

# POLITECNICO DI MILANO

Scuola di Ingegneria Industriale e dell'Informazione  
Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica



## **Sviluppo e validazione sperimentale di un modello computazionale per lo studio dell'influenza dei parametri geometrici dello scaffold nei processi di semina dinamica nell'ingegneria dei tessuti**

Relatore: Prof. Ing. Sara MANTERO

Correlatori: Ing. Caterina TURRISI  
Ing. Elena BIANCHI  
Ing. Chiara ARRIGONI  
Ing. Matteo MORETTI

Tesi di Laurea di  
Martina Ignazia SCIOLA  
Matricola 770608

Anno Accademico 2012-2013



# Indice

<b>Sommario</b> .....	IX
<b>Abstract</b> .....	XX
<b>Capitolo I</b> .....	- 1 -
<b>Introduzione</b> .....	- 1 -
1 L'ingegneria dei tessuti .....	- 1 -
1.1 Il processo di ingegnerizzazione di un tessuto.....	- 3 -
2 Problematiche nei processi di ingegneria tessutale .....	- 11 -
3 Fluidodinamica computazionale per l'ingegneria dei tessuti .....	- 15 -
4 Scopo del lavoro .....	- 20 -
<b>Capitolo II</b> .....	- 24 -
<b>Materiali e metodi</b> .....	- 24 -
1 Progettazione e realizzazione degli scaffold .....	- 24 -
2 Simulazioni computazionali .....	- 30 -
2.1 Geometria.....	- 30 -
2.2 Materiale.....	- 32 -
2.3 Simulazione del flusso laminare .....	- 33 -
2.4 Generazione della mesh .....	- 36 -
2.5 Studio .....	- 38 -
3 Caratterizzazione geometrica degli scaffold.....	- 40 -
3.1 Calcolo della porosità.....	- 40 -
3.2 Calcolo della tortuosità.....	- 40 -
3.3 Calcolo della permeabilità.....	- 42 -
3.4 Calcolo dell'area superficiale dello scaffold.....	- 42 -
3.5 Selezione degli scaffold .....	- 42 -
4 Probabilità di adesione .....	- 43 -
5 Analisi statistica.....	- 45 -
6 Metodi sperimentali.....	- 46 -
6.1 Colture cellulari.....	- 46 -
6.2 Protocollo di semina dinamica .....	- 47 -

---

6.3	Protocollo di semina statica.....	- 48 -
6.4	Protocollo di termine dell'esperimento .....	- 49 -
6.5	Tecniche di analisi.....	- 50 -
<b>Capitolo III</b>	.....	- 53 -
<b>Risultati</b>	.....	- 53 -
1	Risultati computazionali .....	- 53 -
1.1	Caratterizzazione geometrica degli scaffold .....	- 53 -
1.2	Caratterizzazione fluidodinamica degli scaffold.....	- 55 -
1.3	Probabilità di adesione .....	- 60 -
2	Risultati sperimentali.....	- 65 -
2.1	Analisi quantitativa: saggio Cy-Quant .....	- 65 -
2.2	Analisi qualitativa: MTT .....	- 69 -
3	Correlazione statistica tra le variabili .....	- 73 -
<b>Capitolo IV</b>	.....	- 75 -
<b>Discussione dei risultati</b>	.....	- 75 -
<b>Conclusione e sviluppi futuri</b>	.....	- 83 -
<b>Bibliografia</b>	.....	- 85 -

---

# Indice delle figure

**Figura S.1:** Schema a blocchi rappresentativo di come i parametri si influenzano tra loro.

**Figura S.2:** Sforzo di taglio sulle superficie di ingresso degli scaffold, utilizzando per tutti una unica legenda di colore che ha come massimo il valore massimo di sforzo di taglio, e cioè quello relativo allo scaffold 4.

**Figura S.3:** Immagini ottenute allo stereomicroscopio in sono raffigurati i campioni 7 (a sinistra) e 10 (a destra) utilizzati per la semina statica.

**Figura S.4:** Immagini ottenute allo stereomicroscopio in sono raffigurati i campioni 8 (a sinistra) e 2 (a destra) utilizzati per la semina dinamica.

**Figure A.1:** Block diagram representative of how the parameters influence each other.

**Figure A.2:** Shear stress on the input surface of the scaffolds, using a single color legend that has as the maximum the maximum value of shear stress, namely that relative to the scaffold 4.

**Figure A.3:** Images obtained with a stereomicroscope represent the scaffold 7 (left) and the scaffold 10 (right) used for static seeding.

**Figure A.4:** Images obtained with the stereomicroscope represent the scaffold 8 (left) and the scaffold 2 (right) used for the dynamic seeding.

**Figura 1:** Schema concettuale di un approccio dell'ingegneria dei tessuti: prelevare un volume ridotto di tessuto dal paziente, isolare le cellule dalla ECM, espanderle in vitro, seminarle su uno scaffold per indurre il corretto differenziamento ed infine impiantare il costruito nel paziente.

**Figura 2:** Immagine di un bioreattore ideale a circuito chiuso per la produzione automatizzata di tessuti ingegnerizzati. Il chirurgo preleva una biopsia dal paziente e lo introduce nel bioreattore all'interno dell'ospedale. Il bioreattore automaticamente isola le cellule, le fa espandere, le semina sullo scaffold e mantiene in coltura il costruito fino a un certo livello di maturazione. Il tutto è mantenuto in camere con condizioni ambientali adeguate. I parametri ambientali della coltura e lo sviluppo del tessuto vengono monitorati e inviati a un

microprocessore per essere analizzati. Questi dati insieme ai dati della cartella clinica del paziente sono utilizzati per valutare automaticamente lo stadio ottimale di maturazione del costrutto per poter pianificare l'impianto da parte del chirurgo stesso. (8)

**Figura 3:** Disegno della camera dell'OPB con lo scaffold vincolato e il mezzo di coltura in rosso

**Figura 4:** Camera di coltura montata sul disco di supporto. A) Connettori con ghiera d'acciaio e patches per lettura di O<sub>2</sub> e pH. B) Cameretta porta scaffold. C) Connettore luer-lock. D) Tubo in silicone.

**Figura 5:** A sinistra è riportata una configurazione del vecchio sistema di aggancio: le camere devono essere inserite o estratte una di seguito all'altra. A destra invece è riportato il nuovo sistema di aggancio, in cui ogni camera è indipendente dalle altre grazie all'aggancio magnetico del disco al supporto rettangolare.

**Figura 6:** Sezione trasversale dello scaffold con le fibre a 45° (a) e 90°(b) con i vettori velocità all'interno degli scaffold (22).

**Figura 7:** Distribuzione delle cellule nello scaffold e nella cavità al tempo  $t=2s$  con pressione di vuoto pari a  $-20kPa$ , valore che ha mostrato il miglior risultato. Le cellule sono state colorate in base al tempo di residenza (18).

**Figura 8:** A sinistra (fig.a) è riportato il grafico energia-temperatura, in cui è possibile individuare per quali intervalli di energia temperatura le particelle aderiscono (stick), rimbalzano (rebound), si distendono (spread) o si distruggono (splash) nella formulazione "wall film". A destra (fig.b) sono rappresentate le diverse interazioni tra la particella e il substrato (23).

**Figura 9:** Esempio delle simulazioni di semina svolte da Robu et al. A) Condizione iniziale. B), C), D) sono le diverse situazioni finali ottenute con diverse condizioni di interazione tra cellule e scaffold e tra cellule stesse. L'interazione tra cellule è maggiore nel caso D e minore nel caso C (25).

**Figura 10:** Schema a blocchi rappresentativo di come i parametri si influenzano tra loro.

**Figura 11:** Esempio di uno scaffold (scaffold 1) progettato con il software Creo.

**Figura 12:** Esempio di scaffold (scaffold 10) progettato, in cui possiamo vedere il diametro delle fibre (400  $\mu\text{m}$ ), la loro distanza (800  $\mu\text{m}$ ) e gli angoli tra le fibre appartenenti a piani diversi (60°-120°).

**Figura 13:** Formula chimica dell'acido polilattico (PLA)

**Figura 14:** Stampante 3D utilizzata per la realizzazione degli scaffold in PLA

**Figura 15:** Esempio di G-Code per la realizzazione di uno strato dello scaffold

**Figura 16:** Alcuni scaffold prima dell'utilizzo negli esperimenti di semina. A) Scaffold n°1, fibre distanti 0,4 mm, angoli 0° e 90°; B) Scaffold n°7, fibre distanti 0,8 mm, angoli 0° e 90°; C) Scaffold n°2, fibre distanti 0,4 mm, angoli 0° e 90° con sfasamento; D) Scaffold n°8, fibre distanti 0,8 mm, angoli 0° e 90° con sfasamento; E) Scaffold n°4, fibre distanti 0,4 mm, angoli 0°, 60°, 120°; F) Scaffold n°10, fibre distanti 0,8 mm, angoli 0°, 60°, 120°.

**Figura 17:** Geometria iniziale del volume fluido: al centro lo scaffold e ai lati i due cilindri con altezza 6 mm e sezione 6,35 mm, adiacenti alla struttura porosa.

**Figura 18:** Geometria costruita per le simulazioni computazionali in Comsol. In alto si può osservare la simmetria dello scaffold a livello della superficie di ingresso/uscita dello scaffold., mentre in basso è riportato un esempio di geometria completa utilizzato nelle simulazioni.

**Figura 19:** Schermata in Comsol 4.2 in cui è possibile settare i parametri del fluido.

**Figura 10:** Esempio della mesh utilizzata nello scaffold 1.

**Figura 21:** Definizione di tortuosità (31).

**Figura 22:** Le Streamline tracciate lungo una delle geometrie studiate (poroso n° 2), impostando la densità di distribuzione uniforme e la distanza tra i punti di inizio di 0,015 mm.

**Figura 23:** Camera di coltura dell'OPB assemblata.

**Figura 24:** A destra un'immagine della fase di riempimento della camera di coltura, a sinistra la camera di coltura pronta per essere inserita nell'incubatore

**Figura 25:** Reazione di riduzione dell'MTT in formazano, che avviene all'interno dei mitocondri di cellule vive

**Figura 26:** Sforzo di taglio sulle superficie di ingresso degli scaffold, utilizzando per tutti una unica legenda di colore che ha come massimo il valore massimo di sforzo di taglio, e cioè quello relativo allo scaffold 4.

**Figura 27:** Sforzo di taglio sulle superficie di uscita degli scaffold, utilizzando per tutti una unica legenda di colore che ha come massimo il valore massimo di sforzo di taglio, e cioè quello relativo allo scaffold 4.

**Figura 28:** Confronto tra gli scaffold, visti tridimensionalmente, relativamente allo sforzo di taglio sulla superficie delle fibre, utilizzando una unica legenda che ha come valore massimo il massimo valore di sforzo di taglio trovato.

**Figura 29:** Particelle distribuite nel dominio a monte dello scaffold al tempo 0.

**Figura 30:** Particelle trascinate dal fluido al tempo 10 secondi.

**Figura 31:** Particelle trascinate dal fluido al tempo 20 secondi.

**Figura 32:** Particelle trascinate dal fluido al tempo 30 secondi.

**Figura 33:** Particelle trascinate dal fluido al tempo 40 secondi.

**Figura 34:** Dettaglio delle particelle trascinate dal fluido al tempo 40 secondi.

**Figura 35:** Immagini ottenute allo stereomicroscopio relative a ciascuno scaffold utilizzato per la semina statica, mettendo in evidenza la superficie in cui è stata deposta la sospensione cellulare e quella opposta. In ciascuna immagine è riportato il numero dello scaffold raffigurato nella riga.

**Figura 36:** Immagini ottenute allo stereomicroscopio relative a ciascuno scaffold utilizzato per la semina dinamica, mettendo in evidenza la superficie in cui è stata deposta la sospensione cellulare e quella opposta. Nelle immagini a sinistra è riportato il numero dello scaffold raffigurato nella riga.

**Figura 37:** Dettaglio dello strato cellulare adeso sullo scaffold 7 utilizzato per la semina statica nel lato in cui è stata deposta la sospensione cellulare.

**Figura 38:** Confronto tra lo scaffold 2 realizzato con la stampante 3D (a sinistra) e quello realizzato con il CAD (a destra).



---

# Indice delle tabelle

**Tabella S.1:** Le 12 tipologie di scaffold, indicando per ciascuna l'orientamento dei piani adiacenti e l'eventuale sfasamento delle fibre, la distanza tra le fibre dello stesso piano, la porosità.

**Tabella S.2:** Valori di porosità, tortuosità, permeabilità e area superficiale ottenuti dalle simulazioni computazionali per ciascuno dei sei scaffold selezionati.

**Tabella S.3:** Efficienza di semina ottenuta per ciascuno scaffold utilizzato per la semina statica o dinamica.

**Tabella S.4:** Valori del coefficiente di correlazione di Spearman calcolato per ciascuna coppia di parametri.

**Table A.1:** The 12 types of scaffolds, indicating for each one orientation of the adjacent planes, and any shift of the fibers, distance between fibers of the same plan, porosity.

**Table A.2:** Values of porosity, tortuosity, permeability and surface area obtained from computational simulations for each of the six selected scaffolds.

**Table A.3:** Efficiency of seed obtained for each scaffold used for static or dynamic seeding.

**Table A.4:** Values of the Spearman correlation coefficient calculated for each pair of parameters.

**Tabella 1:** Stadi di sviluppo delle applicazioni cliniche e delle sperimentazioni di alcuni tessuti nell'ingegneria tessutale (5), (3), (6).

**Tabella 2:** Efficienza di semina e vitalità normalizzata al variare del tipo di scaffold e del tipo di semina.

**Tabella 3:** Sono elencate le 12 tipologie di scaffold, indicando per ciascuno l'orientamento dei piani adiacenti e l'eventuale sfasamento delle fibre, il diametro delle fibre, la distanza tra le fibre dello stesso piano, la porosità ottenuta come rapporto tra volume vuoto e volume pieno.

**Tabella 4:** In tabella sono riportati i diversi parametri relativi alle mesh realizzate.

**Tabella 5:** Valori di porosità, permeabilità, tortuosità e area superficiale di ciascuno scaffold scelto.

**Tabella 6:** Nella tabella sono riportati i valori di massimo shear stress in mPa, di massima velocità in mm/s e la differenza di pressione tra ingresso e uscita in Pa.

**Tabella 7:** Area superficiale di ciascuno scaffold con valori alti di shear stress.

**Tabella 8:** Valori di probabilità di adesione ottenuti per ciascuno scaffold.

**Tabella 9:** Efficienza di semina ottenuta per ciascuno scaffold utilizzato per la semina statica o dinamica.

**Tabella 10:** Valori del coefficiente di correlazione di Spearman calcolato per ciascuna coppia di parametri.

**Tabella 11:** Valori dei parametri relativi a ciascuno scaffold.

**Tabella 12:** Efficienza di semina relativa a ciascun campione utilizzato nella semina statica e dinamica

---

# Indice dei grafici

**Grafico S.1:** Andamento degli shear stress per ogni scaffold, calcolati su ogni elemento della mesh sulle fibre degli scaffold stessi. In ordinate ci sono i valori di shear stress in Pa, mentre in ascisse il numero dell'elemento della mesh normalizzato rispetto al numero totale degli elementi.

**Grafico S.2:** Distribuzione delle cellule per intervalli di velocità. Nella legenda i valori sono espressi in m/s.

**Grafico S.3:** Efficienza di semina degli scaffold utilizzati per la semina dinamica rapportata al massimo valore di efficienza trovato (9,52% relativo allo scaffold 4).

**Graph A.1:** Trend of shear stress for each scaffold, calculated on each element of the mesh on the scaffolds fibers. In y-axes there are the shear stress values expressed in Pa, while in x-axes the number of the mesh element normalized compared to the total number of elements.

**Graph A.2:** Distribution of particles for speed ranges. In the legend the values are expressed in m/s.

**Graph A.3:** Seeding efficiency of the scaffolds used for dynamic seeding, compared to the maximum value found (9.52% relative to the scaffold 4).

**Grafico 1:** L'efficienza di semina è influenzata dalla velocità del fluido e tempo di semina, mentre non è influenzata dalla densità di semina. Al contrario la vitalità cellulare risulta significativamente più alta per basse densità cellulari.

**Grafico 2:** In alto è riportato l'andamento dell'efficienza di semina al variare della densità di semina e del tempo di semina, fissata la velocità del flusso; al centro l'andamento dell'efficienza di semina al variare della velocità di flusso e della densità cellulare, fissato il tempo di semina; in basso l'andamento dell'efficienza di semina al variare della velocità di flusso e del tempo di semina, fissate le densità di semina.

**Grafico 3:** A) Valori di sforzo di taglio nelle pareti dello scaffold rispettivamente a ciascuna mesh quadratica. In ordinata vi sono i valori di sforzo di taglio puntuali espressi in Pa, in ascissa il numero di elementi della mesh normalizzato. B) Shear rate calcolato su una linea dello scaffold con le mesh quadrate e lineari utilizzate per il confronto.

**Grafico 4:** Confronto tra i profili di velocità calcolati lungo una linea con la mesh quadratica meno fitta e la mesh lineare più fitta.

**Grafico 5:** Curva di calibrazione a 8 punti, realizzata con il kit Cyquant utilizzato per i saggi effettuati. In ascissa è riportata la concentrazione di DNA in ng/ml , mentre in ordinata i valori di fluorescenza relativi ai valori di concentrazione di DNA.

**Grafico 6:** Andamento degli shear stress per ogni scaffold, calcolati su ogni elemento della mesh sulle fibre degli scaffold stessi. In ordinate ci sono i valori di shear stress in Pa, mentre in ascisse il numero dell'elemento della mesh normalizzato rispetto al numero totale degli elementi.

**Grafico 7:** Distribuzione in percentuale degli shear stress sugli scaffold, considerando quattro range, riportati nella legenda, i cui valori sono espressi in Pa.

**Grafico 8:** Distribuzione delle cellule per intervalli di velocità. Nella legenda i valori sono espressi in m/s.

**Grafici 9:** Percentuale di cellule raccolte su ciascun campione normalizzata rispetto all'aliquota di riferimento relativa (NCV). Sono state calcolate le percentuali di cellule adese sullo scaffold, sulla camera e sospese nel mezzo.

**Grafico 10:** Efficienza di semina degli scaffold utilizzati per la semina dinamica rapportata al massimo valore di efficienza trovato (9,52% relativo allo scaffold 4).

**Grafico 11:** Numero medio di cellule raccolte nei diversi campioni statici e dinamici, considerando il contributo sullo scaffold, nel mezzo di coltura e nella camera.

