

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA



FACOLTA' DI INGEGNERIA

**PROGETTAZIONE DI UN SISTEMA A UNA POMPA
PERISTALTICA PER LA SEMINA DI COLTURE
CELLULARI**

Relatore: Ch.mo Prof. ALFREDO RUGGERI

Correlatore: Ing. Federica Meneghesso

Laureanda: ALICE NARDO

Corso di Laurea Triennale in Ingegneria Biomedica

Anno Accademico 2009/2010



Indice

CAPITOLO 1	5
Ingegneria Tissutale e scaffolds.....	5
1.1 Scaffolds Esofagei	7
1.2 Le Cellule Staminali	10
1.3 Cellule Staminali Adulte.....	12
1.4 Cellule Staminali Mesenchimali	14
CAPITOLO 2	17
Lavorazione e Strumentazione Utilizzata	17
2.1 Prima Fase.....	17
2.1.1 IL ROBOT YAMAHA.....	18
2.1.2 IL BISTURI A RISONANZA QUANTICA MOLECOLARE VESALIUS® ...	20
2.2 Seconda Fase	23
CAPITOLO 3	27
Sperimentazioni	27
3.1 Fase Preparatoria	29
3.2 Prima Fase: 500 ml	31
3.3 Seconda Fase: 420 ml	37
2.4 Terza Fase: 256 ml	40
CAPITOLO 4	44
Risultati Delle Sperimentazioni E Prospettive Future	45
4.1 Risultati ottenuti e loro valutazione.....	45
4.2 Ipotesi Teoriche	31
4.3 Nuovo Progetto.....	48
4.4 Lavorazione Sterile.....	51
Bibliografia.....	54



CAPITOLO 1

Ingegneria Tissutale e scaffolds

Il termine ingegneria tissutale (Tissue Engineering) indica l'insieme delle procedure di coltura in laboratorio di cellule su strutture tridimensionali dette anche *scaffolds*, per ottenere nuovi tessuti sostitutivi a quelli originali. Questi scaffolds destinati ad accelerare i processi di guarigione, per rigenerare tessuti che non assolvono più la propria funzione, sia meccanica che conformazionale.

Questo tipo di ricerca è nato sia per il crescente fabbisogno di tessuti e organi che le donazioni non sono in grado di soddisfare, sia per le difficoltà che tuttora esistono nella questione riguardante il rigetto dell'impianto.

La sfida dell'ingegneria tissutale è duplice: da un lato si tratta di individuare un supporto (matrice o scaffold) adatto con il quale le cellule siano in grado di interfacciarsi per formare strutture stratificate, dall'altro di capire e riprodurre le condizioni che consentano a queste ultime di crescere, moltiplicarsi e differenziarsi nei diversi tipi di tessuti.

Lo scaffold può essere pensato come un vero e proprio telaio, di natura sintetica o naturale, quest'ultimo deriva da donatore: *omologo* se appartenente alla stessa specie, *xenologo* se appartenente ad una specie diversa o *autologo* se prelevato dal paziente stesso. Esso funge da struttura per lo sviluppo tridimensionale delle colture cellulari (disposizione 3D e deposizione di matrice extracellulare), cercando di risultare il più possibile simile alla matrice extracellulare originaria.

La matrice extracellulare è costituita da una complessa miscelanza di macromolecole strutturali e funzionali, ragion per cui riveste un ruolo molto importante nella morfogenesi di tessuti ed organi nonché nel mantenimento della struttura e della funzione delle cellule e dei tessuti. È costituita da glicoproteine, proteoglicani e da acido ialuronico. Il componente più abbondante dell'ECM è il collagene, a seconda della sua composizione e morfologia, altamente variabile, l'ECM può favorire il supporto delle cellule, il loro ancoraggio e la rigenerazione di tessuti di nuova formazione.

La matrice è inoltre importante durante la crescita, lo sviluppo, la riparazione delle ferite: la sua composizione dinamica agisce come una riserva di molecole solubili di segnale che veicolano i segnali provenienti da altre sorgenti promuovendo la migrazione, proliferazione e il differenziamento delle cellule, finalizzato alla formazione di tessuto/organo. Questi segnali esterni provengono da fattori di crescita, da interazioni cellula-ECM e cellula-cellula, da stimoli meccanici e fisico-chimici. Per queste sue molteplici peculiarità la matrice extracellulare è stata utilizzata e sviluppata come scaffold biologico nelle applicazioni di ingegneria tissutale[rif 1].

Generalmente la produzione di nuova ECM (Extra Cellular Matrix) è accompagnata da una contemporanea degradazione controllata dello scaffold. Esso subisce fenomeni e modificazioni che portano alla sua "scomparsa", lasciando dietro di sé unicamente il tessuto riprodotto.

Lo scaffold deve essere in grado di:

- Provvedere naturalmente all'attecchimento delle cellule e al supporto delle stesse;
- Avere a disposizione un'area sufficiente da consentire la proliferazione delle cellule;
- Sviluppare la capacità di modellarsi in strutture specifiche;
- Degradarsi una volta *in vivo* senza rilasciare materiale tossico;
- Permettere e favorire la crescita delle cellule ospiti;

Uno scaffold, quindi, deve essere considerato a tutti gli effetti un biomateriale, in quanto deve interfacciarsi con l'ospite influenzando i processi di migrazione cellulare, di infiltrazione vascolare, di contrazione e di divisione cellulare.

Poiché le cellule usate per coltivare i tessuti vengono generalmente prelevate dal paziente stesso, l'eventualità di una reazione di rigetto è nettamente inferiore rispetto al trapianto di un tessuto estraneo. Uno studio fatto da Gilbrt et al.[rif 2] ha evidenziato, infatti, che la maggior parte degli scaffolds di ECM disponibili in commercio contengono tracce del DNA originale, residuo dei processi di decellularizzazione. Tali tracce di DNA possono essere la causa scatenante di una reazione immunologica.

Gli scaffold utilizzati devono essere biodegradabili e immunologicamente inerti una volta entrati in contatto con l'organismo. Gli scaffold di tipo naturale rispondono a tali requisiti, oltre ad essere meno costosi rispetto agli artificiali e ad avere la proprietà importantissima di adattarsi al sito nel quale vengono impiantati e a crescere con esso.

La difficoltà, ad oggi, legata all'utilizzo di scaffold naturali in l'ingegneria tissutale è la loro lavorazione, che presenta non pochi problemi. Essi infatti sono difficilmente lavorabili in 3D: il rischio è la diminuzione della stabilità delle proprietà meccaniche del tessuto. Il processo chimico messo in atto per la decellularizzazione degli scaffold, infatti, ne indebolisce la struttura e influisce sulla sua risposta al sistema.

Gli scaffold naturali, o bioscaffold, derivano da matrice extracellulare che può essere di tipo xenogenico, omologo o autologo. La sicurezza e l'efficacia di tali scaffold, impiegati per la riparazione e ricostruzione di numerosi tessuti del corpo, è stata dimostrata sia da studi clinici sugli animali, sia da studi sull'uomo.

La lavorazione di questi scaffold prevede che essi vengano prima decellularizzati e in seguito sterilizzati, ed è stato possibile constatare che la matrice extracellulare presenta significative modifiche nelle proprietà biologiche e meccaniche al termine della lavorazione, risultando gravemente indebolita dal trattamento.

L'organizzazione tridimensionale dello scaffold naturale lo distingue da quello sintetico in quanto favorisce il rimodellamento costruttivo del tessuto piuttosto che la semplice cicatrizzazione che accompagna generalmente il processo di guarigione di un biomateriale sintetico impiantato.

1.1 Scaffold Esofagei

La costante difficoltà nel reperire organi è il primo incentivo per lo sviluppo e la ricerca nel campo dell'Ingegneria Tissutale, che si pone come obiettivo quello di ottenere sostituti funzionali che sopperiscano disfunzioni o deficit dei tessuti.

Un vasto campo di interesse per le applicazioni dell'Ingegneria Tissutale è la chirurgia pediatrica e neonatale, in quanto sono numerosi i casi di bambini affetti da malformazioni

congenite o lesioni post-trauma che richiedono interventi di sostituzione o ampliamento di tessuti o organi compromessi nella fase neonatale.

In questo lavoro di Tesi le applicazioni delle tecniche ricostruttive dell'Ingegneria Tissutale riguardano principalmente l'apparato digerente, con particolare attenzione rivolta all'esofago. Malformazioni congenite, malattie acquisite, disfunzioni post-traumatiche possono essere alcune delle cause che richiedono un intervento di ricostruzione o, nel peggiore dei casi, di sostituzione dell'intero tratto alterato.

Le principali patologie, siano esse congenite o acquisite, che richiedono un intervento di ricostruzione/sostituzione esofagea sono:

- cancro all'esofago, al quinto posto per diffusione nei paesi sviluppati;
- ingestione di caustica, accidentale nei bambini e volontaria negli adulti;
- Atresia Esofagea, ovvero mancanza di continuità dell'esofago, vale a dire che l'esofago si interrompe, termina a fondo cieco e non comunica con lo stomaco;
- Fistola Tracheo Esofagea, ovvero la comunicazione tra una porzione dell'esofago e la trachea che in questi casi, per un tratto più o meno lungo, è in comune alla via respiratoria e digerente.

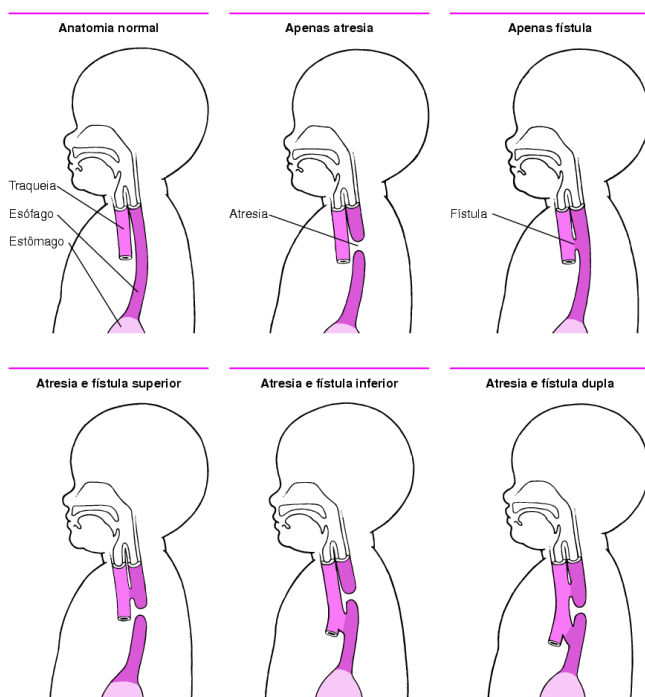


Figura 1: Atresia Esofagea e Fistola Esofagea

La ricostruzione esofagea rimane tutt'ora un risultato impegnativo negli interventi pediatrici e non. Infatti, nonostante quest'organo appaia "semplice" da un punto di vista anatomico, la sua sostituzione rappresenta la complessità di un'esofagectomia in virtù della grande difficoltà nel riprodurre le proprietà e le funzioni essenziali della struttura originaria.

Tipicamente l'esofago presenta scarse eccedenze di

tessuto, pertanto l'utilizzo di strutture autologhe per la ricostruzione risulta difficile. Perfino piccoli segmenti mancanti spesso richiedono complicate interposizioni tubolari. Sono stati usati innesti di tessuto autologo prelevato da stomaco, pelle, intestino, per riparare segmenti esofagei danneggiati, ma le complicazioni derivanti da impianti di questo tipo sono elevate (30-40 % dei casi) perché generalmente non si riescono a riprodurre le stesse funzionalità meccaniche dell'esofago.

Negli ultimi anni gli scaffolds naturali derivanti dalla decellularizzazione di tessuti e organi sono stati utilizzati con successo in applicazioni cliniche. Matrici A-cellulari (AMs) sono ottenute tramite il trattamento dei tessuti con diversi reagenti che rimuovono le componenti cellulari lasciando quasi intatta la matrice extracellulare. E' stato dimostrato che possono supportare *in vitro* l'adesione, la crescita e mantenere la funzionalità di diversi tipi di cellule[rif 3].

L'utilizzo pertanto degli scaffolds naturali presenta vantaggi notevoli. Per quanto riguarda lo scaffold naturale per la rigenerazione della parete esofagea, uno studio fatto da Marzaro et al., ha evidenziato l'utilità a questo scopo della matrice acellulare esofagea omologa di maiale (HEAM, Homologous Esophageal Acellular Matrix) prelevata da maiale. Questo scaffold, infatti, possiede uno spessore e una struttura che si avvicina molto alla struttura del tessuto nativo.

Gli scaffolds naturali rappresentano strutture pre-modellate la cui lunghezza e diametro possono essere scelti coerentemente alle dimensioni del difetto da riparare. Un altro vantaggio è la possibilità di avere disponibilità illimitata di innesti poco costosi contenenti i recettori specifici del tessuto.

Uno step fondamentale in Ingegneria Tissutale è la scelta della linea cellulare da seminare. Le cellule trapiantate possono essere cellule differenziate o cellule staminali. Le cellule mature possono essere raccolte direttamente dal ricevente, evitando così reazioni di tipo immunitario. Inoltre, le cellule autologhe rivestono un ruolo fondamentale per favorire l'integrazione *in vivo* del tessuto ingegnerizzato in quanto inviano segnali per il reclutamento delle cellule ospiti e diminuiscono il rischio che si presentino reazioni infiammatorie.

Il progetto studiato in questo lavoro di Tesi prevede l'impiego come coltura cellulare di *cellule staminali*. Grazie alle peculiarità di queste ultime, sarebbe infatti possibile

ottenere in un breve lasso di tempo importanti quantitativi di cellule identiche, capaci di differenziarsi nei tipi di cellule interessate. Le cellule staminali, infatti, possono essere pensate come cellule versatili e non specializzate, che hanno la potenzialità sia di dividersi per dare origine ad altre cellule staminali sia di differenziarsi in un tipo specifico di cellule, grazie all'azione di specifici fattori di crescita¹ che la indirizzano verso una specifica differenziazione.

E' stato dimostrato che cellule differenziate possono essere ottenute *in vitro* da cellule staminali adulte, come quelle mesenchimali presenti nel midollo osseo [rif 4]. Cellule progenitrici derivate dal midollo osseo sono in grado di differenziarsi in molteplici tipi di cellule specializzate in condizioni di crescita appropriate, e sono già state usate per riparare una grande varietà di tessuti danneggiati, come cartilagini, miocardio, fegato e recentemente per curare il diabete. Esse si affidano all'ambiente extracellulare per il loro sviluppo in tessuti funzionali, pertanto gli scaffolds nei quali esse verranno coltivate, devono essere tali da indirizzare e favorire la funzione e differenziazione delle cellule.

1.2 Le Cellule Staminali

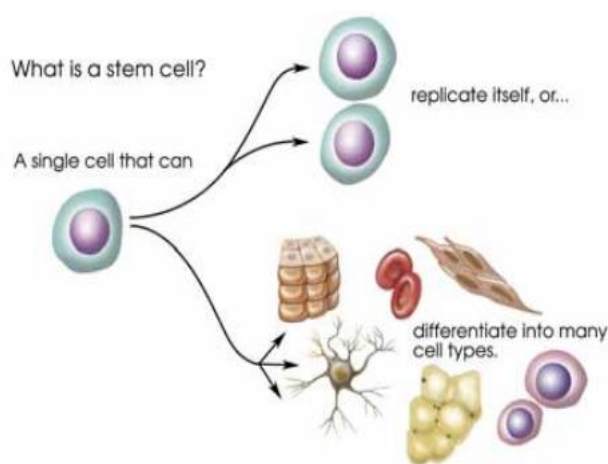


FIG 2. Comportamento di una cellula staminale

Le cellule staminali si caratterizzano dagli altri tipi di cellule perchè sono cellule non differenziate, o non specializzate, nel senso che non hanno ancora una funzione ben precisa all'interno dell'organismo stesso. Le staminali possono riprodursi in maniera pressochè illimitata, dando

vita contemporaneamente ad altre cellule staminali e a cellule *precursori* di una progenie cellulare destinata a differenziarsi e a dar vita a tessuti e organi, come i muscoli, il cuore, il fegato, le ossa ecc. Le cellule staminali hanno infatti la capacità sia di rigenerare loro

stesse (attraverso la mitosi), sia di differenziarsi e generare quindi delle cellule specializzate, programmate per operare e agire in uno specifico distretto del corpo umano.

