

Università degli Studi di Napoli Federico II

Facoltà di Ingegneria



Dipartimento di Ingegneria dei Materiali e della Produzione

Dottorato di Ricerca in Ingegneria Chimica
Dei Materiali e Della Produzione
XVIII Ciclo

**INFLUENZA DELLE CONDIZIONI DI PROCESSO SULLA
CRESCITA DI BIO-IBRIDI TESSUTALI**

Coordinatore

CH. ^{mo} prof. N. Grizzuti

Candidato

Ing. Francesco Urciuolo

Tutor

CH. ^{mo} Prof. P. A. Netti

CAPITOLO 1: Introduzione

1.1 Definizione del problema: approccio dell' ingegneria tessutale.....	1
1.2 Cartilagine articolare: struttura – composizione – proprietà fondamentali.....	1
1.3 Stato dell'arte.....	15
1.4 Obiettivi.....	20

CAPITOLO 2: Caratterizzazione di costrutti cellulari

2.1 Introduzione.....	23
2.2 Metodi teorici.....	24
2.2.1 Teoria multifasica.....	24
Equazioni di bilancio: massa e quantità di moto.....	25
Modello bi-fasico: deformazioni finite.....	27
2.2.2 Biosintesi dell' ECM.....	28
2.3 Metodi sperimentali.....	30
2.3.1 Test meccanici.....	30
2.3.2 Saggi biochimici.....	34

CAPITOLO 3: Risposta cellulare alle variabili di processo

3.1 Introduzione.....	38
3.2 Effetti di stimoli meccanici.....	38
3.2.1 Risposta di espianti di cartilagine.....	38
3.2.2 Risposta di costrutti: agarosio, PEG, PGA.....	43
3.3 Trasporto macromolecolare in gel: implicazioni per la TE.....	51
3.3.1 Caso studio: compressione confinata.....	51
3.3.2 Convalida del modello.....	56
3.3.3 Trasporto dei soluti	62
3.3.4 Influenza dei parametri sul trasporto: implicazioni nel processo.....	63

CAPITOLO 4: Evoluzione spaziale e temporale delle proprietà di trasporto in costrutti.

4.1 Introduzione.....	68
4.2 Materiali e Metodi.....	69
4.2.1 Estrazione di condrociti.....	69
4.2.2 Preparazione dello scaffold e coltura.....	69
4.2.3 Misura del coefficiente di diffusione.....	69
4.2.4 Proprietà meccaniche e di trasporto.....	70
4.2.5 Analisi Istologiche.....	71
4.2.6 Analisi biochimiche.....	72
4.3 Risultati.....	72
4.4 Discussione.....	74
4.5 Conclusioni.....	76

CAPITOLO 5: Conclusioni e sviluppi futuri

Capitolo 1

Introduzione

1.1. Definizione del problema: approccio dell' ingegneria tissutale.

L'ingegneria tissutale si pone l'obiettivo di rigenerare tessuti umani danneggiati da traumi o patologie. L'approccio generale è quello di isolare cellule dal paziente o da altra fonte, inserirle in un materiale (scaffold) e processare opportunamente il costrutto o bio-ibrido (cellule + scaffold). Il termine processo significa fare in modo che le cellule producano un tessuto funzionale in grado di essere impiantato al posto del tessuto danneggiato di partenza. In tale direzione la comunità scientifica ha accumulato notevole esperienza nel comprendere i meccanismi che portano una cellula a produrre un particolare tessuto: ciò è dovuto non solo alla complessità dei fenomeni che sono coinvolti nell'attività biosintetica, ma anche dal fatto che ogni tessuto è diverso dall'altro per cui possiamo dire che rigenerare un particolare tessuto costituisce una disciplina a se.

In tale lavoro si porrà l'attenzione sulla cartilagine articolare, un materiale che nel nostro organismo si trova alle estremità delle articolazioni ricoprendole, garantendo un cinematisma senza attrito e proteggendo la parte ossea delle articolazioni dai carichi esterni. Le patologie relative alla cartilagine articolare coinvolgono un gran numero di persone e la scarsa capacità di auto ripararsi di tale materiale unito ai scarsi risultati ottenuti dalla medicina classica nel curare tali patologie, rendono la rigenerazione in vitro di tessuto cartilagineo, una sfida molto importante. Lo schema dell'approccio dell'ingegneria tissutale relativa alla cartilagine articolare è proposto in **figura 1**.

1.2. Cartilagine articolare: struttura – composizione – proprietà fondamentali.

Il tessuto cartilagineo, insieme al tessuto osseo appartiene ai tessuti scheletrici o tessuti connettivi di sostegno dotati di proprietà meccaniche. La cartilagine rappresenta una forma specializzata di tessuto, costituita da cellule denominate condrociti immersi in una matrice extracellulare composta principalmente di collagene e proteoglicani (**figura 2**). La principale funzione della cartilagine è quella di supporto e protezione.

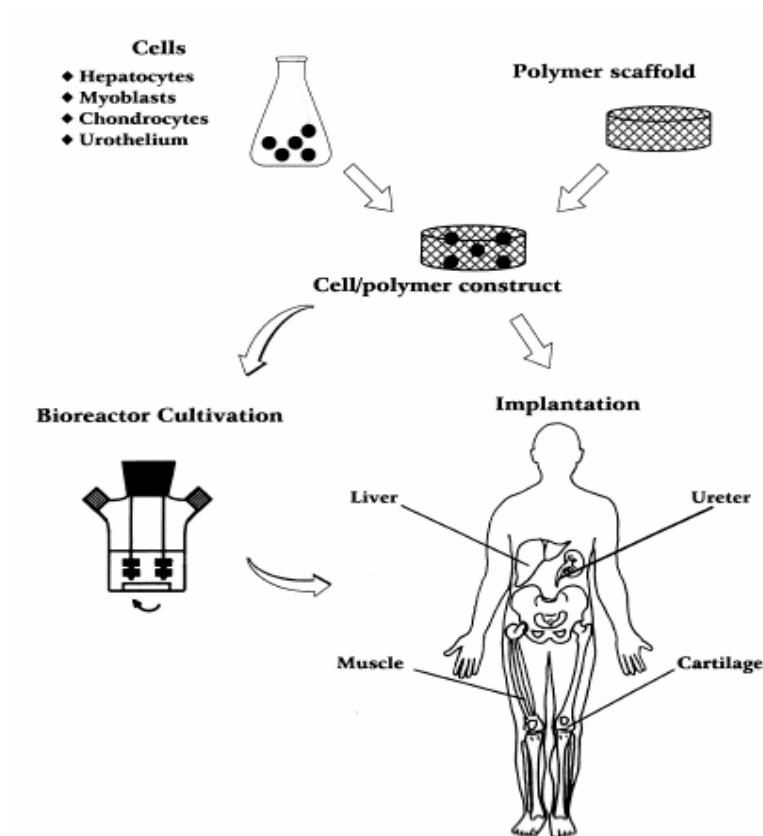


Figura 1. Schema dell' approccio della ingegneria dei tessuti

Nell'embrione serve quale modello per l'osso che si va formando, e dopo la nascita e durante tutto il periodo di accrescimento dell'individuo permane nelle zone di confine tra epifisi e diafisi delle ossa lunghe provvedendo allo sviluppo in lunghezza di tali segmenti scheletrici.

Nell'adulto la cartilagine permane in corrispondenza delle superfici articolari e forma inoltre lo scheletro di sostegno dell'orecchio esterno, del naso, della laringe, della trachea e dei bronchi.

Esistono essenzialmente tre tipi di cartilagine: ialina, elastica e fibrosa e tale classificazione è basata sulla prevalenza delle fibre presenti nella matrice intercellulare le quali sono costituite prevalentemente da collagene, e solo in alcuni casi da fibre elastiche¹.

Condrociti

La cartilagine articolare (**figura 2**) è composta principalmente da una matrice extracellulare (ECM) nella quale si trovano i condrociti accolti in spazi denominati lacune.

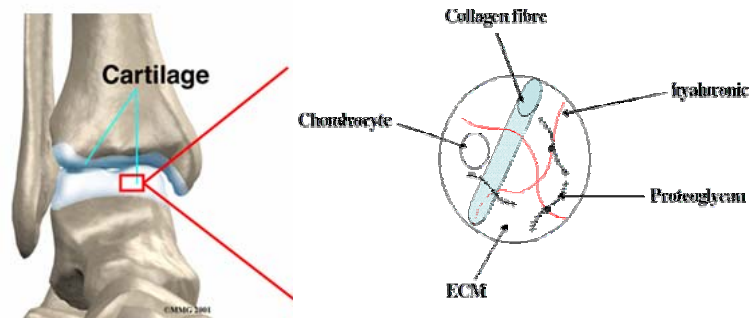


Figura 2. Cartilagine articolare che ricopre l'articolazione del ginocchio; immagine schematica della struttura e composizione della cartilagine.

Al termine del differenziamento, all'esame istologico, i condrociti risultano inglobati nell'abbondante sostanza intercellulare che forma, attorno ad ogni singolo elemento, una capsula.

Ciascuna cellula può essere vista come un'unità metabolicamente funzionale di cartilagine, isolata dalle cellule adiacenti, ma responsabile dell'elaborazione e mantenimento dell'ECM nelle immediate vicinanze. In condizioni fisiologiche, i condrociti regolano quindi un sofisticato sistema dinamico metabolico nel quale l'anabolismo (sintesi di matrice cartilaginea) è bilanciato dal catabolismo (degradazione e perdita della matrice). Essi producono l'ECM con una percentuale di sintesi che varia in risposta alle normali modificazioni che avvengono nel microambiente cellulare, concetto che è in accordo con alcune osservazioni cliniche.

L'immobilizzazione o un ridotto carico portano ad una diminuita sintesi e concentrazione tissutale di proteoglicani, mentre un aumento dinamico del carico porta ad una moderata sintesi di questi ultimi¹.

I condrociti si originano dalle cellule staminali mesenchimali (MSCs) che si trovano nel midollo osseo negli individui maturi. Durante l'embriogenesi, le MSCs cominciano a differenziarsi in condrociti e secretano matrice cartilaginea. Durante questo tempo le cellule continuano a dividersi. Esse passano attraverso vari stati discendenti e i condrociti nella zona centrale, vicini a ciò che presto diventerà l'osso entrano nello stadio finale di sviluppo e diventano condrociti ipertropici, producendo proteine che sono importanti nella calcificazione della matrice.

Altri condrociti, quelli nella periferia, secretano collagene e molecole della matrice nelle giuste proporzioni per produrre cartilagine ialina. I condrociti maturi, incapaci di proliferare, appaiono tondeggianti e sono completamente circondati da matrice².

Matrice extracellulare

La concentrazione ed il bilancio metabolico tra le varie macromolecole dell'ECM e le loro interazioni e relazioni strutturali determinano le proprietà biochimiche e quindi la funzionalità cartilaginea nelle diverse articolazioni.

La maggiore componente dell'ECM è rappresentata dall'acqua che nel tessuto cartilagineo adulto rappresenta circa il 70% del peso totale ed è saldamente legata agli altri componenti macromolecolari del tessuto, che comprendono collagene, proteoglicani e glicoproteine non appartenenti al collagene.

Sono inoltre presenti piccole quantità di lipidi e di lipoproteine.

Collagene

Nella cartilagine dell'adulto le forme di collagene trovate sono di tipo IV, IX, X, XI, ma quello predominante è il collagene di tipo II che rappresenta il 90% del collagene totale. Questo è infatti specifico della cartilagine articolare e forma la struttura fibrillare di base della matrice extracellulare. Esso ha un elevato ammontare di gruppi carboidrati ad esso legati che permettono più interazioni con l'acqua rispetto ad altri tipi di collagene.

Il ruolo principale del collagene è quello di provvedere alle proprietà tensili della cartilagine, esso ha un alto grado di organizzazione strutturale, la struttura a tripla elica è formata da tre catene polipeptidiche ciascuna di esse è sinistrorsa ma legate nella tripla elica sono destrorse. Le tre catene che si uniscono a formare il collagene, a differenza di quanto avviene nella maggior parte dei connettivi dei Vertebrati, sono identiche, per cui necessitano dell'attività di un solo gene per codificare la loro sintesi a differenza della sintesi del collagene degli altri connettivi che richiede invece l'attività di due geni.

La catena polipeptidica è composta da glycina/prolina/X dove X potrebbe essere sia l'idrossiprolina che qualsiasi altro aminoacido.

Proteoglicani

I proteoglicani rappresentano la seconda maggiore componente non acquosa della cartilagine articolare, sono composti per il 95% da polisaccaridi e per il 5% da proteine.

Sono molecole complesse composte da un core di proteine a cui sono covalentemente legate una o più catene di glicosamminoglicani.

I glicosamminoglicani sono catene di polisaccaridi non ramificate composte da unità di disaccaridi ripetute. Sono dette GAG perché uno dei due residui di zucchero nel disaccaride ripetuto è sempre un amminozucchero (N-acetilglucosammina o N-acetilgalattosammina) che nella maggior parte dei casi è solfatato. Il secondo zucchero è di solito un acido uronico.

Poiché ci sono gruppi solforici o carbossilici sulla maggior parte dei residui glucidici, i GAG sono caratterizzati da un'elevata carica negativa.

Le catene di gag sono fortemente idrofile pertanto essi tendono ad assumere nello spazio conformazioni distese che occupano un volume enorme rispetto alla loro massa e formano un gel anche a concentrazioni molto basse. A causa dell'elevata densità delle loro cariche negative attraggono una nube di cationi, quali il Na⁺, che sono osmoticamente attivi, provocando l'afflusso di grandi quantità d'acqua nella matrice. Ne deriva una tendenza al rigonfiamento che rende la matrice capace di resistere alle forze di compressione.

Il proteoglicano più rappresentato nella ECM della cartilagine articolare è l'aggrecano che rappresenta il 90% di tutti i proteoglicani ed al quale sono covalentemente legati unità di glicosamminoglicani quali il cheratansolfato ed il condroitindolfato formando una struttura tipo spazzola (**figura 3**).

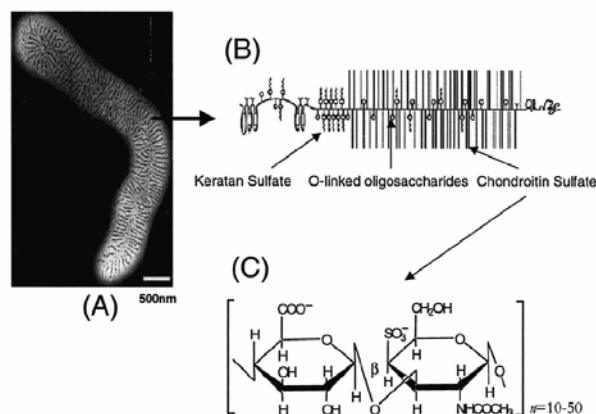


Figura 3 Un proteoglicano aggregato della cartilagine (A), composto da monomeri di proteoglicani chiamati aggrecani (B) che sono attaccati in maniera non covalente a molecole di acido ialuronico. L'aggrecano a sua volta consiste di catene di glicosamminoglicani covalentemente attaccati ad un core protein (B). Le catene di GAG chondroitin sulfate (C) dell'aggrecano sono i responsabili principali della resistenza a compressione della cartilagine.

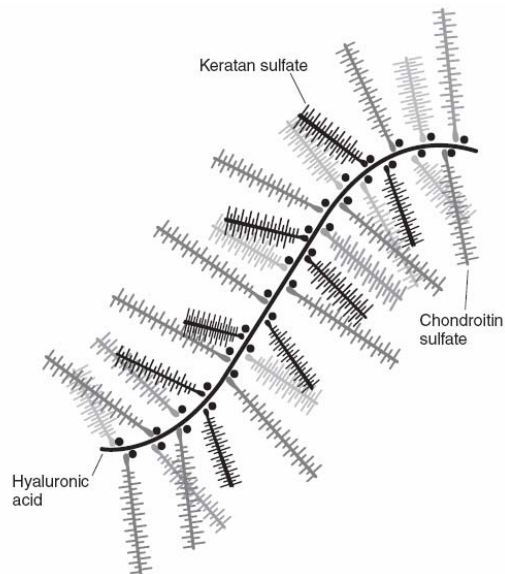


Figura 4 Un aggregato di proteoglicani; vari proteoglicani sono legati ad una catena di acido ialuronico.

Le molecole di aggregano se aggregate (**figura 4**) possono formare complessi macromolecolari di $(300-400) \cdot 10^6$ Da e danno il maggior contributo alle proprietà fisicochimiche e meccaniche della cartilagine articolare. L'aggregano ha una massa di $(1-4) \cdot 10^6$ Da e consiste di un esteso core di proteine (220000-250000 Da) con attaccati fino a 50 catene di keratan solfato e 100 di condroitin solfato.

La cartilagine articolare contiene altri piccoli proteoglicani che portano una catena di dermatan solfato e sono noti con il termine di biglicani e decorine, diversamente dall'aggregano, queste molecole non influiscono sulle proprietà fisiche del tessuto, ma sembrano giocare un ruolo nella funzione delle cellule e nell'organizzazione della matrice di collagene.

Proteine non collaginee

In contrasto con i proteoglicani, le glicoproteine hanno solo un piccolo ammontare di oligosaccaridi associati con il core di proteine.

Questi polipeptidi aiutano a stabilizzare l' ECM ed intervengono nell'interazione tra matrice e condrociti. Sia l'ancorina CII che le proteine oligomeriche della cartilagine ancorano i condrociti alla matrice circostante.

Altre proteine non collaginee comunemente trovate in molti tessuti, come la fibronectina e la tenascina, sono anche osservate nella cartilagine articolare e sono credute avere funzioni simili alle glicoproteine.

Fluido del tessuto

Il fluido del tessuto è una parte essenziale della cartilagine ialina comprendendo fino all'80% del peso umido del tessuto. Oltre all'acqua, il fluido contiene gas metaboliti e una grande quantità di cationi per bilanciare le cariche negative dei GAG nell' ECM.

Inoltre l'esistenza di questo fluido insieme al liquido sinoviale provvede ai nutrienti e all'ossigeno della cartilagine avascolare che infatti è nutrita per diffusione di questi fluidi, il carico intermittente determina un'azione di pompaggio che permette la penetrazione dei nutrienti negli strati profondi e la rimozione dei cataboliti.

Inoltre l'intrappolamento di questo fluido sebbene interagisca con i componenti dell'ECM permette al tessuto di resistere alla compressione e di ritornare alla forma iniziale dopo la deformazione.

Organizzazione in zone

La cartilagine articolare è costituita principalmente da cartilagine ialina la quale è organizzata in quattro zone in base alle differenze nella morfologia e biochimica della matrice (**figura 5**):

1. strato superficiale o tangenziale
2. strato di transizione o mediano
3. strato radiale o profondo
4. zona calcificata

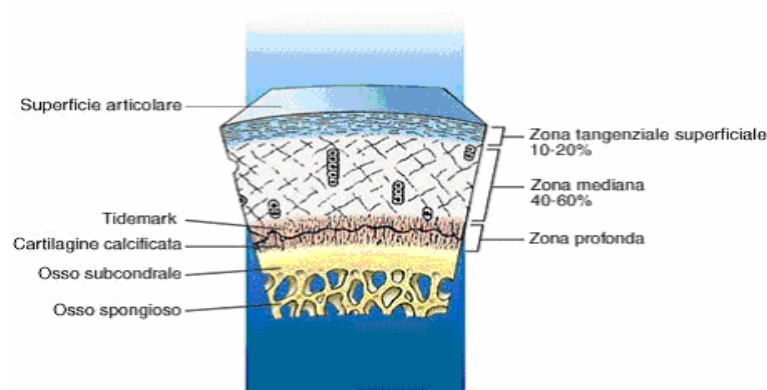


Figura 5 Organizzazione in zone della cartilagine articolare.

La zona superficiale di scivolamento è profonda 40 μm , è la più sottile tra le quattro, ed è fatta da due parti distinte. Una acellulare composta da fibrille collagene che coprono l'articolazione, orientate tangenzialmente e il cui strato "corazza" presenta dei pori che permettono l'ingresso di molte molecole del fluido sinoviale, escluse le proteine e l'acido ialuronico perché troppo grandi. Più profondo rispetto a questo si trova l'altro strato composto da condrociti allungati con asse maggiore parallelo alla superficie articolare circondati dalla matrice pericellulare. L'ECM in questa zona ha più collagene e meno proteoglicani rispetto alle altre zone, e presenta inoltre una grande quantità di acqua e fibronectina, questa combinazione di molecole impartisce più forza tensile (tensile strength) a quest'area della matrice il che è utile per la resistenza a shear della superficie articolare, tale zona è anche importante per la forza di compressione.

La zona di transizione ha uno spessore 250 μm e in essa le cellule sono più attive, dal punto di vista metabolico, rispetto alle superficiali.

Sono sferiche e contengono organelli sintetici come reticolo endoplasmatico, apparato di Golgi e mitocondri. L'ECM ha fibre collagene più grandi e orientate obliquamente alla superficie ha più proteoglicani e meno acqua e collagene rispetto alle zone precedenti.

La zona profonda è la più grande, circa 500 μm , e ha fibrille di collagene con il diametro maggiore ha molti proteoglicani e il minimo contenuto d'acqua. Le cellule sono rotonde come nella zona di transizione ma poste in colonne perpendicolari alla superficie dell'articolazione, inoltre mostrano alta attività di sintesi, 10 volte quella dei condrociti della zona superficiale. Inoltre l'orientazione delle fibre collagene cambia di nuovo, sono verticali e si approfondano, attraverso la zona calcificata sottostante, fino all'osso subcondrale per garantirne l'ancoraggio e i proteoglicani sono strettamente associati con le fibre collagene e aggregati su colonne di acido ialuronico.

La zona di cartilagine calcificata è molto sottile e si trova vicino all'osso subcondrale e agisce come transizione dalla soffice cartilagine ialina all'osso. In quest'area possono essere prodotti significanti stress di taglio dovuti all'interfaccia tra la cartilagine soffice e l'osso molto più duro.

I condrociti qui sono più piccoli inoltre alcuni di essi sembrano essere completamente circondati da ECM calcificata il che indica che hanno pochissima attività metabolica.

Le transizioni tra le zone I e II e specialmente tra la II e la III non presentano dei limiti definiti ma piuttosto graduali cambiamenti in struttura e composizione. Anche la densità cellulare mostra notevoli variazioni a seconda della profondità dello strato, risultando più elevata nella zona I e diminuendo progressivamente nelle zone dalla II alla IV. I condrociti della parte più centrale sono sferici ed ovoidali e sono distribuiti in gruppi detti

gruppi isogeni o nidi mentre verso la periferia essi diventano progressivamente appiattiti e perdono la loro distribuzione in gruppi, così che nella zona immediatamente sub pericondrale essi hanno aspetto fibroblastoide e capsula poco o affatto evidente.

Lesioni della cartilagine articolare

E' dimostrato che, per le sue caratteristiche, la CA danneggiata esprime potenzialità di guarigione molto limitate perché non possiede né vascolarizzazione né drenaggio linfatico; i condrociti, la cui funzione è di produrre i componenti della matrice e gli enzimi che la degradano, circondati da matrice extracellulare, sono al riparo dal riconoscimento immunologico e privi di collegamenti nervosi. L'attività metabolica del condrocita maturo si svolge con un consumo di O₂ molto basso e pertanto predomina il metabolismo glicolitico anaerobico. Lesioni limitate alla CA senza penetrazione nell'osso subcondrale stimolano solo un'esigua reazione nei condrociti adiacenti, la risposta cicatriziale infiammatoria non avviene sulla superficie articolare danneggiata se non è interessato l'osso subcondrale. Il completo ripristino della CA ialina e dell'osso subcondrale è osservato raramente e nessun trattamento tra quelli chirurgici proposti a - restaurare - rimpiazzare - aiutare - incastonare - i condrociti è stato ancora dimostrato essere ottimale a indurre la formazione di tessuti che duplichino struttura, composizione, proprietà meccaniche e durata della CA.

Comportamento meccanico

La matrice conferisce due proprietà fondamentali al tessuto: resistenza tensile ed elasticità.

Queste proprietà sono attribuibili alle catene di collagene di tipo II ed ai proteoglicani solforati di tipo IV caratteristici della cartilagine. Nella matrice i proteoglicani di tipo IV si legano con l'acido ialuronico e con le proteine "di legame" per formare aggregati sopramolecolari funzionali. La sintesi di collagene di tipo II e proteoglicani specifici è probabilmente regolata da gruppi di geni strutturali che differiscono da quelli attivi in altre cellule di tessuto connettivo e non connettivo.

Il contenuto in acqua della matrice extracellulare è molto importante. L'acqua definisce il volume del tessuto stesso ed, "intrappolata" dai proteoglicani, offre resistenza alle compressioni.

In seguito a carico si viene a verificare, infatti, una complessa distribuzione di forze di trazione e compressione che provocano deformazioni della matrice cartilaginea e l'espulsione di acqua e di prodotti metabolici con l'aumento della concentrazione ionica all'interno del fluido interstiziale. Il movimento dell'acqua è correlato alla forza ed alla

durata della compressione ed è ritardato dalle cariche negative esercitate dai proteoglicani. In concomitanza ed a seguito della deformazione del tessuto i proteoglicani vengono compressi aumentando la densità della carica negativa e le forze repulsive intermolecolari che d'altro canto aumentano la resistenza del tessuto a successive sollecitazioni. In soluzione la mutua repulsione di queste cariche negative fa sì che i proteoglicani si respingano occupando un elevato volume.

Nella matrice di cartilagine lo spazio occupato dai proteoglicani aggregati è limitato dall'impalcatura di collagene. L'ingrossamento delle molecole aggregate contro l'impalcatura di collagene è un elemento essenziale nella risposta meccanica della cartilagine. Quando la cartilagine è compressa i siti caricati negativamente sull'aggregato sono spinti ad avvicinarsi, ciò incrementa la loro mutua forza repulsiva e aumenta la resistenza a compressione della cartilagine. Proteoglicani non aggregati non sarebbero così efficaci nel resistere a carichi di compressione, poiché non sarebbero così facilmente trattenuti nella matrice di collagene.

In definitiva, la deformazione raggiunge un equilibrio nel quale la forza esterna è controbilanciata dalle forze interne che si basano sulla pressione di rigonfiamento (proteoglicani - interazioni ioniche) e stress meccanici (proteoglicani - interazioni col collagene).

Come la forza viene rimossa il tessuto riacquista la sua forma originale imbibendosi d'acqua e nutrienti provenienti dai fluidi circostanti. La forma "scarica" del tessuto è raggiunta quando la pressione di rigonfiamento dei proteoglicani è nuovamente bilanciata dalla resistenza fornita dal collagene ad una successiva espansione.

Quindi, le proprietà biomeccaniche della cartilagine articolare nel sopportare la compressione dipendono dall'integrità del tessuto stesso che a sua volta è conseguenza della composizione della "fase solida" costituita dai proteoglicani dal collagene e dai condrociti, dall'idratazione del tessuto e dalla composizione ionica della "fase solubile" composta da acqua ed elettroliti.

Per questo, la biomeccanica della cartilagine è ben spiegata quando questo tessuto viene indicato come un materiale bifasico, composto cioè da una parte solida costituita da proteoglicani, collagene, cellule, e lipidi e da una parte liquida rappresentata dai fluidi interstiziali liberi di muoversi attraverso la matrice e la sua risposta biomeccanica ai diversi stimoli fisiologici avviene attraverso la compartecipazione di entrambe le fasi. Si può comunque semplificare, affermando che le forze di tipo compressivo sono supportate dalla componente fluida del tessuto, attraverso la sua bassissima permeabilità, che permette una lenta fuoriuscita dell'acqua, che è incomprimibile. Applicando una compressione costante al tessuto cartilagineo, si ottiene infatti una lenta fuoriuscita di

liquido, fino allo stato dell'equilibrio. In questa fase di equilibrio, la risposta biomeccanica è data non più dalla fase liquida, ma da quella solida. Questo stato in realtà, in condizioni fisiologiche, non si raggiunge mai, per il continuo movimento delle articolazioni, costante anche durante il sonno. Se consideriamo invece le pure forze di taglio, in questo caso è unicamente la componente solida della matrice extracellulare che permette la risposta biomeccanica del tessuto allo stimolo.

Proprietà meccaniche della cartilagine articolare

Uno dei metodi comunemente usati per determinare le proprietà meccaniche della cartilagine è un test di compressione confinata (**figura 6**).

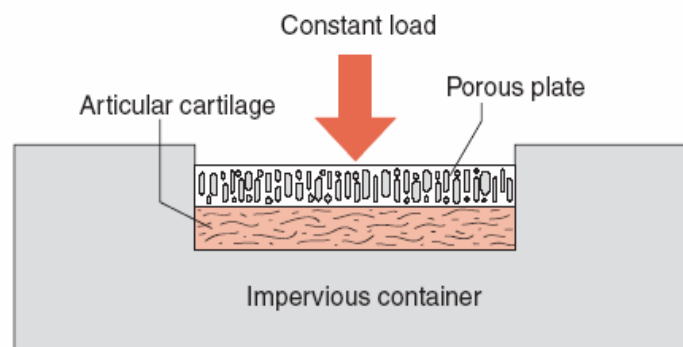


Figura 6 Disegno schematico di un apparato usato per sottoporre la cartilagine ad un test di compressione confinata. Il tessuto è caricato attraverso un piatto poroso. Nella configurazione mostrata, il carico è costante durante il test.

Un disco di tessuto è prelevato dall'articolazione e posto in un pozzetto impermeabile. La compressione confinata è usata sia per un'esperimento di creep che di rilassamento.

Nell'esperimento di creep un carico costante è applicato alla cartilagine attraverso un setto poroso e lo spostamento del tessuto è calcolato come una funzione del tempo.

Nell'esperimento di rilassamento uno spostamento costante è applicato al tessuto ed è misurata la forza necessaria a mantenere tale spostamento.

Nell'esperimento di creep, la cartilagine si deforma sotto un carico costante, ma la deformazione non è istantanea, come accadrebbe in un materiale a singola fase elastica, come una molla.

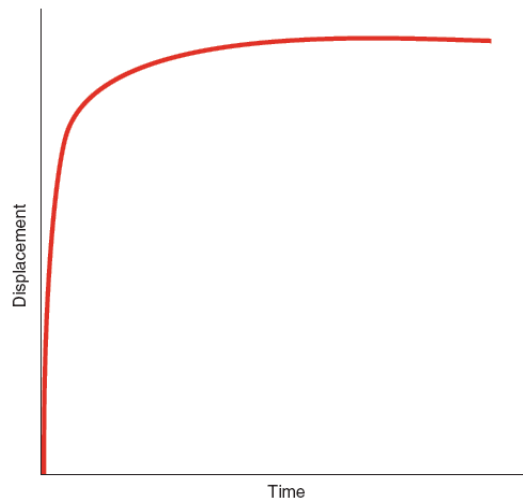


Figura 7 Tipico andamento dello spostamento della cartilagine testata in una prova di compressione confinata un carico costante è applicato alla cartilagine e lo spostamento è misurato nel tempo. Inizialmente, la deformazione è rapida, poiché un'elevata quantità di fluidi escono fuori dal tessuto, quando lo spostamento raggiunge un valore costante, il flusso rallenta e tende a zero.

Lo spostamento della cartilagine è una funzione del tempo poiché il fluido non può uscire dalla matrice istantaneamente (**figura 7**). Inizialmente lo spostamento è rapido, ciò corrisponde ad un elevato flusso di fluido fuori dalla cartilagine. Quando la velocità di spostamento diminuisce e lo spostamento si avvicina ad un valore costante il flusso di fluido, analogamente, rallenta; all'equilibrio lo spostamento è costante e il flusso di fluido si è fermato. In genere ci vogliono centinaia di secondi per raggiungere l'equilibrio dello spostamento.

Dal fitting degli spostamenti misurati con il modello matematico bifasico, sono determinate due proprietà della cartilagine: il modulo aggregato e la permeabilità.

