

# POLITECNICO DI MILANO

Scuola di Ingegneria Industriale e dell'Informazione

Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica



## **INTEGRAZIONE DI CONDIZIONAMENTO DINAMICO E CARATTERIZZAZIONE BIOMECCANICA IN UN SISTEMA DI CULTURA PER VASI DI PICCOLO CALIBRO**

Relatori

Prof. Ing. Gianfranco Beniamino Fiore

Prof. Ing. Monica Soncini

Correlatore

Ing. Nina Bono

Tesi di Laurea di

Alessandra MARZORATI,

Matr. nr. 782023

Michela PIN,

Matr. nr. 781927

Anno Accademico 2013 – 2014

# Indice

<b>Sommario</b> .....	<b>I</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>X</b>
<b>Obiettivi e ordinamento del lavoro</b> .....	<b>1</b>
<b>Capitolo 1- Il ruolo dei bioreattori nell'ingegneria dei tessuti</b> .....	<b>4</b>
1.1. Ingegneria dei tessuti .....	4
1.2. Tipologie di bioreattori .....	10
1.2.1. Bioreattore come sistema di attuazione.....	11
1.2.2. Bioreattore come sistema di monitoraggio e controllo .....	13
1.2.3. Bioreattore come sistema modello .....	14
1.3. Disturbi cardiovascolari e trattamenti clinici in uso.....	15
1.3.1. Struttura dei vasi sanguigni .....	16
1.3.2. Sostituti vascolari nativi.....	18
1.3.3. Sostituti vascolari sintetici .....	19
1.4. Conclusioni .....	21
<b>Capitolo 2- Stato dell'arte</b> .....	<b>23</b>
2.1. Tipologie di costrutti .....	23
2.1.1. Costrutti con <i>scaffold</i> .....	24
2.1.1.1. Matrici decellularizzate .....	24
2.1.1.2. Scaffold biodegradabili .....	25
2.1.1.3. Biopolimeri .....	28
2.1.2. Fogli cellulari.....	30
2.2. Strategie di coltura .....	33
2.2.1. Coltura statica .....	33
2.2.2. Coltura dinamica .....	37
2.2.2.1. Perfusione .....	38
2.2.2.2. Deformazione ciclica.....	45
2.2.2.3. Impianto in vivo.....	51
2.3. Analisi critica e spunti per lo sviluppo del lavoro.....	53
<b>Capitolo 3- Materiali e Metodi</b> .....	<b>55</b>
3.1. Generalità.....	56

3.1.1. Sistema di <i>organ culture</i> per vene safene preesistente.....	57
3.2. Linee guida generali per l'integrazione del sistema.....	59
3.2.1. Specifiche di progetto.....	60
3.3. Ottimizzazione della camera di coltura .....	61
3.3.1. Prototipo 1: sistema a vite.....	61
3.3.2. Prototipo 2: sistema a carrello .....	65
3.4. Architettura del modulo per la coltura dinamica .....	68
3.4.1. Sottosistema idraulico .....	70
3.4.2. Sottosistema di Monitoraggio e Controllo.....	71
3.5. Architettura del modulo per la caratterizzazione meccanica .....	75
3.5.1. Sottosistema idraulico .....	75
3.5.2. Sottosistema di Monitoraggio e Controllo.....	76
3.6. Layout integrato del sistema .....	79
3.7. Previsione del comportamento meccanico del modulo per la coltura dinamica.....	82
3.7.1. Caratterizzazione della guaina in silicone .....	83
3.7.1.1. Curve di caratterizzazione pressione-volume .....	84
3.7.1.2. Curve di caratterizzazione pressione-deformazione.....	86
3.7.1.3. Correlazione dei risultati ottenuti nelle prove di caratterizzazione .....	90
3.7.2. Modello semiempirico.....	92
3.7.2.1. Generalizzazione del modello.....	95
<b>Capitolo 4 – Collaudo del modulo per la coltura ed esperimenti di verifica del modello .....</b>	<b>98</b>
4.1. Collaudo del sistema di stimolazione con guaina in silicone .....	98
4.1.1. Test di deformazione della guaina siliconica in condizioni dinamiche di esercizio .....	99
4.1.2. Collaudo a diverse frequenze di pulsazione .....	103
4.1.3. Test di deformazione della guaina siliconica per tempi prolungati .....	106
4.1.4. Test su guaine sottoposte a sterilizzazione .....	108
4.2. Esperimenti con campioni vascolari per la verifica del modello .....	109
4.2.1. Vasi nativi con diametro interno paragonabile a quello della guaina .....	112
4.2.1.1 . Risultati dell'analisi sperimentale .....	117
4.2.2. Vasi nativi con diametro interno maggiore rispetto a quello della guaina siliconica ...	118
4.2.2.1 . Risultati dell'analisi sperimentale .....	120
4.2.3. Vasi nativi con diametro interno minore rispetto a quello della guaina siliconica .....	123
4.2.3.1 . Risultati dell'analisi sperimentale .....	125

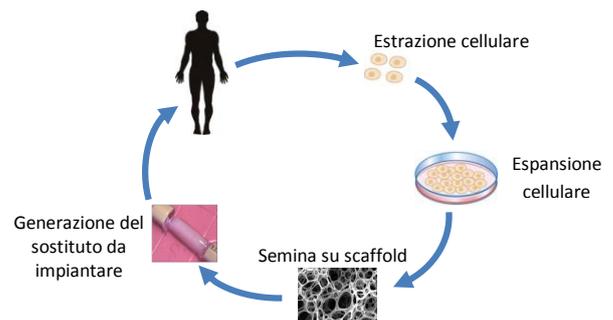
<b>Capitolo 5 – Collaudo del modulo per la caratterizzazione e prove di valutazione funzionale con campioni vascolari .....</b>	<b>129</b>
5.1 . Collaudo del MeCC come sistema di caratterizzazione .....	130
5.1.1. Collaudo con arterie mammarie interne porcine .....	131
5.1.1.1 Risultati delle prove con IMA.....	132
5.1.2. Collaudo con vasi ingegnerizzati.....	135
5.2 Test preliminari di <i>burst pressure</i> su vasi nativi porcini.....	136
5.2.1. Test di trazione uniassiale ad anello ( <i>ring test</i> ) .....	138
5.2.1.1 Risultati dei test di trazione uniassiale ad anello .....	141
5.3 Test di distensibilità.....	144
5.3.1. Risultati dei test di distensibilità.....	145
5.4 . Utilizzo del sistema in campagne sperimentali preliminari con costrutti ingegnerizzati ...	148
5.4.1. Messa in esercizio del sistema per la coltura di vasi sanguigni ingegnerizzati.....	148
5.4.2. Test di caratterizzazione meccanica sui costrutti ingegnerizzati .....	150
<b>Conclusioni e sviluppi futuri .....</b>	<b>151</b>
<b>APPENDICE A.....</b>	<b>159</b>
<b>APPENDICE B .....</b>	<b>161</b>
<b>APPENDICE C .....</b>	<b>167</b>
<b>APPENDICE D.....</b>	<b>174</b>
<b>APPENDICE E .....</b>	<b>176</b>
<b>APPENDICE F .....</b>	<b>178</b>
<b>APPENDICE G.....</b>	<b>180</b>
<b>APPENDICE H.....</b>	<b>187</b>
<b>APPENDICE I .....</b>	<b>188</b>
<b>Bibliografia.....</b>	<b>192</b>

# Sommaro

## 1. Introduzione

I vasi sanguigni possono perdere la loro funzionalità a causa di svariate patologie quali aneurismi, trombosi o aterosclerosi, che nel caso di vasi arteriosi possono causare stenosi, e di conseguenza, ischemia dei tessuti a valle. Quando un intervento chirurgico (ad esempio l'inserimento di *stent* o angioplastica con palloncino) non risulta sufficiente per ripristinare la pervietà del vaso, è richiesta la sostituzione del tratto danneggiato mediante la procedura di *bypass*. In particolare, sono molti gli interventi chirurgici che prevedono la sostituzione di vasi di piccolo calibro, facendo sorgere l'esigenza di avere a disposizione sostituti vascolari adatti a questo impiego. Sebbene i vasi autologhi siano quelli preferibilmente utilizzati in questo tipo di operazione, spesso possono non risultare disponibili perché danneggiati o già utilizzati per altri interventi [1]. In questo ambito l'ingegneria dei tessuti (*Tissue Engineering*, TE) si presenta come un promettente approccio per lo sviluppo di vasi sanguigni ingegnerizzati (TEBVs, *Tissue Engineering Blood Vessels*) di piccolo calibro che potrebbero essere utilizzati negli interventi di *bypass*.

La strategia messa in atto dalla TE prevede l'utilizzo di cellule seminate su uno *scaffold*, una struttura che funge da supporto temporaneo per la crescita cellulare; inoltre, per permettere l'adeguato sviluppo del costrutto, è richiesto anche un opportuno condizionamento meccanico e chimico (Figura 1).



**Figura 1.** Paradigma della TE. Estrazione delle cellule tramite biopsia, espansione e semina sullo *scaffold*. Infine il costrutto ottenuto viene impiantato nel paziente.

In questo contesto, i bioreattori giocano un ruolo fondamentale nello sviluppo della TE. Con il termine bioreattore si intende un dispositivo utilizzato per condurre colture cellulari dinamiche mediante l'applicazione di stimoli biologici, biochimici e/o biomeccanici in un ambiente altamente controllato, cioè in condizioni operative (per esempio pH, pressione parziale di gas, temperatura) standardizzate e riproducibili [2]. Inoltre questi dispositivi possono essere utilizzati come sistemi modello per indagare l'effetto di forze fisiche sullo sviluppo di un

tessuto, predire la risposta del campione una volta impiantato in vivo ed effettuare esperimenti di screening farmacologico.

Un bioreattore può essere costituito da diverse parti: una camera di coltura, una riserva di medium, un sistema di scambio di gas e di ricambio del mezzo di coltura, una strumentazione per il monitoraggio e il controllo.

In questo ambito si colloca il presente lavoro di tesi, condotto presso il Laboratorio di Micro e Biofluidodinamica Sperimentale ( $\mu$ BSLab) del Politecnico di Milano che collabora, nel settore della TE cardiovascolare, con diversi laboratori di ricerca (laboratori di biologia e unità di cardiocirurgia e veterinaria). L'obiettivo del lavoro è stato quello di integrare in una piattaforma (denominata MeCC, Mechanobioreactor for Culture and Characterization) la possibilità di coltivare strutture vascolari tubulari con quella di svolgere caratterizzazione meccanica sulle stesse per valutarne le proprietà meccaniche. In particolare il sistema è stato progettato al fine di applicare in vitro stimoli emodinamici simili a quelli fisiologici (*shear stress*, deformazione circonferenziale ciclica) e di permettere la caratterizzazione di campioni biologici in termini di pressione a rottura (*burst pressure*, BP) e *compliance*.

## **2. Materiali e Metodi**

Il MeCC rappresenta l'evoluzione di un sistema precedentemente sviluppato presso il  $\mu$ BSLab ed attualmente in uso presso il Centro Cardiologico Monzino [3, 4]. Il MeCC è stato progettato con lo scopo di accrescere la versatilità del sistema di coltura esistente in termini di tipologia e geometria della struttura alloggiata al proprio interno, nonché permettere la misura delle proprietà meccaniche dei campioni biologici posti nella camera di coltura tramite l'esecuzione di prove di BP e *compliance*.

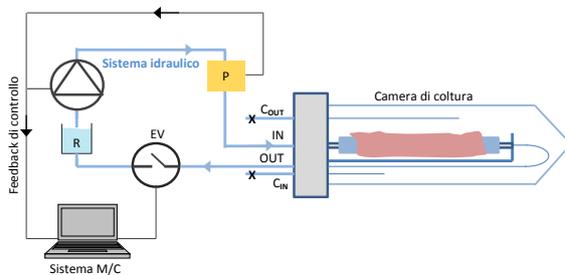
La fase di progettazione del MeCC si è basata sull'individuazione delle specifiche generali che deve soddisfare un bioreattore impiegato nel settore della TE: biocompatibilità dei materiali, sterilizzabilità (e.g. con autoclave o ossido di etilene), trasparenza (per permettere un controllo visivo dei cambiamenti di colorazione del medium), facilità di assemblaggio sotto cappa a flusso laminare e incremento del trasporto di massa.

Per il MeCC sono stati identificati inoltre requisiti specifici: versatilità, capacità di applicare deformazione ciclica circonferenziale e/o perfusione e di indagare le proprietà biomeccaniche principali per la caratterizzazione di un vaso sanguigno.

### **Architettura del MeCC**

Il layout del sistema è mostrato in Figura 2. Esso si compone di una camera di coltura, un

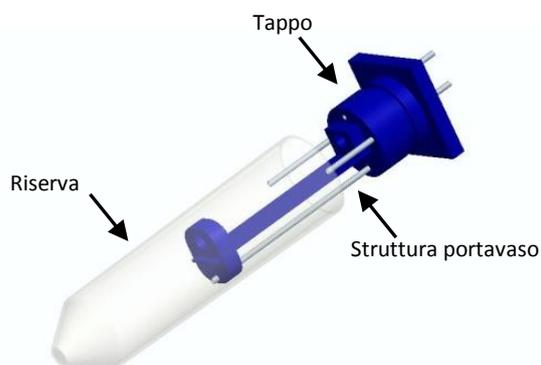
sottosistema idraulico e un sottosistema di Monitoraggio e Controllo (M/C). Quest'ultimo regola il funzionamento degli attuatori (una pompa e un'elettrovalvola) in modo da permettere sia la coltura che la caratterizzazione meccanica dei campioni alloggiati.



**Figura 2.** Schema del layout del sistema di stimolazione sviluppato. In azzurro il circuito idraulico, in nero il sistema di M/C.

### Progettazione della camera di coltura

La camera di coltura realizzata è il risultato dell'evoluzione del progetto precedentemente sviluppato presso il  $\mu$ BSLab [3, 4]. Essa prevede un telaio portavaso e una riserva (Figura 3).



**Figura 3.** Disegno CAD del prototipo sviluppato parzialmente assemblato.

Il telaio è stato disegnato tramite un software di modellazione CAD 3D (Proengineer, PTC) ed è stato realizzato tramite fresa a controllo numerico (Modela MDX-40) e laser (Versalaser VSL2.30, SK Laser), a partire da blocchi in polimetilmetacrilato. Il telaio si compone di un tappo, una sottile lastra che funge da base e un carrello che, traslando orizzontalmente, permette all'operatore di regolare la distanza entro cui calzare la struttura tubolare. In questo modo è possibile alloggiare campioni di lunghezza compresa tra 14 e 55 mm.

Il campione viene calzato su due connettori in polipropilene (Cole Parmer Instrument Company), uno inserito nel tappo e l'altro avvitato nel carrello, e viene mantenuto in sede tramite filo di seta e/o lacci in silicone per utilizzo chirurgico (*vessel loop*, Tecnokit S.r.l.). La riserva è una Falcon commerciale da 50 ml. L'accoppiamento tra riserva e telaio portavaso è stato realizzato mediante un O-ring in silicone.

### Architettura del circuito di stimolazione

Il circuito di stimolazione che si interfaccia con la camera di coltura è stato realizzando integrando due sistemi sviluppati precedentemente presso il  $\mu$ BSLab [5, 6]. Esso risulta composto da un sottosistema idraulico e da un sottosistema di M/C.

Il sottosistema idraulico è costituito da un sistema pompante (pompa peristaltica

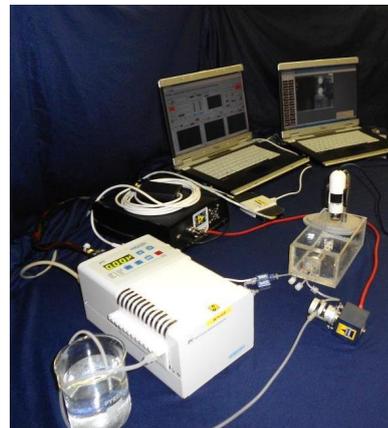
Watson-Marlow 323 DU, Watson-Marlow Group) e dalla circuiteria di raccordo (tubi in silicone Platinum Cured con diametro interno pari a 1.6 mm e spessore 0.8 mm, Tygon®, SaintGobain). La lunghezza di tali tubi risulta pari a 2 m, dimensione necessaria sia per garantire la connessione tra le parti inserite all'interno dell'incubatore (camera di coltura) e le componenti esterne (pompa ed elettrovalvola), sia per limitare l'ingombro del sistema e contenere le perdite di carico lungo il circuito idraulico.

Il sottosistema di M/C, invece, è costituito da componenti hardware e software. Esso permette il controllo della pompa peristaltica (Watson Marlow 323 DU) e dell'elettrovalvola pinza tubo (Z110A 24V, Sirai Elettromeccanica). Un sensore di pressione Press-S-000 (PendoTECH) permette invece l'acquisizione del segnale pressorio. Gli attuatori idraulici sono connessi ad un PC tramite una scheda di acquisizione analogico/digitale (DAQCard NI 6036E, National instruments) e una centralina costruita *ad hoc* ed il loro funzionamento è gestito da due software sviluppati in LabView (National Instruments): PINE per la fase di coltura e C-SO per quella di caratterizzazione meccanica.

Il sistema di M/C riceve in ingresso segnali dalla camera di coltura tramite il sensore di pressione e regola opportunamente la portata erogata dalla pompa mediante un controllo in retroazione (anello chiuso). Il

controllo della deformazione ciclica, invece, è attuato mediante un sistema ad anello aperto, che ha comportato la necessità di effettuare una specifica caratterizzazione dell'elemento siliconico, come descritto successivamente.

Utilizzando il sistema nella modalità per la caratterizzazione meccanica viene impiegato lo stesso circuito precedentemente descritto, ad eccezione dell'elemento pompante che viene sostituito da una pompa Ismatec IPCN-12 (IDEX Health & Science) e della scheda di acquisizione, sostituita da una scheda NI DAQ USB-6009 (National Instruments®) (Figura 4).



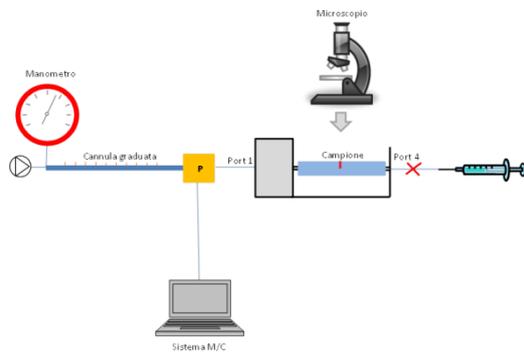
**Figura 4.** Setup sperimentale per test di caratterizzazione meccanica.

#### Caratterizzazione della guaina siliconica

Per incrementare la versatilità del sistema vengono utilizzate delle guaine silconiche (ID 2.5 mm e spessore 0.3 mm, Hilltop Products LTD) tramite le quali viene trasferito lo stimolo ai campioni posti in coltura. Questi elementi permettono infatti di stimolare qualsiasi tipo di costruito

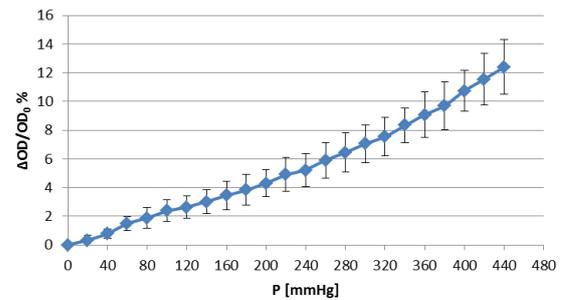
tubolare, anche quelli con bassa consistenza meccanica e che non sarebbero in grado di resistere a una sollecitazione diretta.

Le guaine silconiche hanno richiesto un'opportuna caratterizzazione per sopperire alla mancanza di un sistema di controllo ad anello chiuso della deformazione. La caratterizzazione è stata effettuata ricavando le curve pressione-volume e pressione-deformazione circonferenziale. Il setup per l'esecuzione delle prove è mostrato in Figura 5.



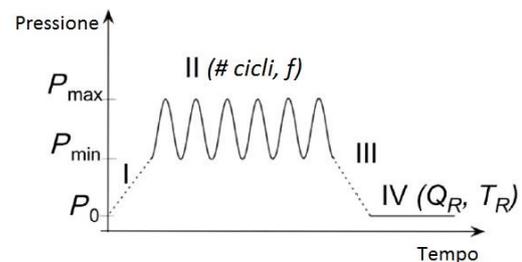
**Figura 5.** Schema del setup utilizzato per effettuare test di caratterizzazione della guaina in silicone.

La caratteristica pressione-deformazione circonferenziale (Figura 6) è stata utilizzata come curva di calibrazione per definire la pressione intraluminale da applicare alla guaina per ottenere la deformazione del diametro esterno desiderata.



**Figura 6.** Curva di calibrazione pressione-deformazione per la guaina silconica.

Il sistema infatti, è in grado di attuare una stimolazione ciclica compresa tra due valori pressori ( $P_{max}$  e  $P_{min}$ ): l'utente può ricavare dalla curva di calibrazione i valori di pressione massima e minima da applicare (Figura 7) per ottenere la deformazione circonferenziale desiderata del campione posto nella camera di coltura.



**Figura 7.** Grafico Pressione-Tempo rappresentante la stimolazione pulsatile attuata dal sistema: I, fase di carico; II, stimolo pulsatile tra valori di pressione massima e minima; III, fase di scarico; IV, fase di ricircolo.

#### Modello semiempirico del comportamento a distensione dei campioni

Per predire la deformazione circonferenziale dei campioni montati sulle guaine è stato sviluppato un modello semiempirico che si avvale dei risultati ottenuti dai test di caratterizzazione effettuati sulle guaine e su

vasi nativi. Il modello descrive analiticamente il comportamento dei campioni biologici montati sulle guaine, sotto le ipotesi di geometria cilindrica e assialsimmetrica e di materiale incomprimibile. Inserendo nel modello le dimensioni e le proprietà meccaniche dei campioni biologici, è possibile definire a priori il *range* pressorio da applicare alla guaina in funzione della deformazione circonferenziale del campione che si vuole ottenere.

#### **Collaudo del modulo per la coltura**

Il collaudo del modulo per la coltura e della strategia di stimolazione basata sull'uso della guaina è stato effettuato sottoponendo le strutture siliciche (n=6) a:

- prove di deformazione in condizioni dinamiche a temperatura ambiente. Le guaine sono state stimulate con  $P_{max}=380$  mmHg e  $\Delta P=360$  mmHg ed è stata analizzata la loro deformazione circonferenziale;
- prove di stimolazione a diverse frequenze (0.25, 0.5, 0.75, 1 Hz) per valutare che la dinamica di deformazione della guaina corrispondesse alla dinamica di applicazione dello stimolo;
- prove di stimolazione per tempi prolungati (7 giorni) a 37°C. Le guaine sono state stimulate per 7 giorni con  $P_{max}=420$  mmHg e  $\Delta P=380$  mmHg, inserendo la camera di coltura in una stufa a 37°C;

- prove di deformazione a seguito di sterilizzazione in autoclave, per verificare che la sterilizzazione non influenzasse le proprietà meccaniche della guaina.

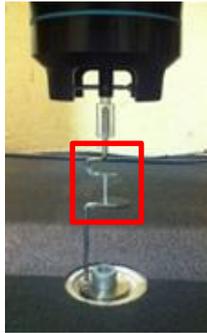
Per effettuare una verifica del modello sviluppato sono stati inoltre condotti test su arterie coronarie e mammarie interne (IMA) porcine, montate sulla guaina e stimulate ciclicamente con  $P_{max}=420$  mmHg e  $\Delta P=390$  mmHg (Figura 8).



**Figura 8.** Campione di IMA porcina calzato sulla guaina silicica e montato tra i due connettori del telaio portavaso del bioreattore.

#### **Collaudo del modulo di caratterizzazione e prove di valutazione funzionale con campioni vascolari**

Per collaudare il MeCC come sistema di caratterizzazione biomeccanica, sono stati sottoposti a test di *burst pressure* (BP) 12 tratti di IMA porcine ed un costrutto a base di collagene ed HELP (*Human Elastin-Like Protein*) realizzato presso il Laboratorio di Anatomia Umana dell'università del Piemonte Orientale di Novara. I risultati sono stati confrontati con i dati ottenuti dai *ring* test effettuati sugli stessi vasi (Figura 9).



**Figura 9.** Set-up dei *ring test*. Nell'immagine viene evidenziato il campione di materiale biologico durante l'esecuzione della prova.

Inoltre il MeCC è stato utilizzato per l'esecuzione di prove di BP su 13 campioni di arterie coronarie porcine.

Infine, vasi nativi porcini (arterie coronarie e IMA) sono stati caratterizzati tramite prove di distensibilità per ottenere informazioni necessarie allo sviluppo del modello semiempirico citato precedentemente.

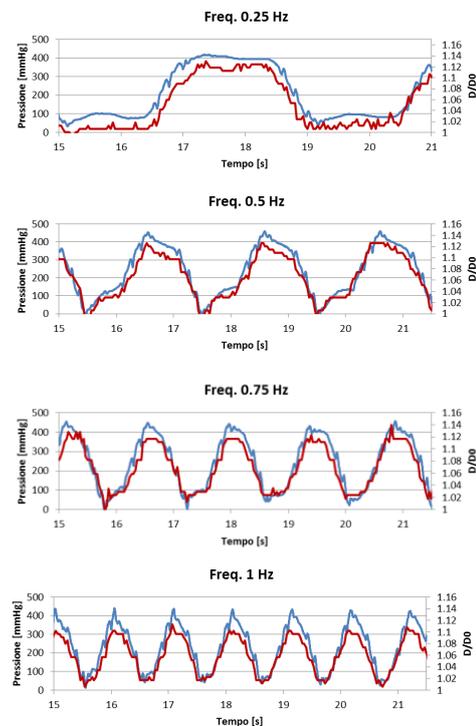
#### Utilizzo del sistema in campagne preliminari con costrutti ingegnerizzati

Il MeCC è stato utilizzato per la coltura in perfusione di vasi sanguigni ingegnerizzati ( $n=8$ ) realizzati con SMCs e *scaffold* biopolimerici in gel di collagene ( $ID=3.5$  mm, lunghezza=25 mm) [7]. I campioni, dopo una settimana di coltura in condizioni statiche sono stati montati all'interno del bioreattore e sottoposti a stimolazione dinamica. Questa è stata effettuata infondendo nei campioni una portata costante pari a 3, 5 e 10 ml/min, per differenti periodi di tempo (3, 7 e 14 giorni). I costrutti, al termine del periodo di coltura, sono stati sottoposti a test di

caratterizzazione meccanica (*ring test* e compressione).

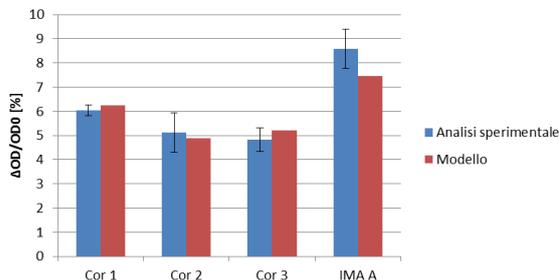
### 3. Risultati

I test eseguiti sulle guaine hanno dimostrato che le strutture silconiche preservano le loro caratteristiche meccaniche anche se sottoposte a lunghi periodi di deformazione ciclica (7 giorni) a temperatura da incubatore ( $37^{\circ}\text{C}$ ). Il collaudo del MeCC ha mostrato che il sistema è in grado di sollecitare il campione inserito nella camera di coltura con deformazione circonferenziale ciclica a differenti frequenze di stimolazione (Figura 10).



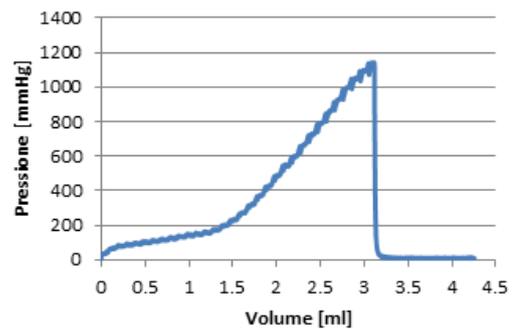
**Figura 10.** Grafici rappresentanti l'andamento del diametro normalizzato rispetto a quello iniziale (in rosso) e della stimolazione in pressione (in blu) in funzione del tempo alle frequenze di 0.25, 0.5, 0.75 e 1 Hz.

I test eseguiti sui vasi porcini montati sulla guaina silconica e sottoposti a sollecitazione ciclica hanno verificato la validità del modello sviluppato, il quale riesce a prevedere con sufficiente accuratezza la deformazione dei campioni in funzione dei valori pressori applicati. I valori di deformazione circonferenziale ricavati sperimentalmente stimolando i vasi con pressione massima pari a 420 mmHg sono stati infatti confrontati con quelli previsti dal modello (Figura 11).



**Figura 11.** Istogramma rappresentante i valori di deformazione circonferenziale esterna corrispondenti a pressione intraluminale massima di 420 mmHg ricavati dall'analisi sperimentale a confronto con quelli ricavati dal modello.

I test di collaudo del sistema di caratterizzazione biomeccanica eseguiti su campioni di IMA hanno permesso di ottimizzare il protocollo delle prove di BP (in Figura 12 un esempio del grafico volume-pressione ottenuto durante un esperimento).



**Figura 12.** Esempio di grafico volume-pressione ottenuto durante la prova di BP per un'arteria mammaria.

I test di caratterizzazione eseguiti sui vasi nativi hanno portato a risultati confrontabili con la letteratura:  $C = 1.9 \times 10^{-3} \text{ mmHg}^{-1}$  e  $BP = 1989 \pm 340 \text{ mmHg}^{-1}$ . La prova eseguita sul costruito in collagene ed HELP ha portato ad un risultato (14.7 mmHg) confrontabile con i valori di BP stimati dai *ring test* ( $14.3 \pm 1.3 \text{ mmHg}$ ). Questi esperimenti hanno consentito il collaudo del MeCC come sistema di caratterizzazione per vasi nativi e ingegnerizzati.

#### **4. Discussione**

Il lavoro di tesi ha portato all'ottenimento di un sistema in grado di coltivare e di caratterizzare strutture tubolari biologiche di piccolo calibro, come vasi sanguigni e TEBVs. Il MeCC appare funzionale, *user-friendly* e versatile, poichè permette l'alloggiamento di campioni di lunghezza variabile. Le ridotte dimensioni del sistema ne rendono anche semplice l'assemblaggio sotto cappa. La tecnica adottata per trasmettere la deformazione circonferenziale ciclica ai

campioni biologici alloggiati nella camera di coltura mediante una guaina siliconica consente di stimolare strutture tubolari, comprese quelle lasse o altamente permeabili ai fluidi, che non sarebbero in grado di sopportare una stimolazione diretta. In futuro, nell'ottica della realizzazione di costrutti ingegnerizzati, l'impiego della guaina di supporto consentirebbe di sviluppare TEBVs direttamente sulla struttura siliconica, riducendo al minimo la loro manipolazione.

I test di collaudo hanno dimostrato efficacia, robustezza e affidabilità del sistema. L'utilizzo del dispositivo per la coltura di costrutti ingegnerizzati ha inoltre dimostrato la sua capacità di mantenere la sterilità dell'ambiente di coltura fino a 14 giorni.

In conclusione, il MeCC è in grado di permettere la coltura in vitro e la caratterizzazione di strutture tubolari, in un ambiente controllato e in condizioni dinamiche ben riproducibili, nonostante il controllo della deformazione sia effettuato ad anello aperto. A tal proposito risulterebbe interessante inserire nel circuito di stimolazione un controllo retroazionato in deformazione tramite un sistema di *computer-vision*.

Il MeCC si presenta quindi come un promettente strumento per il condizionamento dinamico e lo studio delle proprietà principali di vasi sanguigni nativi o ingegnerizzati.

## **Bibliografia**

- [1] M. C. Tanzi, and A. Bianchi, *Approccio integrato per la medicina rigenerativa*, 2013.
- [2] I. Martin, D. Wendt, and M. Heberer, "The role of bioreactors in tissue engineering," *Trends Biotechnol*, vol. 22, no. 2, pp. 80-6, Feb, 2004.
- [3] N. Bono, and L. Casadonte, "Sviluppo di un sistema di coltura di segmenti di vena safena per lo studio ex vivo del vein graft disease," *Politecnico di Milano*, 2011.
- [4] M. Piola et al., "A compact and automated ex vivo vessel culture system for the pulsatile pressure conditioning of human saphenous veins," *J Tissue Eng Regen Med*, Jul, 2013.
- [5] R. Vismara et al., "A bioreactor with compliance monitoring for heart valve grafts," *Ann Biomed Eng*, vol. 38, no. 1, pp. 100-8, Jan, 2010.
- [6] F. Dal Dosso, "Sviluppo di un sistema per il monitoraggio e il controllo della stimolazione in pressione in applicazioni di ingegneria dei tessuti," *Politecnico di Milano*, 2012.
- [7] F. Boccafoschi et al., "The role of shear stress on mechanically stimulated engineered vascular substitutes: influence on mechanical and biological properties," *J Tissue Eng Regen Med*, vol. 6, no. 1, pp. 60-7, Jan, 2012.

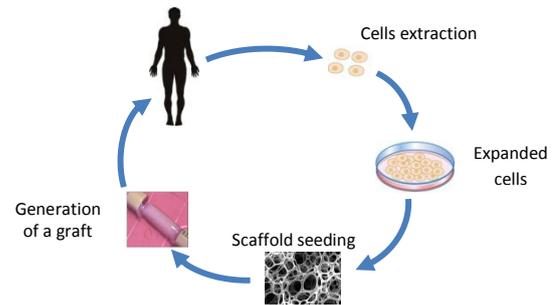
# Abstract

## 1. Introduction

Blood vessels can lose their function because of different pathologies, such as aneurism, thrombosis or atherosclerosis, that, in the case of arterial vessels, can cause tissue stenosis and thus ischemia. When normal surgical procedures such as stent insertion or angioplasty are not able to restore patency of the vessel, a bypass surgery is required. The need to obtain vessels substitutes is due to the large number of surgical procedures involving the replacement of small-caliber blood vessels. Although autologous vessels represent the gold standard, very often the native tissue is not available [1]. In this clinical scenario, vascular tissue engineering (TE) represents a promising approach for the development of living and functional small-diameter vascular grafts, which could be used for bypass surgery.

This strategy involves the use of cells seeded on scaffolds, that work as temporary supports for cell growth. In addition, an appropriate mechanical and chemical conditioning is required to allow the proper development of the constructs (Figure 1).

In this context, the use of bioreactors plays an important role in the field of TE.



**Figure 1.** Paradigm of TE. The cells, extracted via biopsy, are expanded and seeded on the scaffold; the resulting construct is implanted in the patient.

Bioreactors are generally defined as devices in which biological, biochemical and/or biomechanical processes develop under closely monitored and tightly controlled environmental and operating conditions (e.g. pH, temperature, pressure, nutrient supply and waste removal) [2]. Additionally, these devices can be used as model systems to investigate the effects that physical forces produce, to predict the behavior of the samples after *in vivo* implant and to perform pharmacological screening tests.

A bioreactor can be made up of different components: a culture chamber, a medium reservoir, a system of gas and medium exchange, a monitoring and control instrumentation.

In this framework, the rationale of the presented thesis work is to integrate in an *in vitro* culture platform (named MeCC, Mechanobioreactor for Culture and

Characterization) a mechanical testing mode suitable for tissue biomechanical characterization within a culture system where tubular structures are conditioned. In particular, it has been designed to apply *in vitro* physiological-like hemodynamic stimuli, i.e. cyclic wall strain or wall shear stress, and to characterize biological samples in terms of burst pressure (BP) and compliance.

This thesis work is part of a project based on a close collaboration already ongoing between the  $\mu$ BSLab and several research laboratories (biological, cardiac surgery and veterinary units).

## **2. Materials and Methods**

The MeCC represents an evolution of a previous system developed at the  $\mu$ BSLab and currently used at Centro Cardiologico Monzino [3, 4]. The MeCC was designed to increase the versatility of the existent culture system in terms of type and dimensions of the hosted biological structures. Moreover, the device was designed with the aim to allow not only the *in vitro* culture of biological samples, but also to perform the mechanical characterization of tubular structures.

The design of the MeCC took into account the general specifications of a bioreactor for tissue-engineering applications: biocompatibility of the materials, capability with sterilization process (e.g. via

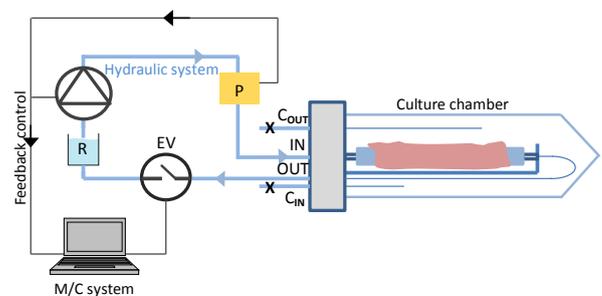
autoclaving and ethylene oxide), transparency (to ensure visual inspection of medium color changes), ease of assembly under the laminar flow hood and increase of mass transport.

Other specific requirements were identified for the MeCC: versatility, in order to allow hosting of tubular structures of different diameters and lengths, ability to apply different stimulation patterns and ability to investigate main biomechanical properties of a blood vessel, such as compliance and burst pressure.

### **Architecture of the MeCC**

The system layout is showed in Figure 2. The MeCC consists of a culture chamber, a hydraulic circuit, actuators and a monitoring and control (M/C) system.

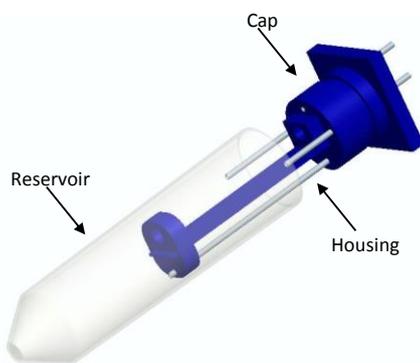
The M/C system manages the actuators (a pump and a solenoid pinch valve) in order to apply both the stimulation and biomechanical characterization of the hosted samples.



**Figure 2.** Diagram of the stimulation system layout. The hydraulic system is drawn in blue, the M/C system is drawn in black.

### Design of the culture chamber

The culture chamber is an evolution of a project developed previously at the  $\mu$ BSLab [3, 4]. It includes a purpose-developed housing and a medium reservoir (Figure 3). The housing was designed with a 3D CAD software (Proengineer, PTC) and was manufactured by laser cutting (Versalaser VSL2.30, SK Laser) and computer numerical control machining (Modela MDX-40) from polymethylmethacrylate blocks. The housing, that is composed of a cap, a thin basement and a translational element, allows to host 14 to 55 mm-long samples.



**Figure 3.** CAD drawing of the prototype developed.

The biological samples are cannulated on both ends with two polypropylene luers (Cole Parmer Instrument Company), one inserted into the cap, the other screwed into the translational element, and are fixed on the connectors by a silk thread and/or silicone loops for surgical applications (vessel loop, Tecnokit S.r.l.). The medium reservoir is a commercial 50 ml tube.

A silicone O-ring coupling connects the reservoir to the vessel housing.

### Architecture of the stimulation circuit

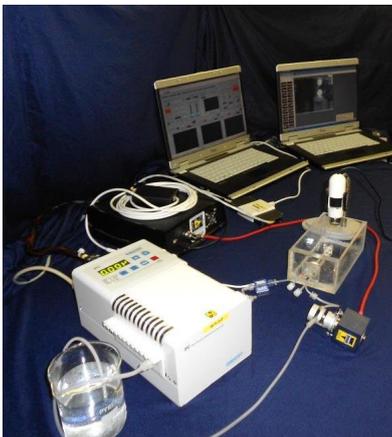
The stimulation circuit was built integrating two systems previously developed at the  $\mu$ BSLab [5, 6]. It is composed of a hydraulic system and a M/C system.

The hydraulic system is composed of a peristaltic pump (Watson-Marlow 323 DU, Watson-Marlow Group) and silicone tubing (Platinum Cured with ID 1.6 mm and thickness 0.8 mm, Tygon®, SaintGobain). The length of tubing is 2 m, in order to ensure both the connections between the parts inside (culture chamber) and outside (pump and solenoid valve) the incubator and to limit the encumbrance of the system.

The M/C system consists of hardware and software components. It automatically controls the peristaltic pumps (Watson Marlow 323 DU) and a solenoid pinch-valve (Z110A 24V, Sirai Elettromeccanica). A pressure sensor Press-S-000 (PendoTECH) allows the acquisition of the pressure signals. The hydraulic actuators are connected to a PC equipped with an I/O board (DAQCard NI 6036E, National Instruments) and a purpose-built electric control unit and are managed via two customized LabView software (National Instruments): PINE, for the culture mode and C-SO for the biomechanical characterization

mode. The M/C system gets the signals acquired by the pressure sensor and adjusts the pump rate through a feedback control (closed loop). Instead, the control of the circumferential deformation is performed in an open loop mode. This involved a specific characterization of the silicone sleeves, as described later.

In the characterization mode, the circuit used is the same as the one previously described, except for the pump, which is replaced by an Ismatec IPCN-12 pump (IDEX Health & Science), and for the data acquisition card, replaced by a NI DAQ USB-6009 card (National Instruments®) (Figure 4).

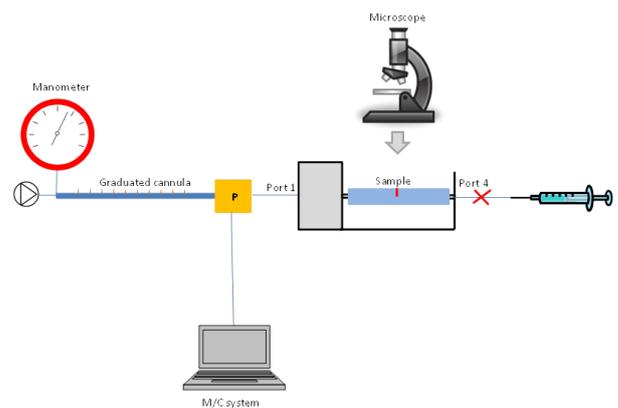


**Figure 4.** Setup of the mechanical characterization test.

#### Silicone sleeve characterization

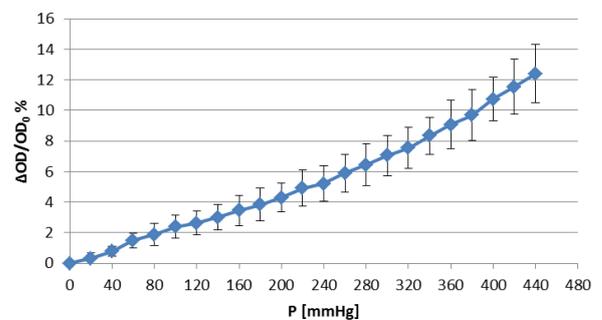
To increase the system versatility, silicone sleeve supports (ID 2.5 mm and 0.3 mm thick, Hilltop Products LTD) were used to impart mechanical strain to the hosted vessels. This strategy allows to stimulate any kind of tubular construct, even water

permeable structures that would not be able to withstand a direct solicitation. The silicone sleeves (n=5) were characterized in order to compensate for the lack of a deformation feedback control. The characterization led to obtain pressure-volume and pressure-circumferential strain relationships. The setup used to perform these tests is represented in Figure 5.



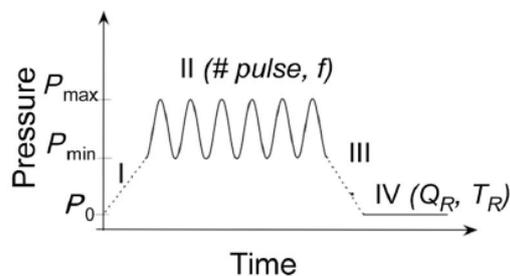
**Figure 5.** Setup used for the characterization tests of the silicone sleeve.

The pressure-circumferential strain relationship of the silicone sleeves (Figure 6) was employed to define the intraluminal pressure range to produce defined cyclic change in the outer diameter.



**Figure 6.** Calibration curve (pressure-strain) of the silicone sleeve.

The system, in fact, can apply a cyclical stimulation between two pressure values ( $P_{\max}$  and  $P_{\min}$ ) (Figure 7): through the pressure-strain curve, the user can know which pressures apply to obtain the desired circumferential strain of the sample placed in the culture chamber.



**Figure 7.** Pressure vs. time relationship representing the pulsatile stimulation implemented by the system: I, loading phase; II, pulsatile stimulation between the maximum and minimum values of pressure; III, unloading phase; IV, recirculation phase.

#### Semi-empirical model about the distension behave of the samples

A semi-empirical model was developed to predict the actual strain of the samples mounted over the sleeves. This model describes analytically the behavior of the samples placed in the culture chamber, under cylindrical, axisymmetric geometry and incompressible material assumptions. The data obtained from the characterization tests performed on the sleeves (Figure 6), as well as the actual dimensions and biomechanical properties of the biological samples, were used in the model to define *a priori* the pressure range to apply to the

sleeves in order to obtain the desired circumferential strain of the biological samples.

#### Testing of the culture mode

To test the MeCC in its culture mode and to test the dynamic conditioning strategy based on the sleeves use, the silicone structures (n=6) were subjected to:

- deformation tests under dynamic conditions at room temperature: the silicone sleeves were stimulated ( $P_{\max}=380$  mmHg and  $\Delta P=360$  mmHg) and their circumferential strain was measured;
- tests at different frequencies (0.25, 0.5, 0.75, 1 Hz), in order to evaluate that the dynamical strain of the sleeve matched with the pressure wave applied by the system;
- culture-like period (7 days) tests at  $37^{\circ}$  C: silicone sleeves were stimulated for 7 days ( $P_{\max}=420$  mmHg and  $\Delta P=380$  mmHg) placing the bioreactor in a heater;
- tests to verify the functionality of the sleeves after sterilization processes, in order to evaluate that the sterilization process didn't affect the mechanical properties of the silicone.

Validation tests were performed on porcine coronary internal mammary (IMA) arteries (IMA) in order to verify the semi-empirical model. Native vessels (n=8) were mounted over the sleeves and stimulated within MeCC

( $P_{max}=420$  mmHg and  $\Delta P=390$  mmHg) (Figure 8).



**Figure 8.** Porcine IMA sample fitted on the silicone sleeve and hosted between the two connectors on the vessel housing of the bioreactor.

### **Testing of the characterization mode and functional evaluation tests with vascular samples**

To test the MeCC in its characterization mode, BP tests were performed on 12 segments of porcine IMA and 1 TEBV (SMCs embedded in collagen-elastin based scaffold), built at the Laboratorio di Anatomia Umana, University of Piemonte Orientale, Novara. The results were then compared to the data obtained with ring tests performed on the same vessels (Figure 9).



**Figure 9.** Ring tests setup. The biological sample is highlighted in the red rectangle.

Furthermore, the MeCC was used to perform preliminary BP tests on 13 samples of porcine coronary arteries.

Finally, porcine vessels (coronary arteries and IMA) were characterized through distensibility tests, in order to obtain values useful for the development of the semi-empirical model.

### **Preliminary experimental campaigns with engineered constructs**

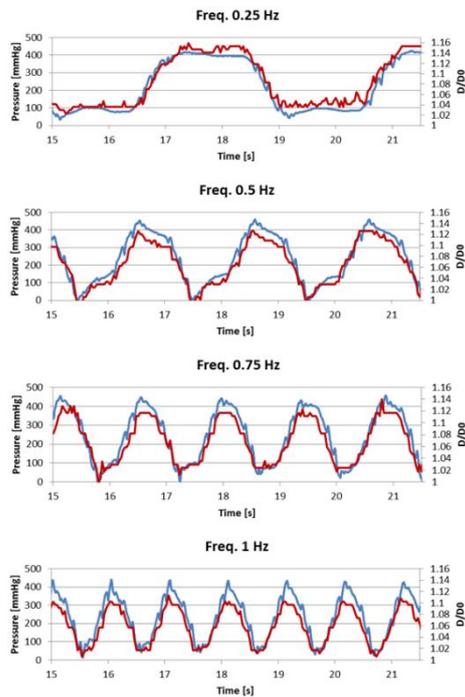
Preliminary experimental campaigns were performed on (n=8) collagen gel-based TEBVs (ID = 3.5 mm, length = 25 mm) [7].

After a week of maturation in static condition, the constructs were placed in the bioreactor and subjected to dynamic culture: a constant flow rate (3, 5 and 10 ml/min) was infused into the samples for different periods of time (3, 7 and 14 days). At the end of the culture period, the constructs were characterized from the biomechanical viewpoint through ring tests and compression tests.

### **3. Results**

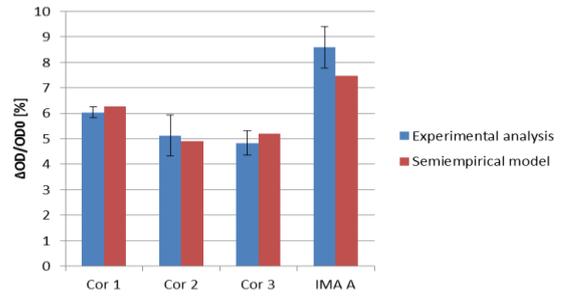
The functional tests performed on the sleeves verified that the silicone structure preserves its mechanical characteristics during long-period (up to 7 days) cyclic stimulation at incubator temperature (37° C). The testing of the system showed that the MeCC is able to apply to the samples

placed in the culture chamber a cyclic circumferential strain at different stimulation frequencies (Figure 10).



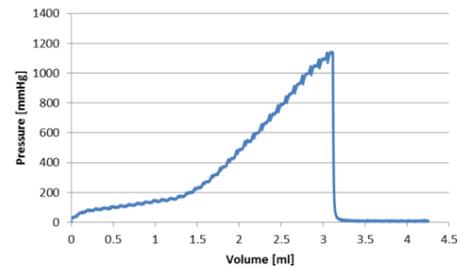
**Figure 10.** Results obtained from the tests performed on the silicone sleeve at different frequencies. In red the standard diameter values, in blue the pressure values, both a function of time.

The tests carried out on porcine vessels mounted over the silicone sleeves and subjected to cyclic strain allowed to validate the semi-empirical model thus to predict the strain of the biological samples as a function of pressure with high accuracy. The circumferential strain values obtained stimulating the vessels with  $P_{max}=420$  mmHg are compared to those predicted by the model (Figure 11).



**Figure 11.** Histogram representing the external circumferential strain values obtained stimulating the samples with  $P_{max}=420$  mmHg and predicted by the semi-empirical model.

The biomechanical characterization tests performed on IMA samples allowed to optimize the BP tests protocol (in Figure 12 an example of the volume-pressure relationship obtained from a test).



**Figure 12.** Example of the volume-pressure relationship obtained from a BP test performed on an IMA.

The characterization tests performed on native vessels showed results comparable with the literature:  $C=1.9 \times 10^{-3} \text{ mmHg}^{-1}$  and  $BP=1989 \pm 340 \text{ mmHg}^{-1}$ . The test performed on the TEBV sample showed BP 14.7 mmHg comparable with the BP values estimated by ring tests ( $14.3 \pm 1.3 \text{ mmHg}$ ).

These experiments allowed to test the MeCC as a system for biomechanical characterization of engineered and native vessels.

#### **4. Discussion**

This thesis work led to obtain a culture and characterization system for small caliber tubular biological structures, such as native and tissue-engineered blood vessels.

The device appears functional, user-friendly, versatile, allowing the housing of samples of variable length. The small size of the system makes the device easy to assembly under the laminar flow hood.

The strategy adopted for the cyclic circumferential strain of the hosted vessels, that involves the use of a silicone sleeve, extends the potential use of the system to water-permeable and weak tubular structures that would not be able to withstand a direct conditioning. In the future, in order to realize engineered constructs, the silicone sleeve use would allow to build TEBVs directly on the silicone support, limiting handling by the user.

The outcomes of the functional tests indicated a good reliability of the M/C system.

Preliminary experimental campaigns showed that the device is suitable for culturing TEBVs, up to 14 days in a controlled and sterile environment.

In conclusion, the MeCC is able to allow in vitro culture and characterization of tubular structures, in a controlled and reproducible dynamic environment, although the deformation control is performed in open

loop mode. In the future, it is possible to develop a feedback control strategy based on real-time computer vision processing.

Then the MeCC appears a promising device for the dynamic conditioning and the study of native and engineered blood vessels.

#### **Bibliography**

- [1] M. C. Tanzi, and A. Bianchi, *Approccio integrato per la medicina rigenerativa*, 2013.
- [2] I. Martin, D. Wendt, and M. Heberer, "The role of bioreactors in tissue engineering," *Trends Biotechnol*, vol. 22, no. 2, pp. 80-6, Feb, 2004.
- [3] N. Bono, and L. Casadonte, "Sviluppo di un sistema di coltura di segmenti di vena safena per lo studio ex vivo del vein graft disease," *Politecnico di Milano*, 2011.
- [4] M. Piola et al., "A compact and automated ex vivo vessel culture system for the pulsatile pressure conditioning of human saphenous veins," *J Tissue Eng Regen Med*, Jul, 2013.
- [5] R. Vismara et al., "A bioreactor with compliance monitoring for heart valve grafts," *Ann Biomed Eng*, vol. 38, no. 1, pp. 100-8, Jan, 2010.
- [6] F. Dal Dosso, "Sviluppo di un sistema per il monitoraggio e il controllo della stimolazione in pressione in applicazioni di ingegneria dei tessuti," *Politecnico di Milano*, 2012.

- [7] F. Boccafoschi et al., "The role of shear stress on mechanically stimulated engineered vascular substitutes: influence on mechanical and biological properties," *J Tissue Eng Regen Med*, vol. 6, no. 1, pp. 60-7, Jan, 2012.

## Obiettivi e ordinamento del lavoro

Il lavoro di tesi, svolto presso il Laboratorio di Micro e Biofluidodinamica Sperimentale ( $\mu$ BSLab) del Dipartimento di Elettronica, Informazione e Bioingegneria del Politecnico di Milano, si inserisce all'interno di un progetto che prende spunto dalla collaborazione con vari gruppi di ricerca, sia laboratori di biologia, sia unità di cardiocirurgia e veterinaria, nel settore della medicina rigenerativa in campo cardiovascolare. Lo scopo del progetto è quello di sviluppare un sistema di stimolazione in grado di integrare la funzione di coltura dinamica *in vitro* con quella di caratterizzazione meccanica di vasi sanguigni (nativi o ingegnerizzati) di piccolo calibro.

Per quanto riguarda la funzione di coltura dinamica, l'obiettivo è quello di riprodurre *in vitro* le condizioni a cui il campione biologico verrebbe sottoposto *in vivo*, per permetterne la stimolazione con le caratteristiche biomeccaniche e biomimetiche adeguate. In particolare, le strutture vascolari arteriose sono soggette, in ambiente fisiologico, a uno stimolo di *shear stress* sulle pareti interne al lume, dovuto allo scorrere del sangue al suo interno, e ad una deformazione circonferenziale ciclica, dovuta alla pulsazione del flusso.

Per quanto riguarda invece la fase di caratterizzazione meccanica, l'obiettivo è quello di sviluppare un sistema che permetta di indagare i principali parametri indice delle proprietà meccaniche del vaso sanguigno, quali la *compliance* e la pressione a rottura.

I problemi cardiovascolari risultano una delle principali cause di morte nel mondo oggi [1]. Le tecniche e i materiali in uso clinico (che prevedono solitamente l'impianto di sostituti vascolari nativi o sintetici) permettono la cura di patologie a carico dei vasi sanguigni di grosso e medio calibro, ma presentano ancora svariati problemi nella cura delle malattie a carico dei vasi di piccolo calibro, quali per esempio quelli periferici o quelli che portano nutrimento ad organi vitali, come il cuore. Risulta quindi necessario lo sviluppo di nuovi materiali e nuove tecniche atte alla produzione di vasi sanguigni ingegnerizzati. In quest'ottica, l'Ingegneria dei tessuti potrebbe rivelarsi una valida strategia, utilizzando cellule, *scaffold* su cui seminarle e applicando un opportuno condizionamento tramite i bioreattori.

Diversi gruppi di ricerca hanno sviluppato sistemi di coltura *in vitro* per la maturazione e il condizionamento meccanico di vasi sanguigni. Questi sistemi sono risultati in grado di fornire un ambiente di coltura controllato dal punto di vista biomeccanico e/o biochimico che permettesse il corretto miglioramento delle caratteristiche biomeccaniche del campione biologico. In particolare, gli stimoli più adeguati da applicare a queste strutture sono quello di perfusione (per

quanto riguarda vasi con cellule endoteliali) e quello di deformazione ciclica (per quelli invece con cellule muscolari lisce), perché risultano le sollecitazioni che meglio replicano gli stimoli risentiti dalle cellule dei vasi sanguigni *in vivo*. Inoltre i bioreattori possono essere utilizzati come sistemi modello per indagare l'effetto di forze fisiche sullo sviluppo di un tessuto, predire la risposta del campione una volta impiantato in vivo ed effettuare esperimenti di screening farmacologico.

In questo contesto si inserisce il presente lavoro di tesi.

A partire dall'ottimizzazione di un sistema per la coltura *ex vivo* di vasi sanguigni in grado di ricreare i *pattern* di stimolazione arteriosa per lo studio del *vein graft disease* [2, 3], sviluppato presso il  $\mu$ BSLab e in uso presso il Centro Cardiologico Monzino, il lavoro di tesi assume l'obiettivo di sviluppare un sistema in grado di integrare la funzione di coltura dinamica (tramite gli stimoli di perfusione e deformazione circonferenziale) con quella di caratterizzazione meccanica dei vasi sanguigni. In particolare, la caratterizzazione del campione biologico viene svolta attraverso l'individuazione del valore di pressione a rottura (*burst pressure*) e di *compliance*: entrambi questi parametri risultano infatti essere indici descrittivi del grado di maturazione del costrutto, se confrontati con le stesse grandezze relative ai vasi nativi.

Di seguito verranno descritti gli argomenti trattati nei capitoli di questo progetto di tesi.

Nel Capitolo 1 verrà introdotta l'Ingegneria dei tessuti come approccio potenziale e promettente ai fini dello sviluppo di sostituti biologici che possano offrirsi come valida alternativa ai trapianti. Si focalizzerà l'attenzione in particolare sull'utilizzo e sullo sviluppo dei bioreattori come strumenti in grado di applicare al costrutto ingegnerizzato un condizionamento meccanico, non solo finalizzato alla maturazione di sostituti biologici, ma anche come modello per lo studio di fenomeni patologici. Infine verranno descritti la struttura dei vasi sanguigni, le patologie a loro carico e i trattamenti clinici oggi in uso per la loro cura.

Il Capitolo 2 sarà incentrato sull'analisi dello stato dell'arte. Inizialmente verranno introdotti i materiali e le tecniche utilizzati per la realizzazione degli *scaffold* in ambito vascolare, successivamente verranno presentate le strategie di coltura sviluppate fino ad oggi nell'ambito dell'ingegneria dei tessuti di vasi sanguigni di piccolo calibro. In particolare si valuterà come la coltura dinamica risulti più adeguata rispetto a quella statica nello sviluppo del tessuto, e si confronteranno dispositivi in grado di fornire lo stimolo di perfusione, con quelli in grado di attuare una deformazione ciclica.

Nel Capitolo 3 verranno illustrate le fasi di progettazione e realizzazione del sistema per la coltura e la caratterizzazione, a partire dall'ottimizzazione della camera di coltura di un sistema già

sviluppato presso il  $\mu$ BSLab e in uso presso il Centro Cardiologico Monzino. Successivamente verrà mostrata la caratterizzazione degli elementi per attuare la stimolazione e lo sviluppo di un modello semiempirico che permetta la previsione del comportamento di strutture tubulari inserite nel sistema sviluppato.

Nel Capitolo 4 verranno presentate le procedure di collaudo e messa in esercizio del sistema in modalità di coltura, in particolare utilizzando vasi nativi porcini. Saranno inoltre illustrati i protocolli di prova adottati e i relativi risultati.

Il Capitolo 5 presenterà le procedure di collaudo del modulo per la caratterizzazione meccanica dei vasi sanguigni (nativi ed ingegnerizzati) e gli esperimenti di caratterizzazione effettuati su vasi nativi. Inoltre sarà descritta la messa in esercizio del sistema per la coltura in sola perfusione di vasi sanguigni ingegnerizzati sviluppati presso il Laboratorio di Anatomia Umana di Novara. Anche in questo capitolo, oltre ai protocolli di prova utilizzati, verranno presentati i risultati ottenuti.

Alla luce dei risultati ottenuti, saranno infine trattate le osservazioni conclusive riguardo i punti di forza, i limiti e le possibili evoluzioni del sistema di stimolazione oggetto del lavoro di tesi.

# Capitolo 1

## Il ruolo dei bioreattori nell'ingegneria dei tessuti

### 1.1. Ingegneria dei tessuti

La Medicina Rigenerativa (MR) rappresenta un nuovo promettente approccio terapeutico finalizzato alla rigenerazione biologica di tessuti e/o organi deteriorati. L'obiettivo principale della MR è quindi lo sviluppo di terapie innovative e avanzate mirate alla "fabbricazione" di tessuti e organi biocompatibili, sia da un punto di vista funzionale che immunologico, che possano essere utilizzati per riparare e/o stimolare i meccanismi di riparazione da parte del corpo di tessuti o organi gravemente danneggiati da malattie, traumi o dal semplice invecchiamento.

Risultano infatti essere numerose le situazioni in cui l'utilizzo di farmaci o di trattamenti contro alcune patologie si rivelano poco efficaci, come ad esempio l'insufficienza epatica o la lesione del midollo spinale, e per cui l'unica soluzione resta il trapianto [4].

A titolo di esempio si riportano i dati emersi dal Rapporto Annuale Mondiale sui Trapianti: nel 2010 in Italia 511 persone sono decedute in attesa di un trapianto e la casistica in Europa cresce fino ad oltre 4000 individui l'anno [5].

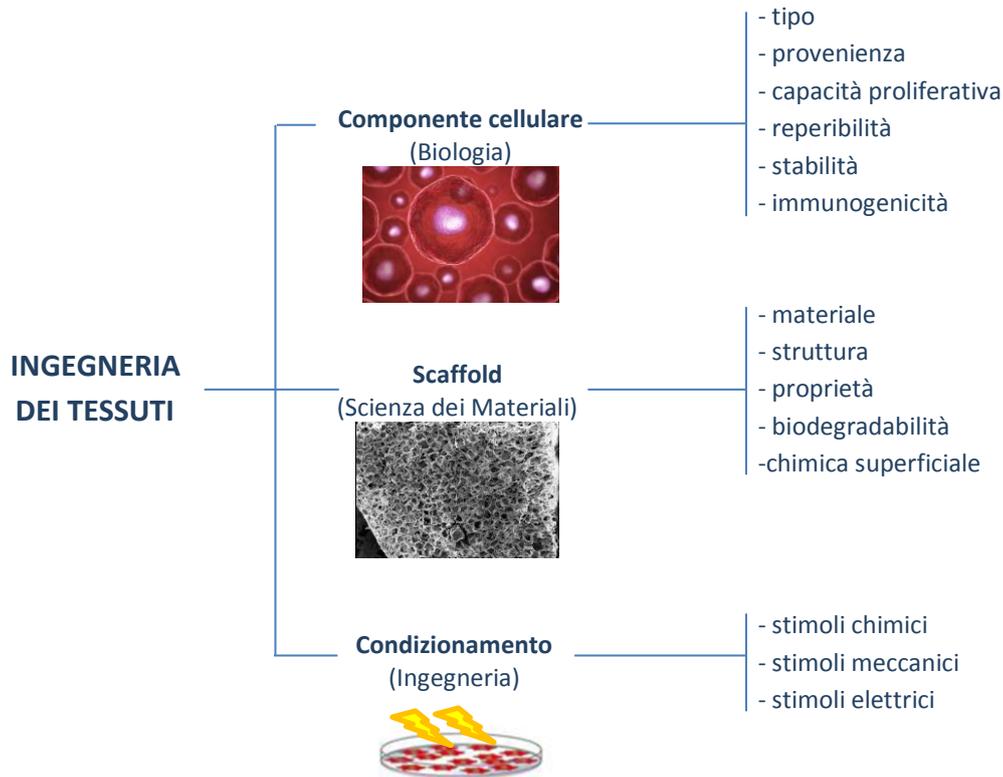
Nell'ambito della MR, l'Ingegneria dei Tessuti (TE, *Tissue Engineering*), si presenta come scienza promettente che potrebbe essere in grado di sopperire alla cronica insufficienza di organi e tessuti da parte di donatori, fornendo una valida alternativa al trapianto [6]. Essa si sviluppa, a partire dagli anni '80, con lo scopo di sostituire il tessuto biologico danneggiato con altro tessuto, anch'esso biologico, sano, progettato e costruito *ad-hoc* per il paziente [4].

La TE sfrutta la risposta biologica dell'organismo in trattamenti finalizzati alla riparazione di tessuti danneggiati e/o patologici e permette l'utilizzo di cellule autologhe, che eviterebbero l'uso di terapie immunosoppressive che indeboliscono il paziente.

È stata definita come un campo interdisciplinare che applica i principi dell'ingegneria e delle scienze naturali per sviluppare sostituti biologici che riparino, mantengano o migliorino le funzioni di un tessuto [7]. È infatti una scienza multisetoriale che si occupa della generazione di nuovo tessuto sfruttando i principi dell'ingegneria e le conoscenze e le tecniche delle scienze biologiche [8].

Un così complesso ambito di ricerca richiede quindi l'interazione e l'integrazione di diversi campi di esperienza che cooperino e convergano verso un obiettivo comune che è quello della guarigione, tramite la rigenerazione del tessuto malato.

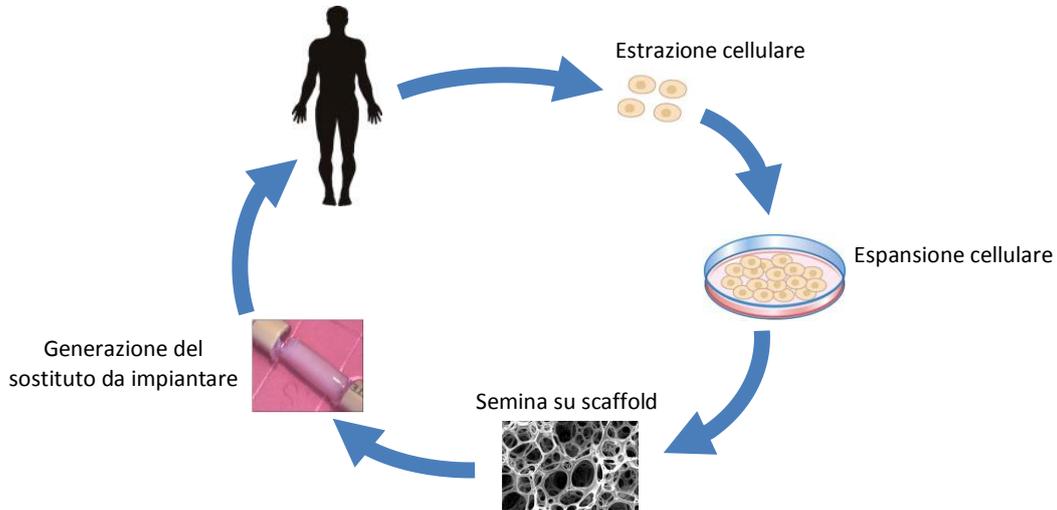
In particolare, i campi della scienza coinvolti sono la Biologia, che si occupa della parte biologica del tessuto, ovvero le cellule, la Scienza dei Materiali, che provvede alla scelta del materiale della struttura, detta *scaffold*, su cui queste cellule verranno seminate andando a formare il così detto costruito, e l'Ingegneria che si occupa di fornire il giusto condizionamento meccanico, chimico o fisico al sistema (Figura 1.1).



**Figura 1.1.** Ingegneria dei tessuti: componenti costituenti e loro principali caratteristiche.

Offrendosi proprio come opzione sostitutiva al trapianto, l'ingegneria dei tessuti pare destinata a fornire una valida alternativa clinica. Un'indagine condotta da Jaklenec e collaboratori [9], in cui si analizzano i dati relativi al giro d'affari intorno al settore della TE, mostra come gli investimenti fatti in questo campo siano aumentati di 1,5 volte tra il 2007 e il 2011; inoltre il National Institute of Health, l'agenzia governativa americana per la ricerca medica, ha previsto che il business della medicina rigenerativa quadruplicherà nei prossimi decenni ed è destinato a crescere in modo esponenziale [10].

Il fine ultimo che si propone la TE è quindi quello di ricreare tessuti e organi immunologicamente compatibili con il ricevente poiché ottenuti prelevando una piccola quantità di cellule dai tessuti vitali del paziente stesso tramite biopsia; tali cellule verrebbero poi poste in coltura statica per permetterne l'espansione, seminate su matrici tridimensionali, eventualmente opportunamente stimulate, dando così origine ad un tessuto ingegnerizzato funzionale per essere impiantato nel paziente (Figura 1.2).



**Figura 1.2.** Paradigma della TE. A partire dall'estrazione delle cellule tramite biopsia, queste vengono espanse e seminate sullo *scaffold*, infine il costruito così ottenuto viene impiantato nel paziente.

Il primo elemento alla base della TE è rappresentato dalla *componente cellulare*. È importante identificare la sorgente più adeguata al tipo di tessuto che si vuole rigenerare e tale da rispettare specifici requisiti quali la reperibilità, la capacità proliferativa *in vitro*, la stabilità fenotipica e l'immunogenicità. Identificata la fonte cellulare, una delle sfide maggiori è proprio quella di riuscire a far espandere le cellule senza alterarne il fenotipo e la funzione e senza introdurre agenti virali o batterici (soprattutto se di origine xenogenica)[11].

La fonte primaria può essere:

- autologa, se le cellule vengono prelevate dal paziente stesso (il donatore e il ricevente coincidono). Ciò permette di ridurre il problema del rigetto e dell'immunogenicità, ma presenta il forte limite legato alla scarsa disponibilità;
- allogena, se le cellule sono prelevate da un donatore della stessa specie del ricevente. La disponibilità di questa fonte è più elevata rispetto alla precedente, ma spesso presenta problemi d'immunocompatibilità;
- singena, se le cellule vengono prelevate da un donatore geneticamente identico al ricevente (è il caso di gemelli monozigoti o cloni). La fonte è immunocompatibile, può

essere riprodotta identica infinite volte grazie alle tecniche di clonazione, ma presenta limitazioni dovute ad aspetti etici;

- xenogenica, se la fonte cellulare appartiene a una specie diversa da quella del ricevente. Anche in questo caso, sebbene sia elevata la disponibilità, può causare problemi quali rigetto acuto e trasmissione di malattie.

Oltre che secondo la provenienza, le cellule impiegate nella rigenerazione di un tessuto possono essere classificate anche in base allo stato di differenziamento. Si distinguono infatti cellule differenziate e cellule staminali: le prime hanno già una funzione ben definita, mentre le seconde sono cellule non specializzate, con grande capacità proliferativa, in grado di generare, nella divisione, sia cellule figlie identiche a se stesse che cellule figlie già differenziate. Le staminali, infatti, che si distinguono a loro volta in embrionali o adulte, proprio per le loro caratteristiche sono considerate un'ottima risorsa per l'ingegneria dei tessuti [12], ma presentano alcune problematiche non ancora risolte quali, per esempio, la difficoltà nel controllare la loro differenziazione [13].

Il secondo elemento principale è lo *scaffold*. Esso viene definito come una struttura di supporto in grado di fornire un sostegno meccanico/strutturale all'attività cellulare, senza indurre fenomeni avversi di tipo locale o sistematico [6]. Esso rappresenta il primo stimolo agente sulle cellule perché definisce un ambiente tridimensionale adeguato alla loro crescita, in termini di caratteristiche biologiche, funzionali e morfologiche, in assenza di matrice extracellulare (ECM, *Extracellular Matrix*) naturale.

