

**POLITECNICO DI MILANO**  
Scuola di Ingegneria dei Sistemi  
Corso di laurea magistrale (CLM) in Ingegneria Biomedica



**Progettazione, sviluppo e caratterizzazione di  
pellets in collagene per la coltura cellulare e  
messa a punto di un protocollo di semina nel  
bioreattore a perfusione OPB**

Relatore: Prof.ssa Sara MANTERO

Correlatori: Ing. Chiara ARRIGONI  
Ing. Stefania Adele RIBOLDI  
Ing. Matteo MORETTI  
Ing. Francesco Giovanni GRECO

Tesi di laurea di:  
Davide MERONI  
Matricola 766406

Anno Accademico 2012-2013

# INDICE

<b>Sommario</b>	1
<b>Abstract</b>	12
<b>Introduzione</b>	22
I.1 Terapie avanzate	22
I.2 Prodotti medicinali per terapia cellulare somatica	23
I.3 Sistemi per l'espansione cellulare	24
I.4 Pellets per l'espansione cellulare	30
I.4.1 Pellets porosi	37
I.5 Scopo del lavoro di tesi	39
<b>Capitolo I: Progettazione, sviluppo e caratterizzazione di pellets in collagene per l'espansione cellulare in bioreattore</b>	42
1.1 Introduzione	42
1.2 Realizzazione dei pellets di collagene	45
1.2.1 Preparazione della sospensione	45
1.2.2 Dispensazione della soluzione	45
1.2.2.1 Produzione in piastra multipozzetto	45
1.2.2.2 Produzione per gocciolamento in azoto liquido	47
1.2.3 Liofilizzazione, reticolazione e sterilizzazione termica	50
1.3 Prove di bagnabilità e galleggiabilità	53
1.3.1 Bagnabilità	53
1.3.1.1 Trattamento al plasma	55
1.3.2 Galleggiabilità	56
1.4 Analisi stereomicroscopica	60
1.4.1 Valutazione della struttura dei pellets	60
1.4.2 Restringimento in seguito alla fase di liofilizzazione	62
1.4.3 Restringimento in seguito al contatto con il mezzo di coltura	64

1.5	Analisi al SEM	68
1.6	Prova di digestione enzimatica	73
1.7	Conclusioni	76
1.8	Appendice	79
1.8.1	Reticolazione del PDMS	79
1.8.2	Elettrovalvola	79
1.8.3	Scheda scaffold di collagene	80
1.8.4	Piastra in PDMS per la realizzazione di dischetti di collagene	81
<b>Capitolo II: Sviluppo di un protocollo di semina cellulare dei pellets in collagene in bioreattore e analisi dell'efficienza di semina</b>		
2.1	Introduzione	82
2.2	Ottimizzazione del protocollo di semina	85
2.2.1	Introduzione	85
2.2.2	Materiali e metodi	85
2.2.3	Risultati	94
2.2.4	Conclusioni	97
2.3	Confronto tra le tipologie di pellets realizzate	99
2.3.1	Introduzione	99
2.3.2	Materiali e metodi	99
2.3.3	Risultati	103
2.3.4	Conclusioni	111
<b>Capitolo III: Analisi preliminare dell'espansione cellulare su pellets in collagene in bioreattore</b>		
3.1	Introduzione	112
3.2	Materiali e metodi	115
3.3	Risultati	119
3.4	Conclusioni	120
<b>Discussione</b>		122
<b>Bibliografia</b>		132

# INDICE DELLE FIGURE

<b>Figura S. 1:</b> Pellets realizzati; A=pellets prodotti in piastra; B=pellets azoto <sub>90</sub> ; C=pellets azoto <sub>50</sub>	5
<b>Figura S. 2:</b> Immagini al SEM della diversa struttura dei pellets prodotti in piastra; A=compatti; B=porosi	6
<b>Figura S. 3:</b> Struttura dei pellets immersi nel mezzo di coltura: A= pellets compatti prodotti in piastra; B=pellets porosi prodotti in piastra; C= azoto <sub>90</sub> ; D=azoto <sub>50</sub>	7
<b>Figura S. 1:</b> Immagine LIVE/DEAD del pellets prodotto in piastra al termine della prova di semina	9
<b>Figure A. 1:</b> Pellets; A=pellets produced in multiwell plate; B=pellets nitrogen <sub>90</sub> ; C=pellets nitrogen <sub>50</sub>	16
<b>Figure A. 2:</b> SEM pictures of the different structure of the pellets produced in multiwell plate. A=compact; B=porous	16
<b>Figure A. 3:</b> Structure of the pellets after the immersion in the culture medium: A=pellets compact produced in multiwell plate; B=pellets porous produced in multiwell plate; C=nitrogen <sub>90</sub> ; D=nitrogen <sub>50</sub>	17
<b>Figure A. 4:</b> LIVE/DEAD picture of the pellet produced in multiwell plate at the end of the seeding phase	19
<b>Figura I.1:</b> Piastra multipozzetto per colture in sospensione	24
<b>Figura I.2:</b> Bioreattore <i>flat-bed</i> per colture in sospensione	25
<b>Figura I.3:</b> Piastra flask per la coltura di cellule ancoraggio di pendenti	25
<b>Figura I.4:</b> Esempio di pellet in gomma di gellano per colture cellulari	28
<b>Figura I.5:</b> Esempi di scaffold di origine naturale: A) spugna di collagene; B) matrice gelatinosa ottenuta da pelle di suino modificata	28
<b>Figura I.6:</b> Esempi di bioreattori per la coltura cellulare: a) <i>spinner flask</i> ; b) <i>rotating wall vessels</i> ; c) <i>hollow fiber bioreactors</i> ; d) bioreattore a perfusione; e) bioreattore in grado di applicare una forza meccanica controllata	29

<b>Figura I.7:</b> Esempio di pellet in PLGA	30
<b>Figura I.8:</b> <i>Spinner flask</i> : A) foto; B) schema	33
<b>Figura 1.1:</b> Fasi di produzione della piastra in PDMS: A = disegno dello stampo; B = disegno della piastra; C = stampo; D = piastra in PDMS (130 mm x 90 mm)	46
<b>Figura 1.2:</b> Set-up per la produzione dei pellets in azoto	48
<b>Figura 1.3:</b> Schematizzazione della dispensazione di collagene nell'azoto liquido	49
<b>Figura 1.4:</b> Liofilizzatore (VirTis)	50
<b>Figura 1.5:</b> Foto delle tre tipologie di pellets	52
<b>Figura 1.6:</b> Doppia struttura dei pellets prodotti in piastra: A = compatti; B = porosi	52
<b>Figura 1.7:</b> Prova di bagnabilità su dischetti in collagene	54
<b>Figura 1.8:</b> Plasma Cleaner (Harrick Plasma)	55
<b>Figura 1.9:</b> Effetto del trattamento al plasma: colonna di sinistra = scaffold non trattati; colonna di destra = scaffold trattati	56
<b>Figura 1.10:</b> Prova di galleggiabilità: Azoto <sub>90</sub> e Azoto <sub>50</sub>	57
<b>Figura 1.11:</b> Prova di galleggiabilità: pellets prodotti in piastra	58
<b>Figura 1.12:</b> Analisi allo stereomicroscopio dei pellets prodotti in piastra, prima e dopo l'immersione nel mezzo di coltura (t=12 ore)	60
<b>Figura 1.13:</b> Analisi allo stereomicroscopio dei pellets prodotti in azoto, Azoto <sub>90</sub> e Azoto <sub>50</sub> , prima e dopo l'immersione nel mezzo di coltura (t=12 ore)	61
<b>Figura 1.14:</b> Immagini al SEM dei pellets realizzati in piastra	68
<b>Figura 1.15:</b> Immagini al SEM dei pellets prodotti in piastra (ingrandimento 200x)	69
<b>Figura 1.16:</b> Immagini al SEM dei pellets prodotti per gocciolamento in azoto, Azoto <sub>90</sub> e Azoto <sub>50</sub> (ingrandimento 2500x)	70
<b>Figura 1.17:</b> Immagini al SEM delle diverse tipologie di pellets (ingrandimento 500x)	71
<b>Figura 1.18:</b> Bilancia analitica a 5 cifre decimali usata per la misura del peso dei pellets	74
<b>Figura 1.19:</b> Elettrovalvola	79
<b>Figura 1.20:</b> Scheda di produzione scaffold di collagene	80
<b>Figura 1.21:</b> Fasi di produzione della piastra in PDMS per dischetti di collagene: A = disegno dello stampo; B = disegno della piastra; C = stampo; D = piastra in PDMS (175 mm x 91 mm)	81
<b>Figura 2.1:</b> Immagine dell'OPB IV (A) e della camera di coltura adatta (B)	84

<b>Figura 2.2:</b> Pellets prodotti in piastra	86
<b>Figura 2.3:</b> Sistema di agitazione dei pellets	86
<b>Figura 2.4:</b> Camera di coltura usata per le prove di semina	87
<b>Figura 2.5:</b> Dinamica di agitazione oscillante	88
<b>Figura 2.6:</b> Dinamica di agitazione non-oscillante	88
<b>Figura 2.7:</b> Metodica di riempimento delle camere di coltura con i pellets	89
<b>Figura 2.8:</b> Falcon + Cell Strainer per il recupero dei pellets	90
<b>Figura 2.9:</b> Tripsinizzazione delle camere di coltura	91
<b>Figura 2.10:</b> Immagini dei pellets prodotti in piastra all'interno della camera di coltura: A) frazione galleggiante dei pellets; B) frazione di pellets deposita sul fondo della camera	94
<b>Figura 2.11:</b> Immagini LIVE/DEAD dei pellets prodotti in piastra della prova 3	96
<b>Figura 2.12:</b> Immagini MTT dei pellets prodotti in piastra della prova 3	97
<b>Figura 2.13:</b> Pellets utilizzati nella prova di semina per l'ottimizzazione del materiale: pellets prodotti in piastra compatti (A), pellets prodotti in piastra porosi (B), Azoto <sub>90</sub> (C), Azoto <sub>50</sub> (D)	99
<b>Figura 2.14:</b> TALI Image Cytometer – Cell Counter	102
<b>Figura 2.15:</b> Risultati mostrati dal TALI dopo la conta cellulare e l'analisi della fluorescenza nei canali verde e rosso	103
<b>Figura 2.16:</b> Comportamento dei pellets all'interno delle camere di coltura	104
<b>Figura 2.17:</b> Comportamento dei pellets compatti prodotti in piastra all'interno della camera di coltura	106
<b>Figura 2.18:</b> Immagini delle cellule seminate su piastra multipozzetto dopo 24 ore	108
<b>Figura 2.19:</b> Immagini delle cellule seminate su piastra multipozzetto a confluenza dopo 4 giorni	109
<b>Figura 3.1:</b> Immagine del bioreattore OPB con 6 camere di coltura	118
<b>Figura 3.2:</b> Immagine LIVE/DEAD di un pellet di collagene al termine della prova di espansione (giorno 15). La colorazione rossa indica che la morte delle cellule	120

# INDICE DELLE TABELLE

<b>Tabella I.1:</b> Esempi di materiali utilizzati per la produzione di pellets; meq = milliequivalent _____	31
<b>Tabella I.2:</b> Tipologie di pellets presenti in commercio _____	32
<b>Tabella 1.1:</b> Parametri di processo della metodica di gocciolamento in azoto _____	49
<b>Tabella 1.2:</b> Protocollo di liofilizzazione _____	51
<b>Tabella 1.3:</b> Parametri di reticolazione del PDMS _____	79
<b>Tabella 2.1:</b> Tempi di digestione enzimatica dei pellets _____	107

# INDICE DEI GRAFICI

<b>Grafico S. 1:</b> Prova di semina per la messa a punto del protocollo di semina_____	9
<b>Grafico S. 2:</b> Prova di semina per la determinazione dell'efficienza di semina delle varie tipologie di pellets_____	10
<b>Grafico S. 3:</b> Vitalità cellulare al termine del trattamento di recupero in collagenasi di tipo I_____	10
<b>Grafico S. 4:</b> Prova preliminare di espansione cellulare_____	11
<b>Graphic A. 1:</b> Seeding tests for the development of the seeding protocol_____	19
<b>Graphic A. 2:</b> Seeding test to define the seeding efficiency of the different types of pellets_____	20
<b>Graphic A. 3:</b> Cell viability at the end of the harvesting treatment with collagenase I_____	20
<b>Graphic A. 4:</b> Preliminary test of cell expansion_____	21
<b>Grafico I.1:</b> Curva di crescita cellulare_____	26
<b>Grafico I.2:</b> Confronto tra l'espansione cellulare 2D e 3D_____	33
<b>Grafico I.3:</b> Effetto della densità di semina sull'espansione massima raggiungibile: A) Pellets vs B) Monostrato_____	35
<b>Grafico I.4:</b> Numero di cellule vitali all'aumentare della velocità di agitazione; □ = 60 rpm; Δ = 100 rpm; ○ = 150 rpm_____	36
<b>Grafico I.5:</b> Concentrazione di ossigeno al variare della profondità dalla superficie dei pellets_____	38
<b>Grafico 1.1:</b> Dimensioni dei pellets prodotti in piastra prima (valori medi: 2,4 mm [w] x 2,4 mm [h] x 2,4 mm [d]) e dopo (valori medi: 1,94 mm [w] x 2,28 mm [h] x 1,94 mm [d]) la fase di liofilizzazione_____	62
<b>Grafico 1.2:</b> Volume dei pellets prodotti in piastra prima (valore medio: 13,82 mm <sup>3</sup> ) e dopo (valore medio: 8,58 mm <sup>3</sup> ) la fase di liofilizzazione_____	63
<b>Grafico 1.3:</b> Volume dei pellets Azoto <sub>90</sub> prima (valore medio: 15 mm <sup>3</sup> ) e dopo (valore medio: 9,62 mm <sup>3</sup> ) la fase di liofilizzazione_____	63



<b>Grafico 1.4:</b> Volume dei pellets Azoto <sub>50</sub> prima (valore medio: 8,3 mm <sup>3</sup> ) e dopo (valore medio: 5,05 mm <sup>3</sup> ) la fase di liofilizzazione	64
<b>Grafico 1.5:</b> Dimensioni dei pellets prodotti in piastra prima (valori medi: 1,94 mm [w] x 2,28 mm [h] x 1,94 mm [d]) e dopo (valori medi: 1,69 mm [w] x 2,12 mm [h] x 1,69 mm [d]) il contatto con il mezzo di coltura	65
<b>Grafico 1.6:</b> Volume dei pellets prodotti in piastra prima (valore medio: 8,58 mm <sup>3</sup> ) e dopo (valore medio: 6,05 mm <sup>3</sup> ) il contatto con il mezzo di coltura	65
<b>Grafico 1.7:</b> Volume dei pellets Azoto <sub>90</sub> prima (valore medio: 9,62 mm <sup>3</sup> ) e dopo (valore medio: 3,05 mm <sup>3</sup> ) il contatto con il mezzo di coltura	66
<b>Grafico 1.8:</b> Volume dei pellets Azoto <sub>50</sub> prima (valore medio: 5,05 mm <sup>3</sup> ) e dopo (valore medio: 1,31 mm <sup>3</sup> ) il contatto con il mezzo di coltura	66
<b>Grafico 1.9:</b> Grafico riassuntivo dei restringimenti subiti dai pellets	67
<b>Grafico 1.10:</b> Perdita di peso nel tempo dei pellets sottoposti a digestione enzimatica	75
<b>Grafico 2.1:</b> Numero di cellule in % recuperato al termine della prova di semina rispetto all'aliquota di riferimento. Prova n.1 (n=2): % di cellule aderite ai pellets = 25,23±9,46 %; % di cellule aderite alla camera = 0,79±0,32 %; % di cellule in sospensione nel mezzo di coltura = 12,10±5,62 %. Prova n.2 (n=3): % di cellule aderite ai pellets = 30,80±6,66 %; % di cellule aderite alla camera = 2,65±3,17 %; % di cellule in sospensione nel mezzo di coltura = 9,33±7,71 %. Prova n.3 (n=2): % di cellule aderite ai pellets = 34,30±11,27 %; % di cellule aderite alla camera = 2,62±1,46 %; % di cellule in sospensione nel mezzo di coltura = 21,38±11,95 %	95
<b>Grafico 2.2:</b> Numero di cellule in % recuperato al termine della prova di semina rispetto all'aliquota di riferimento. Piastra compatti (n=2): % di cellule aderite ai pellets = 42,90±13,38 %; % di cellule aderite alla camera = 4,87±2,61 %; % di cellule in sospensione nel mezzo di coltura = 20,90±0,72 %. Piastra porosi (n=1): % di cellule aderite ai pellets = 38,62 %; % di cellule aderite alla camera = 6,65 %; % di cellule in sospensione nel mezzo di coltura = 18,13 %. Azoto <sub>90</sub> (n=2): % di cellule aderite ai pellets = 51,40±9,48 %; % di cellule aderite alla camera = 6,02±1,28 %; % di cellule in sospensione nel mezzo di coltura = 27,29±10,51 %. Azoto <sub>50</sub> (n=1): % di cellule aderite ai pellets = 43,00 %; % di cellule aderite alla camera = 3,61 %; % di cellule in sospensione nel mezzo di coltura = 33,78 %	105

**Grafico 2.3:** Quantità di cellule vitali in % determinata tramite TALI. Piastra compatti [96%], Piastra porosi [98%], Azoto<sub>90</sub> [96%], Azoto<sub>50</sub> [87%]\_\_\_\_\_110

**Grafico 3.1:** Confronto tra l'espansione in monostrato e l'espansione tramite pellets (Cellagen® Beads). Nel cerchio rosso è messa in evidenza la fase iniziale di morte cellulare (Osteoblasti) comune a entrambi i sistemi. Linea continua = pellets; linea tratteggiata = monostrato\_\_\_\_\_112

**Grafico 3.2:** Prove di espansione cellulare a diverse condizioni iniziali. Nel cerchio rosso è evidenziata la fase iniziale di morte cellulare\_\_\_\_\_113

**Grafico 3. 1:** Risultato della prova di espansione cellulare all'interno del bioreattore OPB. Numero delle camere di coltura per ogni *time-point*: giorno 1→ n=1; giorno 3→ n=1; giorno 7→ n=2; giorno 14→ n=2\_\_\_\_\_

119

# SOMMARIO

**A**l giorno d'oggi l'espansione cellulare in vitro rappresenta il primo passo nell'ambito delle terapie avanzate. Nella pratica comune le cellule isolate da una biopsia, effettuata su una specifica parte del corpo del paziente, vengono espanse in vitro, questo perché, in molti casi, la quantità di cellule utilizzabili non è sufficiente allo scopo prefissato.

A seconda del tipo cellulare le cellule possono crescere adese o in sospensione. Per le cellule che crescono in sospensione, come batteri e molti tipi di cellule presenti nel sangue (linfociti), nel midollo, la sospensione può essere mantenuta in condizioni statiche, utilizzando per esempio piastre Petri o piastre multipozzetto, o dinamiche. La maggior parte delle cellule, però, crescono in adesione. In questo caso la sospensione cellulare viene posta in un contenitore di vetro o di plastica, a fondo piatto (capsula di Petri, flask, ecc.). Qui le popolazioni cellulari hanno la possibilità di sintetizzare specifiche

glicoproteine di membrana che permettono alla cellula di aderire al substrato, di cambiare forma e distendersi grazie ad una nuova organizzazione del citoscheletro. Dopo un periodo di tempo variabile quindi, inizia la divisione mitotica e si sviluppa una coltura. L'adesione ad un supporto è indispensabile per la crescita di queste cellule.

Oltre all'espansione in monostrato 2D molto spesso per la coltura in adesione si utilizzano anche sistemi 3D. I sistemi 3D imitano più strettamente le condizioni di crescita naturali rispetto alle colture in 2D, dove le cellule sono coltivate su piastre piane in plastica molto rigide [1]. Nella coltura cellulare 3D le cellule aderiscono tra loro su un supporto che garantisce superfici maggiori e formano legami cellula-cellula come nell'ambiente fisiologico attraverso la matrice extracellulare che è flessibile e malleabile così da permettere il movimento e la migrazione come nei tessuti naturali. Questo legame, inoltre, ottimizza la

comunicazione e la segnalazione, meccanismi fondamentali per le funzioni delle cellule. Inoltre, le funzioni delle cellule cresciute in 3D sono mantenute e sono più simili alle funzioni dei tessuti nativi rispetto alle cellule coltivate in 2D [2].

Come materiali per i supporti 3D solitamente si usano idrogel, a causa della loro varietà, versatilità e capacità di adattare la loro composizione, o sistemi di crescita cellulare contenenti micro- o macropori che favoriscono l'accesso bilaterale a nutrienti, citochine, ormoni ed altri componenti del mezzo di coltura.

In base all'applicazione finale esistono diversi sistemi di espansione 3D:

- Coltura di cellule su scaffold: questa tecnica prevede l'uso di supporti specifici in grado di organizzare ed indirizzare l'espansione cellulare in modo da ricreare una struttura 3D in grado di mimare le strutture dei tessuti nativi [3].
- Pellets: sono matrici di supporto che permettono l'espansione delle cellule in sistemi in sospensione. Sono caratterizzati da un elevato rapporto superficie-volume e l'area disponibile per la crescita cellulare può essere variata facilmente modificando il numero dei pellets.

La semina cellulare su supporti, quali scaffold o in particolare pellets e il controllo dei parametri ambientali necessari per l'espansione sono il primo passo nello sviluppo di una coltura 3D, per questo motivo il loro studio è di importanza cruciale. Tradizionalmente la sospensione cellulare viene dispensata manualmente all'interno del supporto 3D utilizzando pipette e sfruttando la forza di gravità per far aderire le cellule alle pareti. Questo metodo di semina, difficile da standardizzare a causa della variabilità intra- e inter- operatore, è spesso associato a una scarsa efficienza e ad una distribuzione iniziale delle cellule non uniforme all'interno dello scaffold. Per questo motivo in questi anni diverse tecniche di semina e coltura cellulare si sono basate sull'utilizzo di bioreattori per aumentare la qualità, la riproducibilità, l'efficienza e l'uniformità del processo di semina rispetto ai metodi statici tradizionali [4]. I bioreattori sono dispositivi che permettono di sviluppare, sotto stretto controllo, processi biologici e/o biochimici monitorando le condizioni ambientali e di funzionamento [5].

In particolare nelle terapie cellulari, la necessità di poter espandere il numero di cellule recuperato ha indotto, nel campo della cellule ancoraggio-dipendenti, a un

maggior interesse per lo studio e lo sviluppo dei pellets [6]. I pellets sono scaffold realizzati con diversi materiali che permettono l'espansione cellulare in sospensione all'interno di un opportuno sistema di coltura. I pellets all'interno di un sistema agitante entrano in contatto con le cellule in sospensione, le quali dopo l'adesione iniziano la fase di espansione. Solitamente le colture avvengono all'interno dei bioreattori poiché permettono il rimescolamento dei pellets all'interno delle camere di coltura e permettono la standardizzazione dei protocolli di semina, il monitoraggio e il controllo delle condizioni di coltura e una maggiore sicurezza dalle contaminazioni durante la prova. Nel caso particolare dei pellets garantiscono, inoltre, l'uniformità del processo di semina e la riproducibilità.

Questi particolari scaffold hanno una forma solitamente sferica con un diametro che varia, nella maggior parte dei casi, tra 100 e 400  $\mu\text{m}$  [7]. La loro particolarità è la capacità di offrire un ambiente ottimale per l'adesione delle cellule senza intaccarne la vitalità [8].

Al giorno d'oggi sono presenti in commercio varie tipologie di pellets che differiscono soprattutto per il materiale

con cui sono fatti e per la loro struttura, tra i quali i più utilizzati sono:

- Pellets con superficie liscia: Biosilon (polistirene), Cytodex (DEAE-destrano o gelatina), Cellagen (collagene), Solohil (vetro o collagene).
- Pellets porosi: Cultisphere (collagene o gelatina), Cytoline (polietilene), Cytopore (cellulosa).

In particolare i pellets porosi oltre a permettere l'espansione cellulare sulla superficie esterna, come nel caso dei pellets con superficie liscia, permettono l'adesione delle cellule anche all'interno dei pori, aumentando in questo modo la superficie disponibile e al tempo stesso preservando le cellule da elevati sforzi di taglio.

L'obiettivo di questo lavoro di tesi è pertanto quello di sviluppare un sistema 3D per l'espansione cellulare. In particolare l'idea è quella di sviluppare pellets porosi di collagene e di utilizzarli per l'espansione cellulare all'interno del bioreattore.

Al fine di realizzare uno scaffold biocompatibile e che funga da matrice extracellulare, stimolando l'adesione e l'espansione cellulare senza inficiarne la vitalità, è stato utilizzato il collagene di tipo I per la realizzazione dei pellets. Il

collagene è considerato uno dei biomateriali più utili per applicazioni nelle terapie avanzate e nell'ingegneria dei tessuti. La biocompatibilità e le caratteristiche biologiche, come la biodegradabilità, rendono il collagene la prima risorsa per applicazioni mediche [9]. Molti polimeri naturali e sintetici sono stati utilizzati come biomateriali, ma il collagene si differenzia per la sua interazione con le cellule [10]. In particolare quello di tipo I, visti i suoi vantaggi come biodegradabilità, biocompatibilità e la possibilità di combinarlo con altri materiali, è quello maggiormente utilizzato nell'ambito delle terapie avanzate o nell'ingegneria dei tessuti [11].

Per la progettazione dei pellets è stata considerata la funzione che devono svolgere. Dovendo permettere un'alta efficienza di semina e la possibilità di sostenere l'espansione cellulare, i pellets sono stati progettati con dimensioni dell'ordine del millimetro. In questo modo aumentando la superficie disponibile per singolo pellets rispetto a quelli tradizionali (dimensioni dell'ordine del micrometro), le cellule hanno una probabilità maggiore di impattare efficacemente con gli scaffold durante la coltura in agitazione. Inoltre durante la

fase di coltura hanno a disposizione una superficie maggiore senza dover migrare da un pellet all'altro per raggiungere l'espansione massima [12].

Parte fondamentale di questo lavoro è stata dedicata allo studio di una metodica di produzione facilmente industrializzabile. Per questo motivo sono state analizzate due differenti metodiche di produzione:

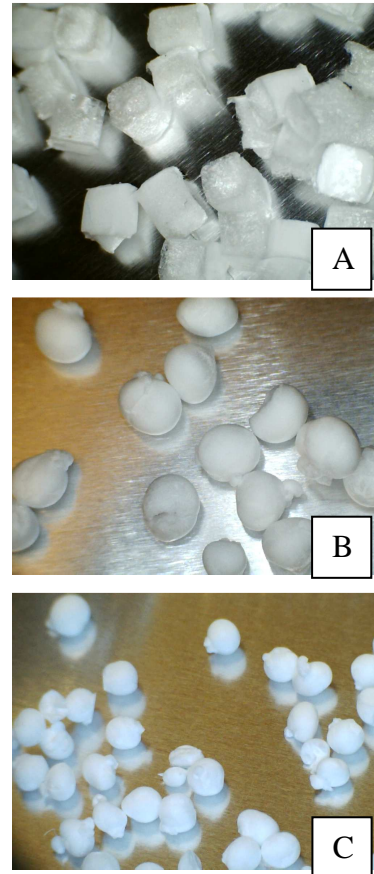
- Realizzazione mediante piastra multi pozzetto in PDMS.
- Realizzazione per gocciolamento in azoto liquido (-196°C).

Nel primo caso è stata ideata una piastra multipozzetto in PDMS. Tramite questa metodica sono stati ottenuti pellets cubici con lato di 2,4 mm (dimensioni pre-liofilizzazione). Il processo produttivo consiste nel dispensare manualmente il collagene tramite una pipetta automatica, in cui è possibile impostare il volume di collagene da dispensare: 13,8 µl.

Nel secondo caso, invece, la sospensione di collagene è stata fatta gocciolare all'interno di un contenitore contenente azoto liquido (-196°C); Il collagene, grazie alla pompa siringa è spinto in un tubo di Teflon che termina con un ago del diametro di 18G al di sopra del contenitore dell'azoto liquido. Qui il volume della goccia di collagene è

determinato dalla temporizzazione del flusso d'aria. L'aria interrompendo ad intervalli prestabiliti la soluzione uscente dalla punta dell'ago permette la formazione di gocce di collagene omogenee in volume. In questo modo si ottengono scaffold sferici di dimensioni dell'ordine del millimetro. Data la facilità di intervento sui parametri di progetto sono state realizzate due tipologie di pellets, differenti per la quantità iniziale dispensata, Azoto<sub>90</sub> (15μl) e Azoto<sub>50</sub> (8,3μl). Questa seconda metodica, appositamente ideata in questo progetto di tesi, dal punto di vista industriale è più veloce, automatizzata e permette di intervenire semplicemente sui parametri di processo; per esempio per modificare il volume dei pellets è sufficiente modificare la portata della pompa siringa o la temporizzazione del flusso d'aria; a differenza della metodica di produzione in piastra dove per modificare il volume del pellets occorre realizzare un'altra piastra e il numero finale di pellets è vincolato al numero di pozzetti della piastra.

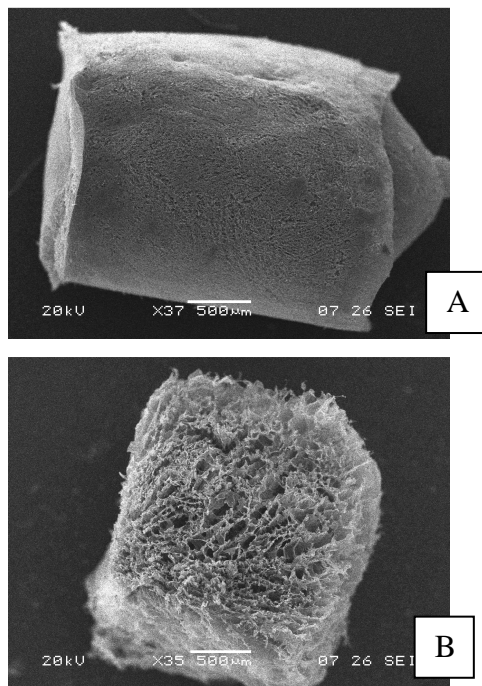
Una volta realizzati i pellets sono stati sottoposti a liofilizzazione, reticolazione e sterilizzazione termica. Al termine del processo produttivo i pellets ottenuti hanno l'aspetto seguente:



**Figura S. 4:** Pellets realizzati; A=pellets prodotti in piastra; B=pellets azoto<sub>90</sub>; C=pellets azoto<sub>50</sub>.

Oltre alla geometria differente i pellets differiscono anche per la struttura superficiale. Il motivo probabilmente risiede nella metodica di congelamento. Come dimostrato da O'Brien et al. [13] aumentando la velocità di congelamento, a parità di materiale le dimensioni dei pori diminuiscono. Infatti anche nel caso in oggetto le dimensioni dei pori di entrambe le tipologie di pellets prodotti per gocciolamento in azoto liquido paiono mediamente inferiori e costanti nonostante il volume differente. Per quanto riguarda i pellets realizzati in

piastra invece è stata riscontrata una duplice struttura superficiale. Come si vede dalle immagini SEM, i pellets differiscono per le dimensioni dei pori:



**Figura S. 5:** Immagini al SEM della diversa struttura dei pellets prodotti in piastra; A=compatti; B=porosi.

Rispetto ai pellets realizzati in azoto liquido, i pellets realizzati in piastra subiscono un congelamento meno istantaneo, infatti al termine della fase di dispensazione vengono disposti in un congelatore a  $-40^{\circ}\text{C}$ .

Durante la caratterizzazione sono state inoltre condotte delle prove di bagnabilità e galleggibilità. La bagnabilità influenza l'adesione cellulare: l'adesione delle cellule al substrato è caratterizzata dalla natura dello strato proteico assorbito. Le proteine svolgono sia una funzione di

segnale per lo stimolo di legami specifici con le cellule sia una funzione strutturale di adesione [14]. Per questo motivo lo scaffold deve essere altamente bagnabile in modo da poter assorbire le proteine necessarie all'adesione con le cellule.

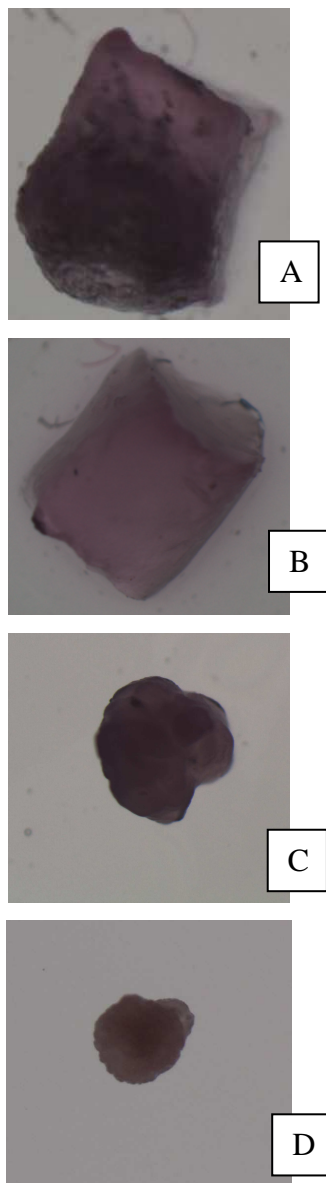
Da una prima analisi dei pellets è stata riscontrata una certa idrofobicità del materiale. Per questo motivo è stato introdotto il trattamento al plasma. Questo trattamento, modificando la struttura superficiale dei pellets, ha permesso di migliorarne la bagnabilità.

Le prove di galleggibilità sono state condotte per definire le caratteristiche dei pellets all'interno del mezzo di coltura.

Per i pellets, che devono rimanere sospesi nel mezzo di coltura all'interno del sistema di agitazione, la galleggibilità assume un'importanza cruciale. Se dovessero galleggiare in superficie o rimanere sul fondo della camera durante tutta la durata della prova di coltura, il rischio sarebbe quello di non impattare efficacemente con le cellule. Durante le prove è stato riscontrato che i pellets realizzati in piastra con struttura compatta una volta immersi nel mezzo di coltura galleggiano in superficie, mentre le altre tipologie di pellets tendono a depositarsi sul fondo. Questo risultato è dimostrato anche dalla disomogeneità di colore nei



pellets compatti prodotti in piastra bagnati, rispetto agli altri pellets.



**Figura S. 6:** Struttura dei pellets immersi nel mezzo di coltura: A= pellets compatti prodotti in piastra; B=pellets porosi prodotti in piastra; C= azoto<sub>90</sub>; D=azoto<sub>50</sub>.

Probabilmente alcune parti del pellet non riescono ad assorbire il mezzo.

Un'altra peculiarità riscontrata è il diverso grado di restringimento dovuto alla fase di liofilizzazione e al contatto con il mezzo di coltura: al di là di quello dovuto

alla fase di liofilizzazione riscontrato anche in letteratura [15] e che si è mostrato costante tra le varie tipologie di pellets, quello dovuto al contatto con il mezzo di coltura mostra come entrambe le strutture (azoto e piastra) ne siano soggette con esito differente:

- Restringimento in volume dei pellets prodotti in piastra (compatti e porosi) = 30%
- Restringimento in volume dei pellets Azoto<sub>90</sub> = 69%
- Restringimento in volume dei pellets Azoto<sub>50</sub> = 74%

Nonostante il restringimento i pellets hanno però dimostrato di poter mantenere la struttura senza andare incontro a degradazione fino a un anno di distanza dall'immersione nel mezzo di coltura a temperatura ambiente.

I pellets sono stati infine sottoposti a una prova di digestione enzimatica. Per colture cellulari in bioreattori, una volta espanso le cellule necessitano di essere staccate dai pellets senza subire danneggiamenti. È stato scelto di testare l'utilizzo della collagenasi, un enzima che permette di digerire completamente i pellets senza intaccare la vitalità cellulare. Da questa prova sono stati definiti i tempi di digestione.

Un'ulteriore sperimentazione è stata condotta con lo scopo di ottimizzare il protocollo di semina e i parametri di processo del bioreattore. Avendo sviluppato dei pellets dimensionalmente diversi da quelli trovati in letteratura (dimensioni dell'ordine del micrometro) lo studio e l'analisi del protocollo di semina assumono ancora più significato. La fase di semina cellulare dovrà permettere l'adesione delle cellule al pellet. Le prove sono state condotte all'interno del bioreattore OPB (Oscillatory Perfusion Bioreactor). L'OPB è un bioreattore a perfusione oscillante brevettato dall'Ing. Matteo Moretti [16,17] (Patent n° WO2008/098165, licenza: SKE Advanced Therapies S.r.l.) in uso allo stato prototipale presso i laboratori di ricerca del MIT (Massachusetts Institute of Technology) di Boston e il Laboratorio di Ingegneria tessutale e Cellulare dell'Istituto Ortopedico Galeazzi di Milano.

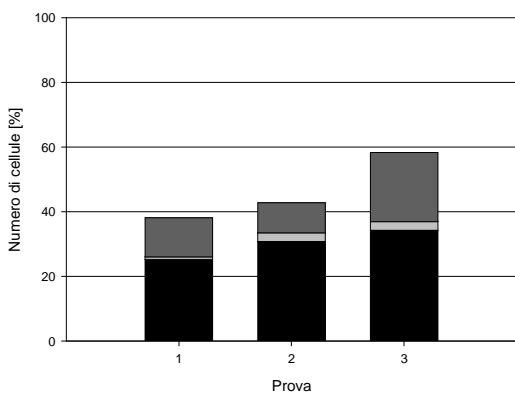
Dovendo definire l'efficienza di semina sui pellets sono state condotte 3 prove della durata di 24 ore l'una sui pellets realizzati in piastra (considerato il caso più critico a causa del doppio comportamento riscontrato). Durante le prove è stato anche migliorato il

protocollo di semina e la modalità di recupero delle cellule al termine delle 24 ore. Le prove si differenziano essenzialmente per la dinamica di agitazione del bioreattore OPB:

- Prova 1: velocità tangenziale di 1000 $\mu$ m/s con andamento oscillante (angolo di 270°).
- Prova 2: velocità tangenziale di 2000 $\mu$ m/s con andamento non-oscillante per permettere un rimescolamento migliore dei pellets all'interno della camera. Inoltre vista anche in letteratura la necessità di un andamento ad intermittenza in grado di migliorare l'adesione delle cellule ai pellets [18], la dinamica del bioreattore in questa prova ha previsto 10 minuti di movimento e 10 minuti di pausa.
- Prova 3: velocità tangenziale di 10000 $\mu$ m/s con l'andamento non-oscillante a intermittenza della prova 2.

Risultato chiave, indice dell'efficacia degli studi effettuati, è stata l'efficienza di semina sui pellets. L'efficienza di semina sui pellets è stata calcolata tramite saggio CyQuant, in cui è stato possibile determinare anche la quantità di cellule aderite alle camere del bioreattore e la quantità di cellule rimaste in sospensione

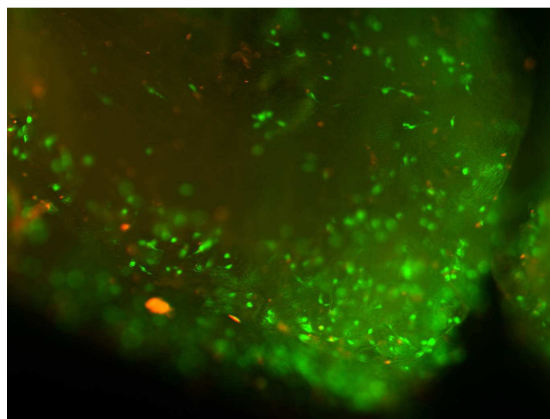
nel mezzo al termine della prova di coltura.



**Grafico S. 5:** Prova di semina per la messa a punto del protocollo di semina.

Come si può notare aumentando la velocità tangenziale del bioreattore e alternando la rotazione con momenti di pausa, rispetto alla prima prova l'efficienza di semina è aumentata complessivamente del 10%. Cambiando la dinamica di agitazione (oscillante → non-oscillante) ed introducendo la pausa nel protocollo, l'efficienza di semina su pellets è aumentata del 5,57%: da 25,23% (prova n. 1) a 30,80% (prova n. 2). Aumentando la velocità tangenziale da 2000 $\mu\text{m/s}$  (prova n. 2) a 10000  $\mu\text{m/s}$  (prova n. 3), invece, l'efficienza di semina è aumentata del 3,5%: da 30,8% a 34,3%. L'utilità della pausa risiede nella possibilità di dare alle cellule il tempo per depositarsi sui pellets. L'aumento di velocità e la rotazione non oscillante garantiscono invece un rimescolamento

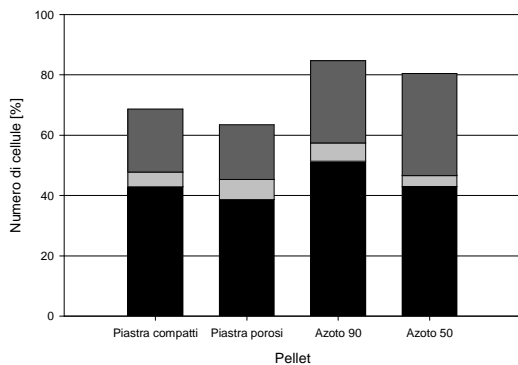
maggiore della soluzione, permettendo così a tutti i pellets di entrare in contatto con le cellule ed aumentando in questo modo l'efficienza di semina complessiva. La qualità del risultato ottenuto è dimostrata anche dalla distribuzione e dalla vitalità delle cellule osservabile dall'immagine LIVE/DEAD.



**Figura S. 2:** Immagine LIVE/DEAD del pellets prodotto in piastra al termine della prova di semina.

Utilizzando il protocollo di semina determinato e la dinamica di agitazione della prova 3 è stata poi condotta una prova per l'ottimizzazione del materiale. Durante la prova sono stati messi a confronto i pellets prodotti in piastra con quelli prodotti per gocciolamento in azoto. Inoltre sono stati confrontati i pellets prodotti in piastra compatti con quelli porosi. I risultati di questa analisi sono mostrati nel grafico seguente dove è mostrato per ogni tipologia di scaffold il numero di cellule aderite ai pellets, il numero di cellule aderite alla camera di

coltura e il numero di cellule rimaste in sospensione nel mezzo di coltura al termine della prova.

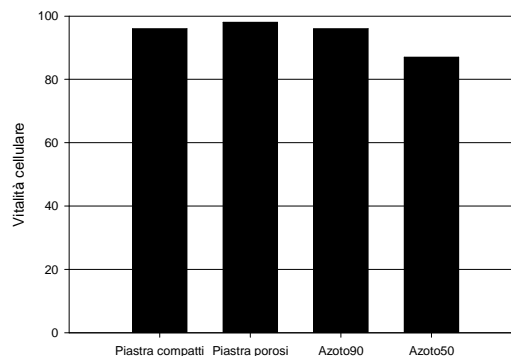


**Grafico S. 6:** Prova di semina per la determinazione dell'efficienza di semina delle varie tipologie di pellets.

Come si può vedere, pur avendo diviso le due strutture, l'efficienza di semina dei pellets prodotti in piastra è rimasta la stessa: 42,90% per quelli compatti e 38,62 per quelli porosi. Dal punto di vista assoluto, invece, in tutte le condizioni le cellule aderite alle pareti della camera rimangono su valori molto bassi (dal 3 al 6%), mentre la maggior parte delle cellule recuperate aderisce ai pellets. La quantità di cellule rimaste in sospensione nel mezzo rimane su valori elevati: dal 20% al 30%.

Confrontando l'efficienza di semina delle varie tipologie di pellets si può notare come i pellets Azoto<sub>90</sub> garantiscono un'efficienza maggiore (51,40%) rispetto alle altre tipologie (circa 40%).

I pellets al termine della prova sono stati digeriti tramite collagenasi I ed è stata analizzata la vitalità delle cellule tramite TALI (Image Cytometer - Cell Counter).



