

# POLITECNICO DI MILANO

Scuola di Ingegneria Industriale e dell'Informazione

Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica



## PROGETTAZIONE E VALIDAZIONE DI SISTEMI SPERIMENTALI E DI MODELLI TEORICI PER L'INGEGNERIA DEL TESSUTO RENALE

Relatore

Prof.ssa Manuela Teresa Raimondi

Correlatore

Prof. Ing. Andrea Remuzzi

Tesi di Laurea di

Roberta NOSSA

Matr. 798805

Anno Accademico 2014-2015

# Indice

---

Indice .....	2
Indice delle figure .....	5
Indice delle tabelle .....	11
Sommario .....	13
Abstract .....	18
1. Cenni di anatomia e patologia del rene .....	23
1.1. Anatomia del rene .....	23
1.1.1. Struttura macroscopica interna.....	24
1.1.2. Vascolarizzazione.....	25
1.1.3. Struttura microscopica .....	26
1.2. Produzione dell'urina.....	29
1.3. Molteplici funzioni renali .....	31
1.4. Patologie renali .....	32
1.4.1. Insufficienza renale acuta.....	33
1.4.2. Insufficienza renale cronica .....	33
1.4.3. Trattamento dell'insufficienza renale mediante trapianto o dialisi con rene artificiale.....	35
2. L'ingegneria dei tessuti e lo stato dell'arte nella rigenerazione del rene.....	38
2.1. Dialisi e trapianto renale come trattamenti per l'insufficienza renale .....	38
2.2. L'ingegneria tissutale per la medicina rigenerativa.....	39
2.3. Ingegneria tissutale renale.....	41
2.3.1. L'ingegneria dei tessuti applicata alla rigenerazione del rene di ratto .....	46
2.3.2. L'ingegneria dei tessuti applicata alla rigenerazione del rene di maiale .....	52
2.3.3. L'ingegneria dei tessuti applicata alla rigenerazione del rene umano.....	55
2.4. Punto di partenza per gli studi futuri riguardo la rigenerazione del rene.....	57
3. Obiettivi del lavoro.....	58
4. Modifiche dell'attuale sistema di perfusione del rene di ratto .....	60
4.1. Analisi del circuito esistente .....	60

4.2.	Problematiche del circuito esistente .....	62
4.3.	Automazione del sistema di perfusione .....	63
4.3.1.	Pompa, trasduttore di pressione e sistema di controllo automatico: come farli comunicare?.....	63
4.3.2.	Soluzione progettuale del sistema di controllo automatico .....	68
4.3.3.	Prove sperimentali con il sistema di controllo automatico.....	72
4.3.4.	Valutazione del sistema di controllo automatico e risultati ottenuti .....	73
4.4.	Ottenimento del flusso pulsatile .....	77
4.4.1.	Soluzione progettuale per l'ottenimento del flusso pulsatile.....	77
4.4.2.	Prove sperimentali con il flusso pulsatile .....	79
4.4.3.	Valutazione del sistema utilizzato per l'ottenimento del flusso pulsatile ....	80
4.4.4.	Risultati delle prove sperimentali con il flusso pulsatile .....	80
4.5.	Discussione .....	85
5.	Verifica della permeabilità dei tessuti del rene decellularizzato.....	86
5.1.	Permeabilità delle pareti dei vasi dello <i>scaffold</i> decellularizzato: causa della ricellularizzazione parziale .....	86
5.1.1.	Prova di perfusione con medium di un rene decellularizzato.....	88
5.1.2.	Prova di perfusione con una sospensione di medium e cellule di un rene decellularizzato .....	90
5.1.3.	Risultati della prova di perfusione con medium del rene decellularizzato...	91
5.1.4.	Risultati della prova di perfusione con medium e cellule del rene decellularizzato .....	93
5.2.	Discussione .....	99
6.	Ottenimento di un modello teorico di rene nativo e decellularizzato .....	100
6.1.	Modello analitico di rene nativo .....	100
6.1.1.	Prova di perusione in rampa di portata su rene nativo .....	102
6.1.2.	Risultati ottenuti dalle prove di perfusione in rampa di portata con reni nativi e validazione del modello.....	104
6.2.	Modello analitico per <i>scaffold</i> con pareti dei vasi permeabili .....	109
6.2.1.	Risultati ottenuti dalle prove di perfusione in rampa di portata con reni decellularizzati e validazione del modello analitico.....	113
6.3.	Discussione .....	119

7. Conclusioni e sviluppi futuri .....	121
7.1. Conclusioni.....	121
7.2. Sviluppi futuri.....	124
Bibliografia.....	126
Appendice.....	129
A. Protocolli per gli esperimenti con il rene di ratto .....	130
B. Codice sorgente del sistema di controllo automatico della pressione .....	139
C. Tecniche analitiche.....	146

# Indice delle figure

---

Figura 1: Schema di massima del circuito di perfusione del rene di ratto presente in laboratorio e dei suoi componenti principali con l'aggiunta del sistema di controllo automatico.....	14
Figura 2: dispositivo per la regolazione automatica della pressione. ....	14
Figura 3: schema di massima del circuito del rene modificato per ottenere un flusso pulsatile. ....	15
Figura 4: <i>set-up</i> sperimentale della prova di perfusione con medium di un rene decellularizzato a cui sono state incannolate vena e arteria. ....	16
Figura 5: confronto tra le pressioni predette dal modello, quelle ottenute sperimentalmente in questo lavoro di tesi e da Uzarski <i>et al.</i> per il rene nativo. ....	17
Figura 6: confronto tra le pressioni predette dal modello, quelle ottenute sperimentalmente in questo lavoro di tesi e da Uzarski <i>et al.</i> per il rene decellularizzato.	17
Figure 1: perfusion system of the rat with the addition of the automatic pressure regulator. ....	19
Figure 2: automatic pressure regulator.....	19
Figure 3: perfusion system modified in order to obtain the pulsatile flow. ....	20
Figure 4: experimental set-up of the perfusion tests of the decellularized kidney. ....	21
Figure 5: pressures predicted by the model compared with the experimental pressures obtained in this work and by Uzarski <i>et al.</i> for the native kidney.....	22
Figure 6: pressures predicted by the model compared with the experimental pressure obtained in this work and by Uzarski <i>et al.</i> for the decellularized kidney. ....	22
Figura 1.1: rapporti dei reni e degli ureteri nella regione retroperitoneale del maschio (© McGraw-Hill).....	24
Figura 1.2: rene di destra sezionato in vari piani, mostrante il parenchima e la pelvi renale (©Guyton e Hall). ....	25
Figura 1.3: vasi sanguigni principali (© Guyton e Hall). ....	26
Figura 1.4: l'unità funzionale del rene, il nefrone (© McGraw-Hill). ....	27
Figura 1.5: Il corpuscolo renale (© Guyton e Hall).....	28

Figura 1.6: produzione dell'urina (© McGraw-Hill).....	31
Figura 1.7: il circuito dialitico (fonte: Wikipedia). .....	37
Figura 2.1: Rene di ratto Sprague-Dawley decellularizzato tramite protocollo con detergenti. Sistema vascolare visibile dopo 25 ore. Scala barra: 5 mm (Fonte: Joseph S. Uzarski et al., 2014). .....	41
Figura 2.2: Decellularizzazione del rene secondo il protocollo di Ross. A) Rene immediatamente dopo l'espianto: si notano l'incannulamento dell'arteria e dell'uretere. B) Rene dopo la perfusione con SDS. C) Immagine SEM della matrice decellularizzata:si nota la struttura di un glomerulo e della zona tubulare adiacente. D-E) Colorazioni con ematossilina e eosina su tessuto renale prima e dopo la decellularizzazione. Si nota la completa rimozione del materiale cellulare residuo. Infine, attraverso colorazioni immunoistochimiche è possibile valutare la conservazione delle proteine di membrana nella regione corticale (G, laminina) e midollare (H, collagene IV) della matrice (Fonte: Ross et al., 2009).....	46
Figura 2.3: Rappresentazione della camera di perfusione del rene di ratto utilizzata da Song durante (A) la fase di infusione delle cellule dall'uretere e (B) la successiva perfusione dall'arteria renale. In (C) è visibile un dettaglio del sistema di perfusione e dell'incannulamento del rene (Adattato da Song et al., 2013). .....	47
Figura 2.4: Fotografie del rene prima (a sinistra) e dopo (a destra) il processo di decellularizzazione secondo la metodica proposta da Bonandrini (Fonte: Bonandrini et al., 2013). .....	49
Figura 2.5: Colorazioni con ematossilina e eosina dei campioni di tessuto renale prelevati prima (a sinistra) e dopo (a destra) il protocollo di decellularizzazione. Si noti la completa rimozione dei nuclei (ematossilina, in viola) (Fonte: Bonandrini et al., 2013). .....	49
Figura 2.6: A sinistra: particolare di un glomerulo decellularizzato (colorazione con ematossilina e eosina). A destra: particolare di un glomerulo in un'immagine di immunofluorescenza con DAPI (nuclei, in blu) e WGA Agglutinina (matrice, in verde). In entrambi i casi si nota l'assenza di materiale nucleare all'interno delle strutture (Fonte: Bonandrini et al., 2013). .....	49

Figura 2.7: ricellularizzazione con cellule tubulari epiteliali della matrice extracellulare (ECM) di un rene di ratto decellularizzato. In figura è presente il bioreattore utilizzato, sezioni del rene ricellularizzato e colorato con ematossilina & eosina (*Hematoxylin & Eosin*, H&E) ai giorni 1, 3 e 7, sezioni della matrice colorata con elastina e acido periodico – reattivo di Shiff (*Periodic Acid-Shiff*, PAS) al giorno 3; la colorazione Wigert rapido – fucsina resorcina (*Weigert's Resorcin-Fuchsin*, WRF) dell'elastina dimostra che la struttura arteriolare non è stata compromessa e che le cellule tubulari epiteliali infuse dall'arteria renale non rimangono all'interno del compartimento arterioso (le frecce indicano la colorazione di elastina). La colorazione PAS evidenzia che anche la membrana basale, rappresentata in rosa scuro, non è stata compromessa e che le cellule rimangono sulla membrana basale e formano quelle che appaiono essere strutture tubulari. Scala barra: 50 µm. (Fonte: Caralt *et al.* 2014). ..... 50

Figura 2.8: sezioni del rene colorato con ematossilina & eosina e ricellularizzato sia infondendo dall'arteria renale che dall'uretere, a 3 e 7 giorni. Scala barra: 100 µm. (Fonte: Uzarski *et al.* 2015). ..... 51

Figura 2.9: (A) Caratterizzazione dell'adattamento morfologico a 3 e 7 giorni (Scala barra: 50 µm), (B) dell'attività metabolica delle cellule marcate con CD133/1+ e (C) dell'espressione del biomarker KIM-1 rilasciato dalle cellule marcate con CD133/1+. (Fonte: Uzarski *et al.* 2015)..... 52

Figura 2.10: Schema del sistema di decellularizzazione del rene porcino proposto da Sullivan et al. 2012: (a) le soluzioni del detergente concentrato e del tampone di lavaggio vengono stoccate nel rispettivo serbatoio e diluite alla concentrazione desiderata attraverso una (b) linea di acqua deionizzata. Le soluzioni sono pompate da (c) una pompa peristaltica che può gestire più linee di perfusione indipendenti. Attraverso connettori a innesto rapido e una valvola a tre vie (d) il perfusato in uscita dagli *scaffold* (e) può essere ripescato dalla camera di perfusione e ricircolato (f) oppure fuoriuscire dal contenitore e confluire verso (g) un serbatoio comune di raccolta del fluido di scarto (tratto da Sullivan D.C., et al., 2012). ..... 54

Figura 4.1: Schema di massima del circuito di perfusione del rene di ratto presente in laboratorio e dei suoi componenti principali. .... 61

Figura 4.2: A sinistra: fotografia del circuito di perfusione del rene di ratto. A destra: particolare della camera di perfusione. ....	61
Figura 4.3: schermo della pompa peristaltica a controllo digitale (Masterflex®). ....	64
Figura 4.4: particolare della pompa peristaltica a controllo digitale (Masterflex®); in rosso è cerchiato il connettore DB9. ....	64
Figura 4.5: connettore DB9 della pompa Masterflex®. ....	64
Figura 4.6: sistema di acquisizione della pressione. A destra è presente il trasduttore di pressione. ....	66
Figura 4.7: Schema di massima del circuito di perfusione del rene di ratto presente in laboratorio e dei suoi componenti principali con l'aggiunta del sistema di controllo automatico. ....	67
Figura 4.8: Fotografia del circuito di perfusione del rene di ratto presente in laboratorio e dei suoi componenti principali con l'aggiunta del sistema di controllo automatico. ....	67
Figura 4.9: Schema a blocchi della logica di funzionamento di Arduino. ....	69
Figura 4.10: dispositivo per la regolazione automatica della pressione. ....	71
Figura 4.11: stringitubo "roller clamp" utilizzato durante le prove sperimentali con Arduino come resistenza variabile. ....	72
Figura 4.12: dettaglio del tracciato di pressione della prova con il sistema di controllo automatico e lo stringitubo. ....	74
Figura 4.13: tracciato della pressione dell'esperimento 208 (controllo con Arduino). ....	75
Figura 4.14: tracciato della pressione dell'esperimento 209 (controllo con Arduino). ....	75
Figura 4.15: colorazione con ematossilina ed eosina della matrice di un rene decellularizzato utilizzando il sistema di controllo di pressione automatico (exp 208) (ingrandimento 20X). ....	76
Figura 4.16: colorazione con ematossilina ed eosina della matrice di un rene decellularizzato utilizzando il sistema di controllo di pressione automatico (exp 209) (ingrandimento 20X). ....	76
Figura 4.17: schema di massima del circuito del rene modificato per ottenere un flusso pulsatile. ....	78
Figura 4.18: azionamento della pompa pulsante. Scala delle ascisse: 10 secondi. ....	81



Figura 4.19: aumento del numero di giri della pompa di perfusione. Scala delle ascisse: 10 secondi.....	81
Figura 4.20: aumento dell'occlusività della pompa pulsante. Scala delle ascisse: 10 secondi.....	82
Figura 4.21: dettagli del tracciato in cui si vedono le 6 pulsazioni al secondo. Scala delle ascisse: 1 secondo. ....	82
Figura 4.22: tracciato della pressione misurata durante le 24 h di flusso pulsatile. Scala delle ascisse: 6 h. ....	83
Figura 4.23: dettaglio del tracciato di pressione misurata durante la perfusione con flusso pulsatile. Scala delle ascisse: 10 secondi.....	83
Figura 4.24: dettaglio del tracciato di pressione misurata durante la perfusione con flusso pulsatile. Scala delle ascisse: 1 secondo.....	83
Figura 4.25: colorazione con ematossilina ed eosina della matrice di un rene decellularizzato e perfuso con flusso pulsatile per 24 ore (exp 208) (ingrandimento 20X). .....	84
Figura 5.1: istologie ottenute a seguito degli esperimenti di ricellularizzazione. (A) infusione da arteria e successiva perfusione di 24 ore; (B) infusione da vena e successiva perfusione di 24 ore; (C) infusione da arteria e uretere e successiva perfusione di 24 ore; (D) infusione da arteria, vena e uretere e successiva perfusione di 24 ore; (E) infusione da arteria, vena e uretere e successiva perfusione di 72 ore. ....	87
Figura 5.2: <i>set-up</i> sperimentale della prova di perfusione con medium di un rene decellularizzato a cui sono state incannolate vena e arteria. ....	89
Figura 5.3: sezioni di rene colorate con ematossilina ed eosina a seguito della perfusione dello <i>scaffold</i> con la sospensione cellulare: (A) exp 186, (B) exp 188, (C) exp 189 e (D) exp 216. ....	98
Figura 6.1: <i>set-up</i> sperimentale della prova di perfusione in rampa di portata. ....	103
Figura 6.2: andamenti delle pressioni medie ottenute per il rene nativo. ....	105
Figura 6.3: pressioni predette dal modello, pressioni medie ottenute sperimentalmente tramite le prove di perfusione e ottenute sperimentalmente da Uzarski <i>et al.</i> ....	108

Figura 6.4: velocità del fluido in uscita a un vaso di un determinato livello gerarchico predette dal modello del rene nativo perfondendo a 1, 10 e 20 mL/min. ....	108
Figura 6.5: dettaglio del grafico in Figura 6.4. ....	109
Figura 6.6: tubo laminare dalle pareti permeabili.....	110
Figura 6.7: confronto delle pressioni in funzione delle portate per il rene decellularizzato ottenute col modello, con le prove sperimentali e da Uzarski et <i>al.</i> ....	117
Figura 6.8: velocità del fluido in uscita a un vaso di un determinato livello gerarchico predette dal modello del rene decellularizzato perfondendo a 1, 10 e 20 mL/min. ....	118
Figura 6.9: dettaglio del grafico in Figura 6.8. ....	118
Figura A.1: Schema di massima dei componenti del circuito di perfusione del rene di ratto.....	130
Figura B.1: Schema di interfacciamento tra Arduino e l'esterno.....	140

# Indice delle tabelle

---

Tabella 1.1: cause di insufficienza renale cronica (2).....	34
Tabella 1.2: cause di ESDR (2).....	35
Tabella 2.1: recenti lavori nell'ambito dell'ingegneria tissutale renale .....	45
Tabella 4.1: descrizione dei pin del connettore della pompa. ....	65
Tabella 5.1: portate utilizzate nella prova di perfusione con medium. ....	88
Tabella 5.2: dati relativi la prova di perfusione di medium con cellule. ....	91
Tabella 5.3: percentuali di medium fuoriuscito dalla vena ( $%V_{vena}$ ), permeato dalle pareti dei vasi ( $%V_{permeato}$ ) e rimasto nelle maglie del setaccio ( $%V_{perso}$ ) perfondendo a 0.25 mL/min.....	91
Tabella 5.4: percentuali di medium fuoriuscito dalla vena ( $%V_{vena}$ ), permeato dalle pareti dei vasi ( $%V_{permeato}$ ) e rimasto nelle maglie del setaccio ( $%V_{perso}$ ) perfondendo a 0.5 mL/min.....	92
Tabella 5.5: percentuali di medium fuoriuscito dalla vena ( $%V_{vena}$ ), permeato dalle pareti dei vasi ( $%V_{permeato}$ ) e rimasto nelle maglie del setaccio ( $%V_{perso}$ ) perfondendo a 0.75 mL/min.....	92
Tabella 5.6: percentuali di medium fuoriuscito dalla vena ( $%V_{vena}$ ), permeato dalle pareti dei vasi ( $%V_{permeato}$ ) e rimasto nelle maglie del setaccio ( $%V_{perso}$ ) perfondendo a 1 mL/min. ....	92
Tabella 5.7: media delle percentuali di medium fuoriuscito dalla vena ( $%V_{vena,mean}$ ), permeato dalle pareti dei vasi ( $%V_{permeato,mean}$ ) e rimasto nelle maglie del setaccio ( $%V_{perso,mean}$ ) per una data portata. ....	93
Tabella 5.8: percentuali di liquido fuoriuscito dalla vena ( $%V_{vena}$ ), permeato dalle pareti dei vasi ( $%V_{permeato}$ ) e rimasto nelle maglie del setaccio ( $%V_{perso}$ ) perfondendo a 1 mL/min. ....	94
Tabella 5.9: percentuali di liquido fuoriuscito dalla vena ( $%V_{vena}$ ), permeato dalle pareti dei vasi ( $%V_{permeato}$ ) e rimasto nelle maglie del setaccio ( $%V_{perso}$ ) perfondendo a 0.4 mL/min.....	95

Tabella 5.10: numero di cellule nel liquido permeato, fuoriuscite dalla vena e la loro somma. ....	96
Tabella 5.11: percentuale di cellule nel liquido permeato, fuoriuscite dalla vena e la loro somma rispetto al totale di quelle infuse.....	96
Tabella 5.12: medie delle percentuali di medium fuoriuscito dalla vena ( $\% V_{\text{vena,mean}}$ ), permeato dalle pareti dei vasi ( $\% V_{\text{permeato, mean}}$ ) e rimasto nelle maglie del setaccio ( $\% V_{\text{perso, mean}}$ ) per le portate di 1 e 0.4 mL/min.....	97
Tabella 5.13: percentuali medie del numero di cellule uscite dalla vena, che si trovano nel medium permeato dalle pareti e la loro somma ( $\%$ totale di cellule uscite dal rene).....	97
Tabella 6.1: modello dell'albero arterioso (38).....	101
Tabella 6.2: modello dell'albero venoso (38).....	101
Tabella 6.3: pressioni ottenute durante le prove di perfusione in rampa di portata per il rene nativo.....	104
Tabella 6.4: media delle pressioni ottenute durante le prove di perfusione dei diversi esperimenti.....	105
Tabella 6.5: confronto tra i raggi dei vasi del ramo arterioso ricavati da Nordsletten e modificati per il nostro modello. ....	107
Tabella 6.6: confronto tra i raggi dei vasi del ramo venoso ricavati da Nordsletten e modificati per il nostro modello. ....	107
Tabella 6.7: pressioni ottenute durante gli esperimenti in rampa di portata con reni decellularizzati e relativa media. ....	114
Tabella 6.8: media delle portate d'uscita alla vena perfondendo il rene a 1 mL/min, sia con solo medium che con la sospensione cellulare. ....	116
Tabella 6.9: pressioni d'ingresso e portate di fluido in uscita dalla vena predette dal modello per una specifica portata di perfusione. ....	119
Tabella A.1: protocollo di decellularizzazione. ....	132

# Sommario

---

L'insufficienza renale cronica è la perdita progressiva e irreversibile di un grande numero di nefroni che, negli stadi più avanzati della malattia, determina per il paziente la necessità di ricorrere a una terapia sostitutiva della funzione renale. Attualmente, quelle utilizzate sono l'emodialisi e il trapianto, che presentano però dei limiti importanti, in quanto, nel primo caso, non si è in grado di ristabilire la funzione omeostatica ed endocrina ma solo quella filtrante, nel secondo, bisogna considerare la scarsità di organi a disposizione. A partire dal 2009 si è quindi cercato di intraprendere una nuova strada: l'ingegneria dei tessuti si è focalizzata sulla rigenerazione dell'intero organo renale attraverso l'uso di uno *scaffold* in matrice extracellulare seminato con cellule pluripotenti. Tuttavia, analizzando sia i lavori in letteratura che i risultati ottenuti presso l'Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri di Bergamo, si è visto che si è ancora lontani dal riuscire ad ottenere un rene effettivamente impiantabile e funzionale, in quanto a seguito del processo di ricellularizzazione si ha una struttura scarsamente ripopolata e non in maniera omogenea. In più bisogna considerare che, non solo le cellule devono ripopolare adeguatamente la matrice, ma devono anche differenziarsi in tutti i diversi fenotipi cellulari per permettere di ottenere un organo funzionale. Ecco perché, arrivati a questo punto della ricerca, risultano necessari uno studio approfondito e sistematico dei parametri che influenzano la distribuzione cellulare durante la perfusione, e la progettazione e lo sviluppo di un bioreattore funzionale e flessibile, che permetta agli operatori di ottimizzare e automatizzare il più possibile i protocolli di decellularizzazione e ricellularizzazione, nonché di stimolare fisicamente lo *scaffold* di modo da simulare la codizione fisiologica e indurre un differenziamento cellulare.

Nel presente lavoro di tesi, svolto presso l'Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri di Bergamo, sono quindi state apportate delle modifiche al circuito già presente in laboratorio e utilizzato per la decellularizzazione e ricellularizzazione del rene di ratto, di modo da automatizzarlo maggiormente e permettere la stimolazione fisica della struttura attraverso l'ottenimento di un flusso pulsatile.

È stato quindi progettato un sistema di controllo automatico che si serve della piattaforma Open Source Arduino (Figura 1 e 2) ed è in grado di regolare i giri della pompa di perfusione in funzione della pressione misurata: in questo modo si è riusciti ad ottenere un controllo preciso ed automatico della pressione, che è uno dei parametri che influenza maggiormente la distribuzione cellulare, svincolando l'operatore da tale incombenza e permettendo il controllo anche *overnight*.

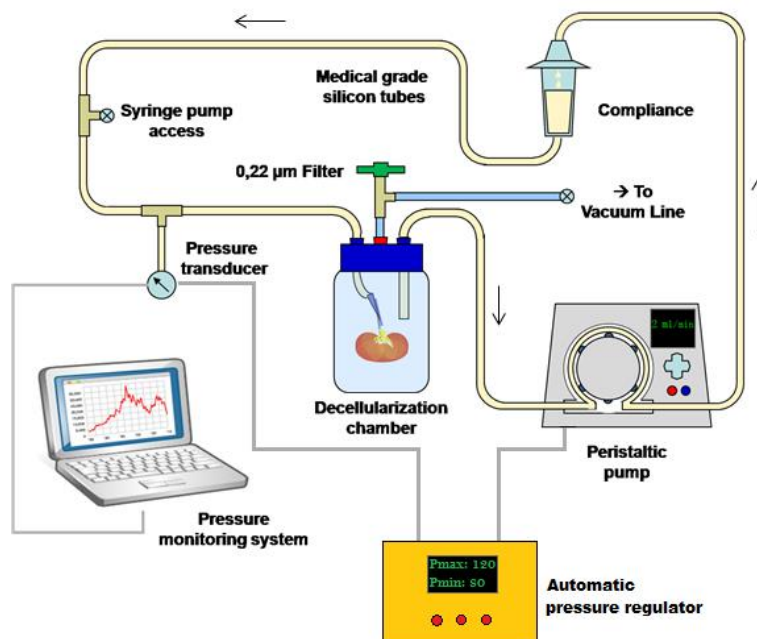


Figura 1: Schema di massima del circuito di perfusione del rene di ratto presente in laboratorio e dei suoi componenti principali con l'aggiunta del sistema di controllo automatico.



Figura 2: dispositivo per la regolazione automatica della pressione.

È stato inoltre ideato un metodo per ottenere un flusso pulsatile durante la fase di ricellularizzazione, in quanto con il circuito già presente in laboratorio era possibile avere solo una perfusione in continuo. Si è infatti pensato che, per ottenere un'ottimale distribuzione cellulare, fosse meglio ricreare le condizioni il più simili possibili a quelle presenti *in vivo*. Tale stimolazione potrebbe inoltre essere d'aiuto nel differenziamento cellulare a seguito del processo di ricellularizzazione. In Figura 3 è presente lo schema del circuito di perfusione modificato, in cui sono presenti due pompe: la *pompa di perfusione* (1), utilizzata per pompare il fluido nel circuito e per l'ottenimento di una *baseline* di circa 100 mmHg a valle della *compliance*, e una *pompa pulsante* a occlusione variabile (2), che ha la funzione di creare un flusso pulsatile grazie alla presenza dei rulli che, ruotando e comprimendo i tubi, creano una pulsatilità di ampiezza variabile in funzione dell'occlusione.

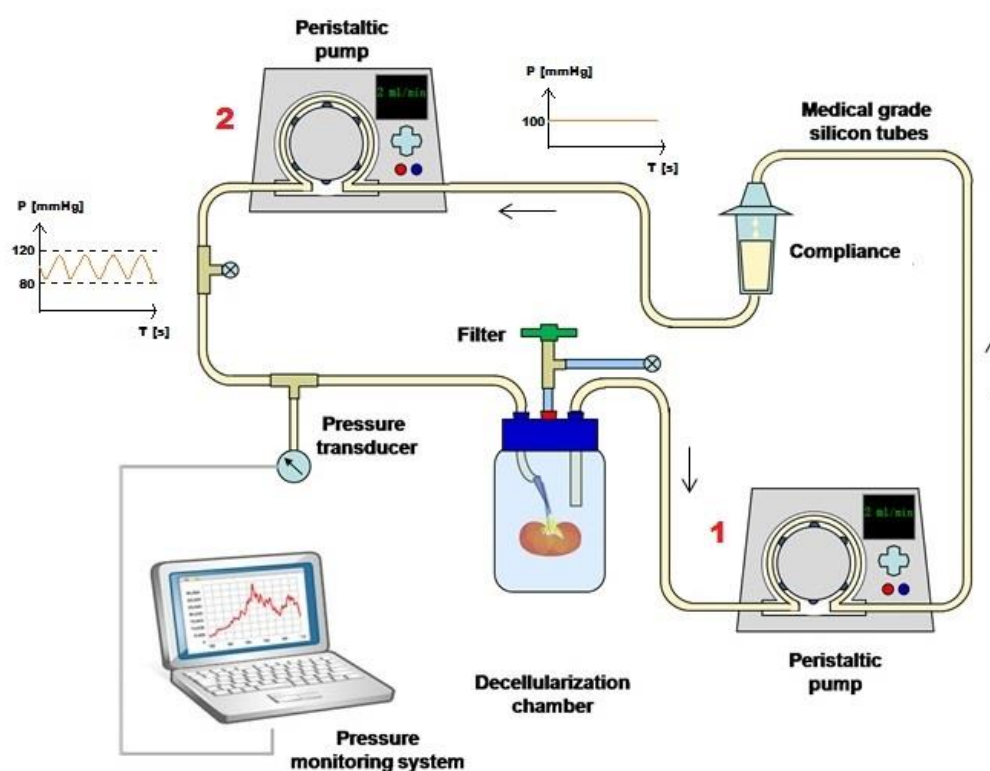


Figura 3: schema di massima del circuito del rene modificato per ottenere un flusso pulsatile.

Parallelamente alle operazioni di modifica del circuito sono state effettuate delle prove sperimentali per valutare se i tessuti del rene di ratto, una volta decellularizzato, fossero permeabili. È stato infatti ipotizzato che essi a seguito della decellularizzazione, avendo perso la componente cellulare, non fossero più totalmente impermeabili. Ciò,

influenzando la distribuzione di portate del rene, potrebbe causare la distribuzione non uniforme di cellule nella struttura. Sono quindi state effettuate delle prove di perfusione (*set-up* sperimentale in Figura 4) sia con solo medium, che con una sospensione di medium e cellule ed è stata quantificata la quantità di liquido fuoriuscito dalla vena.



**Figura 4: *set-up* sperimentale della prova di perfusione con medium di un rene decellularizzato a cui sono state incannulate vena e arteria.**

Durante tali prove si è visto che parte del liquido permeava dalle pareti, a conferma dell'ipotesi di permeabilità dei vasi del rene decellularizzato. È stata inoltre quantificata la quantità di cellule uscite dallo *scaffold* durante la prova di perfusione con la sospensione cellulare.

Infine, sono stati ottenuti un modello analitico di rene nativo e uno di rene decellularizzato in grado di prevedere ciò che avviene nel rene di ratto quando viene perfuso con del liquido. In particolare, il modello di rene nativo, data la portata di perfusione e la pressione d'ingresso all'arteria, è in grado di prevedere, per ogni livello gerarchico in cui sono stati divisi l'albero arterioso e venoso del rene, la velocità del fluido e la pressione in uscita a un vaso. Per quanto riguarda invece il modello di rene decellularizzato, esso considera la permeabilità delle pareti dei vasi e, data la portata di perfusione e la pressione d'ingresso, è in grado di prevedere, per ogni livello gerarchico, sia la velocità del fluido e la pressione in uscita a un vaso, ma anche la portata di liquido permeato dalle pareti del vaso. È quindi in grado di fornire la portata in uscita dalla vena e, di conseguenza, quella del fluido totale permeato dai tessuti renali. Tale strumento può essere utile in quanto è in grado di predire come variano i parametri che influenzano la distribuzione cellulare al variare di pressione e portata d'ingresso.



I grafici in Figura 5 e 6 mostrano il salto di pressione che agisce sul rene in funzione della portata di perfusione, rispettivamente per il rene nativo e per il decellularizzato. In particolare, vengono confrontate le pressioni predette dal modello con quelle ottenute sperimentalmente durante il lavoro di tesi e da Uzarski e il suo gruppo di ricerca (1).

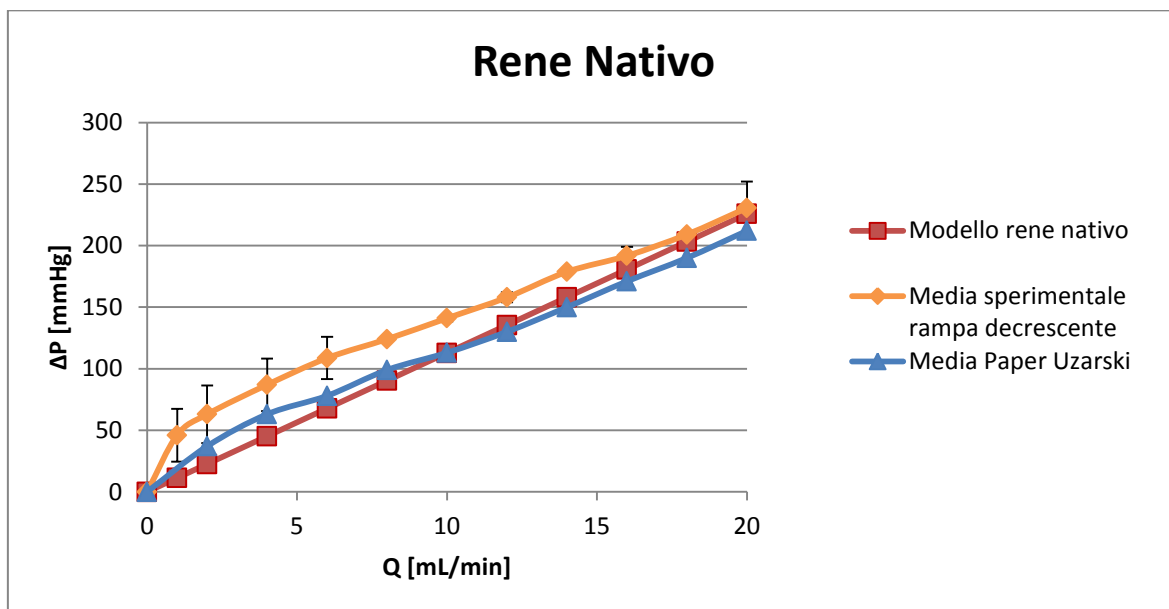


Figura 5: confronto tra le pressioni predette dal modello, quelle ottenute sperimentalmente in questo lavoro di tesi e da Uzarski *et al.* per il rene nativo.

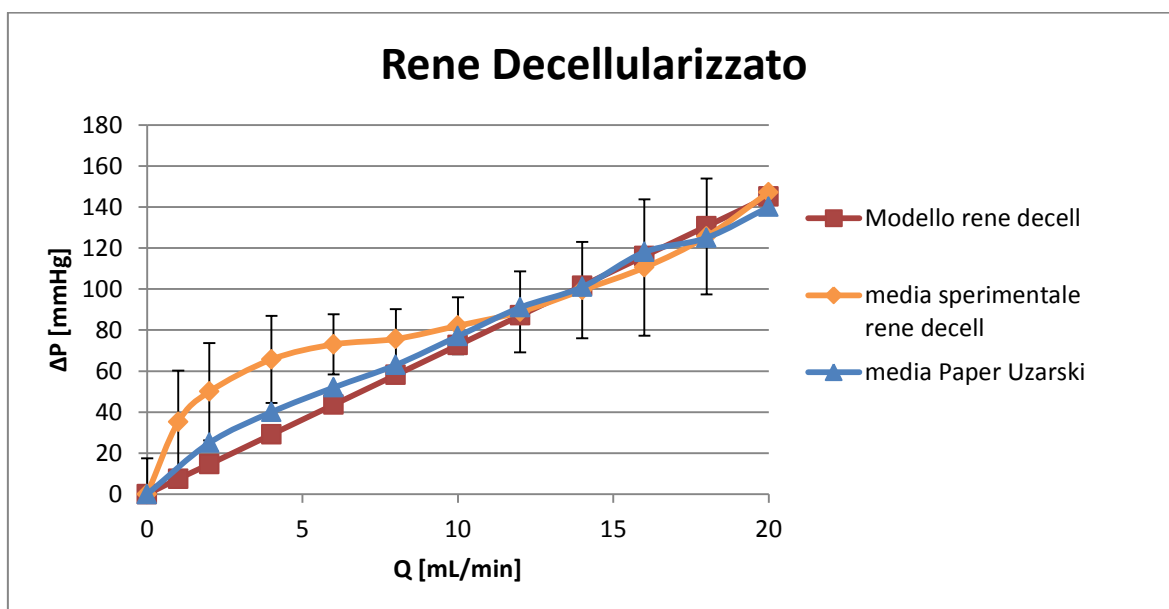


Figura 6: confronto tra le pressioni predette dal modello, quelle ottenute sperimentalmente in questo lavoro di tesi e da Uzarski *et al.* per il rene decellularizzato.

# Abstract

---

Chronic kidney disease (CKD) is referred as the progressive and irreversible loss of the renal function. The worst stage of the disease is called End Stage Renal Disease and is characterized by a complete renal failure. Current solutions to treat this condition are the hemodialysis and the organ transplant. However, both these approaches have some important limits. In fact, hemodialysis substitutes the kidney filtration function but not the endocrine signaling, whereas transplant is affected by a dramatic lack of donors. In order to overcome the current therapies used to replace renal functions, tissue engineering focused on the regeneration of the whole-kidney using the extracellular matrix scaffolds obtained from decellularized kidneys, and seeded with pluripotent stem cells. Even if this promising solution could solve the problems concerning the hemodialysis and the transplant, at the moment we are not still able to create a functional and implantable organ. Indeed, it is known that, after the recellularization process, the scaffolds don't appear uniformly populated. Moreover we have to consider that these cells need to differentiate in all the different phenotypes there are in the kidney in order to restore the renal functionality. So at this point of the research, it's important to do a systematic study of all the parameters that influence the distribution of the cells during the recellularization. Moreover it's necessary the development of a functional and flexible bioreactor that allows the operators to optimize and automatize the decellularization and recellularization processes. This bioreactor should also physically stimulate the scaffold in order to simulate the physiological conditions and to induce the differentiation of stem cells towards renal phenotypes.

The present work, carried out at the Mario Negri Institute in Bergamo, focused initially on the development of a new perfusion system that allows the automation of decellularization and recellularization processes of a rat kidney and the physical stimulation of the scaffold.

This system that uses the Open Source platform Arduino (Figure 1 and 2) has been developed in order to control the pump revolutions depending on the pressure measured

in the perfusion system. In this way we obtained an accurate and systematic control of the pressure, which is the main parameter that influences cells distribution. Using this system we were able to avoid the manual regulation of pump revolutions that were automatically set in order to maintain a controlled pressure at the inlet of the scaffold. Furthermore this solution allows the device to autonomously regulate the perfusion flow during overnight experiments.

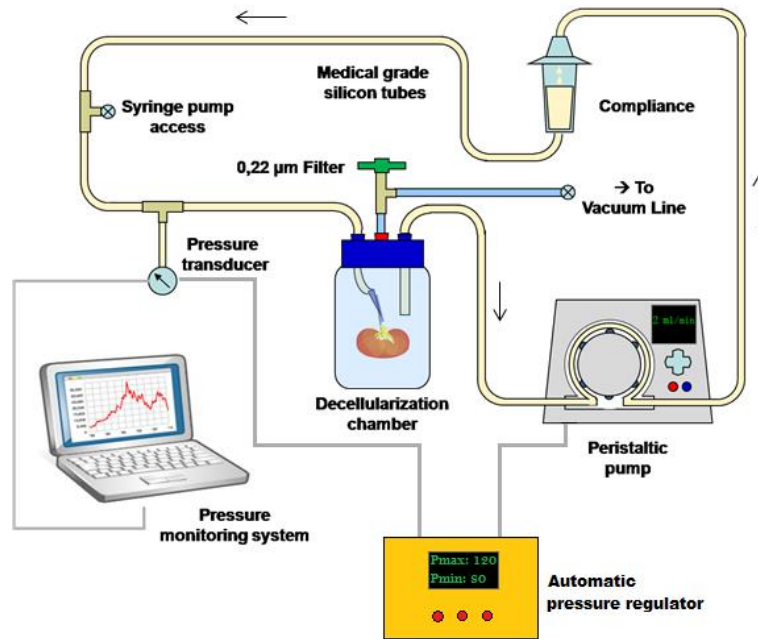


Figure 1: perfusion system of the rat with the addition of the automatic pressure regulator.



Figure 2: automatic pressure regulator.

Since physiological pulsatile flows could have beneficial effects on the recellularization process and eventually on the stem cell differentiation, we developed a method to obtain an inlet flow that simulates the *in vivo* conditions during the recellularization process. In Figure 3 is shown the modified perfusion system, where two pumps are present: the *perfusion pump* (1), used to perfuse the liquid through the circuit and to obtain a baseline pressure of 100 mmHg downstream the compliance, and the *pulsatile pump* (2) that generates a controlled pulsation in the inlet flow depending on the tube occlusion set by the pump rollers.

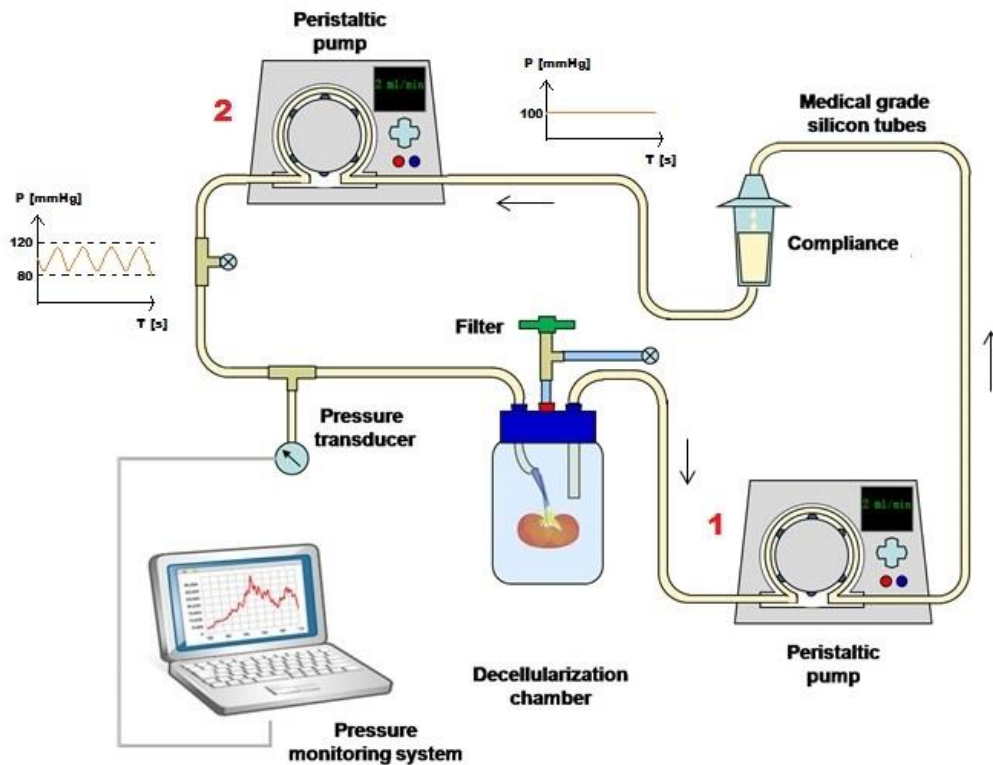


Figure 3: perfusion system modified in order to obtain the pulsatile flow.

In addition to these modifications of the circuit, some experimental tests have been done in order to evaluate the permeability of the scaffold tissues after the decellularization process of rat kidneys. In fact it has been supposed that, after kidney cellular components removal, the scaffold tissues become permeable. This aspect could cause a non-homogeneous cells repopulation of the scaffold due to non-uniform flow distribution. So perfusion tests were performed (experimental set-up in Figure 4) to quantify the amount of liquid released from the vein respect to that infused.



