IDRAULICO

Per quanto riguarda il circuito idraulico si è ritenuto necessario risolvere il problema dell'assenza di una linea che permettesse alla sostanza di ricircolare durante la fase di azione. Garantire una continua perfusione del vaso durante la decellularizzazione ha infatti dimostrato effetti positivi sul processo [43]: la perfusione consente infatti un miglior rimescolamento del fluido tra interno e esterno del vaso. In aggiunta, gli sforzi di taglio generati dal flusso favoriscono teoricamente il risciacquo del vaso e dunque migliorano l'efficacia del processo. La soluzione progettata è mostrata in figura (fig.17)

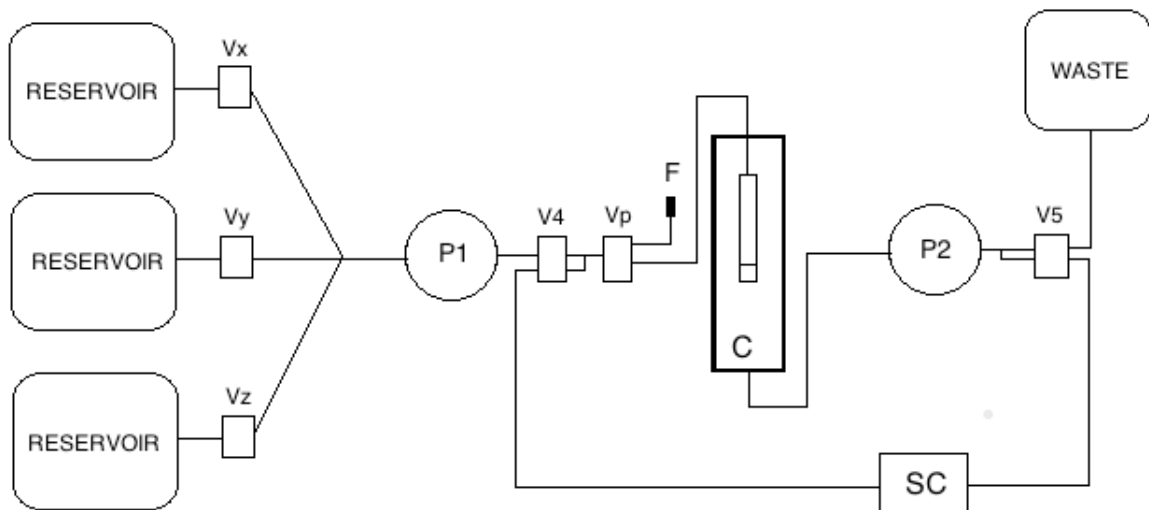


Fig.17: Schema del nuovo circuito idraulico. Si nota il nuovo tratto di ricircolo del fluido, le due nuove valvole (V4 e V5), lo scambiatore di calore (SC), la camera (C) con il vaso e l'afferraggio all'interno, le pompe (P1 e P2).

Il circuito è stato dimensionato stimando le perdite di carico distribuite e concentrate lungo i vari tratti e confrontandoli con la prevalenza delle pompe WPM2: tale valore viene fornito nel datasheet disponibile in appendice ed è compreso tra -0.1 e 0.1 MPa. Sfruttando l'equazione per il calcolo delle perdite di carico distribuite

$$\Delta P d = \frac{\rho L \lambda v^2}{2D} \quad (1)$$

Indicando con ρ la densità del fluido, L la lunghezza del tubo, λ un coefficiente di attrito funzione del tipo di moto, v la velocità del fluido, D il diametro del tubo. I valori utilizzati nell'equazione 1 sono stati i seguenti:

- $\rho = 1000 \text{ Kg/m}^3$: è la densità del mezzo che può essere senza grande approssimazione considerata pari a quello dell'acqua.
- $\lambda = \frac{64}{Re} = \frac{64}{537} = 0.119$: rappresenta il coefficiente d'attrito che dipende dal tipo di moto all'interno del condotto. La tipologia di moto dipende dal valore del numero di Reynolds

$$Re = \frac{vD\rho}{\mu} \quad (2)$$

che a sua volta dipende dalla velocità del fluido, dal diametro del condotto, dalla densità e dalla viscosità (μ) del mezzo. Considerando anche in questo caso i valori dell'acqua per la densità e la viscosità (10^{-3} Pa*s) si è valutata la condizione di moto più critica, ovvero quella a velocità maggiore: tale condizione si ottiene quando la pompa eroga la massima portata, infatti

$$v = \frac{Q}{A} \quad (3)$$

dove Q è appunto la portata della pompa e A è la sezione di passaggio del fluido. Dal datasheet si è risaliti al valore massimo di portata erogabile, pari a circa 40mL/min, e conoscendo il diametro interno del tubo (1.58 mm) si è risaliti al valore della sezione di passaggio A (1.95 mm^2), ottenendo infine tramite

l'equazione 3 una velocità massima pari a 0.34 m/s. Dalla velocità si è infine risaliti con l'equazione 2 al numero di Reynolds, pari a 537, che essendo minore di 2000 indica un moto di tipo laminare. In caso di moto laminare il coefficiente di attrito λ si calcola come $64/Re$, con un valore nel nostro caso pari a 0,119.

- $v = 0.34 \text{ m/s}$: rappresenta la velocità del fluido; per lo stesso discorso fatto precedentemente, si è scelto il valore di velocità massimo corrispondente alla portata massima erogabile dalla pompa
- $D = 1.58 * 10^{-3} \text{ m}$: è il diametro interno dei tubi

Inserendo i valori nell'equazione 1 si ottiene un valore di perdite di carico distribuite di circa 33 mmHg/m. A questo valore vanno aggiunte le perdite di carico concentrate dovute ai connettori presenti lungo il circuito, di diametro 2.5mm, stimate di circa 10 mmHg (considerando le perdite dovute al singolo connettore e il numero di connettori), le perdite di carico associate allo scambiatore di calore, di cui si parlerà successivamente, pari a circa 7 mmHg, e le perdite concentrate dovute all'afferraggio distale, pari a circa 13 mmHg (i valori sono stati calcolati considerando anche in questo caso la condizione fluidodinamica peggiore). All'interno dell'afferraggio, infatti, come visibile dalla sezione mostrata in figura (fig.16), si genera una perdita di carico concentrata dovuta alla presenza di un "raccordo a T" lungo il tratto di scorrimento del fluido (fig.18)

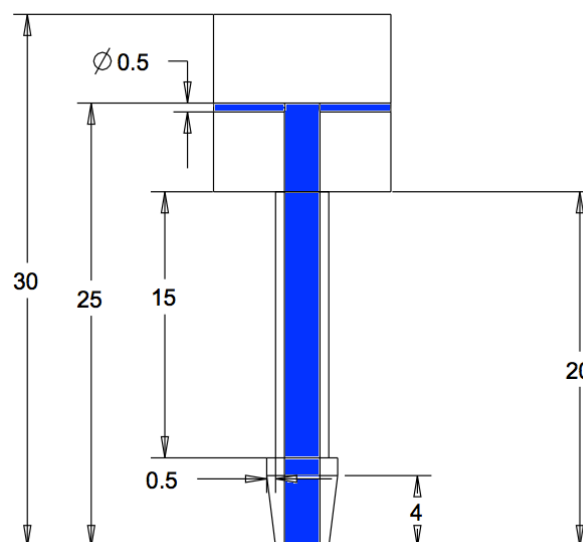


Fig.18: Sezione dell'afferraggio distale più piccolo. In blu è indicata la sezione "a T" all'interno della quale scorre il fluido. Le misure riportate sono in mm

Questo raccordo porta al dimezzamento della portata lungo due tratti di spessore 0.5mm. Dalla formulazione matematica per le perdite concentrate:

$$\Delta P_c = \beta \frac{v^2}{2} \rho \quad (4)$$

dove:

- $\beta = 2$: rappresenta un parametro funzione della geometria dell'ostacolo. Questo valore è ricavato sperimentalmente e vale 2 nel caso di raccordi a T.
- $v = 1.68$ m/s : rappresenta la velocità del fluido nel tratto più critico del raccordo, ovvero nel tratto a sezione minore in cui la velocità è maggiore. Anche in questo caso per il calcolo si è utilizzata l'equazione 3, con la differenza che la portata Q non è più 40mL/min ma 20mL/min, ovvero la metà, mentre la sezione A è pari a 0.196 mm^2 .
- $\rho = 1000 \text{ Kg/m}^3$: densità del mezzo approssimata a quella dell'acqua.

Il sistema costituito da vaso e afferraggio distale può essere dunque visto, nell'equivalente elettrico, come un circuito RC in cui la compliance del vaso rappresenta la capacitance, mentre l'afferraggio rappresenta la resistenza. Questo circuito, unito ad un opportuno pattern ad onda quadra fornito dalla pompa, genera un andamento pulsatile della pressione all'interno del vaso, sollecitandolo radialmente in maniera ciclica. Grazie all'aggiunta del circuito di ricircolo questa sollecitazione avviene per tutto il processo di decellularizzazione e non esclusivamente nella fase di riempimento della camera, come avveniva inizialmente nel dispositivo. Considerando la disposizione reciproca dei componenti del circuito si è ipotizzata una lunghezza totale massima del circuito di circa 3 metri, ottenendo un valore di perdite di carico totali pari a :

$$33,5 \left(\frac{\text{mmHg}}{\text{m}} \right) * 3(\text{m}) + 13 (\text{mmHg}) + 7(\text{mmHg}) + 10 (\text{mmHg}) = 130.5 \text{mmHg}$$

ampiamente contenute nel range di prevalenza delle pompe che, come precedentemente accennato, va da -0.1 a 0.1MPa, ovvero da -750 a 750 mmHg. Una volta dimensionato si è

passati alla realizzazione delle soluzioni progettate: sono state acquistate due valvole 2/3 dall'azienda SIRAI che sono state posizionate all'interno del circuito nei punti rispettivamente indicati dalle valvole V4 e V5 nello schema, mentre per il tratto di ricircolo è stato utilizzato un tratto di tubo PharMed® BPT da 1.58 mm di diametro interno, connesso al resto del circuito tramite connettori barbed.

Il sistema idraulico così realizzato è caratterizzato da cinque fasi controllate in maniera automatizzata :

- **Fase I:** è la fase di riempimento della camera, il fluido viene prelevato da uno dei tre reservoir a seconda di quale tra le valvole 1,2,3 (di tipo 2/2) sia attiva e dunque aperta (nello schema tali valvole sono nominate con il pedice x,y,z in cui la valvola x è quella attiva). La valvola Vp (di tipo 2/3) in questa fase non è attiva e dunque permette il flusso nel tratto che va dal reservoir alla camera. La valvola V4 e V5 sono rispettivamente attiva e inattiva, mentre la pompa P1 è attiva con verso orario e la pompa P2 è inattiva.
- **Fase II:** è la fase di svuotamento della linea di riempimento della camera, durante la quale il fluido viene pompato in senso contrario alla fase precedente e reimpresso nello specifico reservoir di origine. In questa fase cambia il verso di rotazione della pompa P1, che diventa antiorario, e lo stato della valvola Vp, che diventa attiva: in questo modo si isola il tratto connesso alla camera e si svuota il tratto che va dal reservoir alla valvola Vp; lo svuotamento è permesso dalla presenza di un filtro dell'aria connesso alla valvola Vp che viene aperto quando questa passa allo stato attivo. L'apertura del filtro sulla valvola Vp permette l'ingresso dell'aria nella linea di riempimento, garantendone lo svuotamento.
- **Fase III:** è la fase di ricircolo del fluido, in cui la sostanza viene pompata all'interno di un circuito chiuso connesso alla camera. In questa fase viene inattivata la pompa P1 e attivata la P2 con verso orario, mentre tutte le valvole sono disattivate. La disposizione dei tubi sulle valvole è stata scelta in modo tale da mantenerle tutte inattive durante la fase di ricircolo: questa fase infatti è la più lunga del ciclo e, come riportato nel datasheet delle valvole (presente in

appendice), quest'ultime hanno un tempo limite di attivazione di circa cinque minuti, di gran lunga inferiore rispetto alla durata della fase di ricircolo.

- **Fase IV:** è la fase di svuotamento della linea di ricircolo all'interno della camera, necessaria per non mescolare il fluido con quello dei cicli successivi. Questa fase differisce con quella precedente per il verso della pompa P2, non più orario ma antiorario, e per l'attivazione della valvola Vp, che come nella fase 2 permette lo svuotamento della linea; è una fase molto breve in quanto si tratta di trasferire pochi mL di fluido dalla linea di ricircolo alla camera.
- **Fase V:** è la fase di svuotamento della camera nel waste, è l'ultima fase del ciclo e prevede l'attivazione della valvola V5, in modo tale da chiudere il circuito di ricircolo ed aprire quello di svuotamento, e della pompa P2 in senso orario.

Una volta terminata le cinque fasi il ciclo ricomincia, ripetendosi più volte per la stessa sostanza e passando da una sostanza all'altra a seconda delle tempistiche impostate dall'utente secondo un codice di cui si tratterà ampiamente nella sezione dedicata al sistema di controllo. Nella tabella seguente viene riassunto lo stato di ognuno dei componenti del circuito idraulico durante le varie fasi del ciclo.

	FASE I	FASE II	FASE III	FASE IV	FASE V
Vx	Attiva	Attiva	Inattiva	Inattiva	Inattiva
Vy	Inattiva	Inattiva	Inattiva	Inattiva	Inattiva
Vz	Inattiva	Inattiva	Inattiva	Inattiva	Inattiva
V4	Attiva	Attiva	Inattiva	Inattiva	Inattiva
V5	Inattiva	Inattiva	Inattiva	Inattiva	Attiva
Vp	Inattiva	Attiva	Inattiva	Attiva	Inattiva
P1	Attiva (verso orario)	Attiva (verso antiorario)	Inattiva	Inattiva	Inattiva
P2	Inattiva	Inattiva	Attiva (verso orario)	Attiva (verso antiorario)	Attiva (verso orario)

Tab.3: Tabella riassuntiva delle varie fasi in sono indicati i componenti attivi e inattivi

2.3.2 SISTEMA DI TERMOREGOLAZIONE

Il sistema di termoregolazione si basa sul principio del riscaldamento o raffreddamento per contatto tra una fonte di calore e un componente metallico all'interno del quale scorre il fluido da controllare. Esso è essenzialmente costituito da 4 componenti:

- 1 cella di Peltier
- 2 dissipatori
- 1 sensore di temperatura

La *cella di Peltier* costituisce la fonte di calore del sistema: essa è essenzialmente una pompa di calore dall'aspetto di una piastrina sottile (fig.19) costituita da materiali semiconduttori drogati di tipo N e di tipo P, collegati tra loro da una lamella di rame. Se si applica al tipo N una tensione positiva e al tipo P una negativa la lamella superiore si scalda mentre quella inferiore si raffredda. A seconda del verso della corrente che scorre all'interno del dispositivo cambierà il lato freddo e il lato caldo.

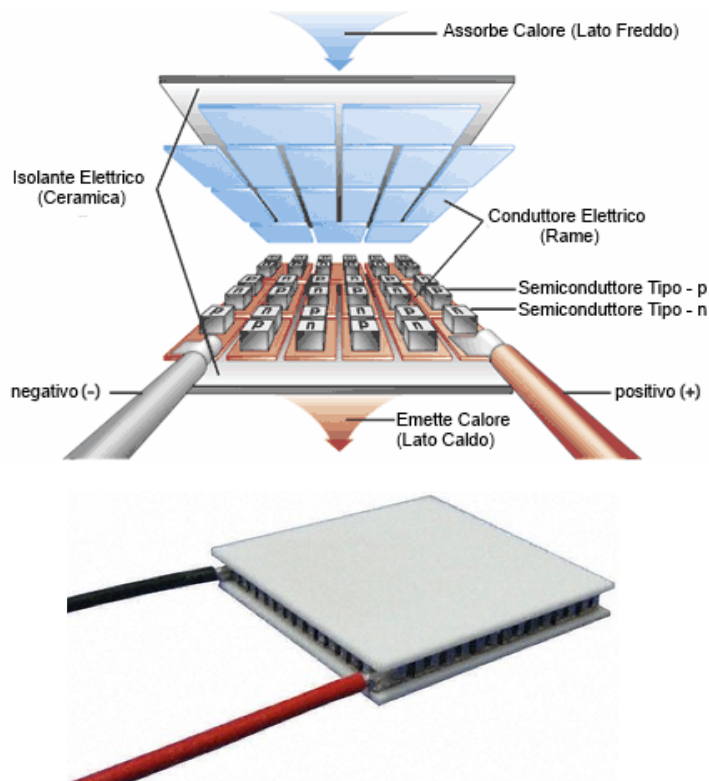


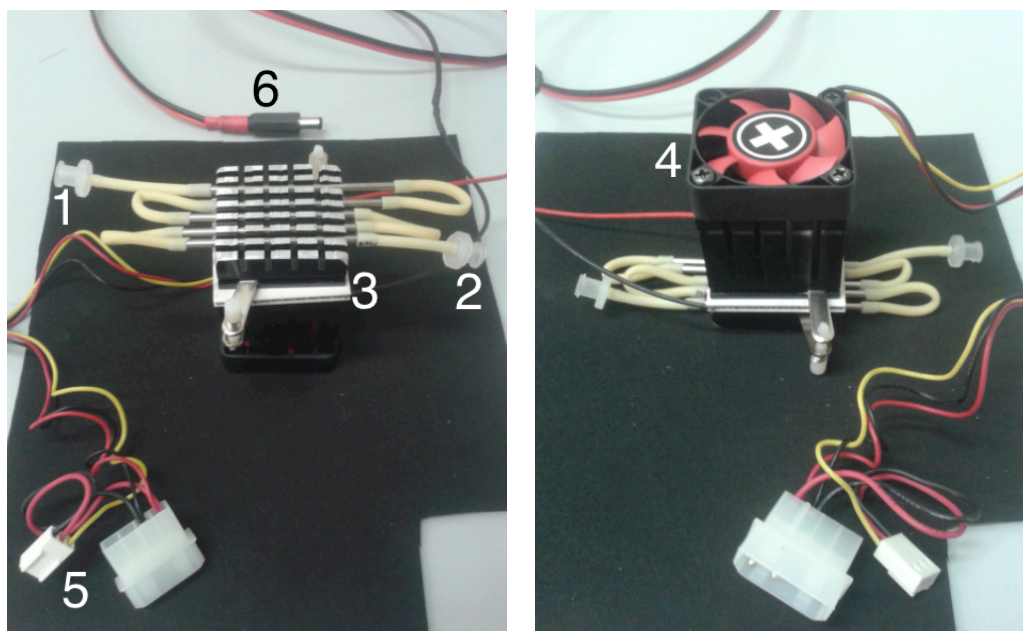
Fig.19: Sopra: immagine illustrativa del funzionamento di una cella di Peltier. Sotto.: dettaglio della cella di Peltier utilizzata nello scambiatore

Tale controllo è effettuato tramite codice e verrà esposto successivamente nella sezione dedicata al software. Per la nostra applicazione è stata acquistata una cella delle dimensioni di 40x40x3.4mm con un assorbimento di 7,3 W. I *dissipatori* acquistati sono dei dissipatori Northbridge per chip della Xilence, completamente in alluminio delle dimensioni di 46x38x38mm (fig.20);



Fig.20: Dissipatore Northbridge della Xilence

uno dei due è stato lavorato in modo tale da alloggiare dei tubi in acciaio aisi 316L, per utilizzare un materiale Medical Grade a contatto con il fluido, di diametro interno di circa 2mm all'interno dei quali scorrerà il fluido da riscaldare o raffreddare. I tubi in acciaio sono stati ottenuti da un unico tubo lungo 30 cm circa suddiviso in 5 parti di 6 cm ciascuna: i raccordi sono stati eseguiti tramite dei tubi Pharmed di 1.58 mm di diametro. Il secondo dissipatore invece non ha subito alcuna lavorazione: è dotato di una ventolina alimentata a 12V e da 0.72W di assorbimento connessa direttamente al sistema di alimentazione tramite 3 pin; l'utilizzo della ventolina garantisce un flusso d'aria costante sulle lamelle del dissipatore migliorando la dissipazione e di conseguenza abbassando la differenza di temperatura tra lato caldo e lato freddo della cella, aumentandone il rendimento. I 3 componenti sono stati quindi assemblati come mostrato in figura (fig.21). La cella di Peltier è inserita tra i due elementi metallici, serrati tra di loro con una clip a molla, in modo tale da consentire il trasferimento del calore per contatto.



Fig,21: A sinistra: parte inferiore dello scambiatore, in cui si nota il dissipatore tagliato per consentire l'inserimento dei tubi in acciaio. A destra: parte superiore, in cui il dissipatore non ha subito lavorazioni. Si notano i connettori barbed (1 e 2) per la connessione con il circuito, la cella di Peltier (3) tra i due componenti metallici, la ventola (4) che incrementa la dissipazione del calore, il connettore a 3 pin (5) per la connessione con il Tank e il connettore (6) per la connessione al dispositivo.

Per quanto riguarda il *sensore di temperatura* è stata mantenuta la soluzione adottata nel precedente lavoro di tesi, ovvero un sensore digitale DS18B20 (Dallas) (fig.22): esso fornisce un valore di temperatura in gradi Celsius in un range che va da -55 a +125 °C con un'accuratezza di +/- 0.5 °C. La connessione con il microprocessore è garantita tramite tre pin, due dei quali utilizzati per l'alimentazione, uno per la lettura del segnale (tale aspetto verrà approfondito nel paragrafo seguente).

