

**UNIVERSITÀ DI PADOVA
FACOLTÀ DI INGEGNERIA**

Corso di Laurea Magistrale in Bioingegneria

**MESSA A PUNTO DI UN BIOREATTORE PER VALVOLE
CARDIACHE INGEGNERIZZATE**

Relatore: Ch.mo Prof. Andrea Bagno

Correlatore: Giorgio Delfitto

Laureanda: Chiara Gelmini

Matricola: 607305

Anno Accademico 2010-2011

Padova, 25 ottobre 2011

Alla mia famiglia

A Guido

INDICE

INDICE	5
SOMMARIO	7
INTRODUZIONE	8
INGEGNERIA TISSUTALE	8
APPLICAZIONE DELL'INGEGNERIA TISSUTALE ALLE VALVOLE CARDIACHE	13
LIMITI DELL'INGEGNERIA DEI TESSUTI	15
ANATOMIA DELLA VALVOLA CARDIACA AORTICA	16
MALATTIE DELLE VALVOLE CARDIACHE	18
CAPITOLO 1 EVOLUZIONE DEI SISTEMI BIOREATTORE	20
CAPITOLO 2 INTRODUZIONE AL BIOREATTORE INNOVATIVO PER TEHVS	34
LA POMPA	35
LA CAMERA DI COLTURA	38
LA CAMERA DI COMPLIANCE	41
UNITÀ DI CONTROLLO	45
UNITÀ DI CONDIZIONAMENTO DEL SEGNALE	46
CAPITOLO 3 MATERIALI E METODI	48
PROVE SPERIMENTALI	48
PROVE SPERIMENTALI SENZA VALVOLA	57
MODELLISTICA	61
CONCLUSIONI	73
APPENDICE A DISEGNI TECNICI DELLE PARTI DEL BIOREATTORE	75
APPENDICE B CODICI SOFTWARE DI GESTIONE DEL BIOREATTORE	80

B.1 - BIOREACT04A.C	80
B.2 - BIOREACT_SUPERVISOR1.VI	91
APPENDICE FORNITORI	102
BIBLIOGRAFIA	104

SOMMARIO

Il presente lavoro ha avuto per obiettivo il set-up di un bioreattore destinato alla produzione di valvole cardiache ingegnerizzate, progettato e realizzato presso i laboratori di Bioingegneria del Dipartimento di Processi Chimici dell'Ingegneria. Si tratta di un dispositivo che deve garantire un ambiente sterile e controllato dal punto di vista chimico-fisico, durante tutto il periodo di condizionamento della TEHV (*Tissue Engineered Heart Valve*). Inoltre, deve poter simulare, grazie al flusso pulsatile, le condizioni di stress idrodinamico tipiche della circolazione umana: in queste condizioni, i costrutti ingegnerizzati potranno presentare caratteristiche funzionali del tutto simili a quelle delle valvole cardiache naturali.

Nell'ambito dell'ingegneria tessutale applicata alla medicina rigenerativa, il bioreattore assume un ruolo fondamentale in quanto permette di coltivare scaffolds valvolari biologici decellularizzati, sui quali vengono seminate le cellule del paziente (autologhe) al quale il costrutto è destinato; si potranno ottenere valvole cardiache vitali e funzionali con le caratteristiche proprie del ricevente, risolvendo i problemi legati alla carenza di donatori e i fenomeni di rigetto di organi o tessuti trapiantati da donatore.

Nell'introduzione vengono illustrate le problematiche che portano alla sostituzione chirurgiche della valvola cardiaca nativa, le fasi fondamentali nella ricostruzione della valvola stessa con cellule autologhe e i limiti dell'ingegneria tessutale.

Viene in seguito eseguita una ricostruzione dell'evoluzione storica dei bioreattori per TEHV, prendendo in esame alcuni progetti presentati nella letteratura scientifica.

Si passa poi alla descrizione del dispositivo assemblato presso i laboratori del Dipartimento di Processi Chimici dell'Ingegneria, con una descrizione degli elementi hardware e software che compongono il sistema.

Vengono riportati i risultati delle misure condotte per determinare l'andamento della pressione in alcuni punti del circuito idraulico, in particolare nella camera di compliance e in corrispondenza della valvola cardiaca. Si cerca, infine, di discutere criticamente i risultati ottenuti facendo riferimento ai risultati delle simulazioni condotte su modelli a parametri concentrati e a parametri distribuiti (linee di trasmissione).

INTRODUZIONE

INGEGNERIA TISSUTALE

L'ingegneria tissutale nasce nei primi anni '90 e si propone come valida alternativa alle tradizionali tecniche di trapianto di organi ed impianto di protesi largamente impiegate in ambito clinico per ripristinare le funzionalità di un tessuto patologico.

Nel 1998 l'ingegneria tissutale è stata definita come *“una tecnica interdisciplinare che applica i principi e i metodi dell'ingegneria e delle scienze biologiche con l'obiettivo di comprendere le relazioni fondamentali tra struttura e funzione nei tessuti sani e malati dei mammiferi e di sviluppare sostituti biologici in grado di ripristinare, mantenere o migliorarne le funzioni”* [1].

Questa tecnica ricopre un ruolo fondamentale nella medicina rigenerativa, definita dai National Institutes of Health (NIH) come il processo per creare tessuti viventi adatti alla riparazione o alla sostituzione di organi o tessuti le cui funzioni sono venute meno a causa dell'invecchiamento, delle malattie e dei danni o dei difetti congeniti.

L'obiettivo della rigenerazione dei tessuti è quindi quello di favorire o innescare una reazione di rigenerazione che non può avvenire spontaneamente in un organo o tessuto irreversibilmente danneggiato.

L'ingegneria tissutale rappresenta un settore di importante e crescente interesse medico e industriale ed è caratterizzato da una grande interdisciplinarietà che prevede la collaborazione di diverse figure professionali: gli ambiti interessati sono le scienze di base, la scienza dei biomateriali, le biotecnologie, la bioingegneria, la medicina rigenerativa e la biologia molecolare [2]. Tra le diverse discipline di competenza dell'ingegneria tissutale, un'importanza rilevante assume la biologia cellulare; risulta, infatti, sempre più necessario studiare e comprendere nei dettagli i meccanismi che regolano la crescita, la proliferazione e la differenziazione delle cellule, le modalità attraverso le quali i componenti della matrice extracellulare (ECM) interagiscono con le funzioni cellulari. Infatti studi su valvole cardiache sane, patologiche o sostituite hanno dimostrato che il principale fattore determinante della durata della valvola è l'ECM, la cui quantità e qualità dipendono dalla vitalità e funzionalità delle cellule interstiziali

valvolari (VIC). Anche l'immunologia risulta rilevante per mettere a punto trapianti compatibili con l'organismo ricevente. Da qui la messa a punto di sistemi per la coltura in vitro su larga scala di cellule, in particolare di nuovi bioreattori.

La coltura in vitro si pone l'obiettivo di risolvere la carenza di tessuti e organi per il trapianto e, al tempo stesso, il problema del rigetto, dal momento che le cellule provengono dallo stesso paziente che riceverà il tessuto rigenerato. Ciò potrà incidere notevolmente sulla qualità della vita, poiché il processo rigenerativo iniziato in vitro è continuato in maniera più efficiente ed efficace anche in vivo.

Per la realizzazione di nuovi costrutti biologici questa disciplina si avvale di tre elementi principali:

1. le cellule: la scelta della corretta fonte cellulare è un punto cruciale per l'ingegnerizzazione di un tessuto;
2. lo scaffold¹: fornisce un supporto tridimensionale alle cellule. Forma, struttura e materiali sono scelti a seconda della specifica applicazione;
3. il bioreattore²: costituisce il sistema di condizionamento della coltura, fornendo opportuni stimoli e mantenendo il costrutto in un ambiente sterile.

Il procedimento per ottenere un tessuto ingegnerizzato è suddiviso in sei fasi (Figura 1):
fabbricazione dei supporti tridimensionali;

- prelievo ed espansione delle cellule del donatore;
- semina su scaffold;
- proliferazione e differenziazione cellulare in condizioni dinamiche all'interno di un bioreattore;
- impianto nel paziente;
- integrazione e adattamento dell'impianto da parte del sistema biologico.

¹ Struttura tridimensionale, naturale o artificiale sulla quale vengono seminate e fatte crescere le cellule al fine di ottenere un costrutto biologico funzionale [3].

² Sistema in grado di simulare l'ambiente fisiologico per creare, condizionare fisicamente e testare cellule, tessuti, precursori, strutture di supporto e organi in vitro [4].

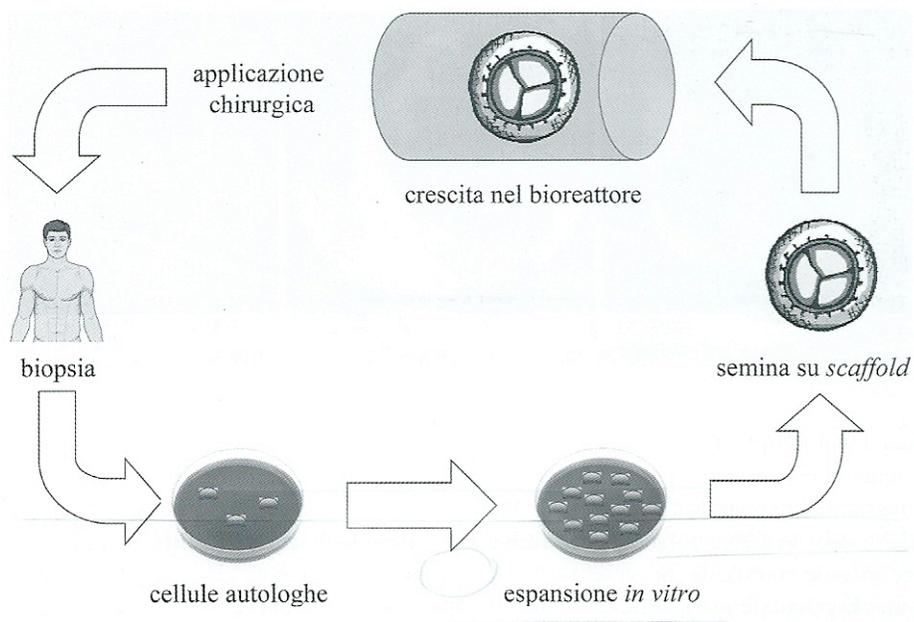


Figura 1 - Fasi fondamentali nella ricostruzione di una valvola cardiaca con cellule autologhe [5].

Il primo punto cruciale è la scelta della tipologia di cellule da utilizzare: cellule differenziate o cellule staminali.

In base agli studi scientifici più recenti, le migliori candidate sembrano le cellule staminali perché, con la capacità di differenziarsi in varie tipologie di cellule, possono essere molto utili nel tentativo di ricreare in vitro i costrutti desiderati. D'altro canto questa tipologia di cellule presenta vari punti a sfavore. Innanzitutto non sono ancora completamente note le proprietà e le potenzialità di queste cellule; inoltre risulta difficile coltivarle ed espanderle in vitro e la loro applicazione è destinata a sollevare problemi etici soprattutto per l'utilizzo eventuale di staminali embrionali.

Un altro dei punti cruciali nella realizzazione di un tessuto biologico è la natura dello scaffold, se naturale o sintetico. Gli scaffolds sintetici, prodotti principalmente con materiali polimerici biodegradabili e biorisorbibili (p. es., PLA e PGA), offrono la possibilità di variare facilmente la composizione per ottenere determinate caratteristiche funzionali e consentire una migliore funzionalizzazione con specifici segnali molecolari in grado di promuovere l'adesione e la crescita delle cellule. Essi presentano tuttavia un'elevata trombogenicità e difficoltà tecniche legate ad una lavorabilità non ottimale.

Gli scaffolds biologici consentono di superare queste difficoltà perché contengono già al loro interno fattori di crescita e segnali molecolari che promuovono l'attività cellulare; tuttavia queste strutture devono essere sottoposte a trattamenti di decellularizzazione, per eliminare totalmente le cellule del donatore, con il rischio però di alterare la composizione e le proprietà dello scaffold stesso.

In ogni caso lo scaffold, sia biologico che sintetico, deve garantire un'adeguata adesione cellulare, non deve essere citotossico, deve possedere un'opportuna porosità e prestarsi come supporto meccanico per lo sviluppo del tessuto, con un profilo di degradazione noto e controllato.

Dovendo i tessuti essere integrati al sistema cardiovascolare, si è ritenuto, sulla base di studi precedenti, di metterli in coltura in un ambiente dinamico pulsatile, in modo da riprodurre i parametri fisiologici come il flusso di sangue arterioso e la pressione sanguigna.

Diversi studi hanno mostrato che la coltura del tessuto in un ambiente para-fisiologico aumenta l'espressione delle fondamentali funzioni cellulari e garantisce migliori proprietà meccaniche.

La scelta del bioreattore rappresenta quindi un ulteriore aspetto critico; ne esistono di due tipologie: statici e dinamici.

Inizialmente trovavano maggior impiego quelli statici, in cui le cellule erano fatte depositare ed aderire allo scaffold semplicemente sotto l'azione del campo gravitazionale; nel corso degli anni però ha preso il sopravvento la tipologia dinamica perché consente di ricreare condizioni di esercizio più simili a quelle fisiologiche.

In entrambi i casi, comunque, i bioreattori per l'ingegneria tissutale devono garantire un ambiente sterile e altamente controllato nei parametri chimico-fisici (p. es., temperatura, pH, concentrazione di O₂ e CO₂, pressione, sforzi di taglio). Si è osservato che l'applicazione di stimoli fisici (nei bioreattori dinamici) migliora ed accelera lo sviluppo e la maturazione dei tessuti in vitro, soprattutto per quelle strutture che sono fisiologicamente sottoposte a sollecitazioni meccaniche, elettriche e fluidodinamiche durante il loro sviluppo in vivo.

In particolare per la realizzazione di valvole cardiache ingegnerizzate si è osservato che utilizzando un bioreattore a flusso pulsatile, capace di mimare le condizioni di stress tipiche del flusso sanguigno in pressione, è possibile ottenere una struttura vivente con caratteristiche molto simili a quella naturale.

Un bioreattore quindi deve essere in grado di:

- generare un flusso attraverso il mezzo di coltura per la semina efficiente ed uniforme su scaffold 3D;
- garantire un adeguato trasporto di gas, nutrienti, metaboliti e fattori di crescita, oltre che provvedere ad un'efficace rimozione dei prodotti di scarto (si deve evitare che la concentrazione di O_2 cada al di sotto di una soglia critica compromettendo la vitalità delle cellule);
- stimolare adeguatamente il costruito da un punto di vista chimico-fisico, in modo da simulare la situazione fisiologica cui sono sottoposti i tessuti in vivo;
- regolare e controllare i parametri di coltura.

APPLICAZIONE DELL'INGEGNERIA TISSUTALE ALLE VALVOLE CARIDACHE

Le malattie cardiovascolari ricoprono un importante problema in tutto il mondo. Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità, esse hanno causato il decesso nel 2005 di circa 17,5 milioni di persone, il 30% di tutti i casi di morte.

Ogni anno vengono eseguite in tutto il mondo oltre 270.000 sostituzioni di valvola cardiaca [6]. Gli interventi di sostituzione riguardano prevalentemente la valvola aortica (più di 200.000 ogni anno) o la valvola mitrale (circa 70.000 ogni anno). In particolare, dal 1998 al 2005, si stima che negli Stati Uniti sono stati eseguiti 350.000 interventi sulla valvola mitrale o aortica, di cui 46.342 di riparazione e 287.989 di sostituzione, ad un costo medio di \$ 141.120 e riportando un tasso di mortalità pari a 4,98% [7].

La **valvulopatie**³ possono essere congenite, presenti quindi dalla nascita, o acquisite: quest'ultime a loro volta possono essere di origine degenerativa, infettiva, ischemica, traumatica o derivante da una dilatazione del ventricolo e/o dei grandi vasi [5].

Per la risoluzione delle valvulopatie si ricorre al trattamento chirurgico; molti specialisti concordano sul fatto che i sostituti biologici siano migliori di quelli sintetici e meccanici [6].

Le protesi valvolari differiscono tra di loro per diverse caratteristiche, quali la durevolezza, la trombogenicità ed il profilo emodinamico.

Le valvole meccaniche (Figura 2) hanno come vantaggio il fatto di non rovinarsi nel tempo (durano 20/30 anni), sono quindi destinate a soggetti giovani; un loro grosso svantaggio è però il fatto di costringere il paziente ad assumere una terapia anticoagulante a vita [9].

³ Termine generico per indicare un'alterazione della funzionalità delle valvole cardiache che, per malattie congenite o malattie acquisite non si chiudono correttamente per cui il sangue ritorna nella camera da cui proviene (*insufficienza*) o non si aprono completamente per cui il sangue è impedito nel suo deflusso (*stenosi*), o presentano entrambi questi inconvenienti (*steno-insufficienza*) [8].

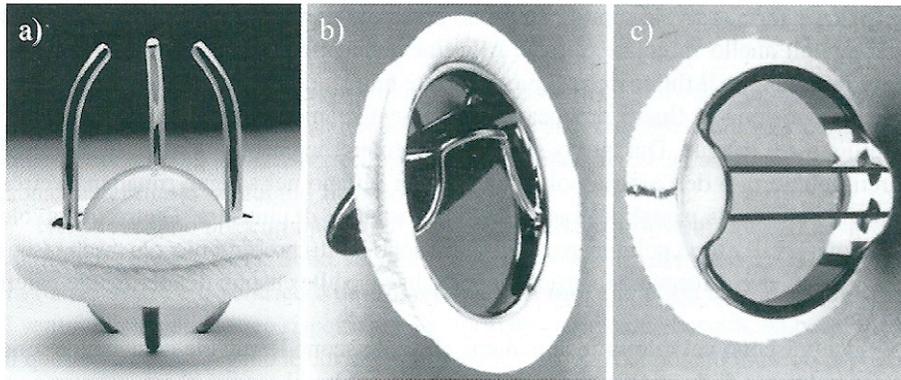


Figura 2 – Esempi di valvole cardiache meccaniche: a) caged-ball (Starr-Edwards); b) single-tilting-disk (Medtronic-Hall); c) bileaflet-tilting-disk (St. Jude Medical) [5].

Per contro, le protesi biologiche (Figura 3), pur durando di meno (10/15 anni; quindi indirizzate prevalentemente a pazienti anziani o comunque con un'aspettativa di vita inferiore ai 10-15 anni), presentano un maggiore adattamento alle caratteristiche dell'ambiente cardiovascolare del paziente.

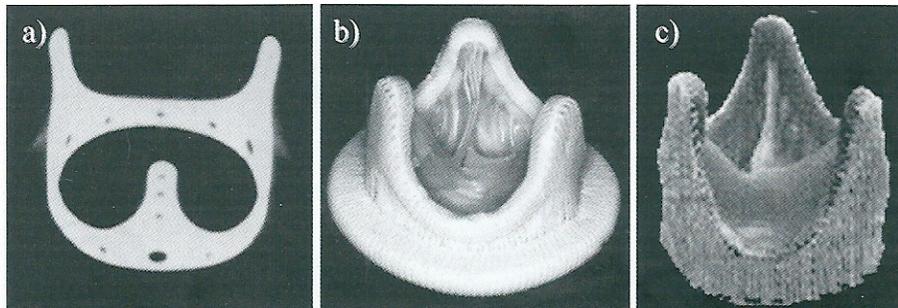


Figura 3 – Protesi valvolari biologiche: a) stent; b) valvola su stent; c) valvola stent-less [5].

LIMITI DELL'INGEGNERIA DEI TESSUTI

Uno dei principali problemi da risolvere è la vascolarizzazione: la funzionalità di cellule e tessuti dipende in maniera fondamentale dalla possibilità di essere adeguatamente ossigenati e di poter espellere e allontanare i prodotti di rifiuto risultanti dalla normale attività metabolica. Questa funzione deve essere garantita e controllata sia in fase di crescita e maturazione in vitro, sia durante l'impianto e la successiva interazione e integrazione con l'organismo. Le difficoltà insorgono quando le cellule vengono coltivate in sistemi tridimensionali di particolare geometria e nel momento dell'impianto in vivo. I tessuti quindi costituiti da aggregati cellulari di dimensioni consistenti non possono essere impiantati se non si predispona di una sede opportunamente vascolarizzata oppure della possibilità di formare nuovi vasi. Se invece vengono impiantati tessuti in prossimità della parete vascolare, in questo caso il contatto con il sangue garantisce una adeguata ossigenazione, ma può causare problemi di deposito e formazione di trombi. Per quanto concerne questo punto, si sta cercando di utilizzare superfici a contatto con il sangue rivestite da cellule endoteliali del paziente, anche se le difficoltà insorgono nella loro reperibilità e resistenza meccanica al flusso sanguigno [7]. Un altro aspetto fondamentale dell'ingegneria tissutale riguarda la differenziazione cellulare. L'ottenimento di nuovo tessuto prevede, infatti, la differenziazione delle cellule durante la loro maturazione ed espansione in vitro su appositi scaffolds. Ci sono due possibilità:

1. la prima prevede la formazione di neo-tessuto a partire da cellule differenziate del paziente; in questo caso le cellule proliferano in vitro andando incontro a un processo iniziale di de-differenziazione a seconda delle condizioni fisico-chimiche che si sperimentano;
2. la seconda possibilità riguarda l'utilizzo di cellule staminali indifferenziate e comporta la conoscenza adeguata e approfondita dei fattori in grado di indurre il differenziamento delle cellule utilizzate. Il percorso di ricerca è però ancora lungo e ostacolato, in parte, da problemi di natura etico-religiosa.

Un altro punto cruciale è la risposta dell'organismo al materiale impiantato. Affinché vi sia un'integrazione funzionale del neo tessuto è necessario che l'organismo reagisca

all'impianto di cellule e tessuti e influenzi la durata del mantenimento delle proprietà fisico-chimiche e meccaniche dello stesso, evitandone deterioramento, danneggiamento e conseguente perdita della originaria funzionalità. Se il materiale fosse accettato dall'organismo in maniera passiva non sarebbe possibile ottenere l'interazione funzionale per la quale il tessuto è stato programmato, coltivato e impiantato. La scelta di utilizzare cellule autologhe per ingegnerizzare tessuti destinati ad uso clinico garantisce una completa accettabilità delle componenti cellulari da parte del sistema immunitario del paziente, ma non garantisce una corretta attrazione cellulare e produzione di matrice extracellulare.

ANATOMIA DELLA VALVOLA CARDIACA AORTICA

Le valvole cardiache sono tessuti vitali e dinamici, composti da cellule specializzate e da matrice extracellulare, che rispondono e si rimodellano in risposta ai cambiamenti locali delle forze meccaniche [10].

Le valvole sono costituite da lamine sottili (lombi), flessibili e resistenti, di tessuto fibroso rivestito da endotelio, saldamente ancorate agli anelli valvolari. I movimenti dei lombi sono passivi e l'orientamento delle valvole assicura l'unidirezionalità del flusso sanguigno attraverso il cuore [9].

La valvola aortica è costituita da tre lombi valvolari (Figura 4a) ed è posta tra il ventricolo sinistro e l'arteria aorta. Il ventricolo sinistro è la parte del cuore che ha il compito di pompare il sangue ossigenato a tutto il corpo attraverso l'aorta. La valvola aortica si apre durante la sistole ventricolare (cioè nel momento in cui il cuore si contrae per pompare), lasciando passare il sangue nell'aorta, e poi si richiude, impedendo al sangue di tornare al ventricolo durante la diastole (cioè durante la fase di rilasciamento e riempimento che precede la contrazione successiva). Funge quindi da valvola unidirezionale, permettendo al sangue ossigenato di fluire dal ventricolo sinistro all'aorta [2].

Circa 40 milioni di volte l'anno l'apertura e la chiusura dei lombi valvolari induce dei cambiamenti nella forma, dimensioni e forze dei lombi stessi e delle strutture di supporto [9].

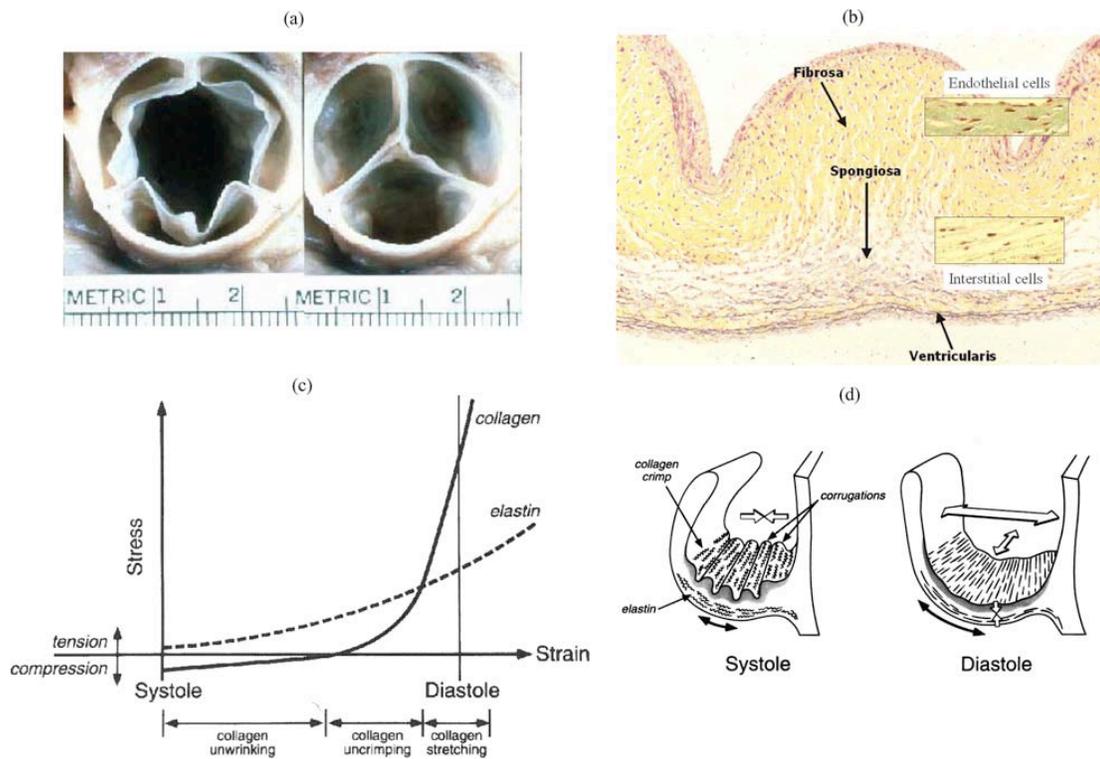


Figura 4 – a) valvola aortica aperta e chiusa; b) istologia della valvola aortica; c) cooperatività biomeccanica tra elastina e collagene durante il movimento della valvola; d) rappresentazione schematica della struttura stratificata della valvola aortica cuspidale e della configurazione di collagene ed elastina durante la sistole e diastole [9].