**Grafico S. 7:** Vitalità cellulare al termine del trattamento di recupero in collagenasi di tipo I.

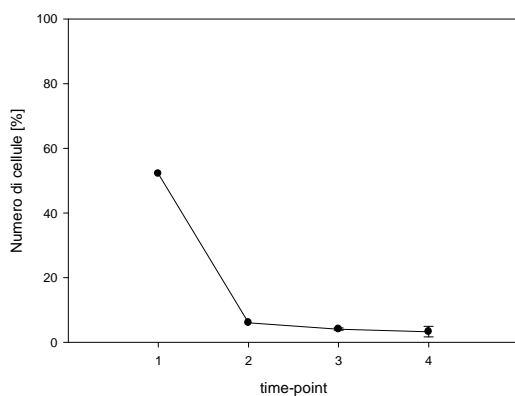
Come si può vedere, in tutti i casi i valori sono prossimi al 100%, indice dell'efficacia del trattamento subito.

La terza parte di questa tesi consiste nell'analisi preliminare di una prova di espansione cellulare. Volendo scegliere un'unica tipologia di pellets per questa prova, la scelta è caduta sui pellets Azoto<sub>90</sub> che garantiscono un'efficienza di semina maggiore rispetto alle altre tipologie di pellets (il 51,40% delle cellule iniettate) e mantengono alti valori di vitalità cellulare. La prova di espansione è durata 15 giorni e sono state utilizzate complessivamente 6 camere di coltura, impostando la velocità tangenziale del bioreattore a 10000µm/s con un andamento non-oscillante a intermittenza per le prime 24 ore e

mantenendo la stessa velocità ma impostando un moto continuo per i giorni successivi.

Le camere di coltura sono state analizzate a diversi *time-point* per valutare il grado di espansione nel tempo.

I risultati della prova sono mostrati nel grafico seguente:



**Grafico S. 8:** Prova preliminare di espansione cellulare.

Quello che si può notare è che, nonostante l'efficienza di semina rimanga sui valori riscontrati durante le prove precedenti (52,18%), nei *time-point* successivi il numero di cellule diminuisce, indice della mortalità cellulare. Questo risultato è probabilmente da attribuirsi a una dinamica di agitazione non adatta alla fase di espansione. Un possibile sviluppo futuro sarà quello di determinare i parametri ottimali del bioreattore da applicare per la fase di espansione, come è stato fatto dettagliatamente per la fase di semina.

# ABSTRACT

Nowadays the in vitro cell expansion is the first step in the field of advanced therapies. In common practice, the cells isolated from a biopsy, performed on a specific part of the body of the patient, are expanded in vitro. The reason is that, in many cases, the amount of cell collected is not sufficient for the final purpose.

Depending on the cell type, cells can grow adherent or in suspension. For cells that grow in suspension, such as many types of cells in the blood (lymphocytes), in the bone and bacteria, the suspension can be maintained in static conditions, using for example Petri dishes or multiwell plates, or in dynamic conditions. A lot of cells, however, grow in adhesion and normally the suspension with cells is placed in a container of glass or plastic, with a flat bottom (Petri dish, flask, etc.). In this conditions, cells have the possibility to synthesize specific membrane glycoproteins that allow the cell to adhere to the substrate, to change its morphology and to organized the structure of cytoskeleton. After a variable period of time, begin the mitotic division

end the culture. The adhesion to a support is essential for the growth of these kind cells.

In addition to the expansion in 2D monolayer culture very often the culture is made in 3D systems. The 3D systems mimic more closely the natural conditions of growth compared to culture in 2D, where the cells grow on unnatural, plastic flat plates [1]. In the 3D cell culture the cells adhere to each other on a support which allow more space and cells make natural cell-to-cell bonds through the extracellular matrix that is flexible to allow the movement and migration as in natural tissues. This kind of adhesion also optimizes communication and signaling among the cells. In addition, the functions of the cells grown in 3D are similar to the functions of native tissues, compared to cells grown in 2D [2].

Materials used as 3D supports are usually hydrogel. This materials are versatility and have the ability to adapt to their composition. Otherwise cells are grown into systems with micro- or macropores that support the bilateral access to

nutrients, cytokines, hormones and other components of the culture medium.

Depending on the final application there are different ways to support 3D expansion:

- Cells culture on scaffolds: This technique allows to develop a scaffold with specific materials that can organize and direct the cell expansion in order to create a 3D structure able to mimic the structure of native tissues [3].
- Pellets: Pellets are particular matrices that allow the expansion of cells in suspension systems. Pellets are characterized by a high surface-volume ratio and the area available for cell growth can be varied easily by changing the number of pellets into the culture.

The cell seeding on surfaces such as scaffolds or pellets, and the control of environmental parameters are the first step to develop a 3D culture, for this reason their study is fundamental. Traditionally, the cell suspension is dispensed manually into the 3D support using pipettes and the force of gravity to allow the adhesion of the cells to the walls. This method of seeding, not easy to make standard due to the variability intra-and inter-operator, is often associated to an

insufficient seeding efficiency and to a non-uniform distribution of cells into the scaffold. For this reason, in these years, various seeding techniques and cell culture involve the use of bioreactors to increase the quality, the reproducibility, the efficiency and the uniformity of the process of seeding, compared to traditional static methods [4]. Bioreactors are devices that allow to develop biological and / or biochemical process, under accurate control, monitoring the environmental and the operating conditions [5]. In particular in cellular therapies, the need to expand the number of cells isolated, encouraged the study and the development of the pellets [6]. The pellets are scaffold realized with different materials that allow the cell expansion in suspension in a culture system. The pellets within a stirring system impact with the cells in suspension, and after the adhesion, cells begin the expansion phase. Usually the culture is within the bioreactors because they allow the mixing of the pellets inside the culture chambers and allow the standardization of seeding protocols, monitoring and control of culture conditions and safety from contamination during the test. In the particular case of the pellets, bioreactors ensure uniformity

of the process of seeding and reproducibility. These particular scaffold usually have a spherical shape with a diameter that range between 100 and 400  $\mu\text{m}$  [7]. Pellets have the ability to provide an optimal environment for cell adhesion without affecting the vitality [8]. Nowadays exist different types of commercial pellets that are made of different materials and have a different structure:

- Pellets with smooth surface: Biosilon (polystyrene), Cytodex (DEAE-dextran or gelatin) Cellagen (collagen), Solohil (glass or collagen).
- Porous pellets: Cultisphere (collagen or gelatin) Cytoline (polyethylene), Cytopore (cellulose).

In particular, the porous pellets in addition to allowing the cell expansion on the external surface, as in the case of pellets with a smooth surface, they allow the adhesion of cells into the pores, increasing the available surface area and at the same time preserving cells by high shear stress.

The purpose of this work is to develop a system for 3D cell expansion. In particular, the idea is to develop porous pellets of collagen and to use this pellets for the cell expansion within a bioreactor.

In order to obtain a biocompatible scaffold similar to the extracellular matrix, stimulating the adhesion and expansion without decrease cell viability, collagen type I was used to realize the pellets. Collagen is one of the most useful biomaterials for applications in tissue engineering and advanced therapies. Thanks to biocompatibility and biological characteristics, such as biodegradability, collagen is the first resource for medical applications [9]. A lot of natural and synthetic polymers have been used as biomaterials, but the collagen differs for its interaction with the cells [10]. In particular collagen type I, thanks to biodegradability and biocompatibility properties and thanks to the ability to combine it with other materials, is the most used in the context of advanced therapies or in tissue engineering[11]. For the design of the pellet was considered its function. Having to allow high seeding efficiency and the possibility of supporting the cell expansion, pellets were designed with dimensions in the millimeter range. In this way increasing the surface area available for the single pellets compared to the traditional ones (micrometer range), the cells have, during the culture in agitation, a higher probability of



impacting with the scaffold. Furthermore, cells have a greater surface area to expand without having to migrate from one pellet to another to obtain the maximum expansion [12]. Fundamental part of this work is the study of an industrial production process. For this reason were analyzed two different production methods:

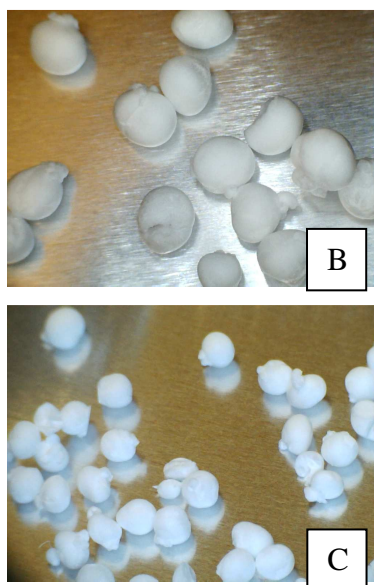
- Production in PDMS multiwell plate.
- Dropping of collagen into liquid nitrogen ( $-196^{\circ}\text{C}$ ).

In the first case has been designed a multiwell plate in PDMS. Through this method were obtained cubic pellets with the side of 2.4 mm (dimensions pre-lyophilization). The collagen is dispensed manually with an automatic pipette, where it can be set the volume of collagen:  $13.8\ \mu\text{l}$ .

In the second case, instead, the suspension of collagen was dripped into a container containing liquid nitrogen ( $-196^{\circ}\text{C}$ ). Collagen, thanks to the syringe pump is pushed into a Teflon tube which ends above the container of liquid nitrogen with a needle with the diameter of 18G. Here the volume of the drop of collagen is determined by the timing of the air flow. The air, interrupting at predetermined intervals the solution that comes out from the tip of the needle,

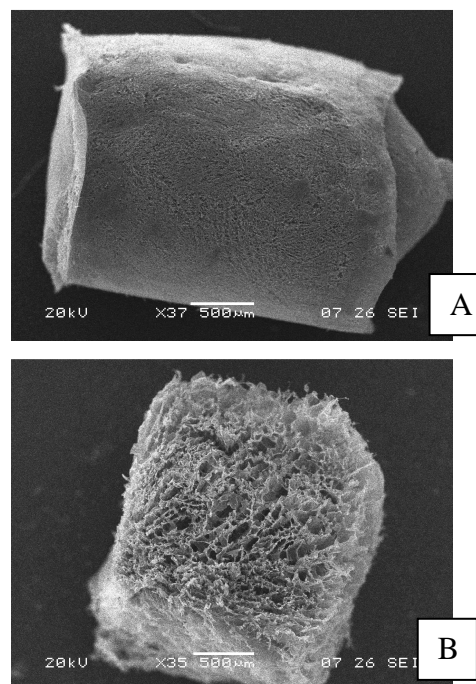
allows the formation of drops of collagen with a homogeneous volume. In this way are obtained spherical scaffold with dimensions in the range of millimeters. With this production process have been developed two types of pellets, with a different volume,  $\text{Nitrogen}_{90} = 15\ \mu\text{l}$ ,  $\text{Nitrogen}_{50} = 8.3\ \mu\text{l}$ . This second method, designed in this thesis project, from the industrial point of view is faster, automated and allows to simply modify the process parameters; for example to change the volume of the pellets is enough to change the flow of the pump or the timing of the air flow. Differently the method of production in the multiwell to change the volume of the pellets is necessary to realize another plate and the final number of pellets depends to the number of wells of the plate. At the end of the production the pellets were freeze-dried, crosslinked and sterilized thermally. The pellets obtained are shown in the following pictures:





**Figure A. 5:** Pellets; A=pellets produced in multiwell plate; B=pellets nitrogen<sub>90</sub>; C=pellets nitrogen<sub>50</sub>.

Pellets also differ in the surface structure. The reason probably is the method of freezing. As demonstrated by O'Brien et al. [13] increasing the speed of freezing, the size of the pores decreases. In fact, even in this case the size of the pores of both types of pellets produced by dripping into liquid nitrogen seems lower and constant despite the different volume. For the pellets made in multiwell plate instead there was a dual surface structure. As seen from the SEM images, the pellets differ in the size of pores:



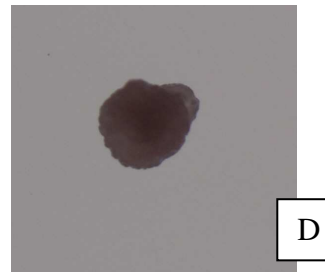
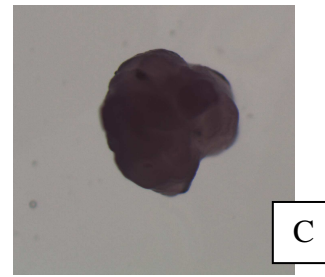
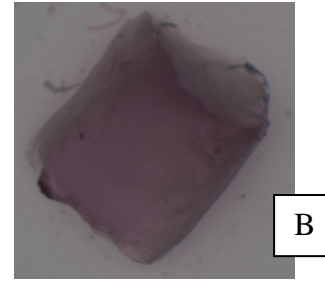
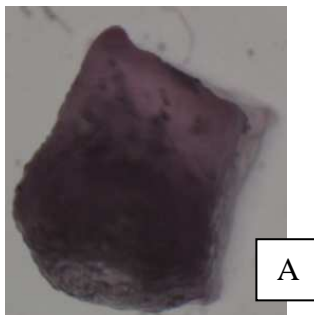
**Figure A. 6:** SEM pictures of the different structure of the pellets produced in multiwell plate. A=compact; B=porous.

Compared to pellets made in liquid nitrogen, the pellets made in multiwell plate undergo a less instantaneous freezing, in fact at the end of the dispensing step the pellets are placed in a freezer at  $-40^{\circ}\text{C}$ .

During the characterization were also conducted tests of wettability and buoyancy. The wettability is linked to the method of cell adhesion: the adhesion of cells to the substrate is characterized by the nature of the protein layer absorbed. Proteins have the function of signal to stimulate specific connection with the cells [14]. For this reason, the scaffold must be highly wettable, in this way it is able to absorb the proteins necessary.

Pellets are idrophobic. For this reason was used the plasma treatment. This treatment, modifying the surface structure of the pellets, allows to improve the wettability.

The tests of buoyancy were conducted to define the characteristics of the pellets within the culture medium. Having the pellets to remain suspended in the culture medium inside the stirring system, the buoyancy has a fundamental importance. If pellets float or remain on the bottom of the culture chamber during the duration of the test culture, the pellets don't impact with the cells. What has been found during the tests is that the pellets made in the multiwell plate with compact structure once immersed in the culture medium float on the surface, while the other types of pellets sink to the bottom. This result is also reflected by the not homogeneous color of the wet pellets compact produced in the multiwell plate, compared to the other pellets.



**Figure A. 7:** Structure of the pellets after the immersion in the culture medium: A=pellets compact produced in multiwell plate; B=pellets porous produced in multiwell plate; C=nitrogen<sub>90</sub>; D=nitrogen<sub>50</sub>.

Probably some parts of the pellet can not absorb the medium.

Another peculiarity is the different degree of shrinkage due to the phase of lyophilization and the contact with the culture medium: the degree of shrinkage due to the phase of lyophilization, also found in the literature [15], is constant between the different types of pellets. The shrinkage due to the contact with the culture medium shows different results:

- Pellets produced in plate (compact and porous) = 30%

- Nitrogen<sub>90</sub> = 69%
- Nitrogen<sub>50</sub> = 74%

Despite the shrinkage, pellets can maintain the structure without degradation for 1 year in culture medium at room temperature. The pellets were subjected to a test of enzymatic digestion. For cell cultures in bioreactors, once expanded cells need to be detached from the pellets without damage. For this reason it was chosen to use the collagenase. Collagenase is an enzyme that allows to digest the pellets without affecting cell viability. With this test are been defined the digestion times. Further experimentation was conducted with the aim of optimizing the protocol of seeding and process parameters of the bioreactor. Having developed the pellets dimensionally different from those found in the literature (dimensions in the order of a micrometer), the study and the analysis of the seeding protocol have more significance. The phase of cell seeding will allow adhesion of the cells to the pellet. The tests were conducted with the bioreactor OPB (Oscillating Perfusion Bioreactor). The OPB is a perfusion bioreactor patented by Eng. Matteo Moretti [16, 17] (Patent No. WO2008/098165, License: SKE Advanced Therapies Srl) use as prototype

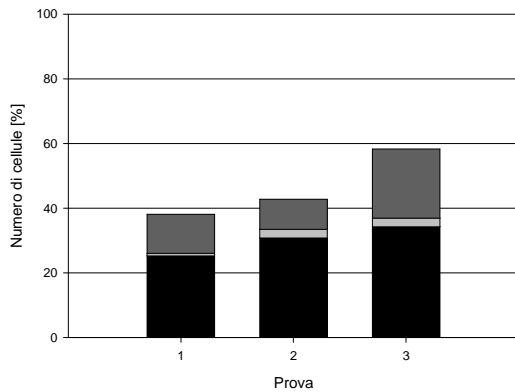
at the research laboratories of MIT (Massachusetts Institute of Technology) in Boston, and at the Laboratory of Cell and Tissue Engineering, Istituto Ortopedico Galeazzi in Milan.

Having to define the seeding efficiency were conducted 3 tests on pellets of the duration of 24 hours. For this test were used the pellets made in the multiwellplate (considered the worst case for the double behavior found). During the tests was improved the seeding protocol and the harvesting protocol of the cells at the end of 24 hours. The tests have different dynamics of agitation:

- Test 1: tangential speed of 1000 $\mu\text{m} / \text{s}$  with oscillation (angle of 270 °).
- Test 2: tangential speed of 2000 $\mu\text{m} / \text{s}$  with non-oscillation to allow a better mixing of the pellets inside the culture chamber. Furthermore, as seen in literature to ensure the adhesion of cells to the pellets, an intermittently agitation is necessary [18], for this reason the dynamics of the bioreactor in this test is different: 10 minutes of agitation and a 10 minute break.
- Test 3: tangential speed of 10000 $\mu\text{m} / \text{s}$  with the non-oscillating intermittent dynamics, seen at point 2.

The efficiency of seeding on the pellets was calculated by the CyQuant assay, in

which it was also possible to determine the quantity of cells adhered to the chamber of the bioreactor and the amount of cells in suspension in the medium at the end of the test.

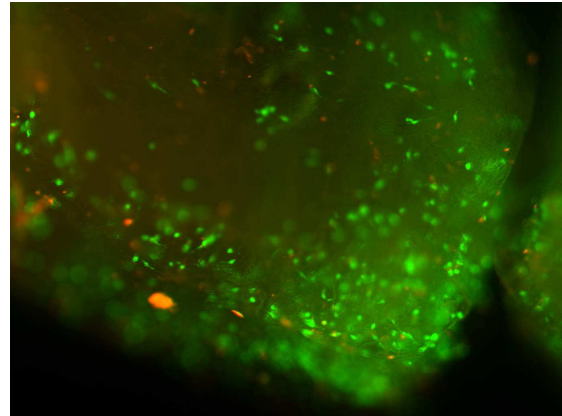


**Graphic A. 5:** Seeding tests for the development of the seeding protocol.

As can be seen, increasing the tangential speed of the bioreactor and using an intermittent protocol the efficiency of seeding increased by 10%. Changing the dynamics of agitation (oscillating → non-oscillating) and introducing the break in protocol, the efficiency of seeding pellets is increased by 5.57%: from 25.23% (test no. 1) to 30.80% (test no. 2). Increasing the tangential speed from  $2000\mu\text{m} / \text{s}$  (test n. 2) to  $10000\mu\text{m} / \text{s}$  (test n. 3), however, the efficiency of seeding is increased by 3.5%: from 30.8% to 34, 3%. The utility of the break is in the possibility to give to the cells the time to adhere on the pellets. The increase of the tangential speed and the not oscillating

protocol guarantee instead a greater mixing of the solution, increasing the possibility of adhesion between cells and pellets.

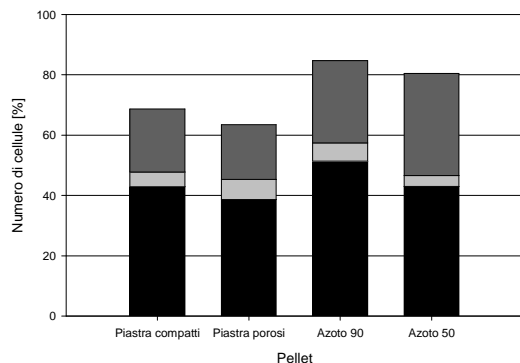
The quality of the result is also reflected in the distribution and in the viability of the cells observed from the LIVE / DEAD picture:



**Figure A. 8:** LIVE/DEAD picture of the pellet produced in multiwell plate at the end of the seeding phase.

Using the seeding protocol determined and the dynamics of agitation of the test 3 a comparison test between pellets was then conducted. During the test were compared pellets produced in multiwell plate with those produced by dropping in nitrogen. In addition, were compared the pellets compact produced in the multiwell plate with those porous. The results of this analysis are shown in the following graphic where it is shown for each type of scaffold the number of cells adhered to the pellets, the number of cells adhered to the culture chamber and the number of

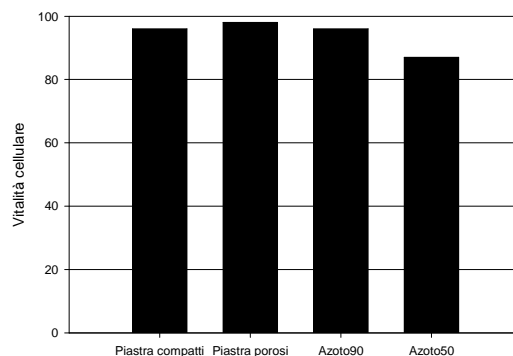
cells in suspension in the culture medium at the end of test.



**Graphic A. 6:** Seeding test to define the seeding efficiency of the different types of pellets.

Despite the two structures of the pellets produced in the multiwell plate were tested separately, the efficiency of seeding of the pellets is the same: 42.90% for those compact and 38.62 for those porous. Instead, among all conditions a few cells adhere to the walls of the culture chamber (from 3 to 6%), while the majority of the cells adheres to the pellets. The amount of cells remained in suspension in the medium is between 20 30%.

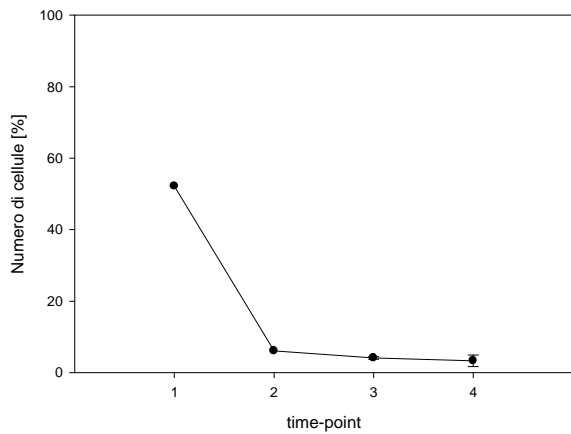
Comparing the efficiency of seeding of the different types of pellets, Nitrogen<sub>90</sub> ensure higher efficiency (51.40%) compared to the other types (about 40%). The pellets at the end of the test were digested by collagenase I and cell viability was analyzed using TALI (Image Cytometer - Cell Counter).



**Graphic A. 7:** Cell viability at the end of the harvesting treatment with collagenase I.

As can be seen in all cases the values are close to 100%.

The third part of this thesis consists in the preliminary analysis of the cell expansion. For this test were chosen Nitrogen<sub>90</sub> pellets that ensure greater efficiency of seeding compared to other types of pellets (51.40% of the injected cells) and cells maintain high levels of cell viability. The expansion test duration is 15 days and a total of 6 culture chambers have been used, setting the tangential speed of the bioreactor at 10000 $\mu\text{m} / \text{s}$  with a non-oscillating intermittently protocol for the first 24 hours and maintaining the same speed but setting a continuous motion for the following days. The culture chambers were analyzed at different time-point to evaluate the degree of expansion in time. The test results are shown in the following graph:



**Graphic A. 8:** Preliminary test of cell expansion.

What can be noted is that, despite the efficiency of seeding remains on the

values found during the previous tests (52.18%), in the subsequent time-point the number of cells decreases, index of cell mortality. This result is probably due to a dynamic of agitation not suitable for the expansion phase. This particular bioreactor at the tangential speed of  $10000\mu\text{m} / \text{s}$  probably causes high shear stress on the cells. A possible future development will be to determine the optimal parameters for the expansion phase, as has been done in detail for the seeding phase.

# INTRODUZIONE

## I.1. Terapie avanzate

Grazie ai rapidi progressi nei settori della biologia, biotecnologia e medicina, che negli ultimi anni hanno condotto allo sviluppo di promettenti approcci genetici e cellulari per la prevenzione ed il trattamento di malattie o disfunzioni del corpo umano, stanno emergendo numerosi approcci terapeutici basati sull'uso di cellule e tessuti come agenti farmacologici.

Con il termine *terapie avanzate* si comprendono tre tipologie di prodotti medicinali<sup>1</sup>: prodotti per terapia cellulare somatica, prodotti per terapia genica e prodotti di ingegneria tissutale.

- Si parla di *terapia cellulare somatica* nel caso di preparazioni contenenti cellule vive allo scopo di ottenere un effetto terapeutico, diagnostico o preventivo. A tal fine le cellule subiscono “manipolazioni” più o meno estese quali ad esempio la selezione cellulare, l'espansione in vitro, la generazione di cloni anti infettivi o anti neoplastici.
- *La terapia genica* è una tecnologia medica nella quale il DNA è direttamente utilizzato come una sostanza farmaceutica. Con questa tecnica, i geni o frammenti di questi vengono inseriti nel corpo umano con lo scopo di prevenire, trattare o curare una malattia. La terapia genica può potenzialmente curare molte malattie o disfunzioni sia genetiche che acquisite.
- *I prodotti di terapia tissutale* contengono o consistono di cellule o tessuti ingegnerizzati somministrati agli esseri umani allo scopo di rigenerare, riparare o sostituire un tessuto umano. I primi prodotti messi a punto sono la

---

<sup>1</sup> Tutti i *Prodotti Medicinali per Terapia Avanzata* (PMTA) sono dal punto di vista giuridico/regolatorio prodotti medicinali definiti e regolati in Europa dal Regolamento Europeo 1394/2007/EC.



cute artificiale, la cartilagine e le ossa<sup>2</sup> (quest'ultimo solo a livello di trial clinico).

## **I.2. Prodotti Medicinali per Terapia Cellulare Somatica**

Secondo la direttiva 2009/120 della Commissione Europea del 14 Settembre 2009 che modifica la direttiva 2001/83/EC del Parlamento europeo e del Consiglio recante un codice comunitario relativo ai medicinali per uso umano, per quanto riguarda i medicinali per terapie avanzate, per medicinale di terapia cellulare somatica si intende un medicinale di origine biologica con le seguenti caratteristiche<sup>3</sup>:

- a. contiene o consiste di cellule o tessuti che sono stati sottoposti a una rilevante manipolazione così da alterare le caratteristiche biologiche, le funzioni fisiologiche o le proprietà strutturali in riferimento all'uso clinico proposto, oppure contiene o consiste di cellule o tessuti che non sono destinati a essere usati per le stesse funzioni essenziali nel ricevente e nel donatore;
- b. è presentato come atto a trattare, prevenire o diagnosticare una malattia mediante l'azione farmacologica, immunologica o metabolica delle sue cellule o dei suoi tessuti, oppure è usato sugli esseri umani o è loro somministrato a tal fine.

Fanno parte di questi prodotti:

- 1) Cellule manipolate (espansive o attivate in vitro, ad esempio cellule dendritiche per le terapie antitumorali).
- 2) Cellule manipolate e combinate con componenti non cellulari (ad esempio isole pancreatiche incapsulate).
- 3) Cellule purificate (ad esempio cellule staminali emopoietiche per il trattamento dell'infarto del miocardio).

Il fattore limitante per l'utilizzo di cellule in applicazioni terapeutiche risiede nella quantità cellulare disponibile in seguito a prelievo da tessuti affetti da patologie. La percentuale di cellule utilizzabili in seguito a biopsia non è quasi mai sufficiente per gli scopi prefissati. Per questo motivo le cellule necessitano di essere espansive in sistemi che garantiscano un processo automatizzato, clinico, altamente riproducibile e sicuro dal punto di vista cellulare.

---

<sup>2</sup> AIFA: Agenzia Italiana del Farmaco

<sup>3</sup> Istituto Superiore di Sanità.

### I.3. Sistemi per l'espansione cellulare

Nella pratica comune le cellule isolate da una biopsia, effettuata su una specifica parte del corpo del paziente, vengono espanse in vitro, perché in molti casi la quantità raccolta da tessuti affetti da patologie non è sufficiente allo scopo prefissato. Ai fini dell'espansione, le cellule necessitano di un ambiente compatibile con le proprie proprietà chimiche e fisiologiche. Come prima cosa, nell'ambito delle terapie cellulari, è pertanto necessario moltiplicare il numero di cellule senza alterarne il fenotipo.

Le cellule crescono adese o in sospensione. In entrambi i casi la sospensione cellulare viene inoculata nell'apposito contenitore per la coltura insieme al mezzo di coltura che, dovendo mantenere le cellule in un ambiente biochimico il più possibile simile a quello naturale, contiene ioni necessari ad una concentrazione isosmotica, numerosi aminoacidi e vitamine, ed un siero animale in proporzione variabile da una bassa percentuale fino al 50%. Per mantenere costante il pH viene di solito utilizzato un sistema tampone bicarbonato/acido carbonico, in equilibrio con la CO<sub>2</sub> (dal 5 al 10%) nell'atmosfera che sovrasta il mezzo. L'atmosfera viene controllata mediante appositi incubatori, che permettono di mantenere la temperatura a 37°C e un'umidità RH=95% [19].

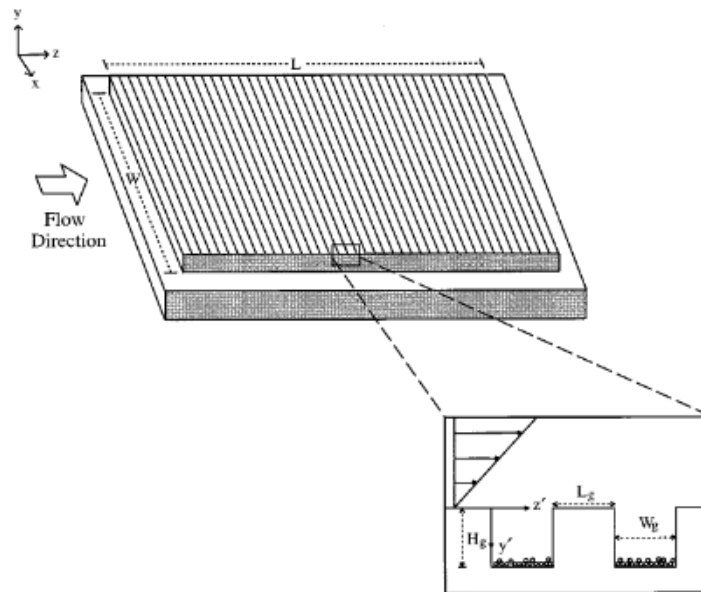
Per le cellule che crescono in sospensione, come molti tipi di cellule presenti nel sangue (linfociti), nel midollo e batteri, la sospensione può essere mantenuta in condizioni statiche, utilizzando per esempio piastre Petri e piastre multipozzetto (Figura I.1), o dinamiche.



**Figura I. 1:** Piastra multi pozzetto per colture in sospensione.

I sistemi in agitazione si usano per crescere volumi di cellule maggiori tramite bottiglie con un'ancoretta magnetica oppure grazie a particolari sistemi come i bioreattori *flat-bed* [20], che utilizzano una camera di coltura con scanalature sulla superficie inferiore, sulla quale viene fatto scorrere il mezzo di coltura mantenendo costanti le condizioni di perfusione,

come shear stress, pH e concentrazioni di ossigeno e nutrienti (Figura I.2).



**Figura I. 2:** Bioreattore *flat-bed* per colture in sospensione [20].

Non meno frequente è la coltura in sospensione di aggregati di cellule: questa tecnica relativamente semplice permette la massima interazione possibile cellula-cellula e consente alle cellule di organizzarsi e svilupparsi in maniera organotipica [21].

La maggior parte delle cellule, però, cresce in adesione, dove normalmente la sospensione cellulare viene posta in un contenitore di vetro o di plastica, a fondo piatto (capsula di Petri, flask ecc., Figura I.3).

Qui le cellule costituenti la sospensione hanno la possibilità di sintetizzare specifiche glicoproteine di membrana che permettono alla cellula di aderire al substrato, di cambiare forma e distendersi grazie ad una nuova organizzazione del citoscheletro (*spreading*).



**Figura I. 3:** Piastra flask per la coltura di cellule ancoraggio dipendenti.

Dopo un periodo di tempo variabile quindi, inizia la divisione mitotica e si sviluppa una coltura. L'adesione ad un supporto è indispensabile per la crescita di queste cellule.

La crescita stazionaria di una popolazione di cellule in coltura può essere definita attraverso la descrizione di quattro fasi consequenziali. La curva di crescita cellulare è mostrata nel Grafico I.1.



**Grafico I. 1:** Curva di crescita cellulare.

- I Fase, detta di latenza (lag phase), della durata di 2-24 ore: prevede l'adattamento delle cellule al nuovo ambiente. La lag phase è la fase durante la quale le cellule non si dividono, ma si adattano al loro nuovo ambiente aderendo al substrato mediante il legame ligando-recettore di adesione.
- II Fase di tipo logaritmico in cui si osserva una crescita esponenziale delle cellule proporzionale alla disponibilità di nutrienti, variabile a seconda del tipo cellulare.
- III Fase detta stazionaria in cui si raggiunge la confluenza, condizione che garantisce il massimo numero di cellule compatibili con la superficie disponibile. Quando la superficie a disposizione è coperta completamente di cellule (la coltura è a confluenza), la proliferazione cellulare rallenta fino a cessare. Questo avviene a causa del fenomeno meglio noto con il nome di inibizione da contatto. A questo punto il numero di cellule resta pressoché costante.
- IV Fase di riduzione del numero di cellule che corrisponde all'ingresso nella fase di senescenza e inevitabilmente di morte [19].

Oltre all'espansione in monostrato 2D, per la coltura in adesione è stato proposto l'utilizzo anche di sistemi 3D. Lo sviluppo di supporti 3D è da attribuire a Alexis Carrel, un chirurgo e biologo francese [22], il quale, mettendo in coltura frammenti di tessuto cardiaco espianati da un embrione di pulcino, notò che la difficoltà nel mantenere il tessuto era dovuta alla mancanza di nutrienti alle cellule in coltura. Osservò che le cellule

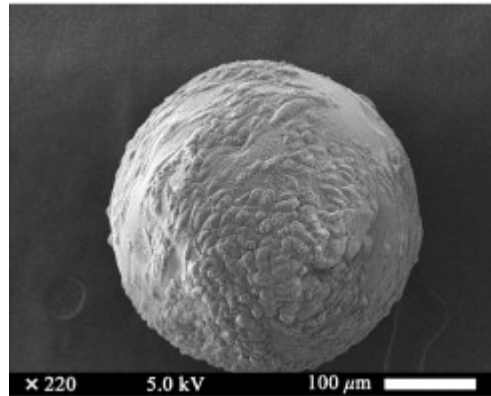
periferiche crescevano più velocemente, mentre quelle delle zone interne diventavano necrotiche. Fu così che Carrel nel 1912 pose le basi per l'idea di una coltura tridimensionale [23]. Nei primi anni 50, infatti, Leighton [24], basandosi sull'idea di Carrel di sviluppare un costrutto che permettesse a tutte le cellule di ricevere i nutrimenti del mezzo di coltura, realizzò una matrice spugnosa di gelatina come substrato per la coltura dei tessuti. Durante la coltura si accorse che queste matrici avevano la qualità di stimolare l'adesione, l'organizzazione e l'espansione cellulare e permettevano l'accesso dei nutrimenti a tutte le cellule.

I risultati hanno dimostrato come i sistemi 3D imitassero più strettamente le condizioni di crescita naturali rispetto alle colture in 2D dove le cellule sono coltivate su piastre piane in plastica molto rigide e innaturali [1]. Nella coltura cellulare 3D le cellule aderiscono tra loro su un supporto che garantisce spazi maggiori e formano legami cellula-cellula naturali attraverso la matrice extracellulare che è flessibile e malleabile così da permettere il movimento e la migrazione come nei tessuti naturali. Questo legame ottimizza anche la comunicazione e la segnalazione, meccanismi fondamentali per le funzioni delle cellule. Inoltre, il fenotipo e le funzioni delle cellule cresciute in 3D sono mantenute e sono più simili alle funzioni dei tessuti nativi rispetto alle cellule coltivate in 2D [2].

Come materiali per i supporti 3D solitamente si usano idrogel, a causa della loro varietà, versatilità e capacità di adattare la loro composizione, o sistemi di crescita cellulare contenenti micro- o macropori che favoriscono l'accesso bilaterale a nutrienti, citochine, ormoni ed altri componenti del mezzo di coltura.

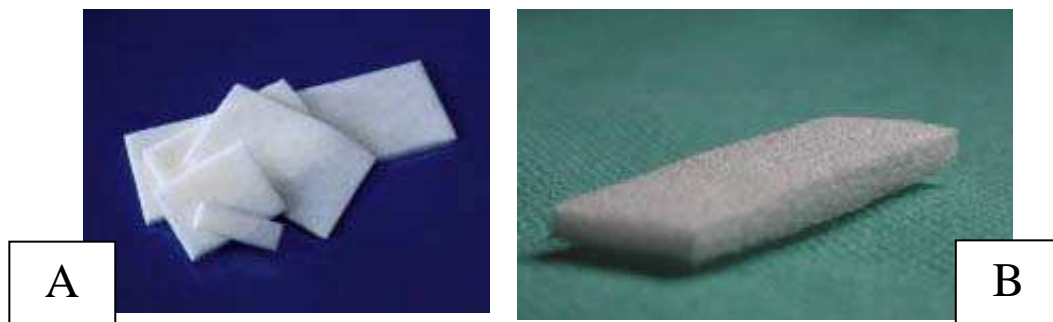
In base all'applicazione finale esistono diversi sistemi di espansione 3D:

- Pellets: sono matrici di supporto che permettono l'espansione delle cellule in sistemi in sospensione. Sono caratterizzati da un elevato rapporto superficie-volume e l'area disponibile per la crescita cellulare può essere variata facilmente modificando il numero dei pellets (Figura I.4).



**Figura I. 4:** Esempio di pellet in gomma di gellano per colture cellulari [25].

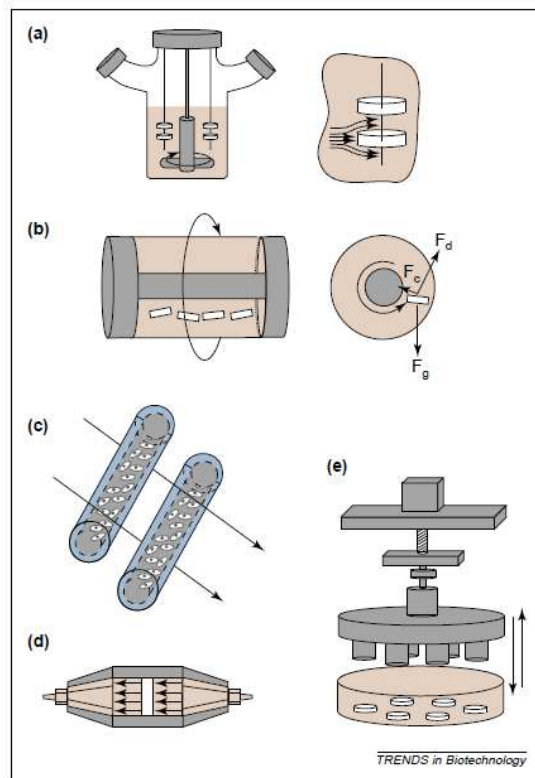
- Coltura di cellule su scaffold: con questa tecnica si utilizza uno scaffold appositamente progettato con specifici materiali che possa organizzare ed indirizzare l'espansione cellulare in modo da ricreare una struttura 3D in grado di mimare le strutture dei tessuti nativi [3] (Figura I.5).



**Figura I. 5:** Esempi di scaffold di origine naturale [26]: A) spugna di collagene; B) matrice gelatinosa ottenuta da pelle di suino modificata.

La semina cellulare su supporti, quali scaffold o in particolare pellets, e il controllo dei parametri ambientali necessari per l'espansione sono i primi passi nello sviluppo di una coltura 3D; per questo motivo il loro studio è di importanza cruciale. Tradizionalmente la sospensione cellulare viene dispensata manualmente all'interno del supporto 3D utilizzando pipette e sfruttando la forza di gravità per far aderire le cellule alle pareti. Questo metodo di semina, difficile da standardizzare a causa della variabilità intra- e inter-operatore, è spesso associato a una scarsa efficienza e ad una distribuzione iniziale delle cellule non uniforme all'interno dello scaffold. Per questo motivo in questi anni diverse tecniche di semina e coltura cellulare si sono basate sull'utilizzo di bioreattori per aumentare la qualità, la riproducibilità, l'efficienza e l'uniformità del processo di semina

rispetto ai metodi statici tradizionali [4]. I bioreattori sono dispositivi che permettono di sviluppare, sotto stretto controllo, processi biologici e/o biochimici monitorando le condizioni ambientali e di funzionamento [5]. *Spinner flasks*, *hollow-fiber bioreactors*, *rotating wall vessels* e bioreattori a perfusione sono alcuni dei dispositivi presenti in letteratura (Figura I.6).



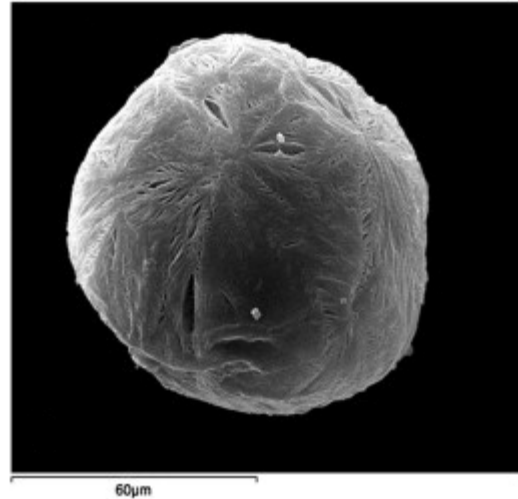
**Figura I. 6:** Esempi di bioreattori per la coltura cellulare: a) *spinner flask*; b) *rotating wall vessels*; c) *hollow fiber bioreactors*; d) bioreattore a perfusione; e) bioreattore in grado di applicare una forza meccanica controllata. [5]

#### I.4. Pellets per l'espansione cellulare

La necessità di sviluppare un metodo migliore di coltura per le cellule ancoraggio-dipendenti ha indotto lo sviluppo dei pellets, ovvero matrici di supporto per l'espansione cellulare in sospensione in sistemi agitanti.

Questi particolari scaffold hanno una forma solitamente sferica con un diametro che varia, nella maggior parte dei casi, tra 100 e 400  $\mu\text{m}$  (Figura I.7, [27]). La loro particolarità è la capacità di offrire un ambiente ottimale per l'adesione delle cellule senza intaccarne la vitalità [8].

Il loro primo utilizzo è avvenuto nel 1967 grazie a van Wezel [28] che dimostrò come pellets di Dietilamminoetil (DEAE) Sephadex



**Figura I. 7:** Esempio di pellet in PLGA.

A50 (carico di ioni positivi) potessero far crescere efficacemente le cellule (HEL, human embryonic lung). Van Wezel è considerato, ancora oggi, il padre di questi particolari scaffold, a tal punto che durante il primo congresso ESACT (European Society for Animal Cell Technology) in Olanda dopo la sua morte nel 1986, questa nuova tecnica di espansione cellulare fu scelta per il “*Toon van Wezel Memorial Lecture*” [29].

Negli anni successivi lo sviluppo dei pellets, al fine di omogeneizzare il processo di espansione per tutte le cellule ancoraggio-dipendenti, grande interesse ebbe lo studio della dinamica di adesione cellulare e di *spreading*. L'idea di van Wezel era quella di sviluppare un pellet “utile per tutti gli scopi”, cioè che permettesse l'adesione di tutti i tipi cellulari, utilizzando pellets carichi positivamente per far aderire le cellule, caratterizzate da una carica superficiale negativa.