Le cellule staminali sono caratterizzate dalla loro *prolungata capacità autorigenerativa* e dalla loro *replicazione asimmetrica*. La replicazione asimmetrica definisce una peculiare proprietà delle cellule staminali, ossia ad ogni divisione cellulare una delle cellule mantiene la sua capacità di rinnovamento, mentre l'altra prosegue in un percorso di differenziamento entrando a far parte di una popolazione di cellule mature che ha perso la capacità di replicarsi. Pertanto, all'interno di un gruppo di cellule staminali, alcune si autorigenerano, altre si differenziano.

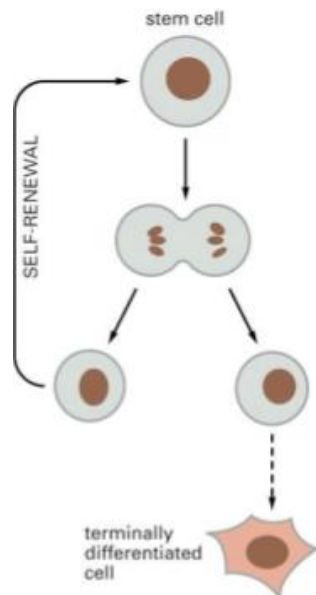


FIG 3. Divisione di una cellula staminale

Le staminali possono essere classificate come *totipendenti*, *pluripendenti*, *multipendenti* o *uni-pendenti*: totipendenti (staminali embrionali), quando una singola cellula ha la capacità di dividersi e produrre tutti i tipi di cellule specializzate di un organismo, inclusi i tessuti extra-embryonali; pluripendenti (staminali prelevate dal cordone ombelicale) e multipendenti (staminali adulte), quando una cellula progenitrice può generare solo alcuni tipi cellulari, limitati in numero e unipendenti, quando una cellula ha la capacità di generare solo un tipo cellulare.

Le due fondamentali proprietà delle cellule staminali sono:

- *auto-rigenerazione*: tali cellule hanno l'abilità di intraprendere numerosi cicli di divisione cellulare mantenendo uno stato indifferenziato;
- *potenzialità intrinseca di differenziazione*: indica la loro capacità di differenziarsi generando tipi cellulari specializzati.

1.3 Cellule Staminali Adulte

Con il termine *cellule staminali adulte* ci si riferisce a cellule multi potenti che si riproducono per fornire alcune specifiche cellule.

Rispetto alle cellule staminali embrionali le cellule staminali dell'adulto hanno una minore capacità di differenziamento e sono di solito specifiche per una sola linea cellulare: sono *multipotenti*, cioè, capaci di generare solo alcuni tipi cellulari limitati in numero.

Tuttavia, da recenti ricerche, sembrerebbe che alcune cellule adulte siano più flessibili rispetto a quanto si potesse pensare in precedenza e potrebbero essere capaci di produrre una grande varietà di tipi cellulari. Tali cellule sono anche note con il nome di *cellule staminali somatiche*, dal greco “che appartengono al corpo”.

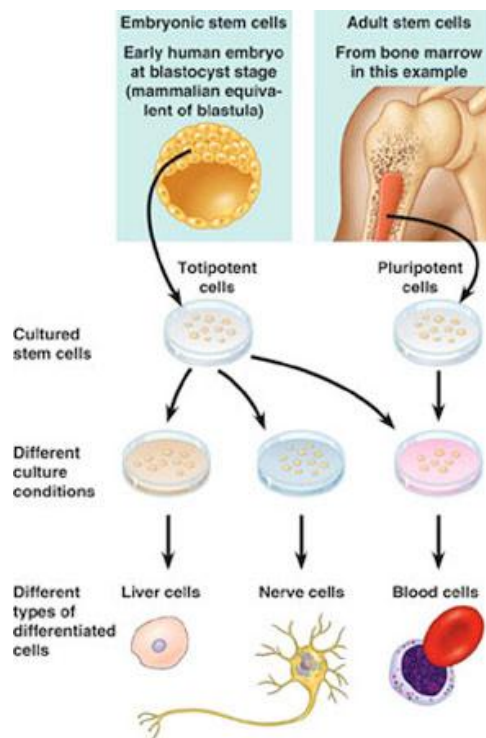


FIG 4. Confronto Adulte/Embrionali

Tra le staminali adulte più importanti, scoperte fino ad ora, ci sono:

- staminali del midollo osseo tra le quali si distinguono: le *ematopoietiche* che hanno il compito di creare le cellule del sangue (globuli rossi, globuli bianchi, piastrine ecc); le *mesenchimali* che generano ossa, cartilagine e tessuto muscolare;
- staminali dell'epitelio che hanno il compito di produrre le cellule del nostro epitelio;
- staminali del fegato, del pancreas, del cuore.
- staminali cerebrali, che provvedono al rinnovo di alcuni neuroni in alcune zone del cervello.

Ad oggi è generalmente accettata l'idea che ogni organo del nostro corpo è in uno stato di costante equilibrio tra la degradazione e la rigenerazione. Le cellule staminali

adulte sono fondamentali per il mantenimento in vita dell'organismo e dei suoi tessuti in quanto la sola divisione cellulare delle cellule mature (già specializzate) non riuscirebbe a far fronte alla degradazione dei tessuti. Infatti ogni volta che viene replicato il dna di una cellula, nel processo di divisione cellulare, c'è il rischio di errori di copiatura del codice genetico. Se le nuove cellule provenissero tutte da cellule mature gli errori si accumulerebbero in breve tempo, portando alla formazione di patologie gravi come le malattie neurodegenerative, i tumori, ecc. In molti casi le cellule mature dei tessuti sono talmente complesse da non potersi più dividere.

Appare chiaro, quindi, come ci sia bisogno di un tipo di cellule che provveda alla sostituzione delle cellule logorate, nei tessuti che compongono i nostri organi. Queste cellule si trovano in posizioni strategiche, nascoste in nicchie preferenziali all'interno degli organi, che permettono loro di sapere tramite impulsi biochimici, quando attivare il processo di rigenerazione cellulare[rif 5].

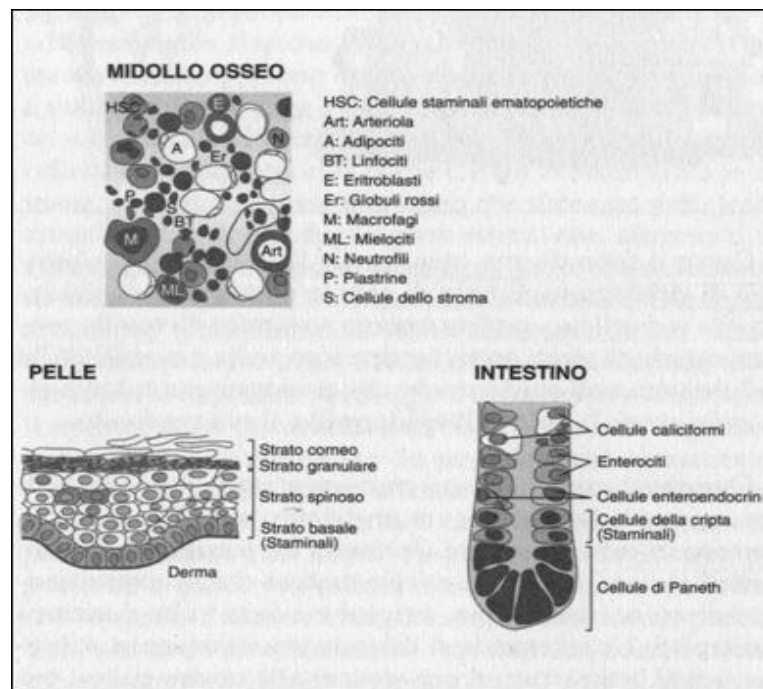


FIG 5. Staminali del midollo osseo, della pelle e dell'intestino

1.4 Cellule Staminali Mesenchimali

A causa della facile accessibilità al midollo osseo e dalla necessità di rimpiazzare le cellule ematopoietiche in molte condizioni cliniche, è nato un grande interesse nello studio delle cellule staminali del midollo osseo. E' stato dimostrato che il midollo osseo contiene *cellule staminali mesenchimali* (MSC) e *cellule staminali ematopoietiche* (HSC, Hematopoietic Stem Cells). Le HSC possono essere prelevate direttamente

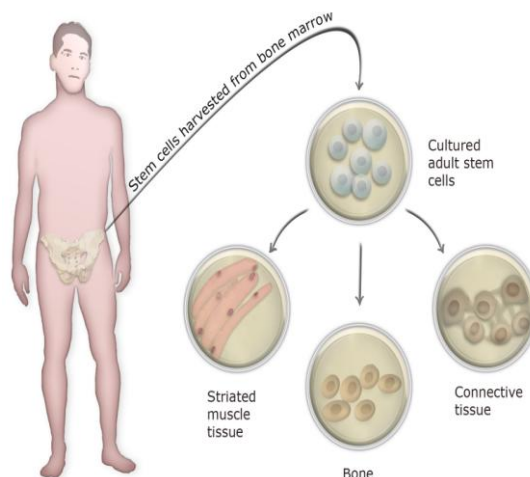


FIG 6. *Comportamento Staminali Mesenchimali*

dal midollo osseo o dal sangue proveniente dal cordone ombelicale. Hanno la capacità di generare tutte le cellule del sangue e sono in grado di ripopolare il midollo osseo in seguito a una deplezione causata da una malattia o da radiazioni. Iniettando nei topi cellule del midollo osseo dell'adulto, queste possono contribuire in proporzioni variabili al ripopolamento del fegato danneggiato e alla produzione di cellule muscolari in muscoli lesi.

Le *cellule staminali mesenchimali* sono una popolazione cellulare multipotente; se adeguatamente indirizzate possono dare origine a cellule con caratteristiche di vari tessuti come quello osseo, cartilagineo, adiposo o muscolare, solo per citare alcuni esempi.

Le cellule staminali mesenchimali sono contenute all'interno dello stroma midollare. Una delle maggiori difficoltà che si incontrano nell'utilizzo in campo clinico di queste cellule è la loro scarsa presenza nel midollo. Quindi, per poter essere utilizzate, devono essere prelevate ed espanse in laboratorio per raggiungere un numero clinicamente rilevante. Al di fuori del corpo (*ex-vivo*), le cellule staminali mesenchimali mantengono una buona capacità proliferativa e sono capaci di aderire a superfici quali vetro e plastica, che vengono comunemente utilizzate per la cultura delle cellule in laboratorio. In un processo composto di prelievo, espansione e reimpianto, l'espansione è il punto chiave. Il metodo utilizzato per espandere deve essere sicuro, efficace, facile da ottenere e poco

costoso. Per ottenere una espansione cellulare è necessario non solo 'alimentare' le cellule, ma anche fornire loro dei segnali che le inducano a moltiplicarsi. Nella pratica di laboratorio questo stimolo si traduce nell'esporre le cellule a delle proteine generalmente classificate come fattori di crescita¹. Questi fattori di crescita solitamente sono somministrati in concentrazioni note, esponendo le cellule a singole proteine, oppure, come avviene nella maggior parte dei casi, esponendo le cellule a svariati fattori di crescita, a concentrazione non nota, contenuti nel siero².

In un'ottica di utilizzo di cellule autologhe, ovvero del soggetto stesso, per una ricostruzione biologica di un tessuto, costituisce una prospettiva logica utilizzare per l'espansione delle cellule fattori di crescita autologhi. Oltre alla logica bisogna considerare che i fattori di crescita autologhi costituiscono un'opzione dai costi contenuti e con buoni margini di sicurezza.

Per entrambe le linee cellulari, MSC e HSC, l'iniezione diretta nel sito danneggiato sembra essere il metodo più favorevole ai trattamenti terapeutici. Sono emersi anche alcuni aspetti negativi principalmente dovuti a:

- scarsa quantità di cellule staminali presenti nell'adulto, che tra l'altro, diminuiscono con l'età;
- ridotta capacità proliferativa e quindi tempi di crescita in coltura troppo lunghi nel caso di malattie a decorso rapido;
- spettro di differenziazione inferiore rispetto alle cellule pluripotenti;
- maggiore presenza di anomalie a carico del DNA;
- presenza nel genoma della cellula staminale dello stesso difetto, in caso di malattie genetiche;
- difficoltà di isolamento e purificazione.

Nonostante questi problemi, lo sviluppo di linee cellulari staminali, in grado di produrre molti tessuti dell'organismo umano, rappresenta una delle più stimolanti scoperte degli ultimi anni ed apre la porta ad una rivoluzione nella pratica medica.

¹ Proteine in grado di stimolare la proliferazione e il differenziamento cellulare.

² Liquido formato da plasma (fase liquida del sangue) senza fibrinogeno.

In futuro si ipotizza che sarà possibile utilizzare le tecnologie basate sulle cellule staminali per il trattamento di diverse patologie ad oggi molto difficili da curare, come molte neoplasie, la malattia di Parkinson, i traumi della spina dorsale, gravi traumi ai tessuti muscolari, e le patologie legate all'esofago, campo di interesse in questo lavoro di Tesi. Questo progetto, infatti, si basa sull'utilizzo di cellule staminali adulte per trovare una prima soluzione ai trapianti di tratti di esofago danneggiati in maniera irreversibile. Si propone infatti di coniugare tali colture cellulari con uno scaffold adeguato per spessore, consistenza, forma e dimensioni in modo tale da arrivare alla produzione di un precursore dell'organo da poter sostituire e rigenerare nei tratti mancanti. È frutto di una collaborazione interdisciplinare che coinvolge diversi enti, quali:

- Università di Padova, con il Dipartimento di Ingegneria dell'Informazione,
- il Dipartimento di Fisiologia, il Dipartimento di Scienze Farmaceutiche e il Centro di Chirurgia Sperimentale;
- Divisione Clinicizzata di Chirurgia Pediatrica dell'Azienda ULSS n°9 di Treviso;
- Telea Electronic Engineering srl (Quinto Vicentino - Vicenza).

CAPITOLO 2

Lavorazione e Strumentazione Utilizzata

Alla luce delle considerazioni fatte precedentemente, questo progetto si propone di lavorare uno scaffold naturale per la sostituzione di tratti di esofago che si integri con l'organismo del paziente senza provocare reazioni di rigetto e crescendo consensualmente all'ospite. L'obiettivo che ci poniamo è sviluppare un sistema combinato il cui prodotto sia un tessuto ingegnerizzato tale da poter essere trapiantato direttamente nell'organismo di un paziente.

In seguito alle considerazioni fatte per la scelta del tipo di scaffold che meglio potesse adattarsi alle nostre esigenze specifiche è stato scelto lo scaffold di tipo naturale, ovvero ricavato da animale e opportunamente decellularizzato. Questo scaffold deve essere lavorato in modo tale da fungere da supporto per la semina di cellule staminali mesenchimali, e successivamente essere impiantato sul paziente.