I requisiti di uno *scaffold* variano a seconda del tipo di tessuto da rigenerare e sono strettamente dipendenti dal tipo di materiale scelto [6]. Uno dei requisiti fondamentali però è la sua biocompatibilità, ovvero la sua capacità di non generare reazioni dannose o comunque indesiderate nelle cellule e nell'organismo con cui entra in contatto. Idealmente la struttura dovrebbe essere tridimensionale, altamente porosa, in modo da permettere la crescita delle cellule, il trasporto dei nutrienti e la rimozione dei cataboliti, consentendo anche la giusta interazione del tessuto ingegnerizzato con l'organismo ospite. Inoltre la struttura superficiale (o chimica superficiale) deve essere tale da favorire l'adesione, la proliferazione e il differenziamento cellulare, ma anche l'incorporazione di elementi nella matrice, come per esempio specifici peptidi che inducono la migrazione delle cellule e conferiscono allo *scaffold* proprietà simili a quelle della matrice extracellulare. Anche la scelta del materiale con cui realizzare lo *scaffold* risulta essere un aspetto critico e, come le altre caratteristiche appena descritte, dipenderà fortemente dalla

funzione che, all'interno del corpo umano, sarà rivestita dal tessuto ingegnerizzato. Si possono per esempio scegliere materiali resistenti ad elevati carichi e a fatica per le ossa, quali ceramici o alcuni sintetici, o materiali con maggiori proprietà elastiche per tendini e legamenti, oppure creare strutture bidimensionali, come per la rigenerazione dell'epidermide e del derma, in cui, essendo il tessuto da sostituire una struttura multistrato altamente elasticizzata, il sostituto potrà essere costituito da uno o più strati di idrogel sovrapposti l'uno sull'altro.

È possibile utilizzare materiali sia sintetici che biologici ed in entrambi i casi, l'integrazione della struttura e/o la sua degradazione, deve avvenire *in vivo* con una velocità che favorisca il corretto sviluppo del tessuto stesso che si sta rigenerando. Una degradazione prematura del biomateriale combinata con una mancanza di tempestività nello sviluppo del tessuto in vivo, potrebbe infatti portare ad una bassa resistenza meccanica e quindi al fallimento [11]. Un altro importante requisito per i materiali biodegradabili riguarda i loro prodotti di degradazione, che non devono essere tossici per l'organismo ospite. Ecco perché, tutti i materiali in uso, in particolare quelli sintetici, devono essere approvati dall'FDA (*Food and Drug Administration*). Ne sono un esempio i poliesteri come il PLA, il PGA e il PLGA o poli-esteri-uretani che rilasciano prodotti che possono essere facilmente eliminati dall'organismo.

Sempre più interessanti appaiono inoltre gli *scaffold* realizzati con biopolimeri, come il collagene, l'elastina e la fibrina, o combinazione di essi. Il grande vantaggio di questi materiali è che permettono di creare strutture, solitamente idrogeli, che possono essere popolate dalle cellule già durante la fase di ottenimento dello *scaffold*; inoltre le cellule possono riconoscere in questi materiali sostanze biologiche già presenti nell'organismo ospite, favorendo quindi l'integrazione ed evitando risposte immunitarie.

Nell'ultimo periodo si sta espandendo anche l'utilizzo di *scaffold* ottenuti da matrici decellularizzate, eliminando la componente cellulare dai tessuti estratti. In questo modo il supporto presenta già una struttura tale da garantire l'architettura e le proprietà uguali a quelle del tessuto da sostituire, proprio grazie al mantenimento dell'ECM.

Negli ultimi anni sta prendendo piede l'idea di combinare la scelta delle cellule e dello *scaffold*, durante la coltura in vitro, con l'applicazione di una serie di stimoli adeguati allo sviluppo del tessuto che si vuole riprodurre.

Il *condizionamento meccanico, chimico o fisico* a cui può essere sottoposto un tessuto ingegnerizzato durante la fase di maturazione deve essere in grado di indurre le cellule a produrre nuova ECM, ad integrarsi nel tessuto, a crescere e proliferare in modo corretto al fine di

permettere l'ottenimento di una struttura in grado di sopportare gli stimoli fisiologici a cui verrà sottoposta dopo l'impianto in vivo. Nel corpo umano i diversi tipi di cellule operano in presenza di stimoli meccanici differenti, ad esempio le cellule endoteliali, che costituiscono lo strato più interno della parete dei vasi sanguigni, sono sottoposte al passaggio continuo del sangue, il quale impone, su queste cellule, degli sforzi tali da influenzarne la forma e la struttura del citoscheletro, con conseguente aumento della rigidità meccanica. Inoltre il flusso sanguigno influenza la proliferazione cellulare e la capacità delle cellule di sintetizzare e/o secernere molecole biologicamente attive [14]. In base quindi al tipo di tessuto che si vuole ricostruire, diversi saranno gli stimoli che permetteranno di produrre il risultato desiderato.

Un condizionamento insufficiente o eccessivo però, porterebbe ad un'alterazione della struttura e del comportamento cellulare e quindi alla formazione di un tessuto che non sarebbe in grado di sostituire quello nativo.

Negli ultimi anni si sta diffondendo l'utilizzo di specifici strumenti in grado di applicare determinati stimoli al costrutto in fase di maturazione: i bioreattori.

Con il termine bioreattore si intende un dispositivo utilizzato per condurre colture cellulari dinamiche mediante l'applicazione di stimoli biologici, biochimici e/o biomeccanici in un ambiente altamente controllato, cioè in condizioni operative (per esempio pH, pressione parziale di gas, temperatura) standardizzate e riproducibili [15]. Tale dispositivo si propone quindi in sostituzione alla classica coltura statica in piastre di Petri per favorire uno sviluppo del tessuto ingegnerizzato più simile a quello *in vivo*, standardizzato e con minori tempi di realizzazione: la stimolazione dinamica delle cellule infatti, mira a favorire la proliferazione cellulare.

Un bioreattore può essere costituito da diverse parti: una camera di coltura, una riserva di medium, un sistema di scambio di gas e di ricambio del mezzo di coltura, una strumentazione per il monitoraggio e il controllo (in molti casi operati da un software). Questi elementi possono essere integrati in un unico dispositivo oppure essere modulari e quindi essere impiegati in più tipologie di bioreattore [1]. Un requisito essenziale per le componenti di tale sistema, che entrano in contatto con le cellule e con il mezzo di coltura, è la loro biocompatibilità, inoltre le parti del bioreattore devono essere sterilizzabili (per esempio tramite autoclave o ossido di etilene) e la sterilità deve essere mantenuta durante tutto il periodo di coltura affinché il costrutto non vada incontro a contaminazione batterica e a conseguente morte cellulare [1].

I bioreattori, permettendo la regolazione di specifici fattori ambientali in modo controllato e riproducibile, possono costituire anche degli strumenti tecnologici in grado di indagare quali siano

i meccanismi fondamentali del funzionamento cellulare, in condizioni normali o patologiche o con l'applicazione di farmaci.

Diverse sono le specifiche che un bioreattore dovrebbe essere in grado di svolgere [15]:

- permettere una semina cellulare uniforme ed efficiente: in modo da favorire una distribuzione omogenea delle cellule sullo *scaffold*, che non è ottenibile con le tradizionali tecniche di semina manuale, e portare così alla formazione di tessuti uniformemente popolati da cellule;
- incrementare il trasporto di massa nei costrutti 3D: nella prospettiva di sviluppare sostituti biologici (o di derivazione biologica) di dimensioni macroscopiche, e tenendo conto del fatto che il tessuto creato non è vascolarizzato, si dovrà permettere a tutte le cellule di ricevere nutrimento e gas. Il semplice trasporto per diffusione in atto durante la coltura statica non è in grado di svolgere questo ruolo in tutto lo spessore del costrutto, per questo il bioreattore dovrà garantire una perfusione attraverso tutto il tessuto;
- conferire stimoli adeguati: come descritto precedentemente, le sollecitazioni meccaniche, rispetto ad una coltura statica, permettono di modulare la fisiologia cellulare e quindi le proprietà biomeccaniche del tessuto, favorendo l'attività biosintetica delle cellule immerse in matrici bioartificiali e di conseguenza migliorando o accelerando la rigenerazione dei tessuti *in vitro*. Inoltre, i bioreattori possono servire da validi modelli *in vitro* per studiare gli effetti patologici di alcuni stimoli e predire le risposte di tessuti ingegnerizzati alle forze fisiologiche a cui si sottoporranno dopo l'impianto chirurgico *in vivo*;
- standardizzare il processo di realizzazione dei costrutti ingegnerizzati: l'utilizzo dei bioreattori permetterebbe di minimizzare la manipolazione del costrutto da parte dell'operatore e consentirebbe l'applicazione di condizioni ambientali di coltura in vitro standardizzate e riproducibili. L'automatizzazione e la standardizzazione del processo di coltura dei tessuti ingegnerizzati porterebbero anche ad una riduzione dei costi di produzione.

## 1.2. Tipologie di bioreattori

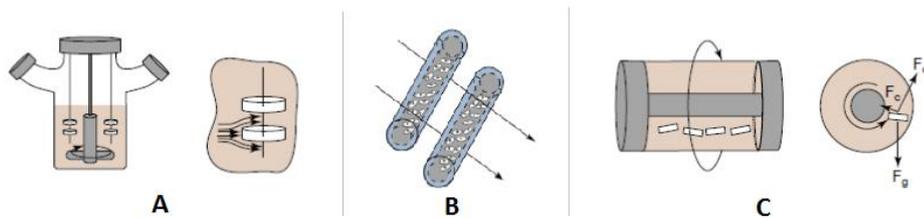
Come descritto nel paragrafo precedente, nell'ambito della TE, il ruolo dell'ingegnere è quello di progettare in maniera adeguata sistemi, definiti bioreattori, che siano in grado di permettere il corretto condizionamento meccanico, chimico o fisico del costrutto.

Di seguito vengono analizzate più nel dettaglio le potenzialità di questi strumenti nel rappresentare sistemi di attuazione, sistemi di monitoraggio e sistemi modello.

### 1.2.1. Bioreattore come sistema di attuazione

Se utilizzato come sistema di attuazione, cioè un sistema in grado di applicare stimoli biofisici controllati e riproducibili, il bioreattore può rivestire funzioni diverse durante tutta la fase di produzione di un tessuto ingegnerizzato, dalla semina delle cellule fino alla formazione del costrutto, contribuendo a superare le limitazioni imposte dalle tradizionali procedure di coltura statiche [6].

Un primo esempio di bioreattore come sistema di attuazione è quello *spinner-flask* (Figura 1.3 A) in cui si provoca agitazione del medium per mezzo di un perno magnetico, mentre gli *scaffold* sono montati su delle aste ancorate al tappo della camera di coltura. In questo modo si crea un flusso convettivo del mezzo che migliora i trasporti di massa, rispetto al semplice meccanismo diffusivo che si ha invece con una coltura statica.



**Figura 1.3.** Tipologie di bioreattore. (A) *spinner-flask*, (B) bioreattore a fibre cave, (C) bioreattore a parete rotante. (Adattato da [15]).

Un altro tipo di bioreattore che è stato sviluppato è quello a perfusione confinata nel quale il costrutto viene vincolato e il medium è forzato ad attraversarne i pori. Durante la fase di coltura, questo sistema garantisce allo *scaffold* un aumento del trasporto di nutrienti e gas che altrimenti sarebbe limitato alla sola superficie esterna, mentre per quanto riguarda la fase di semina, esso è in grado di permettere una distribuzione delle cellule uniforme, inducendole a penetrare anche all'interno dello *scaffold*. Una semina dinamica di questo tipo permette d'incrementare la densità cellulare migliorando quindi la formazione di costrutti 3D. Infatti, sebbene uno dei metodi più utilizzati nei laboratori di coltura cellulare sia la semina manuale, per gravità, la sua efficacia è piuttosto ridotta, poiché questo metodo non garantisce una distribuzione omogenea delle cellule in tutta la struttura tridimensionale del costrutto e risulta fortemente operatore-dipendente. La perfusione confinata inoltre è in grado di creare sulle cellule degli sforzi di taglio che

incrementano la loro proliferazione. Va però precisato che, in base al tipo di cellule in coltura, uno *shear stress* troppo elevato potrebbe avere effetti distruttivi piuttosto che benefici.

Se si desidera un trasporto convettivo di nutrienti, associato ad un sistema a perfusione che non causi elevati sforzi di taglio, è consigliabile l'uso di sistemi a fibre cave (*Hollow Fiber Bioreactors*) (Figura 1.3 B). In questo tipo di bioreattore le cellule possono essere seminate all'interno di una matrice attraversata da condotti porosi i quali, percorsi dal mezzo di coltura, consentono il trasporto di nutrienti proteggendo le cellule da una stimolazione meccanica diretta. Questo tipo di condizioni di coltura è adatto a cellule molto attive metabolicamente come ad esempio gli epatociti del fegato [6].

Un altro sistema che garantisce una corretta diffusione di nutrienti generando bassi sforzi di taglio è il bioreattore a parete rotante (*RWV, Rotating Wall Vessels*) (Figura 1.3 C), dispositivo in cui i costrutti sono coltivati in presenza di un costante flusso di medium generato da una rotazione continua dell'intero sistema intorno ai campioni, che determina condizioni di microgravità [6].

L'efficacia di questo tipo di bioreattore è stata dimostrata utilizzando condrociti e cellule cardiache: i costrutti cartilaginei ottenuti dalla coltura in questo dispositivo hanno infatti mostrato proprietà biochimiche e biomeccaniche superiori rispetto a quelli coltivati nei bioreattori *spinner-flask*, mentre i tessuti cardiaci hanno manifestato la presenza di cellule capaci di contrarsi spontaneamente e sincronicamente [15].

I bioreattori descritti fino ad ora sono in grado di attuare sul costrutto una stimolazione per mezzo di un fluido che favorisca un adeguato trasporto di nutrienti e gas nella struttura. Allo stesso tempo però, l'unico condizionamento meccanico che sono in grado di generare è uno sforzo di taglio sulle cellule in coltura, stimolo utile nel caso si vogliano ricreare tessuti quali cartilagine, vasi sanguigni o valvole cardiache [16], ma che, molte volte, da solo, non risulta sufficiente per garantire una corretta espansione cellulare. In base al tipo di tessuto che si intende sviluppare infatti, diversi sono gli stimoli necessari per una corretta maturazione del costrutto. È stato dimostrato, ad esempio, come la compressione favorisca lo sviluppo di ECM e quindi una miglior risposta da parte dei condrociti nei tessuti cartilaginei [17]; oppure una distensione meccanica ciclica migliori le proprietà dei costrutti contenenti cellule muscolari scheletriche, in particolare la trazione risulta utile nel caso si vogliano creare tessuti che *in vivo* sono sottoposti a tale stimolo, come tendini e legamenti, mentre uno sforzo pulsatile circonferenziale agente su *scaffold* tubulari seminati con cellule muscolari lisce, è in grado di migliorare l'organizzazione strutturale e la resistenza a trazione dei vasi sanguigni ingegnerizzati [15]. Un altro esempio di condizionamento

che determina notevoli risposte nei tessuti coltivati è la stimolazione elettrica, efficace soprattutto su cellule naturalmente eccitabili come i miociti nel muscolo scheletrico, favorendone la proliferazione, la migrazione e l'allineamento [6].

Lo sviluppo di bioreattori come sistemi di attuazione in grado di apportare questi svariati stimoli sui costrutti permette quindi notevoli vantaggi nella creazione di prodotti della TE rispetto alle condizioni di coltura statiche.

### 1.2.2. Bioreattore come sistema di monitoraggio e controllo

Un'esigenza che accomuna tutti i tipi di bioreattori è quella di far avvenire bioprocessi in condizioni operative ed ambientali del sistema costantemente monitorate e controllate.

Tipici fattori ambientali come il pH, la temperatura e la concentrazione di ossigeno, devono essere mantenuti ad un livello definito per permettere la riproducibilità e la standardizzazione dei processi, oltre che per garantire le corrette condizioni di coltura per le cellule. Questo può avvenire sia tramite incubatori, cioè strumenti in grado di ricreare queste condizioni ambientali e all'interno dei quali può esser posta la camera di coltura, sia, soprattutto negli ultimi anni, utilizzando bioreattori automatizzati (*stand-alone*) che siano in grado essi stessi di controllare l'ambiente di crescita delle cellule e mantenere le condizioni desiderate [16].

Con il termine sistema di monitoraggio e controllo però, s'intende più nello specifico l'utilizzo di un bioreattore come sistema in grado di controllare ciò che avviene al costrutto durante la maturazione in termini di proprietà meccaniche, strutturali o chimiche, oppure per quanto riguarda le condizioni del mezzo di coltura (come pH, concentrazione di biomolecole, ...).

Normalmente lo sviluppo del tessuto viene monitorato attraverso prelievi istologici che sono distruttivi e complessi, implicano tempi di analisi molto lunghi e anche un'elevata numerosità di campioni per permettere prelievi multipli e a diversi istanti temporali. Utile risulterebbe quindi l'incorporazione di tecniche avanzate per l'osservazione micro e macroscopica on-line come la video microscopia, la risonanza magnetica nucleare e la tomografia computerizzata. Le tecniche ottiche in particolare presentano grandi potenzialità per l'osservazione non invasiva, sebbene il loro utilizzo sia ostacolato dallo spessore e dalle caratteristiche eterogenee dei costrutti [6, 15].

Queste tecniche permetterebbero di avere un monitoraggio costante delle condizioni del sistema e, se associate ad un controllo in retroazione, i dati da loro raccolti risulterebbero indispensabili per determinare un'eventuale modifica dei parametri di coltura, come per esempio la velocità della portata di perfusione o il ricambio del medium esausto.

La possibilità di monitorare le caratteristiche del costrutto ingegnerizzato in tempo reale infatti, consentirebbe una più agevole identificazione del suo stato di maturazione ed un'opportuna modulazione dei parametri di coltura [6].

Inoltre, modellizzando i parametri acquisiti *on-line* si potrebbe predire lo sviluppo del tessuto nel tempo e quindi prevedere le tempistiche di impianto.

### 1.2.3. Bioreattore come sistema modello

Il ruolo del bioreattore come attuatore di stimoli meccanici su costrutti ingegnerizzati può estendersi oltre l'approccio convenzionale che mira solo al miglioramento della proliferazione e del differenziamento cellulare. I bioreattori, infatti, definiti come piattaforme altamente funzionali per la rappresentazione controllata di sollecitazioni microambientali [6], possono anche servire come validi modelli *in vitro* per valutare l'effetto patologico di forze fisiche sullo sviluppo di un tessuto e predire la risposta del costrutto una volta impiantato *in vivo* [15]. Spesso, per lo studio delle risposte cellulari, si utilizzano modelli basati su colture monostrato in piastre di Petri e in condizioni statiche, che sono poco costosi ma che male rappresentano la condizione *in vivo*. I bioreattori, invece, consentendo la coltura di strutture tridimensionali e l'applicazione di stimoli meccanici che simulano quelli nativi, possono rappresentare ottimi sistemi modello per la comprensione della meccanobiologia, riducendo così anche il ricorso a modelli animali che sono invece molto costosi, determinano forti implicazioni etiche e presentano un'alta variabilità *intra-soggetto*, inoltre offrono una ridotta possibilità di osservazioni in tempo reale e spesso non rappresentano in maniera significativa la fisiologia e la patologia umane [6].

Un esempio di bioreattore usato come sistema modello è il RWV descritto precedentemente; questo tipo di dispositivo si è rivelato efficace non solo nella coltura di cellule sane, ma anche in quella di cellule tumorali. Sono stati infatti svolti studi con questa tipologia cellulare che hanno portato alla realizzazione di tessuti cancerosi atti a riprodurre la struttura e la composizione dei tessuti tumorali *in vivo*. In particolare, il bioreattore è stato utilizzato per identificare e controllare vari fattori biochimici che influenzano le funzioni cellulari e la crescita tessutale. Ha inoltre permesso lo studio dell'instabilità fenotipica, della resistenza alle radiazioni e la risposta ai farmaci da parte del tumore [15].

Infine, i bioreattori come sistemi modello sono stati utilizzati anche per lo studio del comportamento delle cellule staminali mesenchimali, cellule multipotenti capaci di differenziare *in vitro* in diversi tipi cellulari (osteoblasti, condrociti, mioblasti, ...) e che quindi rappresentano una valida risorsa per l'ingegneria dei tessuti. I bioreattori a perfusione confinata, ad esempio, si

sono rivelati strumenti molto efficaci per la determinazione dei fattori che incrementano la proliferazione di questo tipo di cellule o il differenziamento in senso osteogenico piuttosto che condrogenico [6].

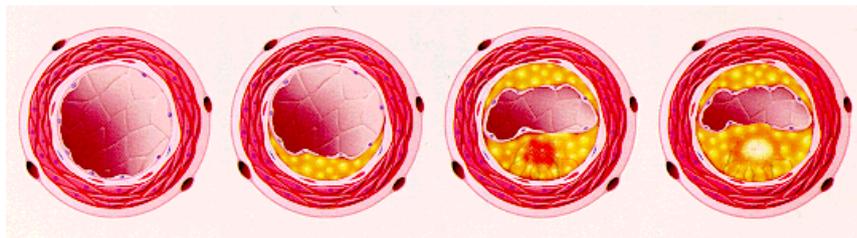
Da quanto descritto per i bioreattori, si può evincere che numerosi siano i parametri che entrano in gioco nello sviluppo di un tessuto ingegnerizzato e che molto importante risulta il compito dell'ingegnere nell'andare a progettare adeguatamente il sistema di condizionamento, in modo da conferire la giusta stimolazione al costrutto.

In un'ottica più orientata ad argomenti inerenti al presente lavoro di tesi, di cui sono oggetto d'interesse strutture vascolari (di tipo nativo o prodotte dall'ingegneria dei tessuti), nei prossimi paragrafi verrà focalizzata l'attenzione sulle caratteristiche di queste strutture e sulle loro implicazioni in ambito clinico.

### **1.3. Disturbi cardiovascolari e trattamenti clinici in uso**

Le malattie cardiovascolari (CVDs, *Cardiovascular Diseases*), ovvero il gruppo di disturbi a carico del cuore e dei vasi sanguigni, rappresentano la principale causa di morte a livello mondiale. Solo negli USA, le CVDs colpiscono 80 milioni di americani e hanno causato la morte del 35.3% della popolazione statunitense nel 2005 [1]. Il problema è accentuato anche dal fatto che, il 33% delle morti dovute a problemi cardiovascolari ha interessato individui di età inferiore ai 75 anni, dato non trascurabile se si tiene conto che l'aspettativa di vita media, oggi, è di 77.9 anni [18].

I vasi sanguigni possono perdere la loro funzionalità a causa di svariate patologie quali aneurismi, che consistono nella dilatazione della parete del vaso, trombosi, cioè la formazione di coaguli, o più comunemente a causa di aterosclerosi, una malattia infiammatoria che provoca indurimento e ispessimento della parete dei vasi fino alla formazione di placche fibroadipose che vanno a depositarsi nello spessore dell'intima e negli strati più interni della tunica media [19]. Questo provoca il graduale restringimento del lume del vaso (stenosi) (Figura 1.4), con conseguente diminuzione dell'irrorazione dei tessuti a valle: la situazione risulta pericolosa, in particolare, quando va a colpire vasi che portano il nutrimento ad organi vitali, come cuore, cervello e fegato [18].



**Figura 1.4.** Evoluzione della formazione di placca aterosclerotica all'interno di un'arteria. Da sinistra: vaso pervio; iniziale deposito di sostanze, quali ad esempio colesterolo, che causano un iniziale inspessimento ed indurimento della parete; aumento del volume della placca fino ad occlusione del lume del vaso.

L'utilizzo di medicinali e la regolazione dello stile di vita non sono spesso sufficienti a prevenire l'occlusione dei vasi. Risulta perciò necessario un intervento chirurgico: le opzioni meno invasive riguardano l'angioplastica con palloncino e l'inserimento di *stent* nella regione malata, tramite i quali è possibile eliminare la placca arteriosclerotica e mantenere il vaso pervio. A volte però questo non è sufficiente ed è richiesta la sostituzione del vaso danneggiato mediante la procedura di *bypass*, cioè l'inserimento di un tratto di vaso posto in parallelo al tratto ostruito, in grado di ripristinare il corretto afflusso sanguigno.

I vasi impiegati nelle operazioni di *bypass* possono essere sia nativi che di origine sintetica. Di seguito sono mostrate più nel dettaglio la struttura dei vasi sanguigni e le terapie cliniche in uso oggi.

### 1.3.1. Struttura dei vasi sanguigni

Per realizzare un prodotto dell'ingegneria dei tessuti bisogna prima di tutto capire la funzione svolta dal tessuto stesso. In particolare, nell'ambito vascolare, la conoscenza della struttura dei vasi sanguigni e di quale sia il loro ruolo all'interno del corpo umano, sono essenziali per poter provare a replicare in vitro questi elementi e quindi garantire che i costrutti creati siano sostituiti efficaci una volta impiantati.

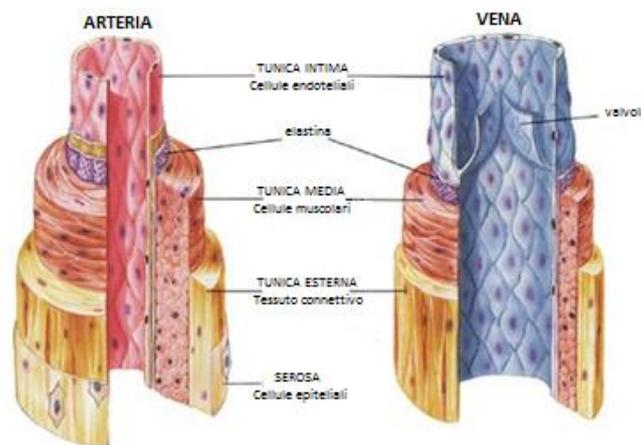
In generale il sistema vascolare ha il compito di trasportare il sangue dal cuore fino ai tessuti periferici del corpo e viceversa, per poterli nutrire e ossigenare, ma anche depurarli dai prodotti di scarto delle diverse reazioni metaboliche che avvengono a livello cellulare [24].

Pompato dal cuore, infatti, il sangue viaggia in grossi vasi dette arterie, le quali si ramificano, divenendo sempre più piccole e numerose, così da assumere il nome di arteriole. Questi piccoli vasi si diramano a loro volta, diminuendo le loro dimensioni e formando i così detti capillari; è a questo livello che avviene lo scambio di gas e molecole con i tessuti circostanti. Da quest'ultimi il

sangue torna a circolare in vasi sempre più grossi, attraversando prima le venule e poi le vene, che lo riportano al cuore stesso.

I vasi sanguigni vengono quindi classificati sulla base del loro calibro e della loro capacità di condurre il sangue dalle zone periferiche del corpo al cuore (arterie) o viceversa (vene).

In generale queste strutture sono composte da tre strati concentrici denominati (dall'interno verso l'esterno) tunica intima, media e avventizia (Figura 1.5). Ogni strato è formato da differenti tipi di cellule e dalla matrice extracellulare da esse prodotta, contenente quantità variabili di tessuto connettivo e muscolare liscio. Sono proprio la struttura e la composizione del vaso che ne determinano le specifiche proprietà funzionali.



**Figura 1.5.** Struttura di un vaso sanguigno: a sinistra sezione di un'arteria, a destra sezione di una vena. Entrambi i tipi di vaso risultano formati da tre strati principali: tunica intima, tunica media, tunica avventizia.

La **tunica intima** costituisce lo strato più interno della parete, è formata principalmente dall'endotelio e dalla membrana basale, composta da fibre di collagene, laminina, fibronectina e proteoglicani (PGs, *Proteoglycans*). L'endotelio è formato da un singolo strato di cellule endoteliali (ECs, *Endothelial Cells*), allungate e generalmente allineate nella direzione del flusso, direttamente a contatto con il sangue che scorre all'interno del vaso. Questa superficie risulta un'interfaccia liscia e non trombogena tra sangue e parete vascolare, che permette di controllare il trasporto di nutrienti e acqua attraverso la parete. L'endotelio è inoltre una struttura biologicamente attiva, infatti, regola il tono vasale tramite la secrezione di sostanze che influenzano il fenotipo delle cellule muscolari lisce [12].

La **tunica media** costituisce generalmente lo strato più spesso della parete ed è caratterizzata da strutture differenti nelle diverse parti del sistema vascolare. Nelle grandi arterie più prossime al cuore essa è costituita da lamelle a base di elastina alternate a fibre di collagene nelle quali sono incorporate le cellule muscolari lisce (SMCs, *Smooth Muscle Cells*) orientate circonferenzialmente

e i PGs [19]. Le componenti proteiche e cellulari della tunica media contribuiscono significativamente alle proprietà meccaniche di questa struttura quali resistenza a trazione, *compliance* e risposta vasoattiva al flusso di sangue: il collagene conferisce rigidità e resistenza al tessuto, mentre l'elastina fornisce elasticità anche a basse deformazioni, impedendo così alla parete di deformarsi in modo permanente a causa dello stretch ciclico a cui è sottoposta. La produzione di fibre di collagene e di elastina è soprattutto a carico delle SMCs, capaci inoltre di regolare l'attività di costrizione e dilatazione del vaso stesso, funzione biomeccanica fondamentale, soprattutto per le arterie [12]. Le pareti di queste ultime, infatti, contengono strati elastici in più rispetto alle vene, rendendole capaci di contrarsi e dilatarsi per regolare il flusso sanguigno e mantenere la pressione entro i parametri fisiologici durante tutto il ciclo cardiaco.

La **tunica avventizia**, infine, è lo strato più esterno costituente la parete dei vasi sanguigni: è composta prevalentemente da fibroblasti (Fbs), fasci di fibre di collagene di tipo I e, in minore quantità, da fibre di elastina e SMCs. I Fbs sono i primi responsabili per la regolazione della ECM dell'avventizia attraverso la sintesi e la degradazione del collagene, ma possono essere stimolati a migrare, proliferare e differenziarsi quando necessario. L'alto contenuto di collagene aiuta invece a prevenire la sovra-distensione e la rottura vascolare alle alte pressioni. Questo strato della parete infatti protegge il vaso e ne permette l'ancoraggio ad altre strutture, formando una sorta di *continuum* tra il vaso e altri tessuti del corpo.

La tunica avventizia è attraversata, inoltre, da fibre nervose e vasi linfatici e nel caso di vasi di grandi dimensioni, è perfusa da un sistema di piccoli vasi, detti *vasa vasorum*, deputati al trasporto di ossigeno e sostanze nutritive ai tessuti della parete del vaso stesso [19, 24].

### 1.3.2. Sostituti vascolari nativi

I vasi di origine naturale si dividono in base alla provenienza in autologhi, allogenici e xenogenici (Tabella 1.1).

Le tecniche vascolari d'impianto in uso clinico non raccomandano l'utilizzo di materiale proveniente da altre specie animali perché porterebbe alla formazione di aneurismi, infezione e trombosi [20]. Inoltre la fonte xenogenica potrebbe fungere da tramite per la trasmissione di malattie. Questi sostituti potrebbero essere utilizzati però, eliminando la loro componente cellulare, come *scaffold* nella TE (come descritto nel Capitolo 2).

La più comune alternativa in uso oggi consiste nel trasferire vasi sanguigni da un sito ad un altro del paziente stesso. In particolare per vasi di piccolo calibro l'utilizzo della vena safena o di arterie

quali la mammaria o la radiale, quando disponibili, risulta essere la tecnica preferita per la realizzazione di bypass per vasi di piccolo calibro [21].

Quando questi vasi non sono disponibili, è possibile ricorrere all'utilizzo di sostituti prelevati da individui della stessa specie, spesso da cadaveri, e crioconservati. Questi vasi presentano caratteristiche migliori rispetto alle protesi sintetiche: sono relativamente resistenti alle infezioni e non richiedono anticoagulanti dato che generano minime complicazioni tromboemboliche. Gli svantaggi riguardano però la loro non semplice reperibilità e durata: possono infatti andare incontro a dilatazione, calcificazione o rottura [20].

	<b>AUTOLOGHI</b>	<b>ALLOGENICI</b>	<b>XENOGENICI</b>
<b>VANTAGGI</b>	Versatilità, resistenza alle infezioni, posizione vicina al tratto interessato dall'operazione di bypass (arteria mammaria interna per bypass coronarici).	Possibilità di crioconservarli, resistenza alle infezioni (generano minime complicazioni tromboemboliche), disponibilità.	Reperimento facile, disponibilità.
<b>SVANTAGGI</b>	Disponibilità limitata, possibili lesioni durante l'espianto.	Bassa reperibilità, deteriorazione sul lungo termine (vasodilatazione, calcificazione).	Deteriorazione sul lungo termine, infezione, trasmissione malattie.
<b>REAZIONE IN VIVO</b>	Ispessimento e iperplasia dell'intima (sostituto arterioso), ispessimento della parete, dilatazione del vaso e desquamazione dell'endotelio (sostituto venoso).	Generazione risposta immunitaria.	Generazione elevata risposta immunitaria, per questo non vengono utilizzati se non come <i>scaffold</i> dopo esser stati decellularizzati.

**Tabella 1.1.** Sostituti vascolari di origine naturale. Vantaggi, svantaggi e principali reazioni che nascono dopo il loro impianto in vivo. (Adattata da [21]).

### 1.3.3. Sostituti vascolari sintetici

Sebbene il *gold standard* per la sostituzione vascolare sia rappresentato dal vaso sanguigno autologo, in molti casi questo materiale potrebbe non essere disponibile, perché già stato utilizzato, o perché soggetto ad altre malattie [21]. Tenendo conto del fatto che le proprietà riscontrate nei sostituti alloigenici non sono soddisfacenti nel lungo termine, si sono sviluppati, come protesi vascolari, nuovi materiali che potessero soddisfare le caratteristiche e le funzioni di un vaso sanguigno.

Un sostituto vascolare ideale infatti dovrebbe possedere le seguenti caratteristiche [21]: resistenza meccanica a fatica e compliance adeguata per sopportare gli sforzi emodinamici,

assenza di tossicità, assenza di immunogenicità, biocompatibilità, disponibilità in varie taglie, suturabilità e semplicità di utilizzo nell'ambito chirurgico, abilità nel sopportare la formazione di trombi in vivo, resistenza alle infezioni, incorporazione completa nel tessuto ospite, capacità di sviluppo e crescita una volta impiantato, costo di produzione ragionevole.

Negli ultimi 50 anni due sono i polimeri che sono stati utilizzati come protesi vascolari sintetiche: il polietilentereftalato (PET) o *Dacron* e il politetrafluoroetilene (PTFE) o *Gore-Tex* se utilizzato in forma espansa [21].

Il PET è un poliestere termoplastico altamente cristallino e idrofobico; viene utilizzato ancora oggi per la realizzazione di protesi vascolari di grosso calibro impiegando fibre di PET lineare tessute, le cui proprietà dipendono dai parametri del processo di formazione [22]. Spesso il sostituto tubulare creato viene rivestito con albumina, collagene o messo a bagno nel sangue del paziente stesso per renderlo più impermeabile [21].

Il PTFE, invece, è un polimero altamente cristallino, idrofobico e resistente al calore; in forma compatta viene usato per accessori e parti di strumentazione biomedicale, mentre in forma espansa (*Gore-Tex*) presenta impermeabilità all'acqua e permette lo scambio di gas e la traspirazione, per questo viene utilizzato per la realizzazione di protesi vascolari di medio calibro (oltre che, per esempio, per la fabbricazione di patch cardiaci e fili di sutura).

Il successo di questi materiali è stato infatti limitato ai soli vasi di grosso e medio calibro (diametro superiore agli 8-6 mm), come l'aorta, l'arteria toracica o addominale, poiché in questo caso l'elevata portata sanguigna riesce a sovrastare l'effetto trombogenico dovuto all'utilizzo di materiale sintetico. Per vasi di piccolo calibro (diametro inferiore ai 6 mm) invece, che risultano quelli maggiormente richiesti e nei quali il flusso sanguigno scorre a velocità inferiori, *Dacron* e *Gore-Tex* hanno generalmente dimostrato inadeguatezza, soprattutto causando trombogenicità, anastomosi, aneurismi e infezioni [23].

Altri materiali in studio clinico da parecchi anni sono i PTU (poliuretani termoplastici) o SPU (poliuretani a segmenti). Sono copolimeri a blocchi con ottima resistenza a fatica in flessione e buona emocompatibilità, per questo possono essere utilizzati per applicazioni cardiovascolari, soprattutto per protesi vascolari di piccolo calibro e cateteri [22]. Questi materiali vengono utilizzati sia in forma di fibre che di schiume. Possiedono molte caratteristiche interessanti, permettono una guarigione eccellente, basso sanguinamento a sutura, ma sono necessarie ulteriori ricerche prima che possano essere raccomandati per l'uso nell'uomo come bypass periferico [21].

Gli svantaggi che riguardano l'utilizzo di materiali sintetici sono inoltre legati alla loro incapacità di crescere e di auto-ripararsi se danneggiati. Questo risulta un problema soprattutto in ambito pediatrico, dove l'utilizzo di sostituti sintetici richiede ulteriori interventi durante la fase di crescita del paziente. Nel caso invece di pazienti sottoposti a emodialisi, gli *shunts* arterovenosi, realizzati spesso in PTFE, essendo sottoposto a ripetuti inserimenti dell'ago usato per il prelievo del sangue, vanno incontro a rottura poiché il sostituto è incapace di cicatrizzare come farebbe invece un vaso nativo.

La Tabella 1.2 riassume vantaggi e svantaggi dei sostituti vascolari sintetici in uso:

	<b>PET (Dacron)</b>	<b>ePTFE (Gore-Tex)</b>	<b>PTU</b>
<b>VANTAGGI</b>	Stabilità, bassa permeabilità, ridotto sanguinamento, porosità.	Stabilità, miglior crescita cellulare.	Buona emo e biocompatibilità, minor trombogenicità.
<b>SVANTAGGI</b>	Ridotta integrazione nel tessuto, rischio di infezione, sfilacciamento, dilatazione nel tempo.	Sanguinamento, rischio di infezione, limitata integrazione, rischio di infezione.	Biodegradazione, rischio di infezione.
<b>REAZIONE IN VIVO</b>	Formazione capsula fibrosa, scarsa formazione di endotelio.	Formazione capsula fibrosa, no crescita interna di tessuto, rivestimento del lume con fibrina e piastrine, angiogenesi, migrazione di macrofagi e fibroblasti.	Sottile strato interno di fibrina, limitata crescita cellulare che accresce con la presenza di porosità.

**Tabella 1.2.** Sostituti vascolari di origine sintetica. Vantaggi, svantaggi e principali reazioni che nascono dopo il loro impianto in vivo. (Adattata da [21]).

A causa delle problematiche sopra descritte relative ai vasi nativi e alle protesi vascolari sintetiche per il piccolo calibro, risulta evidente la necessità di avere a disposizione sostituti pronti all'uso (*off-the-shelf*). Va da sé come la TE si offra quale valida alternativa promettente per la creazione di vasi sanguigni ingegnerizzati (TEBVs, *Tissue Engineering Blood Vessels*) perfettamente biocompatibili, facilmente reperibili e che presentino tutte le proprietà di un vaso nativo.

## 1.4. Conclusioni

Da quanto descritto finora, si evince come l'ingegneria dei tessuti possa rappresentare una valida alternativa alle tecniche fino ad oggi in uso in ambito clinico, offrendo la possibilità di creare

sostituti ingegnerizzati con proprietà simili a quelle dei tessuti nativi [25] e superando i limiti imposti dall'impiego di protesi naturali o sintetiche.

Si è descritto come la TE si avvalga di specifici strumenti, i bioreattori, capaci di garantire una coltura dinamica mediante l'applicazione di processi biologici e/o biochimici in un ambiente altamente monitorato e in condizioni operative standardizzate, riproducibili e controllate [15]. Inoltre, tali dispositivi possono essere utilizzati come validi modelli in vitro per valutare l'effetto di alcuni fattori (meccanici o ambientali) sulla coltura di costrutti, rendendo il loro impiego fondamentale per lo sviluppo della TE.

Con particolare attenzione al campo vascolare, e nello specifico per vasi di piccolo calibro, molte sono le variabili in gioco nell'ambito dell'ingegneria tessutale per quanto riguarda la scelta dei materiali, le tecniche di realizzazione e i tipi di condizionamento cellulare applicabili per lo sviluppo di vasi sanguigni ingegnerizzati. Nel Capitolo 2 verranno analizzati nel dettaglio lavori presenti in letteratura inerenti alle scelte fatte fino ad oggi in questo campo.

Certo è che l'ambito dell'ingegneria tessutale è in continua espansione ed è necessario percorrere ancora molta strada prima di poter ottenere risultati concreti applicabili all'uomo e che diano atto a cambiamenti significativi nella cura delle malattie (cardiovascolari e non).

## Capitolo 2

### Stato dell’arte

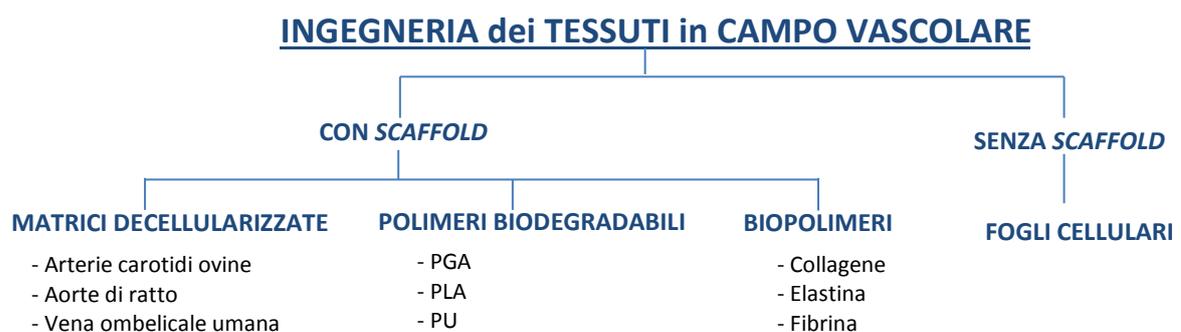
In questo capitolo verranno descritte le differenti strategie utilizzate fino ad oggi nell’ambito dell’ingegneria dei tessuti per applicazioni in campo vascolare; in particolare nella prima parte verranno illustrati i diversi materiali e le tecniche con cui è possibile realizzare vasi sanguigni ingegnerizzati, mentre nella seconda parte ci si focalizzerà sulle tipologie di coltura, nonché sui bioreattori utilizzati in questo ambito.

#### 2.1. Tipologie di costrutti

Per generare costrutti che possano avere proprietà simili ai vasi nativi, è necessario che i materiali utilizzati per realizzarli presentino tre componenti fondamentali [23]:

- una componente con elevata resistenza alla trazione per fornire adeguato supporto meccanico: questo tipo di proprietà può essere garantita dall’uso di fibre di collagene o loro analoghi;
- una componente che fornisca ritorno elastico e prevenga la formazione di aneurismi: è il caso delle fibre di elastina o loro analoghi;
- un endotelio omogeneo che eviti la formazione di trombi.

Fino ad oggi, le strategie utilizzate in grado di rispettare questi criteri sono quattro e sono divise in due grandi gruppi (Figura 2.1): quelle che utilizzano uno *scaffold* e quelle che ne fanno a meno (*scaffold-free*). Al primo gruppo appartengono le tecniche che impiegano matrici decellularizzate, polimeri biodegradabili e biopolimeri, mentre nel secondo gruppo rientra la strategia dei “fogli cellulari”.



**Figura 2.1.** Schema rappresentante i diversi approcci usati nell’ambito della TE con le corrispettive tipologie di *scaffold* impiegate.

### 2.1.1. Costrutti con *scaffold*

In questo paragrafo verranno descritte nel dettaglio le strategie che prevedono l’utilizzo di uno *scaffold* per la realizzazione di vasi sanguigni ingegnerizzati, ovvero quelle che si avvalgono dell’utilizzo di matrici decellularizzate, polimeri biodegradabili o biopolimeri.

#### 2.1.1.1. Matrici decellularizzate

Questo tipo di approccio prevede l’estrazione di un tessuto (di origine xenogenica o allogenica) che viene messo in contatto con una soluzione contenente agenti capaci di lisare le cellule e distruggere le componenti cellulari, come detergenti, enzimi e sali. L’obiettivo è quello di raggiungere un totale livello di decellularizzazione e al contempo riuscire a conservare la struttura e le proprietà della matrice extracellulare. Una volta decellularizzato, il tessuto viene conservato tramite tecniche di criopreservazione (come il congelamento e la vitrificazione) per essere poi utilizzato al momento opportuno. La rimozione degli agenti usati per la criopreservazione viene eseguita lavando il costrutto in soluzione salina o nel medium usato per la coltura cellulare e permette la successiva semina del tessuto con cellule vascolari e la maturazione del costrutto per la formazione del vaso sanguigno ingegnerizzato [25].

Un esempio di studio effettuato usando questa tecnica è quello pubblicato da Zhao e collaboratori [26], nel quale vengono utilizzate come *scaffold* arterie carotidi ovine prelevate da esemplari di età compresa tra i 6 e gli 8 mesi. I campioni, di lunghezza 60 mm e diametro interno tra i 3 e i 4 mm, sono stati decellularizzati attraverso un iniziale congelamento a  $-80^{\circ}\text{C}$ , seguito dall’immersione dei vasi in una soluzione contenente etanolo. Le carotidi sono state successivamente inserite in un agitatore orbitale per 72 ore e, dopo essere state risciacquate in acqua distillata, sono state messe in contatto con DNasi e RNasi per 4 ore.

Lo *scaffold* così ottenuto, dopo essere stato testato attraverso test di *burst pressure* e di resistenza a sutura, è stato utilizzato per la semina di SMCs e ECs differenziate in vitro a partire da cellule mesenchimali ovine (Figura 2.2). I costrutti sono stati anche impiantati per 2 e 5 mesi negli ovini da cui sono state estratte le cellule per studiarne un eventuale rimodellamento in vivo.



**Figura 2.2.** TEBV con *scaffold* ottenuto da matrice decellularizzata inserito in una Petri ed immerso in mezzo di coltura. Sullo *scaffold* sono stati inseriti degli anelli in silicone per mantenere in sospensione il costrutto che altrimenti affonderebbe nel medium.

Il vantaggio e lo svantaggio di questo approccio risiedono entrambi nell’origine animale dello *scaffold*: se infatti da una parte la fonte xenogenica presenta un’elevata disponibilità, dall’altra implica la possibile trasmissione di agenti patogeni dall’animale donatore all’umano ricevente.

Per superare questo ostacolo, è stata sviluppata l’ipotesi di utilizzare vasi autologhi, come nel caso dello studio effettuato da Tosun e collaboratori [27]. In questo lavoro, sono stati estratti campioni di lunghezza 100 mm da cordoni ombelicali umani e sono stati dissezionati fino ad ottenere uno spessore uniforme di 750  $\mu\text{m}$ . I campioni sono stati poi lavati in una soluzione di sodio dodecilsolfato (SDS), sciacquati in acqua distillata e immersi in PBS (*phosphate buffered solution*) contenente DNasi; al termine della decellularizzazione, gli *scaffold* così ottenuti sono stati seminati con miofibroblasti umani e inseriti in un bioreattore a perfusione pulsatile per 30 giorni. Alcuni campioni sono stati coltivati in un sistema duale, cioè che permetteva l’alloggiamento di due campioni, mentre altri singolarmente; i costrutti coltivati in parallelo sono stati esposti a pressioni comprese tra 80 e 120 mmHg, quelli coltivati in singolo anche a pressioni più basse (30-50 mmHg). I test istologici hanno mostrato che in tutti i casi si è avuta aderenza, proliferazione e migrazione cellulare, ma le aree di maggiore densità cellulare dipendevano dal tipo di coltura imposta. Il sistema di coltura ha influenzato anche le proprietà meccaniche, testate con esperimenti di trazione uniassiale.

#### 2.1.1.2. Scaffold biodegradabili

Un materiale polimerico può essere definito “biodegradabile” se tutti i suoi componenti organici sottostanno a processi di degradazione indotti da un sistema biologico per via naturale o metabolica [28].

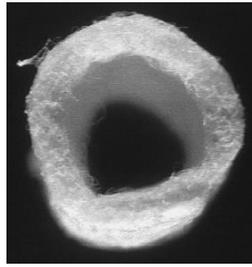
L’idea alla base dell’utilizzo di questo tipo di materiali è quella di seminare le cellule su uno *scaffold* biocompatibile che ne favorisca la crescita e lo sviluppo e che venga completamente

degradato una volta che le cellule abbiano secreto una quantità di ECM tale da garantire le proprietà meccaniche tipiche di un vaso sanguigno. Esempi di polimeri usati in questo ambito sono l'acido poliglicolico (PGA), l'acido polilattico (PLA) e il policaprolattone [25].

Il grande vantaggio dei polimeri biodegradabili è che la loro microstruttura, le loro proprietà meccaniche e la loro velocità di degradazione possono essere controllati regolandone la composizione chimica. È molto importante calcolare quando impiantare lo *scaffold* conoscendo la velocità di degradazione del polimero, in quanto un impianto prematuro può portare alla degradazione del materiale prima che le cellule abbiano prodotto la quantità di ECM richiesta, causando così il fallimento del costrutto. Questo risulta essere uno dei maggiori problemi dello *scaffold* in PGA: questo polimero viene infatti riassorbito molto velocemente non dando alle cellule il tempo per rimodellare completamente il tessuto. Per questo motivo si è pensato di copolimerizzare il PGA con polimeri (come l'acido poli-L-lattico o il policaprolattone) che migliorino le proprietà meccaniche del tessuto [23]. Inoltre le sostanze rilasciate durante la reazione d'idrolisi, che porta alla degradazione dello *scaffold*, sono acide e portano alla formazione di regioni a basso pH; questi cambiamenti di pH inducono alla diminuzione della mitosi delle SMCs e mutano il loro stato di differenziazione da contrattile e sintetico [25]. Un altro svantaggio dei polimeri sintetici è la mancanza di bioattività, per questo, spesso, nella superficie degli *scaffold* biodegradabili vengono incorporati peptidi che promuovono l'adesione cellulare [25].

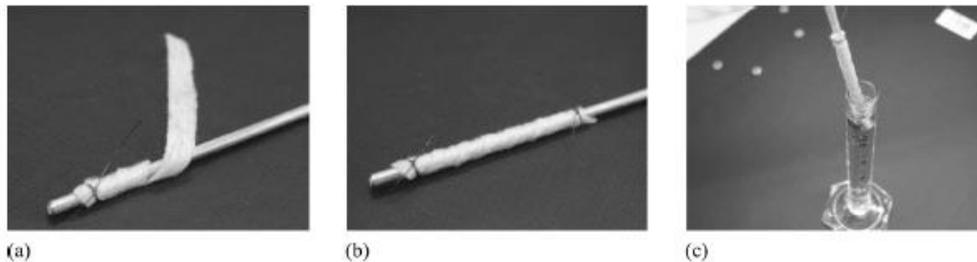
Il PGA rimane comunque uno dei polimeri più utilizzati in questo ambito. Ne è un esempio il lavoro di Hoerstrup e colleghi [29], in cui è stato utilizzato PGA rivestito però con un sottile strato di poli-4-idrossibutirrato (P4HB) per formare un nuovo polimero bioriassorbibile con il quale realizzare degli *scaffold*. Il P4HB è infatti un biopolimero velocemente riassorbibile che non è solamente resistente e duttile, ma anche termoplastico, quindi capace di assumere quasi qualsiasi tipo di forma. I campioni ottenuti presentavano un diametro interno di 0.5 cm e una lunghezza di 4 cm e sono stati sterilizzati con ossido di etilene (Figura 2.3). Successivamente lo *scaffold* è stato seminato con miofibroblasti ovini ed è stato coltivato per 4 giorni in statica. È stato infine inserito nel bioreattore per la coltura dinamica dopo che sono state aggiunte cellule endoteliali ovine. I costrutti sono stati quindi coltivati all'interno di un bioreattore pulsatile per 4, 7, 14, 21 e 28 giorni, applicando una portata crescente da 125 a 750 ml/min. Al termine del periodo di coltura sono state eseguite analisi istologiche e test meccanici (*burst pressure* e *suture retention strength*). I risultati ottenuti hanno permesso di concludere che i TEBVs, realizzati con il nuovo

polimero biorassorbibile ottenuto a partire dal PGA, vantano forze a rottura sopra i livelli fisiologici e resistenza alla sutura appropriata per un'operazione chirurgica.



**Figura 2.3.** Scaffold vascolare realizzato a partire da una *mesh* in PGA e P4HB. Si nota l'elevata porosità del lume del vaso (ID=0.5 cm).

Ispirandosi al lavoro appena descritto, Stekelenburg e collaboratori [30] hanno realizzato anch'essi TEBVs di piccolo diametro usando uno *scaffold* in PGA, con fibre di diametro 10-15  $\mu\text{m}$  e pori di dimensioni 50-200  $\mu\text{m}$ , rivestito con P4HB. Gli *scaffold* tubulari sono stati ottenuti a partire da un foglio di PGA avvolto attorno ad un mandrino in acciaio di diametro 3 mm, in modo da ottenere strutture con diametro interno di circa 3 mm, spessore 1 mm e lunghezza 4 cm. I campioni sono stati successivamente immersi in una soluzione contenente P4HB (Figura 2.4).



**Figura 2.4.** Fasi di fabbricazione di uno *scaffold* in PGA rivestito in P4HB: un foglio rettangolare di PGA è arrotolato attorno ad un mandrino (a) e fissato alle estremità con fili di sutura (b); il costruito è poi immerso in una soluzione contenente P4HB (c).

Gli *scaffold* sono stati calzati su tubi in silicone, sterilizzati con raggi ultravioletti e montati nel bioreattore. Dopo essere stati bagnati con PBS e lasciati asciugare in statica per una notte, sono stati seminati con miofibroblasti isolati da vene safene umane e inseriti in un gel di fibrina.

I campioni sono stati quindi coltivati per 1 settimana in statica e per 3 settimane in condizioni dinamiche di deformazione. Il PGA utilizzato ha iniziato a perdere le sue proprietà meccaniche già dopo circa una settimana, e dopo due settimane si è degradato quasi completamente. Lo studio ha evidenziato che i TEBVs ottenuti presentavano ottime proprietà meccaniche e biologiche, comparabili con quelle delle vene safene e soprattutto con quelle delle arterie mammarie interne.

Oggi giorno i costrutti realizzati con polimeri biodegradabili generano comunque risposte infiammatorie da corpo estraneo e non esiste ancora un sostituto realizzato con un polimero che sia completamente biodegradabile adatto all’impianto nell’uomo [23].

### 2.1.1.3. Biopolimeri

Con il termine “biopolimeri” si intendono polimeri di origine biologica e nell’ambito dell’ingegneria tessutale i più utilizzati sono collagene, elastina e fibrina, una proteina utilizzata nella coagulazione del sangue.

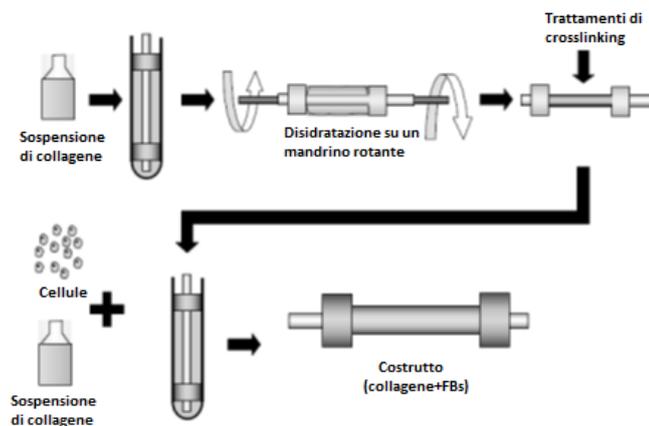
Il lavoro considerato pionieristico in questo campo è quello di Weinberg e Bell [31], i quali hanno utilizzato *scaffold* in gel di collagene su cui hanno seminato SMCs, fibroblasti (FBs) e ECs, generando una struttura multistrato che mima quella dei vasi sanguigni. In una prima fase, le SMCs immerse in un gel di collagene sono state seminate attorno ad un mandrino cilindrico; successivamente è stato creato un secondo strato di cellule aggiungendo per 7 giorni una sospensione cellulare contenente FBs attorno allo strato di SMCs.

Infine, le ECs sono state distribuite nel lume interno del costrutto attraverso l’utilizzo di un sistema di semina e perfusione. La struttura finale si componeva quindi di tre strati, uno più interno composto da ECs circondate, nell’ordine, da uno strato di SMCs e uno di FBs. I test meccanici eseguiti hanno però dimostrato che questi costrutti non risultavano idonei per sopportare la pressione fisiologica arteriosa presentando una *burst pressure* di appena 10 mmHg. Per migliorarne la resistenza, è stata quindi inserita nel costrutto una *mesh* in Dacron® che ha permesso di ottenere una pressione a rottura di 70 mmHg.

Successivamente altri ricercatori hanno intrapreso questa strada, il cui vantaggio principale consiste nel fatto che i biopolimeri non vengono riconosciuti dall’organismo ospite come sostanze estranee, essendo di origine biologica; un altro aspetto positivo risiede nel fatto che la produzione del gel (in collagene o in fibrina) e la semina sono attività concomitanti. Nel caso di materiali sintetici, infatti, la semina avviene successivamente poiché se avvenisse in contemporanea le cellule morirebbero a causa delle nocive condizioni di fabbricazione dello *scaffold* [23]. Inoltre i biopolimeri sono sostanze facilmente reperibili, soprattutto per quanto riguarda il gel di fibrina che può essere estratto direttamente dal sangue del paziente, e degradandosi non rilasciano sostanze citotossiche nell’ambiente circostante [25].

Questi materiali hanno però l’enorme svantaggio di essere caratterizzati da basse proprietà meccaniche. Per ovviare a questo problema, alcuni autori hanno pensato di aumentare la

resistenza dei costrutti in collagene attraverso trattamenti di reticolazione (*crosslinking*). È il caso del lavoro di Berglund e collaboratori [32], il cui obiettivo è quello di utilizzare un costrutto a base di collagene che serva da supporto per la semina cellulare e che dia alle cellule l’opportunità di secernere, riorganizzare e sviluppare la loro propria matrice cellulare. Inoltre, controllando il tasso di sviluppo e di degradazione di questo supporto, risulterebbe possibile anche impiantarli, dopo un breve periodo di coltura, e far terminare il processo di rimodellamento e sviluppo in vivo. Il costrutto in collagene, realizzato su un mandrino di diametro 3 mm, è stato deidratato facendo ruotare il mandrino e sottoposto a trattamenti crosslinkanti (con glutaraldeide o irradiazione UV o disidratazione termica). Successivamente la struttura ottenuta è stata posta all’interno di uno stampo in cui è stata inserita una sospensione di fibroblasti dermici umani che viene lasciata gelificare per 45 minuti a 37° (Figura 2.5). Infine il costrutto è stato tolto dallo stampo e messo in coltura in un medium di crescita per 8-23 giorni prima di essere testato.



**Figura 2.5.** Preparazione del costrutto in collagene e FBs: un mandrino (ID=3 mm) viene prima immerso in una sospensione di collagene, poi viene fatto ruotare per disidratare lo *scaffold* che viene successivamente sottoposto a trattamenti di *crosslinking*. Infine il supporto viene reimmerso in una soluzione contenente collagene e FBs per ottenere il costrutto finale (Adattata da [32]).

I test meccanici (trazione uniassiale circonferenziale e longitudinale e test di *burst pressure*) hanno evidenziato come i trattamenti di reticolazione aumentino le proprietà meccaniche dei costrutti, in particolare quelli trattati con glutaraldeide hanno raggiunto uno sforzo a rottura (10 MPa) più elevato rispetto a quelli sottoposti ad altri trattamenti di *crosslinking* (sforzo a rottura: 6-8 MPa).

I trattamenti di reticolazione utilizzati da Berglund e collaboratori sono risultati però tossici per le cellule. Girton e colleghi [33] hanno proposto quindi come alternativa l’utilizzo della glicazione per irrigidire e rafforzare i costrutti in collagene e incrementare la loro resistenza alla degradazione,

tutto senza intaccare la vitalità delle cellule. La glicazione è la reazione di reticolazione non enzimatica tra i gruppi amminici del collagene e altre proteine della ECM che è determinata dalla presenza di zuccheri riducenti come glucosio e ribosio.

Gli autori, partendo da una soluzione contenente SMCs estratte dall’aorta di ratto e collagene (Vitrogen®) e versandola all’interno di uno stampo contenente un mandrino, hanno realizzato costrutti di diametro 8 mm, lunghezza 3-5 mm e spessore 0.2-0.3 mm. I campioni sono stati quindi posti in coltura per 2 settimane in medium standard M199 (contenente 1 mM di b-aminopropionitrile, 0.1 mM di putrescina o 1 mM di aminoguanidina-HCl ) e successivamente è stato aggiunto al medium ribosio o glucosio in quantità variabile (15 o 30 mM); alcuni campioni sono stati invece mantenuti nel mezzo di coltura standard per essere utilizzati come controllo. I test di trazione uniassiale circonferenziale hanno dimostrato come il modulo elastico dei campioni testati incrementi all’aumentare della quantità di zucchero nel medium e in particolare questo incremento è risultato più rapido nel caso del ribosio piuttosto che in quello del glucosio.

Inoltre, la presenza di glucosio e di ribosio, ha aumentato i tempi di degradazione del collagene di 1.6 e 5.4 volte rispettivamente (campioni confrontati con i gruppi di controllo).

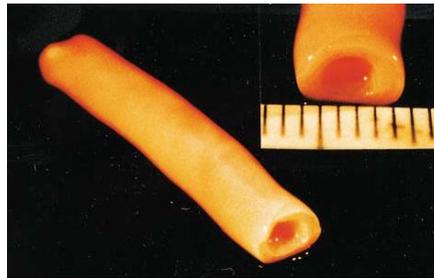
Infine, per verificare che la glicazione estesa nel tempo non producesse una risposta deleteria in seguito all’impianto del costrutto in vivo, i campioni posti in coltura in medium standard e quelli coltivati in medium addizionato con 30 mM di ribosio sono stati impiantati in tre specie di ratto ed estratti due settimane dopo: non sono stati trovati segni evidenti di grandi infiammazioni nè di calcificazione in nessuno dei campioni estratti.

Un’altra soluzione è quella di aumentare le proprietà meccaniche dei biopolimeri direzionando l’allineamento delle fibrille (di collagene o fibrina) e delle cellule applicando adeguati stimoli meccanici; l’uso dei bioreattori risulta quindi indispensabile nel caso della realizzazione di costrutti ingegnerizzati a base di biopolimeri.

### 2.1.2. Fogli cellulari

L’ultimo tipo di strategia descritta differisce dalle altre in quanto non contempla l’utilizzo di uno *scaffold*. Questa tecnica prevede infatti che il supporto del costrutto sia la matrice cellulare secreta dalle cellule stesse. Una volta che queste ultime hanno prodotto una quantità di ECM sufficiente, si forma un foglio cellulare che può essere avvolto intorno ad un mandrino per creare un costrutto tubulare.

Uno dei primi lavori pubblicati in cui è stata utilizzata questa tecnica è stato quello di L’Heureux e collaboratori [34]. SMCs umane estratte dalla vena ombelicale sono state fatte crescere in un medium ricco di acido ascorbico che potesse promuovere la deposizione di collagene affinché si formasse un primo foglio che, avvolto sul mandrino, desse origine alla tunica media del vaso. Successivamente, sul primo strato, ne è stato avvolto un secondo formato, questa volta, da fibroblasti, dando così vita alla tunica avventizia. Infine il costrutto tubulare è stato rimosso dal mandrino e il lume interno è stato ricoperto di ECs generando l’ultimo strato mancante del vaso, la tunica intima (Figura 2.6).



**Figura 2.6.** Vista macroscopica di un TEV maturo dopo 9 settimane di coltura. Il vaso (ID= 3mm) presenta una consistenza strutturale che gli permette di autosostenersi una volta rimosso dal mezzo di coltura. Si nota che i vari strati formano una parete vascolare continua.

Una volta testati, i costrutti realizzati con questa tecnica hanno presentato proprietà meccaniche inferiori rispetto a quelle delle arterie in quanto le fibre dell’ECM non si sono allineate in direzione circonferenziale come avviene invece nei vasi nativi; in particolare i costrutti sono risultati meno complianti, probabilmente a causa di un’insufficiente deposizione di elastina, e quindi se impiantati in vivo avrebbero potuto portare alla formazione di aneurismi [23].

Risultati migliori sono stati invece ottenuti nello studio di König e colleghi [35], in cui sono stati creati costrutti formati da soli due strati anzi che tre. L’obiettivo di questo lavoro è stato quello di dimostrare che lasciando produrre la matrice cellulare alle cellule stesse si crea un foglio molto più robusto e resistente rispetto a quello che si creerebbe utilizzando uno *scaffold* esogeno. Tramite biopsia sono stati prelevati da 25 pazienti campioni di pelle da cui sono stati isolati FBs mantenuti in coltura per 6-8 settimane, dando così origine a fogli cellulari ricchi di collagene e fibroblasti. Un primo foglio è stato avvolto su un mandrino di diametro interno 4.75 mm e lunghezza 21 cm, per poi essere rimesso in coltura per 12 settimane e infine deidratato, formando così una membrana interna acellulare. Attorno ad esso è stato avvolto un secondo strato di fibroblasti e il costrutto è stato mantenuto in coltura fino a un massimo di 28 settimane prima di essere sottoposto ai test meccanici. Si è verificato come i risultati delle prove di *burst pressure*

(circa 3500 mmHg) e di *suture retention strength* (152 gf) siano paragonabili a quelli delle arterie mammarie interne (3196 mmHg e 138 gf). Le analisi istologiche hanno confermato inoltre la fusione dello strato di adventizia con la membrana interna.

Il vantaggio di questa metodologia è che le cellule utilizzate per produrre questi fogli possono essere autologhe, permettendo così di realizzare costrutti completamente biocompatibili con il paziente. Lo svantaggio risiede invece nei tempi di realizzazione: bisogna infatti attendere che le cellule producano la loro ECM affinché si possa arrotolare il foglio cellulare attorno al mandrino. Questo approccio risulta quindi non adatto agli interventi d’emergenza [23].

La Tabella 2.1 riassume quanto descritto a proposito dei costrutti realizzati fino ad oggi nell’ambito dell’ingegneria tessutale di vasi sanguigni.

TIPI DI MATRICI	VANTAGGI	SVANTAGGI	RIFERIMENTO BIBLIOGRAFICO
Matrici decellularizzate	Composizione biochimica e struttura 3D tipiche dei vasi nativi	Se la decellularizzazione non è ottimale, conduce a problemi di rigetto e può causare la trasmissione di malattie (soprattutto se la fonte è xenogenica).	Zhao et al. [26], Tosun et al [27]
Polimeri Biodegradabili	Microstruttura, proprietà meccaniche e tasso di degradazione controllabile regolandone la composizione chimica	Non bioattivi; i prodotti di degradazione possono causare reazioni da corpo estraneo o avere effetti indesiderati sulle cellule.	Hoerstrup et al. [29], Stekelenburg et al.[30]
Biopolimeri	Elevata biocompatibilità; la semina può essere contemporanea alla produzione del gel; fonte facilmente reperibile	Basse proprietà meccaniche; possono portare alla trasmissione di malattie se sono di origine animale	Weinberg e Bell [31] Berglund et al. [32], Girton et al. [33]
Fogli Cellulari	Perfettamente biocompatibili	Lunghi tempi di produzione; proprietà meccaniche inferiori dipendenti dal tipo cellulare	L’Hereux et al. [34], Konig et al. [35]

**Tabella 2.1.** Vantaggi e svantaggi dei diversi tipi di *scaffold* e tecniche utilizzati in ingegneria tessutale.

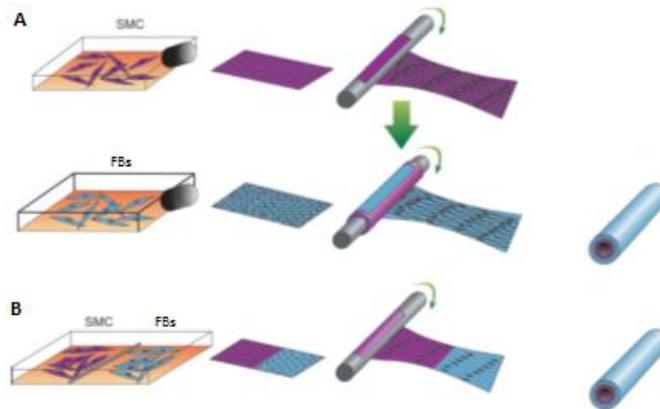
## 2.2. Strategie di coltura

Una delle fasi fondamentali nella realizzazione di un costrutto ingegnerizzato è quella di coltura del campione, che può essere effettuata in statica oppure in dinamica. Di seguito vengono riportati gli articoli presenti in letteratura che risultano più significativi riguardo entrambi i tipi di coltura citati.

### 2.2.1. Coltura statica

Una coltura priva di stimoli viene preferita alla dinamica quando l'obiettivo dello studio è confrontare le proprietà di costrutti realizzati con *scaffold* o cellule diverse, piuttosto che valutare la sollecitazione più adatta con cui stimolarli. L'argomento di questo paragrafo saranno proprio esempi di studi effettuati utilizzando la coltura di tipo statico.

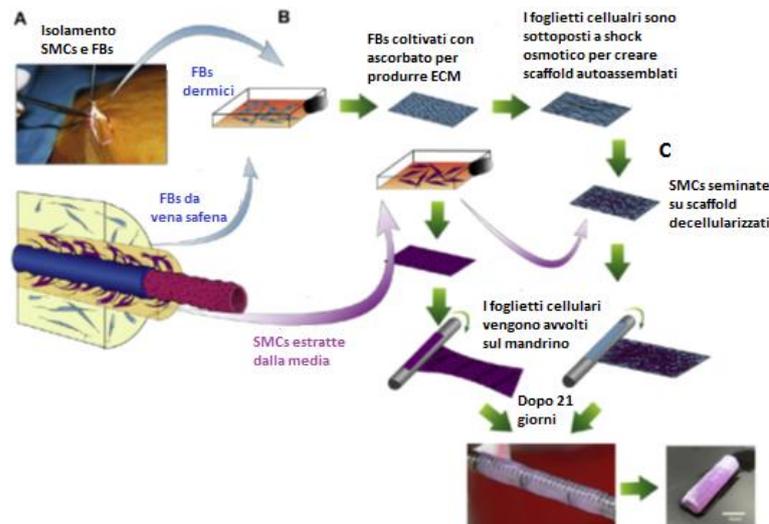
Nel lavoro pubblicato da Gauvin e collaboratori [36] sono stati realizzati TEBVs tramite la tecnica dei fogli cellulari, confrontando nello specifico due tipi di approccio: quello definito standard e quello definito *single-step* (Figura 2.7). Nel primo caso fibroblasti (dermici ed estratti dalla vena safena) e SMCs sono stati messi in coltura in medium standard (DMEM, *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) addizionato col 10% di siero bovino fetale, rispettivamente per 28 e 14 giorni, per essere successivamente avvolti intorno ad un mandrino di diametro 4.5 mm: prima è stato posizionato lo strato di SMCs e poi quello di fibroblasti, dando così origine ad un vaso ingegnerizzato formato da tunica media e avventizia (Figura 2.7 A). Nel caso dell'approccio *single-step*, invece, fibroblasti e SMCs sono stati posti nello stesso piatto di coltura contenente lo stesso tipo di medium usato nell'approccio standard, prima separando le popolazioni cellulari e poi, dopo appena 24 ore, mettendole a diretto contatto: si è formato così un foglio che inglobava entrambi i tipi di cellule e che è stato anch'esso arrotolato sul mandrino (Figura 2.7 B). Entrambi i costrutti sono stati mantenuti in coltura statica sul mandrino per 14 giorni, dopo di che sono stati eseguiti sia test istologici (immunofluorescenza) che meccanici (test di trazione uniassiale, di *burst pressure* e di *stress-relaxation*), i quali hanno evidenziato migliori proprietà meccaniche per i costrutti creati con il metodo *single-step*: UTS (*Ultimate Tensile Stress*), modulo elastico lineare e valore di *burst pressure* sono risultati infatti più elevati. Si può quindi dedurre che l'assemblaggio tra media e avventizia sia migliore nell'approccio *single-step*, il quale ha permesso anche di ridurre ad un solo passaggio le operazioni per la preparazione del TEBV: manipolando meno il costrutto si riduce anche il rischio di contaminazione.



**Figura 2.7.** Rappresentazione schematica dei due metodi utilizzati per produrre TEBVs. (A) I costrutti sono prodotti arrotolando sul mandrino prima lo strato con SMCs e poi quello contenete fibroblasti. (B) Nel metodo *single-step* un unico foglio cellulare contenente entrambi i tipi di cellule viene avvolto sul mandrino.

Un lavoro analogo a quello di Gauvin appena descritto [36], è quello realizzato da Bourget e collaboratori [37], che mira anch’esso a confrontare due tipi di tecniche per la realizzazione di vasi sanguigni ingegnerizzati tramite l’approccio dei fogli cellulari. In particolare, l’obiettivo di questo studio è dimostrare che le proprietà meccaniche dello strato intermedio dei vasi sanguigni (la tunica media) dipendono soprattutto dal tipo di cellule che vengono impiegate per la produzione dell’ECM.