Il modulo aggregato è una misura della rigidità del tessuto all'equilibrio quando tutto il flusso di fluido è cessato. Quanto più è alto il modulo meno il tessuto si deforma sotto un dato carico. Il modulo aggregato della cartilagine è tipicamente compreso tra 0,5 e 0,9 Mpa, utilizzando poi un valore rappresentativo del coefficiente di Poisson si ricava che il modulo di Young della cartilagine è compreso tra 0,45 e 0,80 Mpa. Dal momento che il modulo di Young dell'acciaio è di 200 Gpa e per molti tipi di legno è circa 10 GPa, è chiaro che la cartilagine ha una rigidità molto minore di molti materiali ingegneristici.

Permeabilità

Oltre al modulo aggregato, anche la permeabilità della cartilagine è determinata con un test di compressione confinata. La permeabilità indica la resistenza al flusso di fluido attraverso la matrice della cartilagine, studi sulla permeabilità hanno dimostrato che

l'acqua è capace di fluire attraverso la matrice solida porosa della cartilagine sotto un gradiente di pressione imposto. La velocità media v del fluido attraverso il campione è proporzionale al gradiente di pressione ∇p , la costante di proporzionalità è la permeabilità k , la relazione è espressa dalla legge di Darcy $v=k\nabla p$.

I risultati degli esperimenti mostrano che la permeabilità della cartilagine varia tra 10^{-15} e 10^{-16} $m^4/N*s$ e non è costante attraverso il tessuto infatti è più alta vicino alla superficie dell'articolazione (rendendo il flusso di fluido relativamente semplice) e più bassa nella zona profonda (rendendo il flusso di fluido più difficile).

La permeabilità varia anche con la deformazione del tessuto. Quando la cartilagine è compressa la sua permeabilità diminuisce. Perciò, quando l'articolazione è caricata, molto del fluido che attraversa la superficie articolare viene dalla cartilagine più vicina alla superficie dell'articolazione. Sotto carichi crescenti il flusso del fluido diminuirà a causa del decremento di permeabilità che accompagna la compressione. La dipendenza della permeabilità dalla deformazione potrebbe essere un meccanismo molto utile per sostenere il carico dividendolo tra la fase fluida e quella solida della cartilagine. Se il fluido fluisse facilmente fuori dal tessuto, poi la matrice solida supporterebbe l'intera sollecitazione di contatto e sotto questo sforzo aumentato sarebbe più incline alla rottura. Lo studio delle proprietà tensili della cartilagine chiarisce la sua anisotropia, inomogeneità alcuni sorprendenti cambiamenti dovuti all'età ed ulteriori interazioni collagene-proteoglicani. I test tensili della cartilagine sono fatti rimuovendo dapprima la cartilagine dall'osso sottostante ottenendo un foglio di cartilagine che talvolta è tagliato in sottili fettine (200-500 μ di spessore) parallele alla superficie della cartilagine usando un microtomo. Uno studio particolarmente completo delle proprietà tensili della cartilagine mostra che i campioni orientati paralleli alla linea di separazione hanno una resistenza alla trazione ed una rigidità più bassa di quelli perpendicolari alla linea di separazione.

L'influenza relativa del network di collagene e dei proteoglicani sul comportamento a trazione della cartilagine dipende dalla velocità di carico. Quando è tirata a bassa velocità il collagene da solo è responsabile per la resistenza a trazione e rigidità della cartilagine. Ad alte velocità di carico l'interazione del collagene e dei proteoglicani è responsabile per il comportamento a trazione; i proteoglicani impediscono la rotazione delle fibre di collagene quando il tessuto è caricato rapidamente.

Relazione tra le proprietà meccaniche e composizione

Oltre a queste descrizioni qualitative, sono stati stabilite relazioni quantitative tra le proprietà meccaniche della cartilagine e il contenuto di glicosaminoglicani collagene e acqua.

La resistenza alla compressione della cartilagine aumenta come una funzione del contenuto totale di glicosaminoglicani (**figura 8**) in contrasto non c'è relazione tra la resistenza a compressione e il contenuto di collagene. In questi casi la resistenza a compressione è misurata in creep, 2 secondi dopo che un carico è applicato al tessuto. La permeabilità e la resistenza a compressione quando calcolate dal modulo totale sono entrambe altamente correlate con il contenuto d'acqua. Quando il contenuto d'acqua aumenta la cartilagine diventa meno dura e più permeabile (**figura 9, 10**). Appare evidente che la conoscenza delle proprietà meccaniche è necessaria per alcune analisi di stress del tessuto cartilagineo, esse comunque non danno alcuna indicazione sul fallimento della cartilagine. Infatti, ad esempio, la semplice conoscenza del valore del modulo o del coefficiente di Poisson non è sufficiente a predire se la cartilagine svilupperà cracks, crepe e il danneggiamento generale caratteristico dell'osteoartrosi.

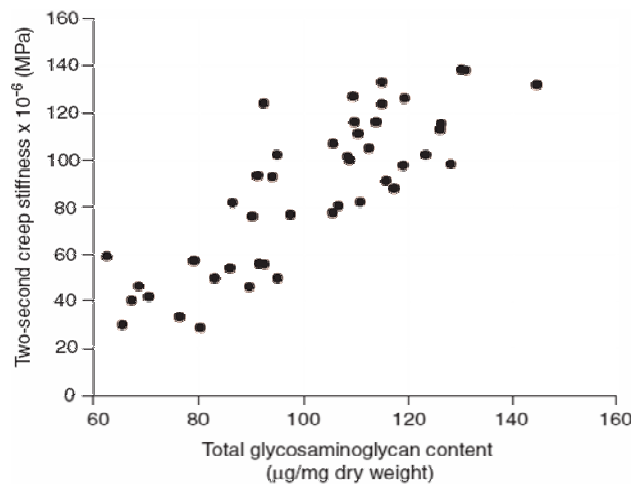


Figura 8 correlazione tra rigidità a compressione e la concentrazione totale di glicosamminoglicani

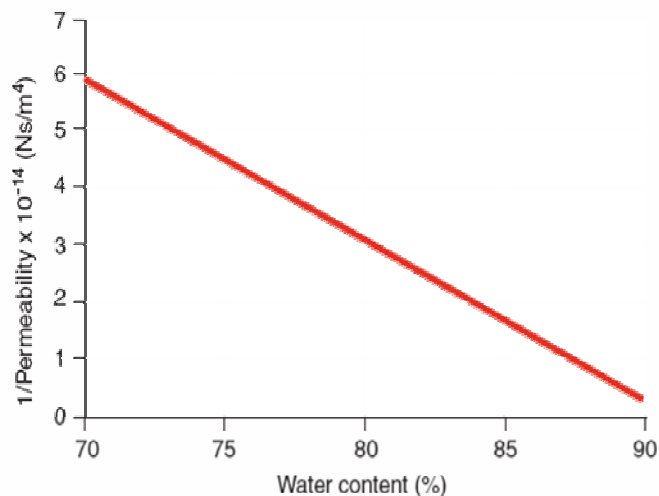


Figura 9 Correlazione tra l'inverso della permeabilità e il contenuto di acqua nella cartilagine

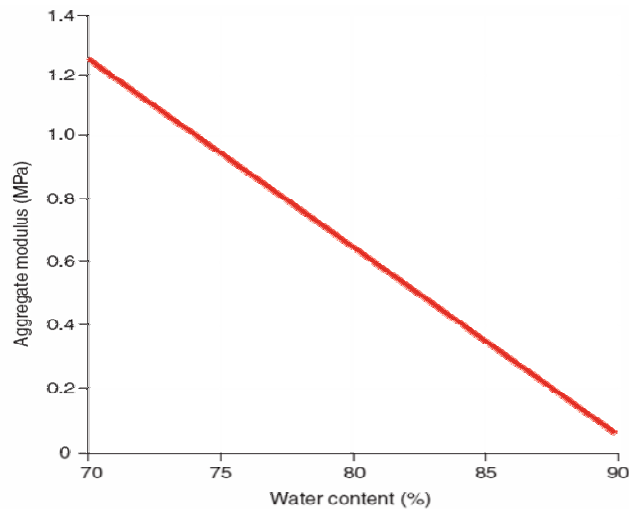


Figura 10 correlazione del modulo aggregato con il contenuto d'acqua della cartilagine articolare. Quando il contenuto d'acqua aumenta, il modulo aggregato diminuisce.

1.3. Stato dell'arte

Studi recenti suggeriscono che ci sono diversi meccanismi regolatori attraverso i quali i condrociti rispondono alle sollecitazioni meccaniche, incluso regolazioni al trasporto di molecole segnale che impattano direttamente sulle fasi trascrizionali, traduzionali, post-traduzionali e meccanismi di comunicazione cellula – materiale che inducono assembly e degradazione della ECM. Negli ultimi 10-20 anni una crescente attenzione è stata rivolta verso gli effetti che stimolazioni esterne (meccaniche e chimiche) possono avere sul rimodellamento di tessuti soffici, duri, epiteliali e muscoli. Purtroppo per la natura specifica dei tessuti viene meno la possibilità di potere definire una teoria unica e generale che sia in grado di descrivere e prevedere il comportamento dei vari tessuti nella loro totalità. Per questo si focalizzerà l'attenzione sulla cartilagine articolare. Tale tessuto è soggetto ad un ampio range di sollecitazioni statiche e dinamiche durante le normali attività di vita quotidiana. Si stima che i valori massimi che tale tessuto subisce sono dell'ordine dei 10-20 MPa a cui corrispondono deformazioni di compressione di circa 15-45%. La capacità di resistere a tali carichi dipende dalla integrità e dalla funzionalità della ECM, viceversa i condrociti hanno bisogno di tali stimolazioni esterne per potere modellare la ECM. È accettato e consolidato oggi che la stimolazione meccanica impatta direttamente sul microambiente dei condrociti andando a modificare le fasi di sintesi e degradazione di nuova matrice. Comunque il meccanismo preciso su come tali segnali vengono trasferiti non è ancora chiaro. È noto che la stimolazione meccanica regola sia la quantità, sia la qualità del tessuto formato.

I meccanismi attraverso i quali i condrociti rispondono a stimoli meccanici sono difficili da studiare in vivo. Come risultato modelli in vivo come espianti di cartilagine o costrutti (cellule + gel polimerici) sono stati ampiamente utilizzati per due motivi:

- Sono sistemi che preservano ed emulano la struttura della cartilagine nativa permettendo correlazioni quantitative tra stimolazioni meccaniche e parametri biologici.
- In tali sistemi è possibile preservare l'interazione cellula – matrice e l'espressione genica.

Espianti di cartilagine geometricamente definiti possono attingere valori stazionari di metabolismo permettendo di studiare le perturbazioni indotte da stimoli esterni³. L'applicazione di compressione meccaniche dirette su espianti di cartilagine è giustificata dal fatto che tale tessuto è sottoposto a sollecitazioni cicliche giornaliere: la risposta metabolica a carichi meccanici mostra le seguenti caratteristiche:

- Compressione statica inibisce la biosintesi.
- Compressione dinamica aumenta la produzione di tessuto.

La risposta alla compressione dinamica dipende dalla frequenza e dalla ampiezza della sollecitazione. Ad esempio la biosintesi di ECM di espianti sottoposti a piccole deformazioni e basse frequenze (< 0.001 Hz) non è influenzata, mentre gli stessi espianti mostrano una sovrapproduzione di componenti della ECM se la frequenza varia tra 0.1 e 1 Hz^{2,4,5}.

Diversi meccanismi biofisici possono regolare la risposta metabolica dei condrociti in regime dinamico e statico. La compressione statica induce una riduzione della dimensione media dei pori per cui ne risulta un trasporto di soluti ostacolato², variazioni in microambiente locale via effetto Donnan^{7,8-10}, e alterazione della struttura del nucleo della cellula¹¹⁻¹³. Applicando l'elaborazione di immagini di Normasky, attraverso l'utilizzo di tecniche di microscopia confocale, è stato trovato che le deformazioni macroscopiche applicate ad espianti di cartilagine si trasmettono alla matrice pericellulare, territoriale e interterritoriale: tale osservazione è congruente con il fatto che il modulo della cartilagine è 1000 volte più grande del modulo elastico della cellula per cui la deformazione viene completamente trasferita alla cellula (**figura 11**).

Uno dei metodi molto utilizzati nello studio dei fenomeni che avvengono durante la stimolazione meccanica è quello della modellazione matematica della cartilagine. Tale modellazione che appartiene alla teoria dei sistemi multi-fasici²⁹, si pone l'obiettivo di

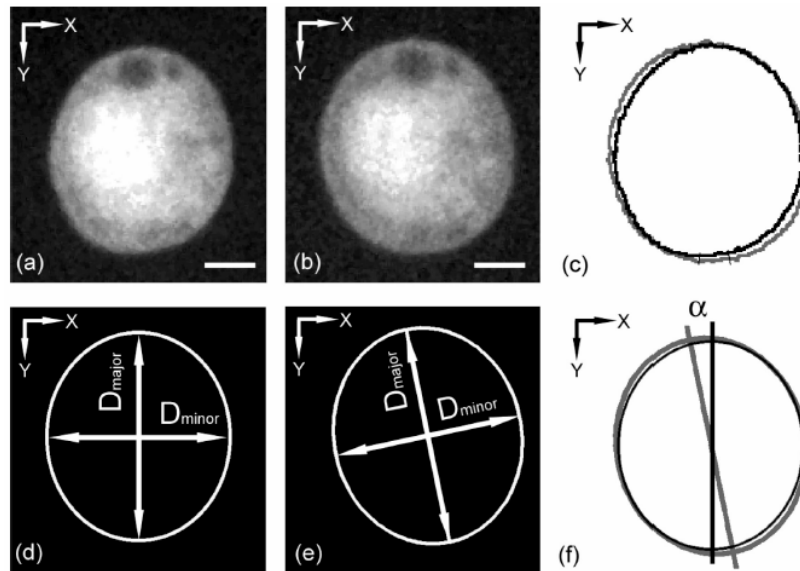


Figura 11: condrociti sottoposti a deformazione di taglio¹³. (a): deformazione nulla, (b):deformazione del 5%.

interpretare il comportamento meccanico dei tessuti soffici in modo da trovare delle correlazioni tra le proprietà del tessuto, gli stimoli esterni e l'attività bio - sintetica dei condrociti. Studi sperimentali hanno dimostrato che durante la compressione il tessuto cartilagineo è sottoposto a gradienti di pressione idrostatica, flusso di fluidi, *streaming potentials* e *streaming currents*^{15,16} (**figura 12**). Ognuno di questi stimoli meccanici fisici ed elettrici ha influenza sul metabolismo cellulare.

Questa fenomenologia è stata formalizzata in equazioni costitutive e modelli che sono in grado di prevedere le distribuzioni dei fluidi, correnti elettriche e potenziali, deformazioni in tessuti o costrutti e hanno permesso la correlazione (anche se ancora qualitativa) tra stimolazioni esterne e attività biosintetica (**v. capitolo 2-3**).

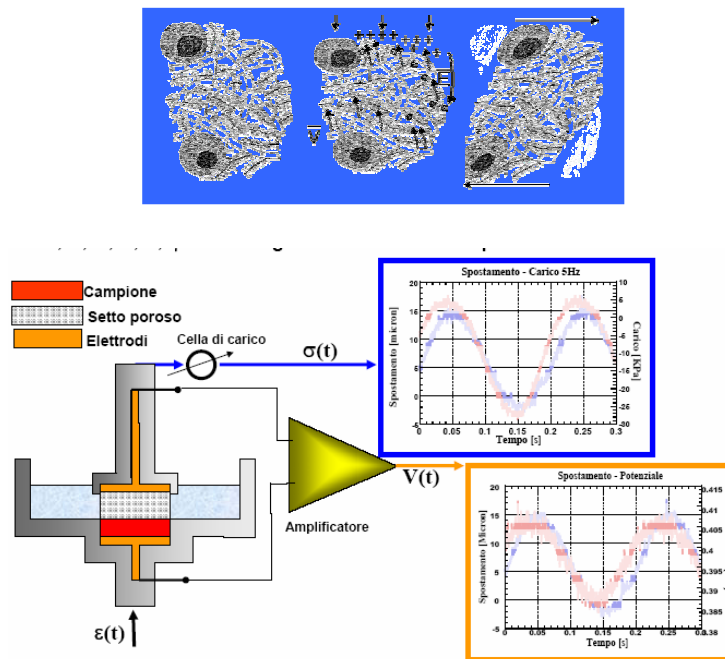


Figura 12. Determinazione delle proprietà meccaniche e di trasporto di tessuti connettivi.

Se il trasporto convettivo è uno stimolante metabolico operativo, esso potrebbe agire come:

- Stimolando direttamente i condrociti attraverso flussi di shear sulle pareti cellulari;
- Alterando la concentrazione di soluti e molecole segnale a livello pericellulare.

Choen et al. e O' Hara et al., Garcia et al.¹⁷⁻¹⁸ studiando gli effetti di stimolazioni meccaniche statiche e dinamiche sulla ripartizione ed il trasporto di IGF-1, uera, glucosio e BSA, hanno concluso che la compressione statica inibisce il trasporto mentre quella dinamica ne aumenta l'efficienza rispetto alla diffusione passiva. Le implicazioni di questi studi furono ulteriormente studiati da Bonnasar et al¹⁹ il quale trovò che una concentrazione di 300ng/ml di IGF-1, aumentava la sintesi di proteine del 90%; una compressione dinamica senza fattore ne aumentava la sintesi del 40%. La combinazione dei due stimoli ne aumentava la sintesi del 180% (**figura 13**).

Tale risultato ha permesso di capire che la stimolazione meccanica stimola l'attività biosintetica attraverso due meccanismi indipendenti: sia stimolando direttamente la cellula con forze di shear sia aumentando l'efficienza al trasporto dei fattori di crescita. Studi recenti hanno investigato anche l'effetto delle stimolazioni meccaniche sull'espressione genica dei condrociti. Ad esempio una pressione statica e intermittente

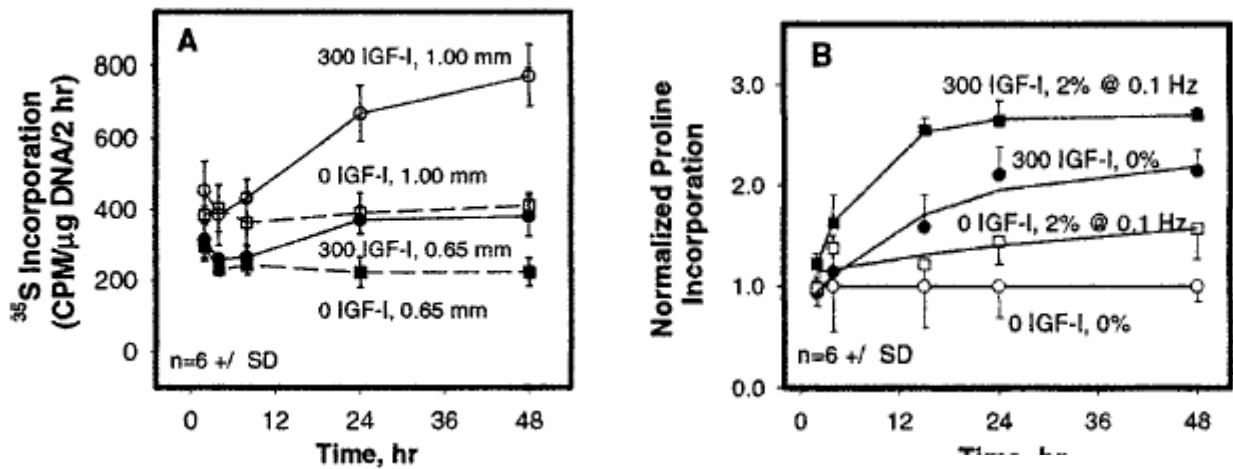


Figura 12 Effetti combinati di stimolazione meccanica e biochimica su espianti di cartilagine

su culture 2D di condrociti, aumenta l'espressione del TGF- β , così come l'm-RNA degli aggregani e del collagene tipo II; una forza di shear costante stimola l'espressione dell'm-RNA per gli MMPS-1. Sfortunatamente spesso le cellule hanno comportamenti diversi a seconda che esse vengano coltivate in 2D o 3D. Per quanto riguarda colture 3D, ci sono informazioni limitate sull'effetto degli stimoli meccanici sulla espressione genica dei condrociti. Uno studio ha riportato che un crico costante di 0.1 MPa, applicato per 1h può aumentare i livelli di m-RNA per gli aggregani. Ragan et al.²⁰⁻²¹, hanno dimostrato che il livello di m-RNA aumenta durante una compressione statica, mentre la biosintesi diminuisce (**figura 14**) stando ad indicare che l'effetto che si ha sulla fase trascrizionale è diverso da quello che ottiene nella fase traduzionale.

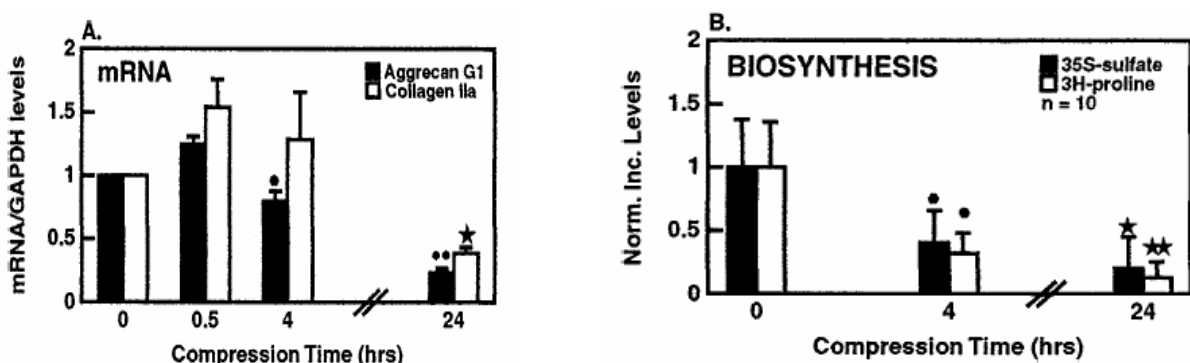


Figura 13 Effetti di stimolazione meccanica sulla fase traduzionale (A) e sulla fase trascrizione (B) di condrociti.

1.4. Obiettivi.

L'attenzione su cui si pone questo lavoro riguarda le problematiche relative al processo di bioibridi. Lo stato della ricerca attualmente è caratterizzato da una moltitudine di informazioni riguardanti la risposta della cellula a stimoli esterni e dal ruolo giocato dal materiale (scaffold) nel modulare la risposta cellulare. Infatti è ormai noto che la rigenerazione della cartilagine articolare, dei tessuti in generale, non può prescindere da opportune condizioni di processo (stimolazioni meccaniche, fluido-dinamiche). Inoltre le condizioni di processo ottimali per una data popolazione cellulare ospitata in materiale variano significativamente con le proprietà dello scaffold. Pertanto il processo di un tessuto in seno ad un materiale di supporto deve essere visto come un doppio processo:

- Processo del materiale: produrre un materiale capace di garantire il mantenimento del fenotipo della popolazione cellulare; mantenimento del microambiente fisiologico in termini di idratazione e proprietà di trasporto; opportune proprietà meccaniche e di comunicazione cellula-materiale. Il materiale di supporto deve cioè assicurare il trasferimento delle sollecitazioni esterne alle cellule in modo tale che queste ultime possano essere capaci di tradurre tali stimoli in informazioni biosintetiche.
- Bioreattore: tale strumento deve fornire le condizioni di processo ottimali per quella popolazione cellulare e per quel tipo di materiale. I bioreattori sono sistemi in grado di fornire al costruito sollecitazioni quali: compressione, tensione, taglio (statico e/o dinamico), perfusione, flusso di shear. L'entità di tali sollecitazioni devono essere modulate in base alle proprietà macroscopiche iniziali dello scaffold. Inoltre il bioreattore deve essere in grado di riconoscere l'evoluzione del tessuto ed aggiornare i parametri di input in base al fabbisogno "attuale" delle cellule. Infatti cambiando le proprietà macroscopiche del costruito, è come se le cellule si venissero a trovare durante il processo in materiale sempre diverso per il quale i parametri di input sono di volta in volta diversi.

Il processo di un tessuto, quindi ad oggi, non è ancora ottimizzato dal punto di vista di produzione in larga scala dello stesso. Per produzione in larga scala si intende produrre un bene in condizione controllate, per il quale esistono delle teorie che descrivono il fenomeno fisico e tali teorie possono essere implementate in modelli matematici i quali a loro volta servono per dimensionare impianti e processi. Per i tessuti esiste oggi "solo" una banca dati di informazioni dovute ad esperienze "trial and error". Esistono oggi dei modelli che riescono a descrivere i fenomeni meccanici e biosintetici, ma sono ancora separati tra loro. Invece dalle esperienze che si hanno sulle risposte cellulari si intuisce

che un tessuto o un costruito deve essere visto come un sistema nel quale tutti i fenomeni sono accoppiati. Si può intuire questo attraverso un ragionamento molto semplice.

Una deformazione meccanica su un tessuto induce allo stesso oltre che un stato di stress anche un moto di fluidi. La cellula sente la deformazione imposta attraverso due meccanismi. Il primo riguarda la presenza di una onda meccanica che la cellula riesce a sentire grazie ad alcuni sensori che sono presenti sulla sua membrana. L'onda meccanica quindi attiva una cascata di eventi che sono legati a tale causa che si traducono in una deformazione del nucleo. Il nucleo deformato ha una attività biosintetica diversa da un nucleo non deformato. Il secondo meccanismo ha effetti sul microambiente metabolico sul quale si affaccia la cellula. Una deformazione meccanica induce un movimento di fluidi il quale attiva una serie di meccanismi contemporaneamente. Si induce un movimento convettivo di sostanze disciolte nei fluidi interstiziali il quale induce uno sbilanciamento di ioni che si traduce in correnti elettriche e differenze di potenziale. Inoltre si crea un flusso convettivo di nutrienti, metaboliti e prodotti di scarto che sbilanciano gli equilibri locali ed inducono una variazione della attività metabolica.

D'altro canto anche se non ci sono particolari stimoli esterni, l'attività biosintetica delle cellule essendo finalizzata alla produzione di neo tessuto, induce una variazione dell'ambiente circostante. Per effetto di questa variazione si ha che il materiale che ospita le cellule, durante l'evolversi del tempo, cambia le sue proprietà per cui può accadere che le condizioni di processo ritenute ottimali all'inizio del processo possono non essere più adeguate. Si evince che una teoria che descriva la meccanica del tessuto non è idonea in quanto non tiene conto del trasporto e della biosintesi. Così come una teoria che tiene conto solo del trasporto non è esaustiva e la stessa cosa vale per una teoria che descrive solo la biosintesi. Pertanto gli obiettivi che si pone questo lavoro riguardano principalmente la necessità di sviluppare modelli unici che nella totalità riescono ad accoppiare i fenomeni principali che stanno alla base della rigenerazione dei tessuti. Tali obiettivi possono essere riassunti come segue:

- **Trasporto molecolare attivato meccanicamente:** in questa fase si prende in considerazione il modello multifasico che viene utilizzato per modellare il comportamento meccanico dei gel e dei mezzi porosi. Tale modello viene estensivamente utilizzato nella sua forma bifasica per la determinazione di alcuni parametri fisici del materiale. In questo lavoro si prende in considerazione la teoria tri-fasica, dove il materiale è composto da tre fasi: solido, liquido, soluto. Interrogando il sistema con un a deformazione meccanica ciclica, si studierà l'effetto della frequenza e

dell'ampiezza della sollecitazione sulla distribuzione spaziale e temporale dei soluti disciolti nel mezzo.

- **Variazione temporale delle proprietà meccaniche e di trasporto di bio-ibridi cellulari:** si prenderà in considerazione un sistema composto da agarosio-condrociti. In tale materiale i condrociti riescono a sintetizzare matrice cartilaginea in quanto riescono a mantenere il loro fenotipo. Lo scopo è quello di dimostrare che durante il processo coltura statica il materiale subisce delle modificazioni nei valori del modulo elastico della conducibilità idraulica e del coefficiente di diffusione. Si mostrerà che tali variazioni dipendono direttamente dai componenti della matrice extracellulare.

Capitolo 2

Caratterizzazione di costrutti cellulari

2.1 Introduzione

L'analisi, lo studio e la caratterizzazione di tessuti in crescita necessita di diverse tecniche, appartenenti a discipline scientifiche diverse, per poter comprendere e caratterizzare i fenomeni che regolano la biosintesi di matrice extracellulare de-novo. Si pensi che un tessuto oltre ad essere caratterizzato da un determinato ammontare relativo di proteine ed altri componenti, si diversifica da altri tessuti anche per la sua architettura tridimensionale. Ad esempio se si prende in considerazione il caso della cartilagine, ci sono notevoli differenze tra quella articolare che sopporta carichi di compressione dell'ordine delle 100 - 200 atm., e quella ad esempio del padiglione auricolare che ha una funzione di supporto. Sebbene la composizione biochimica sia sostanzialmente la stessa, la disposizione spaziale dei costituenti fondamentali ne determina la differenza. Per questo motivo spesso non è sufficiente quantificare il tipo e l'ammontare dei costituenti, ma bisogna essere certi che tali costituenti oltre ad essere secreti dalle cellule, vengano assemblati in modo corretto così da conferire le

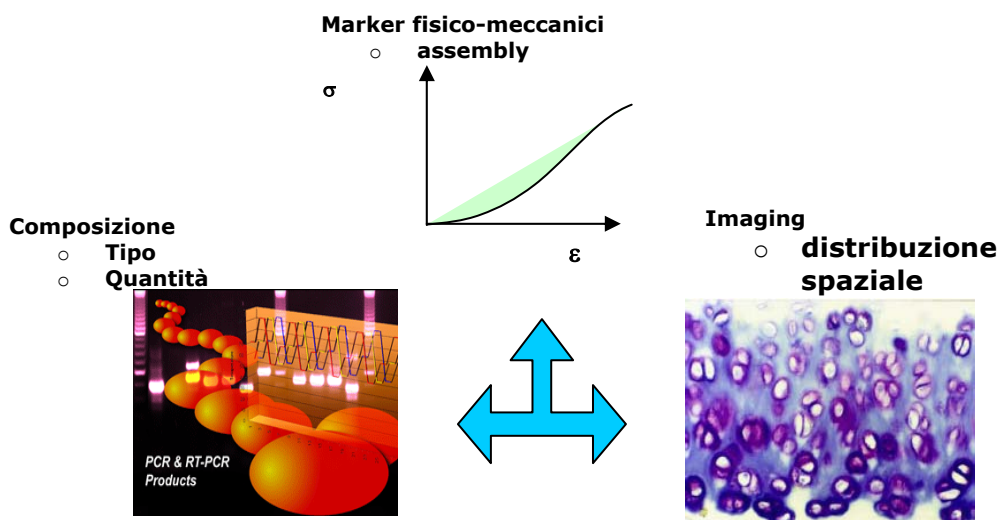


Figura 14 Tecniche di indagine utilizzate in ingegneria.

giuste proprietà meccaniche e di trasporto. Secondo lo schema di **figura 14** , è possibile individuare nella caratterizzazione di bio-ibridi tre diverse macro-aree.

Il settore della ingegneria dei materiali e della ingegneria chimica, interviene nel mettere a punto modelli matematici e tecniche sperimentali che siano in grado di determinare le proprietà fisiche di tessuti e costrutti cellulari. Si sta sentendo già da doversi anni l'esigenza di ampliare quelle che sono le tecniche di indagine sulle proprietà dei materiali in quanto i tessuti ed i costrutti manifestano delle caratteristiche molto diverse e più complesse rispetto agli stessi materiali non-cellularizzati. Si pensi ad esempio al comportamento della cartilagine e di tessuti connettivi molli a compressione, dove intervengono contemporaneamente molteplici fattori: deformazione, pressurizzazione e uscita di fluidi, trasporto molecolare, potenziali elettrici. Si evince che una classica prova di compressione non è in grado di studiare tutti questi fenomeni. Quindi oltre alla messa a punto di metodi, si stanno sviluppando anche nuove teorie che siano in grado di descrivere la totalità dei fenomeni sopra descritti. Un esempio viene introdotto in questo capitolo ed è la teoria multifasica.

Per quanto riguarda le altre due aree si farà un breve cenno a tecniche colorimetriche per la determinazione e quantificazione dei componenti della matrice extracellulare, e ad alcune tecniche di istologia ed immunoistochimica per la analisi spaziale della matrice prodotta.