**Figure 4: experimental set-up of the perfusion tests of the decellularized kidney.**

These tests showed that the liquid permeates the scaffold tissues, confirming that the decellularization process induces scaffold permeability, as previously hypothesized.

Finally, two analytical models were obtained to simulate flows within the native and the decellularized rat kidneys. In each model, the kidney vasculature tree was divided into several hierarchical levels representing vessels from renal artery to renal vein according to their geometrical features. The models acquire the perfusion flow and the inlet pressure and return the fluid velocity and the pressure at the end of the vessel levels. Furthermore the analytic model of the decellularized kidney takes into account the permeability and is able to estimate the amount of the fluid that permeates outside of the scaffold. This model allows the users to estimate the effects of changes in inlet pressure and perfusion flow on the pressures and flows within the scaffold, which ultimately influence the cellular distribution.

The graphs in Figure 5 and 6 show the pressure drop that we measured in this work, that estimated by our models of native and the decellularized kidneys, compared to previously published data obtained by Uzarski *et al.* (1).

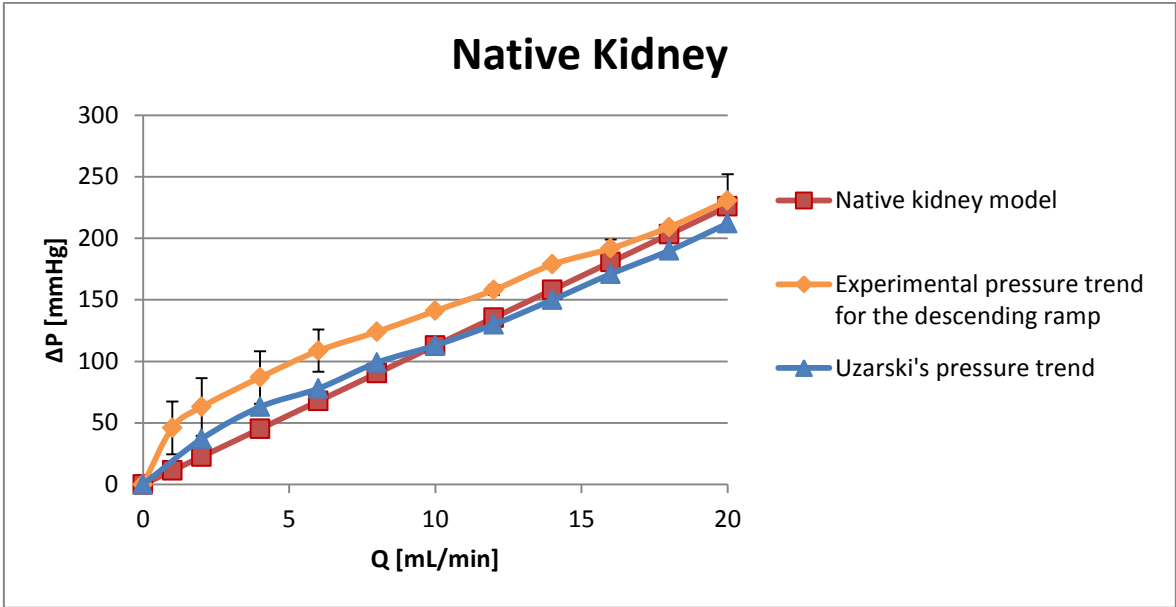


Figure 5: pressures predicted by the model compared with the experimental pressures obtained in this work and by Uzarski *et al.* for the native kidney.

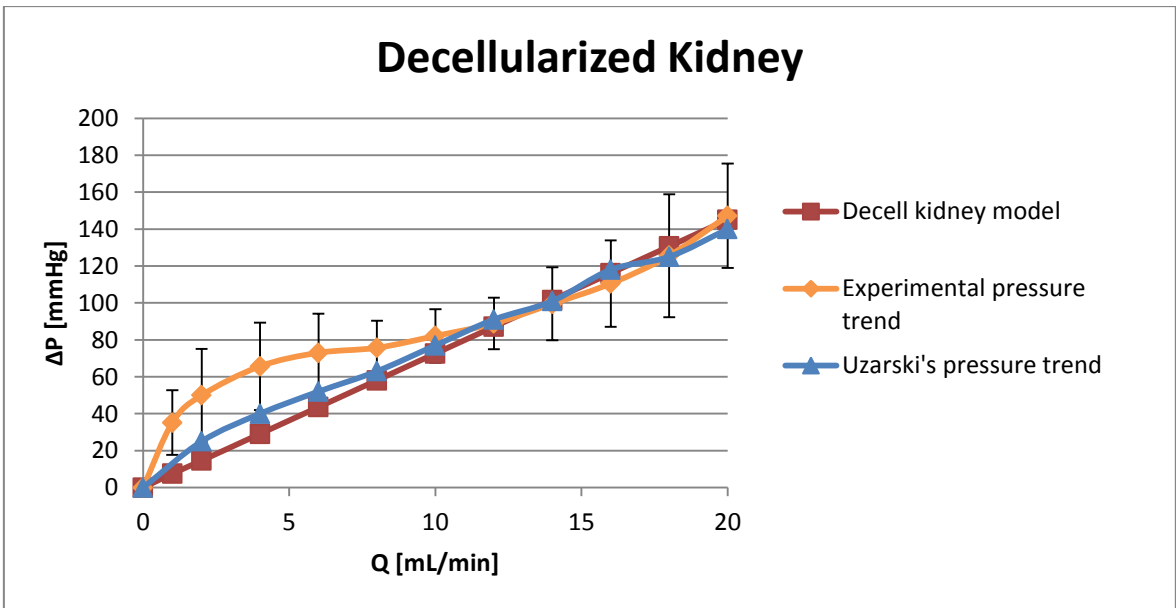


Figure 6: pressures predicted by the model compared with the experimental pressure obtained in this work and by Uzarski *et al.* for the decellularized kidney.

# 1. Cenni di anatomia e patologia del rene

---

*In questo capitolo sono presentati cenni relativi l'anatomia del rene, le patologie che lo colpiscono e le terapie adottate per curare i pazienti affetti da malattia renale cronica (2, 3). Lo scopo è quello di inquadrare lo scenario entro il quale si svolgono gli studi relativi l'ingegneria tissutale applicata alla medicina rigenerativa, identificando i parametri essenziali della funzione renale che devono essere mantenuti nell'organo ingegnerizzato.*

## 1.1. Anatomia del rene

I reni sono organi deputati all'eliminazione dei prodotti terminali del metabolismo e dell'acqua in eccesso, funzioni essenziali per il controllo della concentrazione delle varie sostanze all'interno dell'organismo in quanto mantengono costante il bilancio elettrolitico e idrico nei fluidi tissutali. Svolgono anche funzioni endocrine: rilasciano ad esempio renina, che influenza la pressione sanguigna. Sono situati posteriormente, dietro il peritoneo, su ciascun lato della colonna vertebrale (Fig. 1.1). Ogni rene misura tipicamente 11 cm di lunghezza, 6 cm di larghezza e 3 cm in senso antero-posteriore, con peso medio pari a 150 g negli uomini e 135 g nelle donne. La porzione mediale del rene presenta una rientranza chiamata *ilo*, attraverso cui passano l'arteria e la vena renale, i vasi linfatici, le fibre nervose e l'uretere, che porta l'urina finale dal rene alla vescica dove viene accumulata fino allo svuotamento. Il rene è rivestito da una robusta *capsula* fibrosa che protegge la sua delicata struttura interna. Ciascun rene e ciascuna ghiandola surrenale sono infine rivestiti dalla *fascia renale*, una guaina di tessuto connettivo denso ed elastico, insieme ad uno strato circostante di tessuto adiposo.

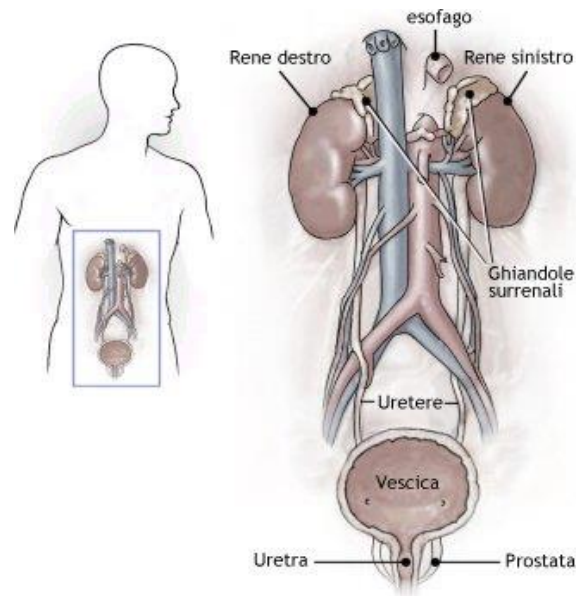
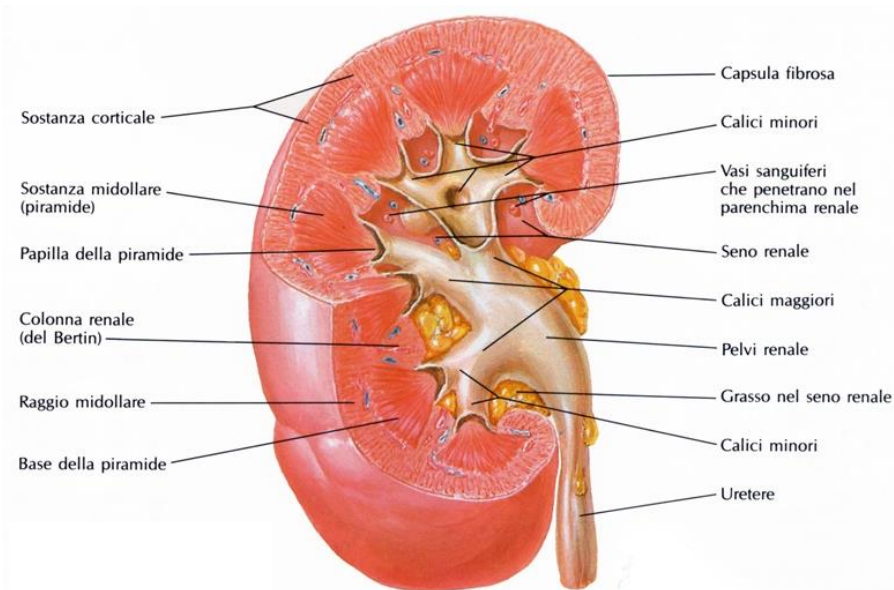


Figura 1.1: rapporti dei reni e degli ureteri nella regione retroperitoneale del maschio (© McGraw-Hill).

### 1.1.1. Struttura macroscopica interna

Se si pratica una sezione longitudinale nel rene, le due principali regioni che si osservano sono esternamente la *corticale* e, più internamente, la *midollare* (Fig. 1.2). Quest'ultima è suddivisa in 8-10 masse di tessuto a forma di cono chiamate *piramidi renali*. Ciascuna piramide ha origine al confine tra la regione corticale e la regione midollare e termina nella *papilla*, che si proietta nello spazio della *pelvi renale*, una continuazione a forma di imbuto della terminazione superiore dell'uretere. Il margine esterno della pelvi è diviso in tasche a terminazione aperta chiamate *calici maggiori* che si estendono verso l'interno dividendosi nei *calici minori*, che raccolgono l'urina nei tubuli di ogni papilla. Le pareti dei calici, della pelvi e dell'uretere contengono elementi contrattili che spingono l'urina nella *vescica*, dove viene conservata fino allo svuotamento tramite la *minzione*.





**Figura 1.2: rene di destra sezionato in vari piani, mostrante il parenchima e la pelvi renale (©Guyton e Hall).**

### 1.1.2. Vascolarizzazione

Le arterie renali ricevono il 20% circa della gittata cardiaca per irrorare organi che rappresentano meno di un centesimo del peso corporeo totale. L'arteria renale entra nel rene attraverso l'ilo e poi si dirama progressivamente a formare le *arterie interlobari*, le *arterie arcuate*, le *arterie interlobulari* (o *arterie radiali*) e le *arteriole afferenti*, da cui originano i *capillari glomerulari*, dove grosse quantità di liquido e di soluti (ad eccezione delle proteine del plasma) sono filtrate per iniziare la formazione dell'urina (Fig. 1.3). Le terminazioni distali dei capillari di ogni glomerulo si fondono a formare l'*arteriola efferente*, che conduce a una seconda rete di capillari, i *capillari peritubulari*, che circondano i tubuli renali. La circolazione renale è caratterizzata dal fatto di avere due letti capillari, i capillari glomerulari e quelli peritubulari, disposti in serie e separati dalle arteriole efferenti, che regolano la pressione idrostatica in entrambi i letti capillari. Modificando la resistenza offerta dalle arteriole afferenti ed efferenti, i reni possono regolare la pressione idrostatica sia nei capillari glomerulari sia in quelli peritubulari, variando così la velocità di filtrazione glomerulare, il riassorbimento tubulare o entrambi, in risposta alle richieste omeostatiche dell'organismo. I capillari peritubulari si svuotano nei vasi del sistema venoso, che corrono paralleli ai vasi arteriolari. I vasi sanguigni del

sistema venoso formano progressivamente la *vena interlobulare*, la *vena arcuata*, la *vena interlobare* e la *vena renale*, che lascia il rene accanto all'arteria renale e all'uretere.

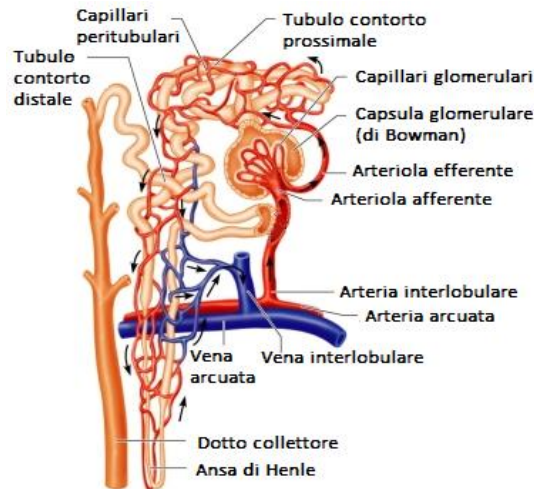


Figura 1.3: vasi sanguigni principali (© Guyton e Hall).

### 1.1.3. Struttura microscopica

Il rene è costituito da molti tubuli uriniferi tortuosi, strettamente affastellati, tenuti insieme da una delicata trama connettivale nella quale decorrono vasi sanguigni, linfatici e nervi. Ciascun tubulo consiste di due porzioni embriologicamente distinte: quella del *nefrone*, che produce l'urina, e quella del *dotto collettore*, che completa il processo di concentrazione dell'urina e attraverso il quale essa si porta nei calici renali, nella pelvi renale, nell'uretere e nella vescica urinaria.

#### Il nefrone

Il nefrone consiste di un *corpuscolo renale*, deputato alla filtrazione plasmatica, e di un *tubulo renale*, deputato al riassorbimento selettivo del filtrato per formare l'urina (Fig. 1.4). I dotti collettori trasportano il fluido da numerosi tubuli renali fino a un dotto papillare terminale, il quale si apre in un calice minore in corrispondenza dell'apice di una papilla renale.

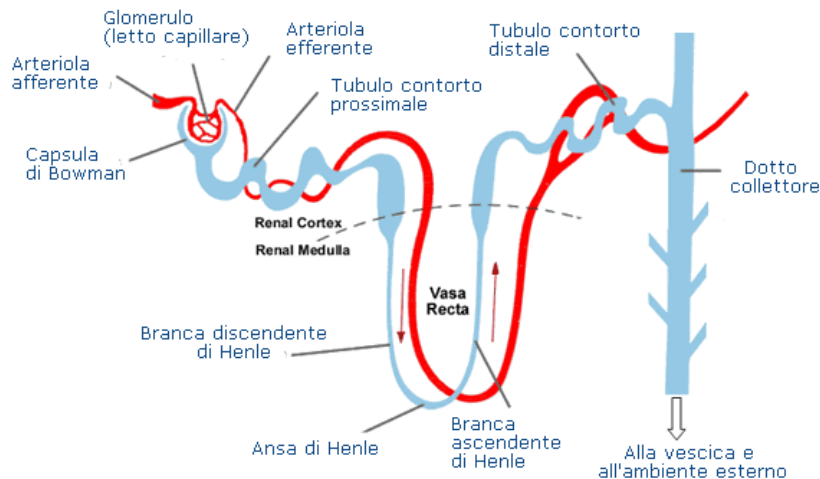


Figura 1.4: l'unità funzionale del rene, il nefrone (© McGraw-Hill).

### Il corpuscolo renale

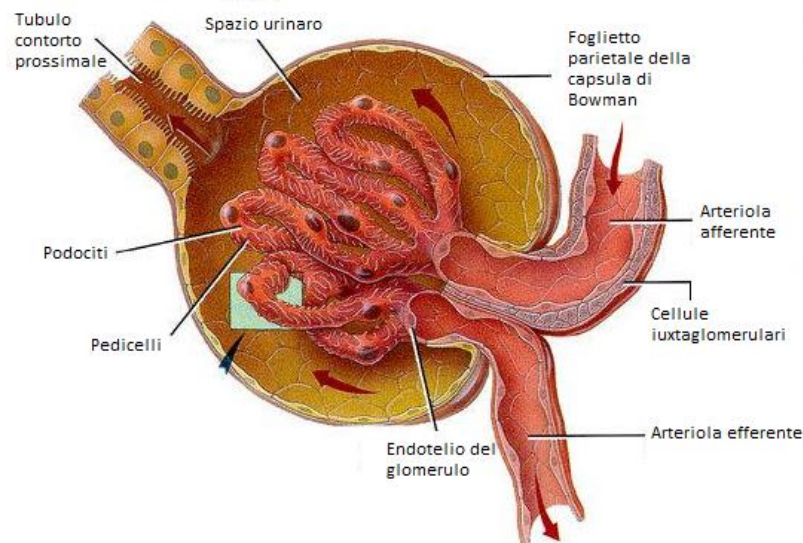
I corpuscoli renali sono piccole strutture rotondeggianti del diametro medio di 0.2 mm. Ciascuno di essi possiede un *glomerulo vascolare centrale* e una *capsula glomerulare* (di *Bowman*), dalla quale trae origine il tubulo renale (Fig. 1.5). In un rene vi sono circa un milione di corpuscoli renali e il loro numero diminuisce con l'età, con riduzione del filtrato glomerulare.

Il *glomerulo* è un insieme di capillari sanguigni convoluti riforniti da un'arteriola afferente, che entra nella capsula dal lato opposto rispetto al polo urinario, in corrispondenza del quale il filtrato entra nel tubulo. Un'arteriola efferente fuoriesce dallo stesso punto, il polo vascolare del corpuscolo. La membrana capillare glomerulare è formata da tre strati: (1) l'*endotelio* capillare, (2) la *membrana basale* e (3) uno strato di *cellule epiteliali*, i *podociti*. Insieme questi tre strati formano la barriera di filtrazione. L'*endotelio* capillare è costellato da migliaia di piccoli pori detti *fenestrate*. Anche se le fenestrazioni sono relativamente grandi, le cellule endoteliali sono cariche negativamente ed ostacolano quindi il passaggio delle proteine plasmatiche. Esternamente all'*endotelio* c'è la *membrana basale*, la quale consiste in una rete di collagene e di fibrille di proteoglicani, che presentano grossi spazi attraverso cui possono essere filtrate grandi quantità di acqua e di piccoli soluti. La membrana basale impedisce di fatto la filtrazione delle proteine plasmatiche, in parte a causa delle forti cariche elettriche negative associate ai

proteoglicani. L'ultima componente della membrana glomerulare è uno strato di cellule epiteliali che tappezza la superficie esterna del glomerulo. Queste cellule (podociti) non formano uno strato continuo, ma hanno dei lunghi processi pedicellari che circondano la superficie esterna dei capillari. I pedicelli sono separati da spazi chiamati *pori*, attraverso cui passa il filtrato glomerulare. Anche i podociti, essendo carichi negativamente, forniscono un'ulteriore limitazione alla filtrazione delle proteine plasmatiche.

La *capsula di Bowman* è l'estremità a fondo cieco di un tubulo renale, nella cui profonda invaginazione è accolto il glomerulo. La capsula è rivestita da un epitelio pavimentoso semplice sul foglietto esterno (parietale), mentre il foglietto glomerulare è costituito dai podociti. Tra i due foglietti della capsula si trova uno *spazio urinario (di Bowman)* appiattito, che si continua con il tubulo contorto prossimale.

*Cellule mesangiali irregolari*, dotate di proprietà fagocitarie e contrattili, si trovano comprese all'interno del corpuscolo renale e producono la *matrice del mesangio glomerulare*, un tessuto connettivo specializzato che tiene insieme l'ansa dei capillari glomerulari e occupa lo spazio compreso tra le superfici endoteliali che non sono rivestite da podociti. Queste cellule sono coinvolte nel *turnover* della membrana basale glomerulare. Esse ripuliscono il filtro glomerulare dagli immunocomplessi e dai detriti cellulari, mentre le loro proprietà contrattili collaborano nella regolazione del flusso sanguigno.



**Figura 1.5: Il corpuscolo renale (© Guyton e Hall).**

## Il tubulo renale

Il *tubulo renale* o *urinifero* si origina dalla capsula glomerulare con il *tubulo contorto prossimale*. Questo è costituito da una porzione contorta o convoluta, che diviene rettilinea in vicinanza della sostanza midollare, diventando il segmento spesso della porzione discendente dell'*ansa di Henle*, la quale poi si continua con un tratto ascendente mediante una stretta curva a U (Fig. 1.4). I tratti dell'ansa di Henle situati più in profondità nella sostanza midollare sono più stretti e presentano pareti più sottili, venendo descritti come *segmenti sottili discendente e ascendente*. Il segmento spesso del tratto ascendente appartiene al *tubulo distale* ed è seguito dalla porzione contorta del *tubulo distale*. Infine il nefrone diviene rettilineo ancora una volta e termina unendosi a un *dotto collettore*. I dotti collettori originano in corrispondenza dei raggi midollari all'interno della sostanza corticale e si uniscono via via agli altri. Alla fine, si aprono nei più grandi *dotti papillari*. I tubuli renali sono completamente rivestiti da un epitelio semplice. Il tipo di cellula epiteliale varia in base ai compiti funzionali nelle diverse regioni.

## **1.2. Produzione dell'urina**

La filtrazione glomerulare è il passaggio di acqua, contenente piccole molecole disciolte, dal plasma sanguigno allo spazio urinario nella capsula glomerulare (Fig. 1.6). Le molecole più grandi, come ad esempio le proteine plasmatiche al di sopra dei 70 Kilodaltons e quelle con carica netta negativa, i polisaccaridi, i lipidi e le cellule, sono in gran parte trattenuti all'interno del sangue a causa della permeabilità selettiva della membrana basale glomerulare. La filtrazione avviene secondo un elevato gradiente pressorio tra gli ampi capillari glomerulari e lo spazio urinario, con la membrana basale glomerulare che si trova a essere la principale struttura di separazione tra i due compartimenti. Tale gradiente supera di gran lunga la pressione colloidale-osmotica del sangue, che si oppone al flusso in uscita del filtrato. Non appena formatosi, il filtrato glomerulare è isotonicamente rispetto al sangue glomerulare e ha identica concentrazione di ioni e piccole molecole.

Quando il filtrato glomerulare entra nei tubuli renali scorre in modo sequenziale attraverso le seguenti parti del tubulo – il *tubulo prossimale*, l'*ansa di Henle*, il *tubulo distale*, il *tubulo collettore* e, alla fine, il *dotto collettore* – prima di essere escreto sotto forma di urina. Lungo questo percorso alcune sostanze vengono selettivamente riassorbite dai tubuli nel flusso sanguigno, mentre altre vengono secrete dal sangue nel lume tubulare. Alla fine, l'urina che si forma e tutte le sostanze in essa presenti rappresentano la somma di tre processi renali di base: la filtrazione glomerulare, il riassorbimento tubulare e la secrezione tubulare.

Il riassorbimento selettivo del filtrato è un processo attivo e avviene principalmente nei tubuli contorti prossimali, i quali riassorbono glucosio, aminoacidi, fosfati, cloro, sodio, calcio e bicarbonato; essi, inoltre, recuperano piccole proteine (ad esempio l'albumina) mediante l'endocitosi. Le cellule dei tubuli prossimali sono permeabili all'acqua, che fuoriesce passivamente dai tubuli, così che il filtrato rimane localmente isotonicamente rispetto al sangue. La porzione rimanente del tubulo riassorbe la maggior parte dell'acqua (in misura variabile fino al 95%), così che, quando l'urina raggiunge i calici, essa è di solito notevolmente ridotta di volume e ipertonica rispetto al sangue.

Poiché gli ioni sodio e cloruro sono selettivamente riassorbiti dalle cellule dei tratti ascendenti e dei tubuli distali sotto regolazione dell'aldosterone, il filtrato all'estremità distale del tubulo contorto è ipotonico. Quando il filtrato raggiunge i dotti collettori, discende nuovamente attraverso la sostanza midollare e rientra così in una regione a elevata pressione osmotica. Le cellule che rivestono i dotti collettori sono variabilmente permeabili all'acqua, sotto l'influenza dell'*ormone antidiuretico* (ADH). L'acqua segue un gradiente osmotico nel portarsi negli spazi extratubulari adiacenti, così che la tonicità del filtrato aumenta gradualmente lungo i dotti collettori, finché, in corrispondenza della sommità delle piramidi renali, essa è maggiore di quella del sangue. Questo complesso sistema è altamente flessibile e il bilancio tra la velocità di filtrazione e l'assorbimento può essere variato per andare incontro alle esigenze fisiologiche del momento.

Il controllo delle concentrazioni di ioni ammonio e idrogeno è fondamentale per la regolazione acido-base nel sangue. La secrezione di vari tipi di ioni avviene in numerosi

punti. Oltre il 91% del potassio ingerito è escreto con le urine, in gran parte dalle cellule del tubulo distale e del dotto collettore.

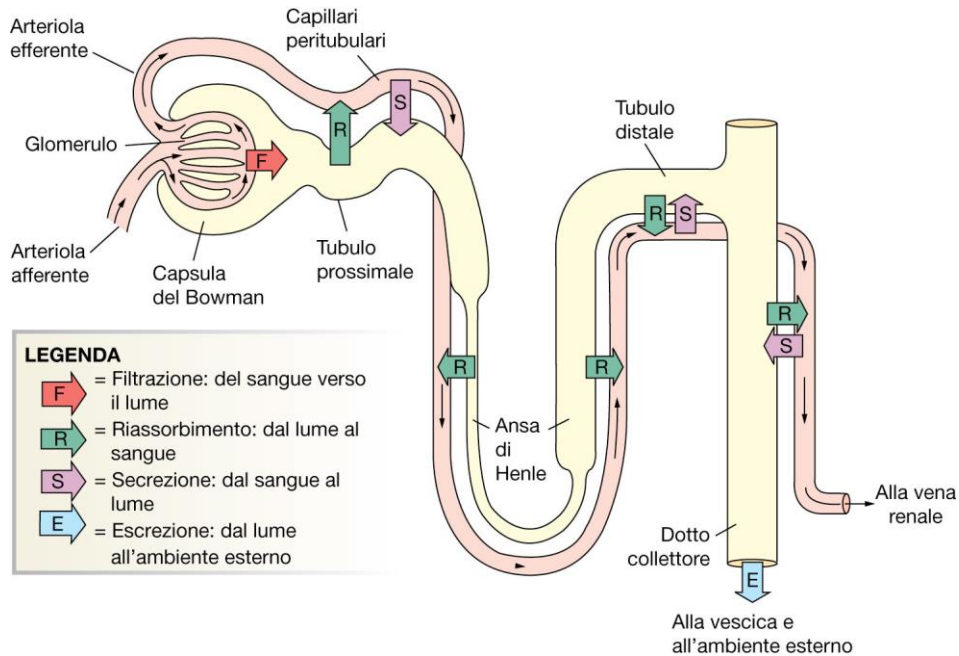


Figura 1.6: produzione dell'urina (© McGraw-Hill).

### 1.3. Molteplici funzioni renali

I reni sono il mezzo principale di eliminazione dei prodotti di scarto del metabolismo non più necessari all'organismo. Svolgono però diverse altre importanti funzioni, tra cui:

- *Regolazione del bilancio idrico e degli elettroliti.* Per il mantenimento dell'omeostasi, l'escrezione di liquidi e degli elettroliti deve corrispondere esattamente alla quantità introdotta.
- *Regolazione della pressione arteriosa.* I reni hanno un ruolo fondamentale nella regolazione a lungo termine della pressione arteriosa, poichè eliminano quantità variabili di acqua e sodio. Contribuiscono inoltre alla regolazione della pressione arteriosa a breve termine secernendo ormoni e fattori vasoattivi o sostanze che portano alla formazione di prodotti vasoattivi.

- *Regolazione dell'equilibrio acido - base.* I reni contribuiscono alla regolazione acido - base assieme ai polmoni e ai tamponi dei liquidi corporei, eliminando gli acidi e regolando le riserve dei tamponi dei liquidi corporei. I reni sono l'unico mezzo per eliminare dal corpo alcuni tipi di acidi, come ad esempio l'acido solforico e l'acido fosforico, che provengono dal metabolismo delle proteine.
- *Regolazione della produzione di eritrociti.* I reni secernano l'*eritropoietina*, che stimola la produzione di globuli rossi a partire da *cellule staminali ematopoietiche* del midollo osseo.
- *Regolazione della produzione di 1,25 - diidrossicolecalciferolo D<sub>3</sub>.* I reni producono la forma attiva della vitamina D, cioè l'1,25 - diidrossicolecalciferolo D<sub>3</sub> (*calcitriolo*), idrossilando questa vitamina in posizione 1. Il calcitriolo è essenziale per la normale deposizione di calcio nelle ossa e per il normale assorbimento di calcio da parte del tratto gastrointestinale.
- *Sintesi del glucosio.* Nei periodi di digiuno prolungato, i reni sono in grado di sintetizzare glucosio a partire da aminoacidi e altri precursori, in un processo noto come *glicogenesi*.

#### **1.4. Patologie renali**

Le patologie dei reni sono tra le più importanti cause di decesso e di invalidità in molti Paesi in tutto il mondo. Per esempio, è stato stimato che nel 2009, negli Stati Uniti, più di 26 milioni di adulti fossero affetti da patologie renali croniche e molti altri milioni di persone da insufficienza renale acuta o da forme meno gravi di disfunzione renale (2).

Le patologie renali gravi possono essere suddivise in due categorie principali: (a) *l'insufficienza renale acuta*, in cui i reni smettono improvvisamente di funzionare in modo completo o quasi completo, ma possono riprendere la normale funzionalità e (b) *l'insufficienza renale cronica*, in cui c'è una progressiva perdita di funzionalità di un numero sempre maggiore di nefroni che gradualmente diminuiscono la funzionalità generale renale. All'interno delle due categorie generali, ci sono molte patologie renali



specifiche che possono colpire i vasi sanguigni renali, i glomeruli, i tubuli, l'interstizio renale e parte del tratto urinifero al di fuori dei reni, compresi gli ureteri e la vescica.

#### **1.4.1. Insufficienza renale acuta**

Le cause dell'insufficienza renale acuta possono essere suddivise nelle seguenti tre categorie principali:

- *insufficienza renale acuta prerenale*, causata da un insufficiente apporto sanguigno ai reni. Può essere dovuta, ad esempio, a un'insufficienza cardiaca con ridotta gittata e bassa pressione sanguigna o a condizioni associate a diminuito volume ematico e bassa pressione sanguigna, come un'emorragia grave.
- *Insufficienza renale acuta intrarenale* che risulta da anomalie all'interno dello stesso rene, che possono interessare i vasi sanguigni, i glomeruli o i tubuli.
- *Insufficienza renale acuta postrenale* che risulta dall'ostruzione del sistema collettore urinario in un punto qualsiasi compreso tra i calici e l'uscita dalla vescica. La causa più comune di ostruzione del tratto urinario al di fuori del rene sono i calcoli renali causati dalla precipitazione di calcio, urato o cistina.

#### **1.4.2. Insufficienza renale cronica**

L'*insufficienza renale cronica* deriva dalla perdita progressiva e irreversibile di un grosso numero di nefroni funzionanti. Di solito non compaiono gravi sintomi clinici finché il numero di nefroni funzionanti non scende al di sotto del 70-75% del valore normale, in quanto può ancora essere mantenuta una normale concentrazione plasmatica degli elettroliti e il volume del liquido corporeo può rimanere adeguato (2).

La Tabella 1.1 mostra alcune delle principali cause di insufficienza renale cronica che, in generale, può comparire, come quella acuta, a causa di disordini dei vasi sanguigni, dei glomeruli, dei tubuli, dell'interstizio renale e del tratto urinario inferiore.

Alcune cause di insufficienza renale cronica
<b>Disordini metabolici</b>
Diabete mellito
Obesità
Amiloidosi
<b>Ipertensione</b>
<b>Alterazioni vascolari renali</b>
Aterosclerosi
Nefrosclerosi-ipertensione
<b>Disordini immunologici</b>
Glomerulonefrite
Poliartrite nodosa
Lupus eritematoso
<b>Infezioni</b>
Pielonefrite
Tubercolosi
<b>Disordini tubulari primari</b>
Sostanze nefrotossiche
<b>Ostruzione del tratto urinario</b>
Calcoli renali
Ipertrofia prostatica
<b>Disordini congeniti</b>
Rene policistico
Mancanza congenita di tessuto renale (ipoplasia renale)

**Tabella 1.1: cause di insufficienza renale cronica (2).**

In molti casi, un danno iniziale al rene porta al progressivo deterioramento della funzionalità renale e all'ulteriore perdita di nefroni fino al punto in cui il soggetto, per sopravvivere, deve essere sottoposto a dialisi o a trapianto di rene. Questa condizione è nota come *uremia terminale* (ESRD, End-Stage Renal Disease; stadio terminale dell'insufficienza renale).

La Tabella 1.2 mostra le cause più comuni di ESRD. Agli inizi degli anni Ottanta si pensava che tutte le forme di glomerulonefrite fossero la più frequente causa iniziale di ESRD. Negli ultimi anni si è cominciato a riconoscere che le principali cause sono il diabete mellito e l'ipertensione, essendo insieme responsabili di più del 70% di tutte le

insufficienze renali croniche (2). L'eccessivo aumento di peso (obesità) sembra essere il fattore di rischio più importante per le due principali cause di ESDR, ovvero diabete e ipertensione. Il diabete di tipo II, che è strettamente legato all'obesità, è responsabile di più del 90% di tutti i casi di diabete mellito (2). Un eccessivo aumento di peso è anche una delle principali cause di ipertensione essenziale, essendo responsabile del 65-75% del rischio di sviluppare ipertensione negli adulti (2). Oltre a causare il danno renale attraverso il diabete e l'ipertensione, l'obesità può avere effetti aggiuntivi o sinergici nel peggiorare la funzionalità renale di pazienti con patologie renali preesistenti.

Cause più comuni di uremia terminale (ESDR)	
Cause	Percentuale di pazienti con ESDR
Diabete mellito	45
Ipertensione	27
Glomerulonefrite	8
Rene policistico	2
Altre/sconosciute	18

Tabella 1.2: cause di ESDR (2)

### 1.4.3. Trattamento dell'insufficienza renale mediante trapianto o dialisi con rene artificiale

La perdita grave della funzionalità renale, sia acuta che cronica, può essere letale e richiede la rimozione dei prodotti di scarto tossici e la reintegrazione del volume di liquido corporeo e della sua composizione fino a valori normali. Ciò può essere ottenuto tramite il trapianto renale o la dialisi con rene artificiale. Oltre 600 000 pazienti negli Stati Uniti sono sottoposti attualmente a qualche forma di terapia per l'ESRD (4).

Il trapianto del rene di un singolo donatore in un paziente con ESDR può ristabilire la funzionalità renale a un livello sufficiente per mantenere un'omeostasi sostanzialmente normale dei liquidi corporei e degli elettroliti. Ogni anno negli Stati Uniti si eseguono circa 17 000 trapianti di rene (4, 5). I pazienti sottoposti a trapianto renale vivono più a lungo e hanno meno problemi di salute rispetto a quelli sottoposti a dialisi. Tuttavia, per quasi tutti questi pazienti è necessaria una terapia immunosoppressiva di mantenimento per

prevenire il rigetto acuto e la perdita del rene trapiantato. Gli effetti collaterali dei farmaci immunosoppressori comprendono un rischio più elevato di infezioni e di sviluppo di alcuni tipi di cancro, anche se il dosaggio della terapia immunosoppressiva di solito può essere ridotto con il passare del tempo per diminuire notevolmente questi rischi.

Negli Stati Uniti, più di 450 000 soggetti con insufficienza renale irreversibile o che hanno subito la rimozione di entrambi i reni sono mantenuti in vita grazie alla dialisi con reni artificiali (4). Essa è usata anche in alcuni tipi di insufficienza renale acuta per aiutare il paziente finché i reni non riacquistano la loro funzionalità. Poiché la dialisi non è in grado di mantenere normale la composizione del liquido corporeo e non può sostituire tutte le molteplici funzioni dei reni, la salute dei pazienti in dialisi è di solito significativamente compromessa.

### **Principi di base della dialisi**

Il principio di base del rene artificiale è di far passare il sangue attraverso piccoli canali a contatto con una sottile membrana. Dall'altra parte della membrana vi è un *liquido dializzante* nel quale le sostanze sanguigne non desiderate passano per diffusione.

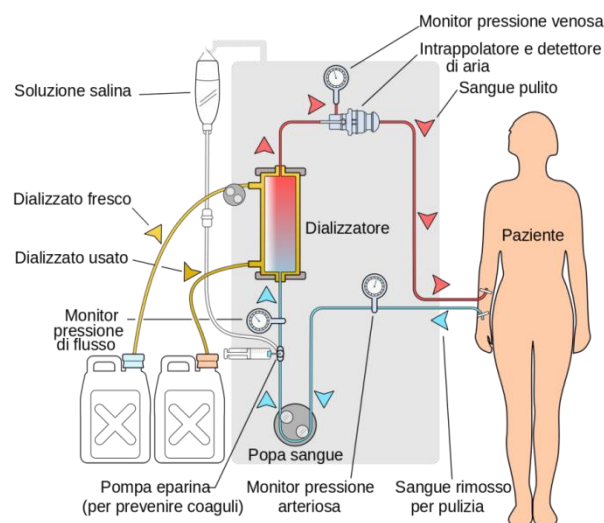
La Figura 1.7 mostra i componenti del rene artificiale; esso consta di due vie, una per liquido dializzante e l'altra per il sangue. Nella *linea del liquido dializzante* è presente il serbatoio che contiene il dializzato fresco, quello che contiene il dializzato usato e una pompa che serve per controllare perfettamente la portata di liquido prelevata dal serbatoio di liquido fresco e immessa nel dializzatore. Alcune componenti aggiuntive sono:

- un miscelatore nel caso in cui, per ottenere il dializzato, venga prelevata acqua dalla rete idrica che viene mischiata, dopo essere passata attraverso un filtro, con una polvere o un liquido dializzante concentrato contenente le sostanze necessarie;
- un monitor per il controllo di pH, temperatura e composizione del liquido;
- un rilevatore a valle del dializzatore per verificare l'eventuale presenza di emoglobina e quindi vedere se il paziente perde sangue.

Nella *linea del sangue* deve sempre essere presente una pompa a monte del dializzatore per poter controllare perfettamente la portata di sangue. Sono inoltre presenti i monitor di pressione arteriosa, di pressione venosa e di pressione di flusso. Nella linea viene infine inserita eparina per prevenire la formazione di coaguli.

La velocità del passaggio del soluto attraverso la membrana dializzante dipende (1) dal gradiente di concentrazione del soluto, (2) dalla permeabilità della membrana al soluto, (3) dall'area della superficie della membrana e (4) dal tempo in cui il plasma e il liquido rimangono a contatto con la membrana. La velocità di assorbimento del soluto è pertanto massima all'inizio, quando il gradiente di concentrazione è più ampio (quando la dialisi è appena iniziata) e diminuisce quando il gradiente si è dissipato. In un sistema a flusso, come nel caso dell'*emodialisi*, in cui il sangue e il liquido dializzato scorrono attraverso il rene artificiale, la dissipazione del gradiente di concentrazione può essere ridotta e la diffusione del soluto attraverso la membrana può essere ottimizzata aumentando la velocità di flusso ematico, del liquido dializzante o di entrambi.

Nel normale funzionamento del rene artificiale, il sangue torna in modo continuo o intermittente nella vena. Il volume totale di sangue nel rene artificiale in ogni istante è di solito inferiore a 500 mL, il flusso può essere di diverse centinaia di mL/min e la superficie totale dell'area di diffusione è compresa tra 0.6 e 2.5 m<sup>2</sup>. Oltre alla diffusione dei soluti, si può ottenere il trasferimento massivo di soluti e acqua applicando una pressione idrostatica che li spinge attraverso la membrana; tale filtrazione è detta *flusso di massa*.



**Figura 1.7: il circuito dialitico (fonte: Wikipedia).**

## 2. L'ingegneria dei tessuti e lo stato dell'arte nella rigenerazione del rene

---

*Nel presente capitolo viene proposta l'analisi della letteratura scientifica sul tema dell'ingegneria dei tessuti applicata alla medicina rigenerativa, in particolare alla rigenerazione del rene, al fine di mettere in evidenza i risultati più significativi ottenuti dai diversi gruppi di ricerca in relazione agli scopi del presente lavoro.*

### **2.1. Dialisi e trapianto renale come trattamenti per l'insufficienza renale**

Le malattie renali croniche sono una delle principali cause di morte, che interessa dall'8% al 16% della popolazione globale adulta (6). Tali percentuali risultano inoltre essere in crescita, a causa dell'aumento dell'aspettativa di vita, del tasso di obesità e, di conseguenza, del numero di individui affetti da ipertensione o diabete (7, 8).

Ad oggi, sono due le possibili terapie utilizzate per trattare pazienti affetti da patologie renali croniche: la dialisi e il trapianto. La prima è in grado di rimpiazzare la funzione filtrante, ma non può tuttavia ristabilire la funzione omeostatica ed endocrina (9-14). Se oltre a ciò si considera che la dialisi è un trattamento della durata di circa quattro ore che deve essere svolto tre volte a settimana, è facile dedurre come la qualità di vita del paziente risulti essere notevolmente compromessa. Tali cure rappresentano inoltre un costo socio-economico, in quanto bisogna considerare che il paziente non è in grado di svolgere una normale attività lavorativa. Il trapianto è sicuramente un'alternativa che migliora la qualità di vita del malato, poiché vengono ristabilite tutte le funzioni di un rene sano. Tuttavia, la quantità di organi a disposizione per il trapianto corrisponde a circa un quinto della domanda (15) e, oltre ad esserci pochi reni disponibili, alcuni di questi devono essere scartati per motivazioni differenti, come anomalie anatomiche, glomerulosclerosi avanzata, atropia tubulare, fibrosi interstiziale, patologie vascolari,

necrosi corticale e una funzione renale povera. Altro aspetto non trascurabile è che i pazienti trapiantati devono sottoporsi a una terapia immunosoppressiva a vita, di modo da prevenire il rigetto dell'organo.

Una possibile soluzione potrebbe essere trovata nell'ambito dell'ingegneria dei tessuti, il cui obiettivo è quello di rigenerare l'organo, seminando cellule su supporti (*scaffold*) con adeguate proprietà fisiche e meccaniche e stimolando adeguatamente il costrutto con stimoli biofisici e biochimici, in modo da favorire il differenziamento cellulare. In questo modo verrebbero risolti sia il problema della scarsità degli organi a disposizione, sia della terapia immunosoppressiva; seminando infatti con cellule autologhe, non si dovrebbero avere problemi per quanto riguarda un possibile rigetto.