In un primo caso, SMCs umane estratte dall’arteria ombelicale sono state messe in coltura per 14-21 giorni in DMEM addizionato con il 10% di siero bovino fetale. Al termine del periodo di coltura si è formato un foglio cellulare che è stato arrotolato su un mandrino (diametro 4.5 mm), dando origine a un costrutto tubulare. La seconda tecnica prevedeva invece di produrre un foglio cellulare a partire da fibroblasti dermici ed estratti dalla vena safena; queste cellule sono state messe in coltura per 21 giorni (nello stesso tipo di medium descritto precedentemente) e il foglio da loro prodotto è stato decellularizzato e seminato con SMCs (Figura 2.8).



**Figura 2.8.** Schema del processo di produzione dei costrutti. (A) Isolamento di fibroblasti umani (da pelle o vene safene) e cellule muscolari lisce (da arterie ombelicali umane). (B) I fogli cellulari ottenuti dai fibroblasti vengono estratti dalle *flask* e successivamente decellularizzati. (C) Le SMCs vengono seminate sui costrutti decellularizzati ed entrambi i tipi di fogli (sia quelli ottenuti dai fibroblasti che quelli ottenuti dalle cellule muscolari) sono avvolti su un mandrino e coltivati per 21 giorni. (Adattato da [37])

Entrambi i tipi di costrutti sono stati mantenuti in coltura statica sul mandrino per altri 21 giorni. Campioni di lunghezza 5 mm sono stati testati con prove di trazione eseguite alla velocità di 0.2 mm/s ed i risultati hanno mostrato un UTS maggiore per i costrutti prodotti utilizzando fibroblasti (UTS=3 MPa) rispetto a quelli prodotti con SMCs (UTS=0.8 MPa); di conseguenza anche la *burst pressure* ricavata dall’UTS tramite la legge di Laplace è risultata maggiore nel primo caso (2500 vs. 450 mmHg).

Si può quindi concludere che i fibroblasti secernono una matrice cellulare più densa e resistente rispetto a quella prodotta dalle SMCs.

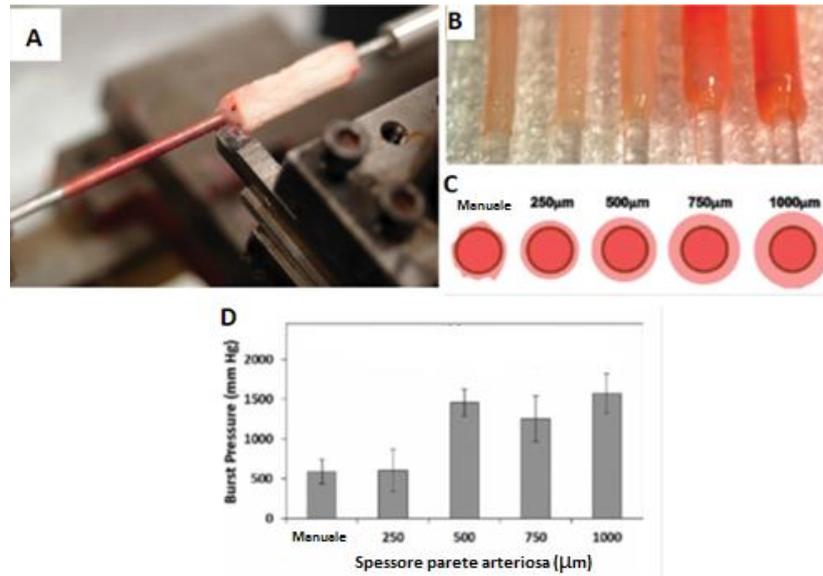
Nel lavoro di Khait e colleghi [38] sono stati invece creati costrutti vascolari a partire da aorte di ratto decellularizzate. In particolare sono stati messi a confronto costrutti realizzati con questo tipo di *scaffold* e quelli prodotti con un supporto in chitosano. Entrambi gli *scaffold* realizzati presentavano forma tubulare e lunghezza 1 cm; le cellule utilizzate sono state SMCs umane provenienti da aorta e FBs umani. Le prime, dopo essere state fatte espandere in un piatto di coltura, sono state inglobate in un gel di fibrina formando uno strato cellulare che è stato arrotolato attorno ad entrambi i due tipi di *scaffold*. I costrutti ottenuti sono stati mantenuti in coltura statica in incubatore (T=37°C, umidità 95%, CO<sub>2</sub> 5%), immersi per tre settimane in DMEM addizionato con acido ascorbico e insulina. La stessa procedura è stata ripetuta utilizzando i fibroblasti, inglobati in un gel di fibrina, arrotolati attorno ai costrutti ottenuti precedentemente. I

TEBVs così ottenuti sono stati mantenuti in coltura statica per altre tre settimane, sempre all’interno di un incubatore ed immersi in medium di coltura standard. Al termine del periodo di coltura, i costrutti sono stati testati tramite prove di contrazione, di rilassamento e di *burst pressure*; i campioni sono stati anche sottoposti ad analisi istologiche e di vitalità.

Entrambi i modelli studiati hanno mostrato una soddisfacente vitalità cellulare e un ottimo rimodellamento. Lo *scaffold* in chitosano però non è stato in grado di resistere ai test di contrazione e rilassamento a differenza di quello con aorta decellularizzata, il quale ha richiesto anche minor tempo per realizzare una struttura stabile.

Un altro lavoro interessante è quello svolto da Rodriguez e collaboratori [39], in cui sono state analizzate le potenzialità delle arterie ombelicali umane (HUA) come *scaffold* per vasi sanguigni ingegnerizzati di piccolo calibro. Obiettivo di questo studio è stato quello di mostrare come sia necessario, per supporti costituiti da tessuti decellularizzati, andare a controllare adeguatamente la fase di dissezione, concentrandosi meno invece sulla fase di coltura.

Dopo essere state prelevate, decellularizzate e sterilizzate, le arterie sono state suddivise in campioni di lunghezza 10 cm e seminate con SMCs umane. I costrutti sono stati coltivati fino a dieci giorni in DMEM e poi analizzati per valutarne le caratteristiche meccaniche e biologiche. I risultati dei test di trazione uniassiale, di *burst pressure* e di *compliance* hanno mostrato che le proprietà meccaniche dei campioni variano al variare dello spessore dello *scaffold*. Concentrandosi su questo parametro, il gruppo di ricerca ha sviluppato un metodo accurato di dissezione del vaso che prevede l’utilizzo di un tornio (come mostrato in Figura 2.9 A), ottenendo così supporti che presentano una superficie liscia e gli spessori desiderati, con i quali è possibile regolare le proprietà meccaniche del vaso a seconda delle necessità del paziente.



**Figura 2.9.** (A) Processo di dissezione della HUA con l’utilizzo di un tornio. (B e C) HUAs ottenute tramite dissezione manuale o con il tornio a diversi spessori. (D) Grafico rappresentante il valore di pressione a rottura raggiunto dal costrutto in relazione al suo spessore. (Adattato da [39]).

In Figura 2.9 D sono riportati i risultati dei test di *burst pressure* effettuati sui costrutti: questi esperimenti sono stati svolti su segmenti di lunghezza 2.5 cm infondendo fluido all’interno del lume del vaso tramite una pompa a siringa, con portata pari a 60 ml/min. La *burst pressure* ricavata varia tra 585 e 1570 mmHg, con *scaffold* più sottili corrispondenti a valori di pressione a rottura minori rispetto a quelli con spessori superiori ai 500 µm.

Gli articoli descritti in questo paragrafo sono riassunti in Tabella 2.2.

TIPO DI CULTURA	DURATA DELLA CULTURA	TIPO DI COSTRUTTO	RIFERIMENTO BIBLIOGRAFICO
Statica	14 giorni	Fogli cellulari prodotti da fibroblasti e SMCs	Gauvin et al. [36]
	21 giorni	Fogli cellulari da SMCs	Bourget et al [37]
	3 settimane	Aorte di ratto decellularizzate o chitosano con SMCs e FBs umani	Khai et al. [38]
	10 giorni	Arterie ombelicali umane con SMCs	Rodriguez et al. [39]

**Tabella 2.2.** Tabella riassuntiva degli articoli riguardanti la coltura statica.

### 2.2.2. Coltura dinamica

Gli stimoli applicabili attraverso un bioreattore possono essere sia di tipo meccanico che elettrico; quelli descritti nei prossimi paragrafi saranno solo stimoli di tipo meccanico, perché sono quelli che influenzano le SMCs e le ECs all’interno degli strati di intima e media e quindi quelli più adatti

alla generazione di vasi sanguigni ingegnerizzati. In particolare, in letteratura, le sollecitazioni più ricorrenti applicate nella coltura di TEBVs sono la perfusione (stazionaria o pulsatile) e la deformazione ciclica.

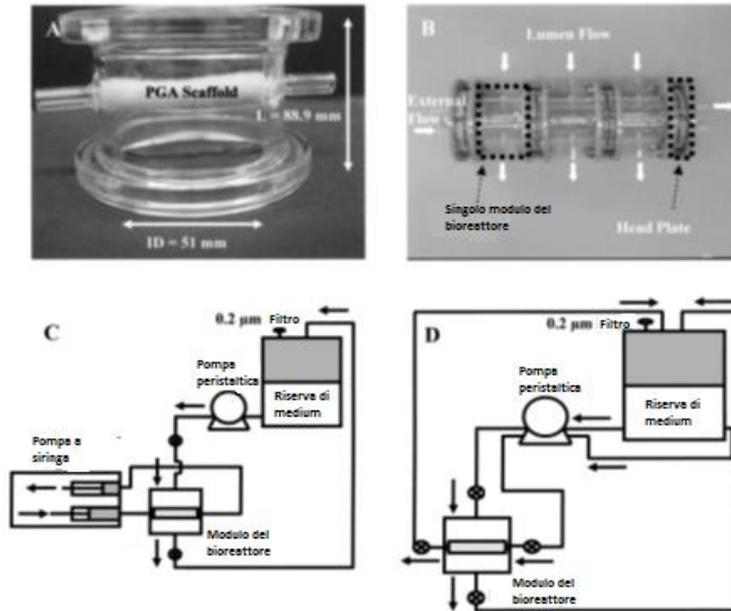
### 2.2.2.1. Perfusione

Lo stimolo dinamico più semplice da riprodurre nella fase di coltura di un vaso sanguigno ingegnerizzato è quello di perfusione che, in parte, replica ciò che succede quando il sangue scorre all’interno del lume di un vaso. Applicare questa condizione dinamica consiste nell’infondere medium all’interno del costrutto con un valore di portata mantenuto costante durante tutto il periodo di coltura.

La perfusione genera degli sforzi di taglio sulla parete che regolano la distribuzione delle cellule nel costrutto e la produzione di ECM. Sebbene lo sforzo di taglio all’interno del vaso venga risentito solo dall’endotelio, che ne riveste il lume, questo segnale viene trasmesso anche alle altre regioni dalle ECs stesse, tramite segnali chimici e fisici.

Nell’ambito di questo tipo di stimolazione, risulta interessante il lavoro di Williams e Wick [40], i quali hanno sviluppato un sistema di coltura costituito da un bioreattore modulare che permette la perfusione dei costrutti.

Cellule muscolari lisce ed endoteliali bovine sono state seminate su uno *scaffold* in PGA e coltivate nel bioreattore fino a 25 giorni. Il sistema sviluppato è costituito da due elementi cilindrici in vetro di diametro interno 52 mm ed esterno 57 mm. Gli *scaffold* (lunghezza 5 cm, ID 4.5 mm) sono stati montati su due tubi di vetro passanti attraverso due lati opposti delle pareti della camera (Figura 2.10 A e B) in modo da garantire la perfusione del lume del vaso da parte del medium. Il flusso indotto dal bioreattore non permette solo la stimolazione meccanica, ma provvede anche alla semina e al nutrimento delle cellule.



**Figura 2.10.** Schema del bioreattore. (A) La figura mostra lo *scaffold* in PGA montato nella camera. (B) Assemblaggio di tre moduli del bioreattore; le frecce indicano la direzione del flusso. (C) Schema del sistema durante la semina. (D) Schema del sistema durante la coltura. (Adattato da [40]).

Tutti i componenti sono stati sterilizzati prima che la struttura venisse montata e l’assemblaggio è stato eseguito sotto cappa a flusso laminare.

Durante la semina, una sospensione di SMCs è stata iniettata tramite una pompa a siringa nel lume del vaso con una portata di 4 ml/min per 24 ore, mentre una pompa peristaltica permetteva il ricircolo del mezzo di coltura nell’ambiente esterno ai costrutti (Figura 2.10 C). Dopo la semina la pompa a siringa è stata sconnessa dal circuito e il tutto è stato collegato alla sola pompa peristaltica che ha provveduto ad infondere medium nel lume del vaso con portata pari a 40 ml/min e con una frequenza di 1.5 Hz. La stessa pompa inseriva terreno di coltura anche nella camera esterna (Figura 2.10 D).

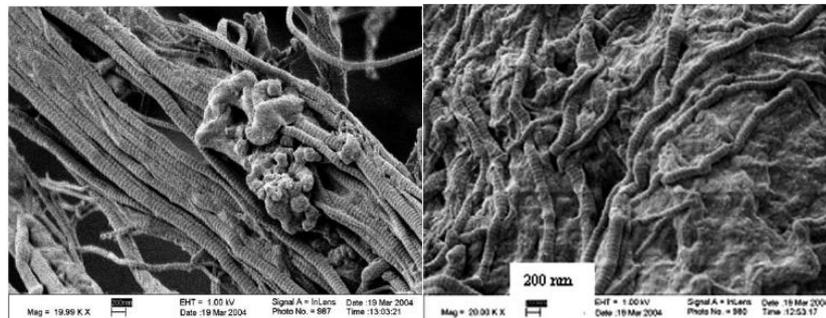
All’inizio sono stati svolti test su costrutti mantenuti in coltura singolarmente per 4 e 16 giorni per verificare la semina, la proliferazione e la distribuzione delle SMCs. Gli esperimenti hanno mostrato che la proliferazione delle cellule triplica già dopo soli 4 giorni e alla fine del periodo di coltura si può notare un’ottima distribuzione di collagene ed elastina in tutto il costrutto. Per quanto riguarda la distribuzione delle cellule, si sono ottenuti risultati simili per i costrutti coltivati per 8 giorni nel bioreattore formato da 3 moduli in serie. I migliori effetti sono stati visti però per un periodo di coltura di 25 giorni, che ha portato degradazione dello *scaffold*, aumento del numero di cellule e deposito di elastina (eccetto che nella regione più interna) e collagene. In

questi esperimenti è stato possibile calcolare l'intensità degli sforzi di taglio che si creano nel lume del vaso: essa risulta essere pari ad un valore compreso tra 2.2 e 8.8 dyn/cm<sup>2</sup>.

Nel lavoro di Butaffoco e collaboratori [41], viene effettuato un confronto tra campioni coltivati in statica e quelli coltivati con stimolo di perfusione pulsatile. Gli *scaffold* utilizzati (lunghezza pari a 4 cm, ID=3 mm, OD=6 mm) sono stati realizzati in collagene (di tipo I, estratto da tendini bovini) ed elastina (estratta da legamenti equini) e sono stati sottoposti a trattamenti di *crosslinking* tramite carbodiimmidi solubili in acqua (NHS e EDC). Successivamente, i supporti ottenuti sono stati seminati con SMCs isolate dalla vena ombelicale umana e i costrutti sono stati inseriti in quattro camere di coltura (ognuna contenente un costrutto) inserite in un bioreattore mantenuto in condizioni ambientali controllate (T=37°C, CO<sub>2</sub> 5%). Le camere sono state collegate tramite circuiteria idraulica in silicone (Watson Marlow, Brussels, Belgium, ID=3.2 mm, OD=6.4 mm) ad una riserva contenente mezzo di coltura. Una pompa peristaltica (Watson Marlow Sci-Q-323), posizionata vicino ai costrutti, generando un flusso pulsatile crescente da 3 a 9.6 ml/min in tre giorni, ha prodotto una pressione interna ai costrutti compresa tra 80 e 120 mmHg.

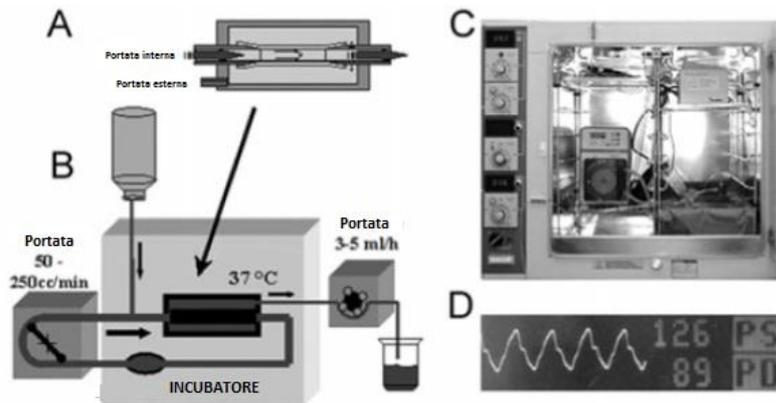
Gli esperimenti sono stati condotti su campioni sottoposti a coltura dinamica per 1, 3, 7 e 14 giorni, utilizzando quelli in coltura statica come controllo. Le prove di trazione uniassiale circonferenziale sono state eseguite a 37°C con un dispositivo (Zwick, Z020, Ulm, Germany) equipaggiato con una cella di carico da 10 N. La velocità di allontanamento degli afferraggi è stata impostata pari a 1 mm/min. Dopo 10 cicli di preconditionamento al 15% di deformazione, i costrutti sono stati testati: le analisi hanno evidenziato come, già dopo 7 giorni di coltura dinamica, i campioni presentassero rigidità ad alte deformazioni e valori di sforzo a rottura maggiori rispetto al controllo (rispettivamente 35 e 40 KPa vs. 16 e 15 KPa). In generale le migliori performances meccaniche dei costrutti in coltura dinamica rispetto a quelli in statica possono essere attribuite alla più alta densità di cellule e di componenti della ECM presenti nel primo caso. Infatti le analisi istologiche (effettuate con il microscopio elettronico a scansione, SEM) hanno mostrato che nei costrutti coltivati per 14 giorni in dinamica, le SMCs si sono distribuite uniformemente nella parete del vaso, mentre nei campioni di controllo le cellule muscolari sono state rilevate soprattutto nello strato più esterno. Questo è dovuto al fatto che lo stimolo pulsatile genera degli sforzi che spingono le SMCs a migrare dalla parete esterna verso il lume del vaso. Inoltre il bioreattore usato in questo studio fornisce un flusso laminare che contribuisce alla diffusione omogenea, nel medium e nel costrutto, di nutrienti (come il glucosio), di gas (ossigeno e CO<sub>2</sub>) e di prodotti di scarto delle reazioni metaboliche. Infine le immagini ricavate dal SEM

(Figura 2.11) hanno mostrato che le fibre di collagene dei costrutti sollecitati dinamicamente tendevano ad orientarsi circonferenzialmente, mentre quelle dei campioni statici si sono orientate casualmente: quindi, se si fossero aumentati i tempi di coltura dinamica e si fosse rivestito il costrutto con uno strato endoteliale interno, probabilmente si sarebbero potuti testare tali costrutti in vivo.



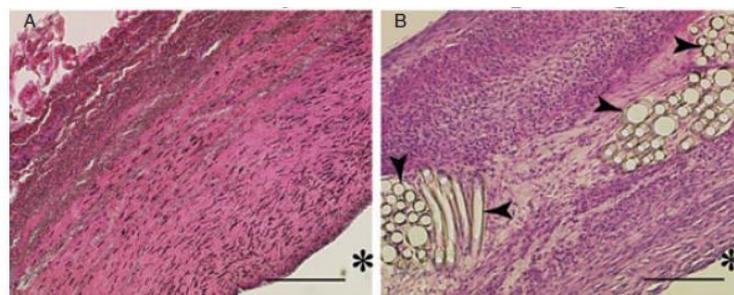
**Figura 2.11.** Immagini ottenute al SEM del lume dei costrutti coltivati in statica (immagine di sinistra) e in dinamica (immagine di destra) per 7 giorni; la scale bar è di 200 nm.

Tschoeke e collaboratori [42], invece, hanno combinato lo sviluppo di uno *scaffold* in gel di fibrina (ottenuta a partire da fibrinogeno umano) e polivinilidene fluoride (PVDF) con l’utilizzo di un bioreattore a perfusione, per creare un costrutto stabile meccanicamente e impiantabile, che richieda un tempo di coltura inferiore rispetto ai tradizionali metodi. Lo *scaffold* è stato prodotto rivestendo la maglia in PVDF con il gel di fibrina nel quale sono stati integrati miofibroblasti provenienti da arterie ovine: la procedura è stata svolta in due passaggi per far sì che il rivestimento si depositasse sia all’esterno che all’interno della struttura tubulare. Dopo 24 ore di coltura statica, il costrutto (lunghezza pari a 80 mm, OD=9 mm, ID=5 mm) è stato trasferito nel bioreattore. Esso è costituito da un compartimento interno, al quale viene legato il campione tramite filo di sutura, e da un compartimento più esterno. La camera interna viene connessa alla circuiteria idraulica, costituita da tubi in silicone, attraverso la quale scorre il medium di coltura, spinto da una pompa peristaltica controllata da un microprocessore. La portata è stata incrementata gradualmente fino a 250 ml/min e, tramite una *clamp*, è stata effettuata la regolazione della pressione mantenendola a livelli fisiologici. Il tutto è stato messo in un incubatore e mantenuto in coltura per 14 giorni (Figura 2.12).



**Figura 2.12.** (A) Rappresentazione della camera di coltura; (B) schema del set up sperimentale; (C) immagine del bioreattore inserito nell’incubatore; (D) esempio della curva di pressione applicata ad un costrutto stimolato con portata di 100 ml/min. (Adattato da [42]).

Alla fine del periodo di coltura il costrutto è risultato molto simile ad un vaso nativo e si nota la formazione di cellule muscolari e di matrice ECM (Figura 2.13).

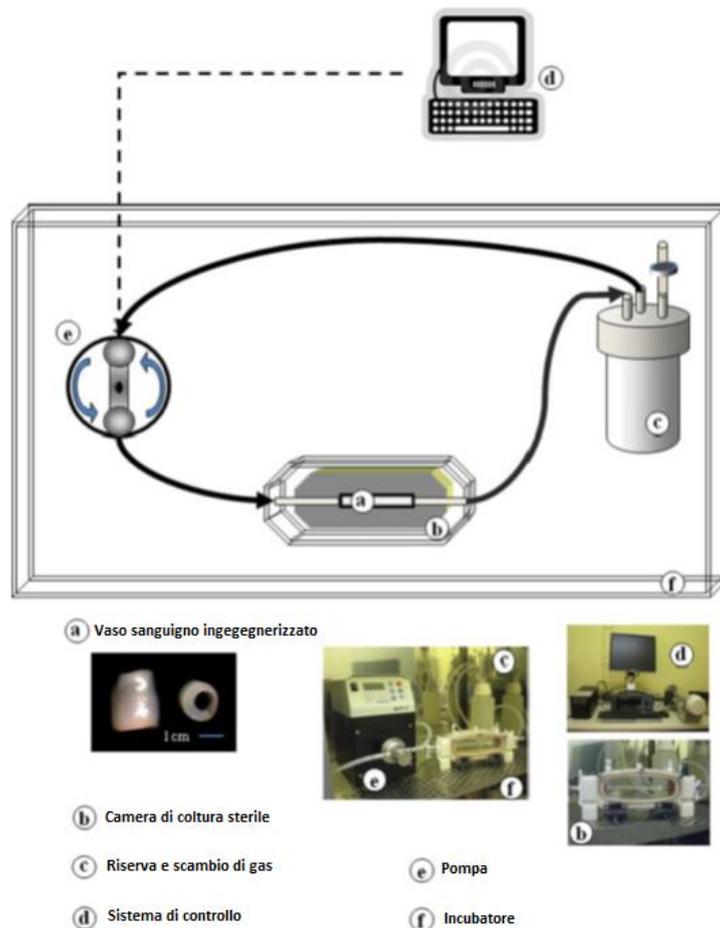


**Figura 2.13.** Immagini della parete di un’arteria carotide (A) e di un costrutto ingegnerizzato (B) colorati con ematossilina/eosina (H&E – *Hematoxylin/Eosin*). La colorazione con H&E rivela la presenza, nei costrutti ingegnerizzati, di una quantità di cellule comparabile a quella delle arterie carotidi native. I nuclei cellulari sono colorati in blu e il citoplasma in rosso. Le frecce indicano le sezioni delle fibre di PVDF. Gli asterischi indicano il lato del lume del vaso. La scala è di 500  $\mu$ m.

Per quanto riguarda invece i risultati delle prove meccaniche, test di resistenza a sutura, eseguiti con velocità 30 mm/min, e test di *burst pressure*, effettuati iniettando acqua nel costrutto con portata di 1 ml/min, hanno portato rispettivamente ad ottenere una forza di 6.3 N (simile a quella delle arterie carotidi) e ad una pressione a rottura di 236 mmHg, molto lontana dai valori trovati per la vena safena (1680 mmHg), ma comunque più alta dei valori di pressione fisiologica.

Nonostante i buoni risultati in termini meccanici, il lavoro ha presentato alcuni limiti, in particolare i principali risiedono nella maglia in PVDF, la quale, essendo in materiale non degradabile, non permette di ottenere valori di *compliance* simili ai vasi nativi e potrebbe causare una reazione da corpo estraneo da parte dell’organismo.

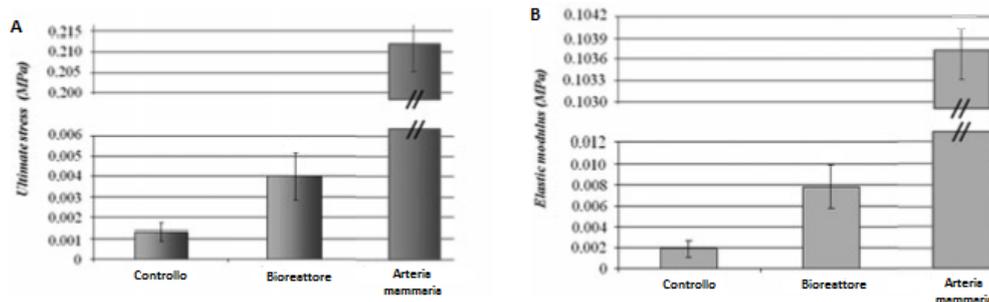
Un ultimo esempio nell’ambito della perfusione, è quello di Boccafoschi e collaboratori [43], in cui si sono valutati gli effetti di una coltura dinamica sulle proprietà di costrutti in collagene. I campioni sono stati realizzati a partire da una soluzione di collagene di tipo I, estratto da code di ratto, che è stata unita ad una sospensione di mioblasti murini. Si sono così ottenuti costrutti tubulari (lunghezza pari a 4 cm, ID=3.5 mm) che sono stati montati orizzontalmente in una camera di coltura sterile, collegata al circuito idraulico. Quest’ultimo è stato riempito con mezzo di coltura, spinto da una pompa all’interno del lume del costrutto, con una portata pari a 50 ml/min che genera degli sforzi di taglio sulla parete di circa 5 dynes/cm<sup>2</sup>. I parametri di stimolazione sono stati impostati e monitorati da un sistema di controllo computerizzato denominato ElectroForce® BioDynamic™ Test Instruments (Bose Corp., ElectroForce Systems Group, MI, USA). Anche la camera di coltura è stata riempita di medium.



**Figura 2.14.** Rappresentazione schematica del set up di stimolazione. Il costrutto (a), mostrato nel dettaglio nell’immagine, è inserito in una camera di coltura sterile (b). Gli sforzi do taglio sono applicati e controllati da una pompa (e) connessa ad un sistema di controllo computerizzato (d). Tutto il sistema è inserito all’interno di un incubatore (f). (Adattato da [43]).

Il circuito descritto (Figura 2.14) è stato inserito all’interno di un incubatore ( $T=37^{\circ}\text{C}$ , umidità 95%,  $\text{CO}_2$  5%) e la stimolazione è stata applicata ai costrutti per tre giorni.

I campioni sono stati sottoposti a prove di trazione uniassiale e analizzati con test immunoistochimici ed istologici (colorazione con H&E, Sirius red e Weigert), confrontando i risultati con costrutti coltivati in statica e con vasi nativi (arterie mammarie porcine). Lo sforzo di rottura a trazione si è rivelato maggiore nei campioni sottoposti a coltura dinamica rispetto a quelli in statica (0.004 vs. 0.001 MPa), ma comunque il suo valore è risultato basso rispetto a quello riscontrato nei vasi nativi (UTS=0.215 MPa). Il modulo elastico ricavato dai test di trazione è risultato quattro volte più grande nel caso di costrutti sottoposti a perfusione in confronto al gruppo di controllo, ma comunque è rimasto 10 volte più piccolo rispetto a quello dei vasi nativi (Figura 2.15).



**Figura 2.15.** Risultati dei test di trazione uniassiale. Vengono confrontati i valori di UTS (A) e di modulo elastico (B) registrati per i costrutti coltivati in statica, in dinamica e per i vasi nativi. I risultati sono espressi come la media  $\pm$  SD (deviazione standard) di tre differenti prove eseguite per ogni gruppo sperimentale. (Adattato da [43]).

Le analisi immunoistochimiche hanno rivelato una bassa presenza di elastina nei costrutti mantenuti in coltura statica, mentre le colorazioni con H&E e Sirius red hanno evidenziato una significativa contrazione delle fibre di collagene e la presenza di elastina e fibrillina nella ECM dei costrutti sottoposti a perfusione.

I risultati dei test meccanici e delle analisi biologiche hanno dimostrato quindi l’efficacia dello stimolo di perfusione nella coltura di vasi sanguigni ingegnerizzati.

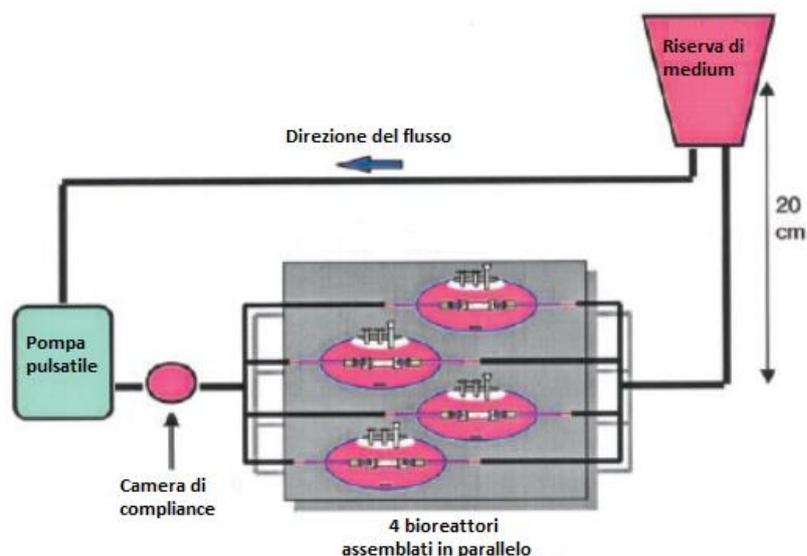
In tutti gli esempi riportati e in molti lavori di letteratura che sviluppano bioreattori a perfusione stazionaria o pulsatile, i costrutti vengono seminati con miofibroblasti o SMCs, ma non in tutti i campioni vengono inserite le ECs: per quelli in cui ciò avviene, si nota efficienza delle cellule endoteliali del 100% e la distribuzione di un monostrato di esse nel lume del vaso dopo solo 48 h. Questo perchè nei vasi sanguigni sono le cellule della tunica intima (quindi le ECs) che risentono

maggiormente dello stimolo di *shear* essendo a contatto diretto col flusso sanguigno, mentre le cellule muscolari lisce, presenti soprattutto nella tunica media, risentono principalmente degli sforzi circolarziali che causano su di esse una distensione in questa direzione [44]. Nasce quindi la necessità di fornire ai costrutti realizzati con SMCs la corretta stimolazione, che è quella maggiormente risentita in vivo da queste cellule, e per questo sono stati sviluppati bioreattori che, come verrà presentato nel paragrafo seguente, conferiscono un condizionamento di deformazione ciclica al vaso.

### 2.2.2.2. Deformazione ciclica

Gli articoli descritti in questo paragrafo mostrano gli studi effettuati per individuare le condizioni di coltura migliori per costrutti che cercano di riprodurre la sola media del vaso sanguigno o per TEBVs in cui l’inserimento di cellule endoteliali non è previsto fin da subito.

Nel lavoro di Niklason e collaboratori [45] sono stati prodotti *scaffold* in PGA, la cui superficie è stata trattata con idrossido di sodio per aumentare l’adesione cellulare. Gli *scaffold* sono stati inseriti nel bioreattore (che si compone di quattro camere poste in parallelo) e seminati con SMCs di origine bovina. Successivamente i bioreattori sono stati riempiti di mezzo di coltura e i campioni sono stati sottoposti per 8 settimane ad una stimolazione che imponeva una deformazione ciclica circonferenziale del 5% con frequenza 165 bpm (Figura 2.16).

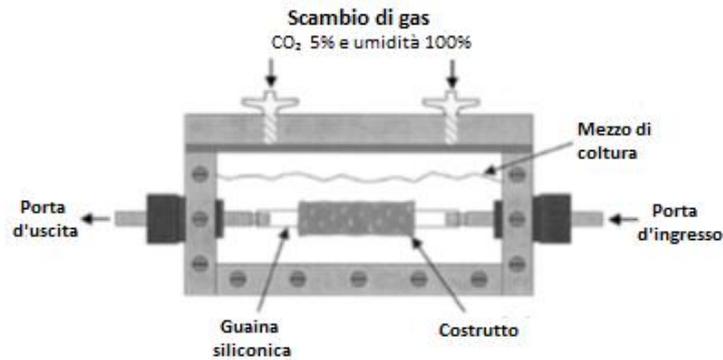


**Figura 2.16.** Rappresentazione schematica del sistema di stimolazione. Gli *scaffold* seminati con SMCs sono inseriti in 4 camere di coltura collegate in parallelo e connesse ad un pompa che spinge il medium contenuto in una riserva. Una camera di *compliance* è posta a valle della pompa per minimizzare la trasmissione delle vibrazioni ai bioreattori. (Adattato da [45]).

Lo stimolo è stato trasmesso da una guaina in silicone inserita nel lume del vaso che si distende e contrae seguendo le variazioni di portata imposte da una pompa pulsatile; dopo 8 settimane le analisi istologiche hanno mostrato una migrazione delle SMCs verso l'interno dello *scaffold*, generando una superficie liscia su cui è risultato possibile seminare facilmente ECs. Dopo aver rimosso la guaina, sono state infatti seminate cellule endoteliali all'interno del lume del costruito e i campioni sono stati tenuti in coltura per altri 3 giorni, perfondendo medium con una portata che è stata aumentata da 0.033 a 0.1 ml/s.

Alla fine del periodo di coltura, l'aspetto dei TEBVs appare simile a quello delle arterie native, sia a livello di spessore della parete che di quantità di collagene, e le proprietà meccaniche riscontrate attraverso test di resistenza a rottura e di *suture retention* sono superiori rispetto a quelle dei costrutti di controllo coltivati in statica. Inoltre alcuni campioni sono stati coltivati con medium addizionato con acido ascorbico per promuovere la sintesi di collagene da parte delle SMCs e la formazione di *crosslinking*. Tutti i costrutti coltivati senza l'aggiunta di acido ascorbico hanno mostrato una *burst pressure* inferiore ai 300 mmHg, mentre quelli posti in coltura dinamica all'interno del medium addizionato hanno raggiunto una pressione a rottura di  $2150 \pm 709$  mmHg. Per testare in vivo le potenzialità dei costrutti così ottenuti, essi sono stati impiantati in quattro suini Yucatan: uno di questi ha subito l'impianto di un TEBV formato da SMCs bovine e ECs autologhe coltivato in dinamica, gli altri tre costrutti impiantati sono invece stati prodotti con entrambi i tipi di cellule autologhe, due coltivati in statica e uno in dinamica. Dopo 4 settimane i TEBVs sono stati espantati e analizzati: quelli sottoposti a coltura pulsatile sono rimasti pervi per tutte e quattro le settimane, mentre i due coltivati in statica sono andati incontro a trombosi.

Nel lavoro di Seliktar e collaboratori [46], invece, sono stati testati costrutti in collagene (estratto da code di ratto) e SMCs murine realizzati su una guaina in silicone (diametro interno 3.15 mm e diametro esterno 3.55 mm); tale guaina è stata immersa tre volte in una soluzione sterile di ECM formata da chitosano e collagene di tipo I per aumentare l'affinità della superficie in silicone con il collagene e quindi permettere una migliore aderenza tra guaina e costruito. Il complesso costruito-guaina è stato posto in coltura all'interno di un bioreattore (Figura 2.17) per 4 o 8 giorni. La guaina siliconica è stata stimolata con una pressione di 6 psi per garantire una deformazione circonferenziale del costruito pari al 10%.

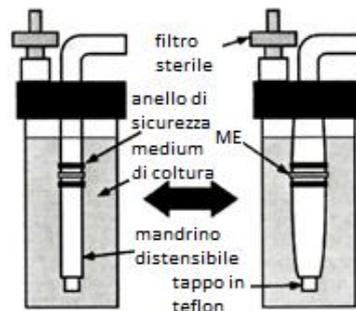


**Figura 2.17.** Figura schematica rappresentante il bioreattore. I costrutti sono calzati sopra guaine in silicone e vengono stimolati con deformazione circonferenziale del 10% infondendo medium all'interno dello sleeve. (Adattato da [46]).

I risultati dei test istologici e quelli di trazione uniassiale sono stati confrontati con le analisi fatte sui campioni mantenuti in statica, sempre per 4 e 8 giorni (gruppo di controllo). I campioni in coltura dinamica sono risultati più corti e più spessi rispetto a quelli in statica, evidenziando una contrazione maggiore delle cellule muscolari. Le immagini ricavate dai test istologici hanno mostrato una distribuzione più omogenea delle SMCs nei costrutti dinamici rispetto a quelli statici, dove le cellule sono disposte soprattutto in una regione vicino al lume del vaso e orientate casualmente, a differenza del caso dinamico in cui sono orientate circonferenzialmente. Dopo 8 giorni di coltura i parametri meccanici sono risultati maggiori nel caso dinamico rispetto a quello statico: sforzo a rottura di 58 kPa nel primo caso contro 16 kPa del secondo e modulo elastico di 142 kPa nel caso dinamico e di soli 68 kPa in quello statico. Inoltre un gruppo di campioni è stato sottoposto a deformazione del 5%. Sebbene i risultati non vengano riportati nell'articolo, gli autori hanno sottolineato come le proprietà meccaniche e la risposta delle cellule siano peggiori rispetto al caso della deformazione al 10%.

L'obiettivo dello studio di Isenberg e Tranquillo [47] è stato quello di indagare ulteriori parametri di coltura: hanno infatti sottoposto le cellule muscolari sia a diversi valori di deformazione (2.5%, 5% e 10%) con frequenza di 0.5 Hz, sia a diverse durate dello stimolo (0.125 s, 0.25 s, 0.375 s e 0.5 s) con deformazione 5%. I costrutti utilizzati (lunghezza pari a 1-3 mm, ID=8 mm, spessore pari a 0.2-0.3 mm) sono formati da uno *scaffold* in collagene bovino di tipo I seminato con SMCs di ratto e sono stati alloggiati su un mandrino distensibile in lattice con dimensioni pari al diametro interno dei costrutti (Figura 2.18). La regione deformabile del mandrino è lunga 4 cm (quindi 20-40 volte più lunga dei campioni su di essa montati) e la distensione dei costrutti è stata controllata regolando la pressione interna al mandrino attraverso una valvola. La natura ciclica dello stimolo

è stata invece garantita dall’uso di una valvola solenoide a tre vie controllata da un circuito di temporizzazione creato su misura.



**Figura 2.18.** Rappresentazione schematica della camera di coltura per la distensione ciclica. ME (*Media Equivalent*) indica il costrutto. La distensione del tubo è esagerata per una miglior chiarezza. (Adattato da [47]).

Dopo 3 giorni di coltura statica si è dato inizio all’applicazione della sollecitazione dinamica che si è protratta per 2 o 5 settimane, eccetto per il gruppo di controllo per il quale la coltura è stata mantenuta statica all’interno di medium standard. I risultati delle prove meccaniche hanno portato a conclusioni contrastanti: i costrutti mantenuti in coltura dinamica per 5 settimane hanno mostrato proprietà meccaniche migliori rispetto a quelli mantenuti in statica, però, mentre quelli sollecitati con deformazione 2.5% e 5% hanno raggiunto i valori più elevati di UTS, quelli stimolati con deformazione 10% sono arrivati invece a valori maggiori di modulo elastico (circa 2.1 volte superiore al gruppo di controllo). I campioni sottoposti a sole 2 settimane di sollecitazione, invece, sono risultati meno prestanti perfino rispetto ai campioni statici.

In vivo le cellule muscolari vascolari sono sottoposte a un *range* ampio di stimolazione (5-10%) a seconda che si trovino in arterie di piccolo o grande calibro, quindi è comprensibile che i campioni in dinamica reagiscano meglio di quelli in statica, mentre sono di più difficile interpretazione i risultati dei test meccanici ottenuti per i diversi gradi di sollecitazione, risultato che andrebbe approfondito con ulteriori test (utilizzando SEM e TEM, cioè microscopio elettronico a scansione e a trasmissione) che però vanno oltre gli scopi di questo lavoro.

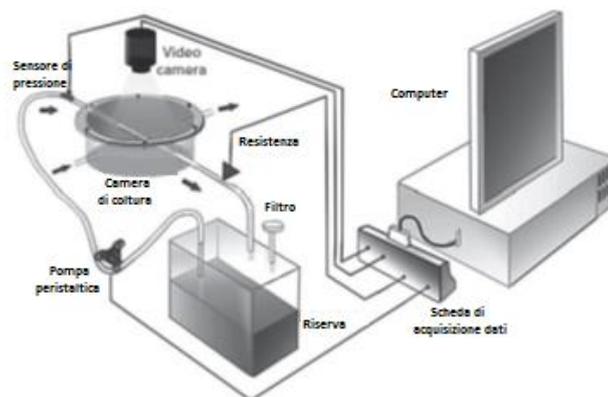
Per gli autori non è stato quindi possibile trarre da questo studio il valore di deformazione circonferenziale più adatto da applicare alle SMCs.

Interessanti sono stati anche i risultati ottenuti con le diverse durate di stimolo: sebbene in vivo le cellule subiscano una distensione di circa 0.375 s, i test meccanici hanno evidenziato come i più alti valori di UTS e modulo elastico si siano ottenuti con stimoli più brevi, di 0.125-0.25 s. Questo risultato è probabilmente dovuto al fatto che le condizioni fisiologiche tendono a mantenere l’omeostasi in vivo, mentre una condizione non perfettamente fisiologica (come può essere quella

patologica o la coltura in vitro) tende a sollecitare risposte cellulari più intense. Di conseguenza, questo dimostra che non è sempre vero che lo stimolo migliore da somministrare nella coltura in vitro sia quello normalmente presente in vivo.

Il lavoro di Xu et al. [48] è invece incentrato sul capire quale tipo di parametro della coltura dinamica vada controllato: la pressione da applicare al costrutto oppure la sua deformazione circonferenziale.

I campioni testati in questo studio sono formati da carotidi canine decellularizzate e seminate con SMCs canine estratte dalla vena safena. I costrutti così ottenuti sono stati mantenuti in coltura per 21 giorni. Il setup sperimentale realizzato per la coltura dinamica (Figura 2.19) si compone di una camera di coltura in policarbonato, una riserva di mezzo di coltura, due pompe peristaltiche (sono presenti infatti due sistemi di perfusione del medium, uno per la perfusione esterna e uno per quella interna al costrutto) e un sistema di monitoraggio e controllo per la regolazione dei parametri di stimolazione. Il sistema è infatti equipaggiato con una videocamera che rileva le variazioni di diametro del costrutto e le invia ad un PC a cui è collegata tramite una scheda di acquisizione. Un sensore invia al computer i valori pressori rilevati, così che il PC possa regolare la portata della pompa; il PC controlla inoltre una valvola solenoide la quale aprendosi e chiudendosi regola la portata di medium in ingresso al costrutto.



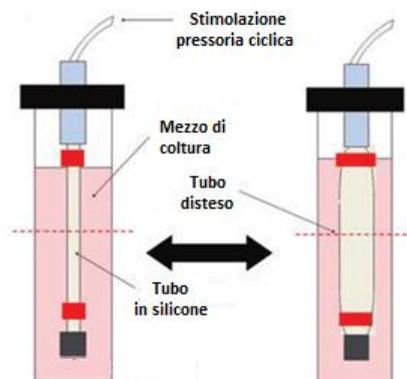
**Figura 2.19.** Schema del sistema di coltura. Tutte le componenti, escluso il computer, vengono poste all'interno di un incubatore. (Adattato da [48]).

In questo studio sono stati eseguiti test applicando due tipi di coltura. Il gruppo di controllo è stato stimolato con pressione pari a 10-25 mmHg nella prima settimana, 35-60 mmHg nella seconda e infine 70-120 mmHg nella terza settimana; le portate interna ed esterna al costrutto sono state mantenute a 45 ml/min e 4 ml/h rispettivamente. Un secondo gruppo è stato invece stimolato applicando una deformazione circonferenziale del 10% con una frequenza di 1 Hz. La

scelta di impostare il valore di deformazione al 10% è stata dettata dai risultati di esperimenti precedenti [49] che hanno mostrato come questo valore di sollecitazione induca le SMCs a proliferare.

Al termine del periodo di coltura, sono stati eseguiti test di *burst pressure*, effettuati infondendo fluido a 15 rpm fino a rottura, e di *suture retention strength*, realizzati per mezzo di un Instron 4465 con velocità di trazione pari a 8 mm/min. I risultati ottenuti hanno mostrato come i costrutti controllati in deformazione abbiano sviluppato proprietà migliori rispetto al gruppo di controllo (1402 mmHg e 58 g vs. 1065 mmHg e 47 g rispettivamente). Si può concludere quindi che lo stimolo migliore da imporre alle cellule muscolari sia proprio quello di deformazione ciclica circonferenziale, con un valore di deformazione costante.

Weidenhamer e Tranquillo [50], utilizzando la tecnica dei fogli cellulari per realizzare vasi sanguigni ingegnerizzati, hanno sviluppato un sistema che, tramite lo stimolo di deformazione ciclica, è in grado di permettere il giusto allineamento delle cellule e delle fibre che compongono la ECM. In questo lavoro sono stati utilizzati fogli cellulari sviluppati a partire da fibroblasti dermici umani seminati direttamente su un tubo in silicone, che è stato precedentemente rivestito con fibronectina bovina per promuovere l’aderenza cellulare. Il costrutto è stato lasciato per una notte in un CELLROLL System (Integra Biosciences AG) che ne permette la rotazione a 2 rpm e successivamente è stato mantenuto in statica per 4 settimane. Infine il campione è stato inserito nel bioreattore e coltivato con stimolazione dinamica per 3 settimane: la deformazione circonferenziale ciclica è stata eseguita inserendo aria all’interno del tubo in silicone, così da applicare al costrutto uno stretch massimo del 5% con frequenza di 0.5 Hz (Figura 2.20).



**Figura 2.20.** Schema della camera di coltura in fase di riposo e durante la distensione del tubo in silicone. La guaina viene occlusa ad una estremità per permettere la pressurizzazione dell’aria. (Adattato da [50]).

Sono stati eseguiti test di trazione uniassiale, di quantificazione di cellule e collagene, prove istologiche e immunoistochimiche, i cui risultati sono stati confrontati con quelli ottenuti dalle prove eseguite sui campioni coltivati in statica (gruppo di controllo).

Gli esperimenti meccanici sono stati svolti su ring di tessuto tramite una Instron MicroBionix (Instron Systems) ad una velocità di 2 mm/min: prima i campioni sono stati preconditionati fino al 10% di deformazione per sei cicli, infine sono stati deformati allontanando gli afferraggi fino a rottura.

In seguito alla coltura dinamica, i campioni presentavano una lunghezza e uno spessore minore rispetto al controllo statico, grazie alla maggior contrazione delle cellule. Inoltre la componente cellulare è risultata distribuita in modo uniforme nel tessuto ed allineata. Anche le proprietà meccaniche sono risultate migliorate: la rigidità e la tensione massima raggiunta sono apparse elevate ( $1068 \pm 222\text{N/m}$  vs.  $399 \pm 58\text{N/m}$  e  $101.4 \pm 21.3\text{N/m}$  vs.  $42.4 \pm 7.8\text{N/m}$ , rispettivamente per costrutti coltivati in dinamica e in statica), ma non si sono notate grandi differenze nei valori di modulo elastico e UTS (rispettivamente  $6.7 \pm 1.5\text{MPa}$  dinamico,  $5.0 \pm 1.0\text{MPa}$  statico e  $642 \pm 141\text{ kPa}$  dinamico vs.  $537 \pm 83\text{ kPa}$  statico) e ciò potrebbe esser dovuto al fatto che la deformazione del 5% non sia stata sufficiente ad incrementare le proprietà intrinseche del materiale. Lo studio svolto ha quindi portato ad ottimi risultati in termini di allineamento cellulare, ma ha confermato il fatto che uno stimolo così basso non è sufficiente ad incrementare la deposizione di collagene nella ECM e favorire il *crosslink*.

### 2.2.2.3. Impianto in vivo

Negli ultimi anni sta prendendo piede un nuovo tipo di approccio, che prevede di stimolare il costrutto ingegnerizzato direttamente in vivo, utilizzando quindi il corpo come un “bioreattore naturale”. In alcuni lavori, sono state infatti studiate le proprietà meccaniche di TEBVs dopo che sono stati impiantati in animali come pecore o ratti. La filosofia alla base di questo tipo di approccio è che la coltura in vivo permette di applicare lo stimolo meccanico più adeguato essendo proprio quello fisiologico, ma è anche un tipo di strategia soggetta a limiti di tipo etico.

Un esempio di studio effettuato in questo ambito è quello condotto da Zhao e colleghi [26], in cui sono stati realizzati TEBVs utilizzando arterie carotidi ovine decellularizzate come *scaffold* e seminandole con SMCs e ECs differenziate in vitro a partire da cellule mesenchimali ovine (MSCs). I costrutti prodotti sono stati mantenuti in vitro per una settimana per permettere l’adesione delle cellule al supporto dopo la semina e sono stati poi impiantati in vivo (negli ovini donatori del

midollo osseo dal quale sono state estratte le cellule) per 2 e 5 mesi mantenendo la loro stabilità meccanica. I campioni di controllo, che sono stati impiantati senza essere seminati, sono falliti dopo sole due settimane. In questo studio, i TEBVs realizzati sono stati sottoposti a test per misurare la forza a rottura, la *compliance* e la resistenza alla sutura, conferendo risultati simili a quelli dei vasi non decellularizzati. Inoltre test biologici hanno evidenziato la rigenerazione, dopo 2 e 5 mesi, di tutti e tre gli strati che formano i vasi sanguigni: intima, media e avventizia.

Uno studio molto simile a quello di Zhao è stato invece effettuato da Cho e collaboratori [51]. In questo lavoro sono stati creati costrutti ingegnerizzati a partire da matrici decellularizzate canine (arterie carotidi con diametro interno 3 mm e lunghezza 40 mm) seminate con cellule muscolari ed endoteliali differenziate a partire da cellule staminali canine del midollo spinale (BMCs). In particolare le cellule muscolari sono state seminate esternamente allo *scaffold* tubolare mentre le endoteliali all’interno del lume del vaso. I costrutti così creati sono stati mantenuti per una settimana in coltura statica, per permettere una migliore adesione cellulare, e successivamente sono stati impiantati negli animali donatori (n=6). Come campioni di controllo vengono impiantati costrutti decellularizzati non seminati (n=6). Prima dell’impianto i vasi ingegnerizzati sono stati testati tramite prove di resistenza a sutura (con velocità 10 mm/min) e sottoposti ad analisi con il SEM, i cui risultati hanno mostrato una buona distribuzione delle cellule in tutta la matrice. La rigenerazione del tessuto e il mantenimento della pervietà del vaso invece sono stati analizzati tramite indagini immunoistochimiche e angiografie. I risultati hanno dimostrato che i vasi ingegnerizzati sono rimasti funzionali per 8 settimane, mentre le sole matrici decellularizzate utilizzate come controllo sono fallite dopo 1-2 settimane. Inoltre, si è notata una rigenerazione del tessuto, a livello di tutti e tre gli strati (intima, media e avventizia) che formano un vaso sanguigno, nei costrutti seminati.

Va ricordato che i test in vivo su animali possono andare incontro a limiti etici, per questo lo sviluppo dell’ingegneria dei tessuti è più spesso legato all’uso di bioreattori in grado di mimare le condizioni in vivo, evitando così il sacrificio di specie viventi.

La Tabella 2.3 riassume gli articoli analizzati nel paragrafo 2.2.2, riguardanti la coltura dinamica.

TIPO DI COLTURA	STIMOLO ESERCITATO	DURATA DELLA COLTURA	TIPO DI COSTRUTTO	RIFERIMENTO BIBLIOGRAFICO
Dinamica	Perfusione	4, 16, 25 giorni	PGA con SMCs ed ECs	Williams et al. [40]
		1, 3, 7, 14 giorni	Collagene ed elastina con SMCs umane	Buttafoco et al. [41]
		14 giorni	Gel di fibrina e PVDF con miofibroblasti ovini	Tschoeke et al. [42]
		3 giorni	Collagene con mioblasti murini	Boccafoschi et al. [43]
	Deformazione ciclica	8 settimane (+ 3 giorni con ECs)	PGA con SMCs bovine (+ ECs dopo 8 settimane)	Niklason et al. [45]
		4 o 8 giorni	Collagene (da code di ratto) e SMCs di ratto	Seliktar et al. [46]
		2 o 5 settimane	Collagene bovino di tipo I seminato con SMCs di ratto	Isenberg e Tranquillo [47]
		21 giorni	Carotidi canine decellularizzate seminate con SMCs	Xu et al. [48]
		3 settimane	Cell sheets a partire da fibroblasti dermici umani	Weidenhamer e Tranquillo [50]
		Impianto in vivo	2 e 5 mesi	Carotidi ovine decellularizzate seminate con SMCs e ECs
	Fino a 8 settimane		Carotidi canine decellularizzate seminate con ECs e SMCs differenziate da BMCs	Cho et al. [51]

**Tabella 2.3.** Confronto tra i lavori presenti in letteratura riguardanti la coltura dinamica.

### 2.3. Analisi critica e spunti per lo sviluppo del lavoro

L’analisi della letteratura ha evidenziato la presenza di diverse soluzioni utilizzabili per lo sviluppo di vasi sanguigni di piccolo calibro ingegnerizzati, dimostrando come la strada della TE risulti essere una valida alternativa per curare disordini vascolari quando i vasi nativi non sono disponibili. Si è visto come, al fine di ottenere costrutti con le proprietà meccaniche desiderate, risulti necessaria non solo la scelta di un materiale adeguato come supporto per la crescita cellulare, ma anche la corretta stimolazione.

Dagli articoli descritti nel paragrafo 2.2.1 emerge come la coltura statica sia infatti utile per indagare caratteristiche strutturali e meccaniche di costrutti ingegnerizzati in relazione ai tipi di materiali (cellule e *scaffold*) e alle tecniche usati per realizzarli, ma non permette la realizzazione di costrutti pronti all’impianto. È chiaro infatti che, qualsiasi tipo di TEBVs, prima di essere impiantato in un essere vivente, necessita di un condizionamento dinamico che possa conferirgli

le proprietà necessarie per resistere agli stimoli fisiologici a cui sarà soggetto in vivo. Inoltre il tradizionale metodo di coltura statica non risulta nemmeno adeguato per studiare la biologia di cellule che normalmente nell’organismo sperimentano sollecitazioni meccaniche che ne favoriscono la proliferazione e la crescita. Per questi motivi è risultato interessante analizzare gli articoli descritti nel paragrafo 2.2.2, inerenti alla coltura dinamica. Quest’ultima risulta preferibile alla statica in quanto favorisce una migliore attività metabolica da parte delle cellule dei costrutti, con conseguente aumento delle proprietà meccaniche degli stessi. Bisogna comunque tenere presente che è importante andare a valutare l’adeguato periodo di stimolazione in vitro per evitare eccessivi rimodellamenti [52]. Oltre alla durata dello stimolo, è importante valutarne anche la tipologia e l’intensità, scelte che dipendono soprattutto dal tipo di cellule utilizzate. Dall’analisi della letteratura si evince infatti come per TEBVs la perfusione sia più adatta alla coltura di cellule endoteliali, mentre nel caso di SMCs lo stimolo più adeguato risulta quello di deformazione ciclica. Inoltre differenti studi hanno indagato quale sia l’intensità dello stimolo da applicare nel caso di costrutti seminati con cellule muscolari, concludendo che una deformazione circonferenziale dell’ordine del 10% sia la sollecitazione più idonea in quanto riproduce ciò che avviene in ambiente fisiologico. Si osservi peraltro che, come verrà trattato più nello specifico nel Capitolo 4, i valori di deformazione da considerare dovranno essere scelti a seconda che gli elementi più sensibili alla sollecitazione si trovino in prossimità del diametro esterno o interno: in base alla posizione di riferimento, infatti, si ottengono valori differenti di deformazione circonferenziale, ma negli articoli citati non viene mai specificato a che livello questa sollecitazione vada applicata.

In base allo *scaffold* e alle cellule scelti, è quindi necessario valutare gli adeguati parametri di stimolazione, tenendo presente che sia una stimolazione di perfusione, che una di deformazione, sono presenti fisiologicamente in un vaso sanguigno, ma vengono risentite in modo differente dalle cellule in esso contenute.

## Capitolo 3

# Materiali e Metodi

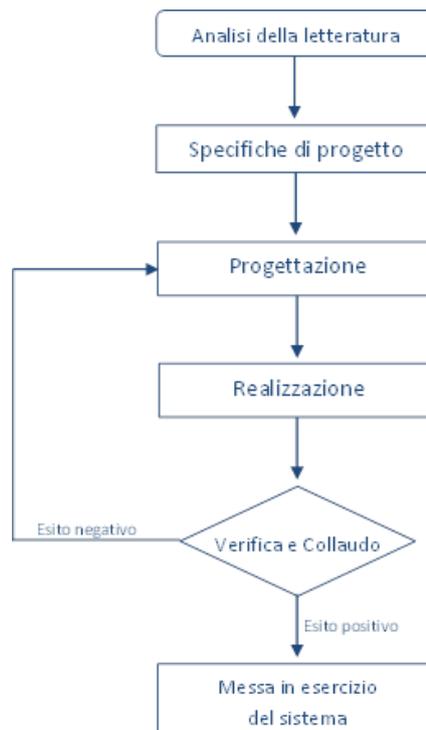
Il presente lavoro di tesi, condotto presso il Laboratorio di Micro e Biofluidodinamica Sperimentale ( $\mu$ BSLab) del Politecnico di Milano, si colloca nell'ambito di un progetto svolto nel settore della medicina rigenerativa in campo cardiovascolare, collaborando sia con laboratori di biologia, sia con unità di cardiocirurgia e di veterinaria. L'approccio metodologico seguito in questo lavoro prevede la realizzazione di un sistema che abbia diverse applicazioni (sia nell'ambito dell'ingegneria dei tessuti che della medicina rigenerativa) che coinvolgono la coltura di strutture tubolari come piccoli vasi sanguigni o sostituti ingegnerizzati. Il sistema qui presentato deve quindi essere in grado di replicare *in vitro* gli effetti esercitati *in vivo* sulle strutture vascolari, da parte di forze emodinamiche quali lo sforzo tangenziale alla parete (*wall stress*) e le deformazioni circonferenziali (*wall strain*). Fine ultimo è quello di identificare il contributo dei diversi fattori biomeccanici sull'architettura del tessuto, in modo da raggiungere la condizione di coltura adeguata che consenta un miglioramento delle caratteristiche biomeccaniche della struttura tubolare e permetta di indagare l'effetto di forze fisiche sullo sviluppo di un tessuto.

A tal fine, il contributo di questo lavoro di tesi consiste nell'integrare in una piattaforma la possibilità di coltivare strutture vascolari tubolari, siano esse vasi nativi o TEBVs, con quella di svolgere caratterizzazione meccanica sulle stesse per valutarne le proprietà meccaniche in termini di pressione a rottura (*burst pressure*) e compliance (*compliance*).

Nel presente capitolo verrà illustrata la fase di progettazione e la successiva realizzazione della piattaforma per la coltura e la caratterizzazione dei vasi sanguigni, da qui in avanti designata con l'acronimo MeCC (*Mechanobioreactor for Culture and Characterization*). L'obiettivo principale, in questa fase del lavoro, è stato quello di ottenere un dispositivo funzionale e *user-friendly*.

Il percorso di progettazione per la realizzazione del sistema, schematizzato in Figura 3.1, è iniziato con l'analisi dello stato dell'arte, in particolare focalizzata sullo studio dei lavori in cui sono stati presentati sistemi di coltura e in cui sono stati descritti test di caratterizzazione biomeccanica di vasi sanguigni o TEBVs. In questo modo sono state identificate le caratteristiche morfometriche e biomeccaniche dei vasi sanguigni di piccolo calibro, nonché i principali materiali utilizzati per la realizzazione di costrutti vascolari. A partire da queste conoscenze si è passati poi alla definizione delle specifiche di progetto generali e particolari per l'applicazione in esame, a cui è seguita la

vera e propria fase di progettazione e realizzazione dei vari prototipi del MeCC. Il collaudo del dispositivo è stato svolto in termini di verifica delle funzionalità di base e della tenuta idraulica ed è stato effettuato sia in modalità di funzionamento per la coltura, che in quella di caratterizzazione meccanica. Durante questa fase il sistema è stato messo in esercizio utilizzando campioni biologici caratterizzati, in modo da verificare che la stimolazione applicata fosse quella desiderata dall'utente. Infine sono state condotte campagne sperimentali preliminari con costrutti in collagene per accertare il mantenimento della sterilità nella camera e per validare il MeCC come sistema per la coltura e la caratterizzazione di vasi ingegnerizzati.



**Figura 3.1.** Diagramma a blocchi che sintetizza le attività svolte durante lo svolgimento del presente lavoro di tesi.

### 3.1. Generalità

Il dispositivo progettato e descritto in questo lavoro di tesi rappresenta un'evoluzione di un sistema precedentemente sviluppato presso il  $\mu$ BSLab ed attualmente in uso presso il Centro Cardiologico Monzino IRCCS [2, 3]. Il MeCC è stato progettato quindi con lo scopo di accrescere la versatilità del sistema di coltura esistente (in termini di tipologia e geometria della struttura tubulare alloggiata al proprio interno), nonché aumentarne le funzionalità permettendo la valutazione delle proprietà meccaniche della struttura alloggiata.

La piattaforma oggetto di questo lavoro di tesi presenta infatti due modalità di lavoro:

- *sistema per la coltura* (bioreattore), che permette la maturazione *in vitro* di costrutti ingegnerizzati o vasi sanguigni sottoposti a stimoli in grado di mimare l'ambiente fisiologico;
- *sistema per la caratterizzazione meccanica*, che permette di sottoporre il campione a prove per la valutazione dei parametri biomeccanici fondamentali per la caratterizzazione di una struttura vascolare: *compliance* e *burst pressure*. Si è deciso di focalizzare l'attenzione soprattutto su questi parametri biomeccanici perchè sono grandezze ampiamente utilizzate in letteratura per correlare il comportamento a distensione del vaso con le caratteristiche strutturali del tessuto; inoltre, entrambi risultano indici descrittivi del grado di maturazione durante la coltura di costrutti ingegnerizzati, che permettono di confrontarne le proprietà meccaniche con quelle del nativo.

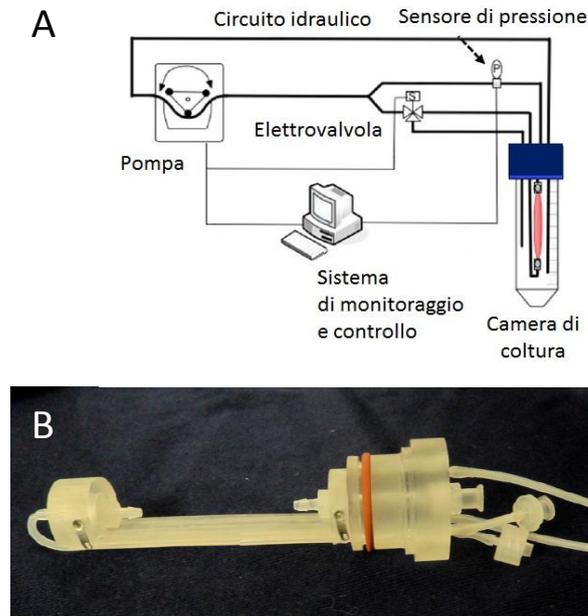
A partire da quanto detto, la progettazione del MeCC si è quindi articolata in una prima fase di modifica delle componenti del dispositivo esistente, seguita poi dalla progettazione e dalla realizzazione del sistema di stimolazione, sviluppato mediante l'utilizzo di componentistica hardware e software già disponibile presso il  $\mu$ BSLab e necessaria per l'imposizione della sollecitazione alla struttura vascolare. La progettazione ha previsto inoltre la modifica della modalità di applicazione della sollecitazione ciclica, effettuata mediante l'utilizzo di una guaina in silicone. Questo elemento, che ha richiesto un'opportuna caratterizzazione, ha permesso di ottenere una maggiore versatilità e conferisce al sistema la possibilità di effettuare la coltura di costrutti tubulari di diverso tipo, come descritto nel paragrafo 3.4.

### 3.1.1. Sistema di *organ culture* per vene safene preesistente

Il sistema di coltura dal quale si è partiti per la realizzazione del MeCC, è un sistema sviluppato per la coltura *ex vivo* di segmenti di vena safena per lo studio del *vein graft disease*, ossia del fallimento del sostituto venoso in seguito a trasposizione in ambiente coronarico [2, 3]. Il progetto è tuttora in corso in collaborazione con il Centro Cardiologico Monzino.

Scopo di questo lavoro è stato quello di sviluppare un sistema di coltura che fosse in grado di replicare *in vitro* la condizione a cui sono soggetti tratti di vena safena quando utilizzati come *bypass* coronarici. In particolare si è focalizzata l'attenzione sull'effetto della stimolazione pressoria sul rimodellamento del tratto venoso, in quanto si ritiene che il differente regime pressorio a cui è sottoposta la vena safena in sede coronarica sia uno dei principali responsabili del rimodellamento patologico che porta al fallimento della procedura chirurgica.

Come mostrato in Figura 3.2, il sistema è costituito da una camera di coltura, da un circuito idraulico e da un sistema di Monitoraggio e Controllo (M/C) per l'applicazione della stimolazione.



**Figura 3.2.** (A) Layout del sistema: il circuito idraulico è contrassegnato dalle linee spesse, quelle fini invece rappresentano il flusso di informazioni che scorre tra il sistema di monitoraggio e controllo e tutti i componenti hardware (pompa, elettrovalvola, sensore di pressione). (Adattata da [3]). (B) Foto del telaio portavaso sviluppato per il sistema per la stimolazione *ex vivo* di segmenti di vena safena [2].

La camera di coltura (Figura 3.2, B) è costituita da un telaio portavaso progettato *ad hoc* per l'alloggiamento di strutture tubulari di lunghezza pari a 55 mm. Esso è inserito all'interno di una provetta Falcon da 50 ml, che svolge anche la funzione di riserva del mezzo di coltura per l'intero sistema.

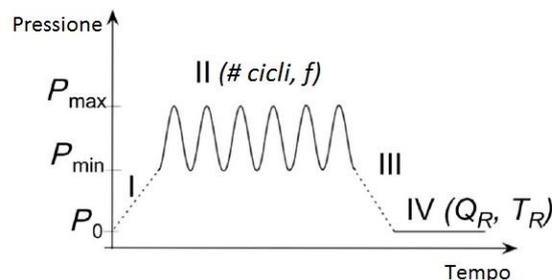
Il sistema di M/C permette sia di applicare un semplice stimolo di perfusione costante (portata e pressione intraluminale generata costante), sia di applicare una stimolazione pressoria pulsatile (e.g. 80-120 mmHg) che riproduca la stimolazione pressoria arteriosa coronarica. Le due funzioni sono ottenute mediante il controllo di una pompa peristaltica (Watson-Marlow 323 DU), che permette l'infusione del fluido nella camera, e di una valvola pinza tubo (S305-09, Sirai® Elettromeccanica), posta a valle del vaso, la cui azione consente di passare dalla fase di perfusione a quella di stimolazione. Il controllo degli attuatori idraulici da parte del sistema di M/C si basa su un controllo retroazionato sulla base della pressione intraluminale misurata da un sensore di pressione *flow-through* (Pendotech Press-S-000), posto lungo il circuito idraulico, a monte del vaso.

Il software, dotato di un controllore PID (controllore ad azione Proporzionale, Integrale e Derivativa), riceve in ingresso la differenza tra la pressione misurata dal sensore all'interno del campione e il valore di pressione desiderato e fornisce in uscita la portata da imporre alla pompa per raggiungere la pressione intraluminale desiderata e impostata dall'utente.

La fase di stimolazione è caratterizzata da tre sottofasi (Figura 3.3):

- **I - carico**, in cui il medium è spinto all'interno del vaso, inducendo un aumento della pressione intraluminale fino al valore minimo che si desidera imporre durante la fase di pulsazione ( $P_{min}$ );
- **II - pulsazione ciclica**, in cui il campione viene ciclicamente caricato e scaricato in volume, producendo un'oscillazione della pressione fra due valori limite preimpostati ( $P_{min}$  e  $P_{max}$ );
- **III - scarico**, in cui il campione viene svuotato fino al raggiungimento di una pressione interna pari a quella atmosferica.

La fase di stimolazione pulsatile è seguita da un periodo di ricircolo (IV) in cui fluisce una portata costante di fluido nel circuito per un intervallo di tempo stabilito dall'utente, al fine di garantire il ricambio del medium interno.



**Figura 3.3.** Grafico Pressione-Tempo rappresentante la condizione di stimolazione pulsatile attuata dal sistema: I, fase di carico; II, stimolo pulsatile tra valori di pressione massima e minima; III, fase di scarico; IV, fase di ricircolo. (Adattata da [3]).

Il sistema sviluppato è stato validato con campioni nativi ed è tuttora in utilizzo presso il Laboratorio di Ingegneria Tissutale Cardiovascolare del Centro Cardiologico Monzino.

## 3.2. Linee guida generali per l'integrazione del sistema

Per la realizzazione del dispositivo oggetto del lavoro di tesi si è partiti dal sistema di *organ culture*, descritto nel paragrafo precedente, in quanto progettato per alloggiare strutture tubolari, funzionale, *user-friendly* e affidabile, facile da assemblare sotto cappa e maneggevole. Inoltre il software di stimolazione utilizzato è versatile perché permette di variare alcuni parametri di

stimolazione, quali i valori di pressione, la frequenza e il numero di cicli e quindi di impostare differenti *pattern* di stimolazione. Il sistema però presentava alcuni limiti, quali l'impossibilità di alloggiare segmenti di vaso con lunghezza diversa e di stimolare più campioni in parallelo.

Il nuovo sistema di coltura e caratterizzazione si propone quindi di ottimizzare il sistema esistente e superare queste limitazioni.

### 3.2.1. Specifiche di progetto

L'analisi della letteratura ha permesso di delineare le specifiche generali che deve soddisfare un bioreattore per la medicina rigenerativa:

- biocompatibilità dei materiali con cui viene costruito, il bioreattore deve cioè essere realizzato con materiali che presentino caratteristiche idonee all'interazione con materiali biologici;
- sterilizzabilità, per esempio in autoclave o con ossido di etilene, e capacità di mantenere la sterilità dell'ambiente di coltura, in modo da non incorrere nella contaminazione batterica;
- trasparenza, per permettere un controllo visivo dello stato del medium e quindi un immediato intervento nel caso di alterazioni dovute a contaminazioni batteriche;
- compatibilità con le procedure tipiche di laboratorio di colture cellulari, quindi deve essere facilmente assemblabile sotto cappa a flusso laminare;
- incremento del trasporto di massa, per favorire il trasferimento di nutrienti e gas dal terreno di coltura ai costrutti ingegnerizzati;
- ingombro ridotto, per permetterne l'alloggiamento all'interno di un incubatore;
- volume di *priming* ridotto per la riduzione dei costi.