**Grafico 12:** Correlazione tra probabilità di adesione e efficienza di semina

**Grafico 13:** Percentuale di particelle con valori di velocità all'interno del range riportato nella legenda in cui le velocità sono espresse in m/s.

**Grafico 14:** Correlazione statistica tra la probabilità di adesione e l'efficienza di semina.

# Sommario

Le problematiche legate ai trattamenti di patologie, che causano malfunzionamento o perdita di funzionalità degli organi, hanno orientato la ricerca scientifica verso l'ingegneria dei tessuti, che prevede l'utilizzo di cellule prelevate da donatore, associate a supporti tridimensionali e poste in coltura in determinate condizioni per lo sviluppo di sostituti biologici in grado di mantenere, migliorare o ripristinare le funzioni dei tessuti o organi danneggiati.

Il processo di ingegnerizzazione dei tessuti prevede diverse fasi concatenate tra di loro in cui il risultato di ognuna determina quello della fase successiva.

Una delle problematiche principali legate ai processi di ingegnerizzazione dei tessuti è legata alla loro riproducibilità e affidabilità. La ricerca si propone quindi di individuare quali parametri influenzino ciascuna fase per poterli controllare e rendere i processi più riproducibili e affidabili.

La semina cellulare su supporti tridimensionali è una fase fondamentale nel processo di ingegnerizzazione dei tessuti. La tecnica tradizionale prevede una semina in condizioni statiche effettuate manualmente, in cui le cellule sono sottoposte soltanto alla forza di gravità. Il risultato è un costrutto poco omogeneo e scarsamente riproducibile.

Per ottimizzare il processo di semina sono stati sviluppati diversi bioreattori capaci di creare condizioni dinamiche in cui il mezzo di coltura e lo scaffold sono in movimento relativo. I risultati ottenuti sono migliori in termini di uniformità della distribuzione cellulare. Il movimento relativo tra mezzo di coltura e scaffold all'interno dei bioreattori comporta l'introduzione di una serie di variabili che influenzano il processo, ma non sempre è possibile controllarle o è noto come interagiscono tra loro al fine di rendere riproducibile e controllabile il processo.

La ricerca si propone di individuare con diversi metodi quali siano tali parametri e quali i loro valori desiderabili per ottimizzare il processo.

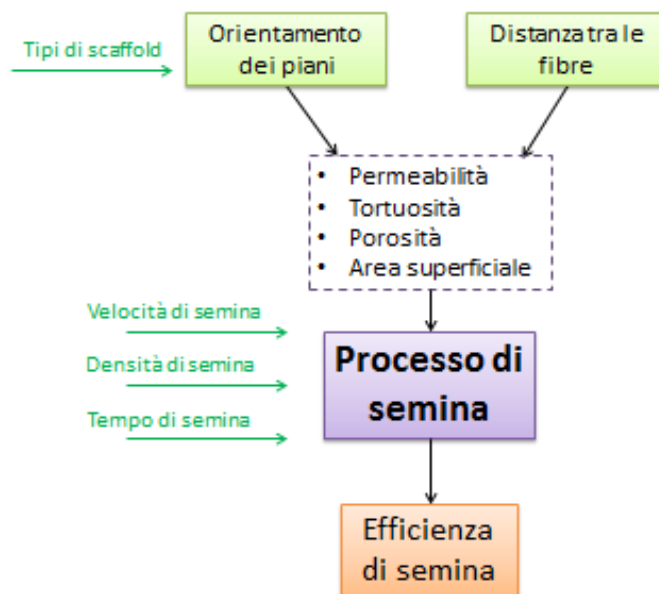
Uno dei metodi utilizzati in letteratura è rappresentato dalle campagne sperimentali, in cui si modifica un parametro alla volta, ipotizzando che siano tra loro

indipendenti, o si valutano le diverse combinazioni per individuare quella che fornisce il miglior risultato.

Un altro approccio consiste nell'utilizzo di tecniche computazionali finalizzate a ottimizzare il processo e il sistema in fase di progettazione.

Queste tecniche costituiscono un valido strumento non distruttivo per individuare quali parametri entrano in gioco all'interno del bioreattore. Numerosi lavori in letteratura mostrano le diverse applicazioni delle tecniche computazionali nell'ingegneria dei tessuti, quali la simulazione della crescita del tessuto, l'individuazione del pattern idrodinamico del sistema, la simulazione del processo di semina.

Lo scopo di questo lavoro di tesi è stato sviluppare un modello computazionale per la semina dinamica in perfusione, che determinasse il ruolo e l'influenza della geometria dello scaffold sul risultato, in modo da poter effettuare un controllo sui parametri e rendere il processo riproducibile (Figura S.1).



*Figura S.1: Schema a blocchi rappresentativo di come i parametri si influenzano tra loro.*

Sono stati svolti inoltre alcuni esperimenti sugli scaffold selezionati al fine di validare il modello sviluppato, utilizzando il bioreattore a perfusione oscillante (OPB).

## Materiali e metodi

Gli scaffold, progettati con Creo (Parametric Technology Corporation, PTC), sono costituiti da fibre con diametro di 400  $\mu\text{m}$ , con una distanza pari a 400  $\mu\text{m}$  o 800  $\mu\text{m}$ . Le fibre sono disposte secondo diversi orientamenti rispetto a una direzione di riferimento. È stata valutata la porosità degli scaffold per fare una prima scelta degli scaffold da analizzare e sono stati scelti valori di porosità intorno al 60% e al 74% (Tabella S.1).

	SCAFFOLD	DIST. FIBRE [ $\mu\text{m}$ ]	POROSITA'
1	0_90	400	59,68%
2	0_90 sfasati	400	59,80%
3	0_90_45_135	400	53,00%
4	0_60_120	400	60,14%
5	0_60_150	400	59,76%
6	0_36_72_108	400	59,70%
7	0_90	800	73,94%
8	0_90 sfasati	800	73,19%
9	0_90_45_135	800	69,14%
10	0_60_120	800	76,19%
11	0_60_150	800	73,14%
12	0_36_72_108	800	73,16%

*Tabella S.1: Le 12 tipologie di scaffold, indicando per ciascuna l'orientamento dei piani adiacenti e l'eventuale sfasamento delle fibre, la distanza tra le fibre dello stesso piano, la porosità.*

Le simulazioni computazionali sono state eseguite con il software Comsol 4.3. La geometria è stata semplificata per ridurre il carico computazionale: è stato considerato un tratto lineare della camera di coltura a monte e a valle dello scaffold, rappresentando inoltre solo un quarto della sezione dello scaffold sfruttando le simmetrie geometriche esistenti.

Il movimento del mezzo di coltura è laminare con profilo parabolico ed è stato studiato in condizioni stazionarie. Sulle pareti dello scaffold la velocità è stata impostata pari a zero.

Al modello simulante il flusso laminare è stato poi aggiunto un modello in grado di stimare le traiettorie di particelle sferiche, secondo un modello "newtoniano", allo scopo di simulare il comportamento della componente cellulare e confrontare la

probabilità di adesione tra i diversi scaffold. Il modulo delle particelle è stato studiato in condizioni tempo-dipendenti per 40 secondi.

Le simulazioni computazionali sono state svolte su sei scaffold diversi selezionati in base alla porosità (60% e 74%) e hanno permesso di caratterizzare gli scaffold in termini di tortuosità, permeabilità, area superficiale e probabilità di adesione. La tortuosità è stata ricavata come rapporto tra la distanza percorsa dalle particelle di fluido e la minima lunghezza lineare che connette il punto di entrata e di uscita, L'area superficiale è stata stimata utilizzando i dati relativi alla discretizzazione. La probabilità di adesione è stata ricavata come rapporto tra il numero di particelle all'interno dello scaffold con una velocità minore di  $1,5 \cdot 10^{-8}$  m/s, (corrispondente alle sole particelle localizzate in prossimità della parete e assimilabile ad una velocità nulla) e il numero di particelle totale.

Gli scaffold sono stati realizzati in PLA con una stampante 3D per effettuare gli esperimenti di semina cellulare dinamica e statica, in cui sono state utilizzate le cellule MG63. Dopo un tempo di semina pari a 24 ore, sono stati effettuati i saggi Cy-Quant per determinare la quantità di DNA sugli scaffold e MTT per un'analisi qualitativa del risultato della semina cellulare.

In seguito è stata fatta un'analisi statistica preliminare basata sull'indice di correlazione di Spearman per verificare se ci fosse una correlazione tra i diversi parametri geometrici e fluidodinamici dello scaffold, tra essi e la probabilità di adesione e tra la probabilità di adesione e l'efficienza di semina per poter validare il modello computazionale.

## **Risultati**

I risultati computazionali riguardo i parametri geometrici degli scaffold sono riportati nella Tabella S.2.

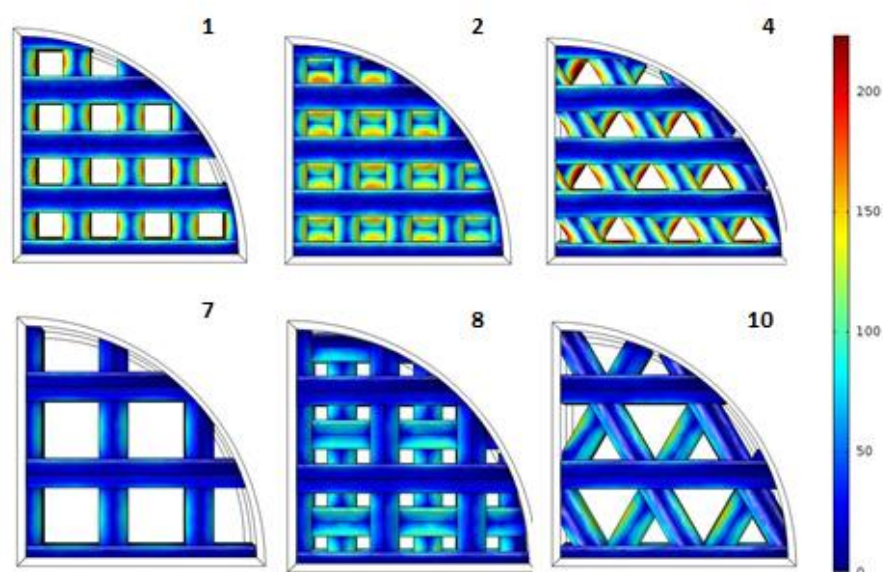
Lo scaffold 4 mostra il maggior valore di area superficiale, parametro proporzionale alla possibilità che le cellule aderiscano allo scaffold avendo a disposizione una maggior superficie. La tortuosità a parità di disposizione delle fibre non varia significativamente. La permeabilità non ha un andamento dipendente dagli altri parametri. Essa risulta più alta per lo scaffold 7.



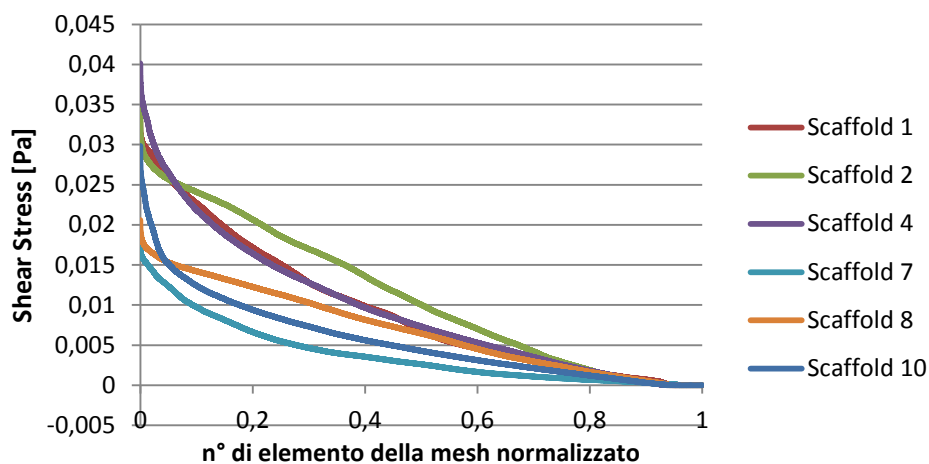
Scaffold	Porosità	Tortuosità	Permeabilità [mm <sup>2</sup> ]	Area superficiale [mm <sup>2</sup> ]
1	59,68%	1,06	0,06885	447,2
2	59,80%	1,14	0,05175	443,6
4	60,14%	1,7	0,05625	489,6
7	73,94%	1,06	0,2538	305,56
8	73,19%	1,15	0,14895	307,28
10	76,19%	1,49	0,1476	346,8

*Tabella S.2: Valori di porosità, tortuosità, permeabilità e area superficiale ottenuti dalle simulazioni computazionali per ciascuno dei sei scaffold selezionati.*

Dalle simulazioni computazionali sono state ottenute le distribuzioni degli shear stress per ciascuno scaffold (Figura S.2). Il valore massimo di shear stress è stato trovato nello scaffold 4, ma, osservando le distribuzioni degli shear stress (Grafico S.2), lo scaffold 2 risulta avere una maggior percentuale di superficie con shear stress più alti.

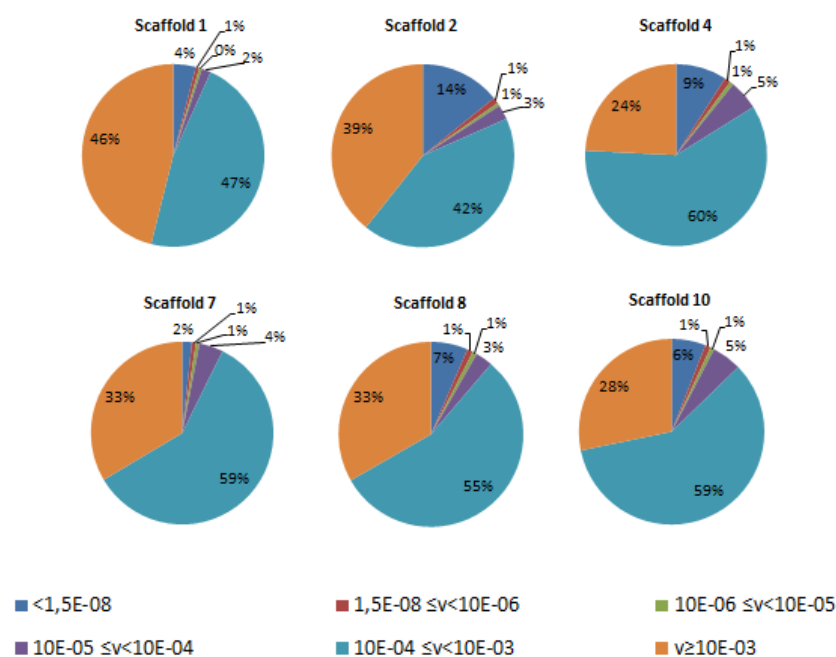


*Figura S.2: Sforzo di taglio sulle superficie di ingresso degli scaffold, utilizzando per tutti una unica legenda di colore che ha come massimo il valore massimo di sforzo di taglio, e cioè quello relativo allo scaffold 4.*



*Grafico S.1: Andamento degli shear stress per ogni scaffold, calcolati su ogni elemento della mesh sulle fibre degli scaffold stessi. In ordinate ci sono i valori di shear stress in Pa, mentre in ascisse il numero dell'elemento della mesh normalizzato rispetto al numero totale degli elementi.*

Dal confronto tra i valori di probabilità di adesione delle particelle su ciascuno scaffold (Grafico S.2), emerge che lo scaffold che presenta la maggior probabilità di adesione risulta essere il 2, mentre lo scaffold 7 è quello che presenta la minor probabilità di adesione.



*Grafico S.2: Distribuzione delle cellule per intervalli di velocità. Nella legenda i valori sono espressi in m/s.*

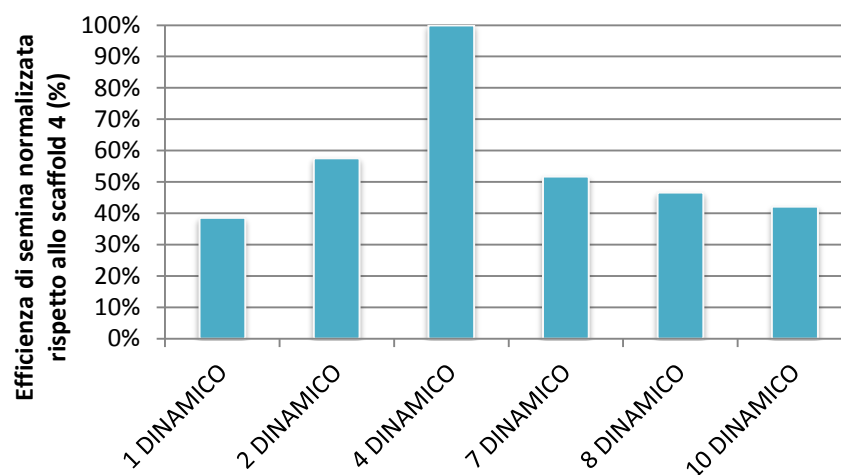
I risultati sperimentali hanno mostrato un'efficienza della semina statica maggiore rispetto a quella dinamica (Tabella S.3).

	Scaffold	Efficienza di semina
<b>Statici</b>	1	45,57%
	2	81,93%
	4	94,12%
	7	78,36%
	8	95,35%
	10	97,08%
<b>Dinamici</b>	1	3,67%
	2	5,48%
	4	9,52%
	7	4,93%
	8	4,44%
	10	4,01%

*Tabella S.3: Efficienza di semina ottenuta per ciascuno scaffold utilizzato per la semina statica o dinamica.*

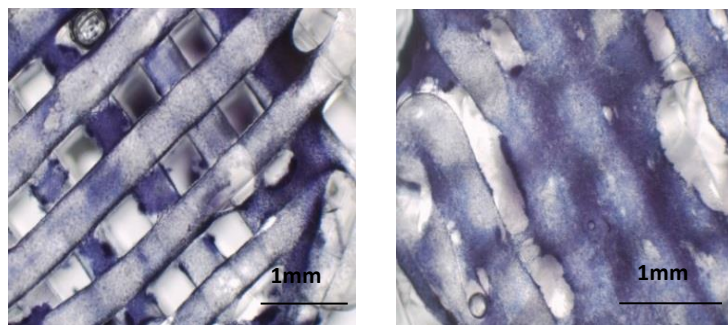
Negli scaffold utilizzati per la semina statica le cellule hanno aderito solo sul lato dove è stata deposta la sospensione cellulare.

Confrontando tra loro gli scaffold utilizzati per la semina dinamica, lo scaffold 4 risulta quello con il miglior risultato di efficienza di semina (Grafico S.3).