Nonostante le cellule abbiano una carica superficiale negativa, Maroudas et al. [30] dimostrarono che potevano aderire a substrati carichi sia positivamente che negativamente. Quindi fu chiaro che non era la polarità il fattore principale per l'adesione [29]. L'adesione è legata all'interazione tra le proteine e la superficie. Cioè per permettere l'adesione cellulare, nel mezzo di coltura devono essere presenti anche proteine della matrice extracellulare come collagene, proteoglicani, fibronectina, laminina, elastina e



condronectina da far assorbire al substrato. Lo scaffold, assorbendo queste proteine, le utilizza come molecole segnale per permettere l'interazione con le cellule.

Da queste considerazioni scaturì la convinzione che l'idea di van Wezel di creare uno scaffold "utile per tutti gli scopi" non era realistica [31]. Il motivo risiede principalmente nel fatto che le cellule aderiscono al substrato attraverso legami differenti che dipendono dalla natura e dalla qualità dello strato proteico assorbito. Il processo di assorbimento proteico è fortemente influenzato dalle proprietà fisiche e chimiche del materiale (bagnabilità, carica elettrica, ruvidezza, topografia proprietà meccaniche, quali rigidità o flessibilità, cristallinità, porosità, solubilità e pH), dalla natura della proteina e dalla soluzione [14].

Nacque così la necessità di studiare nuove tipologie di pellets composti da materiali con carica sia positiva che negativa, o utilizzando direttamente materiali della matrice extracellulare in modo da avere un immediato riconoscimento con il substrato e che potessero garantire l'adesione di tipologie cellulari differenti.

In Tabella I.2 sono mostrati alcuni esempi di materiali usati per la produzione di pellets durante le prime sperimentazioni.

	Ideatore/i
<b>Pellets ionici</b>	
DEAE - Sephadex A50, 3.5 meq.	Van Wezel
Sephadex (low charge), 1.8 meq.	Lévine
DEAE – cellulosa, 1.0 meq.	Reuveny
DEAE – fibre di cellulosa, 0.9 meq.	Litwin
Poliacrilammide, ammina primaria 0.6 meq., ammina terziaria 1.8 meq.	Reuveny
Polistirene a carica positiva e negativa	Maroudas
Microsfere in agarosio	Mizrahi
Vetro	Varani
<b>Pellets non ionici</b>	
Pellets di destrano con collagene denaturato	Gebb
Gelatina reticolata con gluteraldeide	Nilsson and Mosbach
Cellulosa	Kasai
Polistirene con coating di collagene	Jacobsson

Pellets macroporosi di gelatina	Nilson, Mosbach, Almgren
Polietilene	Blüml
Poliuretano legato con fibronectina	Kageyama
Fibre di Polistirene con collagene	Matsumura

**Tabella I. 1:** Esempi di materiali utilizzati per la produzione di pellets [29]; meq = milliequivalent.

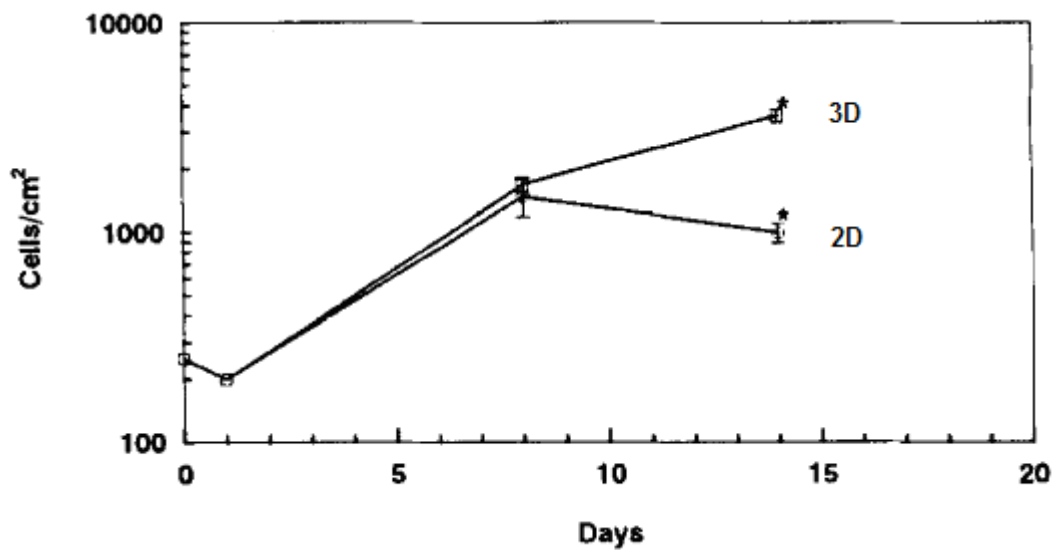
Un altro importante nome legato alla tecnologia dei pellets è quello di Kjehl Nilsson; egli fu tra i primi a sviluppare pellets macroporosi in gelatina [29]. Questo avvenimento aprì la possibilità di sviluppo di nuovi sistemi per l'espansione di cellule ancoraggio-dipendenti (paragrafo I.4.1).

Al giorno d'oggi sono presenti in commercio varie tipologie di pellets che differiscono soprattutto per il materiale con cui sono fatti e per la loro struttura, tra i quali i più utilizzati sono:

<b>Pellets con superficie liscia</b>	
<b>Tipo</b>	<b>Materiale</b>
Biosilon	Polistirene
Cytodex 1	DEAE-destrano
Cytodex 2	DEAE-destrano
Cytodex 3	Gelatina
Solohil Engineering	Vetro, Collagene, e coating di idrossiapatite
Cellagen	Collagene
<b>Pellets porosi</b>	
<b>Tipo</b>	<b>Materiale</b>
Cultisphere	Collagene o Gelatina
Cytoline	Polietilene
Cytopore	Cellulosa

**Tabella I. 2:** Tipologie di pellets presenti in commercio.

Questi pellets vengono largamente utilizzati con diverse tipologie di cellule: cellule primarie, [32, 33], cellule di linea [6], cellule staminali [34, 35], per fare qualche esempio. Il vantaggio principale di questa tecnologia 3D rispetto alla coltura tradizionale 2D risiede soprattutto nell'elevato rapporto superficie-volume che garantisce un'espansione maggiore (Grafico I.2) a parità di tempo e di densità iniziale di semina.



**Grafico I. 2:** Confronto tra l'espansione cellulare 2D e 3D [7].

Questo risultato è però legato alla dinamica e alle condizioni di coltura. Al fine di sfruttare al meglio tutta la superficie disponibile, i pellets necessitano di tecniche di semina dinamica che permettano una distribuzione omogenea delle cellule, consentano la coltura in sospensione e permettano la diffusione dei nutrienti alle cellule. Per questo scopo vengono usati sistemi di agitazione come i bioreattori. Questi sistemi permettono di monitorare le condizioni ambientali e garantiscono un efficace rimescolamento dei pellets durante la fase di semina e di espansione favorendo così un'omogenea distribuzione cellulare. L'esempio più comune di bioreattore utilizzato per la l'espansione delle cellule su pellets è il bioreattore *spinner flask* (Figura I.8, [26]).

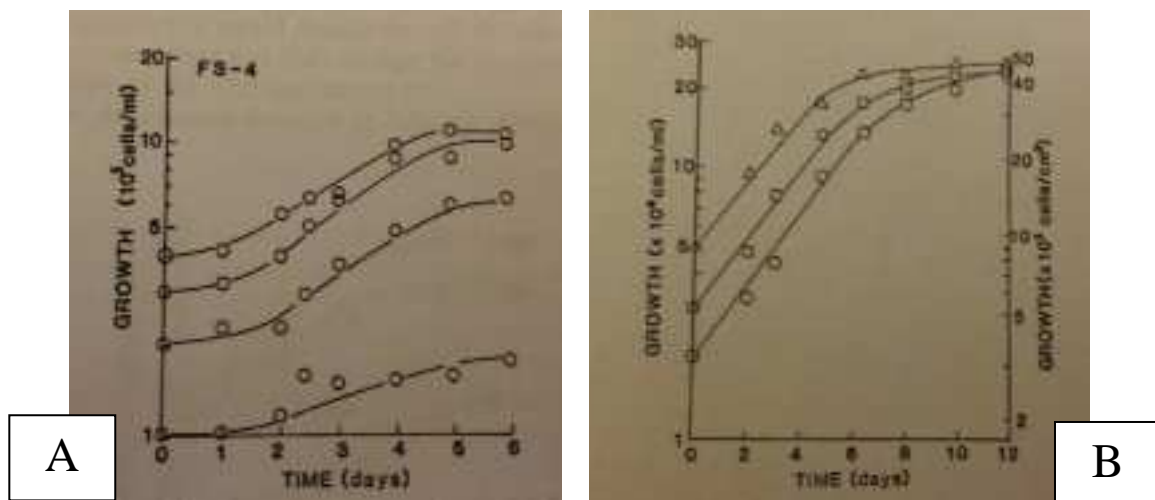


**Figura I. 8:** *Spinner flask*: A) foto; B) schema.

Al fine di ottimizzare l'efficienza di espansione di tali sistemi è necessario tenere conto di parametri critici, quali la densità di semina e il sistema di agitazione, che influenzano la cinetica di adesione cellulare:

- Superficie di adesione: Nel caso di cellule primarie o cellule di linea i tempi di adesione devono essere i più brevi possibili. Il processo di adesione cellulare per qualsiasi superficie può essere visto come una combinazione di due processi separati: l'adesione iniziale delle cellule alla superficie e lo *spreading* cellulare. L'affinità del legame delle cellule a queste strutture dipende dalla linea cellulare, dalle caratteristiche del pellet, dalla fase di crescita in cultura, dalla composizione del mezzo e dal sistema di coltura. Le cellule inizialmente adsorbite possono eventualmente desorbire dalla superficie senza veramente sviluppare un'adesione; la superficie deve avere sufficiente affinità in modo da consentire alle cellule di rimanere attaccate. Risulta pertanto importante la scelta del materiale e la possibilità di eseguire trattamenti superficiali come, per esempio, coating di collagene, laminina, fibronectina. Indipendentemente dalle caratteristiche superficiali, per permettere una buona adesione, la superficie dei pellets deve innanzitutto essere bagnabile [36].
- Densità di semina: Dopo la dispensazione le cellule aderiscono ai pellets in maniera casuale e il numero di cellule per singolo pellet non è controllabile. Una volta aderite poi, la maggior parte delle cellule non si stacca facilmente e non si riattacca ad altri pellets ma cresce fino a coprire tutta la superficie disponibile. Una volta raggiunta la confluenza per le cellule soggette a inibizione da contatto, se non vengono variate le condizioni di coltura [12], la crescita cessa. Altri tipi di cellule possono formare strati multipli, ma il tasso di crescita spesso rallenta. In questo modo può capitare di avere pellets dove la crescita è rallentata a causa della confluenza mentre altri dove la crescita continua. È chiaro quindi che l'iniziale distribuzione delle cellule agisce sulla cinetica di crescita. Così più omogenea sarà la distribuzione iniziale delle cellule e migliore sarà la cinetica della crescita. Inoltre pellets su cui non sono subito aderite le cellule rimarranno tali per tutta la coltura, influenzando in questo modo anche l'espansione massima raggiungibile. Idealmente il numero medio di cellule inizialmente dispensato deve essere tale da ridurre al minimo i pellets senza cellule. Un esempio di questo ragionamento è mostrato da Hu et al. [37]: mantenendo fissa la quantità di pellets iniziale (5 g/L) il gruppo ha effettuato prove con fibroblasti a densità di semina differente. Dopo 6 giorni di

coltura è stato ottenuto un grado di espansione massima differente per le singole prove. Nel caso di inoculi superiori a  $3 \times 10^5$  cellule/mL è stata ottenuta un'espansione cellulare pari  $1,2 \times 10^6$  cellule/mL (circa quattro volte la densità iniziale); per inoculi al di sotto di questo valore è stata ottenuta un'espansione massima inferiore (Grafico I.3, A). Questo risultato è stato attribuito al fatto che il numero di pellets in alcuni casi era sovrastimato rispetto alla quantità iniziale di cellule, che con ogni probabilità non erano aderite omogeneamente su tutti i pellets, non sfruttando appieno tutta la superficie disponibile. Come confronto sono state seminate le stesse cellule su piastre Petri a diverse densità di semina. Il risultato è l'opposto del caso precedente: nonostante la densità di semina differente, in tutti i casi le cellule ottengono lo stesso grado di espansione (Grafico I.3, B), perché anche nel caso di valori di densità di semina inferiori, le cellule avevano comunque la possibilità di coprire tutta la superficie di coltura disponibile.

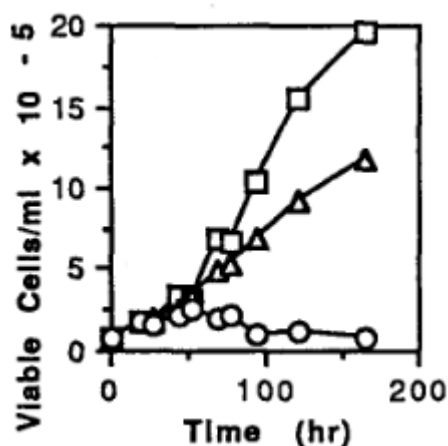


**Grafico I. 3:** Effetto della densità di semina sull'espansione massima raggiungibile: A) Pellets vs B) Monostrato.

- Sistemi di agitazione: L'agitazione dei pellets in coltura è fondamentale per fornire un ambiente omogeneo e un'adeguata ossigenazione. Lo sforzo idrodinamico agente sulle cellule potrebbe però rivelarsi dannoso; infatti le cellule ancoraggio-dipendenti sono più sensibili allo sforzo di taglio rispetto a quelle cresciute in sospensione. I danni maggiori possono essere causati dalle forze generate dalla collisione tra i pellets o da piccoli vortici turbolenti generati

dai cambiamenti di direzione e velocità all'interno del sistema di agitazione in un campo di moto turbolento.

O'Connor e Papoutsakis [38] hanno dimostrato come l'agitazione può risultare dannosa per le cellule. Utilizzando cellule CHO (chinese hamster ovary) in coltura su pellets Cytodex-3 hanno condotto tre prove impostando differenti livelli di agitazione della *spinner flask*: 60, 100 e 150 rpm. I risultati sono mostrati nel grafico seguente:



**Grafico I. 4:** Numero di cellule vitali all'aumentare della velocità di agitazione; □ = 60 rpm; △ = 100 rpm; ○ = 150 rpm.

Come si può notare aumentando la velocità di agitazione il numero delle cellule vitali aderite diminuisce. Le cellule si staccano dai pellets e si risospendono nel mezzo di coltura [38].

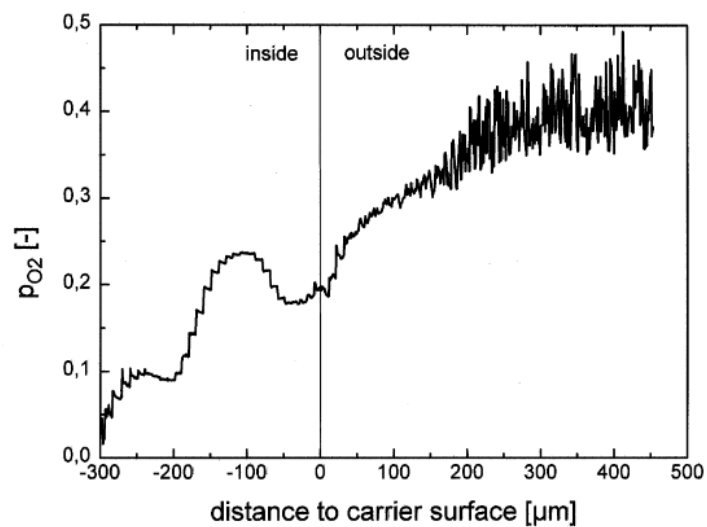
Ad ogni modo, a seconda delle caratteristiche di progetto e del tipo di cellule da espandere, è di importanza cruciale lo studio di sistemi che permettano sforzi di taglio accettabili e garantiscano uno scambio efficace di ossigeno. Ad esempio sono stati proposti sistemi a membrana o tubi in gomma siliconica con elevata permeabilità all'ossigeno [39]. I limiti di questi sistemi sono però legati al gorgogliamento, che potrebbe inficiare l'adesione delle cellule, e la formazione di schiuma che comporterebbe l'accumulo di cellule in quel punto e la loro conseguente perdita di vitalità.

#### **I.4.1. Pellets porosi**

L'espansione cellulare massima è limitata, come detto, dalla superficie disponibile. Aumentando però il numero di pellets iniziali non sempre avremo una crescita maggiore. Per rimescolare efficacemente un numero maggiore di pellets occorre incrementare l'agitazione da parte del bioreattore. Ciò potrebbe, però, causare un aumento degli sforzi di taglio sulle cellule [38]. Per questo motivo sono stati sviluppati pellets porosi che cercano di eludere le limitazioni dei pellets tradizionali; una porosità aperta permetterebbe l'adesione delle cellule anche all'interno, aumentando in questo modo la superficie disponibile e al tempo stesso preservando le cellule da elevati sforzi di taglio.

I materiali comunemente utilizzati per la produzione di pellets porosi sono: gelatina, collagene, cellulosa, vetro, polietilene, e polistirene. Quello che avviene è che le cellule inizialmente aderiscono alla superficie esterna per poi spostarsi anche verso l'interno [36]. In questo modo questa tipologia di pellets fornisce una superficie maggiore per la coltura a parità di numero di pellets rispetto ai pellets tradizionali. Inoltre le cellule all'interno del pellet sono schermate dal flusso [40] senza però che sia impedito l'apporto di ossigeno e nutrienti.

Tuttavia, se i pori dovessero essere irregolari, potrebbero dar luogo a micro vortici locali che potrebbero danneggiare le cellule [36]. Inoltre le dimensioni e la struttura dei pori potrebbero impedire il passaggio di ossigeno o altre sostanze nutritive. Come mostrato da Preissmann et al. [41], con prove condotte su particolari pellets Cytoline (diametro 0.4-2.5 mm), la concentrazione dell'ossigeno all'interno dei pori dello scaffold diminuisce con l'aumentare della profondità. Come si può vedere dal Grafico I.5 a 300  $\mu\text{m}$  di profondità dalla superficie la concentrazione di ossigeno è pari a zero.



**Grafico I. 5:** Concentrazione di ossigeno al variare della profondità dalla superficie dei pellets.

Se pur non estendibile a tutte le tipologie di pellets, questo dato è indice della necessità dello studio di tutte le caratteristiche strutturali di queste matrici.



## **I.5. Scopo del lavoro di tesi**

Nell'ambito delle terapie avanzate il primo passo per l'utilizzo di costrutti cellulari a scopi terapeutici è rappresentato dalla disponibilità cellulare. Poiché il numero di cellule vitali recuperabili al termine di una biopsia è solitamente inferiore rispetto alla necessità, le cellule recuperate devono essere espanse in vitro. Nel corso degli anni, oltre alla metodica tradizionale di espansione cellulare in monostrato, sono stati sviluppati sistemi per l'espansione 3D. La ragione del crescente utilizzo dei sistemi 3D risiede nella capacità di imitare più strettamente le condizioni di crescita naturali rispetto alle colture in 2D [1]. Nella coltura cellulare 3D le cellule aderiscono tra loro su un supporto che garantisce spazi maggiori e la possibilità di formare legami cellula-cellula naturali attraverso la matrice extracellulare. Questo legame ottimizza anche la comunicazione e la segnalazione, meccanismi fondamentali per le funzioni delle cellule. Inoltre, il fenotipo e le funzioni delle cellule cresciute in 3D sono mantenute e sono più simili alle funzioni dei tessuti nativi rispetto alle cellule coltivate in 2D [2].

L'obiettivo di questo lavoro di tesi è pertanto quello di sviluppare un sistema 3D per l'espansione cellulare. In particolare l'idea è quella di sviluppare matrici di collagene, denominate pellets, e di utilizzarli per l'espansione cellulare all'interno di un bioreattore.

Il lavoro si articolerà nei seguenti punti:

- Scelta del materiale dei pellets: al fine di realizzare uno scaffold biocompatibile e che funga da matrice extracellulare, stimolando l'adesione e l'espansione cellulare senza inficiarne la vitalità, verrà proposto l'utilizzo del collagene di tipo I per la realizzazione dei pellets. Il collagene è considerato uno dei biomateriali più utili per applicazioni nelle terapie avanzate e nell'ingegneria dei tessuti. La biocompatibilità e le caratteristiche biologiche, come la biodegradabilità, rendono il collagene la prima risorsa per applicazioni mediche [9]. Molti polimeri naturali e sintetici sono stati utilizzati come biomateriali, ma il collagene si differenzia per la sua interazione con le cellule [10]. Essendo parte della matrice extracellulare garantisce una superficie ottimale per l'adesione cellulare. Da tempo è utilizzato come scaffold per terapie cellulari e nell'ingegneria dei tessuti in diverse conformazioni [42, 43] sia nella sua forma nativa sia in quella denaturata come gelatina; in particolare quello di tipo I, visti i suoi vantaggi come biodegradabilità,

biocompatibilità e la possibilità di combinarlo con altri materiali, è quello maggiormente utilizzato [11].

- Progettazione dei pellets: la progettazione dei pellets dovrà tener conto della funzione che devono svolgere. Innanzitutto dovranno permettere l'adesione delle cellule, in secondo luogo dovranno sostenere la futura fase di espansione cellulare. Per questo motivo i pellets verranno progettati in maniera tale da avere dimensioni dell'ordine del millimetro. In questo modo aumentando la superficie disponibile per singolo pellets rispetto a quelli tradizionali (dimensioni dell'ordine del micrometro), le cellule avranno, durante la coltura in agitazione, una probabilità maggiore di impattare efficacemente con gli scaffold. Inoltre durante la fase di coltura avranno a disposizione una superficie maggiore senza dover migrare da un pellet all'altro per raggiungere l'espansione massima [12].
- Sviluppo del metodo di produzione: Volendo sviluppare un processo produttivo facilmente industrializzabile il pellets dovrà rispondere a caratteristiche quali semplicità e velocità di realizzazione e riproducibilità. Per questo motivo nel corso della tesi verranno descritte e analizzate due differenti metodiche di produzione: realizzazione mediante piastra multi pozzetto in PDMS e realizzazione per gocciolamento in azoto liquido (-196°C).

Al fine di inquadrare il lavoro in un'ottica industriale, le fasi di progettazione e di realizzazione dei pellets saranno condotte presso la Bioengineering Laboratories Spa.

- Definizione del protocollo di semina e di espansione cellulare: volendo sviluppare dei pellets dimensionalmente diversi da quelli trovati in letteratura (dimensioni dell'ordine del micrometro [7]) lo studio e l'analisi del protocollo di coltura assumono ancora più significato. In primo luogo la semina cellulare dovrà permettere l'adesione delle cellule al pellet. In secondo luogo, la fase di coltura dovrà garantire l'espansione cellulare senza alterare il fenotipo cellulare e preservando la vitalità delle cellule. Per realizzare questi obiettivi grande importanza avrà lo studio del protocollo di semina e della dinamica di agitazione dei pellets. Saranno, pertanto, condotte delle prove per calcolare l'efficienza di semina sui pellets. A questo scopo saranno utilizzate cellule di linea MG63; queste

cellule sono caratterizzate da un maggior grado di adesione e consentono un comportamento riproducibile tra le prove.

Le prove verranno condotte all'interno del bioreattore OPB (Oscillating Perfusion Bioreactor). OPB è un bioreattore a perfusione oscillante brevettato dall'Ing. Matteo Moretti [16, 17] (Patent n° WO2008/098165, licenza: SKE Advanced Therapies S.r.l.) in uso allo stato prototipale presso i laboratori di ricerca del MIT (Massachusetts Institute of Technology) di Boston e il Laboratorio di Ingegneria tessutale e Cellulare dell'Istituto Ortopedico Galeazzi di Milano. Questo strumento presenta delle importanti innovazioni rispetto ai tradizionali bioreattori a perfusione poiché è in grado di svolgere all'interno dello stesso strumento sia la funzione di semina delle cellule sullo scaffold sia la fase di coltura delle stesse, riducendo notevolmente il rischio di contaminazioni batteriche. Altro aspetto peculiare di questo bioreattore consiste nel sistema di ossigenazione: lo scambio gassoso tra mezzo di coltura e ambiente circostante avviene senza il bisogno di ausili esterni. Infatti, nella maggior parte dei bioreattori, l'ossigenazione del mezzo di coltura è garantita da ossigenatori posti esternamente alla camera di coltura cellulare [44]; nell'OPB lo scambio di gas è garantito dalle camere stesse del bioreattore che sono costituite da un tubo in materiale siliconico con un alto coefficiente di permeabilità ai gas. Oltre a ciò, il bioreattore a perfusione oscillante non richiede l'utilizzo di pompe peristaltiche deputate alla generazione del flusso del mezzo, indispensabile per l'apporto di nutrienti e la rimozione di cataboliti alle cellule in coltura [45]. Nel caso particolare dei pellets l'OPB grazie al moto rotatorio relativo delle camere rispetto al mezzo di coltura, permette un'efficace agitazione e rimescolamento dei pellets all'interno della camere. Durante la tesi la dinamica di agitazione e i parametri dell'OPB verranno settati in modo da ottimizzare le condizioni di coltura dei pellets.

Quello che otterremo dallo sviluppo di questi punti saranno dei pellets porosi di collagene di diverse geometrie e dimensioni che saranno sottoposti a prove di semina cellulare all'interno del bioreattore OPB. Inoltre, come ultimo punto verrà condotta una prova di coltura cellulare di 15 giorni per determinare il grado di espansione delle cellule nel tempo.

# CAPITOLO I

## PROGETTAZIONE, SVILUPPO E CARATTERIZZAZIONE DI PELLETS IN COLLAGENE PER L'ESPANSIONE CELLULARE IN BIOREATTORE

### 1.1. Introduzione

Come già spiegato nell'Introduzione, dall'analisi della letteratura è evidente come l'utilizzo di matrici di supporto in sospensione in bioreattori per colture cellulari sia una metodica ormai di largo uso per l'espansione cellulare. Per via del loro utilizzo in sistemi, specialmente bioreattori, che hanno la possibilità di imprimere una forte agitazione della sospensione, sono solitamente preferite matrici di dimensioni dell'ordine del micrometro. Come indicato nei vari manuali delle diverse aziende produttrici<sup>4</sup>, pellets posti in agitazione, subirebbero un rimescolamento migliore all'interno del mezzo di coltura e di conseguenza garantirebbero la possibilità di un'adesione cellulare migliore. In particolare a seconda del materiale esistono in commercio diverse tipologie di pellets micrometrici come CultiSpher, Percell (Collagene) [43, 34], Cellagen, MP Biomedicals (Collagene) [46], Cytodex, GE Healthcare (Destrano) [7], o SoloHill Engeneering (Polistirene) [18] per fare qualche esempio.

Esistono comunque anche tipologie di pellets sviluppati per scopi di ricerca dell'ordine del millimetro, ad esempio pellets in collagene e cristalli di nanoidrossiapatite prodotti da Tsai et al. [47] per la proliferazione degli osteoblasti.

---

<sup>4</sup> Microcarrier Cell Culture, Principles and Methods, GE Healthcare

Lo scopo di questo lavoro è quello di sviluppare particolari pellets porosi di collagene di dimensioni millimetriche in grado di supportare l'espansione cellulare all'interno del bioreattore OPB.

L'esigenza basilare è quella di avere un pellet biocompatibile che rimanga in sospensione durante la fase di coltura, che permetta un'efficiente adesione e proliferazione cellulare e che non degradi durante la fase di coltura.

Presupponendone la fabbricazione tramite una metodica facilmente industrializzabile, le caratteristiche di progetto, la dinamica di produzione e lo studio dei parametri di semina ed espansione avranno un peso determinante nello sviluppo del dispositivo.

Pertanto i pellets dovranno garantire le seguenti specifiche:

- Essere facilmente realizzabili e riproducibili nelle dimensioni e nella struttura.
- Essere facilmente sterilizzabili senza la perdita delle caratteristiche meccaniche.
- Permettere un'efficiente adesione cellulare durante la fase di semina.
- Promuovere l'espansione delle cellule senza alterarne il fenotipo.
- Mantenere la struttura senza andare incontro a degradazione per tutta la durata della prova di coltura.
- Permettere il recupero cellulare al termine della fase di espansione cellulare senza alterarne la vitalità.

Per quanto riguarda il materiale i pellets verranno prodotti con collagene di tipo I. Essendo parte della matrice extracellulare, il collagene è da tempo utilizzato come scaffold per terapie cellulari e nell'ingegneria dei tessuti in diverse conformazioni [42, 43] sia nella sua forma nativa sia in quella denaturata come gelatina; in particolare quello di tipo I, visti i suoi vantaggi come biodegradabilità, biocompatibilità e la possibilità di combinarlo con altri materiali, è quello maggiormente utilizzato [11]. In questo caso particolare sarà utilizzato collagene di tipo I a fiocchi SYMATESE Biomateriaux, certificato EDQM (European Directorate for the Quality of Medicines & Healthcare), proveniente da animali esenti da BSE (Bovine Spongiform Encephalopathy). Nella fase di produzione, al fine di sciogliere il collagene, verrà utilizzata l'acqua demineralizzata come solvente. Solitamente per sciogliere il collagene, vengono aggiunti acidi per abbassare il pH. Se non vengono totalmente rimossi il rischio è quello di avere dei pellets citotossici per le cellule.

Utilizzando l'acqua otterremo un pellet biocompatibile che non andrà ad inficiare la vitalità cellulare. Per valutare gli effetti dei pellets sulle cellule, nel Capitolo II verranno condotte prove di semina con cellule di linea MG63. Come già spiegato nell'Introduzione non esiste un pellet "utile per tutti gli scopi" [31] per questo durante la sperimentazione, al fine di caratterizzare i pellets, saranno utilizzate cellule di linea, caratterizzate da un maggior grado di adesione e che consentono un comportamento riproducibile tra le prove. Dal punto di vista della realizzazione, per sviluppare pellets facilmente industrializzabili la metodica di produzione deve essere semplice e facilmente riproducibile. Per questo motivo, in questo capitolo, verranno proposte due metodiche di realizzazione:

- Realizzazione in piastramultipozzetto
- Realizzazione per gocciolamento in azoto liquido

Nel primo caso la metodica consiste nel dispensare il collagene all'interno di una piastra multipozzetto con 468 pozzetti di dimensioni note e costanti, appositamente progettata per questo lavoro di tesi.

Nel secondo caso il concetto è quello di far gocciolare volumi prestabiliti di soluzione di collagene all'interno dell'azoto liquido (-196°C) per ottenere sfere di dimensioni millimetriche. Rispetto alla prima tipologia di produzione, anche in questo caso, al fine di ottenere pellets di dimensioni costanti, il set-up per la fabbricazione verrà dettagliatamente e appositamente sviluppato.

Lo studio dei pellets realizzati comprenderà prove di bagnabilità e galleggiabilità, proprietà essenziali per l'adesione cellulare, e l'analisi della struttura.

La struttura dei pellets dovrà permettere l'espansione cellulare su pellets all'interno del mezzo di coltura per lunghi periodi di tempo. Come si può leggere in letteratura, le prove di coltura possono durare due o tre settimane [46, 49], per questo motivo è necessario che il pellets rimanga integro, senza degradarsi, per tutta la durata dell'esperimento.

## **1.2. Realizzazione dei pellets di collagene**

### **1.2.1. Preparazione della sospensione**

Il primo passo per la realizzazione dei pellets è rappresentato dalla preparazione della sospensione di collagene. Al fine di creare uno scaffold biocompatibile che non provochi effetti citotossici, è stata utilizzata l'acqua demineralizzata come solvente. In particolare la sospensione è stata preparata miscelando acqua demineralizzata e collagene di tipo I a fiocchi (SYMATESE Biomateriaux, Fibre de Collagène Bovin, Francia) alla concentrazione del 1%. Dato che l'utilizzo dell'acqua come solvente non comporta la variazione del pH della soluzione, il collagene fatica a sciogliersi; per questo motivo è stato sviluppato un protocollo ad-hoc che prevede l'utilizzo di un agitatore magnetico e che permette di ottenere una soluzione omogenea in circa 12 ore (O/N).

Il collagene a fiocchi è stato travasato in un becker con un magnete, su un agitatore magnetico, impostando un'agitazione lenta e continua. Per tutta la durata del processo, per evitare la denaturazione del collagene, la soluzione è stata mantenuta ad una temperatura inferiore ai 10°C. Una volta finita la miscelazione la soluzione è stata debollata tramite centrifugazione a 1183,29g (Capricorn Laboratory Equipment).

### **1.2.2. Dispensazione della soluzione**

Per realizzare pellets tramite una metodica semplice e facilmente industrializzabile sono stati studiati e analizzati due processi produttivi:

- Produzione in piastra multipozzetto.
- Produzione per gocciolamento in azoto liquido.

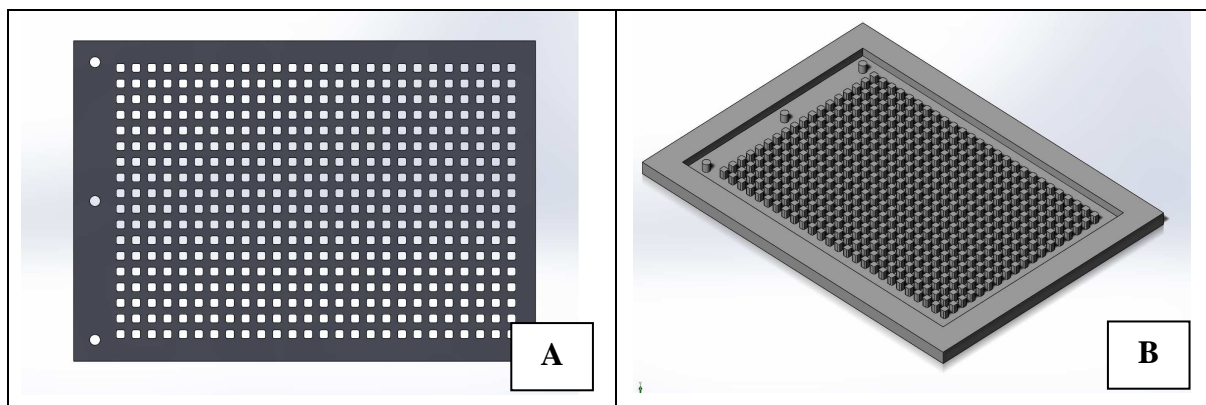
I pellets ottenuti, differenti per di dimensioni, forma e porosità saranno poi caratterizzati al fine di determinare la tipologia che si adatterà meglio allo scopo di questo lavoro e permetterà una semina e una proliferazione più efficaci.

#### **1.2.2.1. Produzione in piastra multipozzetto**

Tramite questo metodo di produzione è possibile ottenere pellets cubici con lato di circa 2 mm. La sospensione di collagene è stata colata all'interno di una piastra multipozzetto, di dimensioni note e costanti, appositamente progettata e realizzata in PDMS (Sylgard®, Polidimetilsilossano): un particolare silicone bicomponente, in cui i tempi di reticolazione

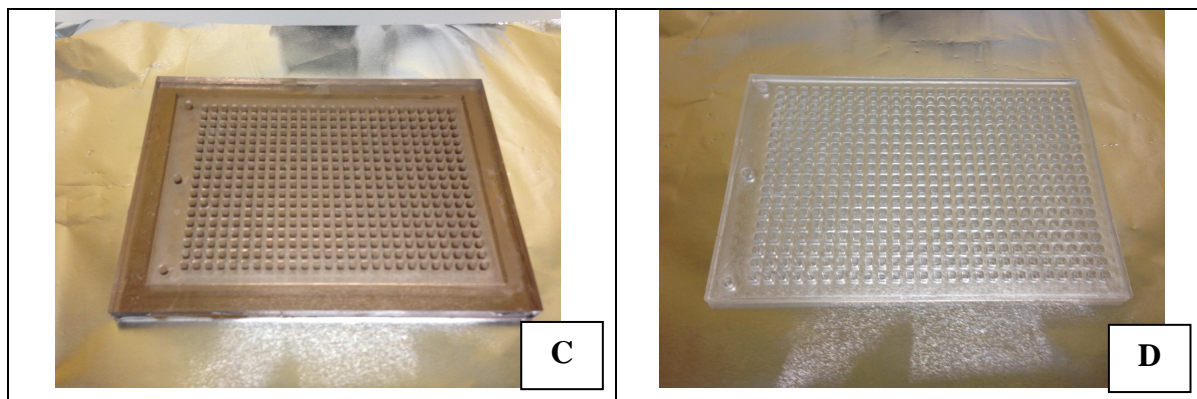
diminuiscono con l'aumentare della temperatura<sup>5</sup>. L'utilizzo di una piastra in PDMS è stato implementato al fine di permettere di estrarre facilmente i pellets al termine delle fasi di produzione. Infatti utilizzando piastre multipozzetto tradizionali (ad esempio piastre multipozzetto per colture cellulari "Advanced TC, VWR" da 384 pozzetti) i pellets dovrebbero essere estratti con una pinza, con il rischio di danneggiare i pellets durante l'estrazione. In questo caso, invece, la soluzione di collagene, mantenuta ad una temperatura inferiore ai 10°C, viene dispensata tramite una pipetta automatica, nei 468 pozzetti della piastra posta sopra un foglio di carta di alluminio. Al termine delle fasi di produzione, sollevando la piastra, i pellets rimangono adesi al foglio di carta d'alluminio semplificandone il recupero.

Realizzazione piastra: Durante la fase di progettazione della piastra il parametro di partenza era rappresentato dal volume di soluzione da colare in ogni singolo pozzetto: 13,8µl, derivato dall'impostazione di una forma cubica. In base a questo dato, attraverso Solidworks (Dessault Systems) è stata disegnata una piastra 130 mm x 90 mm, senza fondo, con 468 pozzetti di dimensioni pari a 2,4mm x 2,4mm x 2,4mm (Figura 1.1, A). Successivamente, partendo dalle dimensioni stabilite, è stato disegnato il controstampo in cui colare il PDMS (Figura 1.1, B). Realizzato il disegno lo stampo in plexiglass (Polimetilmetacrilato) è stato intagliato grazie ad una fresa per prototipazione rapida (Modela, Roland DG, Italia) presso il laboratorio di Micro e Biofluidodinamica Sperimentale del Politecnico di Milano (Figura 1.1, C). Il PDMS è stato poi colato all'interno dello stampo ed è stato lasciato reticolare per 45 minuti all'interno di una stufa impostata a 100°C. Trascorso questo tempo la piastra realizzata è mostrata in Figura 1.1, D:



<sup>5</sup> In Appendice la tabella con i tempi e le temperature di reticolazione del PDMS





**Figura 1. 1:** Fasi di produzione della piastra in PDMS: A = disegno dello stampo; B = disegno della piastra; C = stampo; D = piastra in PDMS (130 mm x 90 mm).

Una volta completata, la piastra è stata posizionata all'interno di un congelatore a  $-40^{\circ}\text{C}$  in attesa della fase successiva.

La dispensazione è avvenuta all'interno di una camera pulita presso la Bioengineering Laboratories Spa.

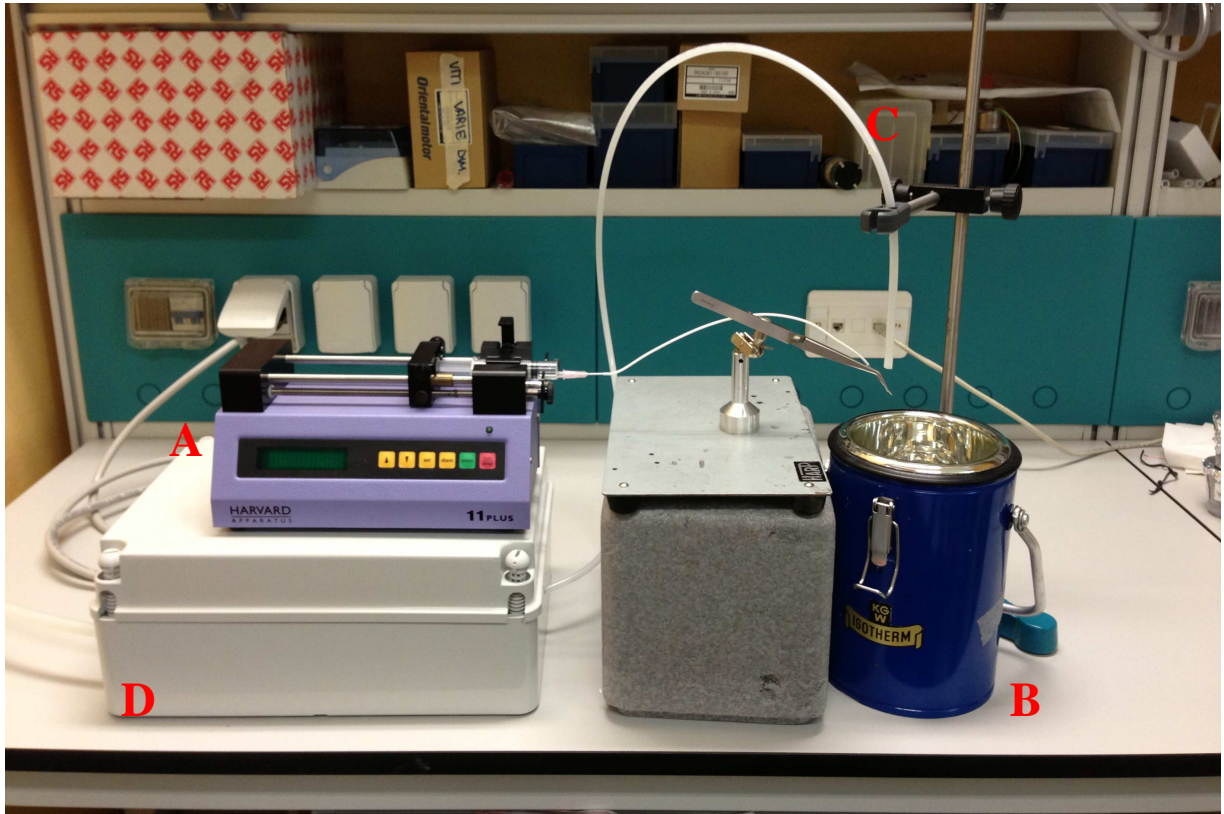
#### **1.2.2.2. Produzione per gocciolamento in azoto liquido**

Nel presente lavoro di tesi è stato ideato un sistema alternativo per la realizzazione dei pellets. Facendo gocciolare in azoto liquido ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) la sospensione di collagene, le gocce congelano istantaneamente mantenendo la forma sferica creata.

La metodica del gocciolamento è già stata utilizzata per la realizzazione di pellets sferici per l'espansione cellulare: Tsai et al. [48] fecero gocciolare una soluzione di collagene e alginato all'interno di cloruro di calcio per formare delle sfere; una volta realizzati i pellets sono stati sottoposti a una serie di lavaggi per rimuovere il solvente in eccesso e ottenere degli scaffold di solo collagene e alginato.

Rispetto a questa metodica, quello che viene proposto è un sistema più semplice e privo di solventi, i quali a contatto con le cellule potrebbero inficiarne la vitalità. Il principio di base è quello di congelare la sospensione di collagene e acqua, precedentemente preparata, in sfere di volume prestabilito, per poi liofilizzarle in modo da conservare la forma ottenuta durante il congelamento. L'azoto liquido non rilasciando alcun residuo nei pellets permette di ottenere matrici biocompatibili di solo collagene senza doverle sottoporre a ulteriori cicli di lavaggio.