Per il sistema di coltura oggetto di questo lavoro di tesi sono stati identificati inoltre dei requisiti specifici che ne semplificano l'utilizzo e ne migliorano le prestazioni, rispetto anche al sistema preesistente:

- versatilità del sistema, in particolare nei termini della capacità di alloggiare costrutti di dimensioni diverse;
- capacità di applicare uno stimolo adeguato allo sviluppo di vasi sanguigni ingegnerizzati, in particolare uno stimolo di deformazione ciclica circonferenziale e/o di perfusione;
- capacità di indagare le proprietà biomeccaniche principali per la caratterizzazione di un vaso sanguigno;

- versatilità del sistema di stimolazione, cioè capacità di attuare vari *pattern* di stimolazione in base alle differenti esigenze e in particolare possibilità di stimolare costrutti con bassa consistenza strutturale;
- minimizzazione della manipolazione da parte dell'operatore per evitare il danneggiamento del materiale e ridurre i rischi di contaminazione.

Alcune delle specifiche definite sono pensate al fine di contribuire alla standardizzazione dei protocolli di maturazione e condizionamento *in vitro*.

### 3.3. Ottimizzazione della camera di coltura

Come descritto nel paragrafo precedente, una caratteristica specifica che deve essere soddisfatta è quella della versatilità, in termini di possibilità di alloggiare all'interno della camera di coltura strutture vascolari di differente lunghezza e calibro.

L'attività di modifica della camera di coltura preesistente si è quindi mossa in questa direzione. Essa è stata svolta utilizzando il software CAD Pro/ENGINEER Wildfire 4.0 (Parametric Technology Corporation, PTC) per la modellazione 3D e ha portato alla realizzazione di due prototipi con differenti gradi di ottimizzazione.

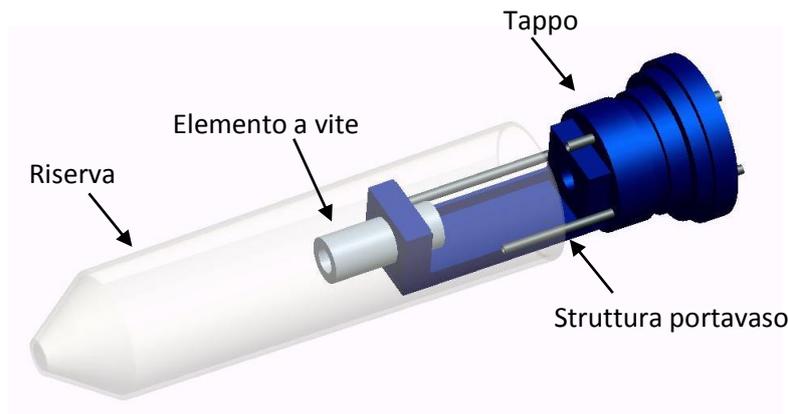
#### 3.3.1. Prototipo 1: sistema a vite

##### Progettazione

La camera di coltura del sistema descritto nel paragrafo 3.1.1 permetteva l'alloggiamento di tratti di vaso con lunghezza pari a 55 mm [2, 3].

Al fine di superare questo limite e andare nella direzione di un sistema più versatile, si è pensato di sviluppare un sistema di adattamento della lunghezza. La prima soluzione progettuale individuata è quella che fa uso di un sistema di regolazione a vite.

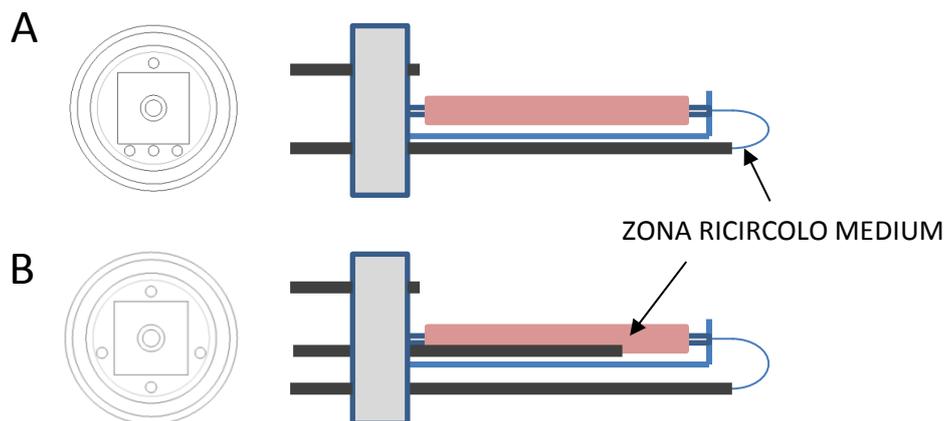
In Figura 3.4 è riportato il disegno CAD del prototipo 1 parzialmente assemblato. Esso consiste, come nel prototipo descritto nel paragrafo 3.1.1, in un telaio portavaso e una riserva (Falcon commerciale da 50 ml). Al telaio è integrato il tappo per la riserva.



**Figura 3.4.** Disegno CAD del prototipo 1 parzialmente assemblato. In esso si distinguono: il tappo, la struttura portavaso, l'elemento a vite (schematizzato come un cilindro cavo) sul quale verranno montati i connettori e la riserva.

Rispetto al bioreattore precedente sono stati conservati, in quanto risultati funzionali, l'accoppiamento tappo-struttura portavaso realizzato mediante incollaggio con colla a presa rapida (Loctite) e l'accoppiamento tappo-riserva ottenuto mediante un O-ring in silicone (Angst+Pfister, Zurigo, Svizzera).

Il tappo del bioreattore è stato modificato rispetto al progetto precedente spostando i fori per le cannule di aspirazione e inserimento del medium nella riserva per aumentare la movimentazione del mezzo di coltura in prossimità del campione e favorire il trasporto di massa.



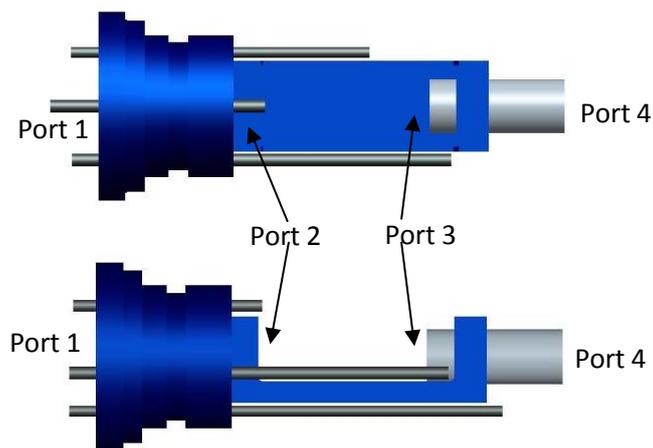
**Figura 3.5.** Schema esplicativo della posizione dei fori delle cannule di inserimento e aspirazione del medium prima (A) e dopo la fase di ottimizzazione (B). (A) Visione frontale del tappo e laterale del telaio nel caso in cui le cannule si trovano sotto il telaio portavaso. (B) Visione frontale del tappo e laterale del telaio nel caso in cui le due cannule vengono spostate in posizione parallela al campione. Sono indicate con una freccia le zone in cui si ha maggior ricircolo di fluido.

Le due cannule, che precedentemente venivano posizionate a fianco della cannula inferiore, posta sotto il telaio portavaso (Figura 3.5 A), vengono inserite ora nel tappo in modo da risultare

parallele al campione e far sì che lo spostamento del fluido sia concentrato nella zona prossima al campione stesso (Figura 3.5 B). Pur non avendo studiato il fenomeno nel dettaglio, è ragionevole credere che lo spostamento delle cannule permetta una migliore movimentazione del fluido in prossimità del campione.

Il telaio portavaso è stato realizzato incollando le seguenti strutture: il tappo, una sottile lastra (spessore 1 mm) che funge da base, due supporti laterali (spessore 1 mm) e un elemento quadrangolare (spessore 6 mm). Esso è stato forato e filettato in modo da poter far scorrere al suo interno l'elemento a vite: avvitando e svitando quest'ultimo, sul quale viene inserito un connettore ad esso solidale, si permette all'operatore di regolare la distanza tra i connettori su cui verrà calzata la struttura tubolare, così da poter alloggiare campioni di diversa lunghezza. È possibile quindi inserire strutture che variano da una lunghezza massima di 36 mm fino ad una minima di 14 mm. Questa dimensione è stata scelta per rispondere a esigenze legate allo sviluppo di costrutti ingegnerizzati, i quali, in seguito alla contrazione cellulare, possono risultare non superiori ai 30 mm di lunghezza [43, 53].

In Figura 3.6 viene mostrato il disegno CAD del telaio portavaso; in APPENDICE A sono riportati i CAD e i disegni quotati dei singoli elementi.



**Figura 3.6.** Disegno CAD del telaio portavaso con elemento a vite: vista dall'alto e laterale. Sono indicati i port di ingresso (Port 1) e uscita (Port 2) del fluido dal tappo e quelli di ingresso (Port 3) e uscita (Port 4) dall'elemento a vite. Sono rappresentate inoltre le cannule in acciaio inox inserite nei fori del tappo.

La struttura tubolare viene calzata su due connettori in polipropilene (Cole Parmer Instrument Company, USA): uno è avvitato in un apposito foro filettato (filettatura  $\frac{1}{4}$  - 28 UNF) realizzato sul tappo (Port 2 in Figura 3.6), l'altro viene avvitato nel canale interno dell'elemento a vite (anch'esso filettato con filettatura  $\frac{1}{4}$  - 28 UNF) (Port 3 in Figura 3.6). L'inserimento del campione è facilitato dal profilo tronco-conico del connettore. All'altra estremità del sistema a vite (Port 4 in

Figura 3.6) viene inserito un altro connettore sul quale viene calzato un tubo in silicone (diametro 1.6 mm, spessore 0.8 mm) connesso poi alla cannula d'uscita posta sotto la struttura portavaso. Una volta calzata sui connettori, la struttura tubolare viene mantenuta in sede tramite filo di seta e/o lacci in silicone per utilizzo chirurgico (*vessel loop*, Tecnokit S.r.l., Milano, Italia). Questo materiale ha il vantaggio di essere già sterile, ma risulta molto costoso, per questo, durante i test di collaudo e gli esperimenti preliminari effettuati è stato sostituito con laccetti in lattice (Penrose Tubing X-Ray Opaque, Kendall Argyle).

### **Realizzazione**

Per quanto riguarda il materiale utilizzato per la realizzazione delle componenti del prototipo, esse sono in polimetilmetacrilato (PMMA, Plasting S.r.l., Segrate, Italia), scelto per la sua resistenza alla sterilizzazione (EtO), la trasparenza, la facile lavorabilità alle macchine utensili e il basso costo. L'elemento a vite invece è realizzato in poliossimetilene (POM, Plasting S.r.l., Segrate, Italia), materiale scelto perché, essendo piuttosto tenero, è adatto al tipo di accoppiamento previsto con l'elemento quadrangolare in PMMA; risulta anch'esso sterilizzabile in EtO.

Tutte le componenti progettate sono state realizzate presso il laboratorio di Prototipazione del  $\mu$ BSLab.

Il tappo è stato realizzato a partire da un blocco in PMMA lavorato tramite fresa a controllo numerico (Modela MDX-40, Roland DG Corporation, Giappone); mentre gli elementi della struttura portavaso sono stati intagliati al laser (VLS 2.30, Universal Laser Systems).

La vite è stata prodotta a partire da un cilindro pieno in POM lavorato al tornio parallelo (OPTI-D 240x500, G-Vario, Optimum, Germania) al fine di ottenere un cilindro cavo delle dimensioni desiderate. Questo è stato poi filettato sia esternamente che internamente, rispettivamente utilizzando una filiera manuale M12 F100 (passo 1.75 mm, Dormer) e un maschiatore manuale ¼-28 UFN E111 (Dormer).

Questa fase ha portato alla realizzazione di quattro esemplari; la Figura 3.7 mostra uno dei bioreattori realizzati.



**Figura 3.7.** Fotografia di un esemplare di prototipo 1 realizzato. Si può notare il telaio portavaso nel quale è avvitato l'elemento a vite in POM (indicato con la freccia) che permette l'avvicinamento/allontanamento dei connettori su cui calzare la struttura tubolare.

### **Analisi del prototipo 1: rispondenza alla specifiche progettuali**

Il dispositivo progettato è parso inizialmente efficiente e pratico per l'alloggiamento di strutture tubolari di diverse geometrie, pur presentando alcuni svantaggi. La struttura a vite risulta infatti molto ingombrante all'interno della Falcon e questo fa sì che la massima lunghezza del campione calzabile sui connettori risulti inferiore ai 4 cm. Inoltre, una volta legato il campione ai connettori, non è più possibile aggiustare la distanza tra questi ultimi (procedura che avviene avvitando/svitando la struttura a vite) poiché si provocherebbe una torsione del campione, rischiando di causare un eventuale danneggiamento dello stesso. A seguito del collaudo sono stati riscontrati altri svantaggi: la geometria cilindrica del tappo ha reso necessaria la presenza di due operatori nella fase di montaggio del campione, un operatore per tenere fermo il bioreattore ed evitare qualsiasi tipo di movimento indesiderato, mentre l'altro per il montaggio della struttura tubolare nel telaio portavaso e del suo eventuale fissaggio. Tutto questo è risultato poco agevole, soprattutto se si tiene conto del fatto che queste operazioni devono essere effettuate in condizioni di sterilità sotto una cappa a flusso laminare.

Infine, durante le prove di collaudo del MeCC come sistema per la caratterizzazione, sono stati riscontrati dei trafileamenti di liquido attraverso i connettori presenti sulla vite in POM a causa delle elevate pressioni in gioco durante i test di caratterizzazione meccanica.

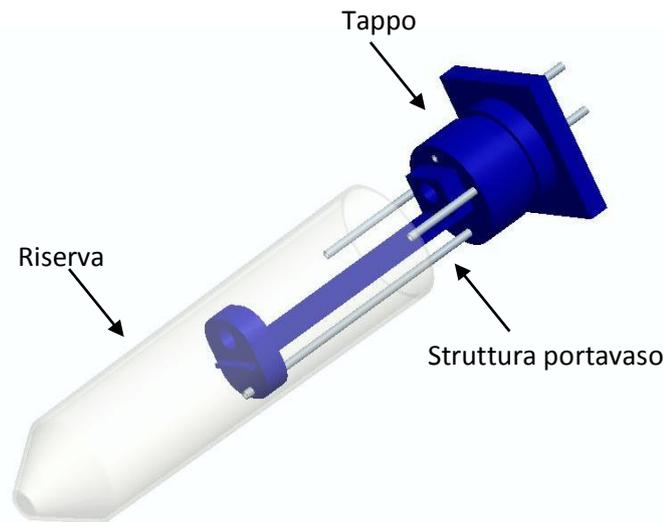
Tutti questi problemi riscontrati hanno fatto sì che si progettasse un secondo prototipo.

### **3.3.2. Prototipo 2: sistema a carrello**

#### **Progettazione**

Per ovviare alle limitazioni riscontrate durante le fasi di collaudo del prototipo 1 si è resa necessaria la progettazione di un nuovo prototipo del bioreattore.

In Figura 3.8 è riportato il disegno CAD d'insieme del prototipo 2.



**Figura 3.8.** Disegno CAD del prototipo 2 parzialmente assemblato. In esso si distinguono: il tappo, la struttura portavaso e la riserva.

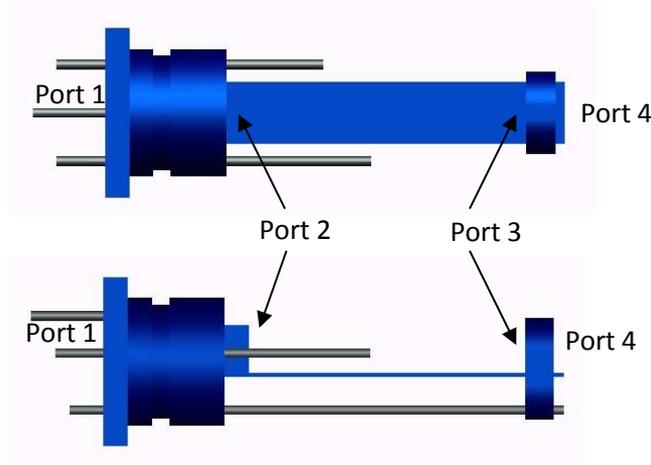
Per rimediare al problema di rotazione del telaio durante la fase di montaggio, la geometria del tappo è stata modificata da cilindrica a prismatica a base quadrata.

La problematica riguardante la torsione del campione durante l'ancoraggio è stata invece risolta sostituendo il sistema a vite con un sistema che fa uso di un carrello in grado di traslare orizzontalmente sulla base del telaio e sulla cannula inferiore. Traslando orizzontalmente sulla base, il carrello porta con sé il connettore che vi è avvitato, permettendo quindi di poter adattare il sistema alla lunghezza delle strutture tubolari alloggiare. Il carrello, una volta collocato nella posizione desiderata, viene bloccato in sede per mezzo di manicotti in silicone inseriti a interferenza sulla cannula in acciaio.

Per permettere l'inserimento nel MeCC di campioni di diverse dimensioni, la base della struttura portavaso è stata allungata, passando da 47 a 70 mm, cosicché l'intervallo di lunghezza delle strutture tubolari che è possibile alloggiare risulta compreso tra 14 e 55 mm.

In Figura 3.9 è rappresentato il disegno CAD del telaio portavaso del prototipo 2; in APPENDICE A sono riportati i CAD e i disegni quotati delle componenti della nuova soluzione progettuale.

Come nel prototipo 1, la struttura tubolare viene calzata tra due connettori in polipropilene, uno inserito nel tappo (in corrispondenza del Port 2 in Figura 3.9) e l'altro avvitato nel carrello (in corrispondenza del Port 3 in Figura 3.9): quest'ultimo connettore, all'altra estremità (Port 4 in Figura 3.9), viene connesso ad un tubo in silicone che si congiunge con la cannula inferiore per l'uscita del fluido.



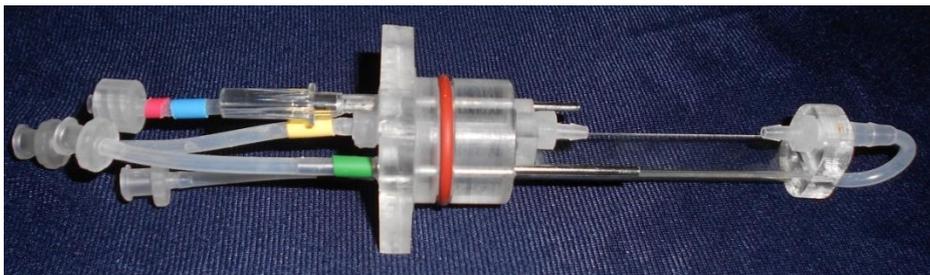
**Figura 3.9.** Disegno CAD del telaio portavaso del prototipo 2: vista dall'alto e laterale. Sono indicati i port di ingresso (Port 1) e uscita (Port 2) del fluido dal tappo e quelli di ingresso (Port 3) e uscita (Port 4) dal carrello. Sono rappresentate inoltre le cannule inserite nei fori del tappo.

### **Realizzazione**

Analogamente al prototipo 1, il tappo e il telaio sono stati realizzati in PMMA.

Le componenti sono state lavorate presso il Laboratorio di Prototipazione del  $\mu$ BSLab tramite fresa a controllo numerico, ad eccezione della lastra che è stata intagliata al laser.

Questa fase ha portato alla realizzazione di quattro esemplari; la Figura 3.10 mostra uno dei bioreattori realizzati.



**Figura 3.10.** Prototipo 2. Il sistema presenta un carrello in grado di traslare orizzontalmente sulla lastra di base e sulla cannula. Si può notare la geometria a sezione quadrata del tappo.

### **Analisi del prototipo 2: rispondenza alle specifiche**

A seguito della fase di collaudo, il prototipo 2 realizzato è stato in grado di superare le limitazioni del prototipo precedente.

La lavorazione è stata semplice e l'utilizzo di un minor numero di componenti ha velocizzato i tempi di realizzazione. Le operazioni di montaggio sotto cappa sono risultate più facili: con il tappo a sezione quadrata, i movimenti del bioreattore sono risultati minimi durante la fase di montaggio e la traslazione imposta dal sistema con carrello evita danneggiamenti del campione.

Durante le prove di collaudo non sono stati riscontrati trafileamenti di fluido, anche ad elevate pressioni, anche grazie al connettore unico inserito nel carrello.

### 3.4. Architettura del modulo per la coltura dinamica

Per quanto riguarda la progettazione del circuito di stimolazione che si dovrà interfacciare con la camera di coltura (descritta nel paragrafo 3.3), esso risulta formato da:

- un sottosistema idraulico, che permette la circolazione del fluido (senza creare elevate perdite di carico);
- un sottosistema di Monitoraggio e Controllo (M/C), in grado di controllare adeguatamente gli attuatori idraulici e fornire così i corretti stimoli al costrutto.

Uno degli obiettivi di questo lavoro di tesi è quello di sviluppare un sistema in grado di stimolare strutture tubolari riproducendo le sollecitazioni a cui un vaso sanguigno viene sottoposto *in vivo*.

Come descritto nel paragrafo 3.1.1, il sistema di coltura preesistente ([2, 3]) era già in grado di conferire al costrutto lo stimolo *di shear stress*, dovuto ad una portata di flusso perfusa all'interno del vaso, e di *wall strain*, per mezzo dell'applicazione di una pressione pulsatile.

In questo lavoro di tesi, si desidera applicare ciclicamente uno stimolo che provochi distensione della parete (*wall strain*) del vaso, non solo a vasi nativi, ma anche a strutture che presentano caratteristiche differenti. Ne sono un esempio tutti quei costrutti con una struttura lassa o altamente permeabile ai fluidi, come nel caso di costrutti realizzati con *scaffold* a base di gel di collagene. Nell'ottica di avere un sistema versatile, si rivela quindi utile l'impiego di una guaina sulla quale possa essere calzato il costrutto e tramite la quale trasmettere la stimolazione al campione biologico montato su di essa. Per essere usata all'uopo, la guaina:

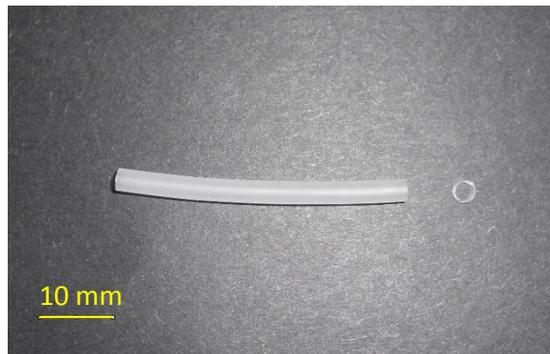
- deve avere dimensioni adeguate, in termini di diametri (esterno e interno) e lunghezza;
- il vaso (naturale o TEBVs) deve essere facilmente calzabile al di sopra di essa, favorendo inoltre l'aderenza al lume dello stesso, al fine di trasmettere la corretta sollecitazione;
- deve essere di un materiale facilmente sterilizzabile, nonchè deformabile sotto l'effetto di pressioni imposte (che non eccedano valori definiti di sicurezza). In particolare la guaina deve riuscire a dilatarsi sotto l'effetto di pressioni ragionevoli applicabili dal sistema, dell'ordine delle centinaia di mmHg, e al tempo stesso in grado di recuperare la configurazione iniziale (per permettere appunto la deformazione ciclica).

Per tutte le caratteristiche sopra elencate, una ricerca di mercato, svolta limitatamente ai prodotti per applicazione biomedica, ha portato a scegliere come guaina un tubo in silicone (Hilltop

Products LTD, Gran Bretagna) con diametro interno nominale di 2.5 mm e spessore di 0.3 mm. In questo modo è possibile calzare vasi di piccolo calibro (cioè che presentano dimensioni in un *range* di diametro inferiore ai 6 mm) che risultano d'interesse per questo lavoro di tesi.

Il materiale che la compone, il silicone, è stato scelto perché biocompatibile, con buona resistenza alle alte e basse temperature, sterilizzabile, con buone caratteristiche di stabilità strutturale e deformabile sotto carichi non eccessivi. Inoltre il silicone, essendo permeabile ai gas, potrebbe permettere anche l'ossigenazione dei costrutti montati sulla guaina.

In Figura 3.11 è mostrato un tratto di guaina in silicone utilizzata in questo lavoro.



**Figura 3.11.** Fotografia della guaina in silicone utilizzata per la sollecitazione del costrutto tramite uno stimolo di deformazione ciclica. Sono mostrati un segmento e un *ring*.

L'utilizzo di questo elemento come mezzo di trasmissione della sollecitazione ciclica al campione in coltura permetterebbe notevoli vantaggi:

- se ben caratterizzata, la guaina siliconica consentirebbe di avere un buon controllo sulla deformazione applicata al campione;
- se ben dimensionata, le lunghezze del campione non sarebbero più vincolanti per la riuscita della stimolazione. Infatti, montando il vaso (nativo o ingegnerizzato) sulla guaina e ancorando solamente quest'ultima ai connettori, si eviterebbero effetti di bordo e il campione risulterebbe interamente disponibile per effettuare le analisi biologiche e biomeccaniche in seguito alla coltura;
- consentirebbe la stimolazione di qualsiasi tipo di costrutto tubulare, anche quelli che presentano una struttura biomeccanica piuttosto fragile, per esempio quelli generati a partire da *scaffold* biopolimerici, e una parete molto sottile e permeabile ai fluidi, come ad esempio idrogeli e *scaffold* porosi. In questi tipo di costrutti, applicare portate o pressioni elevate direttamente sul tessuto ingegnerizzato potrebbe causare permeazione del liquido o addirittura il danneggiamento irreversibile della struttura, portando quindi al fallimento della coltura dinamica.

Lo svantaggio principale nell'utilizzo della guaina siliconica risiede invece nel fatto che calzando il campione biologico su di essa si limita la sua stimolazione alla sola deformazione circonferenziale (*wall strain*), non permettendo così la replicazione *in vitro* di entrambi gli stimoli presenti in ambiente fisiologico: il fluido, passando solo all'interno della guaina, non crea sforzi tangenziali sulla parete del vaso e quindi viene impedita l'applicazione di *wall stress*. Questo implica che l'utilizzo del sistema di stimolazione mediante guaina è indicato per campioni con alta permeabilità o che non necessitano dello stimolo di *shear stress* per il loro sviluppo.

### 3.4.1. Sottosistema idraulico

Il sottosistema idraulico è costituito da un sistema pompante e dalla circuiteria idraulica.

Il sistema pompante (Figura 3.12) è costituito come nel progetto preesistente [2], da una pompa peristaltica Watson-Marlow 323 DU (Watson Marlow Group, UK) con testa pompante 314D a quattro rulli. Questa pompa permette il mantenimento della sterilità in quanto il fluido non entra mai in contatto con la parte meccanica della pompa, ma passa attraverso il tubo sottopompa, in PharMed® BPT (Saint-Gobain), con diametro interno pari a 1.6 mm e spessore pari a 1.6 mm. La scelta è ricaduta su questo materiale in quanto risulta essere più resistente e durevole rispetto al silicone tradizionale nei confronti delle sollecitazioni meccaniche esercitate dai rulli della pompa, evitando quindi il verificarsi del fenomeno della spallazione. Le dimensioni sono invece state scelte in maniera empirica, individuando il tubo sottopompa che permettesse alla pompa di lavorare in maniera ottimale alle pressioni e alle frequenze richieste.



**Figura 3.12.** Pompa peristaltica 323 DU, Watson Marlow.

La circuiteria di raccordo è realizzata mediante tubi in silicone Platinum Cured con diametro interno pari a 1.6 mm e spessore 0.8 mm (Tygon®, SaintGobain). La lunghezza di tali tubi è stata modificata rispetto al lavoro precedente (in cui era di circa 3 m) e risulta essere pari a 2 m: 1 m per il tratto tra la pompa e la camera di coltura e 1 m nel tratto a valle del bioreattore. Tale dimensione nasce dall'esigenza di garantire la connessione tra le parti inserite all'interno

dell'incubatore (camera di coltura) e le componenti esterne (pompa ed elettrovalvola), mantenendo un ridotto ingombro del sistema e cercando, allo stesso tempo, di contenere le perdite di carico lungo il circuito idraulico.

I tubi in silicone e il tubo sottopompa sono autoclavabili oppure sterilizzabili in ossido di etilene (EtO).

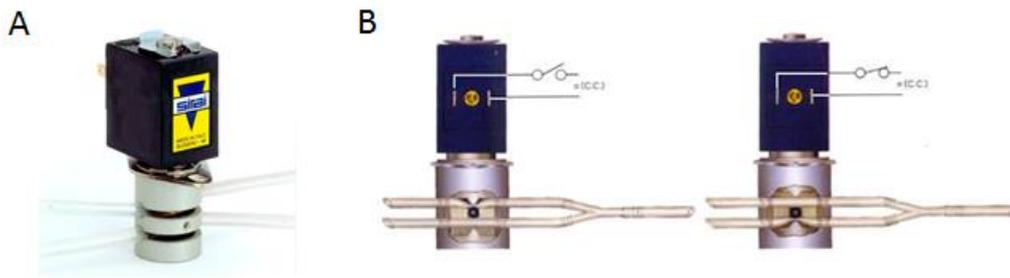
Le connessioni tra le varie parti del circuito sono realizzate per mezzo di connettori di tipo luer in polipropilene (Cole Parmer), con portagomma di diametro interno di 1.6 mm, anch'essi sterilizzabili in autoclave o in EtO.

### 3.4.2. Sottosistema di Monitoraggio e Controllo

Il sottosistema di Monitoraggio e Controllo (M/C) permette di regolare l'azione degli attuatori idraulici (pompa ed elettrovalvola pinza tubo) al fine di applicare la stimolazione desiderata al campione alloggiato nel telaio. Esso è stato realizzato a partire da componentistica hardware e software già disponibile presso il  $\mu$ BSLab e già utilizzata per il sistema di stimolazione preesistente.

Il primo elemento attivo relativo alla parte idraulica dell'hardware è la pompa Watson-Marlow (descritta nel paragrafo 3.4.1): essa può essere controllata dal software oppure può essere azionata tramite controllo manuale. La pompa permette l'alloggiamento di sette differenti dimensioni di tubi sottopompa (e quindi l'applicazione di un ampio ventaglio di portate) e, in entrambe le modalità operative, è in grado di invertire il moto dei rulli e controllare la portata erogata.

Il secondo elemento attivo impiegato nel circuito è un'elettrovalvola pinza-tubo Z110A 24V (Sirai Elettromeccanica, Bussero, Italia) (Figura 3.13). Questa presenta due vie e consente quindi la funzione d'interruttore/deviatore: tramite un elemento mobile, è in grado di occludere o liberare il condotto che la attraversa senza che nessun organo meccanico che la compone entri mai in contatto con il fluido che vi passa all'interno, mantenendo così la sterilità. Nell'applicazione in esame si fa uso di una sola delle due vie dell'elettrovalvola, che in questo caso svolge la sola funzione di interruttore permettendo al sistema di passare dalla modalità di sola perfusione a quella di stimolazione ciclica.



**Figura 3.13.** Elettrovalvola pinza tubo Z110A (Sirai Elettromeccanica). (A) Fotografia dell'elemento utilizzato. (B) Principio di funzionamento.

L'acquisizione del segnale pressorio avviene tramite un sensore di pressione Press-S-000 (PendoTECH, Princeton, NJ, USA) posto a monte del campione. Il sensore appartiene alla famiglia dei sensori definiti *flow-through*, disponibile commercialmente già sterile (Figura 3.14). Tale dispositivo risulta già calibrato e compensato, ma non presenta un'amplificazione del segnale in uscita (che risulta essere dell'ordine dei millivolts). Pertanto si è resa necessaria la realizzazione di un circuito di amplificazione che permettesse di ottenere un segnale in uscita dal sensore dell'ordine dei Volts, quindi tale da poter essere trasmesso alla scheda di acquisizione.



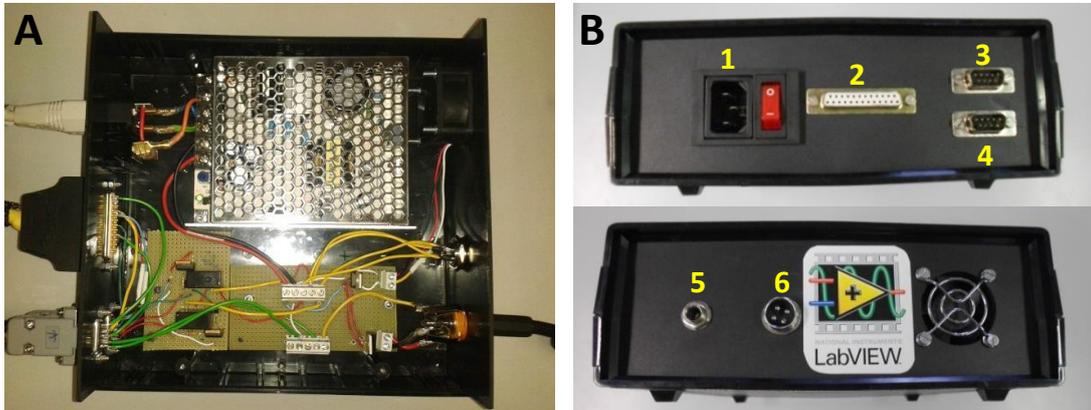
**Figura 3.14.** Sensore Pendotech Press-S-000 (PendoTECH, Princeton, NJ, USA).

La componentistica hardware è controllabile dal software tramite una scheda di acquisizione analogico/digitale e una centralina realizzata *ad hoc*. La scheda elettronica di acquisizione utilizzata è la DAQCard NI 6036E (Figura 3.15) ad interfaccia PCMCIA (National Instruments®, Austin, TX, USA), dotata di 16 ingressi analogici, 2 uscite analogiche e 8 ingressi/uscite digitali.



**Figura 3.15.** Scheda di acquisizione NI 6036E (National Instruments®).

La centralina di cablaggio, realizzata *ad hoc* per questo lavoro (Figura 3.16), fornisce inoltre l'alimentazione alle componenti hardware del sistema a basso assorbimento in corrente. All'interno della suddetta centralina è presente un alimentatore che riceve in ingresso una tensione di 220 V in corrente alternata e la trasforma in un segnale 24 V in corrente continua; esso ha il compito di fornire energia al sensore di pressione e all'elettrovalvola pinza-tubo.

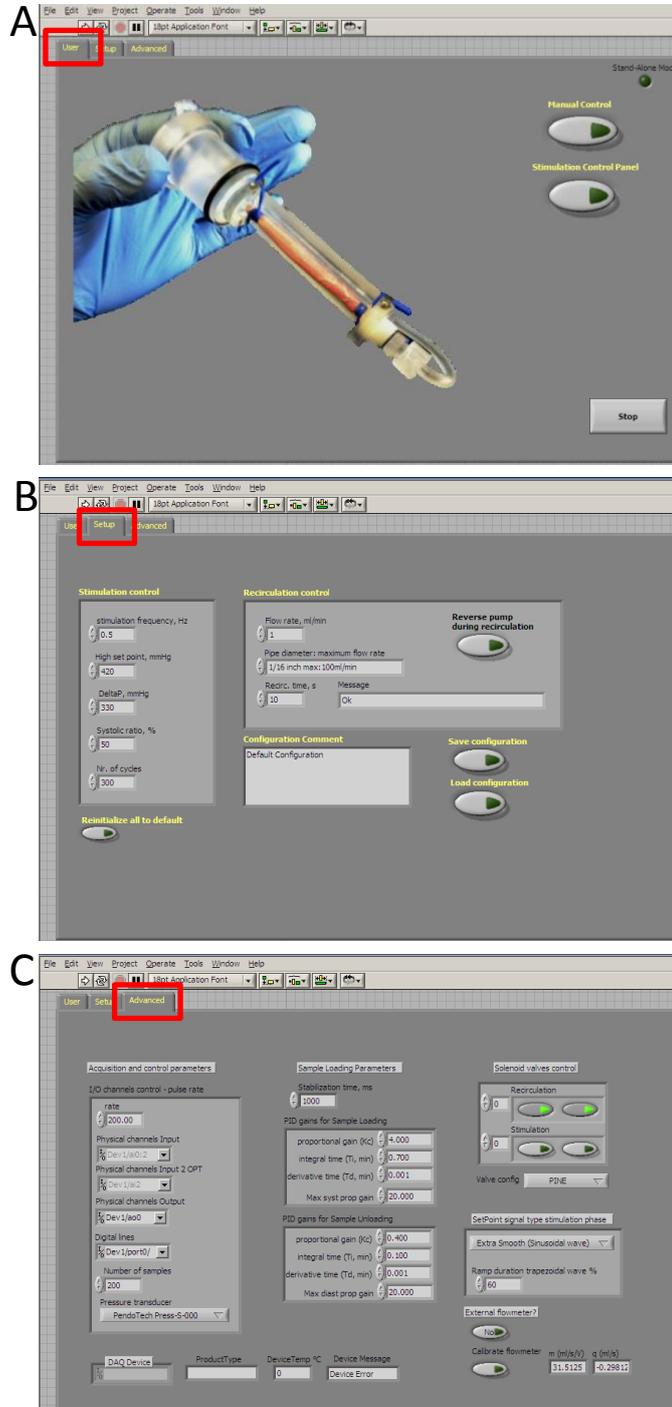


**Figura 3.16.** Centralina di alimentazione e cablaggio. (A) Interno della centralina. (B) Pareti laterali. Sono numerati i connettori: 1. Alimentazione; 2. Connettore per il cavo che collega la pompa; 3. Connettore per il cavo che si interfaccia con la terminaliera analogica della scheda di acquisizione; 4. Connettore per il cavo che si interfaccia con la terminaliera digitale della scheda di acquisizione; 5. Connettore jack per il collegamento con l'amplificatore del sensore di acquisizione; 6. Connettore a quattro poli per il collegamento dell'elettrovalvola.

L'azionamento dell'elettrovalvola è controllato da un relè, contenuto all'interno della centralina: se eccitato da un segnale digitale (TTL, amplificato tramite stadio *buffer*) proveniente dalla scheda di acquisizione, il relè trasmette l'alimentazione a 24 V all'elettrovalvola, provocandone il passaggio da una configurazione di funzionamento all'altra.

Il software di controllo utilizzato nel MeCC durante la coltura è una versione ottimizzata del software preesistente PINE (*Pulsatile IN vitro Emulator*), utilizzato nel sistema descritto nel paragrafo 3.1.1 e realizzato in ambiente di programmazione LabView (National Instruments®). Esso consta di tre sezioni, rispettivamente *User*, *Setup* e *Advanced*. La prima (Figura 3.17, A) serve come interfaccia grafica per l'utente, in cui si può selezionare la modalità di lavoro manuale o automatica: nel primo caso è l'operatore stesso che regola il funzionamento della pompa e dell'elettrovalvola; nel secondo caso, invece, il sistema permette di applicare una stimolazione ciclica (come quella descritta in Figura 3.3) rispettando i parametri inseriti dall'utente. Accedendo all'area *Setup* (Figura 3.17, B), l'operatore può infatti impostare il *range* pressorio ( $\Delta P$ ) e il valore massimo ( $P_{\max}$ ) da applicare, la frequenza, il numero di cicli di stimolazione, la portata e la durata

dell'intervallo di ricircolo e il diametro del tubo sottopompa utilizzato. Nella sezione *Advanced* (Figura 3.17, C) è invece possibile impostare i parametri legati al controllore PID, la cui impostazione è riservata ad utenti esperti.



**Figura 3.17.** Interfaccia grafica del software PINE: (A) sezione *User*, nella quale è possibile scegliere tra la modalità di stimolazione automatica e quella manuale; (B) sezione *Setup*, nella quale è possibile impostare i parametri di stimolazione; (C) sezione *Advanced*, nella quale si possono modificare i parametri legati al controllore PID.

### 3.5. Architettura del modulo per la caratterizzazione meccanica

Come descritto precedentemente, il sistema oggetto di questo lavoro di tesi si propone non solo di consentire la coltura di costrutti ingegnerizzati, ma anche di permetterne la caratterizzazione.

L'analisi dei campioni biologici è infatti indispensabile sia per conoscerne le caratteristiche e capire quindi come attuare su queste strutture un'adeguata stimolazione, sia per andare a valutare le proprietà biomeccaniche a seguito di un periodo di coltura.

Si è quindi deciso di realizzare un sistema che permettesse l'esecuzione di test per la valutazione della *compliance* e della *burst pressure*. Sono stati scelti questi tipi di prove perché reputate più adatte per valutare le proprietà biomeccaniche non solo di vasi nativi, ma di qualsiasi sostituto vascolare ingegnerizzato.

Il MeCC, anche nel caso in cui svolga la funzione di sistema per l'esecuzione di test meccanici, è composto da due sottosistemi:

- il sottosistema idraulico;
- il sottosistema di Monitoraggio e Controllo.

#### 3.5.1. Sottosistema idraulico

Il set up realizzato è formato dalle stesse componenti idrauliche del circuito di stimolazione per la coltura (Paragrafo 3.4.1), ad eccezione del sistema pompante. Al posto della pompa Watson-Marlow, infatti, viene utilizzata una pompa peristaltica Ismatec IPCN-12 (IDEX Health & Science, Germany) (Figura 3.18), perché consente un'erogazione accurata del volume di fluido e quindi più adatta per effettuare i test di *burst pressure* e di *compliance*. I tubi sottopompa utilizzati hanno diametro interno 2.79 mm e spessore 0.8 mm (PharMed® BPT, Saint-Gobain).



**Figura 3.18.** Immagine della pompa Ismatec IPCN-12. La pompa è dotata di 12 canali per l'alloggiamento dei tubi sottopompa.

### 3.5.2. Sottosistema di Monitoraggio e Controllo

Come per il modulo per la coltura, il sottosistema di Monitoraggio e Controllo, che permette di regolare l'attività degli attuatori idraulici, è stato realizzato a partire da componenti hardware e software già disponibili presso il  $\mu$ BSLab del Politecnico di Milano.

Per quanto riguarda il sistema pompante, esso può essere azionato tramite software oppure per mezzo del controllo manuale. La pompa Ismatec scelta è in grado di invertire il moto dei rulli e controllare la portata erogata. Il sensore e l'elettrovalvola utilizzati sono gli stessi descritti nel sistema di stimolazione per la coltura (Paragrafo 3.4.2), mentre la scheda di acquisizione, che ne permette il collegamento col computer, è una scheda NI DAQ USB-6009 (National Instruments®, Austin, TX, USA) (Figura 3.19). Essa è dotata di 8 ingressi analogici, 2 uscite analogiche e 12 ingressi ed uscite digitali e si interfaccia al computer tramite collegamento USB.



**Figura 3.19.** Scheda di acquisizione NI DAQ USB-6009 (National Instruments®, Austin, TX, USA).

Gli elementi hardware fino ad ora descritti sono collegati ad un computer tramite la centralina descritta precedentemente nel paragrafo 3.4.2. I cablaggi della centralina sono stati infatti realizzati in modo da consentire l'interfaccia con le due tipologie di pompa peristaltica utilizzate (la Watson and Marlow 323D e la Ismatec IPC-N 12).

Il software di controllo utilizzato nella modalità in cui il MeCC permette la caratterizzazione meccanica (*C-SO, Characterization Software*) e già disponibile presso il  $\mu$ BSLab, è stato realizzato in ambiente di programmazione LabView (National Instruments®)[54].

Lo scopo principale del programma è quello di controllare gli attuatori (pompa ed elettrovalvola) ed acquisire i segnali dal sensore presente nel sistema attraverso i canali di input ed output della scheda di acquisizione.

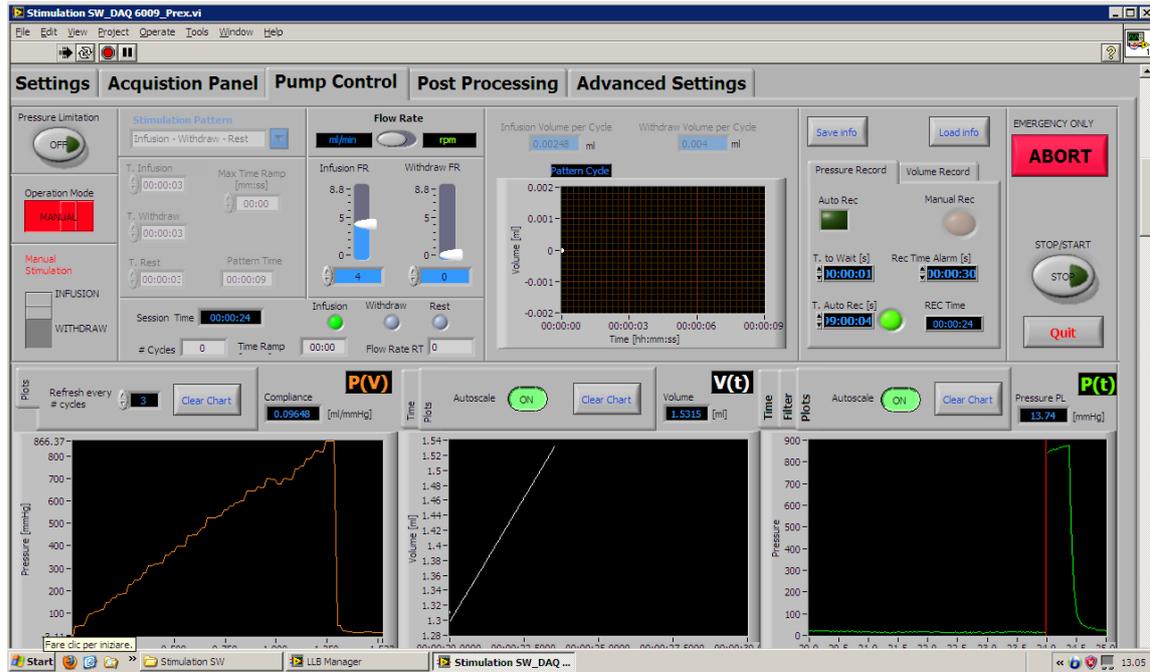
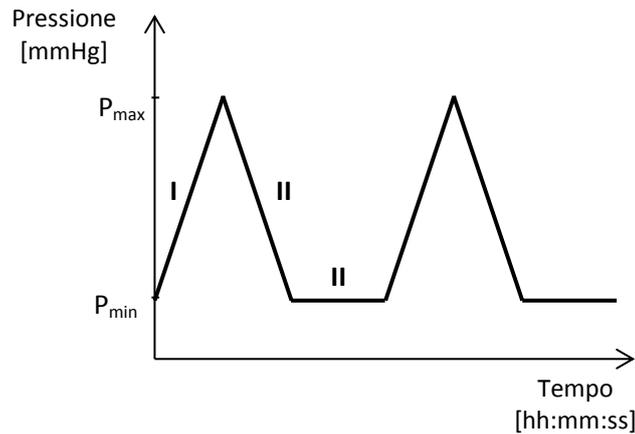


Figura 3.20. Pannello di controllo (*Pump Control*) del software utilizzato nel sistema di stimolazione nella modalità per la caratterizzazione meccanica.

Il software permette sia di controllare manualmente il funzionamento della pompa (*Operation mode: MANUAL*) nella sezione *Pump Control*, Figura 3.20) impostando il valore della portata che verrà mantenuta indefinitamente, che di applicare una sollecitazione ciclica che rispetti i limiti di volume o pressione impostati dall'utente (*Operation mode: AUTO*) nella sezione *Pump Control*). Inserendo la modalità automatica e accedendo all'area *Stimulation Pattern*, l'operatore può infatti impostare quattro diversi *pattern* di sollecitazione:

- Infusione – Riposo;
- Infusione – Aspirazione;
- Infusione – Aspirazione – Riposo;
- Infusione – Riposo – Aspirazione.

Rispetto alla modalità di sollecitazione attuata dal software PINE e descritta nel paragrafo 3.1.1, le dinamiche risultano in questo caso più lente ma risulta critico il requisito di accuratezza del volume erogato dalla pompa. È possibile anche in questo caso ricreare una fase di infusione e una di aspirazione, le cui durate, a differenza del caso in cui si utilizzi il software PINE, sono dell'ordine dei minuti anzi che dei secondi (Figura 3.21).



**Figura 3.21.** Grafico Pressione-Tempo rappresentante, a titolo d'esempio, uno dei quattro *pattern* di sollecitazione che è possibile impostare durante la modalità di limitazione in pressione: I, fase di infusione; II, fase di aspirazione; III, fase di riposo. Si può notare come la durata di ogni fase possa essere dell'ordine dei secondi, dei minuti o addirittura delle ore.

Nel caso sia inserita la modalità di controllo in volume, è possibile impostare la durata di ogni fase di sollecitazione e la portata di infusione/aspirazione erogata dalla pompa.

Attivando invece la modalità di limitazione in pressione (*Pressure limitation ON*), l'utente può selezionare uno tra i quattro *pattern* di stimolazione disponibili e impostare la portata di infusione/aspirazione, però non è possibile impostare la durata delle singoli fasi perché dipendente dal valore di pressione acquisito dal sensore. Infatti in questa modalità è possibile mantenere la stimolazione all'interno di un *range* di pressioni deciso dall'operatore impostando le due differenti soglie di pressione, il valore massimo e il valore minimo ( $P_{max}$  e  $P_{min}$  in Figura 3.21). Il programma controlla l'andamento della pressione e determina il passaggio alla fase successiva del *pattern* di stimolazione nel momento in cui viene raggiunta una delle due soglie. Inoltre l'utente può impostare il tempo oltre soglia, ossia per quanto tempo la pressione debba mantenersi al di sopra (o al di sotto) della soglia impostata prima di cambiare effettivamente fase. Questa verifica da parte del programma evita che il sistema di controllo cambi fase erroneamente. Esiste poi la possibilità di impostare dei valori di tempo massimi oltre i quali, nel caso in cui non venisse raggiunto il valore di pressione desiderato, il programma è in grado di forzare il passaggio alla fase successiva per permettere di uscire da situazioni di stallo. La durata della fase di "Riposo" viene invece impostata dall'utente.

In ognuna delle modalità descritte, abilitando la registrazione del volume e della pressione (sezione "*Pressure Record*" e "*Volume Record*" nel pannello *Pump Control*), è possibile ottenere due file di testo contenenti rispettivamente i valori di pressione e di volume registrati dal software durante il funzionamento della pompa. La frequenza di acquisizione risulta pari a 50 Hz per i valori

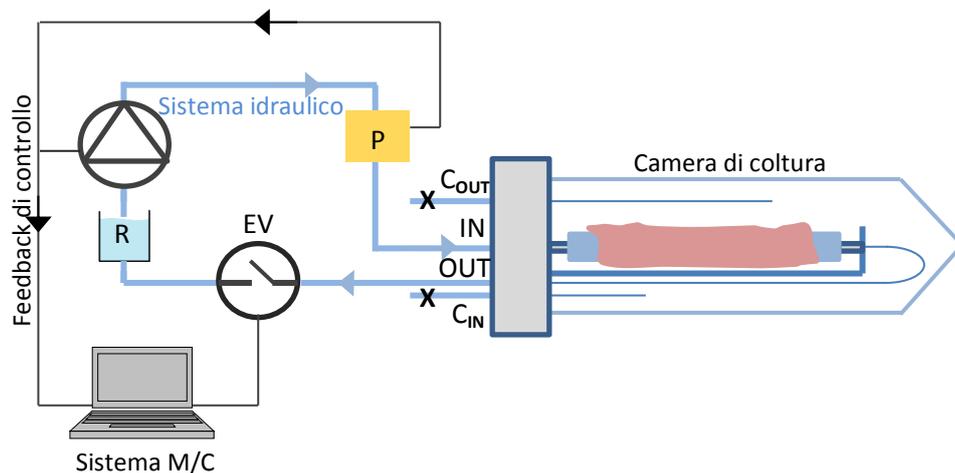
di volume ed è invece impostabile dall'utente nella sezione "Advanced Settings" per quanto riguarda i valori di pressione.

Nel caso in cui si vogliono eseguire col MeCC esperimenti di *burst pressure* sarà necessario utilizzare il software in modalità manuale e, impostata la portata con cui infondere il campione, si procederà alla registrazione dei valori di pressione (ed eventualmente anche di volume) applicati sul campione fino al raggiungimento della sua rottura.

Nel caso in cui si desideri invece eseguire test di *compliance*, questo potrebbe risultare possibile impostando il software di M/C in modalità automatica di limitazione in pressione, consentendo in questo modo di mantenere la sollecitazione all'interno del *range* pressorio deciso dall'operatore nell'intervallo tra due differenti soglie di pressione (minima e massima). In questo modo risulta possibile stimolare il campione nell'intervallo pressorio desiderato senza arrivare alla sua rottura.

### 3.6. Layout integrato del sistema

La Figura 3.22 mostra la configurazione circuitale dell'intero sistema durante la coltura, che prevede: la pompa, l'elettrovalvola, il sensore di pressione e la camera di coltura contenente il vaso e la guaina in silicone.

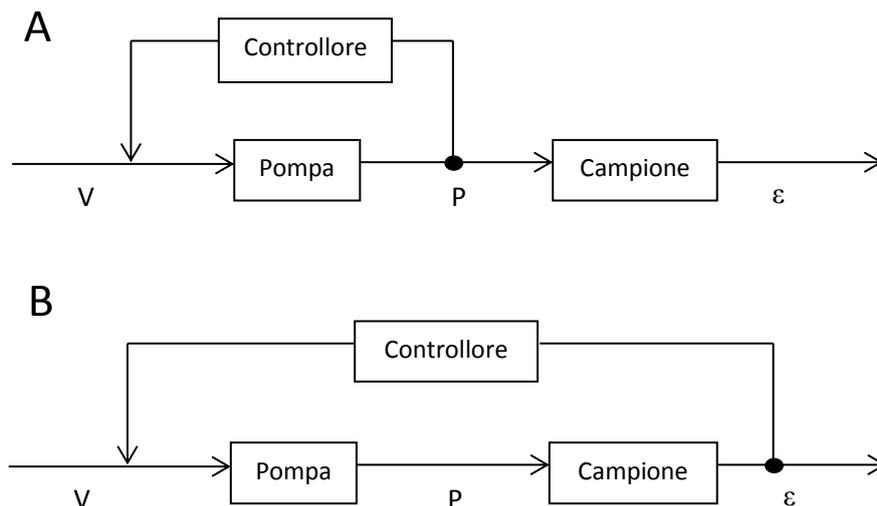


**Figura 3.22.** Schema del layout del sistema di stimolazione. In azzurro il sistema idraulico, connesso alla camera di coltura, in nero il flusso di informazioni che collega sistema di monitoraggio e controllo alle componenti hardware. La pompa pesca fluido da un reservoir esterno (R) e lo infonde nel circuito. Il sensore di pressione (P), posto a monte del campione alloggiato, rileva i valori di pressione intraluminali, mentre l'elettrovalvola (EV), a valle della camera, permette l'occlusione del circuito durante la fase di stimolazione. Le frecce indicano la direzione del flusso. Sono indicati inoltre gli ingressi e le uscite del fluido: IN e OUT indicano l'ingresso e l'uscita del fluido dalla struttura tubolare; C<sub>IN</sub> e C<sub>OUT</sub> invece indicano le cannule per l'inserimento e l'aspirazione del mezzo di coltura dalla camera.

La pompa pesca fluido da una riserva esterna (R) e lo infonde nel circuito; il sensore di pressione (P), posto a monte del campione alloggiato, rileva i valori di pressione intraluminali, mentre

l'elettrovalvola (EV), a valle della camera, permette l'occlusione del circuito durante la fase di stimolazione. Il fluido entra nella camera di coltura attraverso il canale IN (in Figura 3.22) e fuoriesce attraverso il canale OUT (in Figura 3.22). Nel tappo sono inserite anche due cannule ( $C_{in}$  e  $C_{out}$  in Figura 3.22) che vengono invece occluse tramite dei tappi.

La presenza di una riserva esterna, di fatto, non incrementa il volume di *priming* in quanto il fluido infuso dalla pompa nel circuito non è mezzo di coltura, ma può trattarsi semplicemente di un fluido di servizio quale acqua o PBS, poiché entra in contatto solamente con la guaina, non con il materiale biologico. È inoltre presente il sistema di M/C che riceve in ingresso segnali dalla camera di coltura tramite il sensore di pressione e regola opportunamente la portata erogata dalla pompa mediante un controllo in retroazione (anello chiuso). Il controllo della deformazione ciclica, invece, è attuato mediante un sistema ad anello aperto (Figura 3.23 A), tramite una curva di calibrazione ottenuta a seguito di un'opportuna caratterizzazione della guaina siliconica (paragrafo 3.7.1.2). Questa curva sopperisce alla mancanza di un sistema di controllo ad anello chiuso, che permetterebbe di regolare in tempo reale il volume erogato dalla pompa in funzione della dilatazione diametrale raggiunta dal campione stimolato (Figura 3.23 B). La curva di calibrazione permette infatti di scegliere a priori la pressione da applicare in funzione della deformazione circonferenziale che si vuole attuare sulla struttura sollecitata.

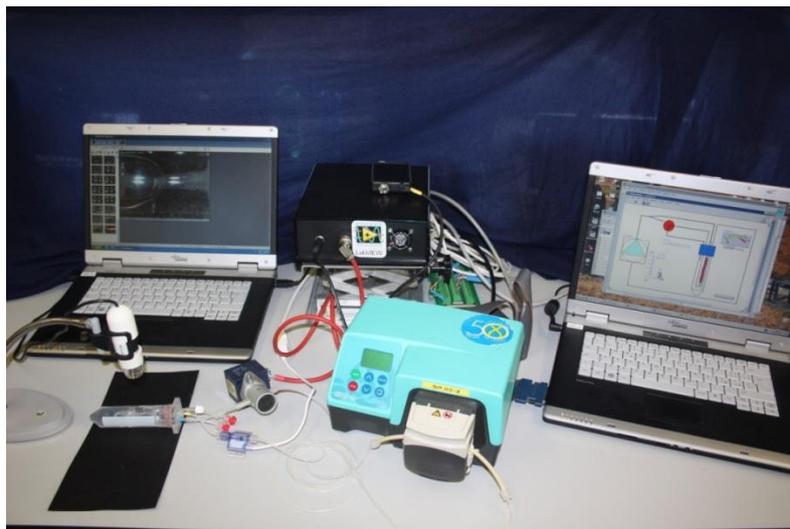


**Figura 3.23.** (A) Schema del controllo attuato nel sistema di stimolazione: anello chiuso per il controllo della pressione e anello aperto nel controllo della deformazione. Quest'ultima viene stabilita impostando il valore di pressione scelto attraverso una curva di calibrazione. (B) Schema del controllo retroazionato ad anello chiuso per la deformazione: la portata (e quindi la pressione) vengono regolate in funzione della deformazione circonferenziale che si vuole ottenere, senza che venga richiesta prima un'opportuna caratterizzazione del campione.  $V$  rappresenta il volume erogato dalla pompa,  $P$  la pressione agente sul campione e  $\epsilon$  la sua deformazione circonferenziale.

Durante la fase di stimolazione l'elettrovalvola (EV) a valle del bioreattore è in configurazione OFF, tale da occludere il condotto. L'elettrovalvola infatti, per evitare un dispendio eccessivo di energia, è configurata in modalità "normalmente chiusa", poiché è la modalità in cui deve lavorare per la maggior parte del tempo. Durante la fase di carico la pompa pesca PBS dalla riserva e lo infonde nella struttura tubulare (IN in Figura 3.22) così che il fluido, non potendo fuoriuscire dal circuito a causa dell'occlusione del condotto, gonfia il campione. Il controllore riceve il segnale di pressione dal sensore e comanda la pompa imponendo ad essa la portata da erogare. Nel momento in cui la pressione intraluminale raggiunge il valore minimo impostato dall'utente, inizia la sottofase di pulsazione ciclica: la pompa, invertendo con una frequenza prestabilita il senso di rotazione dei rulli permette al campione nella camera di coltura di deformarsi in maniera ciclica. Al termine di questa fase, la cui durata è impostata dall'operatore, il vaso verrà scaricato (sottofase di scarico).

Nella fase di ricircolo, infine, l'elettrovalvola si apre (modalità ON) e il fluido scorre all'interno del circuito idraulico con una portata prestabilita, in modo da ricambiare il volume di fluido di servizio presente all'interno della guaina: il liquido viene infuso nel campione tramite la cannula IN in Figura 3.22, percorre quindi un'ansa, all'interno della camera, e fuoriesce tramite la cannula d'uscita (OUT in Figura 3.22).

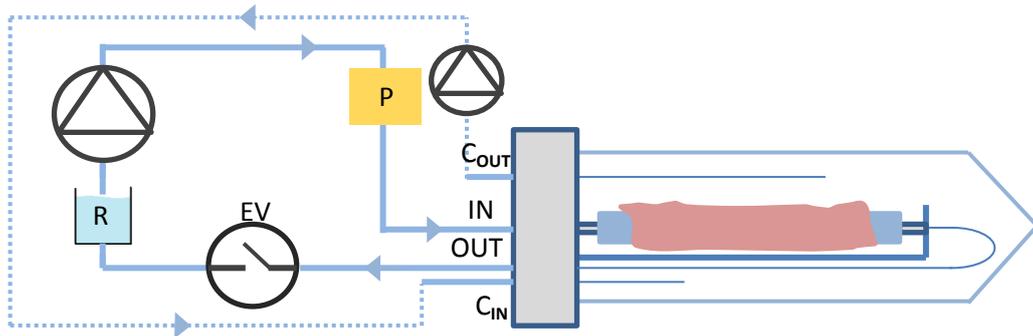
In Figura 3.24 è mostrata una foto del sistema di coltura assemblato.



**Figura 3.24.** Fotografia delle componenti del sistema durante la messa in esercizio.

Se durante la stimolazione si volesse garantire anche un ricircolo del medium, è possibile inserire un'altra pompa all'interno del circuito, in modo da permettere il prelievo del terreno di coltura

dalla camera tramite  $C_{out}$  (in Figura 3.25) e infonderlo nuovamente al suo interno tramite  $C_{in}$  (come mostrato in Figura 3.25).



**Figura 3.25.** Schema del circuito idraulico nel caso in cui venga inserita una seconda pompa per il ricircolo del medium di coltura. Le frecce indicano la direzione del flusso.

Come descritto nel paragrafo 3.5.2, utilizzando il sistema nella modalità per la caratterizzazione meccanica è possibile realizzare test di *burst pressure* e di *compliance*. In questo caso, il layout del sistema resta identico a quello mostrato in Figura 3.22: l'elettrovalvola è in configurazione ON aperta nella fase di riempimento e debollamento del circuito, viene poi chiusa durante l'esperimento (configurazione OFF).

### 3.7. Previsione del comportamento meccanico del modulo per la coltura dinamica

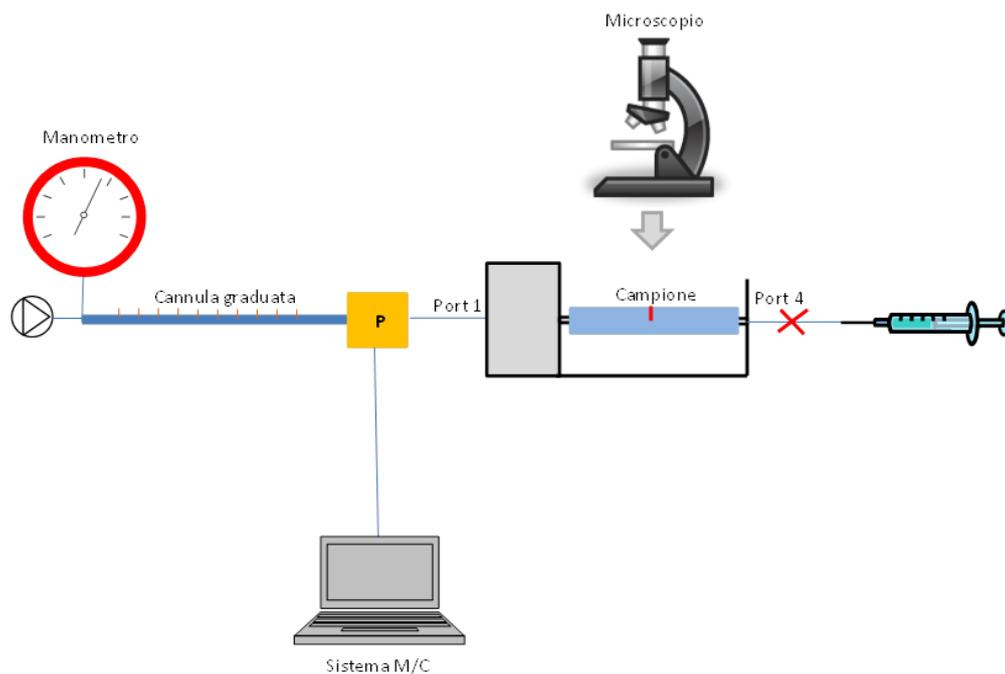
Il sistema di coltura progettato e descritto in un questo capitolo permette l'applicazione di una sollecitazione ciclica sulle strutture alloggiate in controllo di pressione, ma non consente di avere un controllo retroazionato sul livello di deformazione, come descritto nel paragrafo 3.6. Nel caso della guaina in silicone è stato quindi necessario eseguire delle prove di caratterizzazione che permettessero di ottenere una curva di calibrazione pressione-dilatazione diametrale per conoscere i parametri di stimolazione da attuare per ottenere la deformazione circonferenziale desiderata. Avvalendosi di questa caratterizzazione e dei risultati di prove effettuate su vasi nativi, si è sviluppato un modello semiempirico in grado di prevedere la dilatazione della struttura tubulare calzata sulla guaina, in funzione della pressione intraluminale applicata. Di seguito verranno descritte le prove di caratterizzazione eseguite sulla guaina siliconica (paragrafo 3.7.1) i cui risultati sono stati utilizzati all'interno del modello semiempirico sopracitato (paragrafo 3.7.2).

### 3.7.1. Caratterizzazione della guaina in silicone

Come descritto nel paragrafo 3.4, la guaina in silicone svolge un ruolo fondamentale all'interno del sistema di stimolazione, in quanto costituisce l'elemento che ha il compito di trasmettere la sollecitazione al vaso (eventualmente ingegnerizzato). Risulta quindi di necessaria importanza analizzare correttamente il comportamento di questa struttura e quindi caratterizzarla da un punto di vista meccanico, al fine di trasmettere la corretta stimolazione al costrutto.

In questo paragrafo verranno presentate le prove eseguite per caratterizzare queste strutture, ovvero esperimenti che hanno permesso di correlare la pressione intraluminale alla variazione volumetrica e alla deformazione circonferenziale della guaina. La scelta è ricaduta su questo tipo di prove perché considerate quelle in grado di fornire maggiori informazioni sulla capacità di deformarsi della struttura. Per trasmettere l'adeguato stimolo al campione in coltura è infatti necessario conoscere il comportamento in deformazione della guaina in funzione delle pressioni intraluminali applicate.

Le prove per la caratterizzazione della guaina siliconica sono state eseguite utilizzando il set-up sperimentale di Figura 3.26.



**Figura 3.26.** Schema del setup utilizzato per effettuare test di caratterizzazione della guaina in silicone. La pompetta di un manometro permette di incrementare la pressione all'interno della guaina, la cannula graduata consente di valutare lo spostamento del menisco di fluido, il sensore di pressione (P) connesso al software di controllo permette una verifica del valore di pressione, il microscopio permette la cattura delle immagini per l'analisi della deformazione. La siringa viene utilizzata per il riempimento del circuito.

Un tratto di guaina di lunghezza 4 cm è stato alloggiato sul telaio del bioreattore e montato sui connettori. Il bioreattore è stato connesso ad una estremità (Port 1 in Figura 3.26) ad una cannula rigida graduata, parzialmente riempita di acqua, a sua volta collegata ad un manometro; l'altra estremità (Port 4 in Figura 3.26), è stata mantenuta occlusa tramite una *clamp*. Un sensore di pressione di tipo *flow-through* (Pendotech Press-S-000) è stato inserito tra la cannula graduata e il Port 1 come controllo sul valore di pressione applicato (soprattutto per pressioni superiori ai 300 mmHg non rilevate dal manometro). Il sensore di pressione, infatti, è collegato al sistema di M/C, come descritto nel Paragrafo 3.4.2, e permette la lettura istantanea del valore di pressione all'interno della guaina. Durante l'esecuzione degli esperimenti, la struttura siliconica, montata sul telaio, è posta sotto la lente di un microscopio Nikon SMZ1000 (Nikon).

### 3.7.1.1. Curve di caratterizzazione pressione-volume

Per poter ottenere una curva che correli la variazione di volume della guaina siliconica alla pressione intraluminale ad essa applicata, è stato innanzi tutto necessario ricavare dalle prove informazioni sulla variazione di volume.

Prima di effettuare la prova è importante eseguire l'operazione di calibrazione della cannula, affinché sia possibile stabilire una relazione tra gli incrementi di volume nel lume della guaina e lo spostamento del menisco di fluido.

La calibrazione è stata eseguita riempiendo parzialmente la cannula con acqua distillata e inserendo al suo interno, tramite una siringa, una quantità di volume di fluido nota (0.2 ml); è stato quindi valutato lo spostamento del menisco di fluido in mm. Questa operazione è stata ripetuta tre volte ed i valori utilizzati per ottenere il fattore di conversione F (Equazione 3.1) sono la media dei risultati delle tre prove eseguite:

$$F = \frac{\Delta x [mm]}{\Delta V [ml]} = \frac{63 mm}{0.2 ml} = 315 \frac{mm}{ml} \quad (3.1)$$

$\Delta x$  corrisponde allo spostamento del liquido nella cannula e  $\Delta V$  è il volume di fluido inserito tramite la siringa.

Gli esperimenti sono stati svolti incrementando manualmente, mediante una pompetta da sfigmomanometro, la pressione intraluminale a passi di 20 mmHg, fino ad un valore massimo pari a 440 mmHg. Il corrispondente incremento di volume all'interno della guaina è stato valutato misurando la variazione della posizione del menisco di fluido nella cannula graduata ad ogni step pressorio ed inserendolo nell'Equazione 3.2 (per i dettagli si faccia riferimento all'APPENDICE B).

$$\Delta V = \frac{\Delta x}{F} \quad (3.2)$$

Per ottenere dei risultati indipendenti dalla specifica geometria della struttura in esame, la variazione di volume è stata normalizzata rispetto al volume iniziale della guaina ( $V_0$ ), calcolato come

$$V_0 = \frac{\pi D_0^2 L}{4} \quad (3.3)$$

in cui  $D_0$  e  $L$  rappresentano rispettivamente diametro interno e lunghezza iniziali della guaina.

Le prove di caratterizzazione sono state eseguite su cinque tratti di guaina in silicone.

Le misure di lunghezza iniziale di tutti i campioni testati sono state effettuate con un calibro mentre i diametri e gli spessori sono stati misurati a partire da immagini di anelli di materiale di lunghezza pari a 1 mm, acquisite con un microscopio (Nikon SMZ1000) e analizzate tramite software ImageJ (National Institutes of Health, USA).

In Tabella 3.1 sono riportate le caratteristiche geometriche medie dei campioni in esame.

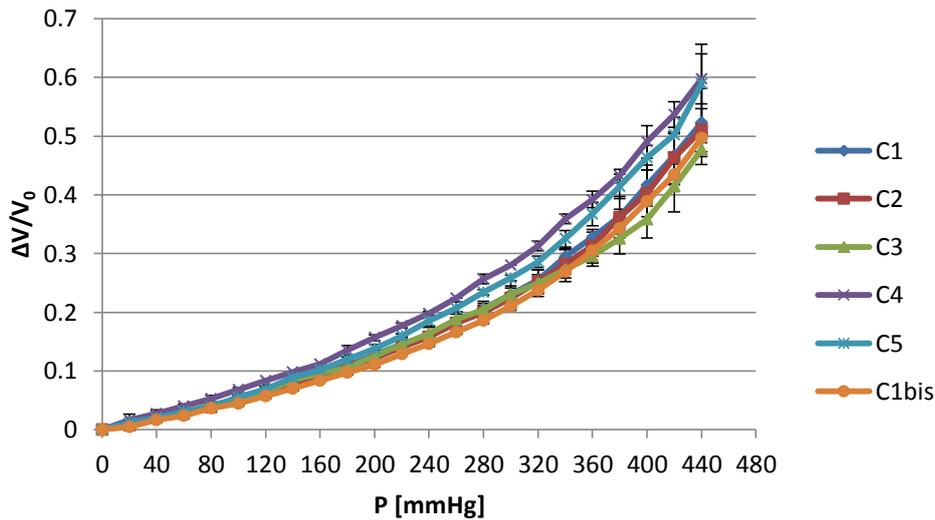
	$L_{\text{utile}}$ [mm]	OD [mm]	t [mm]	ID [mm]	$V_0$ interno [ml]
<b>Media</b>	27.67±1.54	3.29±0.1	0.32±0.04	2.64±0.17	0.15±0.26

**Tabella 3.1.** Caratteristiche geometriche medie dei campioni di guaina in silicone sottoposti a prove di caratterizzazione.  $L_{\text{utile}}$ =lunghezza utile, OD= diametro esterno, t= spessore, ID= diametro interno,  $V_0$ = volume iniziale. Per i dettagli sulle misure dei singoli campioni si rimanda all'APPENDICE C.