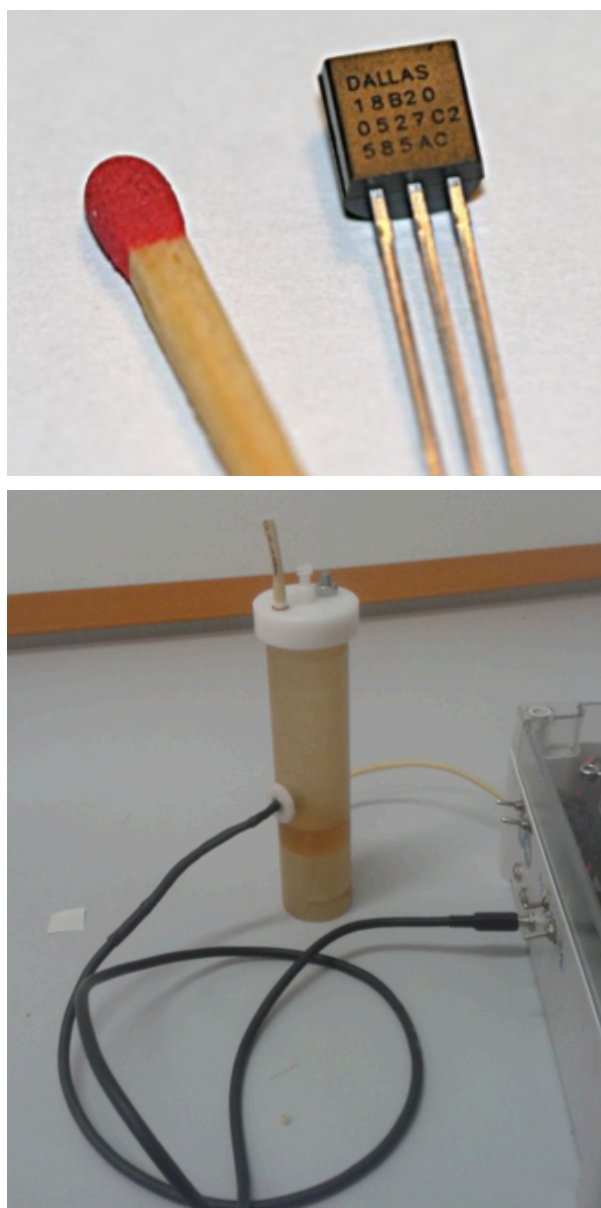


Fig.22: In alto: dettaglio del sensore Dallas. In basso: connessione del sensore con il dispositivo

In generale quindi il sistema di termoregolazione si basa su un controllo a ciclo chiuso che attiva la peltier in modo tale da scaldare o raffreddare la parte a contatto con il fluido circolante a seconda del valore di temperatura rilevato dal sensore: le modalità di controllo saranno specificate nel paragrafo dedicato al software.

2.3.3 SISTEMA DI CONTROLLO

Il sistema di controllo rappresenta il cuore del dispositivo e serve ad alimentare e gestire le pompe, le elettrovalvole ed il sistema di termoregolazione. Nel seguente paragrafo verranno dettagliatamente descritti *hardware* e *software* del dispositivo, con particolare attenzione alle nuove soluzioni proposte nella presente tesi.

2.3.3.1 HARDWARE

Per la progettazione dell'hardware sono stati mantenuti alcuni componenti già presenti nel dispositivo allo stato iniziale mentre ne sono stati aggiunti di nuovi. Tali componenti sono di seguito elencati:

- 1 Arduino Mega 2560
- 1 Motor Shield
- 1 Relay Shield
- 1 Relay Module
- 1 Tank 3A Hp
- 1 LCD Keypad Shield
- 1 Tastierino a 12 tasti
- Sistema di connessione per pompe

L'*Arduino Mega ADK* (fig.23) è una piattaforma programmabile tramite microcontrollore ATmega 2560: può essere programmato tramite pc e costituisce l'elemento fondamentale del sistema di controllo.

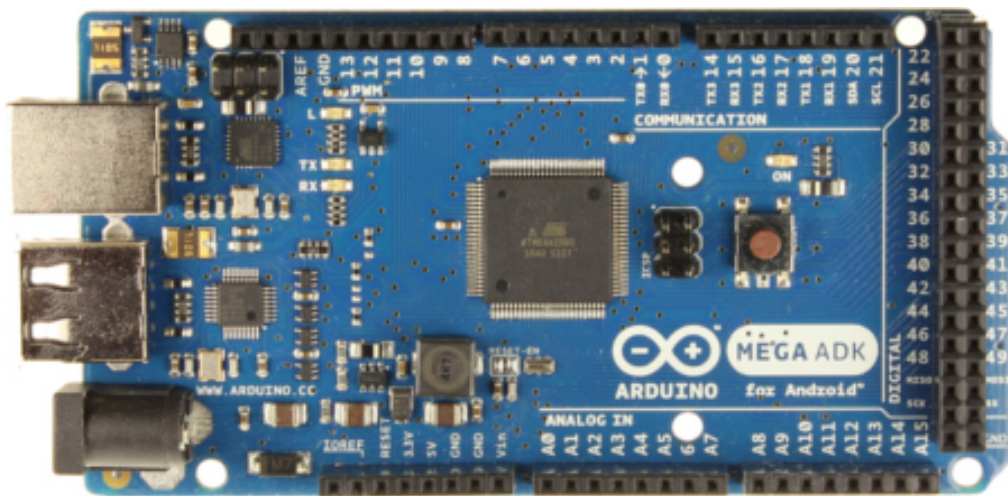


Fig.23: Arduino Mega ADK

Presenta 54 pin che possono essere utilizzati in modalità digitale o in modalità analogica sia per segnali di uscita che di ingresso, con un valore massimo di corrente di circa 40mA. Il segnale di tipo digitale, utilizzabile attraverso le funzioni `digitalWrite()` o `digitalRead()` a seconda che si voglia inviare o leggere tale segnale (gli aspetti di programmazione saranno ripresi nel paragrafo dedicato al software), può essere di tipo LOW, ovvero un segnale logico basso equivalente a 0V, oppure di tipo HIGH, ovvero un segnale logico alto equivalente a 5V. Per alcuni pin del microcontrollore è invece possibile inviare o ricevere segnali di tipo analogico tramite le funzioni `analogWrite()` o `analogRead()`. Tali pin sono caratterizzati da segnali PWM compresi tra 0 e 255: tramite questi valori si va a modificare il duty cycle del segnale ovvero il rapporto tra un valore τ che definisce il tempo in cui il segnale ha un valore logico alto e un valore T che definisce il periodo del segnale

$$d = \frac{\tau}{T} \quad (5)$$

Un valore pari a 0 indica un duty cycle pari a 0 e dunque una durata dell'impulso nulla, mentre un valore pari a 255 indica un duty cycle pari ad 1 e dunque l'impulso avrà durata massima (fig.24).

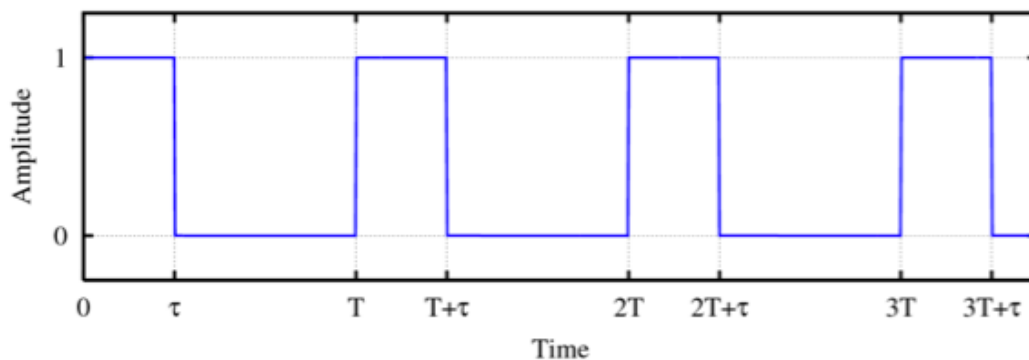


Fig.24: Esempio di duty cycle con modulazione τ su periodo T

Tramite un cavo USB è possibile caricare il codice di programmazione all'interno della memoria del microcontrollore.

Il *Motor shield* (fig.25) è un integrato progettato per pilotare carichi induttivi come relè, solenoidi, motori DC e stepper. Nel nostro caso viene utilizzato per pilotare i due motori DC che controllano la velocità e la direzione di rotazione delle pompe. Il motor shield può essere montato a castello sull'Arduino Mega, rendendo il suo utilizzo molto più comodo in quanto non richiede l'utilizzo di fili per le connessioni.

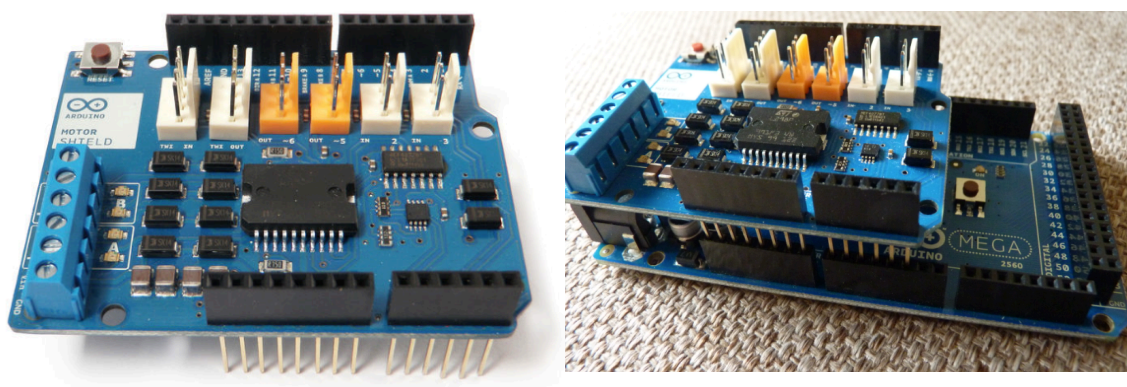


Fig.25: Sinistra: Motor Shield. Destra: Motor shield montato a castello su Arduino Mega ADK (destra)

Il controllo sui motori viene fatto sia in termini di velocità di rotazione della pompa tramite segnale PWM proveniente dai pin 3 e 11 di arduino sia in termini di verso di rotazione tramite segnale digitale proveniente dai pin 13 e 12: in questo modo l'integrato utilizza 4 pin dell'Arduino, due per ogni pompa. La *Relay shield* (fig.26) è un integrato compatibile con Arduino Mega capace di pilotare 4 relè elettromeccanici. Il controllo dei quattro canali avviene tramite 4 segnali digitali provenienti dai pin 5,6,7,8. Un relè può essere visto come un interruttore che, tramite un impulso elettrico, permette di aprire o chiudere un circuito in grado di generare voltaggi e correnti maggiori e tali da pilotare dei carichi che arduino non sarebbe direttamente in grado di gestire. Nel nostro caso i relè sono utilizzati per controllare l'attivazione delle elettrovalvole. Anche per la relay shield è possibile il montaggio a castello, anche se in questo caso è necessaria anche una sorgente esterna da 12V per alimentare correttamente i relè. Questo aspetto è stato sfruttato anche in questo caso per montare la shield a castello sulla motor shield.

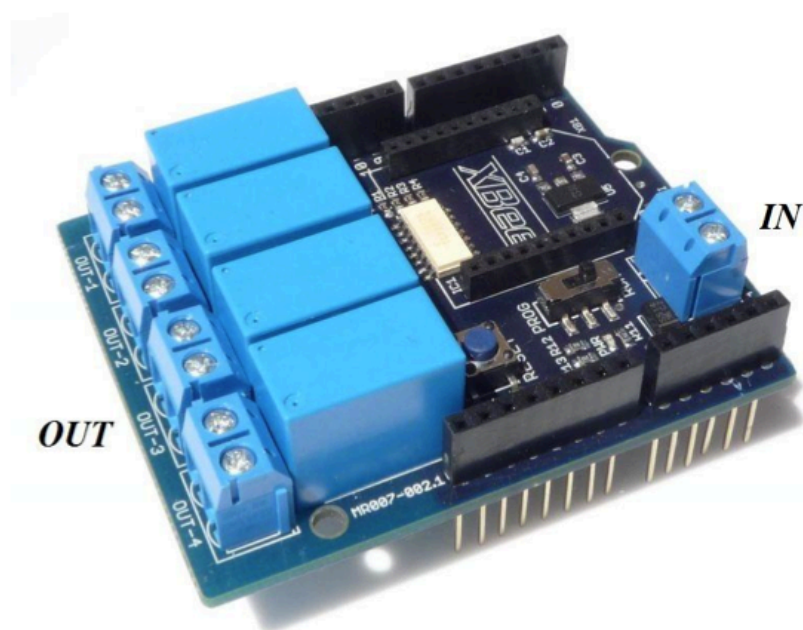


Fig.26: *Relay shield*: sono evidenziate le porte di ingresso (IN) e di uscita (OUT) dell'integrato

Il *relay module* (fig.27) è stato aggiunto in questo lavoro di tesi e presenta delle funzioni analoghe a quelle della relay shield ma non prevede un montaggio a castello: è costituito da quattro relè di cui ne sono stati utilizzati solo due per controllare le due nuove elettrovalvole aggiunte al dispositivo. Il controllo delle due valvole è ottenuto anche in

questo caso tramite due segnali digitali provenienti dai pin 31 e 35 dell'arduino. Anche per questa scheda è prevista una sorgente esterna di 12V per alimentare i relè.

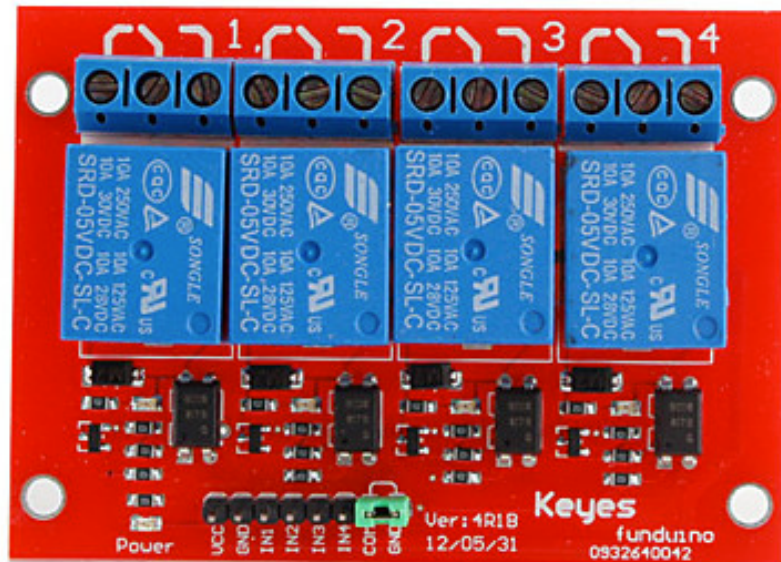


Fig.27: Relay Module a quattro canali alimentato a 12 V

Il *ponte H LMD18200* (fig.28), già nominato precedentemente, è stato mantenuto dal precedente dispositivo: è un integrato montato su scheda Tank 3A Hp in grado di fornire una corrente di 3 Ampere e dunque in grado di pilotare carichi ad elevato assorbimento. Nel nostro caso, questa scheda alimenta e gestisce la cella di Peltier, prendendo in ingresso dall'alimentatore una tensione di 12V. Tramite i pin 9 e 10 di Arduino si controllano rispettivamente la direzione della corrente all'interno della cella e la modulazione in PWM del segnale in ingresso.

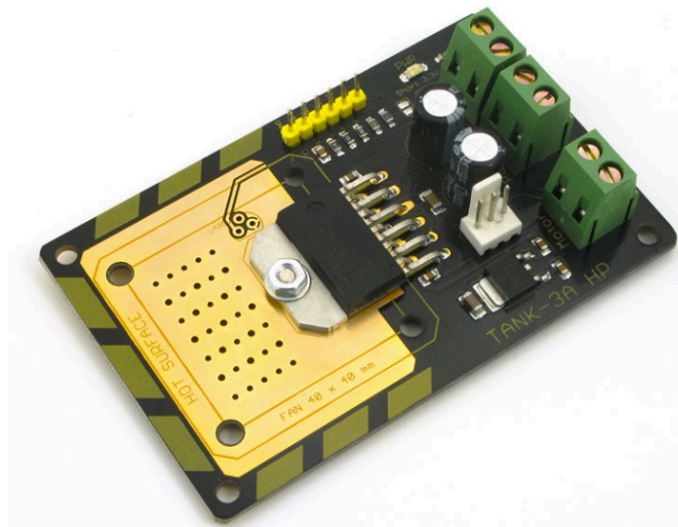


Fig.28: Ponte H LMD18200 montato su Tank 3A Hp

L'*LCD keypad shield* (fig.29) costituisce il cuore dell'interfaccia utente, fornisce infatti a quest'ultimo un output di tipo grafico grazie al quale è possibile impostare e verificare su display i dati inseriti. E' alimentato direttamente da Arduino tramite uno dei pin che forniscono una tensione di 5V. Presenta inoltre da un tastierino a 6 tasti(reset, sinistra, freccia su, freccia giù, destra, select) tramite i quali è possibile muoversi all'interno di un menù che viene creato tramite codice. Le connessioni coinvolgono 8 pin di arduino, di cui 7 digitali e nell'ordine i pin 22,26,30,34,38,42,46, e uno analogico, il pin A8, che serve a verificare quale pulsante tra quelli del tastierino è stato premuto in base al valore analogico letto: ciò rappresenta una soluzione molto pratica in quanto in questo modo viene occupato un unico pin per tutti i tasti, con un risparmio notevole in termini di connessioni. Come nel caso del relay module, per questo integrato non è stato previsto un montaggio a castello e dunque i collegamenti sono stati realizzati tramite dei jumpers, ovvero dei fili flessibili.

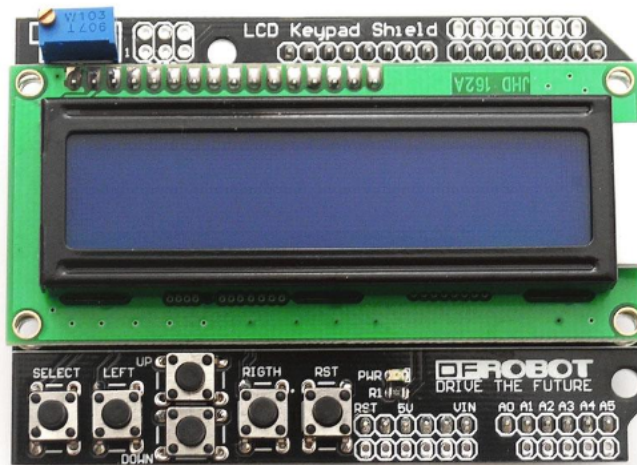


Fig.29: LCD Keypad shield

Il *Tastierino a 12 tasti* (fig.30) è stato aggiunto per rendere ancor più semplice l'interfaccia con il dispositivo: in questo modo l'utente può digitare i valori dei vari parametri visibili dal menù nell' LCD, aspetto che verrà ampiamente descritto nel paragrafo seguente. Il tastierino è connesso a 7 pin di arduino, rispettivamente il 25,29,33,37,41,45,49.



Fig.30: Tastierino a 12 tasti con connettore a 7 pin per l'interfaccia con Arduino

Il sistema di connessione per pompe permette di adattare pompe differenti alle WPM2 al dispositivo tramite dei connettori a due poli. Tramite uno switch si può scegliere quali pompe attivare: questa soluzione ha migliorato molto la versatilità del dispositivo in quanto ha reso possibile l'adattamento di pompe diverse da quelle già assemblate nel sistema di controllo rendendo dunque il sistema utilizzabile anche per protocolli e tessuti differenti, in quanto a seconda delle portate richieste per la perfusione possono essere adattate pompe che presentano un punto di funzionamento ottimale in quel dato range. Nel nostro caso, come verrà approfondito nel capitolo relativo alle prove sperimentali, tale accorgimento è stato sfruttato per adattare delle pompe WPX1 (fig.31), caratterizzate da un range di portata molto ridotto rispetto a quello delle WPM2, per la decellularizzazione di un rene di ratto che necessitava portate di perfusione di circa 1-2 mL/min e che le pompe WPM2 non sono in grado di garantire.

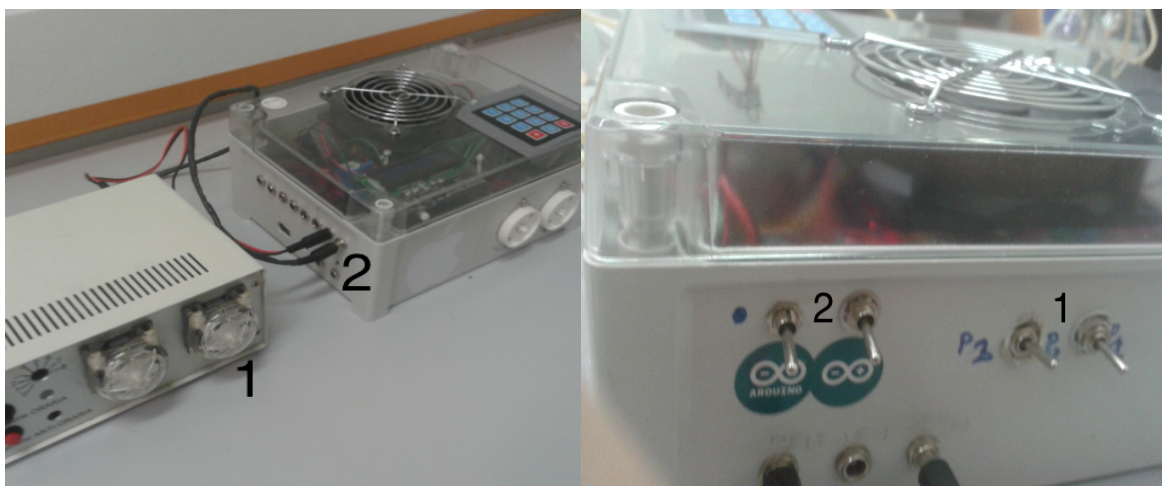


Fig.31: Sinistra: pompe WPX1 (1) connesse dal case al dispositivo (2) tramite cavo. A destra: switch per l'attivazione delle pompe (1) Spostando la levetta a sinistra si attiva la pompa P2, nel nostro caso la pompa che verrà adattata al sistema, spostandola a destra si attivano invece le pompe WPM2, già contenute nel case del sistema di controllo. Nell'immagine sono visibili anche gli switch per l'accensione del dispositivo (2).