2.2 Metodi teorici

2.2.1 Teoria multifasica.

La termodinamica delle soluzioni polimeriche è una teoria ben consolidata nello studio degli stati di equilibrio di tali sistemi. Non fornisce però alcuna informazione sull'evoluzione tra due stati di equilibrio quando il gel viene perturbato. L'informazione più importante che emerge dalla teoria di Flory, è che ad ogni configurazione di equilibrio esiste un determinato stato tensionale ed una determinata pressione osmotica della fase fluida. Quest'ultima, nel caso di macromolecole polari, tiene conto anche della distribuzione di ioni. Per questo motivo quando un tessuto viene sottoposto a compressione, si induce una essudazione di fluidi e un gradiente di potenziale elettrico. La risposta meccanica globale è influenzata dall'attrito tra le fasi, dalle proprietà meccaniche del reticolo solido e dalle proprietà fisiche della soluzione (viscosità, concentrazione ecc.). Il modello che descrive tali fenomeni è il modello multifasico . Il gel viene visto come un continuo tridimensionale costituito da più fasi: fase solida (s), fase fluida (f), anioni e cationi (+,-), altri soluti non polari che possono essere disciolti

nella fase fluida (p). Ogni singola fase viene considerata intrinsecamente incompressibile ma, nella sua totalità, il gel è comprimibile. Il fluido è schematizzato come un fluido perfetto per cui il suo tensore degli sforzi è composto solo da una parte isotropa. Tale ipotesi è giustificata dal fatto che gli sforzi viscosi sono trascurabili rispetto alle interazioni tra solido e fluido. La matrice solida può essere modellata come un mezzo ipoelastico, elastico lineare o iperelastico. Potendo altresì avere anche una componente viscoelastica.

Equazioni di bilancio: conservazione della massa e della quantità di moto.

Il mezzo viene considerato istante per istante saturo, la condizione di saturazione è scritta nel modo seguente:

$$\sum_i \phi^i = 1 \quad (1)$$

ϕ^i è la frazione volumetrica della fase i-ema. Nella equazione 1 la sommatoria è estesa a tutti i componenti del sistema matrice.

La conservazione della massa può essere scritta o in funzione della densità o delle frazioni volumetriche:

$$\begin{aligned} \frac{\partial \rho^i}{\partial t} + \underline{\nabla} \cdot (\rho^i \underline{v}^i) &= 0 \\ \frac{\partial \phi^i}{\partial t} + \underline{\nabla} \cdot (\rho^i \underline{v}^i) &= 0 \end{aligned} \quad (2)$$

sommando su tutte le fasi presenti si ottiene il bilancio globale dell'intero sistema:

$$\underline{\nabla} \cdot \underline{v}^s + \sum_{j=f,+,-,p} \underline{\nabla} \cdot (\phi^j (\underline{v}^j - \underline{v}^s)) \quad (3)$$

dove v_i è il campo di velocità della fase i-ema.

Trascurando le forze di inerzia e le forze di massa il bilancio della quantità di moto per la singola fase si scrive nel seguente modo:

$$\underline{\nabla} \cdot \underline{\underline{\sigma}}^i + \pi^i = 0 \quad (4)$$

dove σ_i è il tensore degli sforzi di Cauchy del componente e π_i è il momento di interazione dovuto all'attrito delle altre fasi. Si assume che, per tali sistemi esiste la seguente equazione di bilancio sulle mutue interazioni:

$$\sum_i \pi^i = 0 \quad (5)$$

pertanto il bilancio globale della quantità di moto si scrive:

$$\underline{\nabla} \cdot \underline{\underline{\sigma}}^t = 0 \quad (6)$$

dove il tensore degli sforzi totali è la somma dei tensori degli sforzi dei singoli componenti:

$$\underline{\underline{\sigma}}^t = \sum \underline{\underline{\sigma}}^i \quad (7)$$

In un sistema gel-like, lo stress totale agente in un volume di controllo è dato dalla somma di uno stress dovuto alla matrice solida e da una pressione idrostatica dovuta alla presenza della fase fluida. Tale pressione è la pressione osmotica e come si nota, viene soddisfatto il vincolo termodinamico che vuole stress e pressione osmotica mutuamente accoppiati.

$$\underline{\underline{\sigma}}^t = \underline{\underline{\sigma}}^s - p \underline{I} \quad (8)$$

il bilancio della quantità di moto diventa:

$$\underline{\nabla} \cdot \underline{\underline{\sigma}}^s - \underline{\nabla} p = 0 \quad (9)$$

Un'altra equazione di bilancio deriva dalla termodinamica dei processi irreversibili di non equilibrio. Tale teoria parte dalla considerazione che in una situazione di non equilibrio c'è un gradiente non nullo dei potenziali chimici. Tale gradiente (che è una forza spingente) è uguale alla velocità del componente che sta evolvendo, moltiplicata per un coefficiente di frizione. Tale approccio, come si vedrà più avanti, dà origine alle leggi di Fick, di Darcy e ai fenomeni elettro-cinetici. I coefficienti di frizione saranno visti allora come coefficiente di diffusività, coefficiente di permeabilità, coefficienti di accoppiamento elettromeccanico: streaming potential, flusso elettroosmotico, elettroforesi ecc.

Matematicamente quanto detto viene posto nella seguente forma:

$$-\phi^\beta \underline{\nabla}_0 \mu^\beta = \sum_{\gamma=f,+, -, p} \underline{B}^{\beta\gamma} \cdot \underline{v}^\gamma \quad (10)$$

B è un tensore definito positivo detto tensore di frizione tra la fase β e γ ; per quanto riguarda la velocità, si ragiona in termini di velocità relativa della fase γ rispetto alla matrice solida. I potenziali chimici possono essere scritti nel modo seguente:

$$\begin{aligned} \mu^{f,p} &= \mu_0^{f,p} + RT \ln a^{f,p} + p \\ \mu^{+/-} &= \mu_0^{+/-} + RT \ln a^{+/-} + p + z^{+/-} F \zeta \end{aligned} \quad (11)$$

Dove $f, p, +, -$ sono rispettivamente fase fluida, soluti, ioni positivi e negativi, a è l'attività del componente considerato, ξ il potenziale elettrico, z la valenza dello ione, F la costante di Faraday. Il flusso attraverso la miscela è definito come:

$$\underline{J} = \sum_{\gamma=f,+, -, p} \phi^\gamma \cdot \underline{v}^{\gamma s} \quad (12)$$

la densità di corrente elettrica è definita in modo analogo:

$$\underline{i} = \sum_{\gamma=f,+, -, p} \frac{\phi^\gamma z^\gamma}{\bar{V}^\gamma} \underline{v}^{\gamma s} \quad (13)$$

Esplicitando le 12 e 13 con l'ausilio delle 10 e 11 si ottiene:

$$\begin{aligned} J &= K_{11} \underline{\nabla} p + K_{12} \underline{\nabla} \xi + K_{13} \underline{\nabla} a \\ i &= K_{21} \underline{\nabla} p + K_{22} \underline{\nabla} \xi + K_{23} \underline{\nabla} a \\ J^p &= K_{31} \underline{\nabla} p + K_{32} \underline{\nabla} \xi + K_{33} \underline{\nabla} a \end{aligned} \quad (14)$$

L'attività definita nelle equazioni precedenti è un'attività media che comprende le attività di tutti i componenti in soluzione. I coefficienti di frizione K_{ij} sono rispettivamente il coefficiente di permeabilità, conducibilità elettrica e coefficiente di diffusione globale. Gli altri termini sono detti coefficienti di accoppiamento, e Onsager dimostrò che $K_{ij} = K_{ji}$. Tale modello offre la possibilità di modellare il comportamento meccanico dei tessuti nella sua totalità. Infatti stress meccanici, moto di fluidi, trasporto di soluti, e potenziali elettrici sono tutti effetti concomitanti, quando un tessuto viene sollecitato.

Modello bifasico – deformazioni finite.

La risoluzione del modello multifasico è onerosa e ad oggi molti autori utilizzano tale teoria solo per casi semplici dove alcuni fenomeni non sono coinvolti. Una forma più semplificata del modello è la teoria bifasica dove la presenza di poli-ioni e di soluti neutri viene trascurata. Tale semplificazioni sono limitative se si pensa che la cartilagine articolare è composta da macromolecole cariche elettricamente e da una fase fluida ricca di proteine disciolte. Comunque le restrizioni su menzionate danno risultati accettabili.

Le equazioni di campo nel modello bifasico diventano:

- *bilancio di massa:*

$$\underline{\nabla} \cdot \underline{v}^s + \underline{\nabla} \cdot (\phi^f (\underline{v}^f - \underline{v}^s)) = 0 \quad (15)$$

- *equazione di attrito(10):*

$$-\phi^f \underline{\nabla} \mu^f = \underline{B} \cdot (\underline{v}^f - \underline{v}^s) \quad (16)$$

- *potenziale chimico del fluido:*

$$\mu^f = \mu_0^f + RT \ln a^f + p \quad (17)$$

- *bilancio della quantità di moto:*

$$\underline{\nabla} \cdot \underline{\underline{\sigma}}^s - \underline{\nabla} p = 0 \quad (18)$$

- *legge Darcy:*

inserendo la (17) nella (16), assumendo che non ci siano gradienti di attività della fase fluida si ottiene:

$$-\phi^f \underline{\nabla} p = \underline{\underline{B}} \cdot (\underline{v}^f - \underline{v}^s) \quad (19)$$

se si definisce il tensore delle permeabilità come:

$$\underline{\underline{K}} = (\phi^f)^2 \underline{\underline{B}}^{-1} \quad (20)$$

si ottiene la legge di Darcy:

$$\phi^f (\underline{v}^f - \underline{v}^s) = -\underline{\underline{K}} \cdot \underline{\nabla} p \quad (21)$$

- *equazione costitutiva della matrice solida:*

$$\underline{\underline{\sigma}} = (\det \underline{\underline{F}})^{-1} \underline{\underline{F}} \frac{\partial W}{\partial \underline{\underline{E}}} \underline{\underline{F}}^T \quad (22)$$

dove

F: tensore delle deformazioni.

E : tensore di Green-Lagrange.

W: potenziale elastico.

2.2.2 Biosintesi dell' ECM.

Oltre alla necessità di modellare il comportamento meccanico dei tessuti e dei costrutti, bisogna riuscire ad interpretare anche l'attività cellulare attraverso un formalismo matematico. Così come avviene nella moderna bio-reattoristica chimica nell'ambito della fermentazione, ad esempio, bisogna inquadrare quali sono le reazioni coinvolte nella sintesi e assemblamento di matrice nei tessuti. In questo modo oltre ad ottenere una modellazione matematica del fenomeno e quindi potere fare delle previsioni, si può pensare di iniziare a fare un discorso più operativo che è quello del dimensionamento di bioreattori.

I primi passi mossi in tal senso sono di Dimicco il quale propone uno schema semplice nel modellare la produzione di PG e collagene, da parte di condrociti. Tale modello è un semplice schema di diffusione-reazione ma molto versatile nel potere estendere il caso di deformazioni meccaniche e flussi indotti.

Si pensi al fatto che la storia di un componente della matrice extracellulare è composta dalle seguenti fasi **figura 14**:

- Biosintesi: secrezione da parte della cellula nell'ambiente esterno. In questa fase il componente si trova in una forma "solubile", nel senso che è libero di muoversi all'interno degli spazi interstiziali. Quindi in questo stato la macromolecola può allontanarsi dal tessuto o essere aggredita da enzimi per formare un reticolo o una macromolecola più grande.
- Assembly: è la fase che corrisponde alla formazione di un reticolo tridimensionale il quale può formarsi e disgregarsi a seconda del bilancio tra la velocità di formazione del reticolo e la velocità di degradazione da parte enzimi specifici.
- Degradazione: è la fase in la molecola dopo essere stata assemblata viene degradata ed allontanata da dal tessuto.

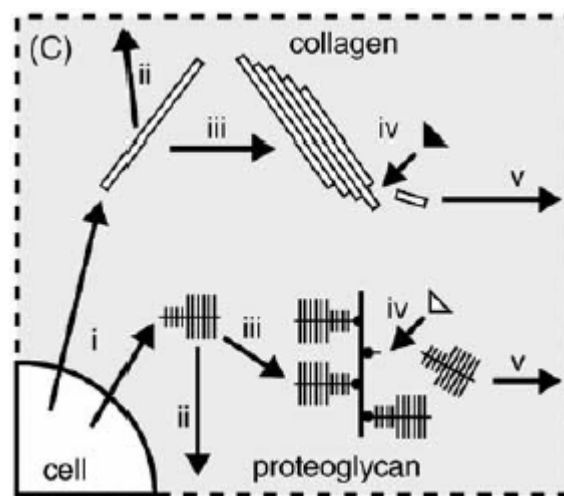


Figura 14 Rappresentazione schematica del ri-modellamento della matrice extracellulare.

Quindi un componente della matrice extracellulare i un determinato istante può essere distribuito tra tre diversi compartimenti: solubile (**s**), legato (**b**), degradato (**b**).

I componenti del reparto **s** e **d** sono assunti essere mobili, e trasportati solo da un meccanismo convettivo. Il bilancio sulla specie solubile si scrive così:

$$\frac{\partial c_s(x,t)}{\partial t} = k_f + D_s \frac{\partial^2 c_s(x,t)}{\partial t^2} - r_b \quad (23)$$

dove i termini del lato destro indicano la velocità di formazione (sintesi), velocità di trasporto diffusivo, e velocità netta di assembly.

La velocità di variazione della specie assemblata, è la differenza tra la velocità di assembly e la velocità di degradazione. Si assume che tale componente sia fermo nello spazio:

$$\frac{\partial c_b(x,t)}{\partial t} = r_b - r_d \quad (24)$$

I componenti degradati della matrice possono invece muoversi per diffusione all'interno della matrice:

$$\frac{\partial c_d(x,t)}{\partial t} = D_d \frac{\partial^2 c_d(x,t)}{\partial t^2} + r_d \quad (25)$$

2.3 Metodi sperimentali

2.3.1 Meccanici

Il modello bifasico descritto nel capitolo precedente può essere ancora semplificato qualora si scelga una opportuna geometria. Si consideri il riferimento come schematizzato in **figura 15**.

Il disco rappresenta il gel che, posto in un alloggio impermeabile e indeformabile (**figura 15b**), durante una sollecitazione nella direzione z, non ha modo di evolvere nelle direzioni x e y. Per questa particolare geometria si assume che tutte le grandezze possano variare solo con la coordinata z.

Il tensore delle deformazioni di Green-Lagrange diventa:

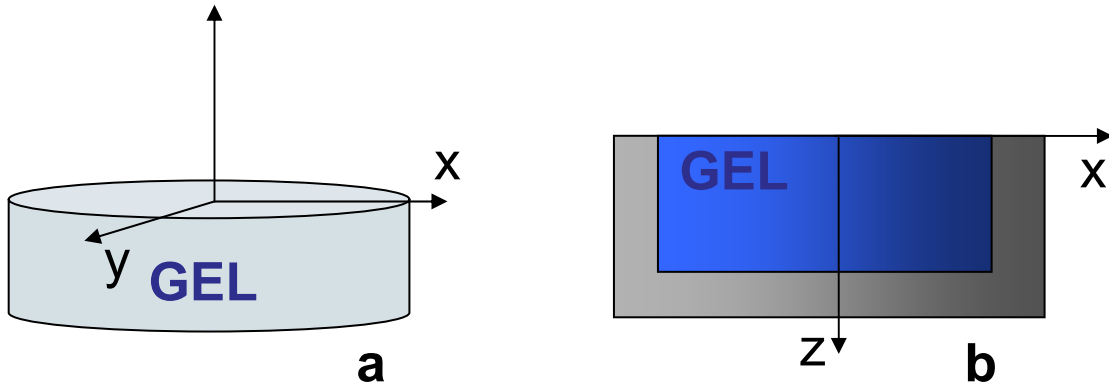


Figura 15: a) sistema di coordinate scelto per schematizzare un dischetto di gel. b) sistema di coordinate nel caso di geometria monoassiale. Il sistema può evolvere solo lungo la direzione z.

$$\mathbf{E}^s = \frac{1}{2}(\mathbf{F} \cdot \mathbf{F}^c - \mathbf{I}) = \begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & \frac{1}{2} \left(\left(\frac{\partial u}{\partial z} \right)^2 - 1 \right) \end{bmatrix} \quad (26)$$

la funzione energia di deformazione e il legame costitutivo della matrice solida si assume abbiano la seguente espressione:

$$\boldsymbol{\sigma}^e = J\mathbf{H} \cdot \mathbf{E}^s \quad (27)$$

è possibile ottenere un sistema di due equazioni in due incognite, introducendo la legge di Darcy nel bilancio di massa, e la 2.2 nel bilancio di quantità di moto:

$$\begin{aligned} \nabla \cdot \mathbf{v}^s - K\nabla^2 p &= 0 \\ \nabla \cdot J\mathbf{H}\mathbf{E}^s - \nabla p &= 0 \end{aligned} \quad (28)$$

tali equazioni possono essere risolte con una routine agli elementi finiti. In particolare può essere utilizzato un modello che prevede una variazione esponenziale di K con la deformazione [62].

$$K = K_0 \exp(-M\varepsilon). \quad (29)$$

La variabile di uscita di tale modello deve essere una grandezza misurabile sperimentalmente attraverso la quale con procedure di curve fitting, possono essere determinate le grandezze di interesse in genere sono modulo elastico e conducibilità idraulica.

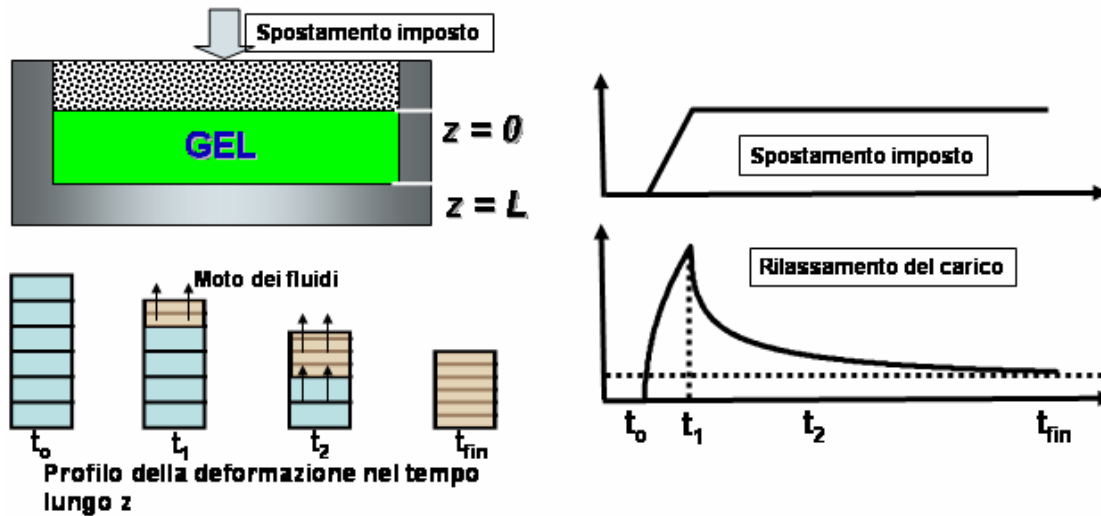


Figura 16: Prova di stress relaxation: il gel viene compresso attraverso un setto poroso che permette la fuoriuscita dei fluidi interstiziali. La risposta del materiale in termini di sforzo è un rilassamento dello stesso dovuto al moto dei fluidi.

In accordo con il comportamento meccanico dei sistemi bifasici, tale modello prevede che il gel sottoposto ad una deformazione costante, rilassi nel tempo lo sforzo necessario per mantenere la deformazione imposta (**figura 16**). Tale fenomeno è dovuto alla frizione tra la matrice solida e la fase fluida che si muovono di moto relativo. Durante la fase di compressione, la deformazione è localizzata negli strati superficiali, generando un aumento dello sforzo; contemporaneamente si ha una espulsione di fluidi verso l'esterno ed una redistribuzione interna degli stessi. Superato il tempo di percolazione, $t_2 = L^2/KH$, la deformazione si propaga agli strati interni uniformandosi al valore di equilibrio. La risposta meccanica del sistema è quindi funzione della permeabilità e del modulo elastico. I test meccanici prevedono la determinazione del modulo elastico e della conducibilità attraverso prove di stress relaxation in geometria monoassiale confinata: tale prova prevede che il disco di gel venga posizionato in un alloggiamento dello stesso diametro e compresso con un setto poroso (**figura 16**). Il setto poroso in vetro, ha la funzione di veicolare i fluidi che defluiscono dal campione e fornire una compressione omogenea al disco. La permeabilità del setto è molto più alta di quella del campione in modo da offrire una resistenza idraulica trascurabile; la rigidità a compressione, essendo molto più alta del gel, ha una cedevolezza trascurabile.

I test sono stati effettuati a controllo di spostamento con un tester dinamico meccanico DYNASTAT, IMASS Inc. pilotato via software tramite LABWIEV®.

La sollecitazione imposta è composta da una rampa iniziale, la cui velocità è di $1,6 \mu\text{m/s}$, tale da raggiungere in 30s una deformazione del 5% rispetto alla spessore iniziale, a

questa segue una fase di mantenimento della durata di circa 450s. Tale sollecitazione viene applicata per sei volte consecutive fino a raggiungere una deformazione finale del 20%.

In **figura 17** è riportata una prova sperimentale su un gel di agarosio e la relativa curva ottenuta dal modello descritto in precedenza.

Dal fitting dei dati sperimentali si ottengono il valore della conducibilità idraulica K_0 e del valore pre-esponenziale M (**figura 18**) mentre il modulo elastico di equilibrio H , viene ricavato dividendo il valore di plateau dello sforzo per la rispettiva deformazione imposta.

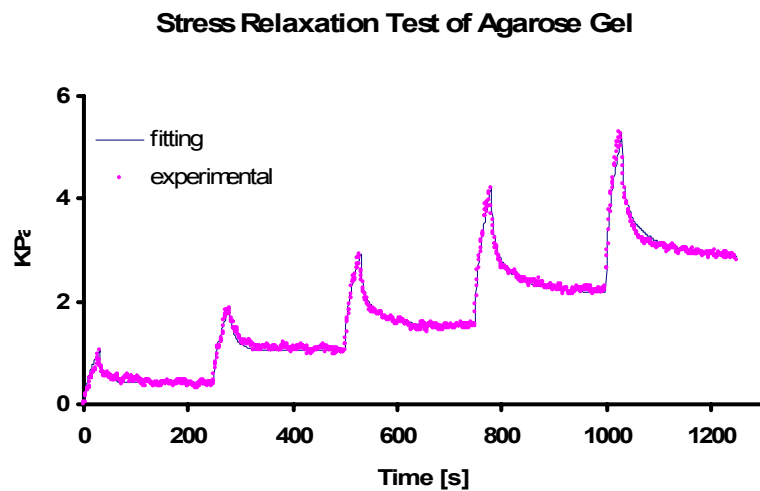


Figura 17: Prova sperimentale e fitting della stessa utilizzando il modello bifasico: la prova consiste in quattro compressioni successive del 5%. Tale modello riesce ad estrapolare il valore di K_0 e M per l'intera storia di carico.

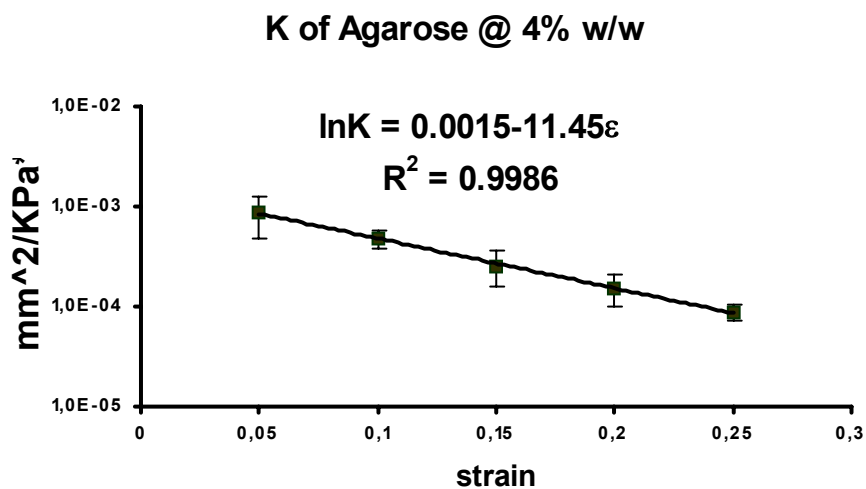


Figura 18: Conducibilità idraulica di gel di agarosio al 4% in peso: attraverso un fitting dei dati si è risalito alla relazione tra K e deformazione imposta.

2.3.2 Test Biochimici

S-GAG

Le analisi biochimiche consistono nel valutare con gli stessi intervalli di tempo delle prove meccaniche il contenuto di DNA e S-GAG nei gel.

Per far ciò si sottopongono i gel, precedentemente trattati in azoto liquido, ad un trattamento di liofilizzazione.

La liofilizzazione ha la durata di 24 ore al termine delle quali il campione viene immediatamente prelevato e posto in un eppendorf tube con 1ml di papain digestion buffer (150mM cloruro di sodio, 55mM sodio citrato, 5mM cisteina, 5mM EDTA) per 1 ora a 70°C.

Trascorsa questa ora si aggiungono 125µg/ml di papaina (SIGMA) nell' eppendorf che verrà poi lasciata in un bagnetto a 60°C per 16 ore.

La soluzione viene poi centrifugata in maniera da avere due fasi una più pesante che si deposita sul fondo dell'eppendorf e una più leggera che rappresenta il supernatante, quello su cui verranno effettuate le analisi. Per la determinazione del contenuto di S-GAG è necessario, prima di iniziare la digestione dei campioni, costruire la curva di taratura per i gag (**figura 19**). A tal scopo si preparano i campioni standard, con concentrazioni di GAG da stock 100 µg/ml (chondroitin sulfate SIGMA), che variano da 0 a 50 µg/ml. Si aggiunge poi sodio citrato salino SSC (300mM cloruro di sodio, 30mM sodio citrato) fino ad un volume finale di 200µl. Nella **tabella 1** sono riportati i volumi di soluzione standard di GAG e SSC da miscelare, al fine di ottenere le concentrazioni di gag desiderate.

[gag] µg/ml	Volume standard (µl)	Volume SSC (µl)
0	0	200
5	10	190
10	20	180
15	30	170
20	40	160
25	50	150
30	60	140
35	70	130
40	80	120
45	90	110
50	100	100

Tabella 1: volumi di soluzione standard di S-GAG e di SSC da prelevare per ottenere campioni a concentrazione crescente di S-GAG.

Si prelevano 40 µl da ciascuno degli 11 campioni standard preparati e si pipettano in altrettante eppendorf aggiungendo a ciascuna 250 µl di DMB (0.016g dimethyl-methylene blue, 5 ml etanolo, 2 g sodio formato 2 ml acido formico). Si ottengono quindi 11 campioni con un volume finale di 290 µl a diverse concentrazioni di gag, se ne

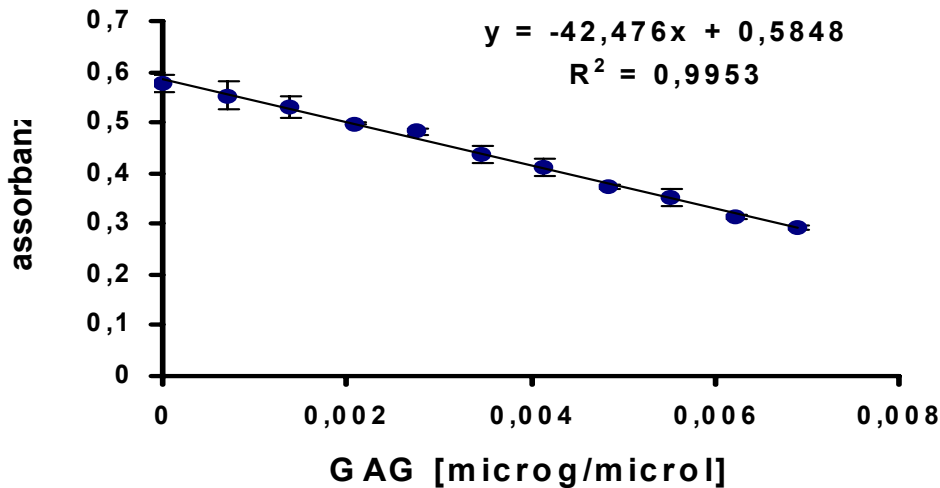


Figura 19. Retta di taratura di Condroitin-Solfato.

prelevano 200 µl da ognuno e lo si pone in un 96-well plate per leggerne l'assorbanza nello spettro-fluorimetro (Wallac Victor3TM Perkin Elmer) con un filtro di 595nm. Come bianco si utilizzano 200µl di SSC.

Si costruisce una curva di calibrazione riportando in ordinata le letture dei campioni a cui è stata sottratta la lettura del campione bianco, e in ascissa le concentrazioni dei gag nel volume finale di 290 µl. Interpolando i punti otteniamo una retta che presenta il seguente andamento.

Per la determinazione dei gag nei costrutti in cui abbiamo coltivato i condrociti, quindi, effettuata la procedura di digestione descritta precedentemente, si prelevano 40 µl del digerito, si aggiungono 250 µl di DMB e si legge l'assorbanza allo spettrofluorimetro.

Entrando nella retta di taratura con il valore dell'assorbanza letto si risale alla concentrazione di GAG nel gel.

DNA

Anche per la determinazione del DNA è necessario costruire una curva di taratura. Si preparano i campioni standard, con concentrazioni di DNA (stock 20µg/ml) che variano

da 10 a 0.3125 µg/ml (**tabella**). Si aggiunge poi SSC (300mM cloruro di sodio, 30mM sodio citrato) fino ad un volume finale di 400 µl.

[DNA] µg/ml	Volume TN buffer (µl)	Volume standard (µl)
10	200	200
5	300	100
2.5	350	50
1.25	375	25
0.625	387.5	12.5
0.3125	393.75	6.25

Tabella 2: volumi di soluzione standard di DNA e di SSC da prelevare per ottenere campioni a concentrazione decrescente di DNA

Si prelevano 100µl da ciascuno dei 6 campioni standard preparati e si pipettano in un 96-well plate, si aggiungono poi in ogni pozzetto riempito 100µl di Hoechst 33258 (da stock 0.2 µg/ml) e si legge la fluorescenza della soluzione nello spettrofluorimetro con un filtro di 460 nm in emissione ed uno di 350 nm per eccitare. Come bianco si utilizzano 200 µl di una soluzione fatta da 100 µl di SSC e 100 µl di Hoechst.

Si costruisce una curva di calibrazione riportando in ordinata le letture dei campioni a cui è stata sottratta la lettura del campione bianco, e in ascissa le concentrazioni del DNA nel volume finale di 200 µl. Interpolando i punti otteniamo una retta (figura 20)

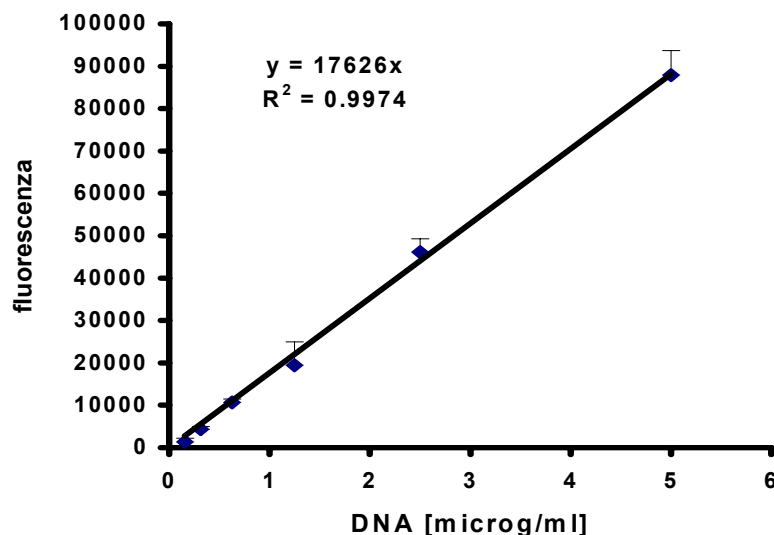


Figura 20. Retta di taratura del DNA in SSC

Per la determinazione del DNA nei costrutti in cui si coltivano i condrociti, quindi, effettuata la procedura di digestione descritta precedentemente si prelevano 100 µl del digerito, si aggiunge 100 µl di Hoechst e si legge la fluorescenza allo spettrofluorimetro. Entrando nella retta di taratura con il valore della fluorescenza letto si risale alla concentrazione di DNA nel gel.