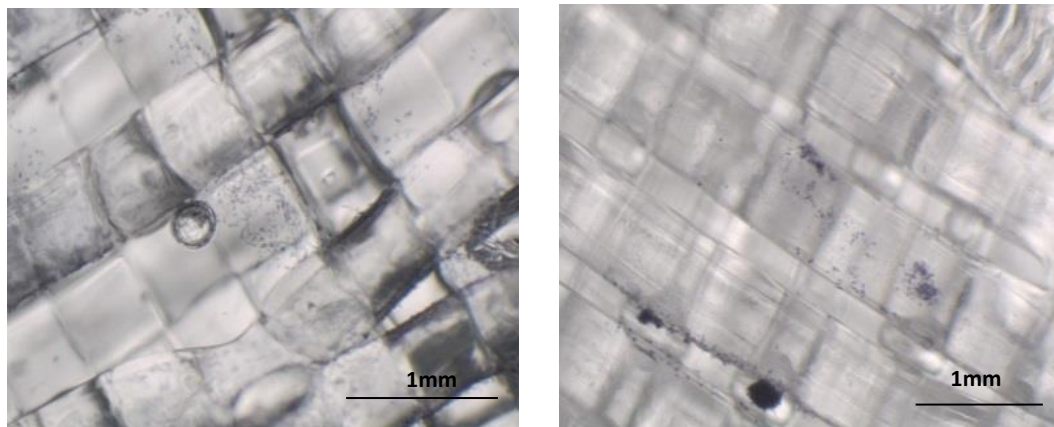


*Grafico S.3: Efficienza di semina degli scaffold utilizzati per la semina dinamica rapportata al massimo valore di efficienza trovato (9,52% relativo allo scaffold 4).*

Il saggio MTT (bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) permette di osservare qualitativamente l'uniformità di semina. Le immagini sono state ottenute con lo stereomicroscopio, il quale però non permette di osservare in profondità all'interno dello scaffold. È possibile osservare il monolayer cellulare sugli scaffold utilizzati per la semina statica, mentre sugli scaffold utilizzati per la semina dinamica le poche cellule adese sono più uniformemente distribuite sulle fibre (Figura S.3- S.4).



*Figura S. 3: Immagini ottenute allo stereomicroscopio in sono raffigurati i campioni 7 (a sinistra) e 10 (a destra) utilizzati per la semina statica.*



*Figura S. 4: Immagini ottenute allo stereomicroscopio in sono raffigurati i campioni 8 (a sinistra) e 2 (a destra) utilizzati per la semina dinamica.*

Nella tabella (Tabella S.4) sono riportati i valori del coefficiente di correlazione di Spearman per ciascuna coppia di variabili.

	Porosità	Tortuosità	Permeabilità	Area superficiale	Probabilità di adesione	Efficienza	Area con max shear	Velocità max	Velocità media
Porosità	1	0,319	0,657	-0,657	-0,314	-0,029	-0,66	-0,86	-0,886
Tortuosità	0,319	1	-0,29	0,377	0,58	0,406	-0,58	0,551	-0,29
Permeabilità	0,657	-0,29	1	-0,829	-0,77	-0,371	-0,83	0,257	-0,886
Area superficiale	-0,657	0,377	-0,829	1	0,486	0,2	0,657	-0,543	0,714
Probabilità di adesione	-0,314	0,58	-0,77	0,486	1	0,6	0,486	0,771	0,657
Efficienza	-0,029	0,406	-0,371	0,2	0,6	1	0,543	0,543	0,143
Area con max shear	-0,657	-0,58	-0,829	0,657	0,486	0,543	1	0,143	0,714
Velocità massima	-0,86	0,551	-0,543	0,771	0,2	0,143	0,371	1	0,2
Velocità media	-0,88	-0,29	-0,886	0,714	0,657	0,143	0,714	0,2	1

*Tabella S.4: Valori del coefficiente di correlazione di Spearman calcolato per ciascuna coppia di parametri.*

## Discussione

Un aspetto cruciale dell'ingegnerizzazione dei tessuti consiste nel riuscire a controllare i parametri che influenzano le diverse fasi per rendere il processo riproducibile. La semina cellulare statica risulta scarsamente controllabile e riproducibile. Una valida alternativa sembra essere la semina dinamica, in cui una serie di parametri interdipendenti tra di loro influiscono sul risultato e in cui lo scaffold introduce una serie di variabili geometriche e fluidodinamiche difficili da valutare con sistemi non invasivi e non distruttivi.

Questo lavoro di tesi utilizza un modello computazionale per caratterizzare diversi scaffold in termini di tortuosità, permeabilità, area superficiale e probabilità di adesione.

La permeabilità ha dei valori mediamente più alti negli scaffold con porosità maggiore. L'area superficiale mostra dei valori più alti negli scaffold con porosità minore con una differenza di circa 100 mm<sup>2</sup> rispetto a quella degli scaffold con porosità maggiore.

Si nota che scaffold con organizzazione geometrica delle fibre uguale, ma distanza tra le fibre diversa, hanno gli stessi valori di tortuosità.

Confrontando gli scaffold tra loro, è emerso che quelli con porosità intorno al 60% hanno dei valori di shear stress più alti rispetto a quelli con porosità maggiore.

Sulla base dei parametri geometrici sembrerebbe che lo scaffold 4 sia quello più adatto tra quelli analizzati e il 7 quello meno adatto. Nel processo di semina si ricercano generalmente shear omogeneamente bassi, ma è difficile stabilire una soglia poiché si devono considerare le condizioni di velocità e gli altri parametri.

Dall'analisi statistica emerge che i parametri dello scaffold con una correlazione forte negativa tra di loro sono la permeabilità con l'area superficiale, la velocità massima, l'area con massimo shear stress. Una correlazione negativa invece emerge anche tra la porosità e le velocità media e massima. Una correlazione positiva è riscontrata tra la velocità media e l'area con il massimo shear stress.

Dalla correlazione tra la probabilità di adesione e i parametri dello scaffold sembrerebbe che essa abbia una correlazione forte positiva con la velocità massima e negativa con la permeabilità. In fase di progettazione sembrerebbe opportuno quindi far sì che la velocità massima aumenti e la permeabilità diminuisca. Sarebbe opportuno anche indagare per quali range di valori di entrambe i parametri sia valida questa correlazione. Inoltre è da tenere in considerazione che i parametri non sono indipendenti tra loro, pertanto la variazione di uno porta alla variazione di altri.

Una correlazione debole è stata trovata tra la tortuosità e la probabilità di adesione.

Inoltre per validare il modello è stata valutata la correlazione tra probabilità di adesione e l'efficienza di semina ed è stato ricavato un valore pari a 0,6. Il valore non può essere definito statisticamente significativo, ma questo potrebbe essere dovuto alle semplificazioni computazionali e alla bassa risoluzione nella realizzazione degli scaffold.

### **Conclusioni e sviluppi futuri**

L'obiettivo di questo lavoro di tesi è mostrare come lo scaffold non sia un parametro trascurabile nel processo di semina, ma possieda variabili geometriche e fluidodinamiche che influenzano il risultato finale del processo di ingegnerizzazione dei tessuti. Si è studiato un modello computazionale che potesse permettere di caratterizzare lo scaffold in modo da ricavare informazioni utili per il suo utilizzo nei processi di ingegnerizzazione dei tessuti in bioreattore.

I risultati ottenuti dal modello computazionale ci permettono di individuare come i parametri geometrici dello scaffold, relativi a porosità, tortuosità, permeabilità e area superficiale, influiscono sulla fluidodinamica del sistema e di conseguenza sul processo di semina. Il calcolo della probabilità di adesione consente inoltre di fare un'analisi predittiva sul comportamento del sistema "scaffold" durante la fase di semina dinamica.

Sono stati condotti poi degli esperimenti per validare il modello computazionale, ma i problemi legati alla realizzazione degli scaffold e una scarsa numerosità di esperimenti non permette di trovare una correlazione significativa.

Ulteriori passi avanti potrebbero riguardare la definizione un modello che riproduca più fedelmente la realtà, eliminando il più possibile le semplificazioni effettuate per contestualizzare quanto più possibile lo scaffold all'interno del bioreattore, la definizione di leggi che regolino l'interazione cellulare, considerando lo specifico materiale che costituisce gli scaffold, e di range di velocità massime e permeabilità ottimali per le cellule.

# Abstract

The problems related to the treatment of pathologies, which cause malfunction or loss of function of the organs, have oriented scientific research toward tissue engineering, which uses cells taken from the donor, associated with three-dimensional supports and placed in culture in certain conditions for the development of biological substitutes able to maintain, improve or restore the functions of damaged tissues or organs.

The process of tissue engineering includes different steps linked between them in which the result of each one defines the result of the next one.

One of the main challenges of the processes of tissue engineering is related to their reproducibility and reliability. The research tries to identify which parameters influence each step to control them and make the processes more reproducible and reliable.

The three-dimensional cell seeding is a critical step in the process of tissue engineering. The traditional technique consists in seeding in static conditions, in which cells are subjected only to the gravity force. The result is a very homogeneous and slightly reproducible construct.

In order to optimize the seeding process, several bioreactors have been developed, capable of creating dynamic conditions in which the culture medium and the scaffold are in relative motion. The obtained results are better in terms of uniformity of the cell distribution. The relative movement between culture medium and scaffold within the bioreactors introduces more variables that influence the process, but it is not always possible to control them or is not known how they interact with each other in order to make the process controllable and reproducible.

The research aims to find which are these parameters and their optimal values, using different methods.

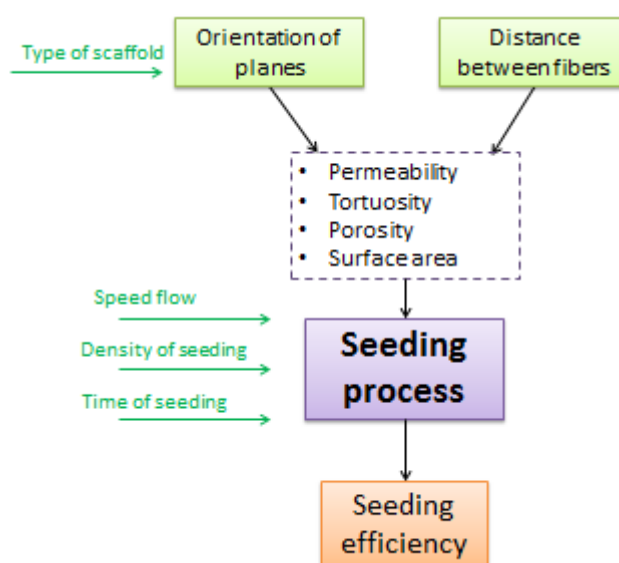
An example is the experimental campaigns, in which it is possible to change one parameter at a time, assuming that they are independent of each other, or to evaluate different combinations to find one that provides the best result.

Another approach is the use of computational techniques aimed to optimize the process and the system during the design phase.



These techniques are a valid non-destructive tool to identify which parameters play a relevant role inside the bioreactor. Numerous studies in the literature show different applications of computational techniques in tissue engineering: simulation of the tissue growth, detection of the hydrodynamic pattern of system, simulation of seeding process.

The purpose of this thesis has been to develop a computational model that simulate the dynamic seeding inside a bioreactor in order to define the role and influence of scaffold's geometry on the result, in order to perform a check on the parameters and make the process reproducible (Figure A.1).



*Figure A.1: Block diagram representative of how the parameters influence each other.*

Experiments have been also carried out, using selected scaffolds, in order to validate the developed model, using the oscillating perfusion bioreactor (OPB).

## Materials and methods

Scaffolds, designed with Creo (Parametric Technology Corporation, PTC), are constituted by fibers with a diameter of 400  $\mu\text{m}$ , with a distance equal to 400  $\mu\text{m}$  or 800  $\mu\text{m}$ . The fibers are arranged in different orientations compared with a reference direction. It has been evaluated porosity to make a first selection of the scaffold to analyzed and has been chosen values of porosity around 60% and 74% (Table A.1).

	SCAFFOLD	DIST. FIBER [ $\mu\text{m}$ ]	POROSITY
1	0_90	400	59,68%
2	0_90 staggered	400	59,80%
3	0_90_45_135	400	53,00%
4	0_60_120	400	60,14%
5	0_60_150	400	59,76%
6	0_36_72_108_14	400	59,70%
7	0_90	800	73,94%
8	0_90 staggered	800	73,19%
9	0_90_45_135	800	69,14%
10	0_60_120	800	76,19%
11	0_60_150	800	73,14%
12	0_36_72_108_14	800	73,16%

*Table A.1: The 12 types of scaffolds, indicating for each one orientation of the adjacent planes, and any shift of the fibers, distance between fibers of the same plan, porosity.*

The computational simulations have been performed with the software Comsol 4.3. The geometry has been simplified to reduce the computational load: has been considered a portion of the culture chamber around the scaffold and the section of the scaffold has been reduced to a quarter of the actual geometry exploiting symmetries. The movement of the culture medium is laminar with parabolic profile and has been studied in stationary conditions. On the walls of the scaffold the speed has been set equal to zero.

Then has been added the “Particle Tracing Module” to simulate the cellular component and compare the probability of adhesion between the different scaffold and it has been studied in time-dependent conditions for 40 seconds.

The computational simulations have been carried out on six different scaffold selected according to the porosity (60 % and 74 %) and they allow to characterizing the scaffolds in terms of tortuosity, permeability, surface area and probability of adhesion. Tortuosity has been obtained as the ratio between the distance traveled by the particles within the fluid and the minimum linear length that connects the point of entry and exit. The surface area has been estimated using the data relating to the discretization. The probability of adhesion has been obtained as the ratio between the number of particles within the scaffold with a speed less than  $1.5 \cdot 10^{-8}$  m / s and the total number of particles.

The scaffolds have been created in PLA with a 3D-printer to carry out the cell seeding experiments in dynamic and static condition, in which has been used MG-63 cells. After a seeding time equal to 24 hours, has been carried out the Cy-Quant assay to determine the amount of DNA on the scaffold and MTT assay for a qualitative analysis of the result of cell seeding.

Following preliminary statistical analysis has been made based on the Spearman correlation index to test whether there was a correlation between the different geometric parameters and fluid flow of the scaffold, between them and the probability of adhesion and in the probability of adhesion and the seeding efficiency in order to validate the computational model.

## Results

The computational results regarding the geometrical parameters of scaffolds are shown in Table A.2.

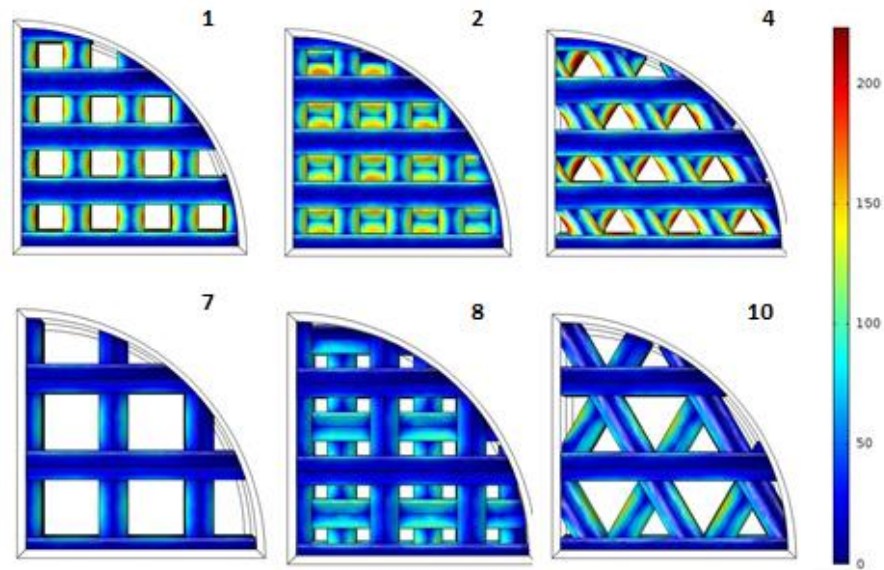
Scaffold	Porosity	Tortuosity	Permeability [mm <sup>2</sup> ]	Surface area [mm <sup>2</sup> ]
1	59,68%	1,06	0,06885	447,2
2	59,80%	1,14	0,05175	443,6
4	60,14%	1,7	0,05625	489,6
7	73,94%	1,06	0,2538	305,56
8	73,19%	1,15	0,14895	307,28
10	76,19%	2,26	0,1476	346,8

*Table A.2: Values of porosity, tortuosity, permeability and surface area obtained from computational simulations for each of the six selected scaffolds.*

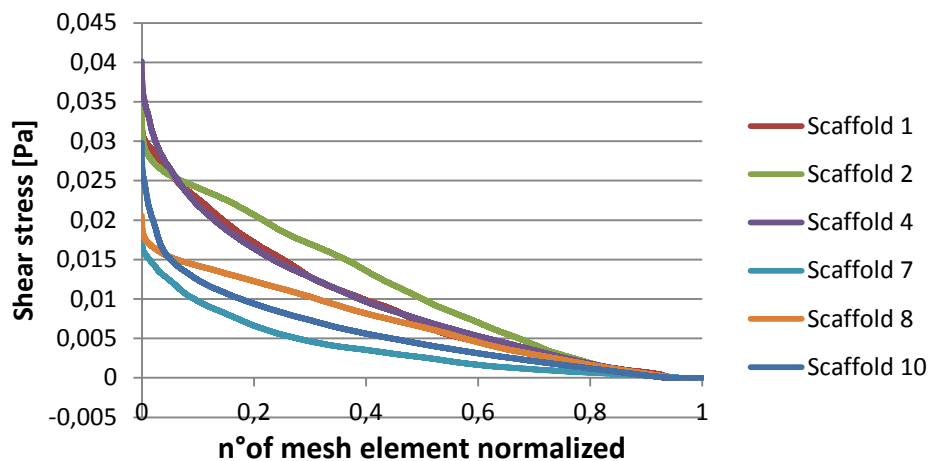
The scaffold 4 shows the highest value of surface area, a parameter proportional to the possibility that the cells adhere to the scaffold because they have a greater available surface area. The tortuosity, equal arrangement of the fibers, does not vary significantly. The permeability has not a pattern dependent on the other parameters. It is higher for the scaffold 7.

Computational simulations have been used in order to obtain shear stress distribution for each scaffold (Figure A.2). The maximum value of shear stress has been found in the scaffold 4, but, by observing the distribution of the shear stress (Graph A.1), the

scaffold 2 appears to have a greater proportion of the surface with the highest shear stress.