La grandezza  $L_{\text{utile}}$  è stata misurata come la distanza tra le estremità dei due connettori una volta calzata la guaina, interpretata come la lunghezza del tratto in silicone effettivamente sottoposto a deformazione. Ogni valore è stato ricavato come media su tre misurazioni.

Per ogni campione sono state eseguite tre prove, eccetto per il campione 1, che è stato testato in due momenti differenti per un totale di 6 prove, per valutare eventuali cambiamenti di comportamento della struttura siliconica a seguito di un numero maggiore di test.

La variazione volumetrica è stata quindi calcolata come la media dei risultati ottenuti nelle tre prove. È stato poi ricavato il grafico della variazione di volume, normalizzata per il volume interno a riposo  $V_0$ , in funzione dell'incremento di pressione imposto al campione (Figura 3.27). I risultati per ciascun campione sono riportati nell'APPENDICE C.



**Figura 3.27.** Grafico pressione-volume rappresentante i risultati dei test di caratterizzazione effettuati su 5 campioni di guaina in silicone. Ogni curva rappresenta la media di tre prove e le linee verticali indicano i valori di deviazione standard calcolati sulle tre prove eseguite.

### 3.7.1.2. Curve di caratterizzazione pressione-deformazione

Tramite l'esecuzione delle prove di caratterizzazione è stato possibile inoltre ricavare il valore della deformazione circonferenziale della guaina siliconica in funzione della pressione.

Come descritto precedentemente, durante l'esecuzione degli esperimenti la struttura siliconica è posta sotto la lente di un microscopio Nikon SMZ1000 (Nikon) (Figura 3.26); in questo modo, durante la prova è possibile acquisire le immagini della deformazione del campione corrispondenti ad un certo incremento pressorio. Le immagini acquisite sono state successivamente analizzate avvalendosi del programma ImageJ.

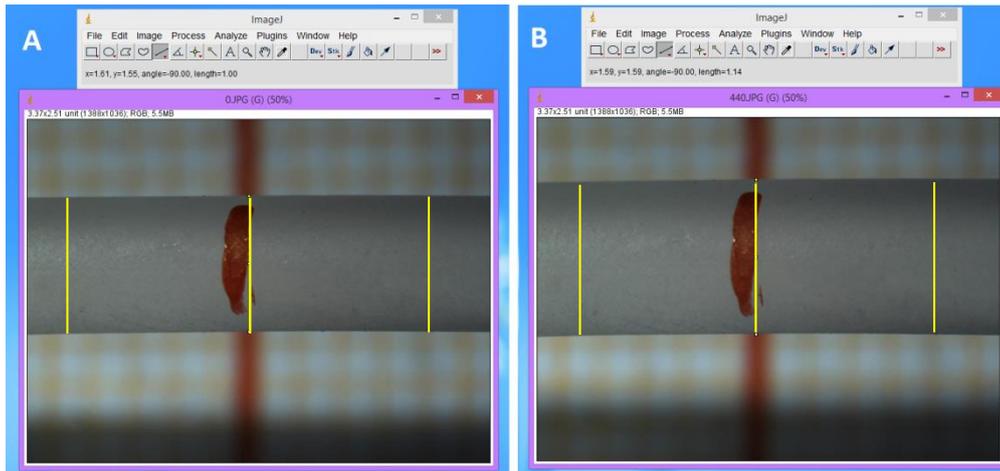
Il valore di deformazione circonferenziale della guaina ( $\varepsilon$ ) è stato ottenuto a partire da una misura del valore del diametro esterno ad ogni intervallo pressorio ( $OD_P$ ); a questo valore è stato sottratto il valore iniziale ( $OD_0$ ) e il tutto è stato normalizzato per il diametro iniziale.

$$\varepsilon = \frac{OD_P - OD_0}{OD_0} \quad (3.4)$$

Nel primo frame acquisito dal microscopio (relativo al valore di  $P=0$  mmHg), è stato infatti misurato, tramite il software ImageJ, il diametro esterno della guaina a riposo ( $OD_0$ ), che è stato posto come diametro di riferimento. Nei frame successivi al primo, viene quindi misurato il diametro esterno ad un determinato valore di pressione ( $OD_P$ ) normalizzato per quello di riferimento ( $OD_0$ ), eseguendone la misura in tre sezioni del campione (Figura 3.28):

$$D_{norm} = \frac{OD_P}{OD_0} \quad (3.5)$$

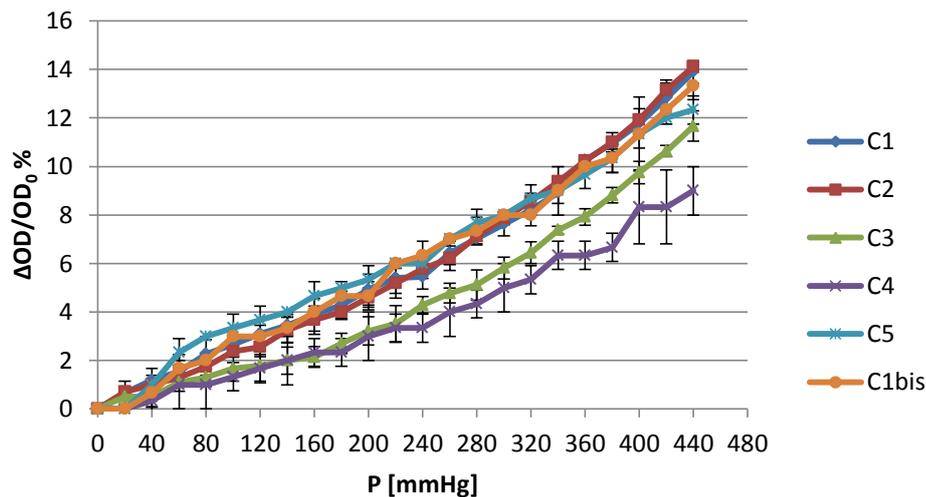
La deformazione è stata successivamente ricavata utilizzando l'Equazione 3.4.



**Figura 3.28.** Esempio dell’analisi della variazione del diametro esterno con software ImageJ per un campione di guaina in silicone. (A) Foto del silicone a pressione interna pari a 0 mmHg: definizione del diametro di riferimento. (B) Analisi del diametro esterno relativo al valore di pressione imposto pari a 440 mmHg. Le linee gialle verticali identificano le tre sezioni del campione in cui viene effettuata l’analisi.

Così facendo è possibile ottenere un andamento della deformazione circonferenziale in funzione della pressione luminale interna applicata per i cinque tratti di guaina in silicone analizzati.

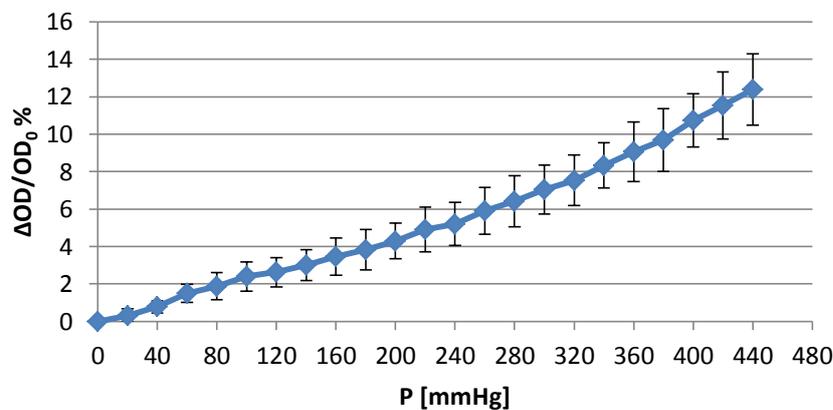
Nella Figura 3.29 vengono riportati i risultati dei livelli di deformazione circonferenziale raggiunti a differenti valori di pressione.



**Figura 3.29.** Grafico pressione-deformazione rappresentante i risultati dei test di caratterizzazione effettuati su 5 campioni di guaina in silicone. Ogni curva rappresenta la media di tre prove e le linee verticali indicano i valori di deviazione standard calcolati sulle tre prove eseguite.

Le misure di deformazione sono state ottenute mediando i risultati di tre prove eseguite su ogni campione.

Dal grafico di Figura 3.29 si evince che ogni tratto di guaina in silicone, a parità di pressione, si deforma in maniera differente rispetto alle altre. Per poter quindi ottenere una caratterizzazione generica della struttura siliconica (utile per lo sviluppo del modello che verrà descritto nel paragrafo 3.7.2) è stata considerata un'unica curva, ottenuta mediando le precedenti (Figura 3.30): essa rappresenta la curva di calibrazione che permette di scegliere i valori di pressione intraluminale da applicare alla guaina siliconica in funzione della deformazione circonferenziale che si vuole ottenere.



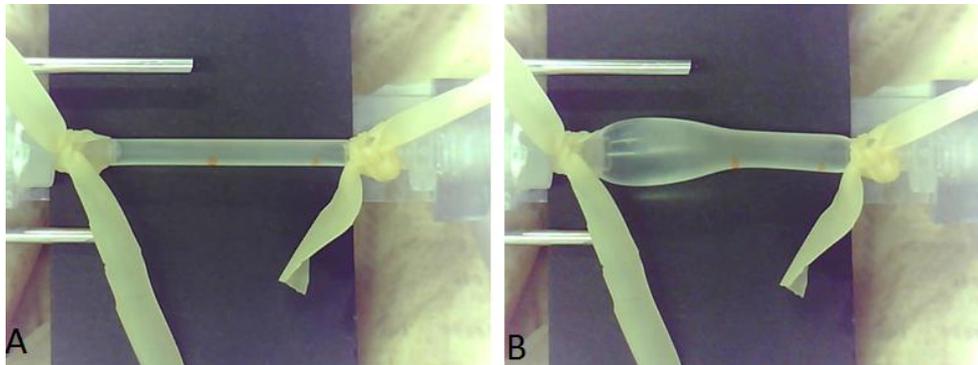
**Figura 3.30.** Curva di calibrazione pressione-deformazione della guaina siliconica.

#### **Pressione massima sopportata dalla guaina**

Per determinare invece la pressione massima sopportata dalla guaina in silicone, e la corrispondente deformazione, due campioni sono stati sottoposti a test eseguiti con un setup differente da quello presentato finora.

Le strutture siliconiche sono state calzate sul telaio e fissate ai connettori utilizzando lacci in lattice (Penrose Tubing X-Ray Opaque, Kendall Argyle). L'esperimento è stato eseguito infondendo fluido all'interno della guaina tramite una pompa peristaltica Ismatec IPCN-12. Il set up per l'esecuzione della prova è formato da diverse componenti hardware tra cui la pompa Ismatec IPCN-12, un sensore di pressione di tipo *flow-through* (Pendotech Press-S-000), un'elettrovalvola pinza-tubo Z110A 24V (Sirai Elettromeccanica, Bussero, Italia), una scheda di acquisizione NI DAQ USB-6009 (National Instruments®, Austin, TX, USA), una centralina di alimentazione e da una componente software (C-SO). Sia il set up che il protocollo di prova saranno oggetto del paragrafo 5.1.1. L'esperimento è stato eseguito incrementando la pressione a step di 40 mmHg e la portata utilizzata per l'esecuzione del test è pari a 0.1 ml/min. La prova è stata interrotta nell'istante in cui si è verificato il fallimento del campione.

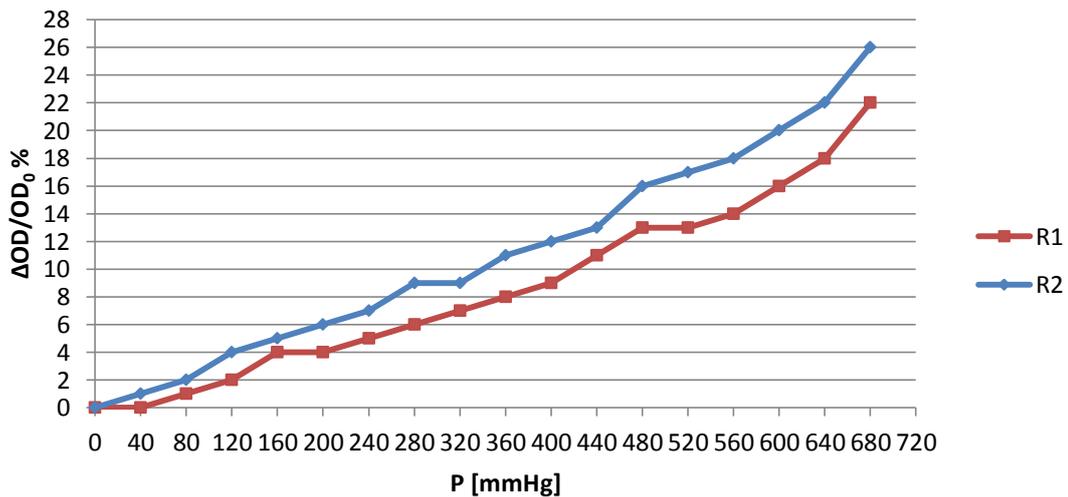
Per pressione d’esercizio massima sopportata dalla guaina in silicone si intende quel valore di pressione oltre il quale si verificano delle perdite di fluido nei punti di ancoraggio della guaina al telaio (in prossimità dei connettori) o in corrispondenza del quale si assiste ad una deformazione non più uniforme lungo il profilo della guaina, come mostrato in Figura 3.31.



**Figura 3.31.** Fotografie rappresentanti un campione di guaina siliconica durante la prova. (A) Deformazione uniforme. (B) Deformazione non uniforme: si nota un rigonfiamento in prossimità del connettore sinistro.

Le misure dei due campioni sottoposti a questo tipo di test sono riportate in APPENDICE C.

Nella Figura 3.32 vengono riportati i risultati dei livelli di deformazione raggiunti a differenti valori di pressione.



**Figura 3.32.** Grafico rappresentante l’andamento della deformazione circonferenziale in funzione della pressione ricavata durante test effettuati per valutare la pressione massima sopportata dalla guaina in silicone.

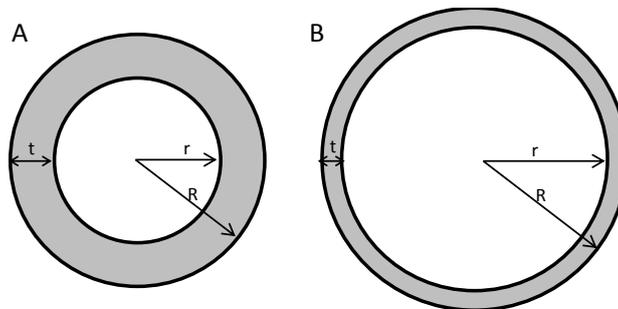
I campioni R1 e R2 hanno raggiunto entrambi una pressione massima di 680 mmHg prima del fallimento. In corrispondenza di questo valore di pressione i due tratti di guaina hanno evidenziato rispettivamente una deformazione circonferenziale del 22% e del 26%: si può quindi ipotizzare che le guaine siliconiche riescano a raggiungere una deformazione poco superiore al

20% prima di arrivare al fallimento. Questo risultato è stato utile per capire quale fosse la dimensione massima dei vasi stimolabili con la guaina in silicone, come verrà descritto più nel dettaglio nel paragrafo 4.2.2. I risultati delle prove per ciascun campione sono riportati in APPENDICE C.

### 3.7.1.3. Correlazione dei risultati ottenuti nelle prove di caratterizzazione

Nell’ottica di voler correlare i risultati mostrati in Figura 3.27, cioè corrispondenti alle variazioni di volume della guaina ricavate dallo spostamento del fluido nella cannula, con quelli di Figura 3.29, ovvero le variazioni di diametro della guaina ottenute dall’analisi delle immagini, si è dovuto riscrivere i primi in termini di variazione di diametro esterno. A tal fine, la guaina siliconica è stata modellizzata come un condotto cilindrico la cui parete è costituita da materiale incompressibile (si è infatti ipotizzato che il modulo di Poisson della guaina in silicone sia pari a 0.5).

Di conseguenza, in seguito all’applicazione di una pressione interna, in condizioni isometriche e isovolumetriche (lunghezza e volume costanti durante la prova), al progressivo aumento del diametro corrisponde un progressivo assottigliamento dello spessore della parete.



**Figura 3.33.** Rappresentazione della sezione della guaina in silicone come una corona circolare:  $r$ = raggio interno,  $R$ = raggio esterno,  $t$ = spessore. (A) Sezione indeformata. (B) Sezione deformata: si nota che durante la deformazione ad un aumento del diametro corrisponde un assottigliamento dello spessore.

Modellizzando una sezione della guaina siliconica come una corona circolare (Figura. 3.33) e ponendo il volume costante ( $V_i=V_f$ ) si ha che:

$$\pi(R_i^2 - r_i^2)L = \pi(R_f^2 - r_f^2)L \quad (3.6)$$

È quindi possibile ricavare l’andamento dello spessore come segue

$$t_f = \frac{-2r_f + \sqrt{4r_f^2 + 4(2r_i t_i + t_i^2)}}{2} \quad (3.7)$$

in cui  $t$  è lo spessore,  $r$  il raggio interno e i pedici  $f$  e  $i$  indicano rispettivamente i valori finali (cioè corrispondenti al termine di ogni step di incremento di pressione) e iniziali (a pressione intraluminale pari a 0 mmHg) delle grandezze in esame (per i dettagli si riporta all’APPENDICE D).

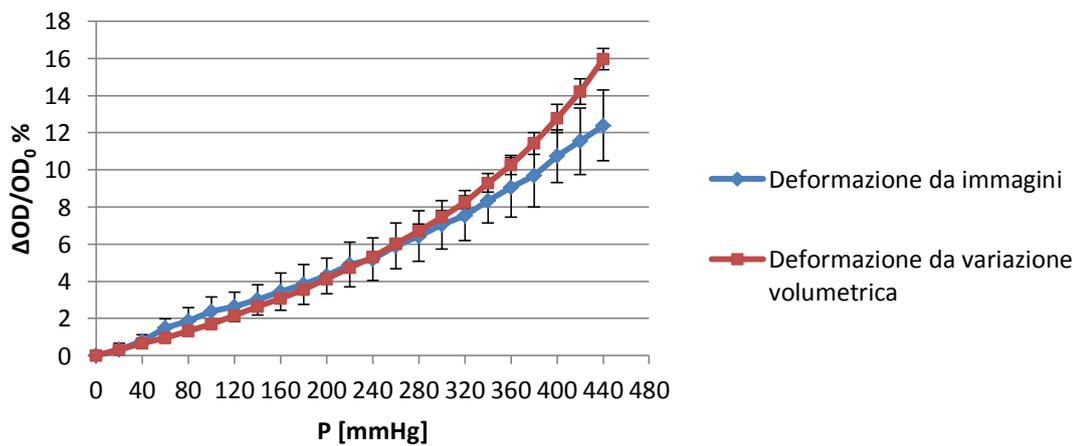
Il valore di  $r_f$  si ricava a partire dalla misura del diametro interno al termine di ogni step pressorio ( $ID$ ), calcolabile mediante l'Equazione 3.8

$$ID = \sqrt{\frac{4\Delta V}{\pi L} + ID_0^2} \quad (3.8)$$

in cui  $\Delta V$  rappresenta l'incremento volumetrico ad ogni step della prova e  $ID_0$  il diametro iniziale del campione.

Sommando i valori di  $t_f$  ricavati dall'Equazione 3.7 ai corrispondenti valori di raggio interno ricavati dall'Equazione 3.8, si ottengono i valori di raggio esterno e quindi di diametro esterno  $OD$  relativi alle differenti  $P_{in}$  applicate.

Le variazioni di raggio esterno  $OD$  ricavate dalle variazioni volumetriche della guaina sono state quindi confrontate con quelle ottenute dall'analisi delle immagini, come mostrato in Figura 3.34.



**Figura 3.34.** Confronto dei valori di deformazione ottenuti a partire dalle variazioni volumetriche e dall'analisi delle immagini. Le curve rappresentano la media dei risultati ottenuti nei test precedenti, mentre le linee verticali indicano la deviazione standard.

Si nota come le curve ottenute siano pressoché sovrapponibili fino a pressioni corrispondenti a circa 300 mmHg, mentre oltrepassando questo valore le due curve tendono a divergere. Questo scostamento può essere dovuto in parte alla modellizzazione della guaina in silicone come un cilindro perfetto, che si deforma uniformemente per qualsiasi  $P_{in}$  applicata. L'evidenza sperimentale ha infatti provato che, per pressioni elevate, la deformazione non risulta omogenea su tutta la lunghezza del campione, il quale tende a deformarsi maggiormente nella zona prossima ai connettori. Di conseguenza, sebbene durante gli esperimenti non si siano notati comportamenti di deformazione non uniforme osservabili ad occhio nudo, bisogna ricordare che le misure di deformazione ricavate dalle immagini sono state effettuate in prossimità della zona centrale del

campione. Questo potrebbe spiegare perché il livello di deformazione ottenuto dall'analisi delle immagini sia inferiore rispetto a quello ricavato dalla variazione di volume.

### 3.7.2. Modello semiempirico

Le informazioni ottenute dagli esperimenti di caratterizzazione della guaina in silicone sono risultate necessarie, come descritto precedentemente, per lo sviluppo di un modello che possa predire, noti i parametri biomeccanici della struttura che si vuole stimolare, la deformazione circonferenziale in funzione della pressione interna applicata.

A tal fine è stato necessario rappresentare il circuito di stimolazione tramite un analogo elettrico. Il circuito idraulico può essere modellizzato come un sistema RLC del tipo a T. I tre parametri, che dipendono dalla geometria dei tubi in silicone che lo compongono, sono (Tabella 3.2):

- la resistenza, che considera le dissipazioni di energia dovute alla viscosità del fluido che vi scorre attraverso e calcolabile, secondo la formula di Poiseuille (valida nell'ipotesi di dominio cilindrico a base circolare nel quale scorre una portata costante di fluido newtoniano, in regime laminare), come

$$R = \frac{128 \mu l}{\pi D^4} \quad (3.9)$$

in cui  $\mu$  è la viscosità del fluido,  $l$  e  $D$  rispettivamente la lunghezza e il diametro del condotto.

- la *compliance*, che rappresenta la capacità di deformarsi dei tubi, intesa come il rapporto tra la variazione del volume del fluido presente nel condotto ( $\Delta V$ ) e la variazione di pressione ai suoi capi ( $\Delta P$ ) ( $C = \Delta V / \Delta P$ ), calcolabile come

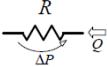
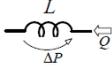
$$C = \frac{\pi D^3 l}{4Es} \quad (3.10)$$

in cui  $s$  è lo spessore della parete ed  $E$  è il modulo elastico del materiale del condotto ( $l$  e  $D$  precedentemente definiti).

- l'inertanza, che rappresenta gli effetti inerziali dovuti al movimento del fluido all'interno del condotto e il cui contributo è calcolabile a partire dalla seguente formula

$$L = \frac{4\rho l}{\pi D^2} \quad (3.11)$$

in cui  $\rho$  rappresenta la densità del fluido ( $l$  e  $D$  precedentemente definiti).

	CAPACITÀ ⇔ COMPLIANCE	$Q = \frac{dV}{dt} = C \frac{dP}{dt}$
	RESISTENZA ⇔ VISCOSITÀ	$\Delta P = RQ$
	INDUTTANZA ⇔ INERZIA	$\Delta P = L \frac{dQ}{dt}$

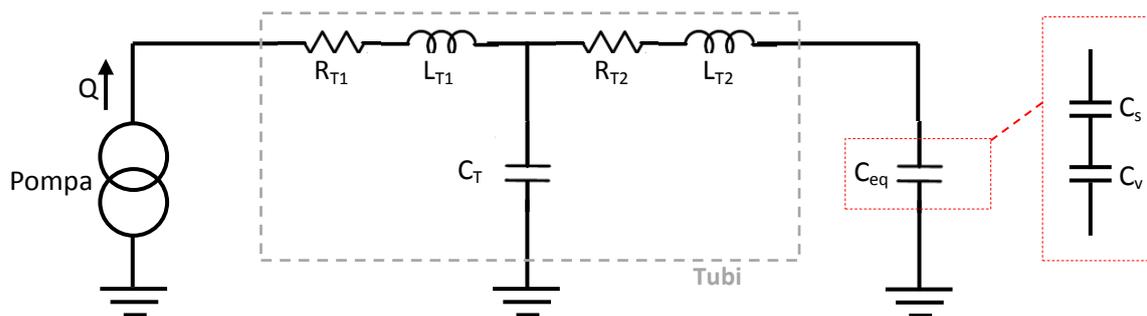
**Tabella 3.2.** Analogie tra sistemi idraulici ed elettrici [55].

La pompa può essere invece modellizzata come un generatore ideale di corrente, mentre la guaina siliconica e il vaso (nativo o ingegnerizzato) che su di essa viene calzato, possono essere rappresentati come un'unica *compliance* che è in realtà l'equivalente della serie delle due e viene calcolata come

$$\frac{1}{C_{eq}} = \frac{1}{C_v} + \frac{1}{C_s} \rightarrow C_{eq} = \frac{C_v \cdot C_s}{C_v + C_s} \quad (3.12)$$

Nel caso della guaina e del vaso vengono trascurati i contributi inerziali e resistivi, almeno in prima approssimazione, grazie alle caratteristiche geometriche delle strutture. Tramite calcoli preliminari si è infatti verificato che per questi due elementi i parametri R e L risultano trascurabili.

Il sistema può quindi essere rappresentato come in Figura 3.35.



**Figura 3.35.** Analogo elettrico del circuito idraulico utilizzato nel sistema di coltura.  $R_{T1}$ ,  $R_{T2}$ ,  $L_{T1}$ ,  $L_{T2}$  e  $C_T$  rappresentano le resistenze, le induttanze e la capacità dei tubi, rispettivamente;  $C_{eq}$  rappresenta la serie tra il vaso (che si vuole stimolare) e la guaina in silicone su cui è montato all'interno della camera di coltura.

Per quanto riguarda i tubi del circuito, calcoli approssimativi hanno verificato che la componente capacitiva risulta trascurabile, così che il circuito rappresentato in Figura 3.35 può essere ulteriormente semplificato eliminando la componente  $C_T$  dei tubi. Questo implica che i tubi che collegano la pompa alla guaina siano considerabili come condotti rigidi e che la variazione di volume (e quindi di pressione) generata dalla pompa provocherà la deformazione dell'unico elemento compliant del circuito, ovvero la serie guaina-vaso.

Per prevedere la deformazione delle strutture tubulari calzate sulla guaina, è stato introdotto, sia per la guaina siliconica che per i vasi nativi, un indice di distensibilità ( $I_D$ ) calcolato secondo l'Equazione 3.13:

$$I_D = \frac{\Delta D / D_0}{P} \quad (3.13)$$

in cui  $\Delta D$  rappresenta la dilatazione del diametro della struttura tubolare in esame ad un determinato valore di pressione  $P$ , mentre  $D_0$  il suo diametro iniziale (a pressione intraluminale nulla). Nel caso delle guaine siliconiche, tale indice è stato ricavato dai risultati delle prove di caratterizzazione descritte nel paragrafo 3.7.1; in particolare  $I_{D(S)}$  è stato calcolato come la pendenza della retta uscente dall'origine e secante la curva di calibrazione di Figura 3.30 in ciascun punto di interesse della curva stessa.

Nel caso dei vasi nativi, invece, l'indice di distensibilità è stato ricavato dai test di distensibilità, che verranno descritti nel paragrafo 5.3.

Considerando che il vaso sanguigno viene calzato sulla guaina, è possibile eseguire la serie tra i due  $I_D$  ottenuti (come se si trattasse delle due *compliance* rappresentate nel modello di Figura 3.35) e ricavare quindi un indice di distensibilità equivalente ( $I_{Deq}$ ) (Equazione 3.14):

$$I_{Deq} = \frac{I_{D(V)} \cdot I_{D(S)}}{I_{D(V)} + I_{D(S)}} \quad (3.14)$$

A partire dal valore di  $I_{Deq}$  ottenuto, viene ricavata la variazione del diametro della struttura guaina-vaso ( $\Delta D/D_0$ ) per ogni valore di pressione  $P$ .

Poichè le informazioni che si otterranno durante la fase di verifica del modello (Capitolo 4) si basano sulla misura della variazione del diametro esterno dei vasi ricavata dall'analisi delle immagini, è stato necessario valutare nel modello la deformazione circonferenziale esterna del sistema guaina-vaso. A tal fine partendo dall'assunzione che il materiale biologico sia incomprimibile [56], il vaso è stato modellizzato come una corona circolare. È stato quindi ripetuto il procedimento svolto nel paragrafo 3.7.1.3 per ricavare lo spessore in funzione della pressione intraluminale applicata utilizzando l'Equazione 3.7. Di conseguenza, sommando gli spessori ai diametri interni dilatati corrispondenti, è possibile ottenere la variazione del diametro esterno del vaso calzato sulla guaina ogni 20 mmHg. Per i dettagli si faccia riferimento all'APPENDICE D.

Tutti i calcoli sono stati effettuati su foglio di calcolo elettronico Microsoft Office Excel.

È sufficiente quindi conoscere le caratteristiche geometriche iniziali del vaso (nativo o ingegnerizzato) e il valore dell'indice di distensibilità, per capire quale *range* di pressioni vada applicato alla guaina siliconica per ottenere la deformazione circonferenziale del vaso desiderata. Si tenga presente che il modello appena descritto è valido nel caso in cui il diametro interno del costruito sia perfettamente coincidente con il diametro esterno della guaina siliconica (ID~3.1 mm), situazione ottenibile solo nell'ipotesi in cui il vaso sia un costruito realizzato direttamente sulla guaina e non subisca alcuna modifica geometrica e/o strutturale durante l'evoluzione temporale della sua maturazione. Essendo questa una situazione che si verifica raramente, si è effettuata una generalizzazione del modello agli altri possibili casi.

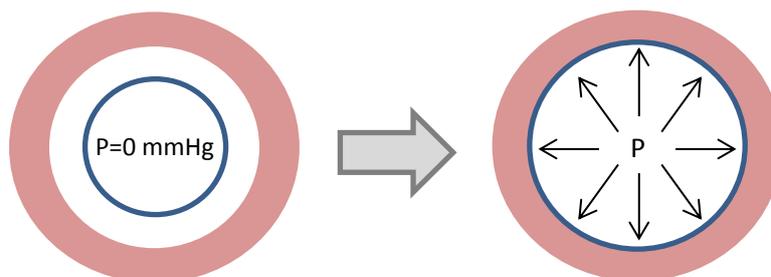
### 3.7.2.1. Generalizzazione del modello

Per poter stimolare il vaso sanguigno anche nel caso in cui non vi sia un'aderenza perfetta tra quest'ultimo e la guaina siliconica su cui viene montato (caso che si potrebbe verificare per esempio utilizzando matrici decellularizzate come *scaffold*), risulta necessario modellizzare cosa accade se il diametro del campione biologico risulta superiore o inferiore rispetto al diametro nominale esterno della guaina.

#### Diametro del vaso maggiore del diametro nominale della guaina (ID > 3.1 mm)

Nel caso in cui il diametro del vaso sia maggiore rispetto a quello della guaina, bisogna valutare, in base alle dimensioni del campione, quanto deve essere dilatato il diametro esterno della guaina in silicone così che risulti coincidente con quello del lume del vaso.

A partire da quanto descritto nel paragrafo 3.7.2, si tratta ora di considerare come  $P_{\min}$  da impostare nel software quella in corrispondenza della quale la guaina in silicone risulta perfettamente aderente al campione biologico: nella configurazione iniziale si avrà quindi la guaina già dilatata mentre il campione montato sopra di essa risulterà indeformato (Figura 3.36).



**Figura 3.36.** Schema della sezione della guaina in silicone sulla quale viene montato un vaso sanguigno con diametro interno maggiore del diametro esterno della guaina. A seguito dell'applicazione di una pressione interna alla guaina siliconica, questa si dilata fino a raggiungere una completa aderenza con la parete interna del vaso sanguigno.

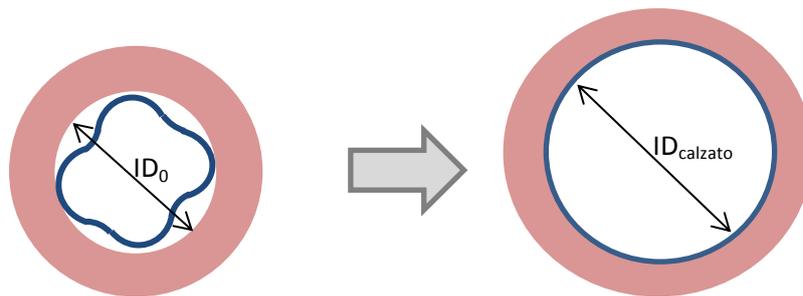
Per ricavare il valore di deformazione circonferenziale da applicare alla guaina è sufficiente risolvere l'Equazione 3.15:

$$\varepsilon = \frac{ID_v - OD_g}{OD_g} \quad (3.15)$$

dove  $ID_v$  corrisponde al diametro interno iniziale del vaso e  $OD_g$  al diametro esterno della guaina a riposo. Utilizzando le curve di caratterizzazione pressione-deformazione (Figura 3.32) è quindi possibile ottenere la  $P_{min}$  corrispondente. In questa applicazione particolare del modello ci si è serviti dei risultati ottenuti dagli esperimenti effettuati per ricavare la pressione massima sopportata dalla guaina, descritti nel paragrafo 3.7.1.2.

**Diametro del vaso minore del diametro nominale della guaina (ID < 3.1 mm)**

Per quanto riguarda invece vasi con calibro inferiore rispetto a quello della guaina in silicone, è necessario descrivere il comportamento in modo differente. Le strutture in silicone, infatti, risultano molto resistenti e l'evidenza sperimentale mostra che, se le guaine vengono inserite in un condotto di dimensioni inferiori al proprio diametro, tendono comunque a mantenere la loro configurazione a riposo. Questo avviene soprattutto se il materiale biologico che viene calzato su di esse risulta essere più deformabile, imponendo quindi una resistenza trascurabile alla deformazione della guaina. Ovviamente questo comportamento è fortemente influenzato anche dalla differenza tra il diametro della guaina e quello del vaso.



**Figura 3.37.** Schema della sezione della guaina in silicone sulla quale viene montato un vaso sanguigno con diametro interno minore del diametro esterno della guaina. Il diametro a riposo del vaso sanguigno ( $ID_0$ ) subisce una dilatazione ( $ID_{calzato}$ ) dovuta al solo inserimento della guaina al suo interno.

Risulta quindi necessario non solo misurare le dimensioni del campione prima di calzarlo sulla guaina, ma anche dopo che è stato calzato, per stabilire quali siano le condizioni iniziali dell'esperimento di stimolazione. La deformazione circonferenziale subita dal vaso sanguigno dopo l'operazione di inserimento della guaina al suo interno infatti risulta pari a

$$\varepsilon = \frac{ID_{calzato} - ID_0}{ID_0} \quad (3.16)$$

dove  $ID_{calzato}$  è il diametro del vaso misurato dopo che quest'ultimo è stato calzato sulla guaina, mentre  $ID_0$  corrisponde al suo diametro iniziale (Figura 3.37). Dal livello di deformazione iniziale del vaso ( $\epsilon$ ), tramite i risultati degli esperimenti che verranno descritti nel paragrafo 5.3 per il calcolo dell'indice di distensibilità del vaso sanguigno, si ricava la pressione interna che permette al vaso stesso di dilatarsi di quel valore. Di conseguenza è possibile calcolare il valore dell'indice di distensibilità del vaso sanguigno inserendo nell'Equazione 3.13 il valore di pressione P ricavato.

Svolgendo gli stessi calcoli descritti nel paragrafo 3.7.2 è poi possibile ricavare la variazione del diametro esterno del vaso in funzione della pressione intraluminale applicata alla guaina.

Esempi dell'utilizzo del modello sviluppato verranno mostrati nel paragrafo 4.2.

## Capitolo 4

# Collaudo del modulo per la coltura ed esperimenti di verifica del modello

La fase di collaudo è fondamentale per la progettazione e il successivo sviluppo di un sistema in quanto permette di verificare il corretto funzionamento del dispositivo progettato (in termini di robustezza, affidabilità, tenuta idraulica, ...), in condizioni paragonabili a quelle a cui sarà sottoposto durante la messa in esercizio.

Il collaudo del sistema è stato svolto per entrambe le modalità di utilizzo, sia come sistema di coltura, sia come dispositivo per la caratterizzazione meccanica.

Nella prima parte del capitolo verranno descritti i test di collaudo per il sistema funzionante in modalità di coltura. In particolare, verranno descritti gli esperimenti eseguiti per la verifica del corretto funzionamento del sistema di stimolazione nel caso in cui venga impiegata la guaina in silicone per la trasmissione dello stimolo. Successivamente verranno descritte le prove che sono state effettuate alloggiando nel bioreattore tratti di un vaso sanguigno di origine porcina, calzati sulla guaina in silicone stessa, per verificare che la deformazione circonferenziale ottenuta stimolando il campione per mezzo del MeCC fosse confrontabile con quella prevista dal modello semiempirico descritto nel Capitolo 3 (Paragrafo 3.7.2).

Tutti gli esperimenti di collaudo riassunti in Tabella 4.1 sono stati svolti presso il  $\mu$ BSLab, in condizioni di non sterilità.

Test di Collaudo	Numero campioni analizzati
Deformazione guaina in condizioni dinamiche di esercizio	4
Stimolazione guaina a diverse frequenze	1
Stimolazione guaina per 7 giorni a 37°C	1
Stimolazione guaina+vaso porcino	8

**Tabella 4.1.** Tabella riassuntiva delle prove di collaudo effettuate sul MeCC in modalità sistema di coltura.

### 4.1. Collaudo del sistema di stimolazione con guaina in silicone

Per verificare l'adeguatezza del circuito di stimolazione realizzato e la capacità della guaina in silicone di mantenere un comportamento stabile durante l'intera durata della coltura, sono stati condotti test di collaudo assemblando il sistema di coltura e facendolo lavorare in condizioni di esercizio.

In particolare in questa fase si sono volute verificare:

- la deformazione della guaina in condizioni dinamiche di esercizio (Paragrafo 4.1.1);
- il funzionamento del sistema a differenti frequenze di stimolazione (Paragrafo 4.1.2);
- l'affidabilità del sistema per tempi prolungati e in condizioni d'esercizio da laboratorio ( $T=37^{\circ}\text{C}$ ) (Paragrafo 4.1.3);
- l'affidabilità della guaina siliconica a seguito della sterilizzazione (Paragrafo 4.1.4).

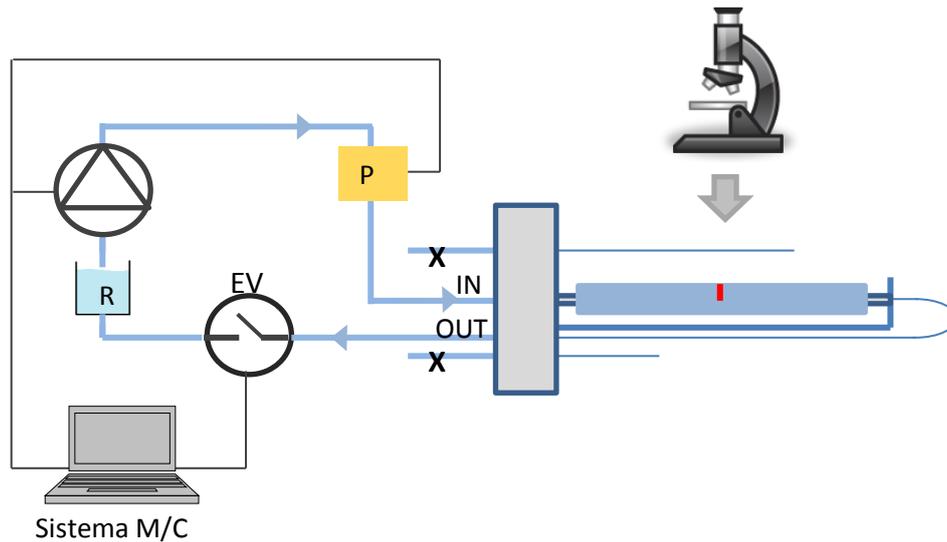
Dall'analisi della letteratura (Capitolo 2) si evince che per simulare una sollecitazione fisiologica sui vasi sanguigni ingegnerizzati posti in coltura dinamica, sia opportuno applicare una deformazione circonferenziale pari al 10% [12]. In questa fase di collaudo sono stati quindi presi in considerazione valori di deformazione circonferenziale pari al 5÷10% come *range* di riferimento.

I valori di pressione impostati nel software di M/C per effettuare la stimolazione sono derivati dalla curva di calibrazione, rappresentata in Figura 3.30, la quale correla il valore di pressione alla deformazione della guaina siliconica. La curva è stata ottenuta a partire dai risultati delle prove di caratterizzazione descritte nel paragrafo 3.7.1.

#### **4.1.1. Test di deformazione della guaina siliconica in condizioni dinamiche di esercizio**

Questi esperimenti sono stati eseguiti al fine di verificare che i valori di deformazione della guaina siliconica raggiunti applicando uno stimolo ciclico pulsatile corrispondessero, a parità di pressione, a quelli ottenuti nelle prove di caratterizzazione eseguite manualmente e descritte nel paragrafo 3.7.1.2. Inoltre si è voluto verificare che la dinamica di deformazione della guaina seguisse quella di applicazione dello stimolo.

Per eseguire questi test il sistema di stimolazione assemblato (descritto nel paragrafo 3.4) è stato posto al di sotto di un microscopio Nikon SMZ1000, dotato di telecamera, in modo da poter eseguire registrazioni video della zona centrale della guaina (Figura 4.1). Per ottenere una migliore risoluzione delle immagini, queste prove di collaudo sono state eseguite montando la guaina sul telaio del bioreattore, senza l'utilizzo della provetta Falcon.



**Figura 4.1.** Schema del setup sperimentale utilizzato per eseguire le prove di deformazione della guaina in condizioni dinamiche di esercizio. Una pompa peristaltica, dopo aver infuso fluido nel circuito durante la fase di riempimento (l'elettrovalvola (EV) è aperta), inverte alternativamente il senso di rotazione dei rulli per aumentare e diminuire ciclicamente la pressione intraluminale nella guaina silconica (fase di stimolazione). L'elettrovalvola a valle della camera, se chiusa, permette di occludere il tratto di circuito a valle del telaio, generando un incremento pressorio all'interno della guaina. Quando aperta la valvola consente il passaggio del fluido fino ad una riserva di scarico. Lungo il circuito idraulico, a monte della guaina, è posizionato il sensore di pressione (P). Il sistema di M/C riceve in ingresso il segnale proveniente dal sensore di pressione e regola opportunamente la portata erogata dalla pompa mediante un controllo in retroazione (segnale di feedback). Un microscopio dotato di telecamera permette di eseguire registrazioni video con risoluzione delle immagini pari a 1388x1036 pixels.

Come descritto precedentemente, durante le prove di collaudo il sistema di coltura è stato fatto lavorare nelle condizioni di esercizio previste nell'applicazione di destinazione. I parametri impostati nel software per la stimolazione ciclica/pulsatile della guaina sono i seguenti:  $P_{max}=380$  mmHg,  $\Delta P=360$  mmHg, frequenza 0.5 Hz, numero di cicli=50, portata di ricircolo pari a 5 ml/min per un tempo pari a 10 s.

I valori pressori sono stati scelti sulla base della curva di calibrazione mostrata in Figura 3.30: il valore di 380 mmHg è quello corrispondente infatti ad una deformazione circonferenziale media della guaina intorno al 10%. Il valore di  $\Delta P$  è stato posto pari a 360 mmHg per garantire, invece, che la pressione intraluminale minima fosse di circa 20 mmHg, a cui corrisponde una deformazione della guaina quasi nulla.

Il protocollo descritto si è limitato alla verifica di pochi cicli di deformazione, ritenuti però significativi al fine di valutare la capacità del sistema di coltura di applicare alla guaina il valore di deformazione ciclica desiderato.

Le prove di deformazione ciclica delle guaine silconiche sono state effettuate su tre campioni: due di essi già precedentemente testati nelle prove di caratterizzazione (C1 e C2), un terzo

campione (C3) è stato invece testato *ex novo*. In questo modo è stato possibile verificare che, a parità di pressione, i valori di deformazione circonferenziale trovati mettendo in esercizio il sistema di stimolazione fossero confrontabili con i risultati descritti nel paragrafo 3.7.1.2. La Tabella 4.2 riporta la media delle caratteristiche geometriche dei campioni in esame: le misure sono state effettuate utilizzando un calibro e/o analizzando le immagini acquisite da anelli di materiale lunghi circa 1 mm tramite il software ImageJ.

	$L_{\text{utile}}$ [mm]	OD [mm]	t [mm]	ID [mm]	$V_0$ interno [ml]
<b>Media</b>	29.16±1.41	3.35±0.09	0.29±0.01	2.76±0.08	0.17±0.01

**Tabella 4.2.** Caratteristiche geometriche dei campioni di guaina in silicone sottoposti a prove di deformazione.  $L_{\text{utile}}$ = distanza tra i connettori, OD= diametro esterno, t= spessore, ID= diametro interno,  $V_0$ = volume iniziale. Per i dettagli sulle misure dei singoli campioni si rimanda all'APPENDICE E.

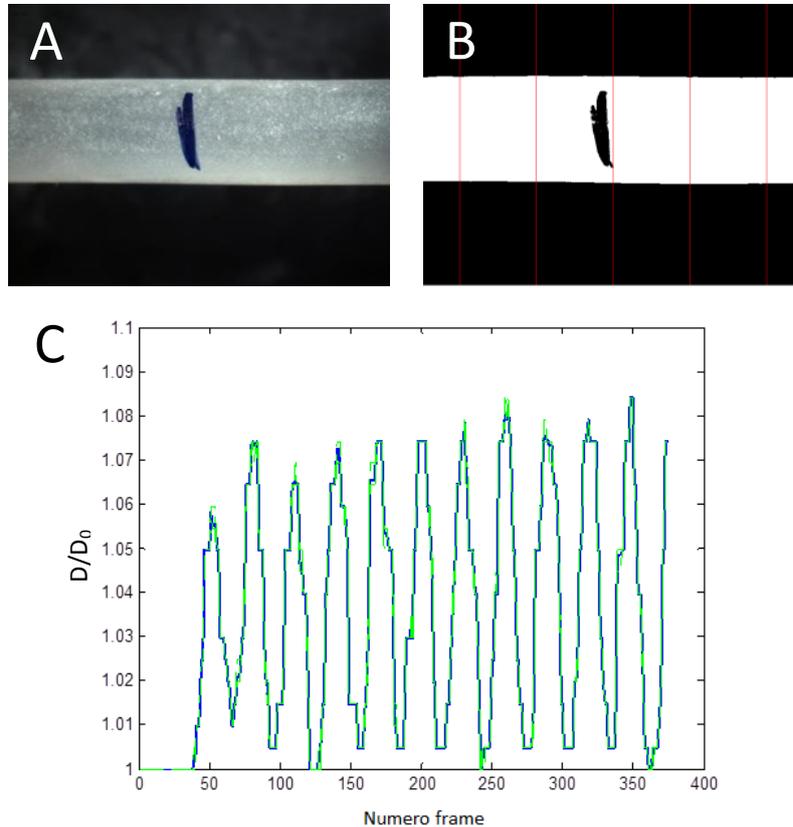
### Elaborazione delle immagini

Una videocamera collegata al microscopio ha permesso l'acquisizione di un video per tutta la durata dell'esperimento; il filmato ottenuto, una volta processato, ha permesso di valutare la variazione del diametro della guaina in silicone durante la stimolazione. Più precisamente, è stato necessario suddividere il filmato in singoli frame tramite software *Free video to JPG converter*: per semplicità di calcolo computazionale è stata scelta la suddivisione in 10 fps. A partire dai singoli frame è stata effettuata un'analisi della misura dei diametri *frame by frame* in maniera analoga a quella descritta nel paragrafo 3.7.1.2, utilizzando però un codice sviluppato in ambiente di programmazione Matlab (i cui risultati sono stati confermati anche dall'analisi manuale effettuata con ImageJ) che ha permesso di analizzare la totalità dei frame ottenuti dal filmato in maniera veloce, efficiente ed automatizzata. In breve, il codice Matlab sviluppato esegue la misurazione dei diametri del campione effettuando su ciascun frame il seguente procedimento:

- binarizzazione dell'immagine: trasformazione in una matrice di 0 e 1 (bianco e nero); l'utente può stabilire la soglia di trasformazione dei pixel in 1 piuttosto che in 0 (Figura 4.2, B);
- misura del diametro esterno del campione in termini di numero di pixel: la misura viene effettuata in più sezioni e il numero di sezioni analizzate viene stabilito dall'utente (Figura 4.2, B);
- normalizzazione della misura ottenuta per ciascun frame rispetto al valore del diametro ricavato dal primo fotogramma;
- inserimento dei valori ricavati all'interno di una matrice (numero di frames x 2 colonne): nella prima colonna viene restituita la misura del diametro in pixel, nella seconda quella normalizzata;

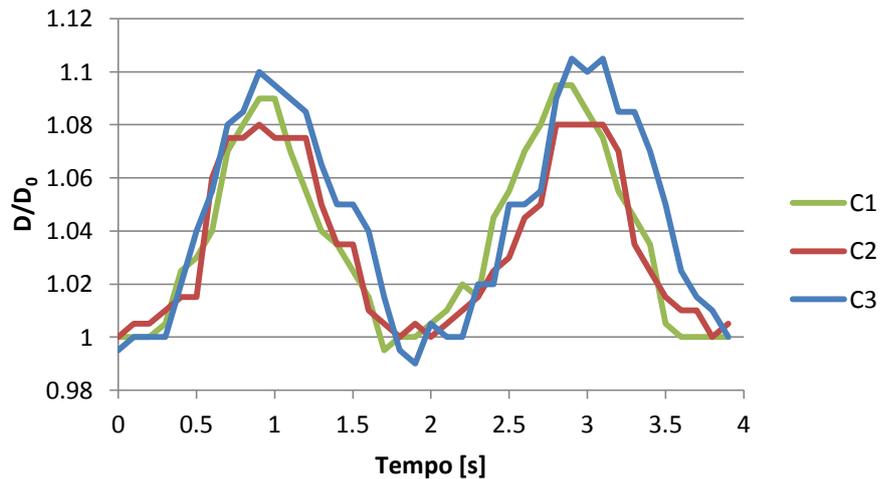
- rappresentazione a video della curva che indica l'andamento della variazione di diametro normalizzata in ogni frame processato. In verde vengono mostrate le curve rappresentanti le singole misure dei diametri effettuate nelle sezioni scelte, in blu, invece, la curva rappresentante la media delle stesse (Figura 4.2, C).

Si faccia riferimento all'APPENDICE F per i dettagli relativi al codice.



**Figura 4.2.** Analisi dei frame con codice Matlab. (A) Esempio di fotogramma analizzato. (B) Esempio di immagine restituita dal software alla fine dell'esecuzione del codice: il fotogramma è stato trasformato in un'immagine in bianco e nero; si notano in rosso le sezioni analizzate. (C) Esempio di grafico restituito dal codice Matlab: sull'asse delle ordinate è mostrata la variazione di diametro esterno, sull'asse delle ascisse il frame corrispondente. Le curve verdi rappresentano le singole misure dei diametri effettuate nelle sezioni scelte, mentre la curva blu rappresenta la media delle stesse.

Nel grafico in Figura 4.3 è riportato l'andamento della variazione relativa di diametro nel tempo, per due cicli di stimolazione, misurata nei tre tratti di guaina siliconica testati. Le curve analizzate corrispondono ai primi due cicli di stimolazione dopo una fase di ricircolo: sono stati scelti questi cicli per dare tempo al sistema di stabilizzarsi. I risultati mostrati sono una media su tre prove effettuate su ciascun tratto di guaina siliconica.



**Figura 4.3.** Grafico della variazione relativa di diametro esterno nel tempo per i tre campioni di guaina siliconica testati in condizioni dinamiche di esercizio.  $D$ = diametro esterno deformato,  $D_0$ = diametro esterno iniziale. Ogni curva rappresenta la media di tre prove.

Come si può notare in Figura 4.3, i campioni C1 e C2, sottoposti a una  $P$  pari a 380 mmHg, hanno raggiunto una deformazione di picco inferiore al 10% (pari al valore normalizzato 1.1 in Figura 4.3). Confrontando questi risultati con quelli riportati nel paragrafo 3.7.1.2 per gli stessi due campioni, si può notare come, a parità di pressione, la deformazione circonferenziale raggiunta sia maggiore nel caso delle prove di caratterizzazione eseguite manualmente, nelle quali il valore a 380 mmHg è pari a 11%. Questo è dovuto al fatto che il software, lavorando in retroazione, applica pressioni nell'intorno del valore di  $P_{max}$  impostato, di conseguenza, queste pressioni, a volte risultano minori rispetto al valore atteso. Dato quindi che i campioni sottoposti ai test in condizioni dinamiche di esercizio risentono di pressioni inferiori a 380 mmHg, essi mostrano una deformazione minore rispetto agli esperimenti eseguiti in statica.

La deformazione di picco media dei tre tratti di guaina stimolati durante questi esperimenti in corrispondenza di questo valore di  $P_{max}$  è comunque pari a  $9 \pm 0.47\%$  e risulta perciò confrontabile con la media ricavata, a parità di pressione, dalle prove eseguite manualmente pari a  $10 \pm 1.67\%$ .

Per evitare di applicare una deformazione inferiore rispetto a quella desiderata, nelle prove successive si è comunque deciso di aumentare i valori di pressione massima impostati nel sistema. I valori medi dei risultati delle prove per ciascun campione sono riportati in APPENDICE E.

#### 4.1.2. Collaudo a diverse frequenze di pulsazione

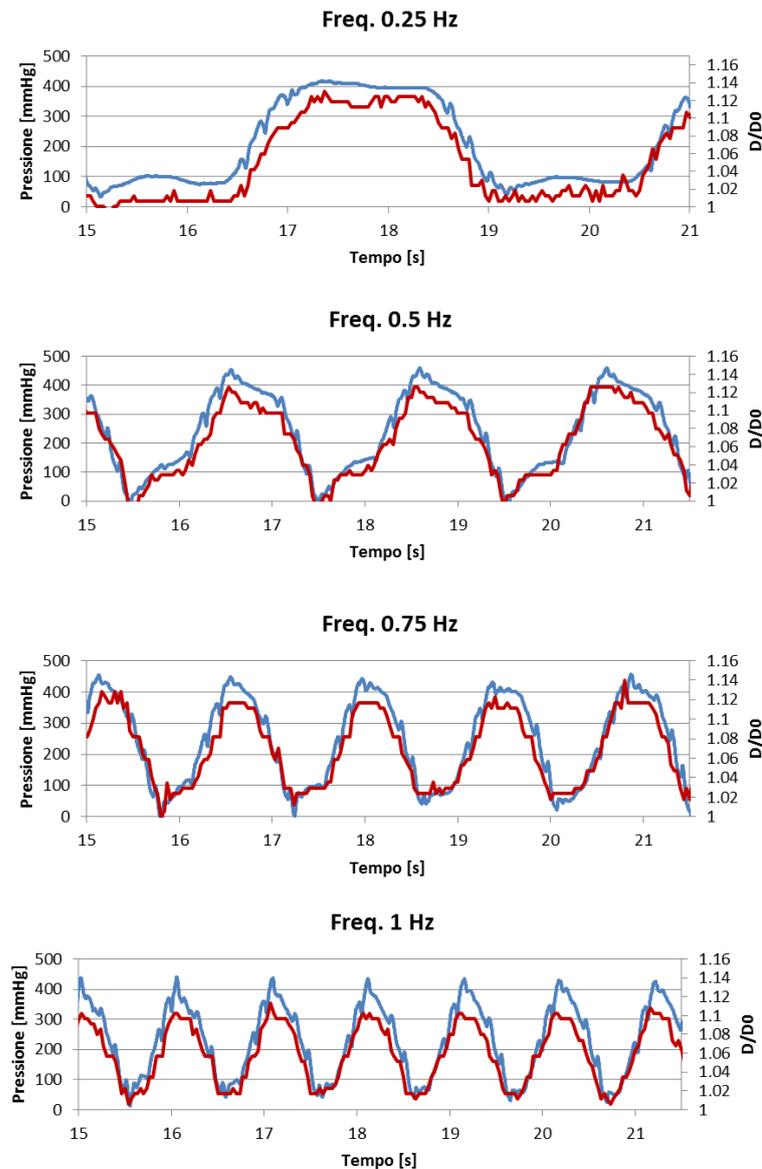
Verificato che con il sistema in esercizio le guaine raggiungono i valori di deformazione desiderati, si è voluto verificare che la dinamica di deformazione della guaina seguisse la dinamica di

applicazione dello stimolo, imposto con diverse frequenze. L'analisi della letteratura ha evidenziato che la frequenza di stimolazione normalmente applicata a costrutti ingegnerizzati posti in coltura dinamica è pari a 1 Hz [12]. Per valutare la robustezza del sistema sviluppato in termini di capacità di applicazione della frequenza di stimolazione impostata, il MeCC è stato quindi testato a differenti frequenze [57]: da quelle più basse (0.25, 0.5, 0.75 Hz) fino a quella fisiologica e (1 Hz). Il setup di stimolazione utilizzato in questi test è quello presentato nel paragrafo 4.1.1, mentre i parametri impostati nel software di M/C sono:  $P_{\max}$  pari a 420 mmHg e  $\Delta P$  di 380 mmHg. Il software di M/C riceve i valori di pressione raccolti dal sensore ed è in grado di registrarli con frequenza di campionamento 200 Hz, filtrandoli con un filtro passa-basso con frequenza di taglio pari a 5 Hz. Si è quindi deciso di eliminare questo filtro per poter confrontare il reale andamento della pressione con quello della deformazione. Per quanto riguarda la curva di deformazione circonferenziale nel tempo invece, è stata ottenuta, come descritto nel paragrafo 4.1.1, tramite l'analisi delle immagini acquisite a partire da un filmato, registrato questa volta da una videocamera Nikon Coolpix S3100 (Nikon, Giappone) e suddiviso in frame (30 fps).

Si è deciso di utilizzare una videocamera differente rispetto a quelle incorporate nei due microscopi disponibili in laboratorio (Nikon SMZ1000 e Dino-Lite AM 2011) poiché queste ultime registrano le immagini acquisite sul PC al quale sono collegate. Ciò portava ad un rallentamento del video registrato, e quindi ad uno sfasamento (non costante, quindi non risolvibile) tra la curva di deformazione del campione e quella di pressione. L'utilizzo di una videocamera *stand-alone* ha permesso di ovviare a questo problema: sebbene la qualità video presentasse una minor risoluzione, non si sono verificati rallentamenti nella registrazione essendo il sistema indipendente da PC. La frequenza di acquisizione dei frame è di 30 fps. Ovviamente si è verificato che le informazioni ricavate dalle immagini registrate col nuovo sistema di acquisizione fossero coerenti con quelle ottenute tramite l'utilizzo dei microscopi.

Le prove sono state effettuate su un unico tratto di guaina in silicone, le cui caratteristiche geometriche sono le seguenti:  $L_{\text{utile}} = 33.47$  mm,  $ID = 2.62$  mm,  $t = 0.29$  mm. Le misure sono state effettuate in maniera analoga alle precedenti ed i valori riportati sono la media di tre misurazioni.

I grafici di Figura 4.4 mostrano l'andamento del diametro normalizzato rispetto a quello iniziale (in rosso) e quello della pressione (in blu) in funzione del tempo. Per verificare che la dinamica di deformazione seguisse quella di stimolazione, i due andamenti sono stati sovrapposti eliminando l'eventuale sfasamento temporale (dovuto al fatto che i due sistemi di registrazione sono indipendenti tra loro e non è stata messa in atto alcuna tecnica di sincronizzazione).



**Figura 4.4.** Grafici rappresentanti l'andamento del diametro normalizzato rispetto a quello iniziale (in rosso) e della stimolazione in pressione (in blu) in funzione del tempo alle frequenze di 0.25, 0.5, 0.75 e 1 Hz. Per chiarezza nella rappresentazione in tutti i grafici viene mostrato solo un intervallo temporale della stimolazione totale. I parametri di stimolazione impostati sono stati  $P_{max} = 420$  mmHg,  $\Delta P = 380$  mmHg.

Come si può notare osservando i grafici mostrati in Figura 4.4, i risultati delle prove hanno dimostrato che la dinamica di deformazione della guaina in silicone segue fedelmente la dinamica di stimolazione in pressione a tutte le frequenze testate.

Il collaudo del sistema porta quindi a dire che la coltura potrebbe essere effettuata sia in condizioni fisiologiche (1 Hz), sia con valori di frequenza di stimolazione inferiori.

### 4.1.3. Test di deformazione della guaina siliconica per tempi prolungati

Le prove di deformazione della guaina siliconica in condizioni dinamiche di esercizio sono state eseguite anche mantenendo il sistema in funzionamento continuo per diversi giorni, a temperature maggiori rispetto a quella ambiente. Questo perché, una volta in esercizio, il sistema dovrà lavorare per periodi maggiori rispetto a quelli caratteristici delle prove al banco e in condizioni d'esercizio da laboratorio, quindi inserito in un ambiente (incubatore) mantenuto alla temperatura di 37°C.

Il setup utilizzato per l'esecuzione del test è quello descritto nel paragrafo 4.1.1.

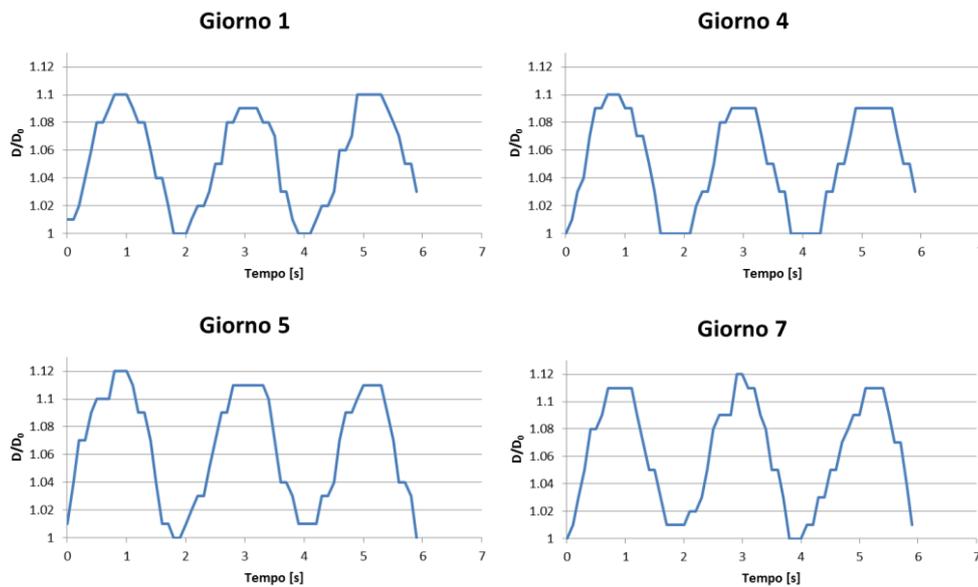
La prova è stata effettuata allocando la guaina, montata nella camera di coltura, all'interno di una stufa mantenuta per sette giorni a 37° C. In questo modo si è voluto verificare che la guaina non andasse incontro a modifiche strutturali, o meglio, a cambiamenti nella risposta in deformazione, lavorando per tempi prolungati a temperatura maggiore rispetto a quella ambiente (che è la temperatura a cui sono state svolte le prove di caratterizzazione).

I parametri impostati nel software sono stati:  $P_{max}=420$  mmHg,  $\Delta P=380$  mmHg, frequenza 0.5 Hz, numero di cicli 300000 e tempo di ricircolo 60 s. Prove sperimentali hanno evidenziato che, per applicare le elevate differenze di pressione impostate ( $\Delta P=380$  mmHg) con frequenza di 1 Hz, i rulli della pompa devono ruotare a velocità molto elevate che provocano il surriscaldamento del dispositivo stesso. Per questo motivo la fase di ricircolo, che nella coltura di strutture tubolari stimulate con deformazione ciclica circonferenziale non risulta indispensabile, viene minimizzata al solo fine di evitare un malfunzionamento della pompa.

Ogni giorno sono state effettuate registrazioni video della guaina siliconica stimolata, utilizzando un microscopio. Per problemi di ingombro nella stufa, il microscopio Nikon è stato sostituito con un microscopio digitale Dino Lite AM.2011 Series (Digital Microscope), il quale, come si era già verificato, presenta risoluzione minore rispetto all'altro dispositivo ma permette di ottenere la stessa informazione. I dati sono poi stati analizzati suddividendo i filmati in frame e ricavando la deformazione della guaina come già descritto per gli esperimenti precedenti.

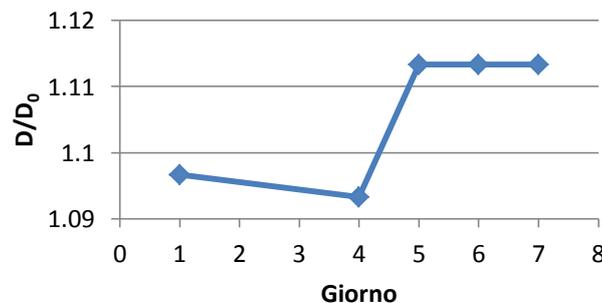
Le caratteristiche geometriche del campione testato sono:  $L_{utile}= 26$  mm,  $ID= 2.59$  mm,  $t= 0.29$  mm. Le misure sono state effettuate utilizzando un calibro e/o analizzando con software ImageJ un *ring* del campione lungo circa 1 mm fotografato al microscopio. I valori riportati sono la media di tre misurazioni.

In Figura 4.5 sono mostrati i grafici rappresentativi dei risultati ricavati dall'analisi delle immagini dell'esperimento in stufa a 37°C.



**Figura 4.5.** Grafici del diametro normalizzato in funzione del tempo per il campione di guaina in silicone sottoposto a deformazione per tempi prolungati a 37°C. Sono mostrati i risultati del primo, del quarto, del quinto e del settimo giorno.  $D$ = diametro esterno deformato,  $D_0$ = diametro esterno iniziale. Per chiarezza grafica sono mostrati solo tre picchi di stimolazione.

Dai risultati si può notare che non ci sono differenze significative tra le deformazioni misurate tra il primo e il quarto giorno, ma che la deformazione cresce dell'1-2% rispetto ai valori iniziali a partire dal quinto giorno, mantenendosi poi stabile fino alla fine della prova (Figura 4.6). Questo può essere dovuto al fatto che il materiale, sottoposto a stimolazione prolungata a temperature superiori a quella ambientale, sia diventato più cedevole, opponendo una minor resistenza alla deformazione. L'aumento di deformazione è stato comunque ritenuto ragionevolmente trascurabile e quindi i risultati dei test sono stati considerati accettabili per il collaudo del sistema. La prova ha inoltre dimostrato l'efficacia del sistema di ancoraggio, in quanto la guaina non si è mai staccata dai connettori durante tutto il periodo di esecuzione dell'esperimento



**Figura 4.6.** Grafico rappresentante il valore medio del diametro di picco normalizzato rilevato ogni giorno durante l'analisi sperimentale. Si può notare un aumento del valore ricavato tra il primo e l'ultimo giorno di stimolazione.

#### 4.1.4. Test su guaine sottoposte a sterilizzazione

Una caratteristica importante per un bioreattore è il mantenimento di un ambiente di coltura sterile. È quindi necessario che tutte le componenti del sistema di stimolazione, comprese le guaine in silicone, vengano sterilizzate prima di essere utilizzate. In particolare, le guaine impiegate in questo lavoro sono sterilizzabili tramite autoclave. Si è voluto perciò verificare che, in seguito alla sterilizzazione, le guaine non modificassero il proprio comportamento in stimolazione e quindi che il processo di sterilizzazione non provocasse irrigidimento né cedimento del materiale.

Per questo esperimento sono stati utilizzati due campioni sottoposti prima della sterilizzazione a deformazione ciclica per 5 giorni, per poter così confrontare il comportamento prima e dopo il processo di sterilizzazione in autoclave.

Le prove sono state effettuate utilizzando un setup e un protocollo di prova simili a quelli descritti nel paragrafo 4.1.3: la differenza risiede nel fatto che la prova è stata eseguita a temperatura ambiente e, per velocizzare l'esecuzione dei test, sono stati stimolati due campioni contemporaneamente, montandoli su telai differenti ma connessi in parallelo allo stesso circuito idraulico.

I parametri impostati nel software di M/C sono gli stessi della prova descritta nel paragrafo 4.1.3 ( $P_{max}$  pari a 420 mmHg e  $\Delta P$  di 380 mmHg).

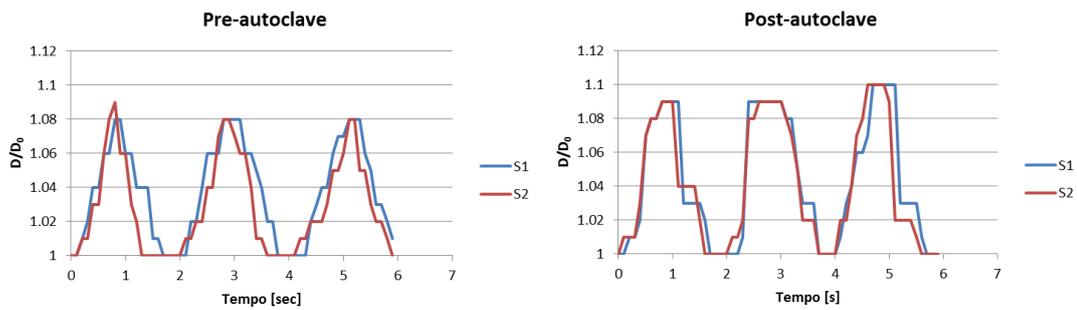
L'analisi della deformazione è stata effettuata nel medesimo modo descritto nei paragrafi precedenti.

Le dimensioni medie dei campioni testati, misurate utilizzando un calibro e il software ImageJ, sono riportate in Tabella 4.3:

	$L_{utile}$ [mm]	OD [mm]	t [mm]	ID [mm]
Media	26.53±0.11	3.27±0.11	0.29	2.49±0.05

**Tabella 4.3.** Media delle dimensioni dei campioni testati prima e dopo un ciclo di sterilizzazione in autoclave.

I grafici della Figura 4.7 mostrano i risultati delle prove effettuate prima (cioè quelli relativi al quinto giorno di stimolazione) e dopo la sterilizzazione in autoclave.



**Figura 4.7.** Grafici rappresentanti la variazione di diametro normalizzato in funzione del tempo, per esperimenti su campioni di guaina siliconica prima e dopo un ciclo di sterilizzazione in autoclave. Per chiarezza grafica sono mostrati solo tre picchi di stimolazione.

Dai grafici mostrati in Figura 4.7 si può notare come non siano avvenuti cambiamenti significativi nel comportamento delle guaine sottoposte a stimolazione, prima e dopo la fase di sterilizzazione. Inoltre la stimolazione dei due campioni di guaina siliconica in parallelo ha permesso di collaudare il sistema per la coltura multicampione. Si è infatti notato che il dispositivo può gestire più camere in parallelo e che quindi, progettando accuratamente il circuito idraulico, si può creare un sistema modulare.

In Tabella 4.4 sono riassunti tutti i test eseguiti con le guaine in silicone che hanno permesso di completare la loro caratterizzazione. Le prove statiche dei campioni non sterilizzati sono state descritte nel paragrafo 3.7.1, le prove dinamiche e dopo sterilizzazione sono invece quelle effettuate durante il collaudo del sistema di stimolazione in modalità coltura descritte nel paragrafo 4.1.