La lavorazione dello scaffold avviene secondo più fasi, ciascuna delle quali si avvale della strumentazione d'avanguardia ad essa necessaria.

La prima fase della lavorazione prevede la creazione di una rete di canali comunicanti all'interno dello scaffold, con diametri e direzioni variabili.

La seconda fase prevede l'applicazione di un sistema depressurizzante, per mezzo di una pompa peristaltica, che faciliti l'ingresso delle cellule staminali adulte all'interno dello scaffold.

2.1 Prima Fase

La prima fase comprende lo studio dei metodi di canalizzazione e la loro successiva applicazione in laboratorio sullo scaffold in questione. E' infatti fondamentale la creazione di una fitta rete di canali comunicanti all'interno dello scaffold, in quanto è proprio

attraverso essi che viene garantita la comunicabilità tra le cellule e il successivo passaggio di fluidi in seguito all'impianto. Le cellule, oltre ad aderire alle pareti interne allo scaffold saranno anche in grado di scambiare segnali tra di loro, riformando così la matrice extracellulare. Questa rete di canali, quindi, viene a configurare un microsistema adatto a rivitalizzare lo scaffold in tutto il suo spessore. Nonostante venga leggermente indebolita dai processi di decellularizzazione, la resistenza e la compattezza della struttura 3D dello scaffold permette una lavorazione ottimale.

La realizzazione del sistema di canali è resa possibile dal connubio tra le tecnologie di un YAMAHA ed il bisturi a Risonanza Quantica Molecolare VESALIUS®. L'impiego del robot YAMAHA è indispensabile per i requisiti di accuratezza e precisione nel fare migliaia di fori del diametro di poche decine di micron, mentre il VESALIUS® garantisce la qualità del tessuto.

2.1.1 IL ROBOT YAMAHA

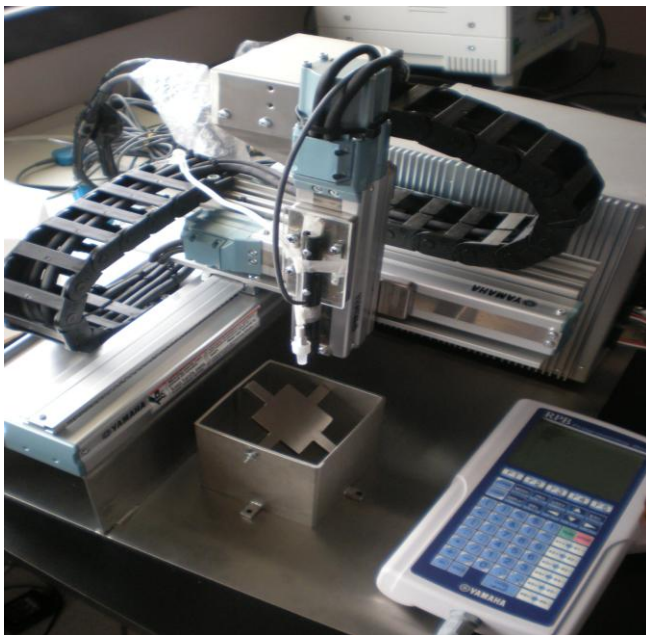


FIG 7. Robot Yamaha

Il Robot YAMAHA utilizzato ha numerose caratteristiche che lo rendono un mezzo estremamente preciso per quanto riguarda gli spostamenti necessari alla creazione della rete di canali. Esso è dotato di due rotaie per gli spostamenti lungo gli assi x e y, e un braccio che effettua gli spostamenti lungo l'asse z.

Le caratteristiche intrinseche del robot indicano che per gli spostamenti sui tre assi, l'errore di

ripetibilità, ovvero il limite inferiore della massima precisione ottenibile dalle misure, per una singola oscillazione è di circa 0,01mm.

Il robot è stato programmato utilizzando un linguaggio di programmazione per robot ad alto livello del tipo BASIC. Questo linguaggio permette una facile implementazione e programmazione anche di movimenti complessi e utilizza un metodo di compilazione per

avere un'esecuzione rapida dei programmi. Questo metodo di compilazione controlla che non siano presenti errori di sintassi nel linguaggio del robot, dopodiché converte in codici intermediari il programma, creando un file eseguibile (file oggetto) prima di far funzionare il programma stesso. Per la programmazione del robot si ha a disposizione un controllore modello RPB (Programming box della serie R). Per le operazioni che riguardano le modifiche, le operazioni di manovra e le istruzioni del robot possono essere supportate da questa unità compatta.

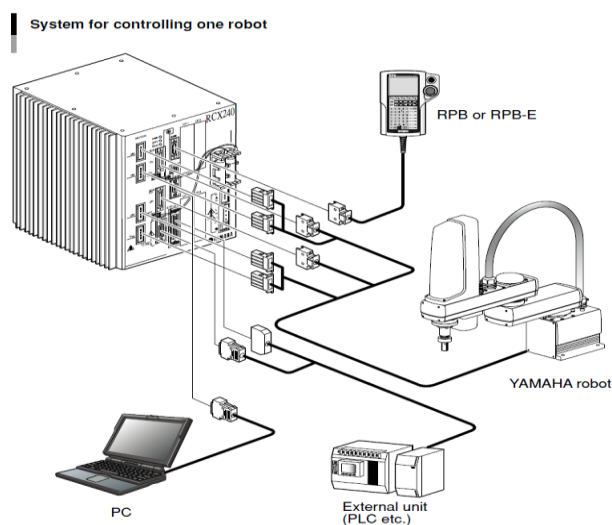


FIG 8. Sistema Utilizzato

Per realizzare i canali alle angolazioni previste dai metodi di canalizzazione studiati è stato utilizzato un piano inclinato con l'ausilio di un angolatore in acciaio. Questo strumento consente il supporto del tessuto durante la fase di lavorazione e ottimizza la realizzazione della rete di canali secondo un'angolazione dei fori a 30°.

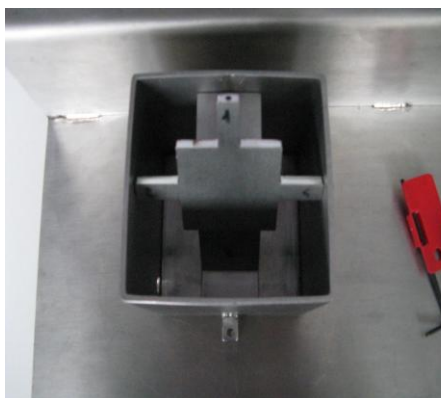


FIG 9. Piano inclinato



FIG 10. Angolatore

2.1.2 IL BISTURI A RISONANZA QUANTICA MOLECOLARE VESALIUS®

Il bisturi VESALIUS®, prodotto dalla *Telea Electronic Engineering*, è uno strumento all'avanguardia, che sfrutta la teoria della Risonanza Quantica Molecolare[rif 6] per il taglio e il coagulo dei tessuti molli. E' infatti un bisturi elettronico in grado di trasferire energia al tessuto biologico effettuando il taglio o il coagulo senza comportare un aumento di temperatura del tessuto, o comunque in modo da mantenere tale temperatura a valori inferiori a 50°C, valore al di sotto del quale le cellule restano vive e non vengono danneggiate. Si ottiene quindi come risultato, un taglio a freddo ed i tessuti ai bordi del taglio sono privi di fenomeni di necrosi tissutale. Il principio fisico innovativo utilizza energia elettrica ad altissima frequenza, opportunamente modulata, per ottenere la separazione del tessuto, agendo sui legami molecolari delle cellule e non attraverso un riscaldamento termico della zona da trattare.



FIG 11. Bisturi a Risonanza Quantica Molecolare Vesalius modello MCN

La Risonanza Quantica Molecolare

Ogni volta che si fornisce energia ad un sistema, gran parte di essa viene dissipata in calore, cioè in energia cinetica molecolare, il cui valor medio in un corpo viene identificato

come temperatura. Esiste un valore quantico di energia capace di rompere qualsiasi tipo di legame, sia esso atomico o molecolare, senza far aumentare l'energia cinetica degli atomi o delle molecole colpite, e quindi senza provocare un aumento della temperatura. Inoltre è noto che qualsiasi forma di energia viene trasmessa da una sorgente ad un "utilizzatore" attraverso *quanti* di energia. Il valore di energia trasportata da questi quanti dipende dalla frequenza della sorgente che li ha prodotti. Quando i quanti colpiscono il ricevente, nel nostro caso il tessuto umano, su di esso possono verificarsi due diverse reazioni:

1. Se il valore dell'energia del quanto è diverso dall'energia di legame della molecola o dell'atomo colpito, si ha solo un aumento dell'energia cinetica dell'atomo o della molecola senza che avvenga la rottura del loro legame, il che comporta un aumento della temperatura
2. Se il valore dell'energia del quanto è uguale al valore dell'energia di legame dell'atomo o molecola interessata allora tutta l'energia del quanto viene utilizzata per rompere il suddetto legame, senza aumentare l'energia cinetica e quindi senza aumentare la temperatura.

Lo strumento che implementa questa teoria è il bisturi elettronico a Risonanza Quantica Molecolare. Questo bisturi genera una corrente alternata con onde ad alta frequenza combinate in modo particolare. L'onda fondamentale è a 4MHz e le successive onde a 8, 12, 16MHz con ampiezza decrescente e aumento della frequenza. In questo modo si creano quanti energetici di valore tale da rompere i legami molecolari senza comportare l'aumento dell'energia cinetica degli atomi o molecole colpite.

E' importante sottolineare che il taglio non è quindi una conseguenza del riscaldamento del tessuto, come avviene nei normali elettro/radio bisturi, bensì dipende dalla rottura diretta dei legami molecolari ed avviene quindi senza produzione del calore. Come conseguenza di questo, la temperatura del tessuto, in modalità taglio, non supera mai i 45-50 °C, e pertanto non viene prodotto tessuto necrotico.

Tra i modelli progettati della linea VESALIUS® abbiamo utilizzato l'MCN che è un apparato monopolare e bipolare pensato per le applicazioni più varie, quali la Chirurgia Plastica, la Maxillo Facciale, la Ginecologia, l'Otorinolaringoiatria, l'Ortopedia, la Chirurgia Pediatrica e in tutte le specialità più delicate. Il VESALIUS® MCN consente di

tagliare il tessuto senza esercitare la minima pressione, il taglio avviene appunto per risonanza molecolare e i tessuti vengono separati senza creare il minimo danno termico.

In questo progetto, l'impiego della tecnologia della Risonanza Quantica Molecolare risulta di fondamentale importanza. Abbiamo impiegato il modello MCN del bisturi VESALIUS® utilizzando un manipolo al quale viene fissato un ago, di diametro variabile nell'ordine dei micrometri, utilizzato più comunemente per trattamenti di epilazione e teleangectasie.

In seguito alle sperimentazioni effettuate, è stato possibile constatare quanto la qualità del tessuto sia risultata inalterata dopo la lavorazione con questo particolare bisturi. Non avremmo ottenuto gli stessi risultati lavorando il tessuto con un elettrobisturi standard, che lo avrebbe danneggiato con necrosi diffuse rendendolo inutilizzabile per la sopravvivenza e la crescita cellulare.

Il robot YAMAHA garantisce la precisione nella foratura, il bisturi garantisce la qualità del tessuto, dando vita così ad un sistema complessivo all'avanguardia, che supera le problematiche emerse in passato per la creazione di scaffolds di questo tipo.

I risultati ottenuti nelle sperimentazioni fatte precedentemente dall'ingegner Meneghesso[4] hanno confermato le aspettative, il tessuto ha infatti mantenuto la sua resistenza meccanica dopo aver subito una foratura con migliaia di buchi (figura a), prova che si avvicinava moltissimo alla lavorazione finale del tessuto esofageo prima dell'impianto in vivo. La sua qualità è risultata ottima, si è presentato intatto e idealmente perfetto per accogliere le cellule. Anche il buco è risultato ben definito (figura b) e il tessuto attorno è rimasto integro. Il tessuto esofageo, nonostante il processo di decellularizzazione che ha indebolito le sue parti, ha resistito in maniera ottimale all'intera lavorazione.

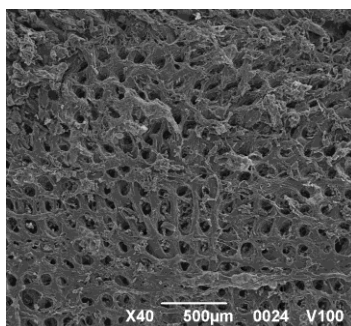


FIG 12. File di fori paralleli

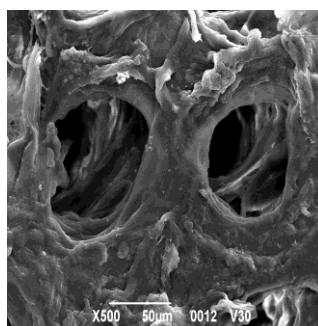


FIG 13. Qualità dei fori eseguiti

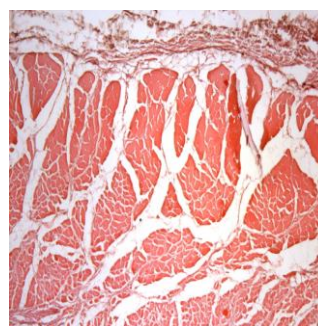


FIG 14. Istologico dopo la lavorazione

Dalle immagine sono visibili più chiaramente le file di fori paralleli praticati col robot YAMAHA e la qualità del foro stesso dopo la lavorazione, resa possibile dalla tecnologia del bisturi VESALIUS®.

2.2 Seconda Fase

La seconda fase della lavorazione dello scaffold prevede una depressione applicata allo scaffold che favorisce l'ingresso delle cellule nei canali creati dall'azione congiunta del robot e del bisturi.

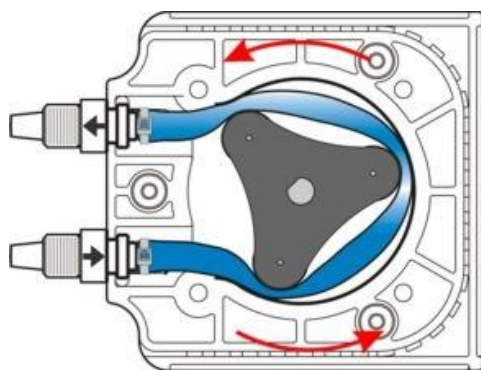


FIG 15. Funzionamento di una pompa peristaltica

L'effetto depressivo è garantito dall'azione controllata di una pompa peristaltica. La pompa peristaltica è una pompa di tipo volumetrico, ovvero è una pompa che sfrutta la variazione di volume in una camera per provocare un'aspirazione o una spinta su un fluido. La portata erogata è indipendente dalla prevalenza ed è invece direttamente proporzionale alla velocità di rotazione.

La pompa peristaltica è un apparecchio che applica il principio della *peristalsi*, in base al quale la prevalenza al fluido trattato viene impressa da una strozzatura che scorre lungo il tubo. In questo tipo di pompa il fluido attraversa un condotto elastico fissato alle due estremità, su tale condotto agiscono due o più rulli che ruotano e deformano il condotto flessibile in modo da isolare le due parti a pressione diverse e provocarne la variazione di volume. I rulli ruotando, "strozzano" il tubo provocando l'avanzamento del fluido. Le pompe peristaltiche devono

infatti il loro funzionamento alle proprietà elastiche dei tubi, in particolare al segmento di tubo destinato al pompaggio, il quale, sottoposto ad una contropressione scorrevole ciclica mediante rulli, realizza le due fasi tipiche che sono l'aspirazione e la eiezione. Pertanto il tubo è componente fondamentale della pompa poichè deve resistere allo schiacciamento il più a lungo possibile, deformandosi in maniera elastica e non plastica. È proprio l'elasticità che consente al tubo di riacquisire le dimensioni originali e quindi garantire la prevalenza al fluido e la capacità d'aspirazione.