## **2.2. L'ingegneria tessutale per la medicina rigenerativa**

L'ingegneria dei tessuti è l'applicazione di principi scientifici per la progettazione, la costruzione, la modificazione, la crescita e il mantenimento di tessuti viventi. Il tessuto ingegnerizzato è il prodotto di tre scelte: (a) le *cellule*, (b) lo *scaffold*, (c) il *condizionamento chimico e fisico*.

La scelta della *fonte cellulare* più adeguata per l'ingegnerizzazione di un tessuto deve tenere conto di numerosi fattori, ovvero: la reperibilità del tipo cellulare, la capacità proliferativa delle cellule *in vitro*, la stabilità fenotipica e l'immunogenicità. In una coltura cellulare possono essere utilizzate o (a) *cellule differenziate*, o (b) *cellule indifferenziate* o si possono effettuare delle (c) *co-culture*. Nel caso delle *cellule differenziate*, ci si deve porre il problema della difficoltà di reperimento di cellule sane in tessuti patologici, del danneggiamento del sito di donazione, della capacità proliferativa limitata e della frequente perdita del fenotipo; esse, tuttavia, sono caratterizzate dalla facilità di coltura. Le *cellule indifferenziate* possono essere o *staminali embrionali* o *staminali adulte*. Le prime hanno capacità proliferativa illimitata ma sono difficili da reperire, sia per questioni etiche, che di tecnologia; le seconde sono totipotenti o multi-potenti e presentano condizioni di coltura meno complesse. Nel caso delle cellule indifferenziate, ci si deve porre il problema di come indurre il differenziamento voluto. Infine, possono essere effettuate delle co-

*colture*: si ha quindi un effetto sinergico e regolatorio tra i diversi tipi cellulari, che porta allo sviluppo di un tessuto più funzionale.

Lo *scaffold* è una struttura di supporto che induce la crescita e lo sviluppo di un tessuto funzionale a partire da una massa di cellule originariamente disperse. Deve avere forma e proprietà chimiche e meccaniche adeguate al tessuto che si vuole generare. I materiali di cui può essere costituito sono sostanzialmente tre:

1. polimeri di sintesi (poliesteri, poliesteri-uretani)
2. polimeri naturali (ottenuti da collagene, acido ialuronico e alginati)
3. matrici decellularizzate; tali matrici sono dei tessuti ai quali stata tolta tutta la componente cellulare ed è rimasta solo la matrice extracellulare (*Extra-Cellular Matrix*, ECM).

Per quanto riguarda il *condizionamento chimico*, possono essere utilizzati dei fattori di crescita; il *condizionamento fisico* può invece essere meccanico (di compressione, di trazione..), elettrico o magnetico. Il condizionamento deve essere effettuato coerentemente al tessuto che si vuole riprodurre.

Ad oggi, si è riusciti ad ingegnerizzare organi y La loro struttura meno complessa permette infatti l'apporto di ossigeno e nutrienti attraverso diffusione semplice dai tessuti adiacenti, consentendo quindi lo sviluppo di nuovi vasi sanguigni a partire da altri già esistenti. Tuttavia, in organi complessi e compartimentalizzati come il rene, la situazione è più complicata, in quanto tale organo non può essere incorporato in modo corretto senza una riconnessione tra la nuova struttura e la vascolatura ospite. Inoltre, mentre con organi semplici è possibile ricreare *scaffold* in laboratorio utilizzando biomateriali, in strutture complesse come il rene questo è impossibile. Una soluzione potrebbe quindi essere quella di utilizzare come *scaffold* organi interi decellularizzati, in cui viene mantenuto intatto il network vascolare. Nello specifico, l'idea è quella di utilizzare il rene malato del paziente stesso che, una volta decellularizzato, viene infuso con cellule autologhe sane. Tale approccio presenta molteplici vantaggi: prima di tutto si riesce ad ottenere uno scaffold con adeguata forma e proprietà meccaniche, mantenendo intatta l'architettura dell'organo, preservando la ECM, i fattori biologici e il network vascolare; in secondo luogo, il paziente non necessita più di una terapia immunosoppressiva a vita;



verrebbe inoltre risolto il problema del numero di organi a disposizione, in quanto verrebbe utilizzato il rene del paziente stesso; infine, è stato ipotizzato che i costituenti della ECM possano inviare dei segnali alle cellule pluripotenti che vengono seminate, inducendo la differenziazione adeguata a seconda del sito: le cellule inizieranno a scambiare segnali tra di loro e con la matrice, portando alla formazione di un tessuto maturo (16-22).

Ottenere un rene funzionante e quindi trapiantabile nell'uomo a partire da una matrice ricellularizzata resta comunque una sfida importante, a causa della complessità di quest'organo. Esso presenta infatti una struttura con più di 30 tipi cellulari diversi e un network vascolare con una complessa struttura. Sono molteplici gli studi atti ad individuare le strategie di decellularizzazione e ricellularizzazione più efficienti. Nei seguenti paragrafi vengono riportati i risultati ottenuti fino a oggi nell'ambito della rigenerazione del rene.

### 2.3. Ingegneria tissutale renale

Per rimuovere il parenchima antigenico dall'intera matrice renale vengono infusi nel rene attraverso una perfusione anterograda detergenti, enzimi o soluzioni, che portano alla lisi cellulare. Ad oggi, questa tecnica è stata utilizzata per produrre *scaffold* decellularizzando reni di roditori (17-19, 22-25), maiali (26-29) e umani (30). Sono stati quindi sviluppati diversi protocolli di decellularizzazione, che utilizzano detergenti differenti per solubilizzare ed eliminare le componenti cellulari (Fig. 2.1): i più utilizzati sono il detergente non ionico Triton X-100 (17, 19, 23-26, 29, 31) e il detergente ionico Sodio Dodecil-Solfato (SDS) (17-20, 22-31). Possono inoltre essere utilizzati cicli di congelamento-decongelamento alternati (22, 29), shock osmotici (17-21, 23-26, 28-30) e desossiribonucleasi (19, 23, 26, 27).

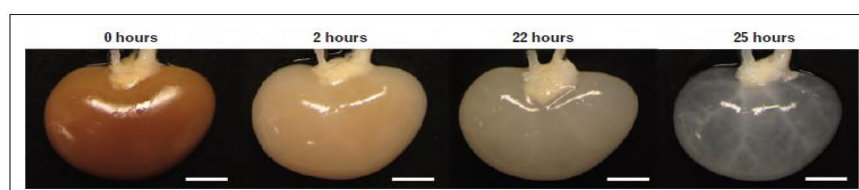


Figura 2.1: Rene di ratto Sprague-Dawley decellularizzato tramite protocollo con detergenti. Sistema vascolare visibile dopo 25 ore. Scala barra: 5 mm (Fonte: Joseph S. Uzarski et al., 2014).

A seguito del processo di decellularizzazione, è necessario ripopolare il rene con cellule in grado di proliferare e occupare la totalità della matrice. Per riuscire ad avere il ripristino di tutte le funzioni renali (filtrazione glomerulare, secrezione/riassorbimento e concentrazione dell'urina) deve essere ricostituito l'intero nefrone; è quindi necessaria la presenza di cellule endoteliali all'interno dei vasi sanguigni e dei glomeruli, di cellule epiteliali nei tubuli e nei dotti collettori, e di altre cellule di supporto, come i fibroblasti renali, i podociti e le cellule mesangiali.

Una prima fonte cellulare utilizzabile per la ricellularizzazione è rappresentata dalle cellule adulte già differenziate, isolate da tessuti biologici e capaci di proliferare generando esclusivamente cellule del loro stesso fenotipo. Un esempio è rappresentato dalle cellule endoteliali provenienti da cordone ombelicale (HUVEC), che vengono infuse attraverso l'arteria renale, e dalle cellule epiteliali, che vengono infuse attraverso l'uretere. Grazie a questa strategia è possibile ottenere un ripopolamento differenziato del comparto vascolare e di quello tubulare.

Una strategia più interessante è rappresentata dall'impiego di cellule staminali embrionali (ESc). Queste cellule, che possono essere isolate solo nello stadio di blastocisti (da 4 a 14 giorni dopo la formazione dello zigote), esprimono un grande potenziale proliferativo e, in presenza dei corretti stimoli fisici e biochimici, possono dare origine a tutti i fenotipi cellulari dell'organismo. L'uso di staminali embrionali di origine umana, tuttavia, è accompagnato da numerose problematiche etiche legate all'inevitabile distruzione dell'embrione da cui vengono prelevate. Un'alternativa potrebbe quindi essere l'uso di cellule staminali a pluripotenza indotta (iPSc), la cui scoperta in tempi recenti rappresenta una fonte potenziale per l'approvvigionamento di cellule staminali priva di controindicazioni di ordine bioetico.

Tuttavia, uno dei problemi da affrontare nel momento in cui si ha a che fare con cellule indifferenziate è quello di riuscire ad indurre un corretto differenziamento, in modo tale che siano presenti cellule del giusto fenotipo nelle diverse regioni del rene. A tale scopo, è necessario stimolare chimicamente e fisicamente il costrutto in modo adeguato. Inoltre, studi recenti mostrano che diversi segnali provenienti dalla ECM influenzano notevolmente il comportamento cellulare (17-23, 32).

Per concludere, la Tabella 2.1 riassume i principali risultati ottenuti da diversi gruppi di ricerca nell'ambito dell'ingegneria tissutale renale.

<b>Autori</b>	<b>Specie</b>	<b>Protocollo di decellularizzazione</b>	<b>Cellule utilizzate</b>	<b>Risultati ottenuti</b>
<b>Ross et al. (2009) (23)</b>	Ratto Sprague-Dawley	1° protocollo: Triton X-100 a concentrazioni crescenti (0.5, 3, 6 e 10%), acqua deionizzata, Dnasi, 4% sodio deossicolato; 2° protocollo: 3% Triton X-100, DNasi, 3% Triton X-100, 4% SDS; non specificata la durata	Cellule staminali embrionali pluripotenti murine	Definizione del miglior protocollo di decellularizzazione; SDS detergente più efficiente del Triton X-100; definizione di un protocollo di ricellularizzazione; espressione dei marker Pax-2, Ksp-caderina e pan-citocheratina
<b>Ross et al. (2012) (19)</b>	Ratto Sprague-Dawley	3% Triton X-100, DNasi, 4% SDS; non specificata la durata	B5/EGFP ESCs pluripotenti murine	Colorazione positiva per BslB4 e VEGFR in ESCs nei glomeruli e nei vasi
<b>Sullivan et al. (2012) (26)</b>	Maiale Yorkshire	0.5% SDS: 36 h; DNase: overnight	Cellule umane renali corticali primarie	Vitalità superiore delle cellule su matrice precedentemente decellularizzata con SDS rispetto a quelle decellularizzate con Triton X-100
<b>Orlando et al. (2012) (28)</b>	Maiale Yorkshire femmina	Acqua distillata: 12 h; SDS: 48 h; PBS: 5 giorni;	Cellule endoteliali murine	Definizione del protocollo di decellularizzazione ottimale; caratterizzazione morfologica dello <i>scaffold</i> ; analisi della biocompatibilità <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> ;
<b>Song et al. (2013) (17)</b>	Ratto Sprague-Dawley	1% SDS: 12 h; 1% Triton X-100: 30 min;	Cellule renali neonatali di ratto; cellule endoteliali umane della vena ombelicale;	Parziale ripristino della filtrazione renale e riassorbimento degli elettroliti in <i>scaffold</i> ricellularizzati
<b>Bonadrini et al. (2013) (18)</b>	Ratto Sprague-Dawley	1% SDS: 17 h;	R1 ESCs pluripotenti murine	Perdita della colorazione per Oct4 e aumento dell'espressione di NCAM, TIE 2 e CD31 nelle cellule dei glomeruli
<b>O' Neill et al. (2013) (21)</b>	Maiale Yorkshire	0.2% tripsona: 2h; 3% Tween: 2h; 4% sodio deossicolato: 2h	Cellule staminali renali di topo; cellule staminali mesenchimali di topo	Attività metabolica diminuita, aumento dell'espressione sulla ECM papillare
<b>Nakayama et al.</b>	Scimmia Rhesus	1% SDS: 7-10 giorni;	WA09 ESCs umane	Aumento dell'espressione dei <i>markers</i> dei geni del

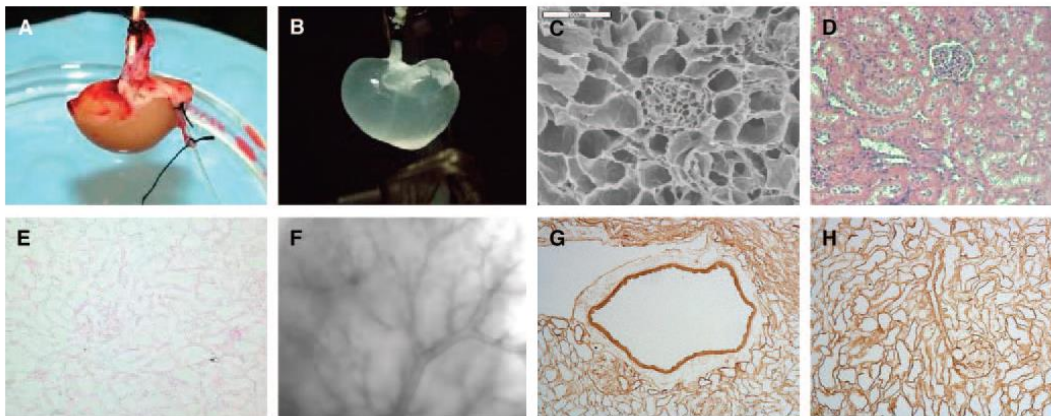
(2013) (20)				tubulo renale (DPEP1 e HS6T1)
<b>Orlando et al. (2013) (30)</b>	Reni umani scartati per il trapianto	Acqua distillata: 12h; 0.5% SDS: 48h; PBS: 5 giorni;	-	Determinazione di un protocollo di decellularizzazione di un rene umano; caratterizzazione morfologica e meccanica dello <i>scaffold</i> ; verifica della capacità angiogenica dello <i>scaffold</i> ;
<b>Burgkart et al. (2014) (22)</b>	Ratto Sprague-Dawley	0.66% SDS: 1h	Osteoblasti primari umani; cellule endoteliali umane della vena ombelicale;	Differenziazione degli osteoblasti in osteociti; aumento della deposizione dell'osteocalcina
<b>Caralt et al. (2014) (25)</b>	Ratto maschio Sprague-Dawley	Acqua distillata: 1h 40 min; 1% Triton X-100: 20 h; 0.1% SDS: 3 h 20 min; Acqua distillata: 1h 40 min;	Cellule umane epiteliali dei tubuli corticali renali (RCTE); cellule epiteliali umane derivate da cellule staminali pluripotenti indotte	Definizione del miglior protocollo di decellularizzazione; dimostrazione della presenza di fattori di crescita (bFGF e VEGF) nella biomatrice a seguito della decellularizzazione; dimostrazione di un nuovo metodo per ripopolare il compartimento tubulare attraverso una perfusione a pressione elevata.
<b>Wang et al. (2014) (29)</b>	Porcellini Bama maschi	Acqua distillata: 3h; congelamento overnight e scongelamento; acqua distillata: 3h; 1% SDS/Triton X-100/PAA/NaDOC: 18 h; PBS: 3h;	-	Definizione del miglior protocollo di decellularizzazione (confronto tra 1% SDS, 1% Triton X-100, 1% PAA, 1% NaDOC); analisi morfologica dello <i>scaffold</i> a seguito della decellularizzazione.
<b>Ko et al. (2014) (27)</b>	Maiale Yorkshire	0.5% SDS in PBS: 36 h; sciacquo con PBS; 0.0025% DNase: 12 h; sciacquo con PBS;	Cellule vascolari endoteliali che esprimono la proteina GFP	Ottimizzazione del protocollo di ricellularizzazione;

<p><b>Uzarski et al. (2015) (1)</b></p>	<p>Ratto Sprague-Dawley</p>	<p>Acqua distillata: 1h 40 min; 1% Triton X-100: 20 h; 0.1% SDS: 3 h 20 min; Acqua distillata: 1h 40 min;</p>	<p>Cellule umane epiteliali dei tubuli corticali renali (RCTE); cellule primarie umane derivate dalle <i>papillae</i> renali e marcate con CD133/1+</p>	<p>Definizione di un nuovo protocollo di ricellularizzazione (perfusione a pressioni elevate dall'arteria renale + perfusione a basse pressioni dall'uretere mantenendo il vuoto); caratterizzazione della maturazione del tessuto durante il mantenimento in coltura valutando la presenza di <i>biomarkers</i> e i <math>\Delta P</math> sullo <i>scaffold</i>.</p>
<p><b>Peloso et al. (2015) (33)</b></p>	<p>Reni umani scartati per il trapianto</p>	<p>PBS: 12 h; 0.5% SDS: 48 h; DNase: 6 h; PBS: 5 giorni;</p>	<p>-</p>	<p>Caratterizzazione morfologica e meccanica dello <i>scaffold</i>; verifica della presenza di fattori di crescita nella matrice decellularizzata;</p>

**Tabella 2.1: recenti lavori nell'ambito dell'ingegneria tissutale renale**

### 2.3.1. L'ingegneria dei tessuti applicata alla rigenerazione del rene di ratto

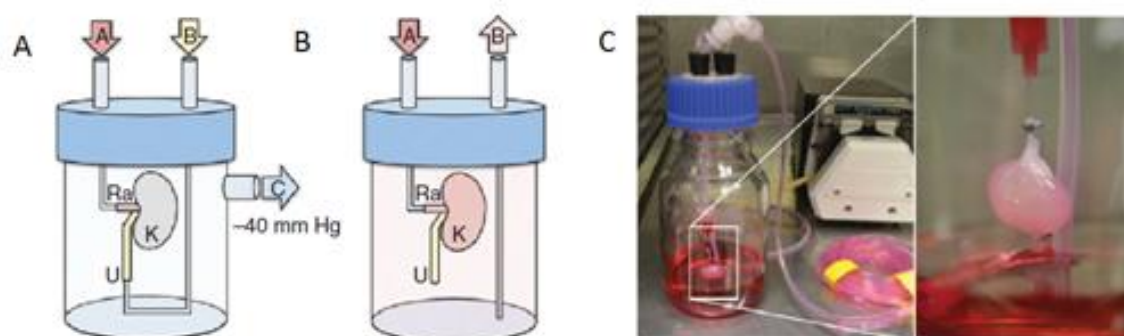
Specifici bioreattori sono stati progettati per consentire la perfusione attraverso la vascolatura del rene decellularizzato, in modo da facilitare un apporto uniforme di medium alle cellule seminate all'interno dello *scaffold* (17-19, 23). È stata effettuata una perfusione sia attraverso l'arteria renale (17-19, 23), che attraverso l'uretere (17, 23) e si è riscontrato che un'infusione retrograda attraverso l'uretere porta a una distribuzione cellulare non uniforme, dato che le cellule non riescono a raggiungere i glomeruli (17, 23). Il primo tentativo di utilizzare il rene decellularizzato come *scaffold* è stato fatto nel 2009 da Ross e il suo gruppo di ricerca (23) (Tabella 2.1). I risultati della procedura di decellularizzazione (Fig. 2.2) hanno evidenziato la completa rimozione del materiale cellulare dalla matrice, ma hanno anche rilevato una sostanziale tossicità dei detergenti non ionici. Il Sodio Dodecil-Solfato (SDS) viene qui identificato come il detergente più efficace nell'eliminazione di materiale nucleare e detriti e meno aggressivo nei confronti delle proteine della matrice.



**Figura 2.2: Decellularizzazione del rene secondo il protocollo di Ross. A) Rene immediatamente dopo l'espianto: si notano l'incannulamento dell'arteria e dell'uretere. B) Rene dopo la perfusione con SDS. C) Immagine SEM della matrice decellularizzata: si nota la struttura di un glomerulo e della zona tubulare adiacente. D-E) Colorazioni con ematossilina e eosina su tessuto renale prima e dopo la decellularizzazione. Si nota la completa rimozione del materiale cellulare residuo. Infine, attraverso colorazioni immunohistochimiche è possibile valutare la conservazione delle proteine di membrana nella regione corticale (G, laminina) e midollare (H, collagene IV) della matrice (Fonte: Ross et al., 2009).**

Per quanto riguarda invece il protocollo di ricellularizzazione, cellule staminali embrionali murine (mES) sono state infuse manualmente attraverso l'arteria renale e l'uretere. I

primi studi hanno mostrato come le cellule tendessero a popolare principalmente i vasi arteriosi e i capillari glomerulari. È stata inoltre riscontrata una perdita del fenotipo embrionale delle cellule infuse e la loro differenziazione verso il fenotipo endoteliale ed epiteliale. Da questo studio è tuttavia emersa la difficoltà di ripopolare l'uretere e i capillari peritubulari con cellule, dato che esse, una volta giunte al glomerulo, rimangono bloccate. A livello di questa struttura si osserva infatti la filtrazione di acqua dai capillari glomerulari ai tubuli, ma non il passaggio di cellule. Una possibile soluzione per permettere la ripopolazione anche dei tubuli potrebbe essere quella di infondere dall'uretere. Tuttavia, tale procedura risulta essere difficoltosa in quanto i tubuli renali sono dei condotti chiusi e, infondendo del liquido, si rischierebbe la distruzione della struttura. È stato quindi ideato un nuovo protocollo di ricellularizzazione da Song e il suo gruppo di ricerca (17) (Tabella 2.1). Esso consiste nella perfusione di un rene di ratto decellularizzato con cellule endoteliali umane differenziate attraverso l'arteria renale, seguito dalla perfusione di cellule renali neonatali di ratto attraverso l'uretere, mantenendo però una pressione negativa nella camera del bioreattore (circa -40/-50 mmHg), di modo da permettere al liquido nel rene di fuoriuscire dai tubuli grazie al gradiente di pressione trans-renale (Fig. 2.3). Questo nuovo protocollo ha permesso un miglioramento per quanto riguarda la distribuzione e l'adesione delle cellule nel sistema collettore. Tuttavia, nonostante il sofisticato metodo di perfusione, si è visto che le cellule nei compartimenti epiteliali ed endoteliali sono comunque principalmente situate nei capillari glomerulari e solo in quantità minore nei tubuli renali o nella circolazione venosa.



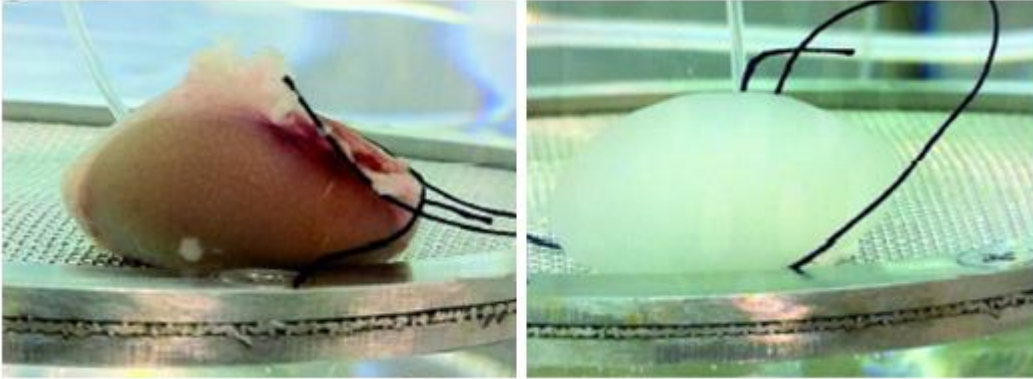
**Figura 2.3: Rappresentazione della camera di perfusione del rene di ratto utilizzata da Song durante (A) la fase di infusione delle cellule dall'uretere e (B) la successiva perfusione dall'arteria renale. In (C) è visibile un dettaglio del sistema di perfusione e dell'incannulamento del rene (Adattato da Song et al., 2013).**

Il gruppo di Ott ha però verificato anche il ripristino di una primitiva funzione urinaria, sia *in vitro* che *in vivo*. Gli Autori hanno perfuso una soluzione standardizzata attraverso l'arteria renale di un rene nativo, di uno decellularizzato e di uno ricellularizzato; hanno quindi analizzato i liquidi uscenti sia dalla vena, che dall'uretere. Nei reni decellularizzati, gli autori hanno notato una maggiore produzione di urina diluita, una diminuzione della ritenzione di albumina e un minor riassorbimento di glucosio ed elettroliti rispetto al rene nativo, che presenta una barriera di filtrazione meno permeabile. Ricellularizzando tali reni e analizzando nuovamente i liquidi escreti, hanno tuttavia riscontrato, rispetto ai reni decellularizzati, una diminuzione dell'urina prodotta, un aumento della ritenzione di albumina e un parziale ripristino del riassorbimento di glucosio ed elettroliti; ciò indicherebbe che le cellule seminate sono state in grado di ristabilire almeno parzialmente la funzione renale.

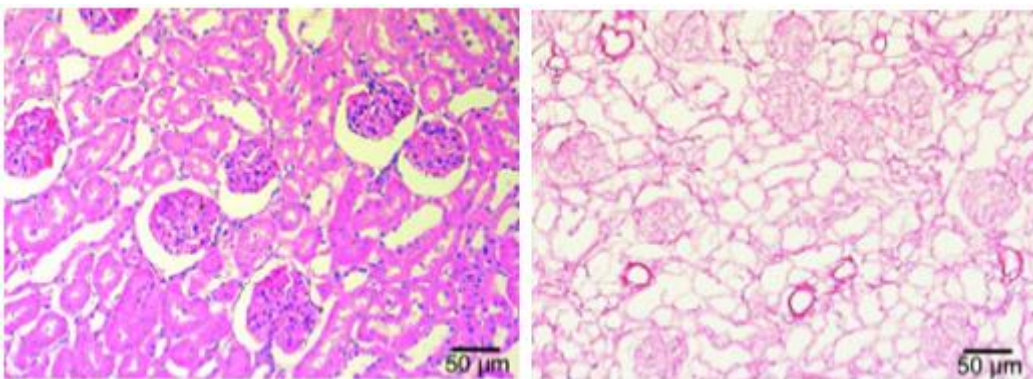
Un terzo lavoro sul rene di ratto è stato svolto da Bonadrini e il suo gruppo di ricerca (18) (Tabella 2.1). Partendo dai risultati ottenuti da Ross, hanno ottimizzato il protocollo di decellularizzazione. Infatti, se nei precedenti studi erano stati effettuati dei lavaggi sia con detergenti ionici che con detergenti anionici, ora è previsto l'uso di un solo detergente (SDS 1%), che mantiene inalterata la struttura tridimensionale e la composizione della ECM, eliminando la tossicità dovuta all'esposizione prolungata con altri agenti chimici (Fig. 2.4). Nel protocollo sviluppato da Bonadrini *et al.* è stato quindi eliminato il detergente Triton X-100, che, a differenza dell'SDS, distrugge la struttura del collagene. Inoltre, è stato accorciato il tempo necessario per la rimozione cellulare (17 ore contro i 5 giorni del gruppo di ricerca di Ross), che contribuisce a preservare meglio l'integrità della matrice renale. Nonostante sia stato eliminato l'utilizzo di un detergente e sia diminuita la durata del protocollo di decellularizzazione, gli Autori hanno comunque ottenuto matrici ben conservate, sia per quanto riguarda la struttura tridimensionale, che i componenti di cui essa è costituita, e, allo stesso tempo, sono stati completamente rimossi sia la componente cellulare che il materiale nucleare, come mostrato nelle Figure 2.5 e 2.6. Durante il processo di decellularizzazione, l'infusione dell'SDS avviene mediante una pompa peristaltica e i valori di pressione vengono mantenuti entro range fisiologici; tale approccio differisce quindi da quello di Ross, che utilizza esclusivamente la gravità come



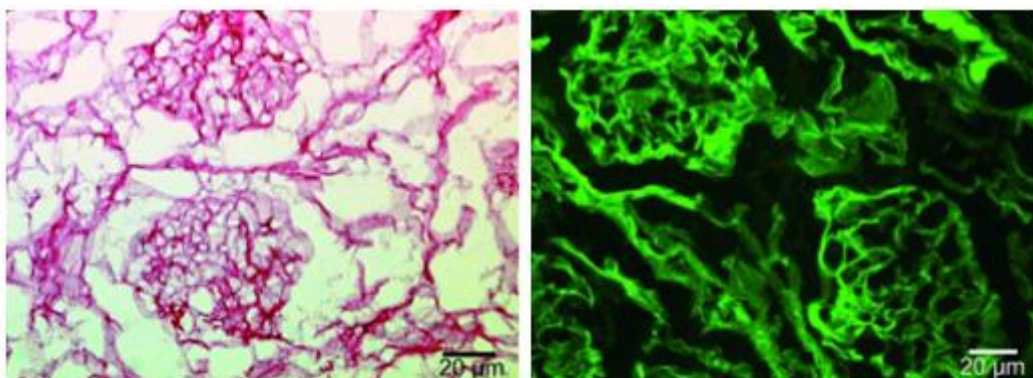
forza motrice della perfusione, ed è probabilmente la ragione grazie alla quale si riesce a decellularizzare l'organo più velocemente ma in modo comunque efficace.



**Figura 2.4: Fotografie del rene prima (a sinistra) e dopo (a destra) il processo di decellularizzazione secondo la metodica proposta da Bonandrini (Fonte: Bonandrini et al., 2013).**



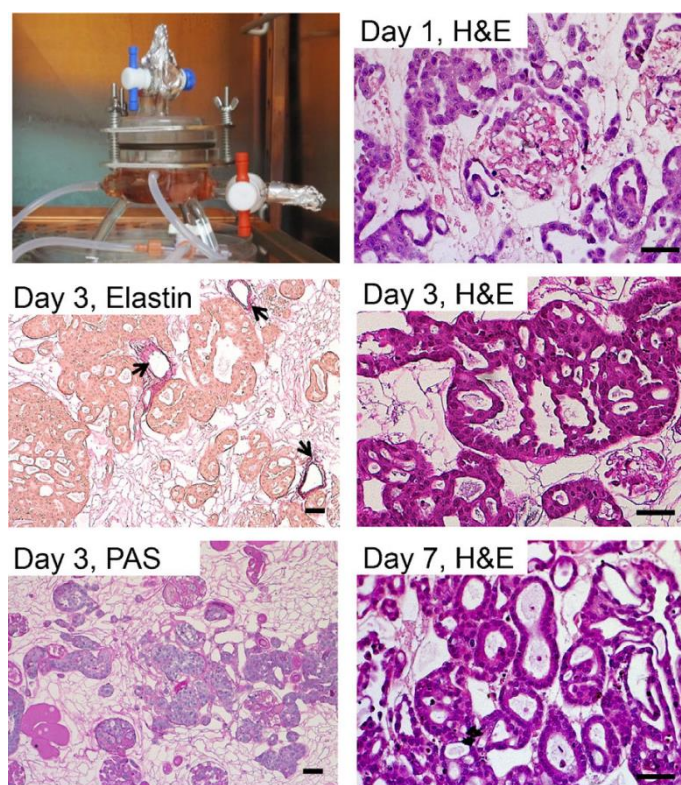
**Figura 2.5: Colorazioni con ematossilina e eosina dei campioni di tessuto renale prelevati prima (a sinistra) e dopo (a destra) il protocollo di decellularizzazione. Si noti la completa rimozione dei nuclei (ematossilina, in viola) (Fonte: Bonandrini et al., 2013).**



**Figura 2.6: A sinistra: particolare di un glomerulo decellularizzato (colorazione con ematossilina e eosina). A destra: particolare di un glomerulo in un'immagine di immunofluorescenza con DAPI (nuclei, in blu) e WGA Agglutinina (matrice, in verde). In entrambi i casi si nota l'assenza di materiale nucleare all'interno delle strutture (Fonte: Bonandrini et al., 2013).**

Anche in questo lavoro, così come nei precedenti, si ha che, a seguito del processo di ricellularizzazione, il compartimento vascolare risulta ripopolato in maniera ottimale, mentre quello tubulare presenta un quantitativo di cellule decisamente minore.

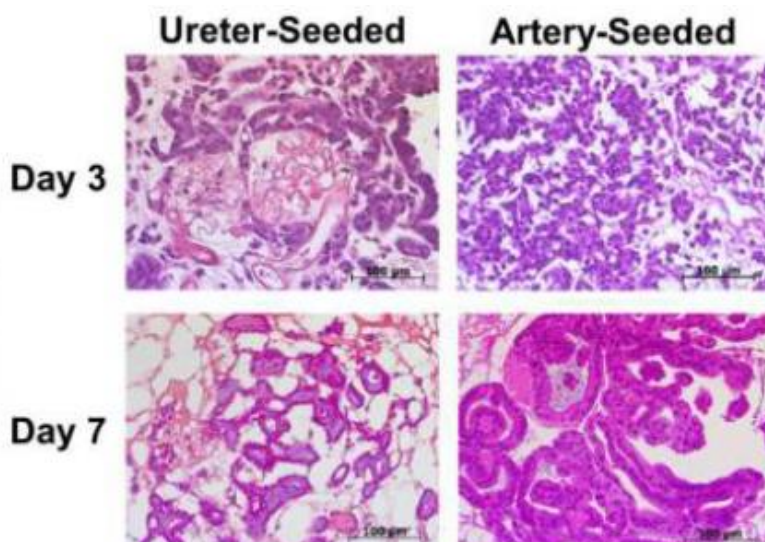
Un metodo alternativo per ripopolare il compartimento tubulare senza infondere le cellule attraverso l'uretere è stato ideato da Caralt e coautori (25) (Tabella 2.1). Essi hanno infatti infuso cellule umane epiteliali dei tubuli corticali renali (*Renal Cortical Tubular Epithelial*, RCTE) solo attraverso l'arteria renale, ma a pressioni elevate utilizzando una portata di perfusione pari a 25 mL/min; ciò ha permesso alle cellule di raggiungere il parenchima o lo spazio peritubulare per poi fermarsi sulla membrana basale (Figura 2.7)



**Figura 2.7:** ricellularizzazione con cellule tubulari epiteliali della matrice extracellulare (ECM) di un rene di ratto decellularizzato. In figura è presente il bioreattore utilizzato, sezioni del rene ricellularizzato e colorato con ematossilina & eosina (*Hematoxylin & Eosin*, H&E) ai giorni 1, 3 e 7, sezioni della matrice colorata con elastina e acido periodico – reattivo di Shiff (*Periodic Acid-Shiff*, PAS) al giorno 3; la colorazione Wigert rapido – fucsina resorcina (*Weigert's Resorcin-Fuchsin*, WRF) dell'elastina dimostra che la struttura arteriolare non è stata compromessa e che le cellule tubulari epiteliali infuse dall'arteria renale non rimangono all'interno del compartimento arterioso (le frecce indicano la colorazione di elastina). La colorazione PAS evidenzia che anche la membrana basale, rappresentata in rosa scuro, non è stata compromessa e che le cellule rimangono sulla membrana basale e formano quelle che appaiono essere strutture tubulari. Scala barra: 50 µm. (Fonte: Caralt *et al.* 2014).

Caralt e il suo gruppo di ricerca ha inoltre identificato che la perfusione con Triton 1% seguita da quella con SDS 0.1% risulta essere il miglior metodo per decellularizzare i reni e hanno dimostrato che il fattore di crescita basico dei fibroblasti (bFGF) e quello dell'endotelio vascolare (VEGF) rimangono all'interno della biomatrice anche a seguito del processo di decellularizzazione.

Uzarski e il suo gruppo di ricerca ha invece presentato un metodo di ricellularizzazione che è una combinazione dei precedenti (1) (Tabella 2.1). Infatti, utilizzando un bioreattore che presenta sia una via per il distretto arterioso che una per il distretto tubulare, ha ricellularizzato il rene sia utilizzando una perfusione a pressioni elevate infondendo dall'arteria renale a una portata di 25 mL/min (come Caralt), ma ha anche infuso cellule epiteliali renali attraverso l'uretere, utilizzando però pressioni minori e facendo il vuoto nella camera (come Bonadrini e Ross). In Figura 2.8 sono presenti le sezioni di rene ricellularizzato e colorato con ematossilina & eosina.



**Figura 2.8:** sezioni del rene colorato con ematossilina & eosina e ricellularizzato sia infondendo dall'arteria renale che dall'uretere, a 3 e 7 giorni. Scala barra: 100 µm. (Fonte: Uzarski *et al.* 2015).

Il bioreattore progettato da Uzarski permette inoltre di prelevare campioni di medium in modo non invasivo così da individuare l'eventuale presenza di *biomarkers* che indicano specifici elementi di funzionalità cellulare, e di misurare il salto di pressione attraverso lo scaffold che si ha durante la perfusione. Ciò ha permesso di migliorare la caratterizzazione della maturazione del tessuto durante il mantenimento in coltura: i risultati ottenuti sono riportati in Figura 2.9. In Figura 2.9 (A) si osserva che le cellule marcate con CD133/1+ hanno ripopolato i tubuli corticali renali, ma non sono state trovate nei glomeruli (g) a 3 giorni dalla semina; dopo 7 giorni di coltura, tali cellule si sono aggregate a formare strutture simil-tubulari (indicate dalle frecce). Dal grafico presente in Figura 2.9 (B) si evince che le cellule marcate con CD133/1+ rimangono vitali all'interno dello scaffold anche dopo 7 giorni, senza deviazioni statisticamente significative

durante tale lasso di tempo ( $p > 0.05$  da ANOVA). Infine, la Figura 2.9 (C) mostra come il marcatore di danno KIM-1 rilasciato dalle cellule marcate con CD133/1+ diminuisce durante i 7 giorni di coltura, suggerendo un adattamento ed attecchimento delle cellule all'interno dello scaffold renale.

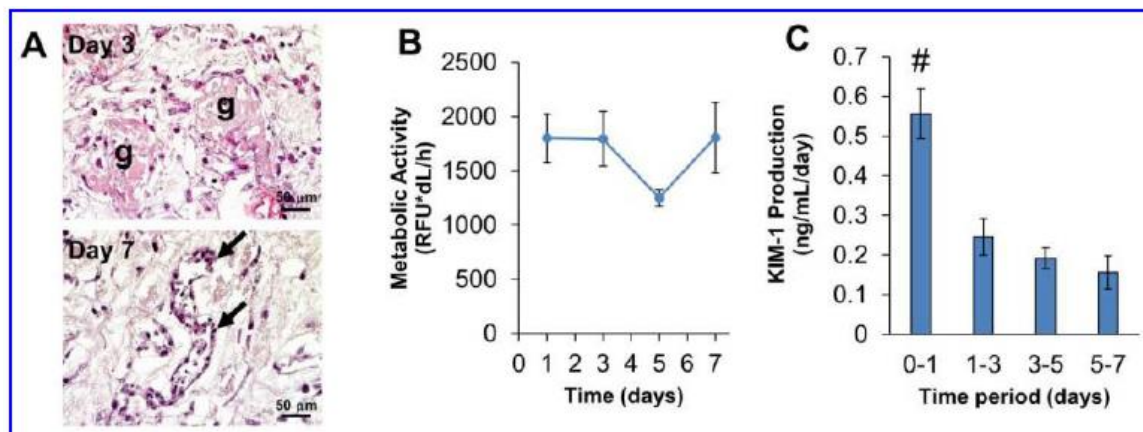


Figura 2.9: (A) Caratterizzazione dell'adattamento morfologico a 3 e 7 giorni (Scala barra: 50 μm), (B) dell'attività metabolica delle cellule marcate con CD133/1+ e (C) dell'espressione del biomarker KIM-1 rilasciato dalle cellule marcate con CD133/1+. (Fonte: Uzarski *et al.* 2015).

### 2.3.2. L'ingegneria dei tessuti applicata alla rigenerazione del rene di maiale

Per cercare di capire se fosse possibile ottenere *scaffold* adatti al processo di rigenerazione del rene a partire da reni umani, alcuni gruppi di ricerca hanno effettuato esperimenti sul rene di maiale, che, rispetto a quelli di roditore, presenta dimensioni maggiori ed è più simile al rene umano.

Un primo lavoro è stato svolto da Giuseppe Orlando e coautori nel 2012 (28) (Tabella 2.1). In primo luogo, essi hanno cercato di individuare un protocollo di decellularizzazione ottimale. Inizialmente, è stato utilizzato come detergente il Triton X-100, ma si è visto che non era in grado di eliminare in modo efficace la componente cellulare. Si è quindi deciso di utilizzare l'SDS, più forte e aggressivo rispetto al Triton X-100. Essendo alcune molecole della ECM sensibili alla digestione enzimatica, il gruppo ha deciso di non utilizzare alcun tipo di agente enzimatico. Inoltre, poiché temperature troppo basse potrebbero compromettere la struttura tridimensionale dello *scaffold*, Orlando e coautori hanno preferito non effettuare cicli di congelamento e scongelamento durante il processo di

decellularizzazione. Infine, poiché uno degli aspetti critici durante il processo di decellularizzazione risulta essere la rimozione degli agenti decellularizzanti, citotossici e quindi da eliminare prima di perfondere l'organo con le nuove cellule, il gruppo di ricerca ha preferito adottare un protocollo in cui vengono effettuati lavaggi con un solo detergente (in questo caso l'SDS), preceduti da lavaggi con acqua distillata ipotonica per indurre la lisi cellulare attraverso uno shock osmotico, piuttosto che usare diversi tipi di agenti decellularizzanti.

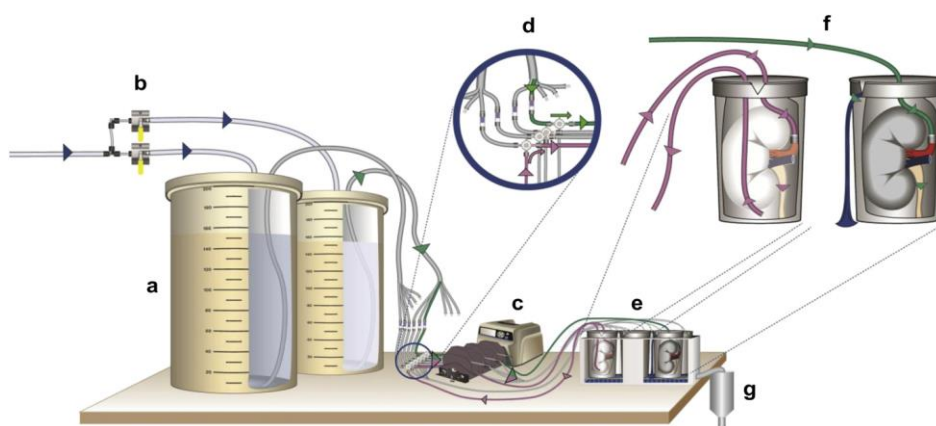
A seguito del processo di decellularizzazione, gli Autori hanno osservato che la struttura tridimensionale del rene viene preservata. Inoltre, attraverso colorazioni chimiche e analisi SEM (*Scanning Electron Microscopy*), è emerso che anche l'albero vascolare rimane intatto a tutti i livelli gerarchici, così come la struttura del nefrone.

Infine, gli *scaffold* ottenuti sono risultati essere biocompatibili sia *in vitro* che *in vivo*. Per quanto riguarda gli esperimenti *in vitro*, è stato osservato che le cellule ematopoietiche murine seminate su tali strutture crescono bene e non si riscontrano problemi di citotossicità, mentre per quanto riguarda gli esperimenti *in vivo*, gli *scaffold* risultano essere ben tollerati sia durante l'intervento, che durante il post-operatorio. Gli Autori hanno inoltre osservato che non si ha una risposta infiammatoria a seguito del trapianto, anche se l'impianto risulta essere altamente trombogenico a causa della mancanza di uno strato endoteliale all'interno dei vasi.