	NON STERILIZZATO		STERILIZZATO		
	Statico	Dinamico	Statico	Dinamico	
		Singolo	Duplicato	Singolo	Duplicato
<b>T AMBIENTE</b>	X (n=5)	X (n=4)	X (n=2)		X (n=2)
<b>T=37°C</b>		X (n=1)			

**Tabella 4.4.** Esperimenti eseguiti sulle guaine in silicone. Si distinguono le diverse temperature a cui sono stati effettuati i test, dividendoli tra quelli realizzati su campioni non sterilizzati e su campioni che hanno subito il processo di sterilizzazione in autoclave.

## 4.2. Esperimenti con campioni vascolari per la verifica del modello

Il MeCC è stato progettato per la coltura e la stimolazione di strutture tubulari. Data la scarsa disponibilità di costrutti biologici e le difficoltà e i costi della loro realizzazione, le prove di verifica in esercizio sono state eseguite utilizzando campioni di vasi nativi animali (quindi facilmente

reperibili), le cui proprietà erano già state indagate attraverso gli esperimenti di caratterizzazione meccanica descritti nel Capitolo 5.

Per valutare e nello stesso tempo aumentare l'efficienza del metodo di stimolazione, si è reso necessario lo sviluppo di un modello semiempirico, descritto nel paragrafo 3.7.2, che fosse in grado di predire il valore di deformazione del campione posto in coltura sulla guaina a partire dalle sue caratteristiche geometriche e meccaniche.

Per far sì che la guaina in silicone trasmetta la corretta deformazione al vaso sanguigno è necessario che ci sia una perfetta aderenza tra le due strutture. La scelta delle dimensioni della guaina, come descritto nel paragrafo 3.4, è stata finalizzata anche a questo scopo. Tuttavia il materiale biologico, presentando una notevole variabilità, non è mai caratterizzato da dimensioni standard. Per questo si è voluto validare il modello suddividendo i vasi sanguigni sulla base del loro calibro ed in particolare rispetto al diametro nominale della guaina siliconica:

- vaso sanguigno con diametro interno paragonabile a quello della guaina siliconica (ID ~ 3.1 mm) (Paragrafo 4.2.1);
- vaso sanguigno con diametro interno maggiore rispetto a quello della guaina siliconica (ID > 3.1 mm) (Paragrafo 4.2.2);
- vaso sanguigno con diametro interno minore rispetto a quello della guaina siliconica (ID < 3.1 mm) (Paragrafo 4.2.3).

Sia il collaudo del MeCC come sistema di stimolazione che fa uso della guaina in silicone che la verifica del modello, sono avvenuti montando all'interno della camera di coltura tratti di vaso ricavati da arterie coronarie e mammarie interne (IMA), entrambe di origine porcina.

Le arterie coronarie sono state estratte da cuori porcini mentre le arterie mammarie sono state reperite da un macello della provincia di Crema tramite il Dipartimento di Scienze Veterinarie per la salute, la produzione animale e la sicurezza alimentare dell'Università degli Studi di Milano.

Di questi vasi, alcuni sono stati analizzati immediatamente dopo l'estrazione, altri sono invece stati conservati in frigorifero, in PBS addizionato con antibatterico, per un massimo di 24 ore prima dell'utilizzo.

Per eseguire questi test i campioni sono stati calzati sulle guaine in silicone, con l'aiuto di pinze, e montati nel telaio portavaso, come mostrato in Figura 4.8.



**Figura 4.8.** Campione di arteria mammaria interna porcina calzato sulla guaina siliconica e montato tra i due connettori del telaio portavaso del bioreattore.

La prova è stata effettuata assemblando il sistema come descritto nel paragrafo 3.4. Per l'acquisizione delle immagini sono stati usati in contemporanea due microscopi (Nikon SMZ1000 e Dino Lite), di cui il primo posto sopra il campione e il secondo lateralmente a quest'ultimo: in questo modo è stato possibile riprendere il comportamento del vaso montato sulla guaina da due prospettive differenti. Le prove di collaudo del sistema hanno infatti dimostrato che i campioni biologici non sempre presentano una deformazione circonferenziale omogenea in tutte le direzioni: riprendendo il campione da due prospettive differenti si è riusciti ad ovviare a questo problema.

Questi test di collaudo sono stati eseguiti mantenendo il campione idratato (a bagno in soluzione fisiologica). Per una migliore acquisizione delle immagini si è scelto di inserire il telaio del bioreattore in una vaschetta in PMMA adeguatamente dimensionata. I parametri di stimolazione scelti per validare il modello sono stati:  $P_{max}=420$  mmHg,  $\Delta P=390$  mmHg e frequenza 0.5 Hz; ciascun campione è poi stato stimolato anche a pressioni superiori.

La deformazione è stata analizzata come già descritto precedentemente, ossia suddividendo i filmati registrati in singoli frame e analizzando i fotogrammi ottenuti tramite il codice Matlab o il software ImageJ. I dati sono stati poi elaborati utilizzando fogli di calcolo Microsoft Office Excel.

#### 4.2.1. Vasi nativi con diametro interno paragonabile a quello della guaina

La Tabella 4.5 mostra le caratteristiche geometriche dei quattro vasi sanguigni analizzati per validare il caso del modello in cui il diametro interno del vaso è simile a quello esterno della guaina. Le misure sono state effettuate usando un calibro e con l'aiuto di un sistema "passa/non passa". I valori riportati sono la media di tre misurazioni.

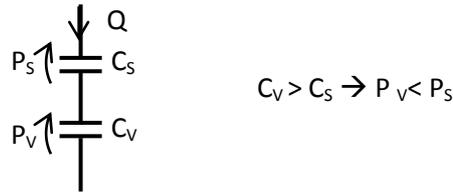
	L [mm]	t [mm]	ID [mm]	OD [mm]
Cor 1	21	0.55	3.12	4.22
Cor 2	20	0.82	3.03	4.67
Cor 3	31.95	0.75	3.08	4.58
IMA A	27.12	0.37	3.13	3.87
<b>Media</b>	25.01±5.59	0.62±0.20	3.09±0.05	4.33±0.37
<b>Guaina siliconica</b>	40	0.3	2.5	3.1

**Tabella 4.5.** Caratteristiche geometriche dei vasi sanguigni e della guaina siliconica testati durante prove di collaudo del MeCC come sistema di stimolazione. Sono state analizzate arterie coronarie porcine (Cor) e arterie mammarie interne porcine (IMA).

Come descritto nel paragrafo 3.7.2, il modello permette di determinare, teoricamente, quale sia la pressione da applicare alla guaina siliconica per ottenere una determinata deformazione del vaso, o viceversa, predire quale sia la deformazione del campione biologico che si ottiene applicando un determinato valore di pressione all'interno della guaina. Le informazioni necessarie da inserire nel modello sono le dimensioni geometriche dei campioni e le loro proprietà meccaniche: tramite la caratterizzazione meccanica dei campioni biologici (Capitolo 5), infatti, è stato possibile ottenere informazioni che correlano la pressione intraluminale dei vasi alla corrispondente variazione di diametro. Come mostrato dai risultati dei test di distensibilità che verranno riportati nel paragrafo 5.3.1, la deformazione circonferenziale dei vasi sanguigni analizzati raggiunge valori piuttosto rilevanti già a basse pressioni: basti pensare che a soli 20 mmHg, la dilatazione diametrica raggiunta dalle coronarie è del 21.5% , mentre per le IMA è pari al 20.4%.

L'evidenza sperimentale ha però dimostrato che i vasi sanguigni, una volta calzati sulla guaina e attivato il sistema di stimolazione, raggiungono deformazioni circonferenziali molto basse (dell'ordine del 5% circa, inserendo nel software una  $P_{max} = 420$  mmHg), se confrontate con quelle ottenute nei risultati dei test di distensibilità (Paragrafo 5.3.1), quindi nel caso in cui siano sottoposte direttamente a pressione. Da ciò si evince che i vasi, in questa configurazione, sono caricati con pressioni molto inferiori rispetto alla pressione trasmurale a cui è soggetta la guaina. Questo fenomeno può essere facilmente interpretato considerando l'analogo elettrico rappresentato in Figura 3.35, in cui il sistema guaina-vaso è stato rappresentato come la serie di due *compliance*. Poiché la *compliance* relativa alla guaina in silicone ( $C_s$ ) è considerevolmente

inferiore (due ordini di grandezza) rispetto a quella dei vasi sanguigni ( $C_V$ ), si evince che la pressione a carico di questi ultimi sia inferiore rispetto a quella a cui è soggetta la guaina siliconica (Figura 4.9).



**Figura 4.9.** Schema rappresentante la serie delle due *compliance*  $C_S$  e  $C_V$  che identificano rispettivamente la guaina siliconica e il vaso sanguigno calzato su di essa.

È per questo motivo che nel modello si è deciso di considerare come indice di distensibilità del vaso ( $I_{D(V)}$ ) il valore ricavato dai test di distensibilità (Paragrafo 5.3.1) calcolato nell'intervallo 0-20 mmHg (Equazione 4.1):

$$I_{D(V)} = \frac{\Delta ID / ID_0}{\Delta P} \quad (4.1)$$

dove  $\Delta P = 20$  mmHg,  $\Delta ID / ID_0 = 21.5\%$  per le coronarie e  $20.4\%$  per le IMA.

$I_{D(V)}$  risulta quindi pari a  $1.075 \times 10^{-2} \text{ mmHg}^{-1}$  per le coronarie e  $1.0195 \times 10^{-2} \text{ mmHg}^{-1}$  per le IMA.

Poiché i test sperimentali hanno dimostrato che i vasi stimolati tramite guaina non raggiungono una deformazione circonferenziale superiore al 20%, si è deciso di mantenere costante il valore di  $I_{D(V)}$ , indipendentemente dalla  $P_{\max}$  applicata nella fase di stimolazione.

Per quanto riguarda invece l'indice di distensibilità della guaina in silicone ( $I_{D(S)}$ ) questo è stato calcolato in funzione dei diversi valori di pressione applicati (Tabella 4.6).

P [mmHg]	$\Delta OD/OD_0$ %	$I_{D(S)}$ [mmHg <sup>-1</sup> x 10 <sup>-4</sup> ]
0	0	0
20	0.31	1.57
40	0.78	1.96
60	1.49	2.49
80	1.88	2.35
100	2.39	2.39
120	2.63	2.19
140	3	2.15
160	3.45	2.15
180	3.83	2.13
200	4.29	2.14
220	4.9	2.23
240	5.19	2.16
260	5.9	2.27
280	6.43	2.29
300	7.04	2.35
320	7.53	2.35
340	8.33	2.45
360	9.06	2.52
380	9.68	2.55
400	10.74	2.68
420	11.54	2.75
440	12.38	2.81

**Tabella 4.6.** Valori di  $I_{D(S)}$  in corrispondenza della pressione intraluminare calcolati risolvendo l'Equazione 4.2; i valori di variazione del diametro esterno ( $\Delta OD/OD_0$ ) sono stati ricavati dalle prove di caratterizzazione eseguite sul silicone (paragrafo 3.7.1.2).

I valori di deformazione circonferenziale ricavata utilizzando il diametro esterno ( $\Delta OD/OD_0$ ) in funzione della pressione sono stati ottenuti dalle prove di caratterizzazione della guaina descritte nel paragrafo 3.7.1, mentre il valore di  $I_{D(S)}$  è stato calcolato per ogni valore di pressione P, secondo l'Equazione 4.2:

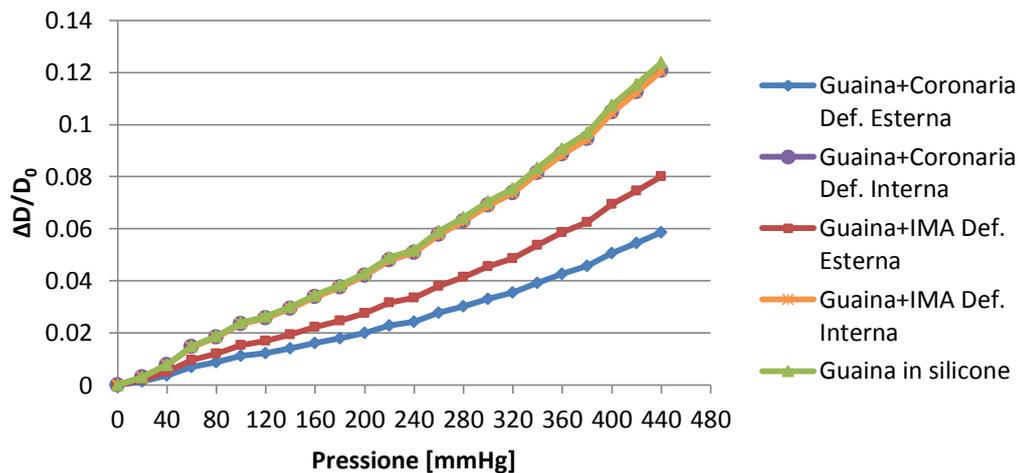
$$I_{D(S)} = \frac{\Delta OD/OD_0}{P} \quad (4.2)$$

Inserendo  $I_{D(S)}$  e  $I_{D(V)}$  nell'Equazione 3.14 per il calcolo di  $I_{Deq}$  e valutando la variazione dello spessore dei vasi è possibile calcolare la variazione del diametro esterno dei vasi calzati sulla guaina siliconica ( $\Delta OD/OD_0$ ) per ogni valore di pressione applicato, come mostrato in Tabella 4.7.

P [mmHg]	$I_{Deq}$ [mmHg <sup>-1</sup> x 10 <sup>-4</sup> ]	$\Delta ID/ID_0$ %	t [mm]	$\Delta OD/OD_0$ %
0	0	0	0.556	0
20	1.55	0.31	0.555	0.17
40	1.92	0.77	0.554	0.42
60	2.43	1.46	0.551	0.76
80	2.30	1.84	0.549	1.01
100	2.34	2.34	0.547	1.28
120	2.15	2.57	0.546	1.41
140	2.11	2.94	0.545	1.61
160	2.11	3.38	0.543	1.85
180	2.09	3.75	0.541	2.06
200	2.10	4.2	0.539	2.31
220	2.19	4.8	0.537	2.64
240	2.12	5.09	0.536	2.8
260	2.23	5.78	0.534	3.18
280	2.25	6.29	0.532	3.47
300	2.30	6.89	0.529	3.8
320	2.30	7.37	0.528	4.07
340	2.40	8.14	0.525	4.5
360	2.46	8.86	0.522	4.9
380	2.49	9.46	0.520	5.24
400	2.62	10.47	0.516	5.82
420	2.68	11.25	0.513	6.26
440	2.74	12.07	0.511	6.73

**Tabella 4.7.** Esempio di calcolo della variazione esterna del diametro di una coronaria calzata sulla guaina:  $I_{Deq}$  è stato calcolato secondo l'Equazione 3.14, la variazione di diametro interno ( $\Delta ID/ID_0$ ) è stata ricavata invertendo l'Equazione 3.13, quella dello spessore invece è stata ottenuta dall'Equazione 3.7 e quella del diametro esterno ( $\Delta OD/OD_0$ ) sommando semplicemente lo spessore al valore di diametro interno corrispondente e calcolando poi la deformazione.

Nel grafico di Figura 4.10 viene riportata la variazione del diametro esterno ( $\Delta OD/OD_0$ ) ed interno ( $\Delta ID/ID_0$ ) dei vasi (sia coronarie che IMA) calzati sulla guaina, calcolata secondo il modello teorico in funzione della pressione intraluminale applicata.



**Figura 4.10.** Grafico della variazione di diametro in funzione della pressione intraluminale applicata. I valori della sola guaina in silicone sono stati ricavati da prove di caratterizzazione descritte nel paragrafo 3.7.1. I valori del sistema con arteria coronaria sono ottenuti come media dei risultati dei tre vasi analizzati.

Nel grafico vengono messi a confronto il comportamento dell'arteria mammaria porcina e delle arterie coronarie porcine ( $n=3$ ) calzate sulla guaina con quello del solo silicone. Si può notare come le curve che rappresentano la variazione di diametro esterno dei vasi calzati sulla guaina siano meno pendenti rispetto a quella che indica la deformazione circonferenziale del solo silicone. Questo è dovuto al fatto che, la modellizzazione delle due strutture tubolari come serie di due elementi porta ad ottenere un valore di indice di distensibilità equivalente ( $I_{D_{eq}}$ ) minore rispetto a quello della sola guaina ( $I_{D(S)}$ ) e di conseguenza anche la deformazione circonferenziale totale risulta essere inferiore. Si può notare invece che la variazione del diametro interno risulta identica per i due tipi di vaso sanguigno e molto simile a quella della sola guaina siliconica. Questo dimostra che, calzando il vaso sulla guaina, la deformazione circonferenziale di quest'ultima non subisce cambiamenti rilevanti. I bassi valori della variazione del diametro esterno dei vasi sono da imputare infatti allo spessore del campione biologico che, all'aumentare del diametro interno, tende ad assottigliarsi, riducendo così la deformazione circonferenziale esterna rispetto a quella interna.

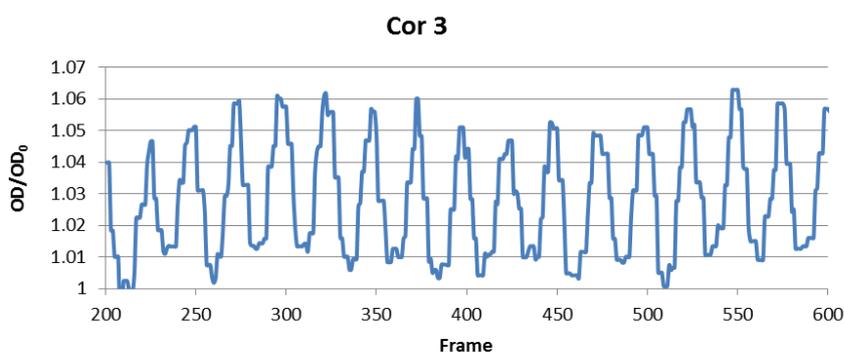
Le differenze in termini di deformazione tra arterie coronarie e IMA sono quindi da attribuire più al diverso spessore dei vasi (le IMA hanno infatti uno spessore molto inferiore rispetto a quello delle coronarie) piuttosto che alle caratteristiche meccaniche, in quanto il valore di  $I_{D(V)}$  risulta simile per entrambi i vasi.

In APPENDICE G sono riportati nel dettaglio i risultati ricavati dal modello.

### 4.2.1.1. Risultati dell'analisi sperimentale

Gli stessi campioni biologici descritti nel paragrafo 4.2.1, sono stati sottoposti a prove sperimentali che hanno permesso di verificare i valori di deformazione circonferenziale esterna stimati nel modello semiempirico. Questo tipo di esperimenti ha permesso anche di collaudare il MeCC come sistema di stimolazione che fa uso della guaina in silicone.

Il grafico di Figura 4.11 mostra, a titolo d'esempio, la dinamica di deformazione di un'arteria coronaria testata durante queste prove.



**Figura 4.11.** Grafico rappresentante il diametro esterno del campione normalizzato, in funzione del numero di frame. Per chiarezza grafica l'asse dei frame è stato ridotto ad un intervallo dell'intera stimolazione, dal frame 200 al 600.

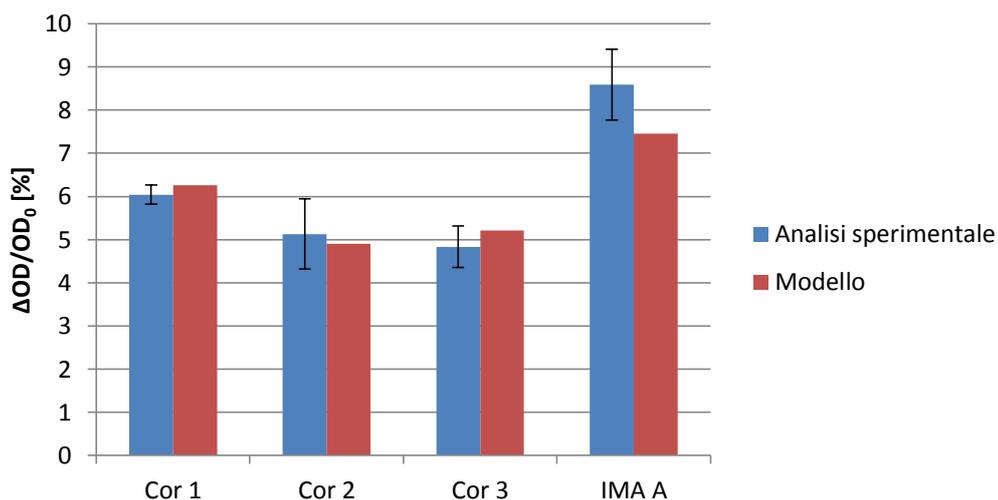
Il grafico mostra come il campione biologico, in questo caso perfettamente aderente alla guaina siliconica, segua bene la dinamica di deformazione.

In Tabella 4.8 vengono messe a confronto le deformazioni circonferenziali esterne ricavate dall'analisi sperimentale, con quelle previste dal modello, in corrispondenza di pressione intraluminale pari a 420 mmHg.

	Modello	Analisi sperimentale
<b>Cor 1</b>	6.26%	6.04±0.22%
<b>Cor 2</b>	4.90%	5.13±0.81%
<b>Cor 3</b>	5.21%	4.83±0.48%
<b>IMA A</b>	7.46%	8.59±0.82%

**Tabella 4.8.** Valori di deformazione circonferenziale esterna corrispondenti a pressione intraluminale massima di 420 mmHg ricavati con il modello sviluppato e tramite l'analisi sperimentale.

Si può notare, confrontando i risultati sperimentali con quelli analitici, come le informazioni previste dal modello corrispondano in maniera soddisfacente a quanto dimostrato dall'analisi sperimentale (Figura 4.12).



**Figura 4.12.** Istogramma rappresentante i valori di deformazione circonferenziale esterna corrispondenti a pressione intraluminale massima di 420 mmHg ricavati dall’analisi sperimentale a confronto con quelli ricavati dal modello sviluppato.

Si può quindi concludere che il modello sviluppato sia in grado di predire con sufficiente accuratezza la deformazione dei vasi calzati sulla guaina.

#### 4.2.2. Vasi nativi con diametro interno maggiore rispetto a quello della guaina siliconica

Le dimensioni dei vasi nativi testati durante queste prove spesso sono risultate non perfettamente coincidenti con quelle della guaina. È stato quindi utilizzato il modello teorico descritto nel paragrafo 3.7.2.1 e creato per prevedere la deformazione circonferenziale dei vasi sanguigni (arterie coronarie e arterie mammarie) con diametro interno di dimensione maggiore rispetto al diametro esterno nominale della guaina siliconica. I risultati del modello sono stati poi confrontati con quelli ottenuti dall’analisi sperimentale.

La Tabella 4.9 mostra le caratteristiche geometriche dei vasi sanguigni analizzati. Le misure sono state effettuate utilizzando un calibro e un puntale come sistema “passa/non passa”. I valori riportati sono la media di tre misurazioni.

	L [mm]	t [mm]	ID [mm]	OD [mm]
Cor 4	28.72	0.54	3.25	4.33
IMA B	26.61	0.34	3.19	3.87
IMA C	29.62	0.59	3.23	4.43
<b>Media</b>	28.32±1.55	0.49±0.13	3.22±0.03	4.20±0.30
<b>Guaina Siliconica</b>	40	0.3	2.5	3.1

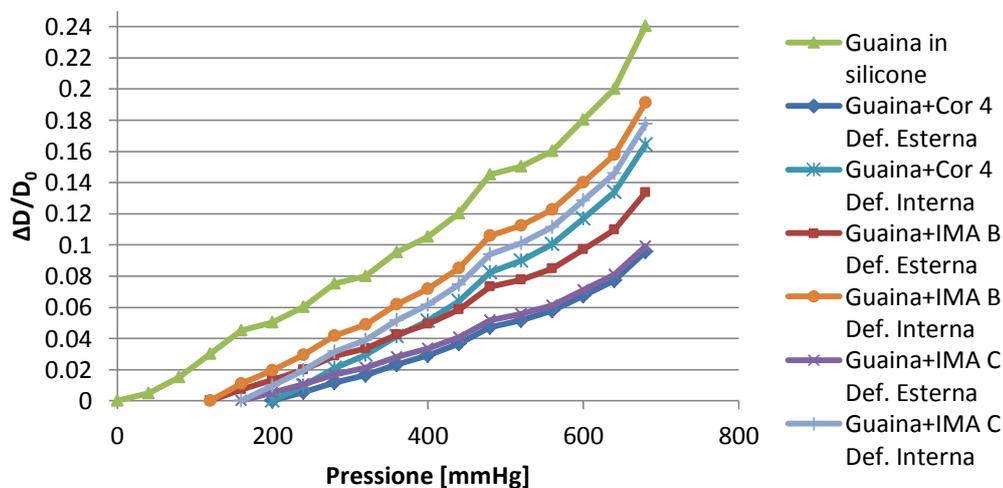
**Tabella 4.9.** Caratteristiche geometriche dei vasi sanguigni testati durante prove di collaudo del sistema di coltura mediante guaina siliconica. I vasi sanguigni analizzati presentano dimensioni maggiori rispetto alla guaina siliconica (dimensioni nominali riportate nell'ultima riga in tabella).

In questo caso, come descritto nel paragrafo 3.7.2.1, i dati geometrici del vaso, inseriti nel modello, permettono di ricavare la pressione con cui dilatare la guaina siliconica per far sì che la parete interna del campione biologico e quella della struttura in silicone aderiscano perfettamente. In particolare, per i vasi riportati in Tabella 4.9, la deformazione circonferenziale iniziale da imporre alla guaina (calcolabile secondo l'Equazione 3.15) e quindi la P corrispondente che permette a quest'ultima di raggiungere la dimensione desiderata, sono riportate in Tabella 4.10.

	Cor 4	IMA B	IMA C
<b>Def. Guaina [%]</b>	4.8	2.9	4.2
<b>P corrispondente [mmHg]</b>	200	120	160

**Tabella 4.10.** Valori di deformazione circonferenziale e corrispondente pressione da applicare alla guaina per raggiungere perfetta aderenza con i vasi Cor4, IMA B e IMA C.

La deformazione circonferenziale del sistema ricavata in funzione della pressione intraluminale applicata è riportata nel grafico di Figura 4.13.



**Figura 4.13.** Grafico della variazione di diametro in funzione della pressione intraluminale applicata. I valori della sola guaina in silicone sono stati ricavati da prove di deformazione fino a rottura eseguite durante la caratterizzazione.  $\Delta D$ = variazione diametro,  $D_0$ = diametro iniziale.

Il diverso *offset* tra le curve è dovuto alla pressione che bisogna imporre alla guaina per raggiungere la dimensione di diametro interno del vaso (Tabella 4.10); la  $P_{min}$  da applicare sarà pari proprio a questo valore di *offset* e quindi la  $P_{max}$  da impostare nel software sarà uguale alla somma tra  $P_{min}$  e il  $\Delta P$  necessario per dilatare il vaso del valore desiderato.

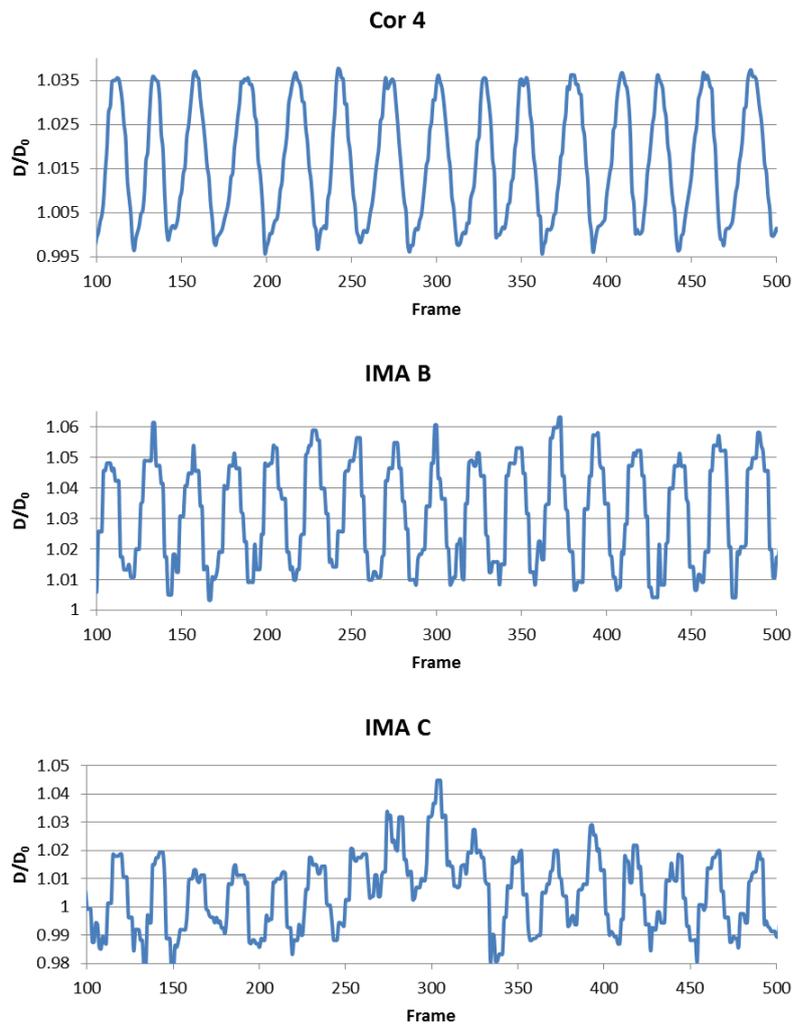
L'andamento delle curve che rappresentano la deformazione circonferenziale esterna del sistema guaina più vaso mostrato in Figura 4.13 assume una pendenza minore rispetto alla curva della sola guaina: ciò è dovuto, come detto nel paragrafo 4.2.1, alla modellizzazione dei due elementi come la serie di due *compliance*. Come per il caso precedente (paragrafo 4.2.1), le curve rappresentanti la variazione del diametro interno hanno invece una pendenza maggiore rispetto a quelle riferite alla variazione del diametro esterno a causa dell'assottigliamento dello spessore. Va aggiunto che i risultati degli esperimenti effettuati portando a fallimento la guaina siliconica (paragrafo 3.7.1.2), hanno permesso di determinare anche il diametro massimo dei campioni stimolabili utilizzando una guaina con le dimensioni scelte in questo lavoro. Dalla Figura 4.13 si evince che i campioni Cor 4 e IMA C potrebbero raggiungere una deformazione esterna del 10% solo dilatando la guaina siliconica di un valore superiore al suo limite massimo di deformazione circonferenziale, oltre il quale si avrebbe fallimento: campioni con diametro interno uguale o superiore a 3.23 mm non riuscirebbero quindi ad essere deformati uniformemente fino al valore di deformazione fisiologico (10%). Potrebbero comunque essere stimolati in un *range* di deformazione più ridotto, dipendente dal loro diametro interno.

In APPENDICE G sono riportati nel dettaglio i risultati ottenuti dal modello.

#### 4.2.2.1. Risultati dell'analisi sperimentale

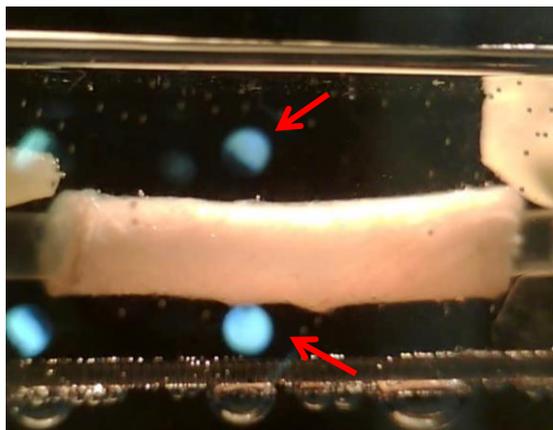
Gli stessi campioni biologici descritti nel paragrafo 4.2.2 sono stati sottoposti a prove sperimentali che hanno permesso la verifica del modello sviluppato anche per vasi il cui diametro risulta superiore rispetto alle dimensioni della guaina.

I grafici di Figura 4.14 mostrano la dinamica di deformazione dei vasi testati.



**Figura 4.14.** Grafici rappresentanti il diametro esterno del campione normalizzato, in funzione del numero di frame. Per chiarezza grafica l'asse dei frame è stato ridotto a solo un intervallo dell'intera stimolazione, dal frame 100 al 500.

Anche in questo caso la dinamica di deformazione segue abbastanza bene la stimolazione. Si può notare che il grafico della IMA C risulta molto irregolare rispetto agli altri: questo potrebbe essere dovuto all'effetto della luce che introduce nei frame analizzati dei pixel bianchi aggiuntivi, causando errori durante la misurazione del diametro tramite il codice Matlab. Il filmato analizzato in questo specifico caso infatti, è stato effettuato con microscopio digitale Dino Lite, in quanto l'analisi della registrazione eseguita col microscopio Nikon mostrava un andamento di deformazione non uniforme. Come si può vedere dalla Figura 4.15, il microscopio digitale crea dei riflessi luminosi sulla parete della vasca in plexiglass e questo potrebbe aver inficiato l'analisi delle immagini effettuata tramite il codice Matlab.



**Figura 4.15.** Foto del campione biologico IMA C durante la prova di deformazione con il sistema di coltura. Si nota la presenza dei riflessi luminosi provocati dal microscopio digitale.

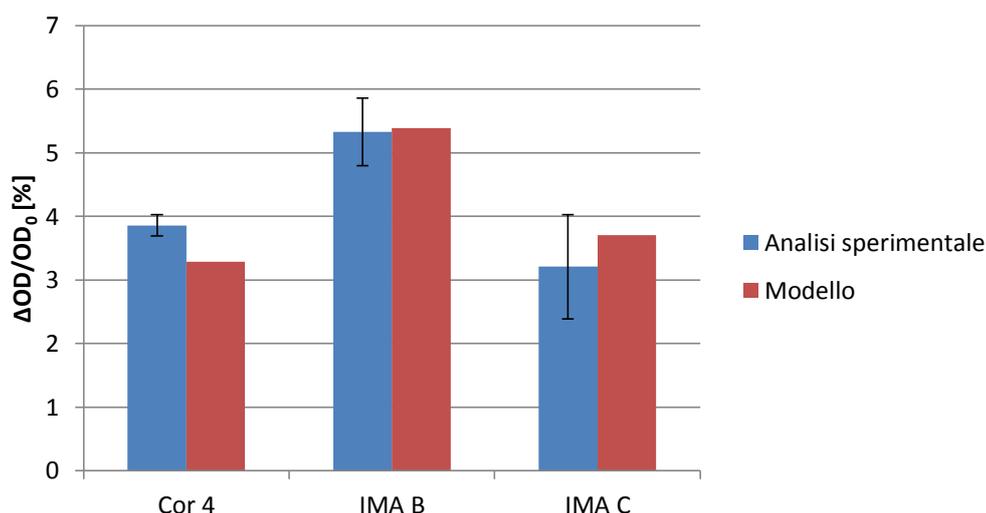
La variazione di diametro però rimane pressochè costante durante tutta la prova, ossia dell'ordine del 3.5%.

In Tabella 4.11 vengono confrontate le deformazioni circonferenziali esterne ricavate dall'analisi sperimentale con quelle previste dal modello, applicando al sistema una pressione intraluminale pari a 420 mmHg.

	<b>Modello</b>	<b>Analisi sperimentale</b>
<b>Cor 4</b>	3.29%	3.86±0.17%
<b>IMA B</b>	5.39%	5.33±0.53%
<b>IMA C</b>	3.71%	3.21±0.82%

**Tabella 4.11.** Valori di deformazione circonferenziale corrispondenti a pressione intraluminale massima di 420 mmHg ricavati dall'analisi sperimentale a confronto con quelli ricavati dal modello.

Il confronto dei dati analitici con quelli ricavati sperimentalmente consente di affermare che le informazioni ottenute tramite l'analisi sperimentale verificano in maniera accettabile quelle predette con il modello anche per vasi sanguigni di dimensioni maggiori rispetto alla guaina (Figura 4.16).



**Figura 4.16.** Istogramma rappresentante i valori di deformazione circonferenziale esterna corrispondenti a pressione intraluminale massima di 420 mmHg ricavati dall’analisi sperimentale a confronto con quelli ricavati dal modello sviluppato.

### 4.2.3. Vasi nativi con diametro interno minore rispetto a quello della guaina siliconica

L’obiettivo delle prove descritte in questo paragrafo è stato quello di determinare la deformazione circonferenziale di vasi nativi calzati sulla guaina siliconica che presentavano un calibro inferiore rispetto a quello nominale della guaina stessa.

È stato reperito un unico campione biologico con le dimensioni richieste, quindi il modello è stato utilizzato per prevedere il comportamento di una sola arteria coronaria.

La Tabella 4.12 mostra le caratteristiche geometriche del vaso in esame, prima e dopo essere stato calzato sulla guaina in silicone. Questo perché, come descritto nel paragrafo 3.7.2.1, è necessario inserire all’interno del modello sviluppato sia le dimensioni a riposo, che quelle dilatate, misurate con il campione biologico montato sul silicone. Le misure sono state effettuate, anche in questo caso, utilizzando un calibro e un sistema “passa/non passa”. I valori riportati sono la media di tre misurazioni.

Cor 5	L [mm]	OD [mm]	t [mm]	ID [mm]
<b>A riposo</b>	30.19	4.01	0.72	2.58
<b>Dilatato</b>	30.19	4.39	0.65	3.09

**Tabella 4.12.** Caratteristiche geometriche dell’arteria coronaria (Cor 5) testata durante prove di collaudo del sistema di coltura con metodo della guaina siliconica: il vaso sanguigno in questo caso presenta dimensioni inferiori rispetto alla guaina stessa. Sono riportate sia le dimensioni a riposo, che quelle misurate una volta calzato il campione biologico sulla guaina in silicone (Dilatato).

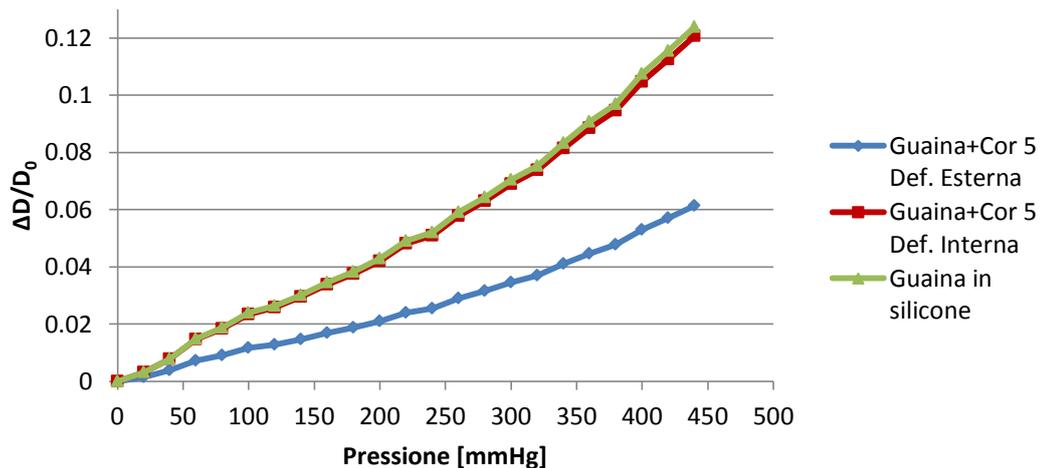
Come si può notare osservando i valori riportati in Tabella 4.12, già semplicemente calzando il vaso sulla guaina siliconica si produce una dilatazione del campione biologico, dovuta al fatto che l'elemento in silicone tende a ritornare nella sua configurazione a riposo. Si può notare che, tenendo conto della deformazione dello spessore, il vaso sanguigno passa da un diametro di 2.58 mm a 3.09 mm, che è pari quasi alle dimensioni nominali esterne della guaina (3.10 mm).

Come descritto nel paragrafo 3.7.2.1, in questo caso, in base al valore di deformazione circonferenziale a cui è sottoposto il vaso sanguigno una volta calzato sopra la guaina in silicone, verrà scelto il valore dell'indice di distensibilità da inserire all'interno del modello. L'arteria coronaria (Cor 5) usata in questo esperimento si deforma di un valore pari circa al 20%, infatti

$$\varepsilon(\%) = \frac{ID-ID_0}{ID_0} \times 100 = \frac{3.09-2.58}{2.58} \times 100 = 19.8\% \quad (4.3)$$

Confrontando questi valori, con la deformazione circonferenziale ricavata dai test di distensibilità per l'arteria coronaria (descritti nel Capitolo 5), si può notare come il valore dell'indice  $I_{D(V)}$  da inserire nel modello sia ancora pari a quello ricavato tra 0 e 20 mmHg, cioè  $1.075 \times 10^{-2} \text{ mmHg}^{-1}$ .

Una volta verificato questo parametro, inserendo tutti i dati nel modello sviluppato, è possibile ricavare la deformazione circonferenziale del campione biologico in corrispondenza della pressione applicata al sistema. Le variazioni del diametro esterno ed interno del vaso, ricavate in funzione della pressione intraluminare applicata al sistema, sono riportate nel grafico di Figura 4.17.



**Figura 4.17.** Grafico della variazione di diametro in funzione della pressione intraluminare applicata al sistema. I valori della sola guaina in silicone sono stati ricavati da prove di deformazione eseguite durante la caratterizzazione.

Il comportamento è molto simile a quello dei campioni descritti nel paragrafo 4.2.1: questo è dovuto proprio al fatto che l'elemento in silicone, nonostante il campione biologico abbia

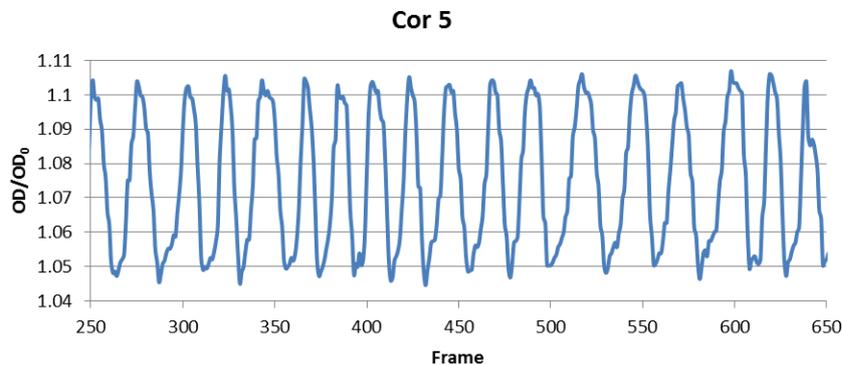
dimensioni ridotte rispetto ad esso, riesce a deformare il vaso sanguigno già prima di mettere in esercizio il sistema di coltura, ritornando alle proprie dimensioni nominali e obbligando il vaso a seguirlo. Anche in questo caso la pendenza della curva che rappresenta la variazione del diametro esterno del sistema guaina-arteria coronaria, è minore rispetto al caso della variazione del diametro interno e a quello del solo elemento in silicone.

In APPENDICE G sono riportati nel dettaglio i risultati ottenuti dal modello.

#### 4.2.3.1. Risultati dell'analisi sperimentale

La prova sperimentale effettuata con il campione Cor 5 ha permesso di verificare il modello sviluppato per i vasi con diametro inferiore rispetto a quello della guaina.

Il grafico di Figura 4.18 mostra la dinamica di deformazione per il vaso testato.

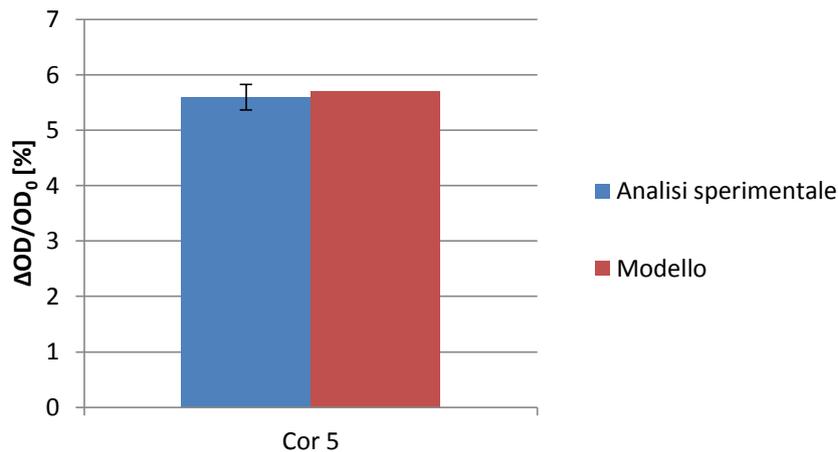


**Figura 4.18.** Grafico rappresentativo dell'andamento del diametro esterno del campione normalizzato, in funzione del numero di frame. Per chiarezza grafica l'asse dei frame è stato ridotto ad un intervallo dell'intera stimolazione, dal frame 250 al 650.

La dinamica di deformazione del vaso segue, anche in questo caso, quella di stimolazione. L'asse delle ordinate risulta traslato rispetto al valore 1, ma l'intervallo di deformazione appare abbastanza costante. Lo spostamento dei valori sull'asse delle ordinate potrebbe essere dovuto ad artifici luminosi causati dall'utilizzo del microscopio Dino Lite, come è stato descritto precedentemente.

Il risultato ottenuto dall'analisi sperimentale è stato confrontato con la deformazione circonferenziale esterna ricavata dal modello, entrambi corrispondenti a pressione intraluminale di 420 mmHg: nel primo caso si è ottenuta una deformazione circonferenziale del vaso pari al 5.7%, nel secondo del  $5.6 \pm 0.23\%$ .

Si può quindi notare un'ottima correlazione tra i risultati sperimentali e quelli ricavati analiticamente (Figura 4.19).



**Figura 4.19.** Istogramma rappresentante i valori di deformazione circonferenziale esterna corrispondenti a pressione intraluminale massima di 420 mmHg ricavati dall'analisi sperimentale a confronto con quelli ricavati dal modello sviluppato.

Purtroppo in questo caso la numerosità dei campioni è pari solamente a uno ma, vista la buona corrispondenza del modello anche nei casi precedentemente descritti, si può ragionevolmente credere che il modello predica bene anche il comportamento dei vasi con calibro inferiore rispetto a quello della guaina.

Dai risultati riportati in questi paragrafi si può concludere che il modello sviluppato è in grado di predire la deformazione circonferenziale esterna dei vasi calzati sulla guaina e sottoposti a stimolazione ciclica. È quindi sufficiente conoscere le caratteristiche geometriche del campione biologico e l'indice di distensibilità a bassi *range* pressori per prevedere quali siano i valori di pressione da impostare nel software per stimolare il campione con il valore di deformazione desiderato. Va però ricordato che il modello è stato validato solo per i risultati inerenti alla variazione del diametro esterno; la fase di verifica è stata infatti effettuata attraverso l'analisi di immagini che non hanno permesso di valutare anche la variazione di diametro interno.

Per quanto riguarda il collaudo del sistema, le prove effettuate hanno dimostrato che il sistema di coltura nella modalità che fa uso della guaina siliconica è perfettamente in grado di stimolare i campioni biologici con una deformazione circonferenziale ciclica.

Per quanto concerne i valori di dilatazione diametrale esterna ottenuti, le prove a 420 mmHg, eseguite in particolar modo per validare il modello analitico, non hanno mai portato ad una deformazione del campione biologico pari o superiore al 10%. Si è quindi deciso di stimolare i

campioni biologici descritti negli esperimenti dei paragrafi precedenti, con valori di pressione massima superiori.

La Tabella 4.13 mostra, per ciascun campione, le prove eseguite e il valore della deformazione circonferenziale esterna ricavato.

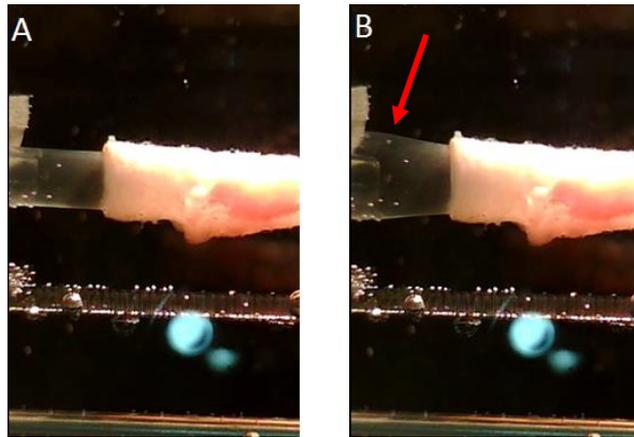
Vaso nativo	ID [mm]	$P_{max}=420$ mmHg $\Delta P=390$ mmHg	$P_{max}=500$ mmHg $\Delta P=450$ mmHg	$P_{max}=580$ mmHg $\Delta P=500$ mmHg	$P_{max}=620$ mmHg $\Delta P=550$ mmHg	$P_{max}=650$ mmHg $\Delta P=590$ mmHg
Cor 1	3.12	6%	7.6%			
Cor 2	3.03	5.1%	6.3%			
Cor 3	3.08	4.8%	7.2%	8.5%		
Cor 4	3.25	3.9%	4.8%	8.2%	10.1%	
Cor 5	2.57	5.6%	9.5%	12.2%		
IMA A	3.13	8.6%	8.5%	9.5%	12.6%	13.3%
IMA B	3.19	5.3%		11.3%		
IMA C	3.25	3.2%	6.7%			

**Tabella 4.13.** Tabella riassuntiva contenente i diametri interni (ID) e i valori di deformazione circonferenziale esterna ricavati da esperimenti effettuati con il sistema di coltura con guaina siliconica, su campioni di vaso sanguigno nativo porcino (arteria coronaria e arteria mammaria interna). I campioni biologici sono stati testati a diversi valori di pressione massima.

Queste prove di collaudo effettuate a pressioni superiori a 420 mmHg hanno consentito di raggiungere e superare il 10% di deformazione circonferenziale esterna, permettendo di validare la capacità del sistema di coltura di stimolare, tramite l'utilizzo della guaina siliconica, i campioni biologici fino al valore di deformazione suggerito dalla letteratura. Si tenga in considerazione che i valori riportati in Tabella 4.13 sono stati ottenuti analizzando la dilatazione del diametro esterno del campione, che, come spiegato precedentemente, risulta inferiore rispetto a quella riferita al diametro interno. Poiché in letteratura non viene specificato a quale dei due diametri ci si riferisca, è ragionevole credere che la deformazione circonferenziale del 10% debba essere applicata alla regione del vaso sanguigno contenente le SMCs. Nel caso di vasi nativi, queste cellule saranno maggiormente contenute nello strato intermedio (tunica media) della parete, quindi la deformazione circonferenziale andrà valutata considerando un diametro medio tra quello interno e quello esterno. Nel caso di costrutti ingegnerizzati, invece, le SMCs potranno essere seminate all'esterno dello *scaffold*, nel lume interno oppure inglobate nello spessore della parete, quindi la deformazione circonferenziale verrà valutata in corrispondenza dello strato in cui tali cellule vengono disposte.

Si è inoltre ulteriormente verificato durante queste prove come la deformazione della guaina, superati i valori pressori di 620-650 mmHg, apparisse visivamente non uniforme. Come si può notare dall'immagine in Figura 4.20, superati i valori di pressione definiti "limite" nel paragrafo

3.7.1.2, la guaina siliconica comincia a deformarsi maggiormente ai bordi, in prossimità dei connettori.



**Figura 4.20.** Particolare della zona in prossimità del connettore fotografato durante la stimolazione di un campione biologico calzato su guaina siliconica a pressioni basse (A) e a pressioni corrispondenti al valore limite di deformazione della guaina (B). La freccia indica la zona in cui si ha deformazione non uniforme.

Per evitare che questo fenomeno si verifichi a pressioni inferiori rispetto a quelle limite, è necessario che la guaina in silicone presenti una lunghezza utile circa uguale a quella del campione che viene montato su di essa. Nel caso in cui il campione risultasse molto più corto rispetto alla guaina, infatti, quest'ultima tenderebbe ad allargarsi maggiormente nelle zone che offrono minore resistenza alla deformazione, quindi quelle in cui non è presente il campione.

## Capitolo 5

# Collaudo del modulo per la caratterizzazione e prove di valutazione funzionale con campioni vascolari

Il collaudo della modalità di caratterizzazione meccanica del sistema è stato eseguito allo scopo di verificare l'affidabilità del circuito realizzato e la capacità del sistema di controllo di svolgere effettivamente le funzioni richieste. I test di collaudo sono stati svolti attraverso l'esecuzione di esperimenti di *burst pressure*, atti a valutare la pressione massima che il campione è in grado di sopportare, effettuati sia su vasi nativi (arterie mammarie interne porcine) che su costrutti ingegnerizzati.

Una volta collaudato, il sistema è stato utilizzato per effettuare prove preliminari di *burst pressure* (Paragrafo 5.2) su vasi nativi porcini.

I campioni biologici testati sono stati ricavati da arterie coronarie estratte da cuori porcini e arterie mammarie interne porcine (IMA) reperite da un macello della provincia di Crema tramite il Dipartimento di Scienze Veterinarie per la salute, la produzione animale e la sicurezza alimentare dell'Università degli Studi di Milano.

La maggior parte dei campioni sono stati analizzati subito dopo l'estrazione, una minoranza è stata invece conservata in frigorifero, in PBS addizionato con antibatterico, per un massimo di 24 ore.

I valori di *burst pressure* ricavati dalle prove sono stati successivamente verificati effettuando test di trazione uniassiale ad anello (*ring test*) sui vasi in esame (Paragrafo 5.2.1).

Sui vasi porcini sono inoltre state eseguite prove di distensibilità (Paragrafo 5.3), i cui risultati sono stati necessari per la validazione del modello semiempirico descritto nel paragrafo 3.7.2.

Questi test sui vasi nativi sono stati svolti presso il  $\mu$ BSLab, in condizioni di non sterilità, ad eccezione dei *ring test* che sono stati eseguiti presso il Laboratorio di Meccanica delle Strutture Biologiche (LaBS) del Politecnico di Milano e presso il Laboratorio di Anatomia Umana dell'Università degli studi del Piemonte orientale "Amedeo Avogadro" di Novara.

Il sistema è stato inoltre messo in esercizio per la coltura in sola perfusione di costrutti ingegnerizzati a base di collagene e SMCs, realizzati presso il Laboratorio di Anatomia Umana di Novara (Paragrafo 5.4).

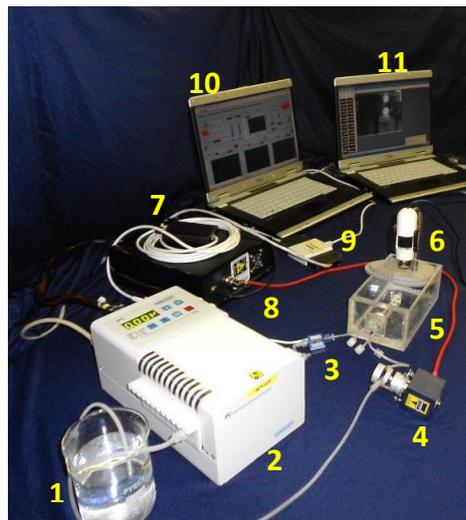
## 5.1. Collaudo del MeCC come sistema di caratterizzazione

Il collaudo del sistema di caratterizzazione meccanica è stato effettuato sottoponendo arterie coronarie porcine ad esperimenti di pressurizzazione fino a rottura (o *burst pressure*, BP) per verificare la tenuta idraulica del sistema e l'efficacia del metodo di ancoraggio utilizzato, anche a pressioni elevate. Inoltre sono stati eseguiti dei test di collaudo effettuando prove di BP su arterie mammarie interne porcine atte a valutare la corretta portata con cui eseguire la prova.

Infine, per collaudare il MeCC anche come sistema per la caratterizzazione di costrutti ingegnerizzati, è stato eseguito un esperimento di BP su un TEBV realizzato presso il Laboratorio di Anatomia Umana di Novara.

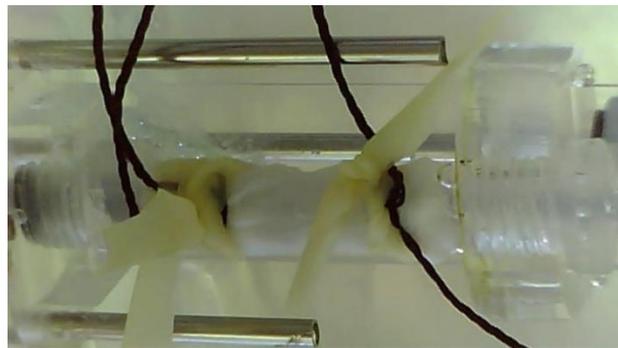
Per eseguire i test di collaudo, il set-up allestito è stato quello descritto nel paragrafo 3.5. Esso si compone di una pompa che preleva il fluido da una riserva e lo infonde nel campione, montato sul telaio portavaso posto all'interno della camera in plexiglass; il circuito idraulico a valle del campione viene mantenuto occluso per mezzo dell'elettrovalvola. La tubistica è la stessa descritta nel paragrafo 3.5, ad eccezione del tubo a valle della pompa che viene sostituito con un componente di diametro interno maggiore e lunghezza inferiore (ID 3.2 mm, spessore 0.8 mm e lunghezza 15 cm).

In Figura 5.1 è mostrata una fotografia del sistema.



**Figura 5.1.** Setup sperimentale per test di *burst pressure*. 1-Riserva. 2-Pompa roller. 3-Sensore di pressione. 4-Elettrovalvola. 5-Bioreattore inserito nella camera in plexiglass. 6-Microscopio digitale. 7-Amplificatore. 8-Centralina di alimentazione. 9-Scheda di acquisizione. 10-PC per l'esecuzione del software di controllo (C-SO). 11-PC per l'acquisizione delle immagini del microscopio digitale.

Per quanto riguarda l'ancoraggio del campione al telaio, questa procedura è stata inizialmente eseguita utilizzando semplicemente del filo di sutura in seta misura 0 (seta, 680, Johnson&Johnson). La tenuta con solo questo materiale non è risultata però sufficiente poiché durante gli esperimenti si sono verificati trafileamenti di liquido in prossimità dei connettori. Si è quindi cercato un materiale più elastico in grado di seguire la deformazione del campione durante la prova e contemporaneamente capace di bloccare stabilmente il vaso sui connettori. La scelta è ricaduta su lacci in lattice (Penrose Tubing X-Ray Opaque, Kendall Argyle). In aggiunta a questo materiale elastico, per rendere più solido l'accoppiamento tra campione e connettore, è stata anche utilizzata della colla a presa rapida (Super Attack, Loctite) e del filo di seta (in sostituzione a quello di sutura). Una fotografia di un campione biologico montato sui connettori del telaio portavaso del bioreattore è mostrata in Figura 5.2.



**Figura 5.2.** Fotografia di un campione biologico montato nella struttura portavaso del bioreattore, prima dell'esecuzione della prova di *burst pressure*.

### 5.1.1. Collaudo con arterie mammarie interne porcine

Il test per la valutazione della BP è stato eseguito infondendo nel campione (tratto di IMA porcina) soluzione fisiologica colorata con inchiostro di china nero. Una volta assemblato il circuito e calibrato il sensore di pressione (come descritto in APPENDICE B), è stato possibile passare all'esecuzione della prova. Questa è stata effettuata montando il campione sul telaio portavaso (e ancorandolo secondo la modalità descritta nel paragrafo 5.1) e inserendo il bioreattore in una vaschetta in plexiglass, appositamente dimensionata, riempita anch'essa con soluzione fisiologica a 37°C. Questo perché i tessuti testati sono di origine biologica, quindi è necessario mantenerli idratati durante l'esecuzione dell'esperimento per evitare un irrigidimento della struttura. Il telaio contenente il campione biologico è stato quindi posto sotto la lente di un microscopio digitale (Dino Lite AM 2011 Series, Digital Microscope) (Figura 5.3), che permette la cattura di immagini video dell'esperimento. Il segnale del sensore di pressione è stato controllato e registrato tramite il sistema di M/C.



**Figura 5.3.** Microscopio digitale Dino Lite AM 2011 Series (Digital Microscope).

Gli esperimenti sono stati effettuati utilizzando il software di M/C (C-SO) nella modalità manuale. I parametri impostati nel software sono stati i seguenti:

- pressione massima pari a 3000 mmHg;
- frequenza di acquisizione del segnale di pressione (ACQ Frequency) pari a 50 Hz.

I primi esperimenti sono stati condotti a differenti portate di infusione, pari a 0.5, 1, 4 e 8 ml/min (portata limite della pompa peristaltica con il tubo sottopompa scelto, il cui diametro interno è pari a 2.79 mm). Questo è stato fatto per valutare se la portata di infusione del campione avesse o meno effetti sul valore di pressione a rottura registrato. Trattandosi di campioni biologici e quindi caratterizzati da un comportamento viscoelastico, si è infatti ritenuto che la velocità di esecuzione della prova potesse influenzare la risposta della struttura.

Durante le prove, il campione, infuso con la portata di fluido prestabilita, si è gonfiato fino al verificarsi di una lacerazione della parete. È stato possibile accertare la rottura del campione sia osservando la rottura macroscopica attraverso le immagini acquisite dal microscopio digitale, sia notando la progressiva diminuzione dei valori di pressione visualizzati a video e registrati tramite il software. Durante le prove, infatti, i valori dei volumi erogati dalla pompa e i valori di pressione misurati dal sensore vengono acquisiti e registrati dal sistema di M/C e trascritti in un file di testo. Questi sono stati poi rielaborati utilizzando un foglio elettronico di calcolo Microsoft Office Excel. Per i dettagli dell'esecuzione della prova si rimanda al protocollo descritto nell'APPENDICE B.

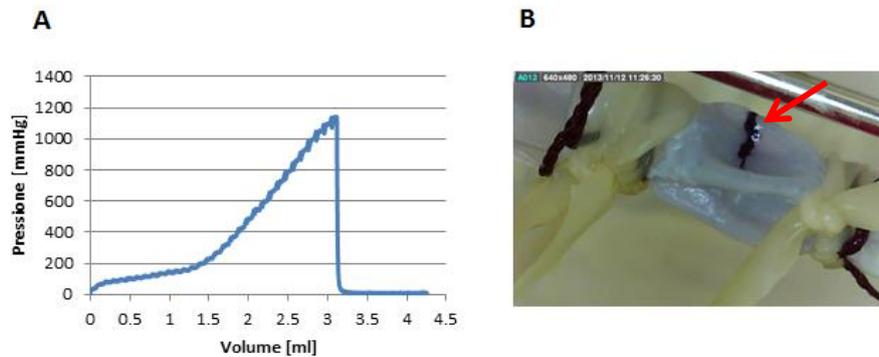
#### **5.1.1.1 Risultati delle prove con IMA**

Sono stati eseguiti esperimenti su 12 campioni, estratti da arterie mammarie provenienti da 5 esemplari porcini diversi. Le loro caratteristiche geometriche sono riportate in Tabella 5.1. Le misure sono state effettuate con un calibro e con l'ausilio di un sistema "passa/non passa". Le dimensioni riportate sono la media di tre misurazioni.

Campione	ID [mm]	L <sub>utile</sub> [mm]	Spessore [mm]	Volume [ml]
A1	4.44	19.70	0.52	0.30
A2	5.90	11.21	0.61	0.31
A3	5.85	12.87	0.56	0.35
A4	6.86	11.76	0.72	0.44
A5	7.18	15.73	0.65	0.64
B1	5.34	10.28	0.85	0.23
B2	6.52	10.22	0.85	0.34
C1	4.91	13.00	0.57	0.25
C2	4.89	9.95	0.63	0.19
D1	5.40	13.98	0.62	0.32
D2	5.12	13.13	0.62	0.27
E1	4.52	30.04	0.71	0.48
<b>Media</b>	<b>5.58±0.9</b>	<b>14.32±5.66</b>	<b>0.66±0.11</b>	<b>0.34±0.12</b>

**Tabella 5.1.** Caratteristiche geometriche dei campioni di arteria mammaria porcina testati con prove di *burst pressure*. Ogni vaso è stato suddiviso in più tratti. Nell’ultima riga della tabella sono riportati i valori medi. Si può notare un’elevata variabilità dimensionale anche per tratti provenienti dallo stesso campione.

In Figura 5.4 A è mostrato un esempio dell’andamento della pressione in corrispondenza dei valori di volume erogato durante un esperimento.



**Figura 5.4.** (A) Grafico volume-pressione dei valori ricavati durante la prova di BP per l’arteria mammaria E1. (B) Fotografia rappresentante la lacerazione di un campione di arteria mammaria interna porcina sottoposto a prova di BP. La lacerazione (tratto nero ben visibile grazie alla presenza di inchiostro nel liquido infuso) risulta perpendicolare all’asse del vaso.

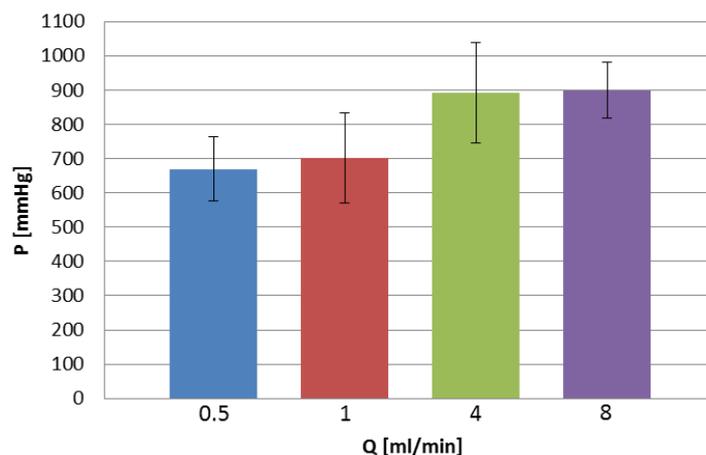
L’andamento della curva rappresentata nel grafico dimostra la rottura del vaso, infatti, una volta raggiunto il valore di pressione massimo, questa torna bruscamente a zero. La verifica dell’avvenuta lacerazione può essere effettuata anche visivamente (Figura 5.4 B).

La portata con cui la prova è stata effettuata e il valore di pressione a rottura ottenuto sono riportati invece nella Tabella 5.2.

Campione	Q [ml/min]	BP [mmHg]
A1	0.5	736
A2	1	609
A3	4	651
A4	4	1002
A5	8	814
B1	0.5	603
B2	8	976
C1	4	802
C2	8	908
D1	1	795
D2	4	866
E1	4	1142
<b>Media</b>		<b>825±165</b>

**Tabella 5.2.** Valori di portata con cui è stata effettuata la prova e valore di pressione a rottura corrispondente.

Il valore medio di pressione a rottura ricavato sui 12 tratti testati è pari a  $825\pm 165$  mmHg e risulta piuttosto basso rispetto a quanto riportato in letteratura per IMA umane ( $3196\pm 1264$  mmHg [58]). La motivazione può risiedere nel fatto che le arterie mammarie porcine testate avessero subito qualche danneggiamento, probabilmente durante l'estrazione, tale da causare un brusco peggioramento delle caratteristiche meccaniche.



**Figura 5.5.** Istogramma rappresentante i valori medi di pressione a rottura al variare della portata d'esercizio.

Per quanto riguarda la portata, osservando la Figura 5.5, si può notare come l'aumento e la diminuzione di questo valore influiscano, anche se non notevolmente, sui risultati ottenuti. Con portate comprese tra 0.5 e 1 ml/min, infatti, il valore medio di BP non varia significativamente ( $669\pm 94$  mmHg e  $702\pm 131$  mmHg rispettivamente), mentre passando a portate più elevate (4 e 8 ml/min), l'incremento dei valori di BP risulta più evidente (rispettivamente  $892\pm 146$  mmHg e

899±81 mmHg). Probabilmente la differenza è dovuta al fatto che, infondendo il campione a basse portate (0.5-1 ml/min), il fluido ha la possibilità di fuoriuscire dalle pareti del vaso (che risultano molto permeabili) prima che quest'ultimo arrivi a rottura. In seguito a questi esperimenti, si è perciò deciso di effettuare le prove con un valore di portata non troppo basso, per evitare il verificarsi del fenomeno sopradescritto, e al tempo stesso nemmeno troppo elevato, per dare alle fibre del materiale biologico il tempo di adattarsi alla deformazione. È stata quindi scelta una portata di erogazione della pompa di 4 ml/min che risulta essere anche in linea con quanto riscontrato in letteratura [32, 36, 59-61].

### 5.1.2. Collaudo con vasi ingegnerizzati

È stato inoltre eseguito un esperimento di BP che ha permesso di collaudare il MeCC come sistema di caratterizzazione anche per costrutti ingegnerizzati, le cui caratteristiche risultano differenti rispetto ai vasi nativi.

In particolare la prova è stata effettuata su un unico costrutto ibrido (collagene addizionato con HELP (*Human Elastin-Like Protein*)) non soggetto a stimolazione meccanica dinamica (il protocollo per la realizzazione del campione biologico verrà descritto brevemente nel paragrafo 5.4.1). Dopo essere stato mantenuto in coltura statica per 4 settimane all'interno di una piastra di Petri, il campione è stato montato all'interno del bioreattore (come descritto nel paragrafo 5.1). Le dimensioni del costrutto testato sono: ID = 4.57 mm, t = 0.97 mm, L = 16.23 mm,  $L_{\text{utile}} = 13.9$  mm. La prova è stata eseguita secondo la modalità descritta nel paragrafo 5.1.1, infondendo PBS colorato con inchiostro di china nel lume del campione con portata pari a 4 ml/min. Per i dettagli nel protocollo di prova si faccia riferimento all'APPENDICE B.

Il valore di BP ricavato è 14.7 mmHg, inferiore rispetto a quanto riportato in letteratura (80.7±17.1 mmHg per costrutti in collagene+ELP [32]), ma questo esula dallo scopo del lavoro di tesi. Il risultato ottenuto è però stato verificato stimando il valore di *burst pressure* a partire dai risultati delle prove di trazione effettuate su questo tipo di costrutto (come verrà descritto nel paragrafo 5.2.1). Tre campioni di materiale (ID=3.96±0.04 mm, w=3 mm, t=1.24±0.08 mm) sono stati analizzati tramite *ring test* seguendo il protocollo che verrà descritto nel paragrafo 5.2.1: il valore di pressione a rottura calcolato (14.3±1.3 mmHg) è risultato confrontabile con quello ottenuto nelle prove di BP.

## 5.2 Test preliminari di *burst pressure* su vasi nativi porcini

Una volta collaudato il MeCC come sistema di caratterizzazione di vasi (nativi ed ingegnerizzati), è stato possibile utilizzarlo per l'esecuzione di prove di BP su vasi nativi.

I test di BP permettono di valutare la pressione massima all'interno del lume del vaso che il campione è in grado di sopportare prima di arrivare a rottura. Si è scelto di sviluppare un sistema in grado di eseguire questo tipo di test perché, nel caso di un costrutto ingegnerizzato, tale parametro è indicativo del fatto che il TEBV abbia o meno caratteristiche strutturali comparabili con quelle dei vasi nativi.

I vasi nativi testati sono stati arterie coronarie porcine. Le arterie coronarie hanno il compito di portare nutrimento a tutto il tessuto cardiaco e quindi presentano una notevole quantità di diramazioni. Questi rami collaterali hanno rappresentato un grosso ostacolo nell'esecuzione della prova di *burst pressure*, in quanto è risultato necessario suturarli adeguatamente per poter evitare la fuoriuscita di liquido attraverso gli stessi. Bisogna inoltre tenere presente che durante l'estrazione dei vasi dal tessuto, procedura che avviene per mezzo di un bisturi, possono essere creati anche microdanni alla parete, non visibili a occhio nudo, che potrebbero inficiare la riuscita della prova. La sutura di questi rami collaterali e/o microfori è stata eseguita utilizzando del filo di sutura misura 4/0 (Polyglactin 910, VICRYL, Johnson&Johnson) con l'aiuto di un porta-aghi.

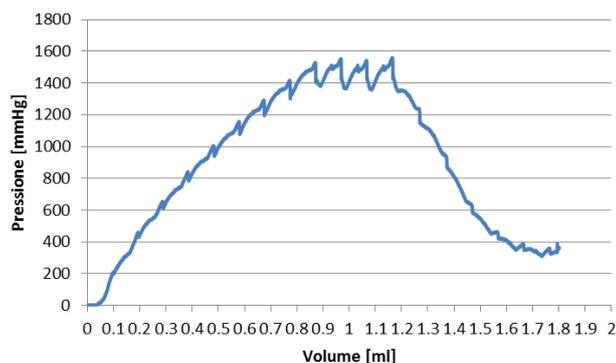
In una prima campagna sperimentale sono state caratterizzate arterie provenienti da 4 diversi cuori porcini. In Tabella 5.3 sono riportate le caratteristiche geometriche dei campioni. Le misure sono state effettuate ancora una volta utilizzando un calibro ed un sistema "passa/non passa". Le dimensioni riportate sono la media di tre misurazioni.