Collagene totale: metodo della idrossiprolina

Per la determinazione del collagene totale può essere utilizzato il metodo della 4-idrossiprolina. Tale proteina è presente sul collagene in una frazione di 1:14 per cui si presta come un indicatore indiretto della presenza di collagene. Il metodo di misura è sempre spettrofotometrico dopo avere opportunamente isolato e liberato tale proteina.

L' idrossiprolina viene liberata inizialmente per idrolisi del tessuto poi, ossidata con clorammina T, e quindi attraverso reazione con il reagente di Ehrlich, si ottiene un complesso che assorbe ad una lunghezza pari a 560 nm. Per maggiori dettagli sul procedimento si invita a leggere: **I.S. Jamall**.

Capitolo 3

Risposta cellulare alle variabili di processo: possibile ruolo del trasporto molecolare

3.1 Introduzione

In questo capitolo verranno rivisti risultati presenti in letteratura relativi all'effetto delle stimolazioni esterne su tessuti coltivati in vitro e su costrutti cellulari coltivati in vitro. In particolare si focalizzerà l'attenzione sulle stimolazioni meccaniche ponendo l'enfasi sugli effetti delle caratteristiche delle sollecitazioni (frequenza, ampiezza, durata). Tali effetti saranno rivisti anche alla luce del trasporto macromolecolare il quale si pensa possa cambiare rispetto al caso statico (diffusione passiva). Tale trasporto verrà studiato in un aspetto teorico derivato dalla teoria multifasica dei tessuti e si cercherà di fornire una interpretazione dei risultati presenti in letteratura.

3.2 Effetti di stimoli meccanici

Gli effetti delle stimolazioni sono stati studiati sia su espianti di tessuto tenuti vitali in vitro sia su costrutti. Il comportamento è stato visto essere simile tra costrutti e tessuti in termini qualitativi ma non quantitativi la qual cosa pone l'enfasi anche sul ruolo che può giocare il materiale nel trasmettere i segnali esterni alle cellule.

3.2.1 Risposta di espianti di cartilagine

Se l'idea della moderna ingegneria dei tessuti è quella di rigenerare e riprodurre in vitro organi artificiali equivalenti a quelli naturali, non si può prescindere dalla conoscenza dei fenomeni che regolano l'attività biosintetica delle cellule e come queste vengono influenzate da stimolazioni esterne. Tali stimolazioni sono presenti normalmente in vivo e per questo vengono dette fisiologiche: stimoli meccanici (compressione, trazione e taglio) e stimoli chimici sono normalmente forniti alle cellule le quali traducono questi stimoli in attività biosintetica. Capire quindi i tessuti come rispondono a questi stimoli, pone le basi per potere in seguito ingegnerizzare materiali che istruiscano le cellule a produrre un determinato tipo di tessuto con specificate prestazioni. Per questo verrà ora fornita una indagine su come espianti di cartilagine articolare rispondono a stimoli esterni.

Utilizzando sistemi come quelli schematizzati in **figura 21**, è possibile tenere in coltura espianti di tessuti in condizioni di stimolazione meccanica sia in regime dinamico che statico.

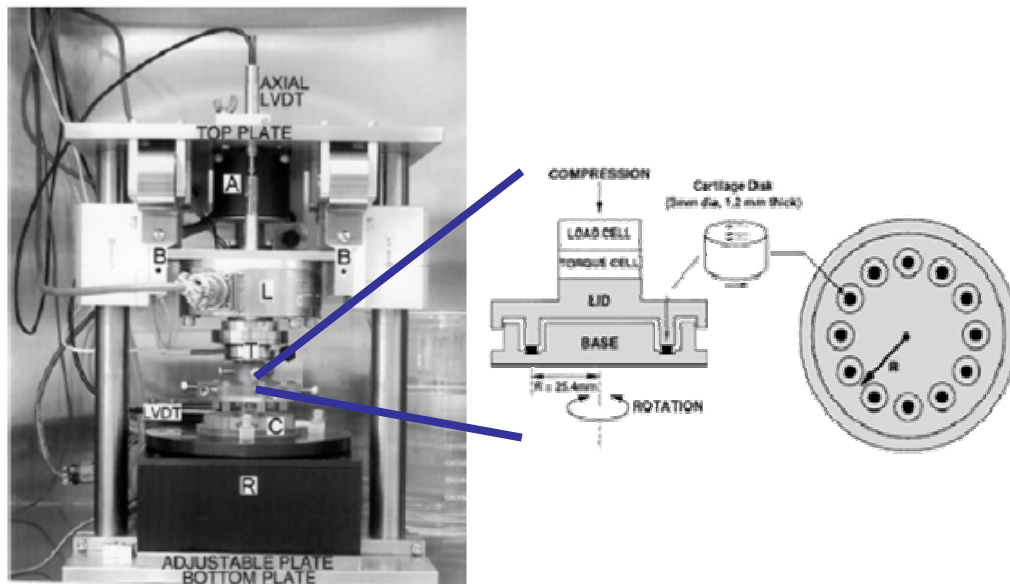


Figura 21 Tipico apparato sperimentale utilizzato per stimolare meccanicamente costrutti cellulari. Tale sistema è in grado di fornire stimolazioni di taglio e compressione sia statiche che dinamiche.

I primi studi effettuati su espianti di cartilagine articolare hanno avuto lo scopo di investigare l'influenza di stimolazioni e fattori di crescita di sull'attività biosintetica dei condrociti. Dischi di cartilagine sono stati isolati dalle articolazioni metacarpali di bovini adulti e coltivati in sistemi come mostrato in **figura 21**. Volendo studiare la risposta biosintetica dei condrociti, si è analizzata la velocità di produzione dei GAG, in funzione del tempo di coltura quando gli espianti venivano sottoposti a sollecitazione statiche e gradienti di fattore di crescita **IGF-1** (**figura 22**).

Dai risultati si vede che quando non c'è alcun tipo di sollecitazione la velocità di produzione dei GAG rimane invariata nel tempo. Si osserva una diminuzione della velocità di produzione quando il tessuto è soggetto ad una compressione statica. Sotto l'influenza di una compressione statica ma in presenza di un concentrazione di fattori di crescita pari a 300ng/l, si ha un recupero della velocità verso i valori che corrispondono al campione non deformato. Se invece il tessuto è tenuto scarico ma in presenza di IGF-1, si nota un aumento nel tempo della velocità di biosintesi. Quindi si nota che la compressione statica inibisce in qualche modo la biosintesi di matrice

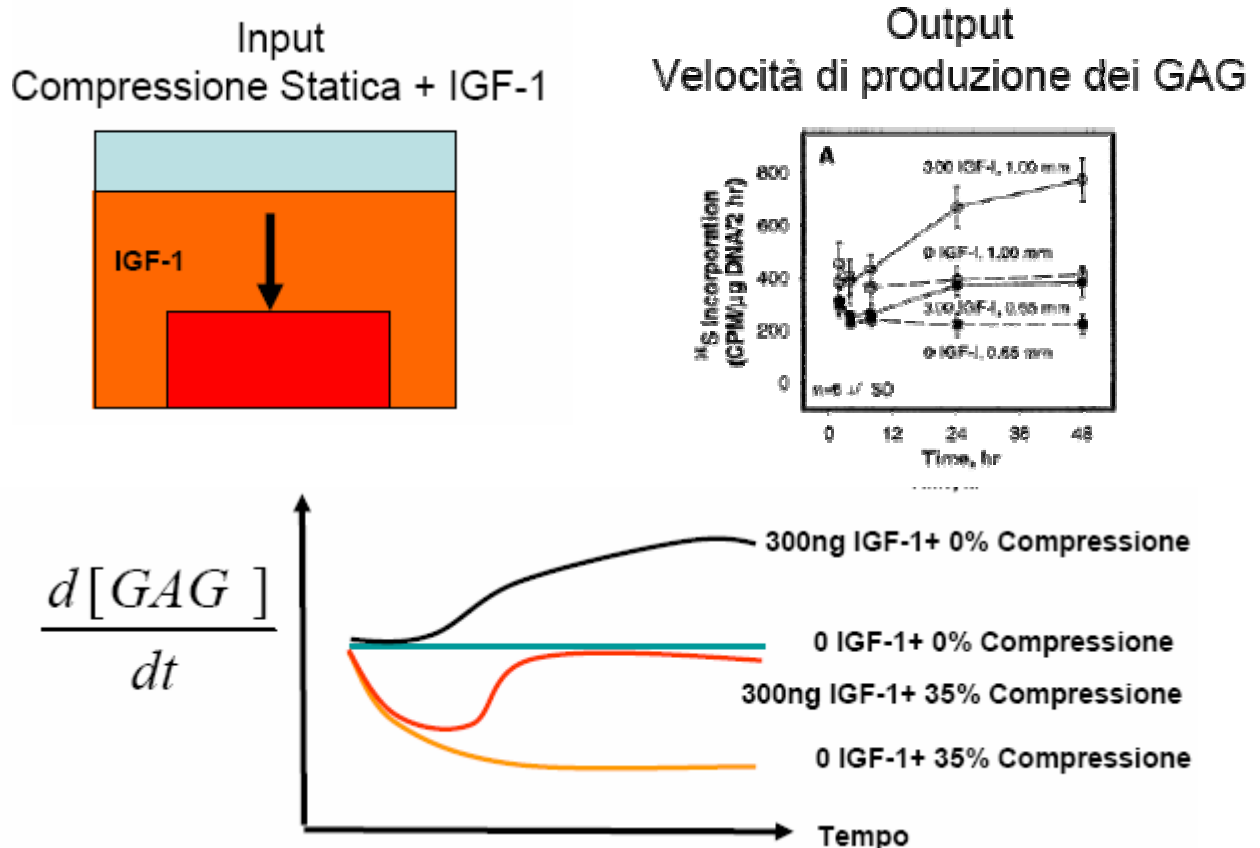


Figura 22 Variazione della velocità di biosintesi di GAG, a diverse condizioni di coltura: vengono variati stimoli chimici in termini di fattori di crescita, stimoli meccanici in termini di compressione statica.

extra-cellulare. La presenza del fattore di crescita, fa aumentare la produzione ma non come accade nel caso in cui il tessuto è in uno stato non deformato. Ciò è dovuto a due motivi: la compressione statica da un lato inibisce i meccanismi di biosintesi per , ragioni non chiare, dall'altro influenza anche trasporto di macromolecole come dimostrano anche altri studi dove si nota un abbassamento della diffusività e del coefficiente di ripartizione in tessuti sottoposti a compressione statica²⁷. Tale risposta bi-modale suggerisce che le vie attraverso le quali la cellula risponde a sollecitazioni meccaniche e gradienti di fattori di crescita sono diverse. Inoltre sottolinea l'importanza di studiare da un punto di vista ingegneristico, il trasporto di soluti macromolecolari all'interno dei tessuti.

Si consideri ora lo stesso espianto ma soggetto ad una sollecitazione ciclica come mostrato in **figura 23**. Si nota che rispetto al controllo, cioè tessuto non deformato e senza fattore di crescita, una stimolazione meccanica oscillatoria fa aumentare la velocità di biosintesi delle proteine. Un andamento analogo si osserva se il campione non deformato viene posto a contatto con una concentrazione di 300 ng/ml di IGF-1.

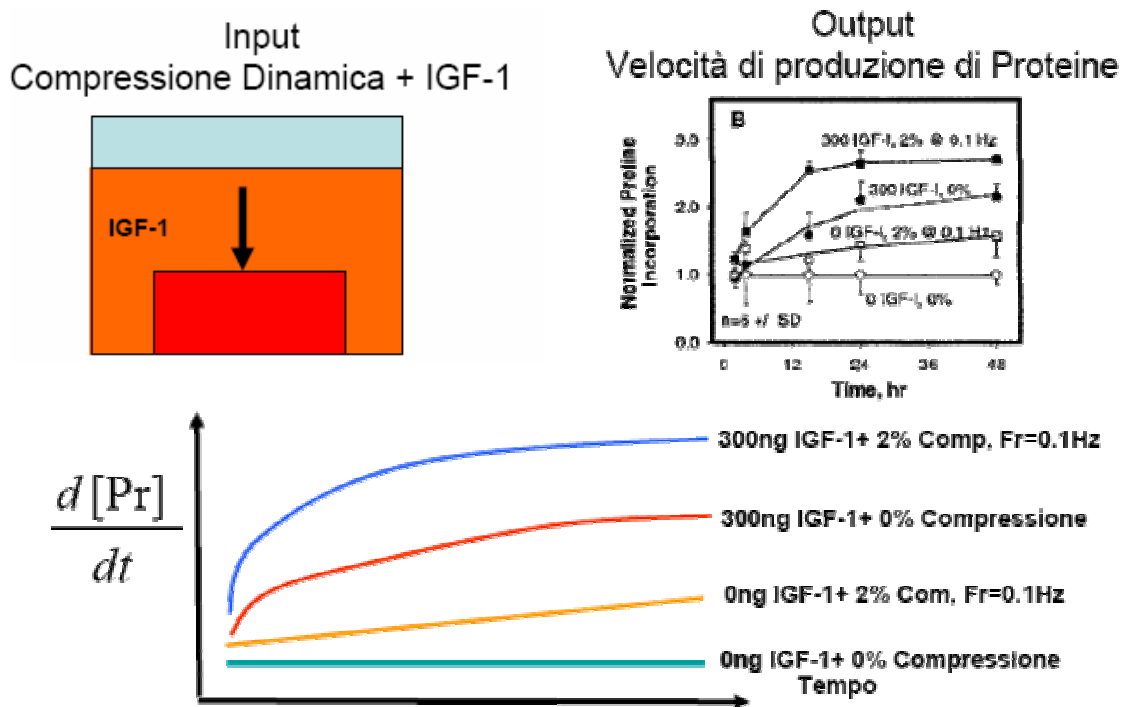


Figura 23 Variazione della velocità di biosintesi di proteine, a diverse condizioni di coltura: vengono variati stimoli chimici in termini di fattori di crescita, stimoli meccanici in termini di compressione statica.

L'effetto dell'aumento di produzione di proteine si amplifica quando il tessuto viene sottoposto contemporaneamente ad una sollecitazione ciclica ad un gradiente di fattore di crescita. E' interessante notare che la presenza di stimolazione meccanica da un lato attiva la mechano-transduction (assenza di IGF-1), dall'altro rende più efficiente il trasporto di fattori di crescita. Tale osservazione sperimentale porta a studiare in maniera più approfondita il trasporto di macromolecole all'interno di gel polimerici.

*Buschmann*³³ ha condotto degli studi modellistici e sperimentali per mettere in relazione la meccanica ed il trasporto nei mezzi porosi con l'attività biosintetica dei condrociti (**figura 24**). Espianti di cartilagine sono stati coltivati in compressione in regime dinamico a diverse frequenze ad ampiezza costante. Tali campioni di forma cilindrica venivano poi sezionati lungo la direttrice e la deposizione spaziale di aggregati veniva monitorata attraverso tecniche autoradiografiche³³.

Parallelamente l'espianto di cartilagine veniva modellato attraverso la teoria bifasica dove come condizioni al contorno venivano prescritte le stesse condizioni

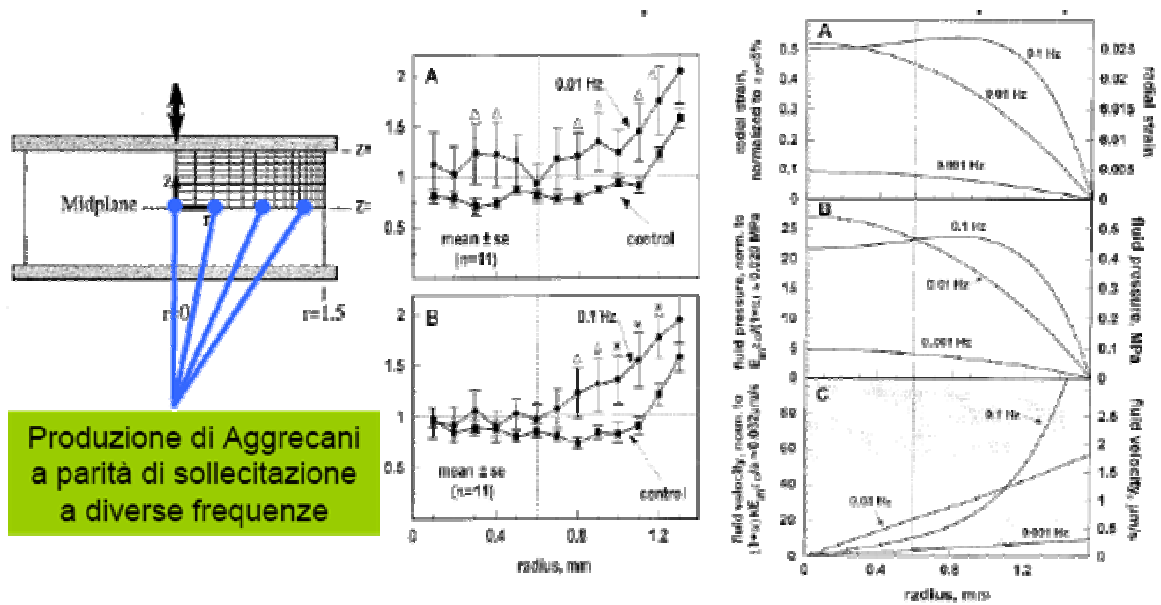


Figura 24 Confronto qualitativo tra le distribuzioni spaziali di Aggregati in costrutti cilindrici di espianti di cartilagine e le distribuzioni dei campi di velocità ottenuti dalla risoluzione del modello bi-fasico applicato alla cartilagine.

sperimentali. Attraverso le simulazioni si è in grado di risalire al campo delle deformazioni radiali, delle pressioni e delle velocità dovute ad un deformazione ciclica.

Analizzando le sezioni istologiche si vede che la distribuzione degli aggregati è localizzata nelle zone dove i campi di velocità sono più spinti. Ma dell'analisi dei risultati si vede anche che aumentando la frequenza di sollecitazione si ottiene una deposizione di matrice che nella zona centrale si appiattisce verso i valori del controllo (non deformato). Osservando l'andamento dei campi di velocità si nota che essi hanno un andamento simile: all'aumentare della frequenza si ha un aumento delle ampiezze di oscillazioni verso il bordo del campione, ma andando verso il centro le velocità si annichiliscono. Si ha sorta di effetto pelle dove all'aumentare della frequenza i campi i velocità vengono confinati verso le zone esterne del campione. Il confronto qualitativo tra i campi dei velocità e la distribuzione spaziale di aggregati, mette in evidenza il ruolo della convezione sui tessuti sia in vivo che in vitro. I campi di velocità se da un lato stimolano la mecano-transduction per effetto delle forze di taglio, dall'altro sono anche responsabili del trasporto convettivo di nutrienti, sia fattori di crescita che vengono sequestrati dall'ambiente circostante, sia lo smaltimento di prodotti di scarto del metabolismo.

3.2.2 Ruolo del materiale: agarosio, PEG, PGA.

L'idea che sta alla base dell'ingegneria dei tessuti è quella di impiantare cellule in matrici polimeriche dove possano generare tessuto equivalente il quale successivamente viene impiantato nella parte danneggiata. In questa ottica sia le proprietà del materiale che le variabili di processo hanno un ruolo sulla biosintesi. In fatti ciò che si evince da una analisi dettagliata della letteratura è per qualunque tipo di materiale, attraverso una coltura statica non si riesce a coltivare costrutti con uno spessore superiore a 1mm. Infatti aumentando lo spessore si osservano zone necrotiche all'interno del costrutto. Inoltre, come visto per gli espianti di cartilagine, l'effetto dei fattori di crescita e delle stimolazioni meccaniche aumentano la produzione di matrice. Però a parità di tutte le variabili l'effetto complessivo delle variabili esterne sulla crescita è materiale dipendente. Di seguito verranno analizzati diversi tipi di materiali polimerici usati nella rigenerazione della cartilagine articolare.

Agarosio

I gel di agarosio si formano a partire da una soluzione acquosa concentrata di agarosio ad alta temperatura. Tal soluzione raffreddandosi forma un reticolato tridimensionale di agarosio imbevuto del solvente formando così un gel polimerico. Ciò garantisce la stabilità tridimensionale ma allo stesso tempo si ottiene una struttura porosa dove è garantito il trasporto interstiziale grazie alla presenza di solvente. Grazie a questa sua caratteristica è stato ampiamente utilizzato per emulare la matrice extra-cellulare: in questa ottica l'agarosio è stato utilizzato come materiale di supporto per ospitare popolazioni cellulari le quali sotto opportune condizioni di processo sono in grado di proliferare, metabolizzare e produrre tessuto. È stato così possibile riuscire a studiare il comportamento delle cellule nei materiali sottoposti a stimoli particolari. I primi studi effettuati in tale direzione sono di Bushman³³. In tale studio si è applicato per la prima volta la teoria multifasica (lineareizzata per piccole deformazioni) nello studio della evoluzione di neo-tessuto in seno ad un altro materiale, quantificando la produzione di tessuto come variazioni strutturali e fisiche che subisce il costrutto durante la biosintesi cellulare. In altri termini si è giunti alla conclusione che popolazioni cellulari (nello specifico condrociti) sono in grado di sintetizzare tessuto cartilagineo funzionale in-vitro. L'aggettivo funzionale indica che il tessuto formato non solo era identico al tessuto originale in termini bio-chimici e istologici, ma presentava caratteristiche meccaniche e fisiche simili a quelle della cartilagine naturale. In particolare si è notato che tutti i parametri

fisici che caratterizzano il tessuto cartilagineo ed altri tessuti simili (disco, tendini) quali streaming potential, modulo elastico e conducibilità idraulica aumentano man mano che si producono le proteine che compongono la matrice extracellulare della cartilagine (figura 25).

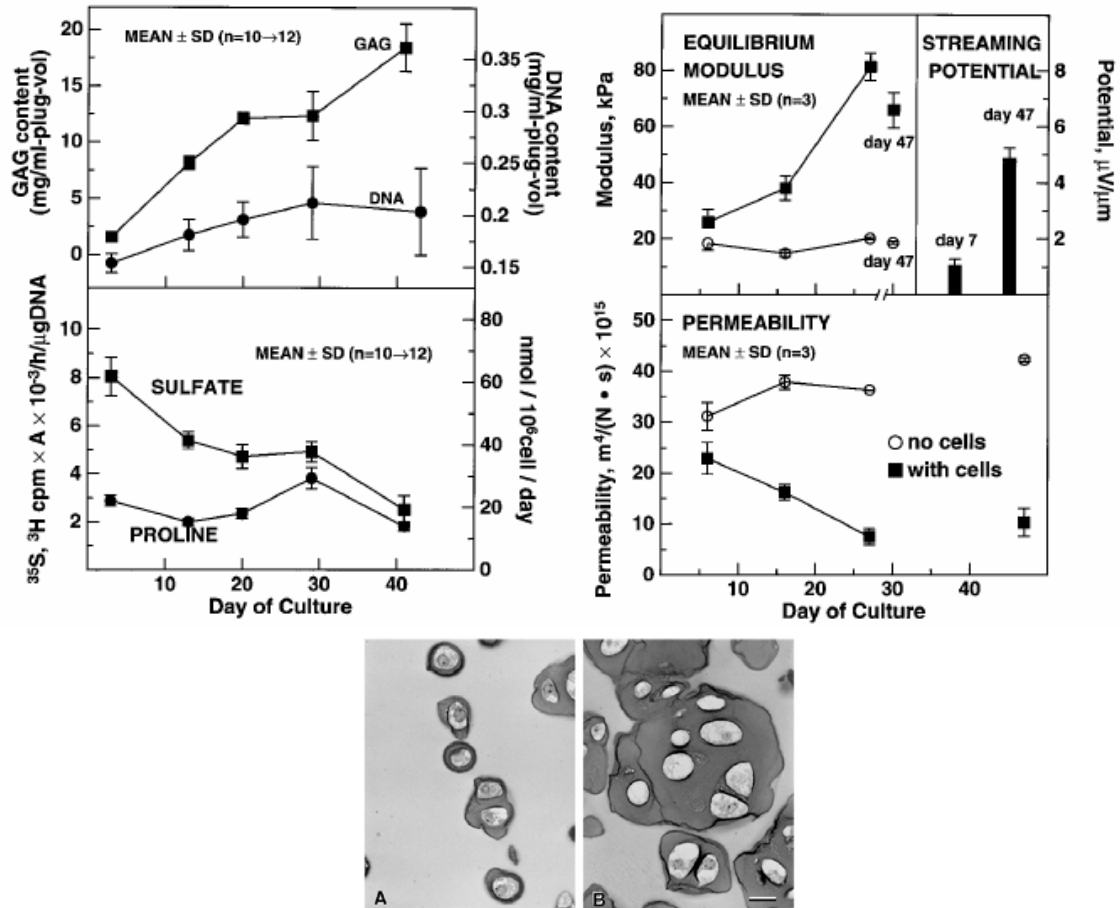


Figura 25 Variazione dei parametri fisici e meccanici e biochimici di costrutti agarosio-condrociti.

In tale studio si sono analizzati materiali dello spessore di 1mm. Andando a coltivare campioni con spessore maggiore si osserva che la limitazioni al trasporto di massa impediscono la formazione di neo tessuto nella zone centrali del costrutto. **In figura 26**, è mostrato un costrutto di agarosio-condrociti con spessore di 3 mm: le zone verdi indicano cellule vitali e quelle rosse cellule morte. Si nota che all' interno del costrutto ci sono zone necrotiche.

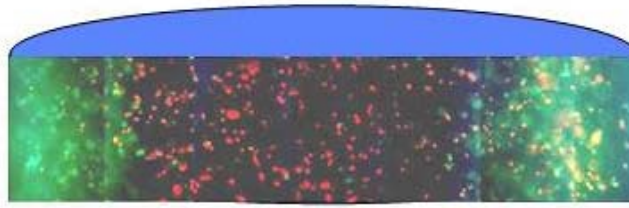


Figura 26 zone necrotiche all'interno di costrutti cellulari.

Per superare tali limitazioni al trasporto e per stimolare la mechano-transduction sono stati condotti studi sugli stessi materiali sottoposti a sollecitazioni meccaniche oscillatorie. Si è visto che così come accadeva nel caso degli espianti di cartilagine anche nel caso dell' agarosio la stimolazione meccanica oscillatoria induce un aumento dell' attività biosintetica (**figura 27**).

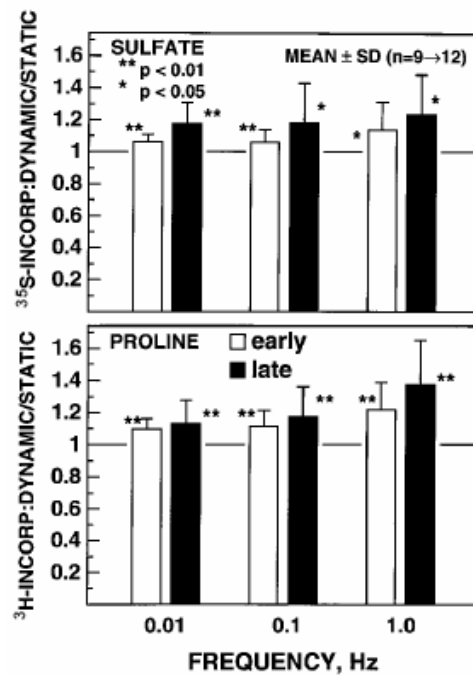


Figura 27 aumento della produzione di matrice in matrici di agarosio.

PEG

Nonostante l' estrema versatilità di utilizzo e disponibilità di agarosio, tale materiale non è idoneo per il riparo di tessuti in quanto non ha un processo di degradazione controllata, è poco funzionalizzabile e rispetto ad altri materiali è meno maneggiabile. Notevoli sviluppi si stanno avendo sui materiali foto-polimerizzabili i quali sono in grado di presentarsi come una soluzione acquosa a temperatura ambiente. Tale opportunità è particolarmente vantaggiosa perché è possibile accoppiare polimero e cellule come

fossero una soluzione e poi attraverso fotopolimerizzazione si ottiene una struttura solida con una densità cellulare omogenea. Altra caratteristica fondamentale è la facilità con la quale è possibile modificare chimicamente il PEG per ottenere una struttura bio-attiva, in grado cioè di riconoscere dei siti specifici delle cellule.

In sistemi come idrogeli, quando sono utilizzati come scaffold per l'ingegneria dei tessuti due proprietà sono importanti: il contenuto di acqua all'equilibrio ed il modulo elastico K. Incapsulando condrociti in gel di PEG degradabili e non degradabili, si nota una differenza nella risposta cellulare proprio perché la degradabilità impatta sulle due caratteristiche sopra indicate. La struttura fondamentale del PEG degradabile e non, è mostrata in **figura 28**. I gel di PEG non degradabili vengono di solito preparati partendo da macromeriti di PEGDM a diverse concentrazioni in modo da ottenere una variazione ampia di proprietà finali.

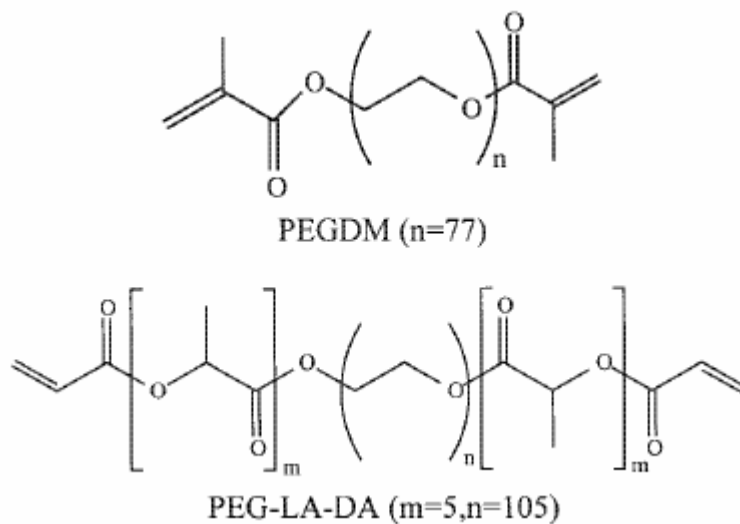


Figura 28 Struttura molecolare del PEGDM e del PEG-LA-DA

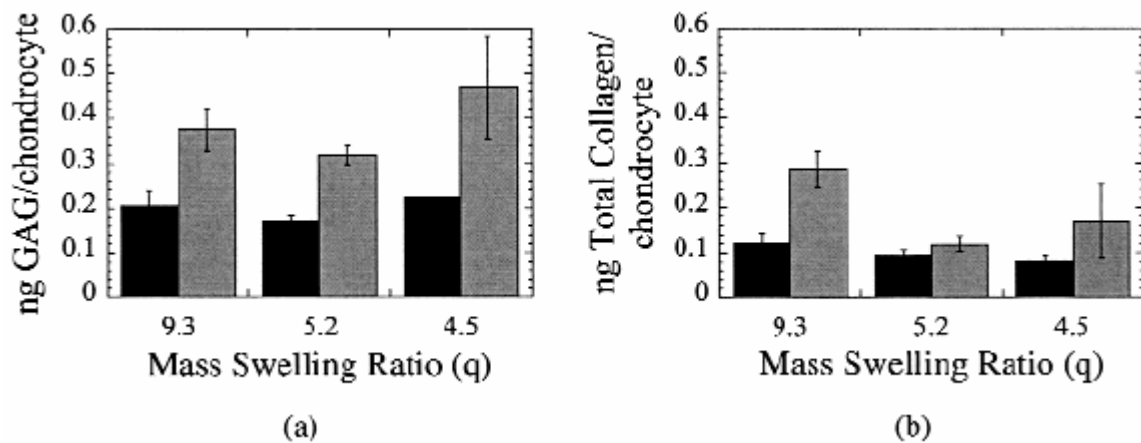


Figura 29 Produzione di matrice cartilaginea, in funzione delle proprietà del PEG.