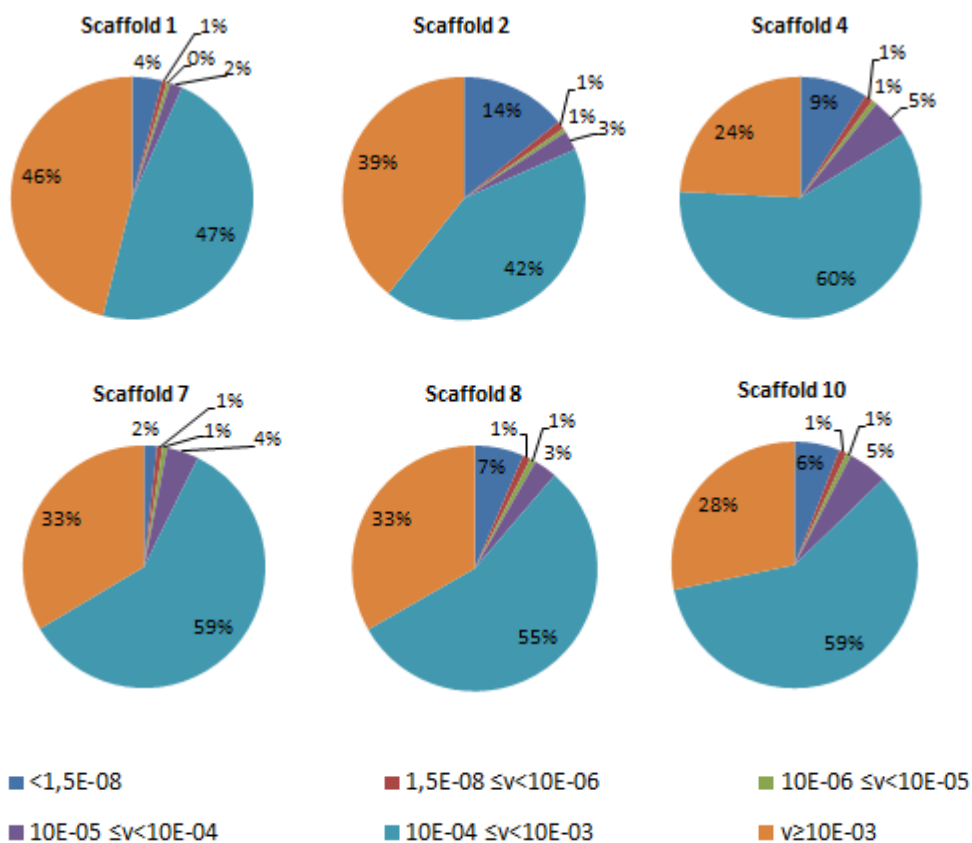


*Figure A.2: Shear stress on the input surface of the scaffolds, using a single color legend that has as the maximum the maximum value of shear stress, namely that relative to the scaffold 4.*



*Graph A.1: Trend of shear stress for each scaffold, calculated on each element of the mesh on the scaffolds fibers. In y-axes there are the shear stress values expressed in Pa, while in x-axes the number of the mesh element normalized compared to the total number of elements.*

The comparison between the values of the adhesion probability of particles on each scaffold (Graph A.2) shows that the scaffold that presents the major adhesion probability is 2, while the scaffold 7 is the one that has the minor one.



Graph A.2: Distribution of particles for speed ranges. In the legend the values are expressed in m/s.

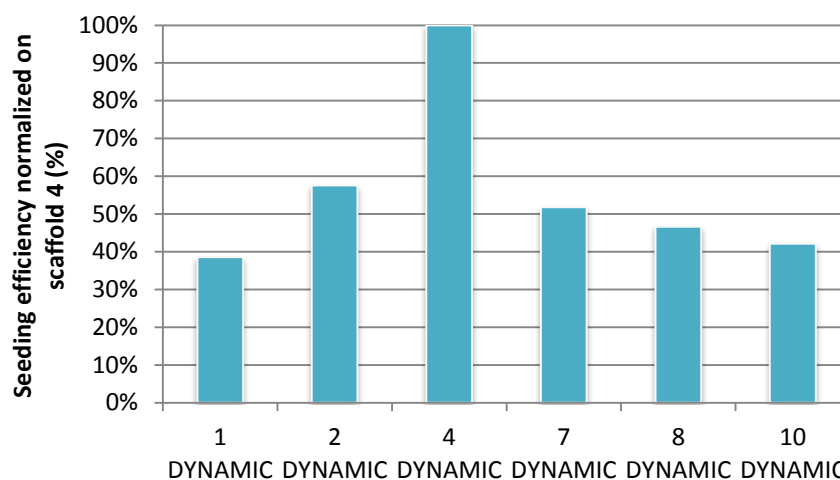
The experimental results have shown better results in terms of efficiency for the statically seeded samples, compared with the dynamically seeded ones (Table A.3).

	Scaffold	Seeding efficiency
Static	1	45,57%
	2	81,93%
	4	94,12%
	7	78,36%
	8	95,35%
	10	97,08%
Dyamic	1	3,67%
	2	5,48%
	4	9,52%
	7	4,93%
	8	4,44%
	10	4,01%

Table A.3: Efficiency of seed obtained for each scaffold used for static or dynamic seeding.

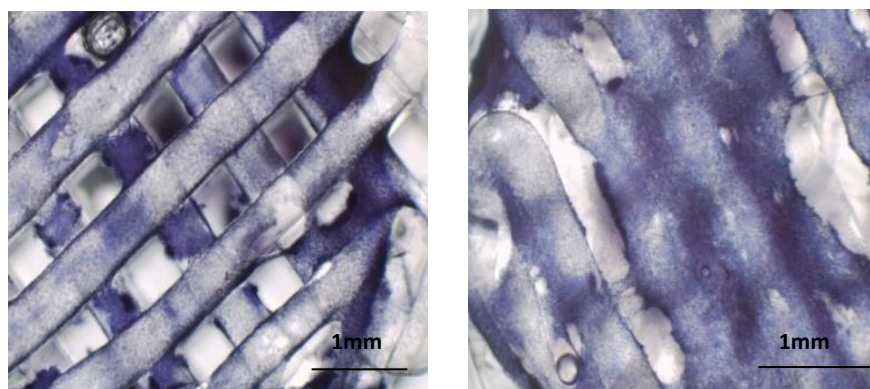
In the scaffold used for static seeding the cells adhered only on the side where the cell suspension has been dropped off.

Comparing the scaffolds used for dynamic seeding, the scaffold 4 is the one with the best result of the seeding efficiency (Graph A.3).



*Graph A.3: Seeding efficiency of the scaffolds used for dynamic seeding, compared to the maximum value found (9.52% relative to the scaffold 4).*

The MTT assay (bromide 3 - (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium) allows observing qualitatively the uniformity of seeding. The images have been obtained with the stereomicroscope, which does not allow observing deep inside the scaffold. It is possible to observe the cell monolayer on the scaffold used for static seeding, while on scaffold used for dynamic one the few adherent cells are more evenly distributed on the fibers (Figure A.3-A.4).



*Figure A. 3: Images obtained with a stereomicroscope represent the scaffold 7 (left) and the scaffold 10 (right) used for static seeding.*

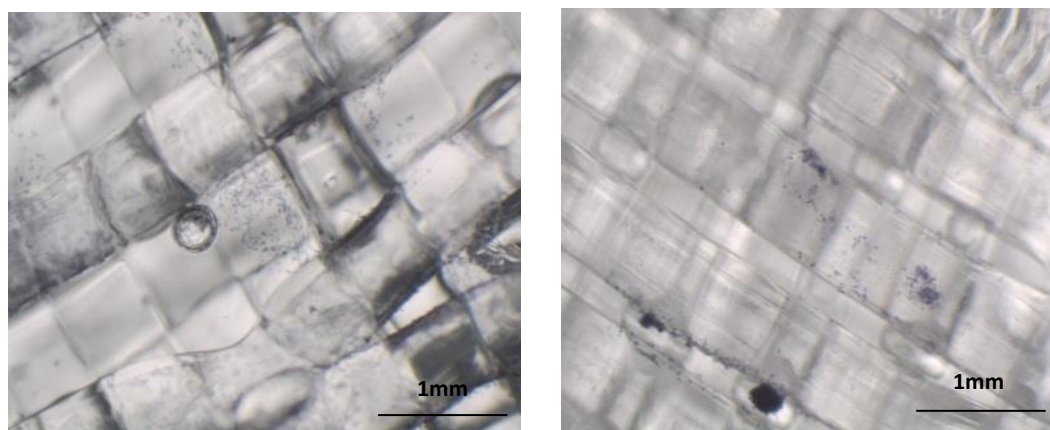


Figure A. 4: Images obtained with the stereomicroscope represent the scaffold 8 (left) and the scaffold 2 (right) used for the dynamic seeding.

The table (Table A.4) shows the values of the Spearman correlation's coefficient for each pair of variables.

	Porosità	Tortuosità	Permeabilità	Area superficiale	Probabilità di adesione	Efficienza	Area con max shear	Velocità max	Velocità media
Porosità	1	0,319	0,657	-0,657	-0,314	-0,029	-0,66	-0,86	-0,886
Tortuosità	0,319	1	-0,29	0,377	0,58	0,406	-0,58	0,551	-0,29
Permeabilità	0,657	-0,29	1	-0,829	-0,77	-0,371	-0,83	0,257	-0,886
Area superficiale	-0,657	0,377	-0,829	1	0,486	0,2	0,657	-0,543	0,714
Probabilità di adesione	-0,314	0,58	-0,77	0,486	1	0,6	0,486	0,771	0,657
Efficienza	-0,029	0,406	-0,371	0,2	0,6	1	0,543	0,543	0,143
Area con max shear	-0,657	-0,58	-0,829	0,657	0,486	0,543	1	0,143	0,714
Velocità massima	-0,86	0,551	-0,543	0,771	0,2	0,143	0,371	1	0,2
Velocità media	-0,88	-0,29	-0,886	0,714	0,657	0,143	0,714	0,2	1

Table A.4: Values of the Spearman correlation coefficient calculated for each pair of parameters.

## Discussion

A crucial aspect of the engineering of tissues consists in being able to control the parameters that influence the different steps to make the process reproducible. The cell seeding on a three-dimensional support is traditionally performed statically, but the technique is slightly controllable and reproducible. A valid alternative technique seems to be the dynamic seeding, in which a series of interdependent parameters between them affect the result. The scaffold introduces a series of geometric

variables and consequently fluid dynamics difficult to evaluate by a non-invasive and non-destructive method.

This thesis uses a computational model to characterize different scaffolds in terms of tortuosity, permeability, surface area and probability of adhesion.

The permeability values are higher in scaffolds with higher porosity. The surface area shows the highest values in the scaffold with lower porosity with a difference compared to that of the scaffolds with a higher porosity than about  $100 \text{ mm}^2$ .

It is interesting to observe that scaffolds with the same geometrical organization of the fibers, but with different distance between the fibers, have the same values of tortuosity.

Comparing the scaffold between them, it was found that those with a porosity of around 60% have values of shear stress higher than those with greater porosity.

On the basis of the geometric parameters would seem that the scaffold 4 is the most suitable among those analyzed and 7 the less suitable, but on the basis of the shear stress is difficult to determine which is better because it does not exist in the literature the definition of a range of shear stress in which the cells respond positively. In the seeding process sowing generally is preferable to have a uniformly low shear, but it is difficult to establish a threshold because it must be considered the conditions of speed and other parameters.

Statistical analysis shows that the parameters of the scaffold with a strong negative correlation between them are the permeability with the surface area, the maximum speed, the area with the maximum shear stress. A negative correlation emerges also between the porosity and the average and maximum speed.

A positive correlation is found between the average speed and the area with the maximum shear stress.

From the correlation between the probability of adhesion and each one of scaffolds parameters would seem that the maximum speed has a strong positive correlation, while the permeability a negative one. In the design phase should therefore ensure that the maximum speed increases and the permeability decreases.

A weak correlation has been found between the tortuosity and the probability of adhesion.

In addition to validate the model has been evaluated the correlation between the probability of adhesion and the seeding efficiency, and its value is 0.6. The value can



not be defined statistically significant, but this may be due to the low resolution during the realization of scaffolds and the computational simplifications.

### **Conclusion and future developments**

The goal of this thesis is to show how the scaffold is not a negligible parameter in the process of seeding, but it introduces geometric and fluid dynamic variables that influence the final result of tissue engineering process. It has been studied a computational model that would allow to characterize the scaffold in order to extract useful information for its use in the tissue engineering processes in the bioreactor.

The results obtained from the computational model allows us to identify how the geometrical parameters of the scaffold, related to porosity, tortuosity, permeability and surface area, affect the fluid dynamics of the system and consequently on the seeding process. The calculation of the probability of adhesion also allows to make predictive analysis on the behavior of the system “scaffold” during the dynamics seeding phase.

Experiments have been carried out to validate the computational model, but the problems related to the scaffold realization and a low number of experiments does not allow to find a significant correlation.

Further steps could include the definition a model that more faithfully reproduces reality, eliminating as much as possible simplifications made to contextualize as much as possible the scaffold inside the bioreactor, the definition of laws that regulate the cellular interaction, considering the specific material which forms the scaffold, and the definition of an optimal range of maximum speeds and permeability for the cells.

# Capitolo I

## Introduzione

### 1 L'ingegneria dei tessuti

Il trattamento di patologie legate al malfunzionamento o alla perdita di funzionalità di organi e tessuti ha presentato negli anni diverse problematiche legate al rigetto di organi o tessuti trapiantati, alla carenza di organi disponibili per il trapianto, al trattamento farmacologico legato a trapianti allogenici, all'affidabilità e alla biocompatibilità dei sostituti artificiali.

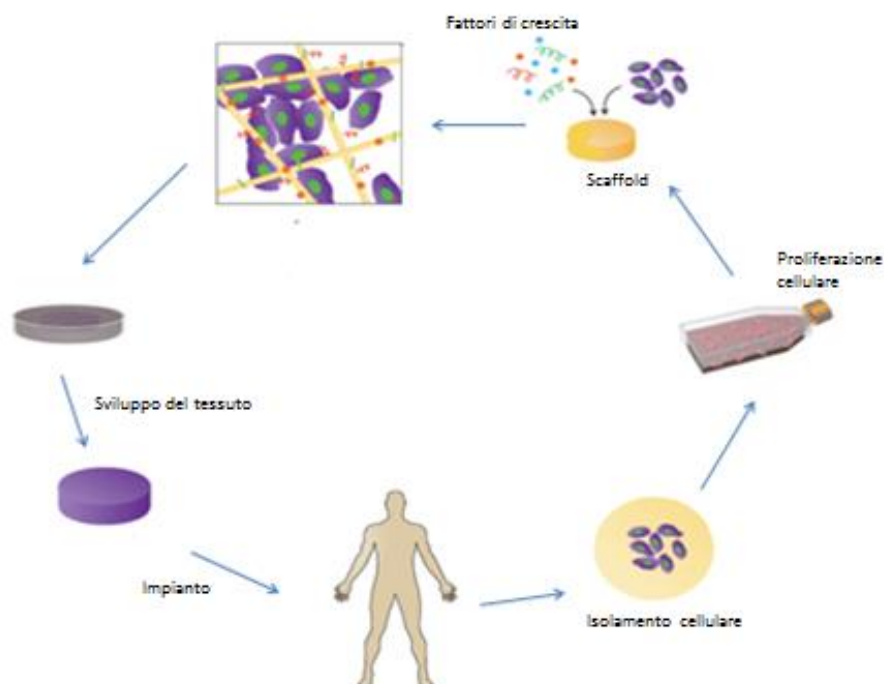
Negli ultimi anni queste problematiche hanno orientato l'interesse della ricerca scientifica all'ingegneria dei tessuti, che è stata definita nel 1988 dalla fondazione Washington Nationale Science come *“una tecnica interdisciplinare che applica i principi e i metodi dell'ingegneria e delle scienze biologiche con l'obiettivo di comprendere le relazioni fondamentali tra struttura e funzione nei tessuti sani e malati e di sviluppare sostituti biologici in grado di ripristinare, mantenere o migliorarne le funzioni”*.

All'interno di questo campo multidisciplinare, è indispensabile la collaborazione di diverse discipline quali scienza dei materiali, biologia cellulare, bioingegneria e chirurgia per il raggiungimento dell'obiettivo.

Il concetto che sta alla base dell'ingegneria dei tessuti è che le cellule, se coltivate su supporti tridimensionali sotto determinate condizioni, sono in grado di organizzarsi in tessuti e successivamente organi da impiantare (1).

Le cellule prelevate e isolate dal paziente vengono seminate su uno scaffold, un supporto tridimensionale fondamentale nella fase di proliferazione cellulare per l'organizzazione del tessuto. La coltura dei costrutti può avvenire all'interno dei bioreattori, dispositivi in cui le condizioni ambientali sono strettamente controllate e monitorate (2). In seguito questo costrutto viene impiantato nel paziente, auspicando un'integrazione completa all'interno dell'ospite. Con questo approccio terapeutico si

evitano i trattamenti immunodepressivi e la dipendenza dalla disponibilità di organi da donatore (Figura 1).



*Figura 2: Schema concettuale di un approccio dell'ingegneria dei tessuti: prelevare un volume ridotto di tessuto dal paziente, isolare le cellule dalla ECM, espanderle in vitro, seminarle su uno scaffold per indurre il corretto differenziamento ed infine impiantare il costruito nel paziente.*

TESSUTO/ORGANO	STRATEGIA TERAPEUTICA	STATO DI SVILUPPO
<b>Epidermide, Derma, Cornea</b>	Trapianto autologo o allogenico di cheratinociti e fibroblasti seminati su biomateriali	Uso clinico
<b>Uretra</b>	Trapianto autologo di cellule epiteliali della vescica o muscolari lisce semiate su biomateriali	Uso clinico
<b>Cartilagine articolare</b>	Trapianto autologo di condrociti seminati su biomateriali	Uso clinico
<b>Vescica</b>	Trapianto autologo di cellule muscolari lisce seminate su biomateriali	Uso clinico
<b>Osso</b>	Trapianto autologo di staminali da midollo seminate su biomateriali	Sperimentazione clinica
<b>Vasi</b>	Trapianto di cellule vascolari o staminali o endoteliali su biomateriali	Sperimentazione clinica
<b>Rene/Fegato</b>	Cartucce bioartificiali extracorporee seminate con cellule animali	Sperimentazione clinica
<b>Nervi</b>	Trapianto autologo di cellule staminali neurali su biomateriali	Sperimentazione animale
<b>Pancreas</b>	Trapianto di isole di Langherans incapsulate in biomateriali	Sperimentazione animale
<b>Organi genitali</b>	Trapianto di cellule muscolari lisce e endoteliali su biomateriali	Sperimentazione animale
<b>Cuore</b>	Trapianto di cellule muscolari lisce, endoteliali, cardiomiociti, fibrociti o staminali su biomateriali	Sperimentazione animale

*Tabella 1: Stadi di sviluppo delle applicazioni cliniche e delle sperimentazioni di alcuni tessuti nell'ingegneria tissutale (5), (3), (6).*

Esistono già in commercio tessuti ingegnerizzati realizzati con questa tecnica e utilizzati in campo clinico. Ad esempio per il trattamento di ustioni e ulcere diabetiche, ove possibile, si impiega un tessuto cutaneo artificiale (Dermagraft, Hyalograft).