Le valvole cardiache native sane mantengono il flusso unidirezionale del sangue attraverso una struttura straordinariamente funzionale dal punto di vista dinamico; struttura caratterizzata da vitalità, resistenza a ripetuti stress meccanici (fatica), con capacità di adattarsi e riparare lesioni.

Gli elementi funzionali chiave delle valvole cardiache sono:

- la matrice extracellulare: costituita da collagene, elastina e glicosamminoglicani (GAG);
- le cellule: interstiziali o endoteliali;
- i vasi sanguigni, i nervi e altri componenti base.

La valvola aortica è quella che meglio illustra le caratteristiche essenziali; inoltre essa si ammala più frequentemente rispetto alla polmonare e mitrale ed è quindi quella più comunemente sostituita [9]. Essa è costituita da tre strati distinti (Figura 4b):

1. strato ventricolare: più vicino alla superficie di afflusso, ricco di elastina;
2. strato fibroso: più vicino alla superficie di deflusso, costituito principalmente da collagene;
3. strato spongioso: situato in posizione centrale, costituito prevalentemente da GAGs.

MALATTIE DELLE VALVOLE CARDIACHE

Le malattie che colpiscono le valvole cardiache sono definite valvulopatie. La valvola aortica si ammala per diversi motivi: vi può essere una anomalia congenita che può richiedere la correzione subito, se grave, oppure predisporre ad una degenerazione che avviene più tardi nella vita; oppure vi possono essere delle malattie acquisite che colpiscono la valvola stessa.

L'anomalia congenita più frequente è data dalla *bicuspidia*. In genere la valvola aortica ha tre lembi valvolari o *cuspidi*, ma a volte può presentarne soltanto due (Figura 5).

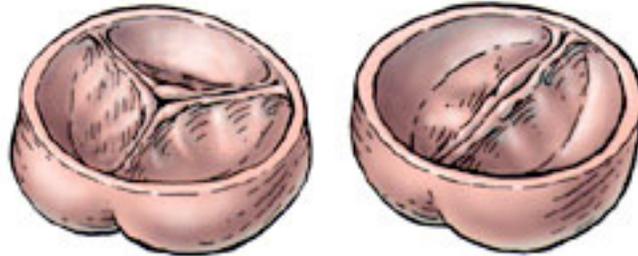


Figura 5 - Valvola normale (a sinistra) e bicuspidia (a destra).

La valvola bicuspidia è presente nell'1-2 % della popolazione, e rappresenta la seconda causa più frequente di alterazione tale da richiedere l'intervento. Queste valvole possono funzionare relativamente bene per molti anni prima di diventare *stenotiche* (con un orifizio troppo stretto) oppure *insufficienti* (non più in grado di chiudersi bene).

La causa più frequente di malattia valvolare necessitante la sostituzione è la *degenerazione* senile: la valvola, invecchiando, si indurisce e vi si depositano noduli di calcio che ne impediscono il funzionamento. La seconda causa più frequente è la malattia reumatica, che provoca fusione e retrazione cicatriziale dei lembi, lasciando una

valvola allo stesso tempo stenotica ed insufficiente. Altre cause meno frequenti di valvulopatia aortica comprendono le infezioni (dette *endocarditi*), il prolasso di una cuslide e le malattie dell'aorta stessa, come aneurismi e dissezioni [9].

Il trattamento risolutivo delle valvulopatie solitamente è quello chirurgico: la valvola nativa viene quindi sostituita con protesi che possono essere meccaniche o biologiche. La scelta viene fatta in relazione all'età del paziente e alle sue condizioni di salute.

Se la strada scelta è quella dell'impianto di una valvola di origine biologica, allora sarà necessario un condizionamento dinamico della valvola stessa, in modo che si ripopoli di cellule del ricevente e che possa essere trapiantata nel paziente stesso senza il rischio di rigetto. Affinché ciò avvenga, ci si avvale dell'utilizzo di un bioreattore dinamico, i cui sviluppi vengono analizzati nel Capitolo successivo.

CAPITOLO 1

EVOLUZIONE DEI SISTEMI BIOREATTORE

La sfida della medicina rigenerativa è quella di personalizzare i trattamenti terapeutici, adeguandoli alle necessità del singolo paziente; da qui l'idea di utilizzare cellule autologhe per creare tessuti o organi che andranno a integrare e sostituire le funzioni dei tessuti e organi malati.

Il dispositivo che permette la realizzazione di questi nuovi costrutti è il bioreattore. I bioreattori sono definiti come *“dispositivi in cui i processi biologici e/o biochimici si sviluppano in un ambiente e in condizioni operative altamente monitorate e controllate”* [2].

Il processo di crescita cellulare e poi tessutale è realizzato in appropriati ambienti che trasmettono stimoli precisi alle cellule in coltura. I campi fisici applicati possono indurre le cellule a modificare la loro forma e promuovere la secrezione di particolari sostanze che compongono la matrice extracellulare.

Consentendo variazioni riproducibili e controllate di specifici fattori ambientali, i bioreattori forniscono lo strumento tecnologico per individuare i meccanismi che regolano lo sviluppo tridimensionale delle cellule e, quindi, possiedono la capacità di accrescere la qualità dei tessuti ingegnerizzati.

I bioreattori sono utilizzati per ottimizzare l'apporto di nutrienti, di fattori di crescita, il rifornimento di ossigeno e la stimolazione meccanica del tessuto in via di formazione. I vari sistemi sono classificati in accordo con il principale tipo di stimolo applicato; alcuni bioreattori utilizzano stimoli meccanici per incoraggiare l'attività di sintesi delle cellule, altri impiegano flussi fluidi a perfusione per sostenere il trasporto di nutrienti e rendere il costrutto omogeneo. Questi sistemi rappresentano quindi un'attrattiva per conferire le proprietà biochimiche e meccaniche adeguate al tessuto ingegnerizzato, attraverso un controllo del trasporto di massa e l'applicazione di stimoli fisici.

Le specifiche generali di progetto dei bioreattori per la medicina rigenerativa sono:

- affidabilità del sistema: si parla anche di lunghi periodi di coltura, quindi il sistema deve prevedere possibili modifiche successive e considerare quindi

requisiti di modularità che ne semplifichino l'attuazione. Particolare attenzione deve anche essere posta al contenimento dei costi di progettazione e dei costi di utilizzo dello strumento;

- compatibilità con le procedure di laboratorio: il sistema per la coltura cellulare deve garantire un ambiente sterile;
- sterilizzabilità dei componenti a contatto con il mezzo di coltura e le cellule: la scelta del metodo di sterilizzazione dipende dal tipo di materiale scelto per la realizzazione del bioreattore;
- ingombro ridotto, per poter essere eventualmente inseriti all'interno di un incubatore;
- facilità di regolazione dei parametri di sollecitazione: il sistema deve poter essere utilizzato da molti utenti, anche non competenti;
- facilità di ricambio del mezzo di coltura;
- fasi di lavorazione automatizzata: ciò è essenziale non solo per controllare studi di base statisticamente rilevanti, ma anche per una futura produzione routinaria in campo clinico.

Dovendo preservare la sterilità dell'ambiente, generalmente le cellule in coltura devono essere mantenute in condizioni di atmosfera controllata mediante appositi incubatori, che permettono di mantenere una temperatura di 37 °C e una pressione parziale di CO₂ pari a quella misurata all'interno dei tessuti, cioè attorno al 5%. Il controllo della temperatura è necessario sapendo che le cellule possono sopportare l'ipotermia ma non l'ipertermia (T>43°C) [3].

Il pH complessivo è invece dato dall'equazione di Henderson Hasselbach riportata di seguito:

$$pH = 6,1 + \frac{\log HCO_3^-}{CO_2}$$

Il valore ottimale del pH per la crescita cellulare è compreso tra 7,2 e 7,4 [3].

Differenti sistemi di reazione per la rigenerazione del tessuto cardiaco sono stati sviluppati negli ultimi decenni in modo da ottenere bioreattori sempre più efficaci, aumentando gli standard di qualità e sicurezza del processo e del prodotto biologico,

diminuendo i fattori di rischio e i costi di produzione, aumentando i volumi di produzione e la fiducia nel prodotto biologico ingegnerizzato, in modo da avere conseguentemente un aumento della domanda e degli investimenti nel settore. Tutto ciò in linea con le richieste della Commissione Europea che richiede una diminuzione del livello di rischio associato alla produzione di tessuti biologici e un aumento degli standard di qualità ed efficacia [3].

L'adesione delle cellule e la loro penetrazione all'interno dello scaffold sono essenziali per un'adeguata produzione di tessuto ingegnerizzato. Generalmente la dimensione dei tessuti ingegnerizzati è limitata, poiché queste strutture non sono vascolarizzate e le cellule sono fornite attraverso la sola diffusione. La semplice deposizione della sospensione cellulare sullo scaffold e la successiva coltura in **condizioni statiche** non garantiscono un'adesione adeguata e una crescita uniforme in quanto le cellule tendono a rimanere sulla superficie esterna del materiale e a distribuirsi in maniera irregolare su di esso. Le colture in condizioni statiche non permettono ai nutrienti di raggiungere le parti centrali del tessuto in formazione.

In base a queste considerazioni si è scelto di ricorrere a colture in **condizioni dinamiche**, le quali forniscono risultati nettamente migliori.

L'impiego di bioreattori a perfusione⁴ è vantaggioso perché:

- aumenta l'efficacia dei processi di semina e l'uniformità della distribuzione delle cellule all'interno di scaffolds porosi, consentendo l'ottenimento di costrutti ingegnerizzati più omogenei;
- aumenta l'efficienza del trasporto di ossigeno e metaboliti e della rimozione di cataboliti;
- se associato all'uso di sensori di ossigeno e pH e all'implementazione di strategie di controllo in retroazione, consente di automatizzare e controllare le operazioni di ricambio del mezzo di coltura;
- permette la sollecitazione fisica delle cellule seminate negli scaffolds porosi determinando condizioni di coltura che meglio rappresentano quelle cui i tessuti

⁴ Consentono una continua sostituzione del terreno di coltura esausto con terreno fresco e un'opportuna eliminazione dei metaboliti escreti dalle cellule.

sono sottoposti nel naturale sviluppo in vivo;

- diminuendo il ricorso alle operazioni manuali, favoriscono la traduzione delle procedure dell'ingegneria dei tessuti dalla ricerca all'applicazione clinica, aumentando la tracciabilità, la riproducibilità, l'efficienza e la sicurezza dei processi.

I sopraelencati sono requisiti chiave affinché tali procedure possano competere con le alternative terapeutiche tradizionali, sia in termini di costo che in termini di rispetto delle regole di produzione [2].

Come passo successivo sono stati sviluppati bioreattori dinamici per TEHVs⁵, che, oltre a garantire un controllo del pH, della temperatura e delle concentrazioni di O₂, CO₂ e nutrienti disciolti nel terreno di coltura, sono in grado di realizzare un flusso pulsatile che simula i regimi pressori (80-120 mmHg per la circolazione sistemica e 20-40 mmHg per la circolazione polmonare), la frequenza cardiaca (60-100 bpm) e la gittata sistolica (50-60 ml) caratteristici del sistema cardiocircolatorio umano. Per raggiungere tali regimi si è fatto ricorso a pompe peristaltiche, centrifughe e pneumatiche, associate a generatori di forme d'onda programmabili, in grado di ricreare il flusso cardiaco fisiologico.

I bioreattori per TEHVs sono quindi progettati per soddisfare due scopi principali:

1. *chiarire* i meccanismi di interazione tra le cellule e scaffold;
2. *preparare* un impianto TEHV in ambiente *vitale*.

I vari tipi di bioreattori dinamici proposti sono accomunati da alcuni elementi costitutivi fondamentali (Figura 6)

⁵ Tissue Engineered Heart Valves.

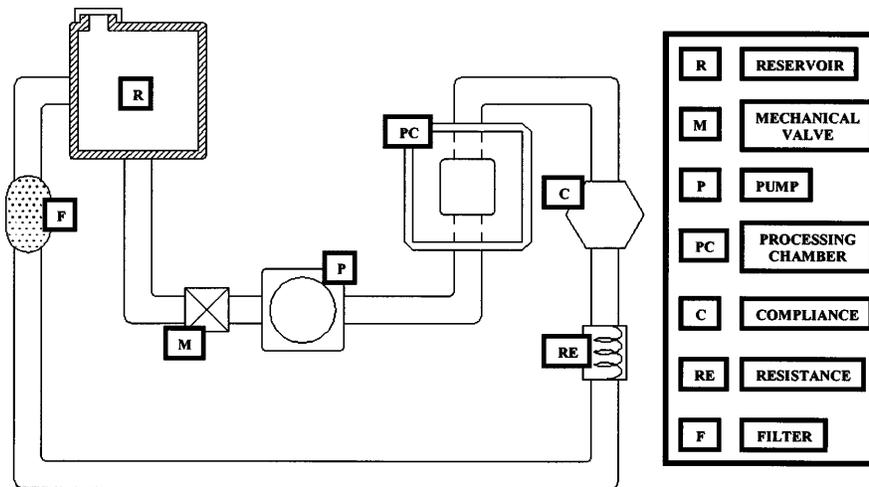


Figura 6 - Schema generale della struttura di un bioreattore dinamico [4].

Gli elementi costitutivi di un generico bioreattore dinamico sono:

- una pompa azionata da un motore (pneumatico, elettrico o meccanico) ed interfacciata con un generatore d'onde in grado di creare un flusso simile a quello prodotto dal cuore;
- una camera di processo dove viene collocata la valvola cardiaca;
- una *compliance* che simula l'energia elastica accumulata nelle arterie e responsabile del ritardo e della forma d'onda della pressione;
- una resistenza necessaria per simulare i restringimenti vascolari, solitamente collocata a valle della TEHV;
- un circuito idraulico per collegare i vari componenti;
- alcuni sensori per controllare i parametri dell'ambiente di coltura.

Solitamente questi componenti, fatta eccezione per il motore, sono costituiti da materiali polimerici (polietilene, Teflon, polipropilene) approvati dalla FDA; in ogni caso devono essere biocompatibili e in grado di resistere ai processi di sterilizzazione. I vari sensori, tranne le sonde di pressione, sono generalmente dispositivi monouso [11].

Di difficile simulazione nella progettazione di sistemi bioreattore sono i parametri che permettono di riprodurre un esatto ambiente fisiologico cardiovascolare. La relazione non lineare esistente tra il flusso dinamico e la pressione sanguigna è una conseguenza diretta della non-linearità dei fenomeni fisici, in particolare l'interazione tra il fluido e la

visco-elasticità dei tessuti [6]. I bioreattori più evoluti sono sviluppati secondo una struttura basata su modelli matematici costituiti da diverse componenti di base: la fonte del flusso, le resistenze del flusso, gli accumulatori elastici e le componenti inerziali. Ogni componente di questi modelli rappresenta una componente fisica del bioreattore, che a sua volta simula una proprietà reale dell'ambiente cardiovascolare.

Tutti i bioreattori pulsatili, in generale, funzionano allo stesso modo, presentando piccole differenze che riproducono diversi ambienti emodinamici. In Figura 7 si riportano i cinque schemi di bioreattore più rilevanti.

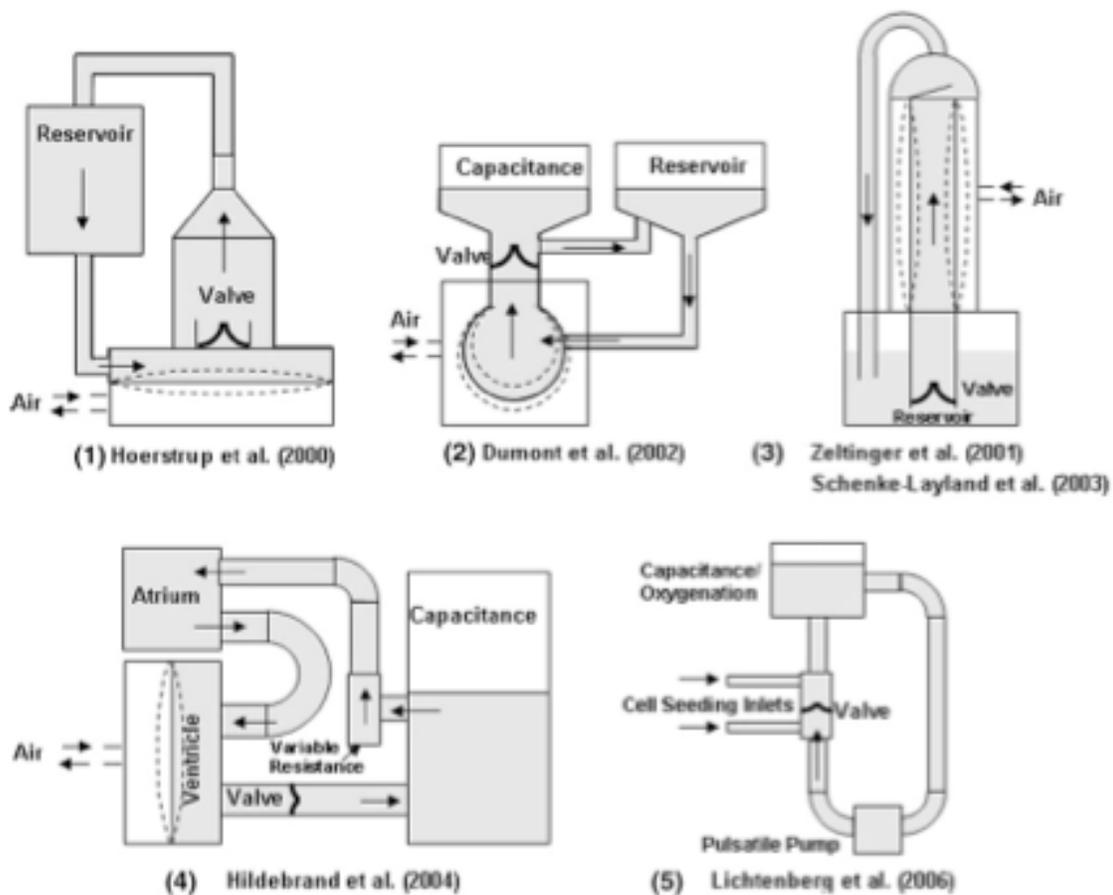


Figura 7 – Schemi di cinque bioreattori per valvole cardiache [7].

Come si può osservare diversi ricercatori hanno creato molteplici bioreattori pulsatili per il condizionamento delle TEHVs. Hoerstrup e collaboratori creano il primo bioreattore per valvole cardiache compatto, costituito da una camera d'aria, una camera di mezzo e una camera di perfusione contenente la valvola cardiaca. Il sistema presenta anche un diaframma, localizzato tra la camera d'aria e quella contenente il mezzo, che consente la creazione del flusso pulsatile. Si raggiungono portate di 50-2000 ml/min e valori di pressione contenuti nell'intervallo 10-240 mmHg [7].

In uno studio successivo di Hoerstrup, i costrutti PGA⁶ TEHV sono seminati con ECs⁷ carotidiche e miofibroblasti carotidici. Tutte le valvole mostrano un aumento della produzione di collagene, DNA totale e resistenza meccanica simile a quella delle valvole native.

Nel 2001 Zeltinger e il suo gruppo di ricerca realizzano un semplice bioreattore pneumatico in cui la pressione viene controllata da un meccanismo a timer, senza però tenere in considerazione i parametri fisiologici. Partendo da una valvola aortica di origine porcina decellularizzata ed in seguito seminata con fibroblasti umani neonatali, riescono a ricreare una valvola cardiaca ingegnerizzata in un periodo compreso tra le 2 e le 4 settimane di coltura all'interno del bioreattore [10]. Il costrutto così ottenuto non ha però successo una volta inserito in vivo nel modello animale, perché la tipologia di cellule utilizzata non risulta accuratamente differenziata e non ha provveduto ad un'opportuna sostituzione dello scaffold con nuova ECM. I lembi della valvola risultano quindi eccessivamente spessi e provocano fenomeni di stenosi valvolare in vivo.

Nel 2002 viene pubblicato dalla rivista *Journal of Artificial Organs* un articolo in cui si illustrato il lavoro di Dumont e colleghi, i quali realizzano un sistema meccanico basato su un'imitazione della circolazione sanguigna che coinvolge la parte sinistra del cuore, riuscendo a produrre un bioreattore a flusso pulsatile che offre la possibilità di variare alcune caratteristiche idrodinamiche. Il dispositivo progettato è formato da due parti principali: una struttura che rappresenta il ventricolo sinistro e un post-carico ottenuto con una *compliance* (che simula le perdite elastiche dovute alla circolazione nelle grandi

⁶ Acido poliglicolico.

⁷ Endothelial Cells.

arterie) e con una resistenza variabile (che rappresenta la resistenza incontrata dal flusso sanguigno attraverso arteriole e capillari). Il ventricolo, realizzato in silicone, viene compresso ed espanso mediante il movimento di un pistone che consente di variare il volume eiettato e la frequenza. La valvola cardiaca è situata nella zona compresa tra il ventricolo e la *compliance*.

Sempre nello stesso anno Sodian e collaboratori progettano un sistema a flusso pulsatile in grado di riprodurre varie condizioni di flusso e pressione in un ambiente controllato a 37° C e al 5% di CO₂ [11]. Per mezzo di questo dispositivo si riesce a stimolare la deposizione di nuova ECM e a promuovere la proliferazione cellulare rispetto alle colture statiche, mettendo in evidenza un allineamento delle cellule lungo la direzione del flusso, con la tendenza a formare uno strato omogeneo. Le cellule sottoposte a tali sollecitazioni sono inoltre in grado di produrre collagene e glicosamminoglicani (GAGs) in quantità decisamente superiori rispetto alle cellule coltivate in condizioni statiche, anche se non viene evidenziata alcuna produzione di elastina.

Nel 2003 Schenke-Layland e collaboratori creano un sistema simile a quello di Zeltinger, solamente che in questo caso la valvola cardiaca è stata posta al di sotto di un recipiente che funge da pompa. Con questo bioreattore si raggiunge una velocità di 3 L/min ad una pressione di 60/40 mmHg [7].

Nel 2005 Molet et al. progettano un DPD (*Diastolic Pulse Duplicator*) in grado di simulare la fase di sforzo massimo prodotto dal cuore (fase diastolica) [12]. Questa sorta di pulse duplicator è formato da un bioreattore in cui viene alloggiata la valvola in coltura e da un serbatoio che contiene il terreno di coltura. Tali recipienti, realizzati in policarbonato, sono collegati mediante due serie di tubi in silicone disposti tra loro in parallelo che vanno a connettersi con la pompa responsabile della circolazione del mezzo di coltura dal serbatoio al bioreattore. Una parte di questi tubi in silicone è collegata con un cilindro in policarbonato all'interno del quale l'aria può entrare e uscire per mezzo di una valvola magnetica; in tal modo, comprimendo o decomprimendo il volume d'aria presente all'interno del cilindro, è possibile creare un gradiente di pressione che è proprio quello da applicare alla valvola. Seminando uno scaffold valvolare sintetico (cioè costituito da materiali polimerici biodegradabili e/o

biorassorbibili, come i poliesteri PLA, PGA) con cellule somatiche contenute in una soluzione di fibrina e sottoponendo il costrutto così ottenuto alle condizioni di coltura realizzate con il DPD, gli autori notano che il tessuto neo-formato si presenta più omogeneo e denso rispetto a quello coltivato senza applicare questi carichi dinamici, registrando inoltre una deposizione anisotropa delle fibre molto simile a quella presente nel tessuto naturale [12].

Lichtenberg et al. nel 2006 progettano un bireattore che comprende una pompa pulsatile, per mezzo della quale si può avere il controllo diretto della portata. Trasduttori di flusso, pressione e temperatura monitorano le condizioni all'interno del bireattore; una pompa a rulli fornisce un flusso continuo di gas attraverso la camera di ossigenazione. Questo sistema è utilizzato per le valvole cardiache preconditionate per uso clinico.

Un'evoluzione nella progettazione dei bioreattori è rappresentata dal dispositivo realizzato dal gruppo di ricerca guidato da Hildebrand, nel 2004. L'apparato (Figura 8) è costituito da un atrio che riempie, grazie ad un gradiente gravitazionale, il ventricolo sottostante, ad azionamento pneumatico, dotato di una valvola meccanica di afflusso e di una valvola biologica di efflusso. Le onde di pressione e di flusso sono controllate sia attraverso la regolazione di una *compliance* e di una resistenza, sia agendo sul motore pneumatico. Il dispositivo è inoltre equipaggiato con sensori per la misura della pressione e con una sonda ad ultrasuoni per monitorare l'andamento del flusso nella zona compresa tra la valvola e la *compliance*.

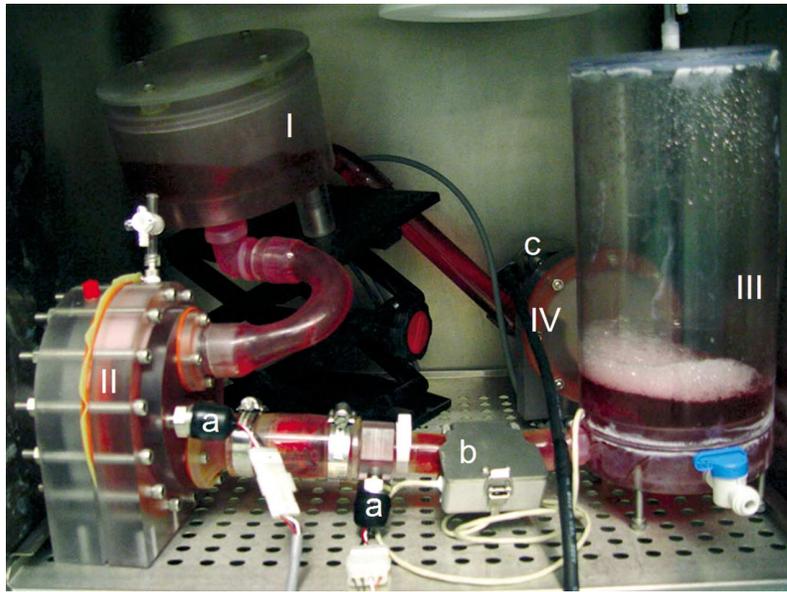


Figura 8 - Bioreattore per TEHV realizzato da Hildebrand [11].

L'aspetto innovativo di questo bioreattore è la possibilità di controllare in modo automatico la pressione media e il volume medio, riducendo così il numero di interventi da parte dell'operatore; inoltre è equipaggiato con sensori di pressione e sonde per la rilevazione del flusso.

L'intero dispositivo è controllato attraverso un software che realizza un controllo predittivo del regime idrodinamico agendo sull'ampiezza dell'onda di pressione e sulla resistenza del sistema; è prevista anche la possibilità di variare la frequenza, la gittata e il range pressorio in modo da ricreare condizioni di stress meccanico il più possibile simili a quelle fisiologiche.