La cartilagine articolare ha un q pari a 5 ed un modulo elastico statico pari a 500-1000 KPa. Attraverso la chimica del PEG è possibile ottenere materiali con un q che varia tra 4 e 9 mentre per il modulo elastico si ha un K che varia tra 34 e 1370 KPa¹². La mesh size dei gel si è vista diminuire con la concentrazione dei macromeri da 140 a 40 Å. In **figura 29** sono mostrati risultati relativi a gel con proprietà pari a $q = 9, 5.2$ e 4.5 rispettivamente a 2 e 4 settimane di coltura.

Il contenuto di GAG è simile ad ogni tempo indicando che q non influenza la loro produzione. Il contenuto di collagene è relativamente più alto in gel con un q pari a 9. Immagini istologiche sono state condotte per analizzare la distribuzione di GAG e collagene. Ciò che si evince è che per quanto riguarda i GAG (**figura 30**) la variazione di q non influenza la quantità prodotta ma la distribuzione spaziale. Per quanto riguarda il collagene si nota che esiste una zona di ottimo pari a $q = 5.2$ (**figura 31**).

Nell'ingegneria dei tessuti è importante però utilizzare scaffold che abbiano una velocità di degradazione pari allo sviluppo di tessuto prodotto dalle cellule. Per questo motivo sono stati progettati ed utilizzati materiali a base di PEG che abbiano una velocità di degradazione controllabile. Tale materiali hanno la seguente struttura:

(PEG-LA-DA) -co- (PEGDM) dove il macromero funzionalizzato con l'acido lattico è degradabile. In **figura 32** è mostrata l'evoluzione temporale dei componenti della ECM in gel con diverse frazioni di macromero degradabile. Si nota che aumentando la frazione degradabile si ha un aumento di tutti i componenti fondamentali della ECM. In questo studio si è dimostrato che la composizione ottimale di frazione degradabile è del 75%¹³. Sulla scia dei risultati pregressi nell'ambito dell'agarosio sono stati studiati anche gli effetti della stimolazione meccanica su costrutti condrociti-PEG¹⁴.

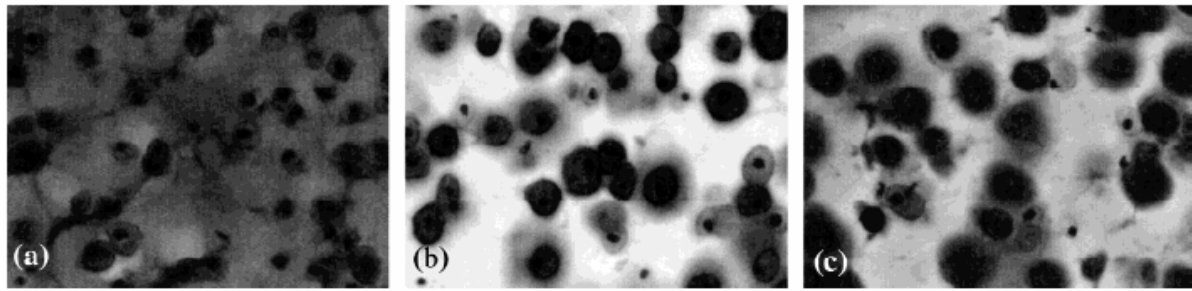


Figura 30 Distribuzione dei GAG in PEG.

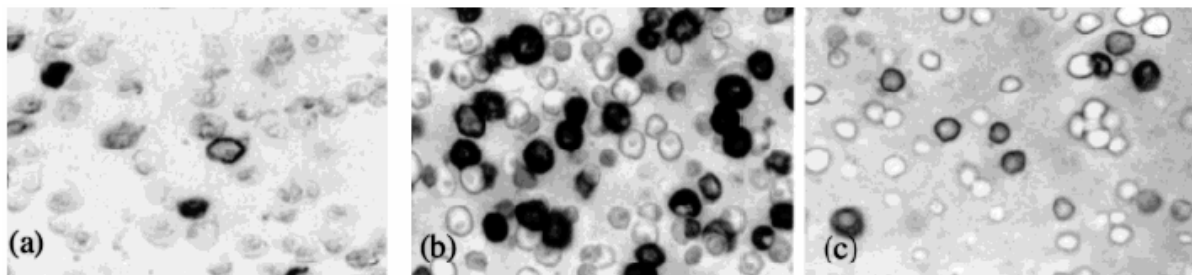


Figura 31 Distribuzione del collagene tipo II in gel PEG.

Studiando gli effetti della stimolazione meccanica ad una singola frequenza (1 Hz) ed una singola ampiezza, si è studiato l'effetto della densità di cross-link del PEG sulla attività biosintetica dei condrociti. Aumentando la densità di cross-link si ha una diminuzione dell'attività biosintetica in termini proliferazione cellulare e sintesi di proteoglicani. Inoltre si è osservato che l'effetto della stimolazione meccanica inibisce la sintesi della matrice in contrasto con le osservazioni fatte su gel di agarosio (**figura 30**). Ciò ha suggerito che evidentemente esiste una frequenza ottimale di sollecitazione facendo pensare ai risultati ottenuti dallo studio degli espianti cartilaginei.

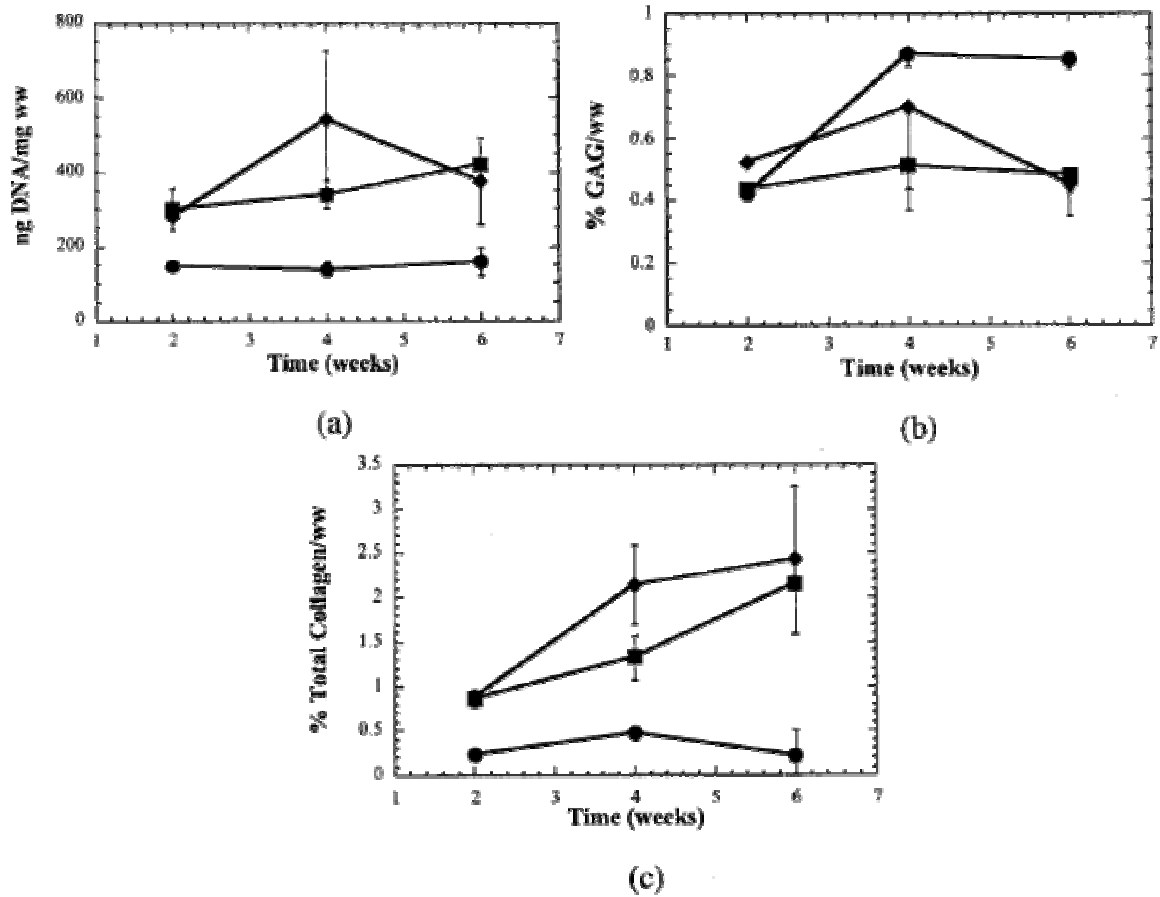


Figura 32 Contenuto biochimico in costrutti di PEG: (●)50% (□)75% (◇)85% di frazione biodegradabile.

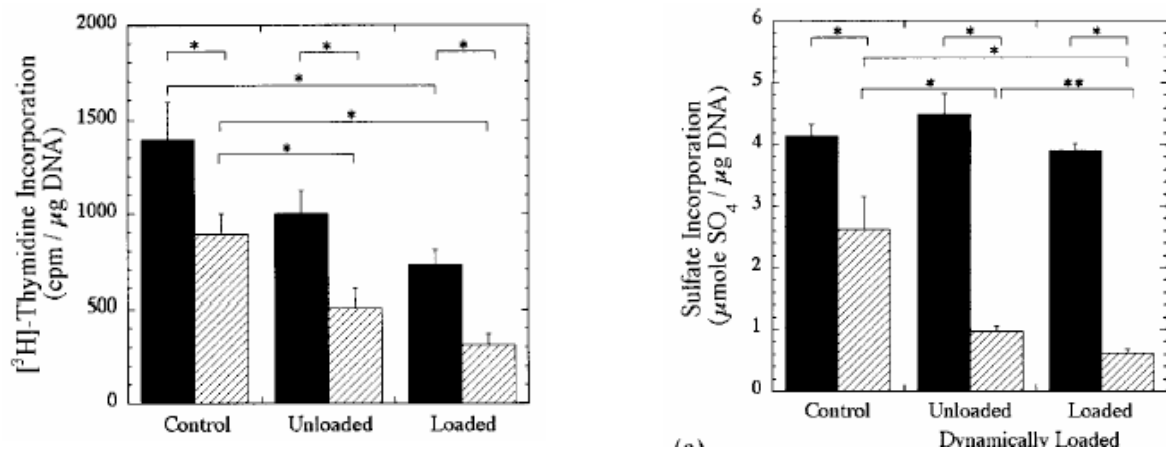


Figura 33 Effetto della frequenza di gel di PEG.

PGA

Molto utilizzato in ingegneria dei tessuti è il PGA che si presenta come un materiale poroso il quale necessita di una prima fase di semina prima della cultura. Attraverso la stimolazione meccanica di tali materiali nei quali sono stati impiantati condrociti, è stato possibile ottenere maggiori informazioni relative alla applicazione di stimolazioni meccaniche sui costrutti. In particolare T. Davison et al.¹⁵, hanno studiato l'effetto della frequenza, dell'offset e dell'ampiezza della sollecitazione meccanica sulla crescita di tessuto cartilagineo. In **figura 34**, si nota che aumentando l'entità della compressione statica, si osserva un significativo decremento della produzione di tessuto ad una deformazione pari al 50%.

La risposta alla compressione dinamica, varia con l'ampiezza dell'oscillazione e con l'offset. Imponendo un offset del 10%, si ha un massimo nella produzione di tessuto ad una frequenza pari a 0.001 Hz (**figura 35**), mentre con un offset del 50%, il massimo si sposta verso frequenze più alte, in particolare a 0.1 Hz (**figura 36**).

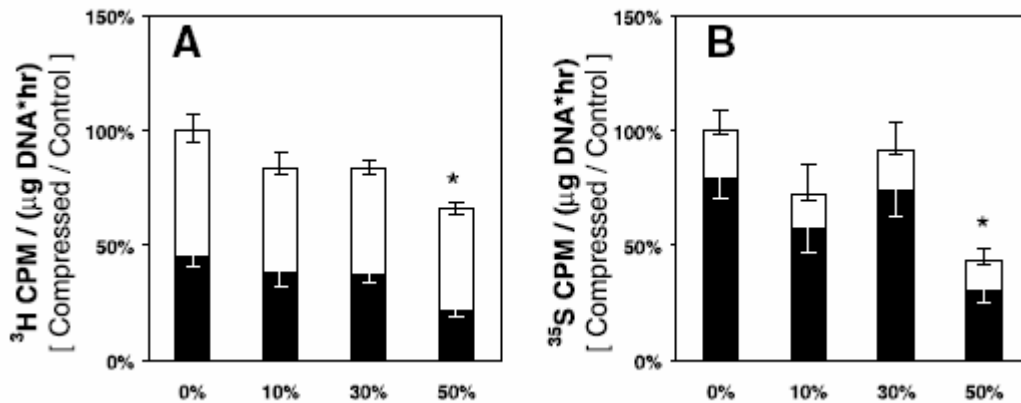


Figura 34 Effetto della compressione statica sulla biosintesi di proteine (A) e sulla biosintesi di S-GAG.

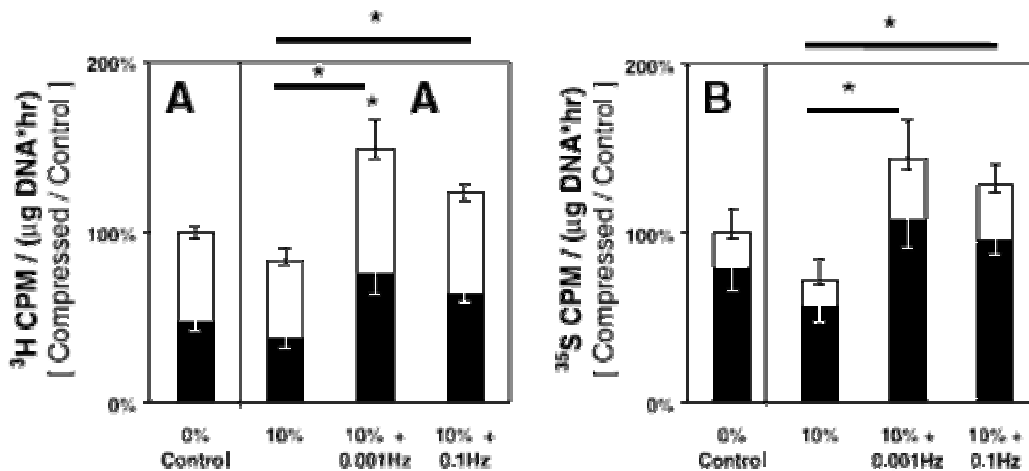


Figura 35 Effetto della frequenza della sollecitazione sulla biosintesi di proteine (A) e sulla biosintesi di S-GAG.

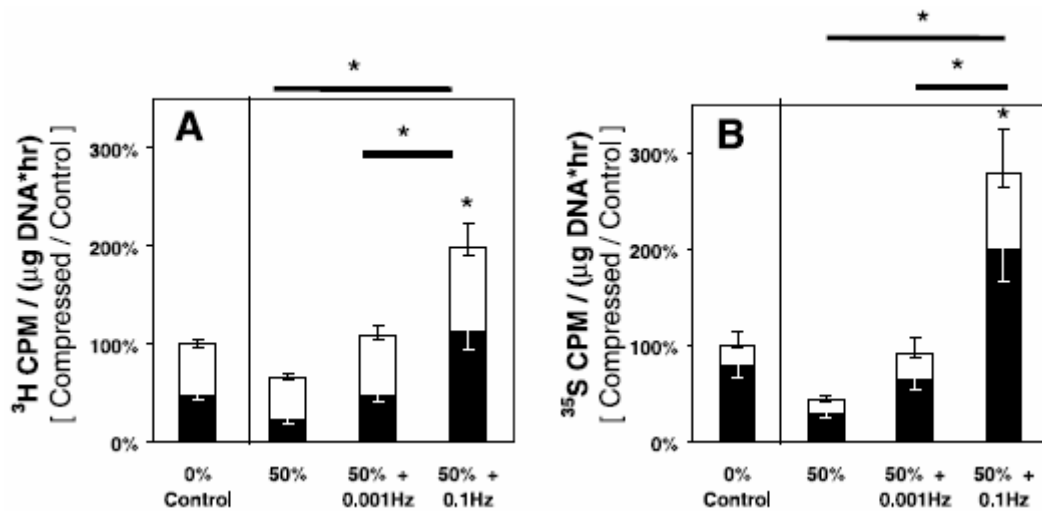


Figura 36 Effetto della frequenza della sollecitazione sulla biosintesi di proteine (A) e sulla biosintesi di S-GAG.

3.3 Trasporto molecolare in gel polimerici: implicazioni in ingegneria dei tessuti

Il meccanismo primario del trasporto di soluti all'interno in tessuti non vascolarizzati è creduto avvenire attraverso la diffusione passiva, ma deformazioni cicliche su tessuti hanno dimostrato sperimentalmente che aumentano o modulano il metabolismo cellulare sia attraverso la mechano-transduction sia attraverso un aumento del trasporto di soluti macromolecolari. L'obiettivo di questo studio è di esaminare da un punto di vista teorico l'effetto che deformazioni cicliche possono avere sui soluti presenti nel gel e di investigare le circostanze attraverso le quali il flusso convettivo indotto dalla deformazione può generare un guadagno del trasporto rispetto al caso della diffusione. Ciò verrà fatto schematizzando il tessuto come un gel polimerico caricato con una certa massa di soluto, sottoposto a deformazioni sinusoidali in geometria monoassiale. Verranno introdotti dei termini adimensionali che contengono i parametri del materiale e dei soluti (modulo elastico H_a , conducibilità idraulica K , coefficiente di diffusione D , spessore) e il tempo caratteristico della sollecitazione (frequenza f). Attraverso tali termini sarà possibile sapere a priori quale è l'intervallo delle ampiezze di sollecitazione e delle frequenze che induce un guadagno del trasporto rispetto al caso diffusivo.

3.3.1 Caso studio: compressione confinata

Molti autori hanno studiato il trasporto molecolare in tessuti come la cartilagine^{1,2}. Il meccanismo della diffusione passiva è stato visto essere aumentato per soluti

macromolecolari in condizioni di carico ciclico³ e da flussi elettro-osmotici⁴, i quali entrambi generano dei flussi convettivi nel sistema, laddove carichi statici hanno dimostrato una diminuzione nei tempi di trasporto⁵. Parallelamente si è visto dai paragrafi precedenti che stimolazioni oscillatorie inducono una risposta biosintetica variabile con la frequenza e con l'ampiezza di oscillazione. Ciò induce a pensare che esista una relazione tra l'aumento del trasporto e l'aumento dell'attività biosintetica delle cellule. In particolare si deve notare che al variare delle suddette variabili, che possono essere definite come vere e proprie variabili di processo, non si ha una legge monotona nel senso che esistono delle regioni di ottimo: cioè degli intervalli in cui variano tali parametri in cui si ha un massimo nel trasporto. Ciò induce a studiare dei gruppi dimensionali attraverso i quali si possa indicare a priori quali siano tali intervalli e nei quali si è sicuri di avere un trasporto di nutrienti efficiente⁶.

Per raggiungere tale obiettivo si schematizzato il materiale in una geometria monoassiale confinata (**figura 37**).

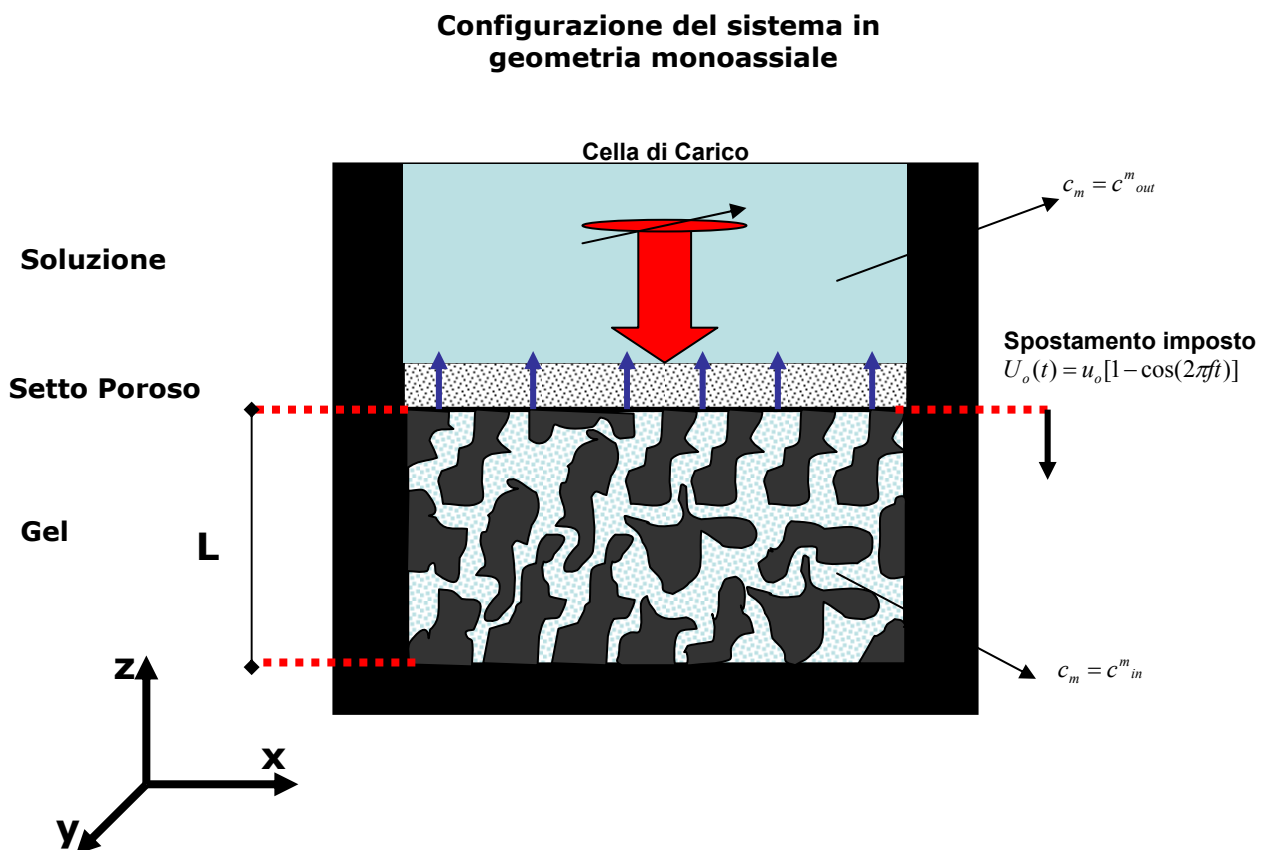


Figura 37

La teoria per descrivere tale comportamento viene mutata dalla teoria dei sistemi multifasici descritta nel capitolo 2, risolvendo le equazioni di campo in geometria monoassiale. Inoltre il sistema viene considerato come composto da tre fasi: matrice solida (s), fluido interstiziale (f), soluto neutro (m). Nella teoria delle miscele note che siano per la fase α il numero di moli n^α il volume V^α e la massa m^α , si ha:

$$\begin{aligned}
 V^\alpha &= \sum_\alpha V^\alpha \text{ Volume -totale} \\
 \varphi^\alpha &= \frac{dV^\alpha}{V} \text{ Frazione Volumetrica} \\
 \rho^\alpha &= \frac{dm^\alpha}{V} \text{ Densità Apparente} \\
 \rho_T^\alpha &= \frac{dm^\alpha}{V^\alpha} \text{ Densità Reale} \\
 \tilde{c}^\alpha &= \frac{dn^\alpha}{V} \text{ Concentrazione su Volume Totale} \\
 c^\alpha &= \frac{dn^\alpha}{V^f} \text{ Concentrazione nella fase fluida} \\
 M^\alpha &= \frac{dm^\alpha}{n^\alpha} \text{ Peso molecolare}
 \end{aligned} \tag{30}$$

Il peso molecolare è costante per ogni fase, ma siccome ogni fase è assunta essere intrinsecamente anche la densità reale è costante per cui si può scrivere:

$$\sum_\alpha \varphi^\alpha = 1, \quad \rho^\alpha = \varphi^\alpha \rho_T^\alpha, \quad \tilde{c}^\alpha = \varphi^f c^\alpha = \frac{\rho^\alpha}{M^\alpha}, \tag{31}$$

Le equazioni di bilancio per un campione cilindrico posto come in **figura 37** in compressione confinata e a contatto con una soluzione contenente lo stesso soluto ma eventualmente a concentrazione diversa le equazioni di campo derivanti dalla teoria multifasica^{7,8}, sono date da:

$$\underline{\nabla} \cdot \underline{\underline{\sigma}}_T = 0 \tag{32}$$

$$-\rho^f \underline{\nabla} \mu^f + f_{fs} (v_s - v_f) + f_{fm} (v_f - v_s) = 0 \tag{33}$$

$$-\rho^m \underline{\nabla} \mu^m + f_{ms} (v_s - v_m) + f_{fm} (v_m - v_f) = 0 \tag{34}$$

$$\underline{\nabla} \cdot (\varphi^s \underline{v}^s + \varphi^f \underline{v}^f) = 0 \tag{35}$$

$$\frac{\partial \rho^\alpha}{\partial t} = -\underline{\nabla} \cdot (\rho^\alpha \underline{v}^\alpha) \tag{36}$$

L'equazione 3 rappresenta il bilancio totale della quantità di moto, la seconda e la terza rappresentano il bilancio della quantità di moto sulla fase fluida e sul soluto espressa in termini della termodinamica dei processi irreversibili, la quarta equazione è il bilancio totale di massa mentre l'ultima è il bilancio di massa sulla fase fluida e sul soluto. I coefficienti $\phi_{\alpha\beta}$ rappresentano coefficienti di attrito tra le fasi che si muovono di moto relativo con velocità $v^\alpha - v^\beta$. A questo punto, sempre dalla meccanica del continuo e dalla termodinamica seguono rispettivamente le equazioni costitutive per il tensore degli sforzi e per i potenziali chimici:

$$\underline{\underline{\sigma}} = -p\mathbf{I} + \lambda_s (tr\mathbf{E}) + 2\mu_s \mathbf{E} \quad (37)$$

$$\mu^f = \mu_0^f + \frac{1}{\rho_T^f} (p - RT\Phi c^m) \quad (38)$$

$$\mu^m = \mu_0^m + \frac{RT}{M_m} \ln a^m \quad (39)$$

Dove \mathbf{E} è il tensore delle deformazioni λ_s e μ_s sono le costanti di Lamè della matrice solida, a^m il coefficiente di attività, R la costante dei gas e T la temperatura assoluta. Se il sistema è schematizzabile come monodimensionale tutte le grandezze sono funzioni solo della variabile z (**figura 1**) e del tempo t . Sostituendo quindi le equazioni costitutive nell'equazioni di bilancio si ottiene il seguente set di equazioni differenziali:

$$-\frac{\partial p}{\partial z} + Ha \frac{\partial u}{\partial z} = 0 \quad (40)$$

$$-\varphi^f \frac{\partial p}{\partial z} + \varphi^f RT \frac{\partial c^m}{\partial z} + f_{fs} (v_s - v_f) + f_{fm} (v_m - v_f) = 0 \quad (41)$$

$$-\varphi^f RT \frac{\partial c^m}{\partial z} + f_{sm} (v_s - v_m) + f_{fm} (v_f - v_m) = 0 \quad (42)$$

$$\frac{\partial}{\partial z} [\varphi^f v^f + \varphi^s v^s] = 0 \quad (43)$$

$$\frac{\partial}{\partial t} (\varphi^f c^m) + \frac{\partial}{\partial z} (\varphi^f c^m v^m) = 0 \quad (44)$$

Tale sistema di equazioni può essere risolto rispetto alle variabili incognite: pressione, concentrazioni e velocità delle specie, ma si presta a qualche semplificazione se si riconosce che integrando la (14) $[\varphi^f v^f + \varphi^s v^s] = C(t)$, dove la costante può essere determinata in punto qualsiasi del dominio e si ottiene:

$$v^f = -\frac{\varphi^s}{\varphi^f} v^s + \frac{1}{\varphi^f} \dot{U}_o(t) \quad (45)$$

Dalla teoria della termodinamica irreversibile si pone che:

$$D_{fm} = \frac{\varphi^f F T c^m}{f_{fm}}; \quad D_{sm} = \frac{\varphi^s F T c^m}{f_{sm}}; \quad K = \frac{(\varphi^f)^2}{f_{fs}} \quad (46)$$

In cui le D_{ij} sono i coefficienti di diffusione e K è la conducibilità idraulica. Mentre si definisce un coefficiente di diffusione globale del soluto contro il soluto ed il solvente. Dalla combinazione delle precedenti relazioni si ottengono due equazioni differenziali che costituiscono quelle risolutive del problema:

$$\frac{\partial^2 u}{\partial z^2} - \left[\frac{1}{K} + \left(1 - \frac{D}{D_{lm}}\right) \frac{RT}{H} \frac{c^m}{\varphi^l D_{lm}} \right] \left(\frac{\partial u}{\partial t} + \dot{U} o \right) - \left(1 - \frac{D}{D_{lm}}\right) \frac{RT}{H} \frac{\partial c^m}{\partial z} = 0 \quad (47)$$

$$\frac{\partial c^m}{\partial t} - D \frac{\partial^2 c^m}{\partial z^2} + \left(1 - \frac{D}{\varphi^l D_{lm}}\right) \frac{\partial}{\partial z} \left[c^m \frac{\partial u}{\partial t} \right] - \frac{D \dot{U} o}{\varphi^l D_{lm}} \frac{\partial c^m}{\partial z} = 0 \quad (48)$$

Per il flusso della specie m si ottiene che:

$$c^m (v^m - v^s) = -D \frac{\partial c^m}{\partial z} - \frac{D}{\varphi^l D_{lm}} c^m (v^s + \dot{U} o) \quad (49)$$

Sollecitando il sistema a $z=0$, è facile verificare che la costante di integrazione dell'equazione di continuità è nulla, per cui le equazioni a cui si farà riferimento sono le seguenti:

$$\frac{\partial^2 u}{\partial z^2} - \left[\frac{1}{K} + \left(1 - \frac{D}{D_{lm}}\right) \frac{RT}{H} \frac{c^m}{\varphi^l D_{lm}} \right] \frac{\partial u}{\partial t} - \left(1 - \frac{D}{D_{lm}}\right) \frac{RT}{H} \frac{\partial c^m}{\partial z} = 0 \quad (50)$$

$$\frac{\partial c^m}{\partial t} - D \frac{\partial^2 c^m}{\partial z^2} + \left(1 - \frac{D}{\varphi^l D_{lm}}\right) \frac{\partial}{\partial z} \left[c^m \frac{\partial u}{\partial t} \right] = 0 \quad (51)$$

$$c^m (v^m - v^s) = -D \frac{\partial c^m}{\partial z} - \frac{D}{\varphi^l D_{lm}} c^m v^s \quad (52)$$

Inoltre volendo disaccoppiare il problema del trasporto da quello meccanico, considerando cioè che variazioni della pressione osmotica del fluido e quindi della concentrazione dei soluti non influenza la configurazione meccanica del gel (trasporto passivo) si ottiene una ulteriore semplificazione:

$$\frac{\partial^2 u}{\partial z^2} - \frac{1}{KH} \frac{\partial u}{\partial t} = 0 \quad (53)$$

$$\frac{\partial c^m}{\partial t} - D \frac{\partial^2 c^m}{\partial z^2} + \frac{\partial}{\partial z} (c^m v^f) = 0 \quad (54)$$

$$c^m (v^m - v^f) = -D \frac{\partial c^m}{\partial z} \quad (55)$$

In questa configurazione è possibile risolvere prima la (24) da cui si calcola il campo degli spostamenti, da questo è possibile risalire al campo di velocità della fase fluida e quindi entrare nel trasporto di massa (25) per conoscere le distribuzioni delle concentrazioni ad ogni tempo nello spazio. A tale scopo è bisogna definire opportune condizioni ai limiti;

$$a) \quad z = 0, \forall t \quad u = U_0(1 - \cos(\omega t)); \quad c^m = c_0^m \quad (56)$$

$$b) \quad z = L, \forall t \quad \left. \frac{\partial u}{\partial z} \right| = 0; \quad \left. \frac{\partial c}{\partial z} \right| = 0; \quad v^f = 0 \quad (57)$$

$$c) \quad t=0; \quad \forall z \quad u = 0; \quad v^f = 0; \quad c^m = c_{in}^m \quad (58)$$

La risoluzione delle equazioni differenziali è stata effettuata con uno schema alle differenze finite scritto in Matlab®. Il metodo di discretizzazione utilizzato è stato realizzato con vari ordini di approssimazione, e cioè è stato realizzato uno schema esplicito del primo ordine, uno schema esplicito del secondo ordine ed infine uno schema implicito del secondo ordine che garantiva la stabilità della soluzione numerica. La discretizzazione delle derivate è la seguente:

$$\left. \frac{\partial u}{\partial z} \right|_i = \frac{u_{(i+1)} - u_{(i-1)}}{2\Delta x} \quad (59)$$

$$\left. \frac{\partial^2 u}{\partial z^2} \right|_i = \frac{u_{(i+1)} - 2u_{(i)} + u_{(i-1)}}{\Delta x^2} \quad (60)$$

$$\left. \frac{\partial u}{\partial t} \right|_i^n = \frac{u_{(i)}^{n+1} - u_{(i)}^n}{\Delta t} \quad (61)$$

3.3.2 Validazione del modello attraverso prove sperimentali: prove in compressione confinata

Per vedere la consistenza del modello sono state effettuate delle simulazioni che riproducono prove sperimentali effettuate su gel di agarosio, e si è visto se attraverso una procedura di fitting si riesce a risalire a dei parametri di letteratura relativi a questo materiale. I parametri che si vuole determinare sono conducibilità idraulica K e modulo elastico H .

