

# BIOREATTORI

15-05-2017

Imp. dei tessuti e medicina rigenerativa

↳ riparare o rimpiazzare porzioni di tessuto

Si vorrebbe che diventassero strategie terapeutiche (maggi ospedale) → soluzioni per curare

- ex. infarto miocardico → si usano delle cicatrici: sono meno elastiche (e così deve pompare di più → si dilata, diventa + grande, si spessisce)

↳ creare una porzione di tessuto cardiaco da sostituire alle cicatrici

Imp. dei tessuti: si fa crescere un tessuto in vitro (su uno scaffold) e poi si impianta

Medicina rigenerativa: si sviluppano materiali funzionalizzati (= è possibile attaccare dei fattori di crescita) → es. cuore: è un gel  
↳ metterli in zone → andare a rigenerare in vivo, localmente

Si basano su: - CELLULE

SCAFFOLD = matrice, supporto allo crescita cellulare

↳ le cellule devono essere stimolate

REGOLATORI = i segnali giusti per far proliferare le cellule (serve anche la matrice extracellulare, ...)

Le bioreattori consente di fornire le condizioni ambientali di coltura che permettono di riprodurre l'ambiente nativo (fisiologico) → crescano il + simile possibile e dentro il corpo umano

↳ deve ripetere tutti gli stimoli (elettrici, meccanici) - fisiologici

(condizioni ambientali e operative strettamente monitorate e controllate) (FEEDBACK)

Problema della contaminazione → creare un ambiente sterile, controllato  
↳ misurare i dati dalle misure, girare se vanno bene e il coltore (course automatically)

in modo automatico

Coltivare cellule in condizioni di sospensione (in un ambiente fluido)

↳ possono crescere in 3D: è molto + fisiologico, favorisce l'espressione delle loro funzioni e la loro proliferazione

Bioreattori → strumenti per ingegnerizzare i tessuti

↳ strumenti per studiare dei modelli

Avere un'automatizzazione il + completa possibile

Questioni regolatorie → bioreattore progettato per superare i controlli di qualità

Popolo diretto tra progettazione e cosa c'è sul mercato (è realizzabile)

Può un processo è automatizzato, + è ripetibile

Scaffold - cellule sullo scaffold - camera di coltura (bioreattore)

misura, manda i dati all'unità di controllo - se non sono giusti, agisce sull'ambiente

## CLASSIFICAZIONE

22-05-2017

Possono essere

- INCUBATI: non sono in grado di mantenere i parametri

↳ devono essere messi in un INCUBATORE: forno a 37°C, 5% di CO<sub>2</sub>, umidità 95-100%

↳ fare bioreattori piccoli; c'è bisogno di parte per far uscire i dati (se si sono)

• AUTOINCUBATI: sono in grado di mantenere temp. e %CO<sub>2</sub> da soli.

↳ hanno delle resistenze che scaldano.

→ ingressi per far entrare l'aria e CO<sub>2</sub>; sensori per monitorare i parametri.

Normalmente i bioreattori hanno degli incubatori, ma sono pieni → se è automatizzato è molto meglio.

↳ hanno molti esperimenti insieme, varie culture.

Sistema di controllo → è fuori dall'incubatore.

Bioreattore automatizzato:

• pompa e sistema di controllo → controllo (ed agisce) sulla temperatura e sul flusso (es. per tessuto cardiovascolare: meccanismo per sopportare a trazione il vaso) deve essere sigillato (anche quello non airt) perché non deve perdere liquido.

→ non fisiologica: garantisco di fare un passo avanti rispetto ad una cultura su un disco di Petri, ma non mi muovo e fisso tutto.

• ↳ SPINNER FLASK: c'è un elica collegata ad un motore → ruota, oppure c'è un magnete fatto girare con un generatore magnetico. ↳ è un miglioramento rispetto ad una cultura statica (disco di Petri) perché muove le cellule → cultura dinamica. ↳ si evitano dei campi fluidodinamici: aumento della distribuzione all'interno.

↳ garantire la sospensione = stessa presenza di fluido e di nutrienti da tutte le direzioni.

• gli scaffali possono essere inseriti in maniera disordinata, oppure inseriti fermi, bloccati a degli angoli (è il fluido che gira).

↳ però le condizioni fluidodinamiche sono diverse nei vari posti.


di solito girano tra i 50 e 80 giri al minuto.