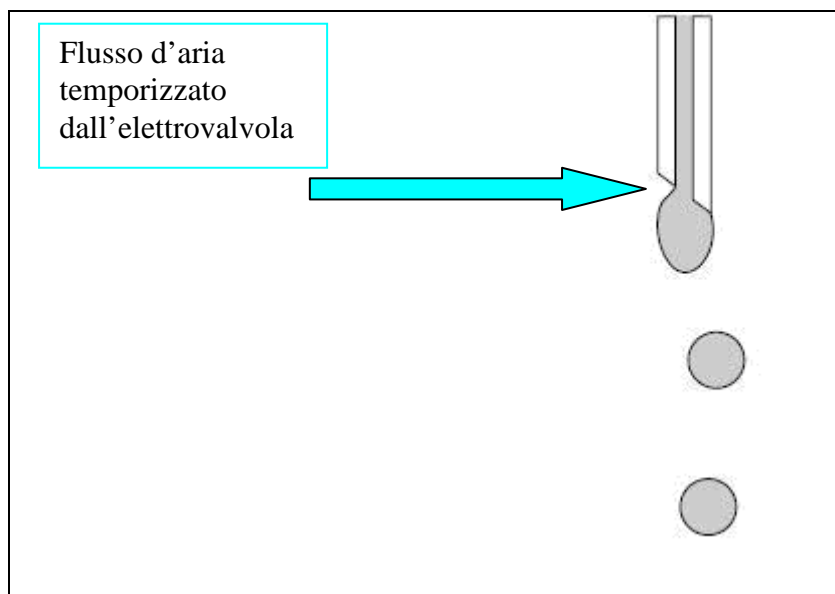
Processo produttivo: L'apparato per la realizzazione dei pellets è quello mostrato in Figura 1.2 e comprende l'utilizzo di una pompa siringa per la dispensazione della soluzione (A), un contenitore contenente azoto liquido (B), un tubo per l'aria compressa (C) e un'elettrovalvola<sup>6</sup> (D), appositamente progettata, per la temporizzazione del flusso d'aria.



**Figura 1. 2:** Set-up per la produzione dei pellets in azoto.

Il collagene, grazie alla pompa siringa (Harvard Apparatus, USA), è spinto in un tubo di Teflon che termina con un ago del diametro di 18G al di sopra del contenitore dell'azoto liquido. Qui il volume della goccia di collagene è determinato dalla temporizzazione del flusso d'aria. L'aria interrompendo ad intervalli prestabiliti la soluzione uscente dalla punta dell'ago permette la formazione di gocce di collagene omogenee in volume. In Figura 1.3 è schematizzata questa fase. Nel caso in oggetto l'elettrovalvola è stata regolata per permettere il passaggio dell'aria ogni 10 secondi per una durata di 0,5 secondi.

<sup>6</sup> In Appendice l'immagine dell'elettrovalvola



**Figura 1. 3:** Schematizzazione della dispensazione di collagene nell'azoto liquido.

Variando la temporizzazione del flusso d'aria o la portata della pompa siringa è possibile variare il volume della goccia dispensata. Vista la facilità con cui si può intervenire sui parametri, con questa metodica di produzione sono state realizzate due tipologie di pellets che differiscono per il volume finale. Nel primo caso il volume iniziale è circa pari a quello dei pellets prodotti in piastra, calcolando un piccolo eccesso a causa del distacco di alcune goccioline di collagene dalla goccia originaria nel contatto con l'azoto; mentre nel secondo caso sono stati realizzati dei pellets più piccoli, circa la metà in volume. Di seguito sono elencati i parametri di processo divisi nelle due tipologie di pellets:

	<b>Azoto 90 (grandi)</b>	<b>Azoto 50 (piccoli)</b>
<b>Portata pompa siringa</b>	90 $\mu\text{l}/\text{min}$	50 $\mu\text{l}/\text{min}$
<b>Pressione aria in uscita</b>	1,5 bar	1,5 bar
<b>Intervallo aria</b>	10 sec	10 sec
<b>Inclinazione ago</b>	70°	70°
<b>Volume teorico</b>	15 $\mu\text{l}$	8,3 $\mu\text{l}$

**Tabella 1. 1:** Parametri di processo della metodica di gocciolamento in azoto.

Una volta realizzati i pellets sono stati immagazzinati all'interno di un tubo Falcon in polipropilene (BD Biosciences, New Jersey) e congelati a  $-80^{\circ}\text{C}$  in attesa delle fasi di lavorazione successive.

### 1.2.3. Liofilizzazione, reticolazione e sterilizzazione termica

Il trattamento successivo è lo stesso per entrambe le tipologie di pellet. Al fine di conservare la forma ottenuta, i pellets sono stati sottoposti a un trattamento di liofilizzazione e per migliorare la resistenza alla degradazione sono stati reticolati. Infine sono stati sterilizzati termicamente.

- Liofilizzazione: grazie alla liofilizzazione viene eliminata l'acqua dal pellet senza deteriorarne la struttura, in modo da avere uno scaffold di solo collagene.

Il metodo comprende fondamentalmente due processi fisici: la surgelazione e la sublimazione. L'acqua contenuta nel pellet e segregata sotto forma di ghiaccio, viene estratta direttamente

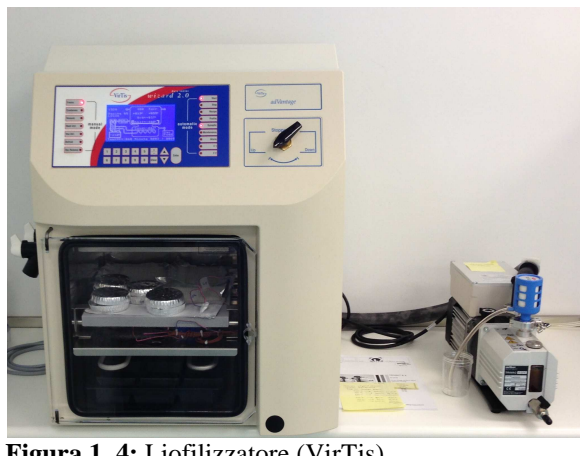


Figura 1. 4: Liofilizzatore (VirTis).

Il vapore acqueo estratto viene catturato per congelamento su serpentine fredde (condensatori).

Il processo viene condotto in condizioni di temperatura e pressione accuratamente controllate per evitare danni alla struttura del pellet. A questo scopo è stato utilizzato un liofilizzatore programmabile industriale (VirTis Advange, SP Scientific, USA) (Figura 1.4) in grado di controllare perfettamente il ciclo termico ed è stato programmato un protocollo ad-hoc suddiviso in diverse fasi:

Fasi	Temperatura mensola [°C]	Temperatura Condensatori [°C]	Tempo [min]	Pressione [mTorr]
<b>Trattamento termico</b>	-60	/	60	/
<b>Congelamento Condensatori e fase di vuoto spinto</b>	-45	-60	5	200000
<b>Ciclo liofilizzazione</b>	+0	/	1020	100
<b>Seconda liofilizzazione</b>	+25	/	60	100

**Tabella 1. 2:** Protocollo di liofilizzazione.

Durante la liofilizzazione i pellets prodotti in azoto sono stati disposti all'interno di alcuni crogiolini in alluminio, mentre la piastra multipozzetto in PDMS, precedentemente disposta sopra un foglio di carta d'alluminio, è stata posta direttamente all'interno del liofilizzatore. L'alluminio permette la trasmissione del calore dal ripiano ai pellets.

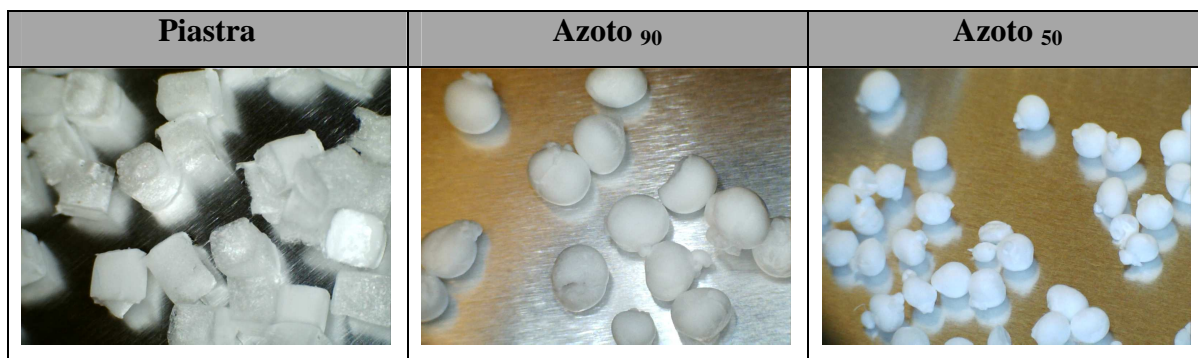
- **Reticolazione termica:** La reticolazione è il processo mediante il quale le catene polimeriche vanno incontro ad una reazione che crea dei legami fra diverse catene (o eventualmente tra due punti diversi della stessa catena), a livello di gruppi funzionali reattivi. In questo modo è possibile modificare le caratteristiche chimico-fisiche del materiale garantendo, nel caso specifico, una resistenza maggiore alla degradazione nel mezzo di coltura durante la fase di espansione. Al fine di conservare la biocompatibilità, i pellets sono stati sottoposti a reticolazione termica in stufa a 121°C per 72h sotto vuoto spinto.
- **Sterilizzazione termica:** Per questa tipologia di scaffold è stato scelto un trattamento termico in stufa a 160°C per 2h sotto vuoto spinto. Nell'ottica di sviluppare un processo facilmente industrializzabile, la sterilizzazione termica è un

trattamento semplice, veloce e economicamente vantaggioso. Inoltre, rispetto alla sterilizzazione con ossido di etilene (EtO), dove i campioni devono essere sottoposti ad un opportuno ciclo di degasaggio, non corre il rischio di rilasciare particelle di EtO all'interno del pellet.

I pellets prodotti in piastra di PDMS sono stati estratti dalla piastra al termine del trattamento di sterilizzazione. Sollevando la piastra i pellets rimangono adesi al foglio di carta di alluminio.

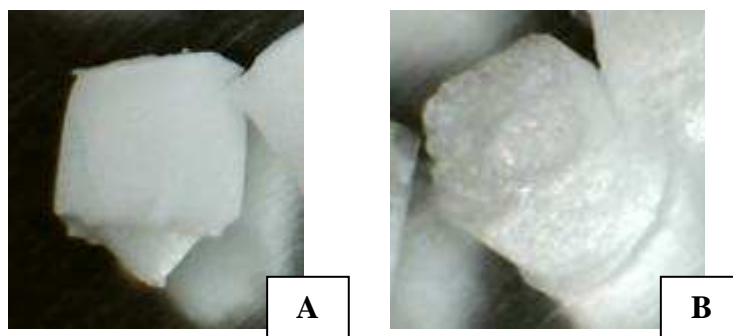
Le fasi e i parametri di produzione dei pellets sono stati registrati, di volta in volta, su una scheda appositamente creata e mostrata in Appendice<sup>7</sup>.

Alla fine del processo di produzione appena descritto i pellets hanno l'aspetto mostrato in Figura 1.5:



**Figura 1. 5:** Foto delle tre tipologie di pellets.

Seppur gli scaffold presentino dimensioni costanti e omogenee all'interno del proprio gruppo di appartenenza, come si può notare, ad un primo controllo visivo, i pellets realizzati in piastra mostrano due strutture diverse: una molto compatta (Figura 1.6, A) e una molto più porosa (Figura 1.6, B).



**Figura 1. 6:** Doppia struttura dei pellets prodotti in piastra: A = compatti; B = porosi.

<sup>7</sup> In Appendice un esempio della scheda per la registrazione dei dati di produzione

### **1.3. Prove di bagnabilità e galleggiabilità**

Per l'espansione cellulare in bioreattore è necessario caratterizzare parametri quali la bagnabilità e la galleggiabilità dei pellets.

L'adesione delle cellule al substrato è caratterizzata dalla natura delle strato proteico assorbito. Le proteine svolgono sia una funzione di segnale per lo stimolo di legami specifici con le cellule sia una funzione strutturale di adesione [14]. Per questo motivo lo scaffold non potrà essere idrofobico ma altamente bagnabile in modo da poter assorbire le proteine necessarie all'adesione con le cellule.

Inoltre i pellets, all'interno delle camere di coltura, dovranno rimanere sospesi nel mezzo di coltura (DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium, Invitrogen, Life Technology, Italia) facendosi trascinare dall'agitazione imposta. Se dovessero galleggiare in superficie o rimanere sul fondo della camera durante tutta la durata della prova, il rischio è quello di non impattare efficacemente con le cellule.

#### **1.3.1. Bagnabilità**





Non potendo valutare precisamente il grado di bagnabilità dei pellets di collagene a causa delle ridotte dimensioni, per questa prova sono stati realizzati dei dischetti di collagene del diametro di 13,4 mm e spessore di 2 mm (dimensioni post liofilizzazione).

I dischetti sono stati realizzati colando il collagene in una piastra multipozzetto da 24 pozzetti e sottoponendoli al ciclo di liofilizzazione, reticolazione e sterilizzazione termica. La piastra è stata realizzata con la stessa metodica sopra descritta per la produzione dei pellets in piastra<sup>8</sup>.

Per valutare il grado di bagnabilità del collagene i dischetti sono stati bagnati con 500µl di mezzo per colture cellulari con i seguenti risultati:

---

<sup>8</sup> In Appendice la foto dello stampo e della piastra in PDMS per la realizzazione degli scaffold discoidali in collagene.

	<p>t = 0</p> <p>Immagine del dischetto prima della dispensazione del mezzo di coltura</p>
	<p>t = 30 secondi</p> <p>Durante la dispensazione del mezzo di coltura il dischetto non si bagna mostrando una certa idrofobicità</p>
	<p>t = 1 ora</p> <p>Dopo un'ora il dischetto non ha ancora assorbito il mezzo di coltura ma inizia a restringersi avvolgendo la goccia di mezzo</p>
	<p>t = 24 ore</p> <p>Dopo circa 24 ore il dischetto si è notevolmente ristretto senza aver assorbito il mezzo di coltura</p>

**Figura 1. 7:** Prova di bagnabilità su dischetti in collagene.

Quello che si può notare è come il materiale risulti altamente idrofobico. Ipotizzando un utilizzo per colture cellulari è chiaro come questo comportamento rappresenti sicuramente un problema per l'adesione delle cellule allo scaffold.



### 1.3.1.1. Trattamento al plasma

Come soluzione al problema della bagnabilità i pellets sono stati trattati al plasma.

Il trattamento al plasma permette di modificare le caratteristiche chimiche superficiali di polimeri e biopolimeri. Esponendo il polimero a uno specifico plasma, si ottiene una superficie chimicamente diversa da quelle di partenza. Il risultato è un nuovo prodotto, che mantiene le stesse caratteristiche meccaniche e fisiche, ma con una diversa possibilità di interagire con la materia circostante. Questo trattamento è frequentemente usato per migliorare le proprietà di adesività e bagnabilità dei polimeri naturali e sintetici permettendo così di trasformare una superficie da idrorepellente in idrofila [50, 51].

Nel caso in esame, dovendo aumentare l'idrofilicità dei pellets è stato quindi utilizzato un PLASMA CLEANER (Harrick Plasma, Ithaca, New York, Figura 1.8) che utilizza plasma ad aria sottovuoto. I campioni sono stati



**Figura 1. 8:** Plasma Cleaner (Harrick Plasma).

inseriti nella camera a cui è stato applicato il vuoto e il trattamento al plasma è durato complessivamente 4,5 minuti.

Anche in questo caso sono stati utilizzati i dischetti di collagene per osservare la differenza di bagnabilità prima e dopo il trattamento (Figura 1.9):



**Figura 1. 9:** Effetto del trattamento al plasma: colonna di sinistra = scaffold non trattati; colonna di destra = scaffold trattati.

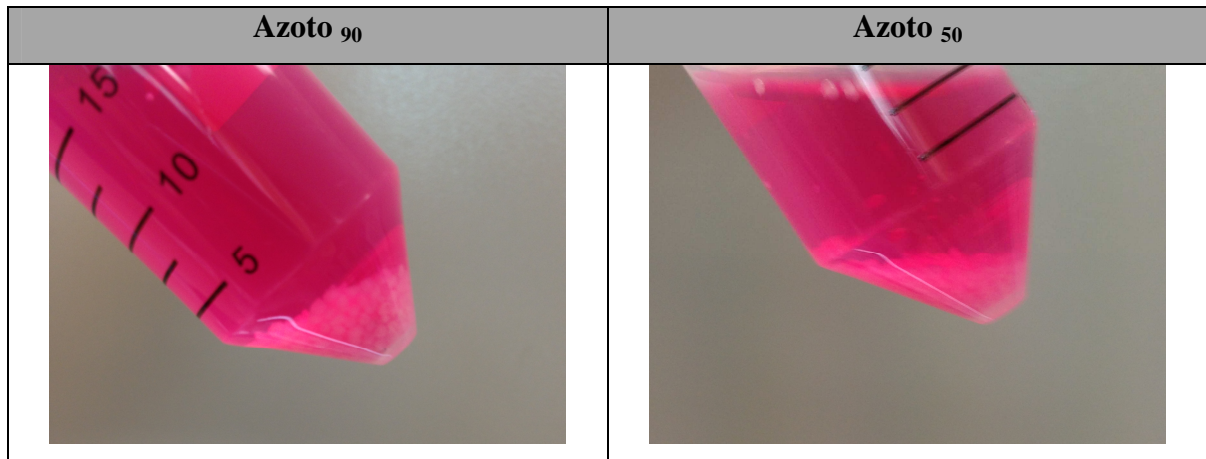
La figura mostra come la bagnabilità del collagene è notevolmente migliorata rispetto ai dischetti non trattati (colonna di sinistra); infatti il mezzo di coltura (500 $\mu$ l) è stato assorbito entro 30 secondi (colonna di destra).

Visti i risultati ottenuti, nei successivi test i pellets sono sempre stati trattati al plasma (vedi Capitolo II).

### 1.3.2. Galleggiabilità

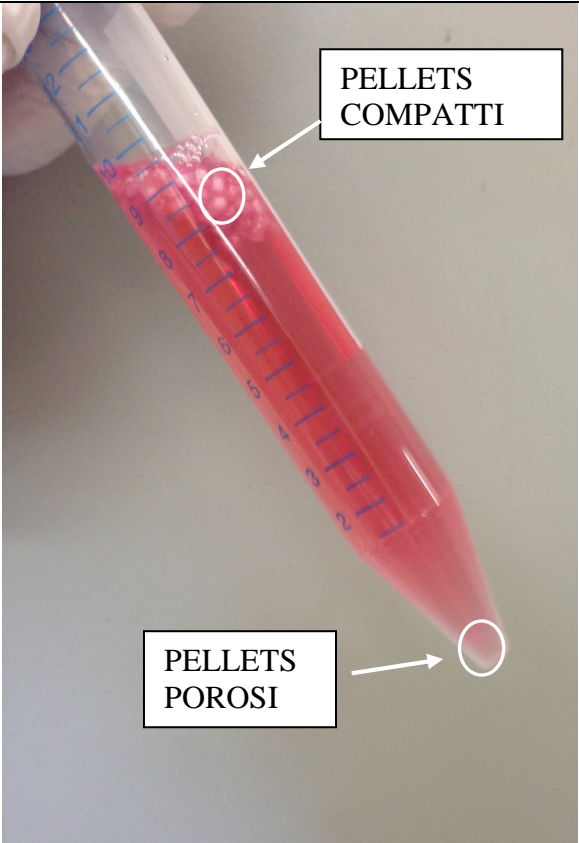
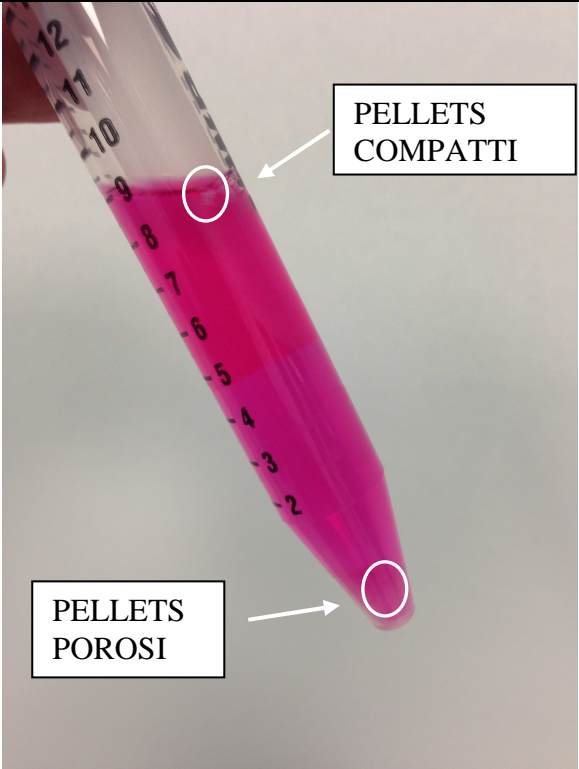
Per la prova di galleggiabilità tutte le tipologie di pellets, dopo trattamento al plasma, sono state immerse, all'interno di un tubo Falcon in polipropilene (BD Biosciences, New Jersey), nel mezzo di coltura (DMEM) a 37°C impostando una lieve agitazione per circa 12h. Quello che si nota dalle immagini è come i pellets realizzati per gocciolamento in

azoto liquido (sia Azoto<sub>90</sub> che Azoto<sub>50</sub>) si siano depositati sul fondo del tubo Falcon (Figura 1.10):



**Figura 1. 10:** Prova di galleggiabilità: Azoto<sub>90</sub> e Azoto<sub>50</sub>.

I pellets realizzati in piastra di PDMS invece mostrano un comportamento disomogeneo: quelli con struttura più compatta galleggiano nel mezzo mentre quelli con struttura porosa si depositano sul fondo; come si vede dalla Figura 1.11 anche dopo 12 mesi la situazione cambia solo leggermente.

 <p>PELLETS COMPATTI</p> <p>PELLETS POROSI</p>	<p>Dopo 12 h in agitazione nel mezzo di coltura, nonostante tutti i pellets abbiano apparentemente assorbito il mezzo, quelli con struttura porosa si depositano sul fondo, mentre quelli con struttura compatta galleggiano.</p>
 <p>PELLETS COMPATTI</p> <p>PELLETS POROSI</p>	<p>Dopo circa un anno la situazione dei pellets è leggermente cambiata. Molti pellets si sono depositati sul fondo mentre alcuni continuano a galleggiare.</p>

**Figura 1. 11:** Prova di galleggiabilità: pellets prodotti in piastra.

Durante le prove di semina e coltura cellulare la galleggiabilità influenza inevitabilmente l'esito delle prove. Pellets galleggianti in superficie potrebbero non impattare efficacemente con le cellule.

Per questo motivo la disomogeneità di comportamento riscontrata nei pellets prodotti in piastra dovrà essere analizzata, per esempio trattando separatamente i due tipi di struttura.

Grazie alla prova eseguita sui pellets prodotti in piastra è stato inoltre possibile verificare la resistenza dei pellets alla degradazione nel mezzo di coltura. Come si può vedere dalla Figura 1.1 anche dopo un anno, a temperatura ambiente, i pellets mantengono la loro struttura, dimostrando quindi una stabilità adeguata per supportare colture cellulari anche per periodi prolungati.

## 1.4. Analisi stereomicroscopica




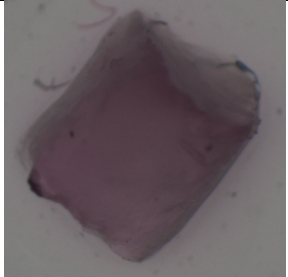
La struttura finale dei pellets è condizionata dal processo di realizzazione. Come verrà mostrato, la fase di liofilizzazione oltre a permettere l'eliminazione dell'acqua dallo scaffold comporta anche il suo restringimento [52, 15]. Un secondo restringimento è invece dovuto all'immersione dei pellets nel mezzo di coltura

Durante la fase di semina, la densità iniziale di cellule e il numero di pellets da utilizzare durante la prova di coltura vengono calcolate in base all'effettiva superficie esterna disponibile dei pellets. Al tal fine è necessario quantificare il restringimento subito durante le fasi di produzione. Attraverso il microscopio stereoscopico sono state fatte le seguenti analisi della struttura dei pellets ed è stato determinato il grado di restringimento dopo la fase di liofilizzazione e dopo l'immersione nel mezzo di coltura:

- Valutazione della struttura dei pellets;
- Restringimento in seguito alla fase di liofilizzazione;
- Restringimento in seguito al contatto con il mezzo di coltura.


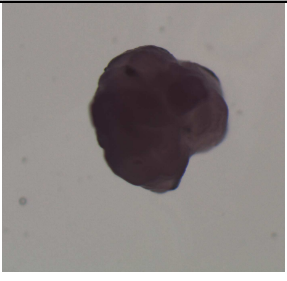


### 1.4.1. Valutazione della struttura dei pellets

Le seguenti immagini confermano, per i pellets prodotti in piastra, la doppia tipologia di struttura riscontrata nel controllo visivo e nella prova di galleggiamento:

	Pellets asciutti	Pellets bagnati
Struttura compatta		
Struttura porosa		

**Figura 1. 12:** Analisi allo stereo microscopio dei pellets prodotti in piastra, prima e dopo l'immersione nel mezzo di coltura (t=12 ore).

Come si vede dalle immagini i due pellets da asciutti presentano una struttura superficiale differente; i pellets compatti mostrano una superficie liscia mentre la superficie dei pellets porosi sembra più rugosa. Dopo l'immersione nel mezzo di coltura, invece, i pellets con struttura compatta presentano una certa disomogeneità nel colore, indice del fatto che parte del pellets potrebbe non aver assorbito il mezzo di coltura. I pellets realizzati per gocciolamento in azoto invece non mostrano disomogeneità:

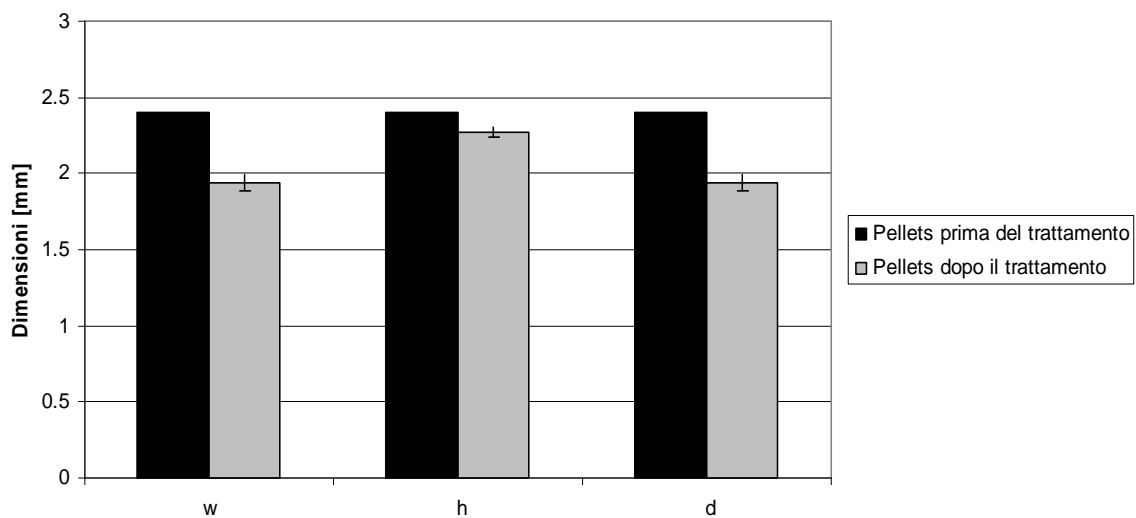
	Pellets asciutti	Pellets bagnati
Azoto 90		
Azoto 50		

**Figura 1. 13:** Analisi allo stereo microscopio dei pellets prodotti in azoto, Azoto 90 e Azoto 50, prima e dopo l'immersione nel mezzo di coltura (t=12 ore).

### 1.4.2. Restringimento in seguito alla fase di liofilizzazione

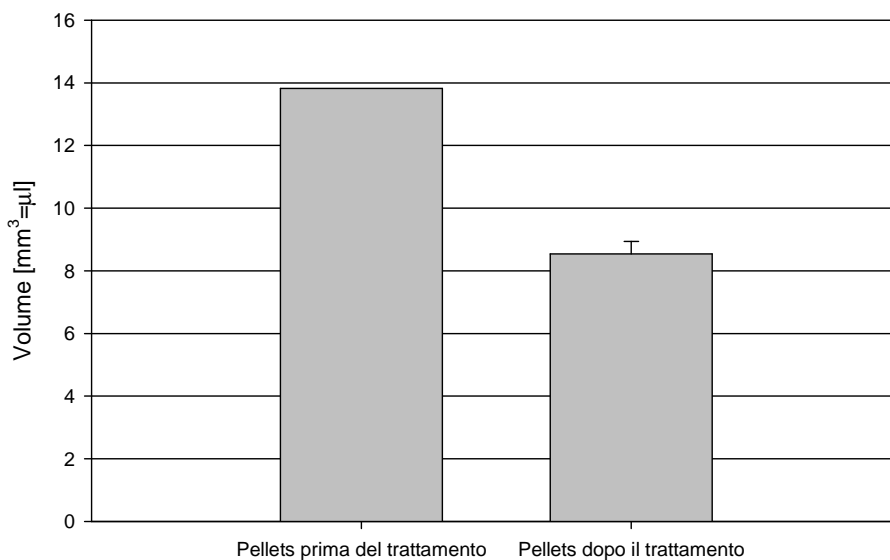
Per calcolare il restringimento sono stati misurati 10 pellets dopo i trattamenti di liofilizzazione e reticolazione. Per le dimensioni pre-trattamento sono state considerate le misure del pozzetto della piastra in PDMS per i pellets in piastra, mentre per i pellets in azoto sono stati fatti dei calcoli teorici del volume e del diametro a partire dal volume dispensato per ogni singola goccia a causa dell'impossibilità di misurare i pellets prima del trattamento, quando non ancora solidificati.

I pellets prodotti in piastra hanno subito un restringimento asimmetrico. Per le dimensioni di base è risultato del 18%, passando per la larghezza e la profondità dei pellets da 2,4 mm a 1,94mm (valori medi), mentre l'altezza ha subito un restringimento del 5%, passando da 2,24 mm a 2,28mm (valori medi). Dopo la liofilizzazione il volume dei pellets è diminuito del 38% circa, inoltre non si notano differenze significative tra i pellets con struttura compatta e quelli con struttura porosa.



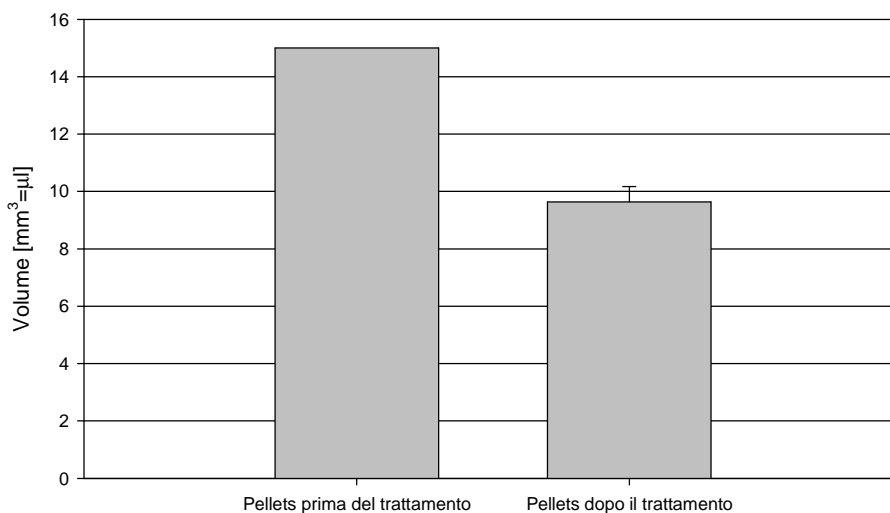
**Grafico 1. 1:** Dimensioni dei pellets prodotti in piastra prima (valori medi: 2,4 mm [w] x 2,4 mm [h] x 2,4 mm [d]) e dopo (valori medi: 1,94 mm [w] x 2,28 mm [h] x 1,94 mm [d]) la fase di liofilizzazione.





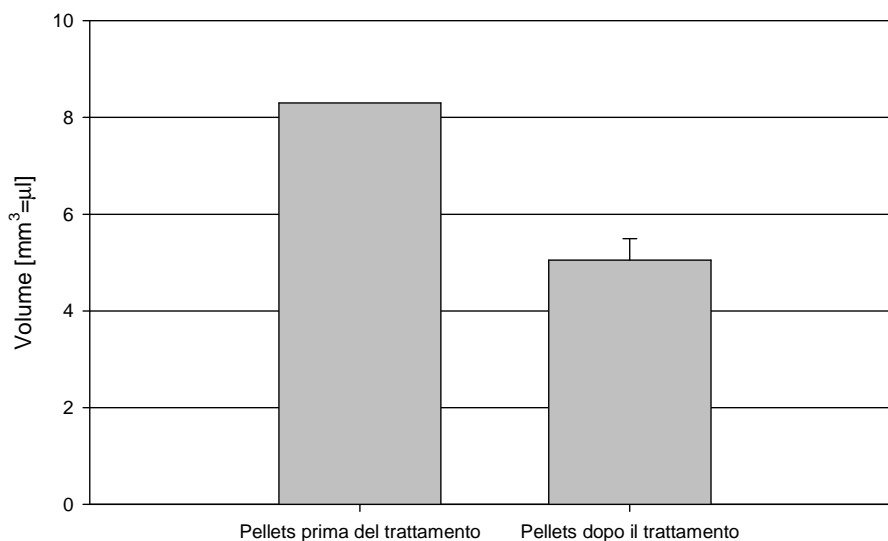
**Grafico 1. 2:** Volume dei pellets prodotti in piastra prima (valore medio: 13,82 mm<sup>3</sup>) e dopo (valore medio: 8,58 mm<sup>3</sup>) la fase di liofilizzazione.

Per quanto riguarda i pellets prodotti in azoto, quelli Azoto<sub>90</sub> hanno subito un restringimento in volume pari al 36%, passando da 15 mm<sup>3</sup> a 9,62 mm<sup>3</sup> (valori medi).



**Grafico 1. 3:** Volume dei pellets Azoto<sub>90</sub> prima (valore medio: 15 mm<sup>3</sup>) e dopo (valore medio: 9,62 mm<sup>3</sup>) la fase di liofilizzazione.

I pellets Azoto<sub>50</sub>, invece, hanno subito un restringimento in volume pari al 39%, passando da 8,3 mm<sup>3</sup> a 5,05 mm<sup>3</sup> (valori medi)

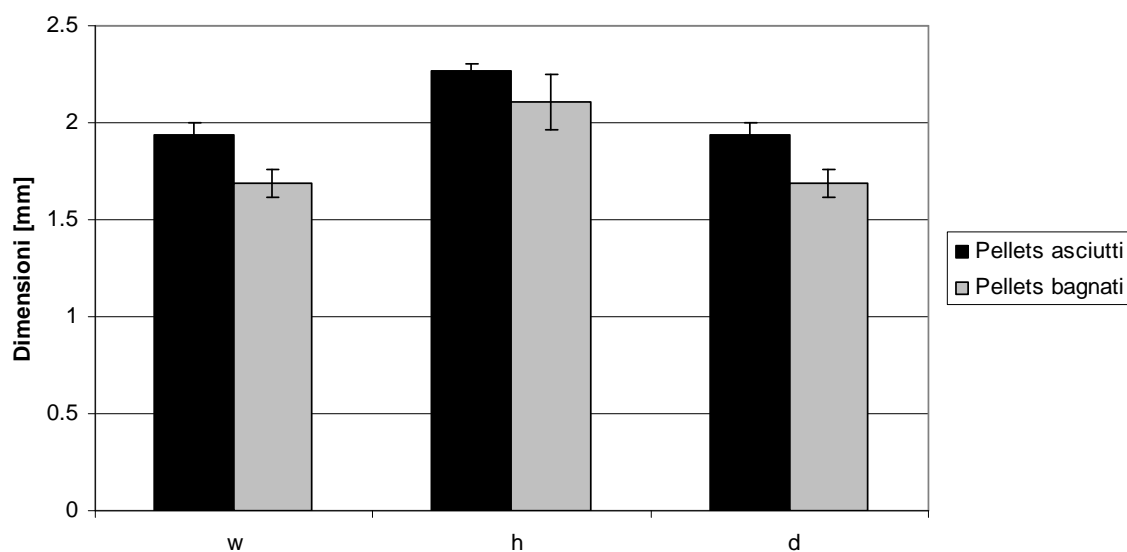


**Grafico 1. 4:** Volume dei pellets Azoto<sub>50</sub> prima (valore medio: 8,3 mm<sup>3</sup>) e dopo (valore medio: 5,05 mm<sup>3</sup>) la fase di liofilizzazione.

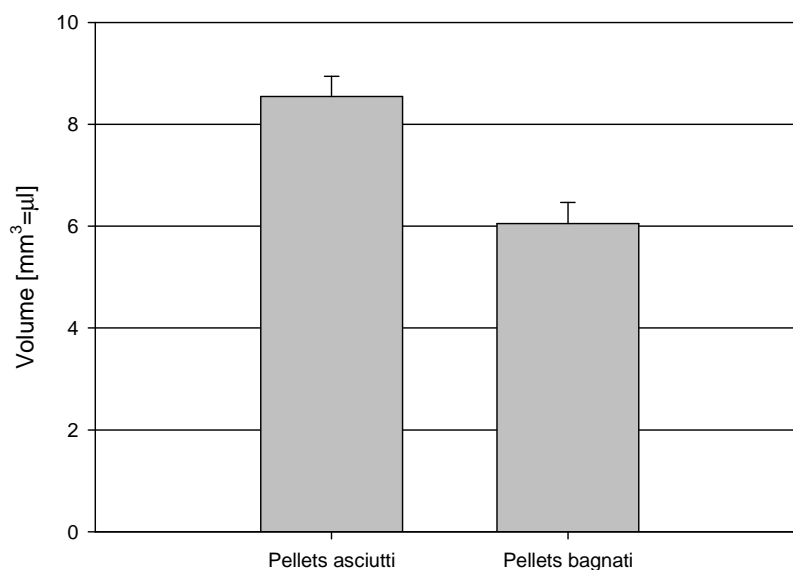
### 1.4.3. Restringimento in seguito al contatto con il mezzo di coltura

Una volta a contatto con il mezzo di coltura le dimensioni dei pellets cambiano ulteriormente. Attraverso fotografie al microscopio stereoscopico sono state prese le misure di 10 pellets per ogni gruppo, prima e dopo l'immersione nel mezzo di coltura per 12 ore.

I pellets prodotti in piastra, anche in questo caso, hanno subito un restringimento asimmetrico. Per le dimensioni di base è risultato del 13%, passando per la larghezza e la profondità dei pellets da 1,94 mm a 1,69 mm (valori medi), mentre l'altezza ha subito un restringimento del 7%, passando da 2,28 mm a 2,12mm (valori medi). Dopo la liofilizzazione il volume dei pellets è diminuito del 30% circa, inoltre non si notano differenze significative tra i pellets con struttura compatta e quelli con struttura porosa.

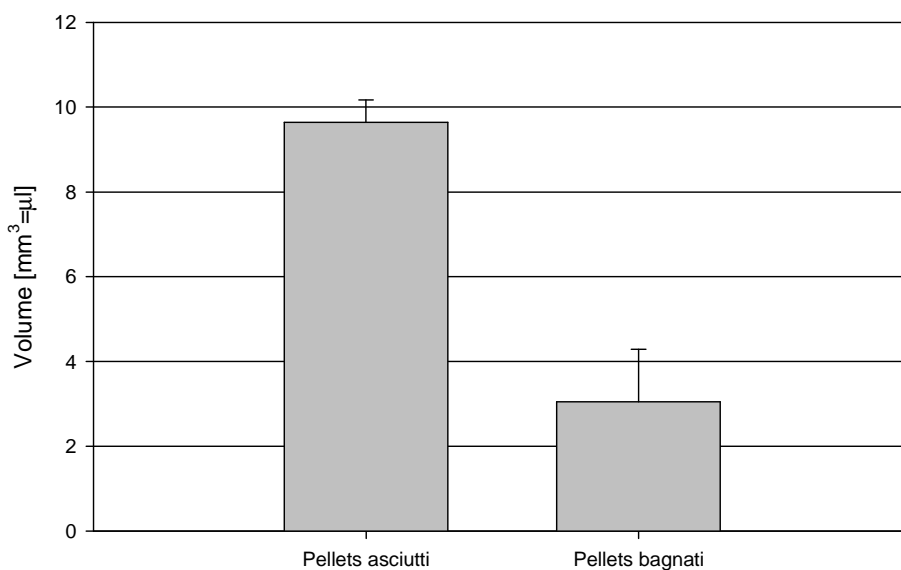


**Grafico 1. 5:** Dimensioni dei pellets prodotti in piastra prima (valori medi: 1,94 mm [w] x 2,28 mm [h] x 1,94 mm [d]) e dopo (valori medi: 1,69 mm [w] x 2,12 mm [h] x 1,69 mm [d]) il contatto con il mezzo di coltura.



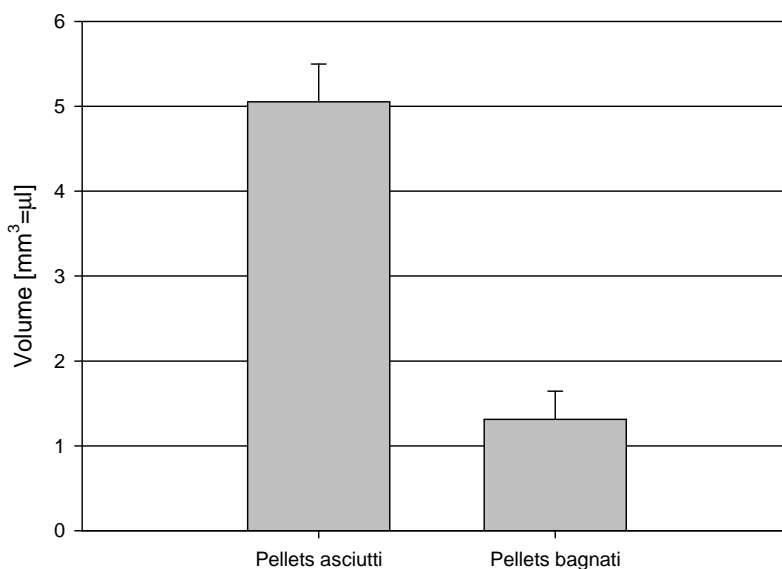
**Grafico 1. 6:** Volume dei pellets prodotti in piastra prima (valore medio: 8,58 mm<sup>3</sup>) e dopo (valore medio: 6,05 mm<sup>3</sup>) il contatto con il mezzo di coltura.

Per quanto riguarda i pellets prodotti in azoto, quelli Azoto<sub>90</sub> hanno subito un restringimento in volume pari al 69%, passando 9,62 mm<sup>3</sup> a 3,05 mm<sup>3</sup> (valori medi).



**Grafico 1. 7:** Volume dei pellets Azoto<sub>90</sub> prima (valore medio: 9,62 mm<sup>3</sup>) e dopo (valore medio: 3,05 mm<sup>3</sup>) il contatto con il mezzo di coltura.

I pellets Azoto<sub>50</sub>, invece, hanno subito un restringimento in volume pari al 74%, passando da 5,05 mm<sup>3</sup> a 1,31 mm<sup>3</sup> (valori medi).



**Grafico 1. 8:** Volume dei pellets Azoto<sub>50</sub> prima (valore medio: 5,05 mm<sup>3</sup>) e dopo (valore medio: 1,31 mm<sup>3</sup>) il contatto con il mezzo di coltura.