Completano lo schema dei collegamenti i pin 0,1,2 e 4: i pin 0 e 1 ricevono dal motor shield un valore che tiene conto della corrente assorbita dalle pompe ma non sono stati tenuti in considerazione per la nostra applicazione. Stesso discorso per il pin 4, che riceve

invece informazioni sulla temperatura raggiunta dal Tank: sfruttando questo segnale sarebbe possibile impostare opportuni allarmi all'operatore o controllare l'attivazione di un'eventuale ventola per migliorare la dissipazione del calore generato dall'integrato. Il pin 2, infine, come accennato nel paragrafo precedente riceve in input il valore di temperatura proveniente dal sensore. Lo schema generale dell'hardware con i vari collegamenti è illustrato nella figura seguente (fig.32). Nel paragrafo seguente ci si occuperà del controllo e della gestione dei vari componenti dal punto di vista informatico.



Fig.32: Schema dell'hardware in cui vengono mostrati i vari collegamenti e il numero di connessioni coinvolte

2.3.3.2 SOFTWARE

Il microcontrollore Arduino Mega 2560 può essere programmato tramite un codice formalmente ispirato al linguaggio C. Tramite pc è possibile creare quello che viene definito uno “sketch”, ovvero un file all’interno del quale vengono inserite tutte le impostazioni e tutti i comandi che il microcontrollore deve eseguire una volta attivato. In questo paragrafo verranno descritti i blocchi principali presenti nello sketch, interamente disponibile nell’Appendice. La struttura portante dell’intero codice è costituita da due funzioni principali, all’interno delle quali vengono richiamate ulteriori funzioni che svolgono compiti più specifici:

- `void impostazioni()`
- `void avvio()`

Una volta acceso il dispositivo, l’utente legge su display un menu contenente rispettivamente le voci *impostazioni* e *avvio* (fig.33): utilizzando la pulsantiera presente sull’LCD shield può muoversi all’interno di questo menu accedendo ad una delle due voci e attivando in questo modo la specifica funzione.



Fig. 33: Immagine illustrativa del menu principale: tramite i tasti “su” e “giù” è possibile muoversi all’interno del menù e selezionare tramite il tasto “select” la specifica voce

Accedendo alle *impostazioni* è possibile scorrere tra diversi parametri e inserire il valore corrispondente tramite il tastierino a 12 tasti. In particolare l'utente può impostare:

-Tempo totale della sostanza: tramite questo valore l'utente decide per quanto tempo una determinata sostanza dovrà essere utilizzata. All'interno di questo intervallo di tempo la stessa sostanza può seguire più di un ciclo di riempimento-svuotamento.

-Tempo di azione della sostanza: tramite questo valore l'utente imposta la durata della fase di ricircolo della sostanza, ovvero il tempo in cui avviene effettivamente il contatto tra fluido decellularizzante e tessuto (Fase III del ciclo)

-Intervallo di ricircolo: tramite questo parametro l'utente stabilisce la durata della fase in cui la pompa nella fase di ricircolo è alternativamente attiva o spenta; in questo modo si salvaguarda la pompa facendola lavorare per metà del tempo (importante in quanto in alcuni casi la fase di ricircolo può durare fino a 12 ore e un'attività continuativa della pompa potrebbe portarla a surriscaldamento e dunque a danneggiamento), mantenendo comunque i benefici derivanti dal rimescolamento del fluido. Questo parametro è stato aggiunto anche per poter sfruttare durante il processo benefici derivanti sia da un tipo di decellularizzazione statica, in cui le sostanze hanno il tempo per diffondere nel tessuto ed agire sulle cellule, sia dalla decellularizzazione dinamica, durante la quale avviene il rimescolamento del fluido circolante e il condizionamento del vaso.

-Tempo di riempimento della camera: è il tempo durante il quale avviene il riempimento della camera (Fase I)

-Tempo di svuotamento linea di riempimento della camera: è il tempo durante il quale viene svuotata la linea di riempimento, ovvero la linea che connette i reservoir alla camera. (Fase II)

-Tempo di svuotamento della linea di ricircolo: è la durata di svuotamento della linea di ricircolo nella camera (Fase IV).

-Tempo di svuotamento della camera: è la durata dell'ultima fase del ciclo (Fase V), in cui la camera viene svuotata all'interno del waste.

-Portata ricircolo: questo valore regola la portata della pompa attiva durante la fase di ricircolo.

-Portata riempimento: questo valore regola la portata della pompa attiva durante la fase di riempimento della camera.

-Tipo di pompa: questo parametro è stato inserito per dare la possibilità all'utente di utilizzare con questo dispositivo differenti tipologie di pompe, che presentano curve caratteristiche differenti. A seconda del tipo di pompa impostata il codice converte il valore di portata inserito (in mL/min) nel valore corrispondente in PWM tramite la retta di taratura specifica per ciascuna pompa, di cui si tratterà nel paragrafo dedicato alla calibrazione delle pompe.

-Temperatura della sostanza: l'utente può impostare la temperatura alla quale vorrebbe mantenere la sostanza di interesse, generando una variabile che viene utilizzate in fase di controllo della cella di peltier.

L'impostazione di una variabile avviene secondo il seguente codice:

```
1  switch (SetModeLevel){
2  case 0:
3  char key=kpd.getkey();
4  switch(key)
5  {
6  case '0': case '1': case '2': case '3': case '4':
7  case '5': case '6': case '7': case '8': case '9':
8  num1=num1*10 + (key-'0');
9  sprintf( buffer, %s %lu, secondario [(setModeLevel+1)],
num1);
10 break;
11 case '#':
12 num1=0;
13 sprintf(buffer, %s %lu, secondario[(setModeLevel+1)],
num1);
14 break;
15 case 2:
16 .....
17 num2=num2*10+(key-'0');
```

Ad ogni “setModeLevel” corrisponde nel menu impostazioni una delle variabili sopra elencate. Il valore della variabile setModeLevel, che aumenta o diminuisce a seconda che l’utente preme il pulsante “freccia su” o “freccia giù”, indica quale parametro l’utente sta visualizzando sull’LCD e dunque il parametro che verrà impostato. Ad ogni setModeLevel (riga1-2) corrisponde una funzione(riga 3-15) tramite la quale, digitando il numero desiderato, si associa tale numero alla variabile corrispondente a quel setModeLevel. Il tasto “#” permette di annullare il valore della variabile nel caso in cui ci sia stato un errore di digitazione (riga 11-12). L’utente visualizza sempre su display la variabile da impostare e il valore appena impostato. Una volta impostati tutti i parametri, premendo il tasto select l’utente può tornare alla schermata principale e scegliere nuovamente una tra le tre funzioni del menù.

Tramite la seconda voce, ovvero *avvio()*, si fa partire la decellularizzazione secondo le tempistiche e le portate impostate precedentemente. E’ la più complessa in quanto contiene funzioni che a loro volta contengono ulteriori funzioni più specifiche, in particolare:

- void setPump();
- void Ricirc();
- void Temperatura();

Nel momento in cui l’utente seleziona la voce avvio il programma inizializza vari parametri, in particolare il numero di processi delle varie sostanze utilizzate nel protocollo, contenuto nella variabile *nprocessisost*, e il numero di processi totali *nprocessitotali*, ottenuto dalla somma dei processi delle singole sostanze. Per processo si intende un ciclo completo delle cinque fasi di cui si è parlato precedentemente; il numero di processi della singola sostanza è ottenuto dividendo il tempo totale di azione della sostanza stessa per la somma delle durate delle singole fasi del processo:

$$nprocessisostanza = \frac{Tempototalesostanza}{Temporcl + temposl + tempoa + temposrc + tempsc}$$

Dove *temporcl* rappresenta la durata della fase I, *temposl* la durata della fase II, *tempoa* la fase III, *temposlrc* la fase IV e *temposc* la fase V. E' dunque l'utente ad impostare indirettamente questo valore tramite l'impostazione dei vari intervalli temporali. Per ogni sostanza è possibile ottenere lo specifico numero di processi, mentre il valore totale dei processi viene allocato alla variabile *nprocessitotali*. Una volta ottenute le variabili di interesse si accede alla parte operativa del codice:

```

1  while (processi<nprocessitotali+1) {
2      if (processi<nprocessisost1+1) {
3          lcd.setCursor(0,0);
4          lcd.print("Processo:");
5          lcd.setCursor(11,0);
6          lcd.print(processi);
7          lcd.setCursor(0,1);
8          lcd.print("Sostanza: 1");
9          setPump(1,tempoazionesostanza1);
10         processi=processi+1;}
11     if (processi>nprocessisost1 && 12
12         processi<nprocessisost1+nprocessisost2) {
13         ....
14         setPump(2,tempoazionesostanza2);
15         processi=processi+1;}
16     if (processi>nprocessisost1+nprocessisost2) {
17         ....
18         setPump(3,tempoazionesostanza3);
19         processi=processi+1;}
20     }
```

Nel nostro caso, dato che le sostanze utilizzate sono tre, si ottengono tre variabili, *nprocessisost1*, *nprocessisost2*, *nprocessisost3*, i cui valori dipendono dalle tempistiche impostate dall'utente: per ogni sostanza viene impostato un tempo totale e un tempo di azione (*tempoa*), mentre i restanti intervalli temporali (*Temporcl*, *temposl*,*temposlrc*,

temposc), sono comuni a tutte e tre le sostanze. La variabile *processi* viene incrementata all'interno di un ciclo while (riga 1) e stampata su schermo LCD in modo che l'utente possa vedere lo stato di avanzamento del processo (riga 3-8); a seconda del suo valore, viene attivata la funzione setPump per la specifica sostanza: la funzione setPump() presenta infatti la seguente sintassi:

```
void setPump (int nomeSostanza, unsigned long tempo);
```

Tale funzione prende quindi in ingresso due parametri che si modificheranno a seconda della sostanza prevista. La variabile *nomeSostanza* può assumere infatti valore pari a 1,2 o 3, e a seconda di questo valore si attiverà e dunque si aprirà la valvola per permettere il prelievo della specifica sostanza durante la fase I. La variabile *tempo* stabilisce invece la durata della fase di ricircolo, e dunque, come si può notare nel codice (righe 3,6,9), tale valore sarà determinato dal parametro tempoazioniesostanza, che come abbiamo visto viene impostato dall'utente. All'interno della funzione setPump sono contenute tutte le istruzioni che il programma deve svolgere secondo i parametri decisi dall'operatore nella funzione impostazioni. La fase di ricircolo è gestita tramite la funzione Ricirc() che prende in ingresso i dati relativi al tempo di azione della sostanza e all'intervallo di tempo in cui la pompa rimane alternativamente spenta o accesa:

```
1 void Ricirc (unsigned long tempo, int inte) {
2     unsigned long cseccr=0;
3     int k=0;
4     int a=1;
6     int intervalloTemp=0;
7     while (cseccr<(tempo)) {
8         if (cseccr<(a*inte)) {
9             if(cseccr==intervalloTemp*20){temperatura();
10                intervalloTemp=intervalloTemp+1;
11                }
12         digitalWrite (ev5,LOW);
```

```

13         digitalWrite (ev6,LOW);
14         digitalWrite (evp,LOW);
15         digitalWrite (evd,LOW);
16         digitalWrite (evu,LOW);
17         digitalWrite (evt,LOW);
18         analogWrite  (pwmb,valore1);
19         digitalWrite (dirb,HIGH);
20         analogWrite  (pwma,0);
21         digitalWrite (dira,LOW);
22         delay (1000);
23         csecr=csecr+1;
24     }
25     else if (csecr==(a*inte)) {
26
27         for (k=(a*inte);k<((a+1)*inte);k++){
28             if(csecr==intervallotemp*20) {temperatura();
29             intervallotemp=intervallotemp+1;
30             }
31             analogWrite  (pwmb,0);
32             analogWrite  (pwma,0);
33             delay (1000);
34         }
35         csecr=k;
36         a=a+2;
37
38     }
39 }
40 }

```

In questa fase, come detto in precedenza, è attiva solamente una delle due pompe (riga 15) con una portata definita dalla variabile *valore1*: tale variabile è ottenuta dalla conversione, tramite retta di taratura, del parametro *portata ricircolo*, in mL/min, in un valore in PWM.

Tale conversione avviene all'interno della funzione impostazioni () a seconda del tipo di pompa che l'utente ha impostato:

```
1  if (tipodipompa==1) {
2  valore1=((portataricircolo*3.9922) + 68.522);
3  valore2=((portatariempimentocamera*3.9922) + 68.522);}
4  else if (tipodipompa==2) {
5  valore1= 36.005*pow (e, 0.7341*portataricircolo) ;
6  valore2= 36.005*pow (e, 0.7341*portatariempimentocamera);
7  }
```

se l'utente sceglie il tipo di pompa "1" (riga 1) i valori in pwm saranno calcolati in base alla curva di taratura ottenuta da pompe di tipo WPM2, mentre scegliendo la pompa di tipo "2" i valori saranno calcolati in base alla curva di taratura delle pompe WPX1: la funzione pow (a,b) (riga 5-6) permette di calcolare una potenza di base a ed esponente b. La necessità di adattare al dispositivo due tipologie di pompe differenti è dovuta alle differenti tipologie di prove effettuate, di cui si parlerà ampiamente nel capitolo 3. La durata della fase di attività o inattività della pompa all'interno del ricircolo è regolata dalla variabile *inte*, che viene associata al parametro "intervallo ricircolo" impostato dall'utente: questo valore suddivide il ricircolo in due fasi distinte, una in cui la pompa è attiva (riga 9-24) e una in cui è inattiva (riga 25-38). All'interno di Ricirc(), infine, viene richiamata la funzione *temperatura()*: essa acquisisce ogni 20 secondi (riga 6) dal sensore un valore di temperatura in gradi Celsius e, in base a tale valore, attiva la cella di Peltier scaldando o raffreddando la parte a contatto con il fluido:

```
1  void temperatura(int t_inserita) {
2  tmin=t_inserita-0.2;
3  tmax=t_inserita+0.2;
4  .....
5  if (tmin<tmisurata<tmax) {
6      analogWrite (peltier,0); }
7  if (tmisurata<tmin) {
8      digitalWrite (direzione,HIGH);
```

```

9         analogWrite(peltier,90); }
10    if (tmisurata>tmax) {
11        digitalWrite(direzione,LOW);
12        analogWrite(peltier,90);
13            }
14            }

```

dopo aver acquisito il dato da sensore (non si riporta il codice che è comunque visibile nell'appendice) la funzione confronta il valore ottenuto con le variabili t_{min} e t_{max} , ottenuti rispettivamente sottraendo e sommando 0.2 al parametro $t_{inserita}$ (riga 2-3) che corrisponde al dato impostato dall'utente nelle impostazioni. In questo modo si genera una fascia di tolleranza che evita, in caso di oscillazione del segnale, continue attivazioni o spegnimenti della cella (tale fascia può essere chiaramente estesa o ridotta a seconda del valore che si aggiunge o si sottrae alla variabile $t_{inserita}$)(fig.34)

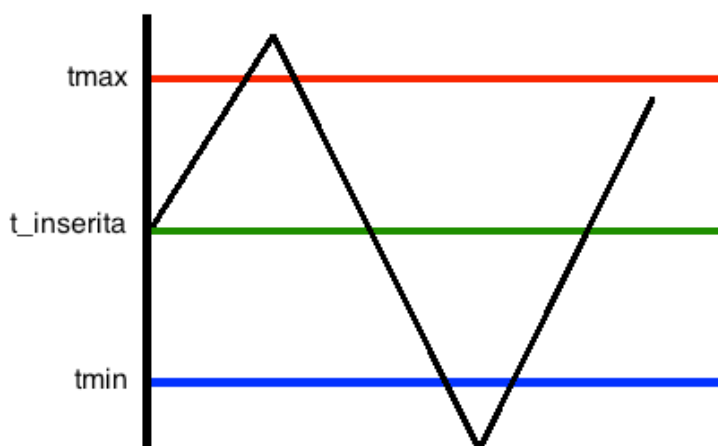


Fig.34: Esempio di controllo a due soglie in cui $t_{max}=t_{inserita}+0.2$, $t_{min}=t_{inserita}-0.2$

Se il valore ottenuto dal sensore ($tmisurata$) si trova all'interno del range impostato la peltier non viene attivata (riga 3-4), se invece si trova al di sotto di questo range vuol dire che il fluido è troppo freddo e dunque va riscaldato (riga 6-7), mentre se si trova al di sopra vuol dire che il fluido è troppo caldo e va raffreddato (riga 9-10); attraverso il controllo digitale della variabile "direzione" si imposta il verso della corrente all'interno della peltier e conseguentemente il lato caldo e il lato freddo della cella. Attraverso la variabile

“peltier” si controlla invece, in PWM, la quantità di corrente che fluisce all’interno della cella e dunque la potenza termica ceduta o assorbita dallo scambiatore. La funzione contiene anche dei comandi qui non riportati ma disponibili in appendice che stampano su LCD il valore di temperatura aggiornato ogni volta che la funzione viene richiamata (nel nostro caso ogni 20 secondi). Una volta verificata la corretta compilazione del codice descritto, si è proceduto con la valutazione del suo effettivo funzionamento tramite una serie di prove su banco di cui si tratterà in maniera specifica nel capitolo successivo.

CAPITOLO III:
PROVE SPERIMENTALI E
RISULTATI

Nel seguente capitolo verranno descritte le prove sperimentali effettuate con il dispositivo di cui si è trattato nel capitolo precedente: in particolare verranno introdotte le tipologie di prove effettuate, il set-up sperimentale adottato, le tipologie di analisi effettuate e i risultati ottenuti tramite tali tecniche di analisi. Le prove sono state utili per valutare l'efficacia del dispositivo e i vantaggi apportati dalle modifiche realizzate.

3.1 PROVE SU BANCO

Prima di utilizzare il dispositivo nelle prove di decellularizzazione sono state svolte delle attività preliminari su banco al fine di valutare l'effettivo funzionamento del sistema idraulico e del sistema di termoregolazione.

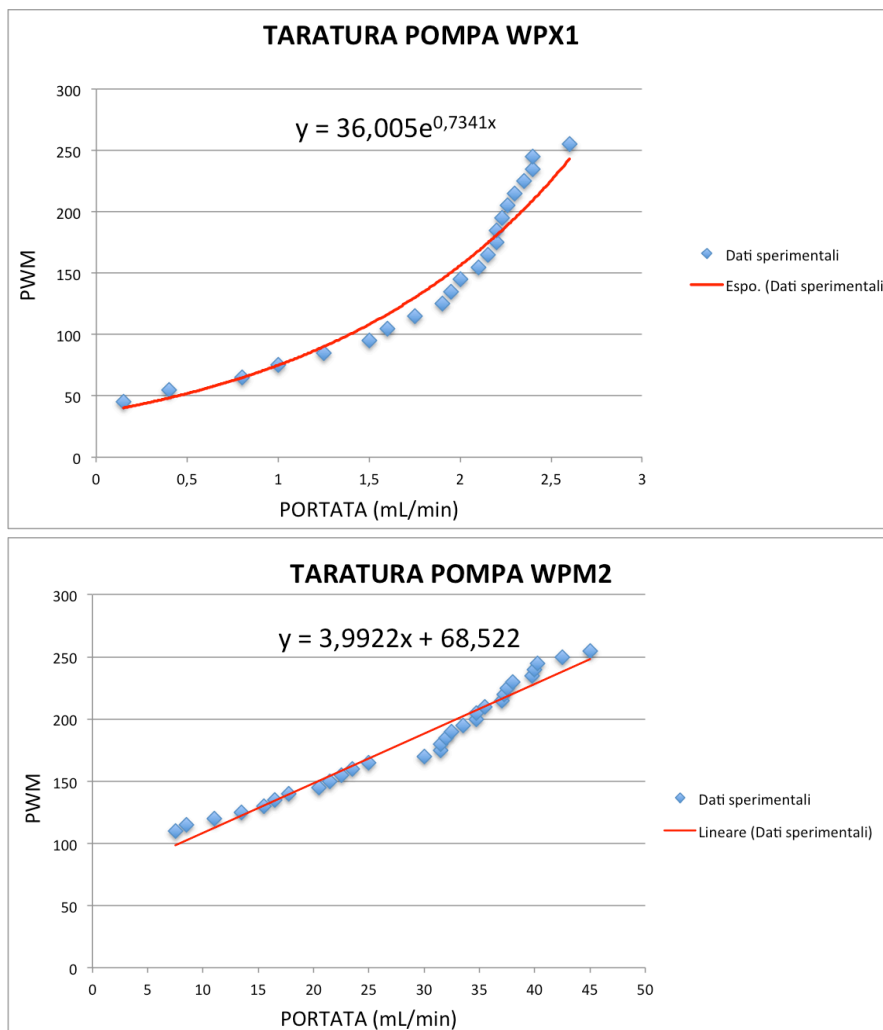
3.1.1 CALIBRAZIONE DELLE POMPE

La *calibrazione delle pompe* è stata necessaria per valutare la portata media di questi componenti. Conoscendo le portate medie garantite dalle pompe è stato possibile valutare la durata ottimale di ciascuna delle cinque fasi del processo. I parametri presi in considerazione sono riassunti nella tabella seguente:

Fase	Parametro/i considerato/i	Parametro/i influenzato/i
I	Portata riempimento; Tempo riempimento	Volume di riempimento camera
II	Lunghezza della linea	Durata fase di svuotamento linea
III	Portata ricircolo	Sollecitazioni sul vaso
IV	Lunghezza della linea	Durata fase di svuotamento linea
V	Tempo svuotamento	Volume aspirato dalla camera

Tab.4: Schema dei parametri presi in considerazione per la valutazione delle corrette tempistiche e portate del processo

La taratura delle pompe ha consentito di individuare quindi una retta di calibrazione necessaria per convertire il parametro impostato dall'utente in mL/min nel corrispettivo valore in PWM. Utilizzando il software di compilazione è stato creato un programma che consentisse di prelevare del volume di acqua distillata da un reservoir e pomparlo all'interno di una Falcon tarata da 50mL: sono stati effettuati cicli di riempimento della durata di un minuto aumentando di volta in volta il valore in PWM in ingresso alla pompa; per ogni valore di PWM sono stati eseguite tre prove e i volumi ottenuti sono stati mediati per ridurre l'errore. Sono state calibrate due tipologie di pompe differenti, la WPM2 e la WPX1: questo perché, come vedremo nel corso del presente capitolo, le due tipologie di pompe serviranno ad eseguire prove su differenti tessuti.