Dopo 7-10 giorni il medium deve essere cambiato, rigenerato (le cellule consumano nutrienti e producono scarti) ⇒ deve ingressare ed uscire.

↳ è facile da usare, costo poco (~700€).

↳ svantaggi: il movimento non è omogeneo, un'elica o gli scaffali

è un'elica (o il magnete) può danneggiare le cellule (o cosa c'è). ↳ sforzi di taglio imposti alle cellule.

• ↳ SPINNER FLASK fatti a forma  → vari motivi per lo scegliere migliorano alcuni parametri perché cambia la fluidodinamica.

no (sul tappo dello scaffale)

• ↳ bioreattore a parete rotante: consente di mantenere in rotazione costante e quindi in sospensione (equilibrio tra gravità e idrodinamica).

• è molto + complesso di uno spinner flask, + costoso, difficoltà di sterilità.

• motora con la possibilità di ruotare a velocità diverse → per identificare la velocità dell'equilibrio (lavoro con passare dell'esperimento → crescono → + pesanti → + rotazione).

## → frisiologia

es. bioreattore per colture cellulari → stimolo di compressione <sup>→ anche per ossi</sup>

vasi sanguigni → passaggio del medium all'interno, maggior flusso anche all'esterno

• bioreattore a compressione (x colture cellulari e ossi)

pistone che comprime → motore controllato da un sistema di controllo (forza, frequenza)  
[es. di costo: 150.000 € → 350.000 €]

• bioreattore a vibrazione (tessuto cartilagineo, legamenti, tendini, tessuto muscolare)

↳ è + complicato dal punto di vista della progettazione: come ottenere senza rovinare, riuscendo a tenerlo e a distribuirne bene il carico, ...

si usano delle pinzette (una parte del campione va persa, è dedicato all'attacco)

il meglio sarebbe far vibrare entrambe le braccia

→ imporre la deformazione (cuore → 15%) e la frequenza ⇒ mimare il cuore

↳ aggiunti degli elettrodi: sottoporre i campioni ad uno stimolo elettrico

• bioreattore a pressione idrostatica → la pressione allo scalfare non è applicata dal pistone ma dal fluido → è meglio

• bioreattore a perfusione (x tessuto osseo, vasi sanguigni) → il medium va a irrorare tutto il costrutto

Mettendo le cellule nel medium, si può seminare le cellule in questo modo (le cellule tendono ad attaccarsi)

↳ apparato collegato ad una pompa, con un filtro ed un serbatoio di medium

[costo del medium: 150ml → 500 €] → fare il bioreattore il + piccolo possibile (con fattori di crescita, ...)

↳ possono essere a multicamera

→ monocamera: costa meno

↳ multicamera: costo di +, ma non in maniera proporzionale

↳ è + comodo: i biofab, devono fare analisi statistiche, per poter fare + test nello stesso momento

## DESIGN REQUIREMENTS

05-06-2012

Requisiti di progetto: a quali caratteristiche devo fare attenzione quando voglio progettare.

• deve essere sicuro stabile (nel tempo le sue caratteristiche non cambiano),

scalabile (cambiando <sup>solo</sup> le dimensioni posso variare senza modifiche funzionali)

↳ è molto utile anche dal punto di vista economico

↳ sia dimensionalmente espandibile, che divisibile in tante parti che dia le massime prestazioni con il minor costo

↳ deve essere il più semplice possibile

un bioreattore dovrebbe:

- fornire una distribuzione cellulare uniforme (es. bioreattore rotanti)
- mantenere le concentrazioni di gas e nutrienti adatte alla coltura
- favorire il trasporto di massa all'interno del costrutto ingegnerizzato

- esporre i tessuti ingegnerizzati a stimoli fisici
- monitorare la formazione del tessuto.

Scegliere materiali  $\rightarrow$  devono essere sterili, non tossici, ...