Nel 2009 Syedain e Tranquillo si concentrano principalmente sul controllo dello stiramento della TEHV. Essendo il rimodellamento e lo sviluppo del tessuto correlati all'ampiezza della tensione imposta, essi dimostrano che specifici cicli di stiramento devono essere applicati allo scaffold per migliorare le proprietà strutturali e favorire la produzione di nuova ECM [13]. Variando inoltre la frequenza e l'ampiezza della sollecitazione, notano che è possibile migliorare decisamente la flessibilità dell'intera struttura. Per verificare le loro ipotesi costruiscono un semplice bioreattore, rappresentato schematicamente in Figura 9, formato da un cilindro in lattice, all'interno

del quale viene montata la valvola ingegnerizzata, collegato alle estremità con due circuiti idraulici utilizzati per il controllo delle sollecitazioni applicate alla valvola e per l'apporto di sostanze nutritive.

La massima deformazione e la frequenza del ciclo di carico sono determinate da una pompa a siringa, in grado di iniettare e prelevare terreno di coltura da entrambe le estremità del cilindro in lattice, una delle quali è dotata di una finestra in vetro per poter monitorare costantemente l'evoluzione del tessuto coltivato. Per il ricircolo delle sostanze nutritive viene utilizzato il secondo circuito idraulico, per mettere in collegamento il tubo contenente la valvola ingegnerizzata con un serbatoio contenente terreno di coltura: una pompa peristaltica regola il movimento del fluido.

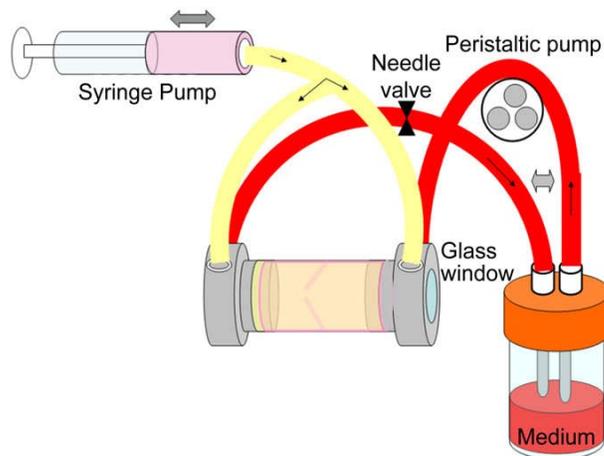


Figura 9 - Schema del bioreattore realizzato da Syedain [13].

Morsi e Ruel hanno come obiettivo la progettazione di bioreattori che nella loro struttura sono possibilmente privi di angoli morti, ritenuti i principali responsabili della propagazione di un flusso non uniforme e non ottimale. Il progetto di Morsi del 2007 [14] prevede la costruzione di un bioreattore verticale caratterizzato da tre compartimenti: la camera d'aria, la camera di pressione e quella di per fusione (Figura 10).

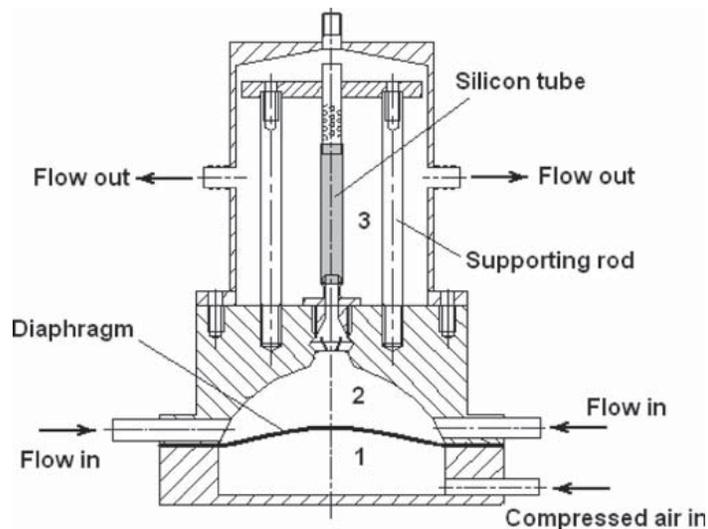


Figura 10 - Bioreattore verticale realizzato da Morsi [14].

La camera d'aria contiene un diaframma in silicone che la separa dalla camera di pressione; riempiendo il compartimento di aria attraverso una pompa si provocano vibrazioni della membrana, generando una differenza di pressione tale da spingere il terreno di coltura dalla camera di pressione verso quella di perfusione, all'interno della quale è posizionato lo scaffold valvolare da coltivare trattenuto da un cilindro di silicone. Tra la camera di pressione e quella di perfusione viene collocata una valvola unidirezionale per evitare fenomeni di reflusso; la scelta ricade su una valvola aortica bi-leaflets perché presenta le minori interazioni con il flusso e le migliori caratteristiche emodinamiche.

Nel 2008 Ruel e collaboratori realizzano un dispositivo per la coltivazione delle valvole cardiache in cui il flusso pulsatile è prodotto da una pompa ventricolare formata da due camere ermeticamente separate per mezzo di una membrana flessibile, come illustrato in Figura 11. Il compartimento inferiore viene riempito ciclicamente d'aria che esercita una pressione sulla membrana flettendola in avanti e provocando l'eiezione di un certo volume di terreno di coltura dal compartimento superiore, avente una forma convergente in modo da minimizzare le turbolenze e garantire una velocità del flusso il più possibile omogenea. Nel compartimento superiore è collocata anche una valvola di non ritorno che si apre, facendo entrare il fluido, quando la membrana si muove verso il basso, e si

chiude quando la membrana si flette in avanti per provocare l'eiezione del terreno di coltura.

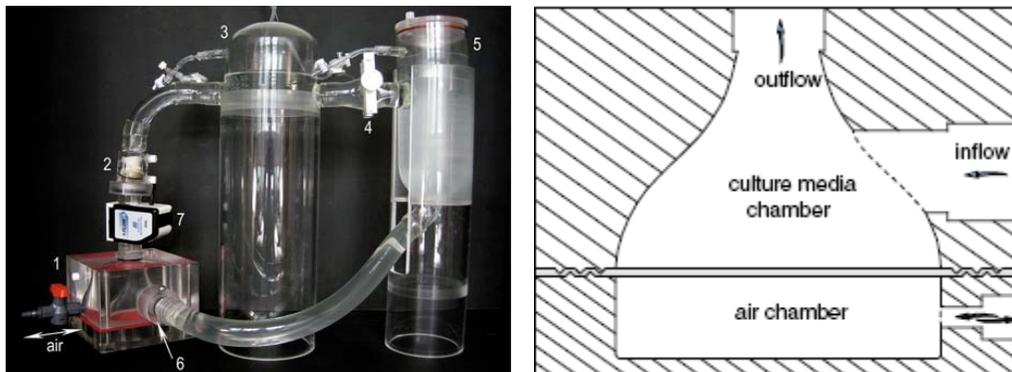


Figura 11 - Bioreattore realizzato da Ruel [14] e sezione verticale della pompa ventricolare [14].

A valle della pompa ventricolare è posta la valvola da coltivare, avvolta da un supporto artificiale che deve simulare la reale collocazione della valvola nella radice aortica. In serie alla valvola cardiaca sono disposte la *compliance* e la resistenza variabile. La *compliance* è un cilindro con un volume di circa 1300 ml riempito di fluido nella parte inferiore e con circa 900 ml di aria nella parte superiore, mentre la resistenza può essere regolata manualmente ed agisce senza entrare in contatto diretto con il fluido [14]. L'aria all'interno della *compliance* può essere compressa fino a una pressione massima il cui valore dipende dal volume iniziale contenuto all'interno del cilindro, dalla gittata della pompa e dall'entità della restrizione provocata dalla resistenza variabile. L'ultimo elemento di questo bioreattore è un serbatoio contenente il terreno di coltura; questa struttura serve sia per rifornire la pompa di fluido, sia per consentire di applicare un certo livello di pressione all'intero sistema. Il dispositivo è interfacciato tramite porta USB con un computer e controllato mediante un'apposita applicazione realizzata in LabView™.

Nel 2009 Vismara si concentra sulla realizzazione della camera di coltura, costruita in polimetilmetacrilato (PMMA) e dotata di vari accessori in Teflon® e polioossimetilene (POM) per collocare lo scaffold valvolare, minimizzando le manipolazioni da parte dell'operatore, in modo da poter preservare il più possibile la sterilità e quindi l'integrità

della struttura da coltivare [15]. Il dispositivo è in grado di produrre una stimolazione pulsatile di tipo diastolico (DPS) mediante una pressurizzazione transvalvolare mantenendo la valvola nella posizione prestabilita, grazie all'apposita camera di coltura (Figura 12).

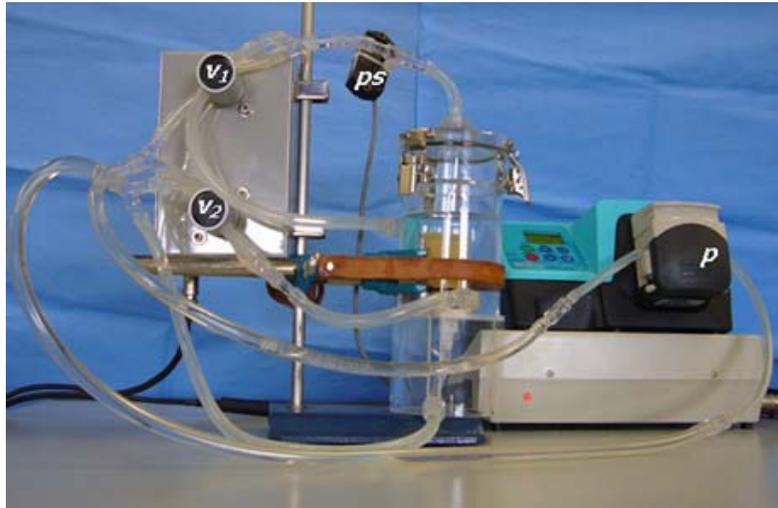


Figura 12 - Bioreattore realizzato da Vismara [15].

Questo bioreattore permette anche di monitorare la *compliance* valvolare, utilizzata come indice dello stato di maturazione del tessuto ingegnerizzato e del comportamento biomeccanico della struttura.

CAPITOLO 2

INTRODUZIONE AL BIOREATTORE INNOVATIVO PER TEHVs

L'obiettivo della progettazione del bioreattore innovativo per TEHV è la riproduzione di un regime idrodinamico ottimale per il condizionamento di valvole cardiache ingegnerizzate. Per avere quindi onde di pressione e di flusso con andamenti stabili e riproducibili, si è introdotto un motore lineare che, guidato da un sistema di controllo digitale collegato ad un computer, realizza un preciso controllo in retroazione.

Il bioreattore (Figura 13) è costituito da tre parti distinte connesse tra loro:

1. la pompa: è una sorta di ventricolo in cui lo spostamento del fluido è generato da un pistone con controllo di posizione, la cui legge di movimento varia in base alle condizioni operative scelte dall'utente;
2. il dispositivo in Teflon[®]⁸: al suo interno è collocata una camera contenente lo scaffold biologico (valvola cardiaca). Il diametro della camera può essere fatto variare da 15 a 30 mm, per mezzo di specifici adattatori, a seconda che vengano scelte radici aortiche o polmonari;
3. la camera di compliance.

⁸ Nome commerciale del politetrafluoroetilene. E' un polimero dotato di una buona biocompatibilità grazie alla sua inerzia chimica che lo rende stabile nel tempo. Mantiene costanti le proprietà strutturali in un range termico compreso tra -80°C e +250°C; è completamente insolubile in acqua e in solventi organici; possiede ottime qualità elettriche e di scorrevolezza superficiale.

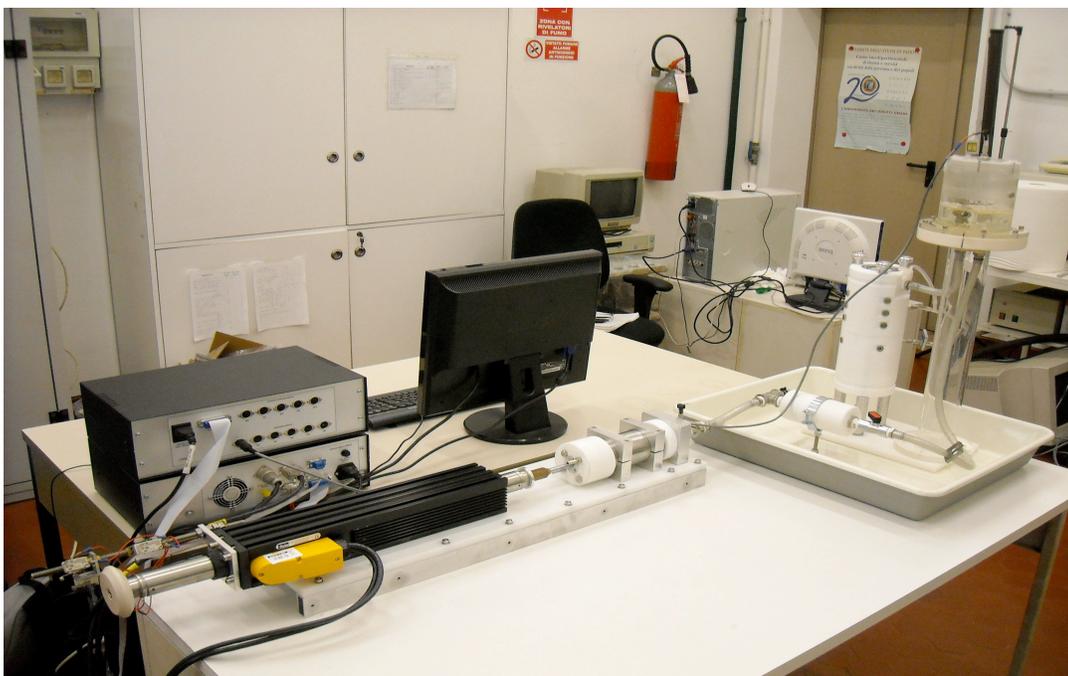


Figura 13 – Configurazione complessiva del bioreattore.

Con l'utilizzo di diverse sonde è possibile rilevare numerosi parametri quali: le concentrazioni di O_2 e CO_2 disciolti nel mezzo di coltura, la temperatura, il pH e la concentrazione di lattato. Queste sonde, tramite l'unità di condizionamento, inviano informazioni al sistema di controllo, che agisce in retroazione sulla pompa al fine di garantire le condizioni di lavoro predefinite.

Il funzionamento del bioreattore è permesso da due unità hardware, una per il controllo del sistema e l'altra di condizionamento dei segnali provenienti dai sensori.

LA POMPA

Attraverso la pompa si vuole simulare il flusso pulsatile del cuore, quindi il suo compito è mettere in movimento il terreno di coltura all'interno del circuito. Come si può osservare in Figura 14, la struttura è ancorata ad una base di Teflon[®], rinforzata con barre di alluminio per evitare movimenti del pistone fuori asse. La pompa è composta da un motore elettrico lineare (Parker PRA3810S) (Figura A1), che ha il compito di azionare il pistone contenuto nel cilindro in acciaio.

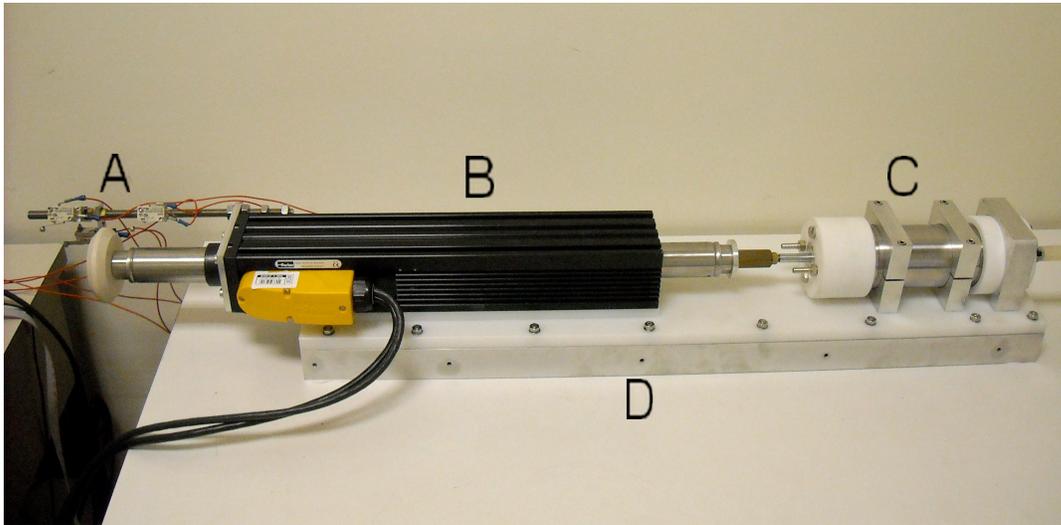


Figura 14 - Il modulo pompa formato dai sensori di zero e di fine corsa (A), dal motore elettrico (B), dal cilindro in acciaio (C) e dalla base in Teflon[®] rinforzata con barre in alluminio (D) [11].

Il movimento del motore deve fare in modo che il liquido di coltura si muova generando un andamento tale da riprodurre le portate (50-60 ml), il regime pressorio (80-120 mmHg e 20-40 mmHg) e le frequenze (60-120 bpm) proprie della circolazione sistemica e polmonare dell'adulto.

Questo tipo di motore è stato scelto per le seguenti caratteristiche:

- elevata efficienza termica, grazie alla dissipazione del calore in tutte le direzioni, che lo rende particolarmente adatto a prolungati cicli di lavoro senza la necessità di dispositivi aggiuntivi di raffreddamento;
- assenza di ingranaggi o parti rotanti, soggette ad usura;
- notevole facilità di manutenzione;
- possibilità di generare forze di picco e carichi in continuo tali da consentire il movimento della massa fluida.

Le principali caratteristiche tecniche del motore Parker PRA3810S [M1] sono:

- forza di picco 1860 N, raggiunto per la durata di un secondo;
- corrente di picco 14.1 A, raggiunta per la durata di un secondo;
- forza erogata in modalità continua 255.0 N;
- corrente di tenuta, per tenere fermo l'attuatore, 1.94 A;
- accelerazione di picco 391 m/s²;

- velocità massima 2.6 m/s;
- massima temperatura supportata dal singolo avvolgimento pari a 100° C [11].

Il motore ad alimentazione trifase è collegato all'unità di controllo che alimenta gli avvolgimenti in modo opportuno, creando un campo magnetico tale da far scorrere l'asta metallica in direzione orizzontale.

Al pistone della pompa (Figura A2) viene imposta una legge di spostamento che viene convertita in una serie di impulsi che fanno assumere al motore la posizione desiderata; esso funziona quindi come un controllore di posizione. Il controllo della posizione del pistone è possibile grazie al segnale di feedback fornito dal sensore di posizione incluso nel motore stesso e dall'elaborazione del driver contenuto nell'unità di controllo.

Uno stelo in acciaio C40⁹, di diametro 10 mm, è collegato all'attuatore del motore elettrico e termina in un pistone di Teflon[®] che scorre all'interno del cilindro in acciaio. Sulla superficie laterale del pistone ci sono due cavità in cui vengono alloggiati il pattino guida antifrizione, realizzato in Teflon[®] caricato con bronzo (40% PTFE e 60% bronzo), che favorisce lo scorrimento all'interno del cilindro, e la guarnizione di tenuta, in Teflon[®] caricato con grafite (60% PTFE e 40% grafite), con un'o-ring sottostante che ha il compito di caricare la guarnizione in modo da mantenerla aderente alle pareti del cilindro; la scelta di realizzare tale componente in Teflon[®] è dovuta al basso coefficiente di attrito di questo materiale che ottimizza lo scorrimento dello stantuffo [11].

Il cilindro è formato da tre parti (Figura A3):

- il corpo centrale in acciaio AISI310¹⁰, di diametro interno pari a 60 mm e spessore 5 mm;
- due testate in Teflon che garantiscono la tenuta idraulica: la testata anteriore è dotata di un foro per l'uscita e l'ingresso del fluido dal cilindro, la testata

⁹ Acciaio allo 0.4% di carbonio, presenta una struttura cristallina cubica a corpo centrato.

¹⁰ Acciaio inox austenitico con struttura cubica a facce centrate, presenta una composizione chimica al 25% di Cr (Cromo) e al 20% di Ni (Nichel); il maggior contenuto di cromo e nichel rispetto agli altri tipi di acciaio, conferisce elevate caratteristiche meccaniche e di resistenza alla corrosione. E' dotato inoltre di ottimo coefficiente igienico e presenta una facile lavorabilità (forgiabile e saldabile).

posteriore è munita di due fori che provvedono a far defluire all'esterno eventuali volumi di liquido filtrati attraverso la guarnizione del pistone.

Il cilindro è ancorato alla piattaforma di Teflon[®] in modo da evitare possibili anomali spostamenti durante il funzionamento del motore.

Alla struttura sono poi ancorati tre sensori di posizione (microswitches Cherry D45X) che rappresentano gli estremi del campo di movimento del motore elettrico (vedi Figura 4). I due sensori di fine corsa¹¹ costituiscono delle protezioni: se attivati, segnalano all'unità di controllo il raggiungimento del "fine corsa" (sia in avanti che indietro) e allo stesso tempo interrompono l'alimentazione a 24 V del drive, bloccando istantaneamente il motore onde evitare possibili danni.

LA CAMERA DI COLTURA

La camera di coltura (Figura 15) è costituita da un cilindro cavo di Teflon[®], al cui interno è posizionato un alloggiamento "porta valvola" di diametro variabile, che serve per sostenere lo scaffold valvolare durante la coltura della TEHV. L'intera struttura è fissata tramite tre supporti cilindrici in Anticorodal, con diametro esterno di 50 mm e altezza di 200 mm, ad una base rettangolare in polietilene, di dimensioni 300 x 200 x 15 mm (Figura A5) [11].

All'interno della camera di coltura hanno luogo tutti i processi biologici che permettono il ripopolamento cellulare dello scaffold. Il cilindro in Teflon[®] è alto 303 mm e ha un diametro esterno pari a 125 mm; si presenta come un'unica struttura. In realtà la camera è costituita da due parti separate (Figura A6), che poggiano l'una sull'altra e che sono serrate ermeticamente mediante tre viti avvitate sulla superficie superiore del cilindro con i tre rispettivi pomelli di serraggio in Anticorodal¹². Il cilindro è inoltre dotato di una cavità interna che percorre tutta la lunghezza: in questo modo il terreno di coltura riesce a fluire attraverso lo scaffold valvolare dal basso verso l'alto.

¹¹ Questi dispositivi possono sopportare una corrente fino a 16 A in alternata (4 A in continua), possono essere alimentati con una tensione fino a 250 V in corrente alternata e resistono in un range di temperature che va da -40° C a +85° C. I costruttori garantiscono il corretto funzionamento per circa 50000 cicli operativi [M2] [11].

¹² Leghe di alluminio con magnesio, rame e manganese, dotate di ottima resistenza a corrosione e buone proprietà meccaniche e di lavorabilità.



Figura 15 - Camera di coltura in Teflon® [11].

La parte interna della camera è caratterizzata da vari diametri a diverse altezze e la cavità è delimitata sulla parte superiore da un vetrino circolare che permette di visualizzare la valvola, durante il periodo di coltura, mediante una videocamera digitale posta sopra l'apertura.

Il “porta valvola” è collocato nella sezione di contatto delle due parti della camera: poggia sulla superficie inferiore e si inserisce in quella superiore. Esso è realizzato interamente in Teflon® ed è formato da due parti (Figura A7):

- la struttura esterna, dotata di una base di appoggio e di una cavità cilindrica di diametro 92.8 mm;
- un cilindro mobile, di diametro esterno 92.8 mm, con uno spessore di 3.6 mm, che viene fatto scorrere lungo la cavità interna del “porta valvola” fino ad entrare in contatto con lo scaffold valvolare in modo tale da bloccarlo ed evitare eventuali spostamenti durante la fase di coltura.

Il diametro del “porta valvola” può essere fatto variare da 15 a 30 mm utilizzando specifici adattatori, a seconda delle dimensioni della valvola (aortica o polmonare) da ripopolare.

Sulla parete esterna della camera di coltura sono presenti sedici viti a testa esagonale che tappano gli alloggiamenti per i sensori (sensori di pressione, temperatura, pH e concentrazione), attualmente destinati ai soli sensori di pressione, in particolare uno a monte e tre a valle della valvola cardiaca. I sensori di pressione così dislocati consentono un preciso monitoraggio della pressione in prossimità della valvola.

In particolare, durante la fase di sistole, si potranno valutare:

- gradiente transvalvolare;
- area orificiale effettiva (*effective orifice area*, EOA);
- valore medio e valore di picco del sovraccarico medio del ventricolo;

e durante la fase di diastole:

- volume di rigurgito;
- volume di chiusura;
- eventuali perdite della valvola;
- massima pressione aortica;
- gradiente transvalvolare;
- sovraccarico del ventricolo [11].

I sensori di pressione utilizzati sono dei dispositivi piezoresistivi (a ponte di Wheatstone), non amplificati e non compensati, che utilizzano la pressione atmosferica come riferimento per rilevare il valore della pressione del fluido all'interno del circuito idraulico. Questo tipo di sensori funziona sfruttando il principio fisico della piezoresistenza, secondo cui le deformazioni fisiche imposte per effetto della pressione all'elemento sensore, nel caso in esame una membrana in fluorosilicone, provocano una variazione della resistenza elettrica del resistore.

Tali dispositivi sono quindi in grado di rilevare una grandezza meccanica come la pressione e convertirla in un segnale elettrico; per essi è definita una sensibilità, detta *gauge factor*, data dal rapporto tra la variazione di resistenza e la deformazione del sensore:

$$Gf = \frac{\Delta R / R}{\varepsilon}$$

dove $\varepsilon = \frac{\Delta L}{L}$ è proprio la deformazione dell'elemento sensibile [11].

Il sensore di pressione utilizzato è Honeywell 24PCBFA6G, riportato in Figura 16.

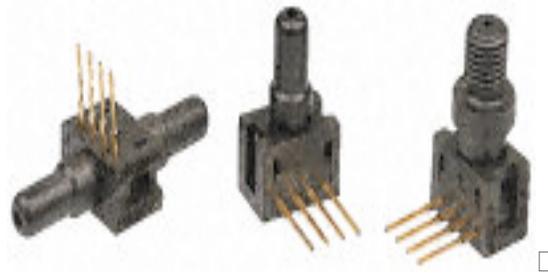


Figura 16 – Il sensore di pressione.

Questi sensori di pressione hanno una portata massima pari a 5.0 psi, circa 350 mbar, con una sovrappressione massima consentita fino a 20 psi ed un range di tensione in uscita di ± 10 V, corrispondenti a $-100 \div 250$ mbar [11]. Quel che si vuole è che il sensore restituisca una tensione pari a -10 V quando la pressione misurata è -100 mbar, e una tensione di $+10$ V quando la pressione è di 250 mbar.

Il sensore è poi collegato all'unità di condizionamento del segnale per mezzo di un cavo schermato.