L'alternanza di compressione e rilassamento del tubo crea una depressione in aspirazione e quindi un continuo richiamo di prodotto da trasferire.

Durante il funzionamento almeno uno dei rulli rimane in contatto con il tubo nel periodo di rotazione ciclico, e questo fatto permette di evitare l'uso di valvole che prevengano il retroflusso del liquido. Tale modalità di funzionamento comporta infatti automaticamente la creazione di una valvola "mobile" che esegue la funzione di aspirazione, di mandata e di valvola di non ritorno. La mancanza di valvole garantisce la funzionalità anche in presenza di prodotti densi, viscosi o contenenti impurità. Il tubo non risente dei depositi di qualunque genere e non si incolla neanche dopo prolungati fermi.

Altra importante proprietà della pompa peristaltica è l'*autoadescamento*. Per adescamento, si intende la capacità della pompa di aspirare un liquido: ciò dipende da svariati fattori esterni che ne condizionano la capacità e dei quali bisogna tenere conto quali:

- il grado di depressione che la pompa riesce a produrre ;
- la viscosità del liquido la perdita di carico dovuta all'attrito;
- il peso della colonna di liquido che deve spostare.

La pompa peristaltica è auto-adescente, ovvero lo schiacciamento del tubo genera una depressione che adesca il liquido anche a tubo vuoto. Questa capacità distingue nettamente le pompe peristaltiche da molti altri tipi di pompa disponibili in commercio. Ma il principale vantaggio di questa pompa, e motivo per cui è stata scelta il suo impiego nel progetto, è che il fluido contenuto non entra mai in contatto con altra parte meccanica che non sia il tubo, ed è isolato dall'atmosfera. In tal modo si evitano possibili contaminazioni dal momento che il fluido trattato non entra mai in contatto con altri componenti della pompa. Questa peculiarità rende la pompa peristaltica adatta per applicazioni in cui non si

voglia far entrare in contatto il fluido trattato con altre parti meccaniche della pompa, ciò può essere necessario in diversi casi:

- per ragioni di sicurezza da contaminazioni, (industria alimentare e farmaceutica);
- perché il fluido è aggressivo, acido o nocivo contro gli organi della pompa o peggio ancora contro l'uomo (solventi, combustibili, reagenti chimici, ecc);
- quando si devono trasferire prodotti con corpi solidi in sospensione e/o fragili senza che vengano danneggiati, rispetto quindi dell'integrità del prodotto.

Questo tipo di pompa consente di tarare con precisione la portata e di mantenerla costante. Tali caratteristiche la rendono ideale laddove la precisione sui dosaggi e la ripetibilità della misura sono requisiti indispensabili, come nei laboratori chimici e nella bioricerca. La pompa peristaltica utilizzata nei nostri esperimenti (modello SR25-S300) appartiene alla gamma di pompe fornite dall'azienda Thomas3.

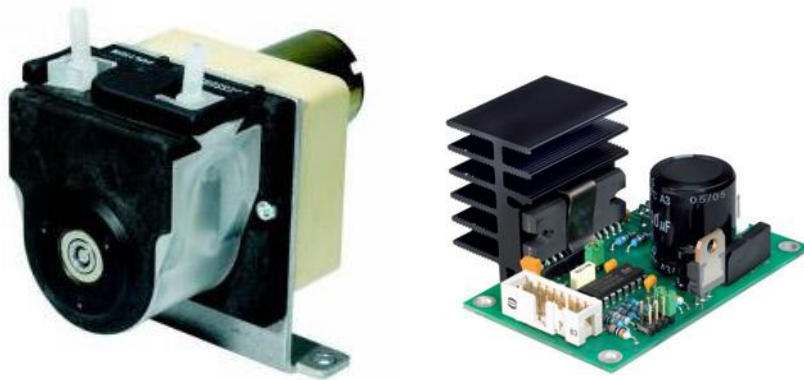


FIG 16. SR25-S300

Possiede le caratteristiche fisiche e funzionali di seguito elencate :

- Protezione del tubo grazie ai rulli a molla e ai rulli di guida laterali
- Rimozione del tubo facile e veloce
- Rullo trasportatore con due rulli
- Adatto anche per un funzionamento continuo, a seconda del motore
- Disponibili diversi motoriduttori (DC, AC e motore a step)

L'utilizzo della pompa peristaltica è fondamentale per il progetto, in quanto l'ingresso della coltura di staminali all'interno dello scaffold precedentemente lavorato è forse la parte più "delicata" dell'intera procedura di lavorazione. Le sperimentazioni fatte, e di

seguito riportate, hanno lo scopo di valutare i parametri ideali da applicare alla pompa nella successiva fase di semina delle colture cellulari.

CAPITOLO 3

Sperimentazioni

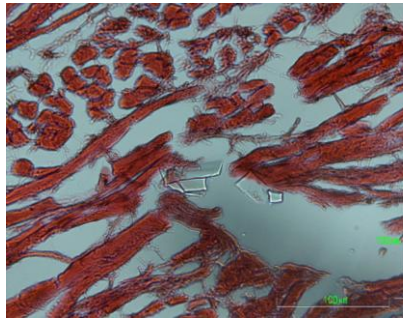


FIG 17. Particelle di Si nei canali

fatta utilizzando uno strato di gel miscelato a micropolveri di silicio, la cui presenza



FIG 18. Sperimentazione di prova

all'interno del tessuto dopo l'applicazione della depressurizzazione è stata verificata tramite analisi istologiche. In alcune immagini è infatti possibile notare la presenza di una singola particella di vetro di Si (vedi figura n 18). Non è stato possibile avere immagini con una presenza massiccia di particelle in quanto i lavaggi che il tessuto subisce durante la preparazione per le analisi istochimiche hanno rimosso gran parte delle particelle presenti all'interno dei canali. L'esperienza ha comunque confermato che le particelle sono penetrate all'interno dei canali grazie alla depressione generata dalla pompa peristaltica (Figura sopra). L' esperimento potrà avere un esito altrettanto positivo con le cellule poichè esse saranno inserite in un gel che verrà collocato sopra il campione. La pompa peristaltica applicherà una depressione sotto il campione che farà penetrare il gel all'interno dei canali.



FIG 19. Pannello di comando della pompa



FIG 20. Due ingressi della pompa peristaltica

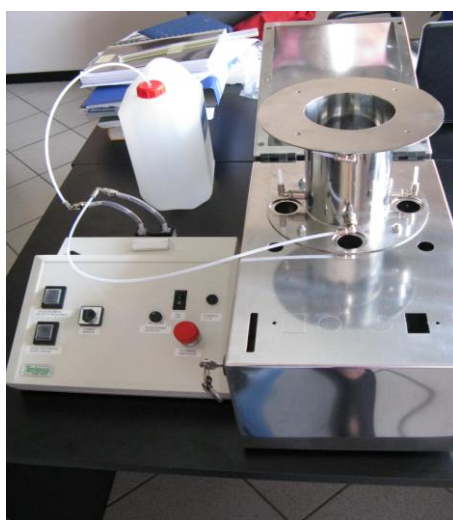


FIG 21. Struttura utilizzata per le sperimentazioni

E' stata infatti sufficiente la presenza di almeno una particella per confermare come il canale risulta libero al suo interno. E questa è la garanzia per quando avverrà la semina effettiva delle colture cellulari. La prova fatta dall'ingegner Meneghesso ha mostrato come in pochi secondi la pompa peristaltica abbia applicato una depressione tale da far penetrare nel tessuto il gel con le particelle di Si. Sono però necessarie ulteriori sperimentazioni per definire al meglio i parametri per la regolazione della depressione da applicare. Le sperimentazioni fatte hanno, pertanto, lo scopo di valutare tali

parametri avvalendosi del prototipo riportato in figura. Il nostro obiettivo è quello di ricavare i parametri ideali, quelli cioè tali da ottimizzare la penetrazione e adesione delle cellule. Bisogna quindi valutare quale deve essere la velocità ottimale della pompa, la marcia della stessa, il livello di liquido che viene aspirato e infine la viscosità del gel soprastante il campione, quello cioè che verrà fatto passare attraverso i canali del campione.

Le sperimentazioni, svolte in questo lavoro di Tesi, possono essere suddivise in quattro diverse fasi. La prima fase è preliminare, comprende cioè la preparazione di tutti gli strumenti utilizzati e il loro corretto posizionamento. Le successive tre fasi,

comprendono le fasi sperimentali vere e proprie, suddivise in base al livello dell'acqua inserita nella struttura, che viene risucchiata dalla pompa peristaltica per ottenere l'effetto depressivo.

Nelle prove da noi svolte sarà versata acqua sopra al campione, in quantità confrontabile a quella del gel contenente la coltura cellulare, che verrà utilizzato solo in un secondo momento. E' stato verificato che la viscosità dell'acqua è pari a $1.0 \times 10^{-3} \text{ N} \times \text{s} / \text{m}^2$ a temperatura ambiente, parametro del quale si terrà conto per le valutazioni conclusive.

3.1 Fase Preparatoria

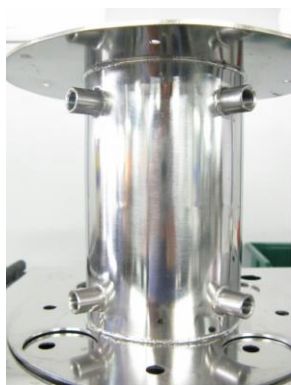


FIG 22. Prototipo



FIG 23. Divisione in due livelli

Per le sperimentazioni è stata utilizzato il prototipo visibile in figura. E' caratterizzato da una forma cilindrica, con un diametro di 9,8 cm, suddivisa in due diversi livelli. Il primo livello funge da serbatoio per l'acqua, il secondo funge da supporto/base d'appoggio per il campione sperimentale. Il serbatoio ha un'altezza di 7,5 cm pertanto il volume d'acqua massimo che contiene è di circa 0,566 litri. Per la sperimentazione è stata utilizzata una spugna di dimensioni 3cm x 2cm con una trama piuttosto fitta, tale da simulare la consistenza del campione vero e proprio di tessuto lavorato. Per prima cosa il serbatoio dell'acqua è stato riempito con il volume d'acqua specifico per la prova. Successivamente è stato posto sul supporto del secondo livello del prototipo un disco bucherellato del medesimo diametro del cilindro che funge da base per il posizionamento della spugna/campione. La spugna è stata quindi appoggiata sul disco bucherellato. Tra il disco e la spugna è stata posizionata

una membrana microporosa con lo scopo di trattenere particelle dell'ordine di grandezza superiore alla sua porosità. La membrana utilizzata nel nostro esperimento è una membrana in policarbonato, idrofilica, biologicamente inerte, e caratterizzata da pori di diametro di circa $5\mu\text{m}$. Si ritiene che questo tipo di membrane risulteranno molto utili nella fase di semina e di penetrazione delle cellule all'interno dello scaffold, in quanto impediranno una dispersione delle cellule al di fuori del biomateriale, qualora la base del



FIG 24. Supporto bucherellato

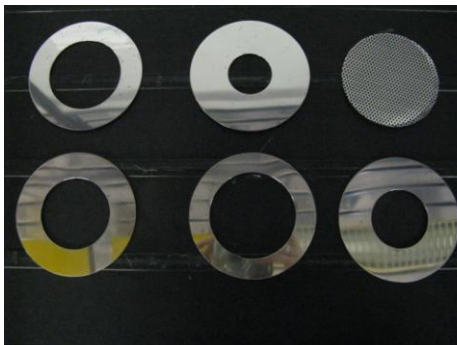


FIG 25. Dischi in acciaio con diametro interno variabile e supporto bucherellato

parallelepipedo e i dischi regolatori in acciaio hanno un foro circolare si è reso necessario l'impiego di nastro adesivo ai bordi del disco regolatore per contornare in maniera precisa la spugna, garantendo il passaggio dell'acqua soltanto attraverso essa, assicurando cioè che non vi fossero fessure attorno al campione che potessero diventare vie preferenziali per il passaggio dell'acqua. Infine è stata versata sopra alla spugna la quantità d'acqua prevista da ciascuna prova.

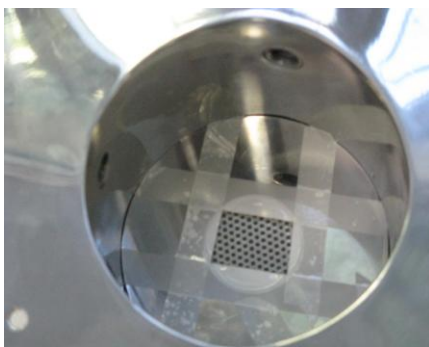


FIG 26. Posizionamento del disco regolatore adattato col nastro adesivo

campione abbia qualche foro d'uscita provocato dalla lavorazione del robot (dovuti prevalentemente agli errori intrinseci della macchina).

Infine il supporto forato è stato bloccato da un disco d'acciaio, anch'esso del medesimo diametro del cilindro strutturale, ma con un diametro interno variabile a seconda delle dimensioni del campione supportato. E' stato scelto il disco dal diametro interno più adatto, ovvero quello che lasciasse libera la minor superficie possibile attorno alla spugna/campione. Così facendo l'intera massa di liquido soprastante deve necessariamente filtrare attraverso la spugna per essere aspirata, garantendo la penetrazione della coltura cellulare. Dal momento che il campione utilizzato, nel nostro caso la spugna, è un

A questo punto può considerarsi terminata la fase preliminare di preparazione della sperimentazione vera e propria. Le immagini che seguono chiariscono meglio la procedura sopra descritta.

La figura n.26 mostra il supporto forato ricoperto dalla membrana microporosa al di sopra del quale è stato posto il disco regolatore in acciaio della dimensione più adatta alle dimensioni della spugna. E' visibile inoltre il nastro adesivo utilizzato per

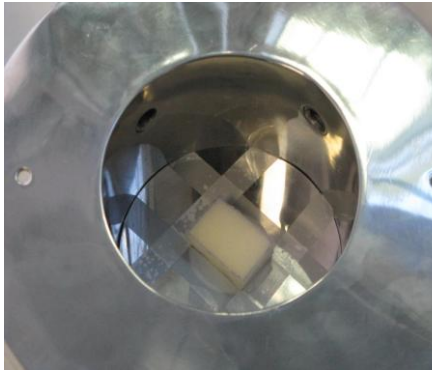


FIG 27. Posizionamento della spugna

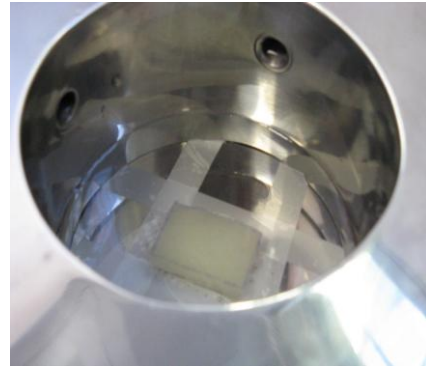
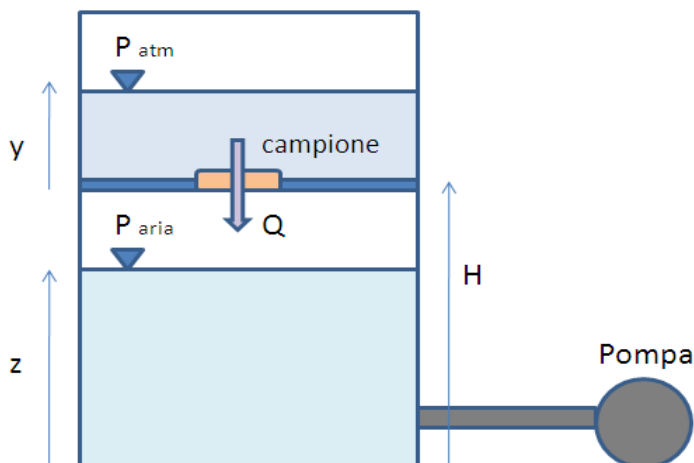


FIG 28. Acqua visibile sopra alla spugna

ottenere il foro rettangolare, che meglio si adatta al contorno della spugna. In figura n.2 è visibile il posizionamento del campione al centro dell'apertura, in modo tale che per il liquido soprastante, in questo caso l'acqua, non vi sia una via preferenziale per la discesa, se non attraverso la spugna stessa, questo per le motivazioni spiegate in precedenza. Infine in figura n.3 si vede la spugna ricoperta interamente dall'acqua, come previsto dalla preparazione preliminare.