$\rightarrow$  bisogna adottare o come il materiale è commercializzato : per fare un prototipo

- deve essere inerzi e biocompatibile  $\rightarrow$  non produrre reazioni da parte delle cellule e rilasciare sostanze

$\rightarrow$  non risposte infiammatorie e colonie di batteri

$\rightarrow$  s. lo superamento della FDA  $\rightarrow$  food grade : il materiale non è tossico, adatto a stare in contatto con alimenti per umani  
 $\rightarrow$  medical grade : non è tossico, deve rilasciare molto poco di componenti, adatto per chirurgia e impianti

i materiali dei bioattori devono essere almeno 'food grade'  $\rightarrow$  non tossici

- la camera di coltura deve essere sterile  $\rightarrow$  dall'esterno non devono occorrere batteri a colonizzare

$\rightarrow$  i materiali devono essere sterilizabili, devono poter sopportare il metodo di sterilizzazione che userà il cliente

- deve funzionare a 37°C in condizioni di atmosfera umida

## METODI DI STERILIZZAZIONE

- autoclavabile a vapore : 121°C per 15 minuti (es. i bacchi ricoprono con dell'alluminio per poterlo poi toccare, prendono  $\rightarrow$  sposta senza contaminarlo)  
 $\rightarrow$  però a la molto tempo prima e dopo : 100 minuti. È il più diffuso.

- a secco : 160°C per 2 ore

- con ossido di etilene : è un gas tossico, utilizzato per i materiali non resistenti a temperatura  
 (EtOx)  
 È costoso

- con radiazioni : gamma, x, UV, microonde  $\rightarrow$  poco usati nel lab di coltura cellulare

$\rightarrow$  metalli : a parte le microonde tutti i metodi di sterilizzazione vanno bene

es. acciaio 316-L (è medical grade)

$\rightarrow$  polimeri : sono di solito termosensibili (non tutti sono autoclavabili)

es. PMMA  $\rightarrow$  EtOx

## Altra requisiti di progetto

- dato che si usano operazioni di foratura, fresatura  $\rightarrow$  si devono togliere i pezzi di lavorazione che potrebbero fornire un ambiente fertile per colonie di batteri
- deve essere facilmente assemblabile e disassemblabile (evitare viti, bulloni)  $\rightarrow$  il biologo deve assemblarlo sotto una cappa (sterile)  $\rightarrow$  usare incastri
- il più piccolo possibile
- problemi dei giunti : tra i tubi e la camera  $\rightarrow$  non devono perdere (può contaminare altre cose nell'incubatore, possono entrare batteri)
- che possa essere sterilizzato

## TECNICHE DI FABBRICAZIONE:

- resatoro: precisione di taglio molto elevata  $\rightarrow$  microfabbricazioni.  
consente di ottenere pezzi con geometrie complesse  $\rightarrow$  si parte da materiale pieno, cerca di non spreccare troppo (costi)
- turning: forme assai simmetriche  $\rightarrow$  ruota il pezzo
- stampaggio a iniezione: per materiale plastico  $\rightarrow$  si fonde il materiale e si spinge in uno stampo  $\rightarrow$  si perde meno materiale  
L' termoplastica  
L'  $\rightarrow$  per prototipi però non conviene, bisogna fare lo stampo prima

## MONITORING

Sistemi di monitoraggio in un bioreattore  $\rightarrow$  sensori

① seguire il processo di coltura

L'  $\rightarrow$  monitorare

② coprire i processi fisici e biochimici che ci sono alla base

(es. ci si è resi conto che basse % di ossigeno favoriscono la proliferazione)

③ implementare delle strategie di controllo (feedback)

④ rendere automatizzata la procedura

Avere una valutazione quantitativa

L'  $\rightarrow$  con l'obiettivo di rendere ottimali la coltura nei vari momenti (i parametri cambiano con l'evoluzione della coltura)

L'  $\rightarrow$  evoluzione temporale di quello che vogliamo ottenere

Ci sono dei parametri fondamentali che devono essere controllati:

$\rightarrow$  ambiente di coltura

$\rightarrow$  del costrutto

$\rightarrow$  parametri fisici, chimici e biologici

I sensori devono essere:

- piccoli
- avere un vita medio di qualche settimana  $\rightarrow$  deve costare poco
- avere una risposta stabile nel tempo

I sensori per l'ambiente:

- invasivi: sono all'interno, entrano in contatto
- non-invasivi: sono all'esterno della camera di coltura
- indiretti: sono all'interno del circuito  $\rightarrow$  misura indiretta di cosa succede in camera

Invasivi → o sono steruolizzabili o sono us e getta  
↳ ne aumento il costo  
sono basati su principi di ottico o elettrochimica

hanno dimensioni molto piccole → limitazione lo spazio che occupano ma + costo

Non invasivi → es. placchetta all'interno della camera ma lo strumento è fuori

compato meno problemi di steruolizzazione, ma il materiale frapposto può provocare alterazioni della misura