Nell'utilizzo dei sensori di pressione è importante evitare la presenza di bolle d'aria in prossimità dell'elemento sensibile, che potrebbero alterare l'esito della misura.

LA CAMERA DI COMPLIANCE

In fisiologia con il termine *compliance* (compensazione = compensare l'impulso di pressione aumentando di volume) si intende la proprietà dei vasi sanguigni di accumulare e rilasciare sangue dovuta all'elasticità dei vasi che sotto l'azione della pressione sanguigna si dilatano e si contraggono: al crescere della pressione la dilatazione provoca un accumulo di sangue, al diminuire della pressione il volume di

sangue accumulato viene restituito. Questa proprietà viene espressa attraverso il rapporto tra la variazione di volume del vaso e la variazione di pressione sanguigna:

$$C = \frac{\Delta V}{\Delta p}$$

Le arterie quindi, grazie al fattore elasticità, ammortizzano la propagazione dell'onda di pressione in modo da prevenire possibili sovraccarichi lungo le pareti del vaso e mantengono il regime pressorio entro i livelli richiesti dalla fisiologia del sistema circolatorio [16].

Per simulare questo comportamento nel bioreattore è stata progettata una camera di compliance (Figura 18).



Figura 18 – Dettaglio della camera di compliance [11].

La camera di compliance è costituita da un recipiente cilindrico cavo in PMMA¹³, alto 135 mm con un diametro interno di 120 mm; la capacità è pari a $1.56 \cdot 10^6 \text{ mm}^3$, che equivalgono a 1.53 L (Figura A8) [11].

¹³ Polimetilmetacrilato, commercialmente noto con il nome di Plexiglass®.

Sulla estremità superiore poggia un coperchio in PVC¹⁴, che presenta un foro al quale è collegato un portagomma con un sensore di pressione. La tenuta della camera è garantita dall'ancoraggio del coperchio alla parte sottostante tramite viti e da una guarnizione in silicone. Nella zona centrale della camera sono presenti due cavità cilindriche di diametro ½” a cui sono collegati i due portagomma che consentono l'ingresso e l'uscita del fluido dalla camera stessa. Il fluido in ingresso proviene dalla camera di coltura; una volta entrato nella camera (fase sistolica) va a comprimere il volume d'aria presente nella parte superiore, fino a raggiungere il valore corrispondente alla pressione massima del range in cui si sta operando. Successivamente, durante la fase diastolica, il fluido viene richiamato dalla pompa; il volume d'aria torna ad espandersi provocando una diminuzione di pressione che si arresta in prossimità del valore corrispondente alla pressione minima prestabilita [11].

La compliance è poi collegata agli altri due moduli del bioreattore attraverso un sistema di tubi che formano il circuito idraulico; in particolare il tubo in uscita dalla camera è collegato al dispositivo dotato della valvola di non ritorno¹⁵ (Figura 19 e Figura A9).



Figura 19 – Dispositivo contenente la valvola di non ritorno: sezione interna con valvola aperta (sx) e chiusa (dx).

Questa valvola è di tipo meccanico (protesi valvolare aortica On-X): impedisce al fluido di passare durante la fase di sistole e ne consente il passaggio durante la fase di diastole, per ritornare all'interno della pompa.

¹⁴ Polivinilcloruro.

¹⁵ Tipologia di valvola che consente di mantenere l'unidirezionalità del flusso. In presenza di una pressione negativa, o bassa, la valvola resta chiusa impedendo il passaggio del fluido, mentre se la pressione esercitata dal liquido è positiva, la valvola si apre e il fluido può quindi passare.

Le dimensioni attuali della camera di compliance non sono quelle definitive, in quanto non consentono di ricreare i due regimi pressori relativi alla circolazione sistemica e polmonare da utilizzare durante il periodo di coltura della TEHV.

UNITÀ DI CONTROLLO

La **Control Unit LT0510** (Figura 20), realizzata dalla ditta LabTrek S.r.l., rappresenta l'elemento fondamentale per il controllo dell'intero bioreattore. Essa gestisce il funzionamento del motore elettrico: l'unità di condizionamento (Sensor conditioning unit LT0609) cui è connessa le invia segnali in tensione provenienti dai sensori nel range opportuno.

Il dispositivo è costituito da tre componenti elettrici principali:

1. il drive del motore elettrico: si tratta del dispositivo SLVD5N della Parker[®]. Esso è un convertitore digitale per motori elettrici lineari, programmabile in modo parametrico tramite l'interfaccia-operatore MotionWiz^{®16}. Il drive fa muovere il motore sulla base delle informazioni ricevute dal computer su scheda, andando a variare le tensioni fornite in ingresso al motore stesso;
2. il computer su scheda: si tratta del modello BL2120 della Rabbit[®]. Esso funge da intermediario tra l'operatore e l'unità SLVD-5N del motore elettrico: comunica, attraverso la linea seriale, con il computer dell'operatore dal quale riceve le informazioni via software e genera i comandi da inviare al drive che a sua volta controlla il funzionamento del motore elettrico lineare;
3. il circuito di alimentazione: ha il compito di prelevare tensione dalla rete elettrica per poi alimentare il drive del motore e il processore.

Questi sono contenuti all'interno di un case (Figura 20).

¹⁶ Software di configurazione che serve a programmare il drive offline. Tra le funzioni principali di questo software ci sono: la possibilità di leggere e impostare i parametri fondamentali e i comandi del convertitore relativi ai vari modi operativi; la programmazione del PLC interno del drive; il monitoraggio dello stato di ingressi e uscite; il salvataggio e il caricamento delle parametrizzazioni del drive; la funzione di oscilloscopio.



Figura 20 – Unità di controllo [11].

UNITÀ DI CONDIZIONAMENTO DEL SEGNALE

Si tratta del dispositivo **Sensor conditioning unit LT0609** (Figura 21), realizzato dalla LabTrek S.r.l: esso ha il compito di acquisire e amplificare i segnali provenienti dai vari sensori dislocati lungo il circuito idraulico, per renderli adatti all'elaborazione condotta dall'unità di controllo.



Figura 21 – Unità di condizionamento del segnale [11].

L'unità di condizionamento ha a che fare con misure non in tensione e con segnali appartenenti a range differenti, in base al tipo di sensore utilizzato: di conseguenza deve garantire la conversione di questi in tensione elettrica e amplificarli in modo tale da renderli compatibili con il range desiderato dal computer su scheda dell'unità di controllo (10 V). Una volta elaborate le informazioni, l'unità di condizionamento del segnale le invia all'unità di controllo, che comunica direttamente con l'utente. Questo

dispositivo è costituito da due componenti elettronici, contenuti all'interno di un case rettangolare:

1. il circuito di alimentazione;
2. la scheda di amplificazione del segnale.

CAPITOLO 3

MATERIALI E METODI

PROVE SPERIMENTALI

Il sistema bioreattore è gestito attraverso due programmi realizzati in due ambienti di sviluppo diversi. Nel primo ambiente, Dynamic C¹⁷, è stato sviluppato il codice contenuto nel file BIOREACT04A.c (Appendice), che è costituito da un insieme di segmenti di codice (*costate*) la cui esecuzione può avvenire in contemporanea durante il ciclo del programma. Questo codice controlla i buffer di ricezione in quanto, attraverso la connessione seriale, l'operatore invia i comandi al computer su scheda.

In ambiente LabView™ è stato invece sviluppato il programma BIOREACT_SUPERVISOR1.vi (Appendice), attraverso il quale avviene una supervisione del sistema e con il quale possono essere modificati alcuni parametri di processo, come lo *stroke volume* (o gittata sistolica) e la frequenza cardiaca.

Sono previste poi altre funzioni come l'analisi e il salvataggio dell'andamento della pressione all'interno del circuito idraulico e in corrispondenza della TEHV nella camera di coltura. Questo programma lavora ad un livello più alto rispetto al Dynamic C e per ora si trova ad una fase di lavorazione intermedia con l'obiettivo di aggiungere funzionalità che saranno poi presenti nell'hardware definitivo.

In Figura 22 viene riportato il pannello frontale del programma BIOREACT_SUPERVISOR1.vi:

¹⁷ Ambiente di sviluppo che consente di programmare i sistemi Rabbit®. Essendo un derivato del C++ riprende le istruzioni del C con l'aggiunta di particolari funzioni che facilitano il real – time multitasking, cioè l'esecuzione di più segmenti di codice contemporaneamente. Tra i principali aspetti innovativi del Dynamic C è opportuno citare alcune strutture come: *function chaining* (consente di inserire segmenti di codice in una o più funzioni che verranno eseguiti ogni qualvolta venga richiamata la funzione stessa); *costatements* (consentono di eseguire processi in parallelo all'interno di un singolo programma); *cofunctions*; *slice statements* (consentono il preemptive multitasking) [11].

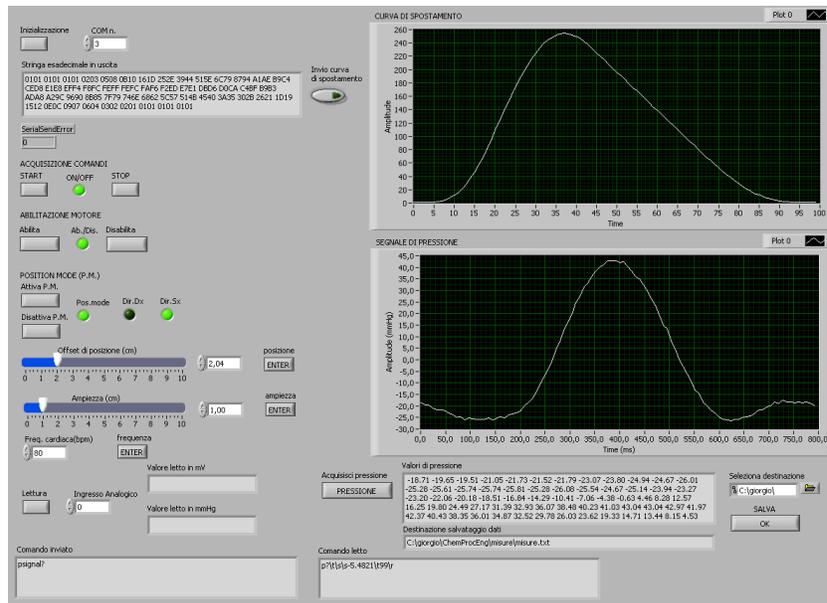


Figura 22 – Pannello frontale durante le normali condizioni di funzionamento del sistema [11].

Il sistema viene comandato con la legge di spostamento del pistone riportata in Figura 23, in modo da ottenere una curva della pressione sistemica il più possibile simile a quella che si registra in condizioni fisiologiche.

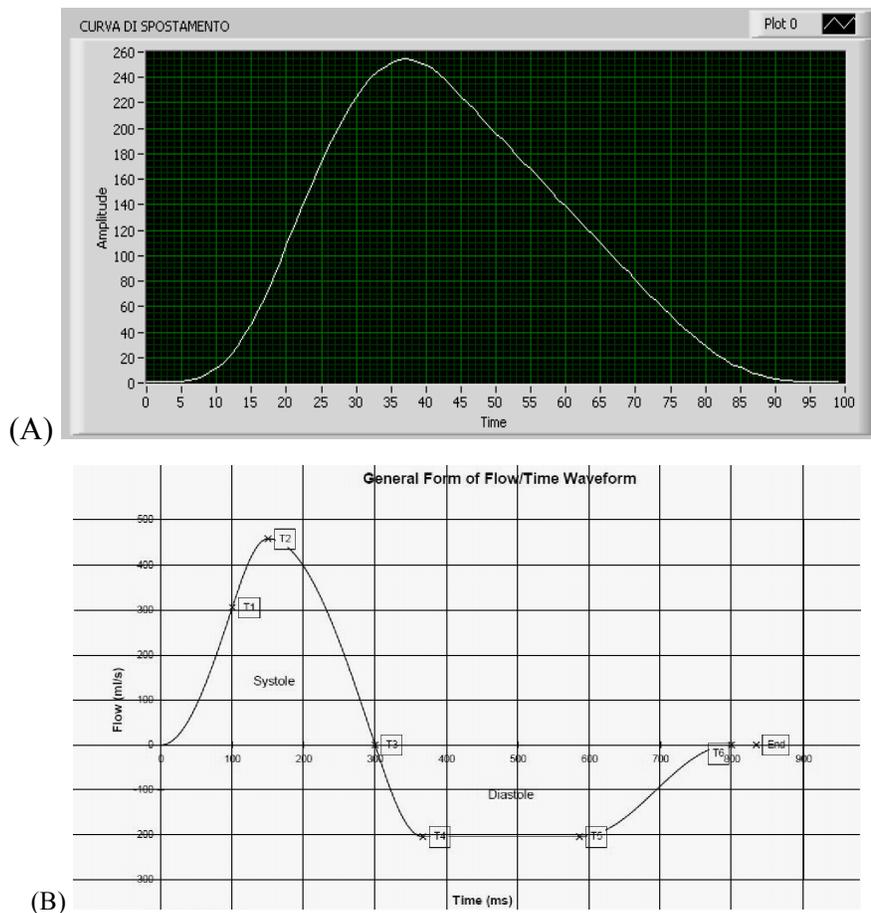


Figura 23 – Curva di spostamento (A) ricavata integrando la curva del flusso cardiaco (B).

I dati vengono quindi rappresentati nella finestra grafica corrispondente e contemporaneamente in una casella di testo sotto forma di stringa esadecimale. In seguito viene abilitato il motore, attivando il *position mode*, e impostati i seguenti parametri di funzionamento:

- l'offset di posizione, che permette di impostare la pressione minima;
- l'ampiezza di oscillazione dell'attuatore, che permette la conseguente impostazione della pressione massima;
- la frequenza cardiaca a cui si desidera operare.

Durante il funzionamento del sistema sono state eseguite delle misure di pressione, acquisendo il segnale dai sensori collegati ai canali analogici e installati a livello della camera di compliance e in prossimità della valvola cardiaca in camera di coltura, allo

scopo di verificare la corrispondenza tra il range di pressione impostato (20÷40 mmHg e 80÷120 mmHg) con i valori rilevati, questo per le diverse condizioni di frequenza cardiaca e *stroke volume*.

Il campionamento del segnale di pressione viene fatto in funzione della frequenza cardiaca impostata, questo per fare in modo di avere la stessa risoluzione nelle misure al variare della frequenza. Per ogni periodo si considera lo stesso numero di campioni (100) in modo da poter confrontare i segnali a frequenze diverse.

In Figura 24 viene riportato l'andamento della curva di pressione misurata dal sensore posizionato in corrispondenza della compliance, relativa al range di funzionamento 20÷40 mmHg:

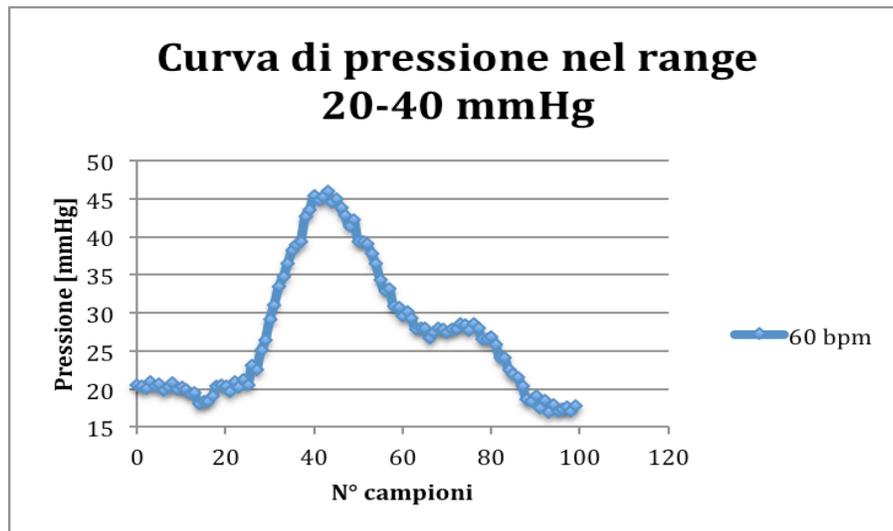


Figura 24 – Andamento della curva di pressione a livello della compliance, acquisita a 60 bpm (battiti al minuto), nel range 20÷40 mmHg.

Dal grafico ottenuto si può osservare che la curva di pressione registrata ha una forma che rispecchia abbastanza la legge di spostamento imposta al pistone, con valori massimi e minimi contenuti (con una certa tolleranza) nell'intervallo di pressione prestabilito.

Si osserva però un disturbo: è presente un "plateau", probabilmente dovuto alla risonanza propria del sistema; il disturbo si presenta sempre circa 300 ms dopo il picco di pressione.

Modificando il circuito, cioè chiudendo quasi del tutto il rubinetto della valvola di non ritorno, si può osservare (Figura 25) un miglioramento dell'andamento della curva di pressione registrata (sempre nel range 20÷40 mmHg).



Figura 25 – Andamento della curva di pressione acquisita in compliance, ad una pressione di 60 bpm e con un'ampiezza di oscillazione di 0.5 cm, quando il rubinetto della valvola di non ritorno è quasi chiuso.

Lo stesso miglioramento nella curva si può osservare quando si posiziona un clamp¹⁸ all'uscita della pompa (Figura 26):

¹⁸ Si tratta di una vite regolatrice che una volta stretta genera una strozzatura del tubo in prossimità dell'uscita della pompa.

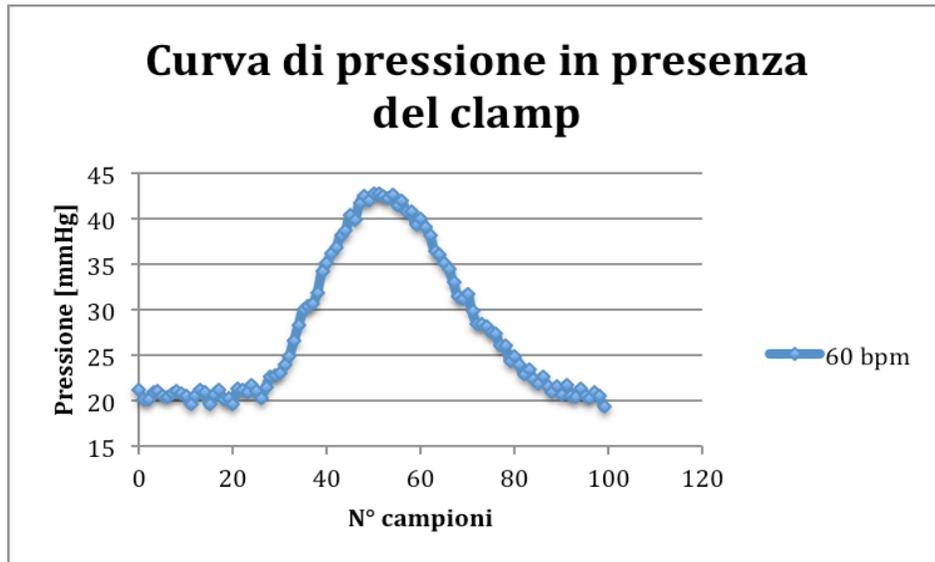


Figura 26 – Andamento della curva di pressione registrata in compliance quando all’uscita della pompa è posizionato un clamp.

Le curve di pressione ottenute apportando queste modifiche al circuito sono soddisfacenti in quanto riproducono in maniera ottimale la legge di spostamento imposta al pistone e sovrapponendo le curve tra loro (Figura 27) si può vedere che non con questi cambiamenti non si modifica il range di variazione delle pressioni misurate e c’è un leggero ritardo della curva di pressione acquisita in presenza del clamp, probabilmente dovuto al fatto che il clamp introduce un rallentamento al fluido.

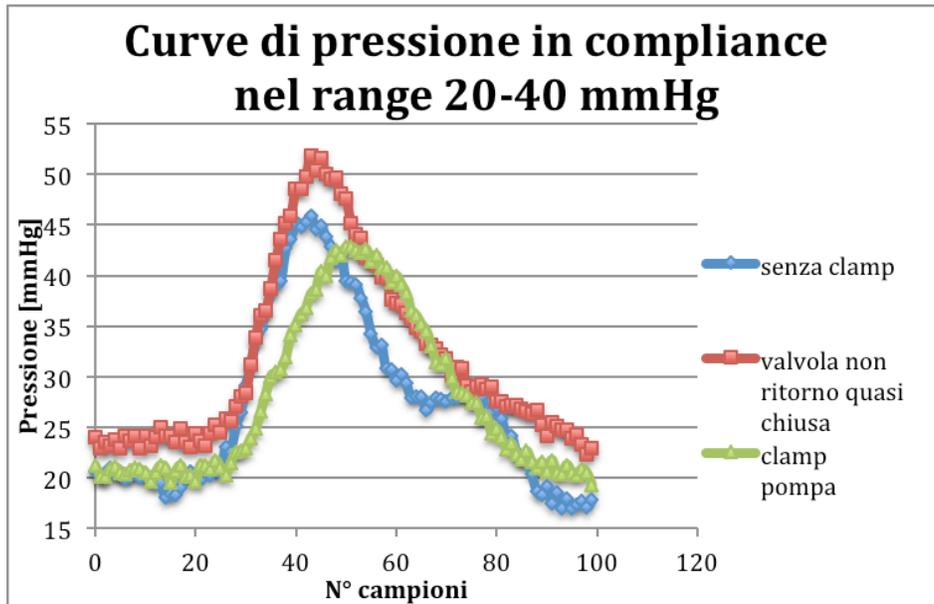


Figura 27 – Sovrapposizione delle curve di pressione nelle diverse configurazioni del sistema.

Sovrapponendo successivamente la curva di spostamento del pistone normalizzata tra 20 e 45 mmHg al segnale di pressione clampato, si può notare (Figura 28) un ritardo di circa 150 ms tra la legge di spostamento e la curva di pressione, dovuto al tempo necessario per la propagazione dell'onda di pressione dall'uscita della pompa fino alla camera di compliance; la stessa cosa avviene per le frequenze indagate (20, 40, 60, 100 bpm) (Figura 29).

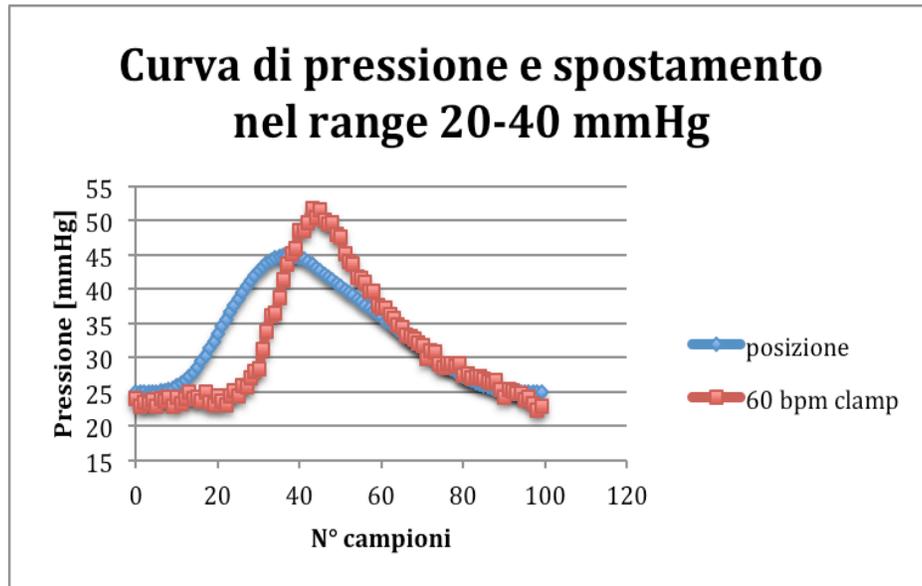


Figura 28 - Confronto tra la curva del segnale di pressione clampato (20÷40 mmHg), acquisito a 60 bpm, e la legge di spostamento del pistone.

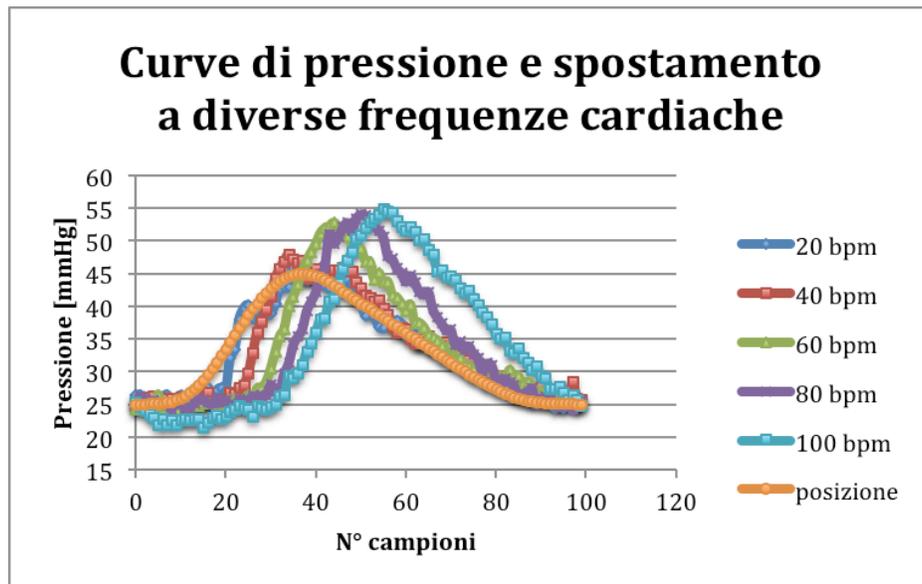


Figura 29 - Confronto tra le curve dei segnali di pressione (20÷40 mmHg) e la legge di spostamento del pistone.

Sono state acquisite anche le pressioni a monte (Figura 30) e a valle (Figura 31) della valvola cardiaca, questa volta nel range di pressione 80÷120 mmHg.

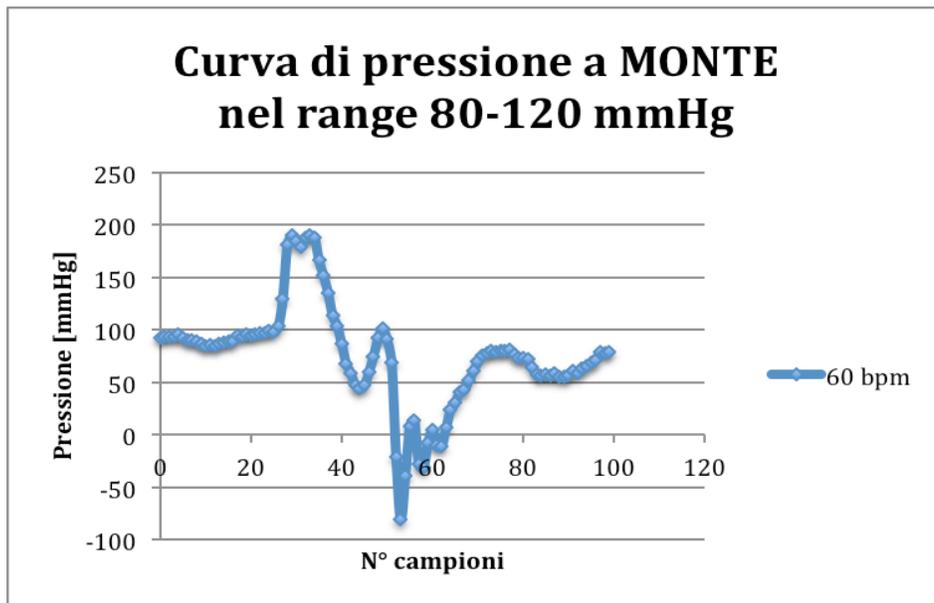


Figura 30 – Andamento della pressione misurata a monte della TEHV.