Il restringimento complessivo subito dai pellets durante i vari passaggi del processo di produzione è riassunto nel grafico seguente:



**Grafico 1. 9:** Grafico riassuntivo dei restringimenti subiti dai pellets.

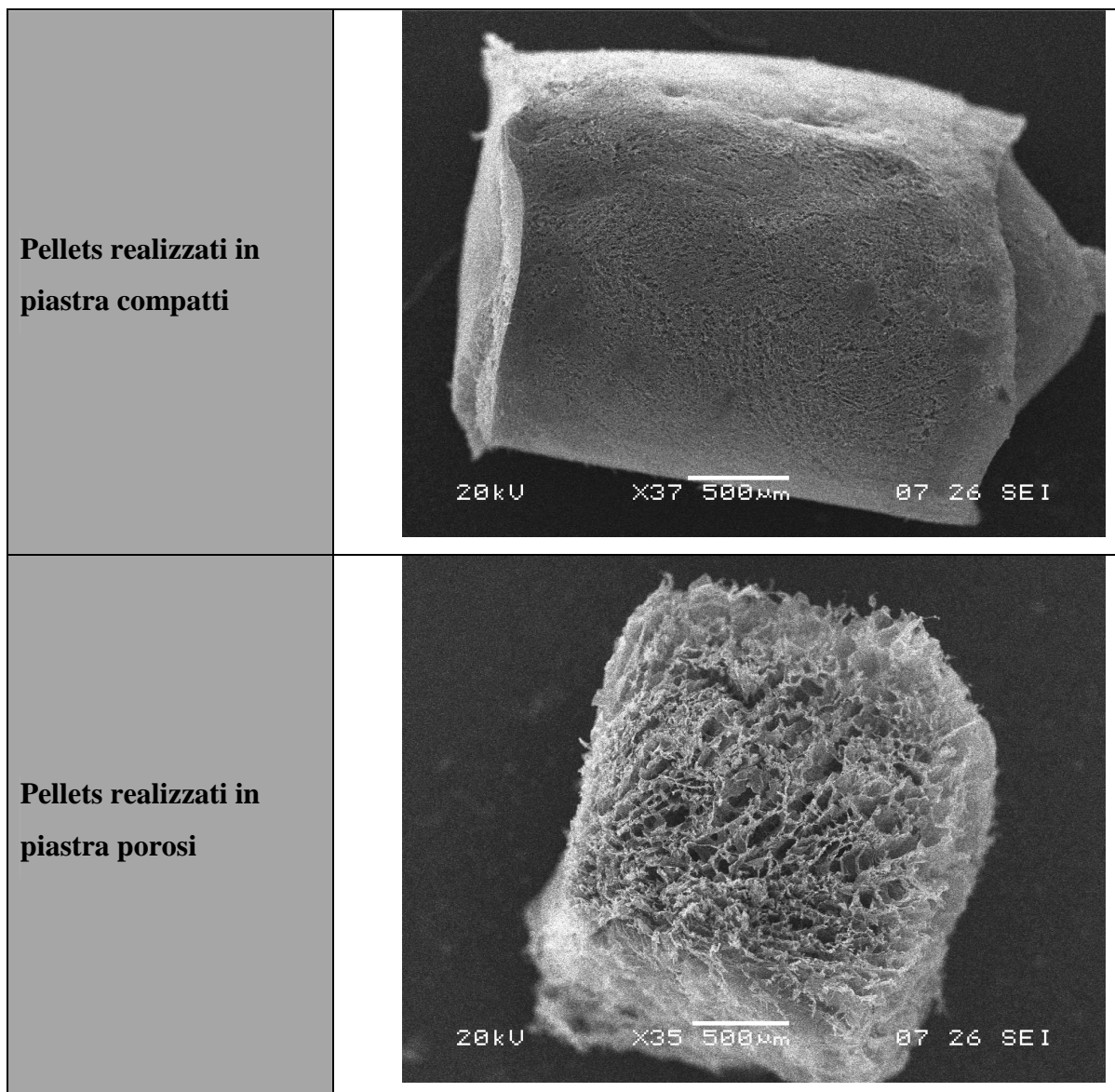
## 1.5. Analisi al SEM

Per studiare la struttura a livello microscopico che causa il comportamento sopra descritto, si è resa necessaria un'analisi al SEM (Microscopio Elettronico a Scansione) della superficie esterna.

Le immagini sono state realizzate presso la Stazione Sperimentale per la Seta a Milano:

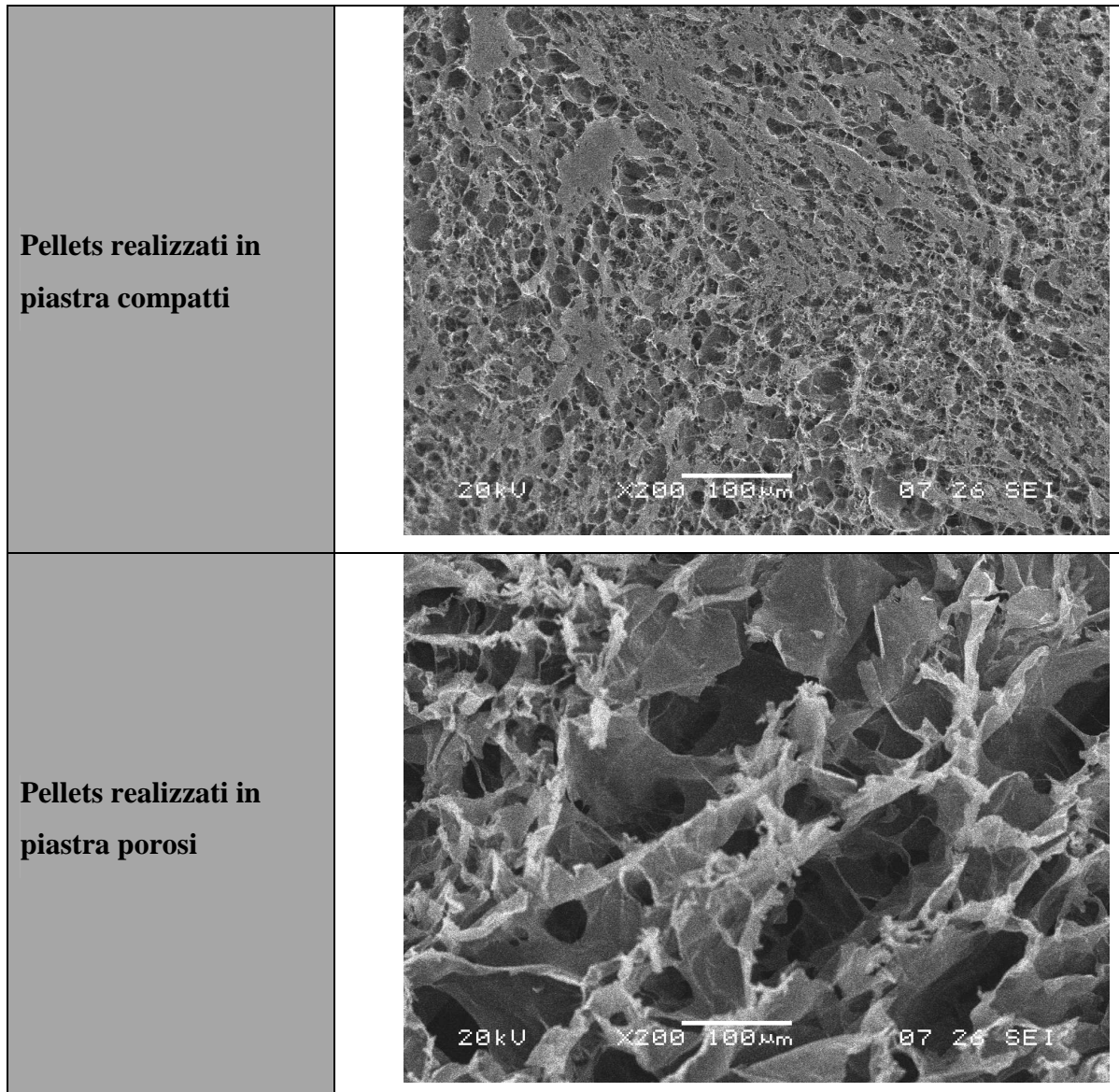
- Pellets realizzati in piastra

Come si può notare dalla Figura 1.14 le immagini SEM dei pellets compatti e porosi mostrano una superficie esterna differente nei due casi.



**Figura 1. 14:** Immagini al SEM dei pellets realizzati in piastra.

L'ingrandimento a 200x mostra nel dettaglio la differente dimensione e struttura dei pori.

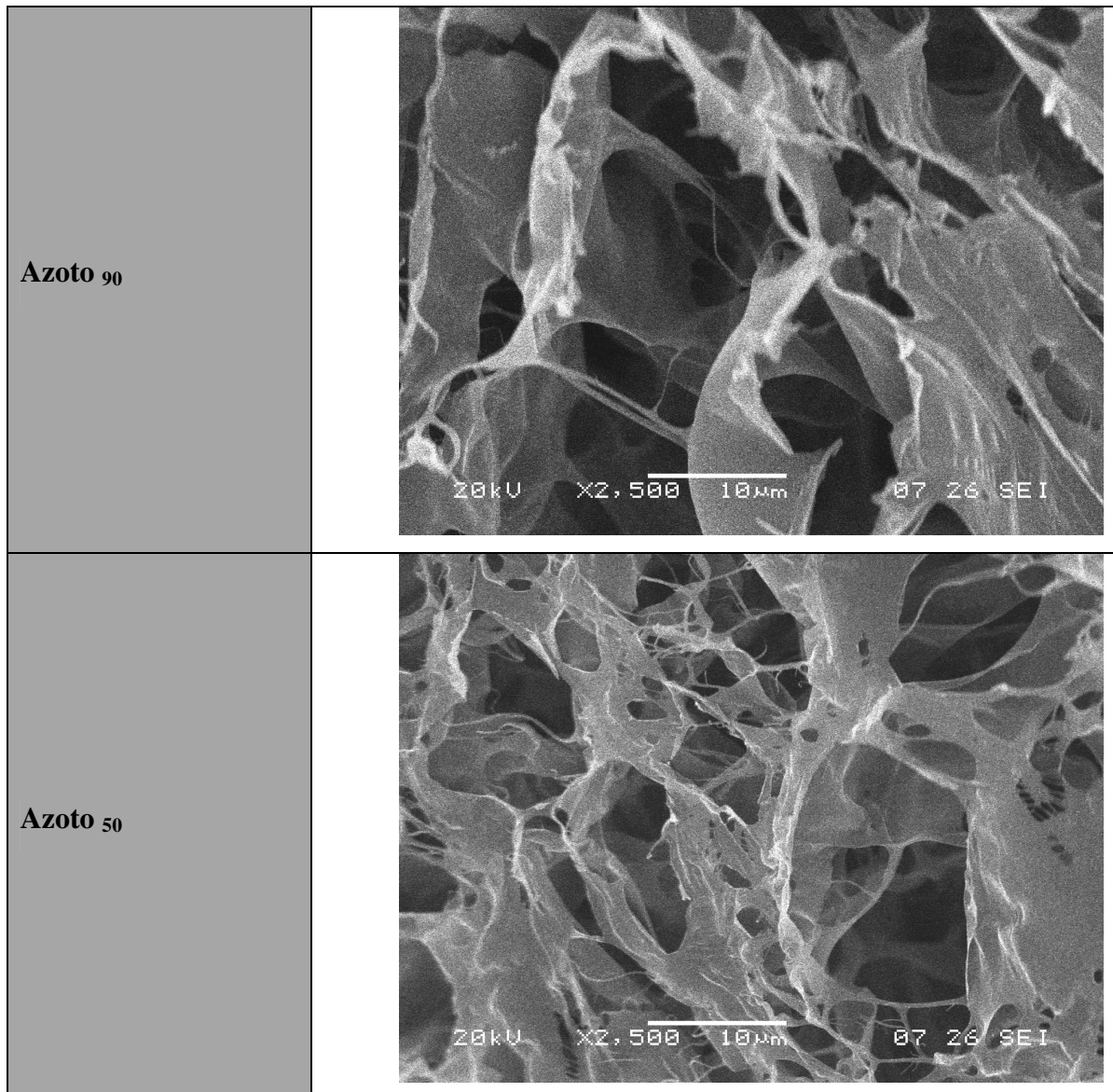


**Figura 1. 15:** Immagini al SEM dei pellets prodotti in piastra (ingrandimento 200x).

Le immagini mostrano due strutture superficiali differenti: nel caso dei pellets compatti mostrano una superficie liscia con pori dell'ordine dei 10 μm, mentre i pellets porosi mostrano una superficie rugosa con i pori dell'ordine dei 100 μm.

- Pellets realizzati per gocciolamento in azoto

Confrontando i pellets prodotti in azoto, Azoto<sub>90</sub> e Azoto<sub>50</sub>, a 2500x possiamo vedere le seguenti strutture:

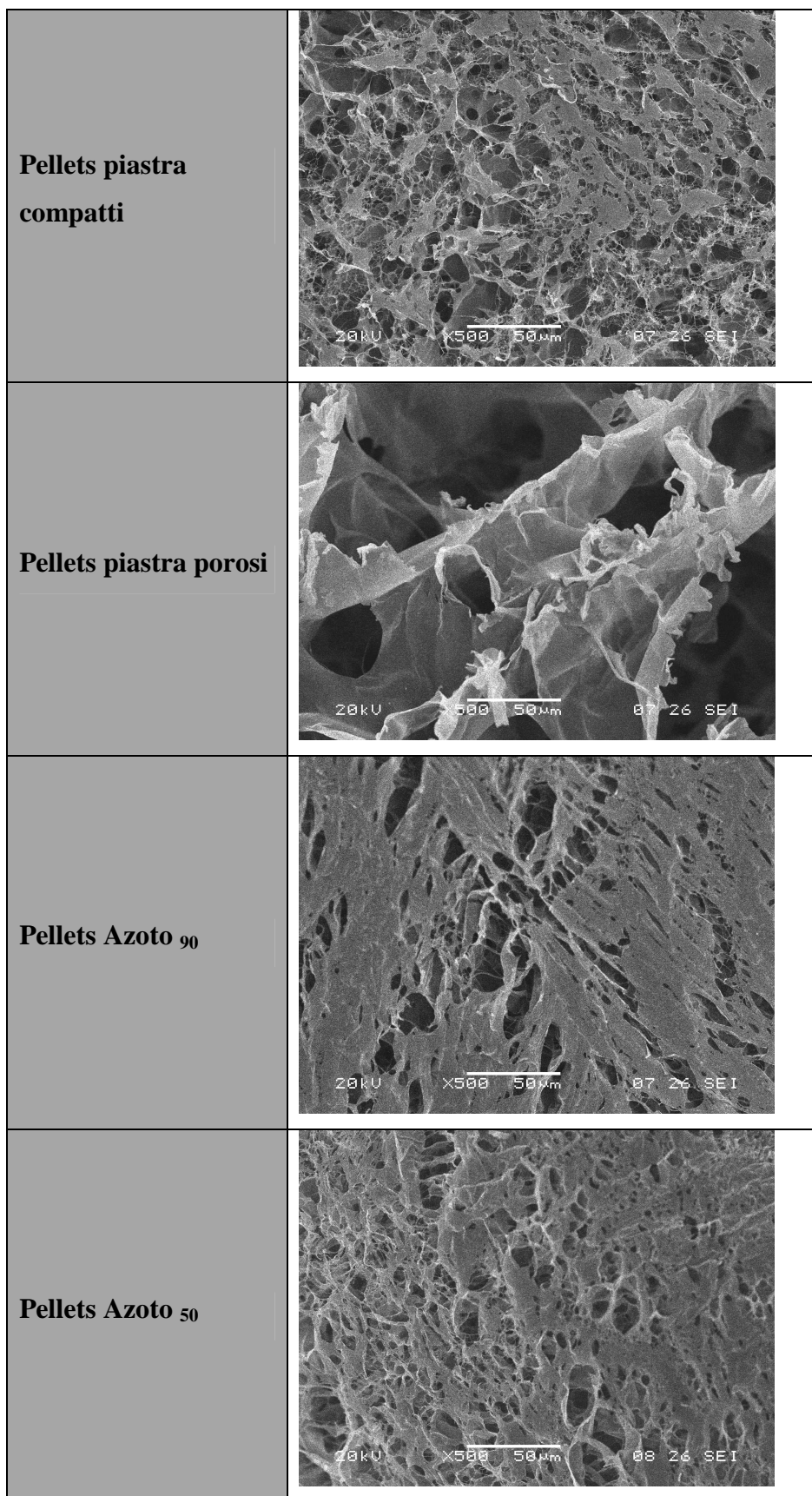


**Figura 1. 16:** Immagini al SEM dei pellets prodotti per gocciolamento in azoto, Azoto<sub>90</sub> e Azoto<sub>50</sub> (ingrandimento 2500x).

Le due tipologie di pellets prodotti in azoto non mostrano particolari differenze nelle dimensioni e nella struttura dei pori, presentando, in entrambi i casi, pori di dimensioni dell'ordine dei 10µm.

Confrontando le quattro tipologie di pellets (pellets prodotti in piastra compatti, pellets prodotti in piastra porosi, Azoto<sub>90</sub>, Azoto<sub>50</sub>) allo stesso ingrandimento (500x) otteniamo i seguenti risultati:





**Figura 1. 17:** Immagini al SEM delle diverse tipologie di pellets (ingrandimento 500x).

Le immagini al SEM, per quanto riguarda i pellets prodotti in piastra confermano le valutazioni fatte fino a questo momento: le due tipologie di strutture presentano strutture superficiali differenti.

Per quanto riguarda i pellets realizzati per gocciolamento in azoto, dalle immagini le due tipologie mostrano superfici con una struttura confrontabile.

Se andiamo però a confrontare le quattro tipologie di pellets con lo stesso ingrandimento notiamo che i pellets prodotti in azoto hanno una struttura superficiale più simile ai pellets compatti prodotti in piastra. Questa analisi non è in linea con le prove di galleggiabilità, dove il comportamento riscontrato per i pellets Azoto<sub>90</sub> e Azoto<sub>50</sub> era lo stesso riscontrato per i pellets porosi prodotti in piastra.

Probabilmente la reale differenza riscontrata durante le prove di galleggiamento è dovuta alla struttura interna. La velocità di congelamento potrebbe strutturare in modo differente la struttura interna dei pellets. Come dimostrato da O'Brien et al. [13] aumentando la velocità di congelamento, a parità di materiale le dimensioni dei pori diminuiscono. Nel caso della metodica in azoto i pellets vengono congelati istantaneamente e riescono ad avere, nonostante il volume, la stessa struttura esterna e probabilmente interna e pori con dimensioni confrontabili. Nel caso di quelli prodotti in piastra invece, il congelamento è meno istantaneo e potrebbe avvenire in maniera disuniforme sia tra i pellets sia all'interno del pellet stesso. Non potendo però fotografare l'interno dei pellets senza danneggiarli questa ipotesi non è stata verificata.

## 1.6. Prova di digestione enzimatica

Al termine della coltura, per permettere il recupero delle cellule i pellets, dovranno essere digeriti. Una metodica che permette il recupero delle cellule senza danneggiare la vitalità è rappresentata dalla digestione con collagenasi di tipo I (enzima che taglia i legami peptidici del collagene). L'utilizzo della collagenasi<sup>9</sup> rappresenta una valida alternativa alla tripsina<sup>10</sup> che già dopo pochi minuti risulta maggiormente dannosa per la membrana cellulare [53]. Nonostante ciò, se i tempi di digestione dovessero essere troppo lunghi (>20 minuti) esiste il rischio concreto di intaccare la vitalità cellulare. Inoltre l'allungamento eccessivo dei tempi di digestione sarebbe negativo in vista dell'applicazione finale, se confrontato con i pochi minuti necessari per il distacco delle cellule dalle flask nelle colture standard. Per tal motivo si è deciso di utilizzare una concentrazione maggiore di collagenase 15 mg/ml. Nella prova di digestione enzimatica sono stati stabiliti e valutati i tempi di digestione dei pellets.

Il protocollo di prova impiegato è il seguente: la collagenasi di tipo I (Worthington, Biochemical Corporation, New Jersey) è stata diluita nel mezzo di coltura (senza siero).

Gruppi di 20 (piastra e Azoto<sub>90</sub>) e 35 pellets (Azoto<sub>50</sub>) sono stati posizionati all'interno di tubi Falcon e pesati a secco, prima della digestione nella soluzione con la collagenasi I, tramite una bilancia analitica a 5 cifre decimali (CPA225D, Sartorius, Italia; Figura 1.18).

---

<sup>9</sup> Collagenasi: Proteasi con specificità per il legame x-gly nella sequenza pro-x-gly-pro. Tale sequenza è presente con alta frequenza nel collagene.

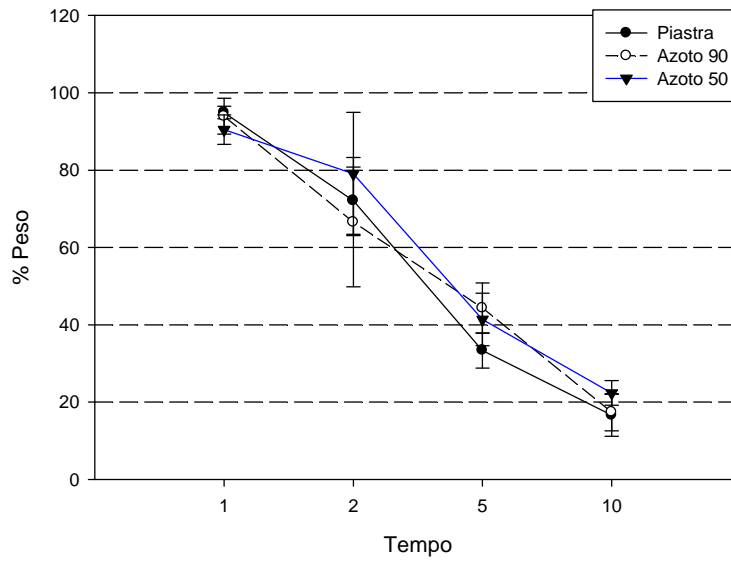
<sup>10</sup> Tripsina: Proteasi con specificità per legami peptidici che coinvolgono il gruppo carbossilico degli amminoacidi arg e lys.



**Figura 1. 18:** Bilancia analitica a 5 cifre decimali usata per la misura del peso dei pellets.

Successivamente i pellets sono stati immersi nella soluzione di collagenasi (sono stati aggiunti 0,2 ml di soluzione per ogni mg di pellet pesato). Per valutare il grado di digestione nel tempo per ogni gruppo di pellets, appartenente alla stessa tipologia, il trattamento è stato interrotto dopo precisi *time-point* (1, 2, 5 e 10 minuti): per ogni *time-point* e per ogni tipologia di pellet sono stati preparati tre tubi Falcon per diminuire le possibilità di errore. Una volta scaduto il tempo, la collagenasi I è stata inattivata con siero bovino e, una volta rimosso, i pellets rimasti sono stati sciacquati in acqua demineralizzata e Etanolo<sub>70%</sub>. I pellets sono stati essiccati e infine pesati.

Misurando il peso dei pellets a *time-point* prestabiliti è stato possibile valutare il diverso grado di digestione nel tempo. Il risultato è mostrato nel grafico seguente:



**Grafico 1. 10:** Perdita di peso nel tempo dei pellets sottoposti a digestione enzimatica.

Come si nota dal grafico la digestione è graduale nel tempo e dopo dieci minuti i pellets sono quasi del tutto degradati. In linea teorica, lasciare le cellule per dieci minuti immerse nella collagenasi (15mg/ml) non dovrebbe inficiarne la vitalità. Questo dato andrà verificato facendo una prova di digestione dei pellets seminati e valutando la vitalità delle cellule una volta recuperate.

## 1.7. Conclusioni

In questo capitolo sono state descritte le fasi di progettazione, sviluppo e caratterizzazione di una nuova tipologia di pellets di collagene. I pellets sono realizzati con collagene certificato EDQM (European Directorate for the Quality of Medicines & Healthcare) e presentano dimensioni dell'ordine del millimetro.

Al fine di sviluppare un processo produttivo industrializzabile sono state testate due metodiche differenti:

- Realizzazione in piastra multipozzetto.
- Realizzazione per gocciolamento in azoto liquido.

Dall'analisi dei processi di produzione è stato possibile delineare alcune caratteristiche che caratterizzano i pellets:

- I pellets presentano forme differenti: nel caso della produzione in piastra i pellets riproducono la forma datagli dalla struttura dei pozzetti; nel secondo caso invece sono caratterizzati da una forma appositamente sferica.
- La tecnica dell'azoto, anche se più complessa in fase di progettazione, permette di intervenire facilmente sui parametri di produzione permettendo di creare pellets di dimensioni differenti, per esempio variando il volume della goccia di soluzione o la temporizzazione del flusso d'aria. Nel caso della piastra, invece, i pellets sono legati alle dimensioni dei pozzetti e la realizzazione di pellets più grandi o più piccoli costringerebbe alla realizzazione di piastre differenti. Inoltre mentre il gocciolamento in azoto liquido non pone limiti sulla quantità di pellets realizzabili, nel caso della produzione in piastra la quantità è vincolata al numero di pozzetti. Per la realizzazione di un numero consistente di pellets è necessario produrre più piastre o ripetere più volte il processo. Il processo di gocciolamento non richiede alcun lavoro manuale, nell'altro caso, invece, se non si dispone di un dispensatore automatizzato, la dispensazione del collagene nei singoli pozzetti deve essere fatta a mano con l'utilizzo di un pipettatore. Come si può notare la produzione di pellets in azoto ha il vantaggio di essere una tecnica facilmente industrializzabile.

Vista la facilità con cui si può intervenire sui parametri di processo, attraverso la produzione in azoto sono state sviluppate due tipologie di pellets, differenti per il volume della sospensione di collagene dispensato.

Come determinato nelle specifiche di progetto, parte fondamentale per l'espansione cellulare è rappresentata dall'efficienza iniziale di semina. Per questo motivo i pellets sono stati progettati in maniera tale da avere dimensioni dell'ordine del millimetro. Aumentando la superficie disponibile per singolo pellets le cellule avranno, durante l'agitazione, una probabilità maggiore di impattare efficacemente con gli scaffold. Inoltre, durante la fase di coltura avranno a disposizione una superficie maggiore senza dover migrare da un pellet all'altro per raggiungere l'espansione massima [12].

I pellets ottenuti, come mostrato dall'analisi stereomicroscopica e dalle immagini al SEM hanno una struttura differente. Il motivo risiede probabilmente nella metodica di congelamento. Come dimostrato da O'Brien et al. [13] aumentando la velocità di congelamento, a parità di materiale le dimensioni dei pori diminuiscono. Infatti anche nel caso in oggetto le dimensioni dei pori dei pellets prodotti per gocciolamento in azoto liquido paiono mediamente inferiori. Per quanto riguarda i pellets realizzati in piastra però è stata riscontrata una duplice struttura superficiale. Come si vede dalle immagini SEM, i pellets differiscono per le dimensioni dei pori, dove però la struttura dei pellets più compatti è maggiormente simile a quella dei pellets prodotti in azoto.

Questo comportamento non è in linea con quanto riscontrato nelle prove di galleggiabilità. Infatti nonostante la bagnabilità sia stata migliorata attraverso il trattamento al plasma, le prove di galleggiabilità mostrano che i pellets compatti realizzati in piastra una volta immersi nel mezzo di coltura galleggiano in superficie, mentre le altre tipologie di pellets si depositano sul fondo. Questo risultato è riscontrabile anche dalla disomogeneità di colore dei pellets bagnati prodotti in piastra compatti. Probabilmente alcune parti del pellet non riescono ad assorbire il mezzo. In linea teorica, vista la simile struttura superficiale dei pellets compatti prodotti in piastra con quelli prodotti in azoto, ci si aspettava lo stesso comportamento a contatto con il mezzo di coltura.

Probabilmente la causa di questo risultato è da attribuire a una particolare struttura interna che differisce a seconda della metodica di produzione. Non potendo acquisire immagini dell'interno dei pellets senza comprometterne la struttura questo dato non è stato verificato.

Un'altra peculiarità riscontrata è il diverso grado di restringimento: al di là di quello dovuto alla fase di liofilizzazione riscontrato anche in letteratura [15, 52] e che si è mostrato costante tra le varie tipologie di pellets, quello dovuto al contatto con il mezzo di coltura mostra come entrambe le strutture (azoto e piastra) ne siano soggette in maniera differente:

- Restringimento pellets prodotti in piastra (compatti e porosi) = 30%
- Restringimento Azoto<sub>90</sub> = 69%
- Restringimento Azoto<sub>50</sub> = 74%

Altro parametro fondamentale, al fine di ottenere dei pellets per colture cellulari è dato dalla resistenza alla degradazione. Nel caso in oggetto, i pellets hanno dimostrato di poter resistere alla degradazione nel mezzo di coltura, a temperatura ambiente, fino a un anno di distanza dall'immersione. Ciò è in linea con la necessità di avere dei pellets che rimangano nel mezzo di coltura fino a tre settimane per permettere l'espansione delle cellule [46, 49].

Inoltre i pellets hanno dimostrato di supportare il trattamento di sterilizzazione scelto senza subire danneggiamenti strutturali. La scelta del trattamento termico di sterilizzazione è dovuta a due motivi fondamentali:.

- Semplicità e velocità di trattamento.
- Sicurezza del trattamento termico. Utilizzando, per esempio, l'ossido di etilene (EtO), se non efficacemente degasati i pellets potrebbero mantenere al loro interno particelle di EtO e di conseguenza risultare citotossici per le cellule.

Per colture cellulari in bioreattori, una volta espansi, le cellule necessitano di essere staccate dai pellets senza subire danneggiamenti. Per questo motivo è stato scelto di usare la collagenasi, un enzima che permette di digerire completamente i pellets e recuperare in questo modo le cellule. Avendo calcolato i tempi di digestione occorrerà poi eseguire un'ulteriore prova al termine dell'adesione delle cellule ai pellets al fine di verificare che le cellule non perdano la propria vitalità.



## 1.8. Appendice

### 1.8.1. Reticolazione del PDMS

Nella tabella sotto riportata sono indicati i tempi e le temperature necessari per la reticolazione del PDMS.

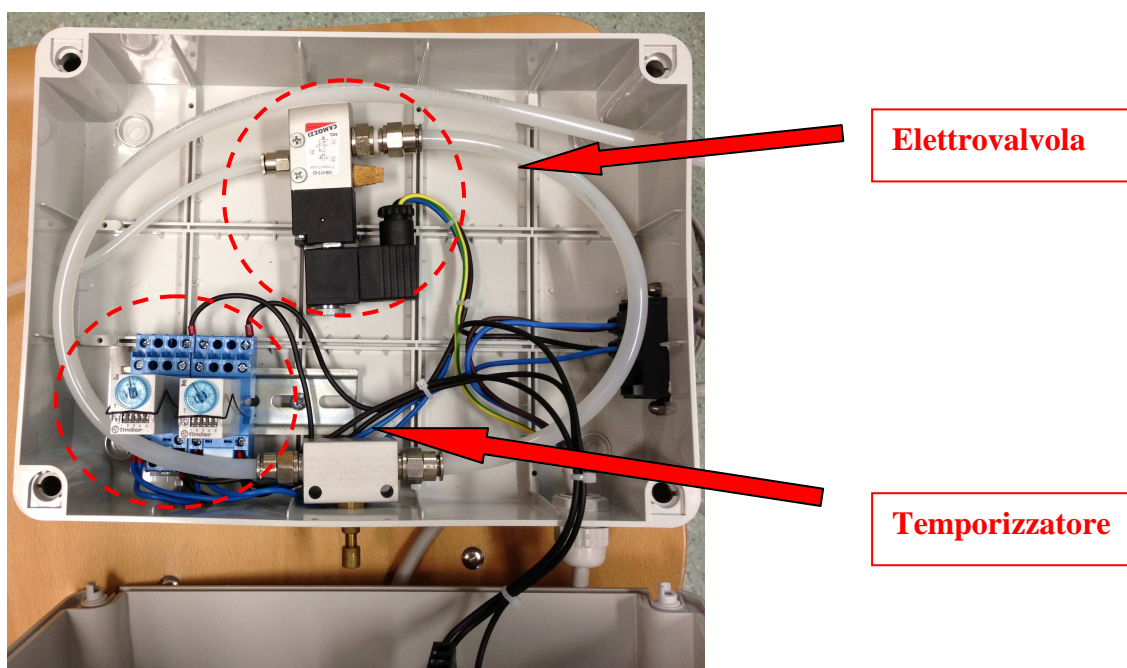
Tempo	Temperatura
48 ore	Temperatura ambiente
45 minuti	100°C (212°F)
20 minuti	125°C (257°F)
10 minuti	150°C (302°F)

**Tabella 1. 3:** Parametri di reticolazione del PDMS.

### 1.8.2. Elettrovalvola

L'elettrovalvola è stata appositamente progettata durante il lavoro di tesi per temporizzare il flusso d'aria diretto sulla soluzione di collagene.

Il temporizzatore, mostrato in figura, comanda l'apertura e la chiusura dell'elettrovalvola stessa; nel caso in oggetto è stato regolato per permettere il passaggio dell'aria ogni 10 secondi per una durata di 0,5 secondi.



**Figura 1. 19:** Elettrovalvola.

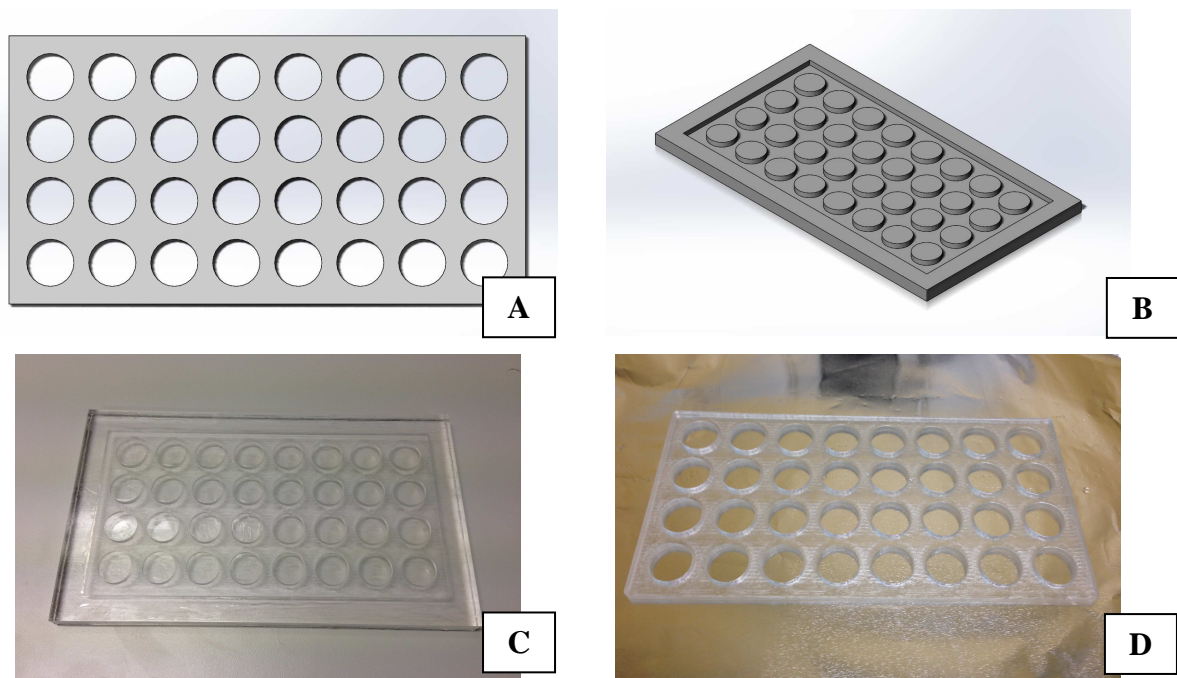
### 1.8.3. Scheda scaffold di collagene

In Figura 1.20 è mostrato un esempio della scheda per la registrazione dei dati di produzione.

Figura 1. 20: Scheda di produzione scaffold di collagene.

#### 1.8.4. Piastra in PDMS per la realizzazione di dischetti in collagene

Attraverso Solidworks (Dessault Systems) è stata disegnata una piastra (175mm x 91mm) con 32 pozzetti con una superficie interna per pozzetto pari a  $2,0 \text{ cm}^2$  (Figura 1.21, A). Successivamente, partendo dalle dimensioni stabilite, è stato disegnato il controstampo in cui colare il PDMS (Figura 1,21, B). Realizzato il disegno lo stampo è stato intagliato grazie ad una fresa per prototipazione rapida (“Modela”) presso il laboratorio di Micro e Biofluidodinamica Sperimentale del Politecnico di Milano (Figura 1.21, C). Il PDMS è stato poi colato all’interno dello stampo ed è stato lasciato reticolare per 45 minuti all’interno di una stufa impostata a  $100^\circ\text{C}$ . Trascorso questo tempo la piastra realizzata è mostrata in Figura 1.21, D:



**Figura 1. 21:** Fasi di produzione della piastra in PDMS per dischetti di collagene: A = disegno dello stampo; B = disegno della piastra; C = stampo; D = piastra in PDMS (175 mm x 91 mm).

# CAPITOLO II

## SVILUPPO DI UN PROTOCOLLO DI SEMINA CELLULARE DEI PELLETS IN COLLAGENE IN BIOREATTORE E ANALISI DELL'EFFICIENZA DI SEMINA

### 2.1. Introduzione

Come descritto nell'introduzione, i pellets sono supporti per l'espansione cellulare comunemente utilizzati in agitazione per la crescita in sospensione di cellule ancoraggio-dipendenti, [54, 55] che grazie all'elevato rapporto superficie volume permettono di trattare un alto numero di cellule in volumi ridotti. Inoltre Levine et al. [56] hanno dimostrato che le cellule possono essere espanse tramite pellets in maniera più efficiente rispetto alla coltura monostrato tradizionale riproducendo il comportamento cellulare *in-vivo* [1]. Per avere un'efficiente espansione cellulare, però, lo studio del protocollo e della dinamica di semina ha un'importanza cruciale.

Avendo sviluppato pellets non convenzionali e strutturalmente diversi da quelli mostrati in letteratura e volendo porre le basi per l'espansione cellulare, questa parte assume ancora più importanza. La semina cellulare deve permettere una distribuzione omogenea delle cellule sui pellets, inoltre deve garantire l'adesione delle cellule su tutti i pellets presenti in coltura. Questo perché, una volta aderite le cellule, fino a che non raggiungono la confluenza [12] non si staccano più dai pellets e l'aggiunta di altri pellets nella camera dopo la fase di semina non aumenta la superficie massima disponibile per l'espansione [37].

Per questi motivi, la prima parte del lavoro si proporrà di studiare ed analizzare un protocollo di semina efficace e di definire i parametri e i tempi per l'ottimizzazione del moto del bioreattore al fine di migliorare l'efficienza di semina sui pellets. Verranno analizzate tre diverse dinamiche di agitazione del bioreattore e verrà introdotta una caratteristica ampiamente utilizzata in letteratura per migliorare l'efficienza di semina [57]: l'alternanza di momenti di moto e di pausa durante l'agitazione.

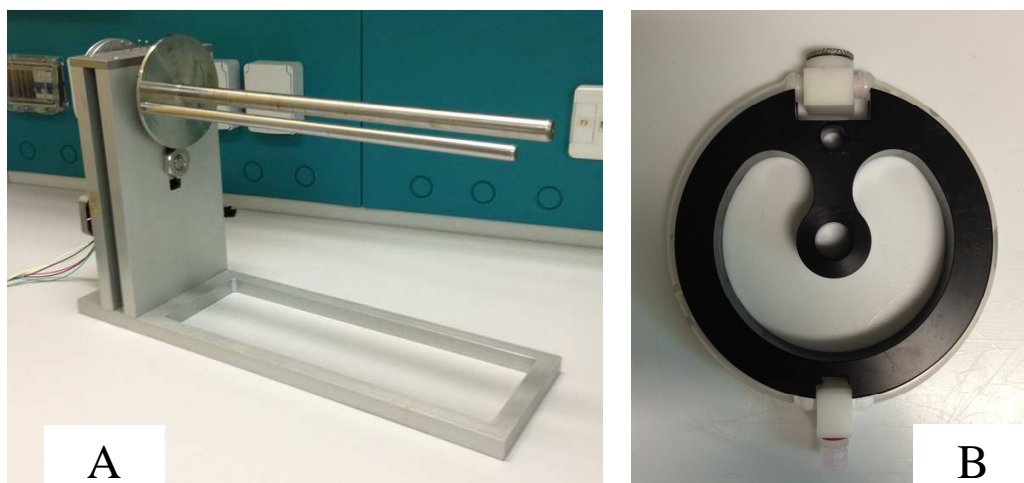
I pellets seminati verranno analizzati tramite saggio CyQuant al fine di determinare l'efficienza di semina su pellets.

Nella seconda parte capitolo del lavoro invece verrà effettuata un'analisi comparativa delle varie tipologie di pellets prodotte, al fine di definire il pellet che garantisca un'efficienza di semina maggiore senza inficiare la vitalità cellulare. Le cellule verranno trattate e seminate secondo il protocollo di semina definito precedentemente mantenendo fissi tutti i parametri e variando solo la tipologia di pellets tra una condizione e l'altra. I pellets verranno analizzati tramite saggio CyQuant per stabilire il numero di cellule aderite.

Inoltre, avendo riscontrato per i pellets prodotti in piastra un duplice comportamento, le due tipologie saranno considerate separatamente per valutare gli effetti del galleggiamento sull'efficienza di semina.

Al termine della prova di semina i pellets verranno sottoposti a digestione enzimatica tramite collagenasi di tipo I. Successivamente verrà valutata la vitalità delle cellule e la capacità di adesione e proliferazione, al fine di verificare che il trattamento di digestione non risulti dannoso per le cellule.

La versione del bioreattore a perfusione oscillante OPB utilizzata per lo svolgimento di questo lavoro è un prototipo attualmente presente presso il Laboratorio di Ingegneria Cellulare e Tessutale dell'Istituto Ortopedico Galeazzi di Milano. Questa versione del bioreattore, denominata OPB IV (Figura 2.1, A), permette di raggiungere velocità maggiori rispetto ai precedenti modelli. Questo motore ha una riduzione integrata di 1:36 e un'ulteriore riduzione della trasmissione di 1:7, per una riduzione totale di 1:252. Le altre versioni di OPB hanno invece una riduzione totale maggiore, 1:866 (riduzione 1:100 integrata al motore + riduzione 1:8,66 dovuta alla trasmissione). Le camere di coltura sono state adattate per essere utilizzate con i pellets (Figura 2.1, B).



**Figura 2. 1:** Immagine dell'OPB IV (A) e della camera di coltura adattata (B).

Le camere sono montate su un supporto specifico per il bioreattore in uso e sono composte da tubi Tygon (Saint-Gobain), da un connettore in Delrin (polioossimetilene) con ghiera d'acciaio e vetrino circolare per l'inserimento dei pellets e da un connettore luer sempre in Delrin.

Le camere dell'OPB presentano un moto rotatorio relativo rispetto al mezzo di coltura inducendo in questo modo un flusso all'interno delle camere stesse.

Come già spiegato questo particolare bioreattore permette velocità maggiori rispetto alle altre tipologie ma la velocità massima che può essere impostata è di  $10000\mu\text{m/s}$ . In questo modo possiamo avere un'efficace rimescolamento dei pellets all'interno delle camere.

Inoltre potendo impostare protocolli di moto differenti è possibile implementare un altro protocollo molto utilizzato in letteratura, che prevede di alternare momenti di agitazione con momenti di pausa durante la semina [7, 18, 33, 43, 46, 57]. Ciò garantirebbe alle cellule di poter aderire più efficacemente ai pellets. In letteratura buona parte dei lavori impostano un movimento a intermittenza con momenti di pausa elevati, per esempio 2 minuti di moto e 30 minuti di pausa [57] o 2 minuti di moto e 20 minuti di pausa [58]. Questo protocollo però non si adatta a questo lavoro. Volendo utilizzare cellule di linea MG63 che garantiscono un comportamento altamente riproducibile e possiedono elevate proprietà di adesione ai substrati, il rischio è quello di distribuire non omogeneamente le cellule sui pellets andando ad interessare solo i pellets posti superiormente durante la pausa. Così per queste prove è stato ritenuto opportuno non superare i dieci minuti di pausa.

## 2.2. Ottimizzazione del protocollo di semina

### 2.2.1. Introduzione

Il primo passo verso la coltura di cellule in un ambiente tridimensionale è lo studio del processo e dei parametri di semina. La semina determina il numero iniziale e la distribuzione spaziale delle cellule aderite e pone le basi per la futura espansione cellulare sui pellets.

Pertanto in questo paragrafo verranno mostrate 3 prove, condotte con l'obiettivo di massimizzare l'efficienza di semina sui pellets, definire un protocollo di semina definitivo da utilizzare durante le successive prove di espansione cellulare e ottimizzare il recupero cellulare totale.

### 2.2.2. Materiali e metodi

**Cellule:** Per questa sperimentazione sono state utilizzate cellule di linea MG63 (Human osteosarcoma cell line). Le cellule sono state conservate all'interno di fiale immerse nell'azoto liquido. Prima di ogni prova sono state espanse secondo la procedura standard, tramite T-Flask, al fine di ottenere il numero di cellule necessario per la prova. In condizioni di coltura standard le cellule vengono seminate sulle T-Flask a una densità di semina di 10000 cellule/cm<sup>2</sup>. Una volta a confluenza le cellule sono state staccate con tripsina 0.05% in attesa di essere iniettate nelle camere di coltura.