Indiretti prelevare del medium ed analizzarlo con gli strumenti che hanno i biology in laboratorio

↳ ci va + tempo di una misura in tempo reale, non è sempre ma solo quando lo fa l'operatore

→ oppure mettere uno shunt collegato al circuito del medium: gli si fa fare una deviazione (però è in tutto rispetto a cosa sta accadendo)

MONITORAGGIO DEL COSTRUTTO

non è semplice → si vuole monitorare senza interferire (equipment)

es. monitorare le caratteristiche meccaniche; lo permeabilità (desolto osso) o lo parosità;

monitorare lo funzione cellulare; diametro interno ed esterno di un vaso  
↳ vedere come maturo nel tempo

Proprietà funzionali

• cello di cuore → dipende da cosa si vuole sentire: da  $\mu N$  a qualche  $N$   
↳ molto difficile  
es. conoscere la forza che sviluppa una cellula aderendo ad un substrato

• permeabilità: il flusso che passa attraverso il costrutto → si conosce  
flusso entrante e uscente, sezione, edto di pressione, altezza scotted

[Review = microfluidic grazie ai tubicini che c'è]

⇒ si può trovare lo permeabilità del costrutto

(altro metodo: misurare lo permeabilità tramite onde sonore)

Proprietà morfologiche

• OCT = tomografia a coerenza ottica

↳ tecniche ottiche: non invasive, in tempo reale → ma molto costose!

microCT, AFM, STED → vedere, vedere in tempo reale cosa sta succedendo al costrutto

con queste tecniche si riescono a vedere le cellule e a identificarle nel costrutto senza toccarlo

Attuatori:

es. bioreattore rotante → serve un motore

↳ dato che stiamo parlando di 1-2cm di costrutto, x tanto bisogna dare alle cellule

• stepper motor: alta risoluzione della posizione ma basso velocità

• Gear stage: alta velocità ma bassa risoluzione sulla posizione

• pompe peristaltiche: funzionano per compressione del tubo → lo pompa non tocca ma il fluido

però non a sono problemi di steruolizzazione

→ tubi normalmente in silicone

# TESSUTO OSSEO

Due possibilità → cellule impiantate nel paziente all'interno dello scaffold  
↓  
cellule cresciute sullo scaffold nel bioreattore, e poi il costrutto impiantato

Primo bisogna conoscere le cellule, il tessuto da ingegnerizzare.

osso non come il cartilagine → è + molle, + debole (non ha una struttura)

↳ periodo della maturazione del tessuto in cui è così

osso come il cartilagine: è organizzato, resistente, ha dei fasci di collagene

diiferenza tra osso corticale e spugnoso → lo scaffold deve avere lo stesso porosità in superficie e al centro → scaffold con porosità diverse  
↳ porosità del 5 al 10%  
↳ porosità del 50 al 80%

Le nostre ossa vengono sottoposte a stimolo meccanico sempre

↳ oggi per una frattura: prima si fissa l'osso fermo per permettere lo crescita del nuovo tessuto, poi si imitano ad applicare dei carichi → l'osso raggiunge le giuste proprietà

Attenzione che se si vuole ingegnerizzare un tessuto → dare degli stimoli, lo quanto del tessuto è più importante della quantità (del tessuto ingegnerizzato)

0.35% in compressione, 0.11% in tensione, 0.15% in taglio (percentuale di deformazione)

Lo stress (forza / superficie), se modulo elastico → 18 GPa longitudinale } osso corticale  
17 GPa trasversale  
3.36 GPa taglio

→ 0.1 - 3.5 GPa per l'osso spugnoso

## Mecanorecettori

↳ sono le cellule che sentono gli stimoli, le forze e si orientano secondo le linee degli stress  
↳ comunicano tra loro e si muovono da segnali

l'elemento osseo è sensibile e molto fragile

↳ non essere costante: variazioni, cioè di carico per farlo sviluppare bene

## BIOREATTORI

Le colture statiche non permettono bene lo crescita di tessuti ossei → crescono solo quelle superficiali, e non si riescono ad ottenere costrutti grandi (cm) → 100 μm di spessore raggiungiti dai nutrienti

Se non si forza il medium nello scaffold, ossigeno e nutrienti non arrivano

Idea di sviluppare qualcosa che migliori la diffusione dell'ossigeno → fluidi sottoposti a dei moti: flusso convettivo