Graf.1: Sopra: Curva di taratura pompe WPX1 (in rosso). Sotto: curva taratura pompe WPM2. Nel grafico è mostrata anche l'equazione della retta di taratura, utilizzata nel codice per l'impostazione delle portate.

La curva ottenuta dalle misurazioni (in blu) è stata interpolata con delle funzioni note (in rosso); per le WPM2 è stato osservato un andamento globalmente lineare, dunque tramite regressione si è ottenuta la retta di equazione:

$$y = 3.992x + 68.522 \quad (5)$$

Per quanto riguarda le WPX1, invece, dato l'andamento più complesso e dato il piccolo range operativo di portata (da 0.15 a 2.6mL/min), si è ritenuta necessaria una migliore approssimazione tramite esponenziale di equazione:

$$y = 36.005 e^{0.7341x} \quad (6)$$

3.1.2 VALIDAZIONE DEL CIRCUITO IDRAULICO E DEL SISTEMA DI TERMOREGOLAZIONE

In questa fase di prova la camera di decellularizzazione è stata collegata al circuito idraulico di ricambio dei reagenti e al sistema di termoregolazione (fig.35).

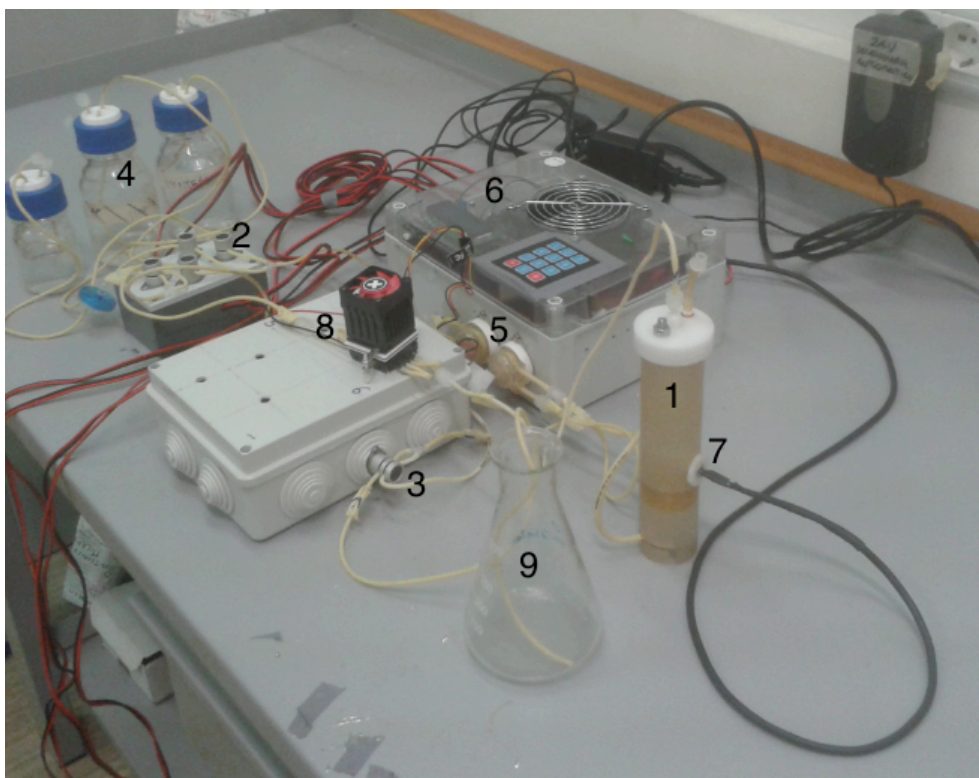


Fig.35: Dispositivo montato su banco. Sono visibili la camera di decellularizzazione (1), le valvole (2,3), i reservoir (4), le pompe (5), il sistema di controllo (6), il sistema di termoregolazione costituito da sensore (7) e scambiatore di calore (8), ed infine il waste (9)

Il programma precedentemente descritto è stato caricato sul microcontrollore e sono state eseguite varie prove facendo circolare dell'acqua distillata per confermare il compimento delle varie fasi del ciclo, il funzionamento delle valvole, i ricambi dei reagenti e l'effettiva termoregolazione del fluido. E' stato verificato il corretto funzionamento del codice valutando la durata delle tempistiche, la portata delle pompe e la temperatura raggiunta dal fluido. Per la verifica delle tempistiche si è utilizzato un timer per valutare la durata delle fasi del processo, mentre per la portata delle pompe sono stati valutati volumi e tempi di riempimento. Per la validazione del sistema di termoregolazione, infine, tramite la

schermata LCD è stato possibile monitorare l'andamento della temperatura misurata dal sensore all'interno della camera e il gradiente di temperatura che il sistema è in grado di garantire. Sono state eseguite più simulazioni della durata di 4 giorni impostando le tempistiche di una prova di decellularizzazione. I valori dei parametri sono mostrati nella tabella seguente:

	Acqua milliQ	Sodio Deossicolato	Siero Fetale Bovino
Tempo			
Totale	86,400 s (24 h)	86,400 s (24 h)	172,800 s (48 h)
Azione	10,460 s (3 h)	42,860 s (12 h)	21,260 s (6 h)
Riempimento camera	120 s	120 s	120 s
Svuotamento linea riempimento	30 s	30 s	30 s
Portata			
Riempimento camera	35 mL/min	35 mL/min	35 mL/min
Ricircolo	30 mL/min	30 mL/min	30 mL/min
Temperatura	37 °C	25 °C	20 °C

Tab.5: Parametri impostati nella simulazione della prova di decellularizzazione

Il test ha avuto esito positivo: il dispositivo ha svolto tutte le fasi implementate nel codice e i cambi delle sostanze, il tutto con le tempistiche impostate tramite interfaccia. I risultati di questa prova hanno permesso di validare l'effettivo funzionamento del sistema di inserimento dei dati da parte dell'utente: l'interfaccia si è dimostrata semplice e intuitiva e non ha richiesto il collegamento del dispositivo con il pc tramite cavo usb. Non è stata riscontrata alcuna perdita o ostruzione nel circuito e le portate impostate si sono rivelate corrette. Il sistema di termoregolazione si è dimostrato molto efficace nel range di temperatura impostato, con un gradiente di temperatura medio di circa 0.02 °C/sec e dunque un'efficienza maggiore rispetto alla soluzione iniziale (che garantiva un valore di 0.004°C/sec). Una volta raggiunta la temperatura impostata si è osservata un'oscillazione

tra $i \pm 0.2$ °C: nel codice, come descritto precedentemente, è stato infatti implementato un controllo a due soglie per evitare continue attivazioni e spegnimenti della cella di Peltier.

3.2 PROVE IN LABORATORIO

In questo paragrafo verranno descritte le prove di decellularizzazione effettuate utilizzando il dispositivo. Sono state eseguite tre differenti tipologie di prove:

- *Decellularizzazione di un vaso porcino con afferraggio distale e prova di sterilità*
- *Decellularizzazione di un vaso porcino senza afferraggio distale*
- *Decellularizzazione di un rene di ratto*

I risultati sono stati ottenuti tramite quantificazione del DNA ed analisi istologiche in ematossilina ed eosina e marcatura con DAPI per avere delle indicazioni qualitative sia sulla rimozione cellulare che sulla struttura della matrice del tessuto decellularizzato.

3.2.1 QUANTIFICAZIONE DEL DNA

Per eseguire la quantificazione del DNA, da ogni vaso sono state ottenute delle porzioni di tessuto pesate su una bilancia di precisione e inserite in eppendorf da 1.5 mL. Il protocollo di quantificazione prevede diversi passaggi:

- 1) *Digestione del tessuto*
 - a. Riempimento delle eppendorf con 500 μ L di buffer di lisi (10 mM NaCl, 10mM TRIS (pH 8.0), 10mM EDTA (pH 8.0), 0.5% SDS) e 2.5 μ L di proteinasi K.
 - b. Omogeneizzazione del tessuto nella soluzione
 - c. Incubazione a 55 °C per 12 ore
 - d. Passaggio al vortex e centrifugazione alla massima velocità per 2 minuti a 4°C
 - e. Aspirazione del surnatante e trasferimento in eppendorf sterile

2) *Precipitazione delle Proteine e dei detriti cellulari*

- a. Aggiunta di 50 μ L di Sodio Acetato a pH 5.2
- b. Mescolamento del contenuto e Incubazione a -20 °C per 15 minuti
- c. Centrifugazione alla massima velocità per 20 minuti a 4 °C
- d. Aspirazione del surnatante e trasferimento in eppendorf sterile

3) *Precipitazione degli Acidi nucleici*

- a. Aggiunta di 1mL di etanolo al 98% congelato
- b. Incubazione a -20 °C per 15 minuti
- c. Centrifugazione alla massima velocità per 20 minuti a 4°C, aspirazione ed eliminazione del supernatante
- d. Aggiunta di 1 mL di etanolo al 98% congelato
- e. Passaggio al vortex e centrifugazione alla massima velocità per 5 minuti a 4 °C, aspirazione ed eliminazione del supernatante
- f. Aggiunta di 1mL di etanolo al 70% congelato
- g. Passaggio al vortex e centrifugazione per 5 minuti a 4 °C, aspirazione ed eliminazione del supernatante

- h. Asciugatura del pellet di dna sotto cappa a flusso laminare

Per la quantificazione i pellet sono stati risospesi in 100 μ L di Tris-EDTA (TE) e inseriti in piastre multipozzetto insieme a SYBR green e TE con le seguenti proporzioni:

- 20 μ L di campione
- 10 μ L di SYBR green
- 70 μ L di TE (Tris-EDTA)

Il *SYBR Green* è un agente intercalante che si lega in maniera preferenziale al DNA a doppio filamento (dsDNA). Il complesso che si forma presenta un picco di assorbimento ad una lunghezza d'onda di 488 nm e un picco di emissione a 522 nm. Tramite

spettrofotometro TECAN è stato possibile effettuare delle quantificazioni in fluorescenza servendosi di una retta di taratura ottenuta da concentrazioni di DNA noti di sperma di salmone. Dal dato fluorimetrico si è poi risaliti al quantitativo di DNA (in ng) rispetto al peso del campione (in mg).

3.2.2 ANALISI ISTOLOGICHE IN EMATOSSILINA-EOSINA E MARCATURA DAPI

I campioni sono stati inclusi in paraffina e successivamente colorati attraverso ematossilina-eosina (EE). L'EE è un colorante vegetale in grado di marcare in blu/violetto gli acidi nucleici (evidenziando dunque il nucleo della cellula) e in rosa proteine strutturali come le fibre di collagene. Tramite analisi al microscopio è quindi possibile individuare la componente nucleare e strutturale di un tessuto utili a valutare la presenza di eventuali residui cellulari e lo stato della matrice extracellulare del tessuto: dai risultati ci si aspetta un mantenimento delle proteine strutturali come il collagene (e che verranno dunque marcate in rosa) e una drastica riduzione dei nuclei cellulari. Inoltre sono state eseguite anche delle analisi tramite marcatura DAPI che hanno permesso di confermare i risultati riportati dalle analisi istologiche. Il DAPI è un colorante organico fluorescente in grado di legarsi a sequenze nucleiche ricche di Adenina e Timina. Presenta un assorbimento massimo a $\lambda=358\text{nm}$ (ultravioletto) e un'emissione massima a $\lambda=461\text{nm}$ (blu). Tramite indagini fluorimetriche è dunque possibile ottenere informazioni sulla quantità di DNA presente nel tessuto.

3.2.3 DECELLULARIZZAZIONE DI VASI SANGUIGNI E PROVA DI STERILITÀ

In queste prove, effettuate nel laboratorio Biocell del Politecnico di Milano, sono state decellularizzate delle aorte addominali porcine di diametro compreso tra i 3-6 mm prelevate presso il Laboratorio di Chirurgia Sperimentale dell'Università degli studi di Pavia e conservate ad una temperatura di -80°C . Sono state eseguite due prove differenti:

-Prova con afferraggio distale

-Prova senza afferraggio distale

in modo tale da valutare eventuali effetti della perfusione accoppiata ad entrambe le soluzioni utilizzando il dispositivo automatico. Nello schema seguente sono schematizzate le due tipologie di prove (fig.36).

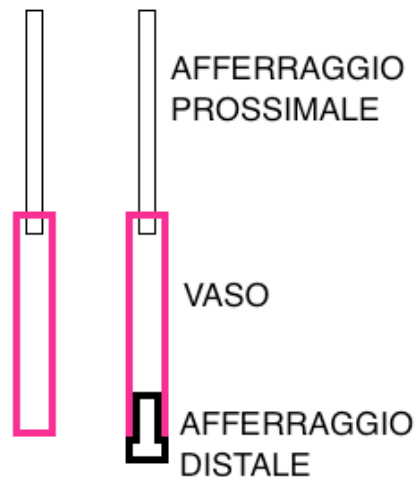


Fig. 36: Schema che mostra l'aggancio del vaso nelle prove senza afferraggio distale (sinistra) e con afferraggio distale (destra)

Nel precedente lavoro di tesi le prove effettuate senza afferraggio avevano mostrato un livello di decellularizzazione maggiore rispetto a quelle effettuate con l'afferraggio. La causa di questa differenza è stata individuata nella perdita di carico dovuta a tale componente che limita i processi diffusivi delle sostanze decellularizzanti all'interno del lume del vaso, creando un ristagno del liquido. L'aggiunta del sistema di ricircolo del fluido, garantendo un maggior rimescolamento tra l'interno e l'esterno del vaso, potrebbe risolvere questa problematica. Attraverso queste due prove è stato valutato il livello di decellularizzazione raggiunto con le due differenti configurazioni. I componenti del circuito idraulico sono stati sterilizzati in autoclave (120 °C) e il montaggio è stato eseguito sotto cappa a flusso laminare utilizzando telo e guanti chirurgici per evitare contaminazioni. Il vaso è stato assicurato agli afferraggi tramite dei fili di sutura sterile in seta di tipo 4-0 (fig.37).

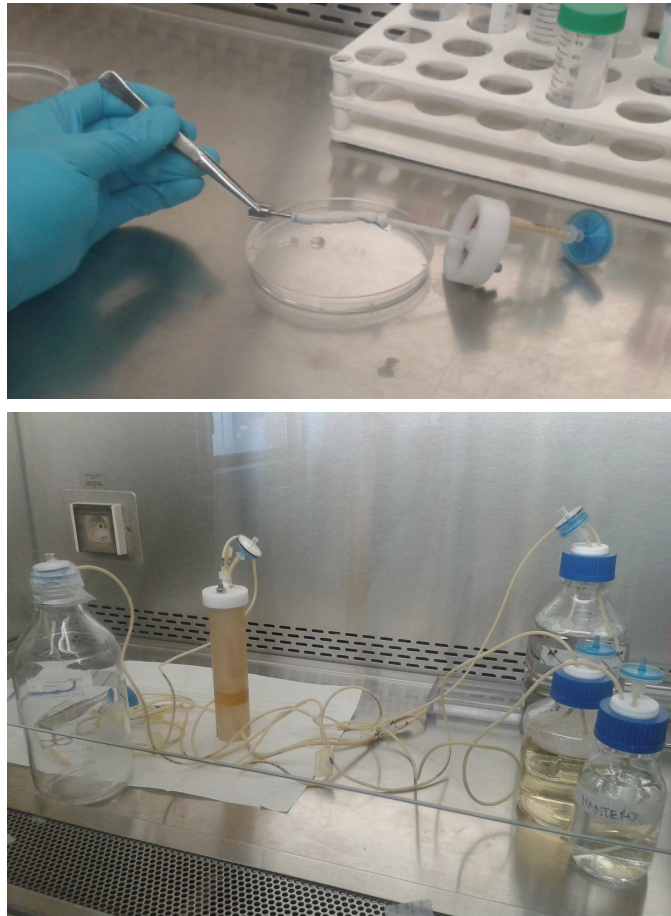


Fig.37: Sopra: montaggio del vaso sugli afferraggi con filo di sutura in seta di tipo 4-0. Sotto: montaggio del circuito idraulico sotto cappa a flusso laminare

Il circuito idraulico è stato collegato al sistema di controllo (fig.37) e sono stati impostati i parametri per lo svolgimento automatico del seguente protocollo:

SOSTANZA	AZIONE
Acqua milliQ con soluzione antibiotica e antimicotica all'1%	24 ore con ricambio ogni 6 ore
Sodio Deossicolato (DCA) al 4%	24 ore con ricambio ogni 12 ore
Siero Fetale Bovino (FBS) al 10% in NaCl 0.9	48 ore con ricambio ogni 6 ore
Tampone fosfato salino (PBS) (in statica)	48 ore

Tab.6: Protocollo di decellularizzazione per vasi sanguigni

-GIORNO 1

La camera viene riempita con 60 mL di acqua milliQ con aggiunta di soluzione antibiotica antimicotica all'1%. L'acqua deionizzata e purificata agisce come agente ipotonico provocando uno shock osmotico nelle cellule. Durante queste 24 ore è previsto un ricambio della stessa sostanza ogni 2 ore per un totale di 12 ricambi.

-GIORNO 2

Il dispositivo dopo le prime 24 ore preleva dal secondo reservoir una soluzione di Sodio deossicolato (DCA, sale sodico dell'acido deossicolico): il DCA è un detergente chimico ionico che lisa le cellule attraverso la solubilizzazione delle membrane, sia cellulari che nucleari. Nelle 24 ore previste il dispositivo ha eseguito un totale di 2 cambi alla distanza di 12 ore ciascuno.

-GIORNO 3-4

Il dispositivo preleva la terza e ultima sostanza dal reservoir contenente Siero Fetale Bovino (FBS), mischiato al 10% con soluzione fisiologica e filtrata come nel precedente caso. Per quest'ultima sostanza è previsto un tempo di azione di 48 ore con ricambio ogni 6 ore.

Al termine del protocollo, il vaso è stato estratto dalla camera e conservato in una falcon con PBS per 48 ore a 4°C: questa fase ha lo scopo di lavare dal tessuto le sostanze decellularizzanti residue.

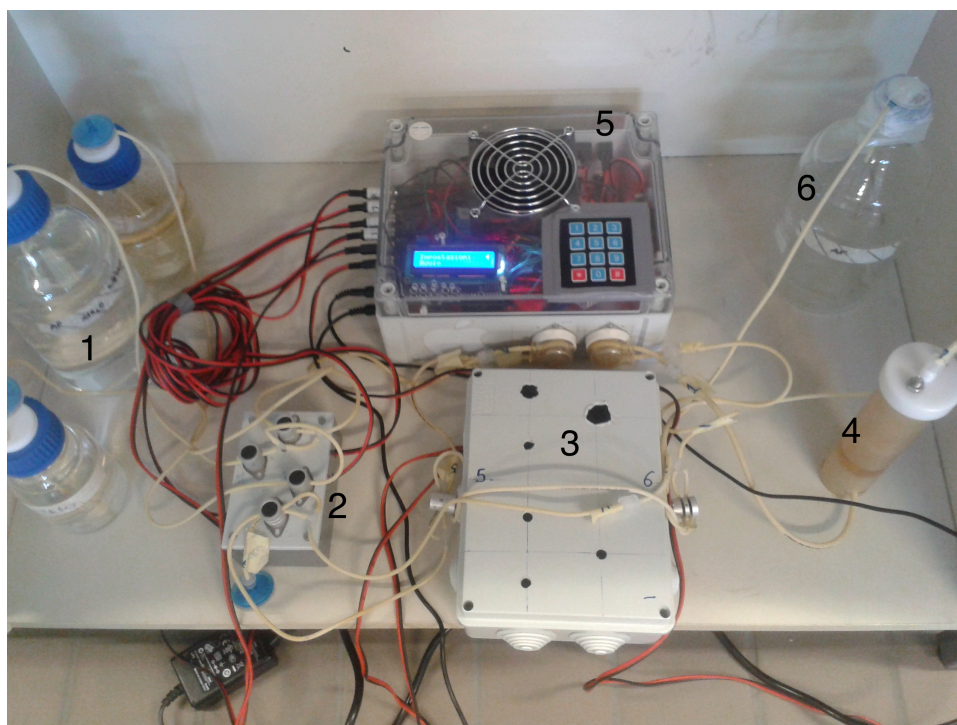


Fig.38: Immagine del dispositivo durante la prova di decellularizzazione. Da sinistra a destra i reservoir (1), le valvole (2), una scatola contenente le due nuove valvole (3), il sistema di controllo (5), la camera di decellularizzazione (4) ed il waste (6)

Il dispositivo ha eseguito correttamente tutti i ricambi rispettando le tempistiche e le portate impostate tramite interfaccia. A seguito della prova è stata valutata la sterilità dello scaffold decellularizzato processato utilizzando il dispositivo. Sono stati ottenuti dal tessuto decellularizzato 6 dischetti di 6 mm di diametro circa, i quali sono stati posizionati all'interno di una piastra da 96 pozzetti (fig.38) insieme a 50 μ L di sospensione di cellule HeLa con una densità di 150 cellule/ μ L e incubati a 37°C per tre giorni.