Vista la dinamica dell'esperimento, l'adesione cellulare ai pellets è un fenomeno probabilistico ed il numero di cellule per pellet può variare [37]. Come conseguenza potremo avere pellets senza cellule; è necessario quindi che il numero di cellule all'interno della camera sia tale da garantire l'adesione al maggior numero possibile di pellets.

Per questo motivo la densità di semina iniziale nelle camere è stata aumentata rispetto a quella delle colture standard statiche in T-Flask ed è stata portata a 66000 cellule/cm<sup>2</sup>, con una densità di cellule per camera pari a  $2 \times 10^5$  cellule/mL (con 10mL totali di mezzo di coltura per camera).

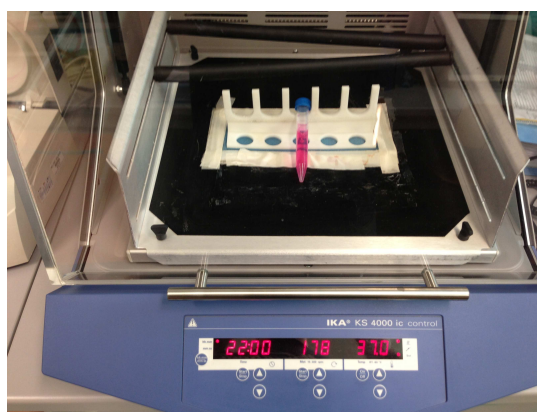
**Pellets:** Per l'ottimizzazione del processo di semina è stato utilizzato un unico tipo di pellets, in particolare quelli prodotti in piastra (Figura 2.2).

La scelta è ricaduta su questi pellets perché, presentando un duplice comportamento a contatto con il mezzo di coltura, sono considerati il caso più critico. I pellets prima di ogni prova sono stati trattati con plasma ad aria per 4,5 minuti (come indicato nel Capitolo I). Subito dopo il trattamento sono stati idratati per circa 12 ore nel mezzo di coltura



**Figura 2. 2:** Pellets prodotti in piastra.

(DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium, Invitrogen, Life Technologies, Italia) a 37°C all'interno di un tubo Falcon (BD Biosciences, New Jersey) in lieve agitazione. In Figura 2.3 è mostrato un esempio dell'apparato (KS 4000 ic control, IKA, Cina).



**Figura 2. 3:** Sistema di agitazione dei pellets.

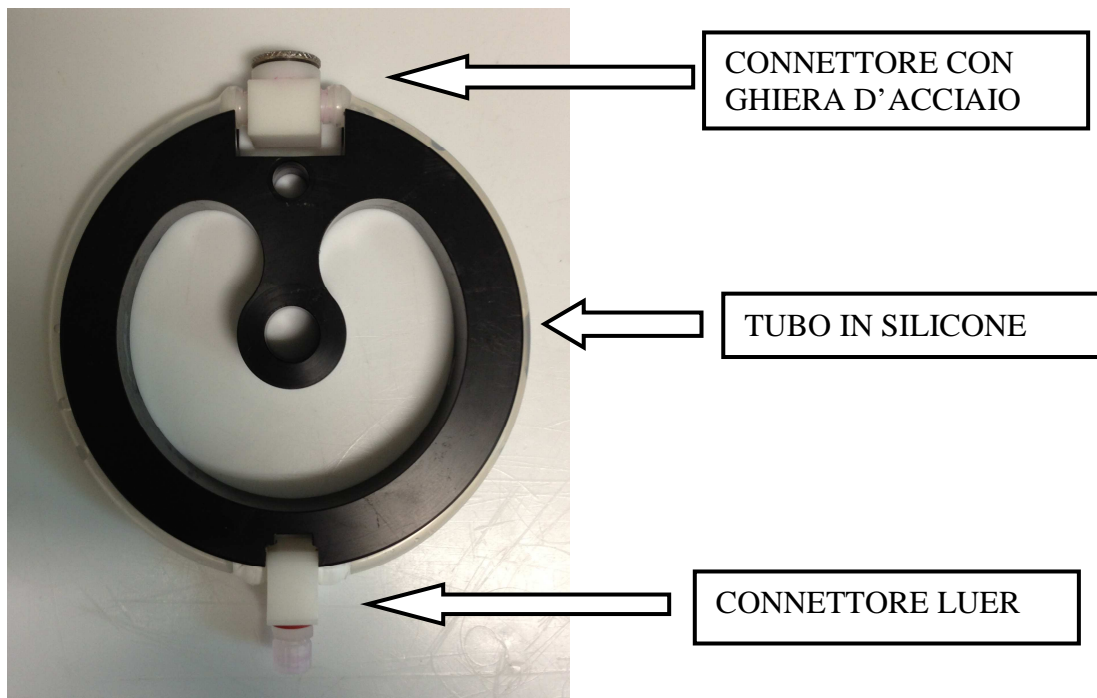
Il numero di pellets da inserire all'interno di ogni camera è stato calcolato partendo dalla densità di semina e dal numero totale di cellule per camera, precedentemente definiti. In particolare calcolando la superficie esterna necessaria per l'adesione (0,20 cm<sup>2</sup> per pellet) è stato possibile calcolare il numero di pellets secondo la formula seguente:

$$N_{Pellets} = \frac{NUMERO\ di\ CELLULE\ per\ CAMERA}{DENSITA'\ di\ SEMINA * SUPERFICIE\ PELLET}$$

Sostituendo i dati nella formula (numero di cellule per camera = 2x10<sup>6</sup>; densità di semina = 66000 cellule/cm<sup>2</sup>) otteniamo che il numero di pellets necessari per questa prova è 150.



**Preparazione camere:** Le camere sono composte da due tubi in silicone (Tygon) e da un connettore in Delrin (polioossimetilene) con ghiera d'acciaio e vetrino circolare per l'inserimento dei pellets e da un connettore luer sempre in Delrin (Figura 2.4).



**Figura 2. 4:** Camera di coltura usata per le prove di semina.

Prima delle prove di semina i componenti sono stati lavati nel bagno a ultrasuoni, a 60 °C per 15 minuti. Il bagno a ultrasuoni genera vibrazioni meccaniche amplificate sfruttando una corrente elettrica ad elevata frequenza prodotta da un generatore. Gli ultrasuoni vengono quindi trasmessi alla vasca contenente acqua e un apposito detergente. La cavitazione sonora è l'effetto energetico che viene sfruttato per effettuare la pulizia. Trascorsi i 15 minuti i vari componenti sono stati sciacquati con acqua demineralizzata e sono stati lasciati ad asciugare all'aria. A questo punto le camere essere sono state assemblate e sterilizzate in autoclave a 121°C per 20 minuti. Nel caso seguente sono state utilizzate:

- Prova n. 1: 2 camere.
- Prova n. 2: 3 camere.
- Prova n. 3: 2 camere.

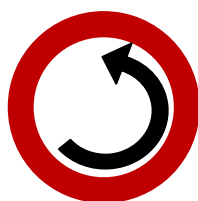
**Dinamica del bioreattore OPB:** Al fine di definire le caratteristiche di semina ottimali, la velocità e la dinamica del bioreattore sono state individuate come due delle variabili che maggiormente possono influenzare l'efficienza di semina dei pellets. Per questo motivo sono state testate 3 diverse configurazioni:

- Prova n. 1: Per la prima è stata impostata una velocità tangenziale a  $1000\mu\text{m/s}$  con andamento oscillante (angolo di  $270^\circ$ ).



**Figura 2. 5:** Dinamica di agitazione oscillante.

- Prova n. 2: Nella seconda prova è stata aumentata la velocità a  $2000\mu\text{m/s}$  ed è stato impostato un andamento non oscillante per permettere un rimescolamento migliore dei pellets all'interno della camera.



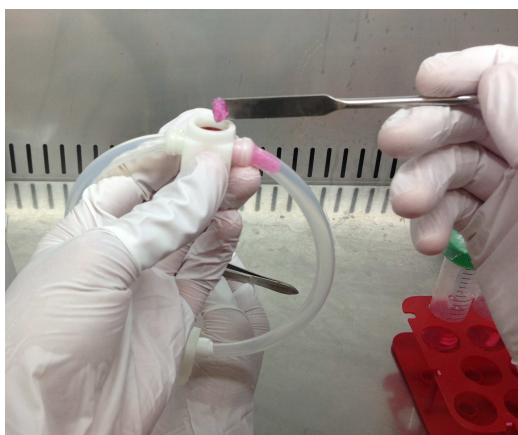
**Figura 2. 6:** Dinamica di agitazione non-oscillante.

Inoltre da un'analisi della letteratura è emersa la necessità di un andamento ad intermittenza in grado di migliorare l'adesione delle cellule ai pellets. La dinamica del bioreattore in questa prova ha quindi previsto 10 minuti di movimento e 10 minuti di pausa.

- Prova n. 3: Nella terza prova è stata impostata una velocità tangenziale di  $10000\mu\text{m/s}$  mantenendo l'andamento non oscillante a intermittenza sopra indicato.

Durante la prova il bioreattore è stato posizionato all'interno di un incubatore a  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  e umidità relativa al 95%.

**Protocollo di semina:** Al termine del pre-trattamento (12 ore) nel mezzo di coltura i pellets sono stati disposti all'interno delle camere attraverso il connettore con la ghiera d'acciaio nel modo mostrato in Figura 2.7: i pellets sono stati filtrati dal mezzo di coltura attraverso un Cell Strainer (BD Biosciences, New Jersey) e tramite una spatola sono stati inseriti all'interno delle camere di coltura.



**Figura 2. 7:** Metodica di riempimento delle camere di coltura con i pellets.

Successivamente sono stati aggiunti 5 mL di mezzo di coltura (DMEM low glucose, 10% FBS, 1% PSG) per mantenere i pellets idratati. Terminata la preparazione di tutte le camere sono state preparate le sospensioni cellulari da seminare nel bioreattore. Le cellule sono state staccate dalle T-Flask seguendo la procedura standard. Al termine della conta tramite camera Burker le cellule sono state risospese ad una concentrazione di  $4 \times 10^5$  cellule/mL. Sono stati quindi prelevati 5mL di sospensione cellulare con un pipettatore e iniettati attraverso l'apposito connettore con la ghiera d'acciaio. Inserendo nelle camere 10mL (5mL + 5mL) di mezzo di coltura la camera non viene riempita. In questo modo si assicura la presenza di una bolla d'aria che garantisce il movimento del mezzo all'interno della camera. Durante l'inoculazione delle cellule nelle camere è stata presa un'aliquota di riferimento, sempre di 5 ml, per verificare che la quantità di cellule inoculate fosse effettivamente pari a  $2 \times 10^6$  e per calcolare, nelle fasi successive, la percentuale di cellule effettivamente aderite ai pellets rispetto alla quantità iniziale.

Una volta che la sospensione è stata inoculata, le ghiera vengono chiuse ermeticamente e le camere sono subito messe in rotazione nel bioreattore posto in incubatore, a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> e saturazione di vapore.

Tutte le prove di semina hanno una durata di 24h. Il tempo non è casuale, ma tiene conto dei tempi di proliferazione delle cellule utilizzate. Volendo valutare in questo caso l'adesione delle cellule senza effetti confondenti dovuti alla proliferazione e sapendo che le cellule di linea MG63 effettuano mediamente il primo *doubling* entro circa 30 ore, si è deciso di verificare l'efficienza di semina ad un tempo inferiore a quel preciso *time point*.

**Recupero cellulare:** Durante lo svolgimento della tesi è stata definita una precisa procedura per il recupero delle cellule da analizzare.

Trascorso il tempo previsto la prima camera è stata tolta dal bioreattore lasciando lo stesso sempre in rotazione all'interno dell'incubatore.

Per prima cosa si svuota la camera all'interno di un tubo Falcon sterile provvista di Cell Strainer per il recupero dei pellets. In questo modo avremo all'interno del tubo Falcon il mezzo di coltura mentre nel Cell Strainer avremo i pellets seminati (Figura 2.8).



**Figura 2. 8:** Falcon + Cell Strainer per il recupero dei pellets.

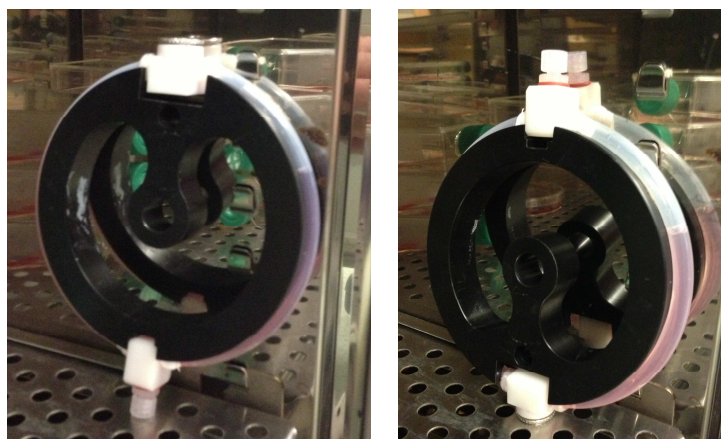
Successivamente per recuperare eventuali pellets rimasti nella camera si effettua un risciacquo con PBS (Phosphate buffered saline). Seguendo la stessa procedura descritta in precedenza il PBS viene fatto defluire in un tubo Falcon sterile provvisto di Cell Strainer per il recupero dei pellets. I pellets recuperati vengono accorpati a quelli recuperati in precedenza mentre il PBS viene scartato. Nella terza prova però, dopo aver visto i risultati delle prime due in cui il recupero finale di cellule era di molto inferiore ai  $2 \times 10^6$  iniziali si è deciso di non buttare il PBS e di aggiungerlo al mezzo di coltura raccolto. Questo permette

di recuperare eventuali cellule rimaste nel PBS.

Al termine di questi passaggi la camera viene tripsinizzata per valutare la quantità di cellule aderite alla stessa. Alla camera vengono aggiunti 8 mL di tripsina per circa 20 minuti, come mostrato in Figura 2.9, al termine dei quali il suo contenuto viene raccolto all'interno di un nuovo tubo Falcon.

Le sospensioni cellulari (mezzo di coltura e tripsina) all'interno dei tubi Falcon sono state centrifugate ed è stato eliminato il surnatante. Successivamente le cellule, recuperate dalla tripsinizzazione della camera di coltura e dal mezzo di coltura, e i pellets di collagene sono stati congelati in attesa delle analisi successive.

10 minuti 10 minuti



**Figura 2. 9:** Tripsinizzazione delle camere di coltura.

Al termine di queste operazioni è possibile quindi quantificare:

- Il numero di cellule aderite ai pellets.
- Il numero di cellule rimaste in sospensione nel mezzo di coltura.
- Il numero di cellule aderite alla camera di coltura.

L'efficienza di semina sui pellets verrà quindi calcolata attraverso la formula seguente:

$$EFFICIENZA \text{ di SEMINA} = \frac{n. \text{ di CELLULE ADERITE ai PELLETS}}{n. \text{ di CELLULE TOT}}$$

### **Tecniche di analisi:**

#### **Analisi quantitativa del numero cellulare: saggio CyQuant**

Al fine di avere una conta precisa e accurata del numero di cellule nei tre contributi (pellets, camera, mezzo), è stato utilizzato questo particolare saggio che permette di stimare il numero di cellule tramite quantificazione del DNA presente in una soluzione. Il saggio CyQuant (Invitrogen Corporation) è un saggio spettrofotometrico che grazie ad una sonda fluorescente riesce a legare in maniera specifica gli acidi nucleici presenti all'interno della cellula. La quantità di DNA presente in ogni singola cellula è costante, perciò, quantificando la quantità di DNA presente nella soluzione analizzata, è possibile risalire al numero totale di cellule. Prima della misura tramite spettrofluorimetro (Victor X3-PerkinElmer) è stato necessario lisare le membrane cellulari per poter estrarre il DNA. Nel caso specifico è stata utilizzata la proteinasi K, un enzima in grado di digerire la cheratina

e lasciare intatto il DNA. La proteinasi K scioglie inoltre anche il collagene, questo permette di non dover staccare le cellule dai pellets prima della misura.

Il kit di analisi è composto dai seguenti reagenti:

- *CyQuant GR dye* (componente A);
- *cell-lysis buffer* (componente B);

Nel caso specifico, per la digestione, a ogni campione (cellule o pellets di collagene) sono stati aggiunti 250  $\mu$ l (per le cellule aderite alla camera di coltura e per le cellule sospese nel mezzo) o 500  $\mu$ l (per i pellets di collagene) di soluzione costituita da proteinasi K. I campioni immersi in soluzione sono stati agitati mediante un Vortex (VELP scientifica, Usmate, Italy), in modo da favorire la rottura delle membrane cellulari, e in seguito posti in un termoaggitatore a 56 °C per 16 ore, per permettere all'enzima di raggiungere la sua massima attività. Considerando letture in triplicato, per ogni campione sono stati preparati 600  $\mu$ l di soluzione di lavoro costituita da una sonda intercalante il DNA (componente A, 400X) e da un lisante cellulare (componente B, 20X) diluiti in un opportuno volume di acqua bi-distillata sterile (H<sub>2</sub>O RNA-ase e DNA-ase free, GIBCO). Per la lettura in fluorescenza, in questo caso alla lunghezza d'onda di 520 nm, è necessario utilizzare 200  $\mu$ L della soluzione da analizzare, ponendoli in una piastra multipozzetto a 96 pozzetti a fondo nero. La soluzione da analizzare è ottenuta miscelando 5  $\mu$ l di sospensione prelevata dai campioni lisati con 195  $\mu$ l della soluzione di lavoro.

### **Analisi qualitativa della distribuzione di cellule vive e morte sui pellets: saggio LIVE/DEAD**

Il saggio LIVE/DEAD (Invitrogen Corporation, Isbad, CA, USA) è un saggio in fluorescenza che permette di definire le presenza e la distribuzione delle cellule vive e di quelle morte utilizzando due sonde molecolari che misurano parametri caratteristici della vitalità cellulare. Le cellule vive, che verranno mostrate in verde, sono marcate grazie all'enzima esterasi, presente solo nelle cellule vitali, che converte la calceina AM non fluorescente in calceina ad intensa fluorescenza verde ( $\lambda_{eccitazione}$ = 495 nm,  $\lambda_{emissione}$ = 515 nm). Le cellule morte sono invece marcate dall'etidio omodimero 1 (EthD-1) che, riuscendo a penetrare nella cellula attraverso la membrana danneggiata, subisce un aumento di fluorescenza di 40 volte legandosi agli acidi nucleici emettendo nel rosso ( $\lambda_{eccitazione}$ = 528 nm,  $\lambda_{emissione}$ = 617 nm). Per eseguire questo saggio è necessario preparare una specifica soluzione di lavoro. La soluzione è stata ottenuta diluendo l'EthD-1 (componente B

del kit) in PBS sterile secondo una diluizione 500X (in questo modo si ottiene una concentrazione di 4  $\mu$ M, partendo dallo *stock* 2 mM conservato in DMSO/H<sub>2</sub>O 1:4 (v/v)). Alla soluzione così ottenuta va aggiunta la calceina AM (componente A). La calceina va diluita 2000 volte, in modo da ottenere una concentrazione di 2  $\mu$ M, partendo dallo *stock* 4 mM, conservato in DMSO anidro. La concentrazione finale di DMSO è <0.1%, un livello generalmente innocuo per la maggior parte delle cellule.

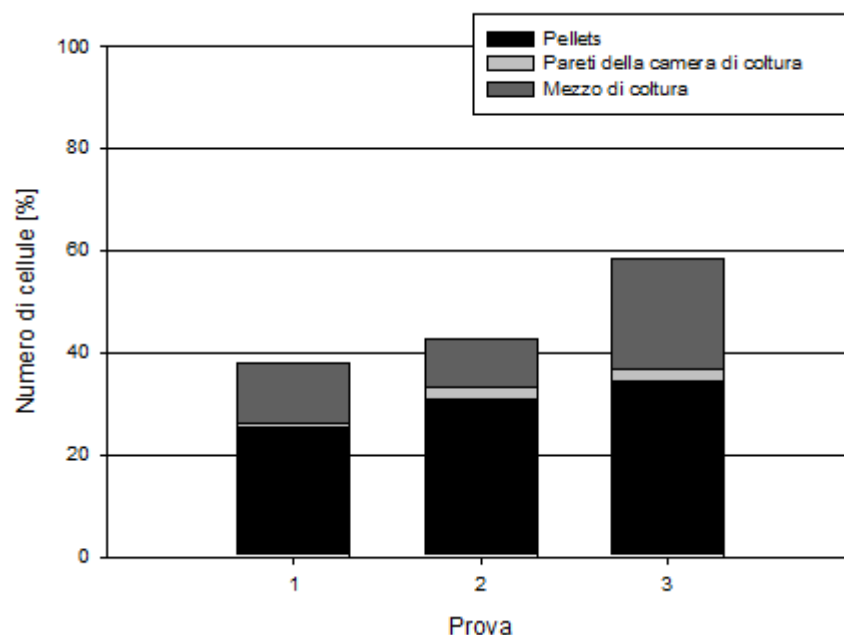
La quantità di soluzione da mettere in ogni pozzetto deve essere sufficiente a coprire interamente il campione. Nel caso specifico, volendo analizzare 2 pellets scelti in maniera casuale dalla camera di coltura, è bastato 1 ml di soluzione LIVE/DEAD per poterli coprire in una piastra multipozzetto da 24. Una volta sciacquati in PBS, i campioni sono stati immersi nella soluzione. Dopo quaranta minuti di incubazione al buio a 37°C, i campioni sono stati lavati con PBS per eliminare l'EthD-1 in eccesso che non ha reagito. I campioni sono quindi stati analizzati con il microscopio a fluorescenza utilizzando il filtro ottico FITC ( $\lambda_{eccitazione}=470-490\text{nm}$ ,  $\lambda_{emissione}>520\text{nm}$ ) per visualizzare le cellule vive in verde, e il TRITC ( $\lambda_{eccitazione}=530-550\text{ nm}$ ,  $\lambda_{emissione} = 600-640\text{nm}$ ) per eccitare il *marker* EthD-1 in quelle morte, che fluoresce nel rosso. Per ogni campione sono state acquisite immagini LIVE e immagini DEAD. Le immagini LIVE e DEAD corrispondenti vengono realizzate sovrapponendo il canale del verde e il canale del rosso mediante un apposito software di *imaging* (ImageJ, National Institutes of Health, USA). Questo particolare saggio è stato utilizzato nella terza prova per valutare visivamente la presenza di cellule vive e morte.

### **Analisi qualitativa della distribuzione cellulare sui pellet: saggio MTT**

L'acronimo MTT indica il composto bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio ed è un saggio colorimetrico standard per la misurazione dell'attività degli enzimi che riducono tetrazolio a formazano, conferendo alla sostanza un colore blu/violaceo. Il saggio MTT (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA) permette di stimare la vitalità cellulare in quanto l'enzima mitocondriale succinato deidrogenasi è attivo soltanto nelle cellule vive. La soluzione madre di MTT viene preparata sciogliendo la polvere di MTT in DMEM senza rosso fenolo ad una concentrazione di 5 mg/ml. La soluzione è quindi filtrata e stoccata a -20 °C in aliquote da 1 ml. Per la *working solution* si diluisce la soluzione madre in DMEM senza rosso fenolo in rapporto 1:10, per avere una concentrazione finale di 0.5 mg/ml. In questo lavoro tale saggio è stato utilizzato in modo qualitativo nella prova n. 3 per valutare la distribuzione delle cellule sui pellets. In







**Grafico 2. 1:** Numero di cellule in % recuperato al termine della prova di semina rispetto all' aliquota di riferimento. Prova n.1 ( $n=2$ ): % di cellule aderite ai pellets =  $25,23 \pm 9,46$  %; % di cellule aderite alla camera =  $0,79 \pm 0,32$  %; % di cellule in sospensione nel mezzo di coltura =  $12,10 \pm 5,62$  %. Prova n.2 ( $n=3$ ): % di cellule aderite ai pellets =  $30,80 \pm 6,66$  %; % di cellule aderite alla camera =  $2,65 \pm 3,17$  %; % di cellule in sospensione nel mezzo di coltura =  $9,33 \pm 7,71$  %. Prova n.3 ( $n=2$ ): % di cellule aderite ai pellets =  $34,30 \pm 11,27$  %; % di cellule aderite alla camera =  $2,62 \pm 1,46$  %; % di cellule in sospensione nel mezzo di coltura =  $21,38 \pm 11,95$  %.

Ad un primo sguardo si nota subito come in tutte le prove non si riesca ad ottenere un recupero cellulare totale pari al 100% ( $2 \times 10^6$  cellule). Rispetto alle prime due prove, però, si nota un lieve miglioramento dovuto alla conservazione del PBS dopo il risciacquo delle camere. La rimanente parte di cellule probabilmente si è persa a causa dei vari passaggi, subiti dalle cellule, tra i tubi Falcon e i pipettatori durante il recupero.

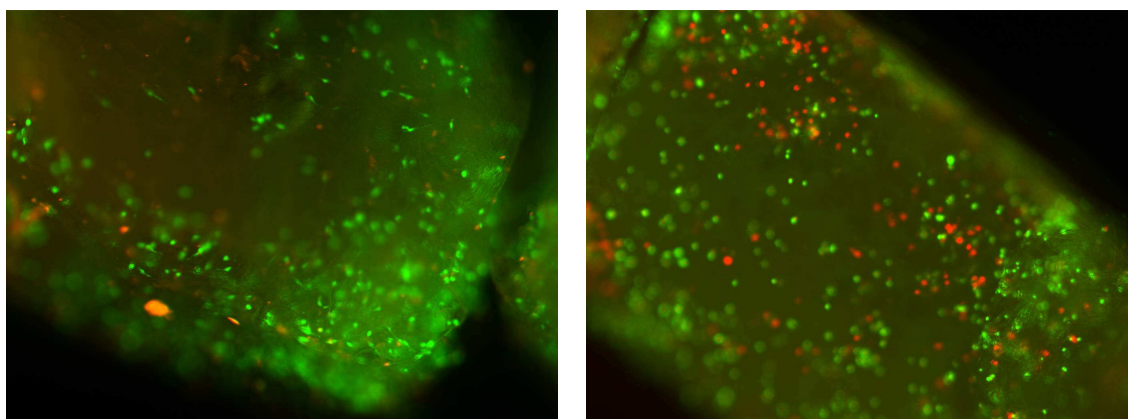
Per quanto riguarda i singoli contributi, invece, la quantità di cellule aderite alle pareti della camera in tutti e tre i casi non supera il 3% mentre la maggior parte delle cellule è aderita ai pellets, suggerendo che le cellule riconoscono nei pellets di collagene un supporto ottimale per l'adesione. Valutando le singole prove, differenti per modalità di semina dinamica nel bioreattore, notiamo inoltre che cambiando la dinamica di agitazione (oscillante  $\rightarrow$  non-oscillante) ed introducendo la pausa nel protocollo, l'efficienza di semina su pellets aumenta del 5,57%: da 25,23% (prova n. 1) a 30,80% (prova n. 2).

Aumentando la velocità di rotazione da 2000 $\mu\text{m/s}$  (prova n. 2) a 10000  $\mu\text{m/s}$  (prova n. 3), invece, l'efficienza di semina aumenta del 3,5%: da 30,8% a 34,3%. L'utilità della pausa risiede nella possibilità di dare alle cellule il tempo per depositarsi sui pellets. L'aumento di velocità garantisce invece un rimescolamento maggiore della soluzione, permettendo così a tutti i pellets di impattare con le cellule ed aumentando in questo modo l'efficienza di semina complessiva.

Inoltre, come si può vedere, una parte consistente delle cellule rimane in sospensione nel mezzo di coltura probabilmente per il mancato impatto con i pellets.

### Saggio LIVE/DEAD

Il saggio è stato condotto in seguito alla prova n. 3: velocità di rotazione di 10000 $\mu\text{m/s}$  con andamento non oscillante a intermittenza. Dalle immagini LIVE/DEAD possiamo valutare la distribuzione delle cellule sui pellets e stimare qualitativamente la presenza di cellule vive (in verde) e morte (in rosso):

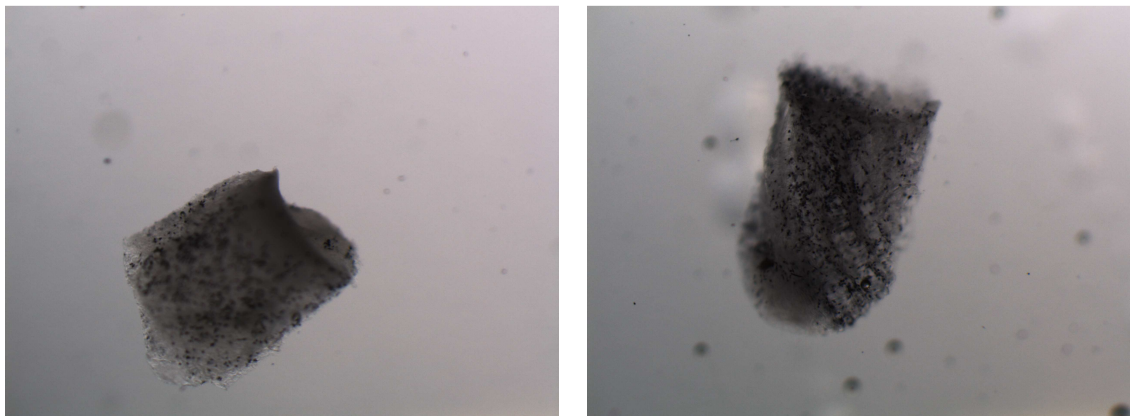


**Figura 2. 11:** Immagini LIVE/DEAD dei pellets prodotti in piastra della prova 3.

Come si può notare su entrambi i pellets le cellule appaiono per la quasi totalità vitali e visivamente il numero di cellule vive è nettamente superiore a quelle morte. Ciò sta a significare che l'impatto e l'adesione sui pellets in collagene non vanno ad inficiare la vitalità delle cellule garantendo un ambiente ideale per l'adesione.

### Saggio MTT

Anche in questo caso il saggio è stato condotto sulla prova n. 3: velocità di rotazione di  $10000\mu\text{m/s}$  con andamento non oscillante a intermittenza. Tramite saggio MTT possiamo vedere la distribuzione delle cellule sul singolo pellet:



**Figura 2. 12:** Immagini MTT dei pellets prodotti in piastra della prova 3.

Dalla immagini sembra che le cellule si siano distribuite uniformemente tra i pellets. Ciò dimostra che il numero di cellule iniettate ( $66000\text{ cellule/cm}^2$ ) permette una distribuzione omogenea delle cellule tra i pellets. Questo permetterà, durante la fase di espansione, di sfruttare tutta la superficie disponibile.

#### 2.2.4. Conclusioni

L'obiettivo del presente studio è stato quello di ottimizzare il protocollo di semina e i parametri di processo del bioreattore OPB. Risultato chiave, indice dell'efficacia degli studi effettuati, è stata l'efficienza di semina sui pellets. Come si può notare aumentando la velocità di rotazione del bioreattore e alternando la rotazione con momenti di pausa, rispetto alla prima prova l'efficienza di semina è aumentata complessivamente del 10%. Cambiando la dinamica di agitazione (oscillante  $\rightarrow$  non-oscillante) ed introducendo la pausa nel protocollo, l'efficienza di semina su pellets è aumentata del 5,57%: da 25,23% (prova n. 1) a 30,80% (prova n. 2). Aumentando la velocità di rotazione da  $2000\mu\text{m/s}$  (prova n. 2) a  $10000\mu\text{m/s}$  (prova n. 3), invece, l'efficienza di semina è aumentata del 3,5%: da 30,8% a 34,3%. L'utilità della pausa risiede nella possibilità di dare alle cellule il tempo per depositarsi sui pellets. L'aumento di velocità garantisce invece un

rimescolamento maggiore della soluzione, permettendo così a tutti i pellets di entrare in contatto con le cellule ed aumentando in questo modo l'efficienza di semina complessiva.

Seppur non riuscendo a recuperare la totalità delle cellule iniettate, nella terza prova il recupero cellulare totale è stato migliorato arrivando a circa il 60%. Il recupero del PBS usato per il risciacquo ha permesso di diminuire le perdite. In linea teorica le cellule mancanti sono da distribuire tra i tre contributi. Infatti, a causa dei vari trattamenti subiti, durante la fase di recupero parte delle cellule rimaste in sospensione potrebbe non essere stata recuperata e rimasta nei tubi Falcon o nei pipettatori; per quanto riguarda le cellule aderite ai pellets, parte delle cellule aderite potrebbe essersi staccata durante lo svuotamento delle camere; mentre per le cellule aderite alle camere il trattamento in tripsina potrebbe non aver staccato la totalità delle cellule.

Le immagini LIVE/DEAD e MTT mostrano un'omogenea distribuzione delle cellule sulle superfici dei pellets con una predominanza delle cellule vive. Questo significa che la densità di semina iniziale ( $66000 \text{ cellule/cm}^2$ ) e il numero di pellets calcolato permettono alle cellule di impattare efficacemente con i pellets.

Per riassumere, il protocollo di semina definito in questo paragrafo e che verrà utilizzato nelle fasi successive è il seguente:

- Densità di cellule per camera:  $2 \times 10^5$  cellule/mL
- Densità di semina:  $66000 \text{ cellule/cm}^2$
- Quantità di mezzo di coltura: 10mL
- Dinamica del bioreattore OPB: Moto non-oscillante a intermittenza (10 minuti di pausa + 10 minuti di moto)
- Velocità di rotazione:  $10000 \mu\text{m/s}$

## 2.3. Confronto tra le tipologie di pellets realizzate

### 2.3.1. Introduzione

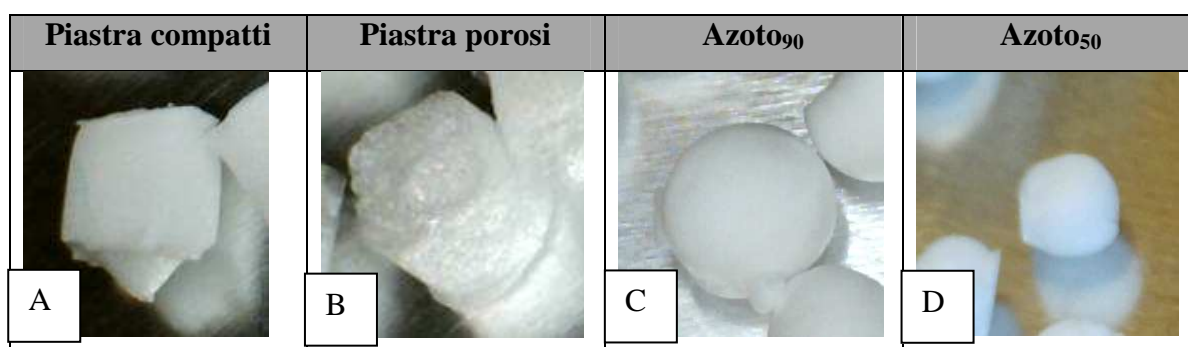
Come già mostrato nel Capitolo I, in questo lavoro di tesi sono state sviluppate diverse tipologie di pellets per dimensioni e struttura. Avendo già valutato i parametri di processo del bioreattore e avendo definito un protocollo di semina efficace l'obiettivo della prova seguente è quello di valutare l'efficienza di semina dei vari pellets e determinare la tipologia migliore per la successiva prova di espansione cellulare. Durante questa prova inoltre verranno messi a confronto i pellets prodotti in piastra compatti con quelli porosi per determinare se le due strutture presentano un'efficienza di semina differente.

### 2.3.2. Materiali e metodi

**Cellule:** In questa prova sono state utilizzate cellule di linea MG63 (Human osteosarcoma cell line) trattate con le procedure già descritte. Densità di semina e numero di cellule sono rimaste invariate rispetto alle prove precedenti:

- Densità di cellule per camera:  $2 \times 10^5$  cellule/mL (10mL di mezzo per camera)
- Densità di semina: 66000 cellule/cm<sup>2</sup>

**Pellets:** Al fine di valutare la tipologia di pellets che permetta una migliore adesione cellulare dopo 24 ore, sono state messe a confronto tutte le tipologie prodotte: pellets prodotti in piastra compatti (Figura 2.13, A), pellets prodotti in piastra porosi (Figura 2.13, B), Azoto<sub>90</sub> (Figura 2.13, C), Azoto<sub>50</sub> (Figura 2.13, D).



**Figura 2. 13:** Pellets utilizzati nella prova di semina per l'ottimizzazione del materiale: pellets prodotti in piastra compatti (A), pellets prodotti in piastra porosi (B), Azoto<sub>90</sub> (C), Azoto<sub>50</sub> (D).

Tutti i pellets prima di ogni prova sono stati trattati con plasma ad aria per 4,5 minuti (come indicato nel Capitolo I). Subito dopo il trattamento, essi sono stati idratati, per circa 12 ore, nel mezzo di coltura (DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium) a 37°C all'interno di un tubo Falcon in lieve agitazione.

Il numero di pellets da inserire all'interno di ogni camera è stato calcolato partendo dalla densità di semina e dal numero totale di cellule per camera precedentemente determinati. In particolare calcolando la superficie esterna disponibile per l'adesione (pellets prodotti in piastra compatti e porosi = 0,20 cm<sup>2</sup>; Azoto<sub>90</sub> = 0,10 cm<sup>2</sup>; Azoto<sub>50</sub> = 0,06 cm<sup>2</sup>) è stato possibile calcolare il numero di pellets secondo la formula seguente:

$$N_{Pellets} = \frac{NUMERO\ di\ CELLULE\ per\ CAMERA}{DENSITA'\ di\ SEMINA * SUPERFICIE\ PELLET}$$

Il numero di pellets così ottenuto è:

- Pellets prodotti in piastra compatti = 150
- Pellets prodotti in piastra porosi = 150
- Azoto<sub>90</sub> = 295
- Azoto<sub>50</sub> = 523

**Preparazione camere:** le camere sono state preparate secondo la procedura descritta nel paragrafo precedente. Nella prova seguente sono state utilizzate:

- Piastra compatti: 2 camere.
- Piastra porosi: 1 camera.
- Azoto<sub>90</sub>: 2 camere.
- Azoto<sub>50</sub>: 1 camera.

**Dinamica del bioreattore OPB:** Per questa prova è stata impostata una velocità di 10000µm/s con un andamento a intermittenza non-oscillante: 10 minuti in movimento e 10 minuti di pausa. Durante la prova il bioreattore è stato posizionato all'interno di un incubatore a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> e umidità relativa al 95%.

**Protocollo di semina:** Il protocollo di semina è rimasto invariato rispetto alle prove precedenti (paragrafo 2.2.2):

- Quantità di mezzo di coltura = 10 mL
- Densità cellulare =  $2 \times 10^5$  cellule/mL
- Durata della prova di semina = 24 ore

**Recupero cellulare:** Le camere sono state svuotate singolarmente all'interno di tubi Falcon provvisti di Cell Strainer (BD Falcon) per il recupero dei pellets. In questo modo all'interno del tubo Falcon si raccoglie il mezzo di coltura, mentre nel Cell Strainer si raccolgono i pellets seminati.

Successivamente, per recuperare eventuali pellets rimasti nella camera, è stato effettuato un risciacquo con PBS (Phosphate buffered saline). Seguendo la stessa procedura descritta in precedenza il PBS è stato fatto defluire in un tubo Falcon sterile provvisto di Cell Strainer per il recupero dei pellets. Il PBS recuperato è stato aggiunto al mezzo di coltura raccolto in precedenza.

Al termine di questi passaggi la camera è stata tripsinizzata per valutare la quantità di cellule aderite alle pareti della camera. Alla camera sono stati aggiunti 8 mL di tripsina per circa 20 minuti, secondo la metodica già mostrata, al termine dei quali il suo contenuto è stato raccolto all'interno di un nuovo tubo Falcon.

Al termine di queste operazioni è possibile quindi quantificare:

- Il numero di cellule aderite ai pellets.
- Il numero di cellule rimaste in sospensione nel mezzo di coltura.
- Il numero di cellule aderite alla camera di coltura.

L'efficienza di semina sui pellets verrà quindi calcolata attraverso la formula seguente:

$$EFFICIENZA \text{ di SEMINA} = \frac{n. \text{ di CELLULE ADERITE ai PELLETS}}{n. \text{ di CELLULE TOTALI}}$$

**Tecniche di analisi:****Analisi quantitativa del numero cellulare: saggio CyQuant**

Per la descrizione del saggio CyQuant si veda il paragrafo 2.2.2.

**Prova di digestione e prova di recupero di adesione ed espansione**

Al fine di permettere il recupero delle cellule vitali al termine di una futura fase di espansione cellulare sui pellets, è necessario mettere a punto un protocollo che permetta la digestione dei pellets senza danneggiare le cellule. Per tale trattamento è stato scelto di utilizzare la collagenasi di tipo I.

Il protocollo di prova impiegato è il seguente: la collagenasi di tipo I (Worthington, Biochemical Corporation) è stata diluita nel mezzo di coltura (senza siero) ad una concentrazione di 15 mg/ml. Al termine della prova di semina i pellets sono stati immersi nella soluzione (5 ml) registrando il tempo per giungere alla completa digestione.

Dopo la digestione la collagenasi I è stata inattivata con siero bovino e, una volta rimosso quest'ultimo, le cellule sono state sospese in 500µl di mezzo di coltura. Il 5% della soluzione contenente le cellule è stato seminato su una piastra multipozzetto da 12 pozzetti (superficie per pozzetto 3.7 cm<sup>2</sup>, Corning Incorporated Harrodsburg, Kentucky, USA) al fine di verificare che le cellule avessero mantenuto la capacità di adesione e proliferazione. Sulle cellule rimanenti sono state effettuate le analisi quantitative della vitalità cellulare mediante TALI e CyQuant.

**Analisi quantitativa della vitalità cellulare: TALI Image Cytometer - Cell Counter**

Il TALI (Life Technologies, Invitrogen, Italia; Figura 2.14) è uno strumento da banco a 3 canali (campo chiaro, fluorescenza verde, fluorescenza rossa) che permette la conta cellulare ed esegue saggi di vitalità su sospensioni cellulari. Per valutare la vitalità delle cellule si misura la fluorescenza cellulare che rientra nei due canali, rosso e verde, dello strumento: (1) eccitazione a 458 nm con un filtro per le emissioni di 525/20 nm (canale verde) e (2) eccitazione a 530 nm con filtro per le emissioni di 585 nm (canale rosso). Per eseguire questa prova è stato

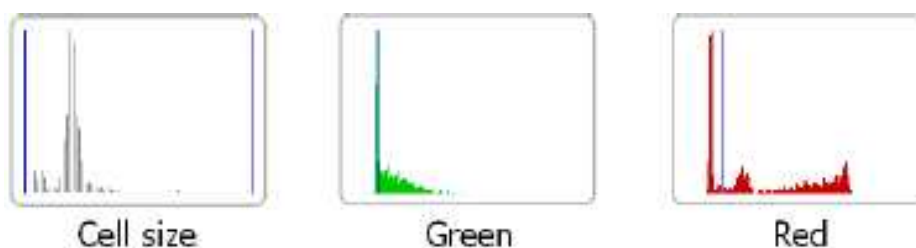


**Figura 2. 14:** TALI Image Cytometer – Cell Counter.



necessario preparare una specifica soluzione di lavoro. 25µl di sospensione cellulare con 10% di calceina AM e il 10% di SYTOX® sono stati incubati per 10 minuti a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> e saturazione di vapore. La calceina AM permette di determinare la vitalità cellulare; nelle cellule vitali la calceina AM non-fluorescente viene convertita in calceina ad intensa fluorescenza verde dopo idrolisi dell'acetossimetilestere dall'enzima esterasi. Il SYTOX® è una sonda molecolare in grado di passare attraverso la membrana cellulare e di legarsi agli acidi nucleici. In questo modo vengono colorate di rosso tutte le cellule all'interno di una coltura.