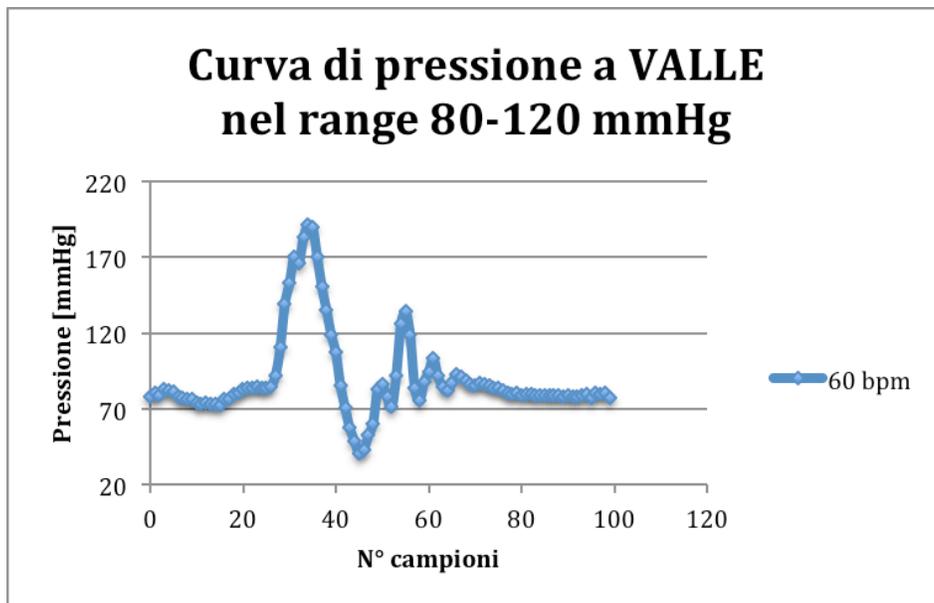


Figura 31 – Andamento della pressione misurata a valle della TEHV.

Dai grafici riportati non si capisce bene quale sia il comportamento del fluido a livello della valvola; si è quindi deciso di acquisire le misure di pressione, sempre in

compliance e in corrispondenza della TEHV, togliendo la valvola dal suo alloggiamento e quindi riducendo il circuito idraulico (chiusa la via di ritorno del fluido).

PROVE SPERIMENTALI SENZA VALVOLA

Di seguito sono riportati i risultati ottenuti togliendo la valvola cardiaca dal suo alloggiamento in camera di coltura.

Inizialmente è stata acquisita la pressione in compliance, nel range di funzionamento 80÷120 mmHg e imponendo una frequenza cardiaca di 60 bpm (Figura 32).

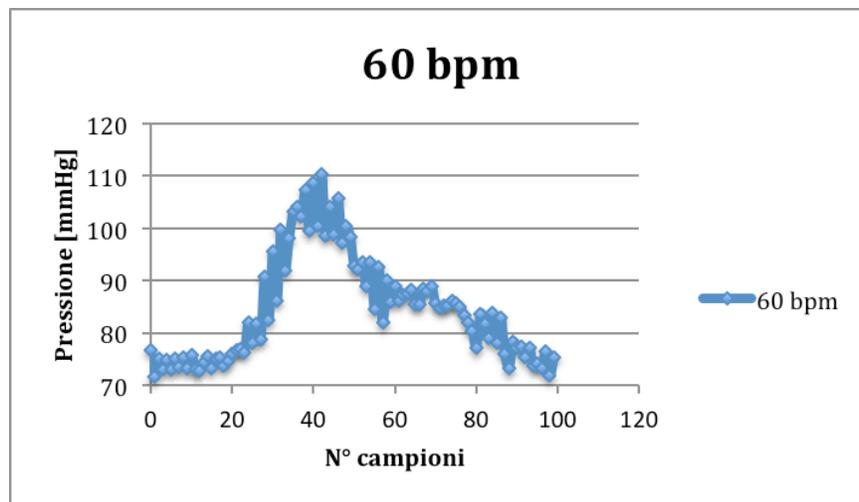


Figura 32 – Andamento del segnale di pressione nel range 80÷120 mmHg alla frequenza cardiaca di 60 bpm.

La curva di pressione ottenuta ha ancora una forma abbastanza fedele alla curva di spostamento imposta al pistone; si osserva però ancora la presenza di un “plateau”. Come riportato nella figura seguente (Figura 33), all’aumentare della frequenza cardiaca (le frequenze indagate sono: 50, 60, 80 bpm) questo disturbo tende a sparire, perché il sistema viene eccitato ad una frequenza sempre più vicina a quella di risonanza. È inoltre presente uno sfasamento tra i segnali a frequenze crescenti (Figura 34), causato dall’aumento della frequenza e quindi del corrispondente periodo di campionamento del segnale che provoca una traslazione della curva lungo l’asse delle ascisse.

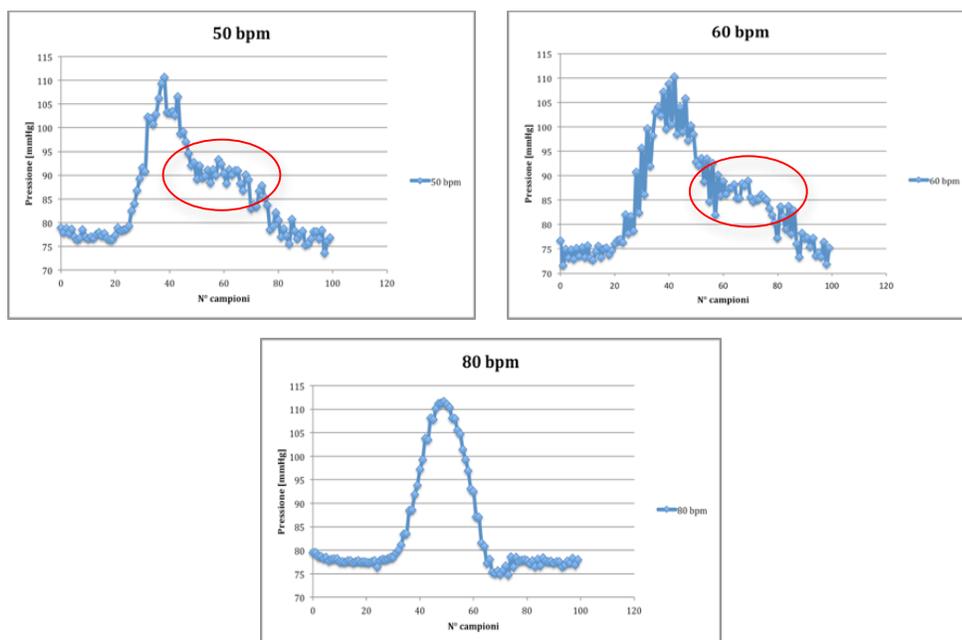


Figura 33 – Andamenti del segnale di pressione nelle diverse frequenze indagate (50, 60, 80 bpm).

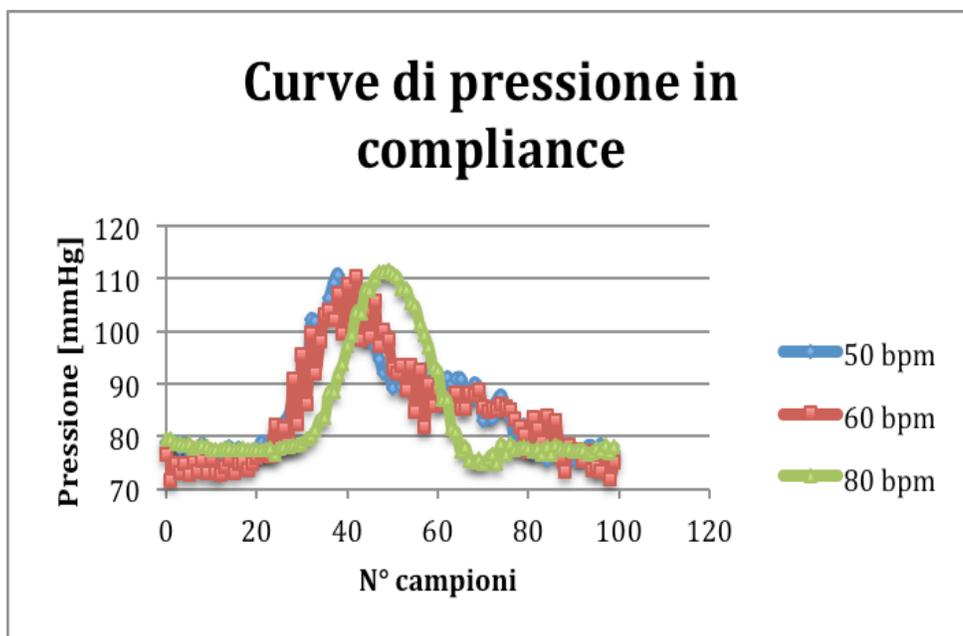


Figura 34 – Sovrapposizione delle curve di pressione misurate in compliance a frequenza diverse.

Nelle prove successive si è provato a “clampare” il tratto in uscita dalla pompa: in questo caso già a 60 bpm non si rileva alcun disturbo. Di seguito (Figura 35) è riportato l’andamento della pressione in compliance quando è presente il clamp in uscita dalla pompa:

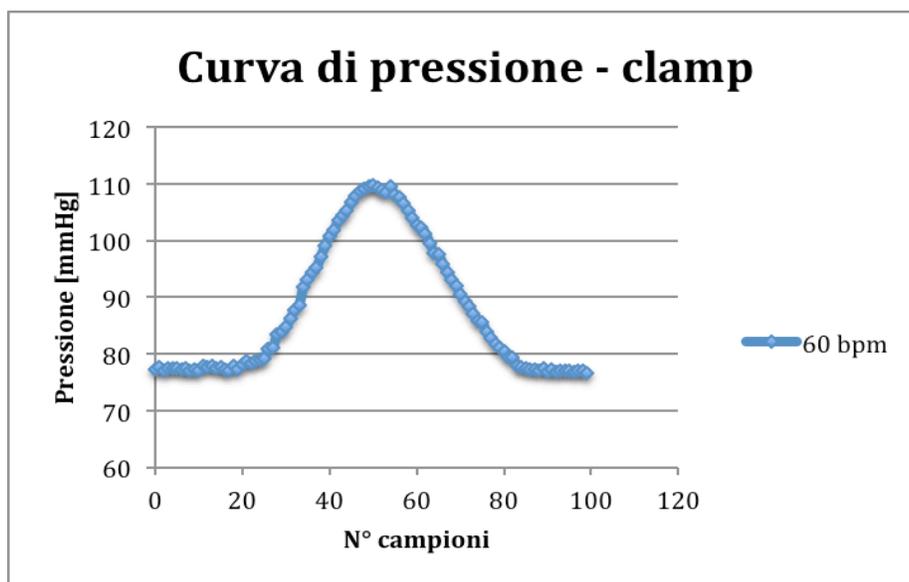


Figura 35 – Andamento della curva di pressione misurat in compliance quando sul tratto di tubo in uscita dalla pompa è posizionato un clamp.

Oltre alle misure di pressione eseguite in camera di compliance, sono state acquisite, anche in questa configurazione del sistema, le pressioni a valle della valvola cardiaca posta nella camera di coltura. Non essendoci la valvola non sono state registrate le pressioni a monte, in quanto ci si aspetta un andamento simile a quello che si ritrova a valle della TEHV.

Un esempio di curva di pressione ottenuta a valle della valvola cardiaca è riportato in Figura 36:

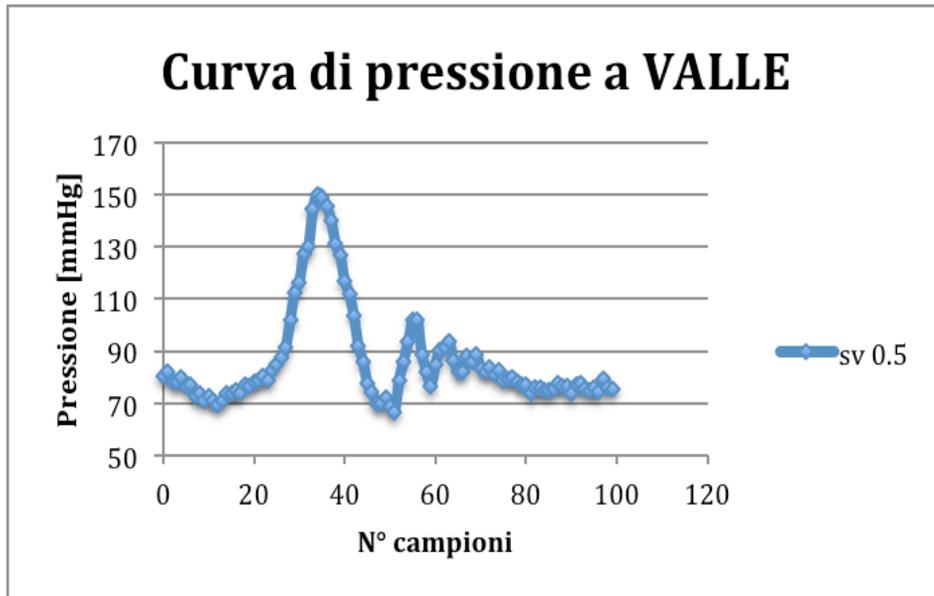


Figura 36– Andamento della curva di pressione misurata a valle della valvola cardiaca.

Si è poi fatto un confronto tra le curve di pressione acquisite andando a variare l'ampiezza di oscillazione del motore (Figura 37):

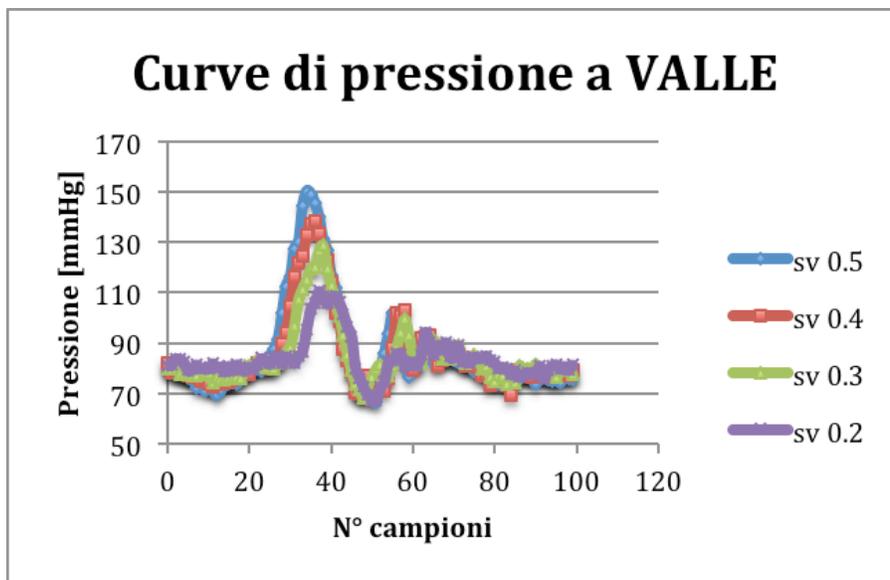


Figura 37 – Confronto tra le curve di pressione registrate a valle della TEHV impostando diverse ampiezze di oscillazione.

Si può osservare che variando l'ampiezza di oscillazione aumenta di conseguenza la pressione massima registrata. Dal confronto delle curve si vede che dopo il picco di pressione, la fase di smorzamento è quasi uguale per ogni *stroke volume*: questo induce a pensare che il problema non è dovuto al motore, visto che a *stroke volume* diversi corrispondono velocità diverse, ma che sia dovuto a risonanze del sistema, rimbalzi della valvola o altro.

Al termine degli esperimenti condotti si è constatato che le onde di pressione registrate in camera di compliance non sono ciò che ci aspettavamo, a causa della presenza del *plateau* e di un ritardo.

MODELLISTICA

Innanzitutto si è cercato di precisare la possibile origine di questi disturbi:

1. causati dai tubi del sistema idraulico;
2. dovuti alle discontinuità dei diametri interni nell'intero circuito: la valvola (dove si riscontrano effettivamente più problemi) è posizionata tra due tratti di tubo di calibro diverso.

A fronte di una legge di spostamento riportata in Figura 38, si ottiene il segnale riportato in Figura 39:

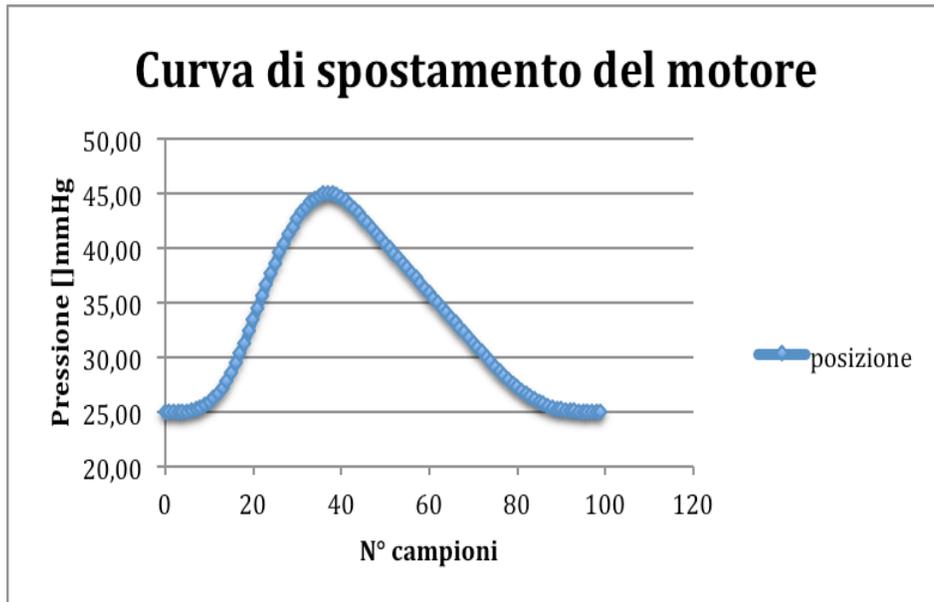


Figura 38 – Curva di spostamento del motore.

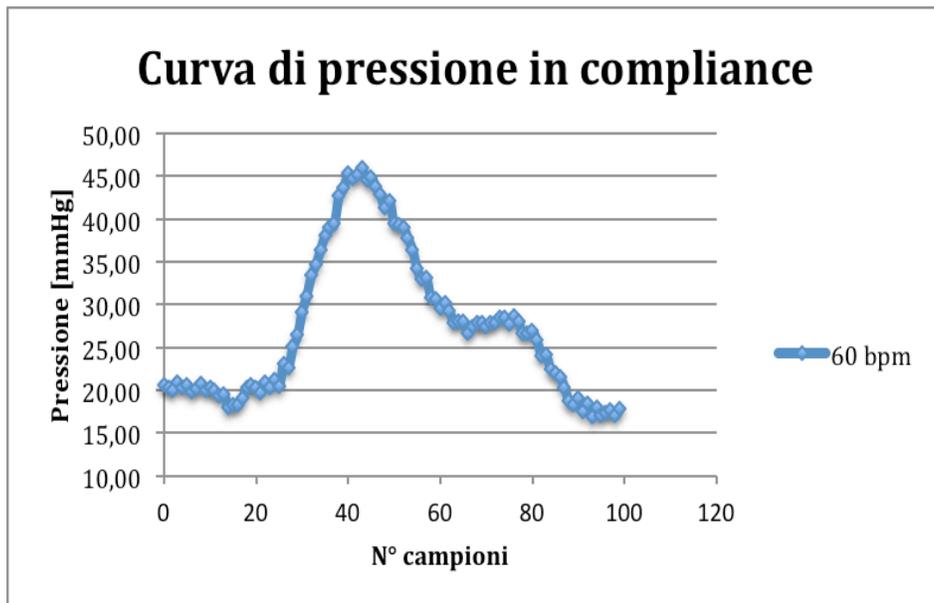


Figura 39 – Andamento della curva di pressione registrata in camera di compliance.

Essendo presenti delle risposte oscillanti da parte del sistema, si ipotizza che il sistema abbia una propria risonanza e funzioni come un oscillatore massa-molla (Figura 40).

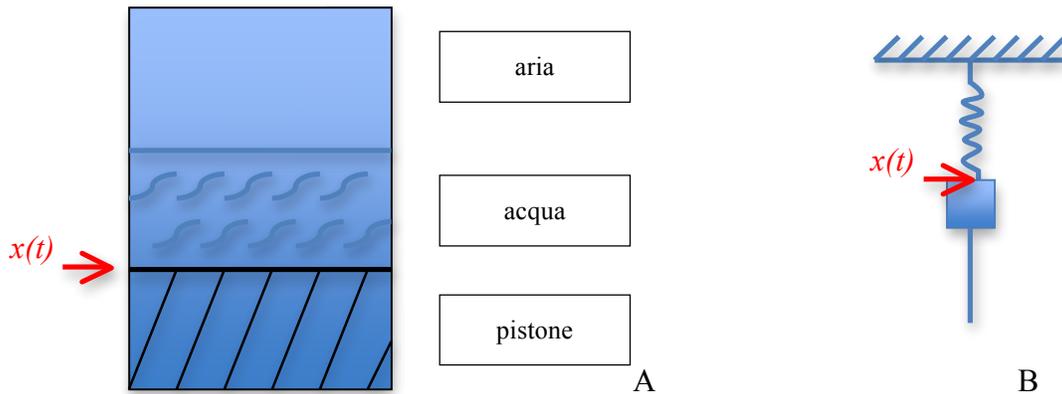


Figura 40 – Rappresentazione della camera di compliance.

All'interfaccia pistone-acqua è imposta la legge di spostamento $x(t)$ (vedi Figura 38). Misurare la pressione in compliance significa misurare la forza della molla, cioè la forza esercitata sulla superficie di interfaccia acqua-aria. Il sistema massa-molla ha quindi una risonanza che dipende da:

- m = massa di acqua che viene spostata;
- k = costante elastica della molla.

Essendo una massa rigida (l'acqua è incompressibile) è come se si applicasse la legge $x(t)$ appena sopra la massa (Figura 40B), per cui si avrà:

$$F(t) = k \cdot x(t) \quad (1)$$

La costante elastica k in una molla ad aria non è una costante, cioè il comportamento della molla ad aria non è lineare; lo si capisce dalla Legge di Boyle : $p \cdot V = costante$.

Nel caso in esame, si ha che:

$$P_m \cdot V_M = V_m \cdot P_M \quad (2)$$

cioè pressione e volume sono inversamente proporzionali: a pressione minima corrisponde un volume massimo e a volume minimo corrisponde la massima pressione.

L'equazione (1) può essere riscritta come segue:

$$P_m \cdot V_M = (V_M - \Delta V) + (P_m + \Delta P) \quad (3)$$

mettendo in evidenza ΔP :

$$P_m + \Delta P = \frac{P_m \cdot V_M}{V_M - \Delta V} \quad (4)$$

$$\Delta P = \frac{P_m \cdot V_M}{V_M - \Delta V} - P_m \quad (5)$$

ΔV è variabile indipendente, se viene eliminata il denominatore varia di poco in quanto il termine costante V_M è molto più grande: ΔV ha valore massimo molto più piccolo rispetto a V_M , quindi si muove in un tratto della funzione (che è un'iperbole) lontano dall'asintoto e può essere linearizzato.

Volendo scrivere la funzione di trasferimento per il sistema massa-molla, si procede nel modo seguente: la forza che si deve vincere per muovere l'acqua è:

$$F(t) = m \cdot \frac{d^2 x_p(t)}{dt^2} + b \cdot \frac{dx_t(t)}{dt} + k \cdot x_c(t) \quad (6)$$

cioè è data dalla somma di tre contributi:

1. accelerazione della massa: di cui è responsabile la pompa, quindi lo spostamento x è dipendente dalla superficie della pompa;
2. resistenza dovuta al tubo;
3. considerando in prima approssimazione i tubi rigidi, $k \cdot x_c$ è la compliance.

Scrivendo tutto in funzione del volume si ottiene:

$$F(t) = m \cdot \frac{d^2}{dt^2} \cdot \frac{V(t)}{S_p} + b \cdot \frac{d}{dt} \cdot \frac{V(t)}{S_t} + k \cdot \frac{V(t)}{S_c} \quad (7)$$

sapendo che $F(t) = p(t) \cdot S_p$, cioè la forza impressa al fluido dalla pompa è data dal prodotto tra la pressione esercitata e la superficie della pompa stessa, allora, passando già alla trasformata di Laplace:

$$p(s) \cdot S_p = \frac{m}{S_p} \cdot V(s) \cdot s^2 + \frac{b}{S_t} \cdot V(s) \cdot s + \frac{k}{S_c} \cdot V(s) \quad (8)$$

$$p(s) = \frac{V(s)}{S_p} \cdot \left(\frac{m}{S_p} \cdot s^2 + \frac{b}{S_t} \cdot s + \frac{k}{S_c} \right) \quad (9)$$

rapportando la pressione al volume:

$$\frac{p(s)}{V(s)} = \frac{m}{S_p} \cdot \left(s + \frac{b \cdot S_p}{m \cdot S_t} \cdot s + \frac{k \cdot S_p}{m \cdot S_c} \right) \quad (10)$$

Per dare una spiegazione ai fenomeni riscontrati si ricorre ai modelli elettrici, soluzione utilizzata in altri studi trovati in letteratura [6, 16, 17]; si è quindi cercato di trovare un modello elettrico capace di riprodurre il comportamento della macchina.

La modellistica relativa al sistema cardiocircolatorio è vasta e va dalla descrizione di un tratto di vaso e della sua interazione con il fluido che lo attraversa, alla rappresentazione di particolari sottosistemi o di interi sistemi, come l'albero arterioso. Soffermandosi sulla modellistica di quest'ultimo, essa è stata la più sviluppata sia per ordine di importanza, dal punto di vista fisiopatologico, del sistema di distribuzione del sangue, che per la possibilità di effettuare ipotesi semplificative che non sono possibili per gli altri sottosistemi [16].