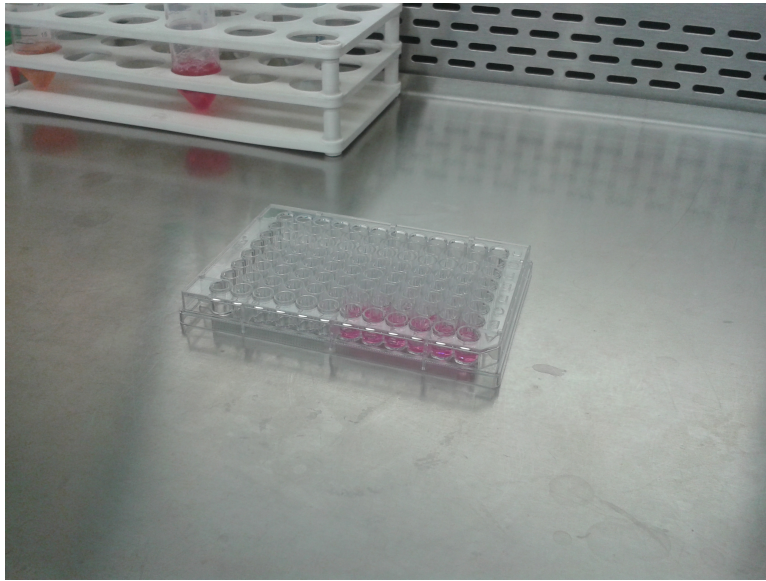


Fig.39: Piastra multipozzetto: si notano i sei pozzetti contenenti i dischetti di tessuto e la sospensione cellulare

Dall'analisi del medium al termine dell'incubazione non sono state individuate contaminazioni batteriche o formazioni di muffe: si è dimostrata dunque la validità del dispositivo nel mantenimento della sterilità all'interno della camera durante il protocollo. La colorazione assunta dal medium al termine dell'incubazione ha mostrato attività cellulare all'interno dei pozzetti: questi risultati confermano ad una prima analisi che il tessuto ottenuto non causa effetti negativi sulle cellule.

I risultati delle decellularizzazioni hanno mostrato una drastica riduzione della componente cellulare nel tessuto (fig.40).

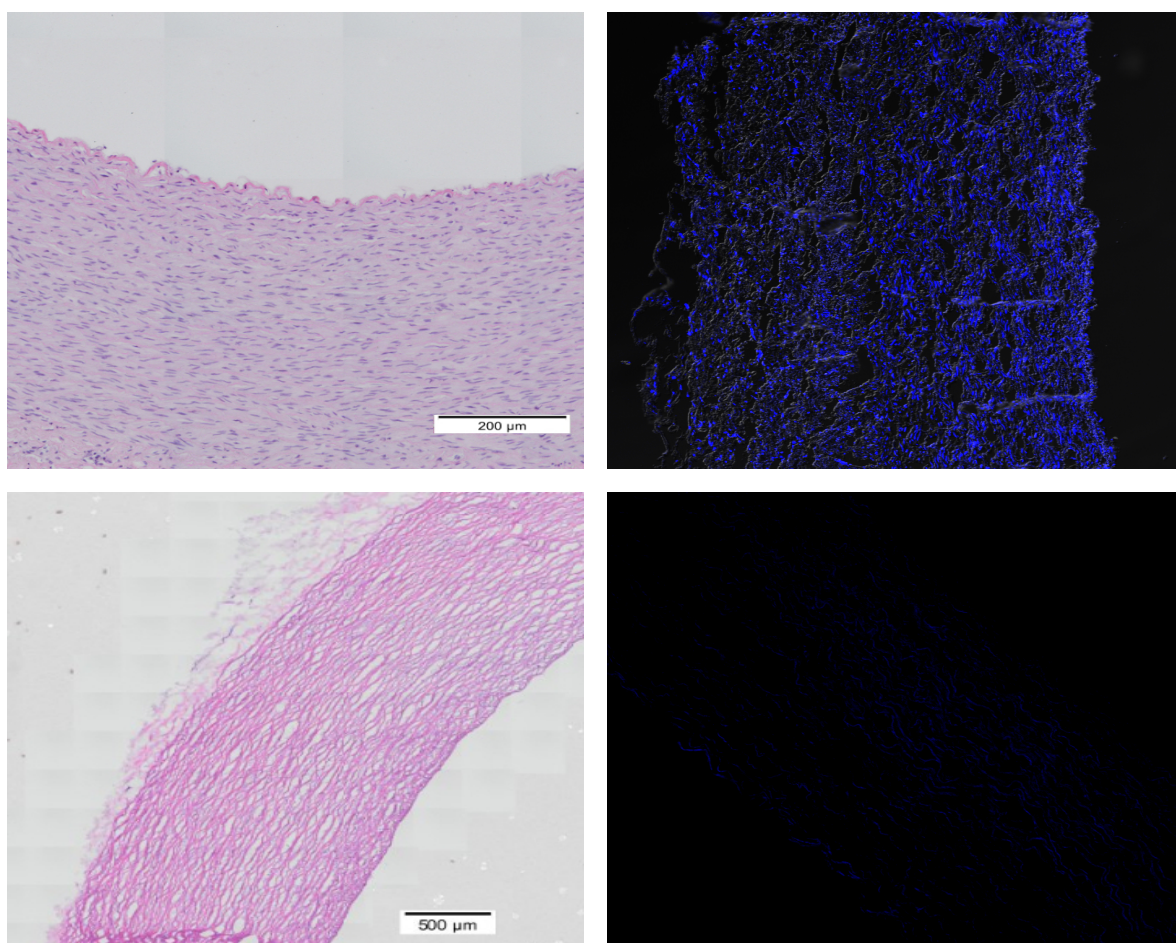
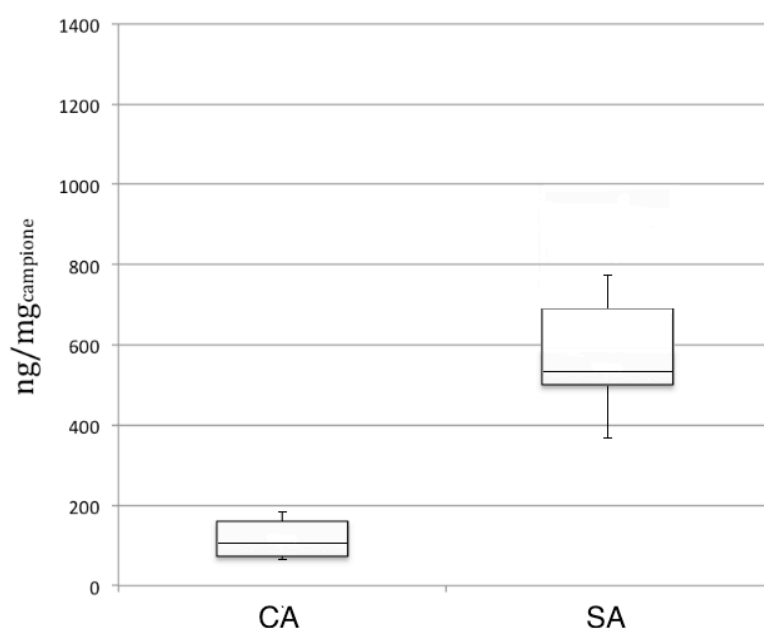


Fig.40: A sinistra: In alto immagine istologica del tessuto nativo. In basso: immagine istologica del tessuto decellularizzato. A destra: In alto immagine a fluorescenza DAPI del tessuto nativo. In basso immagine a fluorescenza DAPI del tessuto decellularizzato

I risultati delle analisi in ematossilina-eosina dimostrano che il protocollo unito alla tecnica di perfusione si è dimostrato efficace. I risultati delle quantificazioni del DNA hanno mostrato un aspetto interessante: i valori ottenuti dalla prova senza afferraggio distale (SA) sono maggiori rispetto a quelli ottenuti dalla prova con afferraggio distale (CA).

	Prova con afferraggio (CA)	Prova senza afferraggio (SA)
Minimo	65	387.8
Primo Quartile	73.04	498.04
Mediana	109.9	574.86
Terzo Quartile	160.4	692.10
Massimo	183.4	778.71



Graf.2: Risultati delle prove di decellularizzazione con afferraggio (CA) e senza afferraggio (SA) che riportano la quantità di DNA (in ng) per mg di campione e relativa rappresentazione grafica

I risultati ottenuti dal precedente lavoro di tesi avevano al contrario mostrato un quantitativo di DNA nel tessuto più elevato nelle prove CA rispetto alle prove SA: tale differenza si accentuava particolarmente per vasi di piccolo calibro (<6mm). E' stato ipotizzato che questo fosse dovuto alla perdita di carico data dall'afferraggio, la quale, opponendosi alla diffusione delle sostanze tra l'interno e l'esterno del vaso, creava un effetto ristagno contrastando la decellularizzazione del tessuto. Con l'aggiunta del circuito di ricircolo l'effetto che si ottiene è completamente differente rispetto alla soluzione adottata in partenza, in quanto non si ha più un ristagno del fluido all'interno del lume del vaso ma un continuo rimescolamento che garantisce una migliore azione decellularizzante.

Con la nuova soluzione progettuale l'afferraggio distale non rappresenta più un ostacolo ai fenomeni diffusivi ma al contrario incentiva la permeazione delle sostanze all'interno del tessuto: il condizionamento sia longitudinale che radiale dovuto al peso dell'afferraggio e alle perdite di carico imposte dalla sua geometria favoriscono l'assorbimento delle sostanze decellularizzanti con conseguente aumento dell'efficacia del processo. La pressione che si crea all'interno del lume del vaso genera infatti un gradiente pressorio che aumenta la permeazione delle molecole lungo lo spessore del tessuto, ottimizzando l'efficacia del processo. Per quanto riguarda i valori ottenuti, i risultati sono al di sopra della media considerando le concentrazioni di DNA ottenute nel precedente lavoro di tesi (intorno ai 100 ng/mg): questa tendenza è stata però osservata anche per i valori ottenuti da prove effettuate manualmente e che qui non vengono riportate in quanto non attinenti con il lavoro svolto. Questo ci porta ad ipotizzare un problema che non riguarda l'utilizzo del dispositivo ma piuttosto aspetti relativi al protocollo di decellularizzazione o al protocollo di quantificazione del DNA: sono tuttora in svolgimento ulteriori prove per validare statisticamente i risultati ottenuti. Il confronto tra le due prove conferma comunque l'osservazione fatta sulla maggiore efficacia della prova CA rispetto alla prova SA.

3.2.4 DECELLULARIZZAZIONE DI UN TESSUTO RENALE

La decellularizzazione del rene è stata eseguita in collaborazione con il Laboratorio di chirurgia sperimentale e microchirurgia dell'Università degli studi di Pavia e il Laboratorio di Biologia delle beta-cellule dell'Ospedale San Raffaele di Milano. Per questa prova è stato utilizzato un rene di ratto Sprague-Dawley. Dato le basse portate necessarie per perfondere il rene il dispositivo è stato adattato connettendo, come descritto in precedenza, due pompe WPX1 (in grado di garantire una portata massima di 2,5 mL/min) al sistema di controllo. Il rene è stato alloggiato all'interno di un reservoir chiuso tramite tappo GL45 (fig.41). L'utilizzo di una camera differente per il posizionamento dell'organo e di pompe differenti ha dimostrato la versatilità del dispositivo, in grado di adattarsi a diversi protocolli e a diversi componenti.



Fig.41: Immagine del reservoir utilizzato per alloggiare il rene. La perfusione è stata ottenuta incannulando l'organo con un vein flow.

Il rene è stato connesso al circuito tramite vein flow, ovvero una microcannula con sistema di ancoraggio Luer-lock che viene inserita nel tratto di aorta precedente alla biforcazione con l'arteria renale (troppo piccola per essere incannulata direttamente) e che permette il collegamento con il resto del circuito. Il tratto di aorta a valle della biforcazione è stato invece occluso in modo tale da garantire l'ingresso del fluido nell'organo esclusivamente attraverso l'arteria renale e la fuoriuscita attraverso la vena renale, mantenuta pervia (fig.42).

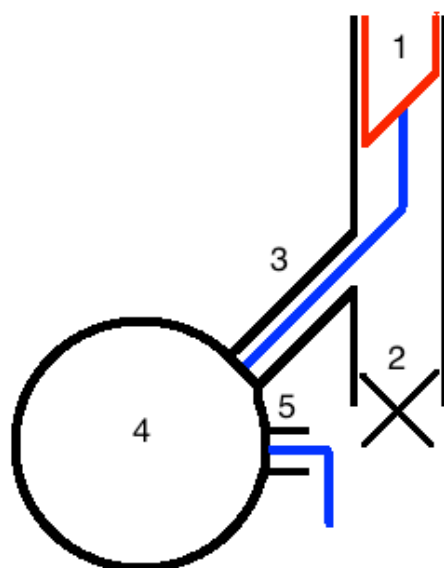


Fig. 42: Schema della connessione del rene con il circuito di perfusione. La cannula (1) è inserita lungo il tratto aortico precedente alla biforcazione con l'arteria renale (3). Il flusso (in blu) avviene attraverso l'arteria renale grazie all'occlusione (2) a valle della biforcazione e, una volta perfuso il rene (4), fuoriesce attraverso la vena renale (5)

Il connettore luer presente nel vein flow potrebbe essere utilizzato per adattare il sistema anche alla camera cilindrica utilizzata per la decellularizzazione dei vasi sanguigni, semplicemente assemblando l'afferraggio prossimale con l'estremità per la connessione rivolta verso l'interno della camera (fig.43).

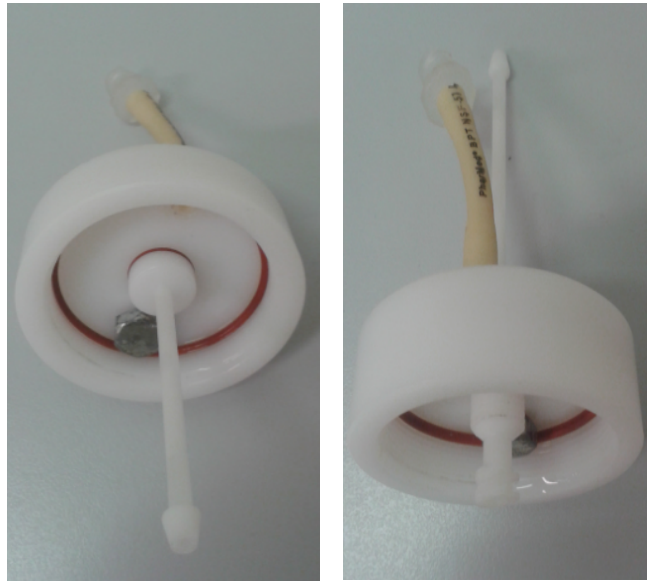


Fig.43: Sinistra: tappo della camera con afferraggio montato “normalmente” per le prove di decellularizzazione di vasi sanguigni. Destra: tappo con afferraggio montato con il connettore rivolto verso l’interno della camera per prove di decellularizzazione di rene.

Per questa prova è stato eseguito un protocollo di decellularizzazione differente rispetto a quello utilizzato con i vasi sanguigni. In particolare il protocollo è stato il seguente:

SOSTANZA	AZIONE
Triton X-100 al 1%	4 Ore
SDS al 0.5%	4 Ore
PBS	12 Ore

Tab.7: Protocollo di decellularizzazione utilizzato per il rene

- *4 ore in Triton X-100 all’1%:* il triton X-100 è un detergente non ionico che rimuove i residui cellulari dalla matrice
- *4 ore in SDS allo 0.5%:* l’SDS è un detergente ionico molto efficace nella rimozione dei nuclei senza un eccessivo danneggiamento della matrice extracellulare e mantenendo quindi intatte le proprietà meccaniche del tessuto.

- *Lavaggio overnight in PBS e antibiotico (penicillina e streptomina all'1%):* questa fase serve per eliminare dal tessuto tutte le sostanze decellularizzanti residue.

L'analisi visiva ha mostrato una totale perdita della componente cellulare, il rene ha assunto una trasparenza sempre maggiore nel corso del processo (fig.44). Si è però mantenuta la morfologia nativa dell'organo e la rete vascolare, così come riscontrato in diversi studi presenti in letteratura [44, 45, 46].



Fig.44: Immagini del rene durante la decellularizzazione. Sono mostrate delle fasi temporali differenti in cui si nota la progressiva riduzione della componente cellulare dalla stato nativo (in alto) a quello decellularizzato (in basso) e il mantenimento della morfologia e della rete vascolare nativa.

Le considerazioni fatte ad un'analisi visiva sono state poi confermate da analisi istologiche effettuate su porzioni del tessuto. I risultati ottenuti hanno confermato un'effettiva

eliminazione della componente cellulare e un mantenimento dell'ultrastruttura e dell'ECM
(fig.45)

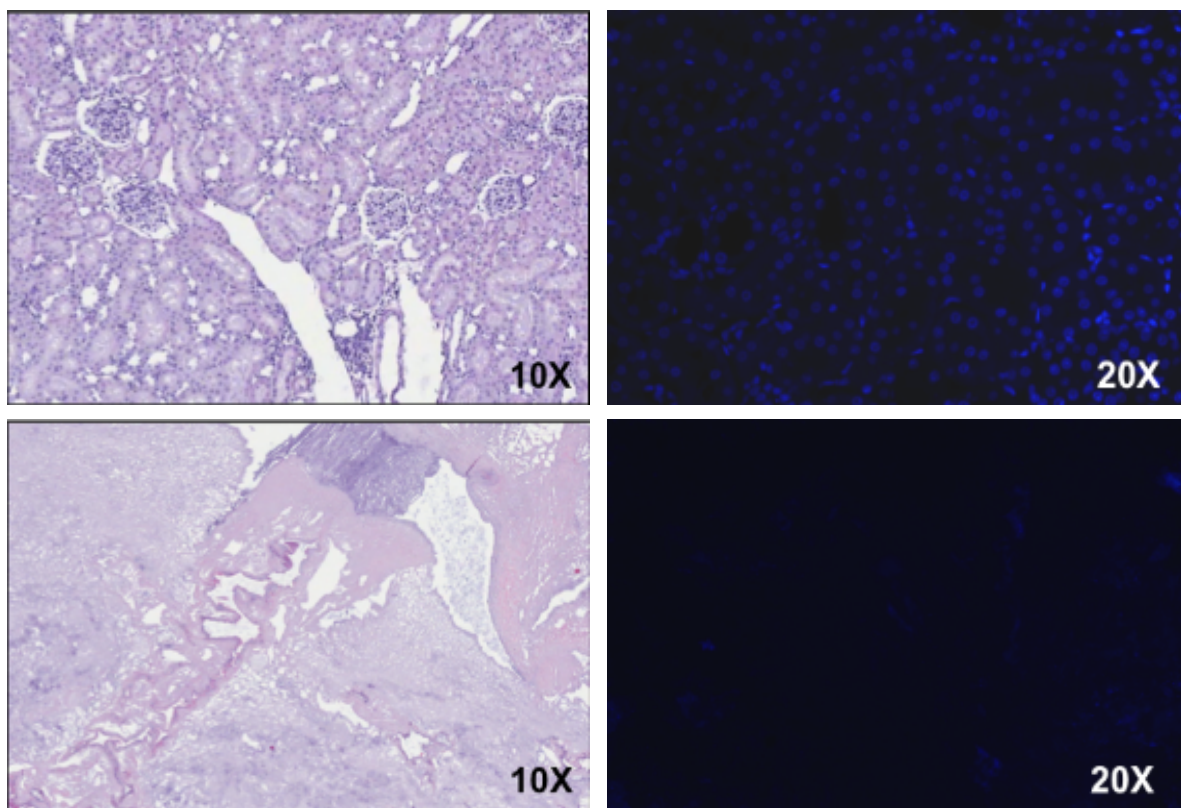


Fig.45: A sinistra: in alto, istologia E-E del tessuto renale nativo. In basso, istologia E-E del tessuto renale decellularizzato. A destra: in alto, immagine a fluorescenza DAPI del tessuto renale nativo. In basso, immagine a fluorescenza DAPI del tessuto renale decellularizzato .

3.2.5 VALUTAZIONE DEL DISPOSITIVO

Le prove descritte sono state utili per valutare vari aspetti del dispositivo e l'adempimento dei requisiti proposti in fase di progettazione:

- *Automazione*: le prove su banco e le prove di decellularizzazione sono state eseguite interamente dal dispositivo senza alcun intervento dell'operatore, che si è limitato al montaggio del circuito, all'impostazione dei parametri e all'estrazione del tessuto dalla camera.
- *Sterilità*: l'analisi sulla sterilità effettuata in parallelo ad una delle due prove di decellularizzazione ha dimostrato l'efficacia del dispositivo nel mantenere il tessuto completamente isolato dall'ambiente esterno e dal possibile contatto con agenti patogeni (batteri, muffe).
- *Sicurezza*: non sono state registrate perdite o fuoriuscite dei fluidi decellularizzanti durante le prove, che dunque non sono entrate in alcun modo a contatto con l'operatore.
- *Semplicità di utilizzo*: l'aggiunta di un'interfaccia utente ha semplificato notevolmente le operazioni fornendo all'operatore un sistema completamente indipendente dal computer in cui è possibile impostare in maniera semplice i parametri desiderati senza ricorrere, come avveniva precedentemente, alla modifica diretta del codice. L'interfaccia permette inoltre di monitorare l'andamento del processo visualizzando su schermo la sostanza processata e il numero di processi totali effettuati, nonché la temperatura misurata dal sensore.
- *Versatilità*: il dispositivo, oltre ad essere già adattabile a vasi di geometrie differenti, è stato utilizzato per la decellularizzazione di un organo e si è dunque dimostrato efficiente anche per applicazioni diverse da quella per cui era stato progettato inizialmente.
- *Autoclavabilità*: tutti i componenti del circuito idraulico sono sterilizzabili in autoclave.
- *Stimolazione*: l'aggiunta del circuito di ricircolo unito alle perdite di carico garantite dall'afferraggio distale permette di stimolare il vaso sanguigno durante la decellularizzazione, favorendo l'azione delle sostanze detergenti. E' possibile

modificare tale stimolazione cambiando gli afferraggi oppure, grazie alle innovazioni apportate, impostando una determinata portata durante la fase di ricircolo. Tuttavia non è ancora possibile definire completamente il condizionamento del tessuto in termini di sforzi e deformazioni.