Campione	ID [mm]	L <sub>utile</sub> [mm]	Spessore [mm]	Volume [ml]
A1	1.10	10.00	0.50	0.01
B1	1.80	10.14	0.42	0.03
B2	2.38	10.99	0.50	0.05
C1	2.45	10.64	0.55	0.05
D1	3.24	12.41	0.74	0.10
D2	3.14	12.74	0.62	0.10
<b>Media</b>	2.35±0.81	11.15±1.16	0.56±0.11	0.06±0.04

**Tabella 5.3.** Caratteristiche geometriche dei campioni di arteria coronaria porcina testati durante la prima campagna sperimentale di prove di *burst pressure*. Nell'ultima riga della tabella sono riportati i valori medi.

Si notano dimensioni minori rispetto ai campioni di arteria mammaria descritti precedentemente (Paragrafo 5.1.1.1).

In Figura 5.6 è possibile visualizzare un esempio dell'andamento della pressione in funzione del volume erogato durante uno degli esperimenti.



**Figura 5.6.** Grafico volume-pressione ottenuto elaborando i valori ricavati dall’esperimento di *burst pressure* per un tratto di arteria coronaria porcina. Si può notare che la pressione raggiunge un valore massimo e poi inizia a decrescere lentamente.

Il grafico mostra che la pressione, una volta raggiunto il valore massimo, decresce lentamente fino ad un valore non nullo. Questo è indice del fatto che il fallimento del campione è dovuto a una piccola lacerazione nella parete o al cedimento della sutura di un collaterale.

La Tabella 5.4 riporta i valori di pressione a rottura ricavati durante le prove.

Campione	BP [mmHg]
A1	1396
B1	986
B2	1507
C1	1594
D1	1070
D2	1560
<b>Media</b>	<b>1352±261</b>

**Tabella 5.4.** Valore di pressione a rottura ricavata durante la prima campagna sperimentale di prove di *burst pressure* con arterie coronarie porcine.

Il valor medio di pressione a rottura ottenuto sui 6 tratti di arteria coronaria testati risulta pari a 1352±261 mmHg. Il confronto di questo risultato con la letteratura è stato fatto utilizzando i dati pubblicati nel lavoro di *L’Heureux et al.* [62] per vasi sanguigni che, sottoposti a test di infusione fino a rottura, falliscono proprio a causa della presenza di collaterali o difetti in parete. Il valore di BP per questi vasi corrisponde a 2031±872 mmHg.

I valori di BP ottenuti risultano quindi confrontabili con i risultati pubblicati da *L’Heureux*, ma, poiché questi valori si riferiscono a vasi che presentano difetti, è stata eseguita una seconda campagna sperimentale ponendo maggior attenzione nella procedura di estrazione, nella selezione dei tratti di vaso da testare (cercando di scegliere segmenti privi di difetti, almeno ad occhio nudo) e nella sutura dei collaterali.

In questa campagna sono stati testati segmenti di arterie coronarie provenienti da tre cuori porcini. In Tabella 5.5 vengono riportate le caratteristiche geometriche dei vasi analizzati. Anche in questo caso le misure sono state effettuate utilizzando un calibro e con l'aiuto di un sistema "passa/non passa". Le dimensioni riportate sono la media di tre misurazioni.

Campione	ID [mm]	Lut [mm]	Spessore [mm]	V [ml]
E1	3.54	7.86	0.54	0.08
F1	2.79	8.55	0.36	0.05
F2	2.97	9.60	0.51	0.07
F3	2.79	8.55	0.36	0.05
G1	4.55	14.27	0.63	0.23
G2	3.846	15.05	0.38	0.17
G3	3.697	9.20	0.32	0.10
<b>Media</b>	<b>3.45±0.7</b>	<b>10.44±3.17</b>	<b>0.44±0.11</b>	<b>0.11±0.07</b>

**Tabella 5.5.** Caratteristiche geometriche dei tratti di arteria coronaria testati con esperimenti di *burst pressure* effettuati nella seconda campagna sperimentale.

Anche per i campioni biologici testati in questa seconda campagna sperimentale la maggior parte dei fallimenti è da attribuire al cedimento delle suture o a microdifetti di parete, ma i valori raggiunti risultano comunque essere maggiormente in linea con il valore di letteratura riportato precedentemente (Tabella 5.6).

Campione	BP [mmHg]
E1	2549
F1	2004
F2	1971
F3	2004
G1	1605
G2	1568
G3	2223
<b>Media</b>	<b>1989±340</b>

**Tabella 5.6.** Valori di pressione a rottura ricavati dagli esperimenti effettuati nella seconda campagna sperimentale con arterie coronarie porcine.

### 5.2.1. Test di trazione uniassiale ad anello (*ring test*)

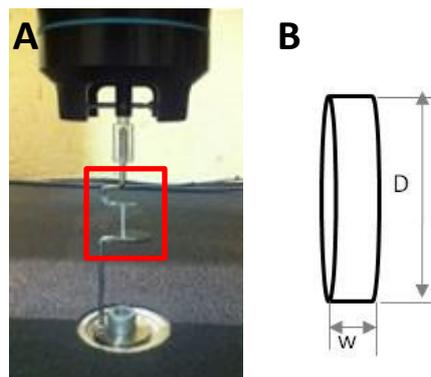
Il MeCC è quindi risultato un valido strumento per effettuare test di BP, la cui esecuzione è utile, come descritto in precedenza, per caratterizzare qualsiasi tipo di vaso sanguigno, che sia ingegnerizzato oppure nativo. I test di *burst pressure* implicano però la distruzione dell'intero campione. Nell'ottica di voler caratterizzare i vasi sanguigni a disposizione evitando di effettuare prove distruttive che necessitano di tutto il campione, sono state eseguite delle prove di trazione che permettessero di stimare il valore di pressione a rottura e che consentissero

contemporaneamente di preservare una quantità maggiore di materiale, utile per eseguire altri tipi di analisi.

Inoltre, poichè i valori di BP ottenuti dalle prove eseguite sulle IMA sono risultati inferiori rispetto a quanto pubblicato in letteratura, sono stati eseguiti i test di trazione uniaassiale per effettuare una verifica dei valori di pressione a rottura ottenuti.

I risultati ricavati dalle prove ad anello permettono infatti di stimare il valore di BP dei campioni testati attraverso l'utilizzo della legge di Laplace; questa legge viene utilizzata in fisiologia per descrivere il comportamento di condotti a parete sottile in pressione, come i vasi sanguigni, e risulta valida nell'ipotesi di geometria cilindrica e sforzo distribuito uniformemente in tutta la parete. I valori di pressione a rottura così ottenuti sono stati quindi confrontati con quelli ricavati dalle prove di BP.

I test di trazione ad anello sono stati effettuati attraverso l'utilizzo di una macchina per prove di trazione (Instron 5564 - Instron Corp., Canton, MA, USA) dotata di una cella di carico da 2.5 N, disponibile presso il laboratorio di Anatomia Umana dell'Università degli studi del Piemonte orientale "Amedeo Avogadro" di Novara, e di una macchina per prove di trazione (Synergie 200 H MTS, Minneapolis, MN, USA ) con cella di carico da 100 N, disponibile presso il Laboratorio di Meccanica delle Strutture Biologiche (LaBS) del Politecnico di Milano.



**Figura 5.7.** (A) Afferraggi in acciaio inossidabile progettati per la macchina per prove di trazione. Nell'immagine viene evidenziato il campione di materiale biologico montato durante l'esecuzione della prova. (B) Schema del campione analizzato nelle prove di trazione. Sono indicate le misure da inserire nel software di controllo della macchina: il diametro interno (D) e la lunghezza (w).

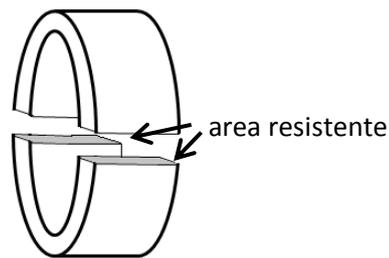
Le prove sono state eseguite su 7 tratti di arterie da cui sono stati ottenuti 21 ring. Prima dell'inizio dell'esperimento sono stati misurati i diametri interni (D) e lo spessore (t) dei campioni tramite un calibro e un sistema "passa/non passa". Successivamente ogni *ring* è stato montato su degli afferraggi in acciaio inossidabile, progettati e costruiti in base alle dimensioni dei campioni da testare. Essi sono stati collegati al macchinario tramite appositi adattatori realizzati in PMMA e

acciaio inox (Fig. 5.7 A). La prova è stata condotta imponendo una velocità di spostamento della traversa pari a 1 mm/min. La prova è stata interrotta non appena si è verificata la rottura del campione. Durante l'esecuzione del test il software di controllo della macchina permette di registrare la forza di trazione esercitata sul campione e lo spostamento della traversa nel tempo (dal quale è possibile ricavare la deformazione circonferenziale del campione come variazione rispetto alla lunghezza iniziale).

I valori di forza misurati dalla macchina da test sono stati convertiti in sforzo agente sul campione ( $\sigma_{\theta}$ ) tramite l'Equazione 5.1

$$\sigma_{\theta} = \frac{F}{A_{res}} = \frac{F}{2wt} \quad (5.1)$$

in cui  $F$  è la forza misurata e  $A_{res}$  la superficie resistente, indicata in grigio in Figura 5.8 ( $w$  e  $t$  già definiti).



**Figura 5.8.** Schema di un *ring* sezionato nel quale viene indicata l'area resistente.

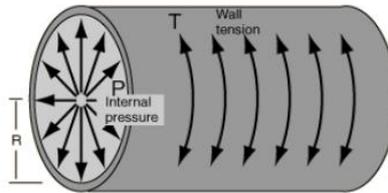
Il valore di sforzo massimo (UTS, *Ultimate Tensile Stress*) rappresenta il valore di sforzo sostenuto dal campione nel momento della rottura e corrisponde quindi al valore di carico massimo che il campione è in grado di sostenere durante la prova prima di giungere a fallimento.

Tenendo conto che la formula di Laplace afferma che la tensione ( $T$ ) agente sulle pareti di un condotto è pari al prodotto della pressione interna ( $P$ ) per il raggio ( $r$ ) del condotto stesso (Figura 5.9)

$$T = \sigma t = Pr \quad (5.2)$$

e descrivendo il valore di sforzo tramite l'Equazione 5.1, è possibile ottenere il valore di pressione come

$$P = \frac{\sigma t}{r} = \frac{F}{wID} \quad (5.3)$$



**Figura 5.9.** Condotto cilindrico sottoposto a una pressione interna P che genera delle forze di trazione sulla parete (T).

Inserendo all'interno dell'equazione 5.3 il valore di forza massima ( $F_{max}$ ) o l'UTS è quindi possibile ricavare una stima del valore di *burst pressure*:

$$BP = \frac{2 \cdot UTS \cdot t}{ID} = \frac{F_{max}}{w \cdot ID} \quad (5.4)$$

Per un approfondimento si faccia riferimento all'APPENDICE H.

L'analisi dei dati ottenuti viene poi svolta utilizzando un foglio elettronico di calcolo Microsoft Office Excel.

### 5.2.1.1 Risultati dei test di trazione uniaassiale ad anello

Per l'esecuzione di questo tipo di test sono state svolte due campagne sperimentali.

Nella prima sono state testate cinque IMA, da cui sono stati estratti undici *ring*. Le loro caratteristiche geometriche sono riportate in Tabella 5.7. Le misure sono state effettuate utilizzando un calibro e un sistema "passa/non passa". Le dimensioni riportate sono la media di tre misurazioni.

Campione	ID [mm]	t [mm]	OD [mm]	w [mm]
A1	6.69	0.45	7.59	2.07
A2	6.9	0.47	7.84	2.24
A3	6.84	0.41	7.66	2.05
B1	5.98	0.39	6.76	2.3
B2	6.37	0.4	7.17	2.15
C1	7.15	0.51	8.17	2.2
C2	7.64	0.46	8.56	2.19
D1	5.6	0.39	6.38	2.27
D2	4.7	0.49	5.68	2.12
<b>Media</b>	<b>6.43±0.89</b>	<b>0.44±0.05</b>	<b>7.31±0.91</b>	<b>2.18±0.09</b>

**Tabella 5.7.** Dimensioni dei campioni di IMA testati durante la prima campagna sperimentale; ID= diametro interno, t= spessore, OD= diametro esterno, w= lunghezza.

Di seguito viene riportata la forza massima a rottura ( $F_{max}$ ) registrata dalla macchina per ogni campione (Tabella 5.8), con i corrispettivi valori di BP stimata mediante l'Equazione 5.4.

Campione	F <sub>max</sub> [N]	BP stimata [mmHg]
A1	1.58	854
A2	2.31	1120
A3	1.45	778
B1	2.47	1348
B2	1.8	987
C1	2.09	995
C2	1.17	525
D1	0.5	294
D2	0.64	485
<b>Media</b>	<b>1.56±0.69</b>	<b>821±337</b>

**Tabella 5.8.** Risultati dei *ring test* effettuati durante la prima campagna sperimentale: F<sub>max</sub> è la forza massima raggiunta dal campione e BP la *burst pressure* stimata tramite l'Equazione 5.4.

Le IMA testate in questa prima campagna sperimentale provengono dagli stessi campioni da cui sono stati ricavati i tratti utilizzati nelle prove di BP descritte nel paragrafo 5.1.1. È possibile quindi confrontare i valori di pressione a rottura stimati dalle prove di trazione ad anello con quelli ottenuti sperimentalmente (Paragrafo 5.1.1), come mostrato in Tabella 5.9.

Vaso	BP TEST		RING TEST	
	n	BP media [mmHg]	n	BP media [mmHg]
A	5	762±155	3	917±180
B	2	790±264	2	1167±255
C	2	855±75	2	760±332
D	2	831±50	2	390±135
<b>Media</b>		<b>809±41</b>		<b>808±325</b>

**Tabella 5.9.** Confronto tra i valori medi di BP ricavati dalle prove di pressione a rottura e quelli stimati tramite la legge di Laplace. n= numero di campioni testati per ogni vaso.

Osservando la Tabella 5.9 si può notare una maggiore variabilità nei dati ricavati dai test di trazione. Tuttavia il valore di BP medio ricavato sperimentalmente e quello medio stimato dai *ring test* risultano confrontabili. I risultati ottenuti in entrambi i casi sono però inferiori rispetto a quanto riportato in letteratura [58]: si è perciò ritenuto che le scarse proprietà meccaniche di questi vasi fossero imputabili ad errori commessi durante la loro fase di estrazione e pulizia e non a errori compiuti durante l'esecuzione dell'esperimento. Gli esperimenti di trazione uniassiale ad anello effettuati durante la prima campagna sperimentale sono comunque serviti per validare i risultati delle prove di *burst pressure* ottenuti utilizzando il MeCC.

È stata successivamente eseguita una seconda campagna sperimentale per cercare di ottenere valori di BP maggiormente confrontabili con la letteratura. In questo caso sono state testate tre

IMA, per un totale di dodici campioni, le cui misure sono riportate in Tabella 5.10. Le dimensioni dei campioni sono state misurate tramite un calibro e con l'aiuto di un sistema "passa/non passa".

Campione	ID [mm]	t [mm]	OD [mm]	w [mm]
A1	4.62	0.46	8.76	7.49
A2	4.68	0.45	9.00	6.27
A3	4.09	0.52	9.60	6.85
A4	4.12	0.51	10.60	3.47
B1	3.55	0.71	12.70	6.29
B2	5.37	0.64	12.89	5.81
B3	4.41	0.67	11.75	6.37
B4	5.21	0.73	10.96	2.72
C1	5.01	0.36	7.87	6.08
C2	4.72	0.40	7.95	4.65
C3	4.65	0.70	8.08	6.20
C4	4.90	0.38	4.90	2.34
<b>Media</b>	<b>4.61±0.51</b>	<b>0.53±0.14</b>	<b>9.59±2.32</b>	<b>5.38±1.68</b>

**Tabella 5.10.** Dimensioni dei campioni di IMA testati durante la seconda campagna sperimentale di prove di trazione uniassiale ad anello.

Di seguito vengono riportati i valori di  $F_{max}$  ricavati per ciascun campione e i corrispettivi valori di BP stimati (Tabella 5.11).

Campione	$F_{max}$ [N]	BP stimata [mmHg]
A1	13.40	2903
A2	8.24	2105
A3	13.76	3683
A4	6.42	3369
B1	13.83	4652
B2	3.94	948
B3	8.18	2181
B4	2.52	1336
C1	7.60	1869
C2	8.72	2980
C3	14.78	3848
C4	3.15	2062
<b>Media</b>	<b>8.71±4.36</b>	<b>2661±1099</b>

**Tabella 5.11.** Risultati ottenuti dai ring test effettuati durante la seconda campagna sperimentale: sono mostrati in tabella il valore di forza massima ( $F_{max}$ ) e il corrispondente valore di BP stimata tramite l'Equazione 5.4.

I valori di BP ricavati in questa seconda campagna sperimentale sono risultati confrontabili con quelli pubblicati in letteratura [58]. Si è perciò ritenuto che i valori di BP inferiori ricavati durante la prima campagna sperimentale fossero effettivamente causati da un danneggiamento delle IMA durante la fase di estrazione e pulizia.

### 5.3 Test di distensibilità

Per ottenere i valori dell'indice di distensibilità ( $I_D$ ) da inserire nel modello semiempirico descritto nel paragrafo 3.7.2, sono stati eseguiti esperimenti su vasi nativi porcini, utilizzando lo stesso set up descritto nel paragrafo 3.7.1.

Le prove sono state effettuate inserendo il bioreattore nella camera in plexiglass usata per i test di *burst pressure*, riempita di soluzione fisiologica a 37°C. Prima dell'esecuzione dell'esperimento, i campioni sono stati sottoposti a tre cicli di preconditionamento tra 0 e 120 mmHg (con incrementi di 20 mmHg). A causa della sua viscoelasticità infatti, il tessuto vascolare non ritorna alla propria configurazione iniziale dopo la rimozione di una sollecitazione esterna (in questo caso la pressione imposta), ma rimane in parte deformato. È necessario quindi caricare e scaricare il campione ciclicamente per poter ridurre il più possibile la differenza di deformazione iniziale tra un ciclo e l'altro prima di procedere alla prova.

Dopo i cicli di preconditionamento, è stato dato inizio alla prova di valutazione della distensibilità. Questa è stata eseguita incrementando manualmente (tramite la pompetta di un manometro) a step di 20 mmHg la pressione intraluminale del vaso nel *range* 0-440 mmHg e valutando lo spostamento del menisco di fluido ( $\Delta x$ ) all'interno della cannula rigida graduata.

A partire dal valore di  $\Delta x$  è stata quindi ricavata la variazione di volume  $\Delta V$  del vaso. Durante questi test è stato necessario utilizzare una cannula con diametro differente rispetto a quella impiegata nelle prove di caratterizzazione delle guaine siliconiche, perché diverso è il comportamento elastico dei due materiali testati, e quindi diversa è la quantità di volume necessaria per effettuare il test. La calibrazione della nuova cannula, eseguita inserendo 1 ml di fluido e valutando lo spostamento avvenuto, ha permesso di ricavare quindi un fattore di conversione pari a:

$$F = \frac{\Delta x}{\Delta V} = \frac{99.5 \text{ mm}}{1 \text{ ml}} \quad (5.5)$$

Successivamente, come descritto precedentemente nel paragrafo 3.7.1.1, al variare della pressione intraluminale è stato ottenuto l'incremento di volume all'interno del vaso:

$$\Delta V = \frac{\Delta x}{F} \quad (5.6)$$

Da questo valore, sapendo che

$$\Delta V = V - V_0 = \pi L \frac{ID^2}{4} - \pi L \frac{ID_0^2}{4} = \pi L \frac{(ID^2 - ID_0^2)}{4} \quad (5.7)$$

dove  $V$  e  $ID$  rappresentano rispettivamente il volume e il diametro interno in corrispondenza di un certo valore di pressione  $P$ , mentre  $V_0$  e  $ID_0$  rappresentano il volume e il diametro interno a

riposo, cioè corrispondenti ad una pressione intraluminale nulla, è possibile ricavare il valore del diametro interno ad ogni step pressorio

$$ID = \sqrt{\frac{4\Delta V}{\pi L} + ID_0^2} \quad (5.8)$$

Una volta ottenuto il valore del diametro al variare della pressione P imposta, è possibile calcolare l'indice di distensibilità utilizzando l'Equazione 5.9:

$$I_D = \frac{ID_2 - ID_1}{P_2 - P_1} \quad [mmHg^{-1}] \quad (5.9)$$

in cui i pedici 1 e 2 indicano la correlazione tra le pressioni e i diametri corrispondenti.

In questo modo è possibile ottenere un valore di  $I_D$  normalizzato rispetto al diametro iniziale e quindi indipendente dalla specifica geometria del campione in esame.

### 5.3.1. Risultati dei test di distensibilità

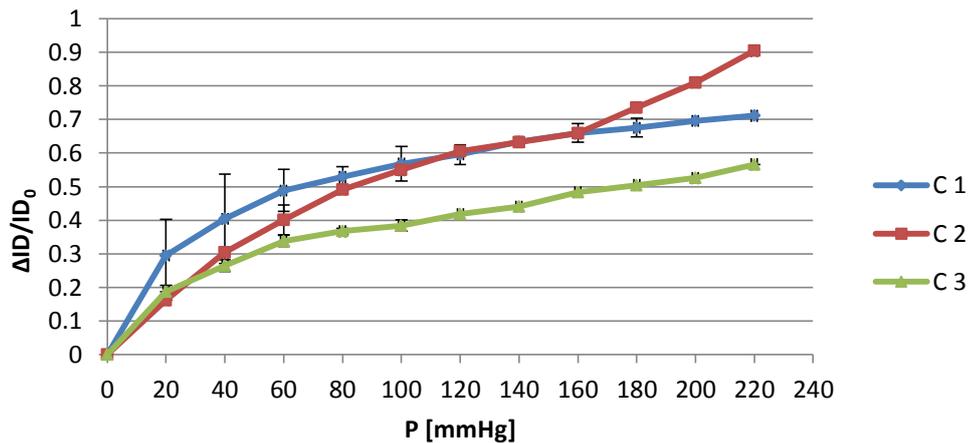
In queste prove sono state testate tre arterie coronarie e quattro IMA, tutte di origine porcina. Le misure sono state effettuate attraverso l'utilizzo di un calibro e con l'aiuto di un sistema "passa/non passa".

In Tabella 5.12 sono riportate le dimensioni (corrispondenti alla media di tre misurazioni effettuate) dei campioni di arteria coronaria in esame e il numero di prove (n) effettuate su ciascuno di essi.

	$L_{utile}$ [mm]	ID [mm]	t [mm]	OD [mm]	$V_0$ interno [ml]	n
C 1	15.53	3.08	1.27	5.63	0.09	3
C 2	8.63	2.88	0.83	4.55	0.06	2
C 3	14.62	3.69	0.53	4.74	0.16	2
<b>Media</b>	<b>12.93±3.75</b>	<b>3.22±0.42</b>	<b>0.88±0.37</b>	<b>4.97±0.58</b>	<b>0.10±0.05</b>	

**Tabella 5.12.** Dimensioni dei campioni di arteria coronaria porcina testati con prove di distensibilità.

In Figura 5.10 sono invece mostrati i risultati ottenuti in termini di variazione di diametro interno normalizzato rispetto a quello iniziale. I valori dell'indice di distensibilità (calcolato secondo l'Equazione 5.9) di ciascun campione sono riportati in APPENDICE I.



**Figura 5.10.** Grafico dei risultati dei test di distensibilità effettuati sulle coronarie ed espressi in termini di variazione di diametro interno normalizzato rispetto al diametro iniziale ( $\Delta ID =$  variazione diametro interno,  $ID_0 =$  diametro interno iniziale). Le curve rappresentano la media dei risultati ottenuti in ogni singola prova sui campioni.

Nel grafico i risultati sono riportati fino a una P pari a 220 mmHg. Solo il campione C1 è stato infatti caratterizzato fino a 440 mmHg come da protocollo, mentre la prova con gli altri due campioni è stata interrotta a 220 mmHg (per C2) e 280 mmHg (per C3) a causa della fuoriuscita del liquido infuso dai rami collaterali presenti sulla parete. Come per gli esperimenti di *burst pressure*, con questo tipo di vaso sanguigno sono state eseguite delle suture intorno ai collaterali (paragrafo 5.2) che hanno ceduto alle pressioni prima descritte, portando a termine l'esperimento prima di raggiungere il valore di pressione massimo definito dal protocollo. Per lo stesso motivo il numero delle prove effettuate su C2 e C3 ( $n=2$ ) è inferiore rispetto a quello dei test eseguiti su C1 ( $n=3$ ).

Per quanto riguarda le IMA, invece, sono stati testati quattro campioni le cui dimensioni sono riportate in Tabella 5.13:

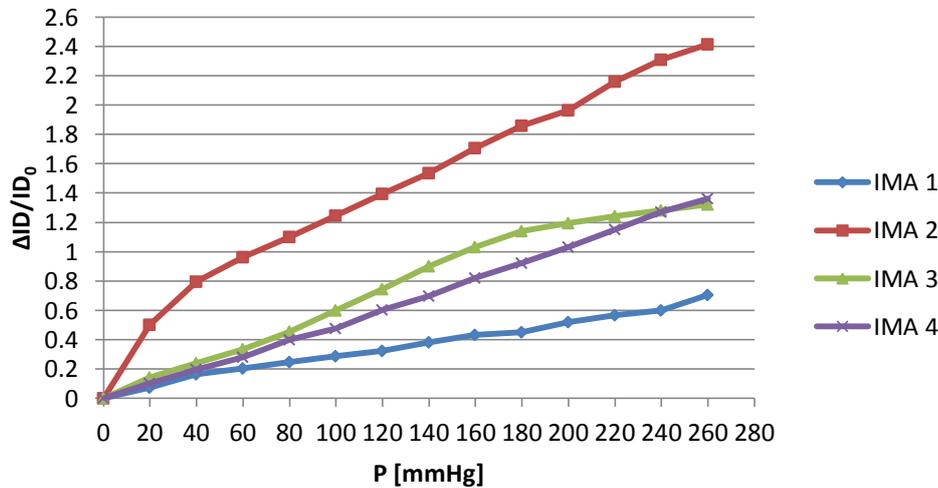
	$L_{\text{utile}}$ [mm]	ID [mm]	t [mm]	OD [mm]	$V_0$ interno [ml]	n
IMA1	15.68	4.07	0.79	5.65	0.20	1
IMA 2	19.03	3.14	0.86	4.85	0.15	1
IMA3	22.68	4.37	0.52	5.41	0.34	1
IMA4	21.03	4.18	0.79	5.76	0.29	1
<b>Media</b>	<b>12.93±3.75</b>	<b>3.22±0.42</b>	<b>0.88±0.37</b>	<b>4.97±0.58</b>	<b>0.10±0.05</b>	

**Tabella 5.13.** Dimensioni dei campioni di arteria mammaria interna porcina testati con prove di distensibilità.

Su ogni campione è stata eseguita una sola prova a causa dell'elevata cedevolezza delle pareti di questo tipo di vasi; una volta iniettato il fluido e aumentata la pressione intraluminale, infatti, il

vaso perdeva la sua capacità elastica, rimanendo molto deformato. Questo implica un assottigliamento della parete che provocava la fuoriuscita del fluido interno anche a basse pressioni, non consentendo l'esecuzione di ulteriori prove. Per lo stesso motivo, sulle IMA, non è stato nemmeno possibile eseguire la fase di preconditionamento.

I risultati ottenuti vengono mostrati in Figura 5.11. I valori dell'indice di distensibilità (calcolato secondo l'Equazione 5.9) dei campioni analizzati sono riportati in APPENDICE I.



**Figura 5.11.** Grafico dei risultati dei test di distensibilità effettuati sulle IMA ed espressi in termini di variazione di diametro interno normalizzato rispetto a quello iniziale.

Anche in questo caso non si è riusciti a caratterizzare tutti i vasi fino a 440 mmHg come previsto dal protocollo. Solo la IMA 1 e la IMA 3 hanno raggiunto il valore di pressione prestabilito, mentre per gli altri campioni si è dovuta terminare la prova a valori di pressione inferiori. Durante questi esperimenti, infatti, le pareti delle IMA, sono risultate altamente permeabili e quindi, infuse a basse velocità, hanno portato alla fuoriuscita del fluido, non permettendo il raggiungimento di pressioni maggiori rispetto a quelle riportate in figura.

La definizione dell'indice di distensibilità coincide con quella di *compliance* diametrica, il cui valore viene calcolato secondo l'Equazione 5.10 [63]:

$$\% C = \frac{(R_{P_2} - R_{P_1}) / R_{P_1}}{P_2 - P_1} \times 10^2 \quad (5.10)$$

dove  $P_1$  e  $P_2$  sono i valori di pressione (rispettivamente minore e maggiore, espressi in mmHg) del *range* in cui si valuta la *compliance*, mentre  $R$  rappresenta la misura del raggio interno del vaso. Nel caso di tessuti biologici, la norma ISO 7198 [63] prevede che venga considerata proprio la

*compliance* diametricale e non quella volumetrica, a causa dell'eccessiva variabilità inter e intra campioni.

Per effettuare quindi un confronto dei risultati ottenuti con la letteratura, è stata valutata la *compliance* dei vasi (come da norma [63]) nel *range* pressorio 80-120 mmHg; è stata quindi calcolata una C pari a  $1.9 \times 10^{-3}$  mmHg<sup>-1</sup> per le coronarie e  $5 \times 10^{-3}$  mmHg<sup>-1</sup> per le IMA. I valori ottenuti sono confrontabili con quelli pubblicati in letteratura:  $1.9 \times 10^{-3}$  e  $1.1 \times 10^{-3}$  mmHg<sup>-1</sup> per le coronarie porcine ([64, 65]) e  $1.1 \times 10^{-3}$  mmHg<sup>-1</sup> per le IMA porcine ([58]).

## 5.4. Utilizzo del sistema in campagne sperimentali preliminari con costrutti ingegnerizzati

Il sistema (MeCC) descritto in questo progetto di tesi è stato utilizzato come sistema di coltura in modalità di sola perfusione durante una serie di campagne sperimentali svolte presso il Laboratorio di Anatomia Umana dell'Università degli studi del Piemonte Orientale "Amedeo Avogadro" di Novara.

### 5.4.1. Messa in esercizio del sistema per la coltura di vasi sanguigni ingegnerizzati

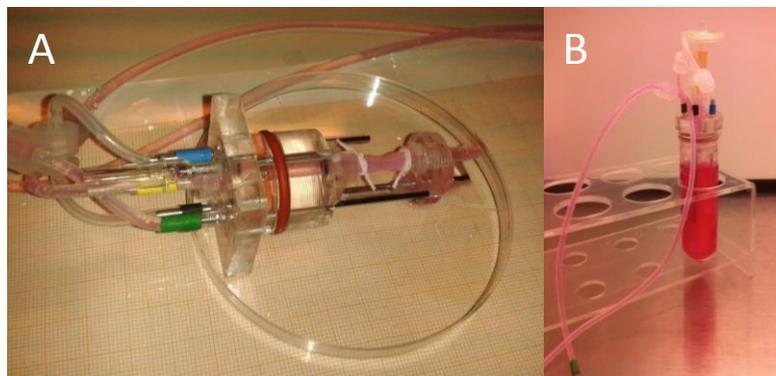
Il sistema sviluppato è stato messo a disposizione per la coltura in perfusione di vasi sanguigni ingegnerizzati realizzati presso il Laboratorio di Anatomia Umana di Novara. Questo ha permesso di valutare anche il mantenimento della sterilità nella camera di coltura e la facilità dell'assemblaggio delle componenti del bioreattore e di montaggio del campione sotto cappa.

I costrutti biologici sono stati ottenuti a partire da *scaffold* biopolimerici a base di gel di collagene contenente SMCs (ID=3.5 mm, lunghezza=25 mm). La procedura di realizzazione ha previsto l'estrazione di collagene di tipo I da code di ratto di 8-9 settimane [66]. Successivamente, i tendini disidratati e sterilizzati agli UV sono stati solubilizzati in acido acetico 0.1%, ottenendo una soluzione acida alla concentrazione di 2mg/ml, quantificato tramite BCA. Il collagene così estratto è stato utilizzato per realizzare degli *scaffold* tubulari arricchiti con una sospensione di  $1,8 \times 10^6$  di cellule muscolari vascolari primarie, estratte da aorta porcina. Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti utilizzando cellule tra il 4°-8° passaggio. Alcuni costrutti sono stati inoltre realizzati aggiungendo HELP (*Human Elastin-Like Protein*) al gel di collagene. La soluzione così ottenuta è stata fatta gelificare su un mandrino di polipropilene per un'ora a 37°C, per poi essere posta in una piastra di Petri contenente del medium [43].

Il costruito, dopo essere rimasto in coltura statica per almeno una settimana, viene montato nel bioreattore.

Si è voluto valutare l'effetto dello *shear stress* sulla struttura del costruito a base di collagene (n=8) e su un costruito ibrido a base di collagene addizionato con HELP.

L'assemblaggio del sistema sotto cappa è avvenuto come descritto di seguito: il campione biologico è stato montato sul telaio portavaso del bioreattore e legato ai connettori utilizzando semplice spago sterilizzato (Figura 5.12 A). Successivamente è stata connessa la camera di coltura al circuito idraulico; il procedimento è stato svolto, fino a questo punto, sotto cappa a flusso laminare. Infine il sistema è stato posto all'interno dell'incubatore e il tubo sottopompa è stato inserito nella testa pompante. I campioni sono stati mantenuti in coltura dinamica, applicando uno stimolo di perfusione per 3, 7 e 14 giorni, permettendo così di valutare l'efficienza dello stimolo imposto sulla maturazione cellulare dopo diversi periodi di tempo. Il mezzo di coltura è stato sostituito ogni 3 giorni.



**Figura 5.12.** Foto del bioreattore nel quale è stato montato un costruito ingegnerizzato (A) e sotto cappa a flusso laminare dopo che la camera è stata connessa al circuito idraulico(B).

Durante la coltura dinamica sono state applicate portate pari a 3, 5, 10 ml/min, che hanno generato sulla parete dei costrutti uno *shear stress* pari rispettivamente a 0.3, 0.5, 1 (condizione fisiologica) dyne/cm<sup>2</sup>.

Visivamente non è emerso nessun tipo di contaminazione batterica: l'utilizzo del sistema in queste campagne sperimentali ha perciò dimostrato che il bioreattore è in grado di mantenere la sterilità dell'ambiente di coltura fino a 14 giorni.

Al termine del periodo di coltura, i campioni condizionati sono stati sottoposti a caratterizzazione meccanica (*ring test* e compressione) per valutare l'effetto del condizionamento dinamico attuato sui costrutti sia in termini di proprietà biologiche che meccaniche.

L'elaborazione dei risultati di questi test, volti a valutare le caratteristiche dei costrutti sottoposti a coltura dinamica in perfusione, è ancora in corso.

#### 5.4.2. Test di caratterizzazione meccanica sui costrutti ingegnerizzati

Per quanto concerne i test di caratterizzazione meccanica svolti sui costrutti in collagene sottoposti a coltura dinamica, sono stati effettuati test di trazione uniassiale, eseguiti utilizzando una macchina per prove di trazione (Instron 5564 - Canton, MA, USA) con cella di carico 2.5 N, disponibile presso il Laboratorio di Anatomia Umana.

Il protocollo di prova è identico a quanto descritto per i vasi nativi nel paragrafo 5.2.1. Sono state eseguite prove su 13 campioni di materiale provenienti da 8 diversi costrutti in collagene e un campione proveniente da un costrutto ibrido (collagene addizionato con HELP).

La Tabella 5.14 riassume i risultati ottenuti e le caratteristiche geometriche medie dei campioni analizzati.

	ID [mm]	t [mm]	w [mm]	F <sub>max</sub> [N]	UTS [KPa]
<b>Collagene</b>	3.97±0.33	0.69±0.19	3.40±0.5	0.04±0.02	10.08±7.17
<b>Collagene+HELP</b>	3.32	1.46	2.5	0.013	1.85

**Tabella 5.14.** Caratteristiche geometriche dei *ring* ricavati da costrutti ingegnerizzati in collagene e collagene+HELP analizzati durante prove di trazione uniassiale e risultati ottenuti.

## Conclusioni e sviluppi futuri

Il lavoro di tesi, svolto presso il Laboratorio di Micro e Biofluidodinamica Sperimentale ( $\mu$ BSLab) del Dipartimento di Elettronica, Informazione e Bioingegneria del Politecnico di Milano si proponeva l'obiettivo di giungere ad un sistema di stimolazione in grado di integrare e ottimizzare procedure e sistemi preesistenti, in un'ottica di continua evoluzione della strumentazione sviluppata dal laboratorio. In particolare, il sistema è stato pensato per garantire sia la coltura *in vitro* che la caratterizzazione meccanica di strutture tubolari, quali vasi sanguigni (nativi o ingegnerizzati) di piccolo calibro. Per quanto riguarda la coltura dinamica dei vasi sanguigni, la linea guida seguita in questo lavoro, come ampiamente suggerito dalla letteratura, è stata di ricreare *in vitro* un ambiente che simuli quello fisiologico, replicando le forze emodinamiche esercitate *in vivo*, così da permettere una stimolazione biomeccanica biomimetica dei campioni in coltura.

La funzionalità di caratterizzazione è stata invece integrata affinché il sistema consentisse di indagare le proprietà meccaniche principali di queste strutture.

L'attività di progettazione del sistema oggetto del lavoro di tesi ha previsto una prima fase in cui è stata effettuata l'ottimizzazione di un sistema di *organ culture* sviluppato presso il  $\mu$ BSLab e in uso presso il Centro Cardiologico Monzino [2]. A partire da questo, sono state individuate delle specifiche di progetto che potessero guidare verso la realizzazione di un sistema di stimolazione (MeCC) capace di applicare una deformazione ciclica circonferenziale e/o perfusione e di indagare le proprietà biomeccaniche principali per la caratterizzazione di un vaso sanguigno. Il MeCC si colloca tra i bioreattori in grado di permettere una coltura dinamica *in vitro* di vasi sanguigni (nativi e ingegnerizzati), al fine di ricreare le condizioni fisiologiche a cui queste strutture sono sottoposte *in vivo*. Il sistema è infatti in grado di applicare sia uno stimolo di perfusione (*shear stress*) al campione biologico alloggiato al suo interno, sia uno stimolo di deformazione circonferenziale (*wall strain*). L'analisi della letteratura tuttavia ha mostrato che le cellule presenti nella tunica media e avventizia di un vaso sanguigno, ossia cellule muscolari lisce (SMCs) e fibroblasti (FBs), sono sensibili principalmente ad una sollecitazione di deformazione circonferenziale ciclica dovuta alla pulsazione del flusso [47]. In particolare, nel caso di vasi ingegnerizzati, si è visto come una deformazione circonferenziale dell'ordine del 10% generi le migliori risposte dei costrutti, permettendo una corretta proliferazione cellulare e un'adeguata secrezione di matrice extracellulare (ECM) da parte delle cellule. Per questi motivi ci si è

concentrati maggiormente su questo tipo di sollecitazione. Considerando i problemi che potrebbero insorgere applicando la stimolazione direttamente sul campione, come l'incapacità di resistere alla sollecitazione da parte di alcune strutture ingegnerizzate, si è indagata a fondo la possibilità di trasmettere al campione biologico lo stimolo di deformazione circonferenziale ciclica attraverso una guaina elastica interna, come suggerito dal lavoro di Seliktar [46]. L'utilizzo di questo elemento presenta intrinsecamente notevoli vantaggi, quale una maggior versatilità, offrendo la possibilità di alloggiare strutture tubolari di diversa lunghezza e diametro e la possibilità di coltivare qualsiasi tipo di costrutto tubolare (anche quelli con bassa consistenza meccanica). L'inserimento della guaina inoltre, permette l'utilizzo di un semplice fluido di servizio, quale acqua o PBS, all'interno dell'intero circuito idraulico. In questo modo è possibile ridurre i costi, in quanto il medium di coltura viene impiegato solo per il riempimento della camera.

Nell'ambito della realizzazione di vasi ingegnerizzati *in vitro*, l'utilizzo della guaina di supporto consentirebbe inoltre la realizzazione di costrutti direttamente sulla struttura siliconica, riducendo al minimo la manipolazione dei campioni biologici. Come suggerito dalla letteratura, per aumentare l'adesione dei costrutti alla guaina, e quindi ottenere un migliore recupero elastico durante la fase di stimolazione ciclica, si potrebbe rivestire la struttura siliconica con opportune sostanze, come per esempio il collagene o la fibronectina [46, 67, 68].

L'utilizzo della guaina per la trasmissione della sollecitazione, però, presenta anche degli svantaggi. In primo luogo, le dimensioni della guaina hanno imposto un limite massimo nelle dimensioni dei campioni biologici che su di essa possono essere calzati a causa della deformazione non uniforme che si è riscontrata in corrispondenza di valori di pressione elevati (superiori ai 680 mmHg). Inoltre, l'inserimento della struttura in silicone nel lume del vaso non permette l'applicazione in contemporanea dello stimolo di deformazione e di quello di perfusione interna al campione. In realtà, per quanto riguarda la coltura di costrutti ingegnerizzati, tale svantaggio non appare rilevante in quanto lo stimolo di *shear* generato dalla perfusione risulta essere essenziale solamente per la proliferazione delle ECs nella tunica intima. Di conseguenza questo limite potrebbe essere superato seminando queste cellule all'interno del costrutto successivamente ad una prima fase di coltura nella quale il campione viene sottoposto alla sola deformazione ciclica tramite guaina [45]. Va però ricordato che la perfusione permette anche un aumento del trasporto di massa, invece l'utilizzo della guaina limita alla sola diffusione il nutrimento delle cellule appartenenti agli strati intraluminali dei campioni in coltura.

Nel caso si decidesse di seminare le ECs, la guaina siliconica andrebbe eliminata e bisognerebbe ancorare direttamente il costrutto ai connettori, sollecitando il campione biologico con il solo

stimolo di perfusione. La fase di semina richiederebbe però l'utilizzo di una pompa a siringa in sostituzione alla roller per evitare un danneggiamento delle cellule; sarebbe quindi necessario apportare modifiche al sistema di controllo affinché possa comandare questo nuovo componente. Ad ogni modo, i risultati del lavoro mostrano l'adeguatezza della strategia di stimolazione tramite l'utilizzo di una guaina siliconica per la trasmissione della sollecitazione. A questi fini è stato fondamentale scegliere una struttura molto meno deformabile rispetto ai campioni biologici e inoltre è stata necessaria una caratterizzazione sistematica dell'elemento siliconico e lo sviluppo di un modello, per conoscere a priori i parametri da attuare durante la stimolazione.

Il modello semiempirico sviluppato infatti, permette di prevedere la deformazione del campione montato sulla guaina in funzione della pressione intraluminale applicata. Inserendo all'interno del modello i risultati ottenuti dalla caratterizzazione della guaina siliconica e le caratteristiche geometriche e meccaniche del campione biologico da stimolare, è possibile prevedere quali siano i valori di pressione da applicare per ottenere il valore di deformazione circonferenziale desiderato. In particolare, le proprietà meccaniche dei vasi nativi sono state ricavate attraverso prove sperimentali che hanno permesso di ottenere i valori dell'indice di distensibilità da inserire nel modello. La validazione di quest'ultimo è avvenuta attraverso una campagna sperimentale nella quale sono stati sollecitati con deformazione circonferenziale ciclica vasi nativi porcini (IMA e arterie coronarie) calzati sulla guaina. I risultati ottenuti hanno permesso di confermare che il modello è in grado di prevedere con sufficiente precisione la deformazione circonferenziale dei campioni biologici sollecitati. Nella configurazione attuale del sistema, dunque, la quantificazione delle deformazioni attraverso il modello è imprescindibile, in quanto sopperisce al fatto che il sistema lavora con controllo ad anello aperto della deformazione.

Rispetto ai sistemi in grado di coltivare un vaso sanguigno con uno stimolo di deformazione circonferenziale ciclica presenti in letteratura [45-48, 50], il sistema sviluppato permette la caratterizzazione meccanica dei vasi sanguigni offrendo la possibilità di eseguire test per valutare la pressione massima a rottura e la *compliance* delle strutture tubolari montate al suo interno (in assenza della guaina di supporto).

Rispetto invece a sistemi commerciali quali Bose (Bose Corporation, ElectroForce Systems Group, MI, USA) o TGT (Instron TERM, Norwood, MA, USA), in grado di effettuare sia la coltura dinamica che la caratterizzazione meccanica, il MeCC risulta meno costoso di almeno un ordine di grandezza (i sistemi commerciali hanno costi intorno ai 70000-100000 euro) e meno ingombrante. Inoltre, essendo un sistema proprietario, risulta facilmente ottimizzabile, poichè il laboratorio che

l'ha creato è in grado di tenere sotto controllo tutte le sue caratteristiche. Il vantaggio dei dispositivi commerciali rispetto al sistema qui sviluppato risiede però nella loro capacità di caratterizzare il campione tramite una più vasta gamma di prove (trazione, compressione, torsione), che ne giustificano quindi le dimensioni e i costi più elevati.

Dal punto di vista progettuale, nella prima fase del lavoro ci si è concentrati sull'ottimizzazione della camera di coltura, cercando di superare i limiti del sistema preesistente. In particolare il nuovo prototipo sviluppato ha reso il bioreattore versatile, permettendo l'alloggiamento di strutture tubolari di diversa lunghezza e semplificando le operazioni di montaggio del campione sotto cappa a flusso laminare, in accordo con le pratiche adottate all'interno di un laboratorio di colture cellulari. La compattezza dell'intero sistema di coltura determina un ingombro ridotto all'interno dell'incubatore e quindi ne rende possibile l'utilizzo all'interno di un laboratorio biologico senza interferire con le consuete attività lavorative.

Per quanto riguarda la modalità di coltura, il software utilizzato (sia per la perfusione che per la deformazione circonferenziale) risulta molto versatile in quanto fornisce all'operatore la possibilità di impostare diversi parametri di stimolazione, quali *range* pressori, numero di cicli, frequenza e tempistiche delle varie fasi. Questo è possibile grazie ad un robusto sistema di monitoraggio e controllo che funziona in retroazione: riceve in ingresso i segnali di pressione dalla camera di coltura tramite il sensore di pressione e regola opportunamente la portata erogata dalla pompa. Analogamente, il software utilizzato nella modalità per la caratterizzazione meccanica, risulta anch'esso versatile e in grado di sollecitare il campione con diverse modalità; la differenza rispetto a quello utilizzato per la coltura risiede nelle diverse tempistiche di attuazione degli stimoli e nella maggior precisione per quanto riguarda i volumi erogati dalla pompa. I software impiegati hanno permesso di attuare sia la coltura che la caratterizzazione meccanica dei campioni biologici senza che fosse necessario apportare ad essi alcuna modifica. Questo è stato possibile perché tra le linee guida del lavoro prefissate era presente quella di non modificare la strategia di stimolazione, mantenendo un controllo ad anello chiuso sulla pressione e attuando un controllo ad anello aperto sulla deformazione. Nel caso si decida di applicare un controllo retroazionato della deformazione, sarà necessario effettuare alcune modifiche al software (vedi oltre).

La fase di collaudo del MeCC, in seguito all'ottimizzazione preliminare effettuata, non ha evidenziato malfunzionamenti. In particolare non sono state rilevate perdite di fluido a livello delle connessioni e degli accessi presenti nella camera di coltura, garantendo così un ottimo isolamento dell'intero sistema dall'ambiente esterno.

Inoltre, la messa in esercizio del MeCC ha verificato l'adeguatezza del sistema di monitoraggio e controllo in termini di sollecitazione imposta e affidabilità per l'intera durata della stimolazione (fino a 7 giorni). Il sistema si è anche dimostrato adatto per la coltura di più campioni in parallelo. Per quanto riguarda il collaudo del MeCC nella modalità atta alla caratterizzazione meccanica, esso è risultato affidabile e adeguato per l'esecuzione di prove di *burst pressure*. In particolare ha permesso di analizzare vasi sanguigni nativi ottenendo valori in accordo con la letteratura o con i risultati dei test di trazione. Inoltre, il protocollo di prova realizzato si è dimostrato efficace anche per l'analisi della pressione a rottura di costrutti ingegnerizzati: i risultati di *burst pressure* ottenuti, confermati tramite prove di trazione, hanno permesso di validare il MeCC come sistema di caratterizzazione per vasi sanguigni ingegnerizzati.

Durante queste campagne sperimentali preliminari, la fase di montaggio è risultata semplice per gli operatori, grazie anche alle ottimizzazioni apportate alla camera di coltura. Inoltre, non sono emerse contaminazioni batteriche evidenti, dimostrando perciò che il bioreattore è in grado di mantenere la sterilità dell'ambiente di coltura fino a 14 giorni.

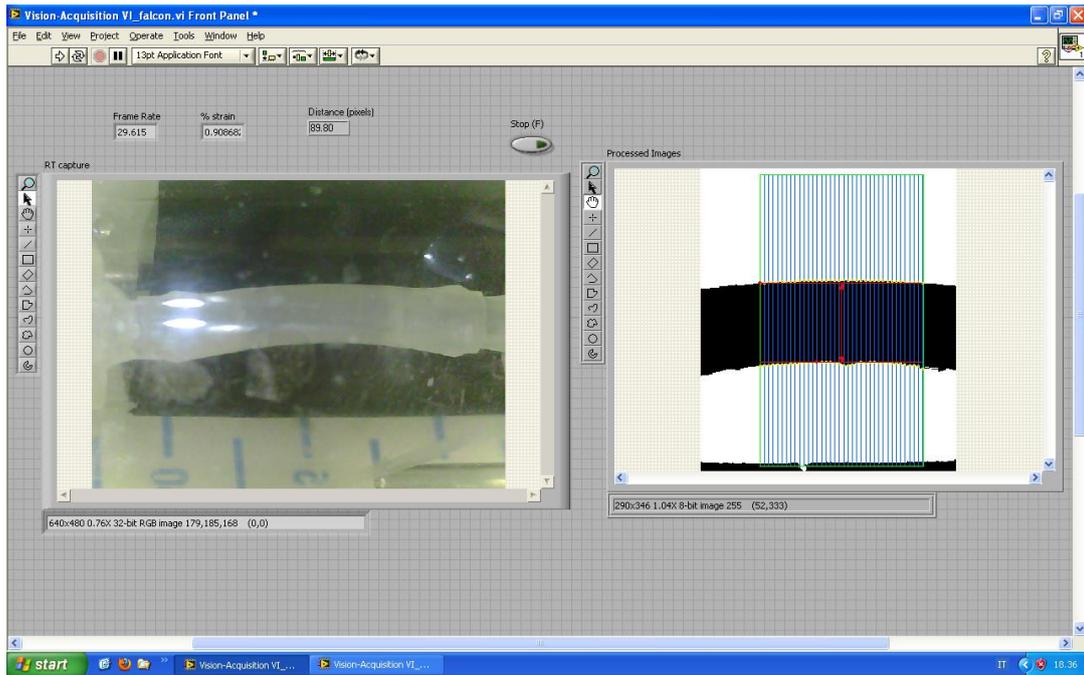
Il sistema realizzato è risultato dunque complessivamente funzionale e adeguato per campagne sperimentali preliminari in laboratorio biologico. L'esperienza maturata nello sviluppo e nell'impiego del sistema ha permesso di individuare quelli che, a nostro avviso, dovrebbero essere i prossimi passi di sviluppo a breve e a medio termine.

Per quanto riguarda le modalità di ancoraggio del vaso nel telaio durante la caratterizzazione meccanica, i lacci in lattice e il *vessel loop* (Tecnokit S.r.l., Milano, Italia) utilizzati sono risultati validi in termini di funzionalità e affidabilità. Il loro utilizzo è però fortemente influenzato dalla manualità dell'operatore e inoltre richiede l'inserimento di ulteriori metodi (come l'uso di colla a presa rapida sui connettori) per mantenere la tenuta anche a elevate pressioni. In futuro, questa strategia potrebbe essere ottimizzata utilizzando differenti materiali.

Alcune ottimizzazioni potrebbero essere apportate al sistema per la coltura, in particolare si potrebbe integrare un flussimetro all'interno del sistema per misurare in modo diretto la portata erogata dalla pompa e avere quindi un ulteriore controllo durante la stimolazione. In questo modo, conoscendo il volume e la pressione di stimolazione, sarebbe possibile stimare un valore indicativo di *compliance* del sistema guaina-vaso già durante il periodo di coltura. Correlando poi questa informazione alla *compliance* della guaina, si potrebbe stimare direttamente il valore di *compliance* del solo campione. Va sottolineato che l'introduzione di un flussimetro comporterebbe però un notevole incremento dei costi del sistema.

In futuro, si potrebbero anche fondere insieme le due modalità di funzionamento del sistema sviluppato in un unico setup, che si avvale di una sola pompa. Il sistema integrato, infatti, fa uso ora di due pompe peristaltiche con diverse specifiche di funzionamento e diversi tubi sottopompa: sarebbe quindi opportuno effettuare una ricerca di mercato per individuare un dispositivo che integri le esigenze dei due sistemi utilizzati. Nel caso non si riuscisse a sostituire le due pompe con un unico attuatore, si potrebbe semplicemente porre nel circuito idraulico i due sottopompa uno in serie all'altro, azionando il sistema pompante corrispondente a seconda della modalità di funzionamento attuata.

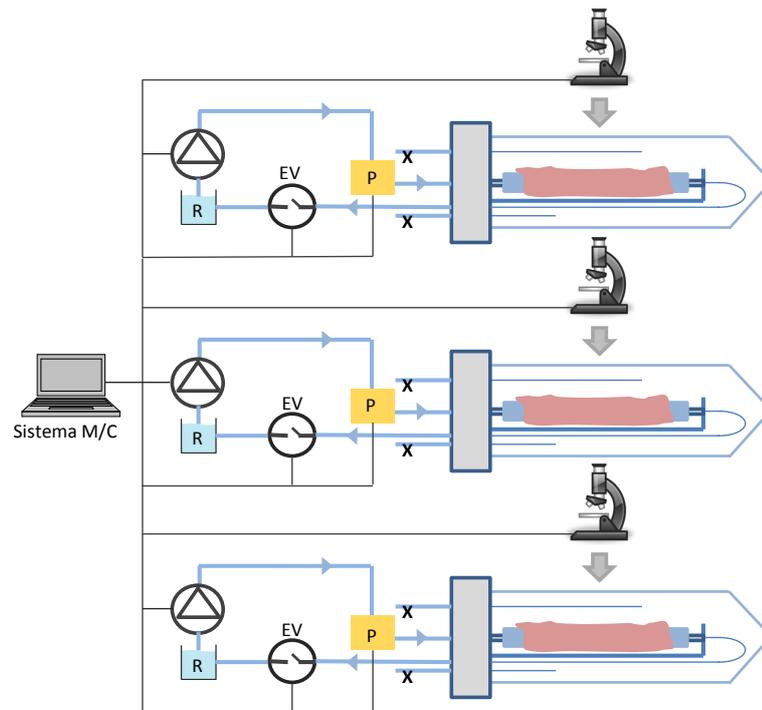
A medio termine, un fondamentale sviluppo del lavoro riguarderà l'inserimento nel sistema di M/C di un controllo in retroazione della deformazione circonferenziale attuata durante la coltura, in modo da ottenere una stimolazione del costrutto più accurata. Si potrebbe perseguire questo obiettivo utilizzando una strategia basata su un sistema di *computer-vision*, che permetta una misurazione diretta della deformazione effettuando in tempo reale un'analisi delle immagini simile a quella eseguita finora al termine degli esperimenti di caratterizzazione e collaudo. Tramite telecamere o sistemi laser a basso costo, ad esempio utilizzando il microscopio digitale già in uso durante le prove di caratterizzazione, sarebbe possibile registrare un video del campione stimolato e, in tempo reale, valutarne la variazione di diametro esterno, regolando di conseguenza la pressione applicata dal sistema e quindi la portata infusa dalla pompa. Il sistema potrebbe così funzionare sia in modalità di controllo di deformazione, sia in modalità di controllo di pressione, attuabile come *backup* in caso di fallimento della lettura diretta della deformazione. A tal fine, sono state già eseguite prove preliminari per valutare l'applicabilità del sistema con un controllo in deformazione di questo tipo (Figura 6.1).



**Figura 6.1.** Attività preliminari svolte per verificare l'applicabilità di un controllo retroazionato della deformazione. Il software riceve in ingresso il video registrato dalla videocamera, lo converte in immagini in bianco e nero e valuta la variazione di diametro nella sezione centrale (evidenziata dalle linee verticali blu).

Nel caso in cui l'analisi delle immagini venga effettuata al termine dell'esecuzione degli esperimenti, è possibile eliminare manualmente alcuni artifici visivi (come i riflessi luminosi) che potrebbero causare errori durante la misurazione della deformazione circonferenziale. Ciò invece non risulterebbe possibile impiegando un sistema video per il controllo retroazionato della deformazione: sarebbe quindi necessario migliorare anche la modalità stessa di acquisizione dell'immagine rispetto a quanto svolto nell'ambito di questo lavoro. A titolo di esempio, un'indagine di mercato ha permesso di individuare nei microscopi polarizzati una valida alternativa ai dispositivi di registrazione video utilizzati in questo lavoro di tesi in quanto, tramite il filtro polarizzatore, permettono di eliminare i riflessi dovuti alla luce.

Il fine ultimo sarebbe quello di sviluppare un sistema modulare con controllo della deformazione ad anello chiuso, in cui ogni bioreattore risulti dotato di un sistema di acquisizione video, di un circuito idraulico di servizio e di attuatori dedicati, connessi e controllati da un unico sistema di M/C. In questo modo ciascun campione verrebbe adeguatamente stimolato in base al valore di deformazione circonferenziale rilevato dal sistema (Figura 6.2).



**Figura 6.2.** Schema del possibile layout del sistema di coltura modulare con controllo in retroazione della deformazione.

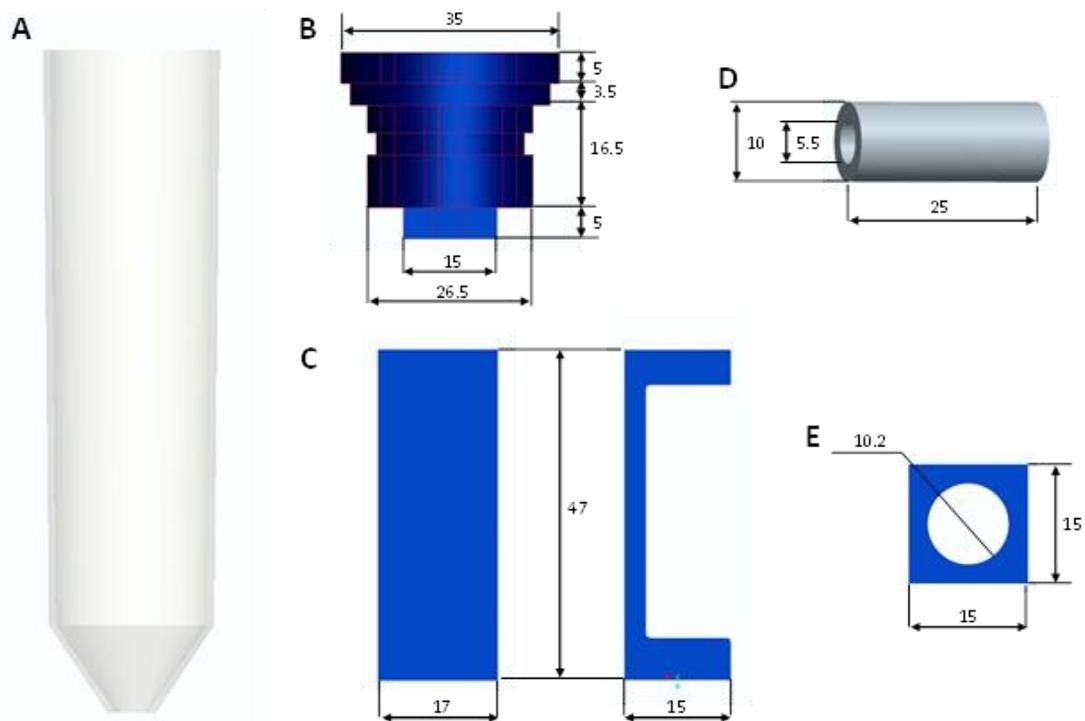
In conclusione, il sistema di stimolazione realizzato durante il lavoro di tesi si è dimostrato un promettente strumento sia per la coltura che per la caratterizzazione dei vasi sanguigni. Il MeCC è stato in grado di rispondere adeguatamente alle specifiche che ci si era prefissati all'inizio del lavoro. A tal fine è stata di fondamentale importanza l'attività di caratterizzazione sistematica e di modellazione, che hanno generato le conoscenze tali da permettere una stimolazione adeguata dei campioni biologici *in vitro*, in condizioni standardizzate e riproducibili e mantenendo la sterilità dell'ambiente di coltura fino a 14 giorni. Inoltre il MeCC è risultato in grado di indagare in maniera soddisfacente le proprietà biomeccaniche principali per la caratterizzazione dei vasi sanguigni. Notevoli sono comunque le migliorie che potrebbero essere ancora apportate al sistema sviluppato per adattarlo alle molteplici e sempre rinnovate esigenze che emergono nel settore dell'ingegneria dei tessuti cardiovascolari.

## APPENDICE A

### Prototipi della camera di coltura

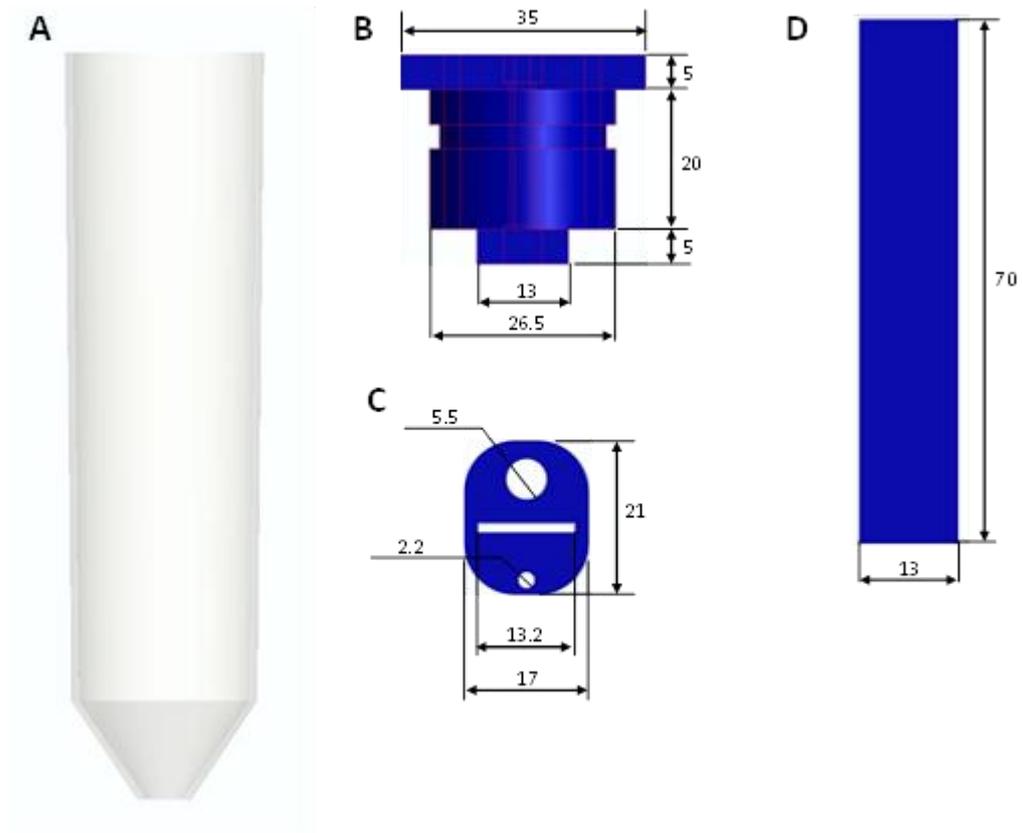
Qui di seguito vengono presentati i disegni CAD con le relative misure dei due prototipi di camera di coltura realizzati.

#### Prototipo 1



**Figura A.1.** Rappresentazione delle componenti principali del prototipo 1: (A) Falcon 50 ml; (B) tappo; (C) lastra e supporto laterale della struttura portavaso; (D) elemento a vite; (E) elemento quadrangolare. Le misure sono riportate in mm.

## Prototipo 2



**Figura A.2.** Rappresentazione delle componenti principali del prototipo 2: (A) flacon 50 ml; (B) tappo; (C) carrello; (D) lastra. Le misure sono riportate in mm.

# APPENDICE B

## Protocolli dei test

### **TEST DI BURST PRESSURE**

#### **COMPONENTI DEL SET UP:**

- pompa peristaltica (IPCN-12, Ismatec);
- sensore di pressione di tipo *flow-through* (Pendotech Press-S-000);
- circuito di amplificazione;
- scheda NI DAQ USB-6009;
- software di controllo (C-SO) [54];
- PC su cui viene eseguito il software di controllo;
- centralina di alimentazione;
- camera di coltura;
- elettrovalvola pinza tubo Z110A 24V (Sirai Elettromeccanica);
- tubistica: tubo sottopompa (diametro 2,79 mm) e tubi in silicone (diametro 3.2 mm, spessore 0.8 mm);
- *reservoir* contenente fisiologica colorata con inchiostro di china;
- camera in plexiglass contenente fisiologica;
- microscopio digitale Dino Lite AM 2011 Series (Digital Microscope) collegato a pc.

#### **FASE DI MONTAGGIO:**

- Porre a monte della pompa il *reservoir*, inserire il tubo sottopompa nell'apposito alloggiamento e a valle collegarlo al tubo in silicone che si conetterà poi al sensore, a sua volta collegato alla camera di coltura.
- Inserire il tubo di uscita dal tappo del telaio del bioreattore nell'elettrovalvola.
- Collegare la centralina alla pompa, al sensore di pressione tramite l'amplificatore, all'elettrovalvola e alla scheda di acquisizione connessa a sua volta al PC.

#### **CALIBRAZIONE DEL SENSORE DI PRESSIONE:**

La calibrazione del sensore viene effettuata prima della connessione al circuito idraulico: collegare l'apparecchio al manometro da un lato e ad un rubinetto a tre vie dall'altro.

Nel SW entrare in “*Acquisition Panel*”, attivare Ch 0 nel riquadro “*Calibration*” e premere il tasto “*Run*”:

- mantenere il rubinetto a tre vie totalmente aperto e il manometro a 0 mmHg, cliccare sul pulsante “*Go*” in fondo alla prima colonna;
- nella seconda colonna inserire il valore 300 mmHg;
- chiudere tutte le uscite del rubinetto a tre vie e applicare tramite la pompetta del manometro la pressione di 300 mmHg;
- cliccare sul pulsante “*Go*” in fondo alla seconda colonna;
- disattivare Ch 0 nel riquadro “*Calibration*” per procedere con il test.

In questo modo viene pulito il segnale di pressione che arriva dal trasduttore.

#### FISSAGGIO DEL CAMPIONE:

Misurare il diametro e lo spessore del campione prima di inserirlo nel bioreattore utilizzando un puntale come sistema “passa/non passa” e un calibro; calcolarne la lunghezza poggiandolo su un foglio di carta millimetrata.

Per il fissaggio del campione al bioreattore calzare il campione su entrambi i connettori (scelti di misura adeguata in base alle dimensioni del campione) e procedere al fissaggio nel seguente modo:

- porre una goccia di colla (cianoacrilato – attack a presa rapida) su uno dei due connettori tramite una siringa da 1 ml e successivamente infilare il campione su di esso;
- legare il campione con filo di seta per fissarlo in posizione;
- avvolgere il campione con un laccio in lattice facendo un primo nodo, successivamente girare un’estremità del laccio attorno al campione e fissare con un doppio nodo;
- fare lo stesso per l’altra estremità.

Misurare la lunghezza utile del campione, definita come la distanza tra i due lacci in lattice, per mezzo di un calibro.

#### ESECUZIONE:

- Collegare il sensore sia alla camera di coltura che al tubo a valle della pompa.
- Entrare nel software di M/C nel pannello “*Advanced Settings*” e impostare la ACQ Frequency a 50 Hz.
- Entrare nel software nel pannello “*Settings*” e impostare la pressione massima a 3000 mmHg.

- Entrare nel software nel pannello “*Pump Control*” e impostare la portata sul valore desiderato (4 ml/min) nel lato *infusion*.
- Cliccare su “*Start*” per riempire il circuito, eliminare le bolle d’aria e controllare che non vi siano perdite (l’elettrovalvola non deve occludere il tubo a valle del bioreattore).
- Attivare la registrazione dati automatica nel pannello “*Pressure e volume record*”.
- Tramite l’elettrovalvola occludere il tubo a valle della camera di coltura e attivare la pompa cliccando su “*Start*”.
- Interrompere la prova in caso di lacerazione del campione o perdite nel circuito: è importante disattivare prima la registrazione (cliccando nel pannello “*Pressure e volume record*”) e successivamente la pompa cliccando su “*Stop*”.

## **TEST DI CARATTERIZZAZIONE DELLA GUAINA SILICONICA**

### **COMPONENTI DEL SET UP:**

- sensore di pressione di tipo *flow-through* (Pendotech Press-S-000);
- circuito di amplificazione;
- scheda NI DAQ USB-6009;
- PC su cui viene eseguito il software di controllo;
- centralina di alimentazione;
- software di controllo (C-SO) [54];
- camera di coltura;
- manometro;
- microscopio Nikon SMZ1000 collegato a pc;
- clamp;
- siringa da 2.5 ml;
- cannula rigida (ID=2.20 mm);
- carta millimetrata;
- rubinetto a tre vie;
- software ImageJ (National Institutes of Health, USA) per l’analisi delle immagini.

### **CALIBRAZIONE CANNULA:**

- Riempire tramite la siringa la cannula (sulla quale è stata incollata la carta millimetrata) con acqua fino a circa metà della sua lunghezza.

- Segnare sulla carta millimetrata il livello raggiunto dall'acqua.
- Aggiungere 0.2 ml di acqua e valutare lo spostamento di liquido in mm.
- Eseguire la procedura 3 volte.
- Effettuare una media dei  $\Delta x$  ottenuti e calcolare il fattore di conversione come

$$F = \frac{\Delta x [mm]}{0.2 ml} \quad (B.1)$$

#### FASE DI MONTAGGIO:

- Collegare l'amplificatore al sensore e alla centralina di alimentazione.
- Collegare la scheda al computer tramite cavo USB, avviare il software e calibrare il sensore nella sezione "Aquisition Panel" (Channel 0).
- Connettere il sensore alla camera di coltura.
- Collegare un'estremità della cannula al sensore, l'altra ad un rubinetto a tre vie a sua volta collegato al manometro.
- Inserire il campione tra i due connettori del telaio portavaso.
- Posizionare il telaio del bioreattore sotto la lente del microscopio cercando di porre il campione al centro dell'immagine

#### ESECUZIONE:

- Riempire tramite una siringa il campione con acqua fino a circa metà cannula e chiudere con una *clamp* il tratto tra siringa e telaio portavaso.
- Catturare l'immagine del campione per ottenere le sue dimensioni iniziali e segnare sulla carta millimetrata la posizione iniziale del menisco d'acqua.
- Aumentare la pressione all'interno del campione (tramite la pompetta del manometro) a step di 20 mmHg fino ad un massimo di 440 mmHg, valutando il  $\Delta x$  e scattando un'istantanea ad ogni step.
- Convertire il valore di  $\Delta x$  in  $\Delta V$  (tramite il fattore di conversione)

$$\Delta V = \frac{\Delta x}{F} \quad (B.2)$$

- Normalizzare la variazione di volume rispetto al volume iniziale  $V_0$  interno.
- Analizzare le immagini con il software ImageJ utilizzando come riferimento il diametro centrale a riposo (imposto pari a 1) e studiando la variazione di diametro in tre punti diversi del campione.
- Eseguire tre prove per campione.