Un secondo lavoro sul rene di maiale è stato effettuato da Sullivan e coautori (26), sempre nel 2012 (Tabella 2.1). In primo luogo, essi hanno confrontato diversi protocolli di decellularizzazione, per verificare quale fosse il più efficiente per decellularizzare il rene porcino. Gli organi sono stati infusi con 0.5% e 0.25% SDS e con 1% Triton X-100. In tutti e tre i casi, si sono ottenute matrici prive di cellule e materiale nucleare. Tale risultato risulta essere coerente con quelli ottenuti in studi su organi più piccoli (23, 34, 35): ciò significa che la taglia dell'organo non incide sul processo di decellularizzazione, a patto che la vascolatura venga preservata e il detergente possa quindi raggiungere tutte le diverse regioni che devono essere decellularizzate. Il protocollo che utilizza 0.5% SDS è però quello che meglio riesce ad eliminare il materiale nucleare e a lasciare quindi meno residui di DNA.

È stato inoltre riscontrato che l'architettura vascolare e l'ultrastruttura nativa viene preservata con tutti e tre i protocolli di decellularizzazione, senza differenze significative per quanto riguarda il quantitativo di residui di collagene o glicosaminoglicani solfati, entrambi necessari per avere integrità strutturale e un adeguato supporto cellulare (36). Tuttavia, è stato verificato che l'utilizzo del Triton X-100, a differenza dell' SDS, porta alla morte cellulare nel momento in cui il rene viene ripopolato. Questo risultato discorda con quanto ottenuto in precedenti studi, in cui *scaffolds* prodotti con tale detergente e ricellularizzati mostravano vitalità cellulare (34, 37). Si ipotizza che il Triton X-100, durante la decellularizzazione, venga trattenuto maggiormente dall'organo rispetto all' SDS e, di conseguenza, non venendo eliminato in modo adeguato dai lavaggi con il *buffer*, porta all'ottenimento di *scaffold* citotossici.

Nello studio condotto da Sullivan è stato inoltre sviluppato e testato un circuito per la decellularizzazione (Fig. 2.10). Esso consente la decellularizzazione contemporanea di 24 organi di grandi dimensioni, mantenendo però la completa indipendenza dei vari organi e consentendo quindi di testare simultaneamente diversi protocolli in parallelo. Tale sistema è altamente adattabile, in quanto è stato costruito di modo da consentire una facile espansione o riduzione a seconda delle necessità. È inoltre flessibile, poiché permette di utilizzare diversi protocolli di decellularizzazione senza dover cambiare il *set-up*.



**Figura 2.10:** Schema del sistema di decellularizzazione del rene porcino proposto da Sullivan et al. 2012: (a) le soluzioni del detergente concentrato e del tampone di lavaggio vengono stoccate nel rispettivo serbatoio e diluite alla concentrazione desiderata attraverso una (b) linea di acqua deionizzata. Le soluzioni sono pompate da (c) una pompa peristaltica che può gestire più linee di perfusione indipendenti. Attraverso connettori a innesto rapido e una valvola a tre vie (d) il perfusato in uscita dagli *scaffold* (e) può essere ripescato dalla camera di perfusione e ricircolato (f) oppure fuoriuscire dal contenitore e confluire verso (g) un serbatoio comune di raccolta del fluido di scarto (tratto da Sullivan D.C., et al., 2012).

Anche il gruppo di ricerca di Wang ha ottimizzato il protocollo di decellularizzazione confrontando in modo sistematico diversi detergenti, ovvero: 1% SDS, 1% Triton X-100, 1% PAA e 1% NaDOC (29) (Tabella 2.1). Essi sono arrivati alla conclusione che il detergente più efficace risulta essere l' SDS e che il Triton X-100 può essere utile ad eliminare i residui di SDS, più che a decellularizzare la matrice. Wang *et al.* hanno inoltre verificato il mantenimento della presenza di proteine strutturali all'interno della matrice e dimostrato che oltre il 60% del collagene e dei glicosaminoglicani vengono conservati.

Un quarto lavoro più recente e pubblicato nel 2014 è stato svolto da Ko e coautori (27) (Tabella 2.1). Se i gruppi di ricerca precedentemente nominati avevano cercato di ottimizzare il protocollo di decellularizzazione, Ko *et al.* hanno invece sviluppato e ottimizzato un metodo di semina cellulare che porta ad avere cellule endoteliali distribuite in modo uniforme sulle pareti di tutti i vasi sanguigni all'interno dello *scaffold*. Durante lo studio sono stati testati diversi metodi di semina e il più efficiente è risultato essere quello in cui la perfusione statica viene alternata a una perfusione dinamica durante la quale la portata viene gradualmente aumentata da 2 mL/min a 5, 10 e 20 mL/min, a intervalli di 10-12 ore, e mantenuta infine a 20 mL/min. Inoltre, per garantire l'adesione cellulare e prevenire il distacco delle cellule in presenza di flusso elevato, le superfici vascolari sono state modificate incorporando uno anticorpo contro il CD31, specifico delle cellule endoteliali. Durante gli studi *in vivo* è stato osservato che tale approccio migliora notevolmente la pervietà vascolare del parenchima e che le cellule rimangono ancorate nonostante il lungo periodo di perfusione con sangue a condizioni fisiologiche.

### **2.3.3. L'ingegneria dei tessuti applicata alla rigenerazione del rene umano**

Orlando e il suo gruppo di ricerca ha recentemente effettuato esperimenti anche su reni umani, inadatti al trapianto per motivi differenti e quindi scartati (30) (Tabella 2.1). Rispetto al protocollo di decellularizzazione adottato sul rene di maiale, col rene di uomo il detergente viene infuso non solo dall'arteria, ma anche dall'uretere, di modo da essere sicuri che esso riesca a raggiungere tutti i compartimenti renali. Tramite questo protocollo

si è visto che circa il 95% della componente nucleare viene eliminata e che gli scaffold ottenuti non danno particolari problemi di immunogenicità. Inoltre, l'architettura renale nativa è mantenuta, sia a livello macroscopico, che a livello microscopico, e le proteine essenziali alla ECM per lo sviluppo e la rigenerazione del tessuto vengono preservate.

A seguito degli esperimenti effettuati, è stato osservato che lo scaffold decellularizzato mantiene l'elasticità e la pervietà della componente vascolare, come dimostrato dal fatto che i vasi riescono a modulare la pressione all'aumentare del flusso in ingresso. La resilienza dei vasi è quindi determinata in gran parte dalla struttura della matrice, piuttosto che dalla componente cellulare. È stato inoltre osservato che i valori di pressione basale sono inferiori rispetto a quelli dei reni normali, probabilmente a causa della mancanza dello strato muscolare delle pareti dei vasi, oppure a causa del fatto che i reni utilizzati durante gli esperimenti, essendo organi scartati per il trapianto, presentano già di loro un albero vascolare compromesso. Infine, la capacità angiogenica della matrice degli *scaffold* suggerisce che esso può supportare l'endotelio vascolare rigenerato anche a seguito del processo di decellularizzazione.

È importante sottolineare che la strategia adottata da Orlando e il suo gruppo di ricerca introduce un nuovo tipo di biomateriale: *scaffolds* naturali ottenuti a seguito del processo di decellularizzazione di organi di scarto, quindi compromessi in partenza. Risulta quindi necessario valutare se essi possano effettivamente essere dei buoni biomateriali, adatti alla rigenerazione di un organo.

Risultati simili sono stati ottenuti da Peloso e coautori (33) (Tabella 2.1); anche nel presente studio, infatti, si è visto che la struttura vascolare dei reni umani decellularizzati viene mantenuta intatta a tutti i livelli gerarchici, che preserva la propria resilienza e che è in grado di sostenere pressioni intravascolari paragonabili a quelle fisiologiche. Inoltre, è stato dimostrato che lo *scaffold*, anche a seguito del processo di decellularizzazione, presenta numerosi fattori di crescita necessari per il mantenimento dell'omeostasi e della funzionalità delle cellule endoteliali.



## **2.4. Punto di partenza per gli studi futuri riguardo la rigenerazione del rene**

Come si evince da quanto riportato negli studi sul rene umano, ma anche dai lavori effettuati sul rene di ratto e di maiale, si è ancora lontani dal riuscire ad ottenere un organo rigenerato effettivamente funzionale e altri esperimenti devono essere effettuati, soprattutto volti a capire quale sia il protocollo di ricellularizzazione più efficiente. Si è visto infatti che lo *scaffold* non risulta essere ripopolato in modo omogeneo, in quanto la maggior parte delle cellule rimane nel compartimento arterioso rispetto a quello tubulare.

Sarebbe quindi interessante valutare le pressioni e le portate che si hanno all'interno dello *scaffold* durante il processo di ricellularizzazione, in quanto esse sono i parametri che influenzano il ripopolamento cellulare a seguito dell'infusione. Conoscendo come esse variano all'interno della struttura, si potrebbe prevedere come si distribuiscono le cellule nel rene ed eventualmente modificare alcune condizioni imposte durante la ricellularizzazione (es: portata di perfusione) di modo da ottimizzare il ripopolamento dello *scaffold*.

Un altro argomento di studio che deve essere ulteriormente approfondito è il comportamento cellulare a seguito dell'infusione per quanto riguarda le cellule staminali e le cellule progenitrici. Esse si devono infatti differenziare nei diversi fenotipi renali e perché ciò sia possibile sono necessari dei segnali biochimici, ma anche delle stimolazioni fisiche che mimino il comportamento *in vivo*, come ad esempio un flusso pulsatile durante il processo di ricellularizzazione. Ecco perché risultano necessari la progettazione e lo sviluppo di un bioreattore funzionale e flessibile, in grado di monitorare diversi parametri simultaneamente, di permettere agli operatori di ottimizzare e automatizzare il più possibile i protocolli di decellularizzazione e ricellularizzazione e di stimolare fisicamente lo *scaffold*, di modo da simulare la condizione fisiologica e indurre un differenziamento cellulare.

### 3. Obiettivi del lavoro

---

Come si evince da quanto riportato in letteratura si è ancora lontani dal riuscire ad ottenere un organo rigenerato effettivamente funzionale e ancora numerosi esperimenti devono essere effettuati, soprattutto volti a capire quale sia il protocollo di ricellularizzazione più efficiente. Ecco perché, arrivati a questo punto della ricerca, risultano necessari uno studio approfondito e sistematico dei parametri che influenzano la distribuzione cellulare durante la perfusione, e la progettazione e lo sviluppo di un bioreattore funzionale e flessibile, che permetta agli operatori di ottimizzare e automatizzare il più possibile i protocolli di decellularizzazione e ricellularizzazione e di stimolare fisicamente lo *scaffold*, di modo da simulare la codizione fisiologica e indurre un differenziamento cellulare.

Durante tale lavoro di tesi sono quindi state apportate delle modifiche al sistema di perfusione del rene di ratto già presente in laboratorio, con l'obiettivo di automatizzarlo maggiormente e fare in modo che fosse in grado di stimolare fisicamente lo *scaffold*. È stato quindi creato un sistema in grado di regolare in modo automatico i giri della pompa del circuito in base alla pressione misurata: in questo modo si è riusciti ad ottenere un controllo preciso ed automatico della pressione, che è uno dei parametri che influenza maggiormente la distribuzione cellulare, svincolando l'operatore da tale incombenza e permettendo il controllo anche *overnight*.

È stata ideata una soluzione per ottenere un flusso pulsatile durante il processo di ricellularizzazione, in quanto si suppone che, ricreando le condizioni il più simili possibili a quelle che si hanno *in vivo*, si ha un miglioramento della distribuzione cellulare e venga indotto un differenziamento delle cellule pluripotenti.

Sono state inoltre effettuate delle prove sperimentali per verificare che, a seguito del processo di decellularizzazione del rene di ratto, le pareti dei vasi dello *scaffold* siano ancora impermeabili. Infatti, sia dalla letteratura sia dai risultati ottenuti presso l'Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri, si evince che la ricellularizzazione del rene è parziale: il compartimento tubulare risulta scarsamente popolato rispetto a quello

vascolare e la distribuzione di cellule nella struttura non è omogenea. Si è quindi supposto che, a seguito del processo di decellularizzazione, le pareti dei vasi non fossero più totalmente impermeabili e che, di conseguenza, la sospensione cellulare infusa durante la ricellularizzazione, permeando durante il suo scorrere nei vasi, non permettesse alle cellule di distribuirsi uniformemente.

Infine, dopo aver verificato che le pareti dei vasi dello *scaffold* fossero effettivamente permeabili, sono state effettuate delle prove sperimentali durante le quali il rene è stato perfuso a diverse portate ed è stata monitorata la pressione. Utilizzando i risultati ottenuti dagli esperimenti per valutare la permeabilità e quindi la distribuzione di portate e quelli relativi la pressione misurata, sono stati implementati due modelli analitici che fossero in grado di prevedere la distribuzione di portate e le pressioni all'interno del rene di ratto sia nativo che decellularizzato (quindi con pareti dei vasi permeabili), di modo da riuscire ad avere un'idea del comportamento del fluido infuso, e quindi della distribuzione cellulare, durante la ricellularizzazione.

## 4. Modifiche dell'attuale sistema di perfusione del rene di ratto

---

*Il crescente interesse nell'ambito dell'ingegneria tissutale renale ha reso necessario lo sviluppo di un sistema di perfusione il più possibile automatizzato e in grado di stimolare adeguatamente il costruito. Nel presente capitolo vengono analizzate e giustificate le modifiche fatte al circuito già esistente in laboratorio, sono descritte le prove sperimentali effettuate per verificare che tali modifiche non causino dei danni allo scaffold ed infine vengono presentati e discussi i risultati ottenuti.*

### 4.1. Analisi del circuito esistente

Prima di apportare delle modifiche al circuito, è stato analizzato il sistema di perfusione già esistente in laboratorio e sviluppato in un precedente lavoro di tesi. Esso è costituito dai seguenti elementi (Figura 4.1 e Figura 4.2):

- Una bottiglia di vetro borosilicato per HPLC (Schott Duran®) nella quella viene alloggiato il rene. Essa presenta un tappo a vite in polipropilene autoclavabile che garantisce la sterilità e quattro accessi. Due di essi, filettati e con passatubi in PTFE per l'inserimento dei tubi di perfusione e ripescaggio, vengono usati durante la normale perfusione dell'organo, uno durante la fase di svuotamento del circuito (tappo cieco) e l'ultimo, anch'esso filettato e con passatubo, viene utilizzato per ottenere il vuoto nella bottiglia e per collegare un filtro in PTFE da 0.22  $\mu\text{m}$  che garantisce il passaggio di aria in sterilità;
- Una pompa peristaltica a controllo digitale (Masterflex®) capace di generare portate da 0,21 a 21 ml/min (portate maggiori o minori possono essere raggiunte variando la dimensione dei tubi).
- Tubi in silicone permeabili all'ossigeno nei quali scorre il liquido perfuso.

- Una *compliance* di tipo usa e getta, importante per debollare il circuito e smorzare le oscillazioni di pressione generate dalla pompa.
- Un trasduttore di pressione.

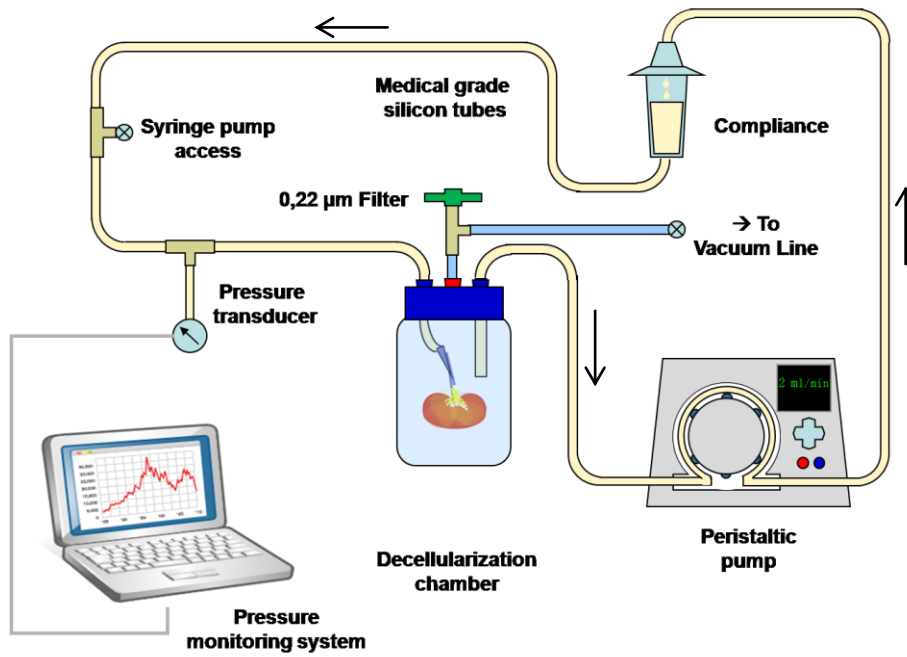


Figura 4.1: Schema di massima del circuito di perfusione del rene di ratto presente in laboratorio e dei suoi componenti principali.



Figura 4.2: A sinistra: fotografia del circuito di perfusione del rene di ratto. A destra: particolare della camera di perfusione.

Le tecniche di prelievo del rene e di montaggio della camera sono riportate in dettaglio in Appendice A. Brevemente, i ratti anestetizzati con Penthotal, vengono posizionati sul

tavolo operatorio. Dopo laparatomia, l'arteria renale sinistra viene incannulata con un catetere sterile PE-50 (a seconda degli esperimenti che si vogliono svolgere, possono venire incannulate anche la vena con una cannula da 14 Gauge e l'uretere con un catetere PE-10). Il rene prelevato viene perfuso con soluzione fisiologica e successivamente con 10 mL di soluzione di nitroprusside  $10^{-4}$ M, per evitare la formazione di coaguli. L'organo viene quindi alloggiato in un contenitore e trasportato nella zona sterile dell'istituto dove vengono effettuati gli esperimenti. Si procede quindi al montaggio e al *priming* del sistema di perfusione. Infine, il rene viene alloggiato all'interno della camera e collegato al circuito idraulico inserendo un ago sterile da 22 Gauge all'interno della cannula.

#### **4.2. Problematiche del circuito esistente**

Un aspetto importante da considerare durante la decellularizzazione e successiva ricellularizzazione del rene è la necessità di mantenere la pressione il più possibile entro il *range* fisiologico, che nel rene di ratto è di 80-120 mmHg. Durante il processo di decellularizzazione la pressione può sia diminuire, poiché la componente cellulare viene progressivamente rimossa, ma anche aumentare, nel caso in cui i vasi vengano ostruiti da detriti cellulari che si formano durante la decellularizzazione. Risulta quindi necessario regolare i giri della pompa: essi devono essere aumentati se la pressione è bassa, di modo da far scorrere il fluido più velocemente e accorciare i tempi di decellularizzazione, e abbassati nel caso in cui diventi troppo alta, poiché la struttura dello *scaffold* potrebbe venir compromessa. Con il sistema di perfusione sviluppato nel precedente lavoro di tesi, tale operazione di controllo della pompa deve essere fatto manualmente da un operatore, il quale regolarmente entra nella zona sterile dove vengono effettuati gli esperimenti e regola la pompa in base alla pressione letta sul monitor del computer. Nel presente lavoro di tesi si è quindi voluto automatizzare tale procedura, di modo da svincolare l'operatore da questa incombenza e far sì che la pompa venga regolata anche negli esperimenti che continuano *overnight*. Inoltre, poiché il salto di pressione che agisce sullo scaffold influenza sia la distribuzione iniziale delle cellule a seguito del processo di

ricellularizzazione, sia l'entità della distribuzione cellulare nel parenchima (1), si è voluto creare un sistema in grado di regolare con precisione tale parametro.

Un'altra importante caratteristica che il bioreattore deve avere nel momento in cui si ha a che fare con cellule staminali, è quella di essere in grado di stimolare fisicamente e in modo adeguato lo *scaffold*, di modo da ricreare le condizioni fisiologiche presenti *in vivo* e favorire le cellule nel loro differenziamento. Nel sistema di perfusione precedente il flusso di liquido è continuo e non ricrea quindi la pulsatilità che si ha *in vivo*. Ecco perché nel seguente lavoro di tesi si è cercato di modificare il circuito di modo tale da ottenere un flusso pulsatile. Esso potrebbe inoltre migliorare la distribuzione cellulare che si ha a seguito del processo di ricellularizzazione.

Nei paragrafi successivi vengono presentate le soluzioni progettuali per il controllo automatico della pompa e per l'ottenimento del flusso pulsatile.

### **4.3. Automazione del sistema di perfusione**

Prima di procedere con lo sviluppo di un sistema in grado di regolare in modo automatico i giri della pompa in base alla pressione misurata dal trasduttore, sono stati definiti i requisiti di progetto. In primo luogo il sistema di controllo deve potersi interfacciare con le apparecchiature già presenti nel sistema di perfusione, senza quindi rivoluzionare il circuito esistente. In secondo luogo deve essere intuitivo, facile da utilizzare e maneggiare, di modo che il lavoro dell'operatore risulti effettivamente semplificato e non viceversa. Infine, deve essere una soluzione poco dispendiosa dal punto di vista economico.

#### **4.3.1. Pompa, trasduttore di pressione e sistema di controllo automatico: come farli comunicare?**

Poiché uno dei requisiti di progetto è fare in modo che le apparecchiature già presenti nel circuito possano interfacciarsi col sistema di controllo automatico, per prima cosa sono

state analizzate le schede tecniche della pompa e del trasduttore di pressione per capire come ciò potesse essere realizzato.

Per quanto riguarda la pompa, la velocità e il senso di rotazione dei rulli possono essere controllati sia tramite pulsanti presenti sullo schermo dello strumento (rispettivamente A e B in Figura 4.3), ma anche in remoto, selezionando la modalità di controllo tramite il pulsante *Int/Ext* (selezionando *Ext* si ha il controllo in remoto) (C in Figura 4.3). Essa presenta inoltre un connettore DB9 (cerchiato in rosso in Figura 4.4) dove poter collegare il cavo da utilizzare per il controllo in remoto.

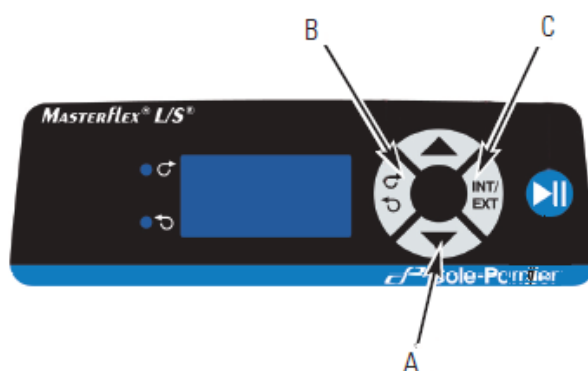


Figura 4.3: schermo della pompa peristaltica a controllo digitale (Masterflex®).



Figura 4.4: particolare della pompa peristaltica a controllo digitale (Masterflex®); in rosso è cerchiato il connettore DB9.

Tale connettore presenta 9 pin, rappresentati in Figura 4.5 e descritti in Tabella 4.1.

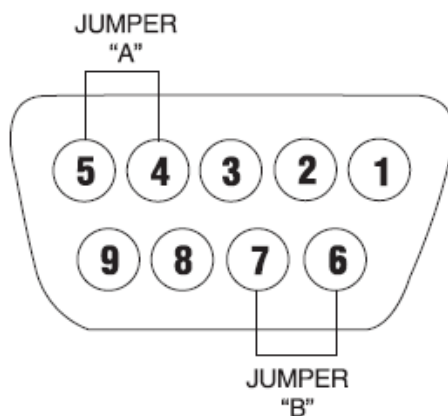


Figura 4.5: connettore DB9 della pompa Masterflex®.



N° pin	Descrizione
1	Controllo in tensione della velocità (0 – 10 V)
2	Controllo in corrente della velocità (4 – 20 mA)
3	Comune del controllo della velocità
4	Controllo locale o in remoto della velocità
5	Comune del controllo locale o in remoto della velocità
6	Comune del pin di start/stop e orario/antiorario
7	Controllo start/stop
8	Controllo orario/antiorario
9	Terra

**Tabella 4.1: descrizione dei pin del connettore della pompa.**

Per comodità circuitale si è deciso di comandare la velocità della pompa tramite controllo in tensione (pin 1 e 3); Il controllo in remoto viene impostato tramite i pin 4 e 5 (cortocircuitati), mentre per lo Start/Stop si utilizza il pin 7.

Per quanto riguarda il sistema di acquisizione della pressione, esso è costituito da cinque componenti (Figura 4.6):

- un'unità di acquisizione dati (A);
- un modulo di interfaccia (B), che presenta 16 canali di *input/output* analogici e permette la connessione tra l'unità di acquisizione e altri dispositivi;
- un modulo di amplificazione differenziale del segnale (C);
- un connettore (D) in grado di collegare il modulo di amplificazione al cavo del trasduttore di pressione (E);
- il trasduttore di pressione (immagine di destra).

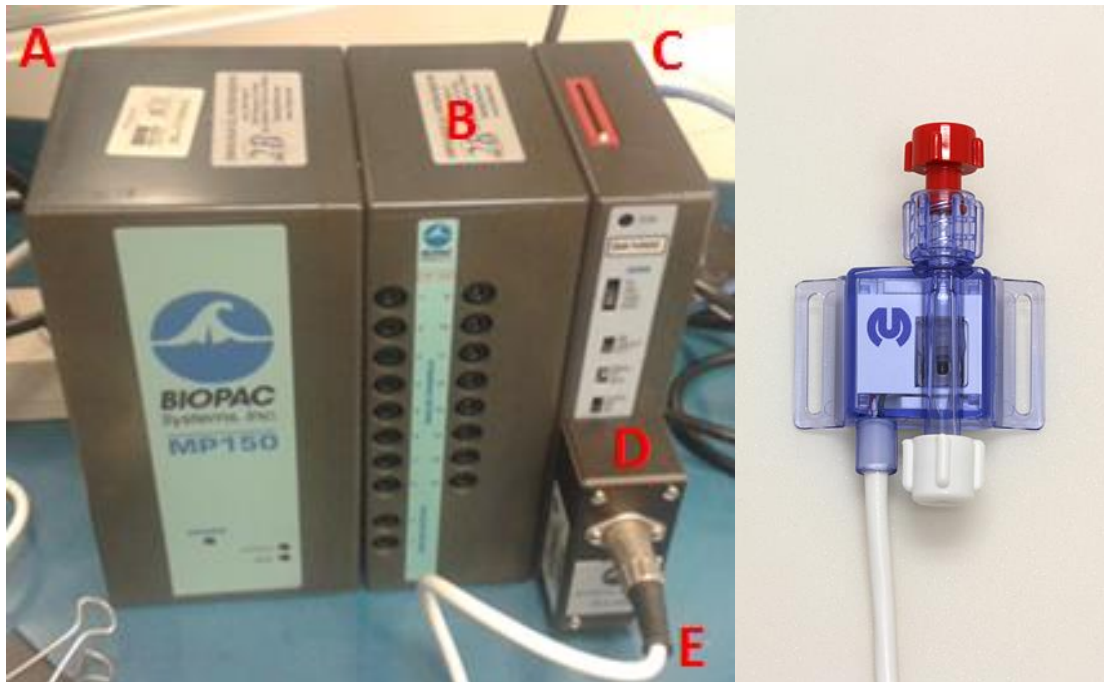


Figura 4.6: sistema di acquisizione della pressione. A destra è presente il trasduttore di pressione.

In sintesi, il trasduttore misura la pressione e il segnale acquisito, una volta amplificato dall'apposito modulo, viene inviato ad un computer tramite un cavo *ethernet*, dopo essere passato attraverso il modulo di interfaccia e l'unità di acquisizione dati. Utilizzando il modulo di interfaccia che ha uscite analogiche 0 – 10 V è quindi possibile collegare il dispositivo di controllo automatico al sistema di acquisizione della pressione tramite un cavo (*mini-jack* maschio) da inserire in uno dei 16 canali di *output* analogici presenti (*mini-jack* femmina), che darà in uscita una tensione 0 – 10 V proporzionale alla pressione letta. I dati relativi alla pressione potranno quindi sia essere inviati digitalmente al computer dove è possibile avere una rappresentazione grafica dell'andamento della pressione, sia essere utilizzati dal nostro regolatore di pressione.

Una volta verificato che le apparecchiature esistenti potessero effettivamente comunicare con il sistema di controllo, si è pensato a come il circuito esistente potesse essere modificato al fine di inserire il nuovo componente; tale modifica è rappresentata in Figura 4.7. In Figura 4.8 è invece presente una fotografia del circuito con il nuovo componente.

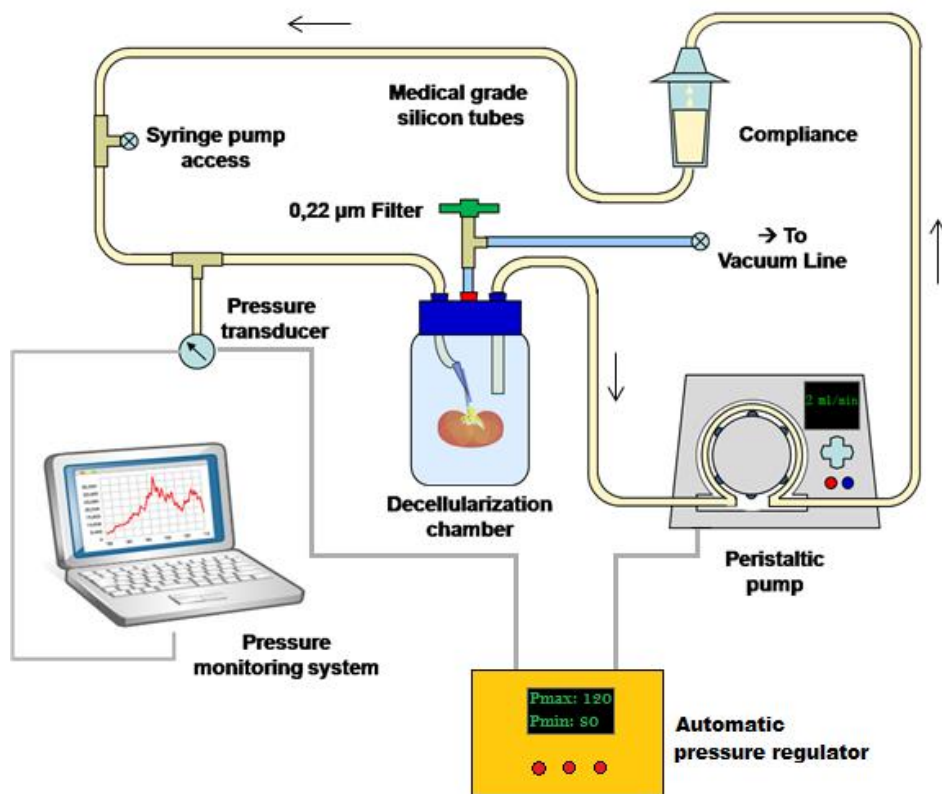


Figura 4.7: Schema di massima del circuito di perfusione del rene di ratto presente in laboratorio e dei suoi componenti principali con l'aggiunta del sistema di controllo automatico.

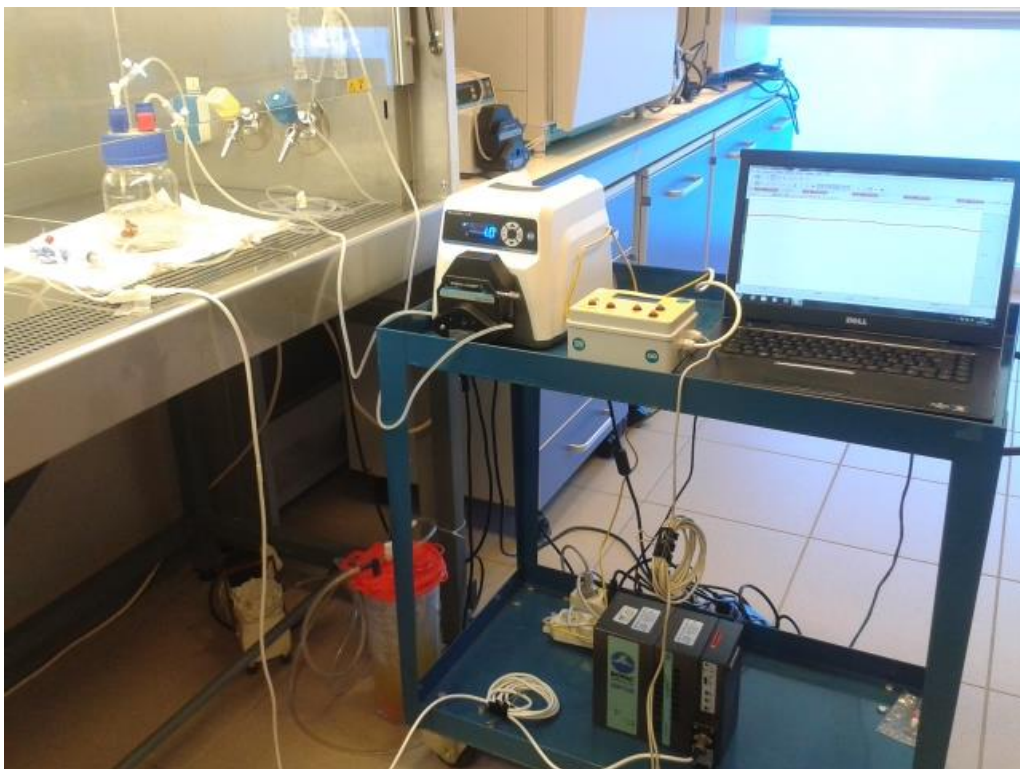


Figura 4.8: Fotografia del circuito di perfusione del rene di ratto presente in laboratorio e dei suoi componenti principali con l'aggiunta del sistema di controllo automatico.

### **4.3.2. Soluzione progettuale del sistema di controllo automatico**

Per il sistema di controllo automatico si è deciso di utilizzare la piattaforma Open Source Arduino, ovvero una scheda elettronica di piccole dimensioni dotata di microcontrollore, *input/output* digitali e ingressi/uscite analogiche. Tale decisione è stata presa poiché Arduino è economico e dotato di un semplice ambiente di sviluppo integrato per la programmazione.

Prima di procedere con la stesura del programma del sistema di controllo è stato definito uno schema a blocchi sulla sua logica di funzionamento, riportato in Figura 4.9.

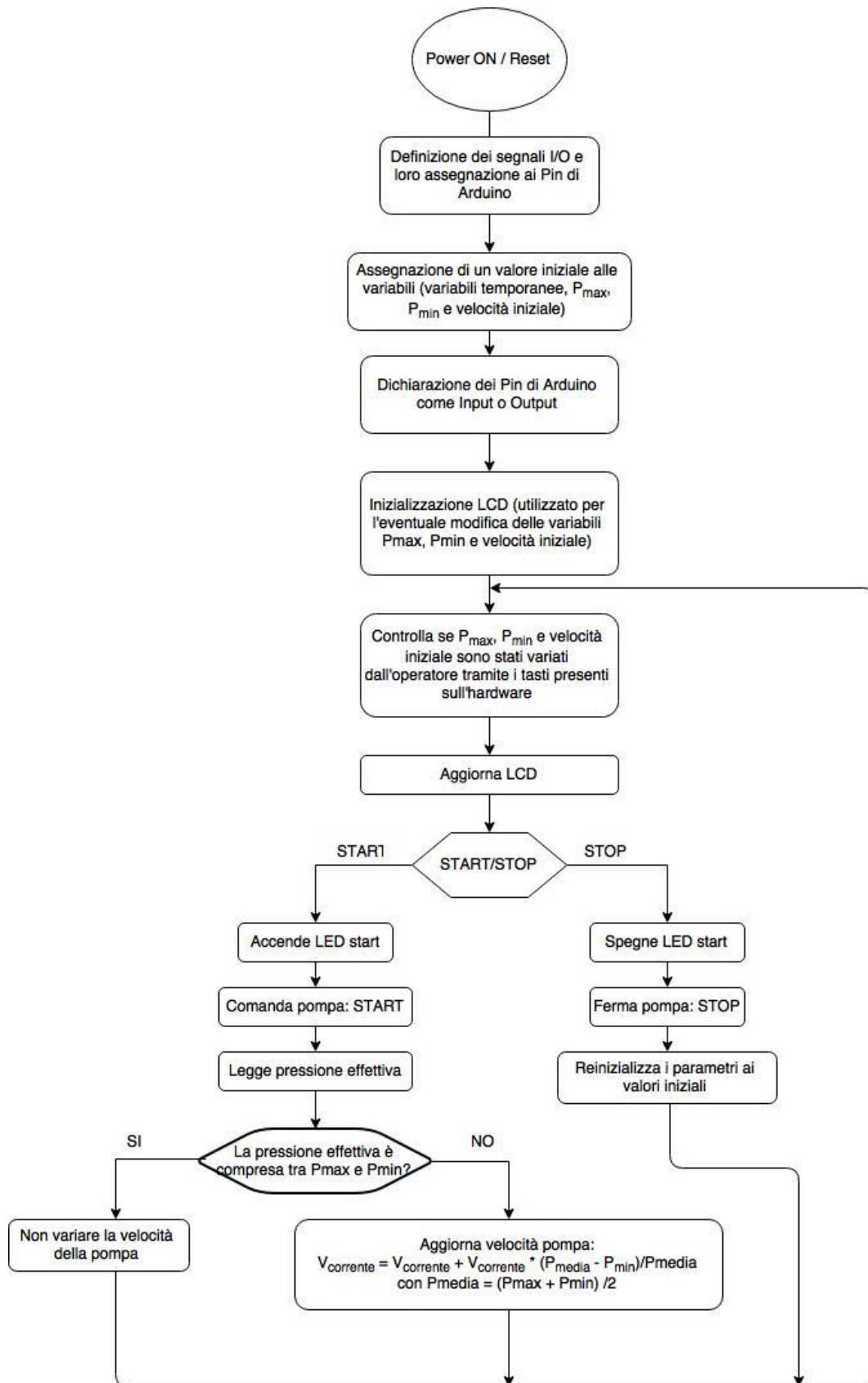


Figura 4.9: Schema a blocchi della logica di funzionamento di Arduino.

In sintesi, si impostano all'interno del microcontrollore la velocità iniziale da cui far partire la pompa una volta azionata e la pressione massima e minima che definiscono l'intervallo entro il quale la pressione effettiva del circuito deve rientrare. Il microcontrollore regolerà quindi la velocità della pompa a seconda della pressione letta. È inoltre possibile modificare i valori soglia di pressione massima e pressione minima e la velocità iniziale inizialmente impostati utilizzando dei pulsanti che saranno presenti sull'*hardware*.

Per il controllo della velocità è stata implementata la seguente formula proporzionale:

$$V_{corrente,new} = V_{corrente} + V_{corrente} \cdot \frac{P_{media} - P_{eff}}{P_{media}}$$

$$\text{con } P_{media} = \frac{P_{max} + P_{min}}{2}$$

Dove:

- $V_{corrente,new}$ : velocità modificata
- $V_{corrente}$ : velocità da modificare se la pressione non è all'interno del *range* desiderato
- $P_{max}$ : pressione di soglia massima impostata
- $P_{eff}$ : pressione effettiva misurata dal trasduttore

Essendo una formula proporzionale, la velocità viene modificata in quantità tanto maggiore quanto il valore di pressione misurato è lontano da quelli soglia.

Il codice scritto per il controllo automatico e lo schema di interfacciamento tra Arduino e l'esterno sono riportati nel dettaglio in Appendice B.

Per il confronto tra la pressione effettiva misurata dal trasduttore e letta da Arduino (in bit) e i valori soglia impostati a programma (in mmHg), si è reso necessario effettuare un'operazione di taratura per capire a che valore digitale (bit) corrispondesse una determinata pressione in mmHg. Per fare ciò è stato scritto un programma in Arduino che, una volta letto il segnale analogico della pressione proveniente dal trasduttore, mandasse a video il valore digitale corrispondente. Utilizzando poi il software su cui poggia il trasduttore, è stato possibile verificare a quanti mmHg corrispondesse il valore digitale visualizzato a video. Effettuata la taratura, nel programma scritto per il controllo della pompa è stato quindi convertito il dato in ingresso relativo la pressione effettiva da

valore digitale a mmHg, di modo che fosse possibile confrontarlo con le pressioni soglia impostate ed espresse in mmHg.

Per quanto riguarda l'hardware (Figura 4.10), è stato stabilito che il sistema di controllo dovesse avere uno schermo a cristalli liquidi dove poter leggere la pressione massima, la pressione minima e la velocità iniziale impostate. Esso deve inoltre essere dotato di un pulsante di *Start/Stop* con relativo LED che permetta l'azionamento della pompa, di due pulsanti che consentano di aumentare o diminuire la velocità iniziale e le pressioni impostate (*Up/Down*), un pulsante (*Tab*) che permetta di far scorrere un cursore sullo schermo LCD e selezionare il parametro che si vuole variare con i pulsanti di *Up* e *Down* ed infine un pulsante di *Reset* per reimpostare i valori di pressione massima, minima e la velocità iniziale scritti a programma.

Il sistema di controllo presenta inoltre due passacavi, in uno è situato il cavo collegato alla pompa, mentre nell'altro quello collegato al trasduttore. Il cavo collegato alla pompa presenta un connettore DB9 maschio, mentre quello del trasduttore un connettore *mini-jack* maschio (3.5 mm). È infine presente un terzo cavo USB utilizzato per l'alimentazione del sistema.



Figura 4.10: dispositivo per la regolazione automatica della pressione.

### 4.3.3. Prove sperimentali con il sistema di controllo automatico

Per prima cosa, per verificare che il sistema di controllo fosse effettivamente in grado di regolare i giri della pompa a seconda della pressione misurata, è stata effettuata una prova utilizzando un circuito a cui però non era stato collegato il rene. Il circuito utilizzato è il medesimo riportato in Figura 4.1 e descritto nel paragrafo 4.1, a cui però è stata tolta la *compliance*, in quanto non interessava smorzare le oscillazioni e debollare il circuito, e a cui è stata aggiunta in serie uno stringitubo “*roller clamp*” da utilizzare come resistenza variabile (Figura 4.11). Durante la prova tale resistenza è stata aumentata e diminuita girando la rotellina presente sullo stringitubo, di modo da variare la pressione e verificare se i giri della pompa venissero effettivamente regolati.



**Figura 4.11: stringitubo “*roller clamp*” utilizzato durante le prove sperimentali con Arduino come resistenza variabile.**

Una volta verificato ciò, sono state effettuate altre due prove utilizzando come resistenza il rene stesso. Esso infatti può far aumentare o diminuire la pressione a causa dell'eliminazione della componente cellulare o della formazione di detriti cellulari al suo interno. È stato quindi montato il circuito come durante una normale procedura di decellularizzazione ed è stato aggiunto il dispositivo per il controllo automatico, come mostrato in Figura 4.8. Al termine delle prove i reni sono stati fissati e i vetrini ottenuti colorati con ematossilina ed eosina per verificare che la struttura non fosse stata compromessa.