- *Termoregolazione*: il sistema di termoregolazione progettato consente di controllare un range di temperatura da 20 a 45 °C, con un gradiente di temperatura medio di circa 0,02°C/sec dimostrando quindi un'efficienza maggiore rispetto alla soluzione precedentemente adottata. Il sistema è in grado di garantire un range che comprenda anche la temperatura di 37 °C e ciò è positivo in quanto la maggior parte dei processi che coinvolgono cellule o tessuti devono soddisfare tale condizione.

CAPITOLO IV:

**CONCLUSIONI E
SVILUPPI FUTURI**

Le patologie cardiovascolari rappresentano una delle più frequenti cause di decesso a livello globale. Alcune di queste sono dovute a restringimenti del lume del vaso (stenosi), dovuto principalmente a formazione di placche aterosclerotiche o ad iperplasia dell'intima, che riducono drasticamente il flusso di sangue a valle dell'occlusione provocando ischemia dei tessuti interessati. Altre sono dovute a cedimenti della parete vascolare (aneurismi) dovute a degenerazioni di origine patologica. Attualmente le soluzioni proposte per tale problematica prevedono, se necessario, la sostituzione del tratto di vaso danneggiato con graft vascolari di origine sintetica o biologica. Entrambe le soluzioni presentano tuttora diversi svantaggi soprattutto per applicazioni su vasi di piccolo calibro (<6mm), per le quali le particolari condizioni fluidodinamiche e meccaniche portano il più delle volte a fallimento dell'impianto per formazione di trombi o coaguli che provocano l'occlusione del lume della protesi. L'ingegneria dei tessuti propone un approccio che prevede la coltura, tramite bioreattori, di cellule su strutture tridimensionali chiamate scaffold. Per applicazioni vascolari esistono attualmente scaffold di origine sintetica e biologica: i primi presentano buone proprietà meccaniche ma hanno lo svantaggio di provocare nella maggior parte dei casi una reazione infiammatoria nell'organismo ospite, mentre i secondi, al contrario, presentano ottima biocompatibilità ma proprietà meccaniche scarse. Con l'intento di superare gli svantaggi di entrambe le soluzioni si sta sperimentando la realizzazione di scaffold tramite un processo che prende il nome di *decellularizzazione*: tale tecnica consiste nella completa rimozione della componente cellulare di un tessuto, di cui viene preservata esclusivamente la matrice extracellulare (ECM), ovvero la struttura tridimensionale di sostegno costituita principalmente da collagene ed elastina. Un tessuto decellularizzato presenta le caratteristiche di uno scaffold ideale: essendo completamente privo della componente cellulare, infatti, non presenta il rischio di una risposta immunitaria, mentre dal punto di vista meccanico presenta proprietà del tutto simili a quelle del tessuto nativo essendo costituito esclusivamente da matrice extracellulare. Obiettivo della presente tesi è l'ottimizzazione di un sistema per la decellularizzazione automatica di tessuti biologici. Il dispositivo è stato modificato rispetto alla configurazione iniziale partendo dalle problematiche riscontrate per poi progettare ed assemblare le nuove soluzioni. La nuova configurazione è stata testata con prove di decellularizzazione di vasi sanguigni e la sua applicazione è stata estesa anche alla decellularizzazione di un intero

organo, in particolare un rene di ratto. È stata apportata una sostanziale modifica del circuito idraulico aggiungendo una nuova linea necessaria per consentire il ricircolo del fluido durante la decellularizzazione, cosa che prima non avveniva in quanto si eseguiva un processo di tipo statico. Alcuni studi sulla decellularizzazione di vasi sanguigni dimostrano una maggior efficacia della perfusione, in quanto gli sforzi di taglio esercitati sulle cellule favoriscono il risciacquo del tessuto e aumentano l'efficacia del processo [43]. Nel nostro caso in particolare sono stati valutati gli effetti della perfusione in base alla presenza o meno dell'afferraggio distale a valle del vaso. Nel precedente lavoro di tesi le prove di decellularizzazione effettuate con l'afferraggio distale avevano mostrato un'efficacia minore rispetto a quelle senza afferraggio. Ciò era dovuto alle perdite di carico introdotte dalla geometria del componente a valle del vaso, le quali creavano un volume di fluido stagnante all'interno del lume limitando gli effetti diffusivi della sostanza decellularizzante. L'aggiunta della linea di ricircolo nella nuova configurazione ha permesso di superare tale problematica, rendendo l'utilizzo dell'afferraggio distale un valore aggiunto. Il sistema vaso-afferraggio può essere infatti assimilato ad un circuito RC in cui la compliance del vaso rappresenta la capacitance, mentre la resistenza è rappresentata dalle perdite di carico imposte dall'afferraggio. La portata imposta durante il ricircolo genera all'interno del sistema delle variazioni cicliche di pressione che favoriscono la diffusione delle sostanze decellularizzanti lungo lo spessore del tessuto aumentando l'efficacia del processo. Sarà necessario effettuare studi più specifici sul comportamento del sistema vaso-afferraggio, per esempio servendosi di analisi computazionali che permettano di valutare con maggior precisione l'andamento della pressione interna al lume e quanto tale variazione influisca sulla diffusività delle sostanze. I risultati ottenuti sembrano confermare l'ipotesi in quanto, dai dati sulla quantificazione del DNA (in ng/mg di campione), i valori ottenuti dalle prove effettuate con l'afferraggio distale (CA) sono più bassi rispetto a quelli ottenuti tramite le prove effettuate senza afferraggio (SA), confermando una decellularizzazione più efficace nel primo caso. Sarà necessario validare statisticamente tali risultati effettuando più prove su campioni di diverse dimensioni e variando alcuni parametri quali la dimensione e la geometria dell'afferraggio (e di conseguenza la perdita di carico ad esso associata) e la portata di ricircolo per valutare l'effettiva influenza sull'efficacia del protocollo. Il dispositivo è stato inoltre dotato di un'interfaccia utente assente nella configurazione iniziale, tramite la quale

è stato reso molto più semplice da utilizzare in quanto la modifica dei parametri non richiede alcun intervento sul codice ma il programma può essere caricato un'unica volta per poi utilizzare il sistema indipendentemente dal pc. Qualora si volesse modificare il menù aggiungendo nuove voci o un nuovo parametro da controllare o impostare basterebbe implementare poche righe di codice e questo grazie ad una sintassi intuitiva e semplice da modificare strutturata a blocchi di funzioni. È inoltre possibile durante il processo visualizzarne l'avanzamento in quanto viene stampata su LCD la sostanza e il processo corrente: in questo modo l'utente può visualizzare la fase del protocollo raggiunta e può valutare se il dispositivo sta eseguendo correttamente il programma impostato intervenendo in caso di necessità. La soluzione adottata rappresenta una forma di interfaccia molto semplice da utilizzare, che permette sia l'impostazione che il monitoraggio dei parametri di interesse. L'utente cui si rivolge questo dispositivo necessita di un'interfaccia che permetta di impostare comandi semplici e chiari. Un aspetto aggiuntivo da poter inserire potrebbe essere una funzione che permetta il controllo manuale del dispositivo che può essere richiamata in caso di problemi durante l'esecuzione del programma automatico. Le modifiche per migliorare e rendere più completa l'interfaccia sarebbero facilmente inseribili all'interno del codice, dotato di una sintassi semplice da gestire. Altro aspetto su cui ci si è concentrati particolarmente nella progettazione del dispositivo è la versatilità : si è voluto rendere il dispositivo utilizzabile anche su tessuti differenti dai vasi sanguigni. Allo stato iniziale il sistema era in grado di potersi adattare esclusivamente a vasi di diversa dimensione utilizzando afferraggi diversi. Nella configurazione attuale è stato aggiunto un circuito elettronico che permette di adattare il sistema a pompe differenti da quelle già presenti nel dispositivo in modo tale da poterlo utilizzare anche per applicazioni che richiedano portate differenti e che dunque necessitino di pompe con caratteristiche diverse. Nello specifico sono state adattate delle pompe, le WPX1, in grado di fornire delle portate molto più basse rispetto a quelle, le WPM2, utilizzate per la perfusione dei vasi sanguigni. Ciò ha permesso di poter utilizzare il dispositivo nella decellularizzazione di un intero organo, in particolare un rene di ratto. Il sistema si è dimostrato molto versatile in quanto è stato facilmente adattato al nuovo scopo che prevedeva portate molto basse ed un protocollo completamente differente rispetto a quello utilizzato per i tessuti vascolari. Con questo dispositivo è anche possibile eseguire prove di perfusione di organi di diverso tipo che necessitano, come nel caso del rene di

ratto, di portate molto basse dell'ordine dell'1-3 mL/min [47]. È interessante poter utilizzare il sistema anche per questo tipo di tecnica dato che essa sta acquisendo un ruolo molto importante nell'ingegneria dei tessuti. Moltissimi gruppi di ricerca stanno portando avanti studi sulla decellularizzazione di interi organi tramite la perfusione attraverso la rete vascolare nativa dell'organo: ad oggi è infatti impossibile riprodurre sinteticamente l'esatta struttura tridimensionale e, anche riuscendoci, ci sarebbero ancora numerose limitazioni dovute alla vascolarizzazione del tessuto ingegnerizzato. Tramite decellularizzazione di un organo si riesce invece ad ottenere la sua struttura tridimensionale fisiologica. Si è lavorato anche sul miglioramento del sistema di termoregolazione proponendo una soluzione legata alla novità apportata al circuito idraulico: sfruttando la perfusione del fluido si è infatti inserito uno scambiatore di calore lungo la linea di ricircolo in modo da scaldare o raffreddare la sostanza durante la fase di decellularizzazione. La nuova soluzione progettata presenta diversi vantaggi rispetto alla configurazione iniziale dello scambiatore: il ricircolo del fluido consente infatti un continuo rimescolamento migliorando il coefficiente di scambio termico e aumentando quindi l'efficienza del sistema. Nonostante ciò potrebbero essere effettuate ulteriori modifiche volte a migliorare il rendimento globale. Si potrebbe ad esempio realizzare un componente metallico in acciaio sul quale creare il circuito all'interno del quale far passare il fluido: in questo modo infatti si aumenterebbe sensibilmente il rendimento del sistema in quanto, nella configurazione attuale, i tubi alloggiati nel componente metallico costituiscono una resistenza aggiuntiva al flusso di calore. Un ulteriore problema è costituito dal raffreddamento: la temperatura minima raggiungibile è di 20 °C il che testimonia una difficoltà del sistema nel garantire basse temperature. Ciò è probabilmente dovuto alla scarsa efficacia del dissipatore nell'eliminare il calore prodotto dalla cella di Peltier: questo vuol dire che il sistema non riesce a contenere l'aumento del ΔT tra lato caldo e lato freddo della cella con conseguente diminuzione del rendimento. Utilizzare un dissipatore più performante potrebbe migliorare il rendimento del sistema, che al momento riesce comunque a gestire un range di temperatura che comprende i 37 °C e questo è positivo in quanto sarebbe possibile utilizzare protocolli che prevedono detergenti enzimatici. Si dovranno progettare afferraggi che consentano un aggancio più semplice del tessuto alla camera e che ridurrebbero la complessità del montaggio del circuito idraulico. Quest'ultimo problema potrebbe inoltre essere migliorato progettando un circuito idraulico

che preveda un numero minore di connessioni, rendendo meno lungo e difficile il montaggio. Sarà necessario progettare anche una camera di decellularizzazione più piccola per contenere un volume minore e diminuire il volume di priming del circuito. In conclusione, considerando i risultati ottenuti dalle prove sperimentali, si può affermare che il dispositivo risponde correttamente ai requisiti definiti in fase di progettazione. Le modifiche apportate si sono dimostrate efficaci nell'automazione del processo di decellularizzazione. Il dispositivo è stato reso molto versatile ed utilizzabile per diverse applicazioni ed è stata creata un'interfaccia user-friendly con cui è possibile impostare protocolli differenti. La configurazione attuale, quindi, rappresenta un ulteriore passo del sistema verso un suo possibile utilizzo in ambito clinico.

BIBLIOGRAFIA

1. Green WT Jr.; Articular cartilage repair. Behavior of rabbit chondrocytes during tissue culture and subsequent allografting; *Clin Orthop Relat Res.* 1977; (124): 237-50.
2. Jannas IV, Burke JF.; Design of an artificial skin. I. Basic design principles; *J Biomed Mater Res.* 1980; 14(1): 65-81.
3. Amit M, Carpenter MK, Inokuma MS ; Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture; *Dev Biol.* 2000; 227(2):271-8.
4. Smith I O, Liu, L.A. Smith et al.; Nano-structured polymer scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine; *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* 2009; 1(2): 226-236.
5. Yun HS, Kim S H, Khang D et al.; Biomimetic component coating on 3D scaffolds using high bioactivity of mesoporous bioactive ceramics; *International Journal of Nanomedicine* 2011; (6): 2521-2531.
6. Causa F, Netti PA, Ambrosio L.; A multi-functional scaffold for tissue regeneration: the need to engineer a tissue analogue; *Biomaterials* 2007; 28(34): 5093-9.
7. Conklin BS, Wu H, Lin PH et.al; Basic fibroblast growth factor coating and endothelial cell seeding of a decellularized heparin-coated vascular graft; *Artif Organs* 2004; 28(7): 668-75.
8. Kim SH, Turnbull J, Guimond S.; Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor; *J Endocrinol* 2011; 209(2):139-51.
9. Sodian R, Lemke T, Fritsche C et al.; Tissue-engineering bioreactors: a new combined cell-seeding and perfusion system for vascular tissue engineering; *Tissue Eng.* 2002; 8(5):863-70.
10. Dong JD, Gu YQ, Li CM et.al; Response of mesenchymal stem cells to shear stress in tissue-engineered vascular grafts; *Acta Pharmacol Sin,* 2009 30(5):530-6.

11. Davisson T, Kunig S, Chen A, Sah R et.al; Static and dynamic compression modulate matrix metabolism in tissue engineered cartilage; *J Orthop Res*, 2002;20(4):842-8.
12. Candiani G., Riboldi SA, Sadr N et.al; Cyclic mechanical stimulation favor myosin heavy chain accumulation in engineered skeletal muscle constructs; *J Appl Biomater Biomech*. 2010; 8(2): 68-75.
13. Fink C, Ergun S, Kralisch D et.al; Chronic stretch of engineered heart tissue induces hypertrophy and functional improvement; *FASEB J* 2000; 14(5): 669-79.
14. Wang T, Gardiner BS, Lin Z et.al; Bioreactor design for tendon/ligament engineering; *Tissue Eng Part B Rev*. 2013; 19(2): 133-46.
15. Demartean O, Wendt D, Braccini A et. Al; Dynamic compression of cartilage constructs engineered from expanded human articular chondrocytes; *Biochem Biophys Res Commun*. 2003; 310(2):580-8.
16. Balint R, Cassidy NJ, Cartmell SH; Electrical stimulation: a novel tool for tissue engineering; *Tissue Eng Part B Rev*. 2013; 19(1):48-57.
17. Badylak SF, Freytes DO, Gilbert TW.; Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function; *Acta Biomater*. 2009; 5(1):1-13.
18. Schmeiden RH, Elbjairami WM, Gobin AS et. al; Tissue engineered small-diameter vascular grafts; *Clin Plast Surg*. 2003; 30(4):507-14.
19. R.J.van Det, B.H.R. Vriens, J.van der Palen et.al: Dacron or ePTFE for femoropopliteal above-knee bypass grafting: short- and long-term results of a multicentre randomised trial; *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery* 2009; 37(4):457-463.
20. Prichard HL, Manson RJ, Di Bernardo L et.al; An early study on the mechanisms that allow tissue-engineered vascular graft to resist intimal hyperplasia; *J Cardiovasc Transl Res*. 2011; 4(5):674-82.
21. L'Heureux N, Paquet S, Labbè R et.al: A completely biological tissue-engineered human blood vessel; *FASEB J* 1998; 12(1):47-56.
22. Hutmacher DW; Scaffold designo and fabrication technologies for engineering tissue-state of the art and future perspectives; *J Biomater Sci Polym Ed* 2001; 12(1): 107-24.

23. C.Liu,Z.Xia,J.T.Czernuszka; Design and Development of Three-Dimensional Scaffold for Tissue Engineering; *Chemical Engineering Research and Design* 2007; 85(7):1051-1064.
24. Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF.; An overview of tissue and whole organ decellularization processes.; *Biomaterials* 2011; 32(12):3233-43.
25. Alessandro F.Pellegata, M.Adelaide Asnaghi, Ilaria Stefani et. al; Detergent-Enzymatic Decellularization of Swine blood vessels: Insight on Mechanical Properties for Vascular Tissue Engineering; *Biomed Res int* 2013; 918753.
26. Macchiarini P, Jungebluth P, Go T et. al; Clinical transplantation of a tissue-engineered airway; *Lancet* 2008; 372(9655): 2023-30.
27. Song JJ, Guyette JP, Glipin SE et. al; Regeneration and experimental orthotopic transplantation of a bioengineered kidney; *Nat Med* 2013; 19(5):646-51.
28. Nichols JE, Niles J., Riddle M et.al; Production and assessment of decellularized pig and human lung scaffolds; *Tissue Eng Part A* 2013; 19(17-18):2045-62.
29. Baptista PM, Vyas D, Moran E et al; Human liver bioengineering using a whole liver decellularized bioscaffold; *Methods Mol Biol* 2013; 1001: 289-98.
30. Aubin H, Kranz A, Hulsmann et. al; Decellularized whole heart for bioartificial heart; *Methods Mol Biol* 2013; 1036:163-78.
31. Xu H, Wan H, Sandro M et al; Host response to human acellular dermal matrix transplantation in a primate model of abdominal wall repair; *Tisse Eng Part A* 2008; 14(12):2009-19.
32. Sheridan WS, Duffy GP, Murphy BP; Mechanical characterization of a customized decellularized scaffold for vascular tissue engineering.; *J Mech Behav Biomed Mater.* 2012; 8: 58-70.
33. Fitzpatrick JC, Clark PM, Capaldi FM; Effect of decellularization protocol of the mechanical behaviour of porcine descending aorta; *Int J Biomater* 2010; 2010.
34. Schaner PJ, Martin ND, Tulenko TN; Decellularized vein as a potential scaffold for vascular tissue engineering; *J Vasc Surg.* 2004; 40(1):146-53.
35. Clay Quint, Yuka Kondo, Roberto J.Manson et. al; Decellularized tissue-engineered blood vessel as an arterial conduit; *PNAS*; 2011;10 (1073).

36. Liqiong Gui, Akihito Muto, Stephen A.Chan et.al; Development of Decellularized Umbilical Arteries as Small-Diameter Vascular Grafts; *Tissue Eng Part A*; 2009; 15(9):2665-2676.
37. Grandi C, Balguera S, Martorina F et. al; Decellularized bovine reinforced vessels for small-diameter tissue-engineering vascular grafts; *Int J Mol Med* 2011; 28(3): 315-25.
38. Xu XF, Guo HP, Gong D et.al; Decellularized porcine pulmonary arteries cross-linked by carbodiimide; *Int J Clin Exp Med* 2013; 6(7):524-31.
39. ZHANG hong-xia, ZHAI Wan-yin, ZHANG Hong-feng; A general decellularization method for preparing vascular scaffolds from blood vessels of different type,diameter and wall-thickness; *Journal of East China Normal University* 2012; 2012(0):1-11.
40. Zou Y, Zhang Y; Mechanical evaluation of decellularized porcine thoracic aorta; *J Surg Res* 2012; 175(2): 359-68.
41. A.Azhim, K.Yamagami, K.Muramatsu et.al; The use of sonication treatment to completely Decellularize aorta tissue; *China IFMBE* 2013; 39: 1987-1990.
42. Regolamento n. 1934/07/CE del 13 novembre 2007 sui medicinali per terapie avanzate recante modifica della direttiva 2001/83/CE e del Regolamento 726/04/CE.
43. Shengjie Chen, Jingxing Li, Peiqing Dong; Utilization of Pulsatile flow to Decellularize the human umbilical Arteries to Make Small-Caliber blood vessel scaffold; *Acta Cardiol Sin* 2013; 29: 451-456.
44. Baptista PM, Orlando G, Mirmalek-Sani SH et.al; Whole organ decellularization – a tool for bioscaffold fabrication and organ bioengineering; *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.* 2009; 2009: 6526-9.
45. Liu CX, Liu SR, Xu AB et.al; Preparation of whole-kidney acellular matrix in rats by perfusion; *Nan Fang Yi Ke Da Xue* 2009; 29(5): 979-82.
46. Ross EA, Williams MJ, Hamazaki T et. al; Embryonic stem cells proliferate and differentiate when seeded into kidney scaffolds; *J Am Soc Nephrol* 2009; 20(11): 2338-47.

47. Mischinger HJ, Walsh TR, Liu T et.al; An improved technique for isolated perfusion of rat livers and an evaluation of perfusates; *J Surg Res* 1992; 53(2): 158-65

APPENDICI

Appendice 1: Datasheet LCD Keypad shield



LCD Keypad shield

- 1602 LCD and 6 AD buttons for Arduino

Overview



This Arduino 1602 LCD Keypad shield is developed for Arduino compatible boards, to provide a user-friendly interface that allows users to go through the menu, make selections etc. It consists of a LCD1602 white character blue backlight LCD. The keypad consists of 5 keys — select, up, right, down and left. To save the digital IO pins, the keypad interface uses only one ADC channel. The key value is read through a 5 stage voltage divider.