• SPINNER FIBRE: barile magnetico che ruota } sono molto bene perché danno origine ad un osso omogeneo di medium

• A PARETE ROTANTE

↳ però non sono ottimi per la perfusione del medium all'interno dello scaffold

• SERINA IN PERFUSIONE

systemi che forzano il medium ad entrare nello scaffold → i nutrienti arrivano a tutto  
↳ serve un pomp

Normalmente vi è sempre un periodo di cultura statica → o si semina in perfusione con porosità molto bassa per lasciare lo possibilità alle cellule di aderire

Al carico meccanico: sottopongono a delle forze i costrutti (es. compressione)

↳ il differenziamento è molto agevole

→ si fa il wato

→ si schiacciano le zone dove ci sono le cellule: due pistoni che applicano la compressione

- automazione
- controllo di feedback e segue durante il processo
- che sia possibile fare imaging ottico
- facile da usare
- semina cellulare uniforme

12-06-2017

## TESSUTO CARDIACO

È un campo complesso, ma le malattie cardiovascolari sono il primo causa di morte (30%)  
↳ se ne prevede un aumento

- miocardio
- valvole cardiache
- vasi sanguigni

→ i cardiomiociti adulti non sono in grado di proliferare: se muoiono non vengono sostituiti naturalmente

⊙ autograft: impianti di porzioni di tessuto del paziente prese da un'altra parte

(es. vene per fare il bypass)

⊙ allograft: tessuti che arrivano da altri pazienti

⊙ xenograft: tessuti che arrivano da animali

⊙ protesi artificiali (es. valvole cardiache artificiali)

cuore, vasi sanguigni

Proprietà macroscopiche, microscopiche, molecolari

↳ cellule e tessuti

↳ resistenza maggiore in senso trasversale  
↳ minore in senso longitudinale  
↳ anisotropia sul campo elettrico

(ANISOTROPIA STRUTTURALE)

I tessuti cardiovascolari sono dei compositi:

- in genere è compositamento anisotro

DISCO  
INTERCALARE

Il miocardio è un muscolo costituito da una serie di fibre che avvolgono l'arteria  
↳ nel miocardio la matrice extracellulare è molto scassa e ci sono molte cellule

Lo spessore della parete del ventricolo destro è minore di quello del ventricolo sinistro

SUDE 9!!

-10% in contrazione } deformazioni a cui è sottoposto il tessuto in vivo

+15% in allungamento

↳ modulo di Young: 0.2/0.5 MPa

↳ il suo lato di gioco  
↳ il bioreattore deve essere in grado di simularlo

↳ vasi sanguigni: forti, flessibili  
(altissime da minore in vivo)

## HEART LAYERS

- epicardio (esterno, tessuto connettivo)
- miocardio (muscolo contrattile) → è nel interesse il miocardio
- endocardio (interno, cellule endoteliali)

L'anisotropia delle fibre è tale da opporre resistenza al passaggio di segnali elettrici in senso trasversale alle fibre

l'arteria è un tessuto molto miscelato dai vasi sanguigni ↳ vascolarizzazione della scabbia



# BIOREATTORI

- **Crouzet, 1988** : bioreattore a parete rotante : maggior trasporto di gas e nutrienti  
spessi strati di taglio bassi sulle cellule ( $\sim 0,001 \text{ s}$ )
- **2002** : una maggiore pressione parziale di  $\text{O}_2$  fa differenziare le cellule  
 $\hookrightarrow$  si ha danneggiamento per no
- **Radisic, 2003** : processo di semina (bioreattore a perfusione)  
 $\hookrightarrow$  gel come mezzo di trasporto per le cellule  
processo di perfusione forzato attraverso il scaffold  
 $\hookrightarrow$  migliore ingresso e disposizione di cellule nello scaffold
- **NASA, 2002**
- **FINK, 2000** : scaffold solubile a braccetti, che si sottopongono a trazione  
 $\hookrightarrow$  effetto della trazione sulla organizzazione del scaffold
- **BURSAC, 2003** : cellule in sospensione - è meglio in 3D che monolayer
- **GONEN-WADHANI, 2004** : palloncino che si gonfia e si sgonfia  
 $\hookrightarrow$  cellule sul palloncino
- **RADISIC, 2004 / 2008** : stimolazione elettrica
- **ZIMMERMANN, 2006**