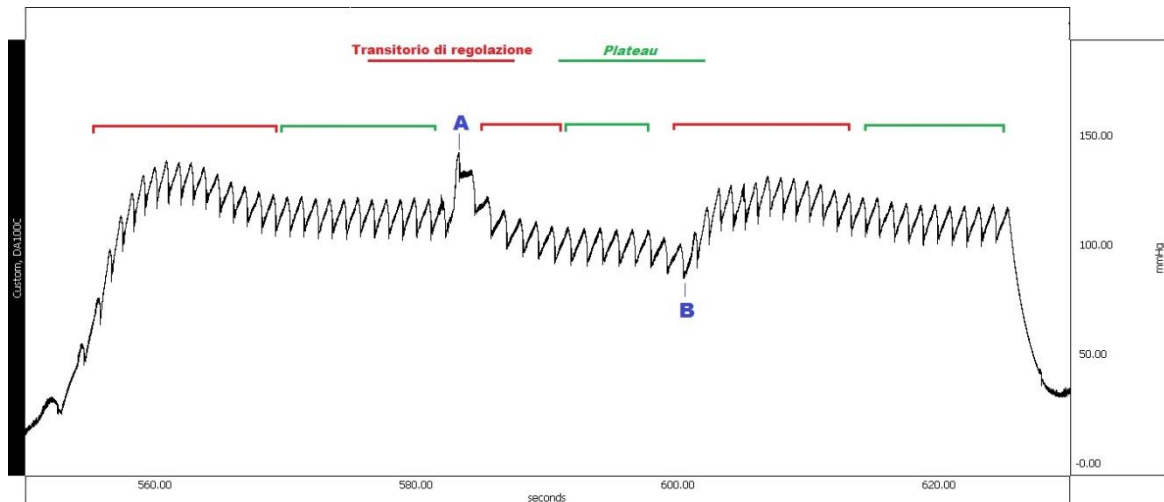
#### **4.3.4. Valutazione del sistema di controllo automatico e risultati ottenuti**

I risultati delle prove di collaudo sul sistema di controllo automatico hanno confermato la validità del dispositivo realizzato rispetto ai requisiti che erano stati identificati in fase di progetto. Il sistema riesce infatti a interfacciarsi facilmente con la pompa e il trasduttore già presenti nel circuito e non è stato quindi necessario apportare cambiamenti radicali al sistema di perfusione: è bastato collegare il nuovo dispositivo alla pompa e al trasduttore tramite due cavi (vedi paragrafo 4.3.1 e 4.3.2 per i dettagli).

Durante le prove sperimentali, esso si è mostrato di semplice utilizzo in quanto, una volta collegato, l'operatore non deve far più nulla, se non modificare, nel caso lo ritenesse necessario, le soglie di pressione massima, pressione minima e velocità iniziale della pompa utilizzando i pulsanti presenti sul dispositivo.

Infine, l'assemblaggio del nuovo componente si è mostrato poco dispendioso dal punto di vista economico.

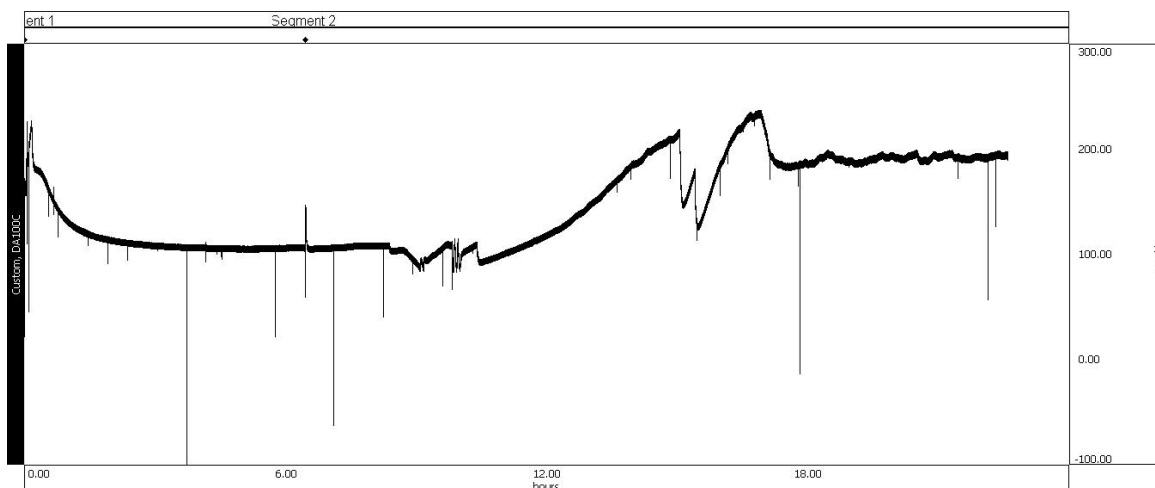
La prima prova effettuata per verificare che tale strumento fosse effettivamente funzionante (descritta nel paragrafo 4.3.3.) è stata utilizzare il sistema di controllo automatico su un circuito a cui non è stato montato il rene ma uno stringitubo "*roller clamp*" in serie. Girando la rotellina presente sullo stringitubo, la resistenza e quindi la pressione misurata sono state aumentate o diminuite. Si è visto che durante tale operazione il sistema di controllo automatico è stato in grado di regolare i giri della pompa a seconda della pressione misurata. In Figura 4.12 è presente un dettaglio del tracciato di pressione ottenuto durante tale prova.



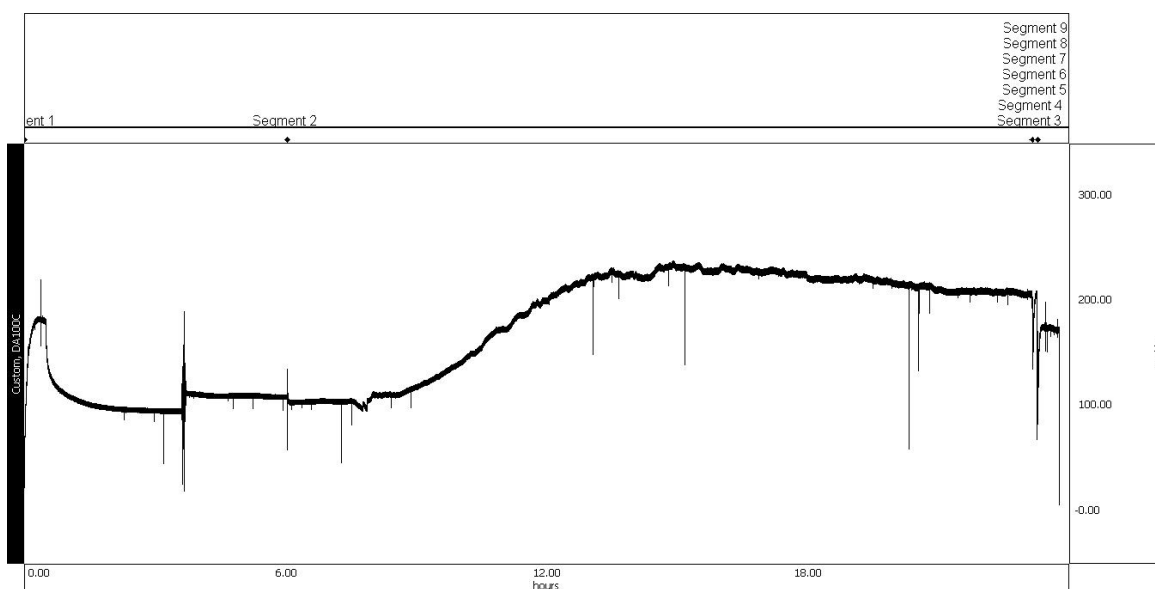
**Figura 4.12: dettaglio del tracciato di pressione della prova con il sistema di controllo automatico e lo stringitubo.**

Il *range* entro il quale doveva rientrare la pressione era pari a 80 – 120 mmHg. Dal tracciato si evince che, a seguito dell'accensione dello strumento, dopo un transitorio iniziale durante il quale il sistema di controllo legge la pressione e regola la pompa, si ha una *plateau* nel momento in cui il dispositivo riesce in tale regolazione. Nel punto indicato con la lettera A si ha un aumento improvviso della pressione, dovuto all'aumento di resistenza imposto girando la rotellina dello stringitubo; poiché la pressione è salita al di sopra del valore soglia, si ha che il sistema di controllo diminuisce i giri della pompa, come si evince dal fatto che la pressione si abbassa e raggiunge nuovamente un *plateau*. Nel punto indicato con la lettera B è stata invece diminuita la resistenza ed essendo scesa la pressione sotto il valore soglia, il dispositivo di controllo ha aumentato i giri della pompa, come si evince dal fatto che la pressione si alza e raggiunge nuovamente un *plateau*.

La seconda prova, descritta nel paragrafo 4.3.3., è servita invece per regolare la pressione con il sistema di controllo automatico durante la decellularizzazione di un rene di ratto. Sono stati effettuati due esperimenti di questo tipo (Exp 208 e Exp 209), i cui tracciati di pressione ottenuti durante l'intero processo di decellularizzazione sono riportati in Figura 4.13 e 4.14.



**Figura 4.13: tracciato della pressione dell'esperimento 208 (controllo con Arduino).**

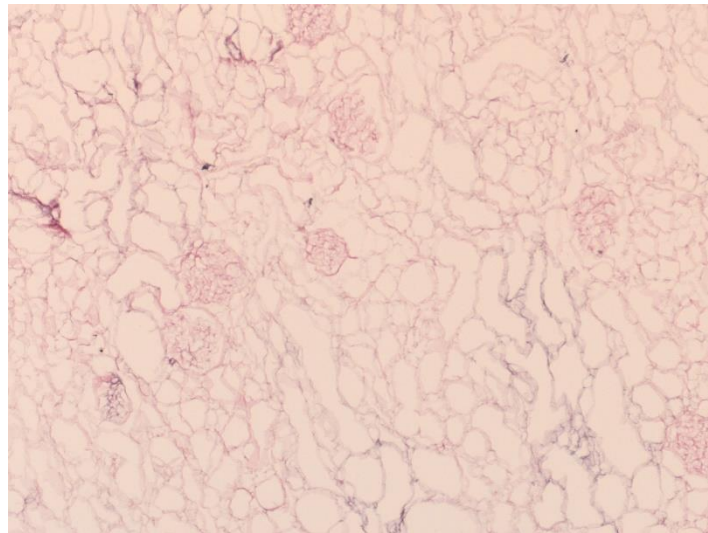


**Figura 4.14: tracciato della pressione dell'esperimento 209 (controllo con Arduino).**

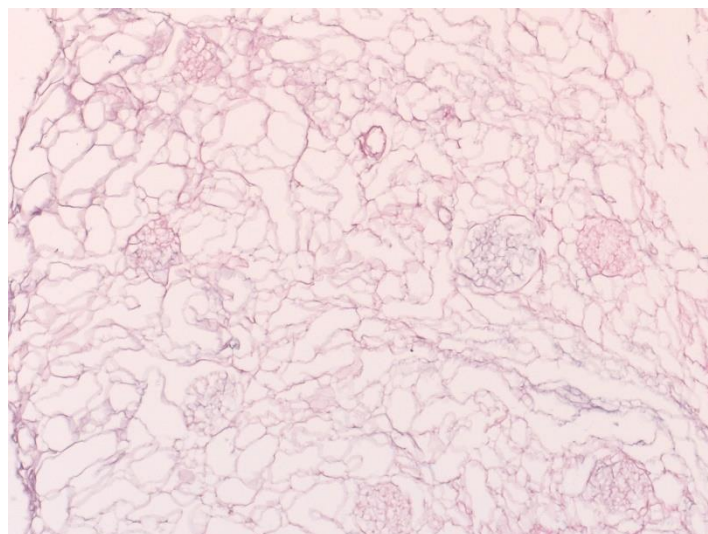
Anche durante le prove con il rene, il *range* entro il quale doveva rimanere la pressione era pari a 80 – 120 mmHg. Inizialmente essa era maggiore del valore soglia massimo e, di conseguenza, i giri della pompa sono stati mantenuti pari a 1 rpm (velocità minima della pompa) dal sistema di controllo. Nel giro di un'ora circa dall'inizio della decellularizzazione si è visto che, in entrambi i casi, la pressione è diminuita, rientrando quindi nel *range* impostato; tuttavia, non essendo mai andata al di sotto del valore di soglia minimo, i giri della pompa non sono stati aumentati. Inoltre, durante la notte, la pressione è aumentata e i giri della pompa sono quindi sempre rimasti pari a 1 rpm senza mai venire aumentati dal sistema di controllo. Nello specifico, durante l'esperimento 208 la pressione ha iniziato ad aumentare dopo circa 11 ore dall'inizio della prova; tra le 15 e

le 17 ore si ha un tracciato irregolare in cui si vede che la pressione diminuisce e aumenta in modo piuttosto repentino, per poi raggiungere un *plateau* al di sopra del valore di soglia massimo dopo circa 17 ore. Durante l'esperimento 209 si ha invece un aumento di pressione tra le 8 e le 14 ore circa dall'inizio della prova; dopodiché la pressione ha iniziato a diminuire molto gradualmente, ma rimanendo sempre al di sopra del valore soglia.

Infine, dall'analisi delle immagini di microscopia delle colorazioni con Ematossilina ed Eosina (Figura 4.15 e 4.16), si evince che in entrambi gli esperimenti la struttura dello *scaffold* non è stata compromessa.



**Figura 4.15:** colorazione con ematossilina ed eosina della matrice di un rene decellularizzato utilizzando il sistema di controllo di pressione automatico (exp 208) (ingrandimento 20X).



**Figura 4.16:** colorazione con ematossilina ed eosina della matrice di un rene decellularizzato utilizzando il sistema di controllo di pressione automatico (exp 209) (ingrandimento 20X).

#### **4.4. Ottenimento del flusso pulsatile**

Se durante il processo di decellularizzazione non è importante avere un flusso pulsatile in quanto le cellule vengono rimosse, durante la ricellularizzazione è bene ricreare le condizioni che ci sono *in vivo*, soprattutto nel momento in cui si ha a che fare con cellule staminali, di modo da aiutarle nel loro processo di differenziamento. Si è quindi cercata una soluzione per ottenere una pulsazione pari a 6 battiti al secondo, tipica del ratto. Tale soluzione non deve dare problemi per quanto riguarda la sterilizzazione del circuito a seguito delle prove, deve essere economica, dalla facile realizzazione pratica e integrabile al circuito già esistente. È stata scartata l'opzione di utilizzare la pompa pulsatile già presente in laboratorio, in quanto essa è di difficile utilizzo, soprattutto per quanto riguarda la pulizia e la sterilizzazione a seguito degli esperimenti. Inoltre, a causa dell'elevata frequenza cardiaca che si vuole simulare, alcune soluzioni quali l'utilizzo di elettrovalvole sono state scartate, poiché la componentistica meccanica non permetteva il raggiungimento di tale frequenza. Alla luce dei requisiti di progetto sopra citati, si è quindi pensato alla soluzione progettuale riportata nel paragrafo seguente.

##### **4.4.1. Soluzione progettuale per l'ottenimento del flusso pulsatile**

L'idea per l'ottenimento del flusso pulsatile è quella di aggiungere una seconda pompa peristaltica al circuito da posizionare dopo la *compliance*, come mostrato in Figura 4.17. La prima pompa, che chiameremo *pompa di perfusione* (contrassegnata in Figura 4.17 con il numero 1), ha la funzione vera e propria di pompare il fluido nel circuito, mentre la seconda, che chiameremo *pompa pulsante* (contrassegnata in Figura 4.17 con il numero 2), viene utilizzata in modalità non completamente occlusiva e ha la funzione di creare un flusso pulsatile grazie alla presenza dei rulli che, ruotando e comprimendo i tubi, creano una pulsatilità. Se le oscillazioni dovute alla pompa di perfusione vengono infatti smorzate dalla *compliance* che è situata dopo la pompa stessa, quelle della pompa pulsante non vengono smorzate da nessun componente.

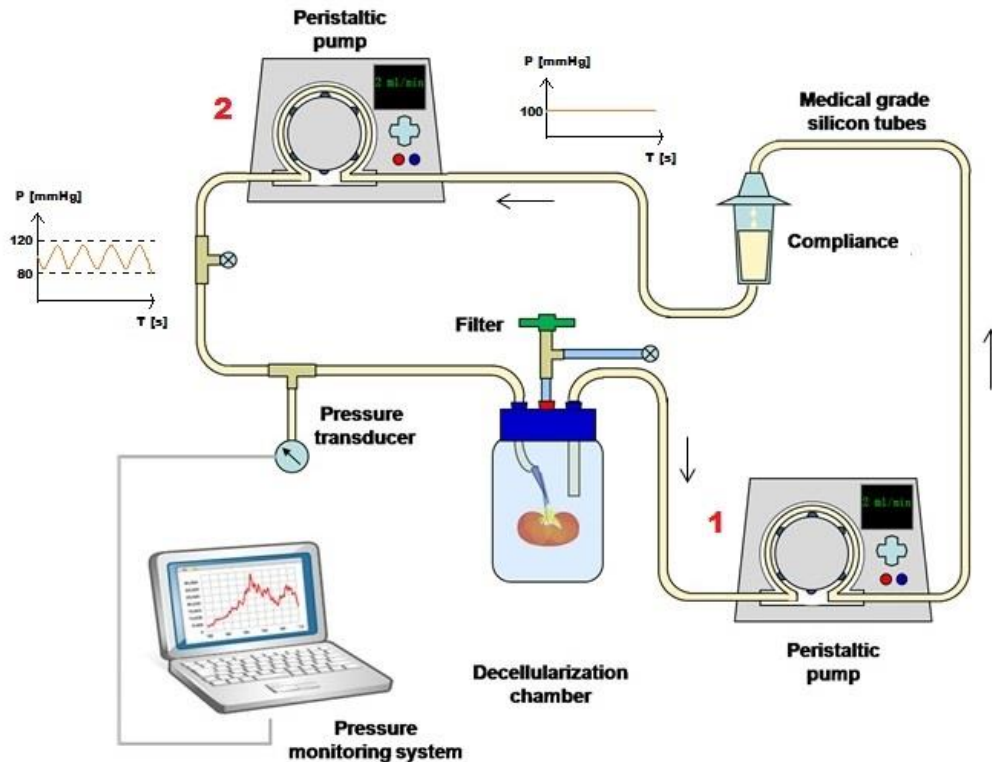


Figura 4.17: schema di massima del circuito del rene modificato per ottenere un flusso pulsatile.

L'idea è quella di avere dopo la *compliance* una pressione di base di circa 100 mmHg e, a quel punto, azionare la *pompa pulsante* in modalità non completamente occlusiva di modo da creare una pulsazione compresa tra 80 e 120 mmHg; quindi:

- la pompa 1 lavora sempre in modalità completamente occlusiva e il numero di giri viene aumentato o diminuito di modo da avere una pressione basale di circa 100 mmHg a valle della *compliance*;
- la pompa 2 lavora in modalità non completamente occlusiva; in particolare, aumentando o diminuendo l'occlusività, aumenterà o diminuirà rispettivamente il *gap* tra la pressione minima e la pressione massima, che noi vogliamo essere pari a circa 80 e 120 mmHg;
- il numero di giri della pompa 2 viene mantenuto fisso e pari a 90 giri al minuto, di modo da ottenere la frequenza di pulsazioni desiderata (6 pulsazioni/sec); il numero di giri è stato così calcolato (*n.b.* la testa della pompa è dotata di quattro rulli):

$$N^{\circ} \text{giri} = \frac{6 \text{ pulsazioni} \cdot 60 \text{ sec}}{4 \text{ rulli}} = 90 \text{ giri/min}$$

Per l'ottenimento del flusso pulsatile tramite la modalità descritta, il circuito utilizzato per la normale decellularizzazione e ricellularizzazione del rene (mostrato in Figura 4.1 e 4.2) non deve essere modificato, se non per l'aggiunta in serie di un tubo sottopompa, dalle particolari caratteristiche meccaniche in quanto soggetto a deformazioni dovute alle compressioni imposte dai rulli.

#### **4.4.2. Prove sperimentali con il flusso pulsatile**

Per verificare che tale soluzione fosse effettivamente in grado di generare il flusso pulsatile desiderato è stata effettuata una prova di pulsatilità secondo le modalità sopra descritte, utilizzando una cannula PE-50 che simulasse la resistenza data dal rene. Il circuito è quello mostrato in Figura 4.17, con l'unica eccezione che al posto del rene è stata attaccata una cannula lunga 24 cm. Durante la prova è stata fatta scorrere acqua nel circuito e sono stati variati il numero di giri della pompa di perfusione e l'occlusività della pompa pulsante, di modo da valutare se effettivamente la pressione basale e il *gap* tra la pressione massima e la pressione minima variassero e fossero quindi regolabili.

È stata poi effettuata una prova di pulsatilità utilizzando il rene di ratto. Sono stati svolti i medesimi passaggi che vengono fatti quando si vuole ripopolare il rene con le cellule e si è quindi lavorato in sterilità. Il rene è stato decellularizzato secondo il protocollo descritto in Appendice A e, terminata la decellularizzazione, è iniziato il protocollo di ricellularizzazione (descritto in Appendice A), solo che, una volta inserito il medium nel circuito, non sono state effettuate le infusioni di cellule ma si è lasciato scorrere il medium per 24 ore, utilizzando però il flusso pulsatile ottenuto con la modalità sopra descritta. Al termine della prova il rene è stato fissato e i vetrini ottenuti colorati con ematossilina ed eosina per verificare che la struttura non fosse stata compromessa.

#### **4.4.3. Valutazione del sistema utilizzato per l'ottenimento del flusso pulsatile**

La soluzione progettuale per l'ottenimento del flusso pulsatile descritta nel paragrafo 4.4.1 rispecchia i requisiti che erano stati identificati in fase di progetto. Non si hanno problemi per quanto riguarda la pulizia e la sterilizzazione del circuito, cosa che si era invece riscontrata con l'utilizzo della pompa pulsatile presente in laboratorio. Infatti, aggiungendo una seconda pompa peristaltica dopo la *compliance* per l'ottenimento della pulsatilità, si ha che nessun componente viene a contatto con il medium e le cellule, se non il tubo sottopompa in silicone, che però viene facilmente lavato e sterilizzato come tutti gli altri tubi del circuito.

Inoltre, poiché la testa della pompa presenta quattro rulli e può arrivare ad una velocità di 100 giri al minuto, è possibile ottenere 6 pulsazioni in un secondo impostando la pompa a 90 rpm, come mostrato nel paragrafo 4.4.1. Tale requisito è difficile da soddisfare con diverse altre soluzioni progettuali (come ad esempio l'utilizzo di elettrovalvole) a causa dell'elevata frequenza che si vuole raggiungere.

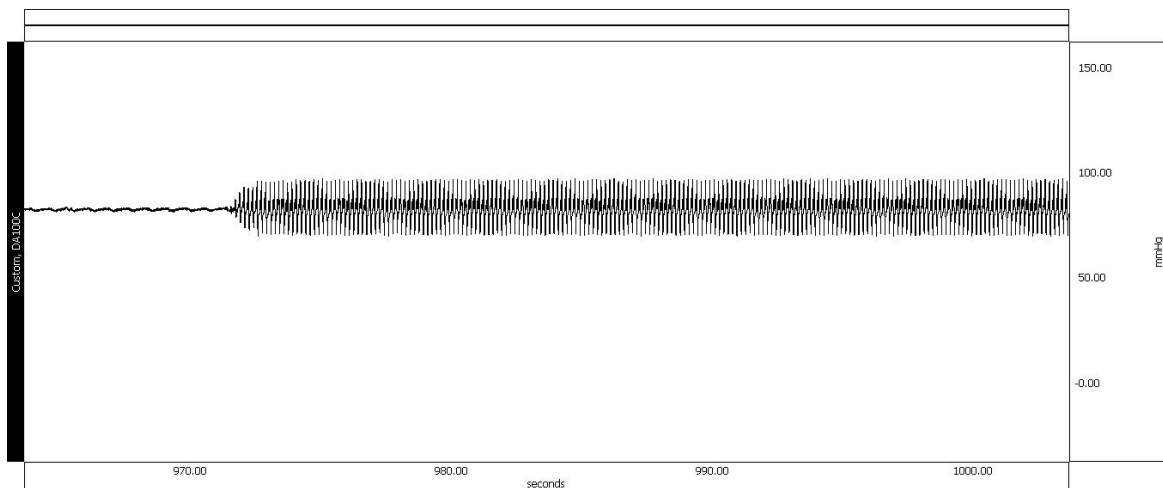
Infine, poiché nel laboratorio era già presente una seconda pompa pulsatile, tale soluzione non ha comportato alcun costo dal punto di vista economico.

#### **4.4.4. Risultati delle prove sperimentali con il flusso pulsatile**

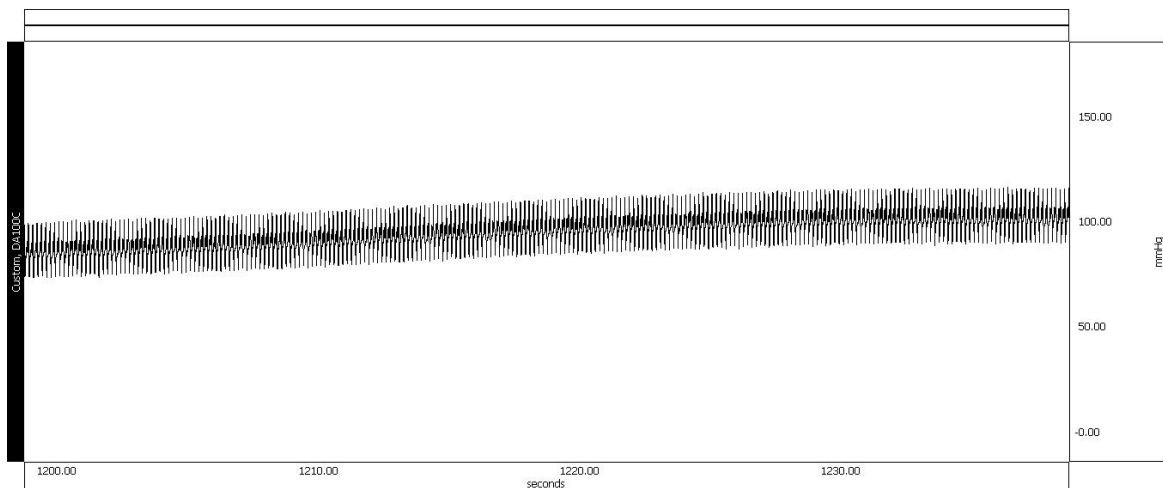
La prima prova con il flusso pulsatile (descritta nel dettaglio nel paragrafo 4.4.2.) è stata effettuata utilizzando come resistenza una cannula anziché il rene ed è servita per verificare se il sistema ideato fosse effettivamente in grado di generare 6 pulsazioni al secondo e mantenere la pressione all'interno del range fisiologico pari a 80 – 120 mmHg. Durante l'esperimento si è tenuto traccia della pressione e si è visto che il sistema è effettivamente in grado di ottenere il flusso pulsatile desiderato. In Figura 4.18, 4.19, 4.20 e 4.21 sono presenti i tracciati di pressione acquisiti. In particolare, in Figura 4.18 è presente il dettaglio del tracciato in cui si vede cosa accade quando viene accesa la *pompa pulsante*: se prima di azionarla la pressione è costante e pari a circa 80 mmHg,



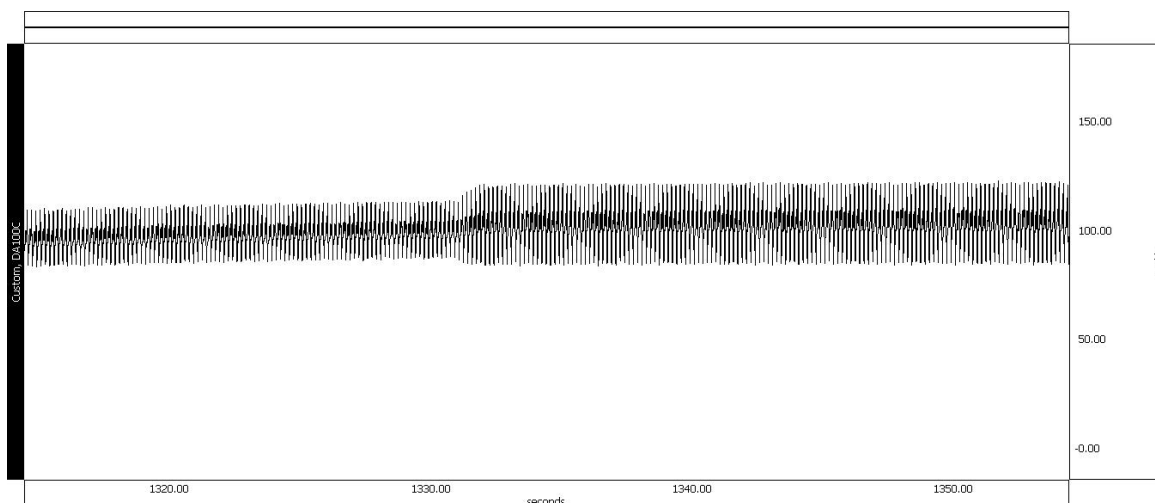
dopo l'accessione a 90 rpm la pressione inizia ad oscillare tra 70 e 100 mmHg. In Figura 4.19, invece, viene mostrato che, quando si aumentano i giri della pompa di perfusione, aumenta la *baseline* della pressione e quindi i valori di massima e minima. In Figura 4.20 si vede che, nel momento in cui viene aumentata l'occlusività della pompa pulsante, aumenta il *gap* tra pressione massima e pressione minima. Infine, in Figura 4.21 si osserva che il numero di pulsazioni in un secondo è pari a 6 come desiderato.



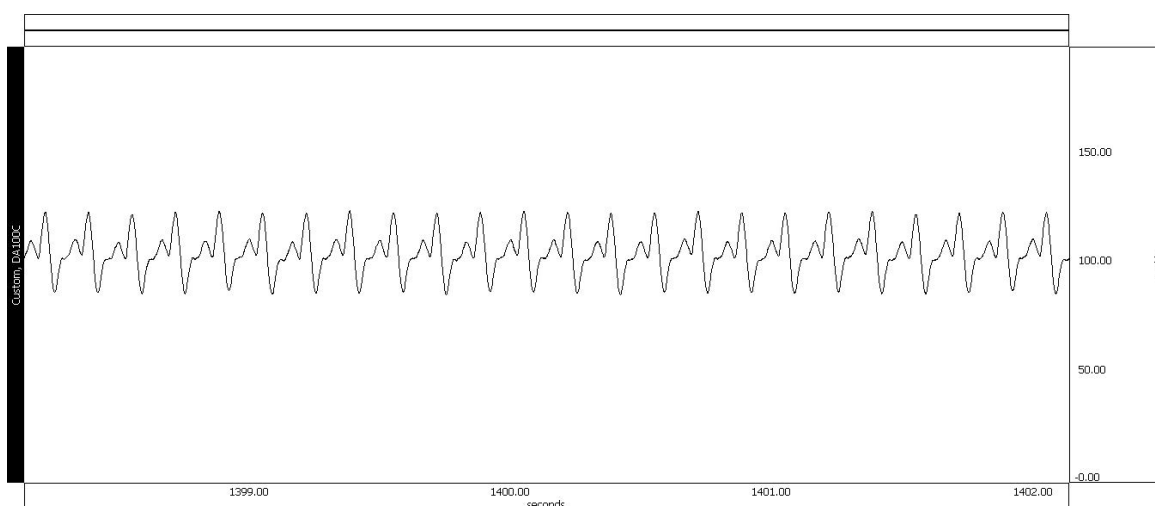
**Figura 4.18: azionamento della pompa pulsante. Scala delle ascisse: 10 secondi.**



**Figura 4.19: aumento del numero di giri della pompa di perfusione. Scala delle ascisse: 10 secondi.**

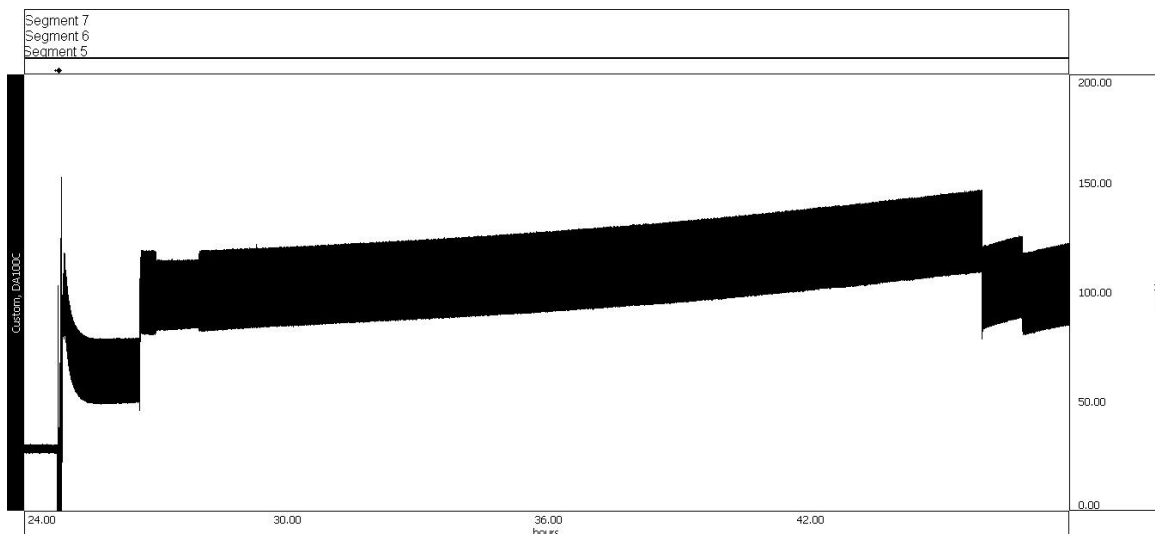


**Figura 4.20: aumento dell'occlusività della pompa pulsante. Scala delle ascisse: 10 secondi.**

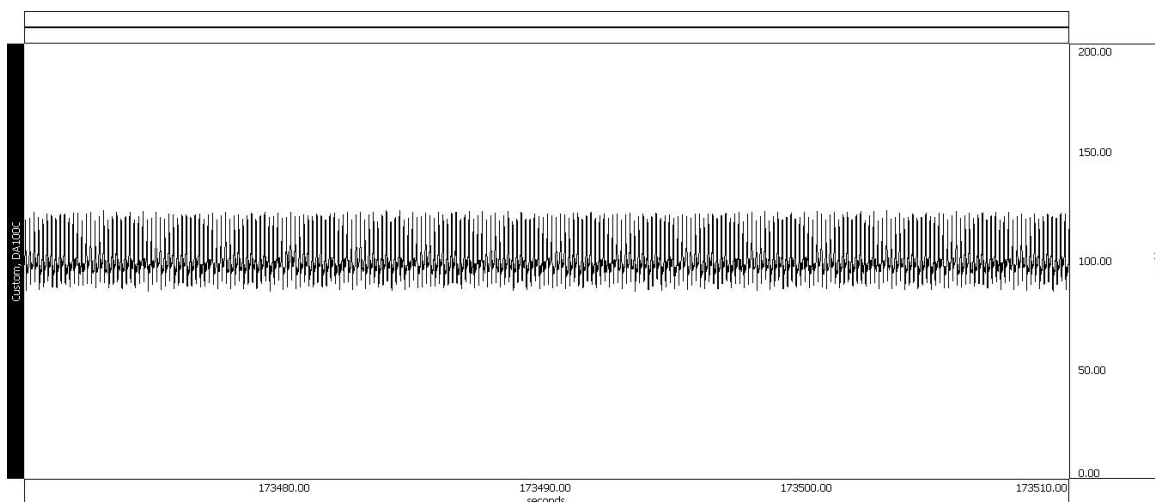


**Figura 4.21: dettagli del tracciato in cui si vedono le 6 pulsazioni al secondo. Scala delle ascisse: 1 secondo.**

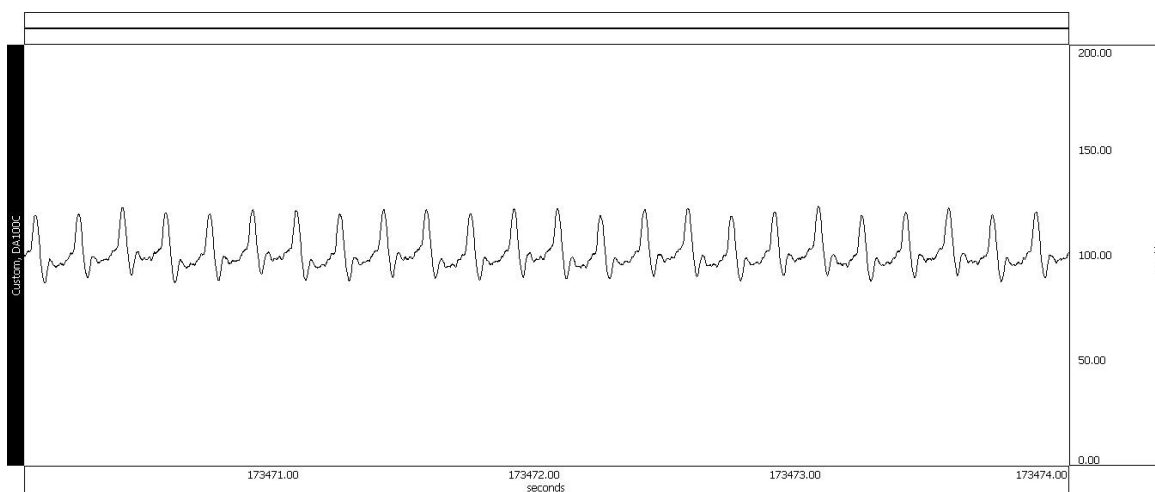
La seconda prova con flusso pulsatile è stata effettuata a seguito del processo di decellularizzazione del rene: si è rimpio il circuito con medium e lo *scaffold* è stato perfuso con flusso pulsatile per 24 ore. Durante la prova si è monitorata la pressione, i cui tracciati sono riportati in Figura 4.22, 4.23 e 4.24. In particolare, in Figura 4.22 è presente l'intero tracciato riferito alle 24 ore di perfusione con flusso pulsatile, mentre in Figura 4.23 è presente un dettaglio del tracciato per evidenziare la pulsatilità utilizzando in ascisse una scala di 10 secondi. Infine, in Figura 4.24 è presente il tracciato con scala in ascisse pari a 1 secondo per evidenziare le 6 pulsazioni desiderate durante tale intervallo di tempo.



**Figura 4.22: tracciato della pressione misurata durante le 24 h di flusso pulsatile. Scala delle ascisse: 6 h.**



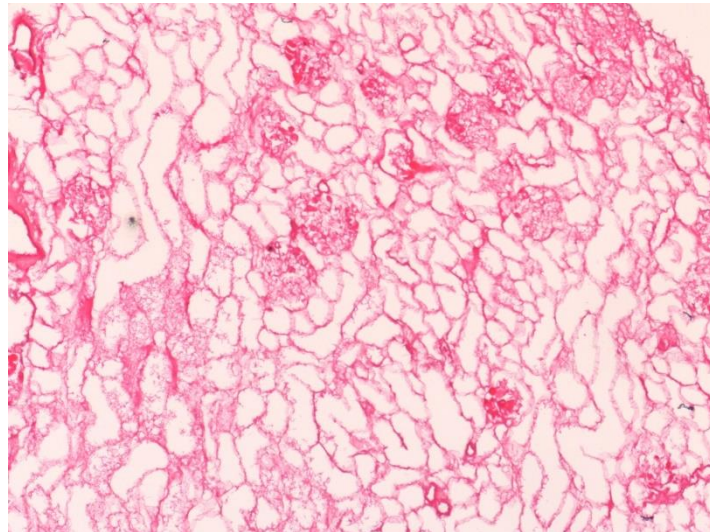
**Figura 4.23: dettaglio del tracciato di pressione misurata durante la perfusione con flusso pulsatile. Scala delle ascisse: 10 secondi.**



**Figura 4.24: dettaglio del tracciato di pressione misurata durante la perfusione con flusso pulsatile. Scala delle ascisse: 1 secondo.**

Dal tracciato in Figura 4.22 si osserva che, durante la prima ora di perfusione pulsatile, la pressione diminuisce gradualmente e il *gap* tra pressione massima e minima inizialmente impostato pari a circa 80 e 120 mmHg passa a essere pari a 50 e 80 mmHg. Tale *range* è stato mantenuto per circa 1 ora e mezza, a seguito delle quali è stato alzato manualmente il numero di giri della pompa di perfusione, in modo da ottenere nuovamente il *gap* desiderato. Nel corso della notte (tra le 2 ore e mezza e le 22 ore dall'inizio della perfusione pulsatile) la pressione è aumentata gradualmente, fino a raggiungere un *gap* compreso tra 110 e 150 mmHg. La mattina successiva si sono dovuti quindi diminuire i giri della pompa di perfusione, di modo da ottenere il *range* desiderato. Tale operazione è stata fatta due volte (dopo circa 46 e 47 ore dall'inizio della perfusione pulsatile), in quanto la pressione continuava ad aumentare. Dopo 24 ore l'esperimento è stato stoppato.

Infine, dall'analisi delle immagini di microscopia delle colorazioni con Ematossilina ed Eosina (Figura 4.25), si evince che la struttura dello *scaffold* non è stata compromessa durante la perfusione con flusso pulsatile.



**Figura 4.25:** colorazione con ematossilina ed eosina della matrice di un rene decellularizzato e perfuso con flusso pulsatile per 24 ore (exp 208) (ingrandimento 20X).

## 4.5. Discussione

Le prove sperimentali con il sistema di controllo automatico e con il flusso pulsatile hanno permesso di verificare se le modifiche ideate per il circuito fossero effettivamente efficaci e non compromettessero la struttura del rene.

Per quanto riguarda il controllo automatico, dagli esperimenti si evince che tale sistema riesce nel regolare la velocità della pompa in funzione della pressione misurata e che la struttura dello *scaffold* non è stata danneggiata. Tale sistema di regolazione è stato però utilizzato solo durante il processo di decellularizzazione e sarebbe quindi interessante effettuare prove anche durante la ricellularizzazione.

Per quanto riguarda invece le prove con il flusso pulsatile, anche in questo caso si è osservato che la struttura del rene non viene compromessa e che si riescono ad ottenere 6 pulsazioni al secondo, con pressione minima pari a 80 mmHg e pressione massima pari a 120 mmHg, come desiderato. Tuttavia, ci sono degli aspetti che devono essere considerati. Per prima cosa, è stata effettuata solo una prova di pulsatilità utilizzando un rene decellularizzato. Questo è stato dettato dalla mancanza di tempo per effettuare altre prove e, di conseguenza, sarebbe opportuno eseguire nuovamente il medesimo esperimento per verificarne la riproducibilità. In secondo luogo, tale prova è stata effettuata solo perfondendo medium, in quanto l'obiettivo era verificare che si riuscisse ad ottenere il flusso pulsatile desiderato e che non fosse compromessa la struttura a seguito della prova. Non è stato quindi verificato se la pulsatilità ottenuta ha delle ripercussioni positive sulla distribuzione cellulare a seguito dell'infusione e sul differenziamento delle cellule in coltura. Ultimo aspetto da considerare è che la pulsatilità ottenuta, nonostante abbia frequenza e valori massimi e minimi come quelli che si hanno nel ratto, non presenta una forma d'onda fisiologica. Bisognerebbe quindi indagare se la differente forma d'onda ha delle ripercussioni per quanto riguarda la distribuzione e il differenziamento cellulare.