Specifications

PCB size	82.8mm X 56.6mm X 1.6mm
Power supply	5V DC
RoSH	Yes

Appendice 2: Datasheet elettrovalvole

ELETTROVALVOLE 3/2

ELECTROVANNES 3/2



Corpo valvola Corps vanne	Tubi - Tubes		Minimo spessore di parete del tubo Épaisseur minimum de paroi du tube (mm)	Forza di pinzaggio Force de pincement (Kg)	Assorbimento Absorption (W)	VALVOLA VANNE	ELETTROMAGNETE 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	0,120	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
Ø 25 mm	3,4	4,7	-	0,400	9	S306-02	Z530A	-	0,280	8
Ø 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 disinserito
- Per l'utilizzo di tubi con Ø esterno minore di 2,2mm (S305) - 3,5mm (S306) - 6mm (S307) occorre montare il dispositivo guida-tubo (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 la tableau
- 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 (S305) - 3,5mm (S306) - 6mm (S307) il faut monter le dispositif guide-tube (voir page 11)
- 1 - Pour service intermittent: voir le diagramme a côté

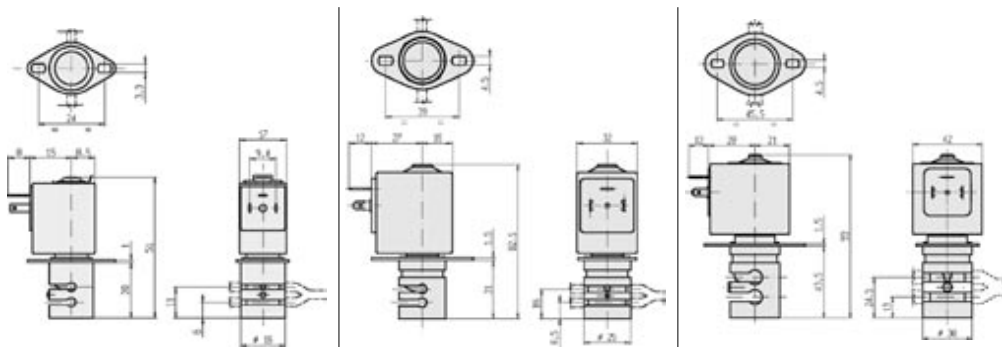
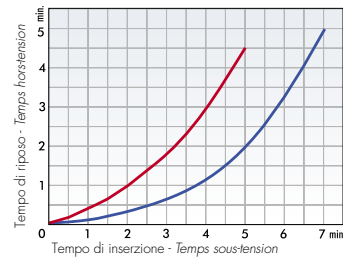


Fig.7



Fig.8



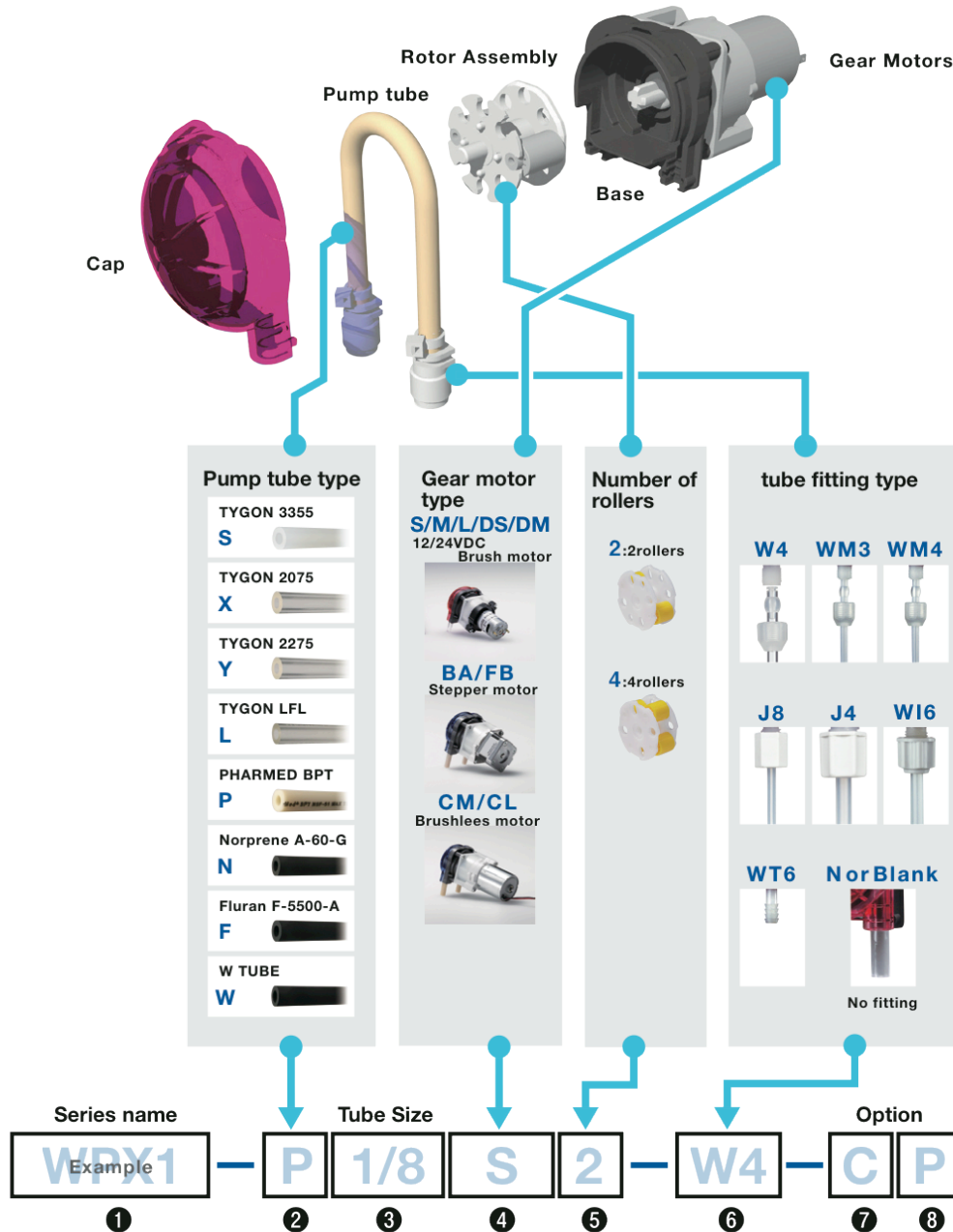
Fig.9

Appendice 3: Datasheet pompe WPX1

WPX1 SELECTION GUIDE

WELCO Peristaltic pumps use a custom ordering system that enables part types and sizes to be selected according to the desired application.

Selection method for customization of pumps
Select the part number according to the following guide



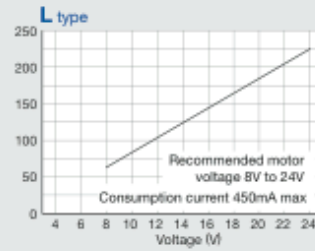
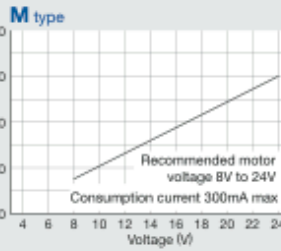
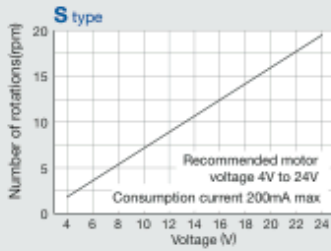
4 Gear motor types



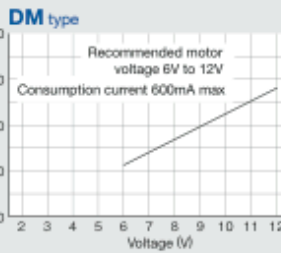
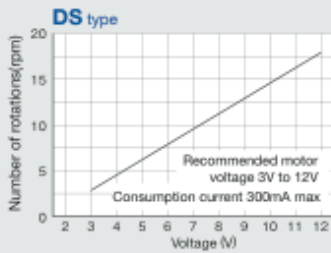
DC Brush Motor & Gear

WPX1 - P 1/8 DS 2 - [] - []

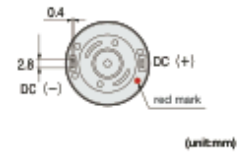
24VDC Brush Motor & Gear: Three types are selectable (low, medium and high speeds)



12VDC Brush Motor & Gear: Two types are selectable (low and medium speeds)



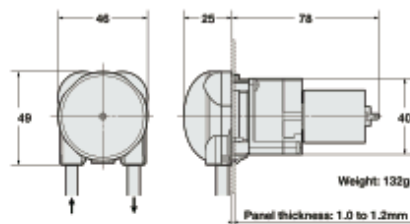
Motor wiring and terminal dimensions diagrams



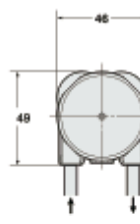
Caution: The consumption current described above is the value during normal operations. An approximately threefold inrush current occurs during rotation startup.

Dimensions (unit:mm)

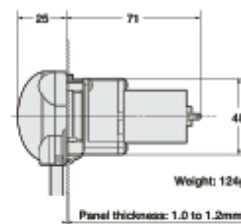
WPX1 - []S
WPX1 - []DS



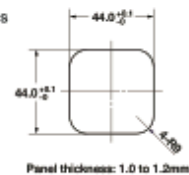
WPX1 - []M
WPX1 - []L



WPX1 - []DM



■ Cutting hole dimensions

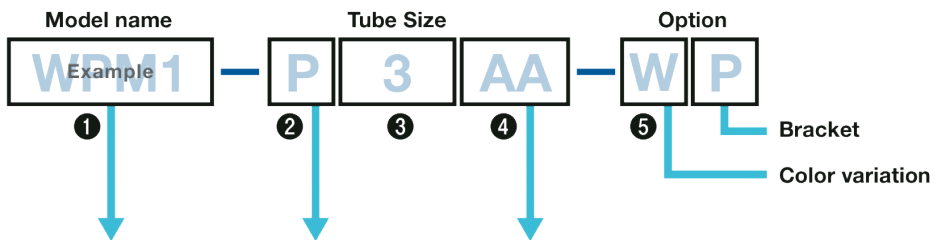
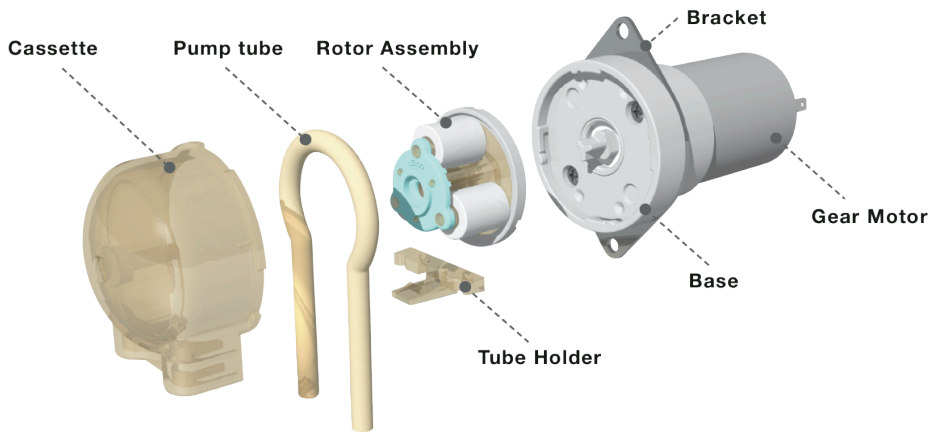









Appendice 4: Datasheet pompe WPM2

WPM SELECTION GUIDE

WELCO Peristaltic pumps use a custom ordering system that enables part types and sizes to be selected according to the desired application.

Selection method for customization of pumps
Select the part number according to the following guide



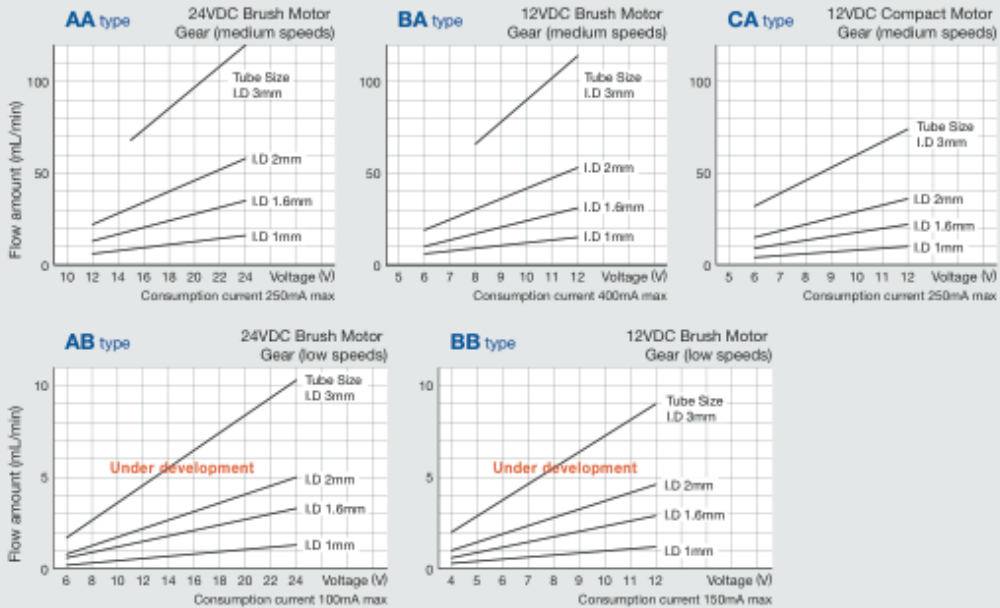
Model name	Tube Size	Option
WPM1	P 3	AA W P
Series name  WPM1  WPM2	Pump tube type TYGON 3355 S Inner diameter 1mm/2mm/3mm PHARMED BPT P Inner diameter 1mm/2mm/3mm Fluran F-5500-A F Inner diameter 1.6mm(1/16") W TUBE W Inner diameter 1mm/2mm/3mm	Gear motor type AA / BA 12/24VDC Brush motor (1/14 Gear ratio)  AB / BB 12/24VDC Brush motor (1/196 Gear ratio) Under development  CA 12VDC Compact Brush motor (1/14 Gear ratio)  E Stepper motor  Under development DA 12VDC Brushless motor Under development 

4 Gear motor types



WPM1 - P 3 AA - P

DC Brush Motor & Gear



Caution:
1. The current consumption indicated is the value during normal operation. When rotation begins, an inrush current of approximately 3 times this amount is generated.
2. To determine the flow rate, the pump was installed at a height of 1.5mm, a hose having the same inside diameter as the pump tube was used, and the flow rate of distilled water was measured with a flow meter. The values indicated are for short-term operation and are not guaranteed for long-term operation. The flow rate has a tendency to increase until the tube becomes acclimated and different lots may have different flow rates within the specified tolerance. When the inside diameter of the hose is smaller than the inside diameter of the pump tube, the flow rate may decrease. Also, the rotating speed of the DC motor will vary depending on the load conditions and fluctuations in motor temperature. During the design stage, be sure to select a motor with ample headroom.

Specification

Gear motor model	AA/BA/AB/BB type	CA type
Max. Discharge pressure *1	0.1MPa (Pharmed BPT)	
Max. Suction pressure *1	-0.1MPa (Pharmed BPT)	
Duty Cycle	50%	
Motor operating temperature	Less than 60°C	
Operating noise *2	Approx. 52dB (JIS B 8310:1985)	
Gear motor endurance *3	More than 1500hr	More than 1000hr
Tubing endurance *3	More than 750hr (Pharmed BPT)	
Operating external temperature	0°C~50°C (No condensation, No freezing)	
Operating humidity	20%~85% (No condensation)	
Standard	UL/CE/RoHS Compliant	CE/RoHS Compliant

Note:
*1 The tubing on the discharge side may rupture if blocked, resulting in a potentially dangerous situation. Be sure to design the discharge side such that the pressure is less than the discharge pressure.
*2 Measurement conditions for the pump noise level conform to JIS B 8310:1985.
*3 The values indicated for durable service life are not guaranteed. The data shown is the result of tests performed by flowing distilled water under the conditions of 20°C room temperature, and intermittent switched operation of 60 seconds ON and 15 seconds OFF. The results vary depending on the chemicals used, ambient temperature and humidity, and operating cycle conditions. Use the indicated values as guidelines.

Appendice 5: Datasheet cella di Peltier



European Thermodynamics Limited
Intelligent Thermal Management

THERMO ELECTRIC GENERATION MODULE

MFG Part Number : GM250-241-10-12

A thermoelectric power generating (TEG) module is one kind of power generating device which uses the Seebeck Effect in order to convert heat into electricity directly.

Characteristics:

- Compact structure (no moving parts)
- Reliable performance
- Maintenance-free
- Noise-free operation
- Low-carbon as it is a "green" technology

The selection of the heat source of the TEG is extensive. It is capable of generating DC electricity continuously as long as there is a temperature difference applied at the two sides of the module.

Except for the thermoelectric material, another important factor which affects the generating capacity and the conversion efficiency of the TEG module is the temperature difference. Increasing the temperature difference between the two sides of the module (the hot side and the cold side), increases both the generating capacity and hence the conversion efficiency of the module.

Performance Parameters

Parameters for Hot Side Temp 250°C and Cold Side 30°C	
Matched Load Output Power	11.3W
Matched Load Resistance	5.25Ω ± 15%
Open Circuit Voltage	15.4V
Matched Load Output Current	1.47A
Matched Load Output Voltage	7.7V
Heat Flow Through Module	~226W
Maximum. Compress. (non destructive)	1MPa
	Hot side : 250°C
Max Operation Temperature	Cold side: 175°C

Tel: +44 (0)116 279 689 / Fax. +44 (0)116 279 3490

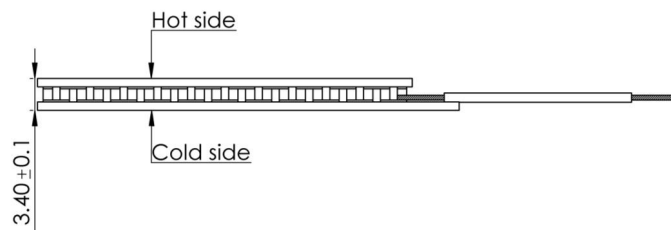
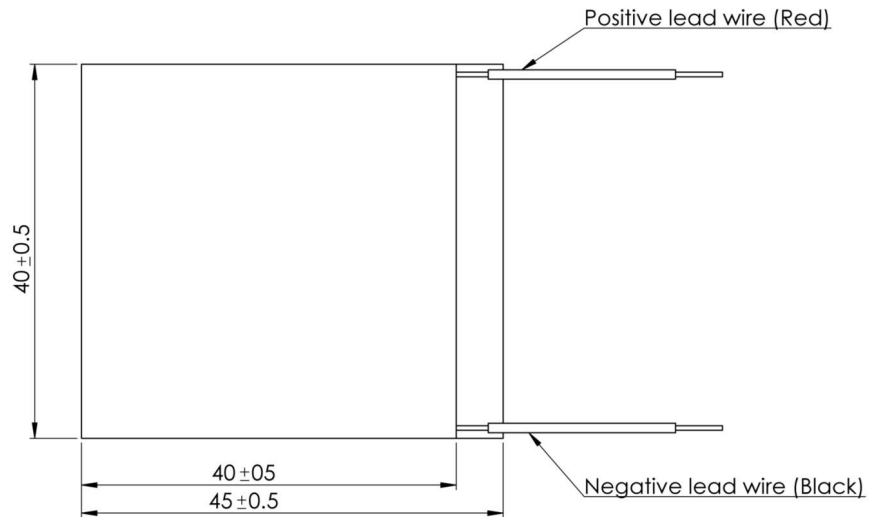
Email: Sales: sales@etdyn.com, information: info@etdyn.com

www.europanthermodynamics.com

Page 1 of 6



Dimensions: *Drawing



Appendice 6: Codice di controllo

```
#include <OneWire.h>
OneWire ds(2);
#include <Keypad.h>
#include <SPI.h>
#include <LiquidCrystal.h>
/*****
#define BUTTON A10
#define BACKLIGHT 22
#define MOTDIME 2000
#define LCDTIME 3000
#define SETMODETIME 2000
#define DEBUG
int ev1=0;
int ev2=0;
int evp=5;
int evu=6;
int evd=7;
int evt=8;
int ev=0;
int ev5=31;
int ev6=35;
int pwma=3;//pompa riempimento camera
int pwmb=11;//pompa ricircolo
int csec= 0;
int cs=0;
int tmsurata=0;
int tempoa=0;
int tempotot=0;
int dira=12;
int dirb=13;
int peltier=10;
int direzione=9;
int k=0;
int tmin=0;
int tmax=0;
int temp=0;
/*****
unsigned long tempoazionesostanza1=0;
unsigned long tempoazionesostanza2=0;
unsigned long tempoazionesostanza3=0;
unsigned long tempototalesostanza1=0;
unsigned long tempototalesostanza2=0;
unsigned long tempototalesostanza3=0;
int temposwitchricircolo=0;
int tipodipompa=0;
int portatarieripimentocamera=0;
int portataricircolo=0;
unsigned long temporcl=0;
unsigned long temposl=0;
unsigned long temposc=0;
unsigned long temposlrc=0;
double valore1=0;
o

double valore2=0;
int temperatura1=0;
int temperatura2=0;
int temperatura3=0;
// CODICE PER LA TASTIERA
const byte ROWS=4 ; const byte COLS=3 ;

char key[ROWS][COLS] = {
  {'1','2','3'},
  {'4','5','6'},
  {'7','8','9'},
  {'*','0','#'}}
{ buttonPress = 2; }
{ buttonPress = 3; }
{ buttonPress = 4; }
{ buttonPress = 5; }
};

byte rowPins[ROWS] = {25,29,33,37};//connect to the row pinouts of the keypad byte colPins[COLS] = {41,45,49};//connect
to the column pinouts of the keypad

Keypad kpd =Keypad( makeKeymap(key), rowPins, colPins, ROWS, COLS);
```

```

void impostazioni() {
    lcd.clear();
    lcd.setCursor(0,0);
    lcd.print( "Menu " );
    lcd.setCursor(0,1);
    lcd.print( "Impostazioni" );
    delay( SETMODETIME ); boolean impostazioniMode int setModeLevel = 0; lcd.clear();

    char key=kpd.getKey();
    =true;

    while ( impostazioniMode ) {
    if ( ctrlButton(analogRead( BUTTON )) == 5 ) && setModeLevel < 32 ) { lcd.clear(); s if ( ctrlButton(analogRead( BUTTON
)) == 4 ) && setModeLevel > 0 ) { lcd.clear(); se

    if ( ctrlButton(analogRead( BUTTON )) == 1 )

    /*****/
    #ifdef DEBUG
        Serial.print( "setMenuLevel: " );
        Serial.println( setModeLevel );
    #endif

    /*****/
    switch ( setModeLevel ) {
    case 0:
        key=kpd.getKey();
        switch (key)
        {
            case NO_KEY:
                break;
            case '0': case '1': case '2': case '3': case '4':
            case '5': case '6': case '7': case '8': case '9':
        } impostazioniMod
        e t e

        tempototalesostanza1 = tempototalesostanza1 * 10 + (key - '0'); sprintf(buffer, "%s %lu", secondario[(setModeLevel+1)],
        tempototalesostanza1

        break;

        case '#':
            tempototalesostanza1 = 0;
            lcd.clear();
            sprintf(buffer, "%s %lu", secondario[(setModeLevel+1)], tempototalesostanza1);
            break;
    }
    sprintf(buffer, "%s %lus", secondario[(setModeLevel+1)], tempototalesostanza1);
    break;

    case 2:
        key=kpd.getKey();
        switch (key)
        {
            case NO_KEY:
                break;
            case '0': case '1': case '2': case '3': case '4':
            case '5': case '6': case '7': case '8': case '9':
        }
        tempototalesostanza2 = tempototalesostanza2 * 10 + (key - '0'); sprintf(buffer, "%s %lus", secondario[(setModeLevel+1)],
        tempototalesostanza2

        break;

        case '#':
            tempototalesostanza2 = 0;
            lcd.clear();
            sprintf(buffer, "%s %lu", secondario[(setModeLevel+1)], tempototalesostanza2);
            break;
    }
    sprintf(buffer, "%s %lus", secondario[(setModeLevel+1)], tempototalesostanza2);
    break;

    case 4:
        key=kpd.getKey();
        switch (key)
        {
            case NO_KEY:

```

```

        break;
        case '0': case '1': case '2': case '3': case '4':
        case '5': case '6': case '7': case '8': case '9':

tempototalesostanza3 = tempototalesostanza3 * 10 + (key - '0'); sprintf(buffer, "%s %lus", secundario[(setModeLevel+1)],
tempototalesostanza3

break;

        case '#':
            tempototalesostanza3 = 0;
            lcd.clear();
            sprintf(buffer, "%s %lu", secundario[(setModeLevel+1)], tempototalesostanza3);
            break;
    }

    sprintf(buffer, "%s %lus", secundario[(setModeLevel+1)], tempototalesostanza3);
    break;
case 6:
    key=kpd.getKey();
    switch (key)
    {
        case NO_KEY:
            break;
        case '0': case '1': case '2': case '3': case '4':
        case '5': case '6': case '7': case '8': case '9':
tempoazionesostanza1 = tempoazionesostanza1 * 10 + (key - '0'); sprintf(buffer, "%s %lus", secundario[(setModeLevel+1)],
tempoazionesostanza1

break;

        case '#':
            tempoazionesostanza1 = 0;
            lcd.clear();
            sprintf(buffer, "%s %lu", secundario[(setModeLevel+1)], tempoazionesostanza1);
            break;
    }
    sprintf(buffer, "%s %lus", secundario[(setModeLevel+1)], tempoazionesostanza1);
    break;

case 8:
    key=kpd.getKey();
    switch (key)
    {
        case NO_KEY:
            break;
        case '0': case '1': case '2': case '3': case '4':
        case '5': case '6': case '7': case '8': case '9':
tempoazionesostanza2 = tempoazionesostanza2 * 10 + (key - '0'); sprintf(buffer, "%s %lus", secundario[(setModeLevel+1)],
tempoazionesostanza2

break;

        case '#':
            tempoazionesostanza2 = 0;
            lcd.clear();
            sprintf(buffer, "%s %lu", secundario[(setModeLevel+1)], tempoazionesostanza2);
            break;
    }
    sprintf(buffer, "%s %lus", secundario[(setModeLevel+1)], tempoazionesostanza2);
    break;

case 10:

key=kpd.getKey();
    switch (key)
    {
        case NO_KEY:
            break;
        case '0': case '1': case '2': case '3': case '4':
        case '5': case '6': case '7': case '8': case '9':
tempoazionesostanza3 = tempoazionesostanza3 * 10 + (key - '0'); sprintf(buffer, "%s %lus", secundario[(setModeLevel+1)],
tempoazionesostanza3

break;

```

```

        case '#':
            tempoazionesostanza3 = 0;
            lcd.clear();
            sprintf(buffer,"%s %lu", secondario[(setModeLevel+1)], tempoazionesostanza3);
            break;
    }
    sprintf(buffer,"%s %lus", secondario[(setModeLevel+1)], tempoazionesostanza3);
    break;

    case 12:
        key=kpd.getKey();
        switch (key)
        {
            case NO_KEY:
                break;
            case '0': case '1': case '2': case '3': case '4':
            case '5': case '6': case '7': case '8': case '9':
                temposwitchricircolo = temposwitchricircolo * 10 + (key - '0'); sprintf(buffer,"%s %ds", secondario[(setModeLevel+1)],
                temposwitchricircolo)

        break;

        case '#':
            temposwitchricircolo = 0;
    )

;

        lcd.clear();
        sprintf(buffer,"%s %d", secondario[(setModeLevel+1)], temposwitchricircolo);
    break; }

    sprintf(buffer,"%s %ds", secondario[(setModeLevel+1)], temposwitchricircolo);
    break;
case 14:
    key=kpd.getKey();
    switch (key)
    {
        case NO_KEY:
            break;
        case '0': case '1': case '2': case '3': case '4':
        case '5': case '6': case '7': case '8': case '9':
            portataricircolo = portataricircolo * 10 + (key - '0');sprintf(buffer,"%s %dmL/min", secondario[(setModeLevel+1)],
            portataricircolo

    break;

        case '#':
            portataricircolo = 0;
            lcd.clear();
            sprintf(buffer,"%s %d", secondario[(setModeLevel+1)], portataricircolo);
            break;
    }
    sprintf(buffer,"%s %dmL/min", secondario[(setModeLevel+1)], portataricircolo);
    break;

case 16:
    key=kpd.getKey();
    switch (key)
    {
        case NO_KEY:
            break;
        case '0': case '1': case '2': case '3': case '4':
        case '5': case '6': case '7': case '8': case '9':
            portatariementocamera = portatariementocamera * 10 + (key - '0'); sprintf(buffer,"%s %dmL/min",
            secondario[(setModeLevel+1)], portatariempimen

    break;

        case '#':
            portatariementocamera = 0;
            lcd.clear();
            sprintf(buffer,"%s %d", secondario[(setModeLevel+1)], portatariementocamer
            break;
    }
    sprintf(buffer,"%s %dmL/min", secondario[(setModeLevel+1)], portatariementoca
    break;

```

```

case 18:
    key=kpd.getKey();
    switch (key)
    {
        case NO_KEY:
            break;
        case '0': case '1': case '2': case '3': case '4':
        case '5': case '6': case '7': case '8': case '9':
tipodipompa = tipodipompa * 10 + (key - '0');printf(buffer,"%s %d", secundario[(setModeLevel+1)], tipodipompa);

break;

        case '#':
            tipodipompa = 0;
            lcd.clear();
            printf(buffer,"%s %d", secundario[(setModeLevel+1)], tipodipompa);
            break;
    }
    printf(buffer,"%s %d", secundario[(setModeLevel+1)], tipodipompa);
break;

case 20:
    key=kpd.getKey();
    switch (key)
    {
        case NO_KEY:
            break;
        case '0': case '1': case '2': case '3': case '4':
        case '5': case '6': case '7': case '8': case '9':
temporcl = temporcl * 10 + (key - '0');printf(buffer,"%s %lus", secundario[(setModeLevel+1)], temporcl);

break;

        case '#':
            temporcl = 0;
            lcd.clear();
            printf(buffer,"%s %lu", secundario[(setModeLevel+1)], temporcl);
            break;
    }

printf(buffer,"%s %lus", secundario[(setModeLevel+1)], temporcl);

break;
case 22:
    key=kpd.getKey();
    switch (key)
    {
        case NO_KEY:
            break;
        case '0': case '1': case '2': case '3': case '4':
        case '5': case '6': case '7': case '8': case '9':
temposl = temposl * 10 + (key - '0');printf(buffer,"%s %lus", secundario[(setModeLevel+1)], temposl);

break;

        case '#':
            temposl = 0;
            lcd.clear();
            printf(buffer,"%s %lu", secundario[(setModeLevel+1)], temposl);
break; }

printf(buffer,"%s %lus", secundario[(setModeLevel+1)], temposl);
break;
case 24:
    key=kpd.getKey();
    switch (key)
    {
        case NO_KEY:
            break;
        case '0': case '1': case '2': case '3': case '4':
        case '5': case '6': case '7': case '8': case '9':
temposc = temposc * 10 + (key - '0');printf(buffer,"%s %lus", secundario[(setModeLevel+1)], temposc);

break;

        case '#':
            temposc = 0;

```

```

        lcd.clear();
        sprintf(buffer, "%s %lu", secundario[(setModeLevel+1)], temposc);
break; }

    sprintf(buffer, "%s %lus", secundario[(setModeLevel+1)], temposc);
break;
    case 26:
key=kpd.getKey();
switch (key)
{
    case NO_KEY:
        break;
    case '0': case '1': case '2': case '3': case '4':
    case '5': case '6': case '7': case '8': case '9':
temposlrc = temposlrc * 10 + (key - '0');sprintf(buffer, "%s %lus", secundario[(setModeLevel+1)], temposlrc);

break;

    case '#':
        temposlrc = 0;
        lcd.clear();
        sprintf(buffer, "%s %lu", secundario[(setModeLevel+1)], temposlrc);
        break;
}
    sprintf(buffer, "%s %lus", secundario[(setModeLevel+1)], temposlrc);
break;

    case 28:
key=kpd.getKey();
switch (key)
{
    case NO_KEY:
        break;
    case '0': case '1': case '2': case '3': case '4':
    case '5': case '6': case '7': case '8': case '9':
temperatura1 = temperatura1 * 10 + (key - '0');sprintf(buffer, "%s %d C", secundario[(setModeLevel+1)], temperatura1);

break;

    case '#':
        temperatura1 = 0;
        lcd.clear();
        sprintf(buffer, "%s %d C", secundario[(setModeLevel+1)], temperatura1);
        break;
}
    sprintf(buffer, "%s %d C", secundario[(setModeLevel+1)], temperatura1);
break;

    case 30:
key=kpd.getKey();
switch (key)

{
    case NO_KEY:
        break;
    case '0': case '1': case '2': case '3': case '4':
    case '5': case '6': case '7': case '8': case '9':
temperatura2 = temperatura2 * 10 + (key - '0');sprintf(buffer, "%s %d C", secundario[(setModeLevel+1)], temperatura2);

break;

    case '#':
        temperatura2 = 0;
        lcd.clear();
        sprintf(buffer, "%s %d C", secundario[(setModeLevel+1)], temperatura2);
        break;
}
    sprintf(buffer, "%s %d C", secundario[(setModeLevel+1)], temperatura2);
break;

    case 32:
key=kpd.getKey();
switch (key)
{
    case NO_KEY:
        break;
    case '0': case '1': case '2': case '3': case '4':
    case '5': case '6': case '7': case '8': case '9':

```

```

temperatura3 = temperatura3 * 10 + (key - '0');printf(buffer,"%s %d C", secondario[(setModeLevel+1)], temperatura3);

break;

    case '#':
        temperatura3 = 0;
        lcd.clear();
        sprintf(buffer,"%s %d C", secondario[(setModeLevel+1)], temperatura3);
        break;
    }
    sprintf(buffer,"%s %d C", secondario[(setModeLevel+1)], temperatura3);
break; }

if (tipodipompa==1) { valore1=((portataricircolo+15.19)/0.24);//sfrutto la retta di
valore2=((portatariempimentocamera+15.19)/0.24);}

else if (tipodipompa==2) { valore1=255;
                           valore2=255;}

c

/*****/
    lcd.setCursor(0,0);
    lcd.print( secondario[setModeLevel] );
    lcd.setCursor(0,1);
    lcd.print( buffer );
    /*****/
    delay( 200 );
}

/*****/
lcd.clear();
}
void 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(650);
    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();
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(cs); Serial.print(" Time ");

float tmisurata = celsius;
lcd.clear();
lcd.setCursor(0, 0);
lcd.print( "T=" );
lcd.setCursor(6, 0);
lcd.print( tmisurata );
lcd.print(" C");
tmin=temp-1;
tmax=temp+1;
if (tmin<tmisurata<tmax) {
analogWrite (peltier,0); }
if (tmisurata<tmin) {
digitalWrite (direzione,HIGH);
analogWrite (peltier,255);
}
if (tmisurata>tmax)
{
digitalWrite (direzione,LOW);
analogWrite (peltier,255);
}
lcd.clear();
lcd.setCursor(0, 0);
lcd.print( "T=" );
lcd.setCursor(6, 0);
lcd.print( tmisurata );
lcd.print(" C");
}

void Ricirc (unsigned long tempo,int inte) {
unsigned long cseccr=0;
int k=0;
int a=1;
int num=0;
int intervalloTemp=0;
while (cseccr<(tempo)) {
if (cseccr<(a*inte)) {if (cseccr==intervalloTemp*20) {temperatura();

intervalloTemp=intervalloTemp+1;
}
digitalWrite (ev5,LOW);
digitalWrite (ev6,LOW);
digitalWrite (evp,LOW);
digitalWrite (evd,LOW);
digitalWrite (evu,LOW);
digitalWrite (evt,LOW);
analogWrite (pwmb,valore1);
digitalWrite (dirb,LOW);//direzione antioraria;
analogWrite (pwma,0);
digitalWrite (dira,LOW);
delay (1000);
cseccr=cseccr+1;
}
else if (cseccr==(a*inte)) {for (k=(a*inte);k<((a+1)*inte);k++)
}
}
}

```

```

        if (csecr==intervallotemp*20) {temperatura();
intervallotemp=intervallotemp+1;
        digitalWrite (ev5,LOW);
        digitalWrite (ev6,LOW);
        digitalWrite (evd,LOW);
        digitalWrite (evu,LOW);
        digitalWrite (evt,LOW);
        analogWrite (pwmb,0);
        analogWrite (pwma,0);
        delay (1000);
        }
        csecr=k;
        a=a+2;
    }//
} //
} //void setPump (int nomeSostanza,unsigned long tempo){

    switch ( nomeSostanza ){
    case 1:
        tempoa=tempo;
        ev=evu;
        ev1=evd;
        ev2=evt;
        temp=temperatura1;
        break;
    case 2:
        tempoa=tempo;
        ev=evd;
        ev1=evu;
        ev2=evt;
        temp=temperatura2;
        break;
    case 3:
        tempoa=tempo;
        ev=evt;
        ev1=evd;
        ev2=evu;
        temp=temperatura3;
        break;
    }
    tempotot=temporcl+temposl+temposlrc+temposc;//tempo riempimento camera+linea
    //tempo svuotamento linea //tempo svuotamento linea ricircolo nella //tempo svuotamento camera nel waste

    for (csec=0; csec<(temposl+temporcl+1); csec++) {
        if (csec==0){//comincia il riempimento camera e linea
        digitalWrite (ev,HIGH);
        digitalWrite (ev1,LOW);
        digitalWrite (ev2,LOW);
        digitalWrite (ev6,HIGH);
        digitalWrite (ev5,LOW);
        digitalWrite (evp,LOW);
        analogWrite (pwma,valore2);
        digitalWrite (dira,HIGH);
        analogWrite (pwmb,0);
        digitalWrite (dirb,LOW);
        }
    }

    c

    else if (csec==temporcl) {//si chiude valvola pompa e comincia a svuotarsi la linea digitalWrite (dira,LOW);analogWrite
    (pwma,255);digitalWrite (evp,HIGH);

        digitalWrite (ev6,HIGH);
        digitalWrite (ev,HIGH);
    }
    else if (csec==((temporcl+temposl)-3))
    {
        digitalWrite (ev6,LOW);
        digitalWrite (dira,LOW);
        analogWrite (pwma,255);
        digitalWrite (evp,HIGH);
        digitalWrite (ev,HIGH);
    }
    }

    else if (csec==((temporcl+temposl)-1))
    {
        digitalWrite (ev6,LOW);
        digitalWrite (ev,HIGH);
        digitalWrite (dira,LOW);
        digitalWrite (pwma,255);
    }
}

```

```

    digitalWrite (evp,LOW);
}

else if (csec==temposl+temporcl) { //comincia il ricircolo
    Ricirc (tempoa,temposwitchricircolo);
    break;
}
delay (1000);
}for (csec=(temposl+temporcl); csec<(tempotot+1); csec++){

if (csec>(temposl+temporcl) && csec<(temposl+temporcl+temposlrc+1)) { //comincia svuotam

    //comandi da definire
    digitalWrite (evp,HIGH);
    digitalWrite (ev6,LOW);
    digitalWrite (ev5,LOW);
    analogWrite (pwmb,255);
    digitalWrite (dirb,HIGH); //nel senso di riempimento della camera
e

    delay (1000);
}
else if (csec>(temposl+temporcl+temposlrc)) { //inizia svuotamento camera nel waste
    analogWrite (pwmb,255);
    digitalWrite (ev6,LOW);
    digitalWrite (ev5,HIGH);
    digitalWrite (dirb,LOW);
    delay (1000);
} // chiudo if
} //chiudo for
} //chiudo void
//
void avvio () {
    /******
    delay( SETMODETIME );
    /******
    int nprocessisost1=((tempototalesostanza1)/(temporcl+temposl+temposc+temposlrc+tempoaz
    int nprocessisost2=((tempototalesostanza2)/(temporcl+temposl+temposc+temposlrc+tempoaz
    int nprocessisost3=((tempototalesostanza3)/(temporcl+temposl+temposc+temposlrc+tempoaz
    int nprocessitotali=nprocessisost1+nprocessisost2+nprocessisost3;
    int processi=1;
    int processi1=0;
    int processi2=0;
    int processi3=0;
    while (processi<(nprocessitotali+1)) {
if (processi<(nprocessisost1+1)) {

        setPump(1,tempoazionesostanza1);
        processi=processi+1;
i i i

    }

else if (processi>(nprocessisost1) && processi<((nprocessisost1+nprocessisost2)+1))
    setPump(2,tempoazionesostanza2);
    processi=processi+1;
}

else if (processi> ((nprocessisost1+nprocessisost2)) && processi<(nprocessitotali+
    setPump (3,tempoazionesostanza3);
    processi=processi+1;
}

    unsigned long contatore=0;
    for (contatore=1;contatore<1000000000;contatore++)
    {
    analogWrite (pwma, 0);
    analogWrite (pwmb, 0);
    digitalWrite (evu,LOW);
    digitalWrite (evd,LOW);
    digitalWrite (evt,LOW);
    digitalWrite (evp,LOW);
    digitalWrite (ev5,LOW);
    digitalWrite (ev6,LOW);
    analogWrite (peltier,0);
    delay (1000);
    }}
}

```

```

}

//chiudo for

void setup() {
  #ifdef DEBUG
    Serial.begin ( 9600 );
    Serial.println ("Avvio");
  #endif

  1

  /******
  pinMode( BACKLIGHT,OUTPUT );
  digitalWrite( BACKLIGHT,LOW );
  /******
  lcd.begin(16, 2);
  lcd.createChar(1, symbolselect);
  lcd.createChar(2, symbolplay);
  lcd.createChar(3, symbolstop);
  lcd.createChar(4, symbolpause);
  /******
  digitalWrite( BACKLIGHT,HIGH );
  lcd.setCursor(0,0);
  lcd.print(line0);
  lcd.setCursor(0,1);
  lcd.print(line1);
  delay( MOTDIME );
  lcdBlacklightOff();
  pinMode (pwma,OUTPUT);
  pinMode (pwmb,OUTPUT);
  pinMode (dira,OUTPUT);
  pinMode (dirb,OUTPUT);
  pinMode (peltier,OUTPUT);
  pinMode (direzione,OUTPUT);
  pinMode (evu,OUTPUT);
  pinMode (evd,OUTPUT);
  pinMode (evt,OUTPUT);
  pinMode (evp,OUTPUT);
  pinMode (ev5,OUTPUT);
  pinMode (ev6,OUTPUT);
  digitalWrite (evp,LOW);
  digitalWrite (evu,LOW);
  digitalWrite (evd,LOW);
  digitalWrite (evt,LOW);
  digitalWrite (dira,LOW);
  digitalWrite (dirb,LOW);
  setPwmFrequency(pwma, 8);
  setPwmFrequency(pwmb, 8);
  //setPwmFrequency(10,8);
  delay(3000);
  }
  void loop() {

  /******
  #ifdef DEBUG
    Serial.print( " Button: "
    Serial.print( " TimeToBlecklight "
    Serial.print( " TimeToSetHour "
  #endif

  );Serial.print( analogRead( BUTTON ) );
  );Serial.print( timeToBacklight );
  );Serial.println( timeToSetMode );
  /******
  if ( ctrlButton(analogRead( BUTTON ) ) == 0 || ctrlButton(analogRead( BUTTON ) ) > 1 if (timeToSetMode > 0 && SETMODETIME
  < (millis() - timeToSetMode) ) { menuMode(); timeTo

  /******
  buttonPress = ctrlButton(analogRead( BUTTON ) );

  /******
  if ( (backlightStatus) && LCDTIME < (millis() - timeToBacklight) ) { lcdBlacklightOff()
  /******
  char line0[16] = " in attesa di "; char line1[16] = " comandi ..";

  /******
  lcd.setCursor(0,0);
  lcd.print(line0);

```

```
lcd.setCursor(0,1);  
lcd.print(line1);  
}
```

```
/*****/
```