Sono in fase di sperimentazione altri tipi di tessuti, come l'osso, la cartilagine, il fegato, il rene e si prevede che nei prossimi anni interi organi o tessuti possano essere realizzati *in vitro* e disponibili in clinica (Tabella 1) (3), (4).

## **1.1 Il processo di ingegnerizzazione di un tessuto**

L'ingegneria dei tessuti ha come obiettivo la realizzazione *in vitro* di un costrutto vitale partendo da cellule del paziente, capace di adattarsi, crescere e rigenerarsi una volta impiantato. Per poter fare questo sono necessarie tre componenti:

- le cellule: la scelta della corretta fonte cellulare è un punto cruciale per l'ingegnerizzazione di un tessuto;
- lo scaffold: fornisce un supporto tridimensionale alle cellule e deve essere specifico a seconda dell'applicazione;
- il bioreattore: costituisce il sistema di condizionamento della coltura, fornendo opportuni stimoli.

### **1.1.1. La componente cellulare**

Il materiale biologico che si ha a disposizione può essere classificato in cellule primarie differenziate e staminali.

Le cellule primarie sono cellule isolate da biopsia del paziente (autologhe) o di un donatore (eterologhe). Le prime, avendo lo stesso corredo genetico del paziente stesso, sono preferibili per una totale compatibilità che consente di evitare il trattamento immunosoppressivo.

Le cellule primarie differenziate presentano diversi limiti: a) la reperibilità, in quanto è necessario prelevare dal paziente il tessuto contenente le cellule desiderate per estrarle successivamente e pertanto è inevitabile danneggiare un'altra zona con il rischio di prelevare cellule malate nel caso in cui la patologia colpisca tutti i tessuti simili (ad esempio tessuto osseo nel caso di osteoporosi) o nel caso in cui il tessuto che deve essere rigenerato sia unico nel corpo umano (ad esempio patologie del pancreas, intestino, cuore); b) la limitata capacità proliferativa, un parametro inversamente proporzionale al differenziamento e all'età del paziente, che in genere

viene indicato con il termine di limite di Hayflick; c) la propensione a de-differenziare in pseudofibroblasti quando si trovano in condizioni non fisiologiche (5).

Le cellule staminali adulte invece hanno una grande potenzialità, poiché sono in grado di differenziare in diversi tipi cellulari e hanno una capacità proliferativa virtualmente illimitata. Gli aspetti critici riguardano la reperibilità, poiché non si trovano in grande numero nei tessuti, e la differenziazione *in vitro*, di cui ancora non sono noti tutti i meccanismi.

Le cellule prelevate dal paziente devono essere espanse *in vitro* per poterne avere in quantità sufficiente da realizzare il costrutto per l'impianto. L'espansione cellulare avviene tradizionalmente su supporti bidimensionali (flask, petri), fornendo tutti gli stimoli biochimici necessari, l'ossigeno e i fattori di crescita, specifici per ogni tipo cellulare, tramite il mezzo di coltura affinché sopravvivano e proliferino.

Esistono poi altri tipi di cellule utilizzate nelle fasi di ricerca che precedono le applicazioni cliniche: le cellule di linea. Esse sono popolazioni cellulari omogenee in grado di duplicarsi indefinitamente senza andare incontro a senescenza per via di modifiche genetiche apportate in laboratorio. Questo comportamento non rispetta quello delle cellule primarie, le quali invece vanno incontro a senescenza dopo un numero limitato di duplicazioni e de-differenziano in pseudo-fibroblasti.

Il vantaggio di utilizzare cellule di linea consiste nel fatto che hanno un comportamento più stabile e riproducibile, che conferisce perciò una buona riproducibilità agli esperimenti, a discapito di risultati poco realistici ai fini di applicazioni cliniche.

### **1.1.2. La componente di supporto: lo scaffold**

Lo scaffold è una struttura tri-dimensionale costituita da un biomateriale, che ha il compito di accogliere la componente cellulare e di fornire un supporto meccanico temporaneo, che sostituisca la naturale matrice extracellulare (7), finché essa non verrà ricreata dalle cellule stesse. Deve possedere alcuni requisiti fondamentali:

- citocompatibilità: caratteristiche chimico-fisiche che non comportino la morte cellulare o modifichino il metabolismo cellulare. Per verificare la citocompatibilità si svolgono test di citotossicità, diretti e indiretti, per verificare che il materiale non produca sostanze dannose e non interferisca negativamente con le cellule;

- biocompatibilità: non deve generare rigetto, risposta immunitaria o infiammazione una volta impiantato;
- elevato grado di porosità e interconnessione tra i pori per permettere lo sviluppo del tessuto e garantire il trasporto di metaboliti, cataboliti e segnali biochimici che le cellule si scambiano tra loro;
- alto rapporto superficie/volume: per ospitare un maggior numero di cellule e avere una maggiore superficie disponibile per l'adesione cellulare;
- sterilizzabilità per evitare contaminazioni;

Per eventuali applicazioni cliniche è importante valutare anche altri fattori e inserire quindi altre specifiche come ad esempio forma e struttura adatta al sito di impianto, proprietà meccaniche paragonabili a quelle del tessuto da sostituire, biodegradabilità e bioassorbibilità con cinetiche adeguate al tempo di sviluppo del tessuto.

I materiali utilizzati per la costruzione dello scaffold possono essere di origine sintetica o naturale. I materiali sintetici sono più facilmente riproducibili e ne esiste una vasta gamma tra metallici (es. leghe di titanio, leghe di acciaio), ceramici (es. ossido di alluminio, idrossiapatite), polimerici (es. PLA, PGA, PCL, PTFE, PPP,...). In fase di produzione è possibile variare le proprietà meccaniche e chimiche, combinando tra loro i materiali.

I polimeri risultano migliori per le loro proprietà di biocompatibilità e per la possibilità di creare copolimeri combinando i pregi di diversi polimeri.

I materiali naturali riproducono un ambiente fisiologico. Esempi sono collagene, fibrina, acido ialuronico, alginato. Tra gli scaffold naturali possiamo classificare anche le matrici decellularizzate (autologhe, allogene, xenogene). Esse ricreano un ambiente più simile a quello fisiologico, ma non sempre sono riconosciute come tessuto nativo dall'ospite.

### **1.1.3. La componente di condizionamento: il bioreattore**

I bioreattori sono definiti come dispositivi in cui si sviluppano processi biologici e biochimici in condizioni ambientali e di funzionamento strettamente controllate e monitorate (pH, temperatura, pressione, apporto di sostanze nutritive e la rimozione dei rifiuti) (8).

La necessità di risolvere i problemi connessi ai processi manuali dell'ingegneria dei tessuti, come la scarsa riproducibilità, affidabilità e scalabilità dei processi legati alle variabili intra-operatore e inter-operatore ha determinato il ricorso sempre più

frequente all'utilizzo dei bioreattori in ogni fase del processo di ingegnerizzazione di un tessuto (espansione cellulare, semina, coltura, ecc.).

I bioreattori inoltre sono considerati non solo un potente strumento tecnologico per supportare e guidare lo sviluppo in vitro di tessuti funzionali, ma anche uno strumento utile per studiare i meccanismi cellulari fondamentali in condizioni fisiologiche.

Nel campo della ricerca scientifica vengono utilizzati con diversi obiettivi:

- come attuatori, per migliorare lo scambio di massa e fornire al costrutto stimoli fisici, utili per indurre il differenziamento e/o il mantenimento del fenotipo cellulare;
- come sistema di controllo per il monitoraggio di parametri come pH, concentrazione di ossigeno, glucosio, temperatura, concentrazione di anidride carbonica, e per il controllo retroattivo di fattori ambientali e fisici;
- come modelli per la definizione di protocolli e metodi, per identificare i parametri cruciali del processo di coltura cellulare e per la comprensione di meccanismi evolutivi.

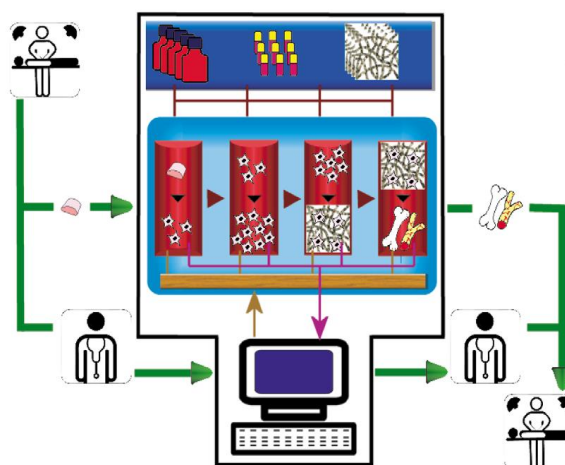
In letteratura sono presenti diverse tipologie di bioreattori: spinner flasks, hollow-fiber bioreactors, rotating wall vessels e bioreattori a perfusione.

#### ***1.1.3.1 Specifiche di progetto di un bioreattore***

Un bioreattore ideale (Figura 2) dovrebbe avere le seguenti caratteristiche:

- materiali citocompatibili nelle parti a contatto diretto e indiretto con il materiale biologico;
- affidabilità del processo per il tempo necessario;
- sterilizzabilità dei componenti a contatto con il mezzo di coltura e le cellule e mantenimento della sterilità durante il processo;
- rispetto delle GLP (Good Laboratory Practice), in particolare facile assemblaggio sotto la cappa a flusso laminare per mantenere la sterilità;
- non deve avvenire la cross-contaminazione nell'eventualità di coltura in parallelo di campioni diversi;
- possibilità di effettuare la semina cellulare automatica, così da evitare la variabilità dovuta all'operatore;
- garantire il trasporto di nutrienti e gas a tutte le cellule simulando quello che è il ruolo del sistema circolatorio;

- stimolazione con campi fisici di diversa natura (meccanica, chimica, elettrica, magnetica, fluidodinamica), eventualmente in combinazione per favorire lo sviluppo corretto del tessuto desiderato (2);
- ingombro ridotto per poter essere posto all'interno dell'incubatore (se il bioreattore non è benchtop) e per ridurre il volume di priming del mezzo di coltura così da abbassare i costi;
- automazione e controllo dell'ambiente fisiologico. La coltura in vitro di un tessuto è un processo non stazionario, pertanto sarebbe opportuno misurare real-time tutti i parametri soprattutto in vista di una standardizzazione dei processi in cui vengano ridotte al minimo le operazioni manuali degli operatori per una maggiore riproducibilità del tessuto stesso.



**Figura 2:** Immagine di un bioreattore ideale a circuito chiuso per la produzione automatizzata di tessuti ingegnerizzati. Il chirurgo preleva una biopsia dal paziente e lo introduce nel bioreattore all'interno dell'ospedale. Il bioreattore automaticamente isola le cellule, le fa espandere, le semina sullo scaffold e mantiene in coltura il costrutto fino a un certo livello di maturazione. Il tutto è mantenuto in camere con condizioni ambientali adeguate. I parametri ambientali della coltura e lo sviluppo del tessuto vengono monitorati e inviati a un microprocessore per essere analizzati. Questi dati insieme ai dati della cartella clinica del paziente sono utilizzati per valutare automaticamente lo stadio ottimale di maturazione del costrutto per poter pianificare l'impianto da parte del chirurgo stesso. (8)

### 1.1.3.2 Il bioreattore OPB

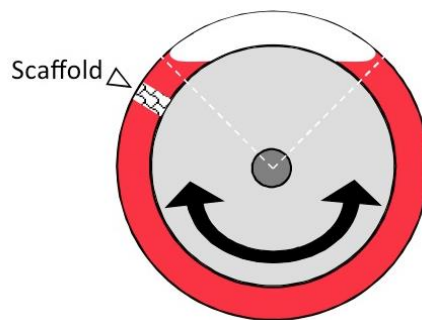
Il bioreattore utilizzato in questo lavoro di tesi è il bioreattore oscillante a perfusione OPB (Oscillating Perfusion Bioreactor), un innovativo modello di bioreattore brevettato dall'ingegner Matteo Moretti (Patent n° WO2008/098165, licenza: SKE Advanced Therapies S.r.l.) in uso allo stato prototipale presso i laboratori di ricerca



del MIT di Boston e il Laboratorio di Ingegneria Tessutale e Cellulare dell'Istituto Ortopedico Galeazzi.

Viene progettato e realizzato nel 2006 e negli anni successivi ha subito diverse modifiche finalizzate a ottimizzarne la funzionalità.

É costituito da una piattaforma sulla quale vengono alloggiati le camere di coltura, all'interno delle quali sono posizionati gli scaffold. Le camere sono poste in rotazione rispetto al loro asse, così da creare un moto relativo tra mezzo di coltura e scaffold. (Figura 3).



*Figura 3: Disegno della camera dell'OPB con lo scaffold vincolato e il mezzo di coltura in rosso*

Il bioreattore OPB possiede delle caratteristiche peculiari rispetto ai normali bioreattori a perfusione:

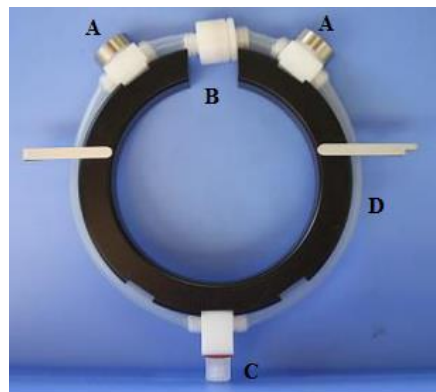
- è in grado di svolgere sia la funzione di semina delle cellule sullo scaffold sia la fase di coltura delle stesse, riducendo notevolmente il rischio di contaminazioni batteriche;
- l'ossigenazione non necessita di nessun dispositivo aggiuntivo, poiché lo scambio di gas tra il medium e l'ambiente circostante è garantito dalle camere in materiale siliconico, il quale possiede un elevato coefficiente di permeabilità ai gas;
- il dispositivo non richiede l'utilizzo di pompe peristaltiche per la movimentazione del mezzo di coltura, fondamentale per l'apporto di nutrienti e la rimozione dei cataboliti. La perfusione confinata è data dal movimento relativo tra scaffold e mezzo di coltura.
- è possibile effettuare diverse colture contemporaneamente sullo stesso dispositivo senza che avvenga nessuna cross-contaminazione, grazie al fatto che le camere sono indipendenti e separate tra di loro.

L'assenza di pompe e ossigenatori rende l'OPB un bioreattore molto compatto.

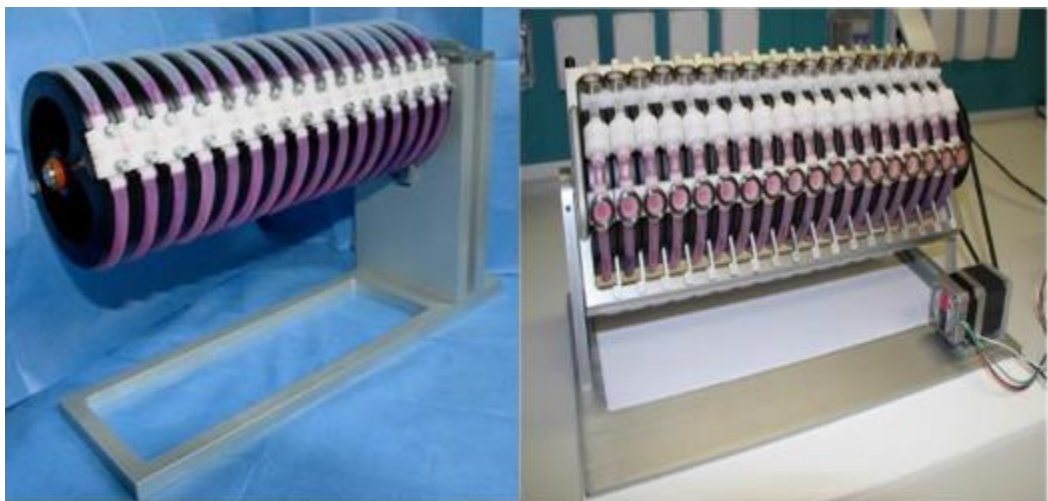
Il tubo in silicone è intervallato da alcuni inserti (Figura 4): la cameretta porta-scaffold e i connettori. La cameretta porta-scaffold contiene lo scaffold vincolandolo al suo interno.

Ai lati della cameretta porta-scaffold sono presenti due connettori, che permettono la fuoriscita dell'aria durante la fase di riempimento della camera con mezzo di coltura o sospensione cellulare.

Un connettore *luer lock*, collocato in posizione opposta alla cameretta porta-scaffold, permette di inserire e rimuovere il mezzo di coltura.



**Figura 4:** Camera di coltura montata sul disco di supporto. A) Connettori con ghiera d'acciaio e patches per lettura di O<sub>2</sub> e pH. B) Cameretta porta scaffold. C) Connettore luer-lock. D) Tubo in silicone.



**Figura 5:** A sinistra è riportata una configurazione del vecchio sistema di aggancio: le camere devono essere inserite o estratte una di seguito all'altra. A destra invece è riportato il nuovo sistema di aggancio, in cui ogni camera è indipendente dalle altre grazie all'aggancio magnetico del disco al supporto rettangolare.

Le camere di coltura sono montate su un disco che a sua volta è agganciato ad un supporto rettangolare tramite un sistema di calamite. Il supporto rettangolare è posto in oscillazione dal motore e così anche le camere ad esso solidali (Figura 5).

Il bioreattore OPB, grazie alle caratteristiche sopra elencate, rappresenta un ottimo strumento per superare i limiti connessi alle tradizionali tecniche di ingegneria dei tessuti, come la riproducibilità e l'affidabilità dei processi, .

Nonostante ciò resta difficile la comprensione dei meccanismi che avvengono al suo interno e che portano, date le variabili in ingresso, al costrutto finale.

## 2 Problematiche nei processi di ingegneria tessutale

L'ingegneria tessutale tenta di sviluppare sistemi sempre più complessi finalizzati a ricreare un ambiente *in vitro* simile a quello *in vivo*, che permettano la generazione di un tessuto 3D funzionale.

Nonostante il progresso scientifico raggiunto, il bisogno di un sostituto biologico sicuro e clinicamente efficiente è ancora insoddisfatto. L'efficacia terapeutica deve essere accompagnata anche da un processo di produzione efficace economicamente e che rispetti le norme di GMP (Good Manufacturing Practice) e il controllo di qualità.