3.2 Ipotesi Teoriche

Prima di cominciare la fase sperimentale vera e propria abbiamo ipotizzato l'andamento dei tempi di risucchio in funzione della quantità di liquido presente nel serbatoio dell'acqua posto sotto il campione basandoci sulla teoria della dinamica dei fluidi.



Se si considera una superficie finita A appartenente ad un fluido in moto e, in essa, una superficie dA sufficientemente piccola da poter essere confusa con un punto. Sia \vec{v} il vettore velocità nel punto, e v_n la componente di \vec{v} normale a dA . La quantità

$$Q = \int_A v_n dA$$

è detta *portata*. Essa rappresenta il volume di fluido che nell'unità di tempo attraversa la superficie A .

L'applicazione del principio di conservazione della massa ad un tronco di corrente fornisce una delle equazioni fondamentali della dinamica dei fluidi, detta *equazione di continuità*. Essa afferma che la differenza tra la massa entrante e la massa uscente nel tronco di corrente in un dato intervallo di tempo è pari alla massa 'aggiunta' (o 'sottratta') in detto intervallo di tempo alla massa inizialmente contenuta nel tronco di corrente stesso. La formulazione analitica generale dell'equazione di continuità per un tronco di corrente è

$$\frac{\partial \rho Q}{\partial s} + \frac{\partial \rho A}{\partial t} = 0$$

Tale equazione, nel nostro caso specifico, assume la formulazione seguente :

$$Q_e - Q_u = \Omega \frac{dz}{dt}$$

Ci troviamo infatti nel caso in cui la corrente alimenta un recipiente a superficie libera, il serbatoio del nostro prototipo, pertanto si ha che, detta z la quota della superficie libera al generico istante t ed Ω la sezione trasversale del recipiente cilindrico, la differenza tra la portata entrante nel serbatoio e la portata uscente dallo stesso risulta essere pari alla sezione trasversale del cilindro per la variazione della quota z nel tempo. Questa equazione è detta *equazione di continuità per un serbatoio*.

Nel nostro caso le variabili che entrano in gioco, e di cui vogliamo conoscere preventivamente l'andamento, sono: la portata che fluisce attraverso il campione (Q), la pressione dell'aria all'interno del serbatoio (P_a), la variazione del livello del fluido sopra il campione (y) e la variazione del livello dell'acqua nel serbatoio (z).

Tali parametri sono deducibili sfruttando *l'equazione di continuità per un serbatoio* e la *legge di Stevino*³ che descrive la variazione della pressione in funzione della profondità.

le formule che si ricavano sono le seguenti :

$$z = z' + \frac{\Delta t}{\Omega} (Q' - Q_p)$$

$$P_{aria} = P_{atm} \left[\frac{H - z_0}{H - z} - 1 \right]$$

$$Q = \frac{\gamma y' - P_{aria}}{K}$$

$$y = y' - \frac{\Delta t}{\Omega} \left(\frac{Q + Q'}{2} \right)$$

L'applicazione delle formule enunciate al nostro sistema specifico prevede che il tempo di risucchio aumenti al diminuire dell'acqua nel serbatoio. Infatti tanta più aria è presente nel serbatoio tanta più acqua dovrà aspirare la pompa peristaltica per creare la medesima depressione, e quindi sarà maggiore la differenza tra la portata che fluisce attraverso il campione e la portata della pompa.

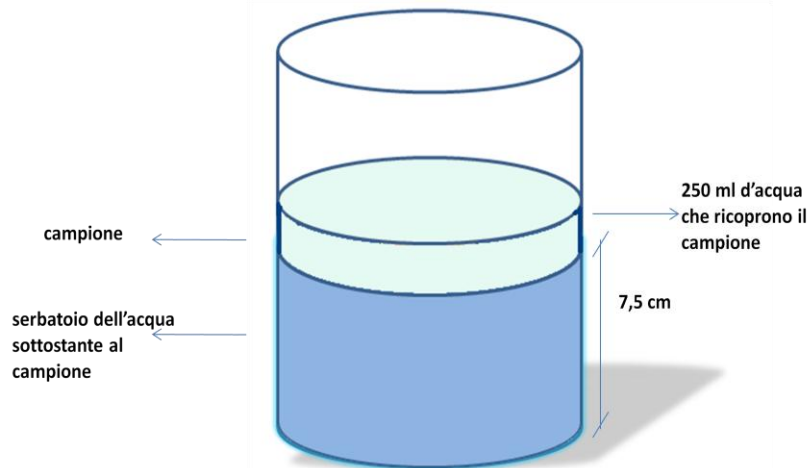
³ Legge di Stevino : Afferma che la pressione esercitata da una colonna di fluido di profondità h (distanza dal pelo libero del fluido, ossia la parte in alto nella colonnina aperta, a contatto con l'ambiente esterno) e densità costante ρ è direttamente proporzionale a h ,

$$P_h = \rho \cdot g \cdot h$$

essendo l'accelerazione di gravità $g = 9.8 \text{ m/s}^2$; se la superficie della colonna di liquido è esposta alla pressione atmosferica P_A allora la legge viene così modificata:

$$P_h = \rho \cdot g \cdot h + P_A$$

3.2 Prima Fase: 500 ml



Si è pensato di verificare sperimentalmente la variazione del tempo di risucchio della pompa al variare del livello di acqua nel serbatoio sottostante.

Nella prima fase di sperimentazione il serbatoio è stato riempito completamente d'acqua, pertanto con un volume d'acqua pari circa a 0,5 litri, in modo da togliere completamente l'aria tra campione e acqua sottostante.

Per ciascuna marcia della pompa è stato calcolato il tempo di risucchio alle tre diverse velocità percentuali: minima, media e massima. Dopo aver posizionato il campione secondo quanto descritto nella fase preliminare, sono stati versati 250 ml d'acqua nella prima sperimentazione, ovvero la quantità equiparabile a quella del gel contenente la coltura di cellule staminali, e nella seconda sperimentazione 100 ml d'acqua.

500 ml d'acqua nel serbatoio, 250 ml d'acqua soprastante				
	Marcia 1	Marcia 2	Marcia 3	Marcia 4
Velocità 1%	120 min	43,7 min	18,9 min	11,8 min
Velocità 50%	24,1 min	6,7 min	2 min	1 min
Velocità 100%	13,7 min	4,1 min	1,3 min	0,9 min

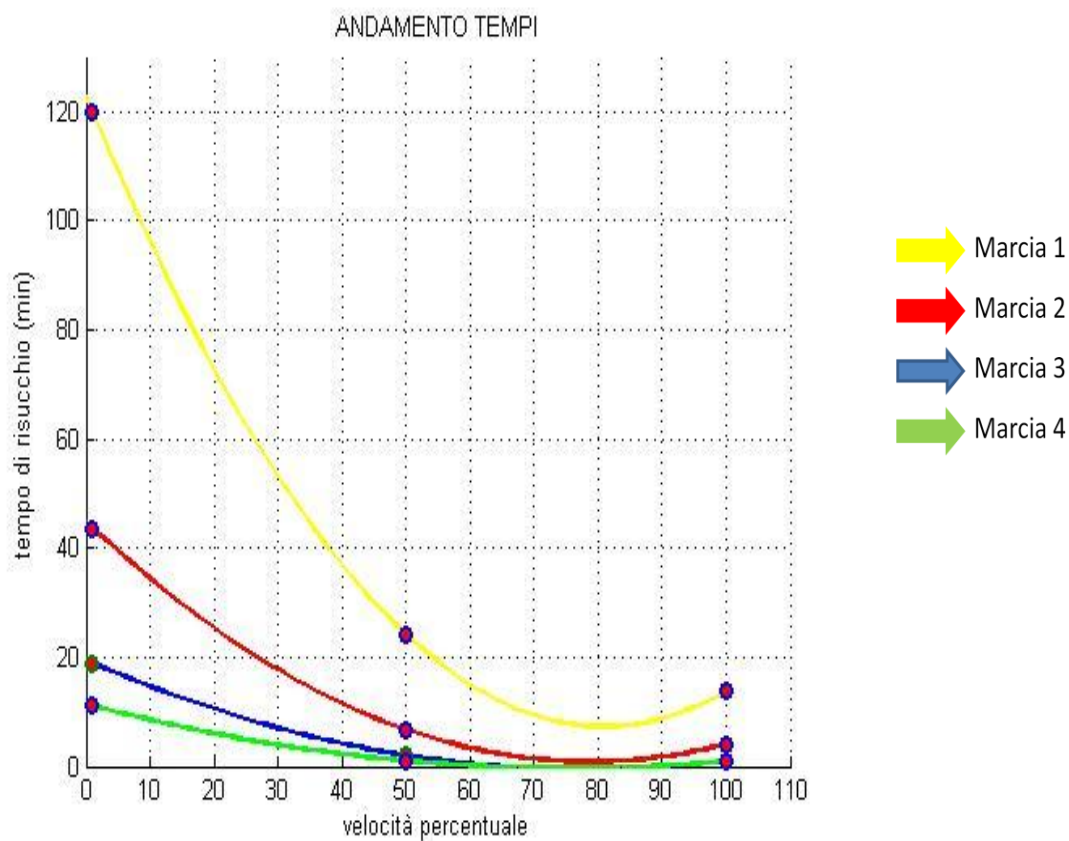


GRAFICO 1. Andamento dei tempi di risucchio per le 4 marce della pompa

Dai risultati si può notare come il tempo di risucchio sia molto lento con la pompa impostata alla marcia 1 in corrispondenza alla velocità minima percentuale, rispetto ai tempi ricavati alla medesima marcia agli altri livelli di velocità. Tale grande differenza nel tempo di risucchio è presente anche nelle altre marce, ma in misura sicuramente minore.

Sono stati raccolti ulteriori valori sperimentali, versando sopra al campione 100 ml d'acqua, per avere un'ulteriore conferma dei risultati ottenuti.

500ml d'acqua nel serbatoio, 100 ml d'acqua soprastante				
	Marcia 1	Marcia 2	Marcia 3	Marcia 4
Velocita' 1%	53,7 min	20,08 min	7,09 min	4,09 min
Velocita' 50%	10 min	3,01 min	0,8 min	0,5 min
Velocita' 100%	7,03 min	1,08 min	0,6 min	0,3 min

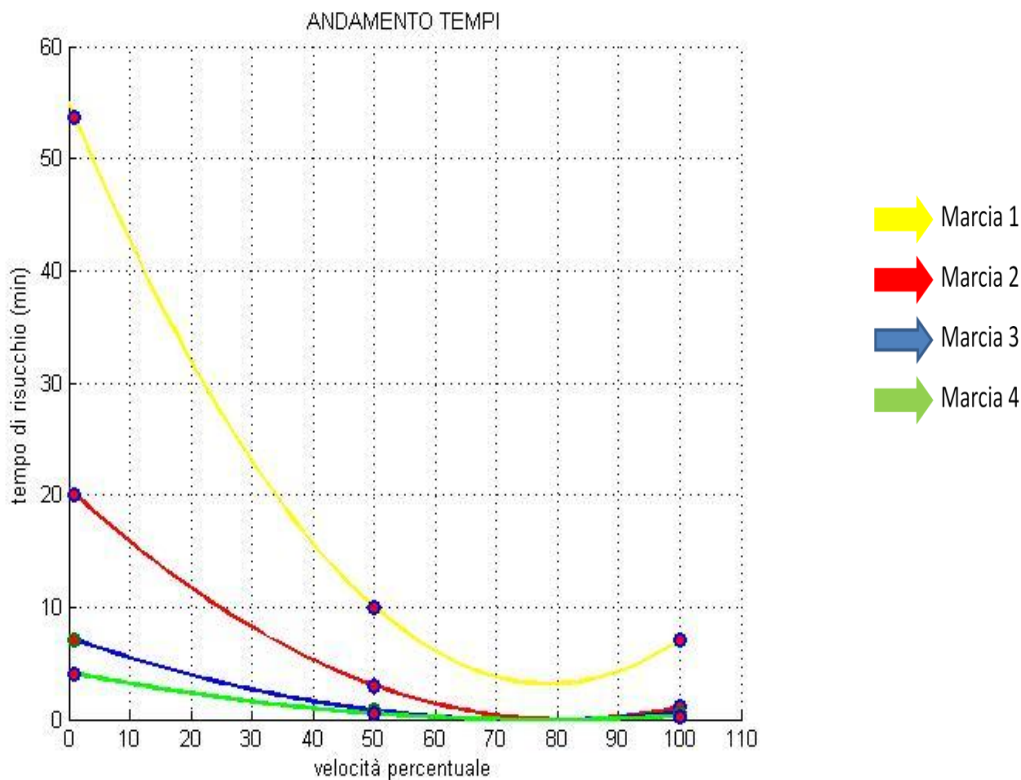


GRAFICO 2. Andamento dei tempi con 100 ml d'acqua aspirata

La tendenza del tempo di risucchio visibile dai dati ricavati nella prima prova con i 250 ml di'acqua è mantenuta anche in questa seconda prova, come è riscontrabile dal confronto tra i due grafici. In riferimento alla seconda prova, con l'aspirazione di 100ml d'acqua, è possibile stimare la quantità d'acqua aspirata al minuto. Il calcolo è stato fatto per la prima marcia della pompa, che presenta i tempi più lenti di risucchio.

$$\frac{\text{quantità di liquido}(ml)}{\text{tempo di risucchio}(min)} = \text{liquido aspirato al minuto}(ml/min)$$

Alla velocità dell' 1%:

$$\frac{100 \text{ ml}}{53,7 \text{ min}} = 1,9 \text{ (ml/min)}$$

Alla velocità del 50%:

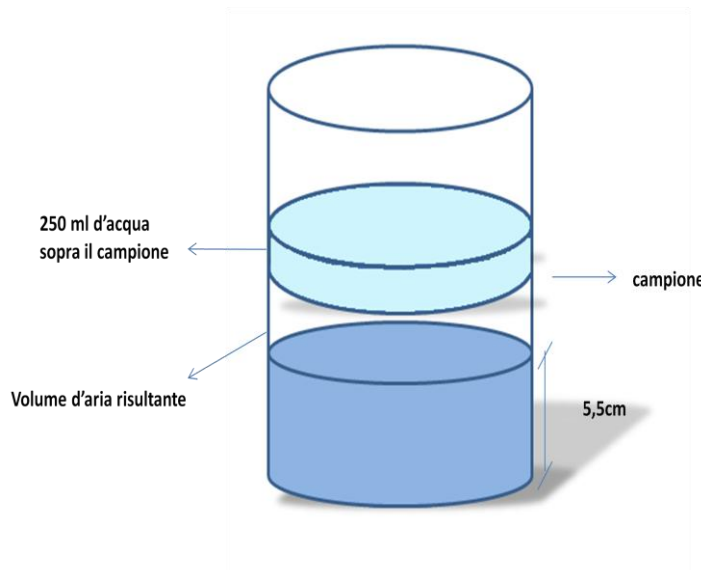
$$\frac{100 \text{ ml}}{10 \text{ min}} = 10 \text{ (ml/min)}$$

Alla velocità del 100%:

$$\frac{100 \text{ ml}}{7,3 \text{ min}} = 13,7 \text{ (ml/min)}$$

Tale procedimento può essere applicato per tutte le marce, anche se risulta più significativo per la prima, in quanto le variazioni nei tempi di risucchio sono maggiori.