## 5. Verifica della permeabilità dei tessuti del rene decellularizzato

---

*Dalla letteratura si evince che a seguito del processo di ricellularizzazione si ha una distribuzione limitata e non uniforme delle cellule nello scaffold. È stato quindi ipotizzato che a seguito del processo di decellularizzazione le pareti dei vasi dello scaffold non siano più totalmente impermeabili e che ciò, influenzando la distribuzione di portate, sia la causa della distribuzione cellulare non uniforme. In questo capitolo vengono quindi presentate le prove sperimentali effettuate per verificare che le pareti dei vasi siano effettivamente permeabili a seguito della decellularizzazione e i risultati ottenuti.*

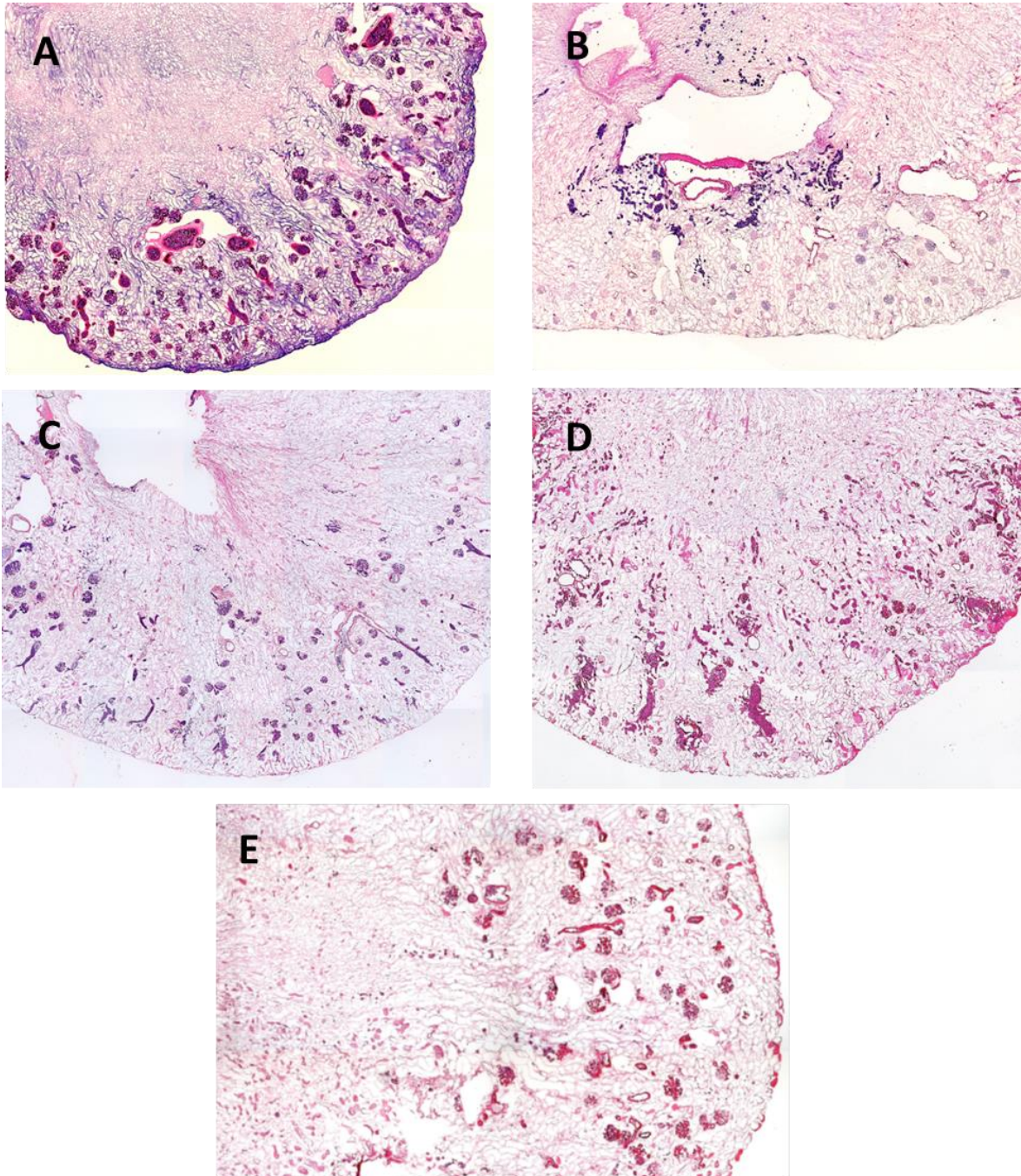
### **5.1. Permeabilità delle pareti dei vasi dello scaffold decellularizzato: causa della ricellularizzazione parziale**

Analizzando quanto riportato in letteratura nell'ambito dell'ingegneria tissutale per la rigenerazione del rene, si evince che a seguito del processo di ricellularizzazione la presenza di cellule nello *scaffold* appare limitata e non uniforme. Presso l'Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri sono quindi stati effettuati diversi esperimenti volti a capire quale fosse il protocollo di ricellularizzazione più adatto per permettere una migliore distribuzione cellulare. I protocolli adottati sono stati i seguenti (per la descrizione precisa del protocollo di ricellularizzazione vedere l'Appendice A):

- infusione da arteria e successiva perfusione di 24 ore;
- infusione da vena e successiva perfusione di 24 ore;
- infusione da arteria e uretere e successiva perfusione di 24 ore;
- infusione da arteria, vena e uretere e successiva perfusione di 24 ore;
- infusione da arteria, vena e uretere e successiva perfusione di 72 ore.

Tuttavia, osservando le istologie presenti in Figura 5.1 riferite agli esperimenti sopra citati, si evince che nessuno di questi protocolli ha permesso di ottenere una

ricellularizzazione ottimale. Le cellule, infatti, sono situate principalmente nella corticale e, in particolare, all'interno dei glomeruli, mentre la midollare e il compartimento tubulare risultano scarsamente popolati.



**Figura 5.1:** istologie ottenute a seguito degli esperimenti di ricellularizzazione. (A) infusione da arteria e successiva perfusione di 24 ore; (B) infusione da vena e successiva perfusione di 24 ore; (C) infusione da arteria e uretere e successiva perfusione di 24 ore; (D) infusione da arteria, vena e uretere e successiva perfusione di 24 ore; (E) infusione da arteria, vena e uretere e successiva perfusione di 72 ore.

È stato quindi ipotizzato che, a seguito del processo di decellularizzazione, le pareti dei vasi dello *scaffold*, non avendo più la componente cellulare, non siano più totalmente impermeabili. Di conseguenza, la sospensione cellulare infusa durante la ricellularizzazione permeerebbe dalle pareti e ciò potrebbe essere la causa della non omogenea distribuzione cellulare. È stata quindi valutata, tramite esperimenti, la portata di liquido fuoriuscito dalla vena: nel caso in cui le pareti non siano impermeabili, infatti, essa non è pari alla portata d'ingresso allo *scaffold*, ma diminuisce man mano che il liquido scorre nei vasi. Sono state quindi effettuate prove di perfusione sia con solo medium, ma anche con medium contenente cellule. Questo per verificare se nel liquido fuoriuscito dalla vena ed eventualmente in quello permeato dalle pareti del rene fossero presenti delle cellule e, nel caso, quantificarle. Tali esperimenti sono descritti nel dettaglio nei paragrafi 5.1.1 e 5.1.2.

### 5.1.1. Prova di perfusione con medium di un rene decellularizzato

Un rene di ratto a cui è stata incannulata l'arteria con un catetere PE-50 e la vena con una cannula da 14 Gauge viene decellularizzato seguendo il protocollo descritto in Appendice A. Terminato il processo di decellularizzazione, esso è stato perfuso dall'arteria con del medium contenente un fattore di inibizione della leucemia (LIF, *Leukemia inhibitory factor*) a portate differenti riportate in Tabella 5.1, prima crescenti (Test 1, 2, 3, 4) e successivamente decrescenti (Test 5, 6, 7, 8).

Test	Portata di perfusione [mL/min]
1-8	0.25
2-7	0.5
3-6	0.75
4-5	1

Tabella 5.1: portate utilizzate nella prova di perfusione con medium.

In piastre da coltura di diametro pari a 100 mm (piastra D-100) viene raccolto il medium che permea dalle pareti dello *scaffold* e quello che fuoriesce dalla vena. Il *set-up* sperimentale, presente in Figura 5.2, è il seguente:



- il catetere inserito nell'arteria del rene viene collegato tramite un ago da 22 Gauge a un tubo nel quale viene pompato il medium attraverso una pompa a siringa (con siringa da 10 mL);
- su un supporto in Plexiglass viene poggiato un setaccio, dove, a sua volta, viene adagiato *lo scaffold*;
- sotto il setaccio è posizionata una piastra D-100, che raccoglierà il medium permeato dalle pareti del rene;
- la cannula della vena viene lasciata sporgere dal setaccio e il liquido uscente viene fatto gocciolare in un'altra piastra D-100.



**Figura 5.2: set-up sperimentale della prova di perfusione con medium di un rene decellularizzato a cui sono state incannulate vena e arteria.**

Nello specifico, la procedura dell'esperimento è la seguente:

- vengono pesate 16 piastre D-100 utilizzate per raccogliere il medium permeato dalle pareti e uscente dalla vena durante le 8 perfusioni a portate differenti (vedi Tabella 5.1);
- lo *scaffold* è perfuso per 5 minuti alle portate riportate in Tabella 5.1;
- ogni volta che si cambia la portata, vengono cambiate le piastre, di modo da sapere quanto liquido è permeato dalle pareti e quanto fuoriuscito dalla vena per ciascun test;
- le piastre nelle quali è stato raccolto il medium vengono nuovamente pesate a seguito della prova;
- conoscendo quindi la differenza di peso delle piastre prima e dopo la prova e la densità del medium con LIF, pari a 0.977 g/mL, è stato possibile calcolare il volume

di liquido permeato dalle pareti dello *scaffold*, quello fuoriuscito dalla vena e quello “andato perso” perché rimasto nelle maglie del setaccio;

- durante la prova è stata monitorata la pressione.

### **5.1.2. Prova di perfusione con una sospensione di medium e cellule di un rene decellularizzato**

Un rene di ratto a cui è stata incannulata l'arteria con un catetere PE-50 e la vena con una cannula da 14 Gauge viene decellularizzato seguendo il protocollo descritto in Appendice A. Terminato il processo di decellularizzazione, è stato montato il *set-up* descritto nel paragrafo precedente ed è stata effettuata la seguente prova:

- Tramite una pompa a siringa vengono effettuate tre infusioni della durata di 3 minuti ciascuna di medium contenente cellule, intervallate da tre perfusioni di solo medium della durata di 10 minuti. La portata di infusione di medium con cellule è pari a 1 mL/min, mentre quella di perfusione di solo medium è di 0.4 mL/min.
- Sia durante l'infusione di medium con cellule, che durante la perfusione di solo medium, è stato raccolto in piastre D-100 il liquido permeato dalle pareti dello *scaffold* e quello fuoriuscito dalla vena.
- Avendo pesato le piastre sia prima che dopo la prova, è stato possibile ricavare il peso del medium permeato dalle pareti e di quello fuoriuscito dalla vena.
- Conoscendo la densità del medium utilizzato (senza LIF), pari a 0.9688 g/mL, è stato calcolato il volume di liquido permeato dalle pareti dello *scaffold*, quello fuoriuscito dalla vena e quello “andato perso” perché rimasto nelle maglie del setaccio.
- Sono state contate le cellule presenti in tutte le piastre D-100.
- Durante la prova è stata monitorata la pressione.

In Tabella 5.2 sono riassunti i dati relativi la prova effettuata.

	Q [mL/min]	T <sub>perfusione</sub> [min]	V <sub>perfuso</sub> [mL]	N°cellule infuse
<b>Infusione cellule</b>	1	3	3	5 milioni a infusione (15 milioni in tutto)
<b>Perfusione con medium</b>	0.4	10	4	-

Tabella 5.2: dati relativi la prova di perfusione di medium con cellule.

### 5.1.3. Risultati della prova di perfusione con medium del rene decellularizzato

Durante la prova di perfusione con solo medium si è osservato che parte del liquido fuoriusciva dalla vena, mentre parte permeava dalla superficie del rene: l'ipotesi che a seguito del processo di decellularizzazione le pareti dei vasi non siano più completamente impermeabili è quindi stata confermata.

In Tabella 5.3, 5.4, 5.5 e 5.6 sono riportate le percentuali di medium fuoriuscito dalla vena (%V<sub>vena</sub>), permeato dalle pareti dei vasi (%V<sub>permeato</sub>) e non raccolto nelle piastre di coltura perché rimasto "intrappolato" nelle maglie del setaccio (%V<sub>perso</sub>) per le diverse prove effettuate (exp 183, exp 184 e, solo per la portata di 1 mL/min, exp 217). In Tabella 5.3 sono riportati i risultati ottenuti perfondendo a 0.25 mL/min, in Tabella 5.4 a 0.5 mL/min, in Tabella 5.5 a 0.75 mL/min ed infine in Tabella 5.6 a 1 mL/min. Per ogni esperimento si noti che è presente due volte una medesima portata, in quanto prima è stata effettuata una perfusione in rampa di portata crescente (Q = 0.25 0.5, 0.75 e 1 mL/min) e, successivamente, decrescente (Q = 1, 0.75, 0.5 e 0.25 mL/min).

N°esperimento	Q <sub>perfusione</sub> [mL/min]	% V <sub>vena</sub>	% V <sub>permeato</sub>	% V <sub>perso</sub>
<b>183</b>	0.25	52%	5.6%	42.4%
	0.25	62.4%	2.4%	35.2%
<b>184</b>	0.25	53.1%	33.9%	13%
	0.25	36.9%	63.1%	0%

Tabella 5.3: percentuali di medium fuoriuscito dalla vena (%V<sub>vena</sub>), permeato dalle pareti dei vasi (%V<sub>permeato</sub>) e rimasto nelle maglie del setaccio (%V<sub>perso</sub>) perfondendo a 0.25 mL/min.

N°esperimento	Q perfusione [mL/min]	% V <sub>vena</sub>	% V <sub>permeato</sub>	% V <sub>perso</sub>
183	0.5	55.6%	19.2%	25.2%
	0.5	43.6%	23.2%	33.2%
184	0.5	32.2%	43.3%	24.5%
	0.5	40.7%	46.9%	12.4%

Tabella 5.4: percentuali di medium fuoriuscito dalla vena (%V<sub>vena</sub>), permeato dalle pareti dei vasi (%V<sub>permeato</sub>) e rimasto nelle maglie del setaccio (%V<sub>perso</sub>) perfondendo a 0.5 mL/min.

N°esperimento	Q perfusione [mL/min]	% V <sub>vena</sub>	% V <sub>permeato</sub>	% V <sub>perso</sub>
183	0.75	59.7%	20%	20.3%
	0.75	75.7%	9.6%	14.7%
184	0.75	50.9%	30.3%	18.8%
	0.75	49.9%	50.1%	0%

Tabella 5.5: percentuali di medium fuoriuscito dalla vena (%V<sub>vena</sub>), permeato dalle pareti dei vasi (%V<sub>permeato</sub>) e rimasto nelle maglie del setaccio (%V<sub>perso</sub>) perfondendo a 0.75 mL/min.

N°esperimento	Q perfusione [mL/min]	% V <sub>vena</sub>	% V <sub>permeato</sub>	% V <sub>perso</sub>
183	1	11.2%	78.4%	10.4%
	1	20.6%	73.6%	5.8%
184	1	35.6%	63.1%	1.3%
	1	18.1%	77.5%	4.4%
217	1	34.6%	42%	23.4%
	1	33%	0%	67%
	1	25.8%	0%	74.2%

Tabella 5.6: percentuali di medium fuoriuscito dalla vena (%V<sub>vena</sub>), permeato dalle pareti dei vasi (%V<sub>permeato</sub>) e rimasto nelle maglie del setaccio (%V<sub>perso</sub>) perfondendo a 1 mL/min.

Si noti che per la portata pari a 1 mL/min sono presenti dei dati in più rispetto che con le altre portate in quanto è stata effettuata una prova di perfusione (exp 217) infondendo solo a 1 mL/min (non facendo quindi la rampa di portata). Questo perché si volevano maggiori dati relativi a tale portata, in quanto durante il processo di ricellularizzazione le cellule vengono infuse a 1 mL/min.

In Tabella 5.7 sono invece presenti le medie delle percentuali di medium fuoriuscito dalla vena ( $\% V_{\text{vena,mean}}$ ), permeato dalle pareti dei vasi ( $\% V_{\text{permeato, mean}}$ ) e rimasto nelle maglie del setaccio ( $\% V_{\text{perso, mean}}$ ) a una data portata, per tutti i diversi esperimenti effettuati.

$Q_{\text{perfusione}}$ [mL/min]	$\% V_{\text{vena,mean}}$	$\% V_{\text{permeato, mean}}$	$\% V_{\text{perso, mean}}$
0.25	51.1%	26.3%	22.7%
0.5	43.0%	33.2%	23.8%
0.75	59.1%	27.5%	13.5%
1	25.4%	47.8%	26.6%

Tabella 5.7: media delle percentuali di medium fuoriuscito dalla vena ( $\%V_{\text{vena,mean}}$ ), permeato dalle pareti dei vasi ( $\%V_{\text{permeato,mean}}$ ) e rimasto nelle maglie del setaccio ( $\%V_{\text{perso,mean}}$ ) per una data portata.

#### 5.1.4. Risultati della prova di perfusione con medium e cellule del rene decellularizzato

Una volta verificata la permeabilità dei tessuti, è stata effettuata una perfusione della sospensione di medium e cellule secondo la modalità descritta nel paragrafo 5.1.2. per quantificare sia la quantità di liquido fuoriuscito dalla vena o permeato dalle pareti, sia per verificare se vi fossero cellule che durante la prova fuoriuscivano dalla vena o si trovavano nel liquido permeato dalle pareti del rene ed eventualmente quantificarle.

In Tabella 5.8 e 5.9 sono presenti le percentuali di medium fuoriuscito dalla vena ( $\%V_{\text{vena}}$ ), permeato dalle pareti dei vasi ( $\%V_{\text{permeato}}$ ) e non raccolto nelle piastre di coltura perché rimasto “intrappolato” nelle maglie del setaccio ( $\%V_{\text{perso}}$ ), per le diverse prove effettuate (exp 186, 188, 189, 191, 202, 216 e 218). In Tabella 5.8 sono presenti le percentuali ottenute perfondendo a 1 mL/min, mentre in Tabella 5.9 quelle ottenute perfondendo a 0.4 mL/min.

<b>N°esperimento</b>	<b>Q perfusione [mL/min]</b>	<b>N° infusione</b>	<b>% V<sub>vena</sub></b>	<b>% V<sub>permeato</sub></b>	<b>% V<sub>perso</sub></b>
<b>186</b>	1	1	5.5%	71.1%	23.4%
		2	20.2%	49.8%	30%
		3	25.5%	58.9%	15.6%
<b>188</b>	1	1	14.2%	35.1%	50.7%
		2	17.6%	39.5%	42.9%
		3	4.2%	75.1%	20.7%
<b>189</b>	1	1	42.7%	36.2%	21.1%
		2	30.8%	51.5%	17.7%
		3	80.8%	15.6%	3.6%
<b>191</b>	1	1	24.4%	48%	27.6%
		2	25.7%	51%	23.3%
		3	28.6%	47.6%	23.8%
<b>202</b>	1	1	51.5%	37.9%	10.6%
		2	26.9%	40.9%	32.2%
		3	15.6%	41.3%	43.1%
<b>216</b>	1	1	33.9%	51.7%	14.4%
		2	3.4%	76%	20.6%
		3	0%	55.8%	44.2%
<b>218</b>	1	1	18.4%	43.6%	38%
		2	20.6%	25.5%	53.9%
		3	23.6%	24.4%	52%

**Tabella 5.8: percentuali di liquido fuoriuscito dalla vena ( $\%V_{\text{vena}}$ ), permeato dalle pareti dei vasi ( $\%V_{\text{permeato}}$ ) e rimasto nelle maglie del setaccio ( $\%V_{\text{perso}}$ ) perfondendo a 1 mL/min.**

<b>N°esperimento</b>	<b>Q perfusione [mL/min]</b>	<b>N° perfusione</b>	<b>% V<sub>vena</sub></b>	<b>% V<sub>permeato</sub></b>	<b>% V<sub>perso</sub></b>
<b>186</b>	0.4	1	20.5%	63.7%	15.8%
		2	22.6%	55.5%	21.9%
		3	34.9%	51.6%	13.5%
<b>188</b>	0.4	1	4.4%	82.7%	12.9%
		2	6%	83.7%	10.3%
		3	10.4%	81.2%	8.4%
<b>189</b>	0.4	1	17.3%	82.7%	-
		2	71.5%	26.4%	2.1%
		3	55%	27.4%	17.6%
<b>191</b>	0.4	1	24.3%	60.3%	15.4%
		2	28.7%	59.1%	12.2%
		3	21.8%	64.8%	13.4%
<b>202</b>	0.4	1	29.8%	48.7 %	21.5 %
		2	25.3%	50.8%	23.8%
		3	25.3%	50.8%	23.8%
<b>216</b>	0.4	1	23%	55.5%	21.4%
		2	0%	91%	9%
		3	-	-	-
<b>218</b>	0.4	1	19%	49.6%	31.4%
		2	39.1%	59%	1.9%
		3	43.2%	54.4%	2.3%

**Tabella 5.9: percentuali di liquido fuoriuscito dalla vena (%V<sub>vena</sub>), permeato dalle pareti dei vasi (%V<sub>permeato</sub>) e rimasto nelle maglie del setaccio (%V<sub>perso</sub>) perfondendo a 0.4 mL/min.**

Si è visto inoltre che, sia nel liquido fuoriuscito dalla vena, che in quello permeato dalle pareti, erano presenti delle cellule, le quali sono state contate e i dati ottenuti sono riportati in Tabella 5.10 e 5.11.

<b>Exp</b>	<b>N°cellule nel liquido permeato</b>	<b>N°cellule uscite dalla vena</b>	<b>Totale cellule uscite dal rene</b>
<b>186</b>	1.75E+06	5.14E+04	1.80E+06
<b>188</b>	7.54E+05	2.66E+04	7.81E+05
<b>189</b>	1.29E+06	6.77E+04	1.36E+06
<b>191</b>	1.72E+06	2.18E+05	1.93E+06
<b>202</b>	5.38E+05	7.62E+04	6.15E+05
<b>216</b>	3.47E+06	2.02E+04	3.49E+06
<b>218</b>	1.11E+06	6.05E+04	1.17E+06

Tabella 5.10: numero di cellule nel liquido permeato, fuoriuscite dalla vena e la loro somma.

<b>Exp</b>	<b>% cellule nel liquido permeato</b>	<b>% cellule uscite dalla vena</b>	<b>% cellule uscite dal rene</b>
<b>186</b>	11.68%	0.34%	12.02%
<b>188</b>	5.03%	0.18%	5.21%
<b>189</b>	8.60%	0.45%	9.05%
<b>191</b>	11.47%	1.45%	12.87%
<b>202</b>	3.59%	0.51%	4.10%
<b>216</b>	23.13%	0.13%	23.26%
<b>218</b>	7.4%	0.4%	7.8%

Tabella 5.11: percentuale di cellule nel liquido permeato, fuoriuscite dalla vena e la loro somma rispetto al totale di quelle infuse.



Le Tabelle 5.12 e 5.13 riassumono i risultati ottenuti nei diversi esperimenti effettuati perfondendo la sospensione di medium e cellule. In Tabella 5.12 sono infatti presenti le medie delle percentuali di medium fuoriuscito dalla vena ( $\% V_{\text{vena,mean}}$ ), permeato dalle pareti dei vasi ( $\% V_{\text{permeato, mean}}$ ) e rimasto nelle maglie del setaccio ( $\% V_{\text{perso, mean}}$ ) per le portate di 1 e 0.4 mL/min, mentre in Tabella 5.13 sono presenti le percentuali medie del numero di cellule uscite dalla vena, che si trovano nel medium permeato dalle pareti e la loro somma (% totale di cellule uscite dal rene).

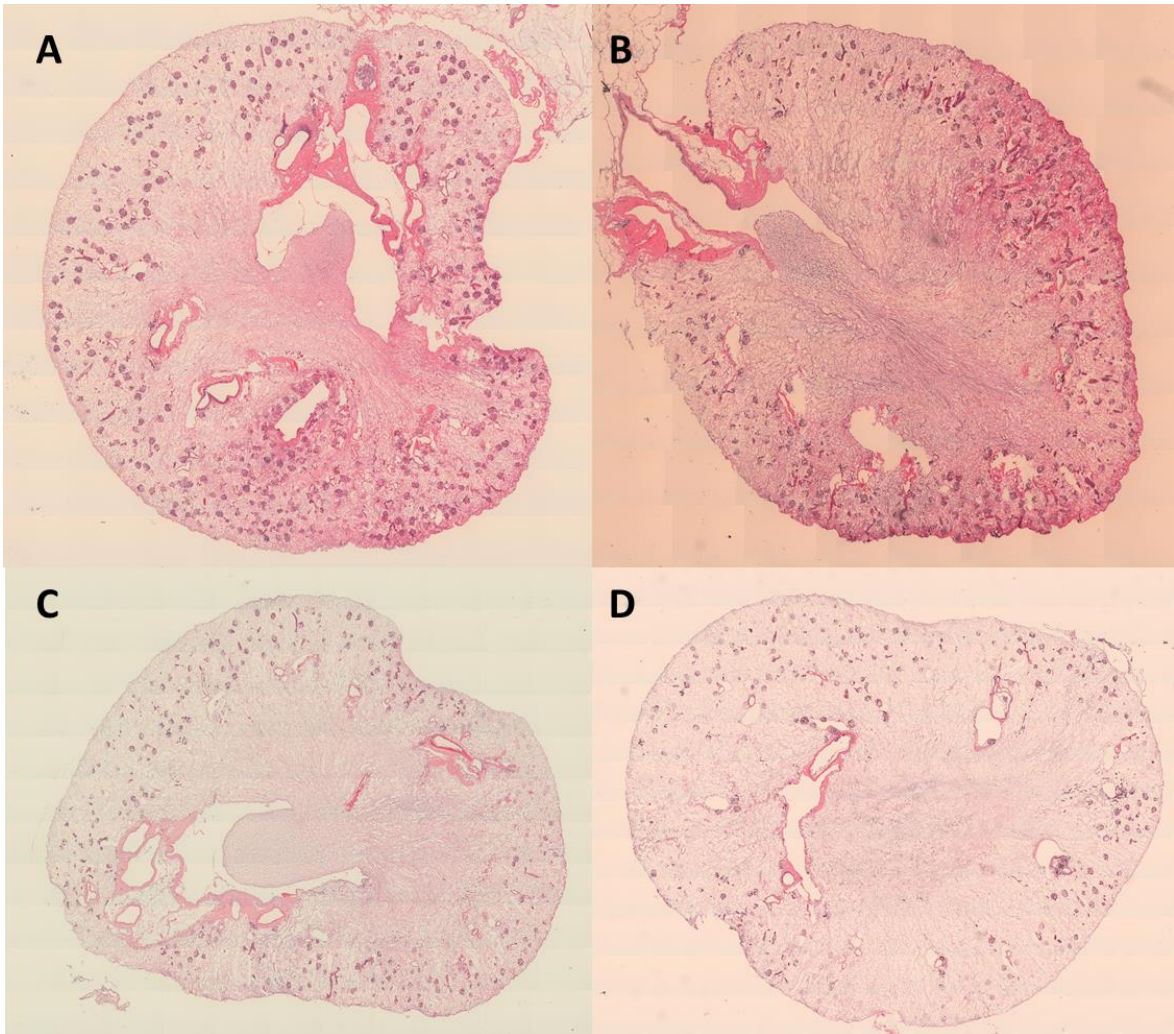
$\% V_{\text{vena,mean}}$ Q = 1 mL/min	$\% V_{\text{permeato, mean}}$ Q = 1 mL/min	$\% V_{\text{perso, mean}}$ Q = 1 mL/min	$\% V_{\text{vena,mean}}$ Q = 0.4 mL/min	$\% V_{\text{permeato, mean}}$ Q = 0.4 mL/min	$\% V_{\text{perso, mean}}$ Q = 0.4 mL/min
24.5%	46.5%	29%	59.9%	26.1%	13.9%

**Tabella 5.12: medie delle percentuali di medium fuoriuscito dalla vena ( $\% V_{\text{vena,mean}}$ ), permeato dalle pareti dei vasi ( $\% V_{\text{permeato, mean}}$ ) e rimasto nelle maglie del setaccio ( $\% V_{\text{perso, mean}}$ ) per le portate di 1 e 0.4 mL/min.**

<b>% media di cellule nel liquido permeato</b>	<b>% media di cellule uscite dalla vena</b>	<b>% media di cellule uscite dal rene</b>
10.1%	0.5%	10.6%

**Tabella 5.13: percentuali medie del numero di cellule uscite dalla vena, che si trovano nel medium permeato dalle pareti e la loro somma (% totale di cellule uscite dal rene).**

Infine, in Figura 5.3 sono presenti le istologie riferite agli esperimenti 186, 188, 189 e 216, dove si può osservare la distribuzione di cellule che si ha nella struttura a seguito delle tre infusioni eseguite durante il singolo esperimento. Si noti come, in tutti i casi, la regione corticale risulta maggiormente ripopolata rispetto alla midollare e che le cellule si trovano principalmente nei glomeruli, a conferma del fatto che la distribuzione cellulare a seguito della ricellularizzazione non è uniforme.



**Figura 5.3:** sezioni di rene colorate con ematossilina ed eosina a seguito della perfusione dello *scaffold* con la sospensione cellulare: (A) exp 186, (B) exp 188, (C) exp 189 e (D) exp 216.

## 5.2. Discussione

Dalle prove di perfusione effettuate e descritte nei paragrafi precedenti si evince che il liquido, una volta infuso dall'arteria nel rene decellularizzato, non fuoriesce completamente dalla vena, in quanto parte permea dai tessuti renali. In particolare, osservando i risultati riferiti alla prova di perfusione con medium presenti in Tabella 5.7, si evince che, mentre per le portate pari a 0.25, 0.5 e 0.75 mL/min il volume di medium fuoriuscito dalla vena è di circa il 50% rispetto al totale del volume infuso, quello fuoriuscito dalla vena perfondendo a una portata di 1 mL/min è di circa il 25%. Ciò è probabilmente dovuto al fatto che, alla portata di 1 mL/min, la pressione transmembrana tra l'intero e l'esterno del vaso diventa tale da favorire la permeazione di liquido dalle pareti piuttosto che lo scorrere all'interno del vaso. Ciò è confermato anche osservando i risultati delle prove di perfusione della sospensione di medium e cellule presenti in Tabella 5.12; anche qui si osserva infatti che, mentre perfondendo a 0.4 mL/min il volume di liquido uscito dalla vena è di circa il 50% rispetto al totale, perfondendo a 1 mL/min è ancora pari a circa il 25%. Dai risultati ottenuti si osserva quindi che alla portata con la quale le cellule vengono infuse durante il protocollo di ricellularizzazione, pari a 1 mL/min, la quantità di liquido che permea dai tessuti è maggiore rispetto a quando il rene viene perfuso a portate minori. Tuttavia, in precedenti esperimenti effettuati presso l'Istituto Mario Negri volti a stabilire quale fosse il protocollo di ricellularizzazione migliore, si era osservato che, infondendo le cellule a portate minori, esse, rimanendo più tempo nella siringa, tendevano a sedimentare. Ecco perché si è quindi deciso di alternare tre infusioni di cellule da 1 mL/min a tre perfusioni della durata di 10 minuti a 0.4 mL/min. È stato inoltre verificato che non tutti i 15 milioni di cellule infusi durante la prova rimangono all'interno dello *scaffold*: in media il 10.6% delle cellule esce dalla struttura e di questo 10.6%, lo 0.5% corrisponde alle cellule fuoriuscite dalla vena, mentre il 10.1% sono le cellule che si trovano nel medium permeato dai tessuti. Tuttavia, le pareti dei vasi, anche se decellularizzate, non hanno una porosità tale da permettere alle cellule di permeare. È stato quindi ipotizzato che a seguito del processo di decellularizzazione possano esserci dei micro danni della struttura dello *scaffold* che causano la perdita delle cellule anche dalle pareti del rene e non solo dalla vena.

## 6. Ottenimento di un modello teorico di rene nativo e decellularizzato

---

*In questo capitolo vengono descritti un modello di rene nativo e uno di rene decellularizzato in grado di prevedere le pressioni, le portate e le velocità all'interno dell'organo. In particolare, quello del rene decellularizzato può essere utile sia per valutare i vari parametri che influenzano la distribuzione cellulare, che per capire come variarli per migliorare la ricellularizzazione.*

### 6.1. Modello analitico di rene nativo

Poiché la distribuzione delle cellule nello *scaffold* a seguito del processo di ricellularizzazione è limitata e non uniforme, oltre alle prove sperimentali precedentemente descritte per valutare la permeabilità delle pareti del rene decellularizzato, si è voluto creare un modello di *scaffold* che fosse in grado di prevedere le pressioni, le portate e le velocità all'interno della struttura, in modo da avere uno strumento in grado di predire come variano i parametri che influenzano la distribuzione cellulare al variare di pressione e portata d'ingresso. Tale modello potrebbe inoltre essere uno strumento d'appoggio nel capire come variare i parametri al fine di migliorare la ricellularizzazione. Tuttavia, prima di implementare un modello che descrivesse il rene decellularizzato e che tenesse quindi conto della permeabilità delle pareti dei vasi, si è deciso di partire col modellizzare un rene nativo.

Per quanto riguarda la geometria, si è suddiviso l'albero arterioso e venoso in diversi ordini, per ciascuno dei quali è stato attribuito il numero, la misura del raggio e la lunghezza dei vasi appartenenti (approssimati come cilindri in parallelo). Per fare ciò, è stato ripreso il modello introdotto da Nordsletten e coautori (Tabella 6.1 e 6.2) (38). Tale modello è stato modificato aggiungendo un ordine all'albero arterioso che modellizzasse i capillari glomerulari (ordine 11), e due ordini all'albero venoso che modellizzassero le

arteriole efferenti (ordine 12) e la vena renale (ordine 0). In Tabella 6.1 e 6.2 sono riportati il numero di elementi, la lunghezza e il raggio dei vasi di ciascuno ordine, rispettivamente dell'albero arterioso e venoso.

Ordine	Raggio [ $\mu\text{m}$ ]	Lunghezza [ $\mu\text{m}$ ]	N°stimato di elementi
0	216.1 $\pm$ 4.74	185	1
1	191.42 $\pm$ 17.79	1440 $\pm$ 647	3
2	139.83 $\pm$ 20.11	8975 $\pm$ 1331	6
3	86.15 $\pm$ 24.06	2516 $\pm$ 2053	24 $\pm$ 1
4	53.87 $\pm$ 12.51	1031 $\pm$ 674	90 $\pm$ 6
5	44.23 $\pm$ 9.81	511 $\pm$ 0	247 $\pm$ 23
6	39.29 $\pm$ 1.08	1001 $\pm$ 216	578 $\pm$ 71
7	29.87 $\pm$ 0.35	656 $\pm$ 286	1245 $\pm$ 198
8	20.06 $\pm$ 6.90	404 $\pm$ 390	4373 $\pm$ 664
9	13.9 $\pm$ 3.80	423 $\pm$ 283	13070 $\pm$ 2293
10	10.08 $\pm$ 0.14	312 $\pm$ 285	29566 $\pm$ 5965
11	5	150	591320

Tabella 6.1: modello dell'albero arterioso (38).

Ordine	Raggio [ $\mu\text{m}$ ]	Lunghezza [ $\mu\text{m}$ ]	N°stimato di elementi
12	6.08	300	29566
11	10.79 $\pm$ 2.41	155 $\pm$ 202	68564 $\pm$ 16647
10	14.72 $\pm$ 4.05	248 $\pm$ 230	30659 $\pm$ 2017
9	26.16 $\pm$ 1.57	315 $\pm$ 277	9258 $\pm$ 647
8	40.13 $\pm$ 8.51	625 $\pm$ 434	2926 $\pm$ 94
7	50.3 $\pm$ 12.12	820 $\pm$ 487	1210 $\pm$ 5
6	69.22 $\pm$ 21.18	1054 $\pm$ 626	418
5	114.07 $\pm$ 29.59	1147 $\pm$ 761	139
4	177.04 $\pm$ 39.04	1695 $\pm$ 1289	38
3	285.63 $\pm$ 52.86	6131 $\pm$ 2251	9
2	428.05 $\pm$ 80.95	3091 $\pm$ 965	4
1	603.77 $\pm$ 94.52	3123	2
0	850	100	1

Tabella 6.2: modello dell'albero venoso (38).

Utilizzando tale geometria è stato quindi implementato un foglio Excel che, data la pressione e la portata d'ingresso al rene, fosse in grado di fornire la pressione, la portata e la velocità del fluido per ogni livello gerarchico dell'albero arterioso e venoso.

Per ottenere la pressione d'uscita di un determinato livello gerarchico  $i$ , e quindi la pressione d'ingresso del successivo, è stata implementata la formula di *Poiseuille*:

$$(1) \quad P_{out,i} = P_{in,i} - \frac{8\mu\Delta x_i}{\pi R_i^4} \cdot Q_i$$

Dove:

- $P_{out,i}$ : pressione d'uscita del livello gerarchico  $i$
- $P_{in,i}$ : pressione d'ingresso del livello gerarchico  $i$
- $Q_i$ : portata di un vaso del livello gerarchico  $i$
- $\mu$ : viscosità del liquido
- $\Delta x_i$ : lunghezza media dei vasi del livello gerarchico  $i$
- $R_i$ : raggio medio dei vasi del livello gerarchico  $i$ .

La portata d'ingresso a un vaso di un determinato livello gerarchico è stata invece calcolata dividendo la portata di ingresso allo *scaffold* per il numero di elementi del livello considerato. Infine, la velocità del fluido in un vaso è stata trovata dividendo la portata all'interno di quel vaso per la sua sezione trasversale.

Si sono quindi effettuate delle prove sperimentali sul rene nativo di modo tale da avere le portate e le pressioni d'ingresso da inserire nel modello per poterlo validare. In particolare, sono state fatte delle prove di perfusione in rampa di portata durante le quali è stata monitorata la pressione: si è quindi visto qual era la pressione in ingresso al rene per una determinata portata impostata. Tali prove sono descritte nel dettaglio nel paragrafo 6.1.1.

### **6.1.1. Prova di perfusione in rampa di portata su rene nativo**

Un rene di ratto nativo ( $P_{ratto} = 250 - 350$  g) a cui è stata incannulata l'arteria con un catetere PE-50 è stato perfuso dall'arteria con del tampone fosfato salino 1X (*Phosphate buffered saline 1X*, PBS 1X) a portate crescenti ( $Q = 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20$  mL/min) e decrescenti ( $Q = 20, 18, 16, \dots, 2, 1$  mL/min), utilizzando una pompa a siringa con siringa da 60 mL. Ciascuna portata è stata mantenuta per 3 minuti, durante i quali si è misurata la pressione. È stata inoltre effettuata la prova di perfusione a portate crescenti

togliendo il rene e infondendo quindi il liquido nel tubo, nell'ago e nel catetere; anche in questo caso è stata misurata la pressione, di modo da valutare il contributo dovuto a tubo, ago e catetere e calcolare quindi il delta di pressione che agisce effettivamente sullo *scaffold*.

Il *set-up* sperimentale è il seguente (Figura 6.1):

- il catetere inserito nell'arteria viene collegato tramite un ago da 22 Gauge a un tubo nel quale viene pompato il PBS attraverso la pompa a siringa;
- su un supporto in Plexiglass viene poggiato un setaccio, dove, a sua volta, viene adagiato lo *scaffold*;
- il liquido che permea dalle prete del rene passa attraverso le maglie del setaccio e viene raccolto in una piastra da coltura di diametro pari a 100 mm (D-100) posizionata sotto il supporto.



**Figura 6.1: *set-up* sperimentale della prova di perfusione in rampa di portata.**

Anche Uzarski e coautori hanno effettuato prove di perfusione in rampa di portata (1) e i risultati da noi ottenuti sono quindi stati confrontati con quelli di questo gruppo di ricerca, di modo da valutare se fossero confrontabili.

### 6.1.2. Risultati ottenuti dalle prove di perfusione in rampa di portata con reni nativi e validazione del modello

Inizialmente la prova di perfusione era stata effettuata solo in rampa crescente ( $Q = 1, 2, 4, 6, \dots, 18, 20$  mL/min), tuttavia si è visto che per basse portate le pressioni misurate d'ingresso al rene risultavano essere più alte di quanto ci si sarebbe aspettato. Ciò è dovuto al fatto che all'inizio della prova la struttura è parzialmente collassata perché non perfusa e quindi la pressione è alta nonostante le basse portate. Successivamente, nel momento in cui il rene viene perfuso, i vasi si dilatano e la pressione sale in maniera più graduale all'aumentare della portata. È stato quindi deciso di effettuare la prova sia in rampa crescente che decrescente, in quanto durante la rampa decrescente, al diminuire della portata, la struttura tende ancora a collassare, tuttavia la pressione è comunque più bassa di quella necessaria per distendere i vasi durante la perfusione in rampa crescente. In Tabella 6.3 sono presenti le pressioni ottenute durante le prove effettuate: i reni degli esperimenti 194 e 198 sono stati perfusi solo in rampa crescente, mentre quelli degli esperimenti 200 e 204 sia in rampa crescente che decrescente.

Q [mL/min]	$\Delta P$ [mmHg] Exp 194	$\Delta P$ [mmHg] Exp 198	$\Delta P$ [mmHg] Exp 200 (crescente)	$\Delta P$ [mmHg] Exp 200 (decrescente)	$\Delta P$ [mmHg] Exp 204 (crescente)	$\Delta P$ [mmHg] Exp 204 (decrescente)
1	66.57	82.48	58.2	61.19	67.81	30.84
2	111.25	127.89	79.71	79.48	96	46.47
4	154.52	175.46	109.72	102.01	131.28	71.92
6	146.61	197.57	129.81	120.8	158.3	96.49
8	150.75	164.15	145.05	124.41	178.98	123.62
10	153.99	166.97	157.98	139.12	199.56	142.92
12	166.93	175.65	177.83	155.09	223.01	160.8
14	174.46	184.43	188.27	179.3	219.95	178.14
16	185.36	204.3	199.1	186.51	212.59	196.93
18	198.03	216.98	210.18	209.18	221.46	208.98
20	210.78	227.34	218.83	215.5	234.92	245.69

Tabella 6.3: pressioni ottenute durante le prove di perfusione in rampa di portata per il rene nativo.

In Tabella 6.4 sono invece presenti le medie delle pressioni misurate nei diversi esperimenti: la media di tutte le pressioni ottenute sia durante le perfusioni in rampa



crescente che decrescente, la media delle pressioni ottenute solo durante la perfusione in rampa crescente ed infine la media delle pressioni ottenute solo durante la perfusione in rampa decrescente.

Q [mL/min]	$\Delta P_{\text{medio}}$ [mmHg]	$\Delta P_{\text{medio}}$ [mmHg] (crescente)	$\Delta P_{\text{medio}}$ [mmHg] (decrescente)
1	61.2 ± 17.1	68.8 ± 10.1	46.0 ± 21.5
2	90.1 ± 28.4	103.7 ± 20.6	63.0 ± 23.3
4	124.2 ± 37.5	142.7 ± 28.5	87.0 ± 21.3
6	141.6 ± 34.8	158.1 ± 28.8	108.6 ± 17.2
8	147.8 ± 21.9	159.7 ± 15.1	124.0 ± 0.6
10	160.1 ± 21.8	169.6 ± 20.7	141.0 ± 2.7
12	176.6 ± 24.3	185.9 ± 25.2	157.9 ± 4.0
14	187.4 ± 16.7	191.8 ± 19.7	178.7 ± 0.8
16	197.5 ± 10.4	200.3 ± 11.4	191.7 ± 7.4
18	210.8 ± 8.0	211.7 ± 10.2	209.1 ± 0.1
20	225.5 ± 13.1	223.0 ± 10.5	230.6 ± 21.3

Tabella 6.4: media delle pressioni ottenute durante le prove di perfusione dei diversi esperimenti.