Il processo di ingegnerizzazione di un tessuto prevede diverse fasi (Figura 1):

- Isolamento da biopsia da donatore;
- Espansione cellulare;
- Semina su un supporto tridimensionale;
- Coltura del costrutto;
- Impianto nel paziente.

Il risultato di ciascuna fase determina il risultato di quella successiva e pertanto il risultato finale sarà determinato da tutte le variabili che entrano in gioco durante tutto il processo.

Una delle criticità principali dell'ingegneria dei tessuti è il fatto che non tutte le variabili sono note e non tutte sono controllabili, specie quelle in cui interviene l'operatore. In questo contesto il bioreattore potrebbe svolgere un ruolo fondamentale per lo sviluppo di processi di produzione sicuri, riproducibili, tracciabili, economicamente sostenibili nell'ingegneria dei tessuti.

Risulta quindi importante indagare per ciascuna fase quali siano le variabili determinanti e in che modo controllarle, così da rendere il processo riproducibile e affidabile per le applicazioni cliniche.

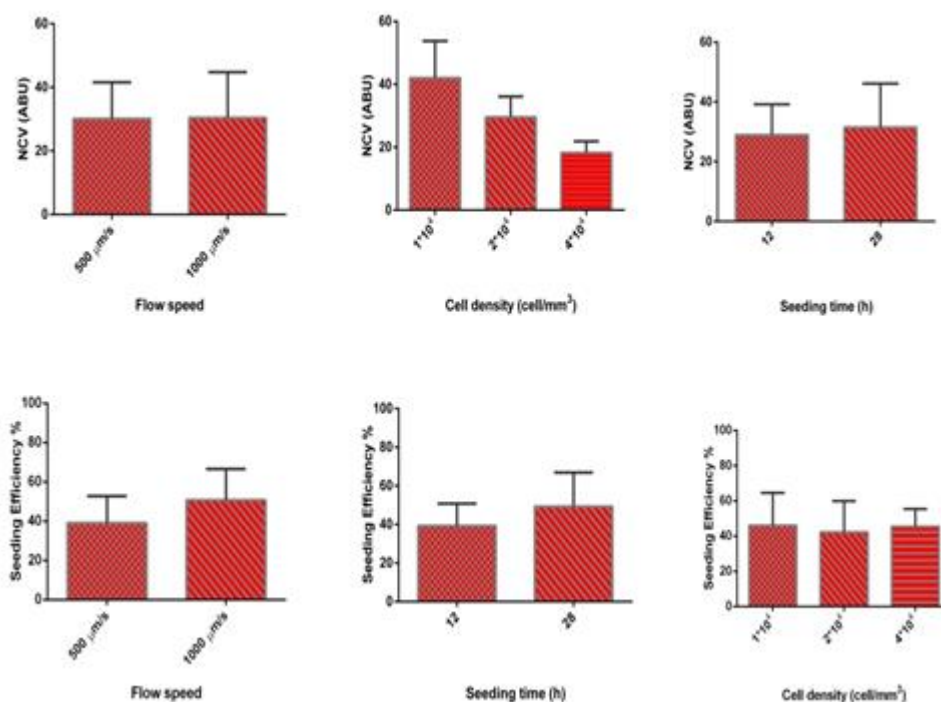
La semina cellulare è la prima fase del processo di ingegnerizzazione e determina la buona riuscita dell'intero processo.

È importante che essa avvenga uniformemente sul supporto, così da permettere lo sviluppo del costrutto funzionale e con caratteristiche quanto più simili a quelle del tessuto fisiologico. I parametri in gioco in questa fase sono diversi: la densità cellulare, il tempo di semina, il tipo di scaffold e la sua geometria, il tipo di cellule

utilizzato (9). Tradizionalmente la semina cellulare su scaffold tridimensionali avviene depositandovi sopra la sospensione cellulare con una micropipetta e lasciando che la forza di gravità porti all'interno dello scaffold le cellule. Utilizzando questa procedura il risultato non è riproducibile, le variabili inter- e intra-operatore sono diverse.

Una delle soluzioni a questa problematica è effettuare una semina di tipo dinamico, in cui le cellule sono spinte all'interno dello scaffold grazie al movimento del mezzo di coltura. Con questo tipo di procedura, invece, i risultati più promettenti in termini di uniformità di semina e di riproducibilità del processo (10), (11), (12), (13), (14). Il limite più grande è il non conoscere in che modo i parametri influenzino il risultato nella semina dinamica.

I bioreattori sono considerati delle “black box” (15): è difficile comprendere in modo chiaro ciò che succede all'interno del dispositivo con metodi non distruttivi e non invasivi in tempo reale. Ecco perché nella maggior parte degli studi riguardanti la semina su scaffold viene usato un tipo di approccio “trial and error”, cioè puramente sperimentale (16). Nonostante siano stati tanti i progressi in campo biologico e in campo tecnologico, la realizzazione di studi sperimentali nell'ingegneria dei tessuti risulta essere onerosa sia da un punto di vista economico che da un punto di vista temporale e spesso non consente di valutare i parametri di interesse in modo accurato (17). In questo scenario sembrerebbe che un campo così importante e promettente come l'ingegneria dei tessuti risulti rallentato nelle applicazioni industriali e cliniche. Un modalità di affrontare il problema è l'approccio statistico basato sugli esperimenti. In un precedente lavoro svolto presso l'Istituto Ortopedico Galeazzi è stata svolta una campagna sperimentale con l'intento di ottimizzare il processo di semina nel bioreattore oscillante a perfusione OPB. Utilizzando l'approccio statistico del DoE (Design of Experiment), si è voluto individuare quali variabili del processo di semina influenzano il risultato della semina stessa. Sono state individuate le variabili di processo, quali la velocità del flusso, il tempo di semina e la densità cellulare per capire in che modo influenzano l'efficienza, l'uniformità di semina e la vitalità cellulare. I parametri di processo sono stati variati uno alla volta così da individuare quale combinazione avrebbe determinato il miglior risultato.



**Grafico 1:** L'efficienza di semina è influenzata dalla velocità del fluido e tempo di semina, mentre non è influenzata dalla densità di semina. Al contrario la vitalità cellulare risulta significativamente più alta per basse densità cellulari.

Dai grafici (Grafico 1) ottenuti si deduce che la vitalità cellulare è inversamente proporzionale alla densità cellulare di semina, ma non dipende significativamente dalla durata della fase di semina e dalla velocità del flusso.

L'efficienza di semina invece dipende dalla velocità del flusso e dal tempo di semina, ma non dalla densità cellulare.

Gli esperimenti sono stati condotti su due diversi scaffold in commercio: l'Ultrafoam (UF) e il titanio trabecolare (Ti).

	Scaffold	Cellule	Densità [cells/ml]	Tempo di semina [ore]	Efficienza di semina [%]	Vitalità normalizzata [ABU]
Dinamico	UF	MG63	$0.2 \cdot 10^6$	28	$65,84 \pm 17,41$	$49,86 \pm 16,49$
	Ti	MG63	$0.2 \cdot 10^6$	28	$17,77 \pm 4,42$	$407,48 \pm 24,83$
Statico	UF	MG63	$0.2 \cdot 10^6$	28	$91,54 \pm 16,92$	$25,02 \pm 5,15$
	Ti	MG63	$0.2 \cdot 10^6$	28	$85,82 \pm 4,28$	$127,24 \pm 5,95$

**Tabella 2:** Efficienza di semina e vitalità normalizzata al variare del tipo di scaffold e del tipo di semina.

Dalla tabella 2 emerge che, a parità di densità di semina e di tempo di semina, l'efficienza di semina cambia notevolmente a seconda dello scaffold utilizzato.

La variabile "tipo di scaffold" quindi non è da trascurare nella fase di semina. Anch'essa gioca un ruolo importante e determina la riproducibilità e l'affidabilità del processo.

Al fine di indagare quali parametri relativi allo scaffold influenzano il processo di semina, e ricavare informazioni utili per la scelta dei parametri si può ricorrere ad un approccio di tipo computazionale, come sarà descritto nei capitoli successivi.

### 3 Fluidodinamica computazionale per l'ingegneria dei tessuti

Negli ultimi anni si è ricorso sempre più spesso a tecniche computazionali (CFD, Computational Fluid Dynamics), già ben affermate in altri campi ingegneristici per la progettazione e l'ottimizzazione di dispositivi. Queste tecniche di calcolo numerico si sono rivelate vantaggiose sia da un punto di vista economico, perché consentono di evitare la realizzazione di campagne sperimentali, sia temporale, perché le simulazioni computazionali richiedono generalmente meno tempo rispetto agli esperimenti reali, e inoltre hanno consentito di comprendere meglio alcuni fenomeni poiché permettono di stimare il comportamento di fenomeni locali e una più ampia casistica di geometrie e condizioni in una fase preliminare alla prova sperimentale.

Le simulazioni computazionali possono essere considerate utili nell'ingegneria dei tessuti per la progettazione di un bioreattore o di uno scaffold, per lo sviluppo di modelli predittivi del processo di semina. Sono un ottimo strumento non distruttivo per capire quali parametri entrano in gioco nel bioreattore e modificarli di conseguenza al fine di ottimizzare le prestazioni del dispositivo, già durante la fase di progettazione (17).

I parametri di interesse all'interno di un bioreattore sono diversi. Tra quelli macroscopici troviamo il design del bioreattore, il tipo di movimento relativo del mezzo di coltura rispetto allo scaffold, gli eventuali stimoli meccanici applicati, la geometria dello scaffold.

Ci sono poi alcuni parametri relativi ad un livello microscopico che derivano dalle condizioni di coltura come ad esempio i profili di velocità del fluido, gli sforzi di taglio che esso genera sulle strutture e le pressioni locali che si generano al suo interno, che sono difficili da misurare sperimentalmente in tutti i punti del dominio.

Ciascuno di essi influenza l'efficienza di semina e la crescita del tessuto (18) (15) (17), ma non sempre è noto come siano correlati.

In questo contesto risultano di grande aiuto le simulazioni computazionali, in cui è possibile separare le diverse variabili e analizzare come influenzano il processo o eventualmente come si influenzano tra di loro.

Quanto più i modelli computazionali costruiti si avvicinano alla realtà sperimentale, tanto più si potrebbe pensare di effettuare la progettazione e la scelta delle condizioni



sperimentali in modo totalmente computazionale, riducendo i tempi e i costi relativi agli esperimenti.

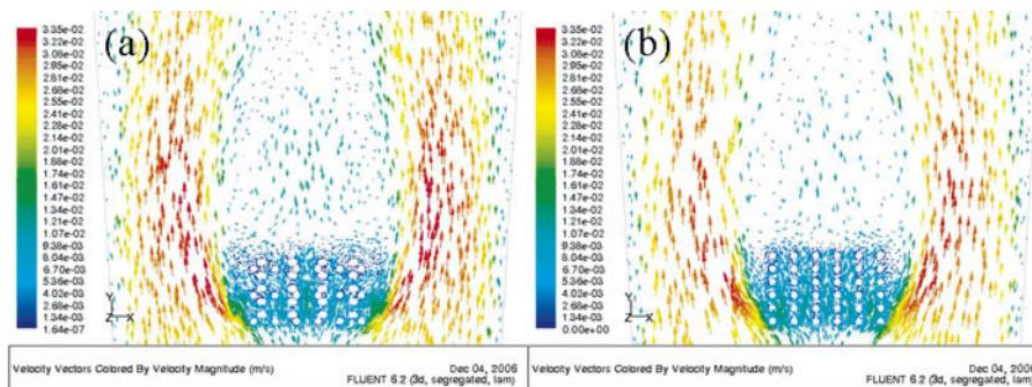
In letteratura sono presenti diversi articoli relativi alle simulazioni CFD di semina, crescita del tessuto e pattern idrodinamico all'interno di bioreattori.

Nello studio di *Boschetti et al.* (19) è stato analizzato con simulazioni computazionali il profilo idrodinamico imposto alle cellule in uno scaffold microporoso con porosità a pori aperti ed è stata valutata la distribuzione degli sforzi di taglio in funzione dei parametri di fabbricazione dello scaffold, come la porosità e la dimensione dei pori, e dei parametri di processo, come la portata del mezzo di coltura e il diametro della sezione perfusa. I risultati hanno mostrato che la dimensione dei pori è una variabile che influenza i valori di sforzi di taglio, mentre la porosità influenza la loro distribuzione. Sebbene un'alta porosità sia preferibile per la semina e la proliferazione cellulare, dai risultati si osserva che porosità basse consentono di controllare meglio il livello di sforzi di taglio imposto alle cellule.

Nello studio di *Nava et al.* (20) è presentato un modello multifisico per la predizione del fenomeno di crescita di un tessuto ingegnerizzato, che avviene all'interno di un bioreattore a perfusione confinata, nel tentativo di correlare i dati con i risultati sperimentali. Il tessuto è considerato come un singola fase in cui sono comprese sia la componente cellulare che la matrice extracellulare.

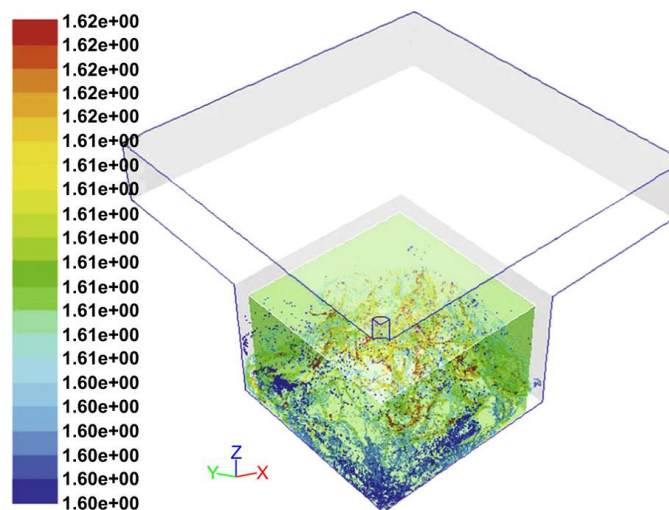
Lo studio di *Araida et al.* (21) propone un metodo veloce e computazionalmente meno intensivo per modellare il flusso all'interno di un bioreattore a perfusione, assumendo una microstruttura uniforme dello scaffold e una distribuzione uniforme della componente cellulare sullo scaffold, con l'obiettivo di ottimizzare il design del bioreattore per l'ottenimento di una porzione di tessuto ingegnerizzato uniforme.

*Singh et al.* (22) hanno condotto uno studio per analizzare come l'architettura dello scaffold influenzi l'impatto del fluido all'interno e intorno a se stesso, nonché le caratteristiche del fluido. Vengono analizzati due tipi di scaffold con orientamento delle fibre a 45° e 90°. Viene messo in evidenza come lo scaffold con le fibre a 45° impone una resistenza maggiore al fluido, poiché disturba il percorso del fluido in modo più significativo rispetto allo scaffold con fibre a 90° (Figura 6).



**Figura 6:** Sezione trasversale dello scaffold con le fibre a  $45^\circ$  (a) e  $90^\circ$  (b) con i vettori velocità all'interno degli scaffold (22).

Nel lavoro di *Adebayo et al.* (18) è stato utilizzato un metodo numerico per caratterizzare l'efficienza di semina in una procedura in cui con il vuoto si induce il movimento del fluido per il trascinamento delle cellule in esso sospese. Le cellule sono sottoposte ad un equilibrio di forze di diverso tipo (gravitazionale, di trascinamento, di pressione, di massa virtuale). Le cellule vengono evidenziate nel dominio in base al tempo di residenza (Figura 7).



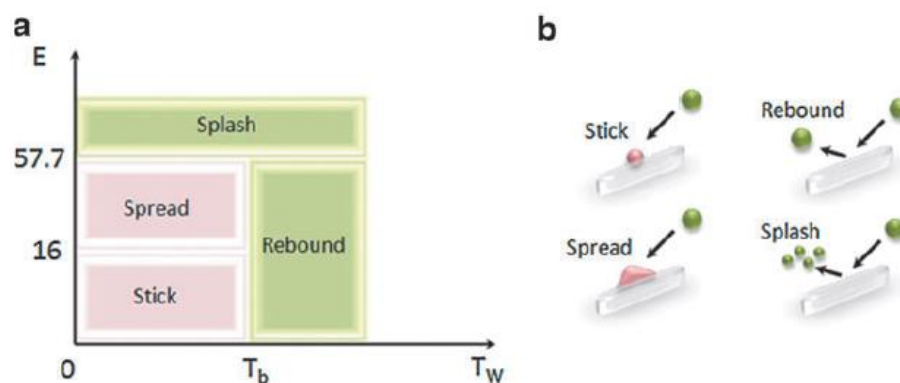
**Figura 7:** Distribuzione delle cellule nello scaffold e nella cavità al tempo  $t=2s$  con pressione di vuoto pari a  $-20kPa$ , valore che ha mostrato il miglior risultato. Le cellule sono state colorate in base al tempo di residenza (18).

Nei bioreattori in cui il fluido è posto in movimento per favorire la distribuzione delle cellule all'interno dello scaffold per una semina uniforme e omogenea, con l'ausilio di simulazioni computazionali è possibile ottenere informazioni riguardo alla fluidodinamica, ma risulta difficile simulare la componente biologica nella fase

di semina cellulare e di crescita del tessuto, tenendo in considerazione tutte le interazioni biochimiche che avvengono nel mondo cellulare.

Uno dei fenomeni più difficili da simulare è l'adesione tra le cellule e lo scaffold e tra le cellule stesse. Non esistono delle relazioni matematiche che descrivano esaurientemente il fenomeno. In letteratura è stato affrontato questo argomento nel tentativo di formulare una legge per descrivere il fenomeno.

Olivares et al. (23) presuppongono l'utilizzo della formulazione del "wall film" implementata in un software per simulare il fenomeno della combustione. In particolare è stata impostata una condizione di adesione ogni qualvolta la particella venga a contatto con le superfici dello scaffold stesso. (Figura 8).



**Figura 8:** A sinistra (fig.a) è riportato il grafico energia-temperatura, in cui è possibile individuare per quali intervalli di energia temperatura le particelle aderiscono (stick), rimbalzano (rebound), si distendono (spread) o si distruggono (splash) nella formulazione "wall film". A destra (fig.b) sono rappresentate le diverse interazioni tra la particella e il substrato (23).