3.3 Seconda Fase: 420 ml



Nella seconda fase abbiamo variato il livello d'acqua nel serbatoio inferiore. L'obiettivo è quello di verificare come varia la depressione originata dalla pompa in presenza di un volume d'aria sotto il campione, e come varia di conseguenza il tempo di risucchio di tutto il liquido soprastante. A partire dalla vasca totalmente piena d'acqua è stato tolto il volume d'acqua corrispondente a 2 cm d'altezza, ovvero 150,86 ml . Pertanto se la vasca totalmente piena d'acqua aveva un volume pari a 565,72 ml in questa fase il volume sottostante sarà pari a circa 420 ml.

420 ml d'acqua nel serbatoio, 250 ml d'acqua soprastante				
	MARCIA 1	MARCIA 2	MARCIA 3	MARCIA 4
VELOCITA' 1%	98 min	42,1 min	17,7 min	11,6 min
VELOCITA' 50%	23 min	6,7 min	1,8 min	1 min
VELOCITA' 100%	13 min	4 min	1,1 min	0,8 min

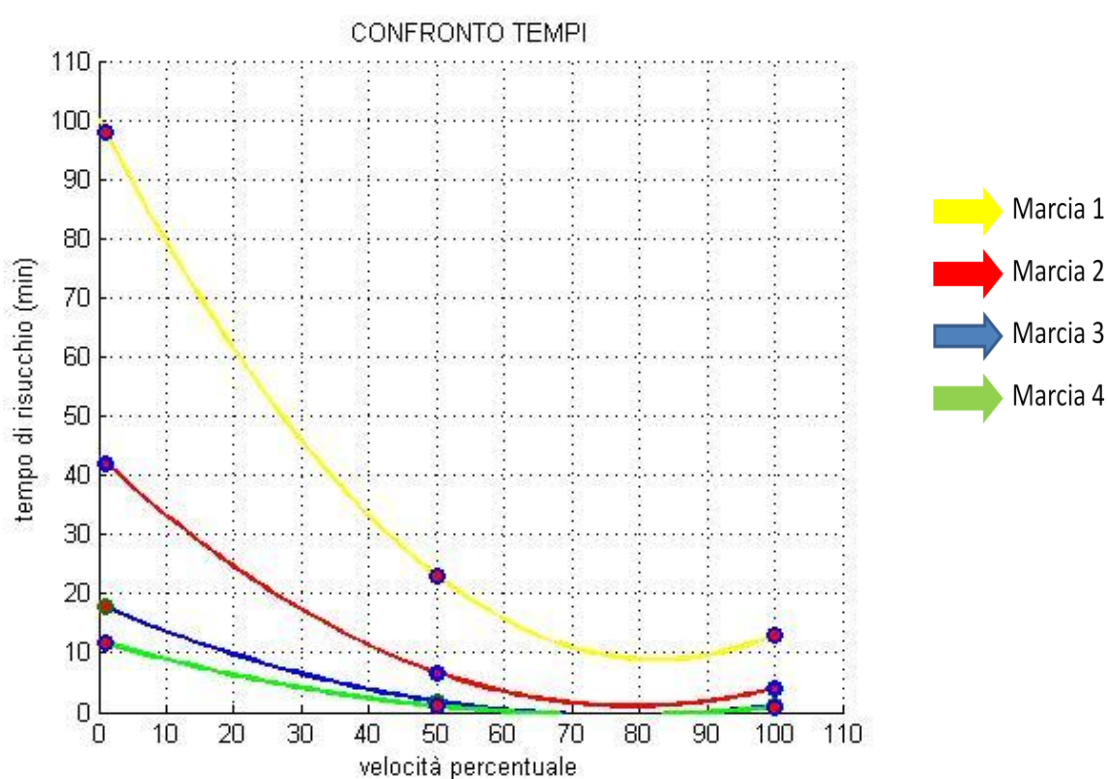


GRAFICO 3. Andamento dei tempi di risucchio per la seconda fase con 250 ml d'acqua aspirati

Variando il volume d'acqua sottostante al campione si è verificata, come previsto dalle ipotesi, una variazione nei tempi di risucchio della pompa. I grafici riportati in figura sono ottenuti mediante l'interpolazione dei valori ottenuti, segnati con il pallino rosso. Anche per questa seconda fase sono stati raccolti ulteriori dati, in modo da confermare il trend ottenuto, ponendo al di sopra del campione 100 ml d'acqua, al posto dei 250 ml di partenza. I risultati ottenuti sono riportati di seguito in tabella.

420 ml d'acqua nel serbatoio, 100 ml d'acqua soprastante				
	Marcia 1	Marcia 2	Marcia 3	Marcia 4
Velocita' 1%	36,6 min	16,8 min	7,5 min	4,8 min
Velocita' 50%	29,5min	3 min	0,8 min	0,5 min
Velocita' 100%	6,8 min	1,6 min	0,5 min	0,3 min

E' possibile notare dai dati che anche per questi valori la tendenza si mantiene se confrontati con i valori e con i grafici ottenuti per la stessa quantità di liquido nella prima fase.

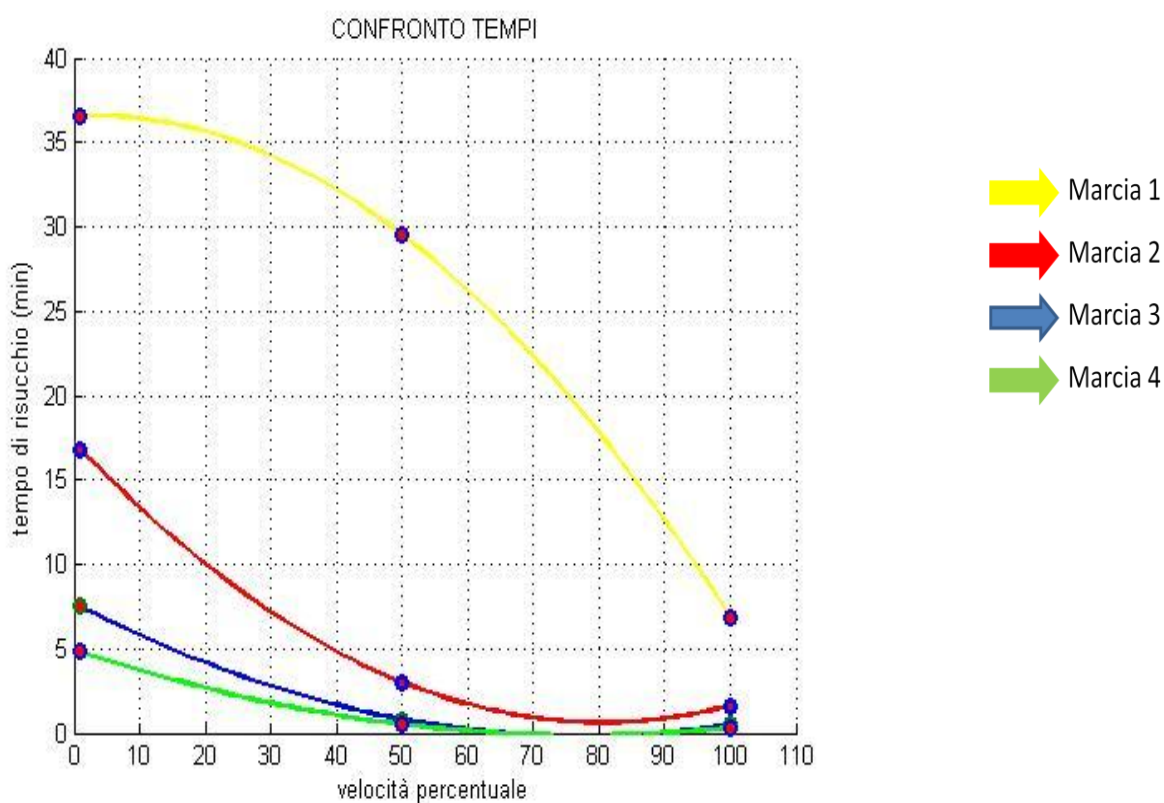


GRAFICO 4. Andamento dei tempi rilevati con 100 ml d'acqua

Procediamo quindi alla terza fase delle sperimentazioni

Anche per questa fase, in riferimento alla seconda prova con l'aspirazione di 100ml d'acqua, è possibile stimare la quantità d'acqua aspirata al minuto

$$\frac{\text{quantità di liquido}(ml)}{\text{tempo di risucchio}(min)} = \text{liquido aspirato al minuto}(ml/min)$$

Alla velocità dell' 1%:

$$\frac{100 \text{ ml}}{36,6 \text{ min}} = 2,7 \text{ (ml/min)}$$

Alla velocità del 50%:

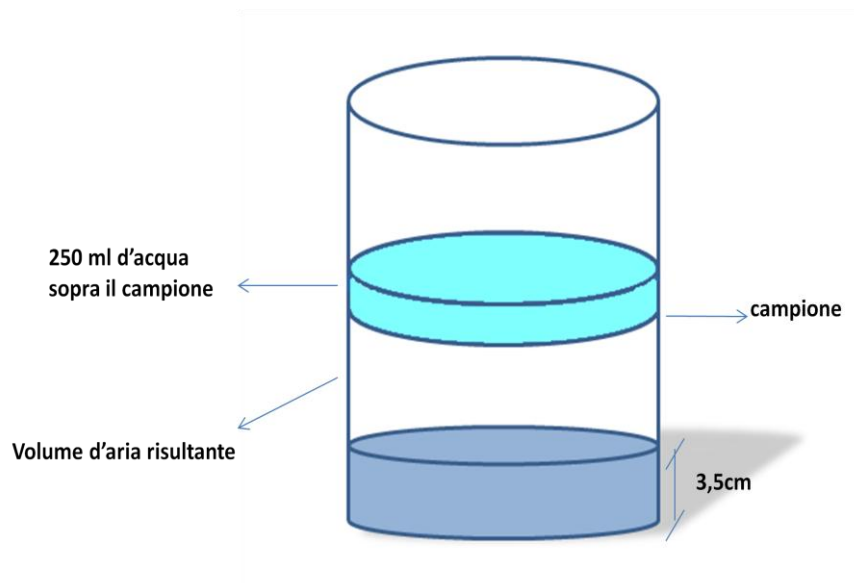
$$\frac{100 \text{ ml}}{29,5 \text{ min}} = 3,4 \text{ (ml/min)}$$

Alla velocità del 100%:

$$\frac{100 \text{ ml}}{6,8 \text{ min}} = 14,7 \text{ (ml/min)}$$

I risultati ottenuti per questa seconda fase mostrano come la quantità d'acqua aspirata nel tempo sia aumentata rispetto alla fase precedente. Tranne per la velocità media (50%) per la quale si ha una riduzione di 6,6 ml/min.

2.4 Terza Fase: 256 ml



Nella terza ed ultima fase è stato ridotto ulteriormente il volume d'acqua sottostante al campione, in modo da verificare ulteriormente l'attendibilità dell'ipotesi fatta.

E' stato tolto il volume d'acqua corrispondente a ulteriori 2 cm d'altezza, ovvero 150,86 ml .

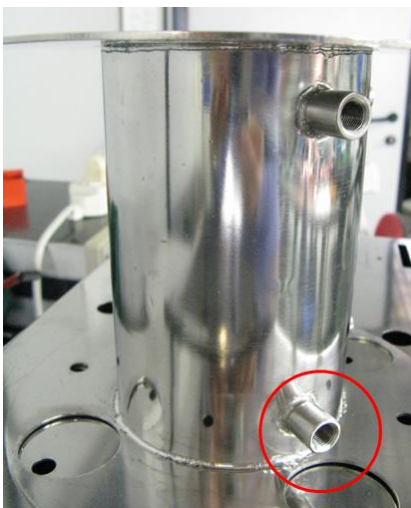


FIG 29. Valvola a cui viene collegata la pompa peristaltica

Pertanto se la vasca totalmente piena d'acqua aveva un volume pari a 565,72 ml in questa fase il volume sottostante sarà pari a circa 265 ml. Quello che ci si aspetta dai risultati sperimentali è che il tempo di risucchio della pompa diminuisca ulteriormente, e questo andamento sarà verificato fino ad un valore limite, ovvero quello per cui il livello dell'acqua nel serbatoio non scende al di sotto della valvola a cui è collegata la pompa peristaltica.

256 ml d'acqua nel serbatoio, 250 ml d'acqua sopra il campione				
	Marcia 1	Marcia 2	Marcia 3	Marcia 4
Velocita' 1%	117 min	40,4 min	21,2min	13,5 min
Velocita' 50%	29 min	5,7 min	2,1 min	1 min
Velocita' 100%	14,4 min	4,1 min	1,2 min	43 min

Contrariamente alle aspettative, in questa terza fase il tempo di risucchio non è diminuito ulteriormente rispetto alla fase precedente, bensì è aumentato arrivando quasi ai tempi della prima fase. Procediamo pertanto all'altra sperimentazione, rilevando le velocità con i 100 ml d'acqua versati sopra al campione e verificando l'esito.

256 ml d'acqua nel serbatoio, 100 ml di liquido sopra il campione				
	Marcia 1	Marcia 2	Marcia 3	Marcia 4
Velocita' 1%	49 min	16 min	6,9 min	4,4 min
Velocita' 50%	10,8 min	2,4 min	0,8 min	0,4 min
Velocita' 100%	6,3 min	1,6 min	0,4 min	0,3 min

Per quest'ultima fase e per questo livello d'acqua sopra il campione i tempi di risucchio della pompa si sono ridotti rispetto alle due fasi precedenti con la medesima quantità di liquido aspirato dalla pompa, cioè è meglio visibile dal grafico sottostante. Si è ripristinato l'andamento già riscontrato per le fasi precedenti, pertanto i risultati ottenuti per i tempi di risucchio dei 250 ml d'acqua risultano anomali e verranno valutati per le conclusioni. Di seguito è riportato il grafico degli andamenti dei tempi per i 250 ml d'acqua.