Il primo modello dell'albero arterioso sistemico ("modello Windkessel") risale alla fine del XIX secolo, quando Otto Frank, nel 1899, sviluppò un modello ancora oggi diffusamente utilizzato nelle differenti formulazioni. I modelli Windkessel di Frank descrivono l'emodinamica del sistema arterioso in termini di resistenza e capacità; in particolare, questi modelli descrivono le caratteristiche generali dell'impedenza d'ingresso, con parametri fisiologicamente interpretabili.

Il modello Windkessel è il cosiddetto modello a parametri concentrati¹⁹: in altre parole questo modello descrive l'andamento della pressione nel sistema arterioso per mezzo di due soli parametri, che hanno un significato fisiologico [17].

Facendo riferimento ai modelli elettrici Windkessel si è cercato di trovare, procedendo per gradi, quello che simula in maniera migliore il sistema.

Dalla funzione di trasferimento ottenuta prima (10), quello che si deve utilizzare è un sistema oscillante: per questo motivo il modello è stato cercato tra i circuiti serie RLC, come quello riportato in Figura 41.

¹⁹ Nei circuiti a parametri concentrati la proprietà elettriche del circuito (resistenza, induttanza e conduttanza) sono considerate tutte contenute nei relativi componenti circuitali.

Le analogie sono:

- la tensione (U) è equivalente alla pressione (p);
- la corrente (I) è equivalente al flusso (q);
- la carica (Q) corrisponde al volume (V);
- la capacità è pari a $\Delta V / \Delta p$, dove ΔV è l'integrale del flusso;
- la resistenza è pari a $\Delta p / q$;
- l'induttanza è $\frac{\Delta p}{dq/dt}$.

Scrivendo la funzione di trasferimento del circuito, si ottiene:

$$U_i(t) = L \cdot \frac{dI(t)}{dt} + R \cdot I(t) + \frac{1}{C} \cdot \int I(t) dt \quad (11)$$

la corrente $I(t) = \frac{dQ(t)}{dt}$, quindi l'equazione (11) diventa:

$$U_i(t) = L \cdot \frac{d^2Q(t)}{dt^2} + R \cdot \frac{dQ(t)}{dt} + \frac{1}{C} \cdot Q(t) \quad (12)$$

Passando alla trasformata di Laplace si ottiene:

$$U_i(s) = Q(s) \cdot \left(L \cdot s^2 + R \cdot s + \frac{1}{C} \right) \quad (13)$$

Rapportando tensione in ingresso e carica, si ottiene la seguente funzione di trasferimento:

$$\frac{U_i(s)}{Q(s)} = L \cdot \left(s^2 + \frac{R}{L} \cdot s + \frac{1}{LC} \right) \quad (14)$$

Confrontando questa con la funzione di trasferimento del nostro sistema (10), si può associare ad L il rapporto $\frac{m}{S_p^2}$; in questo modo si riesce ad introdurre una corrispondenza anche con R e C :

$$\frac{b \cdot S_p}{m \cdot S_t} = \frac{S_p^2}{m} \cdot \frac{b}{S_t \cdot S_p} \Rightarrow \text{considerando } \frac{R}{L}: R \rightarrow \frac{b}{S_t \cdot S_p}$$

$$\frac{k \cdot S_p}{m \cdot S_c} = \frac{k}{S_c \cdot S_p} \cdot \frac{S_p^2}{m} \Rightarrow \text{considerando } \frac{1}{LC}: C \rightarrow \frac{S_t \cdot S_p}{k}$$

Il primo modello analizzato è lo schema elettrico di Figura 41:

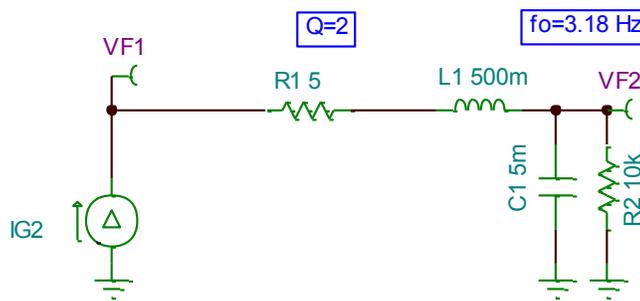


Figura 41 – Schema elettrico del primo modello associato al bioreattore.

L'equivalenza in ambito idraulico è:

- R = resistenza per unità di lunghezza che il condotto oppone al fluido;
- L = inerzia di spostamento del fluido;
- C = compliance (in questo primo modello viene trascurato l'effetto elastico).

Procedendo con il metodo dell'equivalenza, possiamo dire che la corrente in uscita dal generatore è il flusso pompato attraverso il nostro sistema idraulico:

$$Q = \frac{dV}{dt} \quad (9)$$

La corrente, quindi, è pari a:

$$I = \frac{dQ}{dt} \quad (10)$$

L'andamento della corrente è riportato in Figura 42:

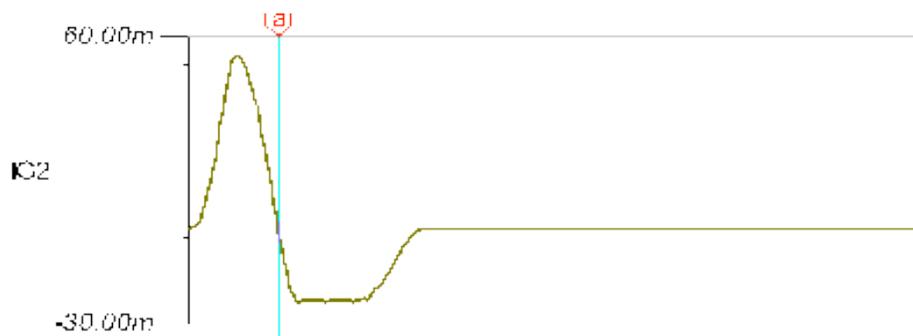


Figura 42 – Legge di corrente in ingresso al circuito.

Ai capi del condensatore C1 viene misurata una tensione (Figura 43), che corrisponde alla pressione registrata in compliance (Figura 44):

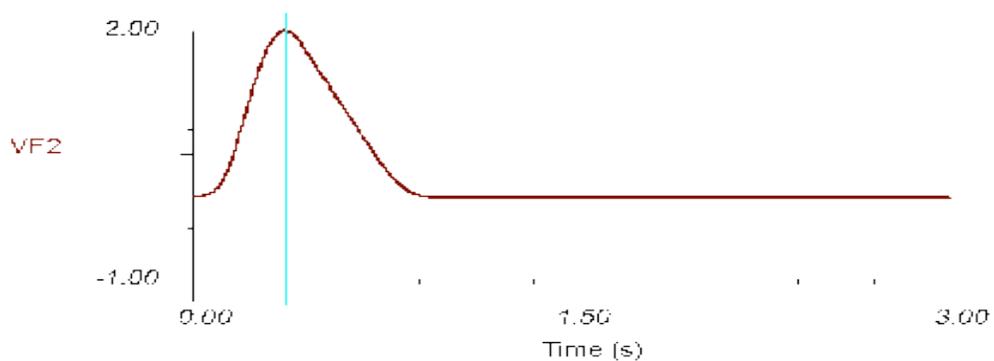


Figura 43 – Tensione misurata ai capi del condensatore.

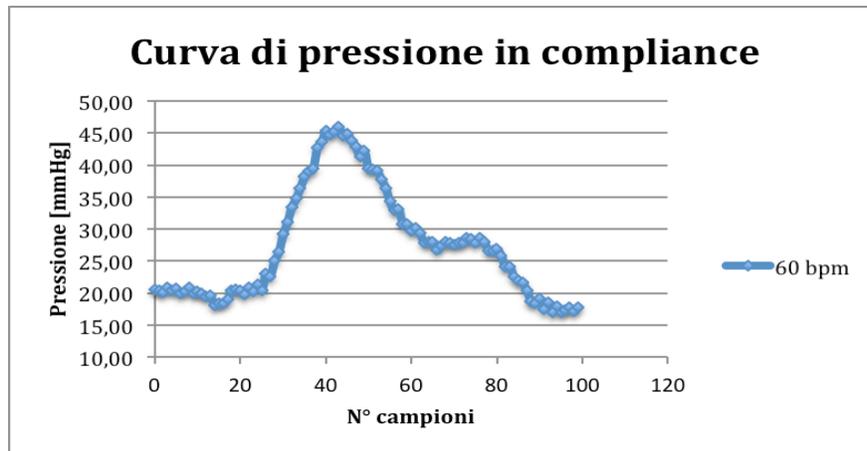


Figura 44 – Andamento della curva di pressione registrata in camera di compliance.

Come si può osservare dal confronto tra le figure, il primo modello a parametri concentrati proposto non è in grado di riprodurre quello che effettivamente si è ottenuto negli esperimenti; non si evidenzia la presenza di alcun *plateau* nella curva della tensione ai capi del condensatore.

Si è quindi deciso di passare ad un secondo modello, considerando diviso in due tratti il tubo che parte dalla pompa e arriva in compliance:

- primo tratto: pistone - valvola cardiaca;
- secondo tratto: valvola cardiaca - camera di compliance.

Il modello elettrico corrispondente è proposto in Figura 45.

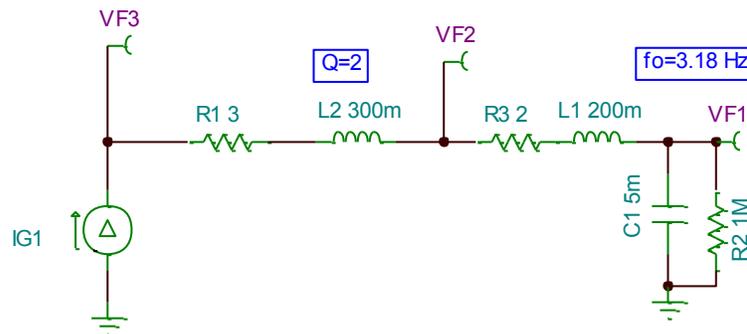


Figura 45 - Schema elettrico del secondo modello associato alla nostra macchina.

In questo modo è possibile evidenziare cosa succede sulla valvola, ma VF1 (tensione misurata in uscita) non risulta variata nella forma rispetto a quella ottenuta nel modello elettrico precedente (Figura 46).

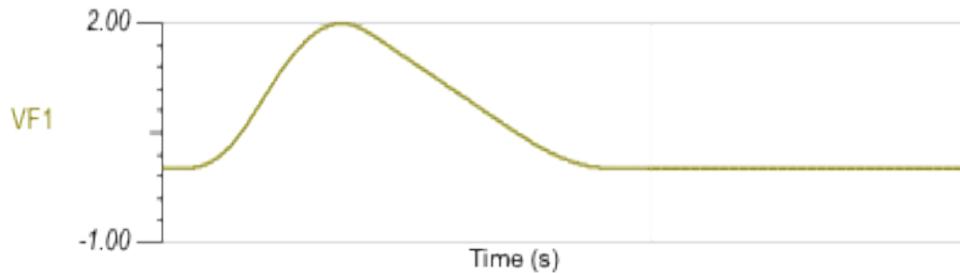


Figura 46 – Tensione misurata ai capi del condensatore.

La tensione intermedia VF2 (Figura 47), che è l’analogo della pressione sulla valvola, presenta un andamento uguale a quello della VF1, ma diverso dall’andamento della pressione misurata nel bioreattore.



Figura 47 – Tensione misurata al nodo F2.

Viene proposto, quindi, un terzo modello (Figura 48), dove si mantiene separato in due tratti il tubo che va dalla pompa alla compliance, e si considera l’elasticità dei tubi. Per questo motivo viene introdotto un secondo condensatore C2 in corrispondenza del nodo F2 del circuito.

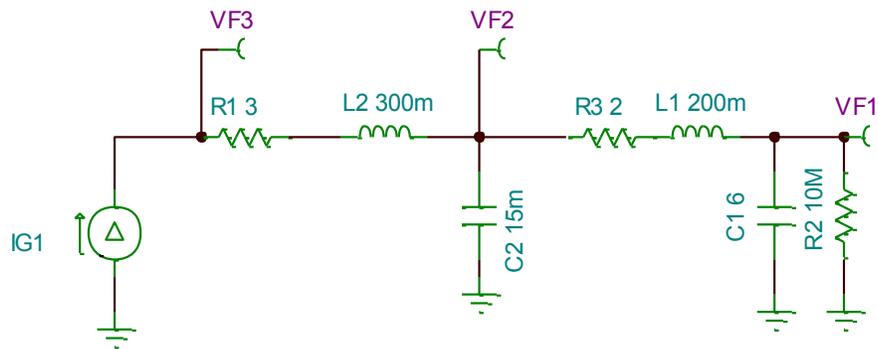


Figura 48 - Schema elettrico del terzo modello associato al bioreattore.

In questo modello, nel primo tratto:

- R è proporzionale l'attrito viscoso;
- L è la massa d'acqua;
- C2 è l'elasticità del tubo.

Nel secondo tratto di tubo, invece, C1 è data dalla somma della capacità del tubo e di quella della compliance.

Gli andamenti delle tensioni, e quindi delle pressioni in corrispondenza della valvola e in camera di compliance, sono riportati in Figura 49.

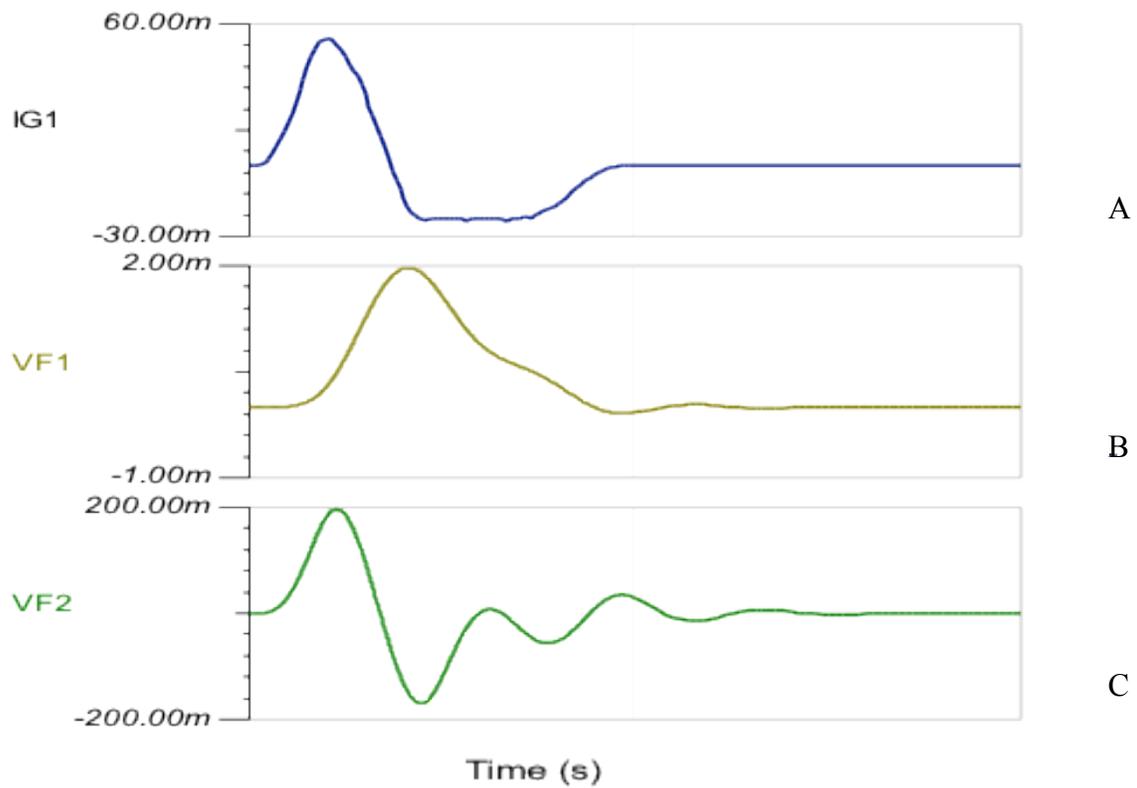


Figura 49 – Rappresentazione dell'andamento della corrente in ingresso al circuito (A), della tensione misurata ai capi di C1 (B), della tensione ai capi di C2 (C).

L'andamento delle tensioni ai capi dei condensatori riproduce in maniera soddisfacente gli andamenti di pressione registrati in corrispondenza della valvola cardiaca e nella camera di compliance (vedi Figura 36 e Figura 39).

La forma d'onda a metà ha un andamento che somiglia quello che si registra sulla valvola

CONCLUSIONI

Al termine di questo lavoro di tesi si può affermare che i risultati ottenuti nelle prove sperimentali evidenziano la necessità di apportare alcune modifiche al progetto inizialmente elaborato.

Passando infatti ad un'analisi del sistema nel campo delle analogie elettriche, si è descritto il sistema con un modello a parametri concentrati, in cui si può osservare che, fornendo specifici valori alle componenti elettriche (R, L e C), si possono simulare andamenti di pressione molto simili a quelli misurati sperimentalmente. E' da evidenziare però che questi valori non sono compatibili con le reali condizioni di lavoro del bioreattore: aggiornando i parametri elettrici con i valori calcolati nelle condizioni di esercizio del bioreattore, dalle simulazioni si osservano andamenti differenti delle pressioni, soprattutto a livello della valvola. Per questo motivo si cercherà di approssimare il sistema, sempre per analogia con i circuiti elettrici, con un modello a parametri distribuiti; soluzione già presentata in diversi studi presenti in letteratura.

Questo approccio ha però permesso di capire su quali parametri del sistema intervenire: aumentando la resistenza di ingresso si può infatti osservare nelle curve di simulazione un miglioramento della curva di tensione (che nel campo idraulico corrisponde alla curva di pressione) registrata a livello di C1, che nel bioreattore corrisponde alla compliance; cioè non è più presente l'oscillazione aggiuntiva nel tratto discendente della curva. A livello del bioreattore è stato quindi introdotto un clamp all'uscita della pompa, che effettivamente porta ad una curva di pressione acquisita in compliance con andamento simile a quello ottenuta con il modello.

Si è quindi capito che nel sistema è presente una "capacità" che deve essere eliminata; bisogna però valutare se essa sia attribuibile ai tubi deformabili o ad un'eventuale presenza di una fase diversa da quella liquida all'interno del nostro circuito idraulico (bolle d'aria).

Si procederà quindi con l'utilizzo di tubi non deformabili e di rigidità nota, e alla messa a punto di un sistema dove sia garantita l'assenza di bolle d'aria all'interno del fluido.

Nel corso di questi mesi di lavoro si è inoltre giunti alla conclusione che l'idea di realizzare la pompa con un sistema cilindro-pistone collegato al motore elettrico non offre le adeguate garanzie ipotizzate durante la fase di progetto. Per ottenere una sufficiente tenuta idraulica all'interno del cilindro, è stata posizionata una guarnizione a labbro sul corpo del pistone, che evita il passaggio di liquido dall'interno del bioreattore verso l'ambiente esterno. Tuttavia questa soluzione non si è rivelata soddisfacente, in quanto la guarnizione è soggetta ad usura; inoltre viene richiesta un'elevata forza per vincere l'attrito di distacco nel momento in cui si voglia muovere il pistone.

Per risolvere questo problema si sostituirà il dispositivo cilindro-pistone con un soffiello che consentirà di far circolare il terreno di coltura bioreattore. In questo modo si potranno impiegare in modo migliore le caratteristiche del motore, sfruttando maggiormente la capacità di spinta ed evitando quindi di sprecare gran parte della potenza sviluppata in attrito.

APPENDICE A

DISEGNI TECNICI DELLE PARTI DEL BIOREATTORE

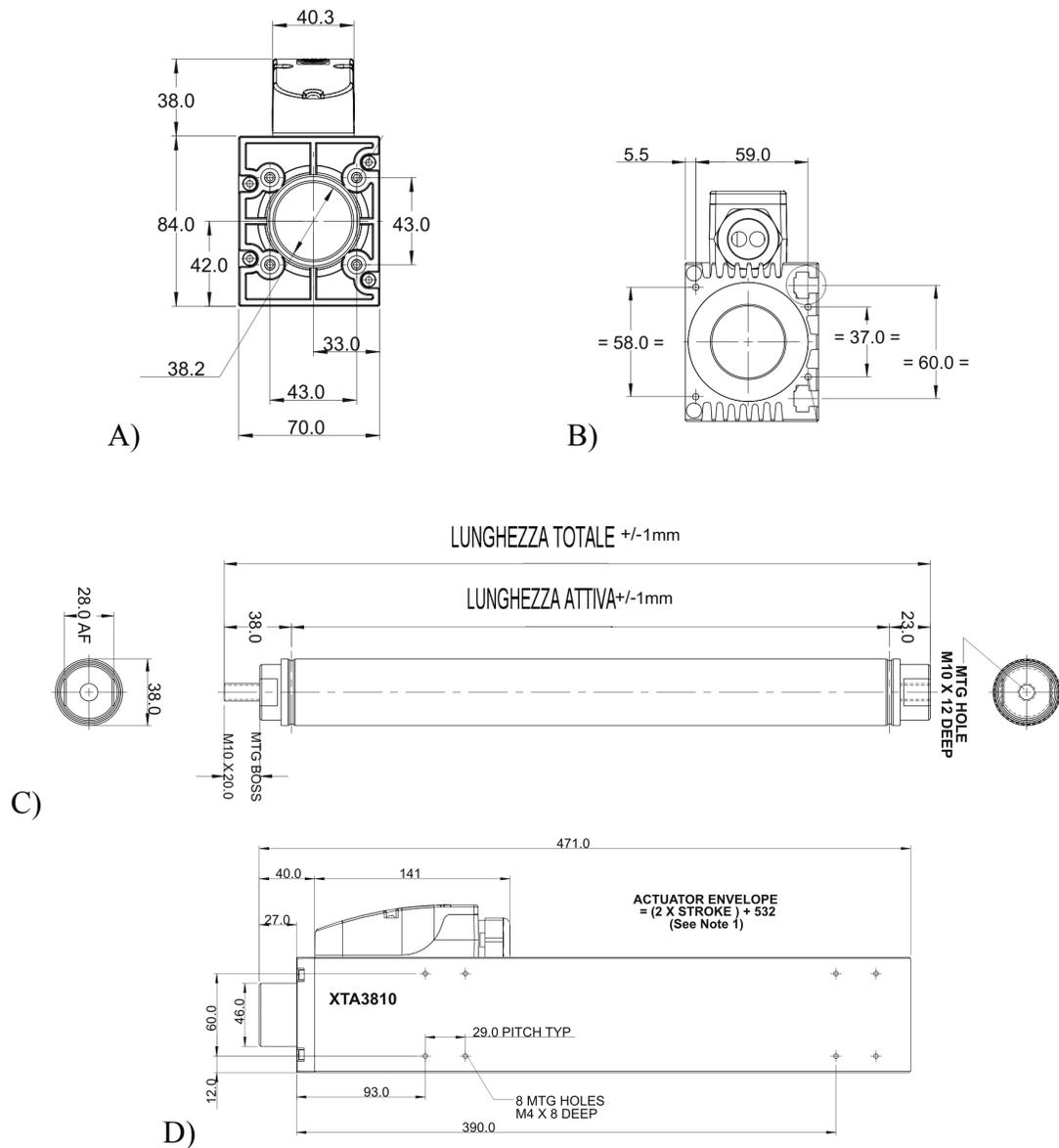


Figura A1: Disegni tecnici relativi alle due sezioni frontali (A anteriore e B posteriore), all'attuatore (C) e alla struttura esterna del motore Parker PRA 3810S (D).

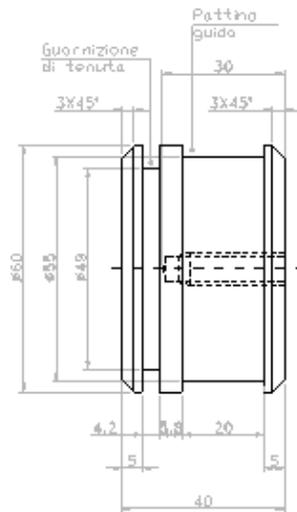


Figura A2: Schema tecnico della testa in Teflon® del pistone.

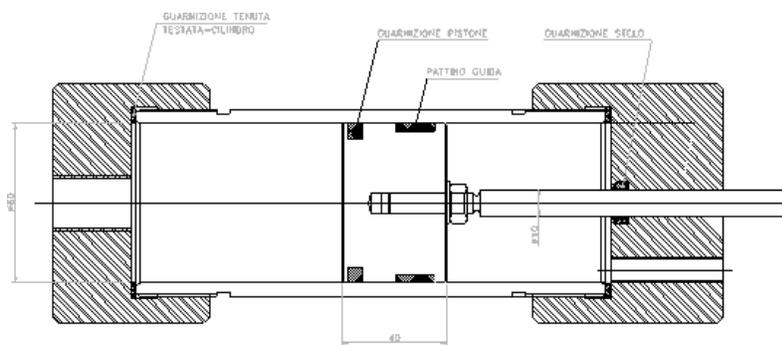


Figura A3: Schema tecnico del cilindro.

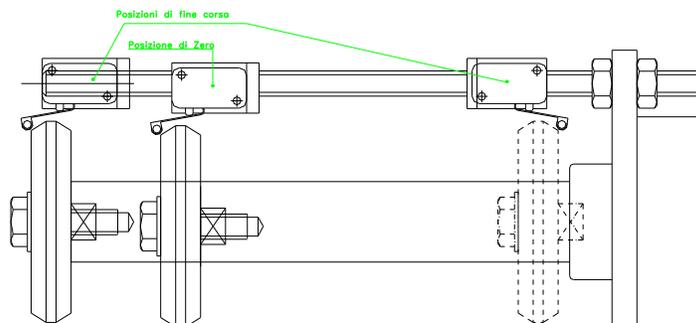


Figura A4: Schema tecnico del posizionamento dei due sensori di fine corsa e della posizione di zero.

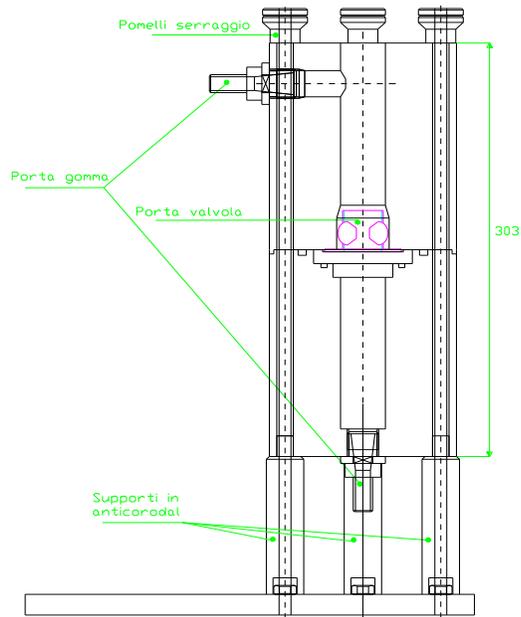


Figura A5: Disegno tecnico della camera di coltura.