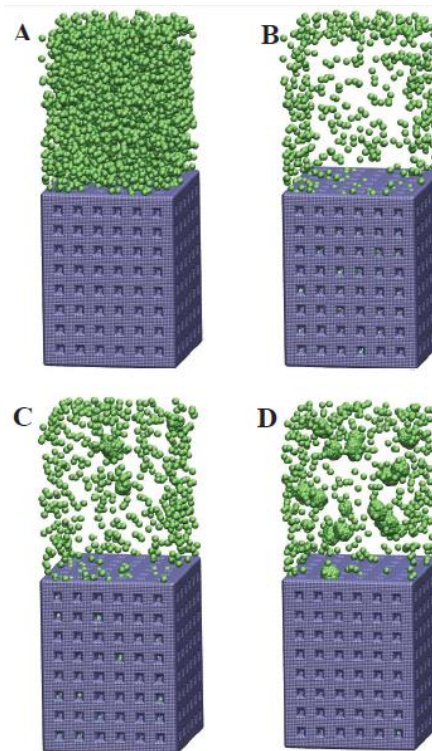
Galbusera et al. (24) descrivono il fenomeno introducendo una forza di adesione  $F_{adh}$ , data dalla seguente relazione:

$$F_{adh} = F_{max} e^{\lambda (d_0 - x)^2} \quad \text{con} \quad x = \frac{d_{triangle} - r}{r}$$

in cui  $F_{max}$  è la massima forza di adesione posta a 40 nN,  $\lambda$  è un coefficiente empirico dipendente dalla geometria e posto pari a 7,  $r$  è il raggio della particella e  $d_{triangle}$  è la distanza tra la particella e gli elementi triangolari in cui sono state suddivise le pareti dello scaffold.

Altri studi riguardanti l'interazione tra la cellula e lo scaffold prevedono l'utilizzo di teorie probabilistiche, come il Metodo Monte Carlo. Nel suo studio, per esempio, Robu et al. (25) definiscono un'energia di interazione tra cellule e scaffold. Se l'energia di interazione tra particelle è maggiore di quella tra particella e scaffold, le

cellule formano degli aggregati tra loro; se invece l'energia di interazione tra le particelle è nulla le particelle aderiranno allo scaffold (Figura 9).



**Figura 9:** Esempio delle simulazioni di semina svolte da Robu et al. A) Condizione iniziale. B), C), D) sono le diverse situazioni finali ottenute con diverse condizioni di interazione tra cellule e scaffold e tra cellule stesse. L'interazione tra cellule è maggiore nel caso D e minore nel caso C (25).

Gli studi computazionali risultano di grande utilità nell'ingegneria dei tessuti, sia nella caratterizzazione fluidodinamica dei sistemi, che nella simulazione di determinate fasi, poiché permettono di controllare i processi, individuare i parametri influenti e impostarli ad un valore tale da ottimizzare i processi stessi per avere un buon prodotto finale riproducibile.

## 4 Scopo del lavoro

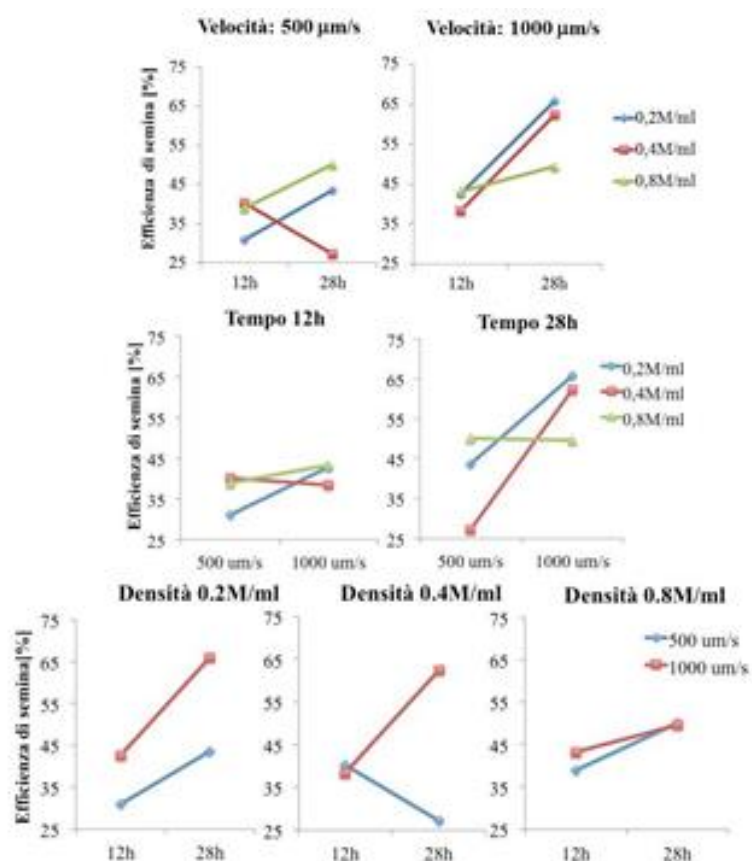
La difficoltà principale dell'ingegneria dei tessuti è quella di garantire alta riproducibilità e affidabilità nei processi di generazione di tessuti *in vitro*. L'utilizzo di dispositivi come i bioreattori, in cui le condizioni fisiche e chimiche sono sotto stretto controllo e riproducibili, tenta di sopperire a questa difficoltà. D'altra parte risulta utile studiare e analizzare questi dispositivi da un punto vista fluidodinamico attraverso i modelli computazionali, affinché siano ottimizzate le prestazioni in fase di progettazione.

È importante analizzare anche la componente di supporto cellulare poiché anche essa è un parametro che influenza il processo di ingegnerizzazione dei tessuti.

La semina cellulare su un supporto tridimensionale è la fase iniziale del processo di ingegnerizzazione dei tessuti e allo stesso tempo delicata e determinante per l'ottenimento di un buon prodotto finale. Nel caso di una semina dinamica, le condizioni idrodinamiche sono fondamentali per ottenere un buon risultato in termini di uniformità ed efficienza di semina.

I parametri che influenzano questa fase del processo sono tanti e sarebbe opportuno capire come questi siano dipendenti tra loro per determinare la combinazione di parametri che fornisca il miglior risultato.

Il lavoro di tesi svolto presso l'Istituto Ortopedico Galeazzi, citato precedentemente, ha avuto come obiettivo quello di valutare come i parametri relativi a velocità del flusso, tempo di semina e densità cellulare influenzino l'efficienza di semina nel bioreattore oscillante a perfusione (OPB). È stata svolta una campagna sperimentale utilizzando il metodo DoE (Design of Experiment) in cui si è variato un parametro alla volta per valutare quale valore permettesse di ottenere risultati migliori. Questo studio ha mostrato che l'efficienza di semina dipende dalla velocità del flusso e dal tempo di semina, ma non dalla densità cellulare, mentre la vitalità cellulare è inversamente proporzionale alla densità cellulare di semina, ma non dipende significativamente dalla durata della fase di semina e dalla velocità del flusso (Grafico 2).

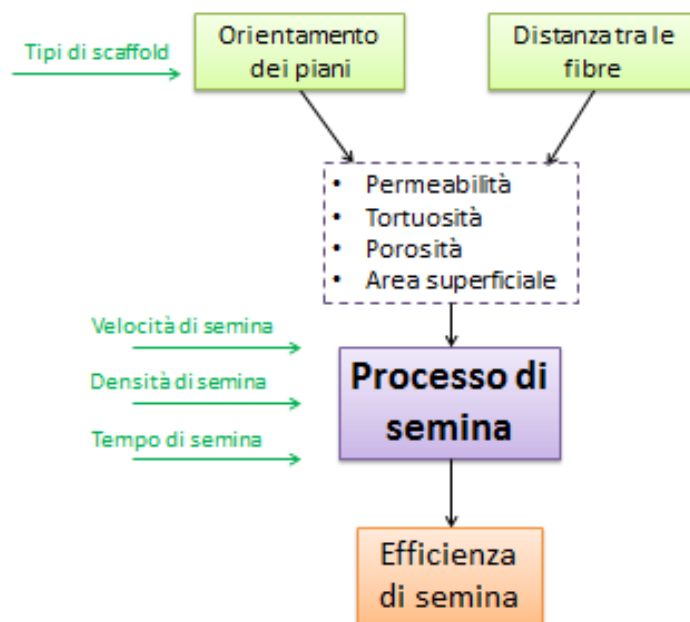


*Grafico 2: in alto è riportato l'andamento dell'efficienza di semina al variare della densità di semina e del tempo di semina, fissata la velocità del flusso; al centro l'andamento dell'efficienza di semina al variare della velocità di flusso e della densità cellulare, fissato il tempo di semina; in basso l'andamento dell'efficienza di semina al variare della velocità di flusso e del tempo di semina, fissate le densità di semina.*

Oltre alle variabili di processo, anche la variabile “scaffold” ha un ruolo non trascurabile nel processo di ingegnerizzazione dei tessuti.

Il presente lavoro di tesi si colloca nell'ambito della modellistica computazionale applicata all'ingegneria dei tessuti e si propone di analizzare come i parametri geometrici dello scaffold influenzino la fluidodinamica e, di conseguenza, il processo di semina dinamica per creare un modello computazionale predittivo. Lo scaffold possiede delle proprietà geometriche, relative alla sua macrostruttura, che influenzano il flusso del mezzo di coltura, generando sforzi di taglio diversi che influiscono sul processo di adesione delle cellule sullo scaffold stesso.

In questo lavoro di tesi sono stati progettati diversi scaffold variando l'orientamento dei piani rispetto agli altri adiacenti e la distanza tra le fibre, i quali a loro volta influenzano la porosità, la tortuosità, l'area superficiale e la permeabilità dello scaffold stesso (Figura 10).



*Figura 10: Schema a blocchi rappresentativo di come i parametri si influenzano tra loro.*

Con il software Pro.E sono stati progettati 12 scaffold costituiti da fibre che danno origine a diverse geometrie.

Mediante simulazioni computazionali è stata effettuata una caratterizzazione degli scaffold sia da un punto di vista fluidodinamico, ponendo l'attenzione sulle velocità che si generano al loro interno e sulla distribuzione degli sforzi di taglio derivati, sia da un punto di vista geometrico, valutando i parametri derivati dalla loro macrostruttura come la tortuosità, la permeabilità, l'area superficiale e la porosità.

Dai risultati delle simulazioni fluidodinamiche e in base ai valori dei parametri realtivi agli scaffold, sono stati selezionati alcuni di essi e sono stati realizzati in PLA con una stampante 3D.

Sono state eseguite inoltre delle simulazioni computazionali introducendo il comortamento di particelle in sospensione nel fluido per confrontare il processo di semina tra le diverse geometrie e valutare quale fornisce un risultato migliore in termini di efficienza di semina.

Sono stati condotti esperimenti di semina cellulare nel bioreattore OPB (Oscillating Perfusion Bioreactor) per validare il modello computazionale.

I modelli computazionali permettono di ottenere risultati concernenti parametri difficilmente valutabili all'interno di un bioreattore per la difficoltà di raggiungere e osservare tutti i punti del sistema. Inoltre consentono di valutare i fenomeni locali e

di isolare i contributi di diversi parametri fisici e geometrici. Presentano comunque limiti legati all'impossibilità di rappresentare correttamente la complessità dei fenomeni biologici nella totalità e nella variabilità intrinseca degli aspetti biochimici, biomeccanici che caratterizzano invece i processi cellulari. Occorre quindi prestare attenzione nelle fasi di definizione dei parametri del modello, in modo da riprodurre quanto più fedelmente possibile l'intero processo.



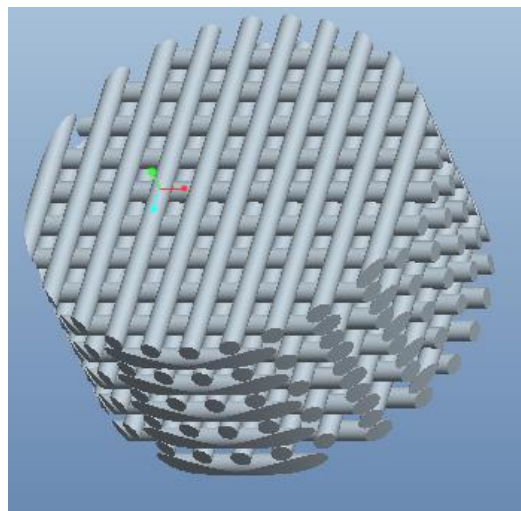
# Capitolo II

## Materiali e metodi

### 1 Progettazione e realizzazione degli scaffold

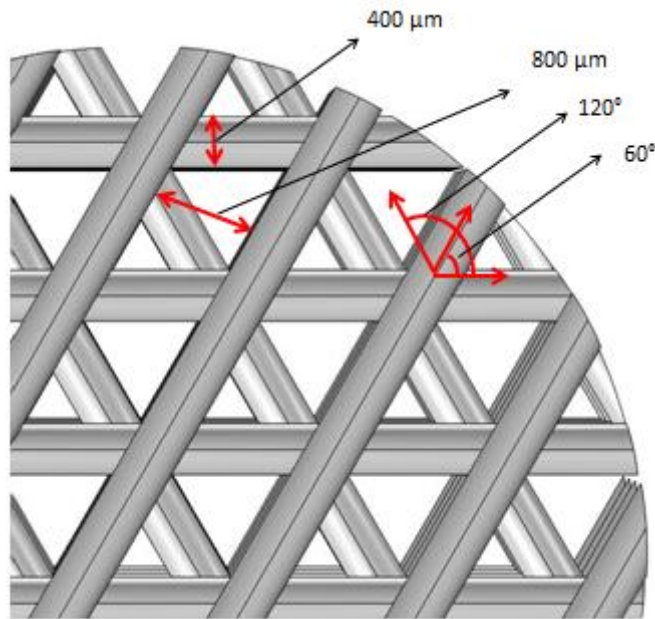
Nella fase di progettazione degli scaffold si è tenuto conto delle caratteristiche che uno scaffold deve possedere per ricreare un ambiente favorevole all'adesione e allo sviluppo cellulare. In particolare gli scaffold devono avere un elevato grado di porosità e interconnessione tra i pori e un alto rapporto superficie/volume.

Gli scaffold sono stati progettati con il software Creo (Parametric Technology Corporation, PTC) e sono cilindrici con diametro pari a 8 mm e spessore pari a 4 mm per essere alloggiati all'interno della camera porta-scaffold dell'OPB (Figura 11).



*Figura 11: Esempio di uno scaffold (scaffold 1) progettato con il software Creo.*

La geometria realizzata è costituita da fibre cilindriche intrecciate tra di loro, che generano una griglia. I parametri in ingresso sono la distanza tra le fibre e l'orientamento dei piani tra di loro. Le fibre sono cilindriche con diametro pari a  $400\ \mu\text{m}$  giacenti su diversi piani equidistanti (Figura 12).



**Figura 12:** Esempio di scaffold (scaffold 10) progettato, in cui possiamo vedere il diametro delle fibre ( $400\ \mu\text{m}$ ), la loro distanza ( $800\ \mu\text{m}$ ) e gli angoli tra le fibre appartenenti a piani diversi ( $60^\circ$ - $120^\circ$ ).

La distanza tra le fibre dello stesso piano è stata fissata a  $400\ \mu\text{m}$  e  $800\ \mu\text{m}$ .

Le fibre dello scaffold appartenenti a piani diversi adiacenti sono state sovrapposte di  $10\ \mu\text{m}$  nel tentativo di imitare quello che avviene nella fase di realizzazione in cui le fibre di PLA fuso in parte si sovrappongono a quelle adiacenti. Questa sovrapposizione nei file di progettazione è utile anche nelle simulazioni computazionali per evitare i punti di tangenza di superfici in cui risulterebbe impossibile creare una suddivisione in elementi.

In totale sono state progettate 12 tipologie di scaffold (Tabella 3), che di seguito verranno contraddistinte con il numero indicato nella prima colonna della Tabella 2. La nomenclatura riportata nella seconda colonna sta a indicare l'orientamento in gradi delle fibre di un piano rispetto al piano di riferimento che ha orientamento

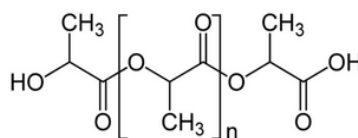
pari a 0° (ad esempio lo scaffold numero 3 ha il primo piano a 0°, il secondo ruotato di 45° rispetto al primo, il terzo di 90°, il quarto di 135°). L'aggiunta del termine "sfasati" invece indica che i piani con lo stesso orientamento sono disallineati tra di loro.

	SCAFFOLD	DIAM. FIBRE [µm]	DIST. FIBRE [µm]	VOL. PIENO [mm <sup>3</sup> ]	POROSITA'
1	0_90	400	400	79,0395	59,68%
2	0_90 sfasati	400	400	78,8114	59,80%
3	0_90_45_135	400	400	92,1278	53,00%
4	0_60_120	400	400	78,1327	60,14%
5	0_60_150	400	400	78,8808	59,76%
6	0_36_72_108_144	400	400	78,994	59,70%
7	0_90	400	800	51,0947	73,94%
8	0_90 sfasati	400	800	52,5477	73,19%
9	0_90_45_135	400	800	60,4942	69,14%
10	0_60_120	400	800	46,6773	76,19%
11	0_60_150	400	800	52,6494	73,14%
12	0_36_72_108_144	400	800	52,6116	73,16%

*Tabella 3: Sono elencate le 12 tipologie di scaffold, indicando per ciascuno l'orientamento dei piani adiacenti e l'eventuale sfasamento delle fibre, il diametro delle fibre, la distanza tra le fibre dello stesso piano, la porosità ottenuta come rapporto tra volume vuoto e volume pieno.*

Gli scaffold sono stati realizzati in acido poli-lattico (PLA) trasparente, un polimero sintetico citocompatibile.

Il PLA è un poliestere alifatico (Figura 13) termoplastico ottenuto dalla fermentazione di amido proveniente da riso o mais.



*Figura 13: Formula chimica dell'acido polilattico (PLA)*

Possiede alte proprietà termiche e di processabilità. Si può lavorare con diverse tecniche (film casting, estrusione, blow molding, fiber spinning,...).

È un polimero che va incontro a degradazione lenta (6 mesi-2 anni), ma i suoi prodotti di degradazione ( $H_2O$  e  $CO_2$ ) sono perfettamente biocompatibili. Attualmente è utilizzato in numerose applicazioni biomediche, come suture, stent, dispositivi per somministrazione dei farmaci (26).

La temperatura di fusione è intorno ai  $195^{\circ}C$ . Non possiede elevate proprietà meccaniche: va incontro a rottura fragile con meno del 10% di allungamento.

Per realizzare gli scaffold è stata usata la tecnica del Fused Deposition Modeling (FDM): il polimero viene fuso ed estruso in fibre del diametro desiderato che vengono deposte su una superficie. I file CAD degli scaffold progettati sono stati convertiti manualmente in G-Code, il formato che permette alla stampante 3D “RapMan 3.1” della “Bits from bytes” (Figura 14) di creare l’estrusione.