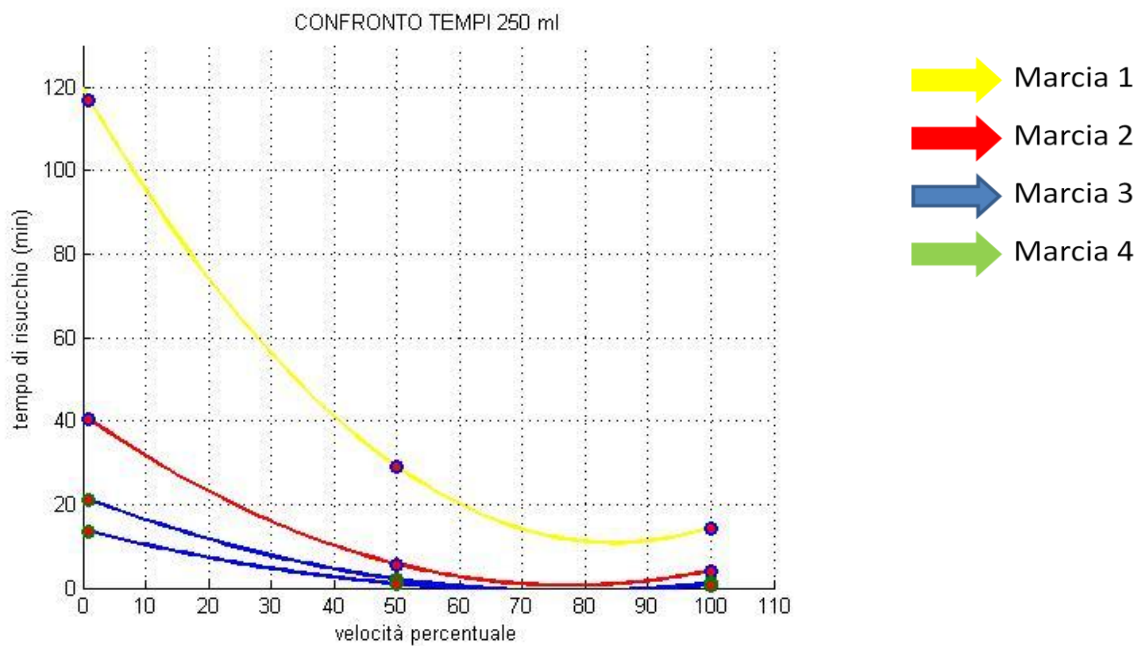


GRAFICO 5. Andamento tempi di risucchio terza fase con 250 ml d'acqua

Anche per quest'ultima fase è stata stimata la quantità d'acqua aspirata al minuto in riferimento alla seconda prova con l'aspirazione di 100ml d'acqua.

$$\frac{\text{quantità di liquido}(ml)}{\text{tempo di risucchio}(min)} = \text{liquido aspirato al minuto}(ml/min)$$

Alla velocità dell' 1%:

$$\frac{100 \text{ ml}}{49 \text{ min}} = 2,0 \text{ (ml/min)}$$

Alla velocità del 50% :

$$\frac{100 \text{ ml}}{10,8 \text{ min}} = 9,3 \text{ (ml/min)}$$

Alla velocità del 100% :

$$\frac{100 \text{ ml}}{6,3 \text{ min}} = 15,9 \text{ (ml/min)}$$

In quest'ultima fase i valori ottenuti si avvicinano molto a quelli della prima fase, alla velocità dell'1% la differenza è dell'ordine dello 0,1 ml/min.

CAPITOLO 4

Risultati Delle Sperimentazioni E Prospettive Future

4.1 Risultati ottenuti e loro valutazione

Sono stati confrontati innanzitutto i valori dei tempi di risucchio ottenuti nella prima e nella seconda fase, successivamente il confronto è stato esteso anche alla terza fase. Il confronto è stato fatto per i tempi rilevati con la pompa peristaltica impostata alla marcia 1, in quanto per questo parametro sono maggiormente visibili le differenze tra i diversi andamenti temporali.

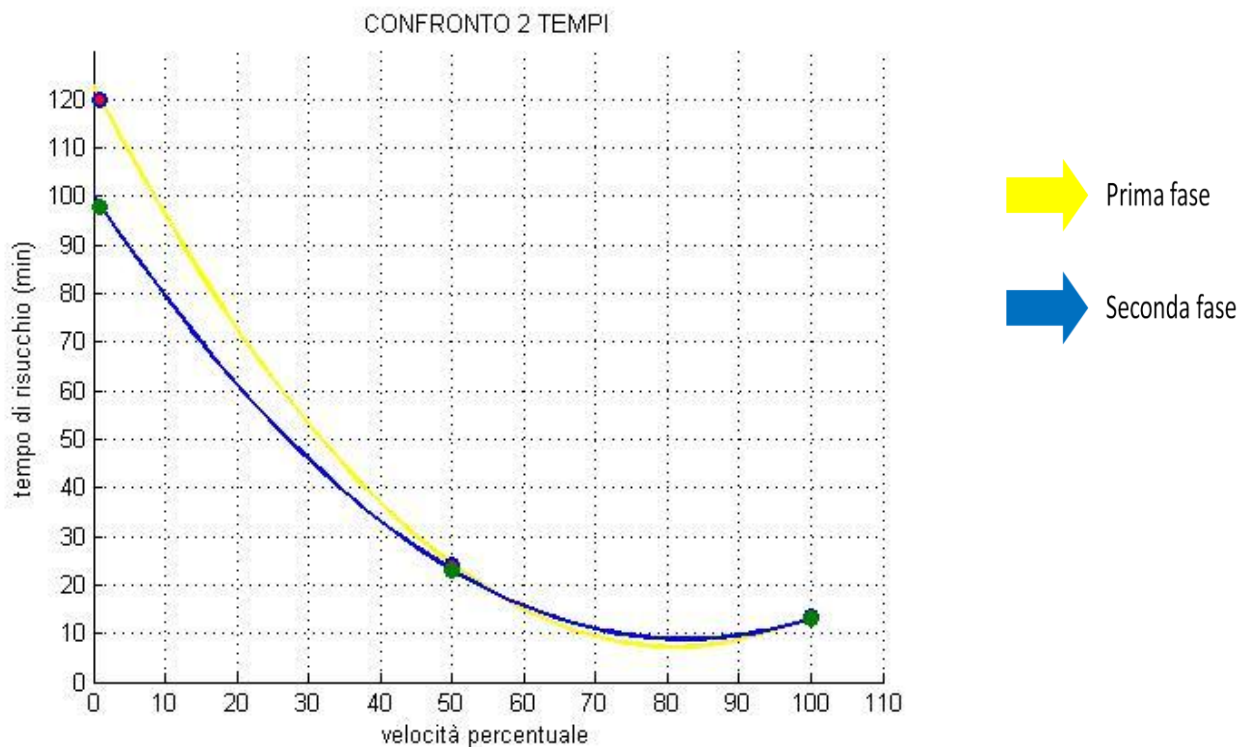


GRAFICO 6. Confronto tempi di risucchio delle prime due fasi con 250 ml

Si nota dal grafico comparativo come i tempi di risucchio nella seconda fase si riducano notevolmente, a parità di marcia della pompa peristaltica. Nella prima fase il tempo di risucchio all'1% della velocità è pari a 120 minuti, nelle stesse condizioni per la seconda fase il tempo impiegato per il risucchio dei 250 ml di acqua è pari a 98 minuti. Il tempo si è

ridotto pertanto di ben 22 minuti. Il grafico comparativo riportato rende in modo migliore l'idea della variazione nel tempo di risucchio riscontrata con le prove sperimentali.

Il confronto è stato fatto successivamente per le tre fasi, comparando i tempi di aspirazione per le medesime condizioni di funzionamento della pompa (marcia1). Il risultato del raffronto è chiaramente visibile dai grafici sottostanti.

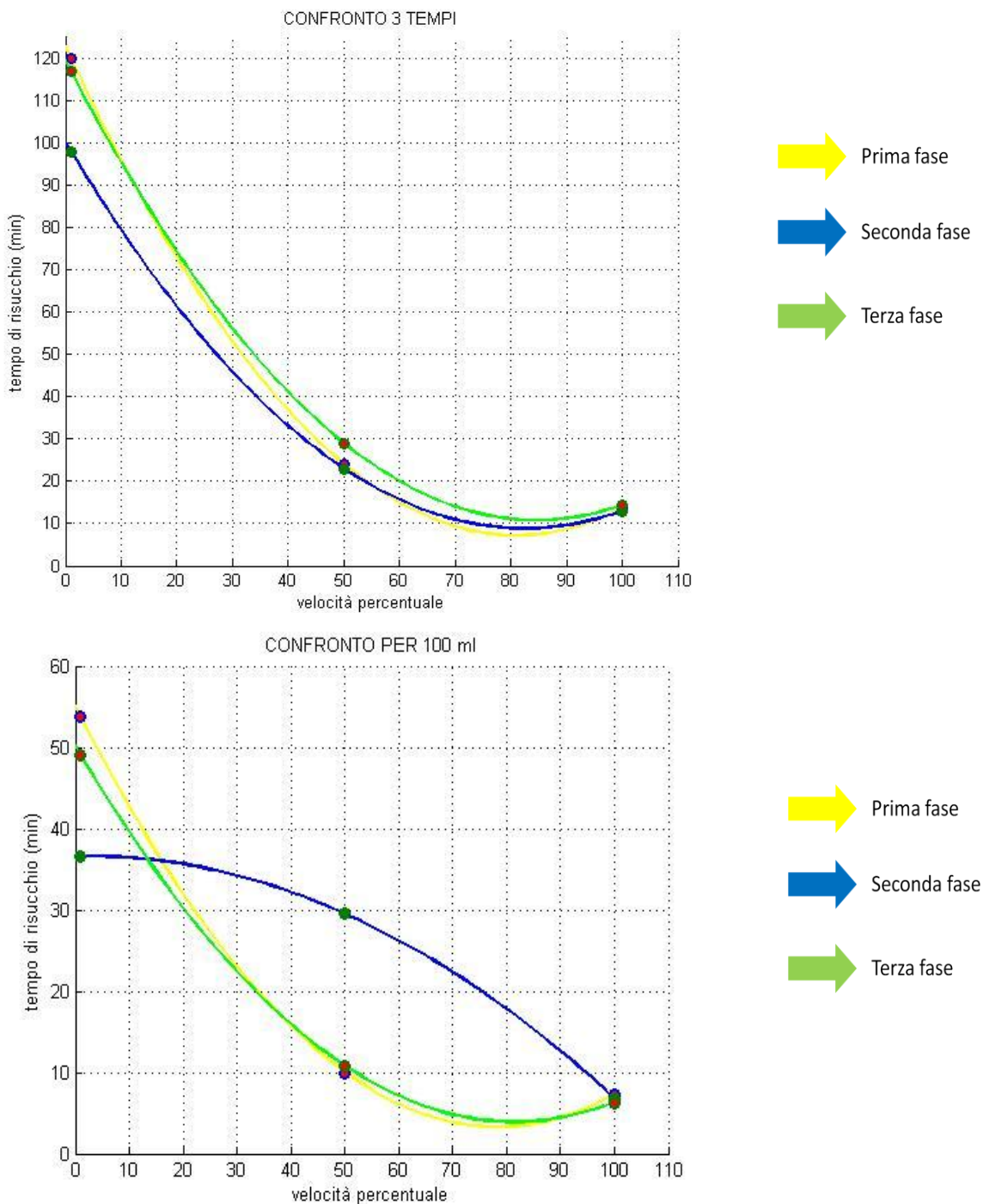


GRAFICO 7-8. Confronto tempi di risucchio delle tre fasi con 250 ml e 100 ml

Contrariamente alle aspettative, nella terza fase il tempo di risucchio non è diminuito rispetto alle fasi precedenti, bensì è aumentato arrivando quasi ai tempi della prima fase. Tale andamento è stato riscontrato anche nella seconda sperimentazione con 100 ml d'acqua. Ciò è visibile dai due grafici comparativi riportati nella pagina precedente, in cui sono messi a confronto i tempi di risucchio delle tre fasi rilevati per 250 ml d'acqua e per 100 ml d'acqua aspirati.

Pertanto ciò che si può evincere dalle sperimentazioni, è il fatto che il tempo di risucchio della pompa peristaltica sicuramente può essere variato modificando il volume d'acqua nel serbatoio posto al di sotto del tessuto da trattare, ma è evidente che la struttura utilizzata presenta dei problemi, in quanto non c'è stata una regolarità nei risultati ottenuti nelle prove, ripetute pertanto più volte.

L'andamento che è stato rilevato sperimentalmente è opposto, o quasi, a quello previsto dai calcoli basati sulla teoria.

La spiegazione che è possibile dare a tale fenomeno è che la struttura utilizzata presenta difetti strutturali che sono causa di errori.

Sono state notate nel prototipo delle vie preferenziali per il passaggio d'aria attraverso i dischi regolatori, che ne sono senza dubbio la causa. Quest'ultimi non hanno garantito la tenuta al passaggio dell'aria una volta che l'acqua veniva a trovarsi ad un livello basso, cioè verso la fine della fase di aspirazione dell'acqua soprastante. E' stato possibile osservare come, arrivata a quel livello, la pompa aspirasse l'aria che, attraverso le vie preferenziali appunto, riusciva a passare. Inoltre le sperimentazioni sono state fatte posizionando la pompa ad un'altezza superiore rispetto a quella alla quale si trovava il prototipo, e ciò rende incerto il corretto funzionamento della pompa peristaltica stessa.

L'obiettivo di far entrare, aderire e proliferare le cellule staminali può essere comunque ottenuto variando nel modo desiderato il parametro che è stato verificato tramite i risultati sperimentali, ossia il livello di volume d'acqua sotto il campione, ma basandosi esclusivamente sulle sperimentazioni fatte e non sulla teoria del comportamento dei fluidi.

Nella prospettiva di un impiego futuro della struttura utilizzata per le prove, ovvero i test con la presenza del gel contenente la coltura di cellule al posto dell'acqua, il tempo più

lungo è forse da considerarsi l'ottimale, in quanto riduce notevolmente il rischio che le cellule si danneggino a causa della velocità di aspirazione troppo elevata. Un tempo lento, inoltre, garantisce la penetrazione delle cellule attraverso le pareti dei canali presenti nel tessuto. Allo stesso tempo tale valore di tempo, per un futuro impiego, può risultare eccessivo.

Per le future lavorazioni con le cellule sarà pertanto utilizzato un giusto compromesso tra velocità di lavorazione e tempo di risucchio, in modo tale da ottimizzare da una parte i tempi di lavorazione, che per i costi delle operazione non possono essere eccessivamente elevati, e dall'altra la qualità della lavorazione e del prodotto, preservando cioè l'integrità delle staminali.

In conclusione il range che va dall'1% al 50% delle marce più basse della pompa.

4.3 Nuovo Progetto

Al fine di ottimizzare la lavorazione del tessuto è stato verificato che la struttura attualmente in uso presenta numerosi svantaggi funzionali, per sopperire ai quali è stato

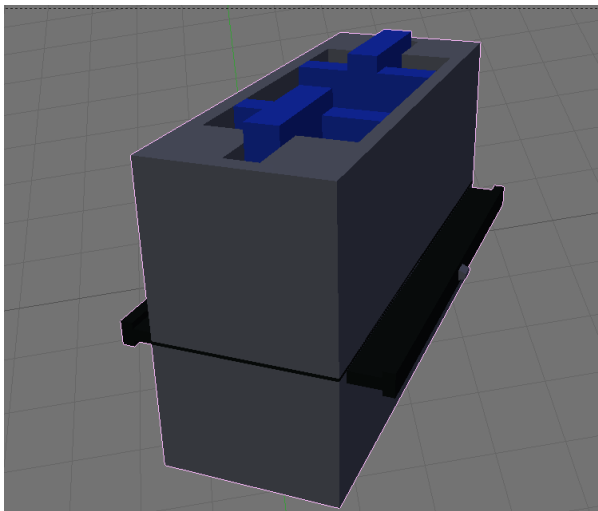


FIG 30. Nuovo prototipo

realizzato il progetto di un nuovo prototipo che provveda a risolvere i deficit del modello usato ad oggi.