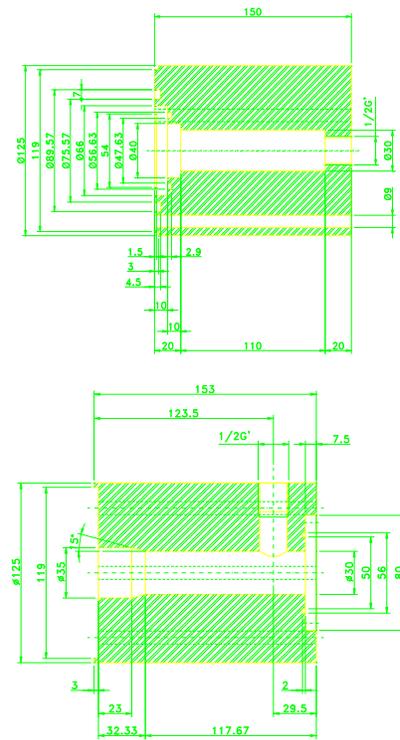


Figura A6: Sezione trasversale delle due parti della camera di coltura.

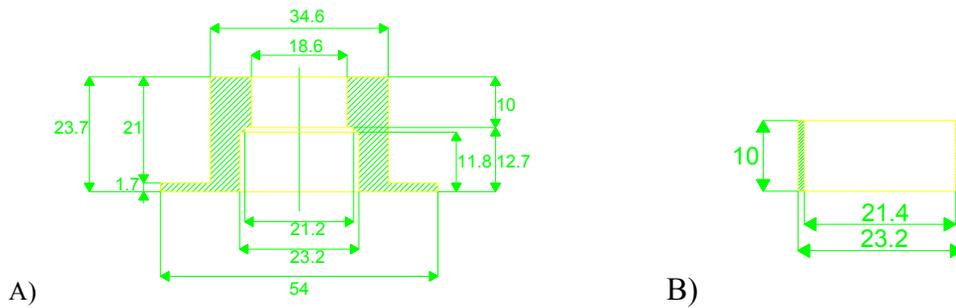


Figura A7: Disegno tecnico del dispositivo porta valvola, con struttura esterna (A) e cilindro interno serra valvola (B).

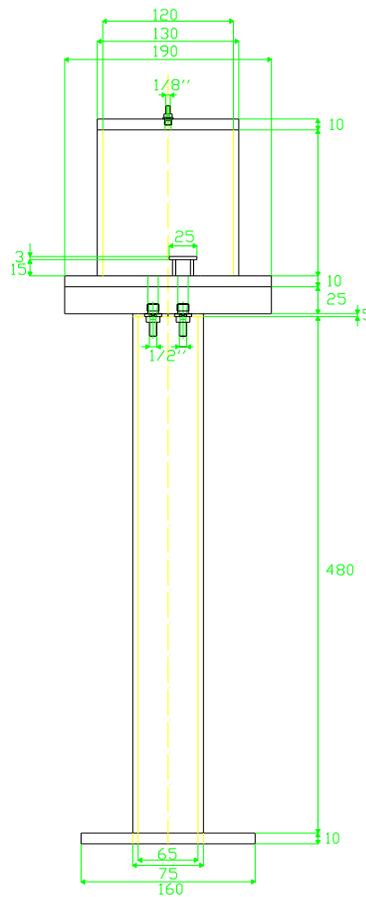


Figura A8: Schema tecnico della camera di compliance: essa poggia su una colonna cilindrica cava di diametro 65 mm, spessa 5 mm e alta 480 mm, all'interno della quale passano i tubi di collegamento, e termina con una base circolare di diametro 160 mm, spessa 10 mm.

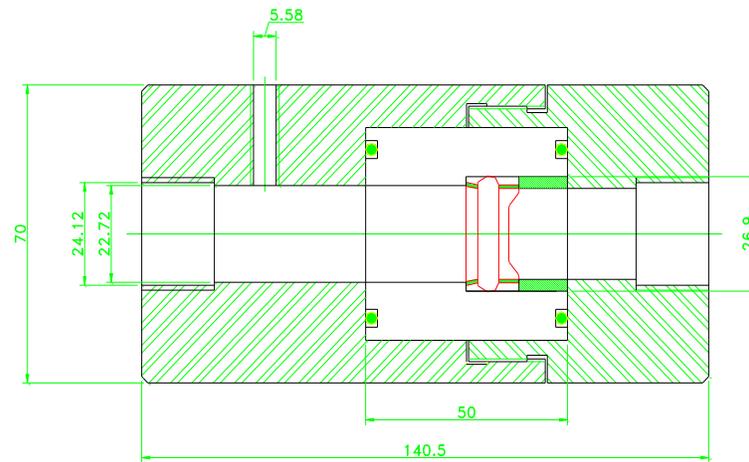


Figura A9: Schema tecnico del dispositivo dotato di valvola di non ritorno (elemento rosso nella zona centrale).

APPENDICE B

CODICI SOFTWARE DI GESTIONE DEL BIOREATTORE

B.1 - BIOREACT04A.C

Costate Ricevo: sempre attiva (*always_on*) durante l'esecuzione del programma.

Al suo interno sono racchiusi tutti i segmenti di codice relativi ai comandi necessari per il corretto funzionamento dell'intero sistema.

Nelle prime righe di *Ricevo* è collocata una temporizzazione (*waitfor*) di 150 ms che regola la frequenza con cui viene eseguita la *costate*. Pertanto, ogni 150 ms viene analizzato il contenuto del buffer di ricezione della seriale alla ricerca dell'eventuale presenza di stringhe corrispondenti ai comandi previsti. Ogni qualvolta venga rilevata una stringa corrispondente ad un comando preciso, si ha la trasmissione a ritroso (cioè dal Rabbit[®] al computer dell'operatore) di una stringa, contenente l'istruzione ricevuta, come conferma della corretta ricezione da parte dell'unità di controllo.

Per eseguire questa operazione si deve ricorrere alla funzione *sertrasm*, richiamata di volta in volta quando si presenta la necessità di trasmettere una stringa di risposta ad un comando ricevuto.

Con l'istruzione *strncmp* (string compare), oltre alla corrispondenza dei caratteri che compongono la stringa, viene presa in considerazione anche la lunghezza di quest'ultima. Tale caratteristica assume una notevole importanza nel momento in cui vengono variati i parametri del processo perchè, conoscendo la lunghezza della riga di comando, il programma individua, nei caratteri immediatamente successivi alla fine della stringa, il nuovo valore da utilizzare.

Considerando per esempio l'istruzione "*vout=2*" (necessaria per portare a 2 V l'ampiezza dell'escursione effettuata dal motore elettrico), la funzione *strncmp* individua il comando *vout=* e identifica, a partire dal carattere successivo alla stringa fondamentale (nel caso specifico dal sesto carattere in poi, visto che "*vout=*" ha lunghezza 5), il nuovo valore (cioè "2") da assegnare al parametro.

I comandi principali contenuti all'interno della *costate Ricevo*, cioè tutte le istruzioni che l'operatore può inviare al buffer di ricezione del computer su scheda sono:

- ***acqON***, comando che serve per attivare la fase di acquisizione del computer su scheda. Se il Rabbit[®] non riceve questo codice, ogni comando (relativo all'acquisizione) inviato dall'operatore verrà ignorato;
- ***acqOFF***, al contrario, interrompe la fase di acquisizione. Una volta ricevuto questo comando vengono ignorate tutte le successive istruzioni fin tanto che il buffer di ricezione non riceve in ingresso nuovamente *acqON*;
- ***per=***, consente di variare il periodo di campionamento del segnale di posizione. In termini biologici, modificando il periodo si può aumentare o diminuire la frequenza cardiaca, ovvero il numero di battiti per minuto;
- ***vout=***, viene utilizzato per variare l'ampiezza della funzione di spostamento, aumentando o diminuendo l'escursione eseguita dal motore elettrico, tenendo in considerazione che esiste un fattore di conversione (0,70225 cm/V) tra la tensione (in V) fornita come *vout* e lo spostamento in cm operato dal motore. In termini biologici, variando la *vout*, si può modificare la gittata della pompa (*stroke volume*);
- ***offset=***, consente di impostare la posizione di partenza in cui collocare l'attuatore prima di far partire le oscillazioni previste dal processo. Dal punto di vista biologico, serve per fissare la pressione minima. Anche in questo caso, come per il comando *vout*, bisogna tenere in considerazione il fattore di conversione tra volt e cm;
- ***outch=*** consente di selezionare il canale analogico del computer su scheda, cioè quel canale che consente di inviare al drive la tensione corrispondente allo spostamento che il motore deve compiere;
- ***InDrv0*, *InDrv1*, *InDrv1*, *InDrv3***, corrispondono ai quattro ingressi del drive del motore elettrico. Sono quattro variabili booleane che possono assumere, quindi, esclusivamente valore vero (1) o falso (0). In particolare *InDrv0* gestisce il

comando di *enable*²⁰, *InDrv1* regola la direzione di spostamento del motore elettrico e *InDrv2* gestisce la funzione di *position mode*²¹. Attualmente il comando *InDrv3* non ricopre alcuna funzione;

- *ain0?*, ... , *ain5?* sono i comandi necessari per leggere gli ingressi analogici provenienti dai primi sei canali del Rabbit[®] BL2120. In realtà il computer su scheda dispone nel complesso di undici canali: allo stato attuale del progetto ne vengono sfruttati solamente sei per eseguire le misure con i sensori di pressione. Utilizzando la funzione *ains?* è possibile interrogare contemporaneamente tutti i canali analogici. Questa operazione può risultare particolarmente utile nel caso in cui si vogliano misurare, nello stesso istante, le pressioni in posizioni diverse del circuito idraulico;
- *in0?*, ... , *in7?* sono i comandi da utilizzare per poter leggere il contenuto degli otto canali digitali, anche se attualmente non vengono sfruttati. Come nel caso degli ingressi analogici, anche per quelli digitali è possibile eseguire una lettura in contemporanea mediante la funzione *ins?*;
- *signal=* serve per inserire i cento valori relativi alla curva di spostamento che rappresenta la legge di movimento del motore. La stringa contiene cento caratteri (bytes) che sono interpretati dal Rabbit[®] BL2120 come cento numeri interi che vanno da 1 a 255. Questo permette di aumentare la velocità di trasmissione (1 byte/campione) senza rinunciare alla risoluzione che è comunque sufficientemente elevata (1/255). La necessità di utilizzare solo 255 combinazioni delle 256 possibili in un byte, è data dal fatto che nel linguaggio C il carattere “0” (00000000₂) è utilizzato come carattere di fine stringa. Per questo motivo il profilo normalizzato viene inviato al Rabbit[®] facendo corrispondere il carattere “1” (00000001₂) al valore 0, e il carattere “255” (11111111₂) al valore 1;

²⁰ Indica l'abilitazione/disabilitazione del motore elettrico lineare. Se *InDrv0*=0 il sistema è disabilitato; al contrario se *InDrv0*=1 il sistema viene abilitato e il motore si porta in posizione di zero.

²¹ Indica il normale funzionamento del motore. Viene attivato imponendo *InDrv2*=1, dopo aver invertito la direzione di spostamento del motore assegnando ad *InDrv1* il valore logico 1.

- *psignal?* è il comando che consente di avviare la procedura di acquisizione del segnale di pressione contenuta all'interno della costate Acq.

```

costate Ricevo always_on {
    waitfor(serBrdUsed()!=0);
    waitfor(DelayMs(150L));
    lrec=serBrdUsed();
    lrec1=(unsigned)serBread (buf_rec,lrec,255);
    serBrdFlush();
    if (!strncmp(buf_rec,"init",4)){
        sprintf(buf_tra,"%s\tOK1",buf_rec);
        printf("%s\t%s\n\r",buf_rec,buf_tra);
        sertransm();
        CoBegin(&Init);
    }
    if (!strncmp(buf_rec,"acqON",5)){
        sprintf(buf_tra,"%s\t",buf_rec);
        sertransm();
        vout=0;
        offset=0;
        vout1=0;
        offset1=0;
        flag=0;
        acq=1;
        i=0;
        j=0;
        printf("%s\n\r",buf_rec);
        CoBegin(&Tempo);
    }
    if (!strncmp(buf_rec,"acqOFF",6)){

```

```

sprintf(buf_tra,"%s\t",buf_rec);
sertransm();
vout=vout1;
offset=offset1;
vout1=0;
offset1=0;
flag=0;
acq=0;
j=0;
}
if (!strncmp(buf_rec,"per=",4)){
    per=atol(buf_rec+4);
    printf("%d\n\r",per);
    buf_rec[4]=0;
    sprintf(buf_tra,"%s\t%d",buf_rec,per);
    sertransm();
}
if (!strncmp(buf_rec,"vout=",5)){
    if(acq){
        flag=1;
        vout=vout1;
        vout1=atof(buf_rec+5);
        printf("%9.4f\n\r",vout);
        sprintf(buf_tra,"%s\t",buf_rec);
        sertransm();
        j=0;
    }
}
if (!strncmp(buf_rec,"offset=",7)){
    if(acq){

```

```

        flag=2;
        offset=offset1;
        offset1=atof(buf_rec+7);
        printf("%9.4f\n\r",offset);
        sprintf(buf_tra,"%s\t",buf_rec);
        sertransm();
        j=0;
    }
}
if (!strncmp(buf_rec,"outch=",6)){
    channel=atoi(buf_rec+6);
    printf("%d\n\r",channel);
    sprintf(buf_tra,"%s\t",buf_rec);
    sertransm();
}
/* Enable */
if (!strncmp(buf_rec,"InDrv0=",7)){
    dout0=atoi(buf_rec+7);
printf("%d\n\r",dout0);
    digOut(0,dout0);
    sprintf(buf_tra,"%s\t",buf_rec);
    sertransm();
}
/* Direzione */
if (!strncmp(buf_rec,"InDrv1=",7)){
    dout1=atoi(buf_rec+7);
    digOut(1,dout1);
    sprintf(buf_tra,"%s\t",buf_rec);
    sertransm();
}

```

```

/* Pos./Home */
    if (!strcmp(buf_rec,"InDrv2=",7)){
        dout2=atoi(buf_rec+7);
        digOut(2,dout2);
        sprintf(buf_tra,"%s\t",buf_rec);
        sertransm();
    }
    if (!strcmp(buf_rec,"InDrv3=",7)){
        dout3=atoi(buf_rec+7);
        digOut(3,dout3);
        sprintf(buf_tra,"%s\t",buf_rec);
        sertransm();
    }
/* Lettura ingressi analogici: viene eseguita per tutti i canali nello stesso modo,
variando semplicemente il numero del canale. */
    if (!strcmp(buf_rec,"ain0?",5)){
        Vpress[0]=anaInVolts(0);
        sprintf(buf_tra,"%s\t%9.4f",buf_rec,Vpress[0]);
        sertransm();
    }
/* Lettura ingressi digitali: viene eseguita per tutti i canali nello stesso modo, variando
semplicemente il numero del canale. */
    if (!strcmp(buf_rec,"in0?",4)){
        ins[0]=digIn(0);
        sprintf(buf_tra,"%s\t%d",buf_rec,ins[0]);
        sertransm();
    }
/* Inserimento stringa curva di spostamento. */
    if (!strcmp(buf_rec,"signal=",7)){
        if (!acq){

```

```

    reclen=strlen(buf_rec)-2;
    printf("\n\r%d    \n\r",reclen);
    for (i=7;i<reclen;++i)
    {
        signal[i-7]=(double)((buf_rec[i]-1)/254.0);
    }
    sprintf(buf_tra,"%s\t",buf_rec);
}
else
    sprintf(buf_tra,"%s\t","signal=");
    sertransm();
}
/* Lettura segnale di pressione. */
if (!strcmp(buf_rec,"psignal?",8)){
    sprintf(buf_tra,"");
    pp=1;
}

```

Costate Init: permette di resettare (tramite il comando ***CoReset***) le *costate Tempo* e *Acq*, inviando, inoltre, una tensione (***voltout***) di 0 V nel canale 0 del computer su scheda.

```

costate Init{
    i=0;
    j=0;
    CoReset(&Tempo);
    CoReset(&Acq);
    anaOutVolts(0, 0);
}

```

Costate Tempo: attivata nel momento in cui viene trasmesso il comando ***acqON***, gestisce esclusivamente la temporizzazione del segnale di uscita sulla base del periodo di campionamento impostato con il comando ***per=***. Una volta attivata, la ***costate*** viene eseguita di default ogni 10 ms dato che ***per=10*** corrisponde ad una frequenza cardiaca di 60 bpm. Considerando, infatti, che la curva di spostamento è formata da cento punti, con periodo di campionamento di 10 ms, nell'arco di un secondo viene trasmessa l'intera funzione di spostamento, che avrà quindi una frequenza pari ad 1 Hz.

```
costate Tempo{  
    waitfor(DelayMs(per));  
    if(j<=1000)j=j+1;  
    CoBegin(&Acq);  
    CoBegin(&Tempo);  
}
```

Costate Acq: (Appendice 1.D), attivata all'interno di ***Tempo*** ed eseguita con una frequenza che dipende dal periodo di campionamento scelto, si occupa della gestione delle transizioni e dell'acquisizione del segnale di pressione.

Per quanto riguarda le transizioni, deve decidere come aggiornare il comportamento del sistema quando vengono modificati i valori dei parametri ***offset*** e ***vout*** durante il normale funzionamento del dispositivo. In particolare sono previste tre possibili situazioni operative: quando si modifica solamente la ***vout***; quando si cambia solo il valore dell'offset oppure quando vengono variati entrambi i parametri. In ogni caso nella parte finale della ***costate*** viene aggiornata la tensione di uscita, che verrà poi trasmessa tramite il comando ***anaOutVolts(channel, voltout)***, sulla base della curva di spostamento e del valore dei parametri di ***vout*** e di ***offset*** eventualmente modificati in precedenza.

```

costate Acq{
    if (j<=1000){
        if (flag==0){
            os=offset+(offset1 - offset)*(double)j/1000;
            vo=vout+(vout1-vout)*(double)j/1000;
        }
        if (flag==1)
            vo=vout+(vout1-vout)*(double)j/1000;
        if (flag==2)
            os=offset+(offset1 - offset)*(double)j/1000;
    }
    else{
        if (!acq)
            CoBegin(&Init);
        flag=0; }
    voltout = os + vo * signal[i];

if(pp>0&&pp1==1&&i==ii){
    sprintf(buf_tra,"p?\t%9.4f\t%d",psignal[i],i);
    sertransm();
    pp=pp+1;
    pp1=0;
    ii=ii+1;
    if(ii==100)ii=0;
    if(pp>100)pp=0;
}
anaOutVolts(channel, voltout);
psignal[i]=anaInVolts(0);
i=i+1;
if(i==100){

```

```
i=0;  
pp1=1;  
}  
}
```

Considerando la parte di acquisizione del segnale di pressione, questa è organizzata sfruttando una **funzione IF**, attivata con il comando *psignal?*, che restituisce in uscita un vettore di dimensione cento contenente i valori del segnale di pressione. I cento valori di pressione, corrispondenti alle cento posizioni della curva di spostamento, vengono acquisiti e memorizzati in un array dal computer su scheda con una temporizzazione di 10 ms (quella della *costate Acq*).

La trasmissione dei dati misurati al PC avviene con una frequenza di un campione al secondo. Pertanto, il grafico del segnale di pressione viene aggiornato progressivamente nell'arco di 100 s.

B.2 - BIOREACT_SUPERVISOR1.vi

La struttura principale dello schema a blocchi del software implementato per il bioreattore, è stata progettata come una *sequence*²² (sequenza) formata da due *frame* eseguiti in serie durante il funzionamento del programma.

La **prima parte della sequenza** (Figura 1B) ha i seguenti compiti:

1. inizializzare le “variabili” del programma;
2. predisporre il file per il salvataggio dei dati;
3. fissare i parametri (dimensione del buffer, velocità di trasmissione, numero di bits e bit di stop) necessari per la trasmissione via seriale, sulla base dell’indirizzo della porta utilizzata.

Inoltre, vengono ripulite le finestre grafiche in cui verranno visualizzate le due curve, quella di spostamento e quella del segnale di pressione.

L’inizializzazione delle “variabili”:

- avvio del software;
- spenti tutti i led;
- ripuliti gli indicatori e azzerati i parametri di offset, ampiezza e frequenza.

Tramite la funzione *build array*²³ vengono creati due vettori:

1. contiene tutte le possibili stringhe che possono essere inviate dal controllore (al computer dell’operatore) in risposta ai comandi standard;
2. è di cento elementi posti tutti a zero: viene aggiornato con i valori di pressione acquisiti di volta in volta.

²² Insieme di *frame* eseguiti in sequenza. Ogni *frame* è identificato mediante un indicatore numerico, collocato sulla parte superiore della struttura, che corrisponde all’ordine di esecuzione.

²³ Concatena qualsiasi numero di *array* o singoli elementi collegati in ingresso, in base all’ordine in cui sono collegati, fornendo in uscita un unico vettore.

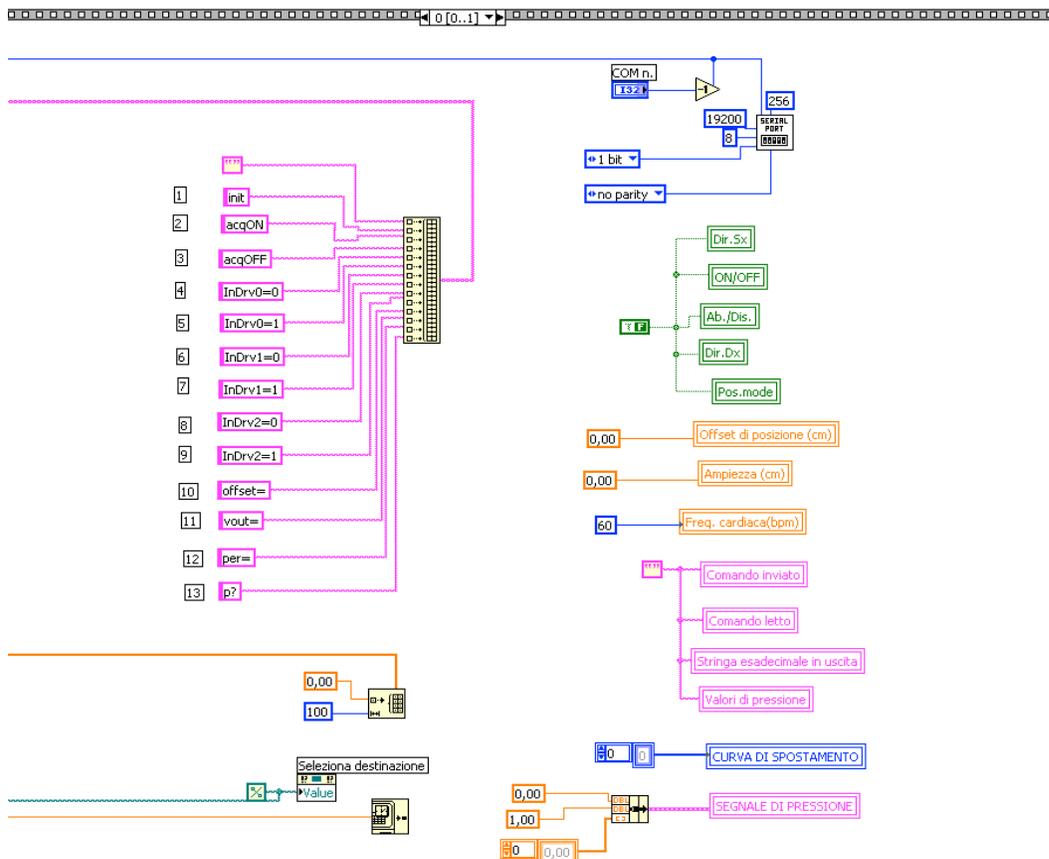


Figura 1B - Frame contenente le istruzioni per l'inizializzazione delle variabili [11].

Tramite quattro *sequence local*²⁴, vengono trasmessi al *frame* successivo:

- i parametri necessari per la trasmissione seriale;
- il vettore delle risposte standard;
- l'array azzerato del segnale di pressione;
- le indicazioni per il salvataggio dei dati.

Secondo step della sequenza: sono presenti tre cicli indipendenti che svolgono delle operazioni essenziali per il corretto funzionamento del software.

²⁴ Consente di rendere disponibile il valore di una variabile presente in un *frame* di una sequenza ai *frames* successivi. Viene rappresentata con un quadrato contenente una freccia, dove il verso di quest'ultima indica la direzione della trasmissione dei dati (in uscita dal frame se la freccia è diretta all'esterno o in ingresso se diretta all'interno).

1. Il primo gestisce la trasmissione dei comandi che l'operatore vuole inviare al computer su scheda;
2. il secondo ciclo si occupa della ricezione delle risposte inviate dall'unità di controllo al computer dell'operatore, elaborandole in modo tale da renderle interpretabili da parte dell'utente umano;
3. il terzo è adibito alle operazioni di salvataggio dei dati.

Tutti e tre hanno al loro interno degli elementi che controllano la temporizzazione, stabilendo ogni quanti ms deve essere ripetuta l'esecuzione.

Gestione dei comandi: operata tramite un **ciclo while** (Figura 2B), sempre attivo, ripetutamente eseguito ogni 200 ms.

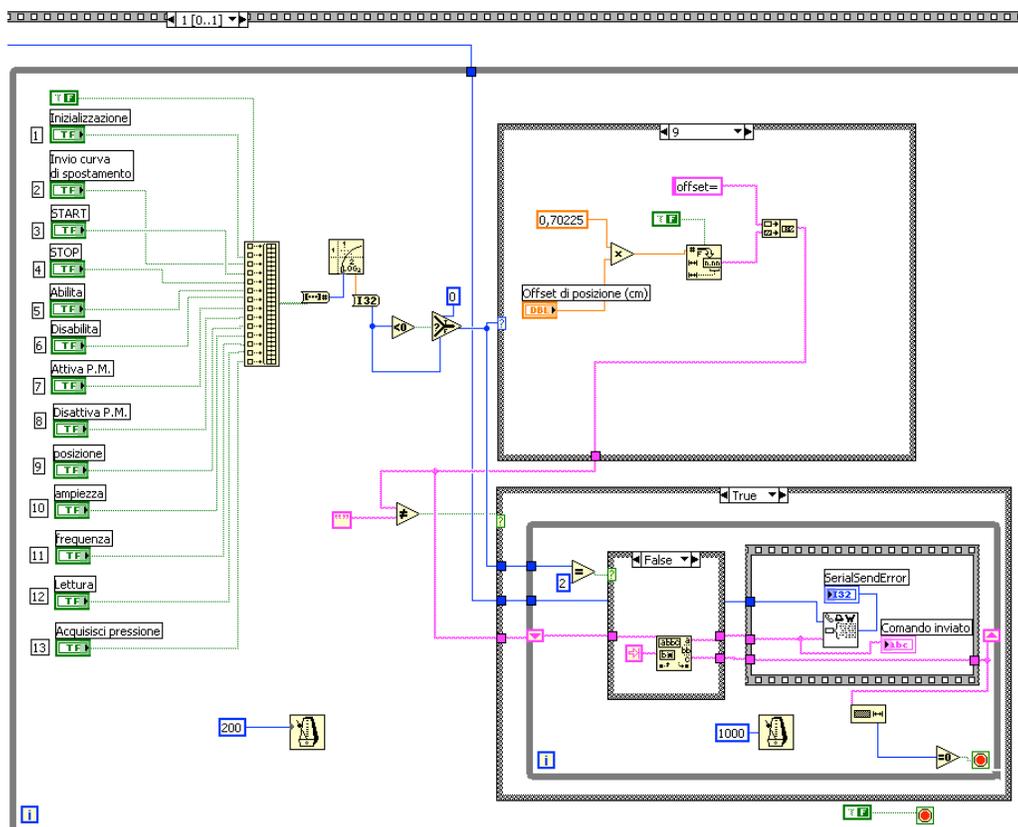


Figura 2B - Ciclo *while* per la gestione dei comandi da trasmettere [11].