Infine, nel grafico in Figura 6.2 sono presenti gli andamenti delle pressioni medie ottenute durante le perfusioni in rampa crescente e decrescente, solo in rampa crescente e solo in rampa decrescente.

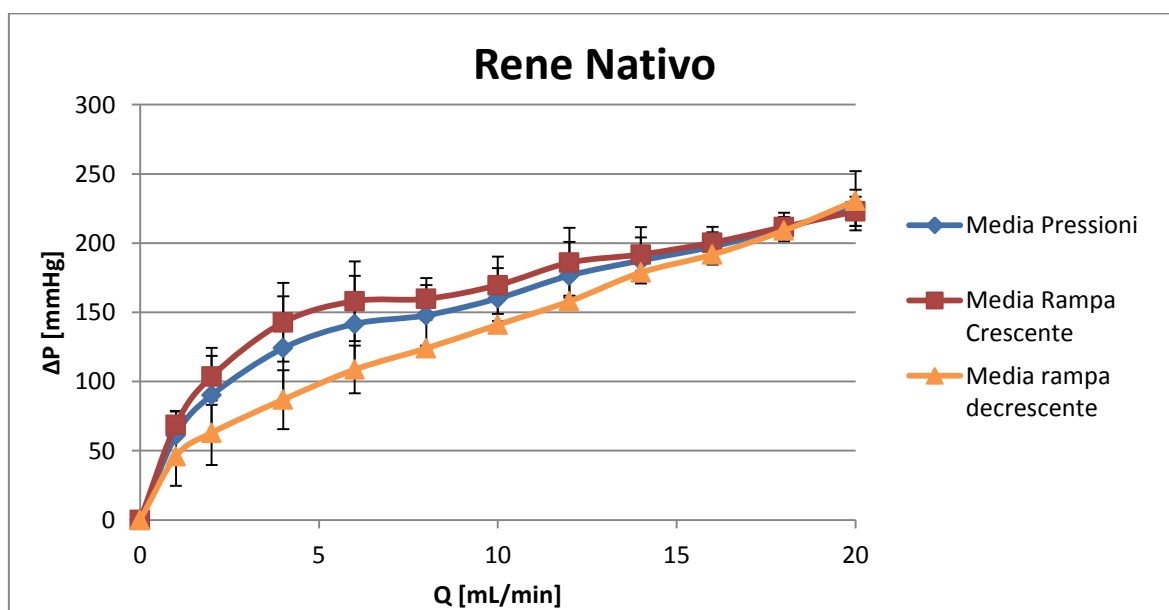


Figura 6.2: andamenti delle pressioni medie ottenute per il rene nativo.

Come precedentemente scritto, si ha un isteresi tra la curva ottenuta effettuando la perfusione in rampa crescente e quella ottenuta con la rampa decrescente, in quanto la pressione per distendere i vasi collassati (rampa crescente) è maggiore rispetto a quella che si ha alla medesima portata durante la rampa decrescente, quando i vasi si stanno “rilassando”. Si è quindi deciso che, per validare il modello di rene nativo, venissero utilizzati i valori di pressione ottenuti durante la prova di perfusione in rampa decrescente. Quindi, una volta inserite nel modello tali pressioni d’ingresso per una determinata portata e la viscosità del PBS 1X (pari a 0.001 Pa·s), esso restituisce le pressioni d’uscita ad ogni livello gerarchico fino ad arrivare alla vena, dove la pressione d’uscita deve essere pari a 0 mmHg.

Tuttavia a basse pressioni, anche durante la perfusione in rampa decrescente, il rene tende comunque a collassare e, di conseguenza, per validare il modello si è deciso di partire ad inserire come valore di pressione d’ingresso quello ottenuto perfondendo a 20 mL/min, in quanto ci si aspetta che a una portata così elevata i vasi siano ben distesi e che quindi il modello, che considera tubi dalle pareti rigide e non collassabili, predica in modo più corretto la pressione. Si è visto però che, inserendo nel modello la pressione d’ingresso ottenuta sperimentalmente a 20 mL/min, non si aveva una pressione in uscita alla vena pari a 0 mmHg. Si è quindi pensato di modificare il modello geometrico di modo da aumentare le perdite di carico e avere in uscita una pressione pari a 0 mmHg: è infatti ragionevole pensare che i valori ottenuti da Nordsletten possano essere modificati vista l’elevata deviazione standard. Si è visto che, per avere una pressione nulla a livello della vena, la media dei raggi dei diversi livelli gerarchici doveva essere moltiplicata per un fattore pari a 0.875. In Tabella 6.5 e 6.6 sono presenti i raggi del modello geometrico di Nordsletten inizialmente proposto e quelli modificati e inseriti nel nostro modello, rispettivamente per il ramo arterioso e venoso.

<b>Ordine</b>	<b>Raggio Nordsletten [<math>\mu\text{m}</math>]</b>	<b>Raggio modificato [<math>\mu\text{m}</math>]</b>
<b>0</b>	216.1 $\pm$ 4.74	189.09
<b>1</b>	191.42 $\pm$ 17.79	167.49
<b>2</b>	139.83 $\pm$ 20.11	122.35
<b>3</b>	86.15 $\pm$ 24.06	75.38
<b>4</b>	53.87 $\pm$ 12.51	47.14
<b>5</b>	44.23 $\pm$ 9.81	38.70
<b>6</b>	39.29 $\pm$ 1.08	34.38
<b>7</b>	29.87 $\pm$ 0.35	26.14
<b>8</b>	20.06 $\pm$ 6.90	17.55
<b>9</b>	13.9 $\pm$ 3.80	12.16
<b>10</b>	10.08 $\pm$ 0.14	8.82
<b>11</b>	5	4.38

**Tabella 6.5:** confronto tra i raggi dei vasi del ramo arterioso ricavati da Nordsletten e modificati per il nostro modello.

<b>Ordine</b>	<b>Raggio Nordsletten [<math>\mu\text{m}</math>]</b>	<b>Raggio modificato [<math>\mu\text{m}</math>]</b>
<b>12</b>	6.08	5.32
<b>11</b>	10.79 $\pm$ 2.41	9.44
<b>10</b>	14.72 $\pm$ 4.05	12.88
<b>9</b>	26.16 $\pm$ 1.57	22.89
<b>8</b>	40.13 $\pm$ 8.51	35.11
<b>7</b>	50.3 $\pm$ 12.12	44.01
<b>6</b>	69.22 $\pm$ 21.18	60.57
<b>5</b>	114.07 $\pm$ 29.59	99.81
<b>4</b>	177.04 $\pm$ 39.04	154.91
<b>3</b>	285.63 $\pm$ 52.86	249.93
<b>2</b>	428.05 $\pm$ 80.95	374.54
<b>1</b>	603.77 $\pm$ 94.52	528.30

**Tabella 6.6:** confronto tra i raggi dei vasi del ramo venoso ricavati da Nordsletten e modificati per il nostro modello.

Stabilita la geometria definitiva, sono state inserite nel modello anche le altre portate di perfusione e, per ciascuna di esse, sono state determinate le pressioni iniziali necessarie per avere 0 mmHg in uscita dalla vena. Il grafico in Figura 5.3 mostra quindi, per una determinata portata di perfusione, i valori di pressione predetti dal modello messi a confronto le pressioni medie ottenute sperimentalmente durante le prove di perfusione

in rampa decrescente e con le pressioni medie ottenute da Uzarski e coautori per il rene nativo.

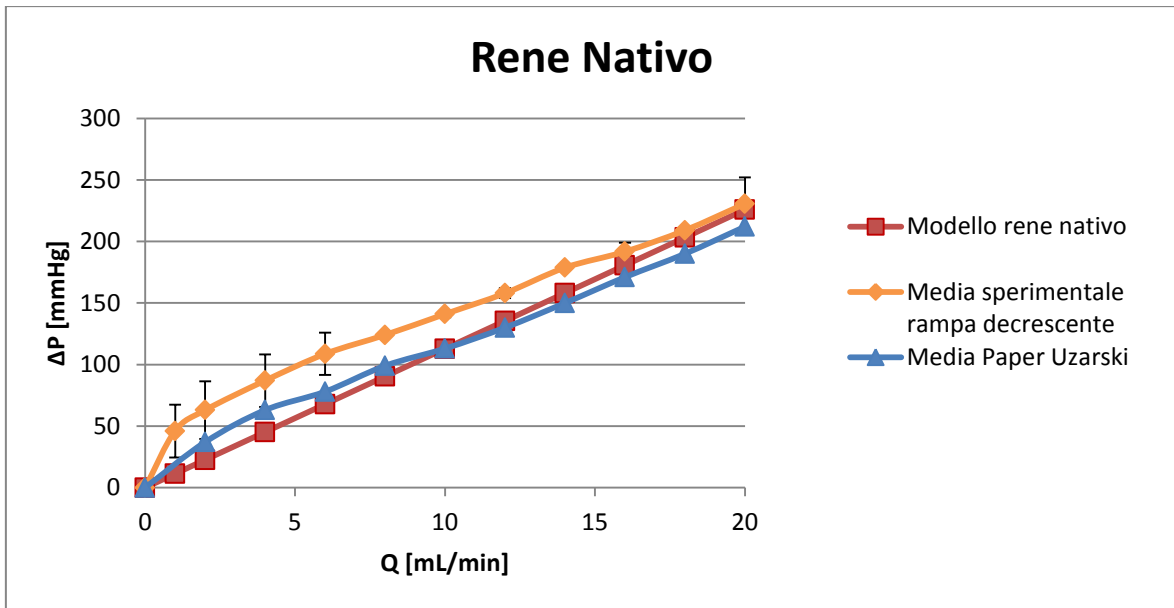


Figura 6.3: pressioni predette dal modello, pressioni medie ottenute sperimentalmente tramite le prove di perfusione e ottenute sperimentalmente da Uzarski *et al.*.

Infine, in Figura 6.4 è presente il grafico delle velocità del fluido in uscita a un vaso di un determinato livello gerarchico predette dal modello per il rene nativo, perfondendo a portate pari a 1, 10 e 20 mL/min. In Figura 6.5 è presente un dettaglio della Figura 6.4.

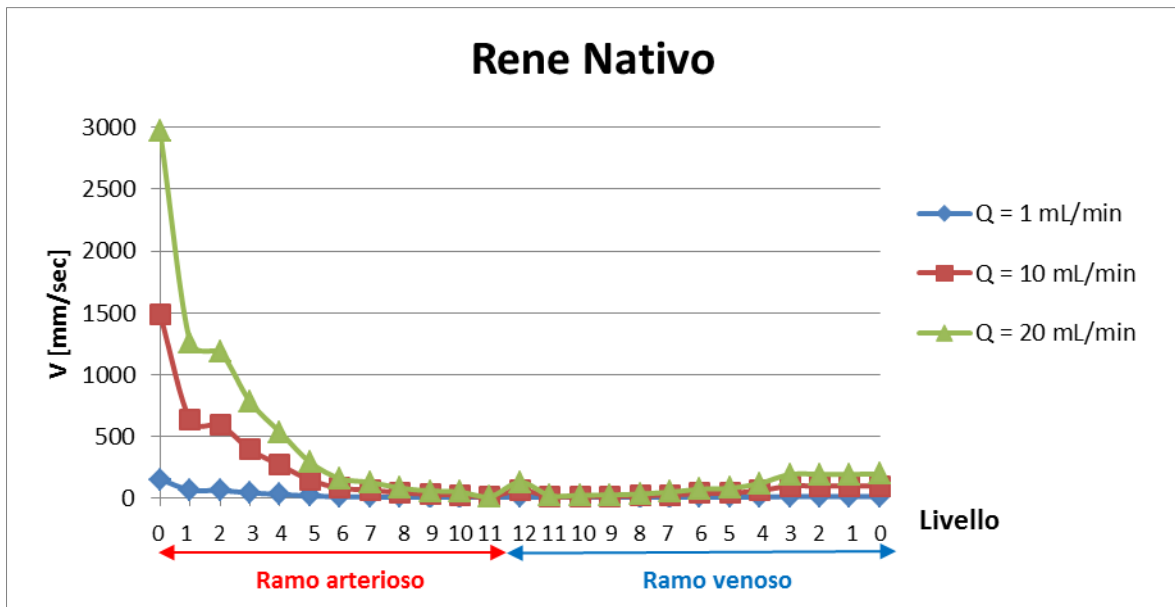


Figura 6.4: velocità del fluido in uscita a un vaso di un determinato livello gerarchico predette dal modello del rene nativo perfondendo a 1, 10 e 20 mL/min.

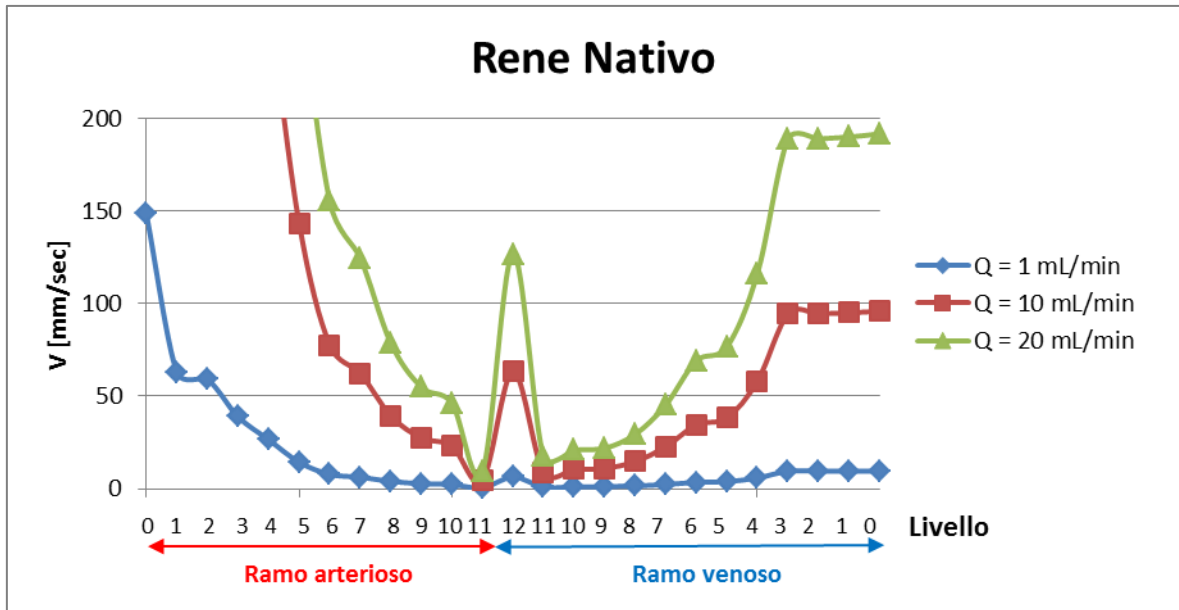


Figura 6.5: dettaglio del grafico in Figura 6.4.

## 6.2. Modello analitico per *scaffold* con pareti dei vasi permeabili

Come detto e dimostrato nel precedente capitolo, le pareti dei vasi di un rene decellularizzato sono permeabili e, di conseguenza, la portata all'interno di un vaso di un determinato livello gerarchico non è costante, ma diminuisce progressivamente. Il modello sopra descritto, tuttavia, non considera la permeabilità delle pareti e, di conseguenza, per descrivere ciò che avviene in un rene decellularizzato è stato implementato il modello analitico descritto da Gorji e coautori (39).

Si consideri un flusso laminare attraverso un tubo permeabile di raggio R e lunghezza L (Figura 6.4).

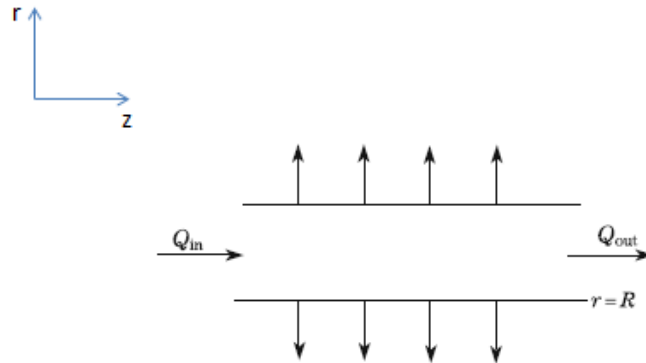


Figura 6.6: tubo laminare dalle pareti permeabili.

Date le assunzioni sopra citate, avremo:

$$(1) \quad V = [V_r(r, z), 0, V_z(r, z)]$$

$$(2) \quad p = p(r, z).$$

Si considerino quindi l'equazione di Navier-Stokes (3) e l'equazione di continuità (4) lungo la direzione z del tubo.

$$(3) \quad -\frac{\partial p}{\partial z} + \mu \left( \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left( r \frac{\partial V_z}{\partial r} \right) + \frac{\partial^2 V_z}{\partial z^2} \right) = 0$$

$$(4) \quad \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} (r V_r) + \frac{\partial V_z}{\partial z} = 0$$

Man mano che il fluido scorre lungo il tubo la pressione diminuisce e, di conseguenza, anche la quantità di liquido che permea dalle pareti. È quindi necessario definire un parametro di trasferimento di massa, che è dimensionalmente uguale alla componente radiale della velocità:

$$(5) \quad j(z) = k(p(z) - p_0),$$

dove  $j(z)$  è il trasferimento di massa,  $p(z)$  è la pressione all'interno del tubo,  $p_0$  è la pressione atmosferica e  $k$  è il coefficiente di permeabilità. Considerando che le perdite di liquido avvengono in corrispondenza del raggio del tubo, il vettore della velocità radiale sulle pareti del tubo sarà pari a:

$$(6) \quad j(z) = V_r(r, z) = V_r(z)$$

Considerando il profilo di velocità di Hagen-Poiseuille, avremo:

$$(7) \quad V_z = 2U_0 \left(1 - \left(\frac{r}{R}\right)^2\right) f(z),$$

dove  $U_0$  è la velocità media d'ingresso al tubo ed è pari a  $U_0 = \frac{Q_{in}}{\pi R^2}$ , e  $f(z)$  è una funzione da determinare. Utilizzando l'equazione di continuità (4) possiamo ricavare la seguente relazione tra  $V_r$  e  $V_z$ :

$$(8) \quad V_r = -\frac{1}{r} \int_0^r r \frac{\partial V_z}{\partial z} dr.$$

Differenziando l'equazione (7) rispetto a  $z$ , sostituendola nell'equazione (8) e integrando l'equazione ottenuta rispetto a  $r$ , avremo:

$$(9) \quad V_r = -RU_0 f'(z) \left( \left(\frac{r}{R}\right)^2 - \frac{1}{2} \left(\frac{r}{R}\right)^4 \right),$$

con  $f'(z) = \partial f / \partial z$ .

In corrispondenza della superficie del tubo abbiamo  $r = R$  e quindi:

$$(10) \quad V_r(R, z) \equiv V_R(z) = -\frac{RU_0}{2} f'(z).$$

Ora, considerando l'equazione di Navier-Stokes (3) nella direzione dell'asse del tubo, avremo:

$$(11) \quad \frac{\partial p}{\partial z} = \mu \left( -\frac{8U_0}{R^2} f(z) + 2U_0 \left(1 - \left(\frac{r}{R}\right)^2\right) f''(z) \right).$$

Considerando le equazioni (5), (6) e (10) otteniamo:

$$(12) \quad \frac{\partial p}{\partial z} = \frac{1}{k} \frac{dV_R}{dz} = -\frac{RU_0}{2k} f''(z).$$

Sostituendo la (12) nella (11) avremo:

$$(13) \quad f''(z) = \frac{16k\mu}{R^3} f(z) - \frac{4k\mu}{R} \left(1 - \left(\frac{r}{R}\right)^2\right) f''(z).$$

L'equazione (13) presenta un termine  $r$ , ciò significa che la funzione  $f$  dipende sia da  $r$  che da  $z$ . Ciò è quindi in disaccordo con l'assunzione che  $f$  dipende solo da  $z$ . Per ottenere tale assunzione è stato quindi omesso l'ultimo termine dell'equazione (13), in quanto è trascurabile rispetto al resto. L'equazione (13) diventa quindi:

$$(14) \quad f''(z) - \frac{16k\mu}{R^3}f(z) = 0.$$

La (14) è un'equazione lineare di secondo ordine che necessita di condizioni al contorno per essere risolta. Considerando le assunzioni applicate nella (7) e nella (8), legate a un flusso completamente sviluppato, abbiamo:

$$z = 0 \Rightarrow f(z) = 0$$

$$z \rightarrow \infty \Rightarrow f(z) = \text{cost}$$

E quindi:

$$(15) \quad f(z) = \exp\left(-4\beta \frac{z}{R}\right),$$

dove  $\beta = \left(\frac{k\mu}{R}\right)^{0.5}$ , con  $\beta$  adimensionale.

Dalle equazioni (12) e (14) si determina la pressione assoluta  $p(z)$ :

$$(16) \quad \frac{\partial p}{\partial z} = -\frac{8\mu U_0}{R^2}f(z) = -\frac{8\mu U_0}{R^2}\exp\left(-4\beta \frac{z}{R}\right).$$

In  $z = 0$  la pressione è pari alla pressione d'ingresso al vaso  $p_{in}$ , che sarà determinata sperimentalmente. Quindi, integrando la (16), avremo:

$$(17) \quad p(z) = p_{in} + \frac{2\mu U_0}{\beta R}\left(\exp\left(-4\beta \frac{z}{R}\right) - 1\right).$$

La portata di liquido che permea dalla superficie laterale sarà invece data dalla seguente equazione:

$$(18) \quad Q_r = \int_0^z 2\pi R j(z) dz.$$



Assumendo la pressione atmosferica  $p_0$  pari a zero, la (5) diventa:

$$(19) \quad j(z) = k p(z)$$

Inserendo quindi l'espressione (17) di  $p(z)$  nella (19), la (19) nella (18) e integrando in  $z$  la (18), avremo:

$$(20) \quad Q_r(z = L) = 2\pi Rk \left\{ p_{in}L - \frac{\mu U_0}{2\beta^2} \left[ \exp\left(-4\beta \frac{L}{R}\right) - 1 \right] - \frac{2\mu U_0}{\beta R} L \right\}.$$

La portata d'ingresso a un vaso di un determinato livello gerarchico  $i$  sarà data dalla seguente espressione:

$$(21) \quad Q_{in,i} = \frac{Q_{out,i-1}}{R_i/R_{i-1}}.$$

La portata d'uscita di un vaso del livello gerarchico  $i$  sarà quindi data da:

$$(22) \quad Q_{out,i} = Q_{in,i} - Q_{r,i}(z = L).$$

Infine, la velocità del fluido in uscita dal vaso del livello gerarchico  $i$  sarà data da:

$$(23) \quad V_{out,i} = \frac{Q_{out,i}}{\pi R_i^2}.$$

### **6.2.1. Risultati ottenuti dalle prove di perfusione in rampa di portata con reni decellularizzati e validazione del modello analitico**

Il modello sopra descritto è in grado di calcolare le portate, le pressioni, le velocità d'uscita a ogni livello gerarchico e la portata di liquido permeato dalle pareti dei vasi, dati i seguenti parametri in ingresso:

- la portata di perfusione,
- la pressione d'ingresso al rene,
- la geometria dello scaffold,
- la viscosità del fluido perfuso nello scaffold,

- il coefficiente di permeabilità  $k$ .

Le pressioni d'ingresso al rene per una determinata portata sono state determinate sperimentalmente attraverso le prove di perfusione in rampa di portata descritte nel paragrafo 6.1.1, utilizzando però reni decellularizzati. I risultati ottenuti durante gli esperimenti sono riportati in Tabella 6.7, dove, nell'ultima colonna, sono presenti le medie delle pressioni dei diversi esperimenti per una determinata portata che sono state inserite nel modello.

Q [mL/min]	$\Delta P$ [mmHg] Exp 199	$\Delta P$ [mmHg] Exp 213 (crescente)	$\Delta P$ [mmHg] Exp 213 (decescente)	$\Delta P_{\text{medio}}$ [mmHg]
1	55.11	28.02	22.39	35.17 ± 17.49
2	78.41	40.61	30.89	49.97 ± 25.10
4	92.29	57.85	46.93	65.69 ± 23.67
6	96.11	68.51	54.4	73.01 ± 21.22
8	89.59	77.15	60.31	75.68 ± 14.69
10	93.3	87.27	65.76	89.86 ± 25.5
12	95.64	98.16	72.88	88.89 ± 13.93
14	115.99	104.9	77.59	99.49 ± 19.76
16	135.16	107.89	88.48	110.51 ± 23.45
18	163.83	110.2	102.82	125.62 ± 33.30
20	178.8	124.39	138.32	147.17 ± 28.26

**Tabella 6.7: pressioni ottenute durante gli esperimenti in rampa di portata con reni decellularizzati e relativa media.**

La geometria utilizzata è quella proposta da Nordsletten per il rene nativo, che verrà poi eventualmente modificata di modo che i risultati sperimentali siano confrontabili con quelli predetti dal modello.

Per quanto riguarda la viscosità del liquido, poiché durante le prove di perfusione in rampa di portata è stato perfuso PBS 1X, si è deciso di inserire nel modello la stessa viscosità dell'acqua, pari a 0.001 Pa·s.

Infine, la permeabilità delle pareti è stata calcolata con la seguente formula:

$$(24) \quad k = \frac{k_d}{\mu s}$$

dove  $k_d$  è la permeabilità di Darcy e  $s$  è lo spessore del mezzo poroso. Poiché anche in letteratura non si trovano dati relativi la permeabilità dei diversi vasi del rene decellularizzato, ma solo quelli della membrana basale glomerulare (*glomerular basal membrane*, GBM), si è deciso di considerare  $k_d$  e  $s$  della GBM per calcolare una permeabilità di riferimento da inserire nel modello. Lo spessore della GBM è pari a circa 200 nm (40), mentre  $k_d$  è compreso tra 1.2 e 2.7 nm<sup>2</sup> (40, 41). La permeabilità di riferimento è dunque compresa tra 0.008 e 0.018  $\frac{\mu m}{Pa \cdot s}$  se il rene viene perfuso con PBS 1X ( $\mu = 0.001$  Pa·s), mentre è compresa tra 0.006 e 0.014  $\frac{\mu m}{Pa \cdot s}$  se il rene viene perfuso con medium ( $\mu = 0.00073$  Pa·s). Nel modello è stato quindi inserito un coefficiente di permeabilità di riferimento pari a 0.008  $\frac{\mu m}{Pa \cdot s}$ , che verrà poi eventualmente modificato per fare in modo che il modello dia risultati confrontabili a quelli ottenuti sperimentalmente.

Per validare il modello di rene decellularizzato sono stati svolti i seguenti passaggi:

- è stata inserita come pressione d'ingresso la media delle pressioni ottenute perfondendo a 20 mL/min, come precedentemente fatto per il nativo.
- Nota la geometria, la portata di perfusione, la pressione d'ingresso, il coefficiente di permeabilità e la viscosità, il modello analitico ha calcolato le pressioni, le portate d'uscita e la portata di fluido permeato riferite ad un vaso, per ogni livello gerarchico.
- In uscita dalla vena, tuttavia, si è visto che la pressione non era pari a 0 mmHg, come invece dovrebbe essere in quanto pari alla pressione atmosferica.
- È stata quindi modificata la geometria di modo da avere in uscita dalla vena una pressione nulla. Si è visto che moltiplicando i raggi del modello geometrico proposto da Nordsletten per un fattore pari a 0.894 si aveva una pressione nulla in uscita. Tale geometria risulta essere coerente con quella utilizzata nel modello di rene nativo, dove i raggi erano stati moltiplicati per un fattore pari a 0.875. Quest'ultimi risultano infatti essere più piccoli rispetto a quelli utilizzati per il rene decellularizzato, coerentemente col fatto che, a seguito del processo di decellularizzazione, si ha un aumento del raggio in quanto la componente cellulare viene eliminata.

- Si è però osservato che la portata in uscita dalla vena non era confrontabile con quella ottenuta sperimentalmente durante le prove di perfusione con medium e con la sospensione cellulare descritte rispettivamente nei paragrafi 5.1.1. e 5.1.2. Durante tali prove era stata infatti determinata la media delle portate d’uscita alla vena ottenute nei diversi esperimenti, sia per le perfusioni di solo medium, che per le perfusioni con la sospensione cellulare. Esse sono riportate in Tabella 6.8.

$Q_{\text{perfusione}}$ [mL/min]	$Q_{\text{vena,medium}}$ [mL/min]	$Q_{\text{vena, medium+ cellule}}$ [mL/min]
1	$0.22 \pm 0.11$	$0.25 \pm 0.18$

Tabella 6.8: media delle portate d’uscita alla vena perfondendo il rene a 1 mL/min, sia con solo medium che con la sospensione cellulare.

- Poichè tali prove erano state effettuate perfondendo a 1 mL/min, è stata inserita nel modello tale portata ed è stata modificata “manualmente” la pressione d’ingresso al rene di modo che per quella portata la pressione in uscita fosse nuovamente pari a 0 mmHg.
- Si è visto però che la portata d’uscita alla vena non era confrontabile con quelle ottenute sperimentalmente.
- È stata quindi utilizzata la funzione “*Solver*” di Excel per impostare pari a 0.2 mL/min la portata in uscita alla vena, facendo variare il valore della permeabilità  $k$ , inizialmente imposto pari a  $0.008 \frac{\mu\text{m}}{\text{Pa}\cdot\text{s}}$ . Utilizzando tale funzione, la permeabilità è stata variata in  $0.0088 \frac{\mu\text{m}}{\text{Pa}\cdot\text{s}}$ .
- Modificati quindi la geometria e il coefficiente di permeabilità di modo che i risultati predetti dal modello fossero confrontabili con quelli ottenuti sperimentalmente, è stata effettuata un’ultima prova per verificare che il modello fosse effettivamente in grado di prevedere le giuste portate d’uscita dalla vena. Durante le prove di perfusione con la sospensione cellulare si era infatti perfuso anche a 0.4 mL/min ed era stata calcolata la media delle portate d’uscita alla vena ottenute nei vari esperimenti. Essa risultava essere pari a  $0.097 \pm 0.066$  mL/min. Inserendo la portata pari a 0.4 mL/min nel modello e modificando la pressione d’ingresso di modo che fosse uguale a zero a livello della vena, la portata in uscita

risultava essere pari a 0.08 mL/min, valore confrontabile con quello ottenuto sperimentalmente.

Validato il modello, è stato ottenuto il grafico che mette a confronto le pressioni in funzione delle portate determinate sperimentalmente tramite la prova di perfusione in rampa di portata, ottenute sperimentalmente da Uzarski e il suo gruppo di ricerca e predette dal modello appena descritto (Figura 6.5).

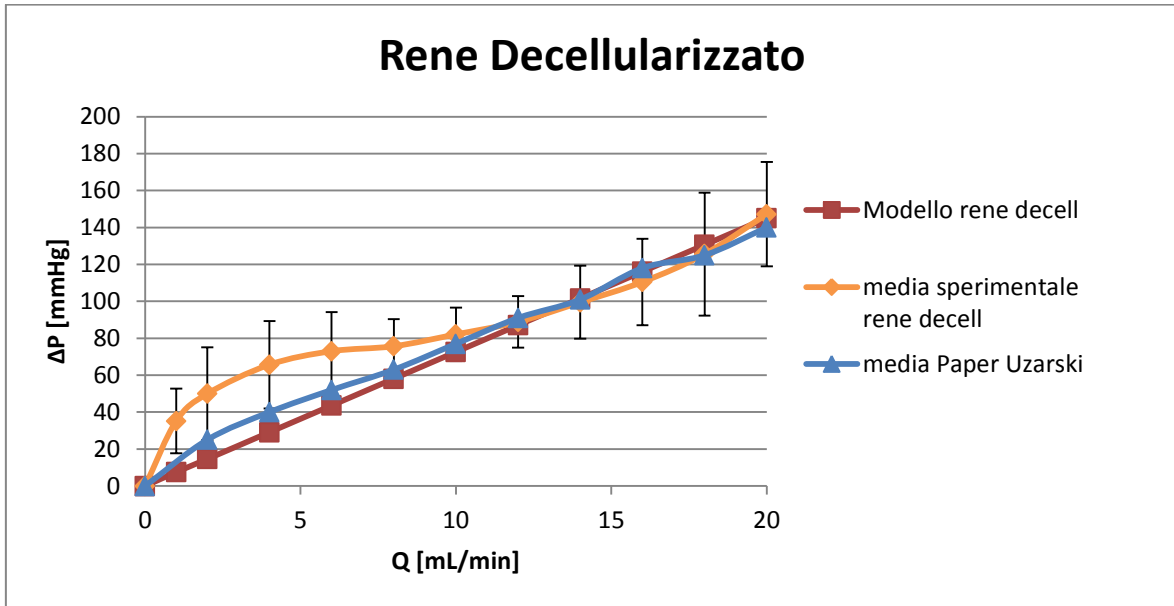


Figura 6.7: confronto delle pressioni in funzione delle portate per il rene decellularizzato ottenute col modello, con le prove sperimentali e da Uzarski et al..

Infine, in Figura 6.8 è presente il grafico delle velocità del fluido in uscita a un vaso di un determinato livello gerarchico predette dal modello per il rene decellularizzato, perfondendo il rene a portate pari a 1, 10 e 20 mL/min. In Figura 6.9 è presente un dettaglio della Figura 6.8.

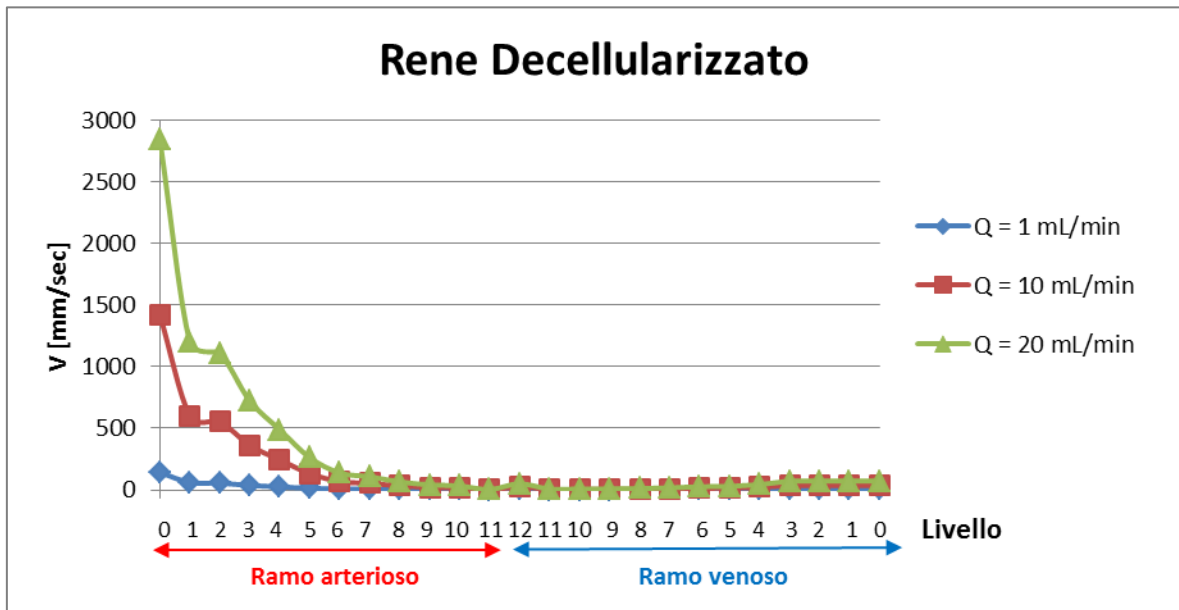


Figura 6.8: velocità del fluido in uscita a un vaso di un determinato livello gerarchico predette dal modello del rene decellularizzato perfondendo a 1, 10 e 20 mL/min.

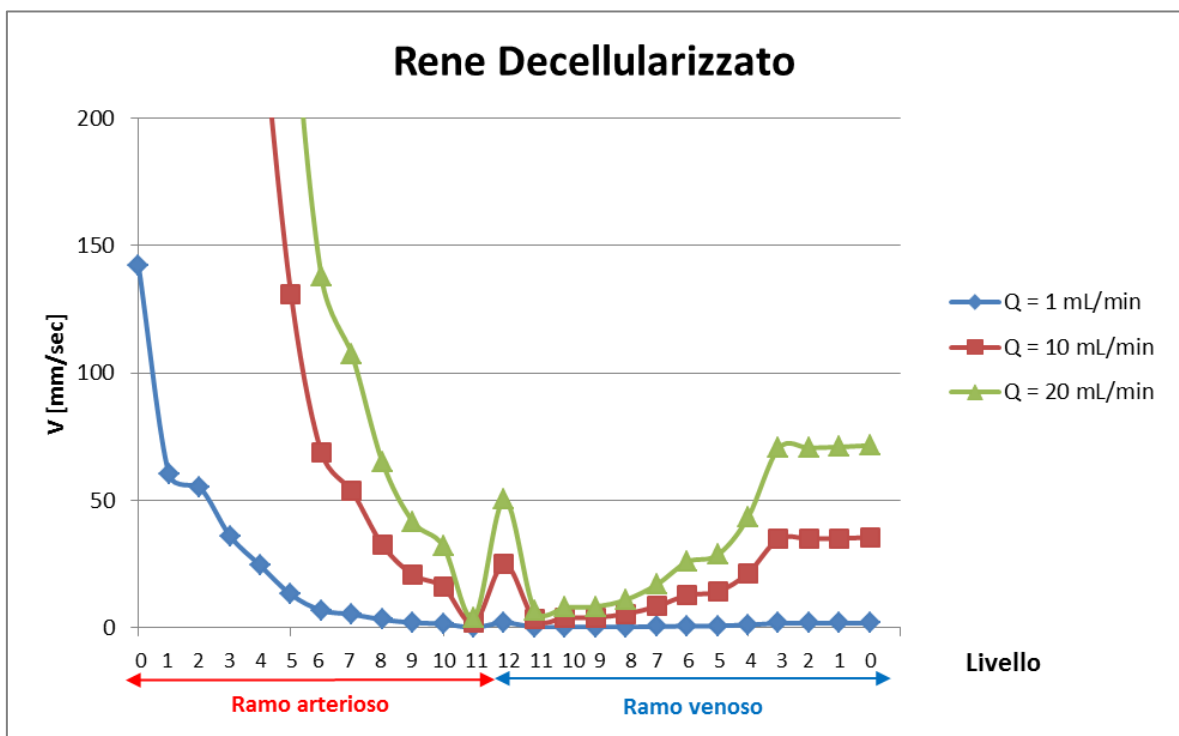


Figura 6.9: dettaglio del grafico in Figura 6.8.

Infine, in Tabella 6.9, sono presenti le pressioni d'ingresso e le portate di fluido in uscita dalla vena predette dal modello per una specifica portata di perfusione.

<b>Q<sub>perfusione</sub> [mL/min]</b>	<b>P<sub>in</sub> [mmHg]</b>	<b>Q<sub>out, vena</sub> [mL/min]</b>
<b>1</b>	7.5	0.2
<b>2</b>	14.6	0.71
<b>4</b>	29.1	1.50
<b>6</b>	43.6	2.28
<b>8</b>	58.1	3.07
<b>10</b>	72.6	3.86
<b>12</b>	87.1	4.65
<b>14</b>	101.6	5.43
<b>16</b>	116.1	6.22
<b>18</b>	130.6	7.01
<b>20</b>	145.1	7.80

**Tabella 6.9: pressioni d'ingresso e portate di fluido in uscita dalla vena predette dal modello per una specifica portata di perfusione.**

### **6.3. Discussione**

Sono stati ottenuti un modello di rene nativo e uno di rene decellularizzato in grado di prevedere ciò che avviene nel rene quando viene perfuso con del liquido. In particolare, il modello di rene nativo, data la portata di perfusione e la pressione d'ingresso all'arteria, è in grado di prevedere, per ogni livello gerarchico, la velocità del fluido e la pressione in uscita a un vaso. Per quanto riguarda invece il modello analitico di rene decellularizzato, esso considera la permeabilità delle pareti dei vasi e, data la portata di perfusione e la pressione d'ingresso, è in grado di prevedere, per ogni livello gerarchico, sia la velocità del fluido e la pressione in uscita a un vaso, ma anche la portata di liquido permeato dalle pareti del vaso. Sarà quindi in grado di fornire la portata in uscita dalla vena e, di conseguenza, quella del fluido totale permeato dai tessuti renali.

Entrambi i modelli, tuttavia, considerano i vasi come dei tubi dalle pareti rigide e, di conseguenza, osservando i grafici  $\Delta P-Q$  sia del rene nativo che del rene decellularizzato, rispettivamente in Figura 6.3 e 6.5, si nota come l'andamento della curva ottenuta col modello sia lineare, mentre quelle ottenute sperimentalmente presentano un andamento parabolico con concavità rivolta verso il basso. Questo perché, come precedentemente descritto, quando il rene non è perfuso i vasi tendono a collassare e, di conseguenza, per basse portate di perfusione si ha una pressione alta rispetto a quella che si ha successivamente, quando i vasi sono ben distesi poiché perfusi a portate sufficientemente elevate. Si noti inoltre come questo andamento parabolico si riscontri sia con le pressioni ottenute sperimentalmente tramite le prove di perfusione in rampa di portata, sia con le pressioni ottenute sperimentalmente da Uzarski e il suo gruppo di ricerca.

Concluendo, si può affermare che entrambi i modelli descrivono bene l'andamento della pressione per portate di perfusione elevate, mentre a basse pressioni non sono in grado di simulare l'andamento parabolico che si ha sperimentalmente dovuto al fatto che i vasi del rene sono collassabili. In particolare, per quanto riguarda il rene nativo, il modello descrive bene l'andamento a partire dalla portata di perfusione di 6 mL/min, mentre per il rene decellularizzato a partire da 10 mL/min. Questo perché le pareti dei vasi del rene decellularizzato, non avendo più la componente cellulare, collassano più facilmente e, di conseguenza, ci vogliono portate più elevate rispetto al nativo per permettere ai vasi di distendersi e avere quindi un comportamento più simile a quello di un tubo rigido.



## 7. Conclusioni e sviluppi futuri

---

*In questo capitolo vengono riportate le conclusioni che derivano dal presente lavoro di tesi. In ultimo vengono indicati i possibili sviluppi futuri per il miglioramento dei sistemi progettati e per la programmazione delle prossime attività sperimentali.*

### 7.1. Conclusioni

L'insufficienza renale cronica è una perdita progressiva e irreversibile di un grande numero di nefroni che causa circa 740.000 morti l'anno e interessa dall'8 al 16% della popolazione globale adulta (6). Questa condizione, negli stadi più avanzati della malattia, determina per il paziente la necessità di ricorrere a una terapia sostitutiva della funzione renale: attualmente quelle utilizzate sono l'emodialisi e il trapianto, che presentano però dei limiti importanti. Nel primo caso, infatti, si è in grado di ristabilire la funzione filtrante ma non quella omeostatica ed endocrina. Inoltre, la qualità di vita del paziente risulta notevolmente compromessa, in quanto deve recarsi in ospedale tre volte a settimana per sottoporsi a una terapia della durata di circa 4 ore. Anche l'attività lavorativa risulta compromessa e, di conseguenza, l'emodialisi comporta elevati costi sia sociali che economici. Il trapianto è sicuramente una soluzione migliore per quanto riguarda la qualità di vita del paziente, poiché vengono ristabilite tutte le funzioni renali. Tuttavia, il numero di organi a disposizione è decisamente inferiore rispetto alla richiesta e, oltre a ciò, bisogna considerare il fatto che il paziente trapiantato necessita di una terapia immunosoppressiva a vita per prevenire il rigetto dell'organo.