Per perseguire questo scopo sono state condotte delle prove di stress-relaxation incrementale (descritte in dettaglio nel capitolo 5) su gel di agarosio al 3% 4% e 5% in peso preparati a partire da una soluzione acquosa di agarosio in polvere e acqua distillata. Lo schema sperimentale è quello descritto in **figura 37**. Per fornire la

compressione desiderata e leggere il carico si è utilizzata una macchina dinamo-metrica DYNASTAT Imass Inc.

Materiali e Metodi

Polvere di agarosio (Sigma) è stata sciolta in acqua in diverse proporzioni al fine di raggiungere le composizioni desiderate di agarosio nella miscela: 3%, 4% e 5%. La soluzione che inizialmente si presenta molto viscosa ed eterogenea necessita di essere posta ad una temperatura di circa 90°C al fine di ottenere una completa miscelazione tra agarosio ed acqua. Raggiunta la miscelazione, la soluzione viene colata in appositi stampi cilindrici dalle dimensioni pari a: $D = 10 \text{ m}$, $L = 1 \text{ mm}$. Tali stampi vengono posti poi in frigorifero a 4°C per 15 min. A tale temperatura l'agarosio forma un gel fisico che è stabile fino a 4 =°C. I campioni ottenuti possono essere così testati meccanicamente.

La prova meccanica prevede l'alloggiamento del campione in una camera cilindrica dello stesso diametro in modo da ottenere un sconfinamento laterale. Sulla parte superiore è posto un setto poroso che offre una bassa resistenza al trasporto dei fluidi e sul quale viene applicato lo spostamento che si trasmette poi al campione. Il setto poroso è infinitamente più rigido dell'agarosio per cui possiamo assumere che lo spostamento si trasmette interamente al materiale. Dallo stesso lato vi è posta una cella di carico che registra lo sforzo durante l'applicazione del carico.

L'esperimento viene condotto impostando i parametri delle sollecitazione in modo tale che si abbia una deformazione pari al 5% in 30 secondi e mantenendo tale deformazione per un tempo sufficientemente lungo. Durante la fase di compressione si registra un aumento dello sforzo che raggiunge un picco alla fine della rampa di deformazione. Da questo punto in poi lo sforzo rilassa fino ad un valore di equilibrio, e quando viene raggiunto il plateau la prova viene arrestata.

La storia di carico registrata viene soggetta ad una procedura di curve-fitting con la curva teorica di stress-relaxation prodotta dal modello il quale viene fatto girare portando come variabile di fitting la conducibilità idraulica K . Il modulo elastico viene fornito come dato di input essendo per definizione il valore dello sforzo residuo diviso la deformazione applicata.

Risultati

Per determinare lo sforzo attraverso le simulazioni si risolve la (24) con le seguenti condizioni ai limiti:

$$u(L,t) = \begin{cases} V_o t & t \in [0, t_o] \\ V_o t_o & t \in [t_o, t] \end{cases}$$
$$u(0,t) = 0; \forall t \tag{62}$$

$$u(z,0) = 0; \forall z$$

Determinato il campo degli spostamenti $\mathbf{u}(\mathbf{z},t)$ che rispetta le condizioni ai limiti precedenti, è possibile determinare lo sforzo all'interfaccia che è poi la grandezza che si va a misurare. Tale sforzo è dato dalla relazione costitutiva del materiale valutata all'interfaccia:

$$\sigma|_{\text{int}} = -H \frac{\partial u}{\partial z} \Big|_{z=L} \quad (63)$$

In **figura 18** sono mostrati i risultati di una simulazione dove sono stati imposte tre rampe di sollecitazione consecutiva (**figura 38-a**). Successivamente è mostrata la soluzione del campo degli spostamenti lungo tutto il dominio (**figura 38-b**) attraverso la quale è possibile poi ricavare le derivate spaziali e temporali della \mathbf{u} . Lo sforzo del materiale è mostrato in **figura 38-c** dove si vede il comportamento visco-elastico del materiale dovuto in questo caso non a rilassamenti di catene macromolecolari ma ad un redistribuzione dei fluidi all' interno del. Sperimentalmente il materiale si comporta allo stesso modo ed in **figura 39-40-41** sono mostrati i risultati delle prove sperimentali con i relativi fitting per agarosio 3-4-5%. I risultati del fitting sono riassunti in tabella e confrontati con valori di letteratura⁹ per gli stessi materiali utilizzati, dove le misure di permeabilità sono state condotte con prove indipendenti.

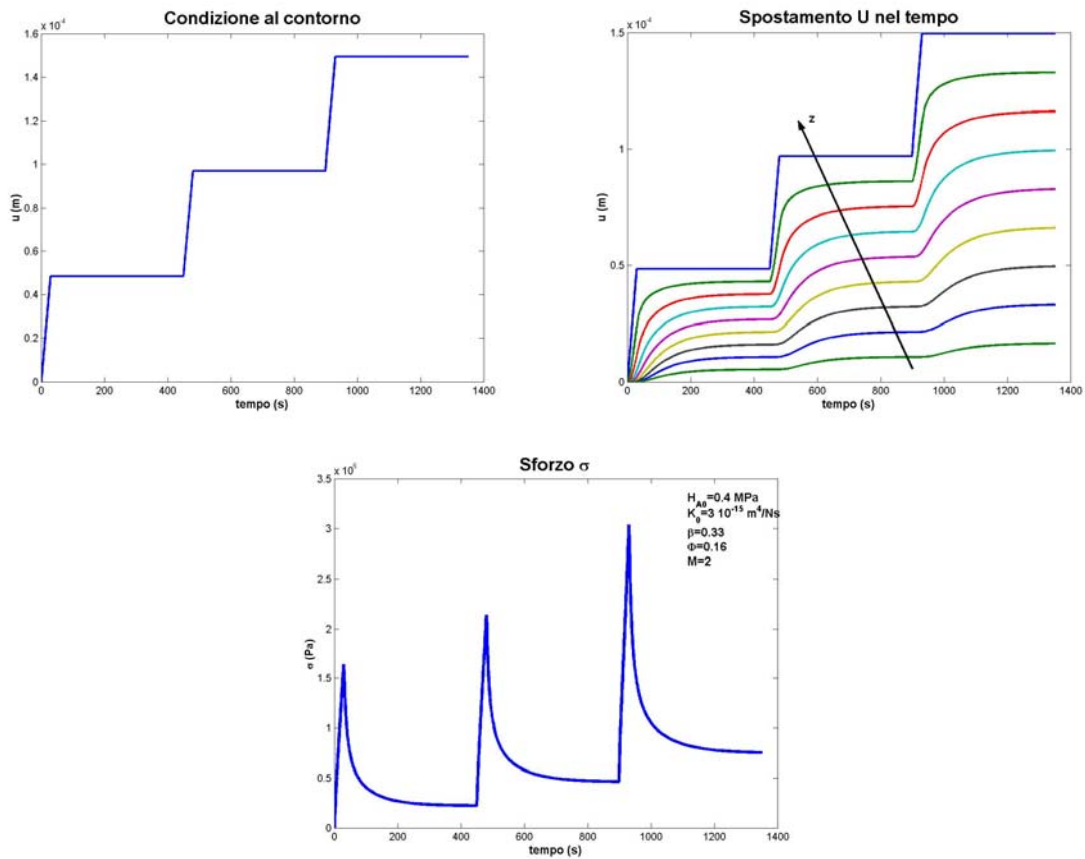


Figura 38 a: spostamento imposto, b: distribuzione del campo degli spostamenti, c: sforzo all'interfaccia

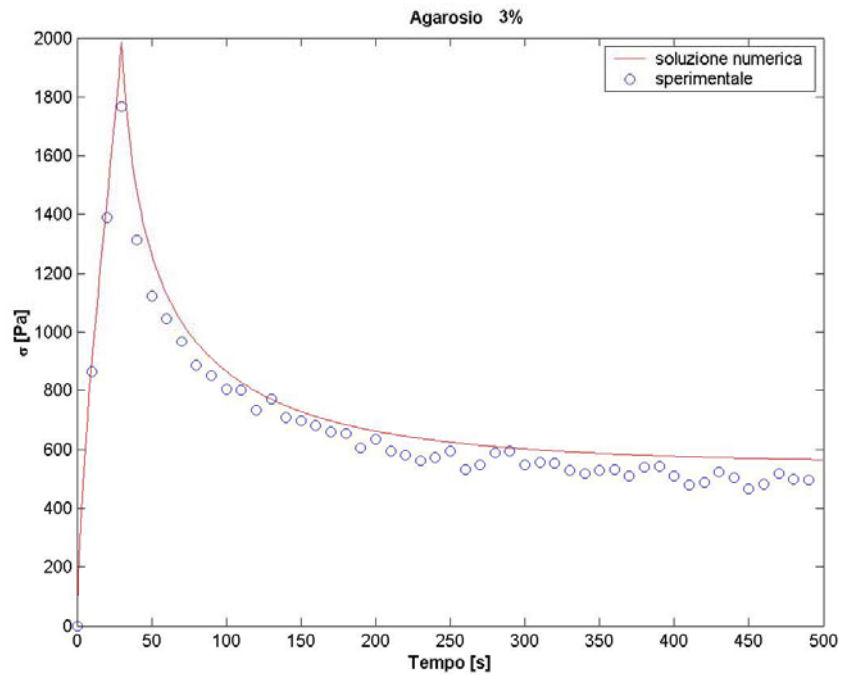


Figura 39 Curve fittine di gel di agarosio 3%.

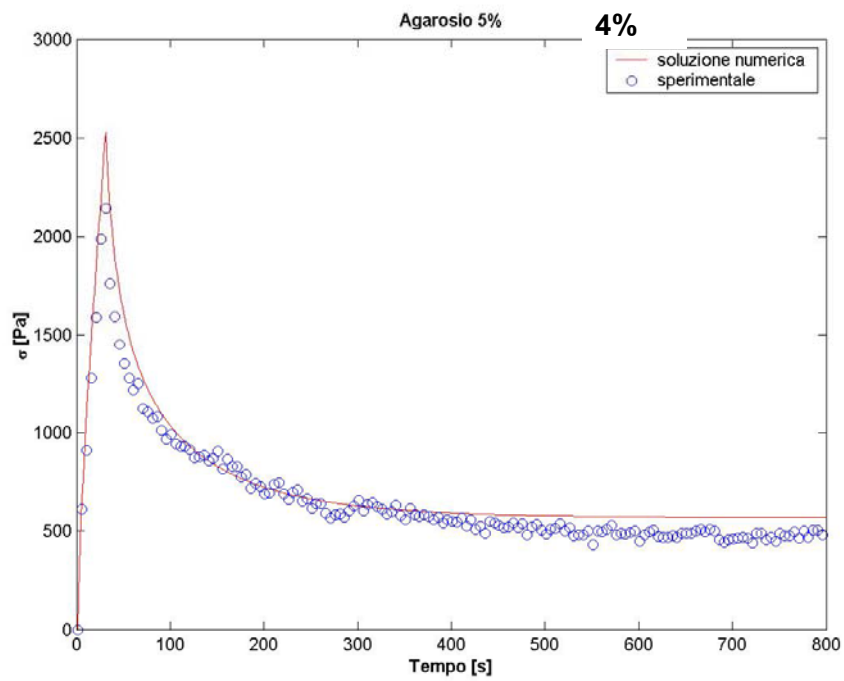


Figura 40 Curve fittine di gel di agarosio 4%.

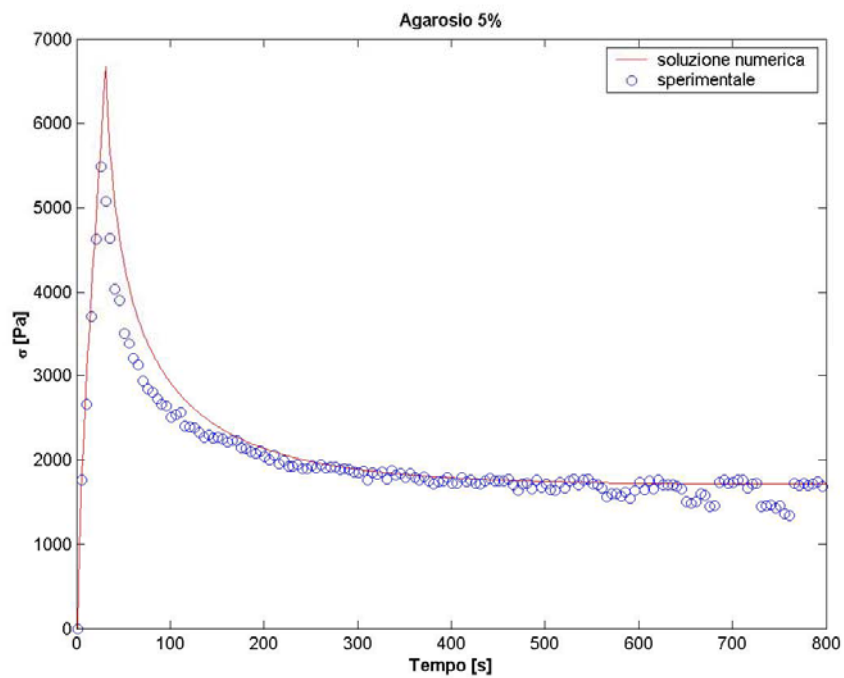


Figura 41 Curve fittine di gel di agarosio 5%.

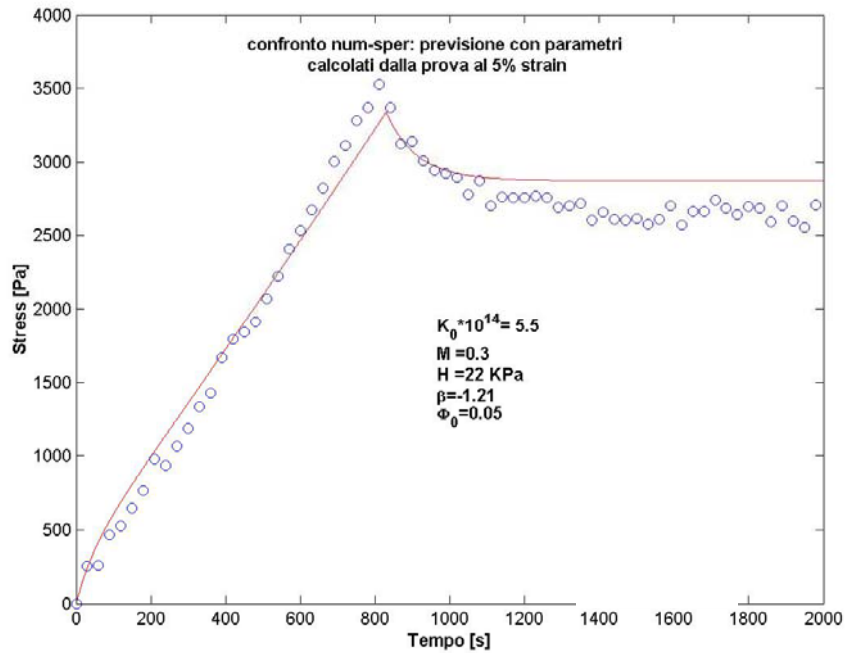


Figura 42 Previsione del comportamento meccanico di gel di agarosio utilizzando i parametri di fitting delle curve precedenti.

Concentrazione di	Modulo Elastico [KPa]		Conducibilità Idraulica [m^4/Ns]	
Agarosio				
3%	10^9	9.2 ^a	$10.1 \cdot 10^{-14}$, ⁹	$20.1 \cdot 10^{-14}$, ^a
4%	15^9	14.56 ^a	$6.6 \cdot 10^{-14}$, ⁹	$15.2 \cdot 10^{-14}$, ^a
5%	30^9	30.3 ^a	$3.1 \cdot 10^{-14}$, ⁹	$6.6 \cdot 10^{-14}$, ^a

Tabella 3 Valori dei moduli elastici e della conducibilità idraulica tra i dati di letteratura (9) e quelli relativi ai fitting (a).

La discrepanza tra i valori di conducibilità può essere attribuita al fatto che nei test meccanici il rilassamento può essere dovuto anche ad effetti visco-elastici veri e propri i quali non sono contemplati nella equazione costitutiva del materiale. I dati relativi alla letteratura inoltre, sono stati effettuati con prove di perfusione diretta nei quali non vengono contemplate gli stati tensionali indotti nel materiale durante la perfusione, quindi ci si aspetta una discrepanza tra i due approcci. Inoltre per avere un ulteriore verifica che il modello possa descrivere il comportamento di mezzi bifasici, è stata effettuata un previsione dell'andamento di un campione di agarosio soggetto ad una deformazione del 10% con una velocità di deformazione più bassa (10% in 800s anziché

5% in 30 s), sfruttando i dati riportati in tabella 1. In **figura 40** è mostrato l'andamento di questa analisi e si nota un buon accordo tra pervisionee dati sperimentali.

3.3.3 Trasporto dei soluti.

Durante i processi di coltura dinamica, come visto nei paragrafi precedenti, gli espianti o i tessuti sono immersi in mezzi di coltura nei quali sono presenti diversi fattori di crescita i quali hanno lo scopo di fornire alla cellula i nutrienti opportuni per il differenziamento. Sia in vivo che in vitro in condizioni statiche, il trasporto di sostanze ad alto peso molecolare è affidato al meccanismo della diffusione passiva il quale è in genere molto lento, quindi rispetto ai tempi della sollecitazione dinamica non si spiegherebbero significativi aumenti dell'attività biosintetica cellulare dovuto al trasporto di nutrienti. Infatti a parità di tutte le condizioni di processo se una macromolecola ha un coefficiente di diffusione di $0.4 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ affinché un disco di cartilagine con raggio pari a 2mm raggiunga una configurazione di equilibrio con la concentrazione esterna ci vogliono circa 48h. Da molti risultati sperimentali invece, già nelle prime ore della sollecitazione si osserva un aumento dell'attività biosintetica cellulare. Tale aumento può essere dovuto sia alla mecano-transduction, sia ad un aumento del trasporto macromolecolare che in presenza di sollecitazioni cicliche vede intervenire anche un trasporto di tipo convettivo. Pertanto riuscire a quantificare in termini matematici quali sono i guadagni che si ottengono nei tempi per il trasporto macromolecolare è di notevole interesse scientifico per igegnerizzare i processi produttivi di tessuti. Per quanto visto precedentemente non si può prescindere da modelli contemplano l'accoppiamento tra meccanica e trasporto essendo i campi di velocità indotti da deformazioni meccaniche. Facendo sempre riferimento alla **figura 37**, ciò che si vuole modellare è lo svuotamento di una macromolecola caricata in un sistema bifasico con una concentrazione C_0 che si trovi a contatto con una soluzione a concentrazione nulla della specie in esame. Lo studio che viene effettuato è quello di analizzare lo svuotamento della macromolecola quando il sistema viene sollecitato dinamicamente e di studiare gli effetti rispetto alla diffusione passiva, quando non c'è sollecitazione.

Il sistema è caratterizzato da diversi fenomeni ed ognuno dei quali da un proprio tempo caratteristico. Definiamo i tempi caratteristici del sistema:

$$T_d = \frac{L^2}{D} \quad \text{Tempo Caratteristico della diffusione} \quad (64)$$

$$T_p = \frac{L^2}{KH} \quad \text{Tempo Caratteristico della redistribuzione dei fluidi} \quad (65)$$

$$T_{dp} = \frac{D}{KH} \quad \text{Rapportotra } T_p \text{ e } T_d \quad (66)$$

I tempi caratteristici della sollecitazione sono:

$$t \quad \text{Tempo attuale} \quad (67)$$

$$f \quad \text{Frequenza della sollecitazione} \quad (68)$$

Si può decidere di studiare il sistema attraverso due tempi dimensionali:

$$\hat{t}_d = \frac{t}{T_d} \quad (69)$$

$$\hat{t}_p = \frac{t}{T_p} \quad (70)$$

e due frequenze adimensionali

$$\hat{f}_d = fT_d \quad (71)$$

$$\hat{f}_p = fT_p \quad (72)$$

3.3.4 Influenza dei parametri sul trasporto: implicazioni nel processo

In questa sezione verranno mostrati i risultati relativi alle simulazioni derivanti dalla risoluzione delle equazioni 50-51. Si è voluto analizzare il processo di svuotamento di un gel inizialmente caricato con una concentrazione di soluto C_o , coefficiente di diffusione pari a $D = 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$. Il processo di scarica è dovuto alla diffusione passiva nel caso di simulazioni prive di sforzo imposto mentre è contemplato il processo di diffusione + convezione indotta nei campioni in cui è presente la sollecitazione. La sollecitazione è caratterizzata da una forzante sinusoidale della quale sono state fatte variare la frequenza e l'ampiezza. In **figura 43** e **44** sono mostrate le distribuzioni delle concentrazioni nel spazio e nel tempo nel caso stato e nel caso dinamico. Si nota la netta differenza tra i profili temporali e spaziali nel mezzo. In condizioni statiche, non solo c'è una distribuzione diversa del profilo delle concentrazioni, ma si nota che in condizioni dinamiche c'è una sempre una concentrazione minore nel sistema. In figura 23 è mostrato la diminuzione della massa ad un tempo sufficiente per vedere un profilo (10000 s) ottenuta come post-processing integrando la concentrazione sul volume del materiale. Le curve sono parametriche nella frequenza e sinora che all'aumentare della frequenza la diminuzione della massa diviene sempre più rapida. L'ampiezza della

sollecitazione è pari a 5%. In figura 23-25-25-26 sono mostrate le cinetiche parametrizzate nella frequenza e nell' ampiezza la quale varia fino al 20%. Si nota globalmente un trend: all' aumentare della frequenza e della ampiezza la cinetica di svuotamento è sempre più veloce.

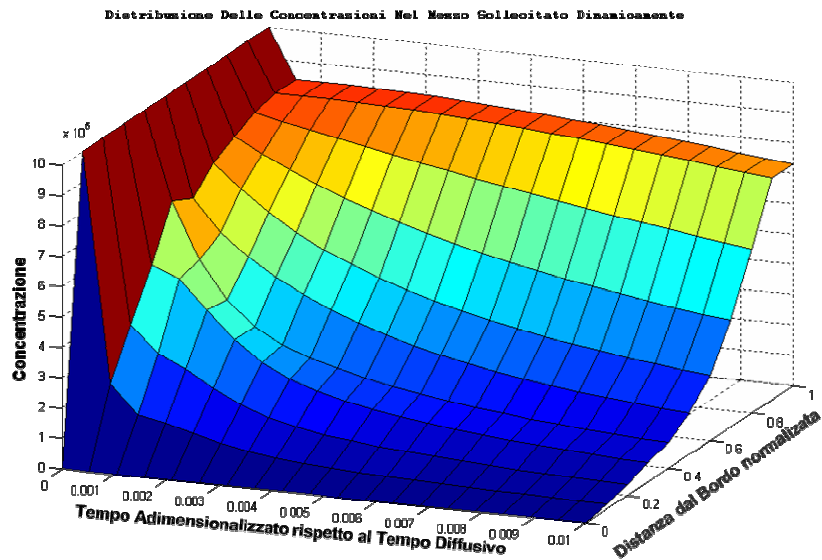


Figura 43 Distribuzione spaziale e temporale del soluto in gel sottoposto a deformazione meccanica.

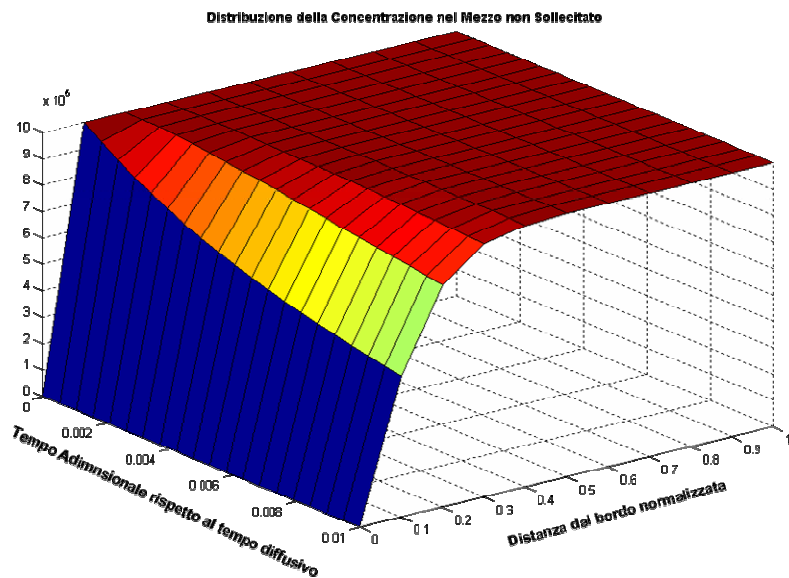


Figura 44 Distribuzione spaziale e temporale del soluto in gel non sottoposto a deformazione meccanica

È interessante notare che ad alte frequenze e ad ampiezze elevate c'è una inversione di tendenza nella cinetica di rilascio. Mentre all'aumentare della frequenza e della ampiezza ci sono cinetiche più veloci, si nota che in **figura 48** la curva relativa alla frequenza 0.1Hz, scavalca le curve a frequenza minore risultando in un meccanismo di trasporto più lento. Questa osservazione è consistente con il fatto che materiali bi-fasici, quando sono sollecitati con frequenze alte e alte deformazioni, rispondono in maniera "vetrosa", confinando i moti convettivi in zone più ristrette del sistema. Sebbene i campi di velocità siano più spinti, la quantità di materia trasportata è minore risultando in una minore massa uscita dal sistema. Tale risultato è più evidente in **figura 49** dove è mostrata la massa presente a 10000s nel sistema in funzione della frequenza parametrica nella ampiezza.

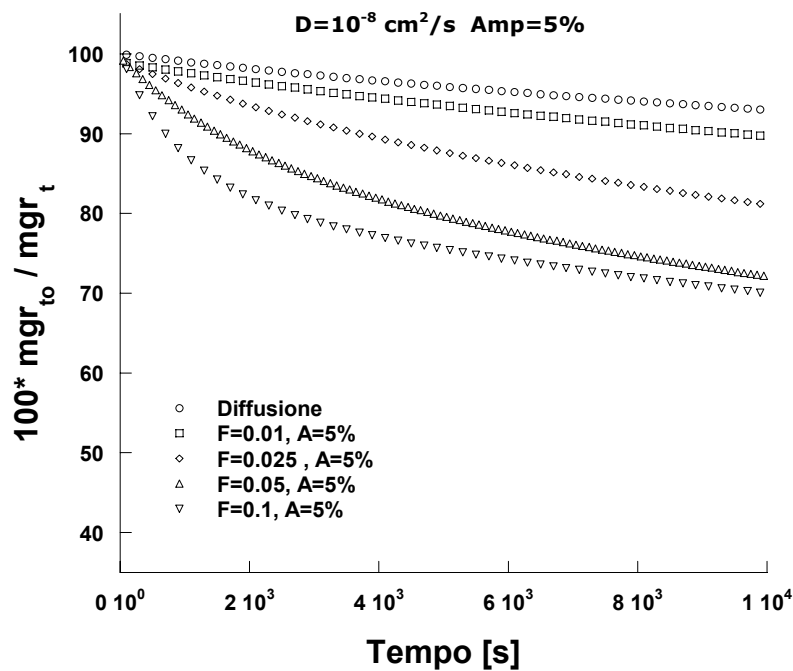


Figura 45 Andamento della massa totale nel gel in funzione della frequenza sottoposto ad una deformazione del 5%.

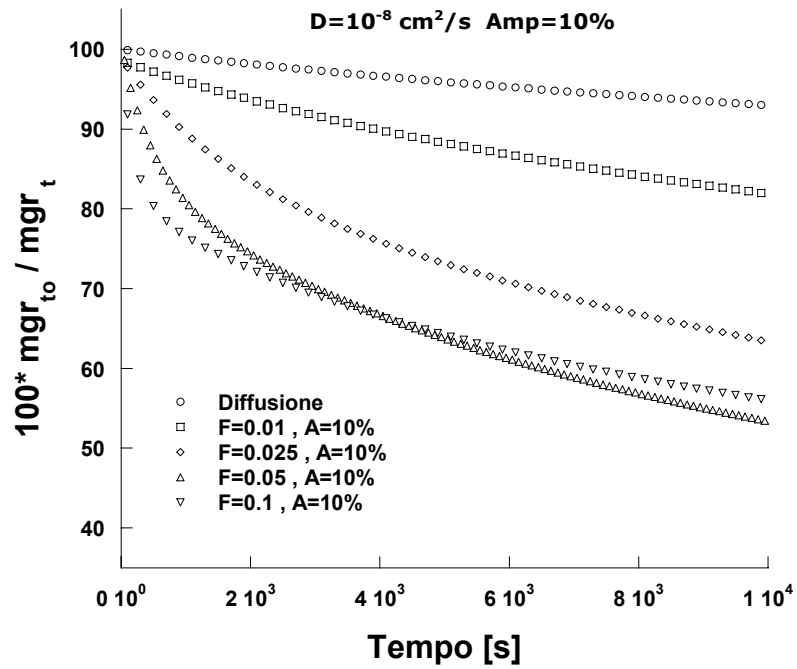


Figura 46. Andamento della massa totale nel gel in funzione della frequenza sottoposto ad una deformazione del 10%.