Al suo interno sono contenute tre parti fondamentali:

- un ***build array*** a cui vengono collegati i terminali di tutti i pulsanti, rappresentati come variabili booleane, presenti sul pannello frontale;
- una struttura ***switch-case***²⁵ per l'identificazione e la generazione della riga di codice corrispondente al comando da trasmettere;
- una **struttura *IF*** necessaria per l'invio dei comandi, tramite seriale, al Rabbit[®] BL2120.

Quando l'utente aziona un pulsante del pannello frontale, il *build array* dei comandi assume valori falsi in tutte le posizioni tranne per quella corrispondente al tasto premuto, che assume valore vero. Individuando la posizione dell'unico valore vero contenuto nell'array è possibile identificare qual è il tasto premuto dall'operatore.

L'indice ottenuto viene poi trasmesso alla struttura ***switch-case***, contenente tanti casi quanti sono i comandi, la quale esegue le istruzioni corrispondenti al pulsante azionato in modo tale da generare la riga di codice relativa al comando da trasmettere al computer su scheda. Una volta elaborata, la stringa viene inviata al successivo ciclo *IF* che si occupa della trasmissione vera e propria del comando.

La stringa in ingresso al ciclo *IF* deve essere diversa dalla stringa vuota, altrimenti non viene eseguita alcuna operazione.

All'interno della *IF* il codice in uscita dalla struttura ***switch-case*** viene:

- sovrascritto nel buffer di trasmissione della seriale, nel caso in cui la riga di comando sia formata da una sola stringa,
- è sottoposto ad un trattamento preventivo nel caso di stringhe concatenate.

Considerando, per esempio, i comandi relativi ai pulsanti **Attiva P.M.** e **Disattiva P.M.**, essi sono formati da due stringhe (una riguardante la modalità ***position mode*** e l'altra connessa alla direzione di spostamento) concatenate tra loro e separate mediante un **tab**.

All'interno della struttura *IF* questi comandi vengono gestiti tramite un **ciclo *while*** (con temporizzazione di 1 s) che separa la riga di comando nelle due stringhe che la

²⁵ Struttura logica che consente l'elaborazione condizionata di sub-diagrammi sulla base del valore assunto da una determinata variabile.

compongono, inviando in serie ciascuna delle due parti, considerate come due comandi distinti.

Per questa operazione ci si avvale della funzione *match pattern*²⁶ e degli *shift register*²⁷ che consentono la corretta separazione del codice di comando nelle due parti necessarie, mediante la ricerca del carattere tab all'interno della stringa da analizzare.

Ricezione delle risposte (inviata dall'unità di controllo al computer dell'operatore): è organizzata all'interno di un ciclo *while*, sempre attivo, che viene ripetuto ogni 200 ms. Si sfruttano una *sequence* a due *frames*:

- nel primo frame la stringa letta, nel buffer di ricezione della seriale, viene:
 - visualizzata nel riquadro **Comando letto**;
 - in seguito si opera un'analisi tramite *match pattern* per individuare la presenza del tab al suo interno.
- Una volta scomposta la stringa in due parti, queste vengono trasmesse al frame successivo, tramite due *sequence local*, dove avviene l'analisi vera e propria della risposta.

Una volta effettuata la misura, la riga di codice ricevuta viene elaborata direttamente nel primo frame (Figura 3B) controllando se i primi tre caratteri corrispondono alla stringa *ain*; in caso affermativo, dal codice della risposta viene isolato il valore della misura, tramite la funzione *string subset*²⁸, che verrà poi visualizzato nelle caselle **Valore letto in mV** e in **Valore letto in mmHg**, dopo un opportuno processo di conversione.

Per tutte le altre opzioni, nel secondo frame, viene eseguita una ricerca all'interno del vettore delle risposte standard per individuare il tipo di codice ricevuto. La ricerca è effettuata mediante la funzione *search 1D array*²⁹ che restituisce direttamente l'indice

²⁶ Funzione che ricerca una certa espressione (*pattern*) all'interno di una stringa, restituendo in uscita tre elementi: il *pattern*, la parte di stringa precedente e quella successiva al *pattern*.

²⁷ Variabili locali che consentono di trasferire il valore di una variabile dalla fine di un iterazione del ciclo alla successiva.

²⁸ Ricerca un certo elemento all'interno di un array restituendo l'indice associato all'elemento trovato.

²⁹ Restituisce una sotto stringa estratta da quella di partenza a partire da una certa posizione di offset, per un ben definito numero di caratteri.

corrispondente all'elemento individuato, inviandolo all'ingresso di una struttura **switch-case** che, in base al valore ricevuto, esegue le istruzioni contenute nel sub-diagramma corrispondente, tipicamente accensione/spegnimento dei led, elaborazione di grafici e visualizzazione di messaggi di testo.

Nel sub-diagramma 13 (Figura 4B) viene gestita la risposta relativa al comando **psignal?**: consente di ottenere i cento campioni del segnale di pressione, con i rispettivi indici, separati da dei tab.

Ogni volta che il computer del laboratorio riceve la stringa contenente il valore di pressione e il corrispondente indice va a separarla, sulla base della ricerca del tab, in modo tale da distinguere i due contributi numerici. Il valore e l'indice vengono poi convertiti da stringhe a valori numerici per poter essere inseriti nell'array del segnale di pressione. In questo modo ognuna delle cento misure di pressione viene inserita all'interno dell'array nella posizione corrispondente all'indice rilevato e successivamente visualizzata nella finestra grafica.

Il grafico viene costruito sfruttando un **bundle**³⁰ a cui sono collegati:

- un offset di partenza ($x_0=0$);
- il periodo di campionamento dell'asse x sulla base del valore assegnato alla frequenza del processo;
- il vettore contenente i valori di pressione acquisiti.

Tramite un **formula node** la frequenza inserita dall'utente viene convertita nel periodo di campionamento del segnale misurato.

³⁰ È una funzione di LabView™ che consente di riunire in un unico cluster più dati anche di tipi differenti tra loro.

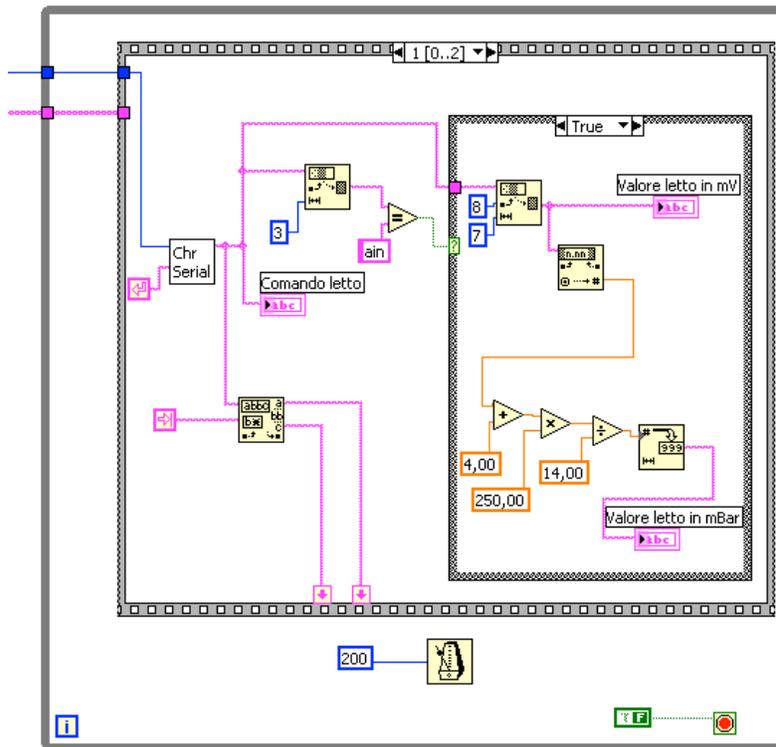


Figura 3B: primo frame del ciclo di ricezione delle risposte.

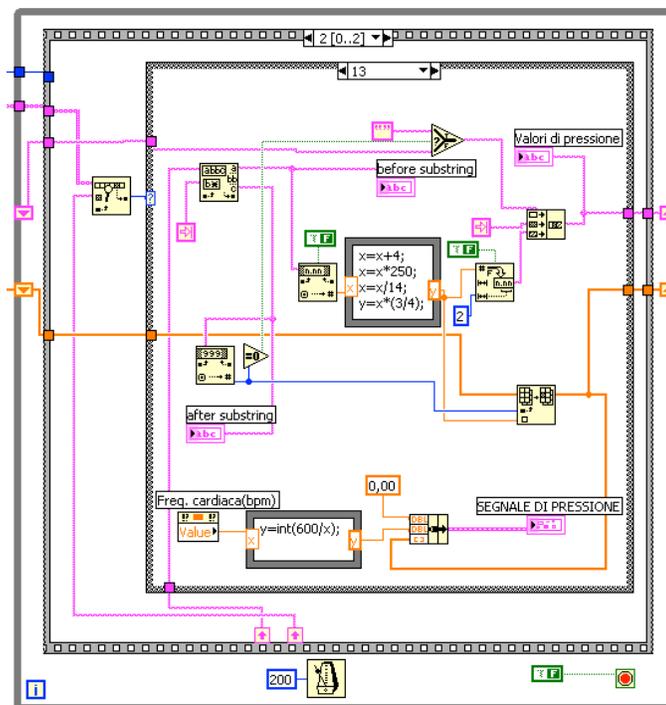


Figura 4B: secondo frame del ciclo di ricezione delle risposte relativo alla gestione delle misure di pressione.

La struttura *formula node*³¹, al centro del sub-diagramma 13 (Figura 4B), consente di scrivere al suo interno una serie di istruzioni, secondo le regole della programmazione tradizionale, evitando di ricorrere agli elementi grafici convenzionali del linguaggio G. (in questo caso sono contenute le espressioni necessarie per convertire il valore di pressione misurato da mV a mmHg).

Terzo ciclo (Figura 5B): relativo al salvataggio dei dati; esso prevede che all'avvio del programma (frame 0) venga svuotata la casella per la selezione dell'indirizzo in cui salvare i dati.

Nel frame 1, che si trova all'interno di un ciclo *while* (con temporizzazione di 100 ms) contenente due *IF* nidificate e un ciclo *for*, sono presenti le funzioni che consentono di selezionare la destinazione in cui salvare i dati, con la possibilità di creare un file nuovo o di sovrascrivere i dati all'interno di un file già esistente. I valori vengono salvati tramite il ciclo *for* a cento iterazioni, che consente di inserire all'interno del file scelto i cento campioni del segnale di pressione, prelevati dal grafico **SEGNALE DI PRESSIONE**, con i relativi indici.

³¹ Le variabili di I/O della struttura *Formula Node* sono definite mediante le voci *Add input*, che permette di aggiungere una variabile di ingresso, e *Add output*, che consente di aggiungere una variabile di uscita. L'utilità di questa funzione è quella di ridurre il numero di elementi grafici da utilizzare per eseguire una determinata espressione rendendo così più leggibili le operazioni svolte.

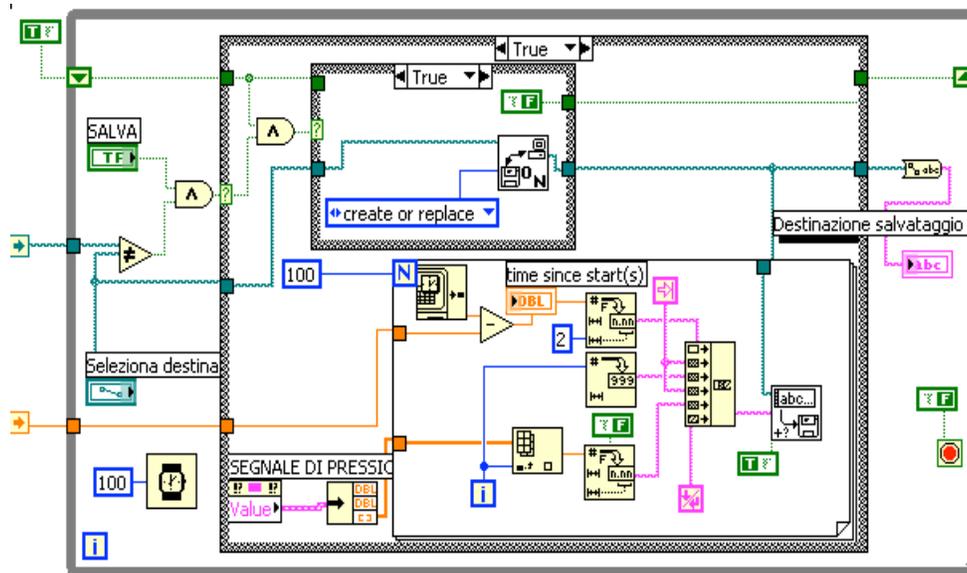


Figura 5B: ciclo while per il salvataggio dei dati.

Utilizzo del software:

1. caricamento del file contenente i cento campioni della curva di spostamento:
 - ✓ cliccare sul pulsante **Invio curva di spostamento**
 - ✓ selezionare il file **SegnaleSpostamento1.txt** dalla finestra **Apri**.
2. avvio della fase di acquisizione dei comandi:
 - ✓ cliccare sul tasto **START**;
 - ✓ se il comando è stato ricevuto correttamente dall'unità di controllo, viene acceso il led **ON/OFF**.
3. attivazione della fase di acquisizione:
 - ✓ abilitare il motore elettrico tramite il tasto **Abilita**: in risposta a questa azione l'attuatore si porta in posizione "zero" e vengono accesi i led **Ab./Dis.** e **Dir.Dx** (indica la direzione di spostamento del motore);
 - ✓ attivare il *position mode* con il tasto **Attiva P.M.**: il risultato di questa azione è quello di invertire la direzione di spostamento del motore e rendere attiva la modalità di posizionamento, con la conseguente accensione dei led **Pos.mode** e **Dir.Sx**.

D'ora in poi è possibile inserire o modificare i vari parametri di processo.

4. Agendo sulla barra di controllo **Offset di posizione (cm)** o sul corrispondente controllo numerico digitale, si può scegliere il punto da cui far partire l'azione del motore elettrico (corrispondente al valore della pressione minima desiderata), che sarà trasmesso al computer su scheda solo nel momento in cui verrà premuto il tasto **ENTER** (posizione).
5. Agendo sulla barra di controllo **Ampiezza (cm)** o sul corrispondente controllo numerico digitale si modifica l'ampiezza del movimento effettuato dall'attuatore.
6. Per modificare la frequenza è necessario interagire con il controllo numerico digitale **Freq. Cardiaca (bpm)**:
 - ✓ selezionare il valore desiderato;
 - ✓ premere il tasto **ENTER** (frequenza) per inviare il comando (di default la frequenza impostata è di 60 bpm).
7. Se durante il normale funzionamento del processo si vogliono effettuare delle misure dai sensori collegati ai canali analogici è necessario:
 - ✓ selezionare il canale analogico, mediante il controllo numerico **Ingresso Analogico**, a cui è collegato il sensore;
 - ✓ premere il tasto **Lettura**;
 - ✓ i valori acquisiti verranno visualizzati nelle caselle di testo **Valore letto in mV** e **Valore letto in mmHg**.
8. Per la lettura del segnale di pressione:
 - ✓ selezionare il canale analogico opportuno;
 - ✓ premere il tasto **Acquisisci pressione** per avviare l'acquisizione;
 - ✓ i valori verranno visualizzati in forma numerica nella casella di testo **Valori di pressione** con un contemporaneo aggiornamento della finestra grafica per poter visualizzare l'andamento del segnale.
9. Per salvare i dati acquisiti, relativi al segnale di pressione, si deve:
 - ✓ selezionare il percorso in cui salvare il file: è possibile creare un file nuovo o sovrascrivere i dati su un file precedentemente creato;

- ✓ nella casella **Destinazione salvataggio dati** viene indicato l'indirizzo di memoria in cui si potrà reperire successivamente il file.
 - ✓ cliccare sul pulsante **SALVA**: in questo modo il software andrà a salvare in automatico i cento valori all'interno del file precedentemente creato.
10. Prima di arrestare l'esecuzione del software è necessario (in questa versione del programma) eseguire alcune operazioni:
- ✓ azzerare l'ampiezza del movimento del motore elettrico, in modo da farlo fermare gradualmente;
 - ✓ disattivare il motore (pulsante **Disabilita**) e anche la modalità position mode (tasto **Disattiva P.M.**);
 - ✓ azzerare l'offset di posizione;
 - ✓ disattivare la modalità di acquisizione dei comandi (tasto **STOP**).
11. Al termine del procedimento descritto si può procedere all'arresto del software. Nelle evoluzioni del progetto queste ultime operazioni potranno essere automatizzate.

APPENDICE FORNITORI

Teflon[®], PVC e PMMA sono stati forniti da:

G.B. Plast S.r.l

Via Bolzani 123

35020 Maserà (PADOVA)

Guarnizioni di tenuta del pistone e O-ring sono stati forniti da:

PANAR AUTOMAZIONI S.r.l.

Via Avanzo 67

35132 PADOVA

Tubi in PVC flessibile con rinforzo interno in fibra di poliestere usati per realizzare il circuito idraulico sono stati forniti da:

FIP Articoli Tecnici S.r.l

Viale Regione Veneto 9

35127 PADOVA

Il cilindro in acciaio inox AISI 316 è stato fornito da:

C.A.T.I S.p.A – Commercio Articoli Tecnici Industriali

Via Ugo Foscolo 12/14

35131 PADOVA

I trasduttori di pressione Honeywell (da 0 – 5 psi) sono stati forniti da **RS Components**

(<http://it.rs-online.com/web/>):

Costruttore: **HONEYWELL**

Codice costruttore: 24PCBFA6G

Codice RS: 235-5807

I microswitches Cherry V3 16A a rotella sono stati forniti da **RS Components**
(<http://it.rs-online.com/web/>):

Costruttore: **CHERRY**

Codice costruttore: D45U-V3RD

Codice RS: 159-4562

Il Rabbit[®] BL2120 single-board computer è stato fornito da:

PRIMECONCEPT S.r.l

Business Palace

Corso Susa 299/A

10098 Rivoli (TO)

Il motore elettrico lineare Parker PRA3810S e l'unità drive SLVD-5N sono stati forniti
da:

PARKER HANNIFIN S.p.A

Via Gounod 1

20092 Cinisello Balsamo (MI)

Il soffietto in TPE è stato fornito da:

FLUID SYSTEM srl

Via Newton 33

31050 Villorba (TV)

BIBLIOGRAFIA

- [1] Di Bello C., “Biomateriali. Introduzione allo studio dei materiali per uso biomedico”, Pàtron Editore 2004.
- [2] De Zanet D., “Bioreattori per l’ingegneria tissutale della cartilagine”, Università degli studi di Padova 2009-2010.
- [3] Mantero S., Remuzzi A., T. Raimondi M., Ahluwalia A., “ Fondamenti di ingegneria dei tessuti per la medicina rigenerativa”, Pàtron Editore 2009.
- [4] Barron V., Lyons E., Stenson-Cox C., McHugh P.E., Pandit A., “Bioreactors for Cardiovascular Cell and Tissue Growth: A Review”, *Annals of Biomedical Engineering*, 2003, 31:1017-1030.
- [5] Di Bello C., Bagno A., “Interazioni tra biomateriali e tessuti”, Pàtron Editore 2009.
- [6] Ruel J., Lachance G., “A new bioreactor for the development of tissue-engineered heart valves”, *Annals of Biomedical Engineering*, 2009, pp. 674–681.
- [7] Berry J.L., Steen J.A., Williams J.K., Jordan J.E., Atala A., and Yoo J.J., “Bioreactors for development of tissue engineered heart valves”, *Annals of Biomedical Engineering*, 2010, pp. 3272–3279.
- [8] <http://www.corriere.it/salute/dizionario/valvulopatia/index.shtml>.
- [9] Mendelson K., J.Schoen F., “Heart valve tissue engineered: concepts, approaches, progress and challenges”, *Annals of Biomedical Engineering*, 2006, pp. 1799–1819.

- [10] Zeltinger J., Landeen L.K., Alexander H.G., Kidd I.D., Sibanda B., “Development and characterization of tissue-engineered aortic valves”, *Tissue Engineering* 2001, 7:9-22.
- [11] Canella D., “Sviluppo di un bioreattore innovativo per la produzione di valvole cardiache ingegnerizzate”, Università degli studi di Padova 2010-2011.
- [12] Mol A., Driessen N.J., Rutten M.C., Hoerstrup S.P., Bouten C.V., Baaijens F.P., “Tissue engineering of human heart valve leaflets: a novel bioreactor for a strain-based conditioning approach”, *Annals of Biomedical Engineering* 2005,33:1778-1788.
- [13] Syedain Z.H., Tranquillo R.T., “Controlled cyclic stretch bioreactor for tissue-engineered heart valves”, *Biomaterials* 2009,31:2549-2554.
- [14] Morsi Y.S., Yang W.W., Owida A., Wong C.S., “Development of a novel pulsatile bioreactor for tissue culture”, *Journal of Artificial Organs* 2007,10:109-114.
- [15] Vismara R., Soncini M., Talò G., Dainese L., Guarino A., Redaelli A., Fiore G.B., “A bioreactor with compliance monitoring for heart valve grafts”, *Annals of Biomedical Engineering* 2010,38:100-108.
- [16] www.dis.uniroma1.it/salinari/Didattica/corso%20IX.ppt.
- [17] Westerhof N., Lankhaar J.W., Westerhof B.E., “The arterial Windkessel”, *Med Biol Eng Comput*, 2008.

Manuali tecnici

[M1] Manuale motore lineare Parker PRA3810S: “*PowerRod Actuators and components*”, Catalog: 192-570006 N2 / UK Version 2, 2006

[M2] Manuale Cherry Microswitches D45X prelevato dal sito internet <http://it.rs-online.com/web/>

[M3] Manuale Honeywell Trasduttori di pressione non compensati, 1998

[M4] Manuale drive Parker SLVD5N del motore elettrico, 2009

[M5] Manuale Dynamic C, “Dynamic C User’s Manual”, Rabbit[®] 2008

RINGRAZIAMENTI

Arrivata alla fine del mio percorso universitario, vorrei esprimere un sentito ringraziamento alle persone che hanno contribuito al raggiungimento di questo giorno.

Ringrazio il Professor Andrea Bagno che mi ha permesso di lavorare per questo progetto e che, anche se abbiamo incontrato qualche difficoltà, ha mostrato grande professionalità e mi ha permesso di concludere il lavoro, stimolando un grande interesse per l'argomento.

Ringrazio Giorgio Delfitto, che mi ha accompagnato anch'egli nella realizzazione della tesi, dandomi un grosso aiuto.. una persona di cui ammiro fortemente le conoscenze. Senza il suo aiuto forse non sarei riuscita a terminare la tesi come meglio potevo.

Un GRAZIE dal profondo del cuore va ai miei genitori, che hanno reso tutto ciò possibile.

Mi avete accompagnato in tutti questi anni di studio donandomi l'aiuto e il conforto anche nei momenti più difficili, aiutandomi a rialzarmi e avvicinandomi ad una persona che mi è stata di enorme aiuto, il Dott. Dal Fiume, che voglio ringraziare infinitamente per l'appoggio e gli insegnamenti datimi/ci in questi anni.. ora posso dire che va molto meglio ☺.

Sono successe molte cose in questi anni.. cose belle e purtroppo anche brutte, ma grazie all'amore reciproco con i miei genitori sono riuscita a guardare avanti e ad affrontare le cose nel miglior modo possibile. Se non ci fosse la mamma mancherebbe un po' di ottimismo e se non ci fosse il papà mancherebbero i piedi ben saldi per terra. Mi avete insegnato molto e, anche se sembra banale dirlo, grazie a voi sono in grado di affrontare la mia vita.

Siate davvero felici, perché siamo una bella famiglia!

Ringrazio Luca: anche se a volte abbiamo opinioni diverse e ci scontriamo, tengo sempre per me tutti i bei momenti passati insieme. Sono felice vedendoti accanto all'Agne!

Ringrazio Francesca.. come farei senza di te.. la mia anima gemella ☺. Anche se distanti nello studio siamo sempre in contatto, un rapporto a cui non voglio mai rinunciare! Ti ringrazio per i gesti, le parole, la convivenza di una vita ricca di esperienze, momenti di contrasto e gioie.. tutto ci è servito per creare una sana sintonia insieme!!

Ringrazio Guido, una delle persone più importanti della mia vita.. mi hai accompagnato in questi ultimi anni donandomi il tuo Amore in ogni momento, soprattutto quando sono scoraggiata e quando non sono stata bene.. mi sei sempre stato accanto con infinita pazienza. La tua presenza è per me fondamentale.. mi rendo conto che non avrei potuto trovare di meglio..! Tutti i momenti passati insieme sono meravigliosi e spero ce ne siano altri per mooolto tempo!!

Voglio ringraziare anche la Sandra e Roberto, che mi hanno sempre accolta in casa come una di famiglia.

Ringrazio tutte le Amiche e amici di Verona.. anche se ci vediamo poco, i momenti passati insieme sono sempre unici e so che ci sarete sempre: Elena A, Elena B, Irene, Laura, Patty, Valentina A, Valentina B, Valentina T, Mauro, Salvo.

Grazie anche alle amiche di Padova: Arianna, Chiara, Claudia, Deborah, Francesca Pelizzaro, Francesca Peroli e a tutti gli altri compagni di corso che ho incontrato nel mio cammino.. ognuno di voi mi ha insegnato e lasciato qualcosa!! Grazie!!

Nella mia vita ho imparato che niente è dato per scontato, che ci sono tanti ostacoli.. Ostacoli che ho sempre cercato di superare, mi sono battuta per ciò che desideravo e che era giusto.

Mi sento di dire che tutto quello che ho avuto me lo sono costruito e forse anche meritato.

Allora è anche giusto che mi dica: BRAVA..hai finito!

Chiara

*“Non permettere a nessuno di dirti
che quello che desideri è irraggiungibile,
se hai un sogno devi difenderlo,
se vuoi qualcosa, vai e prenditela!”*