Il prototipo realizza una nuova struttura nella quale inserire il campione di tessuto lavorato rendendo ottimali le condizioni per la seconda fase di lavorazione dello scaffold. La struttura usata nelle sperimentazioni ad oggi ha mostrato non pochi difetti che con questo prototipo si pensa di ridurre, se non di eliminare completamente. Come

si può ben vedere dalla figura a lato è stata cambiata drasticamente la struttura operativa, innanzi tutto nella forma, da un cilindro si è passati ad un parallelepipedo. E' infatti stato

verificato che la forma del recipiente non va a modificare in alcun modo le pressioni del liquido in esso contenuto e quindi le prestazioni della pompa peristaltica.

Inoltre, dal momento che i risultati sperimentali hanno dimostrato che non è consigliabile l'utilizzo dei dischi regolatori, in quanto via preferenziale per il passaggio dell'aria, nella nuova struttura è prevista la regolazione del canale in base alla forma del tessuto, che è di forma rettangolare.

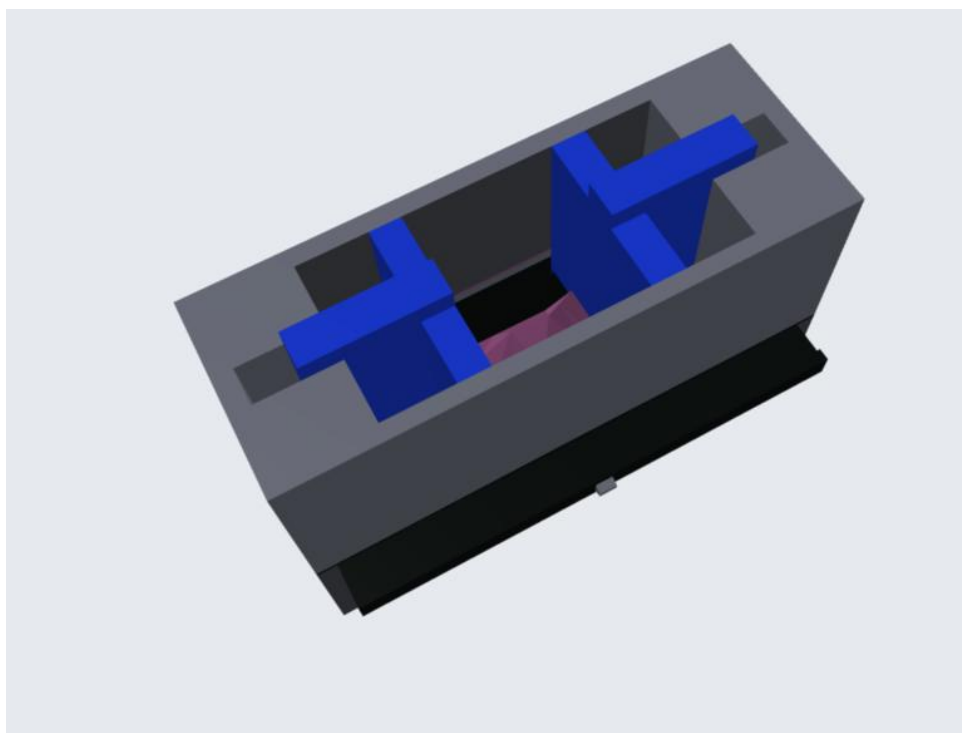


FIG 31. Nuovo prototipo 3D 1

Per le future applicazioni è infatti previsto che i tessuti lavorati possano essere di diverse dimensioni, a seconda del loro impiego, pertanto la struttura deve essere adattabile alle più diverse situazioni.

Proprio per questo è stato predisposto un sistema di “binari”: facendo scorrere gli adattatori verticali sarà possibile posizionarli in modo tale da ottenere un doppio effetto: da una parte verrà bloccato il campione e dall'altra sarà possibile incanalare in maniera ottimale il gel con la coltura di cellule staminale, senza che vi siano fuoriuscite e quindi sprechi.

Proprio per prevenire alle fuoriuscite è stato pensato al miglior sistema che riesca a limitarle, garantendo che l'intera quantità di gel passi esclusivamente attraverso il campione. Sono stati posti pertanto due livelli a scorrimento, uno superiore e uno inferiore.

Il livello superiore presenta due adattatori rettangolari verticali mobili e regolabili tramite lo scorrimento sui binari, il secondo livello è sottostante e regolabile esternamente.

Come nella precedente struttura, anche nel nuovo prototipo è stato predisposto un serbatoio per l'acqua, collegato tramite una valvola alla pompa peristaltica, posizionato al di sotto del piano sul quale viene posto il campione da trattare.

Grazie alla nuova struttura, che sarà realizzata entro breve, si apriranno nuove strade e nuove metodologie per migliorare ulteriormente la tecnica della lavorazione del biomateriale considerato.

Sotto viene riportato il prototipo nei tre diversi piani spaziali: orizzontale, verticale e laterale.

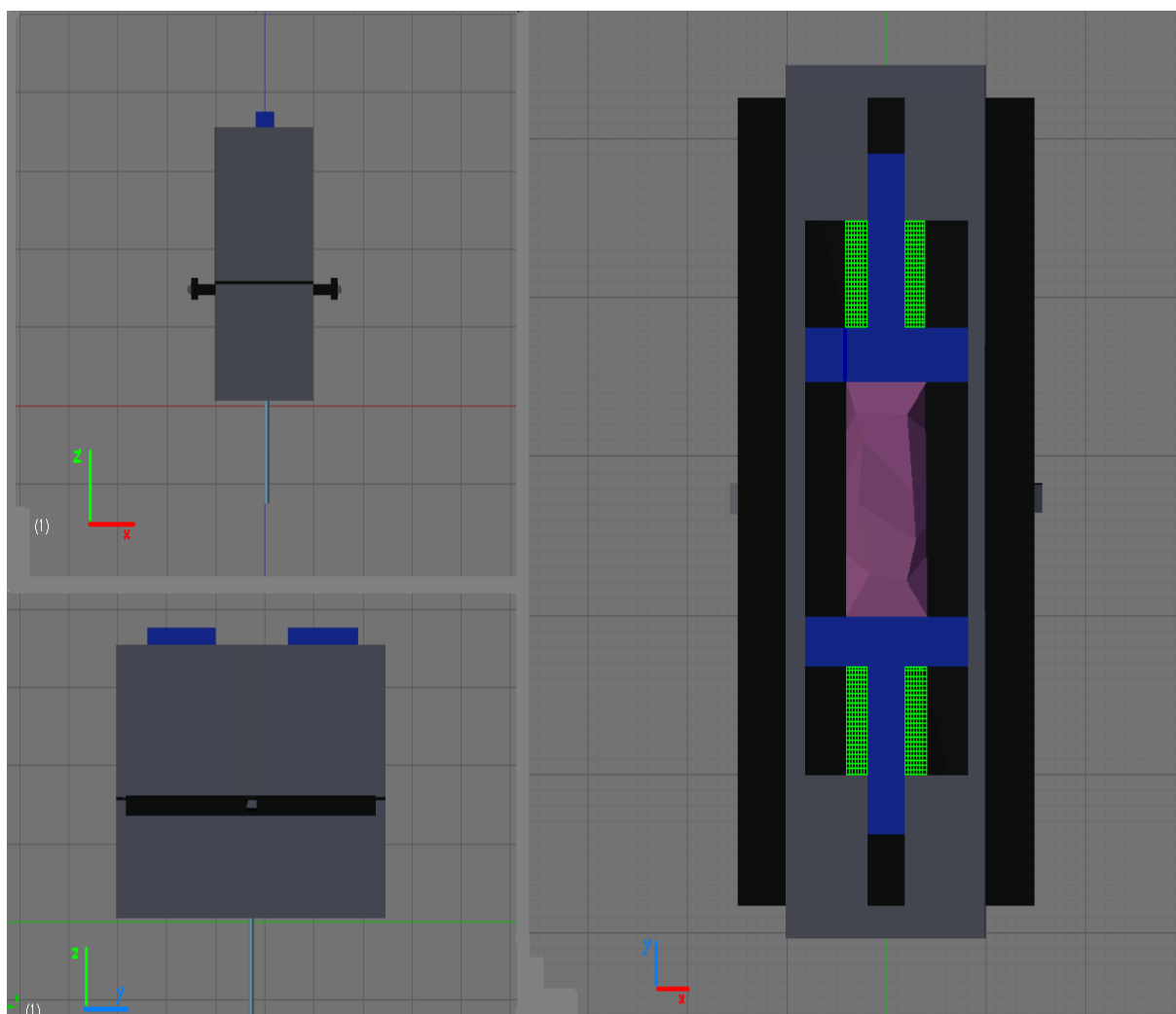


FIG 32. Visione sui tre piani del nuovo prototipo

4.4 Lavorazione Sterile

La tappa successiva del progetto prevede la lavorazione del tessuto in condizioni di sterilità, in quanto la procedura applicata ad oggi in via sperimentale non ha rispettato suddette condizioni, imprescindibili per lavorare con materiale biologico da impiantare successivamente *in vivo*, eliminando cioè il rischio che vi sia una contaminazione batterica del tessuto. La lavorazione in condizioni sterili prevede l'utilizzo in laboratorio di una *cappa sterile*.

Il controllo della contaminazione dell'aria è fondamentale per tutelare la salute degli operatori e per assicurare al prodotto le migliori condizioni di trattamento.

E' possibile fare la distinzione tra due diversi tipi di contaminazione: la contaminazione dovuta a presenza di particelle solide in sospensione (contaminazione particellare) e la contaminazione da vapori e gas normalmente non presenti nell'aria pura (contaminazione chimica). Il controllo del primo tipo di contaminazione si ottiene con la filtrazione a flusso laminare, mentre la contaminazione chimica viene controllata con cappe a filtrazione molecolare o cappe chimiche. Nel nostro caso specifico è sufficiente utilizzare una cappa con filtrazione a flusso laminare. Il flusso laminare è un flusso d'aria unidirezionale formato da filetti d'aria sterili paralleli che si muovono alla medesima velocità in tutti i punti, così da creare una corrente d'aria omogenea senza turbolenze. In un ambiente sterile così ottenuto ogni contaminante libero nella zona di lavoro viene trascinato lontano da un fronte di aria sterile.

Applicazioni della tecnologia del flusso laminare sono ormai diffusissime nell'industria farmaceutica, alimentare, nelle sale operatorie, nei laboratori di microbiologia e biotecnologie. A seconda del campo applicativo in cui si opera, è possibile scegliere tra le cappe in commercio quella più adatta. Esistono cappe a flusso laminare principalmente di due tipi: orizzontali e verticali. Mentre nelle prime l'aria sterile si muove in modo laminare parallelamente al piano di lavoro mantenendo sterile o depolverizzata la zona di lavoro, nelle seconde l'aria che fuoriesce dal filtro si muove perpendicolarmente al piano. Pertanto le cappe a flusso laminare orizzontale sono utili per la sola protezione del

prodotto, le seconde, quelle verticali, assicurano la protezione sia dell'operatore che del prodotto.

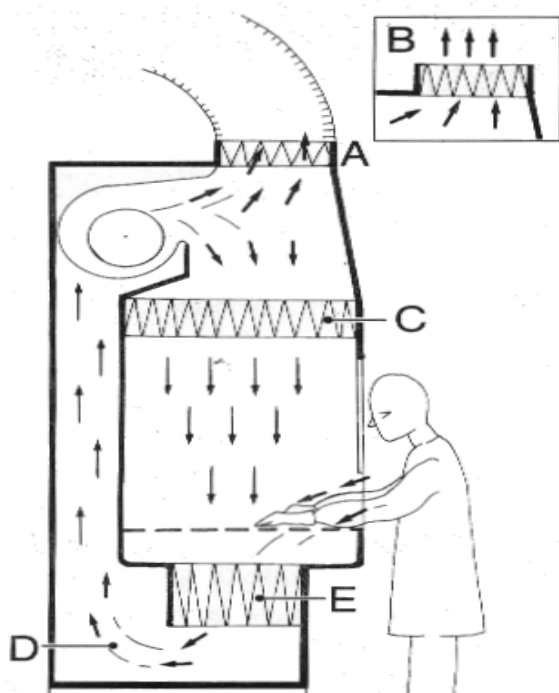


FIG 33 (A) filtro HEPA di espulsione dell'aria; (B) filtro a carbone attivo posizionato sopra il filtro HEPA (A) quando il riciclo dell'aria avviene nello stesso locale; (C) filtro HEPA dell'aria di ricircolo; (D) zona a rischio facilmente raggiungibile per la decontaminazione; (E) filtro HEPA sostituibile in bagout.

Le cabine a flusso laminare verticale sono particolarmente indicate nel caso sia preferibile non investire l'operatore con il flusso d'aria proveniente dalla zona di lavoro (ad es. manipolazione di sostanze allergizzanti o potenzialmente tali, finemente polverose, maleodoranti ecc).

La cappa scelta per il progetto è una cappa TELSTAR, a flusso laminare verticale, classe IIA. Le Cappe di sicurezza biologica di classe II sono progettate per la contemporanea protezione dell'operatore, dei prodotti manipolati al suo interno e dell'ambiente circostante. Sono provviste di un'apertura frontale che permette l'ingresso dell'aria e sono caratterizzate dalla filtrazione sia dell'aria aspirata che di quella espulsa. La filtrazione dell'aria avviene attraverso dei particolari tipi di filtri, i filtri HEPA (dall'inglese *High Efficiency Particulate Air filter*).

Un filtro HEPA è composto da foglietti filtranti di microfibre (generalmente in borosilicato) assemblati in più strati, separati da setti in alluminio. I foglietti filtranti in

microfibra hanno il compito di bloccare le particelle solide inquinanti (o particolato) presenti nella corrente fluida da trattare. Le particelle solide possono essere infatti nocive per la salute oppure possono pregiudicare la qualità del prodotto finale che si desidera ottenere. I filtri HEPA fanno parte della categoria dei cosiddetti "filtri assoluti", il termine "filtro assoluto" è giustificato dal fatto che i filtri HEPA hanno una elevata efficienza di filtrazione. In particolare, i filtri HEPA presentano un'efficienza di filtrazione compresa tra il 99,97% e il 99,99%.

Bibliografia

- [1] S.F. Badylak. "The extracellular matrix as a biologic scaffold material". *Biomaterials*, Volume 28, Issue 25, pages 3587-3593, 2007.
- [2] T. W. Gilbert, J. M. Freund, and S. F. Badylak. "Quantification of DNA in Biologic Scaffold Materials". *Journal of Surgical Research*, 2008.
- [3] M. Marzaro, B. Oselladore, S. Giuliani, G. Perrino, P. P. Parnigotto, and M. T. Conconi. "Natural and non-natural biomaterials for esophageal reconstruction: new perspectives". 2008.
- [4] W. J. Lia, R. Tulia, X. Huanga, P. Laquerriereb, and R. S. Tuana. "Multilineage differentiation of human mesenchymal stem cells in a three-dimensional nanofibrous scaffold". *Biomaterials - ScienceDirect*, 26:5158–5166, 2005.
- [5] C. Conrad and R. Huss. "Adult Stem Cell Lines in Regenerative Medicine and Reconstructive Surgery". *Journal of Surgical Research*, 124:201–208, 2005.
- [6] G. Pozzato and G. Vignato. "Teoria della risonanza quantica molecolare nella realizzazione del bisturi elettronico VESALIUS®". *Quintessence International*, pages 153–155, 2003.
- [7] F.Meneghesso,G.Pozzato,M.Marzaro. "Sviluppo e integrazione di macchine per la preparazione di tessuti naturali decellularizzati, omologhi o eterologhi, e arricchimento con cellule staminali autologhe". *Tesi di Laurea Specialistica in Bioingegneria*. 2009.