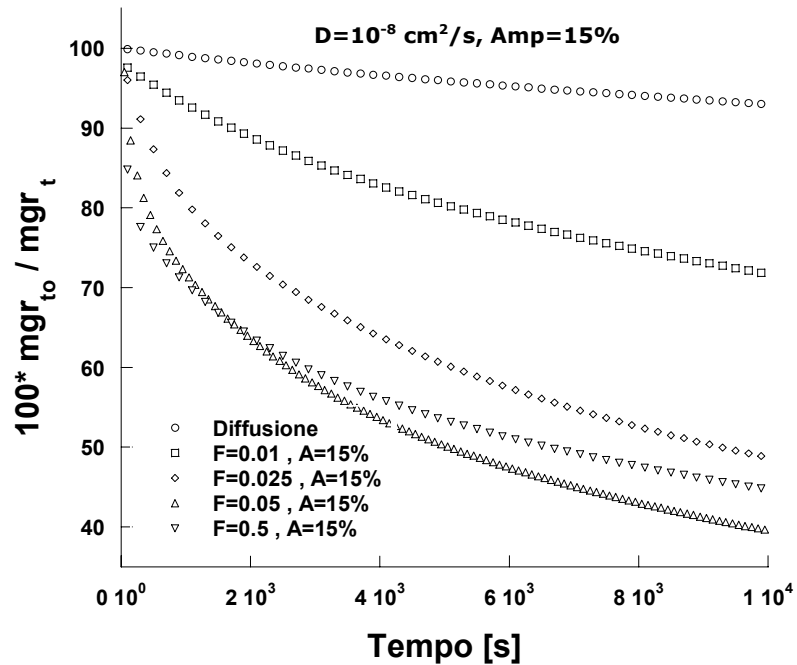


Figura 47. Andamento della massa totale nel gel in funzione della frequenza sottoposto ad una deformazione del 15%

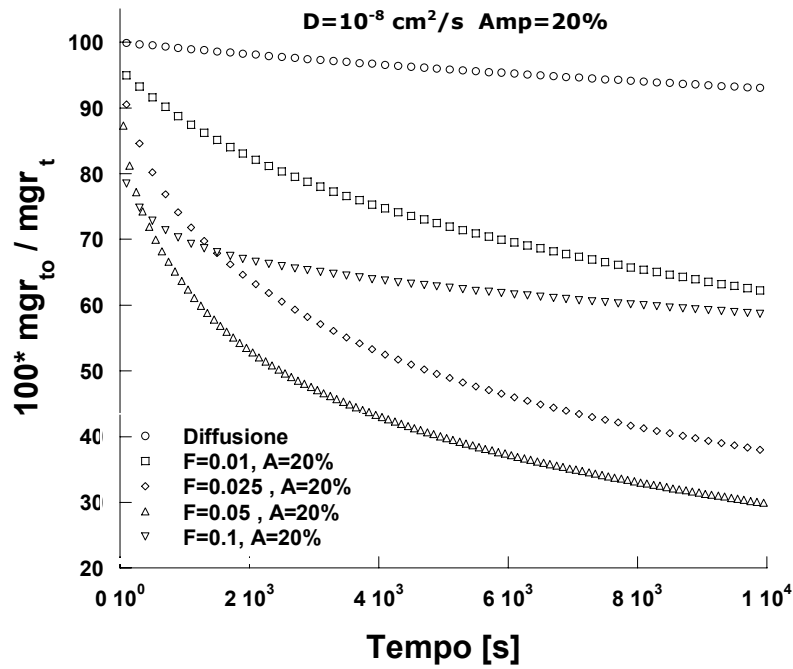


Figura 48 Andamento della massa totale nel gel in funzione della frequenza sottoposto ad una deformazione del 20%.

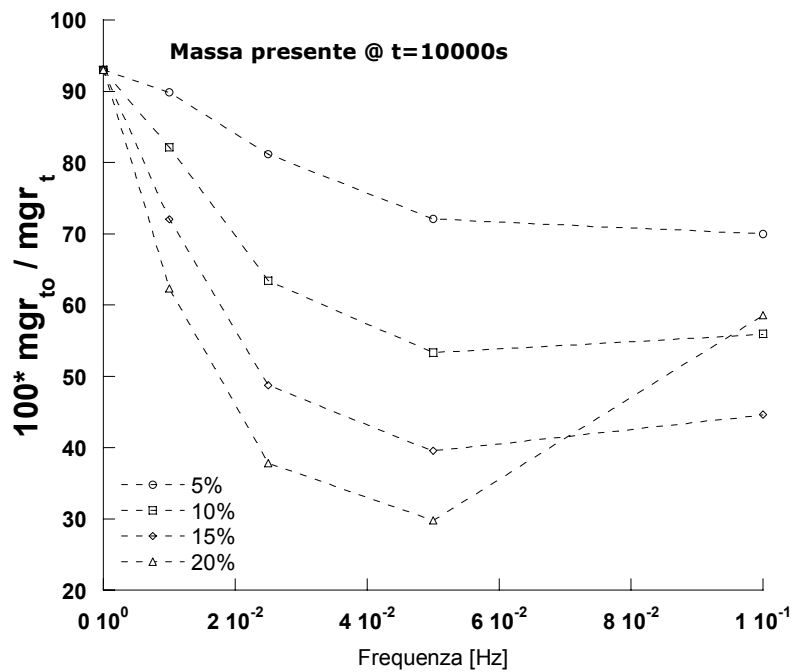


Figura 49. Confronto della massa presente nel sistema al tempo $t = 10000$ secondi in funzione della frequenza e dell'ampiezza della sollecitazione.

CAPITOLO 4

Evoluzione spaziale e temporale delle proprietà di trasporto in agarosio – condrociti.

4.1 Introduzione

La possibilità di potere coltivare in vitro delle popolazioni cellulari è una scommessa verso la rigenerazione di organi danneggiati che altrimenti sarebbe difficile o quasi impossibile con le tecniche della medicina classica. Il maggiore ostacolo alla ingegnerizzazione dei processi produttivi è la limitata conoscenza dell' influenza dei parametri sulla crescita del tessuto. La crescita del tessuto in vitro è il risultato di un complesso intreccio tra proliferazione cellulare, biosintesi di ECM, interazione cellula materiale e microambiente metabolico. In particolare, la velocità alla quale il neo-tessuto è prodotto, è strettamente legata alle variabili ambientali quali pH, pO₂, glucosio e livello di molecole bioattive che dipende dalla permeabilità dello scaffold. D' altro canto, l' attività biosintetica delle cellule influenza l' ambiente metabolico poiché le proprietà di trasporto del costruito cambiano come conseguenza della produzione di nuova matrice all' interno del materiale. E' stato postulato che la resistenza al trasporto dei fluidi dipende principalmente dal contenuto dei glicosamminogilcani nella matrice extracellulare⁵⁷⁻⁵⁹. Quindi ci sia spetta una correlazione tra l' ammontare di GAG e la resistenza al trasporto dei fluidi.

Durante lo sviluppo del tessuto in vitro, il deposito di matrice extracellulare può portare ad una alterazione della velocità della diffusione molecolare e quindi ad avere un influenza indiretta sul metabolismo e la biosintesi dei condrociti. In casi estremi il deposito di matrice può indebolire il trasporto di metaboliti e prodotti di scarto del metabolismo attraverso lo scaffold inducendo ad una minore vitalità e zone necrotiche⁴. Per evitare questi problemi una vasta gamma di bioreattori è stata utilizzata per aumentare l'efficienza del trasporto dei fluidi e dei soluti attraverso il tessuto in crescita⁵. L' idea che si sta sviluppando oggi è che controllare le condizioni del processo del tessuto può portare ad una corretta rigenerazione del tessuto⁶¹. Comunque, per comprendere al meglio come progettare un processo di rigenerazione è necessaria una profonda conoscenza dell' evoluzione spaziale e temporale delle proprietà meccaniche e di trasporto in funzione dei componenti della matrice extracellulare. La mancanza di

correlazioni tra misure macroscopiche dei componenti della matrice extracellulare e le proprietà di trasporto impedisce il miglioramento della funzionalità dei costrutti di cartilagine ingegnerizzati. In questo studio teorico-sperimentale viene affrontato il problema di correlare le proprietà di trasporto convettivo -diffusivo in costrutti di agarosio condrociti, con la formazione di matrice. La variazione di tali parametri viene correlata con la produzione dei GAG e confortata da analisi isologiche che dimostrano la formazione di neo-tessuto.

4.2 Materiali e metodi

4.2.1 Estrazione dei condrociti

Pezzi di cartilagine sono stati rimossi dalla articolazione metacarpale di bovini di 18 mesi forniti da un mattatoio locale. I pezzi di cartilagine sono stati finemente suddivisi e incubati a 37°C per 1h in mezzo di Dulbecco (Sigma) con 20% di siero FCS (Sigma) e 700 U/ml di pronase (Calbiochem), e per 16h a 37°C in DMEM, 20% FCS, 100 U/ml di Collagenase (Sigma). Il sovrinatante contenente i condrociti rilasciati, fu passato attraverso un setaccio di 70 μ m (Falcon) lavato tre volte in DMEM, e sospeso a 20 10^6 cellule/ml Il numero totale di cellule fu determinato e la vitalità attraverso esclusione del TripanBlue (Sigma) su Neubauer Chamber.

4.2.2 Preparazione dello scaffold e coltura

La sospensione di condrociti, fu addizionata ad un volume uguale di agarosio 6% tipo VII (Sigma) in EBSS per fornire una densità totale di 10^6 cellule/ml in agarosio al 3%. La sospensione di agarosio condrociti fu colata tra due barrette di vetro spaziate da una membrana di silicone di 1mm e poste in frigorifero per 15 min. Dopo la gelificazione dalle barre di gel sono stati prelevati 20 dischi con diametro di 10mm.

Ogni disco è stato messo a contatto con mezzo di coltura (DMEM high glucose, amminoacidi non essenziali 0.1mM, prolina 0.4mM, glutammica 2mM, penicillina G / streptomicina, Ascorbato 150 μ g/ml, e FCS 20%) a incubati a 37°C , 5% CO₂. Il mezzo fu cambiato ogni 2 giorni e i condrociti coltivati fino a 21 giorni.

4.2.3 Misura del coefficiente di diffusione

Prima delle misure di diffusione, i costrutti cellulari 3D sono stati divisi longitudinalmente e incubati 18h in BSA 68 KDa, o Destrani 500 KDa coniugati con FITC. Dopo l' incubazione si raggiunge una distribuzione omogenea all' interno del costrutto. Le misure del coefficiente di diffusione di entrambi i probes, sono state condotte attraverso FRAP.

Con tale tecnica una regione del costrutto viene esposta brevemente ad un raggio laser causando lo spegnimento della fluorescenza. Il processo di redistribuzione della fluorescenza all'interno della zona spenta, è causato dal moto browniano. Attraverso un'analisi di immagine attraverso Metamorph e MatLab, si riesce a risalire al tempo di redistribuzione delle macromolecole che è collegato al coefficiente di diffusione.

4.2.4 Proprietà meccaniche e di trasporto

I dischi sono stati testati via DynaStat (Imass Inc.) in condizioni di controllo di spostamento (Stress Relaxation Test). L'apparato meccanico è stato interfacciato con un computer attraverso una scheda di acquisizione DAQ PCI-MIO 16XE NATIONAL INSTRUMENTS e controllato via LABVIEW. Ogni disco fu posizionato in una camera impermeabile dello stesso diametro in modo da ottenere una configurazione di compressione confinata. La superficie superiore del campione è stata caricata attraverso un setto poroso che offre poca resistenza al trasporto dei fluidi. Prima di effettuare il test è stata necessaria una compressione lenta del 5% in modo da stabilizzare bene il campione all'interno della camera. Nelle successive fasi di stress relaxation il campione è stato caricato da una sequenza di compressioni relative al 5% della lunghezza iniziale attraverso una rampa della durata di 30s e la velocità di $1.6 \times 10^{-4} \text{ m s}^{-1}$ ed una successiva fase di rilassamento di 500s. L'evoluzione del carico fu registrata attraverso una cella di carico e lo sforzo è stato calcolato dividendo la forza per l'area. Le misure sono state effettuate ogni settimana fino a 21 giorni.

Le curve sperimentali di stress relaxation sono state utilizzate per determinare le proprietà meccaniche e di trasporto dei fluidi dei costrutti: modulo elastico e conducibilità idraulica. La procedura è simile a quella sviluppata da Athesian⁹ e Iatridis¹⁰. Il costrutto è stato modellato come un mezzo bifasico¹¹⁻¹³: tale modello assume che il comportamento visco-elastico osservato nelle prove di stress relaxation è dovuto all'attrito tra la fase solida e fluida che si muovono di moto relativo. Tale coefficiente di attrito è la conducibilità idraulica di Darcy \mathbf{k} , equazione 73⁷⁰:

$$\mathbf{K} = \frac{(\phi^f)^2}{k} \quad (73)$$

dove \mathbf{K} è un tensore definito positivo che descrive il trasporto, k è la conducibilità di circuito aperto e ϕ^f è la frazione volumetrica di fluido. Nel caso di compressione uniassiale la legge costitutiva per la parte simmetrica del tensore degli sforzi è stata sviluppata da Cohen⁶⁶ in equazione 74⁶⁶:

$$\sigma_z^e = \frac{1}{2} H_{A0} \left(\frac{\lambda^2 - 1}{\lambda^{2\beta+1}} \right) \exp[\beta(\lambda^2 - 1)] \quad (74)$$

Dove H_{A0} è il modulo elastico a deformazione nulla e β è un coefficiente che tiene conto della sensibilità alla deformazione; λ è il rapporto di stiramento ed è relazionato alla deformazione assiale $\partial U / \partial Z$ da $\lambda = 1 - \partial U / \partial Z$ dove Z è la coordinata riferita alla configurazione iniziale. La conducibilità idraulica è stata messa in relazione alla deformazione nel caso di deformazioni finite dalla seguente equazione⁵⁰:

$$k = k_0 \left(\frac{\lambda - \phi_0}{1 - \phi_0} \right)^2 \exp[M(\lambda^2 - 1)/2] \quad (75)$$

Nell'equazione 3 la conducibilità idraulica k è relazionata alla deformazione dal coefficiente M che esprime la sensibilità alla deformazione; k_0 è la conducibilità a deformazione nulla e mostra la conducibilità del costrutto in condizioni di free swelling. Utilizzando questo approccio teorico, nel caso monodimensionale è stato possibile ottenere una equazione parabolica non lineare per il campo degli spostamenti equazione 76:

$$\frac{\partial \sigma_z^e}{\partial \lambda} \frac{\partial^2 U}{\partial Z^2} = \frac{\lambda}{k} \frac{\partial U}{\partial t}; 0 < Z < h \quad (76)$$

The boundary condition was prescribed in order to reflect the experimental condition:

$$U(h, t) = 0;$$

$$U(0, t) = \begin{cases} V_0 t \rightarrow 0 \leq t \leq t_0 \\ V_0 t_0 \rightarrow t_0 \leq t \end{cases} \quad (77 \text{ a.b.})$$

$$U(Z, 0) = 0; \quad (78)$$

La conoscenza del campo degli spostamenti permette di valutare lo stress teorico all'interfaccia. Tale stress è stato utilizzato per il curve fitting delle curve di stress relaxation sperimentali con H_{A0} e β note e k_0 e M come parametri di fitting.

4.2.5 Analisi istologiche

Fresh bovine cartilage disk from articular cartilage joint and chondrocyte-agarose construct were fixed in 10% buffered formalin, dehydrated, processed to paraffin, sectioned at 5 μm and stained with hematoxylin/eosin.

4.2.6 Analisi biochimiche

Ogni settimana 3 campioni sono stati liofilizzati e digeriti in una soluzione buffer di papaina (125µg/ml papain in 150mM sodium chloride, 55mM sodium citrate, 5mM cystein, 5mM EDTA) per 16h a 60° C. L' agarosio è stato poi fuso a 70°C per 10 min. posizionato su vortex. La determinazione di S-GAG, è stata condotta attraverso la reazione di 40 µl con 250 µl di DMB, in microlpates da 96 leggendo l' assorbenza a 525 nm con Wallac Victor3TM (Perkin Elmer).

Il Contenuto di DNA nei campioni è stato misurato attraverso reazione di 100 µl di digerito con 100 µl di Hoechst, attraverso la lettura della fluorescenza a 350 nm in eccitazione e 460 nm in emissione con Wallac Victor3TM plate reader (Perkin Elmer).

Ogni settimana i costrutti sono stati pesati prima di fare qualunque test e il volume è stato misurato attraverso misure di densità fatte al tempo zero. In questo modo è stato possibile ottenere il contenuto di S-GAG e DNA in termini di mg/ml di volume di costruito.

4.3 Risultati

Misure del coefficiente di diffusione.

Le misure effettuate con la FRAP, sono state condotte sui costrutti di cartilagine utilizzando due probe (BSA e DESTRAANI) diversi per dimensione e natura. Le **figure 48 e 2** riportano i coefficienti di diffusione normalizzati dei due probes al coefficiente di diffusione in agarosio senza cellule durante i 21 giorni di coltura. Il coefficiente di diffusione normalizzato tiene conto delle variazioni della resistenza al trasporto dovuto al solo depositarsi della matrice extracellulare. Sia per BSA che per DESTRANO si registra un abbassamento nel trasporto. da 1 a 0.6 in 21 giorni. Ciò che si osserva è un differente trend: mentre la BSA decresce durante l'intero periodo di coltura, per il destrano si osserva un a riduzione a partire da 7 giorno.

La distribuzione spaziale del coefficiente di diffusione è stata analizzata effettuando le misure partendo dall' angolo a distanza di 100 µm (**Figura 49 e 50**). Non si sono osservate significative differenze nel coefficiente di diffusione lungo lo spessore del campione. Solo una piccola variazione è stata osservata verso il centro nella prima settimana.

Il coefficiente di diffusione di entrambi i probes fu anche misurato per un periodo più lungo. Un significativo aumento nella diffusività normalizzata fu osservato dopo la terza settimana per entrambi i probes. Questo adamento inaspettato è stato attribuito alla degradazione dell' agarosio indotto dal metabolismo cellulare.

Proprietà meccaniche e di trasporto dei fluidi

Ogni settimana di coltura tre costrutti e tre controlli (agarosio senza cellule), furono usati per valutare dello stress di equilibrio. I parametri H_{a0} e β furono valutati per utilizzando la curva di equilibrio stress-strain e "fittando" tale curva con l'equazione 74 (**figura 51 a**). I valori di k_0 e M furono ottenuti dal fit dei dati di stress relaxation con le equazioni 2-4, usando i valori di H_{a0} e β già stimati. I dati relativi alla meccanica del tessuto (**figura 51 a**) indicano che la rigidità del materiale aumenta nel tempo: H_{a0} varia tra 8.81 ± 4.9 al tempo 0, e 24.79 ± 6.49 KPa a 21 giorni (**Figure 52 a** - square). Non si osserva un trend particolare nel parametro di irrigidimento iper-elastico β . Le curve di stress-strain mostrano un andamento iper-elastico in accordo con il modello utilizzato (equazione 74). Gli stessi test effettuati sui controlli indicano una riduzione della rigidità meccanica.

I parametri k_0 e M permettono di valutare la curva della conducibilità idraulica dipendente dalla deformazione (**figura 51 b**) e del controllo ad ogni tempo di coltura. La conducibilità idraulica decresce progressivamente con il tempo. Le variazioni sono sostanziali tra il giorno 7 e 21. In particolare k_0 a 0 e 21 giorni varia tra $11,7 \cdot 10^{-14}$ to $0,7 \cdot 10^{-14} \text{ m}^4 \text{ N}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (**Figure 52 a** - circle). Il coefficiente di variazione della conducibilità con la deformazione M , non ha mostrato un trend particolare. Per valutare il solo effetto dovuto alla proliferazione cellulare ed alla biosintesi, i dati sono stati normalizzati a quelli del controllo. La permeabilità normalizzata ($k_n = k_{0\text{-cell}} / k_{\text{cell_free}}$) ed il modulo elastico normalizzato ($H_n = H_{A0\text{-cell}} / H_{A0\text{cell_free}}$), sono riportati in **figura 52 b**. k_n decresce monotonicamente con il tempo mentre il modulo normalizzato aumenta. Il valore di k_n al tempo zero è minore dell'unità perché la natura impermeabile delle cellule fanno aumentare la frazione volumetrica di solido.

Histological analysis

I costrutti agarosio condrociti possono essere descritti come aventi due zone principali: superficiale e profonda (**figura 53 a**). In tutte le zone, le cellule appaiono vitali assumendo una morfologia sferica. Appena dopo la semina i condrociti sono caratterizzati da un citoplasma luminoso. Dopo un giorno di coltura le cellule assumono una morfologia espansa con una tendenza a formare dei gruppi radiali. Con il tempo di coltura, (**figura 53 b**) la deposizione di ECM può essere chiaramente visualizzata attorno i cluster di condrociti con la tendenza a sostituirsi progressivamente alla matrice di agarosio. Comparando le istologie della cartilagine nativa con quella dei costrutti, si evince una stretta somiglianza morfologica (**figura 54**).

Evoluzione temporale del contenuto di S-GAG e DNA.

Il contenuto totale di GAG in termini di μg per plug was è stato determinato leggendo l'assorbanza a 460 nm di aliquote ottenute dalla soluzione di digestione della papaina aggiungendo DMMB: si è misurato un aumento del contenuto totale di GAG nel tempo. Il contenuto totale di DNA è stato quantificato con l' Hoechst e si è osservato incrementare nel tempo fino a 21 giorni. L' andamento del contenuto di GAG e DNA è riportato in **figura 55**. Il aumento di venti volte rispetto al valore iniziale, mentre il valore di DNA aumenta di tre volte. In **figura 56 b** è riportato il rapporto tra la concentrazione di GAG e DNA ad ogni tempo di coltura.

4.4 Discussione

Misure del coefficiente di diffusione dei due probe molecolari di differente natura nel costrutto ingegnerizzato effettuate con alta risoluzione spaziale e temporale indicano una correlazione tra le proprietà di trasporto e la produzione di matrice extracellulare. Il coefficiente di diffusione nei costrutti cellulari (D_c) è stato normalizzato rispetto allo stesso parametro misurato nei costrutti senza cellule (D_{nc}) per entrambi i probes: una proteina globulare bioattiva (BSA 68KDa) e una flessibile (Destano 500KDa).

La normalizzazione è stata necessaria per escludere la riduzione al trasporto dovuto alla degradazione dell'agarosio nel mezzo di coltura. Mentre la diffusività diminuisce con il tempo di coltura in accordo con altri lavori riportati ¹⁶, non si è riscontrata una variazione spaziale dello stesso. La diffusività del destrano diminuisce del 30%, mentre quella della BSA del 40%. Le proprietà meccaniche del neo-tessuto, possono essere descritte per tessuti soffici proposto da Holmes e Mow, Athesian e Choen. Tale approccio fornisce la relazione tra proprietà fisiche in termini di conducibilità idraulica e modulo elastico e la deformazione durante il tempo di coltura. Tali parametri sono stati utilizzati in tale lavoro per comparare le proprietà di free swelling (k_0 e H_{A0}) con il coefficiente di diffusione misurato in condizioni di deformazione nulla. Il modello proposto da Frank e Grodzinsky e utilizzato da Buschmann è stato utilizzato nei loro lavori per misurare tali proprietà in condizioni di deformazione pari al 20%.

Durante i primi 21 giorni di coltura, è stato osservato una diminuzione della conducibilità idraulica di circa il 40% quasi la metà di quella trovata da Buschmann ad una deformazione del 20%. In ogni caso i nostri dati di conducibilità ad una deformazione del 20%, mostrano una riduzione del 60%. Comunque poiché la deformazione imposta non era relazionata alla altezza attuale del costrutto, la deformazione imposta era leggermente sottostimata, e quindi ne risulta una conducibilità sovrastimata. Un aumento

del modulo elastico di circa 3 volte è stato osservato. Tale trend è in sintonia con i dati riportati da Buschmann⁷⁵. Un trend opposto è stato osservato nel controllo.

Le analisi istologiche hanno localizzato la formazione di neo cartilagine intorno alle cellule in accordo con precedenti studi e una uniforme distribuzione della matrice è stata osservata nel costrutto dal lato verso il centro assicurato dal piccolo spessore del costrutto. È stata anche osservata una deposizione di uno strato superficiale sul cilindro. Il contenuto di GAG e DNA aumentava durante il tempo di coltura. Il DNA ha mostrato un aumento comparabile con dati di letteratura, mentre la variazione di GAG è risultata in una variazione più alta dovuto probabilmente ad una concentrazione maggiore di ascorbato utilizzato nel mezzo di coltura.

La riduzione delle proprietà di trasporto, osservata per diffusività e permeabilità, è fortemente correlata al contenuto di GAG misurato durante il tempo di coltura con le analisi biochimiche e istologiche. Le relazioni esistenti tra K, H e GAG

$$\log\left(\frac{K}{K_0}\right) = -A_K \cdot c_{GAG} ;$$

$$H = H_0 + A_H \cdot c_{GAG} \quad (79)$$

sono state verificate⁸⁶⁻⁸⁸ (**Tabella 4**).

I valori di fitting del modulo elastico e della conducibilità idraulica, risultano vicini a quelli trovati in letteratura. La variazione del coefficiente di diffusione con l' ammontare di GAG è risultata essere simile alla variazione della conducibilità idraulica (equazione 80)

$$\log\left(\frac{D}{D_0}\right) = -A_D \cdot c_{GAG} ; \quad (80)$$

dove per tenere conto della dimensione del probres in accordo con Phillies e Cukier⁸⁶⁻⁸⁸ si ritiene che

$$A_D = e^{\kappa \cdot r} \quad (81)$$

dove κ rappresenta l'interazione idrodinamica tra la matrice ed il soluto ed r il raggio idrodinamico (**Tabella 5**).

Il valore di κ per I due probes sono presumibilmente differenti dovuti alla natura differente, e alla differente interazione con la ECM. La possibilità di modellare e predire il traffico molecolare all'interno dei costrutti può risultare molto utile e importante nella ingegnerizzazione dei processi produttivi di tessuti. La formazione di neo-tessuto, in un ambiente finemente ottimizzato e controllato, può sicuramente risultare un tessuto più

	r [nm]	κ [$\ln(\text{ml}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{nm}^{-1})$]
BSA	5	0.62
dextran	15	0.25

Table 4. Fitting parameter of transport properties versus GAG content.

	R ²	A
H vs GAG	0.75	3 [MPa·ml·g ⁻¹]
K vs GAG	0.98	50 [ml·g ⁻¹]
D_{BSA} vs GAG	0.96	22 [ml·g ⁻¹]
D_{dextran} vs GAG	0.95	40 [ml·g ⁻¹]

Table 5. Fitting parameter of diffusion parameter versus probe radius.

efficiente e funzionale rispetto al caso di colture statiche ma necessita di una modellazione matematica che sia in grado di correlare i parametri di processo. I modelli proposti recentemente in letteratura⁷⁶ predicono l'evoluzione della ECM in costrutti 3D considerando solo H e K come variabili di processo. La possibilità di ottenere informazioni sperimentali sulla variazione dei parametri di trasporto permette di ottenere modelli più riproducibili che tengono conto del coefficiente delle variazioni spaziali e temporali del coefficiente di diffusione e di tutte le variabili che possono influenzare il processo.

4.5 Conclusioni

La resistenza al trasporto diffusivo nei costrutti aumenta progressivamente con il tempo di coltura e con la produzione di matrice. La riduzione del coefficiente di diffusione segue una legge esponenziale con l'aumento dei GAG in accordo anche con la variazione della conducibilità idraulica. Il decadimento della diffusione dipende principalmente dal probe. Non si sono verificate particolari variazioni spaziali della diffusività. La determinazione sperimentale della diffusività è stata correlata empiricamente con la produzione di GAG. L'evoluzione delle proprietà di trasporto dei fluidi e delle macromolecole, nel tessuto in crescita, forniscono utili informazioni per migliorare la progettazione di bioreattori.

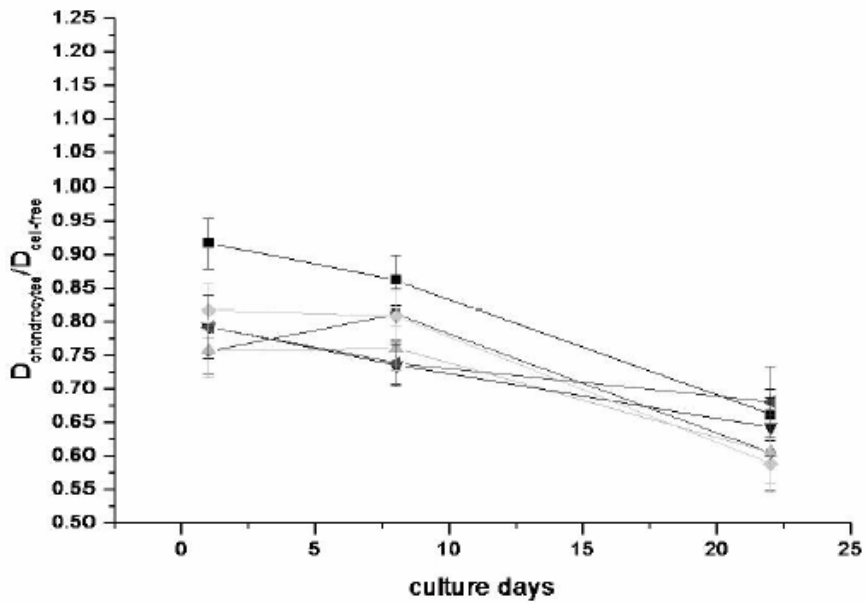


Figure 48 – Normalized diffusion coefficients variation with culture time of dextran in cellular scaffold respect the control gels changes in culture time at the edge (square), 100µm (circle), 200µm (triangle), 300µm (inverted triangle), 400µm (diamond) and 500µm (left triangle) from the edge.

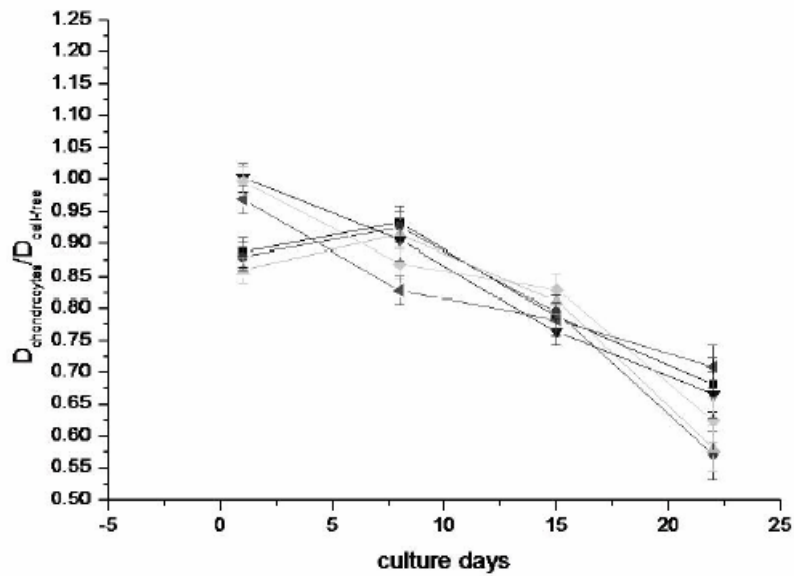


Figure 49 – Diffusion coefficients variation with culture time of BSA in cellular scaffold respect the control gels changes in culture time at the edge (square), 100µm (circle), 200µm (triangle), 300µm (inverted triangle), 400µm (diamond) and 500µm (left triangle) from the edge.