Al termine del processo della durata di circa 2 minuti, lo strumento automaticamente mostra il risultato dell'analisi, che comprende il numero di cellule e l'analisi della fluorescenza nel canale verde e rosso (Figura 2.15).



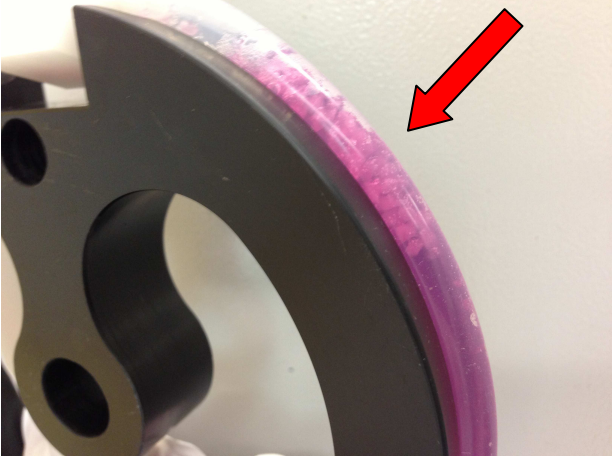

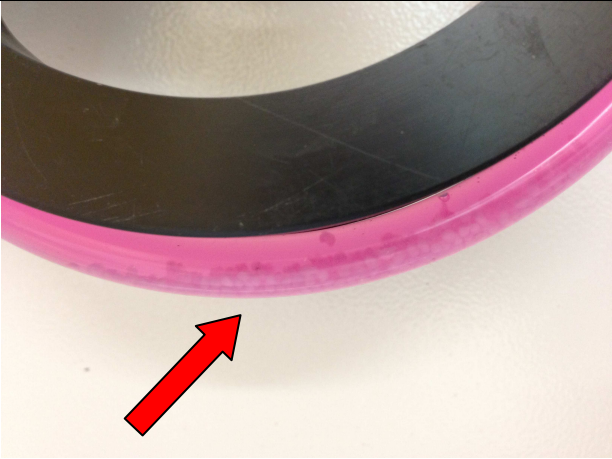
**Figura 2. 15:** Risultati mostrati dal dallo strumento TALI dopo la conta cellulare e l'analisi della fluorescenza nei canali verde e rosso.

Le cellule vitali emettono in entrambi i canali di fluorescenza dello strumento.

Nel caso in esame dopo la digestione enzimatica dei pellets, il TALI è stato utilizzato per calcolare la percentuale di cellule vitali presenti sui pellets dopo la semina.

### 2.3.3. Risultati

Come si può notare, all'interno della camera di coltura i pellets mantengono il comportamento riscontrato nel Capitolo I: i pellets prodotti in piastra con struttura compatta galleggiano nel mezzo mentre tutte le altre tipologie si depositano sul fondo (Figura 2.16).

<p><b>Piastra compatti</b></p>	
<p><b>Piastra porosi</b></p>	
<p><b>Azoto<sub>90</sub></b></p>	

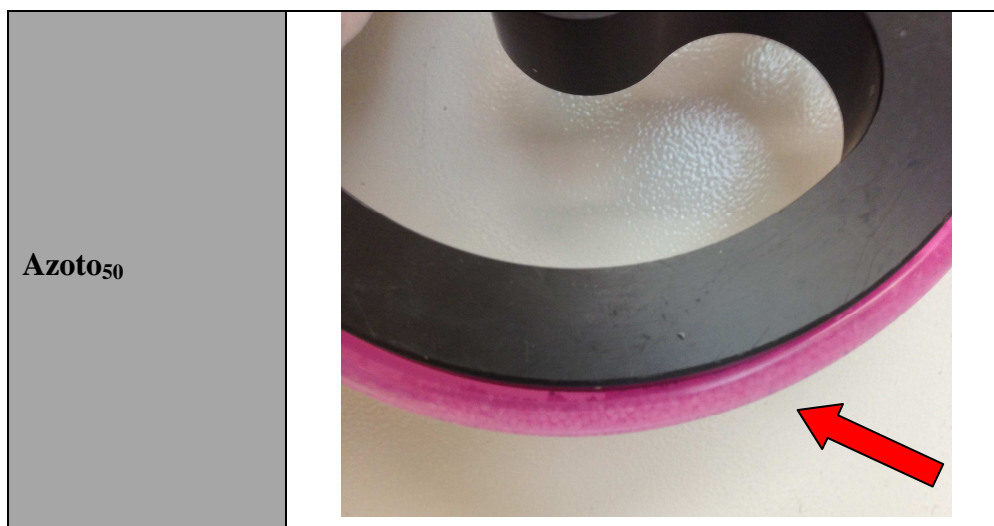
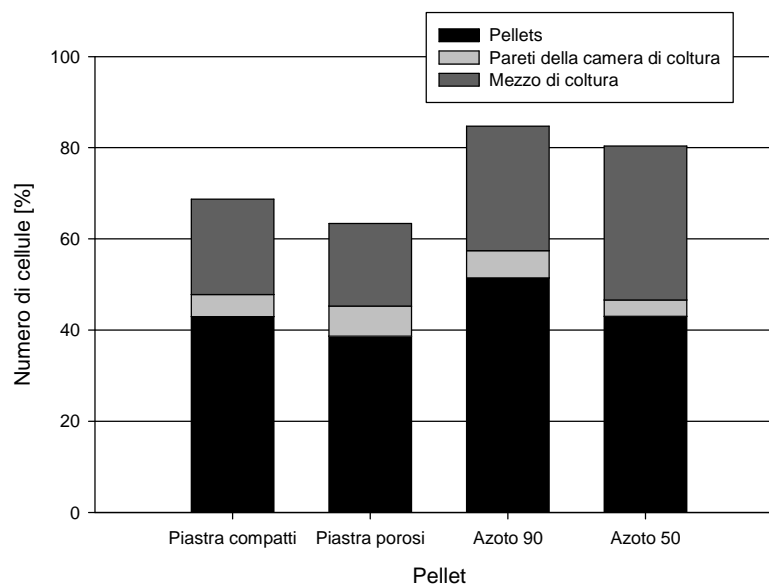


Figura 2. 16: Comportamento dei pellets all'interno delle camere di coltura.

### Saggio CyQuant

Nel grafico seguente sono riportati il numero di cellule recuperate suddiviso nei tre contributi.

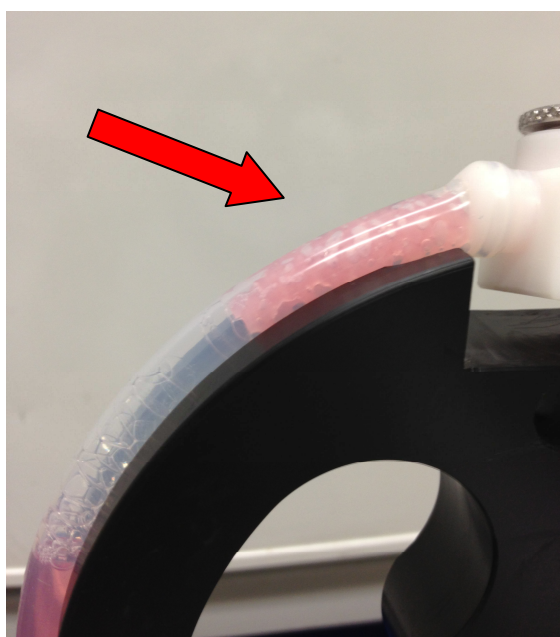


**Grafico 2. 2:** Numero di cellule in % recuperato al termine della prova di semina rispetto all'aliquota di riferimento. Piastra compatti ( $n=2$ ): % di cellule aderite ai pellets =  $42,90 \pm 13,38$  %; % di cellule aderite alla camera =  $4,87 \pm 2,61$  %; % di cellule in sospensione nel mezzo di coltura =  $20,90 \pm 0,72$  %. Piastra porosi ( $n=1$ ): % di cellule aderite ai pellets =  $38,62$  %; % di cellule aderite alla camera =  $6,65$  %; % di cellule in sospensione nel mezzo di coltura =  $18,13$  %. Azoto90 ( $n=2$ ): % di cellule aderite ai pellets =  $51,40 \pm 9,48$  %; % di cellule aderite alla camera =  $6,02 \pm 1,28$  %; % di cellule in sospensione nel mezzo di coltura =

27,29±10,51 %. Azoto50 ( $n=1$ ): % di cellule aderite ai pellets = 43,00 %; % di cellule aderite alla camera = 3,61 %; % di cellule in sospensione nel mezzo di coltura = 33,78 %.

Come si può vedere, pur avendo separato le due strutture, l'efficienza di semina dei pellets prodotti in piastra è rimasta la stessa: 42,90% per quelli compatti e 38,62% per quelli porosi.

Sebbene ci si aspettasse che i pellets porosi, depositandosi sul fondo durante la pausa, permettessero un'efficienza di semina maggiore, i pellets compatti hanno raggiunto alti valori di efficienza a causa del comportamento mostrato nell'immagine seguente:



**Figura 2. 17:** Comportamento dei pellets compatti prodotti in piastra all'interno della camera di coltura.

Durante l'agitazione i pellets compatti si sono bloccati tra il connettore ed il tubo Tygon, permettendo a tutte le cellule di impattare con i pellets. Questa dinamica potrebbe causare l'efficienza di semina riscontrata.

Inoltre, rispetto all'ultima prova descritta nel paragrafo precedente, dove le due strutture di pellets sono state messe in coltura nella stessa camera, l'efficienza di semina è confrontabile: 42,90% e 38,62% vs. 34,30%.

Dal punto di vista assoluto, in tutte le condizioni, le cellule aderite alle pareti della camera rimangono su valori molto bassi (dal 3 al 6%), mentre la maggior parte delle cellule

recuperate aderisce ai pellets. La quantità di cellule rimaste in sospensione nel mezzo rimane su valori piuttosto elevati: dal 20 al 30%.

Confrontando l'efficienza di semina delle varie tipologie di pellets ci accorgiamo che le Azoto<sub>90</sub> garantiscono un'efficienza maggiore (51,40%) rispetto alle altre tipologie (circa 40%).

Anche in questa serie di prove non si riesce a recuperare il numero totale di cellule iniettate. A causa dei vari trattamenti subiti durante la fase di recupero, parte delle cellule rimaste in sospensione potrebbe non essere stata recuperata ed essere rimasta nei tubi Falcon o nei pipettatori; per quanto riguarda le cellule aderite ai pellets, parte delle cellule aderite potrebbe essersi staccata durante lo svuotamento delle camere, mentre per le cellule aderite alle camere non possiamo essere sicuri che il trattamento in tripsina abbia staccato tutte le cellule.

### **Prova di degradazione e prova di recupero di adesione e espansione**

Al termine delle 24 ore i pellets sono stati digeriti in collagenasi I, la tabella seguente mostra i tempi per la completa digestione dei pellets:

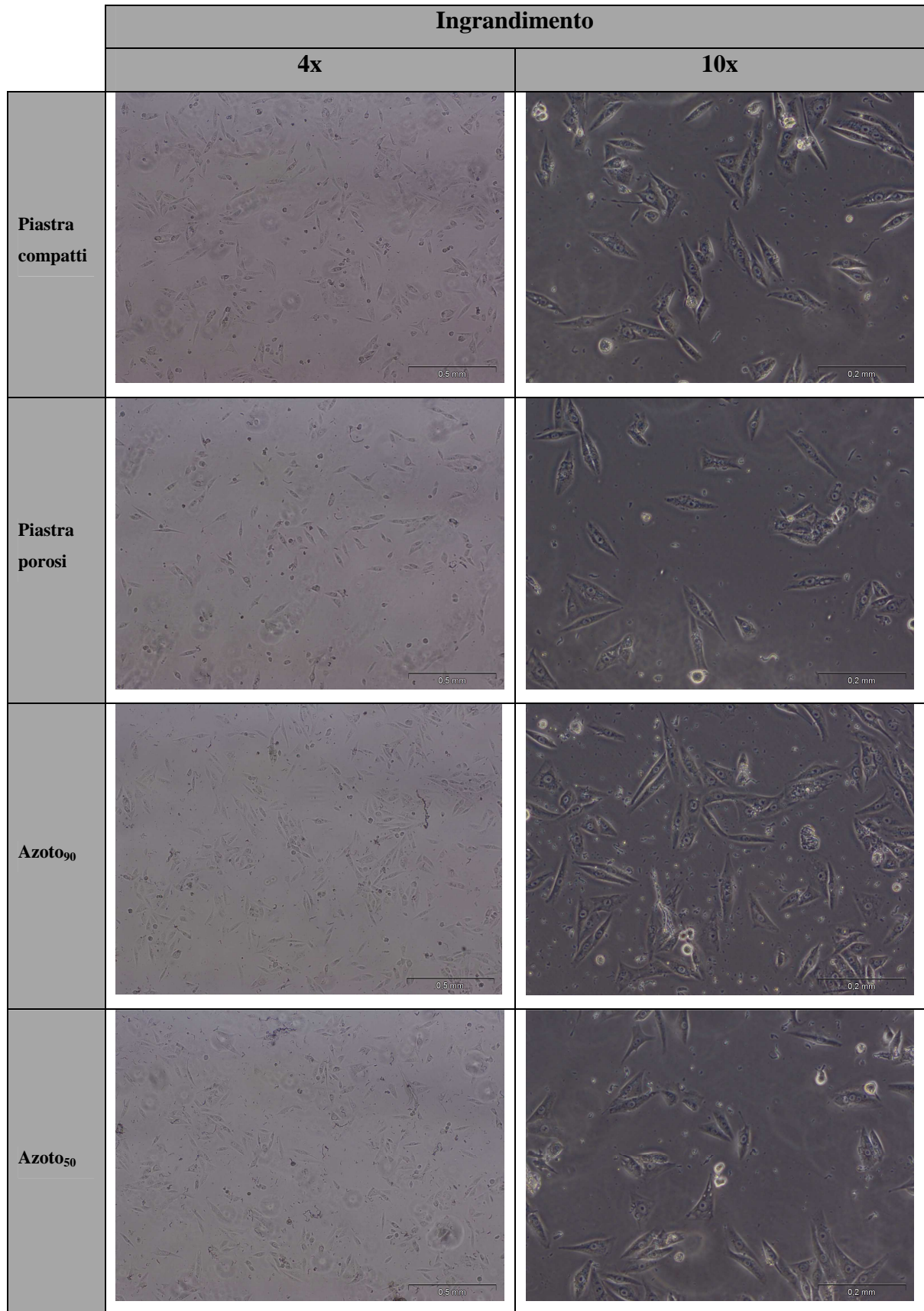
	<b>Tempi digestione</b>
<b>Piastra compatti</b>	14 minuti
<b>Piastra porosi</b>	14 minuti
<b>Azoto<sub>90</sub></b>	15 minuti
<b>Azoto<sub>50</sub></b>	15 minuti

**Tabella 2. 1:** Tempi di digestione enzimatica dei pellets.

Tali valori risultano confrontabili con i risultati delle prove di degradazione descritte nel capitolo I su pellets senza cellule, dove dopo dieci minuti non era stata raggiunta la completa digestione.

Al termine della digestione enzimatica dei pellets, una parte delle cellule (circa il 5%) è stata seminata all'interno di una piastra multipozzetto da 12 pozzetti.

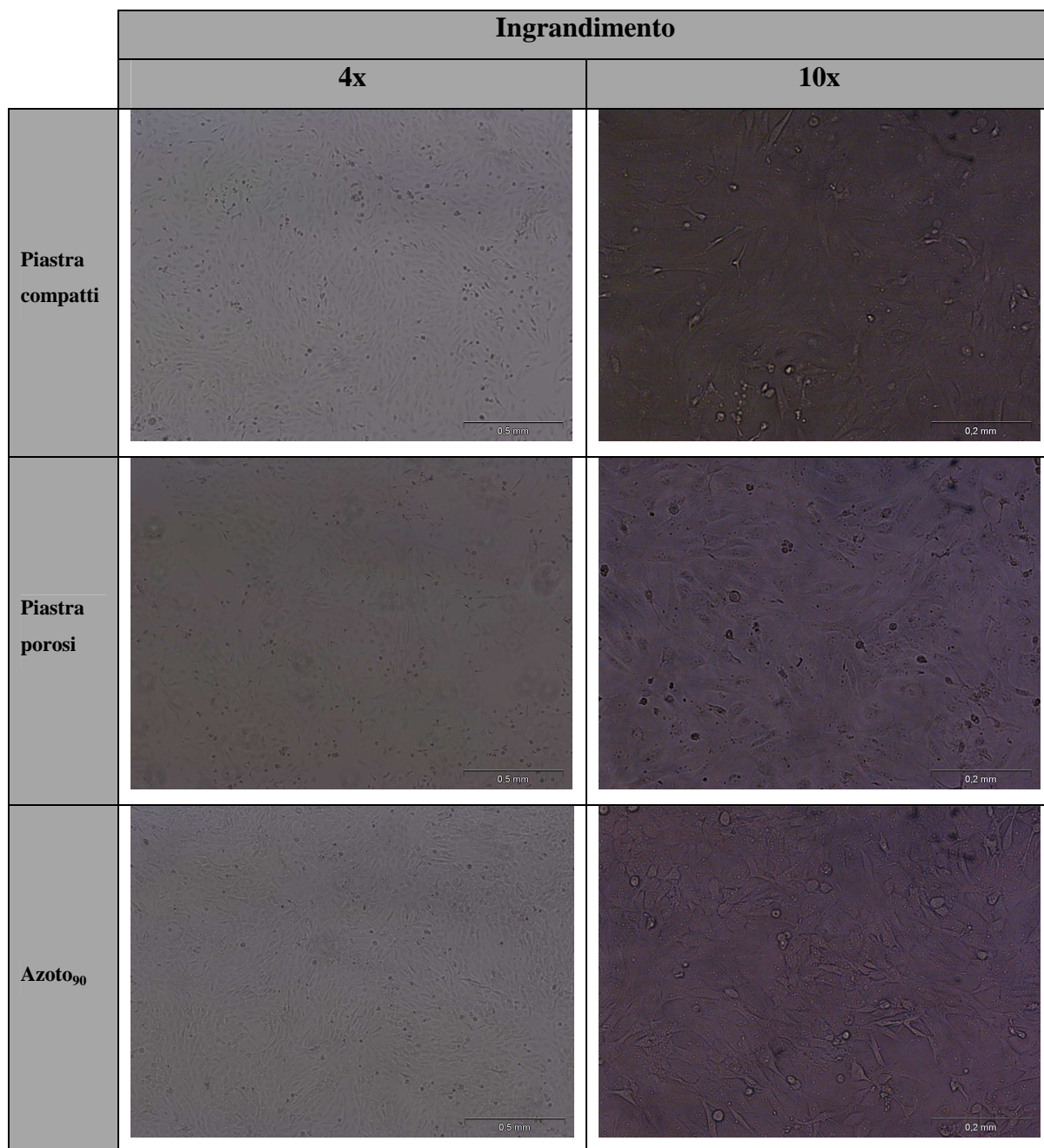
Le seguenti immagini mostrano le foto delle cellule 24 ore dopo la semina sulla piastra.

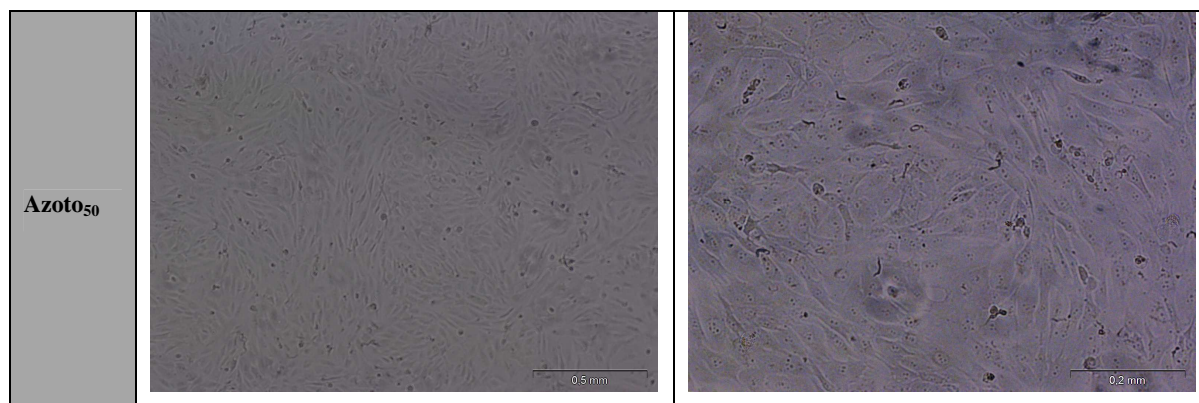


**Figura 2. 18:** Immagini delle cellule seminate su piastra multipozzetto dopo 24 ore.

Come si può notare le cellule sono aderite perfettamente alla piastra, lo conferma la forma allungata che hanno assunto. Oltre alle cellule sono presenti anche molti residui di collagene rimasti dopo la digestione.

A distanza di quattro giorni le cellule hanno continuato la loro espansione e in tutti i casi sono arrivate a confluenza, come mostrato dalle seguenti immagini:

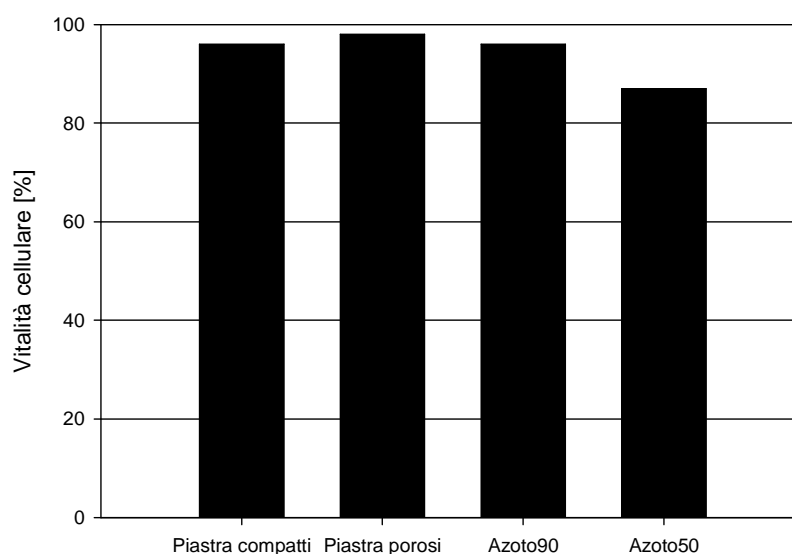




**Figura 2. 19:** Immagini delle cellule seminate su piastra multipozzetto a confluenza dopo 4 giorni.

### TALI Image Cytometer - Cell Counter

La quantità di cellule vitali recuperata dai pellets dopo la digestione enzimatica in collagenasi I è mostrata in percentuale nel grafico seguente:



**Grafico 2. 3:** Quantità di cellule vitali in % determinata tramite TALI. Piastra compatti [96%], Piastra porosi [98%], Azoto<sub>90</sub> [96%], Azoto<sub>50</sub> [87%].

I valori di vitalità sono prossimi al 100% a conferma del fatto che il trattamento in collagenase di tipo I non ha inficiato la vitalità cellulare.

A parte il caso dei pellets Azoto<sub>50</sub> che mostrano una vitalità leggermente inferiore, tutte le altre tipologie mostrano valori di vitalità confrontabili.



#### **2.3.4. Conclusioni**

L'obiettivo del presente studio è stato quello di mettere a punto il protocollo di semina e confrontare le prestazioni dei diversi tipi di pellets.

Nonostante la scelta di separare i pellets prodotti in piastra con struttura porosa da quelli con struttura compatta l'efficienza di semina è rimasta la stessa per le due tipologie: 42,90% per quelli compatti e 38,62% per quelli porosi.

Dal punto di vista assoluto, invece, in tutti i casi le cellule aderite alle pareti della camera rimangono su valori molto bassi (dal 3% al 6%), mentre la maggior parte delle cellule recuperate aderisce ai pellets. La quantità di cellule rimaste in sospensione nel mezzo rimane su valori piuttosto elevati: dal 20% al 30%.

Confrontando l'efficienza di semina delle varie tipologie di pellets ci accorgiamo che i pellets Azoto<sub>90</sub> garantiscono un'efficienza maggiore (51,40%) rispetto alle altre tipologie (circa 40%).

Inoltre l'analisi della vitalità post-digestione mostra valori prossimi al 100% per quasi tutte le tipologie di pellets. Questo dato è confermato dal fatto che nonostante le cellule avessero subito un trattamento di digestione che avrebbe potuto in qualche modo danneggiarle, dopo la semina hanno mantenuto la capacità di adesione ed espansione. Come si nota dalle immagini dei paragrafi precedenti, nelle 24 ore successive le cellule erano già aderite al substrato, dato confermato dalla morfologia allungata assunta dalle cellule, e dopo 4 giorni tutte le cellule avevano raggiunto la confluenza.

Dovendo scegliere un'unica tipologia di pellets per la prova di espansione, la scelta cade così sui pellets Azoto<sub>90</sub> che garantiscono un'efficienza di semina maggiore (il 51,40% delle cellule iniettate) e mantengono alti valori di vitalità cellulare.

# CAPITOLO III

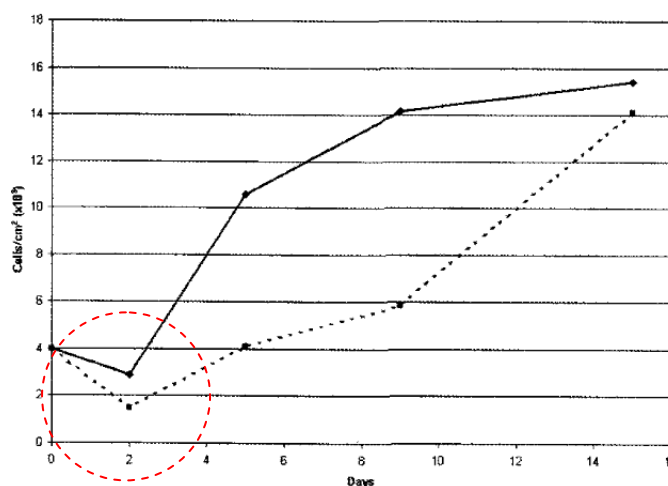
## ANALISI PRELIMINARE DELL'ESPANSIONE CELLULARE SU PELLETS IN COLLAGENE IN BIOREATTORE

### 3.1. Introduzione

Grazie all'elevato rapporto superficie volume e alla possibilità di ottenere un'espansione maggiore rispetto alle colture tradizionali 2D [49], l'interesse per sistemi di coltura 3D a base di pellets è in continuo aumento.

Come già delineato, lo scopo di questo lavoro di tesi è proprio quello di sviluppare un sistema di coltura 3D per l'espansione cellulare già testato in letteratura [6, 8, 59], utilizzando però una nuova tipologia di pellets a base di collagene. Definite nei precedenti capitoli le caratteristiche degli scaffold da utilizzare e definiti il protocollo e la dinamica di semina, in questo capitolo si riporteranno i risultati di una prova preliminare di espansione cellulare su pellets.

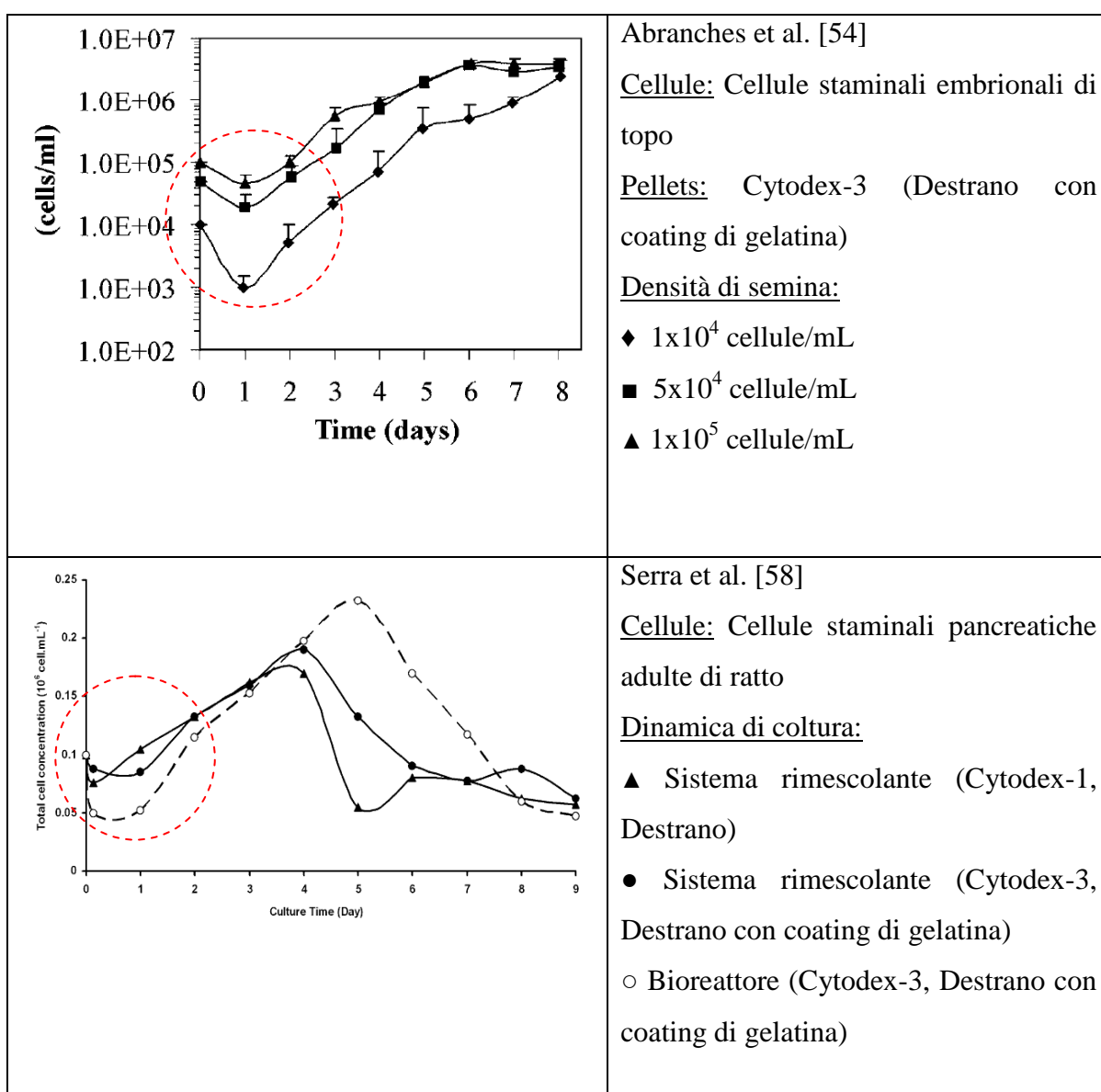
La dinamica di coltura non differisce da quella monostrato tradizionale (Grafico 3.1, [46]) e



**Grafico 3.1:** Confronto tra l'espansione in monostrato e l'espansione tramite pellets (Cellagen® Beads). Nel cerchio rosso è messa in evidenza la fase iniziale di morte cellulare (Osteoblasti) comune a entrambi i sistemi. Linea continua = pellets; linea tratteggiata = monostrato [46].

prevede una fase iniziale di morte cellulare in cui il numero di cellule diminuisce sensibilmente, seguita dall'espansione vera e propria che continua fino al riempimento di tutta la superficie disponibile.

Come mostrato in letteratura, la fase iniziale di morte cellulare si verifica indipendentemente dal tipo di cellule, dalla densità di semina e dalla dinamica di coltura. Abranches et al. [54] hanno confrontato diverse densità di semina utilizzando cellule staminali embrionali di topo ottenendo risultati confrontabili tra le diverse densità di semina. Serra et al. [58] hanno invece messo a confronto la dinamica di agitazione e due diverse tipologie di pellets.



**Grafico 3.2:** Prove di espansione cellulare a diverse condizioni iniziali. Nel cerchio rosso è evidenziata la fase iniziale di morte cellulare.

Come si può inoltre notare dai grafici di Serra et al., una volta raggiunta la confluenza le cellule, se lasciate in coltura, andranno inevitabilmente incontro a senescenza e quindi alla morte. L'espansione massima raggiungibile dipenderà poi dal tipo cellulare e dalle condizioni di coltura: Eibes et al. [60], utilizzando pellets Cultispher S con cellule staminali mesenchimali del midollo osseo, dopo 8 giorni di coltura in spinner flask hanno ottenuto un numero di cellule 8,4 volte superiore rispetto al numero iniziale. Frondoza et al. [7], dopo 8 giorni in spinner flask, utilizzando pellets Cellagen per l'espansione di condrociti, hanno ottenuto un numero di cellule pari a 7 volte quello iniziale.

Partendo da questi dati e utilizzando la tipologia di pellet che ha mostrato un'efficienza di semina maggiore (Azoto<sub>90</sub>), verrà eseguita una prova di coltura della durata di 14 giorni e verrà determinato a diversi *time-point* il grado di espansione della popolazione cellulare. Per questa prova verrà utilizzato il modello di OPB numero IV, impostando durante la semina un movimento non-oscillante a intermittenza (come quello descritto nel Capitolo II) con velocità pari 10000 $\mu$ m/s e per la rimanente parte della prova verrà mantenuta la stessa velocità ma impostando un movimento continuo. Il razionale di questa scelta deriva dall'analisi della letteratura, dove tra la fase di semina e quella di coltura viene aumentata la velocità di rotazione [46]. Essendo però una prova preliminare e non conoscendo il reale comportamento delle cellule e dei pellets all'interno del bioreattore per lunghi periodi, è stato scelto di mantenere la stessa velocità della fase di semina, la quale durante le prove ha permesso di recuperare le cellule per la quasi totalità vitali.

### 3.2. Materiali e metodi

**Cellule:** Per questa sperimentazione sono state utilizzate cellule di linea MG63 (Human osteosarcoma cell line). Le cellule sono state conservate all'interno di fiale immerse nell'azoto liquido. Prima di ogni prova sono state espanse secondo la procedura standard, tramite T-Flask, al fine di ottenere il numero necessario per la prova. Una volta a confluenza sono state staccate con tripsina 0.05% in attesa di essere iniettate nelle camere di coltura. Le cellule sono state seminate a 66000 cellule/cm<sup>2</sup>, con una densità di cellule per camera pari a 2x10<sup>5</sup> cellule/mL (10mL totali di mezzo di coltura per camera).

**Pellets:** I pellets prima di ogni prova sono stati trattati con plasma ad aria per 4,5 minuti (come indicato nel Capitolo I). Subito dopo il trattamento sono stati idratati, per circa 12 ore, nel mezzo di coltura (DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium) a 37°C all'interno di tubi Falcon in lieve agitazione. Il numero di pellets da inserire all'interno di ogni camera è stato calcolato partendo dalla densità di semina e dal numero totale di cellule per camera precedentemente definiti. In particolare calcolando la superficie esterna disponibile per l'adesione (0,10 cm<sup>2</sup> per pellet) è stato possibile calcolare il numero di pellets secondo la formula seguente:

$$N_{Pellets} = \frac{NUMERO\ di\ CELLULE\ per\ CAMERA}{DENSITA'\ di\ SEMINA * SUPERFICIE\ PELLET}$$

Sostituendo i dati nella formula (numero di cellule per camere = 2x10<sup>6</sup>; densità di semina = 66000 cellule/cm<sup>2</sup>) otteniamo che il numero di pellets necessari per questa prova è 295.

**Preparazione camere:** Sono state preparate 6 camere secondo la procedura descritta nel Capitolo II.

**Dinamica del bioreattore OPB:** Per questa prova è stata impostata durante la semina una velocità di 10000µm/s con un andamento a intermittenza non oscillante: 10 minuti in movimento e 10 minuti di pausa. Durante la coltura è stata mantenuta la stessa velocità di rotazione togliendo però la pausa, come nel caso di Sun et al. [34]. Durante la prova il

bioreattore (OPB IV) è stato posizionato all'interno di un incubatore a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> e umidità relativa 95%.

**Protocollo di semina:** Il protocollo di semina è stato determinato nel Capitolo II:

- Quantità di mezzo di coltura (DMEM low glucose, 10% FBS, 1% PSG) = 10 mL
- Densità di cellule iniettate =  $2 \times 10^5$  cellule/mL

**Tecniche di analisi:**

**Analisi quantitativa del numero cellulare: saggio CyQuant**

Al fine di avere una conta precisa e accurata del numero di cellule, è stato utilizzato questo particolare saggio che permette di stimare il numero di cellule tramite quantificazione del DNA presente in una soluzione. Il saggio CyQuant (Invitrogen Corporation) è un saggio spettrofotometrico che grazie ad una sonda fluorescente riesce a legare in maniera specifica gli acidi nucleici presenti all'interno della cellula. La quantità di DNA presente in ogni singola cellula è costante, perciò, quantificando la quantità di DNA presente nella soluzione analizzata, è possibile risalire al numero totale di cellule. Prima della misura tramite spettrofluorimetro (Victor X3-PerkinElmer), è stato necessario lisare le membrane cellulari per poter estrarre il DNA. Nel caso specifico è stata utilizzata la proteinasi K, un enzima in grado di digerire la cheratina e lasciare intatto il DNA. La proteinasi K scioglie inoltre anche il collagene, questo permette di non dover staccare le cellule dai pellets prima della misura.

Il kit di analisi è composto dai seguenti reagenti:

- *CyQuant GR dye* (componente A);
- *cell-lysis buffer* (componente B);

Nel caso specifico, per la digestione, a ogni campione (cellule o pellets di collagene) sono stati aggiunti 250 µl (per le cellule aderite alla camera di coltura e per le cellule sospese nel mezzo) o 500 µl (per i pellets di collagene) di soluzione costituita da proteinasi K. I campioni immersi in soluzione sono stati agitati mediante un Vortex (VELP scientifica, Usmate, Italy), in modo da favorire la rottura delle membrane cellulari, e in seguito posti in un termoagitatore a 56 °C per 16 ore, per permettere all'enzima di raggiungere la sua massima attività. Considerando letture in triplicato, per ogni campione sono stati preparati 600 µl di soluzione di lavoro costituita da una sonda intercalante il DNA (componente A, 400X) e da un lisante cellulare

(componente B, 20X) diluiti in un opportuno volume di acqua bi-distillata sterile (H<sub>2</sub>O RNA-ase e DNA-ase free, GIBCO). Per la lettura in fluorescenza, in questo caso alla lunghezza d'onda di 520 nm, è stato necessario utilizzare 200 µL della soluzione da analizzare, ponendoli in una piastra multipozzetto a 96 pozzetti a fondo nero. La soluzione da analizzare è ottenuta miscelando 5 µl di sospensione prelevata dai campioni lisati con 195 µl della soluzione di lavoro.

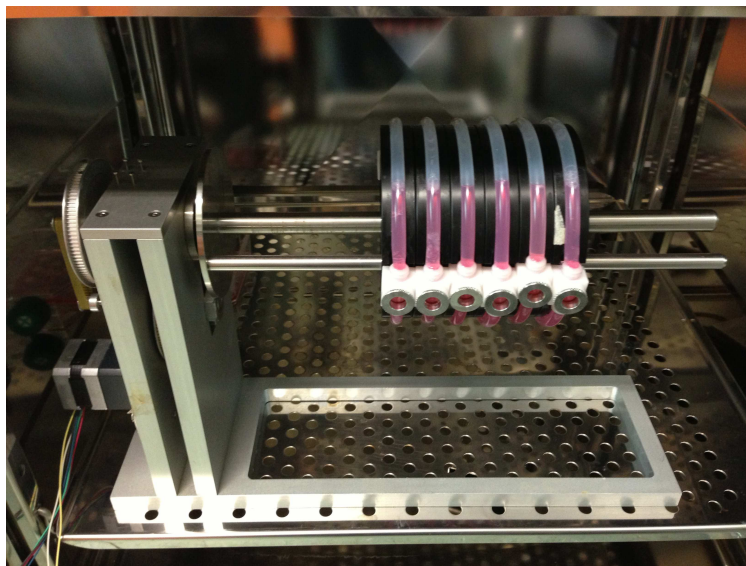
### **Analisi qualitativa della distribuzione di cellule vive e morte sui pellets: saggio LIVE/DEAD**

Il saggio LIVE/DEAD (Invitrogen Corporation, Isbad, CA, USA) è un saggio in fluorescenza che permette di definire la presenza e la distribuzione delle cellule vive e di quelle morte utilizzando due sonde molecolari che stimano parametri caratteristici della vitalità cellulare. Le cellule vive, che verranno mostrate in verde, sono marcate grazie all'enzima esterasi, presente solo nelle cellule vitali, che converte la calceina AM non fluorescente in calceina ad intensa fluorescenza verde ( $\lambda_{\text{eccitazione}} = 495 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{emissione}} = 515 \text{ nm}$ ). Le cellule morte sono invece marcate dall'etidio omodimero 1 (EthD-1) che, riuscendo a penetrare nella cellula attraverso la membrana danneggiata, subisce un aumento di fluorescenza di 40 volte legandosi agli acidi nucleici emettendo nel rosso ( $\lambda_{\text{eccitazione}} = 528 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{emissione}} = 617 \text{ nm}$ ). Per eseguire questo saggio è necessario preparare una specifica soluzione di lavoro. La soluzione è stata ottenuta diluendo l'EthD-1 (componente B del kit) in PBS sterile secondo una diluizione 500X (in questo modo si ottiene una concentrazione di 4 µM, partendo dallo *stock* 2 mM conservato in DMSO/H<sub>2</sub>O 1:4 (v/v)). Alla soluzione così ottenuta va aggiunta la calceina AM (componente A). La calceina va diluita 2000 volte, in modo da ottenere una concentrazione di 2 µM, partendo dallo *stock* 4 mM, conservato in DMSO anidro. La concentrazione finale di DMSO è <0.1%, un livello generalmente innocuo per la maggior parte delle cellule.

La quantità di soluzione da mettere in ogni pozzetto deve essere sufficiente a coprire interamente il campione. Nel caso specifico, volendo analizzare 1 pellet scelto in maniera casuale dalla camera di coltura, è bastato 1 ml di soluzione LIVE/DEAD per poterlo coprire in una piastra multipozzetto da 24. Una volta sciacquato in PBS, il campione è stato immerso nella soluzione. Dopo quaranta minuti di incubazione al buio a 37°C, il campione è stato lavato con PBS per eliminare l'EthD-1 in eccesso che non ha reagito. Il campione è quindi stato analizzato con il microscopio a fluorescenza utilizzando il filtro ottico FITC ( $\lambda_{\text{eccitazione}} = 470-$

490nm,  $\lambda_{\text{emissione}} > 520\text{nm}$ ) per visualizzare le cellule vive in verde, e il TRITC ( $\lambda_{\text{eccitazione}} = 530\text{-}550\text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{emissione}} = 600\text{-}640\text{nm}$ ) per eccitare il *marker* EthD-1 in quelle morte, che fluoresce nel rosso. Sono state acquisite immagini LIVE e immagini DEAD del campione. Le immagini LIVE e DEAD corrispondenti vengono realizzate sovrapponendo il canale del verde e il canale del rosso mediante un apposito software di *imaging* (ImageJ, National Institutes of Health, USA).

**Protocollo di espansione:** La prova di coltura è durata complessivamente 14 giorni. Per valutare il grado di espansione nel tempo sono state utilizzate 6 camere di coltura (Figura 3.1).



**Figura 3. 1:** Immagine del bioreattore OPB con 6 camere di coltura.

Le camere sono state analizzate a diversi *time-point* e sono stati eseguiti i seguenti saggi.