## **TEST DI DEFORMAZIONE FINO A PRESSIONE MASSIMA PER GUAINE IN SILICONE**

### **COMPONENTI DEL SET UP:**

- sensore di pressione di tipo *flow-through* (Pendotech Press-S-000);
- circuito di amplificazione;
- scheda NI DAQ USB-6009;
- PC su cui viene eseguito il software di controllo;
- centralina di alimentazione;
- software di controllo (C-SO) [54];
- camera di coltura;
- microscopio Nikon SMZ1000 collegato a pc;
- elettrovalvola pinza tubo Z110A 24V (Sirai Elettromeccanica);
- pompa peristaltica (IPCN-12, Ismatec);
- tubistica: tubo sottopompa (diametro 2.79 mm) e tubi in silicone (diametro 3.2 mm, spessore 0.8 mm);
- *reservoir* contenente acqua;
- software ImageJ (National Institutes of Health, USA) per l'analisi delle immagini.

### **FASE DI MONTAGGIO:**

- Collegare l'amplificatore al sensore e alla centralina di alimentazione.
- Collegare la scheda al computer tramite cavo USB, avviare il software e calibrare il sensore nella sezione "*Aquisition Panel*" (Channel 0).
- Porre a monte della pompa il *reservoir*, collegarla a valle al sensore di pressione e successivamente connettere quest'ultimo alla camera di coltura.
- Inserire il tubo di uscita dal tappo del telaio del bioreattore nell'elettrovalvola.
- Inserire la guaina in silicone (sulla quale viene segnato il centro con un pennarello) sui due connettori del telaio portavaso.
- Legare il tratto di guaina con lacci in lattice, facendo due giri e un doppio nodo, in modo da bloccare il silicone ai connettori.
- Posizionare il telaio del bioreattore sotto la lente del microscopio cercando di porre il campione al centro dell'immagine.

ESECUZIONE:

- Riempire il circuito infondendo fluido con una portata di 0.1 ml/min.
- Occludere la zona a valle della camera di coltura azionando l'elettrovalvola una volta che il circuito è riempito e debollato.
- Catturare l'immagine del campione per ottenere le sue dimensioni iniziali.
- Aumentare la pressione all'interno del campione infondendo fluido con step di 40 mmHg e portata di 0.1 ml/min fino a fallimento, scattando un'istantanea ad ogni step.
- Analizzare le immagini con il software ImageJ, utilizzando come riferimento il diametro centrale a riposo (imposto pari a 1) e studiando la variazione di diametro in tre punti diversi del campione.

## APPENDICE C

# Risultati dei test di caratterizzazione della guaina siliconica

### TEST DI CARATTERIZZAZIONE: CURVA PRESSIONE-VOLUME

Caratteristiche geometriche dei campioni analizzati e numero (n) di prove effettuate:

	$L_{\text{utile}}$ [mm]	OD [mm]	t [mm]	ID [mm]	$V_0$ interno [ml]	n
<b>C 1</b>	27.56	3.44	0.30	2.84	0.17	6
<b>C 2</b>	29.70	3.35	0.29	2.77	0.18	3
<b>C 3</b>	28.60	3.26	0.29	2.68	0.16	3
<b>C 4</b>	25.77	3.17	0.36	2.44	0.12	3
<b>C 5</b>	26.73	3.22	0.36	2.50	0.13	3
<b>Media</b>	27.67±1.54	3.29±0.1	0.32±0.04	2.64±0.17	0.15±0.26	

Risultati:

<b>C 1</b>					
<b>P</b>	$\Delta V1/V_0$	$\Delta V2/V_0$	$\Delta V3/V_0$	media $\Delta V/V_0$	dev.st
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
20	0.009	0.009	0.009	0.009	0.000
40	0.018	0.018	0.018	0.018	0.000
60	0.027	0.027	0.031	0.029	0.002
80	0.036	0.042	0.042	0.040	0.003
100	0.046	0.055	0.055	0.052	0.005
120	0.064	0.064	0.067	0.065	0.002
140	0.073	0.078	0.082	0.078	0.005
160	0.091	0.097	0.097	0.095	0.003
180	0.109	0.109	0.109	0.109	0.000
200	0.127	0.127	0.127	0.127	0.000
220	0.146	0.146	0.146	0.146	0.000
240	0.160	0.158	0.164	0.161	0.003
260	0.182	0.182	0.182	0.182	0.000
280	0.209	0.200	0.209	0.206	0.005
300	0.237	0.219	0.237	0.231	0.011
320	0.264	0.246	0.255	0.255	0.009
340	0.310	0.291	0.282	0.294	0.014
360	0.337	0.328	0.319	0.328	0.009
380	0.377	0.355	0.355	0.362	0.013
400	0.455	0.401	0.392	0.416	0.034
420	0.510	0.446	0.446	0.467	0.037
440	0.565	0.483		0.524	0.058

<b>C 1bis</b>					
<b>P</b>	<b><math>\Delta V1/V_0</math></b>	<b><math>\Delta V2/V_0</math></b>	<b><math>\Delta V3/V_0</math></b>	<b>media <math>\Delta V/V_0</math></b>	<b>dev.st</b>
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
20	0.004	0.006	0.004	0.004	0.001
40	0.015	0.019	0.015	0.017	0.002
60	0.022	0.029	0.019	0.024	0.003
80	0.037	0.039	0.033	0.036	0.002
100	0.046	0.045	0.043	0.044	0.001
120	0.055	0.058	0.058	0.057	0.001
140	0.070	0.074	0.068	0.070	0.002
160	0.083	0.087	0.081	0.084	0.002
180	0.094	0.101	0.097	0.097	0.002
200	0.110	0.116	0.107	0.111	0.003
220	0.129	0.126	0.132	0.129	0.002
240	0.147	0.145	0.145	0.146	0.001
260	0.166	0.165	0.168	0.166	0.001
280	0.184	0.184	0.190	0.186	0.002
300	0.206	0.213	0.213	0.211	0.003
320	0.239	0.242	0.232	0.238	0.003
340	0.267	0.271	0.271	0.270	0.002
360	0.295	0.310	0.310	0.305	0.006
380	0.331	0.349	0.349	0.343	0.007
400	0.387	0.393	0.387	0.389	0.002
420	0.423	0.455	0.426	0.435	0.012
440	0.497	0.513	0.503	0.497	0.006

<b>C 2</b>					
<b>P</b>	<b><math>\Delta V1/V_0</math></b>	<b><math>\Delta V2/V_0</math></b>	<b><math>\Delta V3/V_0</math></b>	<b>media <math>\Delta V/V_0</math></b>	<b>dev.st</b>
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
20	0.005	0.009	0.009	0.008	0.002
40	0.018	0.030	0.018	0.022	0.007
60	0.027	0.032	0.027	0.028	0.003
80	0.035	0.044	0.035	0.038	0.005
100	0.044	0.062	0.044	0.050	0.010
120	0.057	0.071	0.058	0.062	0.008
140	0.071	0.088	0.071	0.077	0.010
160	0.088	0.097	0.088	0.091	0.005
180	0.103	0.120	0.097	0.107	0.012
200	0.115	0.136	0.115	0.122	0.012
220	0.133	0.156	0.133	0.140	0.013
240	0.147	0.177	0.150	0.158	0.016
260	0.173	0.203	0.168	0.182	0.019
280	0.186	0.221	0.191	0.199	0.019
300	0.212	0.248	0.212	0.224	0.020
320	0.248	0.274	0.234	0.252	0.021
340	0.265	0.310	0.272	0.283	0.024
360	0.292	0.345	0.301	0.313	0.028
380	0.327	0.398	0.359	0.362	0.035
400	0.372	0.448	0.389	0.403	0.040
420	0.434	0.513	0.442	0.463	0.044
440	0.522	0.540	0.469	0.510	0.037

<b>C 3</b>					
<b>P</b>	<b><math>\Delta V1/V_0</math></b>	<b><math>\Delta V2/V_0</math></b>	<b><math>\Delta V3/V_0</math></b>	<b>media <math>\Delta V/V_0</math></b>	<b>dev.st</b>
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
20	0.014	0.010	0.006	0.010	0.004
40	0.024	0.020	0.016	0.020	0.004
60	0.039	0.024	0.024	0.029	0.009
80	0.049	0.039	0.039	0.043	0.006
100	0.059	0.045	0.045	0.050	0.008
120	0.075	0.059	0.059	0.064	0.009
140	0.099	0.079	0.075	0.084	0.013
160	0.108	0.089	0.089	0.095	0.011
180	0.118	0.099	0.099	0.105	0.011
200	0.138	0.118	0.118	0.125	0.011
220	0.160	0.138	0.138	0.145	0.013
240	0.178	0.154	0.158	0.163	0.013
260	0.197	0.174	0.193	0.188	0.013
280	0.217	0.197	0.197	0.204	0.011
300	0.256	0.217	0.217	0.230	0.023
320	0.276	0.237	0.237	0.250	0.023
340	0.296	0.256	0.266	0.273	0.021
360	0.316	0.286	0.286	0.296	0.017
380	0.355	0.306	0.316	0.325	0.026
400	0.395	0.335	0.345	0.358	0.032
420	0.464	0.395	0.385	0.414	0.043
440	0.473	0.454	0.503	0.477	0.025

<b>C 4</b>					
<b>P</b>	<b><math>\Delta V1/V_0</math></b>	<b><math>\Delta V2/V_0</math></b>	<b><math>\Delta V3/V_0</math></b>	<b>media <math>\Delta V/V_0</math></b>	<b>dev.st</b>
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
20	0.028	0.014	0.008	0.017	0.010
40	0.034	0.028	0.020	0.027	0.007
60	0.042	0.042	0.036	0.040	0.003
80	0.056	0.056	0.048	0.053	0.005
100	0.070	0.070	0.064	0.068	0.003
120	0.084	0.084	0.084	0.084	0.000
140	0.098	0.098	0.098	0.098	0.000
160	0.112	0.112	0.112	0.112	0.000
180	0.140	0.140	0.126	0.135	0.008
200	0.162	0.154	0.154	0.157	0.005
220	0.174	0.182	0.176	0.177	0.004
240	0.196	0.202	0.196	0.198	0.003
260	0.224	0.224	0.224	0.224	0.000
280	0.252	0.266	0.252	0.257	0.008
300	0.280	0.280	0.280	0.280	0.000
320	0.322	0.308	0.308	0.313	0.008
340	0.364	0.364	0.350	0.359	0.008
360	0.392	0.406	0.378	0.392	0.014
380	0.443	0.434	0.420	0.432	0.011
400	0.518	0.490	0.462	0.490	0.028
420	0.560	0.532	0.518	0.537	0.021
440	0.644	0.588	0.560	0.598	0.043

<b>C 5</b>					
<b>P</b>	<b><math>\Delta V1/V_0</math></b>	<b><math>\Delta V2/V_0</math></b>	<b><math>\Delta V3/V_0</math></b>	<b>media <math>\Delta V/V_0</math></b>	<b>dev.st</b>
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
20	0.012	0.015	0.010	0.012	0.002
40	0.024	0.017	0.020	0.020	0.004
60	0.032	0.032	0.029	0.031	0.001
80	0.044	0.037	0.037	0.039	0.004
100	0.061	0.056	0.049	0.055	0.006
120	0.073	0.073	0.061	0.069	0.007
140	0.098	0.085	0.085	0.089	0.007
160	0.110	0.098	0.098	0.102	0.007
180	0.122	0.122	0.115	0.120	0.004
200	0.146	0.134	0.134	0.138	0.007
220	0.163	0.159	0.159	0.160	0.003
240	0.195	0.183	0.178	0.185	0.009
260	0.219	0.202	0.200	0.207	0.011
280	0.239	0.232	0.232	0.234	0.004
300	0.263	0.256	0.256	0.259	0.004
320	0.298	0.280	0.280	0.286	0.010
340	0.341	0.317	0.317	0.325	0.014
360	0.390	0.359	0.354	0.367	0.020
380	0.439	0.402	0.402	0.415	0.021
400	0.488	0.451	0.451	0.463	0.021
420	0.537	0.488	0.483	0.502	0.030
440	0.658	0.524	0.585	0.589	0.067

### **TEST DI CARATTERIZZAZIONE: CURVA PRESSIONE-DEFORMAZIONE**

<b>C 1</b>					
<b>P</b>	<b>D1/D<sub>0</sub></b>	<b>D2/D<sub>0</sub></b>	<b>D3/D<sub>0</sub></b>	<b>Def% media</b>	<b>dev.st</b>
0	1.00	1.00	1.00	0.00	0.00
20	1.00	1.01	1.01	0.67	0.48
40	1.01	1.02	1.01	1.19	0.50
60	1.01	1.02	1.02	1.56	0.22
80	1.02	1.03	1.03	2.26	0.61
100	1.02	1.03	1.02	2.67	0.38
120	1.03	1.03	1.03	3.11	0.33
140	1.03	1.04	1.04	3.44	0.38
160	1.03	1.05	1.04	3.89	0.67
180	1.04	1.05	1.04	4.30	0.56
200	1.05	1.06	1.05	4.93	0.64
220	1.05	1.06	1.05	5.41	0.63
240	1.05	1.06	1.05	5.44	0.51
260	1.06	1.07	1.07	6.44	0.48
280	1.07	1.07	1.07	7.04	0.13
300	1.07	1.08	1.08	7.63	0.50
320	1.08	1.09	1.08	8.22	0.67
340	1.09	1.08	1.09	8.93	0.45
360	1.10	1.10	1.10	10.26	0.06
380	1.11	1.11	1.11	10.96	0.26
400	1.12	1.12	1.12	11.78	0.22
420	1.14	1.12	1.12	12.81	0.74
440	1.14		1.14	13.89	0.47

<b>C 1bis</b>					
<b>P</b>	<b>D1/D<sub>0</sub></b>	<b>D2/D<sub>0</sub></b>	<b>D3/D<sub>0</sub></b>	<b>Def% media</b>	<b>dev.st</b>
0	1.00	1.00	1.00	0.00	0.00
20	1.00	1.00	1.00	0.00	0.00
40	1.01	1.01	1.00	0.67	0.58
60	1.02	1.02	1.01	1.67	0.58
80	1.02	1.02	1.02	2.00	0.00
100	1.03	1.03	1.03	3.00	0.00
120	1.03	1.03	1.03	3.00	0.00
140	1.04	1.03	1.03	3.33	0.58
160	1.04	1.04	1.04	4.00	0.00
180	1.05	1.04	1.05	4.67	0.58
200	1.05	1.04	1.05	4.67	0.58
220	1.06	1.06	1.06	6.00	0.00
240	1.07	1.06	1.06	6.33	0.58
260	1.07	1.07	1.07	7.00	0.00
280	1.08	1.07	1.07	7.33	0.58
300	1.08	1.08	1.08	8.00	0.00
320	1.08	1.08	1.08	8.00	0.00
340	1.09	1.10	1.08	9.00	1.00
360	1.10	1.10	1.10	10.00	0.00
380	1.10	1.11	1.10	10.33	0.58
400	1.11	1.13	1.10	11.33	1.53
420	1.12	1.13	1.12	12.33	0.58
440	1.14	1.13	1.13	13.33	0.58

<b>C 2</b>					
<b>P</b>	<b>D1/D<sub>0</sub></b>	<b>D2/D<sub>0</sub></b>	<b>D3/D<sub>0</sub></b>	<b>Def% media</b>	<b>dev.st</b>
0	1.00	1.00	1.00	0.00	0.00
20	1.00	1.01	1.01	0.70	0.23
40	1.00	1.01	1.02	1.00	0.40
60	1.01	1.01	1.02	1.30	0.32
80	1.01	1.02	1.02	1.74	0.36
100	1.02	1.03	1.03	2.37	0.23
120	1.02	1.03	1.03	2.56	0.40
140	1.02	1.04	1.04	3.26	0.53
160	1.03	1.04	1.04	3.67	0.58
180	1.04	1.04	1.05	4.00	0.29
200	1.04	1.05	1.05	4.59	0.39
220	1.04	1.06	1.06	5.19	0.61
240	1.05	1.06	1.06	5.78	0.38
260	1.05	1.07	1.07	6.22	0.51
280	1.07	1.08	1.08	7.11	0.29
300	1.07	1.08	1.08	7.85	0.26
320	1.08	1.09	1.09	8.56	0.11
340	1.09	1.10	1.10	9.37	0.13
360	1.10	1.11	1.11	10.22	0.11
380	1.10	1.12	1.12	11.00	0.40
400	1.12	1.12	1.12	11.93	0.46
420	1.13	1.13	1.13	13.15	0.28
440	1.14	1.14	1.15	14.11	0.22

<b>C 3</b>					
<b>P</b>	<b>D1/D<sub>0</sub></b>	<b>D2/D<sub>0</sub></b>	<b>D3/D<sub>0</sub></b>	<b>Def% media</b>	<b>dev.st</b>
0	0.98	0.99	1.00	0.00	0.00
20	0.99	0.99	1.00	0.52	0.17
40	0.98	0.99	1.01	0.52	0.45
60	0.99	1.00	1.01	1.11	0.38
80	1.00	1.00	1.01	1.30	0.36
100	1.00	1.00	1.02	1.67	0.51
120	1.00	1.00	1.02	1.78	0.62
140	1.00	1.01	1.02	2.00	0.56
160	1.00	1.01	1.02	2.15	0.42
180	1.01	1.01	1.03	2.70	0.42
200	1.01	1.02	1.04	3.22	0.59
220	1.01	1.02	1.04	3.52	0.74
240	1.02	1.03	1.04	4.30	0.34
260	1.03	1.03	1.05	4.78	0.40
280	1.03	1.04	1.05	5.11	0.62
300	1.04	1.05	1.06	5.81	0.45
320	1.04	1.06	1.07	6.44	0.44
340	1.06	1.06	1.07	7.37	0.17
360	1.06	1.07	1.08	7.93	0.34
380	1.07	1.08	1.09	8.81	0.32
400	1.08	1.08	1.10	9.74	0.46
420	1.09	1.10	1.10	10.63	0.23
440	1.10	1.10	1.11	11.67	0.62

<b>C 4</b>					
<b>P</b>	<b>D1/D<sub>0</sub></b>	<b>D2/D<sub>0</sub></b>	<b>D3/D<sub>0</sub></b>	<b>Def% media</b>	<b>dev.st</b>
0	1.00	1.00	1.00	0.00	0.00
20	1.00	1.00	1.00	0.00	0.00
40	1.01	1.00	1.00	0.33	0.58
60	1.02	1.01	1.00	1.00	1.00
80	1.02	1.01	1.00	1.00	1.00
100	1.02	1.01	1.01	1.33	0.58
120	1.02	1.01	1.02	1.67	0.58
140	1.03	1.01	1.02	2.00	1.00
160	1.03	1.02	1.02	2.33	0.58
180	1.03	1.02	1.02	2.33	0.58
200	1.04	1.03	1.02	3.00	1.00
220	1.04	1.03	1.03	3.33	0.58
240	1.04	1.03	1.03	3.33	0.58
260	1.05	1.03	1.04	4.00	1.00
280	1.05	1.04	1.04	4.33	0.58
300	1.06	1.04	1.05	5.00	1.00
320	1.06	1.05	1.05	5.33	0.58
340	1.07	1.06	1.06	6.33	0.58
360	1.07	1.06	1.06	6.33	0.58
380	1.07	1.07	1.06	6.67	0.58
400	1.10	1.08	1.07	8.33	1.53
420	1.10	1.08	1.07	8.33	1.53
440	1.10	1.09	1.08	9.00	1.00

C 5					
P	D1/D <sub>0</sub>	D2/D <sub>0</sub>	D3/D <sub>0</sub>	Def% media	dev.st
0	1.00	1.00	1.00	0.00	0.00
20	1.00	1.00	1.00	0.00	0.00
40	1.01	1.01	1.01	1.00	0.00
60	1.02	1.02	1.03	2.33	0.58
80	1.03	1.03	1.03	3.00	0.00
100	1.03	1.04	1.03	3.33	0.58
120	1.03	1.04	1.04	3.67	0.58
140	1.04	1.04	1.04	4.00	0.00
160	1.05	1.04	1.05	4.67	0.58
180	1.05	1.05	1.05	5.00	0.00
200	1.06	1.05	1.05	5.33	0.58
220	1.06	1.06	1.06	6.00	0.00
240	1.06	1.06	1.06	6.00	0.00
260	1.07	1.07	1.07	7.00	0.00
280	1.08	1.07	1.08	7.67	0.58
300	1.08	1.08	1.08	8.00	0.00
320	1.09	1.08	1.09	8.67	0.58
340	1.09	1.09	1.09	9.00	0.00
360	1.10	1.09	1.10	9.67	0.58
380	1.11	1.10	1.10	10.33	0.58
400	1.12	1.11	1.11	11.33	0.58
420	1.12	1.12	1.12	12.00	0.00
440	1.13	1.12	1.12	12.33	0.58

### Pressione massima sopportata dalla guaina

Dimensioni dei campioni R1 e R2:

	L <sub>utile</sub> [mm]	OD [mm]	t [mm]	ID [mm]	V <sub>0</sub> interno [ml]
<b>R 1</b>	27.56	3.44	0.30	2.84	0.17
<b>R 2</b>	29.70	3.35	0.29	2.77	0.18

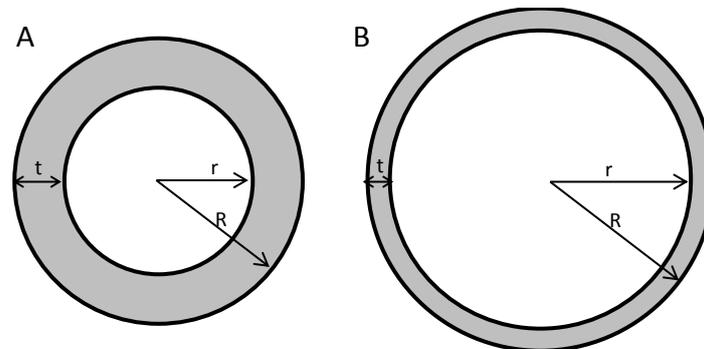
Risultati:

R 1		R 2	
P	Def%	P	Def%
0	0	0	0
40	0	40	1
80	1	80	2
120	2	120	4
160	4	160	5
200	4	200	6
240	5	240	7
280	6	280	9
320	7	320	9
360	8	360	11
400	9	400	12
440	11	440	13
480	13	480	16
520	13	520	17
560	14	560	18
600	16	600	20
640	18	640	22
680	22	680	26

## APPENDICE D

### Modello della corona circolare

La sezione del condotto tubulare (guaina in silicone o vaso sanguigno) può essere vista idealmente come una corona circolare.



**Figura D.1.** Rappresentazione della sezione del condotto tubulare in materiale incompressibile come una corona circolare:  $r$ = raggio interno,  $R$ = raggio esterno,  $t$ = spessore. (A) Sezione indeformata. (B) Sezione deformata: si nota che durante la deformazione ad un aumento del diametro corrisponde un assottigliamento dello spessore.

$R$  rappresenta il raggio esterno,  $r$  il raggio interno e  $t$  lo spessore.

A seguito dell'applicazione di una forza esterna, un materiale incompressibile si deforma mantenendo inalterato il suo volume: ciò significa che, applicando all'interno di un condotto una pressione, all'aumentare del diametro interno, diminuirà la dimensione dello spessore della parete (Figura D.1).

Infatti partendo dal presupposto che il volume iniziale  $V_i$  e finale  $V_f$  debbano rimanere uguali, è possibile scrivere la seguente identità:

$$V_i = V_f \quad (D.1)$$

Sapendo che

$$V = A \cdot L \quad (D.2)$$

con  $A$ = area della corona circolare, quindi pari a

$$A = \pi(R^2 - r^2) \quad (D.3)$$

risulta

$$A_i L = A_f L \quad (D.4)$$

cioè

$$\pi(R_i^2 - r_i^2)L = \pi(R_f^2 - r_f^2)L \quad (D.5)$$

Ipotizzando che la lunghezza L non possa variare e considerando che  $R = r + t$  si avrà

$$(r_i + t_i)^2 - r_i^2 = (r_f + t_f)^2 - r_f^2 \quad (D.6)$$

che semplificata diventa un'equazione di secondo grado, con incognita  $t_f$ , come di seguito mostrato:

$$t_f^2 + 2r_f t_f - (2r_i t_i + t_i^2) = 0 \quad (D.7)$$

Risolvendo l'equazione è possibile calcolare il valore dello spessore in configurazione deformata conoscendo la misura del raggio interno deformato e le misure dello spessore e del raggio interno iniziali:

$$t_f = \frac{-2r_f + \sqrt{4r_f^2 + 4(2r_i t_i + t_i^2)}}{2} \quad (D.8)$$

# APPENDICE E

## Collaudo del sistema di coltura

### TEST DI DEFORMAZIONE DELLA GUAINA SILICONICA IN ESERCIZIO

Caratteristiche geometriche dei campioni analizzati e numero (n) di prove effettuate:

	$L_{\text{utile}}$ [mm]	OD [mm]	t [mm]	ID [mm]	$V_0$ interno [ml]	n
<b>C 1</b>	27.56	3.44	0.30	2.84	0.17	3
<b>C 2</b>	29.70	3.35	0.29	2.77	0.18	3
<b>C 3</b>	30.22	3.26	0.29	2.68	0.17	3
<b>Media</b>	29.16	3.35	0.29	2.76	0.17	

Risultati:

C 1			
Tempo [s]	Media D/D <sub>0</sub>		
0	1	1.9	1
0.1	1	2	1.005
0.2	1	2.1	1.01
0.3	1.005	2.2	1.02
0.4	1.025	2.3	1.015
0.5	1.03	2.4	1.045
0.6	1.04	2.5	1.055
0.7	1.07	2.6	1.07
0.8	1.08	2.7	1.08
0.9	1.09	2.8	1.095
1	1.09	2.9	1.095
1.1	1.07	3	1.085
1.2	1.055	3.1	1.075
1.3	1.04	3.2	1.055
1.4	1.035	3.3	1.045
1.5	1.025	3.4	1.035
1.6	1.015	3.5	1.005
1.7	0.995	3.6	1
1.8	1	3.7	1
		3.8	1
		3.9	1

C 2	
Tempo [s]	Media D/D <sub>0</sub>
0	1
0.1	1.005
0.2	1.005
0.3	1.01
0.4	1.015
0.5	1.015
0.6	1.06
0.7	1.075
0.8	1.075
0.9	1.08
1	1.075
1.1	1.075
1.2	1.075
1.3	1.05
1.4	1.035
1.5	1.035
1.6	1.01
1.7	1.005
1.8	1
1.9	1.005
2	1
2.1	1.005
2.2	1.01
2.3	1.015
2.4	1.025
2.5	1.03
2.6	1.045
2.7	1.05
2.8	1.08
2.9	1.08
3	1.08
3.1	1.08
3.2	1.07
3.3	1.035
3.4	1.025
3.5	1.015
3.6	1.01
3.7	1.01
3.8	1
3.9	1.005

C 3	
Tempo [s]	Media D/D <sub>0</sub>
0	0.995
0.1	1
0.2	1
0.3	1
0.4	1.02
0.5	1.04
0.6	1.055
0.7	1.08
0.8	1.085
0.9	1.1
1	1.095
1.1	1.09
1.2	1.085
1.3	1.065
1.4	1.05
1.5	1.05
1.6	1.04
1.7	1.015
1.8	0.995
1.9	0.99
2	1.005
2.1	1
2.2	1
2.3	1.02
2.4	1.02
2.5	1.05
2.6	1.05
2.7	1.055
2.8	1.09
2.9	1.105
3	1.1
3.1	1.105
3.2	1.085
3.3	1.085
3.4	1.07
3.5	1.05
3.6	1.025
3.7	1.015
3.8	1.01
3.9	1

# APPENDICE F

## Codice Matlab del sistema di analisi delle immagini

```

% Le immagini devono essere salvate in formato .JPG ed in ordine
% progressivo crescente partendo da 1.

% Il codice effettua il calcolo su ciascuna immagine e riporta in
% conclusione il grafico di diametro normalizzato rispetto al diametro
% iniziale del lume (frame=1)

% I risultati sono contenuti nella matrice C [#frames x 2]:
% colonna1 = misura del diametro;
% colonna2 = misura normalizzata del diametro;

clear all
clc

prompt={'Numero di frames/immagini'};
titolo='Info';
numlines=1;
defaultanswer={'21'};
answer=inputdlg(prompt,titolo,numlines,defaultanswer);
%Numero totale di frames/immagini
N=str2double(cell2mat(answer(1,1)));

% Numero sezioni di misura aggiuntive rispetto alla mezzaria
% Considero 5 sezioni in prossimità della mezzaria (passo 2%)
N_s = 2;
passo=0.02;

%Genero matrice salvataggio per ogni sezione
C=zeros(N,2);

%Genero matrice salvataggio su tutte le sezioni
C_sezioni=zeros(N,N_s*2+1);
C_sezioni_norm=zeros(N,N_s*2+1);
cont_s=0;
for s=(-N_s):(N_s)
    cont_s=cont_s+1;
    for j=1:N
        I = imread(num2str(j, '%2d.JPG'));
        %figure, imshow(I)
        I_bw = im2bw(I,0.3);
        if(j==1) && (s==-N_s)
            imshow(I_bw)

            % Numero pixel righe
            rows=size(I_bw,1);
            cols=size(I_bw,2);
        end
    end
end

```

```

        % Individuo colonna centrale
        mean_col = round(cols/2);
    end

    % Valuto sezione di interesse per la misura
    sezione= mean_col + round(s*(passo*cols));

    if(j==1)
        hold on
        plot(sezione,1:rows,'r--')
        hold off
    end

    % Calcolo diametro del lume [numero di pixels]
    count=0;
    for i=1:rows
        if(I_bw(i,sezione)==1)
            count=count+1;
        end
    end

    % Salvataggio valore assoluto
    C(j,1)=count;

    %Normalizzo rispetto al valore iniziale
    C(j,2)=C(j,1)/C(1,1);

end

%Salvataggio su tutte le sezioni
C_sezioni(:,cont_s) = C(:,1);
C_sezioni_norm(:,cont_s) = C(:,2);
end

% Media diametro su tutte le sezioni
C_sezioni_media = mean(C_sezioni,2);

% Media normalizzata su tutte le sezioni
C_sezioni_norm_media = mean(C_sezioni_norm,2);

figure
plot(C_sezioni_norm_media(:,1),'b-','LineWidth',2)
hold on
for k=1:size(C_sezioni_norm,2)
    plot(C_sezioni_norm(:,k),'g--');
end

```

## APPENDICE G

### Esperimenti con campioni vascolari per la verifica del modello

#### RISULTATI RICAVALI DAL MODELLO PER VASI NATIVI CON DIAMETRO INTERNO PARAGONABILE A QUELLO DELLA GUAINA

Cor 1									
P [mmHg]	Silicone		Coronaria	Sistema					
	$\Delta OD/OD_0$ %	$I_{D(S)}$ [mmHg <sup>-1</sup> x10 <sup>-4</sup> ]	$I_{D(V)}$ [mmHg <sup>-1</sup> x10 <sup>-2</sup> ]	$I_{Deq}$ [mmHg <sup>-1</sup> x10 <sup>-4</sup> ]	$\Delta ID/ID_0$ %	ID [mm]	t [mm]	OD [mm]	$\Delta OD/OD_0$ %
0	0	0	1.0751	0	0	3.12	0.557	4.23	0
20	0.31	1.57	1.0751	1.55	0.31	3.13	0.555	4.24	0.17
40	0.78	1.96	1.0751	1.92	0.77	3.14	0.554	4.25	0.42
60	1.49	2.49	1.0751	2.43	1.46	3.17	0.551	4.27	0.80
80	1.88	2.35	1.0751	2.30	1.84	3.18	0.549	4.28	1.00
100	2.40	2.4	1.0751	2.34	2.34	3.19	0.547	4.29	1.28
120	2.63	2.19	1.0751	2.15	2.58	3.20	0.546	4.29	1.41
140	3.01	2.15	1.0751	2.11	2.95	3.21	0.545	4.30	1.61
160	3.45	2.16	1.0751	2.11	3.38	3.23	0.543	4.31	1.85
180	3.83	2.13	1.0751	2.09	3.76	3.24	0.542	4.32	2.06
200	4.29	2.15	1.0751	2.10	4.21	3.25	0.540	4.33	2.31
220	4.91	2.23	1.0751	2.19	4.81	3.27	0.538	4.35	2.64
240	5.20	2.17	1.0751	2.12	5.09	3.28	0.536	4.35	2.80
260	5.91	2.27	1.0751	2.23	5.79	3.30	0.534	4.37	3.18
280	6.43	2.3	1.0751	2.25	6.30	3.32	0.532	4.38	3.47
300	7.05	2.35	1.0751	2.30	6.90	3.34	0.530	4.39	3.80
320	7.54	2.36	1.0751	2.30	7.38	3.35	0.528	4.41	4.07
340	8.33	2.45	1.0751	2.40	8.15	3.37	0.525	4.42	4.50
360	9.07	2.52	1.0751	2.46	8.86	3.40	0.522	4.44	4.91
380	9.69	2.55	1.0751	2.49	9.46	3.42	0.520	4.46	5.24
400	10.74	2.69	1.0751	2.62	10.48	3.45	0.516	4.48	5.82
420	11.54	2.75	1.0751	2.68	11.26	3.47	0.514	4.50	6.26
440	12.39	2.82	1.0751	2.74	12.07	3.50	0.511	4.52	6.73

Cor 2									
P [mmHg]	Silicone		Coronaria	Sistema					
	$\Delta OD/OD_0$ %	$I_{D(S)}$ [mmHg <sup>-1</sup> x10 <sup>-4</sup> ]	$I_{D(V)}$ [mmHg <sup>-1</sup> x10 <sup>-2</sup> ]	$I_{Deq}$ [mmHg <sup>-1</sup> x10 <sup>-4</sup> ]	$\Delta ID/ID_0$ %	ID [mm]	t [mm]	OD [mm]	$\Delta OD/OD_0$ %
0	0	0	1.0751	0	0	3.03	0.816	4.66	0
20	0.31	1.57	1.0751	1.55	0.31	3.04	0.814	4.67	0.13
40	0.78	1.96	1.0751	1.92	0.77	3.05	0.812	4.68	0.33
60	1.49	2.49	1.0751	2.43	1.46	3.07	0.808	4.69	0.62
80	1.88	2.35	1.0751	2.3	1.84	3.09	0.806	4.70	0.78
100	2.40	2.4	1.0751	2.34	2.34	3.10	0.804	4.71	1.00
120	2.63	2.19	1.0751	2.15	2.58	3.11	0.803	4.71	1.10
140	3.01	2.15	1.0751	2.11	2.95	3.12	0.801	4.72	1.26
160	3.45	2.16	1.0751	2.11	3.38	3.13	0.798	4.73	1.44
180	3.83	2.13	1.0751	2.09	3.76	3.14	0.796	4.74	1.60
200	4.29	2.15	1.0751	2.1	4.21	3.16	0.794	4.75	1.80
220	4.91	2.23	1.0751	2.19	4.81	3.18	0.791	4.76	2.06
240	5.20	2.17	1.0751	2.12	5.09	3.18	0.790	4.76	2.18
260	5.91	2.27	1.0751	2.23	5.79	3.21	0.786	4.78	2.48
280	6.43	2.3	1.0751	2.25	6.30	3.22	0.784	4.79	2.71
300	7.05	2.35	1.0751	2.3	6.90	3.24	0.781	4.80	2.97
320	7.54	2.36	1.0751	2.3	7.38	3.25	0.778	4.81	3.18
340	8.33	2.45	1.0751	2.4	8.15	3.28	0.775	4.83	3.52
360	9.07	2.52	1.0751	2.46	8.86	3.30	0.771	4.84	3.84
380	9.69	2.55	1.0751	2.49	9.46	3.32	0.768	4.85	4.10
400	10.74	2.69	1.0751	2.62	10.48	3.35	0.763	4.87	4.55
420	11.54	2.75	1.0751	2.68	11.26	3.37	0.760	4.89	4.90
440	12.39	2.82	1.0751	2.74	12.07	3.40	0.756	4.91	5.27

Cor 3									
P [mmHg]	Silicone		Coronaria	Sistema					
	$\Delta OD/OD_0$ %	$I_{D(S)}$ [mmHg <sup>-1</sup> x10 <sup>-4</sup> ]	$I_{D(V)}$ [mmHg <sup>-1</sup> x10 <sup>-2</sup> ]	$I_{Deq}$ [mmHg <sup>-1</sup> x10 <sup>-4</sup> ]	$\Delta ID/ID_0$ %	ID [mm]	t [mm]	OD [mm]	$\Delta OD/OD_0$ %
0	0	0	1.0751	0	0	3.08	0.756	4.59	0
20	0.31	1.57	1.0751	1.55	0.31	3.09	0.754	4.60	0.14
40	0.78	1.96	1.0751	1.92	0.77	3.10	0.752	4.61	0.35
60	1.49	2.49	1.0751	2.43	1.46	3.12	0.749	4.62	0.66
80	1.88	2.35	1.0751	2.3	1.84	3.14	0.747	4.63	0.83
100	2.40	2.4	1.0751	2.34	2.34	3.15	0.744	4.64	1.06
120	2.63	2.19	1.0751	2.15	2.58	3.16	0.743	4.65	1.17
140	3.01	2.15	1.0751	2.11	2.95	3.17	0.741	4.65	1.34
160	3.45	2.16	1.0751	2.11	3.38	3.18	0.739	4.66	1.54
180	3.83	2.13	1.0751	2.09	3.76	3.20	0.737	4.67	1.71
200	4.29	2.15	1.0751	2.1	4.21	3.21	0.735	4.68	1.91
220	4.91	2.23	1.0751	2.19	4.81	3.23	0.732	4.69	2.19
240	5.20	2.17	1.0751	2.12	5.09	3.24	0.731	4.70	2.32
260	5.91	2.27	1.0751	2.23	5.79	3.26	0.728	4.71	2.64
280	6.43	2.3	1.0751	2.25	6.30	3.27	0.725	4.72	2.88
300	7.05	2.35	1.0751	2.3	6.90	3.29	0.722	4.74	3.16
320	7.54	2.36	1.0751	2.3	7.38	3.31	0.720	4.75	3.38
340	8.33	2.45	1.0751	2.4	8.15	3.33	0.717	4.76	3.74
360	9.07	2.52	1.0751	2.46	8.86	3.35	0.713	4.78	4.08
380	9.69	2.55	1.0751	2.49	9.46	3.37	0.710	4.79	4.36
400	10.74	2.69	1.0751	2.62	10.48	3.40	0.706	4.81	4.84
420	11.54	2.75	1.0751	2.68	11.26	3.43	0.702	4.83	5.21
440	12.39	2.82	1.0751	2.74	12.07	3.45	0.699	4.85	5.60

IMA A									
P [mmHg]	Silicone		IMA	Sistema					
	$\Delta OD/OD_0$ %	$I_{D(S)}$ [mmHg <sup>-1</sup> x10 <sup>-4</sup> ]	$I_{D(V)}$ [mmHg <sup>-1</sup> x10 <sup>-2</sup> ]	$I_{Deq}$ [mmHg <sup>-1</sup> x10 <sup>-4</sup> ]	$\Delta ID/ID_0$ %	ID [mm]	t [mm]	OD [mm]	$\Delta OD/OD_0$ %
0	0	0	1.019	0	0	3.14	0.373	3.88	0
20	0.31	1.57	1.019	1.55	0.31	3.15	0.372	3.89	0.20
40	0.78	1.96	1.019	1.92	0.77	3.16	0.371	3.90	0.50
60	1.49	2.49	1.019	2.43	1.46	3.18	0.369	3.92	0.95
80	1.88	2.35	1.019	2.30	1.84	3.19	0.368	3.93	1.20
100	2.40	2.4	1.019	2.34	2.34	3.21	0.366	3.94	1.53
120	2.63	2.19	1.019	2.15	2.57	3.22	0.366	3.95	1.69
140	3.01	2.15	1.019	2.10	2.94	3.23	0.365	3.96	1.93
160	3.45	2.16	1.019	2.11	3.38	3.24	0.363	3.97	2.22
180	3.83	2.13	1.019	2.09	3.75	3.25	0.362	3.98	2.47
200	4.29	2.15	1.019	2.10	4.20	3.27	0.361	3.99	2.76
220	4.91	2.23	1.019	2.18	4.80	3.29	0.359	4.01	3.16
240	5.20	2.17	1.019	2.12	5.09	3.30	0.359	4.01	3.35
260	5.91	2.27	1.019	2.22	5.78	3.32	0.357	4.03	3.81
280	6.43	2.3	1.019	2.25	6.29	3.33	0.355	4.04	4.15
300	7.05	2.35	1.019	2.30	6.89	3.35	0.354	4.06	4.55
320	7.54	2.36	1.019	2.30	7.37	3.37	0.352	4.07	4.87
340	8.33	2.45	1.019	2.39	8.14	3.39	0.350	4.09	5.38
360	9.07	2.52	1.019	2.46	8.85	3.41	0.348	4.11	5.86
380	9.69	2.55	1.019	2.49	9.45	3.43	0.347	4.13	6.26
400	10.74	2.69	1.019	2.62	10.47	3.46	0.344	4.15	6.94
420	11.54	2.75	1.019	2.68	11.24	3.49	0.342	4.17	7.47
440	12.39	2.82	1.019	2.74	12.06	3.51	0.340	4.19	8.02

**RISULTATI RICAIVATI DAL MODELLO PER VASI NATIVI CON DIAMETRO  
INTERNO MAGGIORE RISPETTO ALLA GUAINA SILICONICA (ID>3.1 mm)**

Cor 4							
P [mmHg]	$I_{D(s)}$ [mmHg <sup>-1</sup> ×10 <sup>-4</sup> ]	$I_{Deq}$ [mmHg <sup>-1</sup> ×10 <sup>-4</sup> ]	$\Delta ID/ID_0$ sist %	ID [mm]	t [mm]	OD [mm]	$\Delta OD/OD_0$ %
200	2.51	2.45	0	3.25	0.540	4.33	0
240	2.51	2.45	0.98	3.28	0.536	4.35	0.55
280	2.69	2.62	2.10	3.32	0.532	4.38	1.19
320	2.50	2.45	2.94	3.35	0.528	4.40	1.66
360	2.64	2.58	4.13	3.38	0.524	4.43	2.35
400	2.63	2.57	5.13	3.42	0.520	4.46	2.92
440	2.73	2.66	6.39	3.46	0.515	4.49	3.65
480	3.02	2.94	8.24	3.52	0.508	4.53	4.72
520	2.89	2.81	9.00	3.54	0.506	4.55	5.17
560	2.86	2.79	10.03	3.58	0.502	4.58	5.77
600	3.00	2.92	11.69	3.63	0.496	4.62	6.74
640	3.13	3.04	13.38	3.68	0.490	4.67	7.74
680	3.53	3.42	16.42	3.78	0.480	4.74	9.55

IMA B							
P [mmHg]	$I_{D(s)}$ [mmHg <sup>-1</sup> ×10 <sup>-4</sup> ]	$I_{Deq}$ [mmHg <sup>-1</sup> ×10 <sup>-4</sup> ]	$\Delta ID/ID_0$ sist %	ID [mm]	t [mm]	OD [mm]	$\Delta OD/OD_0$ %
120	2.51	2.45	0	3.19	0.340	3.87	0
160	2.82	2.74	1.10	3.22	0.337	3.90	0.75
200	2.51	2.45	1.96	3.25	0.335	3.92	1.33
240	2.51	2.45	2.93	3.28	0.332	3.95	2.00
280	2.69	2.62	4.19	3.32	0.329	3.98	2.86
320	2.50	2.44	4.89	3.35	0.327	4.00	3.35
360	2.64	2.58	6.19	3.39	0.323	4.03	4.24
400	2.63	2.56	7.18	3.42	0.321	4.06	4.93
440	2.73	2.66	8.51	3.46	0.318	4.10	5.86
480	3.02	2.94	10.58	3.53	0.313	4.15	7.30
520	2.89	2.81	11.24	3.55	0.311	4.17	7.76
560	2.86	2.78	12.25	3.58	0.309	4.20	8.47
600	3.00	2.92	14.01	3.64	0.305	4.25	9.71
640	3.13	3.04	15.79	3.69	0.300	4.29	10.97
680	3.53	3.41	19.12	3.80	0.293	4.39	13.35

IMA C							
P [mmHg]	$I_{D(s)}$ [mmHg <sup>-1</sup> x10 <sup>-4</sup> ]	$I_{Deq}$ [mmHg <sup>-1</sup> x10 <sup>-4</sup> ]	$\Delta ID/ID_0$ sist %	ID [mm]	t [mm]	OD [mm]	$\Delta OD/OD_0$ %
160	2.82	2.74	0	3.25	0.590	4.43	0
200	2.51	2.45	0.98	3.28	0.586	4.45	0.53
240	2.51	2.45	1.96	3.31	0.582	4.48	1.06
280	2.69	2.62	3.14	3.35	0.577	4.51	1.70
320	2.50	2.44	3.91	3.38	0.573	4.52	2.12
360	2.64	2.58	5.15	3.42	0.568	4.55	2.81
400	2.63	2.56	6.15	3.45	0.564	4.58	3.36
440	2.73	2.66	7.45	3.49	0.559	4.61	4.07
480	3.02	2.94	9.40	3.56	0.552	4.66	5.16
520	2.89	2.81	10.12	3.58	0.549	4.68	5.57
560	2.86	2.78	11.13	3.61	0.545	4.70	6.14
600	3.00	2.92	12.84	3.67	0.539	4.74	7.10
640	3.13	3.04	14.57	3.72	0.532	4.79	8.09
680	3.53	3.41	17.76	3.83	0.521	4.87	9.91

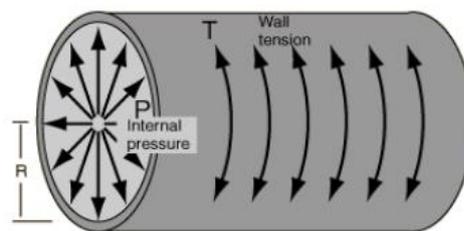
**RISULTATI RICAIVATI DAL MODELLO PER VASI NATIVI CON DIAMETRO  
INTERNO MINORE RISPETTO ALLA GUAINA SILICONICA (ID<3.1 mm)**

Cor 5								
P [mmHg]	Silicone		Sistema					
	$\Delta OD/OD_0$ silic. %	$I_{D(S)}$ [mmHg <sup>-1</sup> x10 <sup>-4</sup> ]	$I_{Deq}$ [mmHg <sup>-1</sup> x10 <sup>-4</sup> ]	$\Delta ID/ID_0$ sistema %	ID da montato [mm]	t [mm]	OD da montato [mm]	$\Delta OD/OD_0$ %
0	0	0	0	0	3.09	0.654	4.40	0.00
20	0.31	1.57	1.55	0.30	3.10	0.652	4.40	0.20
40	0.78	1.96	1.92	0.80	3.11	0.650	4.41	0.40
60	1.49	2.49	2.43	1.50	3.14	0.647	4.43	0.70
80	1.88	2.35	2.30	1.80	3.15	0.645	4.44	0.90
100	2.40	2.40	2.34	2.30	3.16	0.643	4.45	1.20
120	2.63	2.19	2.15	2.60	3.17	0.642	4.45	1.30
140	3.01	2.15	2.11	2.90	3.18	0.640	4.46	1.50
160	3.45	2.16	2.11	3.40	3.20	0.638	4.47	1.70
180	3.83	2.13	2.09	3.80	3.21	0.637	4.48	1.90
200	4.29	2.15	2.10	4.20	3.22	0.635	4.49	2.10
220	4.91	2.23	2.19	4.80	3.24	0.632	4.50	2.40
240	5.20	2.17	2.12	5.10	3.25	0.631	4.51	2.50
260	5.91	2.27	2.22	5.80	3.27	0.628	4.53	2.90
280	6.43	2.30	2.25	6.30	3.29	0.626	4.54	3.20
300	7.05	2.35	2.30	6.90	3.30	0.623	4.55	3.50
320	7.54	2.36	2.30	7.40	3.32	0.621	4.56	3.70
340	8.33	2.45	2.40	8.10	3.34	0.618	4.58	4.10
360	9.07	2.52	2.46	8.90	3.36	0.615	4.59	4.50
380	9.69	2.55	2.49	9.50	3.38	0.612	4.61	4.80
400	10.74	2.69	2.62	10.50	3.41	0.608	4.63	5.30
420	11.54	2.75	2.68	11.30	3.44	0.605	4.65	5.70
440	12.39	2.82	2.74	12.10	3.46	0.602	4.67	6.10

## APPENDICE H

### Legge di Laplace

Si consideri un condotto di geometria cilindrica (vaso sanguigno) caratterizzato da un rapporto spessore/diametro molto minore di 1 ( $s/d < 0.1$ ); vale pertanto l'ipotesi di condotto a pareti sottili. Con riferimento alla Figura H.1, si consideri una sezione longitudinale del vaso su cui agiscono la pressione del fluido P (diretta sulla parete interna) e la tensione superficiale T (agente nell'interno delle pareti).



**Figura H.1.** Forze agenti sul condotto.

Per evitare che il condotto collassi è necessario che le forze agenti su di esso siano in equilibrio. Considerando che la forza in parete è data dal prodotto dello sforzo circonferenziale per l'area su cui agisce ( $A=tL$ ), si avrà

$$F_{parete} = \sigma_{\theta} t L \quad (H.1)$$

in cui  $t$  è lo spessore del condotto e  $L$  la sua lunghezza.

L'equilibrio delle forze sarà allora

$$2PRL = 2\sigma_{\theta} t L \quad (H.2)$$

dove  $R$  rappresenta il raggio interno del condotto.

Dall'equazione H.2 si ricava l'equazione di Laplace

$$T = \sigma_{\theta} t = PR \quad (H.3)$$

in cui  $T$  rappresenta la tensione superficiale agente sulle pareti del condotto.

## APPENDICE I

# Risultati dei test di caratterizzazione dei campioni nativi

### TEST DI DISTENSIBILITÀ CON CORONARIE

Di ciascun campione vengono riportati la deformazione ricavata dai valori di diametro interno per ciascuna prova effettuata, la deformazione media e l'indice di distensibilità.

C 1						
P [mmHg]	$\Delta ID1/ID_0$	$\Delta ID2/ID_0$	$\Delta ID3/ID_0$	Def% media	P [mmHg]	$I_D$ [mmHg <sup>-1</sup> ·x10 <sup>-2</sup> ]
0	0	0	0	0	0-20	1.47
20	0.25	0.32	0.32	29.49	20-40	2.02
40	0.35	0.43	0.43	40.41	40-60	2.44
60	0.47	0.50	0.50	48.86	60-80	2.64
80	0.52	0.54	0.54	52.89	80-100	2.84
100	0.55	0.57	0.59	56.82	100-120	2.98
120	0.59	0.60	0.60	59.57	120-140	3.17
140	0.63	0.63	0.63	63.33	140-160	3.3
160	0.65	0.67	0.67	65.97	160-180	3.38
180	0.67	0.68	0.68	67.53	180-200	3.48
200	0.70	0.70	0.70	69.59	200-220	3.56
220	0.71	0.71	0.71	71.12	220-240	3.63
240	0.73	0.73	0.73	72.64	240-260	3.71
260	0.74	0.74	0.74	74.14	260-280	3.76
280	0.74	0.76	0.76	75.14	280-300	3.83
300	0.76	0.77	0.77	76.62	300-320	3.95
320	0.79	0.80	0.79	79.06	320-340	4.05
340	0.80	0.82	0.82	80.99	340-360	4.12
360	0.82	0.83	0.83	82.42	360-380	4.19
380	0.83	0.84	0.84	83.85	380-400	4.26
400	0.84	0.86	0.86	85.26	400-420	4.33
420	0.86	0.87	0.87	86.66	420-440	4.4
440	0.87	0.87	0.90	88.05		

C 2					
P [mmHg]	$\Delta ID1/ID_0$	$\Delta ID2/ID_0$	Def% media	P [mmHg]	$I_D$ [mmHg <sup>-1</sup> x10 <sup>-2</sup> ]
0	0	0	0	0-20	0.81
20	0.16	0.16	16.20	20-40	1.52
40	0.30	0.30	30.41	40-60	2
60	0.37	0.43	40.08	60-80	2.46
80	0.49	0.49	49.20	80-100	2.75
100	0.55	0.55	54.95	100-120	3.03
120	0.61	0.61	60.51	120-140	3.16
140		0.63	63.21	140-160	3.29
160		0.66	65.87	160-180	3.68
180		0.74	73.61	180-200	4.05
200		0.81	81.02	200-220	4.52
220		0.90	90.45		

C 3					
P [mmHg]	$\Delta ID1/ID_0$	$\Delta ID2/ID_0$	Def% media	P [mmHg]	$I_D$ [mmHg <sup>-1</sup> x10 <sup>-2</sup> ]
0	0	0	0	0-20	0.94
20	0.17	0.20	18.78	20-40	1.33
40	0.25	0.28	26.51	40-60	1.69
60	0.33	0.35	33.80	60-80	1.84
80	0.36	0.37	36.73	80-100	1.92
100	0.37	0.40	38.45	100-120	2.09
120	0.42	0.42	41.84	120-140	2.2
140		0.44	44.05	140-160	2.42
160		0.48	48.37	160-180	2.52
180		0.51	50.49	180-200	2.63
200		0.53	52.58	200-220	2.83
220		0.57	56.67	220-240	3.03
240		0.61	60.65	240-260	3.13
260		0.63	62.61	260-280	3.32
280		0.67	66.45		

**TEST DI DISTENSIBILITÀ CON ARTERIE MAMMARIE**

Per ciascun campione vengono riportate la deformazione e l'indice di distensibilità.

P [mmHg]	$\Delta D/ID_0$				Def %			
	IMA1	IMA2	IMA3	IMA4	IMA1	IMA2	IMA3	IMA4
0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	0.07	0.50	0.14	0.10	7.3	50.1	14.0	10.1
40	0.16	0.80	0.24	0.19	16.2	79.7	24.1	19.4
60	0.21	0.96	0.34	0.28	20.5	96.3	33.5	28.0
80	0.25	1.10	0.45	0.40	24.6	110.0	45.3	40.0
100	0.29	1.25	0.60	0.47	28.5	124.5	60.1	47.4
120	0.32	1.40	0.75	0.60	32.4	139.5	74.5	60.1
140	0.38	1.54	0.90	0.70	38.0	153.6	90.1	69.8
160	0.43	1.71	1.03	0.82	43.3	170.9	103.1	81.9
180	0.45	1.86	1.14	0.92	45.1	185.9	113.9	92.4
200	0.52	1.97	1.20	1.03	51.8	196.6	119.5	103.2
220	0.57	2.16	1.24	1.15	56.7	215.9	124.2	115.0
240	0.60	2.31	1.28	1.27	59.9	231.0	128.2	127.1
260	0.71	2.41	1.32	1.36	70.5	241.4	132.1	136.3
280	0.85		1.37	1.43	84.6		137.2	143.0
300	0.98		1.40	1.54	97.8		140.4	154.4
320	1.10		1.44	1.60	110.1		143.5	159.9
340	1.22		1.47		121.7		146.6	
360	1.34		1.48		133.8		148.4	
380	1.41		1.51		141.2		151.4	
400	1.48		1.54		148.4		154.4	
420	1.54		1.57		154.4		157.3	
440	1.62		1.60		162.1		159.6	

P [mmHg]	$I_D$ [mmHg <sup>-1</sup> x10 <sup>-2</sup> ]			
	IMA1	IMA2	IMA3	IMA4
0-20	0.36	2.51	0.70	0.51
20-40	0.81	3.98	1.21	0.97
40-60	1.02	4.82	1.67	1.40
60-80	1.23	5.50	2.27	2.00
80-100	1.43	6.22	3.00	2.37
100-120	1.62	6.97	3.72	3.01
120-140	1.90	7.68	4.51	3.49
140-160	2.17	8.54	5.16	4.10
160-180	2.25	9.29	5.70	4.62
180-200	2.59	9.83	5.97	5.16
200-220	2.84	10.80	6.21	5.75
220-240	2.99	11.55	6.41	6.36
240-260	3.53	12.07	6.61	6.82
260-280	4.23		6.86	7.15
280-300	4.89		7.02	7.72
300-320	5.50		7.17	8.00
320-340	6.08		7.33	
340-360	6.69		7.42	
360-380	7.06		7.57	
380-400	7.42		7.72	
400-420	7.72		7.86	
420-440	8.11		7.98	

Nella seguente tabella vengono messe a confronto le deformazioni percentuali medie dei due tipi di vasi nativi testati.

P [mmHg]	IMA	CORONARIA
	Deformazione %	Deformazione %
0	0	0
20	20.4	21.5
40	34.9	32.5
60	44.6	40.9
80	55	46.3
100	65.1	50.1
120	76.6	54
140	87.9	56.9
160	99.8	60.1
180	109.3	63.9
200	117.8	67.7
220	128	72.8
240	136.5	
260	145.1	

## Bibliografia

- [1] B. D. Ratner, *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*, 2013.
- [2] N. Bono, and L. Casadonte, "Sviluppo di un sistema di coltura di segmenti di vena safena per lo studio *ex vivo* del *vein graft disease*," Politecnico di Milano, 2011.
- [3] M. Piola *et al.*, "A compact and automated *ex vivo* vessel culture system for the pulsatile pressure conditioning of human saphenous veins," *J Tissue Eng Regen Med*, Jul, 2013.
- [4] J. P. Vacanti, and R. Langer, "Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation," *Lancet*, vol. 354 Suppl 1, pp. SI32-4, Jul, 1999.
- [5] F. Angelini, "Trapianti: nel 2010 in Italia 511 pazienti sono morti in attesa di un organo," *Il Giornale*, 2011.
- [6] M. C. Tanzi, and A. Bianchi, *Approccio integrato per la medicina rigenerativa*, 2013.
- [7] R. Langer, and J. P. Vacanti, "Tissue engineering," *Science*, vol. 260, no. 5110, pp. 920-6, May, 1993.
- [8] C. A. Vacanti, "The history of tissue engineering," *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2006.
- [9] A. Jaklenec, "Progress in the Tissue Engineering and Stem Cell Industry: Are we there yet?," *Tissue engineering: Part B*, vol. 18, no. 3, pp. 155-166, 2012.
- [10] L. Teodori, and L. Ambrosio, "La fabbrica dei tessuti umani: il futuro busa alle porte," *EAI*, vol. 4-5, pp. 65-67, 2011.
- [11] M. S. Chapekar, "Tissue engineering: challenges and opportunities," *J Biomed Mater Res*, vol. 53, no. 6, pp. 617-20, 2000.
- [12] M. B. Chan-Park *et al.*, "Biomimetic control of vascular smooth muscle cell morphology and phenotype for functional tissue-engineered small-diameter blood vessels," *J Biomed Mater Res A*, vol. 88, no. 4, pp. 1104-21, Mar, 2009.
- [13] J. P. Stegeman, S. N. Kaszuba, and S. L. Rowe, "Review: advances in vascular tissue engineering using protein-based biomaterials," *Tissue Eng*, vol. 13, no. 11, pp. 2601-13, Nov, 2007.
- [14] R. M. Nerem, and A. Sambanis, "Tissue engineering: from biology to biological substitutes," *Tissue Eng*, vol. 1, no. 1, pp. 3-13, 1995.
- [15] I. Martin, D. Wendt, and M. Heberer, "The role of bioreactors in tissue engineering," *Trends Biotechnol*, vol. 22, no. 2, pp. 80-6, Feb, 2004.

- [16] D. Wendt *et al.*, "Bioreactors in tissue engineering: scientific challenges and clinical perspectives," *Adv Biochem Eng Biotechnol*, vol. 112, pp. 1-27, 2009.
- [17] O. Démariseau *et al.*, "Dynamic compression of cartilage constructs engineered from expanded human articular chondrocytes," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 310, no. 2, pp. 580-8, Oct, 2003.
- [18] V. L. Roger *et al.*, "Heart disease and stroke statistics--2012 update: a report from the American Heart Association," *Circulation*, vol. 125, no. 1, pp. e2-e220, Jan, 2012.
- [19] A. Redaelli, and F. Montecvecchi, *Biomeccanica. Analisi multiscala di tessuti biologici*, 2007.
- [20] O. E. Teebken, and A. Haverich, "Tissue engineering of small diameter vascular grafts," *Eur J Vasc Endovasc Surg*, vol. 23, no. 6, pp. 475-85, Jun, 2002.
- [21] J. Chlupáč, E. Filová, and L. Bacáková, "Blood vessel replacement: 50 years of development and tissue engineering paradigms in vascular surgery," *Physiol Res*, vol. 58 Suppl 2, pp. S119-39, 2009.
- [22] M. C. Tanzi, *Fondamenti di bioingegneria chimica: non solo biomateriali*, 2010.
- [23] B. C. Isenberg, C. Williams, and R. T. Tranquillo, "Small-diameter artificial arteries engineered in vitro," *Circ Res*, vol. 98, no. 1, pp. 25-35, Jan, 2006.
- [24] C. L. Stanfield, and W. J. Germann, *Fisiologia*, 2009.
- [25] D. G. Seifu *et al.*, "Small-diameter vascular tissue engineering," *Nat Rev Cardiol*, vol. 10, no. 7, pp. 410-21, Jul, 2013.
- [26] Y. Zhao *et al.*, "The development of a tissue-engineered artery using decellularized scaffold and autologous ovine mesenchymal stem cells," *Biomaterials*, vol. 31, no. 2, pp. 296-307, Jan, 2010.
- [27] Z. Tosun, and P. S. McFetridge, "Improved recellularization of ex vivo vascular scaffolds using directed transport gradients to modulate ECM remodeling," *Biotechnol Bioeng*, vol. 110, no. 7, pp. 2035-45, Jul, 2013.
- [28] N. Flamel, "I biopolimeri. Compostabili, bioriassorbibili o biodegradabili?," 2007.
- [29] S. P. Hoerstrup *et al.*, "Tissue engineering of small caliber vascular grafts," *Eur J Cardiothorac Surg*, vol. 20, no. 1, pp. 164-9, Jul, 2001.
- [30] M. Stekelenburg *et al.*, "Dynamic straining combined with fibrin gel cell seeding improves strength of tissue-engineered small-diameter vascular grafts," *Tissue Eng Part A*, vol. 15, no. 5, pp. 1081-9, May, 2009.
- [31] C. B. Weinberg, and E. Bell, "A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells," *Science*, vol. 231, no. 4736, pp. 397-400, Jan, 1986.

- [32] J. D. Berglund *et al.*, "A biological hybrid model for collagen-based tissue engineered vascular constructs," *Biomaterials*, vol. 24, no. 7, pp. 1241-54, Mar, 2003.
- [33] T. S. Girton, T. R. Oegema, and R. T. Tranquillo, "Exploiting glycation to stiffen and strengthen tissue equivalents for tissue engineering," *J Biomed Mater Res*, vol. 46, no. 1, pp. 87-92, Jul, 1999.
- [34] N. L'Heureux *et al.*, "A completely biological tissue-engineered human blood vessel," *FASEB J*, vol. 12, no. 1, pp. 47-56, Jan, 1998.
- [35] G. Konig, "Mechanical properties of completely autologous human tissue engineered blood vessels compared to human saphenous vein and mammary artery," *Biomaterials*, vol. 30, pp. 1542-1550, 2009.
- [36] R. Gauvin *et al.*, "A novel single-step self-assembly approach for the fabrication of tissue-engineered vascular constructs," *Tissue Eng Part A*, vol. 16, no. 5, pp. 1737-47, May, 2010.
- [37] J. M. Bourget *et al.*, "Human fibroblast-derived ECM as a scaffold for vascular tissue engineering," *Biomaterials*, vol. 33, no. 36, pp. 9205-13, Dec, 2012.
- [38] L. Khait, and R. K. Birla, "Bypassing the patient: comparison of biocompatible models for the future of vascular tissue engineering," *Cell Transplant*, vol. 21, no. 1, pp. 269-83, 2012.
- [39] M. Rodriguez *et al.*, "Development of a mechanically tuneable 3D scaffold for vascular reconstruction," *J Biomed Mater Res A*, vol. 100, no. 12, pp. 3480-9, Dec, 2012.
- [40] C. Williams, and T. M. Wick, "Perfusion bioreactor for small diameter tissue-engineered arteries," *Tissue Eng*, vol. 10, no. 5-6, pp. 930-41, 2004 May-Jun, 2004.
- [41] L. Buttafoco *et al.*, "Physical characterization of vascular grafts cultured in a bioreactor," *Biomaterials*, vol. 27, no. 11, pp. 2380-9, Apr, 2006.
- [42] B. Tschoeke *et al.*, "Development of a composite degradable/nondegradable tissue-engineered vascular graft," *Artif Organs*, vol. 32, no. 10, pp. 800-9, Oct, 2008.
- [43] F. Boccafoschi *et al.*, "The role of shear stress on mechanically stimulated engineered vascular substitutes: influence on mechanical and biological properties," *J Tissue Eng Regen Med*, vol. 6, no. 1, pp. 60-7, Jan, 2012.
- [44] D. Seliktar, R. M. Nerem, and Z. S. Galis, "Mechanical strain-stimulated remodeling of tissue-engineered blood vessel constructs," *Tissue Eng*, vol. 9, no. 4, pp. 657-66, Aug, 2003.
- [45] L. E. Niklason *et al.*, "Functional arteries grown in vitro," *Science*, vol. 284, no. 5413, pp. 489-93, Apr, 1999.

- [46] D. Seliktar *et al.*, "Dynamic mechanical conditioning of collagen-gel blood vessel constructs induces remodeling in vitro," *Ann Biomed Eng*, vol. 28, no. 4, pp. 351-62, Apr, 2000.
- [47] B. C. Isenberg, and R. T. Tranquillo, "Long-term cyclic distention enhances the mechanical properties of collagen-based media-equivalents," *Ann Biomed Eng*, vol. 31, no. 8, pp. 937-49, Sep, 2003.
- [48] J. Xu, and H. Ge, "Tissue-Engineered Vessel Strengthens Quickly under Physiological Deformation: Application of a New Perfusion Bioreactor with Machine Vision," *Journal of vascular research*, vol. 42, pp. 503-508, 2005.
- [49] Q. Xu *et al.*, "Induction of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 during acute hypertension," *Hypertension*, vol. 30, no. 1 Pt 1, pp. 106-11, Jul, 1997.
- [50] N. K. Weidenhamer, and R. T. Tranquillo, "Influence of cyclic mechanical stretch and tissue constraints on cellular and collagen alignment in fibroblast-derived cell sheets," *Tissue Eng Part C Methods*, vol. 19, no. 5, pp. 386-95, May, 2013.
- [51] S. W. Cho *et al.*, "Small-diameter blood vessels engineered with bone marrow-derived cells," *Ann Surg*, vol. 241, no. 3, pp. 506-15, Mar, 2005.
- [52] Z. Tosun, C. Villegas-Montoya, and C. S. McFetridge, "The influence of early-phase remodeling events on the biomechanical properties of engineered vascular tissues," *Journal of vascular surgery*, pp. 1451-1460, 2011.
- [53] T. A. Gwyther *et al.*, "Directed cellular self-assembly to fabricate cell-derived tissue rings for biomechanical analysis and tissue engineering," *J Vis Exp*, no. 57, pp. e3366, 2011.
- [54] F. Dal Dosso, "Sviluppo di un sistema per il monitoraggio e il controllo della stimolazione in pressione in applicazioni di ingegneria dei tessuti," Politecnico di Milano, 2012.
- [55] G. Dubini, *Appunti del corso di biofluidodinamica*, 2011.
- [56] X. J. Girerd *et al.*, "Incompressibility of the human arterial wall: an in vitro ultrasound study," *J Hypertens Suppl*, vol. 10, no. 6, pp. S111-4, Aug, 1992.
- [57] R. Vismara *et al.*, "A bioreactor with compliance monitoring for heart valve grafts," *Ann Biomed Eng*, vol. 38, no. 1, pp. 100-8, Jan, 2010.
- [58] G. Konig, "Mechanical properties of completely autologous human tissue engineered blood vessels compared to human saphenous vein and mammary artery" *Biomaterials*, vol. 30, pp. 1542-1550, 2009.

- [59] M. D. Guillemette *et al.*, "Tissue-engineered vascular adventitia with vasa vasorum improves graft integration and vascularization through inosculation," *Tissue Eng Part A*, vol. 16, no. 8, pp. 2617-26, Aug, 2010.
- [60] Z. H. Syedain *et al.*, "Implantable arterial grafts from human fibroblasts and fibrin using a multi-graft pulsed flow-stretch bioreactor with noninvasive strength monitoring," *Biomaterials*, vol. 32, no. 3, pp. 714-22, Jan, 2011.
- [61] J. M. Caves *et al.*, "The use of microfiber composites of elastin-like protein matrix reinforced with synthetic collagen in the design of vascular grafts," *Biomaterials*, vol. 31, no. 27, pp. 7175-82, Sep, 2010.
- [62] N. L'Heureux *et al.*, "Human tissue-engineered blood vessels for adult arterial revascularization," *Nat Med*, vol. 12, no. 3, pp. 361-5, Mar, 2006.
- [63] "ISO 7198: Cardiovascular implants — Tubular vascular prostheses," 1998.
- [64] G. S. Kassab, and S. Molloy, "Cross-sectional area and volume compliance of porcine left coronary arteries," *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, vol. 281, no. 2, pp. H623-8, Aug, 2001.
- [65] L. H. Hamza *et al.*, "Effect of passive myocardium on the compliance of porcine coronary arteries," *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, vol. 285, no. 2, pp. H653-60, Aug, 2003.
- [66] N. Rajan *et al.*, "Preparation of ready-to-use, storable and reconstituted type I collagen from rat tail tendon for tissue engineering applications," *Nat Protoc*, vol. 1, no. 6, pp. 2753-8, 2006.
- [67] C. L. Cummings *et al.*, "Properties of engineered vascular constructs made from collagen, fibrin, and collagen-fibrin mixtures," *Biomaterials*, vol. 25, no. 17, pp. 3699-706, Aug, 2004.
- [68] S. C. Schutte *et al.*, "Cyclic strain improves strength and function of a collagen-based tissue-engineered vascular media," *Tissue Eng Part A*, vol. 16, no. 10, pp. 3149-57, Oct, 2010.

Al termine di questo lavoro di tesi ci sembra doveroso ringraziare tutte le persone che ci hanno supportato e aiutato a raggiungere questo traguardo.

Un sentito grazie va, prima di tutto, al Prof. Beniamino Fiore perché nonostante i suoi mille impegni è riuscito a trovare del tempo per correzioni, suggerimenti e consigli nella stesura della tesi. Grazie anche per la sua pazienza e per la capacità che ha avuto di trasmetterci tranquillità, impresa ardua in quest'ultimo periodo!

Grazie inoltre alla Prof.ssa Monica Soncini, per i suoi consigli che hanno arricchito il nostro lavoro.

Ringraziamo in particolare la nostra tutor, l'Ing. Nina Bono, per averci aiutato, consigliato, sopportato durante tutto il lavoro preparandoci alla vita vera. Grazie per averci insegnato che c'è sempre un modo per superare tutte le difficoltà, per essere sempre rimasta al nostro fianco (anche quando ci "obbligava" a rimanere in laboratorio fino alle 8 di sera!) e per essere riuscita a seguirci anche dal Canada, correggendo la nostra tesi a qualsiasi ora senza farsi impaurire dal fuso orario.

Un particolare ringraziamento va al prof. Simone Stella, che pur insegnando in un'altra università, non si è fatto scrupoli nell'aiutarci procurandoci i vasi porcini di cui necessitavamo con urgenza e concedendoci anche un tour al macello di Crema che sicuramente rimarrà impresso nella nostra mente!

Ringraziamo inoltre tutti i componenti del gruppo di ricerca del  $\mu$ BSLab, per la simpatia, la disponibilità, e la compagnia che ci hanno offerto ogni giorno.

Un grande grazie va anche alle nostre compagne di laboratorio, Giulia e Valentina, con le quali abbiamo condiviso le gioie e i dolori di qualsiasi tesista, le pause pranzo e i gossip del Poli! La loro compagnia ha reso le lunghe giornate di lavoro un po' meno pesanti. Grazie per averci aiutato, sopportato, supportato e per tutti gli strumenti fantastici che ci avete prestato!

E il ringraziamento più grande va ai nostri PoliFriends, con i quali abbiamo condiviso 5 anni di Poli e 5 anni di vita. Grazie a voi Ladies (Fra, Marty Pate, Ire) and Gentlemen (Gian, Jack, Ste, Robi, Paolo, Pippo) per aver condiviso con noi il bello e il brutto di questi anni, offrendoci sempre una spalla su cui piangere e una battuta su cui ridere. Grazie per essere stati non solo compagni di uni, ma amici.

E infine grazie anche a tutti coloro che hanno vissuto con noi anche solo un pezzo di questa avventura.

Alessandra e Michela