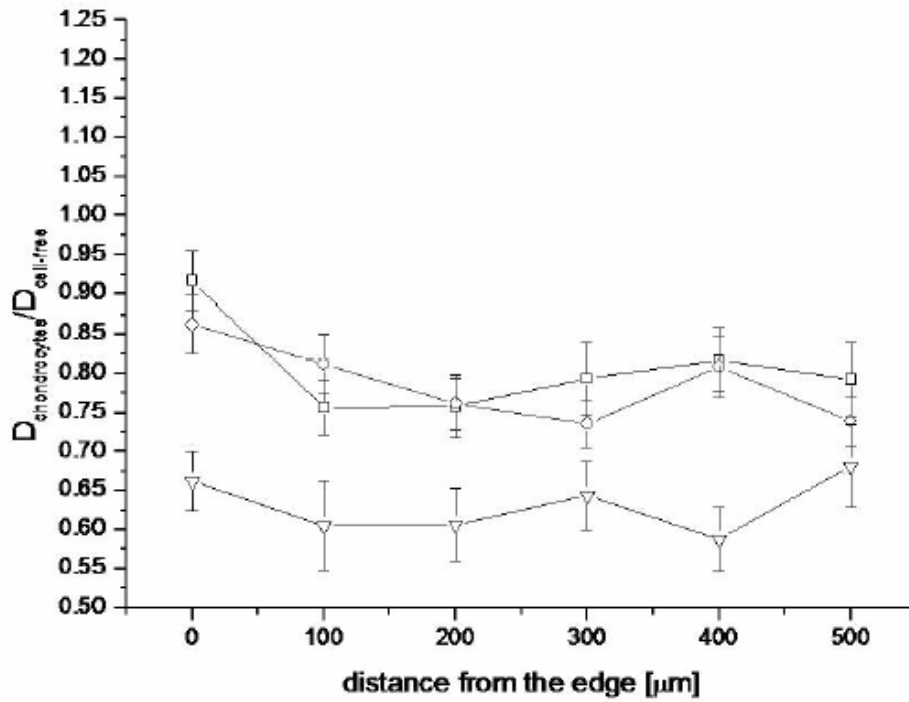


Figure 50 – Normalized diffusion coefficients variation with distance from the edge of dextran in cellular scaffold respect the control gels values at the same position at 1day (square), 8days (circle) and 21days (inverted triangle) of culture

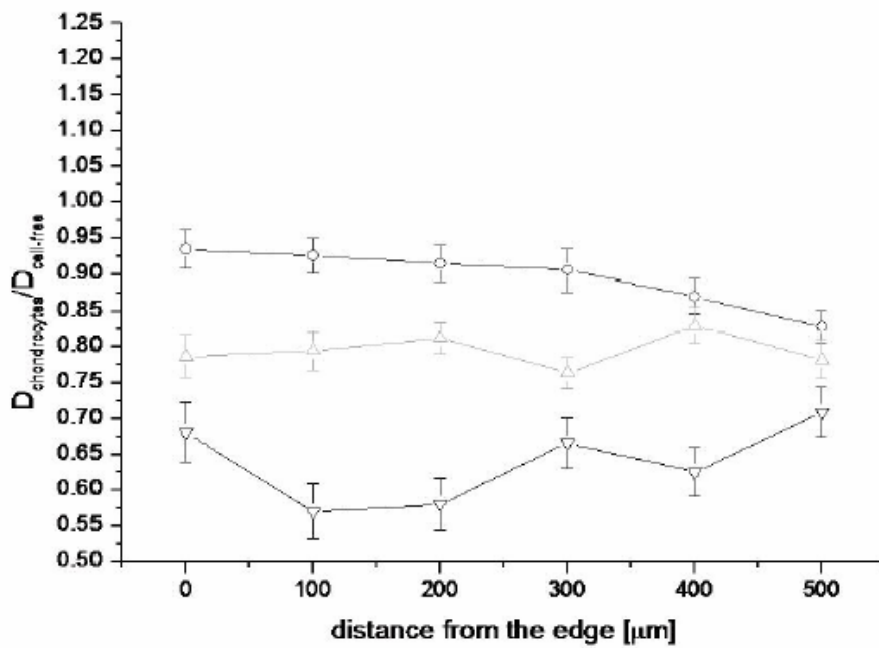


Figure 51 – Diffusion coefficients variation with distance from the edge of BSA in cellular scaffold respect the control gels values at the same culture time at 8 (circle), 15 (triangle) and 21 (inverted triangle) days of culture.

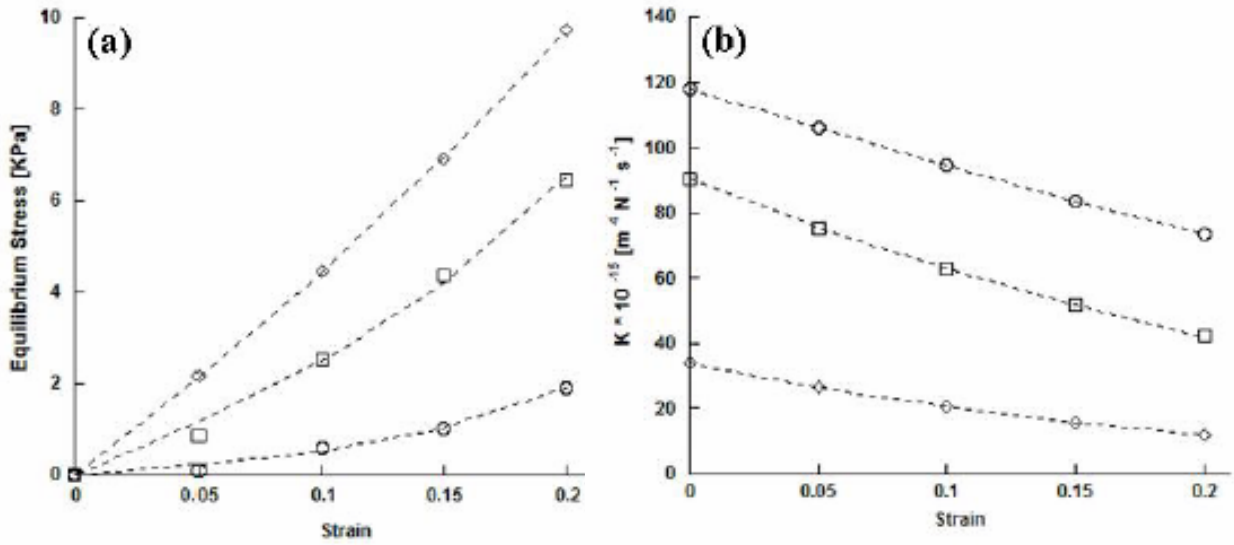


Figure 52 – (a) Experimental and curve fitted stress strain curve of the construct at t_0 (0 days, circle), t_2 (14 days, square) and t_3 (21 days, rumble); (b) hydraulic conductivity – strain curve from at t_0 (circle) to t_2 (square) t_3 (rumble) . Clear trend is showed: increase in mechanical properties and decrease in permeability during culture time.

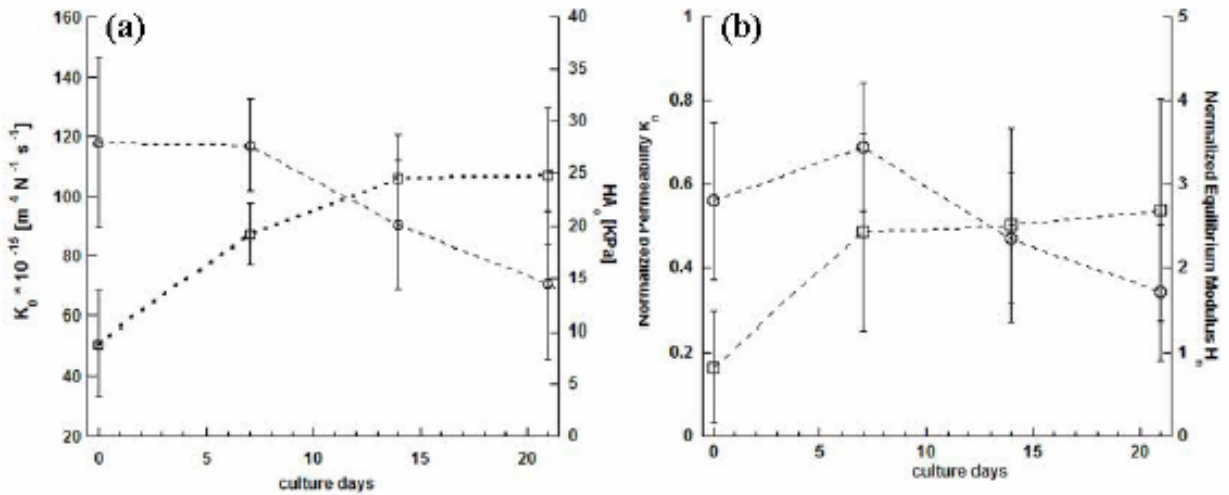


Figure 53 – (a) Physical properties of the cellular construct at zero strain k_0 (circle) and H_{A0} (square) during time of culture (mean \pm s.d. $n=3$); the former decreases whereas the latter increases during culture time. (b) Normalized modulus H_n (square) and permeability k_n (circle) as ratio between the properties of the construct and control at same culture time.

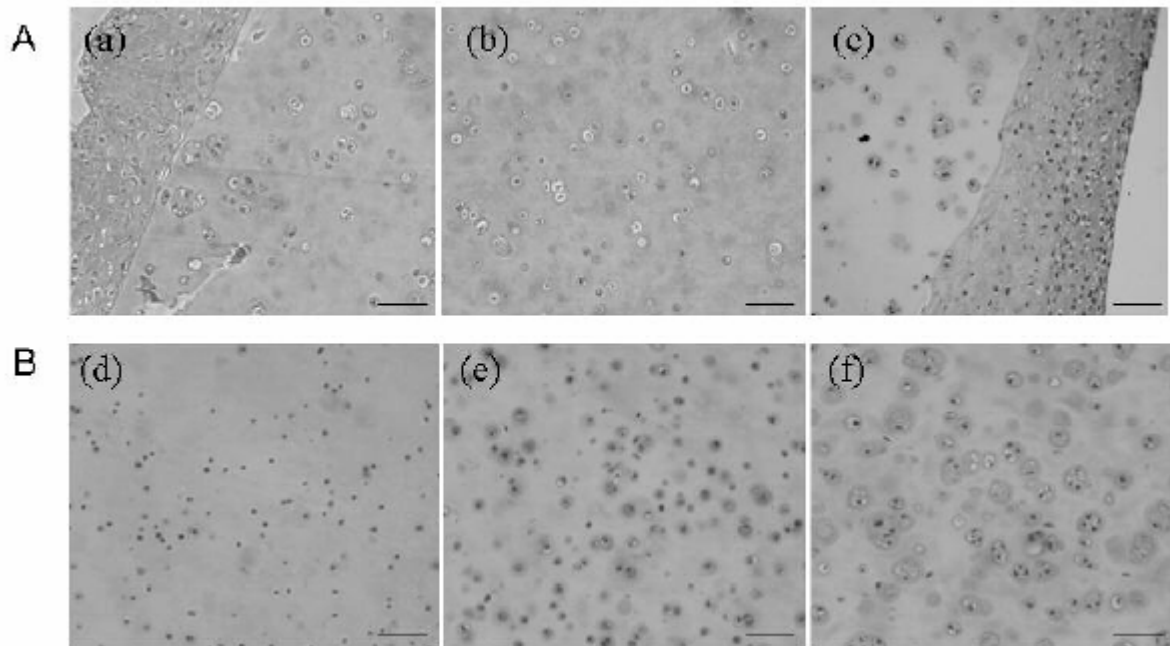


Figure 54 - (A) Spatial representative light micrographs of hematoxylin and eosin chondrocyte/agarose construct in the superficial zone (a,c) and deep zone (b). (B) Representative light micrographs of hematoxylin and eosin stained 50 μ m sections from chondrocyte/agarose cultures after 1 (d) , 8 (e) and 21 (f) days of culture. Magnification bar is 100 μ m.

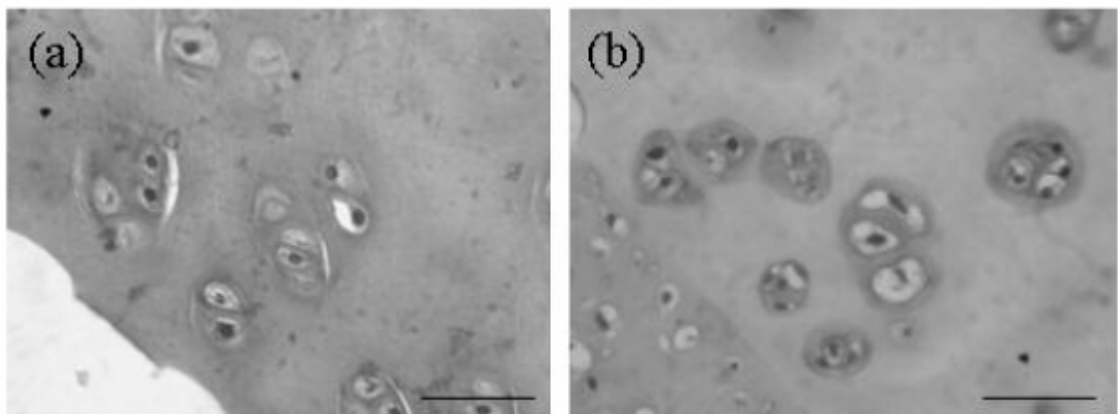


Figure 55 - Hematoxylin- and eosin staining histologic section of articular cartilage from a steer biopsy (a) is compared with 21 days culture chondrocyte-construct (b).

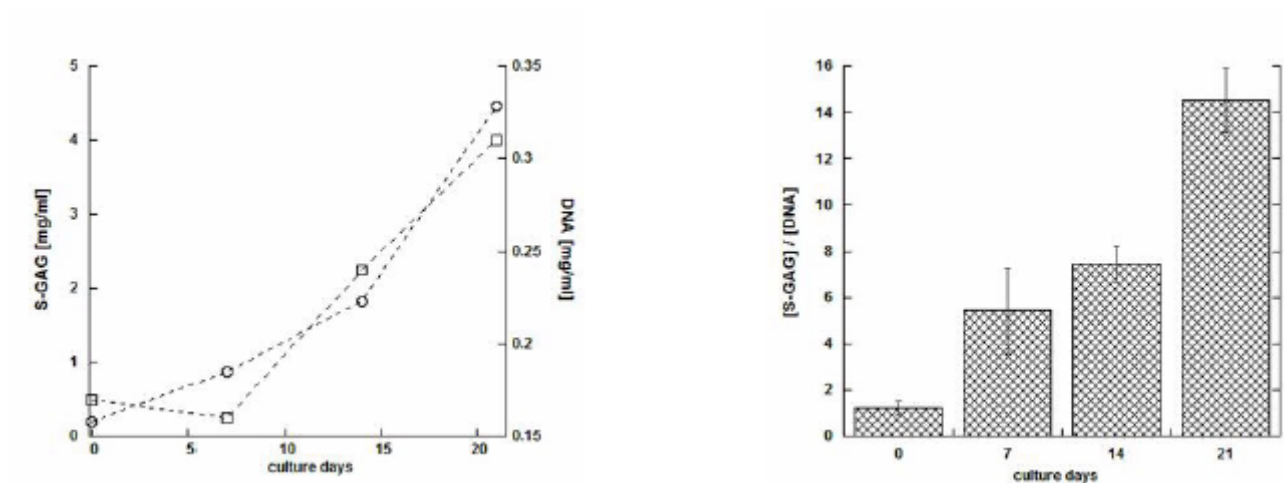


Figure 56 – (a) Increase of S-GAG concentration (circle) and DNA concentration (square) during culture time. (b) Specific GAG production per DNA during time of culture reaches a plateau at 21 days.

1. A.Facchini, B.Grigolo. Le caratteristiche della cartilagine articolare. Convegno 1999: A nel trattamento delle condropatie di caviglia e ginocchio.
2. Temenoff J.S., G.A.Mikos. Review: Tissue engineering for regeneration of articular cartilage. *Biomaterials* 2000; 21: 431-440
3. MICHAEL A. DIMICCO and ROBERT L. SAH Dependence of Cartilage Matrix Composition on Biosynthesis, Diffusion, and Reaction Transport in Porous Media 50: 57-73, 2003.
4. Doong JH, Grodzinsky AJ, Plaas AHK, Sandy JD. 1989. Biosynthetic response of cartilage explants to dynamic compression. *J. Orthop. Res.* 7:619
5. Sandstrom T. 1982. The effect of continuous mechanical pressure upon the turnover of articular cartilage proteoglycans in vitro. *Clin. Orthop.*
6. D, Maroudas A. 1986. Effects of mechanical and osmotic pressure on the rate of glycosaminoglycan synthesis in the human adult femoral head cartilage: an in vitro study. *J. Orthop. Res.*
7. Grodzinsky AJ Lee RC. 1988. Mechanical and physicochemical determinants of the chondrocytes biosynthetic response. *J. Orthop. Res.*
8. Farquhar T, Lust G. 1993. Effect of compressive loading and unloading on synthesis of total protein, proteoglycan, and fibronectin by canine cartilage explants. *J. Orthop Res.* 11:717
9. Grodzinsky AJ, Lee RC. 1988. Mechanical and physicochemical determinants of the chondrocytes biosynthetic response. *J. Orthop. Res.*
10. Urban JPG, Hall AC, Gohl KA. 1993. Regulation of matrix synthesis rates by the ionic and osmotic environment of articular chondrocytes. *J. Cell Physiol.* 154:262-70
11. Boustany NN, Gray ML, Black AC, Hunziker EB. 1995. Correlation between the synthetic activity and glycosaminoglycan concentration in epiphyseal cartilage raises questions about the regulatory role of interstitial pH. *J. Orthop. Res.* 13:733-39
12. Hall AC, Horwitz ER, Wilkins RJ. 1996. Physiological society symposium: ion transport in health and disease, the cellular physiology of articular cartilage. *Exp. Physiol.* 81:535-45.
13. Freeman PM, Natarajan RN, Kimura JH, Andriacchi TP. 1994. Chondrocyte cells respond mechanically to compressive loads. *J. Orthop. Res.* 12:311-20
14. Guilak F, Ratcliffe A, Mow VC. 1995. Chondrocyte deformation and local tissue strain in articular cartilage: a confocal microscopy study. *J. Orthop. Res.* 13:410-21
15. Buschmann MD, Hunziker EB, Kim YJ, Grodzinsky AJ. 1996. Altered aggrecan synthesis correlates with cell and nucleus structure in statically compressed cartilage. *J. Cell Sci.* 109:499-508

16. YOSHINORI SAWAE,¹ JULIA C. SHELTON,^{2;3} DAN L. BADER,^{2;3} and MARTIN M. KNIGHT,^{2;3} Confocal Analysis of Local and Cellular Strains in Chondrocyte-Agarose Constructs Subjected to Mechanical Shear *Annals of Biomedical Engineering*, Vol. 32, No. 6, June 2004 (©2004) pp. 860–870
17. Grodzinsky AJ. 1987. Cartilage electromechanics. I. Electrokinetic transduction and the effects of electrolyte pH and ionic strength. *J. Biomech.* 20:615–27
18. Frank EH, Grodzinsky AJ, Phillips SL, Grimshaw PE. 1990. Physicochemical and bioelectrical determinants of cartilage material properties. In *Biomechanics of Diarthrodial Joints*, ed. VC Mow, A Ratcliffe, SLYWoo, pp. 261–82. NewYork: Springer
19. Cohen S, Snir E, Schneiderman R, Maroudas A. 1993. Solute transport in cartilage: effect of static compression. *Trans. Orthop. Res. Soc.* 18:622–95.
20. O'Hara BP, Urban JPG, Maroudas A. 1990. Influence of cyclic loading on the nutrition of articular cartilage. *Ann. Rheum.*
21. Bonassar LJ, Grodzinsky AJ, Frank EH, Davila SG, Bhakta NR, Trippel SB. 2000. The effect of dynamic compression on the response of articular cartilage to insulinlike growth factor, I. *J. Orthop Res.* In pres.
22. Regan AM, Cook M, Chin VI, Gowen M, et al. 1999. Down-regulation of chondrocyte aggrecan and type-II collagen gene expression correlates with increases in static compression magnitude and duration. *J. Orthop. Res.* 17:
23. Morudas A., 1968 "Physicochemical Properties of Cartilage in The Light of Ion Exchange Theory". *Biophys. J.* 8(5), pp. 575-595.
24. Torzilli, P.A., Adams T.C. and Mis R.J., 1987 "Transient Solute Diffusion In Articular Cartilage". *J. Biomech* 20(2), pp. 203-214.
25. O'Hara , B.P., Urban J.P. and Morudas A., 1990. Influence of cyclical loading on Nutrition of Articular Cartilage". *Ann. Rheum Diss.* 49(7) pp 536-539
26. Garcia A.M, Frank E.H., Grimshaw P.E and Grodzinsky A.J. 1996 "Contribution of Fluid Convection and Electrical Migration in Cartilage: Relevance to loading". 333(2) pp. 317-325.
27. Quinn T.M, Morel V. and Meister J.J 2001. "Static Compression of articular cartilage can reduce solute Diffusivity and Partitioning: Implication for chondrocyte Biological Response". *J. Biomech.* 34(11) pp. 1463-1469.
28. Mauk R.L, Hung C.T. and Ateshian G.A., 2003. "Modeling of Neutral solute Transport in A Dynamically Loaded Porous Permeable Gel: Implications for Articular Cartilage Biosynthesis and Tissue Engineering". *J. Biomech. Eng.* 125 pp.602-614.
29. Frfijns A.J.H., Huyghe J.M. and Janseen J.D 1997. "A Validation of The Quadiphasic Mixture Theory for Intervertebral Disc Tissue" *Int. Engng. Sci.* 35 (15) pp. 1419-1429

30. Levenston M.E., Eisenberg S.R. and Grodzinsky A.J. "A Variational Formulation for coupled Physicochemical Flows During Deformations of Charged Porous Media". *Int. J. Solid Structures* 35 (34-35) pp. 4999-5019.
31. Gu W.Y., Yao H., Huang C.Y. and Cheung H.S. 2003 "New Insight into deformation – dependent hydraulic permeability of gels and cartilage, and dynamic behaviour of agarose gels in confined compression" *J. Biomech.* 36, pp. 593-598
32. Quinn T.M., Morel V., Meister J.J., 2001 "Static compression of articular cartilage can reduce solute diffusivity and partitioning :implication for the chondrocytes biological response" *J. Biomecc,* 34, pp. 1463-1469
33. Michael D. Buschmann,* ,†,2 Young-Jo Kim,‡ Marcy Wong,* Eliot Frank,‡ Ernst B. Hunziker,* and Alan J. Grodzinsky‡, 1999 *Archives of Biochemistry and Biophysics* 366. (1), June 1, pp. 1–7,
34. Stephanie J. Bryant¹ and Kristi S. Anseth "Hydrogel properties influence ECM production by chondrocytes photoencapsulated in poly(ethylene glycol) hydrogels". 2001 John Wiley & Sons, Inc..
35. Stephanie J. Bryant,¹ Kristi S. Anseth "Controlling the spatial distribution of ECM components in degradable PEG hydrogels for tissue engineeringcartilage" 2001 John Wiley & Sons ,Inc..
36. STEPHANIE J. BRYANT,¹ TINA T. CHOWDHURY, DAVID A. LEE, DAN L. BADER and KRISTI S. ANSETH "Crosslinking Density Influences Chondrocyte Metabolism in Dynamically Loaded Photocrosslinked Poly(ethylene glycol) Hydrogels" *Annals of Biomedical Engineering*, Vol. 32, No. 3, March 2004 (©2004) pp. 407–417
37. Twana Davisson, Sabine Kunig, Albert Chen, Robert Sah Anthony Ratcliffe "Static and dynamic compression modulate matrix metabolism in tissue engineered cartilage *Journal of Orthopaedic Research* 20 (2002) 842–848.
38. Grodzinsky, A.J., Electromechanical and physicochemical properties of connective tissue. *Crit Rev Biomed Eng* 9, 133, 1983.
39. Lorenzo, P., Bayliss, M.T., Heinegard, D. A novel cartilage protein (CILP) present in the mid-zone of human articular cartilage increases with age. *J Biol Chem* 273, 23463, 1998.
40. Mow, V.C., Ratcliffe, A. *Basic orthopaedic biomechanics*. New York: Raven Press, 1997.
41. Sutherland, R.M., Sordat, B., Bamat, J., Gabbert, H., Bourrat, B., Mueller-Klieser, W. Oxigenation and differentiation in multicellular spheroids of human colon carcinoma. *Cancer Res* 46,5320, 1986.
42. Martin, I., Wendt, D., and Heberer, M. The role of bioreactors in tissue engineering. *Trends Biotechnol* 22, 80, 2004
43. Davisson, T., Sah, R.L., Rattcliffe, A. Perfusion increases cell content and matrix syntesis in chondrocyte three-dimensional cultures. *Tissue Eng* 8, 807, 2002.

- 44.** Buschmann, M.D., Young-Jo, K., Marcy, W., Eliot, F., Hunziker, E.B., and Grodzinsky, A.J. Stimulation of Aggrecan Synthesis in Cartilage Explants by Cyclic Loading Is Localized to Regions of High Interstitial Fluid Flow. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 366, 1, 1999.
- 45.** Berk, D.A., Yuan, F., Leunig, M., Jain, R.K. Fluorescence photobleaching with spatial Fourier analysis: measurement of diffusion in light scattering media. *Biphys J* 65, 2428, 1993.
- 46.** Ateshian G.A., Warden W.H., Kim J.J., Grelsamer R.P., Mow V.C., Finite Deformation Biphasic Material Properties of Bovine Articular Cartilage from confined compression experiment. *J Biomech* 30, 1157, 1997.
- 47.** Iatridis, J.C., Setton, L.A., Foster, R.J., Rawlins, B.A., Weidenbaum, M., Mow, V.C., Degeneration affects the anisotropic and nonlinear behaviours of human annulus fibrosus in compression. *J. Biomech* 31, 535, 1998.
- 48.** Cohen, B. Anisotropic hydrated soft tissues in finite deformation. Ph.D. Thesis, Columbia University, New York, NY, 1992.
- 49.** Cohen, B., Lai, W.M, and Mow, V.C. J. A transversely isotropic biphasic model for unconfined compression of growth plate and chondroepiphysis. *Biomech Eng, ASME*, 1997
- 50.** Holmes, M.H. and Mow, V.C. The nonlinear characteristics of soft gel and hydrated connective tissues in ultrafiltration. *J. Biomech*, 23, 1145, 1990.
- 51.** Lai, W.M, and Mow, V.C. Drag-induced compression of articular cartilage during permeation experiment. *Biorheology*, 17, 111, 1980.
- 52.** Buschmann, M.D., Gluzband, Y.A., Grodzinsky, A.J., and Hunziker, E.B. Mechanical compression modulates matrix biosynthesis in chondrocyte/agarose culture. *J of Cell Sci* 108, 1497, 1995.
- 53.** Leddy, H.A., Awad, H.A., Guilak, F. Molecular diffusion in tissue-engineered cartilage constructs: effects of scaffold material, time, and culture conditions. *J Biomed Mater Res* 70, 397, 2004.
- 54.** Frank, E.H., and Grodzinsky, A.J. Cartilage electromechanics-I. Electrokinetic Transduction and the effect of electrolyte pH and ionic strength. *J. Biomech* 20, 615, 1987.
- 55.** Frank, E.H., and Grodzinsky, A.J. Cartilage electromechanics-I. A continuum model of cartilage electrokinetics an correlation with experiments. *J. Biomech* 20, 629, 1987.
- 56.** Buschmann, M.D., Gluzband, Y.A., Grodzinsky, A.J., Kimura, J.H., Hunziker, E.B., Chondrocytes in agarose culture synthesize a mechanically functional extracellular matrix. *J Orthop Res* 10, 745, 1992.
- 57.** Grodzinsky, A.J., Electromechanical and physicochemical properties of connective tissue. *Crit Rev Biomed Eng* 9, 133, 1983.

-
58. Lorenzo, P., Bayliss, M.T., Heinegard, D. A novel cartilage protein (CILP) present in the mid-zone of human articular cartilage increases with age. *J Biol Chem* 273, 23463, 1998.
 59. Mow, V.C., Ratcliffe, A. *Basic orthopaedic biomechanics*. New York: Raven Press, 1997.
 60. Sutherland, R.M., Sordat, B., Bamat, J., Gabbert, H., Bourrat, B., Mueller-Klieser, W. Oxigenation and differentiation in multicellular spheroids of human colon carcinoma. *Cancer Res* 46,5320, 1986.
 61. Martin, I., Wendt, D., and Heberer, M. The role of bioreactors in tissue engineering. *Trends Biotechnol* 22, 80, 2004
 62. Davisson, T., Sah, R.L., Rattcliffe, A. Perfusion increases cell content and matrix syntesis in chondrocyte three-dimensional cultures. *Tissue Eng* 8, 807, 2002.
 63. Buschmann, M.D., Young-Jo, K., Marcy, W., Eliot, F., Hunziker, E.B., and Grodzinsky, A.J. Stimulation of Aggrecan Synthesis in Cartilage Explantsby Cyclic Loading Is Localized to Regions of High Interstitial Fluid Flow. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 366, 1, 1999.
 64. Berk, D.A., Yuan, F., Leunig, M., Jain, R.K. Fluorescence photobleaching with spatial Fourier analysis: measurement of diffusion in light scattering media. *Biphys J* 65, 2428, 1993.
 65. Ateshian G.A., Warden W.H., Kim J.J., Grelsamer R.P., Mow V.C., Finite Deformation Biphasic Material Properties of Bovine Articular Cartilage from confined compression experiment. *J Biomech* 30, 1157, 1997.
 66. Iatridis, J.C., Setton, L.A., Foster, R.J., Rawlins, B.A., Weidenbaum, M., Mow, V.C., Degeneration affects the anisotropic and nonlinear behaviours of human annulus fibrous in compression. *J. Biomech* 31, 535, 1998.
 67. Cohen, B. Anisotropic hydrated soft tissues in finite deformation. Ph.D. Thesis, Columbia University, New York, NY, 1992.
 68. Cohen, B., Lai, W.M, and Mow, V.C. J. A transversely isotropic biphasic model for unconfined compression of growth plate and chodroepiphysis. *Biomech Eng, ASME*,1997
 69. Holmes, M.H. and Mow, V.C. The nonlinear characteristics of soft gel and hydrated connective tissues in ultrafiltration. *J. Biomech*, 23, 1145, 1990.
 70. Lai, W.M, and Mow, V.C. Drag-induced compression of articular cartilage during permeation experiment. *Biorheology*, 17, 111, 1980.
 71. Buschmann, M.D., Gluzband, Y.A., Grodzinsky, A.J., and Hunziker, E.B. Mechanical compression modulates matrix biosyntesis in chondrocyte/agarose culture. *J of Cell Sci* 108, 1497, 1995.
 72. Leddy, H.A., Awad, H.A., Guilak, F. Molecular diffusion in tissue-engineered cartilage constructs: effects of scaffold material, time, and culture conditions. *J Biomed Mater Res* 70, 397, 2004.

- 73.** Frank, E.H., and Grodzinsky, A.J. Cartilage electromechanics-I. Electrokinetic Transduction and the effect of electrolyte pH and ionic strength. *J. Biomech* 20, 615, 1987.
- 74.** Frank, E.H., and Grodzinsky, A.J. Cartilage electromechanics-I. A continuum model of cartilage electrokinetics an correlation with experiments. *J. Biomech* 20, 629, 1987.
- 75.** Buschmann, M.D., Gluzband, Y.A., Grodzinsky, A.J., Kimura, J.H., Hunziker, E.B., Chondrocytes in agarose culture synthesize a mechanically functional extracellular matrix. *J Orthop Res* 10, 745, 1992.
- 76.** Mauk, R.L., Seyhan, S.L., Ateshian, G.A., Hung, T,C. Influence of seeding density and dynamic deformational loading on the developing structure/function relationships of chondrocytes-seeded agarose gel hydrogel. *Annals Biomed Eng* 30, 1046, 2002.
- 77.** Williamson, A.K., Chen, C.A., Sah, R.L. Compressive properties and function-composition relationships of developing bovine articular cartilage. *Othop Res* 19, 1113, 2001.
- 78.** Sengers, B.G., van Donkelaar, C.C., Oomens, C.W.J., Baaijens, F.P.T. The local matrix distribution and the functional development of tissue engineering cartilage, a finite element study. *Annals Biomed Eng* 32, 1718, 2004.
- 79.** Cukier, R.I. Diffusion of Brownian spheres in semidilute polymer solutions. *Macromolecules* 17, 252, 1984
- 80.** Phillies, G.D.J. Universal scaling equation for self-diffusion by macromolecules in solution. *Macromolecules* 19, 2367, 1986.
- 81.** Phillies, G.D.J. Dynamics of polymers in concentrated solutions: the universal scaling equation derived. *Macromolecules* 20, 558, 1987.
- 82.** Phillies, G.D.J. The hydrodynamic scaling model for polymer self-diffusion. *J Phys Chem* 93, 5029, 1989.
- 83.** Williamson, A.K., Chen, C.A., Sah, R.L. Compressive properties and function-composition relationships of developing bovine articular cartilage. *Othop Res* 19, 1113, 2001.
- 84.** Sengers, B.G., van Donkelaar, C.C., Oomens, C.W.J., Baaijens, F.P.T. The local matrix distribution and the functional development of tissue engineering cartilage, a finite element study. *Annals Biomed Eng* 32, 1718, 2004.
- 85.** Cukier, R.I. Diffusion of Brownian spheres in semidilute polymer solutions. *Macromolecules* 17, 252, 1984
- 86.** Phillies, G.D.J. Universal scaling equation for self-diffusion by macromolecules in solution. *Macromolecules* 19, 2367, 1986.
- 87.** Phillies, G.D.J. Dynamics of polymers in concentrated solutions: the universal scaling equation derived. *Macromolecules* 20, 558, 1987.

- 88.** Phillies, G.D.J. The hydrodynamic scaling model for polymer self-diffusion. *J Phys Chem* 93, 5029, 1989.