Per ovviare ai problemi connessi all'emodialisi e al trapianto, a partire dal 2009 è stata intrapresa una nuova strada nell'ambito dell'ingegneria dei tessuti (il primo lavoro è stato pubblicato da Ross *et al.* (23)). In sintesi, l'obiettivo è quello di prelevare il rene malato dal paziente stesso, decellularizzarlo eliminando quindi le cellule malate e seminare sulla struttura ottenuta delle cellule staminali pluripotenti che, in linea teorica, dovrebbero distribuirsi in modo omogeneo all'interno della struttura e differenziarsi in tutti i fenotipi

cellulari presenti nel rene. In questo modo verrebbero risolti tutti i problemi connessi all'emo-dialisi e al trapianto: la scarsità di organi a disposizione, la necessità di una terapia immunosoppressiva a vita e la mancanza del ripristino di tutte le funzioni renali. Mentre con organi semplici e cavi come la vescica, i vasi sanguigni, l'uretere e i segmenti superiori delle vie aeree si è riusciti a ricreare un organo in laboratorio (36, 42, 43), con organi complessi quali il rene si è ancora lontani da riuscire ad ottenere uno *scaffold* effettivamente impiantabile. Sia dagli studi presenti in letteratura, che dai risultati ottenuti presso il laboratorio di ingegneria dei tessuti dell'istituto Mario Negri, si è infatti visto che a seguito del processo di ricellularizzazione la struttura risulta scarsamente ripopolata e non in modo omogeneo, in quanto la maggior parte delle cellule vengono ritrovate nel compartimento vascolare ma non in quello tubulare. Negli ultimi anni sono quindi state studiate diverse soluzioni per risolvere il problema, come, ad esempio, applicare una pressione negativa nella camera in cui viene alloggiato il rene durante la ricellularizzazione per facilitare il ripopolamento del compartimento tubulare (17, 18). Altra soluzione è quella adottata da Caralt *et al.*, i quali, dopo l'infusione, perfondono lo *scaffold* a pressioni elevate di modo da permettere alle cellule di raggiungere il parenchima o lo spazio peritubulare (25). Nonostante tali soluzioni abbiano permesso di ottenere un ripopolamento più omogeneo, si è ancora ben lontani dal riuscire ad ottenere una struttura funzionale e molti sono ancora gli studi da effettuare. Ecco perché, arrivati a questo punto della ricerca, risultano necessari uno studio approfondito e sistematico dei parametri che influenzano la distribuzione cellulare durante la perfusione, e la progettazione e lo sviluppo di un bioreattore funzionale e flessibile, che permetta agli operatori di ottimizzare e automatizzare il più possibile i protocolli di decellularizzazione e ricellularizzazione e di stimolare fisicamente lo *scaffold*, di modo da simulare la condizione fisiologica e indurre un differenziamento cellulare.

Nel presente lavoro di tesi è stato quindi progettato un sistema in grado di regolare in modo automatico i giri della pompa del circuito in base alla pressione misurata: essi vengono aumentati se la pressione è bassa, di modo da far scorrere il fluido più velocemente e accorciare i tempi di decellularizzazione, e abbassati nel caso in cui diventi troppo alta, per evitare che la struttura dello *scaffold* venga compromessa. In questo

modo si è riusciti ad ottenere un controllo preciso ed automatico della pressione, che è uno dei parametri che influenza maggiormente la distribuzione cellulare, svincolando l'operatore da tale incombenza e permettendo il controllo anche *overnight*.

Durante tale lavoro di tesi è stato inoltre ideato un metodo per ottenere un flusso pulsatile durante la fase di ricellularizzazione, in quanto con il circuito già presente in laboratorio era possibile avere solo una perfusione in continuo. Si è infatti pensato che, per ottenere un'ottimale distribuzione cellulare ed eventualmente per facilitare il differenziamento cellulare, fosse meglio ricreare le condizioni il più simili possibili a quelle presenti *in vivo*. Tale sistema è quindi in grado di generare la pulsazione presente nel ratto, compresa tra 80 e 120 mmHg e con una frequenza pari a sei "battiti" al secondo.

Parallelamente alle operazioni di modifica del circuito sono state effettuate delle prove sperimentali per valutare se le pareti dei vasi del rene, una volta decellularizzato, fossero permeabili. È stato infatti ipotizzato che i vasi, perdendo la componente cellulare, non fossero più impermeabili e che ciò causasse una perdita di liquido dalla struttura durante il processo di ricellularizzazione e, di conseguenza, una distribuzione cellulare non ottimale. Tramite tali prove sperimentali è stato quantificato il volume di liquido uscente dalla vena durante la perfusione e si è visto che esso non era pari al volume infuso, a conferma dell'ipotesi di permeabilità delle pareti dei vasi. Durante tali prove si è inoltre osservato che non tutte le cellule infuse rimangono all'interno della struttura, in quanto il 10.6% riesce ad uscire dall'organo. Tali cellule, non solo fuoriescono dalla vena, ma sono state trovate anche nel medium permeato dalle pareti dei vasi: ciò significa che probabilmente durante il processo di decellularizzazione si creano delle microfratture della struttura che permettono alle cellule di uscire dalle pareti del rene.

Una volta verificata la permeabilità dei vasi dello *scaffold*, è stato ottenuto un modello di rene decellularizzato che tenesse conto del fatto che parte del liquido infuso permea dalla struttura. Per fare ciò è stato prima implementato un modello di rene nativo che, data la portata di perfusione e la pressione d'ingresso all'arteria, è in grado di prevedere, per ogni livello gerarchico in cui sono stati divisi l'albero arterioso e venoso del rene, la velocità del fluido e la pressione in uscita a un vaso. Validato il modello di rene nativo, è stato ottenuto il modello analitico di rene decellularizzato. Esso a differenza del primo,

considerando la permeabilità dello *scaffold*, è in grado di prevedere anche la portata di liquido permeato dalle pareti del vaso per ogni livello gerarchico. È quindi in grado di fornire la portata in uscita dalla vena e, di conseguenza, quella del fluido totale permeato dalle pareti dei vasi. Tale strumento può essere utile in quanto è in grado di predire come variano i parametri che influenzano la distribuzione cellulare al variare di pressione e portata d'ingresso.

## 7.2. Sviluppi futuri

Nonostante le modifiche apportate al circuito, rimangono ancora degli aspetti che potrebbero essere migliorati. In primo luogo, sebbene il controllo della portata in funzione della pressione sia stato automatizzato, rimangono altre variabili che devono essere regolate manualmente, quali la temperatura all'interno del bioreattore e la depressurizzazione della camera durante l'infusione dall'uretere, ed operazioni che devono essere svolte dall'operatore, come alcune procedure di coltura, quali il riempimento e lo svuotamento del circuito durante i passaggi tra le varie fasi degli esperimenti. Sarebbe quindi utile apportare ulteriori modifiche al circuito di modo da automatizzare il loro controllo. Ciò, oltre a semplificare l'attività del personale di laboratorio, consentirebbe una maggiore ripetibilità degli esperimenti e un più agevole confronto dei risultati ottenuti.

Per quanto riguarda l'ottenimento del flusso pulsatile, è stata ideata una soluzione che non ha richiesto nessun costo economico in quanto utilizza le apparecchiature già presenti in laboratorio. Come descritto nel Capitolo 4, la soluzione ideata è la seguente:

- La *pompa di perfusione* lavora sempre in modalità completamente occlusiva e il numero di giri viene aumentato o diminuito di modo da avere una pressione basale di circa 100 mmHg a valle della *compliance*;
- la *pompa pulsante*, il cui numero di giri viene mantenuto fisso di modo da garantire la frequenza di pulsazioni desiderata, lavora in modalità non

completamente occlusiva; in particolare, aumentando o diminuendo l'occlusività, aumenterà o diminuirà il *gap* tra la pressione minima e la pressione massima.

Si noti però che, attualmente, mentre il numero di giri della *pompa di perfusione* può essere controllato in modo automatico dal sistema descritto nel Capitolo 4, l'occlusività della *pompa pulsante* deve essere regolata manualmente da un operatore: si potrebbe quindi pensare di progettare un sistema che riesca a controllare in modo automatico questo parametro. Bisognerebbe inoltre verificare che il flusso pulsatile ottenuto permetta di ottenere un'effettivo miglioramento per quanto riguarda la distribuzione cellulare, in quanto al momento non sono stati effettuati esperimenti con cellule. Inoltre, sarebbe opportuno svolgere prove con flusso pulsatile su tempi di coltura lunghi, per valutare la capacità di sopravvivenza, proliferazione ed eventuale differenziamento delle cellule all'interno della matrice.

Infine, per quanto riguarda i modelli proposti, bisogna sottolineare il fatto che, in entrambi, i vasi sono descritti come dei tubi dalle pareti rigide e non considerano quindi il fatto che, se il rene non viene perfuso o è perfuso a portate molto basse, essi tendono a collassare. Se si osservano quindi i grafici  $\Delta p$ -Q riferiti al rene nativo e al decellularizzato presenti nel Capitolo 6, si nota che i modelli descrivono bene l'andamento solo per alte portate di perfusione, quando le pareti dei vasi sono ben distese. Si potrebbe quindi pensare di modificare i modelli di modo da tener conto del fatto che le pareti dei vasi sono collassabili.

# Bibliografia

---

1. Uzarski JS, Bijonowski BM, Wang B, *et al.* Dual-Purpose Bioreactors to Monitor Noninvasive Physical and Biochemical Markers of Kidney and Liver Scaffold Recellularization. *Tissue Eng Part C Methods* 2015.
2. Hall JE. *Fisiologia medica*, 12° edn. Elsevier, 2011.
3. Standring S. *Anatomia del Gray - Le basi anatomiche per la pratica clinica*, 40° edn. Elsevier, 2010.
4. Saran R, Li Y, Robinson B, *et al.* US Renal Data System 2014 Annual Data Report: Epidemiology of Kidney Disease in the United States. *Am J Kidney Dis* 2015; **65**: A7.
5. Nikaein A, Cherikh W, Nelson K, *et al.* Organ procurement and transplantation network/united network for organ sharing histocompatibility committee collaborative study to evaluate prediction of crossmatch results in highly sensitized patients. *Transplantation* 2009; **87**: 557-562.
6. Figliuzzi M, Remuzzi G, Remuzzi A. Renal bioengineering with scaffolds generated from rat and pig kidneys. *Nephron Exp Nephrol* 2014; **126**: 113.
7. Coresh J, Selvin E, Stevens LA, *et al.* Prevalence of chronic kidney disease in the United States. *JAMA* 2007; **298**: 2038-2047.
8. Coresh J, Eknoyan G, Levey AS. Estimating the prevalence of low glomerular filtration rate requires attention to the creatinine assay calibration. *J Am Soc Nephrol* 2002; **13**: 2811-2812; author reply 2812-2816.
9. Steer CB, Marx GM, Galani E, *et al.* Quality of life: it's never too late. *J Clin Oncol* 2002; **20**: 2915-2917.
10. Ikizler TA. CKD classification: time to move beyond KDOQI. *J Am Soc Nephrol* 2009; **20**: 929-930.
11. Chazan JA, Libbey NP, London MR, *et al.* The clinical spectrum of renal osteodystrophy in 57 chronic hemodialysis patients: a correlation between biochemical parameters and bone pathology findings. *Clin Nephrol* 1991; **35**: 78-85.
12. Wolfe RA, Ashby VB, Milford EL, *et al.* Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. *N Engl J Med* 1999; **341**: 1725-1730.
13. Moe SM, Chertow GM, Coburn JW, *et al.* Achieving NKF-K/DOQI bone metabolism and disease treatment goals with cinacalcet HCl. *Kidney Int* 2005; **67**: 760-771.

14. Barreto FC, Barreto DV, Moyses RM, *et al.* K/DOQI-recommended intact PTH levels do not prevent low-turnover bone disease in hemodialysis patients. *Kidney Int* 2008; **73**: 771-777.
15. Benigni A, Morigi M, Remuzzi G. Kidney regeneration. *Lancet* 2010; **375**: 1310-1317.
16. Uzarski JS, Xia Y, Belmonte JC, *et al.* New strategies in kidney regeneration and tissue engineering. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2014; **23**: 399-405.
17. Song JJ, Guyette JP, Gilpin SE, *et al.* Regeneration and experimental orthotopic transplantation of a bioengineered kidney. *Nat Med* 2013; **19**: 646-651.
18. Bonandrini B, Figliuzzi M, Papadimou E, *et al.* Recellularization of well-preserved acellular kidney scaffold using embryonic stem cells. *Tissue Eng Part A* 2014; **20**: 1486-1498.
19. Ross EA, Abrahamson DR, St John P, *et al.* Mouse stem cells seeded into decellularized rat kidney scaffolds endothelialize and remodel basement membranes. *Organogenesis* 2012; **8**: 49-55.
20. Nakayama KH, Lee CC, Batchelder CA, *et al.* Tissue specificity of decellularized rhesus monkey kidney and lung scaffolds. *PLoS One* 2013; **8**: e64134.
21. O'Neill JD, Freytes DO, Anandappa AJ, *et al.* The regulation of growth and metabolism of kidney stem cells with regional specificity using extracellular matrix derived from kidney. *Biomaterials* 2013; **34**: 9830-9841.
22. Burgkart R, Tron A, Prodingler P, *et al.* Decellularized kidney matrix for perfused bone engineering. *Tissue Eng Part C Methods* 2014; **20**: 553-561.
23. Ross EA, Williams MJ, Hamazaki T, *et al.* Embryonic stem cells proliferate and differentiate when seeded into kidney scaffolds. *J Am Soc Nephrol* 2009; **20**: 2338-2347.
24. Yu YL, Shao YK, Ding YQ, *et al.* Decellularized kidney scaffold-mediated renal regeneration. *Biomaterials* 2014; **35**: 6822-6828.
25. Caralt M, Uzarski JS, Iacob S, *et al.* Optimization and critical evaluation of decellularization strategies to develop renal extracellular matrix scaffolds as biological templates for organ engineering and transplantation. *Am J Transplant* 2015; **15**: 64-75.
26. Sullivan DC, Mirmalek-Sani SH, Deegan DB, *et al.* Decellularization methods of porcine kidneys for whole organ engineering using a high-throughput system. *Biomaterials* 2012; **33**: 7756-7764.
27. Ko IK. Enhanced re-endothelialization of acellular kidney scaffolds for whole organ engineering via antibody conjugation of vasculatures. *Technology* 2014; **02**: 243.
28. Orlando G, Farney AC, Iskandar SS, *et al.* Production and implantation of renal extracellular matrix scaffolds from porcine kidneys as a platform for renal bioengineering investigations. *Ann Surg* 2012; **256**: 363-370.

29. Wang Y, Bao J, Wu Q, *et al.* Method for perfusion decellularization of porcine whole liver and kidney for use as a scaffold for clinical-scale bioengineering engrafts. *Xenotransplantation* 2015; **22**: 48-61.
30. Orlando G, Booth C, Wang Z, *et al.* Discarded human kidneys as a source of ECM scaffold for kidney regeneration technologies. *Biomaterials* 2013; **34**: 5915-5925.
31. Nakayama KH, Batchelder CA, Lee CI, *et al.* Decellularized rhesus monkey kidney as a three-dimensional scaffold for renal tissue engineering. *Tissue Eng Part A* 2010; **16**: 2207-2216.
32. Sebinger DD, Ofenbauer A, Gruber P, *et al.* ECM modulated early kidney development in embryonic organ culture. *Biomaterials* 2013; **34**: 6670-6682.
33. Peloso A, Petrosyan A, Da Sacco S, *et al.* Renal Extracellular Matrix Scaffolds From Discarded Kidneys Maintain Glomerular Morphometry and Vascular Resilience and Retains Critical Growth Factors. *Transplantation* 2015; **99**: 1807-1816.
34. Baptista PM, Siddiqui MM, Lozier G, *et al.* The use of whole organ decellularization for the generation of a vascularized liver organoid. *Hepatology* 2011; **53**: 604-617.
35. Soto-Gutierrez A, Zhang L, Medberry C, *et al.* A whole-organ regenerative medicine approach for liver replacement. *Tissue Eng Part C Methods* 2011; **17**: 677-686.
36. Badylak SF, Freytes DO, Gilbert TW. Extracellular matrix as biological scaffold material: structure and function. *Acta Biomater* 2009; **5**: 1-13.
37. Vavken P, Joshi S, Murray MM. TRITON-X is most effective among three decellularization agents for ACL tissue engineering. *J Orthop Res* 2009; **27**: 1612-1618.
38. Nordsletten DA, Blackett S, Bentley MD, *et al.* Structural morphology of renal vasculature. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; **291**: H296-309.
39. Gorji M, Alipanah M, Shateri M, *et al.* Analytical solution for laminar flow through leaky tube. *Applied Mathematics and Mechanics* 2011; **32**: 69-74.
40. Deen WM, Lazzara MJ, Myers BD. Structural determinants of glomerular permeability. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; **281**: F579-596.
41. Palassini M, Remuzzi A. Numerical analysis of viscous flow through fibrous media: a model for glomerular basement membrane permeability. *Am J Physiol* 1998; **274**: F223-231.
42. Badylak SF. The extracellular matrix as a biologic scaffold material. *Biomaterials* 2007; **28**: 3587-3593.
43. Badylak SF. Regenerative medicine and developmental biology: the role of the extracellular matrix. *Anat Rec B New Anat* 2005; **287**: 36-41.



# Appendice

---

# A. Protocolli per gli esperimenti con il rene di ratto

---

*Vengono qui descritte le procedure operative adottate durante gli esperimenti di perfusione del rene di ratto. Tutte le procedure, salvo diversa indicazione, devono essere effettuate in sterilità sotto cappa a flusso laminare, mediante l'utilizzo di guanti, camici mascherine e calzari come da disposizioni.*

## **a) Coltura delle cellule**

Per la procedura di coltura delle cellule si fa riferimento a quanto riportato in Bonandrini et al. (18). Le cellule embrionali murine sono state coltivate su fibroblasti da embrioni murini mitoticamente inattivati e mantenute con terreno di coltura di base DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium). Il terreno è stato arricchito con sodio piruvato 1 mM, 10 nM di amminoacidi non essenziali, 2mM di glutammina, 100 U/ml di penicillina, 100 ng/ml di streptomicina, 0,1 mM di  $\beta$ -mercaptoetanololo, 10% di siero fetale bovino e 1000 U/ml di LIF (Leukemia inhibitory factor). Le cellule sono state staccate e passate ogni 2-3 giorni con tripsina 0,05%.

## **b) Preparazione delle soluzioni**

### **Soluzione di nitroprusside $10^{-4}$ M**

Tale soluzione viene utilizzata come vasodilatatore durante il prelievo del rene di ratto. La seguente procedura di preparazione va eseguita sotto cappa chimica, ponendo particolare attenzione nel maneggiare la nitroprusside a causa della sua tossicità:

- Si apre sotto cappa il flacone contenente la nitroprusside in granuli
- Si preleva un granulo e lo si deposita in una provetta di plastica, quindi lo si pesa mediante una bilancia di precisione (tarare la bilancia per eliminare il peso della provetta)

- Nota la massa molare della nitroprusside (297,95 g/mol) si calcola il numero di moli contenute nella quantità prelevata, quindi si aggiunge il volume di soluzione fisiologica necessario per ottenere una soluzione madre 0,1 M
- Si chiude la provetta e si agita mediante vortex per facilitare lo scioglimento della nitroprusside
- Si prepara una provetta Falcon contenente 50 mL di soluzione fisiologica
- Mediante una micro pipetta, si eliminano 50  $\mu$ L della soluzione fisiologica nella provetta Falcon
- Si prelevano 50  $\mu$ L di soluzione madre 0,1 M di nitroprusside e si aggiungono alla soluzione fisiologica rimasta
- Si chiude la Falcon e la si agita
- Si prepara una seconda provetta Falcon e un filtro siringa da 0,22  $\mu$ m
- Mediante una siringa si preleva la soluzione di nitroprusside dalla prima Falcon e la si inietta attraverso il filtro siringa nella seconda.
- Terminata l'operazione, si tappa la seconda provetta e la si sigilla con pellicola Parafilm, scrivendo il contenuto in modo indelebile sul corpo del contenitore

#### **Soluzione di decellularizzazione**

- Si versano 25 mL di soluzione SDS al 20% in una provetta Falcon
- Si tolgono 25 mL di acqua distillata da una bottiglia da 500 mL
- Si aggiungono i 25 mL di SDS 20% ai 475 mL di acqua distillata rimasti nella bottiglia.
- La bottiglia viene chiusa e agitata
- Sotto cappa, si filtra la soluzione ottenuta mediante un filtro Stericup
- Si chiude il contenitore sterile con la soluzione fino all'utilizzo

### c) Protocollo di decellularizzazione

In Tabella A.1 sono presenti i passaggi che vengono effettuati durante la decellularizzazione del rene. Nei paragrafi successivi è presentato nel dettaglio tutto ciò che viene fatto dal momento del prelievo del rene alla sua completa decellularizzazione.

<i>Descrizione del passaggio</i>	<i>Durata</i>	<i>Note</i>
Perfusione dall'arteria renale con SDS 1%	6 ore	Circuito chiuso, portata: 0.4 mL/min
Lavaggio dall'arteria renale con H <sub>2</sub> O	17 ore	Circuito aperto, portata: 0.4 mL/min
Lavaggio dall'arteria renale con PBS 1X + 1% PenStrep	5 ore	Circuito aperto, portata: 0.4 mL/min
Medium	1 ora	Circuito chiuso, portata: 0.4 mL/min, T=37°C

**Tabella A.1: protocollo di decellularizzazione.**

#### Prelievo del rene

Procedura effettuata da un solo operatore:

- Si effettua l'incisione lungo la linea mediana e dei laterali
- Si chiude l'aorta al di sopra della biforcazione delle renali
- Si inserisce un filo sterile nel tratto di aorta al di sotto della biforcazione renale di sinistra
- Si bloccano tutti i vasi verso le viscere facendo un nodo che includa anche la vena cava
- Si incannula l'arteria renale sinistra con un catetere PE-50 e l'uretere con catetere PE-10
- Si fissa il catetere con il filo sterile precedentemente inserito
- Si taglia la vena in uscita dal rene sinistro all'altezza della ricongiunzione delle vene renali
- Si perfondono 10 mL di soluzione di nitroprusside  $10^{-4}$  M per lavare i vasi
- Si trasporta il rene immerso in fisiologica e incannulato all'interno di una provetta Falcon sterile



- Si monta il tappo di chiusura (2) già completo di tutti i passatubi, del tappo cieco e del tappo con la predisposizione per il filtro da 0,22 µm (il filtro è impacchettato separatamente)
- Si connette un rubinetto tre vie a ciascuno dei tre accessi utilizzati
- Si connette il filtro siringa da 0,22 µm (3) al tubo del tappo dotato di porta gomma, per mezzo di un rubinetto a tre vie
- Si connette il tubo sottopompa (4) al rubinetto tre vie posto sul tubo del ripescaggio
- Si connette lo spezzone di tubo contrassegnato con la dicitura “bypass compliance” (5) all’altro estremo del tubo sottopompa
- Si inserisce il connettore portagomma della compliance (6) nel tubo per il bypass, mentre sul raccordo all’altra estremità viene connesso un rubinetto a tre vie
- Si collega il tubo contrassegnato con la dicitura “corto intermedio” (7) al tre vie a valle della compliance, quindi si posiziona un ulteriore rubinetto a tre vie
- Si connette il tubo contrassegnato con la dicitura “finale” (8)
- Si avvia la pompa e si effettua il priming del circuito
- Separatamente, si prepara il trasduttore di pressione connettendolo al relativo tubo di collegamento (9). Il tubo e il trasduttore vengono quindi riempiti con acqua sterile
- Si connette il trasduttore al rubinetto tre vie posizionato tra i tubi “corto intermedio” (7) e “finale” (8).

### **Alloggiamento del rene**

Procedura effettuata da due operatori, di cui uno munito di guanti sterili:

- Si prepara una piastra Petri sterile sul piano della cappa
- L’operatore senza i guanti sterili apre la provetta Falcon dove è trasportato il rene
- L’operatore con i guanti sterili estrae il rene dalla provetta tramite l’uso di pinze sterili e lo posiziona nella piastra Petri, quindi provvede a inserire l’ago di infusione all’interno del catetere o della cannula da perfondere (arteria o uretere)
- Si ferma la pompa

- L'operatore senza guanti sterili svita il tappo principale della bottiglia e lo solleva esponendo il tubo di perfusione. L'operatore con i guanti sterili avvicina l'ago collegato al rene al tubo di perfusione
- Si posiziona l'ago collegato al catetere sotto il luer bicono del tubo di perfusione.
- L'operatore senza i guanti sterili avvia la pompa alla minima velocità e lascia gocciolare la soluzione all'interno dell'ago per eliminare le bolle. Una volta riempito si connette l'ago al luer e si ferma la pompa
- La bottiglia viene richiusa agendo sulla ghiera filettata del tappo
- Si riavvia la pompa al regime di infusione desiderato o comunque mantenendo una pressione di infusione inferiore ai 100 mmHg.

### **Cambi delle soluzioni e lavaggi in aperto**

Procedura effettuata da due operatori, di cui uno munito di guanti sterili:

- Si ferma la pompa
- Si riempie un becker sterile con la soluzione da introdurre nel circuito
- Si apre il tappo cieco presente sulla bottiglia
- Si collega una pipetta al tubo del vuoto, e la si introduce lentamente nella camera
- Si accende la pompa del vuoto e si aspira il liquido nella bottiglia, facendo attenzione a non avvicinarsi al rene
- Terminata l'operazione, si spegne la pompa del vuoto
- Si collega il tubo contrassegnato con la dicitura "ripescaggio esterno" (11) all'accesso libero del rubinetto a 3 vie posizionato sul tubo di ripescaggio della camera
- Si collega l'estremità libera del tubo a una pipetta e si posiziona quest'ultima nel becker della soluzione
- Si avvia la pompa e si riempie il circuito

Se è necessario effettuare solo il cambio della soluzione, terminato il riempimento con la soluzione si richiude l'accesso del rubinetto a tre vie cui è collegato il tubo di ripescaggio esterno, e si ripristina il ripescaggio dall'interno della camera. Se invece si

desidera effettuare un lavaggio in aperto mantenere la configurazione descritta, avendo cura di rimuovere periodicamente il liquido in eccesso dalla bottiglia.

#### **d) Protocollo di ricellularizzazione**

15 milioni di cellule vengono sospese in 9 mL di medium e suddivise in tre aliquote da 3 mL ciascuna. L'infusione di ogni aliquota è alternata con la perfusione del terreno di coltura per 10 minuti. Tale procedura viene effettuata sia che le cellule vengano infuse dall'arteria, che dall'uretere o dalla vena. Tuttavia, quando vengono infuse dall'uretere, nella camera viene creato il vuoto, pari a - 50 mmHg. Nei paragrafi successivi vengono descritti nel dettaglio la procedura per l'infusione di cellule e di ottenimento del vuoto.

##### **Procedura per l'infusione delle cellule**

Viene effettuata da due operatori di cui uno munito di guanti sterili:

- Si ferma la pompa
- Si collega il tubo di infusione (10) delle cellule al rubinetto a tre vie più vicino al tubo di perfusione del rene
- Si chiude il rubinetto tre vie in direzione del rene e si avvia la pompa per riempire e debollare il circuito. Terminata l'operazione la pompa viene fermata
- Si prepara una siringa da 10 mL con la sospensione cellulare da infondere
- Si inserisce la siringa nell'apposito alloggiamento della pompa siringa
- Si eliminano tutte le bolle presenti nel tubo di infusione e nella parte di connessione della siringa al tubo, quindi si collegano le due parti
- Si apre il rubinetto tre vie in direzione del rene e si chiude l'accesso collegato alla pompa roller
- Si imposta la velocità di infusione della pompa siringa e la si avvia
- Terminata l'infusione, si ferma la pompa a siringa
- Si apre l'accesso del rubinetto a tre vie cui è connesso il tubo sottopompa e viene chiuso l'accesso collegato al tubo di infusione delle cellule
- Si avvia la pompa roller alla portata desiderata



- Terminata la perfusione, si ripete l'operazione di infusione (se necessario) come indicato nei punti precedenti

### **Procedura per l'applicazione del vuoto**

Effettuata da due operatori, non è richiesto l'uso di guanti sterili:

- Si ferma la pompa peristaltica
- Si chiude l'accesso del rubinetto a tre vie al quale è collegato il tubo del trasduttore di pressione (9)
- Il tubo che collega il trasduttore di pressione al circuito viene disconnesso e completamente svuotato.
- Si rimuove il filtro da 0,22  $\mu\text{m}$  (3) dal relativo rubinetto a tre vie sulla bottiglia e al suo posto viene connesso il trasduttore
- Si collega il tubo della linea di aspirazione (12) all'altro accesso del tre vie
- Si apre completamente il tappo cieco sull'accesso non utilizzato della bottiglia.
- Si attiva la pompa del vuoto e si verifica la pressione rilevata dal trasduttore (deve essere pari a quella atmosferica)
- Si posiziona il tappo cieco sull'accesso libero, quindi lo si avvita lentamente, monitorando la pressione sul grafico del trasduttore
- Si agisce sul tappo fino al raggiungimento della depressurizzazione desiderata.
- Raggiunto un valore stabile di depressurizzazione, si procede all'infusione delle cellule.



## B. Codice sorgente del sistema di controllo automatico della pressione

---

*In questa sezione sono riportati il codice sorgente caricato sulla scheda Arduino e lo schema di interfacciamento tra Arduino e l'esterno.*

### a) Codice sorgente

```
#include <TimerOne.h>

#include <LiquidCrystal.h>

LiquidCrystal lcd(12, 11, 5, 4, 3, 2);

char buffer[16];

const byte period = 128;

//INPUT
const int pressurePin = A0;

const int start_stopPin = 15;

const int tab = 16;
const int up = 17;
const int down = 19;

//OUTPUT
const byte speed_controlPin = 9;
const int start_stopPinOut = 8;
const int LED_start_stop = 13;

//VARIABILI TEMPORANEE LCD
int buttonCounter = 0;
int readTab = 0;
int prevReadTab = 0;

int readUp = 0;
int readDown = 0;

//VALORI INIZIALI E SOGLIE IMPOSTATE
float Vin = 1.0*5.0*1024/(5.0*44.3);
```

```

float Vmin = 1.0*5.0*1024/(5.0*44.3);
float Vmin2 = 1.5*5.0*1024/(5.0*44.3);
int Pmax = 120;
int Pmin = 80;

int analogPressure = analogRead(pressurePin);
int pressure = analogPressure + 5;

float pumpSpeed = Vin;
float pumpSpeedNew = 0;

int value_start_stop = 0;
int prevValue_start_stop = 0;
int switchState_start_stop = 0;

void setup(){
  Timer1.initialize(period);

  pinMode(pressurePin,INPUT);
  pinMode(speed_controlPin,OUTPUT);
  digitalWrite(speed_controlPin, LOW);

  pinMode(start_stopPin,INPUT);
  pinMode(start_stopPinOut,OUTPUT);
  digitalWrite(start_stopPinOut, HIGH);

  // LED:
  pinMode(LED_start_stop,OUTPUT);
  digitalWrite(LED_start_stop,LOW);

  //LCD:
  pinMode(tab, INPUT);
  pinMode(up, INPUT);
  pinMode(down, INPUT);

  lcd.begin(16,2);
  lcd.clear();

  lcd.setCursor(0,0);
  sprintf(buffer, "%s:%03d %s:%03d" , "MIN", Pmin, "MAX", Pmax);
  lcd.print( buffer );
  lcd.setCursor(0,1);
  lcd.print("Vin:");
  lcd.setCursor(4,1);
  lcd.print(Vin*44.3/1024,1);
}

void loop(){

  //IMPOSTO LCD

```

```

readTab = digitalRead(tab);
if (readTab != prevReadTab) {
  if (readTab == HIGH) {
    buttonCounter++;
    if (buttonCounter == 1){
      lcd.setCursor(6,0);
      lcd.cursor();
      delay (300);
      lcd.noCursor();
    }
    if (buttonCounter == 2){
      lcd.setCursor(14,0);
      lcd.cursor();
      delay (300);
      lcd.noCursor();
    }
    if (buttonCounter == 3){
      lcd.setCursor(4,1);
      lcd.cursor();
      delay (300);
      lcd.noCursor();
    }
  }
}
prevReadTab = readTab;

if (buttonCounter > 3) {
  buttonCounter = 1;
  readTab = 0;
  prevReadTab = 0;
  lcd.setCursor(6,0);
  lcd.cursor();
  delay (300);
  lcd.noCursor();
  digitalWrite(up, LOW);
  digitalWrite(down, LOW);
}

readUp = digitalRead(up);
readDown = digitalRead(down);
if (readUp == HIGH && readDown == LOW && buttonCounter == 1){
  Pmin = Pmin + 1;
  delay(250);
  lcd.setCursor(0,0);
  sprintf(buffer, "%s:%03d %s:%03d" , "MIN", Pmin, "MAX", Pmax);
  lcd.print( buffer );
  readUp = 0;
  readDown = 0;
}
if (readUp == HIGH && readDown == LOW && buttonCounter == 2){

```

```

Pmax = Pmax + 1;
delay(250);
lcd.setCursor(0,0);
sprintf(buffer, "%s:%03d %s:%03d", "MIN", Pmin, "MAX", Pmax);
lcd.print( buffer );
readUp = 0;
readDown = 0;
}
if (readUp == HIGH && readDown == LOW && buttonCounter == 3){
Vin = Vin + (0.1 * 1024/44.3);
delay(250);
lcd.setCursor(0,1);
lcd.print("Vin:");
lcd.setCursor(4,1);
lcd.print(Vin*44.3/1024,1);
readUp = 0;
readDown = 0;
}
if (readUp == LOW && readDown == HIGH && buttonCounter == 1){
Pmin = Pmin - 1;
delay(250);
lcd.setCursor(0,0);
sprintf(buffer, "%s:%03d %s:%03d", "MIN", Pmin, "MAX", Pmax);
lcd.print( buffer );
readUp = 0;
readDown = 0;
}
if (readUp == LOW && readDown == HIGH && buttonCounter == 2){
Pmax = Pmax - 1;
delay(250);
lcd.setCursor(0,0);
sprintf(buffer, "%s:%03d %s:%03d", "MIN", Pmin, "MAX", Pmax);
lcd.print( buffer );
readUp = 0;
readDown = 0;
}
if (readUp == LOW && readDown == HIGH && buttonCounter == 3){
Vin = Vin - (0.1 * 1024/44.3);
delay(250);
lcd.setCursor(0,1);
lcd.print("Vin:");
lcd.setCursor(4,1);
lcd.print(Vin*44.3/1024,1);
readUp = 0;
readDown = 0;
}
//FINE IMPOSTAZIONE LCD

//FASE DI AVVIO + ACCENSIONE LED
value_start_stop = digitalRead(start_stopPin);

```

```

if ((value_start_stop == HIGH)&&(prevValue_start_stop == LOW)){
  switchState_start_stop = 1 - switchState_start_stop;
  delay(200);
}
prevValue_start_stop = value_start_stop;
if (switchState_start_stop == 1){
  digitalWrite(LED_start_stop,HIGH);
  digitalWrite(start_stopPinOut,LOW);
  //delay(50);

//INIZIO CONTROLLO VELOCITA' IN BASE ALLA PRESSIONE MISURATA
analogPressure = analogRead(pressurePin);
pressure = analogPressure + 5;

if (pressure > Pmax || pressure < Pmin){
  if (pressure >= Pmax && pumpSpeed <= Vmin2) { pumpSpeedNew = Vmin; } else
  pumpSpeedNew = pumpSpeed + pumpSpeed * ((Pmax + Pmin)/2 - pressure)/((Pmax +
Pmin)/2));
  Timer1.pwm(speed_controlPin, pumpSpeedNew);
  pumpSpeed = pumpSpeedNew;
  delay(1000);
}
else {
  pumpSpeedNew = pumpSpeed;
  Timer1.pwm(speed_controlPin, pumpSpeedNew);
  pumpSpeed = pumpSpeedNew;
  delay(500);
}
} else {
  digitalWrite(LED_start_stop,LOW);
  digitalWrite(start_stopPinOut,HIGH);
  pumpSpeed = Vin;
  pumpSpeedNew = 0;
}
}
}

```

## b) Schema di interfacciamento tra Arduino e l'esterno

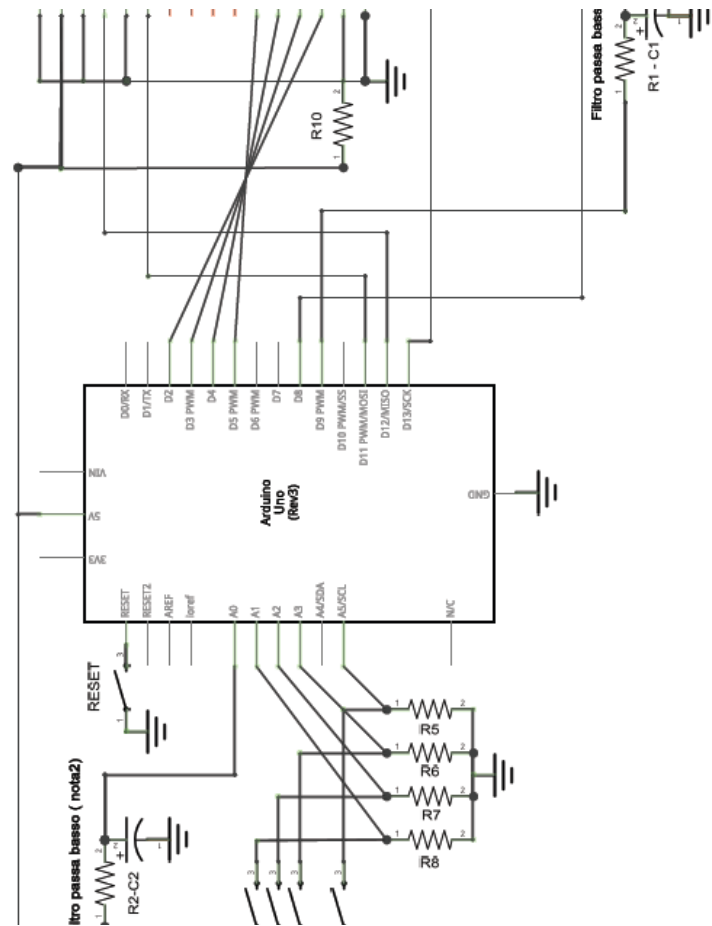


Fig. B.1: Schema di interfacciamento tra Arduino e l'esterno.

In Figura B.1:

- **Nota 1:** poiché l'intervallo ammesso ad input analogico di Arduino è pari a 0 – 5 V, mentre il segnale in uscita dal trasduttore ha un intervallo compreso tra 0 e 10 V, è stato inserito un partitore con due resistenze uguali da 1 K $\Omega$ , di modo da dimezzare il segnale in ingresso ad Arduino.
- **Nota 2:** è stato introdotto un filtro passa basso costituito da una resistenza da 10 K $\Omega$  e una capacità da 1  $\mu$ F per eliminare eventuali disturbi presenti sul segnale in ingresso ad Arduino; la frequenza di taglio, data dalla formula  $\frac{1}{2 \cdot \pi \cdot R \cdot C}$ , è di circa 16 Hz.
- **Nota 3:** è stato introdotto in uscita un filtro passa basso costituito da una resistenza da 1 K $\Omega$  e una capacità da 10  $\mu$ F. Esso serve per eliminare la



componente alternata dell'uscita PWM (*Pulse-Width Modulation*, uscita modulata in ampiezza). La frequenza di taglio impostata è di circa 16 Hz: in questo modo l'uscita sarà in grado di seguire le variazioni di velocità volute.

## C. Tecniche analitiche

---

*Vengono qui descritte le tecniche analitiche effettuate per valutare la struttura del rene a seguito degli esperimenti.*

### **a) Tecniche analitiche**

La valutazione dei risultati conseguiti a seguito delle prove descritte nei capitoli 4 e 5 viene principalmente effettuata con metodi di microscopia ottica. In breve, i campioni di rene decellularizzato (ed eventualmente ricellularizzato) vengono sezionati alla fine di ogni esperimento in un numero di fette sufficiente alle analisi che si intendono svolgere. Quindi si procede a trattare il campione per mezzo di soluzioni liquide contenenti fissativi. Questa operazione ha la funzione di creare legami covalenti con le proteine bloccandole spazialmente ed impedendo la loro interazione con altri sistemi, consentendo quindi la successiva valutazione del tessuto fissato con tecniche di microscopia ottica. E' necessario ricordare che i fissativi sono particolarmente tossici, e quindi il loro uso deve essere fatto sotto cappa chimica e mediante l'uso di adeguati sistemi di protezione.

Nell'ambito degli esperimenti proposti, si è fatto ricorso alla tecnica di colorazione Ematossilina ed eosina (H&E). Si tratta di una delle colorazioni più comunemente utilizzate per l'analisi istologica dei tessuti: l'ematossilina colora in viola scuro la cromatina, permettendo quindi l'individuazione dei nuclei cellulari, l'eosina, invece, conferisce al citoplasma un colore che varia dal rosso al rosa.

In breve, si procede al fissaggio della sezione di rene con soluzione di Duboscq-Brazil (picroformolo). Successivamente, il campione viene prima sottoposto a un protocollo disidratazione e quindi risospeso nel solvente del mezzo di inclusione. Si procede quindi a includere il campione in paraffina allo scopo di facilitarne la successiva operazione di taglio in sezioni sufficientemente sottili da consentirne l'osservazione al microscopio. Queste sezioni, montate su un vetrino, vengono infine trattate con i due coloranti. I dettagli della procedura di colorazione sono riportati nel paragrafo successivo.

### Procedura per effettuare la colorazione ematossilina ed eosina

La colorazione deve essere effettuata sotto cappa chimica e i passaggi sono i seguenti:

- Si effettua la sparaffinatura:
  - Unhyol → 5'
  - Unhyol → 5'
  - Alcool 100% → si muove su e giù il porta vetrini per 30/40''
  - Alcool 100% → "
  - Alcool 90% → "
  - Alcool 80% → "
  - Acqua → si lascia per un paio di secondi per togliere i residui di alcool.
- Ematossilina → 10 ';
- Acqua distillata → 1 passaggio rapido
- Acqua corrente fredda → 5';
- Acqua distillata → un passaggio rapido
- Eosina → 5';
- Acqua distillata → 2 passaggi rapidi
- Alcool assoluto → si prende un vetrino alla volta e vengono effettuati dei lavaggi nell'alcool assoluto facendo attenzione a bagnare tutte le fette, poi si poggia il vetrino sulla cappa e si lascia ad asciugare;
- Eurokitt (montante) → si depositano i coprivetrini sul bancone della cappa, si preleva con una pipetta un po' di montante e si mettono 3 piccole gocce su ogni vetrino
- Quando i vetrini sono asciutti, ad uno a uno vengono immersi nell'Unhyol plus e, senza farli sgocciolare, vengono fatti cadere sul coprivetrino; quando il toluene ha "mangiato" il montante, con un pezzo di carta si asciuga il liquido in eccesso; si controlla quindi che non ci siano bolle;
- i vetrini vengono fatti svaporare sotto cappa chimica.