- 1° *time-point*: Dopo 24 ore è stata analizzata 1 camera per controllare l'efficienza di semina sui pellets. Sui pellets di questa camera è stato eseguito un saggio CyQuant.
- 2° *time-point*: Dopo 3 giorni dalla semina è stata analizzata 1 camera e i pellets sono stati analizzati tramite saggio CyQuant.
- 3° *time-point*: Dopo 7 giorni dalla semina sono state analizzate 2 camere e i pellets sono stati analizzati tramite saggio CyQuant.
- 4° *time-point*: Dopo 14 giorni dalla semina sono state analizzate 2 camere e i pellets sono stati analizzati attraverso i seguenti saggi cellulari: CyQuant,

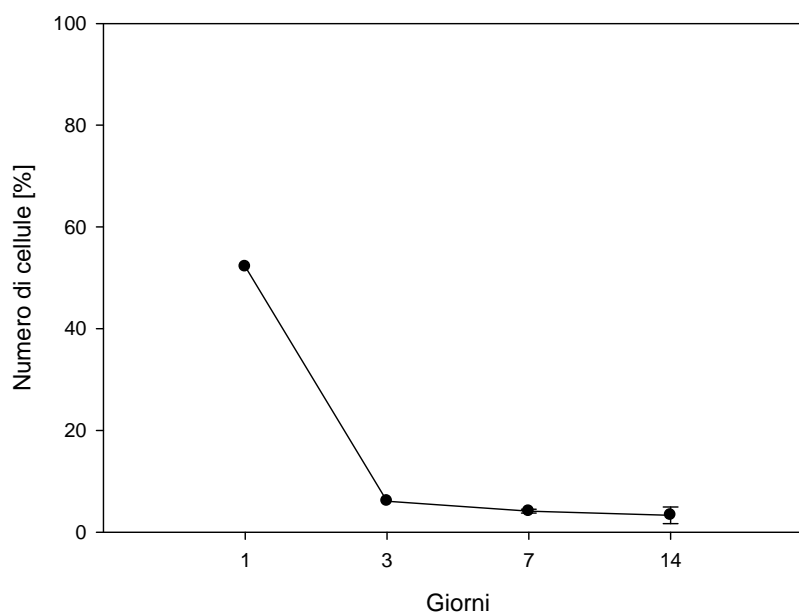


LIVE/DEAD. In questo caso, tramite saggio CyQuant, è stato determinato anche il numero di cellule rimaste in sospensione nel mezzo di coltura e quelle aderite alle pareti della camera di coltura.

Ogni 4 giorni è stato effettuato il cambio del mezzo di coltura nelle camere.

### 3.3. Risultati

Il grado di espansione nel tempo è stato determinato tramite saggio CyQuant. Come si vede dal grafico seguente per ogni *time-point* è stato determinato il numero di cellule aderite ai pellets. Il numero di cellule è stimato rispetto ad un'aliquota di riferimento presa prima del riempimento delle camere.



**Grafico 3. 3:** Risultato della prova di espansione cellulare all'interno del bioreattore OPB. Numero delle camere di coltura per ogni *time-point*: giorno 1 → n=1; giorno 3 → n=1; giorno 7 → n=2; giorno 14 → n=2.

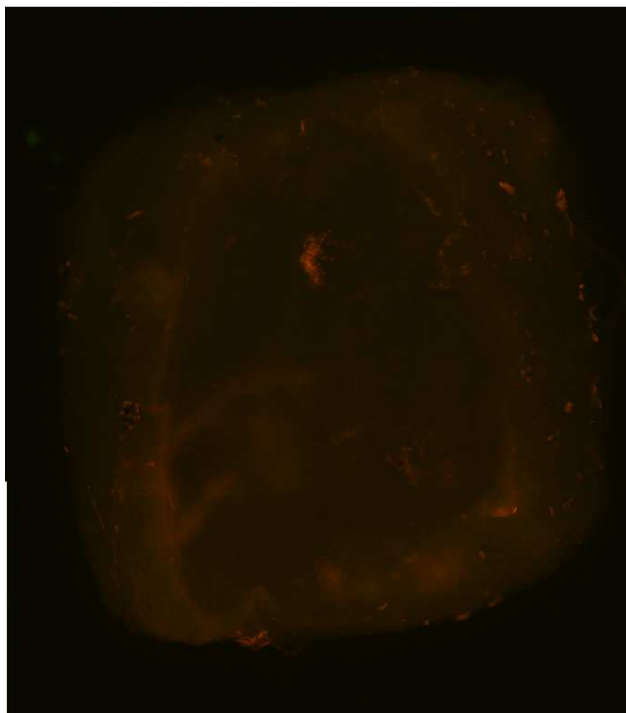
Dopo 24 ore l'efficienza di semina calcolata (*time-point* 1) è del 52,18%, in linea con i risultati mostrati nel Capitolo II (51,40%), confermando la stabilità del protocollo di semina messo a punto.

Nei *time-point* successivi il numero di cellule aderite ai pellets diminuisce drasticamente arrivando dopo 14 giorni di coltura al 3% delle cellule iniettate.

La quantità di cellule rimaste in sospensione nel mezzo di coltura e quelle rimaste aderite alle pareti delle camere di coltura, al termine della prova di coltura, è rispettivamente del 0,05% e del 0,17% (valori medi, n=2).

La dinamica di coltura impostata durante la prova non ha permesso di mantenere le cellule in condizioni ideali per l'espansione. Un'ipotesi possibile è che le cellule subiscono elevati sforzi di taglio che possono aver causato il loro distacco dai pellets.

Tramite saggio LIVE/DEAD è stato possibile confermare il risultato trovato.



**Figura 3. 2:** Immagine LIVE/DEAD di un pellet di collagene al termine della prova di espansione (giorno 15). La colorazione rossa indica la morte delle cellule..

Il saggio, effettuato al *time-point* 4 (14 giorni) al termine della prova di coltura, mostra la scarsa presenza di cellule sulla superficie dei pellets. Inoltre le poche cellule rimaste sono tutte morte, infatti hanno assunto la tipica colorazione rossa.

### 3.4. Conclusioni

In letteratura tra la fase di semina e quella di espansione, la velocità di rotazione del bioreattore viene mantenuta costante o gradualmente aumentata. Per fare qualche esempio, nel caso di Frondoza et al. [7] la velocità di rotazione, inizialmente impostata a 30rpm, viene gradualmente aumentata fino a 60rpm; nel caso di Storm et al. [18] la velocità, dopo la semina, viene incrementata da 15 rpm a 45 rpm; nel caso di Sun et al. [34] la velocità di rotazione viene mantenuta costante a 25 rpm per tutta la durata della prova di coltura.

In questo caso, essendo un prova preliminare, è stato deciso di mantenere la velocità del bioreattore costante tra la fase di semina e quella di espansione eliminando però la pausa. La prova è stata condotta con l'intento di non diminuire l'agitazione imposta ai pellets, come mostrato in letteratura, senza però sollecitare ulteriormente le cellule nel passaggio dalla fase di semina a quella di espansione.

Nonostante queste accortezze, al termine della prova non si è riscontrata nessuna espansione e il numero di cellule aderite ai pellets è diminuito soprattutto nei tre giorni successivi la semina. Inoltre l'immagine LIVE/DEAD mostra che le poche cellule rimaste aderite sono comunque morte.

La diminuzione del numero cellulare, successivamente alla fase di semina, è ampiamente riscontrata anche in molti casi in letteratura, come negli esempi mostrati in Introduzione [46, 54, 58], la differenza è che in questo caso non è iniziata la fase di espansione successiva. Probabilmente le poche cellule rimaste sui pellets erano troppo isolate per ricominciare ad espandersi.

La causa di questo comportamento potrebbe essere dovuto (la scarsa numerosità degli esperimenti impedisce di trarre delle conclusioni definitive) alla differenza del sistema di coltura tra la letteratura e questo lavoro. In letteratura viene utilizzato il bioreattore *spinner-flask* [34, 46]. Questo bioreattore permette un'agitazione maggiore del mezzo di coltura rispetto al presente lavoro ma viene utilizzato con pellets micrometrici che subiscono differentemente gli effetti degli sforzi di taglio.

Avendo comunque dimostrato che grazie all'OPB possiamo garantire un'adesione efficace delle cellule ai pellets, nella fase successiva andrebbe studiato un protocollo di espansione cellulare settando e testando diversi pattern e diverse velocità di rotazione delle camere di coltura. L'ottimizzazione delle condizioni di espansione in dinamico deve garantire l'adesione delle cellule ai pellets durante tutta la durata della prova, senza intaccarne la vitalità.

## DISCUSSIONE

**L**o scopo di questo lavoro di tesi è stato quello di sviluppare un sistema 3D per l'espansione cellulare utilizzando pellets in collagene.

La tesi si è articolata in quattro fasi:

- Progettazione, sviluppo e caratterizzazione dei pellets in collagene.
- Sviluppo di un protocollo di semina all'interno del bioreattore OPB.
- Analisi dell'efficienza di semina.
- Analisi preliminare dell'espansione cellulare all'interno del bioreattore OPB.

Nella prima parte l'esigenza basilare era quella di avere un pellet biocompatibile in grado di rimanere in sospensione durante la fase di coltura, che permettesse un'efficiente adesione e proliferazione cellulare e che non degradasse durante la fase di coltura.

Pertanto i pellets dovevano garantire le seguenti specifiche:

- Essere facilmente realizzabili e riproducibili nelle dimensioni e nella struttura.
- Essere facilmente sterilizzabili senza la perdita delle caratteristiche meccaniche.
- Permettere un'efficiente adesione cellulare durante la fase di semina.
- Promuovere l'espansione delle cellule senza alterarne il fenotipo.
- Mantenere la struttura senza andare incontro a degradazione per tutta la durata della prova di coltura.
- Permettere il recupero cellulare al termine della fase di espansione delle cellule senza alterarne la vitalità.

Al fine di realizzare uno scaffold biocompatibile e che non inficiasse la vitalità cellulare, i pellets sono stati realizzati con collagene di tipo I certificato EDQM (European Directorate for the Quality of Medicines & Healthcare), proveniente da animali esenti da BSE (Bovine Spongiform Encephalopathy).

Per sciogliere il collagene è stata utilizzata l'acqua demineralizzata. Solitamente per sciogliere il collagene si utilizzano solventi acidi per abbassare il pH. Se questi solventi

non vengono totalmente rimossi il rischio è quello di avere dei pellets citotossici per le cellule. Utilizzando l'acqua otteniamo un pellet biocompatibile che non andrà ad inficiare la vitalità cellulare. Il collagene, però, fatica a sciogliersi nell'acqua, per questo motivo è stato sviluppato un protocollo ad-hoc che ha previsto l'utilizzo di un agitatore magnetico per realizzare una soluzione omogenea in circa 12 ore (O/N).

Dal punto di vista realizzativo l'idea è stata quella di sviluppare pellets la cui produzione fosse facilmente industrializzabile. Per questo motivo sono state proposte ed analizzate due metodiche di realizzazione:

- Realizzazione in piastra multipozzetto.
- Realizzazione per gocciolamento in azoto liquido.

Nel primo caso la sospensione di collagene è stata colata all'interno di una piastra multipozzetto con 468 pozzetti di dimensioni note e costanti, appositamente progettata per questo lavoro di tesi. Tramite questa metodica sono stati ottenuti pellets di dimensioni millimetriche ed omogenee tra loro.

Nel secondo caso volumi prestabiliti della sospensione di collagene sono stati dispensati all'interno di un contenitore contenente azoto liquido (-196°C). In questo modo sono stati ottenuti pellets sferici di dimensioni millimetriche. L'azoto liquido evaporando non rilascia alcun residuo permettendo di ottenere pellets di solo collagene, senza la necessità di alcun ciclo di lavaggio per eliminare i residui di solvente. In questo modo si riducono i costi e i tempi di produzione.

Analizzando i due processi dal punto di vista dell'industrializzazione del prodotto, la metodica di gocciolamento in azoto, sebbene in fase di progettazione abbia richiesto un'analisi maggiore, si è dimostrata più veloce e automatizzabile. Inoltre, vista la facilità di modifica dei parametri di processo, ha permesso la realizzazione di pellets di dimensioni differenti.

La metodica di produzione in piastra non ha permesso questi vantaggi e questa elasticità. La fase di dispensazione è stata fatta a mano tramite un pipettatore. Questo tipo di operazione è soggetta ad alta variabilità, dovuta alla viscosità della soluzione di collagene, ed è estremamente onerosa per l'operatore, causando, in questo modo, l'allungamento dei tempi di produzione. Per realizzare pellets di dimensioni differenti è necessaria la realizzazione di nuovi stampi con conseguente aumento dei tempi, in fase di progettazione e realizzazione, e aumento dei costi. Inoltre il numero dei pellets realizzabile è legato al

numero dei pozzetti. L'utilizzo di diverse piastre contemporaneamente avrebbe portato ad un aumento dei tempi di produzione da parte dell'operatore e a un ingombro maggiore all'interno del liofilizzatore e della stufa per la reticolazione e la sterilizzazione termica.

Inoltre la piastra in PDMS ha un ciclo di vita limitato, dopo alcuni cicli di processo perde adesività al foglio di alluminio, rendendo necessaria la realizzazione di nuove piastre.

Tramite produzione in azoto, invece, il processo sviluppato è robusto e automatizzato a tal punto da non richiedere l'intervento dell'operatore per tutta la durata della dispensazione.

Dal punto di vista dell'ingombro, i pellets sono raggruppabili all'interno di crogiolini di alluminio, diminuendo in questo modo lo spazio necessario nelle fasi di lavoro successive.

Dal punto di vista realizzativo, i pellets prodotti si differenziano anche nell'omogeneità della struttura creata. Sebbene la realizzazione in piastra permetta di produrre pellets dimensionalmente identici l'uno con l'altro, la metodica di realizzazione non consente di produrre strutture omogenee. Come si è visto, all'interno dello stesso lotto di produzione si riscontrano due strutture completamente diverse tra loro per geometria e dimensioni dei pori: una più compatta e una più porosa. La causa di questo comportamento è poco chiara, ma probabilmente è da attribuire alla fase di congelamento. Nella metodica di produzione in piastra, non subendo un congelamento istantaneo ma più graduale, ogni pellets si struttura in modo differente. Discorso inverso per i pellets prodotti in azoto: la struttura riscontrata è omogenea sia tra pellets dello stesso lotto sia tra pellets con diametro differente, confermando la riproducibilità e la robustezza del processo di produzione.

Questo risultato è confermato dalle immagini SEM dove i pellets prodotti in piastra mostrano una duplice struttura, differente per le dimensioni dei pori. I pellets prodotti in azoto, invece, nonostante le dimensioni differenti, mostrano la stessa struttura superficiale.

Analizzando le prove di bagnabilità e galleggiabilità eseguite sui pellets emerge un altro svantaggio dei pellets prodotti in piastra, rappresentato dall'incongruenza dei risultati ottenuti. Per quanto riguarda la bagnabilità, nonostante il trattamento al plasma abbia migliorato notevolmente il comportamento dei pellets al contatto con il mezzo di coltura, i pellets compatti prodotti in piastra mostrano comunque, all'interno dello stesso pellet, zone in cui il mezzo viene assorbito ed altre, caratterizzate da una diversa colorazione, in cui il mezzo sembra non essere stato assorbito. Quelli porosi prodotti in piastra e i pellets realizzati per gocciolamento in azoto liquido, invece, mostrano una colorazione omogenea.

Dalla prova di galleggiabilità osserviamo che l'unica tipologia di pellets a restare a galla nel mezzo di coltura sono i pellets compatti realizzati in piastra, mentre quelli porosi e quelli prodotti in azoto si depositano sul fondo del recipiente.

Probabilmente la causa di questo comportamento è da attribuire, anche in questo caso, a delle disomogeneità nella fase di congelamento. Probabilmente all'interno dei pellets compatti prodotti in piastra si viene a formare una struttura interna differente con la formazione di un cuore idrofobico e compatto che non permette l'assorbimento del mezzo di coltura e costringe il pellet al galleggiamento. Questa ipotesi, non potendo tagliare i pellets per analizzare la struttura interna senza danneggiarli, non è stata verificata.

Un'ulteriore ipotesi della diversa galleggiabilità potrebbe essere la presenza di bolle all'interno dei pellets compatti prodotti in piastra. Alcune bolle potrebbero essersi formate all'interno dei pellets durante la fase di dispensazione del collagene e a causa di una porosità chiusa, strutturatasi durante il congelamento, essere rimaste intrappolate. La presenza di queste bolle causerebbe la galleggiabilità dei pellets. I pellets porosi prodotti in piastra, invece, avendo pori di dimensioni maggiori e probabilmente una porosità aperta, non permettono la formazione di bolle all'interno del pellet.

I pellets prodotti in azoto subendo un congelamento istantaneo, presentano una struttura omogenea con pori aperti, simile a quella dei pellets porosi prodotti in piastra, seppur con pori di dimensioni inferiori. In questo modo le bolle non rimangono intrappolate nella matrice.

Punto in comune tra le due tipologie di pellets, legato più che altro al materiale di cui sono composti, è la resistenza nel mezzo di coltura. Come si è visto oltre a mantenere la propria integrità strutturale durante la fase di semina ed espansione hanno dimostrato di poter resistere all'interno del mezzo di coltura per più di un anno, a temperatura ambiente, senza degradarsi. Questo risultato è indice della qualità dei trattamenti di liofilizzazione e reticolazione studiati. Nella fase successiva andrebbe studiata e determinata la degradazione dei pellets all'interno del mezzo di coltura a 37°C.

La seconda parte del lavoro è stata incentrata sulla necessità di definire un protocollo di semina efficace per l'adesione delle cellule ai pellets. Primo punto fondamentale è stata la determinazione del numero di cellule e di pellets da inserire all'interno della camera di coltura. Vista la dinamica dell'esperimento, l'adesione cellulare ai pellets è un fenomeno probabilistico ed il numero di cellule per pellets può variare [37]. Come conseguenza le

cellule potrebbero distribuirsi in maniera disuniforme, portando ad avere pellets senza cellule. Per sopperire a questo fenomeno il numero di cellule all'interno della camera è stato calcolato in modo da aumentare la probabilità di adesione ai pellets.

Così la densità di semina iniziale (teorica) nelle camere è stata aumentata rispetto a quella delle colture standard statiche in T-Flask (10000 cellule/ cm<sup>2</sup>) ed è stata portata a 66000 cellule/cm<sup>2</sup>, con una densità di cellule per camera pari a  $2 \times 10^5$  cellule/mL (con 10mL totali di mezzo di coltura per camera).

Avendo deciso di utilizzare un bioreattore, l'OPB, non convenzionale per questa tecnica di coltura cellulare (in letteratura viene fatto largo uso della spinner flask [34, 46]) è stato necessario condurre una serie di prove volte a definire la dinamica di agitazione che meglio si adattasse a questa tipologia di pellets:

- Nella prima prova è stata impostata una velocità tangenziale pari a 1000µm/s con andamento oscillante (angolo di 270°), come da esperimenti standard con l'OPB.
- Nella seconda prova è stata aumentata la velocità a 2000µm/s ed è stato impostato un andamento non oscillante per permettere un rimescolamento migliore dei pellets all'interno della camera.  
Inoltre, vista anche in letteratura la necessità di un andamento ad intermittenza in grado di migliorare l'adesione delle cellule ai pellets [18], la dinamica del bioreattore in questa prova ha previsto 10 minuti di movimento e 10 minuti di pausa.
- Nella terza prova è stata impostata una velocità tangenziale delle camere di coltura pari a 10000µm/s mantenendo l'andamento non oscillante a intermittenza sopra indicato.

Come si è potuto notare aumentando la velocità di rotazione del bioreattore e alternando la rotazione con momenti di pausa, rispetto alla prima prova l'efficienza di semina è aumentata complessivamente del 10%. Cambiando la dinamica di agitazione (oscillante → non-oscillante) ed introducendo la pausa nel protocollo, l'efficienza di semina su pellets è aumentata del 5,57%: da 25,23% (prova n. 1) a 30,80% (prova n. 2). Aumentando la velocità tangenziale da 2000µm/s (prova n. 2) a 10000 µm/s (prova n. 3), invece, l'efficienza di semina è aumentata del 3,5%: da 30,8% a 34,3%. Si ritiene che grazie



all'utilizzo della pausa durante il moto, le cellule abbiano avuto il tempo di depositarsi sui pellets ed aumentare in questo modo l'efficienza di semina.

L'aumento di velocità e la rotazione non oscillante possono aver garantito, invece, un rimescolamento maggiore della soluzione, permettendo così a tutti i pellets di impattare con le cellule ed aumentando in questo modo l'efficienza di semina complessiva. Infatti come indicato anche nei manuali delle varie aziende produttrici di pellets, il rimescolamento di cellule e pellets aumenta la probabilità di impatto e quindi di adesione.

Avendo definito un protocollo di semina efficace e riproducibile, nella parte successiva del Capitolo II sono state confrontate le varie tipologie di pellets prodotte, analizzando separatamente anche le due strutture di pellets prodotti in piastra. In questo caso è stata effettuata una prova di semina con i seguenti parametri:

- Densità di cellule per camera:  $2 \times 10^5$  cellule/mL
- Densità di semina: 66000 cellule/cm<sup>2</sup>
- Quantità di mezzo di coltura: 10mL
- Dinamica del bioreattore OPB: Moto non-oscillante a intermittenza (10 minuti di pausa + 10 minuti di moto)
- Velocità tangenziale: 10000 $\mu$ m/s

Come prima cosa quello che si è notato è che, nonostante la scelta di separare i pellets prodotti in piastra con struttura porosa da quelli con struttura compatta l'efficienza di semina è rimasta comparabile per le due tipologie: 42,90% per quelli compatti e 38,62 per quelli porosi.

Sebbene ci si aspettasse che i pellets porosi, depositandosi sul fondo durante la pausa, permettessero un'efficienza di semina maggiore, i pellets compatti hanno raggiunto alti valori di efficienza probabilmente a causa della dinamica di agitazione all'interno della camera. Durante l'agitazione i pellets compatti si sono bloccati tra il connettore ed il tubo Tygon, permettendo alle cellule di impattare forzatamente con i pellets. Durante la pausa poi, mentre i pellets galleggiavano in superficie, la parte di cellule non aderite ai pellets si è depositata sul fondo. Nonostante la decisione di separare le due strutture, i valori di efficienza di semina sono risultati confrontabili con quelli trovati nella prova precedente (prova n. 3), dove le due strutture sono state inserite nella stessa camera: 34,30%.

Dal punto di vista assoluto, invece, in tutti i casi la quantità di cellule aderite alle pareti della camera è rimasta su valori molto bassi (dal 3 al 6%), mentre la maggior parte delle

cellule recuperate è aderita ai pellets. La quantità di cellule in sospensione nel mezzo è rimasta, come per le prove precedenti, su valori piuttosto elevati: dal 20 al 30%.

La quantità di cellule rimaste in sospensione è da attribuire a due possibili cause: parte delle cellule durante la prova non ha impattato con i pellets e/o, avendo deciso di impostare una densità di semina elevata, il numero di cellule era sovrastimato rispetto alla superficie di semina effettivamente disponibile.

Confrontando, poi, l'efficienza di semina delle varie tipologie di pellets le Azoto<sub>90</sub> hanno garantito un'efficienza maggiore (51,40%) rispetto alle altre tipologie (circa 40%). La spiegazione di questo risultato è, probabilmente, da attribuire alle caratteristiche geometriche e strutturali di questi pellets. Rispetto ai pellets Azoto<sub>50</sub> a parità di superficie totale, presentano una superficie per singolo pellet maggiore. Questo ha permesso alle cellule di impattare in maniera più efficace sui pellets Azoto<sub>90</sub> rispetto ai pellets Azoto<sub>50</sub>. Confrontandoli, invece, con i pellets prodotti in piastra, rispetto a quelli compatti, depositandosi sul fondo durante la pausa, i pellets Azoto<sub>90</sub> hanno permesso un maggior grado di adesione, mentre rispetto a quelli porosi il fattore determinante probabilmente è stato il maggior rimescolamento durante la fase di moto. Avendo un volume maggiore, i pellets prodotti in piastra porosi hanno subito in maniera minore il trascinarsi da parte del mezzo di coltura. Come spiegato in precedenza, un rimescolamento maggiore permette un impatto più efficiente con le cellule e un'adesione maggiore.

In ogni caso però, i valori di efficienza trovati sono inferiori rispetto a quelli trovati in letteratura. Per fare un esempio, in lavori come quelli di Serra et al. [58] o Sart et al. [61] sono state raggiunte efficienze di semina pari all'80%. Questo è dovuto essenzialmente alla dinamica di coltura scelta: in letteratura i tempi di pausa sono di molto superiori ai tempi di moto: 2 minuti di moto ogni 30 o 2 minuti ogni 20. Nel nostro caso invece è stato volutamente scelto di impostare 10 minuti di pausa e 10 minuti di moto. Il rationale di questa scelta risiede nella necessità di dover utilizzare cellule di linea MG63 per le prove di semina. Dovendo progettare un sistema 3D *ex novo*, le cellule di linea garantiscono un comportamento riproducibile tra le diverse camere di coltura e tra le prove. La peculiarità di queste cellule è però la grande capacità di adesione. Scegliendo tempi troppo lunghi di pausa, si sarebbe corso il rischio di ottenere una distribuzione non omogenea delle cellule sui pellets e tra i pellets. Verosimilmente i pellets che durante la pausa si fossero depositati nelle zone superiori, avrebbero avuto un'efficienza di semina maggiore rispetto agli altri.

Inoltre, con tempi troppo lunghi di pausa le cellule sarebbero aderite maggiormente alle pareti della camera di coltura.

Un'alternativa per aumentare l'efficienza di semina poteva essere quella mostrata da Declercq et al. [62] e cioè di effettuare una semina statica di 24 ore su piastre multipozzetto e spostare solo al termine di questa fase i pellets seminati in una spinner flask per la coltura in agitazione. Questa metodica però avrebbe potuto danneggiare le cellule nel trasferimento dalla piastra all'agitatore e avrebbe aumentato sicuramente le operazioni per l'operatore. Ciò sarebbe stato in disaccordo con gli obiettivi della tesi. Infatti l'idea di base era quella di definire un protocollo di semina e coltura semplice, che riducesse al minimo i tempi e le operazioni da compiere sulle cellule da parte dell'operatore. Motivo per cui è stato scelto l'OPB, che permette di unire la fase di semina e quella di coltura.

Un'ulteriore caratteristica del processo di semina riscontrata durante l'analisi della semina è stata la dinamica del recupero cellulare. Nonostante durante la tesi sia stata posta particolare attenzione al recupero cellulare dalle camere di coltura e nonostante l'accortezza di non buttare il PBS usato per il risciacquo delle camere, in nessuna prova è stato possibile ottenere un recupero cellulare pari al 100% delle cellule iniettate. A causa dei vari trattamenti subiti durante la fase di recupero parte delle cellule rimaste in sospensione potrebbe non essere stata recuperata ed essere rimasta nei tubi Falcon o nei pipettatori; per quanto riguarda le cellule aderite ai pellets, parte delle cellule aderite potrebbe essersi staccata durante lo svuotamento delle camere di coltura; per le cellule aderite alle pareti delle camere di coltura, nonostante tutte le camere venissero controllate al microscopio, non è possibile essere sicuri che il trattamento in tripsina abbia staccato realmente tutte le cellule. Questo fatto sottolinea ancora di più i vantaggi di utilizzare un protocollo che consenta sia la fase di semina che quella di coltura; in questo modo si possono limitare le perdite cellulari e i danni subiti dalle cellule.

Al termine della fase di semina, è stata utilizzata la collagenasi di tipo I per sciogliere i pellets e permettere, in questo modo, di recuperare le cellule. È stata utilizzata la collagenasi perché, differentemente dalla tripsina, non danneggia la membrana cellulare [53]. Nonostante ciò, per essere sicuri della sicurezza del trattamento, sono stati calcolati i tempi per la totale digestione dei pellets ed è stata valutata la vitalità delle cellule. Dalle prove si può notare che in soli 15 minuti tutte le tipologie di pellets vengono

completamente digeriti e la quantità di cellule vitali recuperate è prossima al 100%. Inoltre, al termine del trattamento, le cellule sono state seminate su una piastra multipozzetto dimostrando di mantenere la capacità di adesione ed espansione nonostante il trattamento subito.

Nella terza parte di questo lavoro di tesi è stata effettuata una prova di espansione cellulare. La velocità del bioreattore è stata mantenuta, volutamente, costante tra la fase di semina e quella di espansione eliminando però la pausa. La prova è stata condotta con l'intento non abbassare l'agitazione imposta ai pellets, come mostrato in letteratura [18, 34], senza però sollecitare ulteriormente le cellule nel passaggio dalla fase di semina a quella di espansione.

Al termine della prova non si è riscontrata nessuna espansione e il numero di cellule aderite ai pellets è diminuito soprattutto nei tre giorni successivi la semina. Inoltre l'immagine LIVE/DEAD, realizzata al termine della prova di espansione (14 giorni), ha mostrato che le poche cellule rimaste aderite erano comunque morte.

La diminuzione del numero cellulare al termine della fase di semina è ampiamente riscontrata anche in molti casi in letteratura, la differenza è che in questo caso non è iniziata la fase di espansione successiva. Probabilmente le poche cellule rimaste sui pellets erano troppo isolate per ricominciare ad espandersi.

La causa di questo comportamento potrebbe essere dovuto (la scarsa numerosità degli esperimenti impedisce di trarre delle conclusioni definitive) alla differenza del sistema di coltura tra la letteratura e questo lavoro. In letteratura viene utilizzato il bioreattore *spinner-flask*. Questo bioreattore permette un'agitazione maggiore del mezzo di coltura rispetto all'OPB ma viene utilizzato con pellets micrometrici che subiscono diversamente gli effetti degli sforzi di taglio.

In questo caso, nonostante l'efficienza di semina fosse pari al 52,18%, il flusso di mezzo di coltura, generatosi all'interno delle camere, potrebbe aver staccato le cellule dai pellets.

Avendo comunque dimostrato che grazie all'OPB è possibile garantire un'adesione efficace delle cellule ai pellets, un possibile sviluppo futuro potrebbe essere quello di studiare un protocollo di espansione cellulare settando e testando diversi pattern e diverse velocità di rotazione delle camere di coltura. L'ottimizzazione delle condizioni di espansione in dinamico dovrà garantire l'adesione delle cellule ai pellets durante tutta la durata della prova e dovrà permetterne l'espansione senza intaccarne la vitalità.

Definendo i parametri e la dinamica di agitazione per la fase di espansione cellulare avremmo a disposizione un sistema di espansione 3D a base di pellets biocompatibili di collagene da utilizzare nell'ambito delle terapie avanzate, in quei casi in cui, il numero ridotto di cellule utilizzabili, isolate da una biopsia, rende necessaria l'espansione *in-vitro*.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] Hoffman R. M.; *To do tissue culture in two or three dimensions? That is the question*; Stem Cells 1993, 11 (2), 105-111.
- [2] Ratner B. D., Hoffman A. S., Schoen F. J., Lemons J. E., Dyro J., Martinsen O. G., Kyle R., Preim B., Bartz D., Grimmes S., Vallero D., Semmlow J., Murray W. B., Perez R., Bankman I., Dunn S., Ikada Y., Moghe P. V., Constantinides A.; *Biomedical engineering e-Mega reference*; Academic Press 2009.
- [3] Serra M., Brito C., Alves P. M.; *Bioengineering strategies for stem cell expansion and differentiation*; Canal BQ 2010, 7, 30-37.
- [4] Wendt D., Riboldi S. A., Cioffi M., Martin I.; *Potential and bottlenecks of bioreactors in 3D cell culture and tissue manufacturing*; Advanced Materials 2009, 21, 1-16.
- [5] Martin I., Wendt D., Heberer M.; *The role of bioreactors in tissue engineering*; Trends in Biotechnology 2004, 22 (2), 80-86.
- [6] Varani J., Bendelow M. J., Chun J. H., Hillegas W. A.; *Cell growth on microcarriers: comparison of proliferation on and recovery from various substrates*; Journal of Biological Standardization 1986, 14 (4), 331-336.
- [7] Frondoza C., Sohrabi A., Hungerford D.; *Human chondrocytes proliferate and produce matrix components in microcarrier suspension culture*; Biomaterials 1996, 17, 879-888.
- [8] Yang Y., Rossi F. M. V., Putnins E. E.; *Ex vivo expansion of rat bone marrow mesenchymal stromal cells on microcarrier beads in spin culture*; Biomaterials 2007, 28 (20), 3110-3120.
- [9] Lee C. H.; Singla A.; Lee Y.; *Biomedical applications of collagen*; International Journal of Pharmaceutics 2001, 221(1-2), 1-22.
- [10] McPherson J. M., Sawamura S., Amstrong R.; *An examination of the biologic response to injectable, glutaraldehyde cross-linked collagen implants*; Journal of Biomedical Materials Research 1986, 20 (1), 93-107.

- [11] Glowacki J., Mizuno S.; *Collagen scaffolds for tissue engineering*; Biopolymers 2008, 89(5), 338-344.
- [12] Wang Y. & Ouyang F.; *Bead-to-bead transfer of Vero cells in microcarriers culture*; Cytotechnology 1999, 31, 221-224.
- [13] O'Brien F. J., Harley B. A., Yannas I. V., Gibson L.; *Influence of freezing rate on pore structure in freeze-dried collagen-GAG scaffolds*; Biomaterials 2004, 25, 1077-1086.
- [14] Guarnieri D.; *Interazione cellula-materiale*; Dottorato di Ricerca in ingegneria chimica, dei materiali e della produzione XIX ciclo, Università degli Studi di Napoli Federico II.
- [15] Grover C. N., Cameron R. E., Best S. M.; *Investigating the morphological, mechanical and degradation properties of scaffolds comprising collagen, gelatine and elastin for use in soft tissue engineering*; Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials 2012, 10, 62-74.
- [16] Cheng M., Moretti M., Engelmayr G. C., Freed L. E.; *Insulin-like growth factor-I and slow, bi-directional perfusion enhance the formation of tissue-engineered cardiac grafts*; Tissue Engineering Part A 2009, 15 (3), 2009.
- [17] Valonen P. K., Moutos F. T., Kusanagi A., Moretti M. G., Diekmann B. O., Welter J. F., Caplan A. I., Guilak F., Freed L. E.; *In vitro generation of mechanically functional cartilage grafts based on adult human stem cells and 3D-woven poly( $\epsilon$ -caprolactone) scaffolds*; Biomaterials 2010, 31, 2193-2200.
- [18] Storm M. P., Orchard C. B., Bone H. K., Chaudhuri J. B., Welham M. J.; *Three-dimensional culture systems for the expansion of pluripotent embryonic stem cells*; Biotechnology and Bioengineering 2010, 107(4), 683-695.
- [19] Mantero S., Remuzzi A., Raimondi M. T., Ahluwalia A.; *Fondamenti di ingegneria dei tessuti per la medicina rigenerativa*; Patron Editore 2009.
- [20] Horner M., Miller W. M., Ottino J. M., Papoutsakis T.; *Transport in a grooved perfusion flat-bed bioreactor for cell therapy applications*; Biotechnology Progress 1998, 14, 689-698.
- [21] Honegger P.; *Aggregate cell culture*; Altex 1989, 6 (1), 29-36.
- [22] Carrel A.; *On the permanent life of tissues outside of the organism*; Journal of experimental medicine 1912, 15 (5), 516-528.

- [23] Sherwin R. P.; Richters A.; Yellin A. E.; Donovan A. J.; *Histoculture of human breast cancers*; Journal of Surgical Oncology 1980, 13 (1), 9-20.
- [24] Leighton J.; *A sponge matrix method for tissue culture; formation of organized aggregates of cells in vitro*; Journal of the National Cancer Institute 1951, 12 (3), 545-561.
- [25] Wang C., Gong Y., Lin Y., Shen J., Wang D.-A.; *A novel gellan gel-based microcarrier for anchorage-dependent cell delivery*; Acta Biomaterialia 2008, 4 (5), 1226-1234.
- [26] Govoni M., *Riparazione del danno vascolare ischemico ostruttivo del miocardio mediante cellule staminali mesenchimali sottoposte a stimolazione elettromeccanica in bioreattore*; Dottorato di Ricerca in metodologie di ricerca nelle malattie vascolari XXI ciclo, Alma Mater Studiorum – Università di Bologna.
- [27] Ahmadi R., Mordan N., Forbes A., Day R. M.; *Enhanced attachment, growth and migration of smooth muscle cells on microcarriers produced using thermally induced phase separation*; Acta Biomaterialia 2011, 7 (4), 1542-1549.
- [28] van Wezel A. L.; *Growth of cell-strains and primary cells on micro-carriers in homogeneous culture*; Nature 1967, 216 (5110), 64-65.
- [29] van der Velden-de Groot C. A. M.; *Microcarrier technology, present status and perspective*; Cytotechnology 1995, 18, 51-56.
- [30] Maroudas N. G.; *Adhesion and spreading of cells on charged surfaces*; Journal of Theoretical Biology 1975, 49 (1), 417-424.
- [31] Reuveny S., Corett R., Freeman A., Kotler M., Mizrahi A.; *Newly developed microcarrier culturing systems – an overview*; Development in Biological Standardization 1985, 60, 243-253.
- [32] Surrao D. C., Khan A. A., McGregor A. J., Amsden B. G., Waldman S. D., *Can microcarrier-expanded chondrocytes synthesize cartilaginous tissue in vitro?*; Tissue Engineering Part A 2011, 17, 1959-1967.
- [33] Tebb T. A., Tsai S.-W., Glattauer V., White J. F., Ramshaw J. A. M., Werkmeister J. A.; *Development of porous collagen beads for chondrocyte culture*; Cytotechnology 2006, 52 (2), 99-106.
- [34] Sun L.-Y., Hsieh D.-K., Syu W.-S., Li Y.-S., Chiu H.-T., Chiou T.-W.; *Cell proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells on biodegradable*



*microcarriers enhances in vitro differentiation potential*; Cell Proliferation 2010, 43, 445-456.

[35] Nie Y., Bergendahl V., Hei D. J., Jones J. M., Palecek S. P.; *Scalable culture and cryopreservation of human embryonic stem cells on microcarriers*; Biotechnology Progress 2009, 25 (1), 20-31.

[36] Peshwa M. V., Wong K., Hu W.-S.; *Microcarrier culture*; Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation; John Wiley & Sons, Inc. New York 1999, 1781-1785.

[37] Hu W. S., Meier J., Wang D. I. C.; *A mechanistic analysis of the inoculum requirement for the cultivation of mammalian cells on microcarriers*; Biotechnology and Bioengineering 1985, 27, 585-595.

[38] O'Connor K. C. & Papoutsakis E. T.; *Agitation effects on microcarriers and suspension CHO cells*; Biotechnology Techniques 1992, 6 (4), 323-328.

[39] Zhang H.; *The permeability characteristics of silicon rubber*; Society for the Advancement of Material and Process Engineering 2006.

[40] Martens D. E., Nollen E. A. A., Hardeveld M., van der Velden-de Groot C. A. M., de Gooijer C. D., Beuvery E. C., Tramper J.; *Death rate in a small air-lift loop reactor of vero cells grown on solid microcarriers and in macroporous microcarriers*; Cytotechnology 1997, 23, 61-75.

[41] Preissmann A., Wiesmann R., Buchholz R., Werner R. G., Noé W.; *Investigation on oxygen limitations of adherent cells growing on macroporous microcarriers*; Cytotechnology 1997, 24, 121-134.

[42] Neuss S., Stainforth R., Salber J., Schenck P., Bovi M., Knüchel R., Perez-Bouza A.; *Long-term survival and bipotent terminal differentiation of human mesenchymal stem cells (hMSC) in combination with a commercially available three-dimensional collagen scaffold*; Cell Transplantation 2008, 17, 977-986.

[43] Malda J., Kreijveld E., Temenoff J.S., van Blitterswijk C.A., Riesle J.; *Expansion of human nasal chondrocytes on macroporous microcarriers enhances redifferentiation*; Biomaterials 2003, 24, 5153-5161.

[44] Zhao F., Ma T.; *Perfusion bioreactor system for human mesenchymal stem cell tissue engineering: dynamic cell seeding and construct development*; Biotechnology and Bioengineering 2005, 91 (4), 482-493.

- [45] Marcotto A. L.; *L'approccio sperimentale del Quality by Design applicato all'ingegneria dei tessuti: ottimizzazione del processo di semina cellulare nel Bioreattore a Perfusion Oscillante*; Tesi di Laurea Magistrale 2012, Politecnico di Milano.
- [46] Overstreet M., Sohrabi A., Polotsky A., Hungerford D. S., Frondoza C. G.; *Collagen microcarrier spinner culture promotes osteoblast proliferation and synthesis of matrix proteins*; *In Vitro Cellular & Development Biology – Animal* 2003, 39, 228-234.
- [47] Tsai S.-W., Hsu F.-Y., Chen P.-L.; *Beads of collagen-nanohydroxyapatite composites prepared by a biomimetic process and the effects of their surface texture on cellular behaviour in MG63 osteoblast-like cells*; *Acta Biomaterialia* 2008, 4 (5), 1332-1341.
- [48] Tsai S. W., Jeng M. J., Tsay R. Y., Wang Y. J.; *Gel beads composed of collagen reconstituted in alginate*; *Biotechnology Techniques* 1998, 12 (1), 21-23.
- [49] Borg D. J., Dawson R. A., Leavesley D. I., Hutmacher D. W., Upton Z., Malda J.; *Functionale and phenotypic characterization of human keratinocytes expanded in microcarrier culture*; *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2009, 88 (1), 184-194.
- [50] Loh I.-H.; *Plasma surface modification in biomedical application*; *AST Technical Journal* 1999, 10(1), 24-30.
- [51] Spridon D., Ungureanu A., Topala I., Alupei I. C., Dumitrascu N.; *Hydrophylisation of collagen samples for medical application*; *ISPC19* 2009.
- [52] Rowe S. L.; *Mechanical characterization of collagen-fibrin composites for vascular tissue engineering*; Ph.D. in Biomedical Engineering 2007, Rensselaer Polytechnic Institute, Troy, New York.
- [53] Kirkpatrick C. J., Melzner I., Göller T.; *Comparative effects of trypsin, collagenase and mechanical harvesting on cell membrane lipids studied in monolayer-cultured endothelial cells and a green monkey kidney cell line*; *Biochimica et Biophysica Acta* 1985, 846(1), 120-126.
- [54] Abranches E., Bekman E., Henrique D., Cabral J. M. S.; *Expansion of Mouse Embryonic Stem Cells on Microcarriers*; *Biotechnology and Bioengineering* 2007, 96 (6), 1211-1221.
- [55] Fernandes A. M., Marinho P. A. N., Sartore R. C., Paulsen B. S., Mariante R. M., Castilho L. R., Rehen S. K.; *Successful scale-up of human embryonic stem cell production*

*in a stirred microcarrier culture system*; Brazilian Journal of Medical and Biological Research 2009, 42 (6), 515-522.

[56] Levine D. W., Wong J. S., Wang D. I. C., Thilly W. G.; *Microcarrier Cell Culture: New Methods for Research-Scale Application*; Somatic Cell Genetics 1977, 3 (2), 149-155.

[57] Melero-Martin J. M., Dowling M.-A., Smith M., Al-Rubeai M.; *Expansion of chondroprogenitor cells on macroporous microcarriers as an alternative to conventional monolayer systems*; Biomaterials 2006, 27, 2970-2979.

[58] Serra M., Brito C., Leite S. B., Gorjup E., von Briesen H., Carrondo M. J. T., Alves P. M.; *Stirred bioreactors for the expansion of adult pancreatic stem cells*; Annals of Anatomy 2009, 191 (1), 104-115.

[59] Gorodetsky R., Levdansky L., Gaberman E., Gurevitch O., Lubzens E., McBride H.; *Fibrin Microbeads Loaded with Mesenchymal Cells Support Their Long-Term Survival While Sealed at Room Temperature*; Tissue Engineering Part C 2011, 17 (7), 745-755.

[60] Eibes G., dos Santos F., Andrade P. Z., Boura J. S., Abecasis M. M. A., da Silva C. L., Cabral J. M. S.; *Maximizing the ex vivo expansion of human mesenchymal stem cells using a microcarrier-based stirred culture system*; Journal of Biotechnology 2010, 146 (4), 194-197.

[61] Sart S., Schneider Y.-J., Agathos S. N.; *Ear mesenchymal stem cells: An efficient adult multipotent cell population fit for rapid and scalable expansion*; Journal of Biotechnology 2009, 139, 291-299.

[62] Declercq H. A., Gorski T. L., Tielens S. P., Schacht E. H., Cornelissen M. J.; *Encapsulation of Osteoblast Seeded Microcarriers into Injectable, Photopolymerizable Three-Dimensional Scaffolds Based on D,L-Lactide and E-Caprolactone*; Biomacromolecules 2005, 6 (3), 1608-1614.