*Figura 14: Stampante 3D utilizzata per la realizzazione degli scaffold in PLA*

Nel file G-Code sono presenti le coordinate delle estremità delle fibre nello spazio in modo che l’estrusore, azionato da motori stepper, esegua gli spostamenti in x,y,z così da depositare le fibre secondo la geometria desiderata.

La dimensione delle fibre dipende dalla temperatura del polimero, dalla velocità con cui si muove l’estrusore e dalla portata del polimero fuso all’interno dell’estrusore stesso, il quale ha un diametro fisso di 0,5 mm.

Per realizzare le fibre con un diametro di 400  $\mu\text{m}$  è stata fissata una temperatura di fusione di 220°C e una frequenza di rotazione del motore, legata alla velocità con cui gli estrusori si spostano e alla portata del polimero estruso, di 1600 Hz (Figura 15).

```

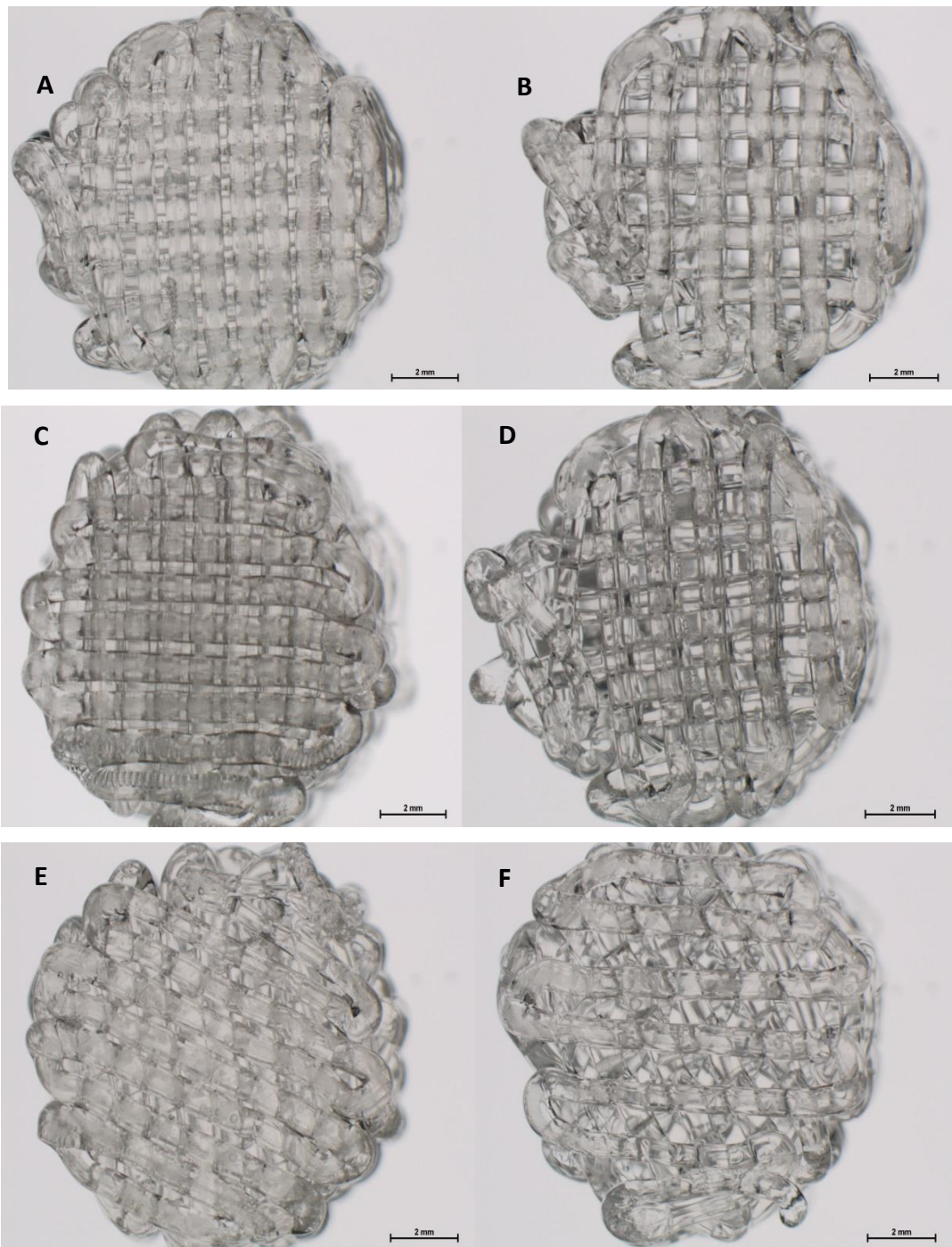
^Axon version: 2.1.0
^Checksum: YES
^Time: 1234
^Ex1: ABS black
^Ex2: PLA white
^Ex3: None           ^8strati D=8mm 90° sfasati
M227 P3200 S3200
M105
M113 S1.0
M108 S600.0
M542
M107
M204 S220
M106
M552 P57600 S600
M543
M107
G1 X-4.0 Y-1.2 Z0.4 F30000.0 ^1strato
M201
G1 X-4.0 Y1.2 Z0.4 F1600.0
G1 X-3.2 Y2.4 Z0.4 F1600.0
G1 X-3.2 Y-2.4 Z0.4 F1600.0
G1 X-2.4 Y-3.2 Z0.4 F1600.0
G1 X-2.4 Y3.2 Z0.4 F1600.0
G1 X-1.6 Y3.6 Z0.4 F1600.0
G1 X-1.6 Y-3.6 Z0.4 F1600.0
G1 X-0.8 Y-3.9 Z0.4 F1600.0
G1 X-0.8 Y3.9 Z0.4 F1600.0
G1 X0.0 Y4.0 Z0.4 F1600.0
G1 X0.0 Y-4.0 Z0.4 F1600.0
G1 X0.8 Y-3.9 Z0.4 F1600.0
G1 X0.8 Y3.9 Z0.4 F1600.0
G1 X1.6 Y3.6 Z0.4 F1600.0
G1 X1.6 Y-3.6 Z0.4 F1600.0
G1 X2.4 Y-3.2 Z0.4 F1600.0
G1 X2.4 Y3.2 Z0.4 F1600.0
G1 X3.2 Y2.4 Z0.4 F1600.0
G1 X3.2 Y-2.4 Z0.4 F1600.0
G1 X4.0 Y-1.2 Z0.4 F1600.0
G1 X4.0 Y1.2 Z0.4 F1600.0
M103

```

*Figura 15: Esempio di G-Code per la realizzazione di uno strato dello scaffold*

Dopo la deposizione gli scaffold sono stati sterilizzati immergendoli per 30 minuti in etanolo al 70%, sono stati lasciati asciugare all'interno della cappa a flusso laminare sotto il getto di aria sterile per far sì che l'etanolo evaporasse e sono stati sottoposti a radiazioni UV per 60 minuti.

Nelle immagini che seguono (Figura 16 A, B, C, D, E, F) sono riportate delle immagini ottenute allo stereo microscopio degli scaffold 1, 2, 4, 7, 8.



**Figura 16:** Alcuni scaffold prima dell'utilizzo negli esperimenti di semina. A) Scaffold n°1, fibre distanti 0,4mm, angoli 0° e 90°; B) Scaffold n°7, fibre distanti 0,8mm, angoli 0° e 90°; C) Scaffold n°2, fibre distanti 0,4mm, angoli 0° e 90° con sfasamento; D) Scaffold n°8, fibre distanti 0,8mm, angoli 0° e 90° con sfasamento; E) Scaffold n°4, fibre distanti 0,4mm, angoli 0°, 60°, 120°; F) Scaffold n°10, fibre distanti 0,8mm, angoli 0°, 60°, 120°.

## 2 Simulazioni computazionali

Le simulazioni computazionali sono state eseguite presso il LaBS (Laboratory of Biological Structure Mechanics) del Dipartimento di Chimica, Materiali e Ingegneria Chimica del Politecnico di Milano.

La preparazione di un modello computazionale prevede:

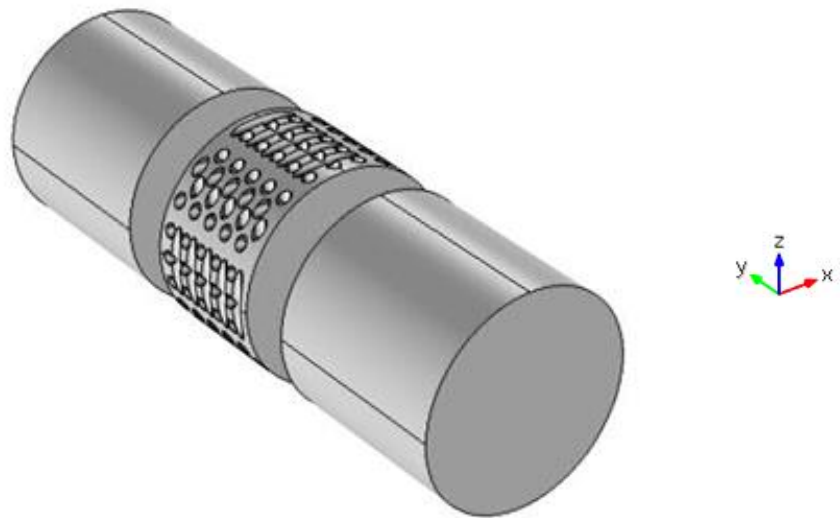
- 1- importazione e adattamento di una geometria in formato CAD;
- 2- preparazione e validazione della griglia di calcolo (mesh);
- 3- scelta e impostazione delle condizioni al contorno nell'opportuno modello fisico.

Nelle analisi computazionali è stata considerata una singola camera di coltura.

Data la tortuosa e complessa configurazione interna del singolo scaffold è necessario sfruttare simmetrie, ridurre e semplificare il sistema nei domini più periferici (es. tubi di connessione), in modo da ridurre la dimensione totale del modello e permettendone il calcolo con gli strumenti a disposizione (workstation – RAM - 16GB).

### 2.1 Geometria

La simulazione computazionale è svolta sul volume occupato dal fluido contenuto nel bioreattore. Per ottenere la parte fluida del sistema è stato importato il file CAD dello scaffold ed è stato creato al suo interno un cilindro di diametro di 6,35 mm (pari al diametro interno del tubo in silicone utilizzato per le camere di coltura e quindi al diametro della sezione dello scaffold effettivamente perfusa), con altezza 5 mm. È stata eseguita la sottrazione tra il cilindro e il file importato. Sono stati aggiunti poi due cilindri con diametro di 6,35 mm e altezza pari a 6 mm tali che una loro base fosse congruente rispettivamente a una base del cilindro già esistente (Figura 17).



*Figura 17: Geometria iniziale del volume fluido: al centro lo scaffold e ai lati i due cilindri con altezza 6 mm e sezione 6,35 mm, adiacenti alla struttura porosa.*

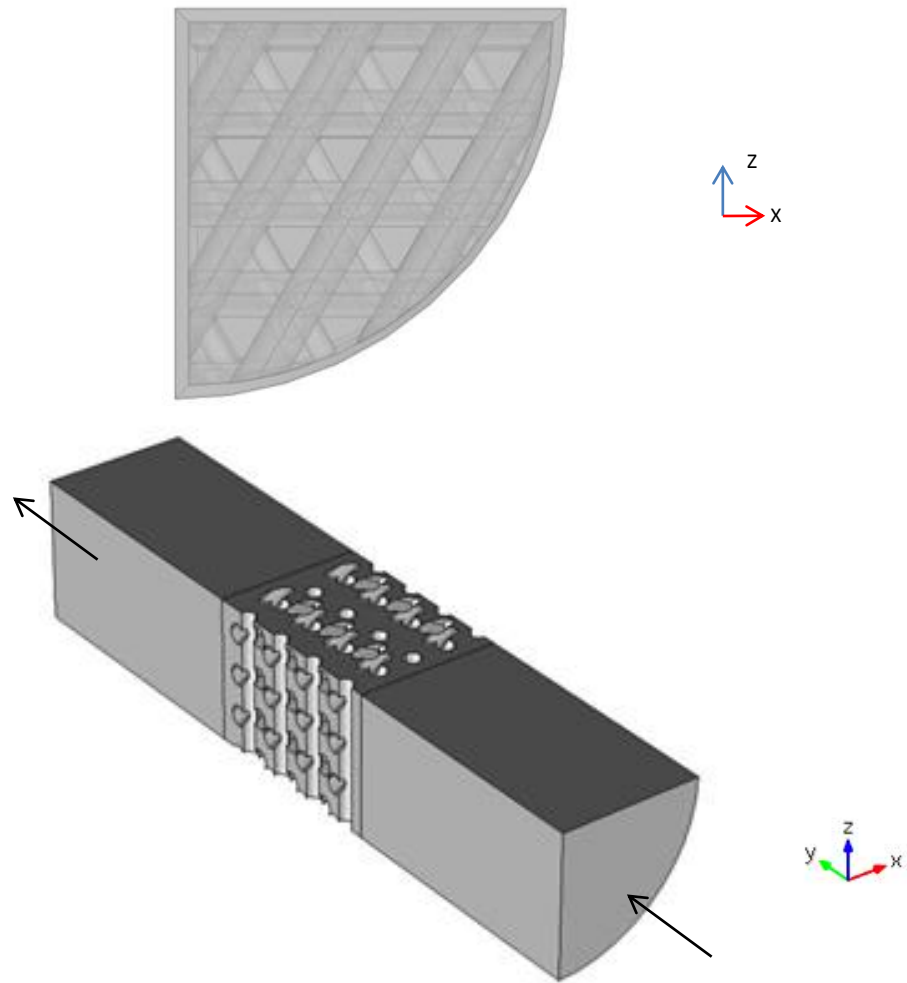
La lunghezza del tratto lineare della camera è di 16,5 mm. L'altezza dei cilindri affincati allo scaffold è stata calcolata sulla base dei risultati di simulazioni preliminari eseguite su un modello geometrico con canali cilindrici di ingresso di lunghezza maggiore. Si è scelta la minima lunghezza utile per rappresentare correttamente lo sviluppo del profilo di velocità da parabolico (all'ingresso del tubo) a quello specifico in ingresso allo scaffold nelle specifiche condizioni di portata.

Lo stessa soluzione è stata adottata sia a monte che a valle dello scaffold. Il modello rappresenta quindi una porzione di tubo nell'intorno dello scaffold, nella quale è stata trascurata la curvatura.

Un'ulteriore semplificazione è stata quella di considerare un quarto del sistema, sfruttando le simmetrie che caratterizzano il reticolo di fibre che compone gli scaffold (Figura 18).

Il fine ultimo delle semplificazioni eseguite in questa parte è quello di ridurre il più possibile la geometria per limitare il numero di elementi di calcolo e di conseguenza il carico computazionale.





*Figura 18: Geometria costruita per le simulazioni computazionali in Comsol. In alto si può osservare la simmetria dello scaffold a livello della superficie di ingresso/uscita dello scaffold., mentre in basso è riportato un esempio di geometria completa utilizzato nelle simulazioni.*

## 2.2 Materiale

Il fluido utilizzato nella simulazione ha le caratteristiche del mezzo di coltura utilizzato negli esperimenti. Il mezzo di coltura è un fluido acquoso che presenta, a 37°C, valori di densità e di viscosità posti rispettivamente a 1000 kg/m<sup>3</sup> (27) e a 8,1\*10<sup>-4</sup> Pa/s (28) (Figura 19).

Property	Name	Value	Unit	Property group
✓ Dynamic viscosity	mu	8.1/10 <sup>4</sup>	Pa*s	Basic
✓ Density	rho	1000	kg/...	Basic

*Figura 19: Schermata in Comsol 4.2 in cui è possibile settare i parametri del fluido.*

### 2.3 Simulazione del flusso laminare

Nella camera di coltura del bioreattore OPB si genera un movimento relativo tra il mezzo di coltura e le pareti della camera e dello scaffold.

Si considera come sistema di riferimento [1] l'insieme di scaffold e tubo in silicone. Tale sistema di riferimento è in movimento rispetto al sistema di riferimento [2] globale esterno alla camera stessa e rispetto al mezzo di coltura [3]. Se ci si pone sul sistema di riferimento [1] solidale allo scaffold-tubo, si osserva il movimento del fluido nella forma di flusso laminare con profilo parabolico sulle pareti e sulle fibre dello scaffold.

Riferendoci alla condizione sperimentale nella quale lo scaffold oscilla solidale ad un tubo rotante (sistema di riferimento [1]), e i due peli liberi del mezzo di coltura ai capi del tubo non subiscono variazioni di quota rispetto al sistema di riferimento [2], è possibile calcolare la portata di fluido fluente attraverso lo scaffold in condizioni stazionarie.

La portata si calcola quindi come rapporto tra il volume di fluido totale che fluisce attraverso lo scaffold durante un'oscillazione ( $V=10^4 \text{ mm}^3$ ) e la durata di un'oscillazione ( $t=631 \text{ s}$ ) ottenendo un valore di  $Q=15,8 \text{ mm}^3/\text{s}$ .

Si può esprimere la portata volumetrica anche come il prodotto tra la velocità media,  $v_{media}$ , e la sezione attraversata,  $A$ .

$$Q = \frac{V}{t_{osc}} = v_{media} \cdot A \quad (1)$$

La velocità media nel tubo risulta essere  $v_{media}=5 \cdot 10^{-4} \text{ m/s}$  e si può quindi verificare la condizione di regime laminare, valutando il numero di Reynolds nel tubo pari a 3,92 (eq.2).

$$Re = \frac{v \cdot D \cdot \rho}{\mu} \quad (2)$$

in cui  $v$  è la velocità media ( $500 \mu\text{m/s}$ ),  $D$  il diametro del tubo ( $6,35 \text{ mm}$ ),  $\rho$  la densità del fluido ( $1000 \text{ kg/m}^3$ ) e  $\mu$  la viscosità del fluido ( $8,1 \cdot 10^{-4} \text{ Pa}\cdot\text{s}$ ) (28).

Le equazioni che governano il flusso laminare sono:

$$\rho \frac{\partial \mathbf{u}}{\partial t} + \rho(\mathbf{u} \cdot \nabla)\mathbf{u} = \nabla \cdot [-p\mathbf{I} + \mu(\nabla\mathbf{u} + (\nabla\mathbf{u})^T)] + F_G + F_{ST} + F_{EXT} + F \quad (3)$$

$$\rho \nabla \cdot \mathbf{u} = 0 \quad (4)$$

La (3) è l'equazione di Navier-Stokes, derivata dal principio di conservazione della quantità di moto in un flusso incomprimibile di un fluido newtoniano, dove  $\mathbf{u}$  è il vettore velocità,  $\rho$  la densità del fluido,  $\mu$  la viscosità del fluido,  $p$  la pressione e  $F$  comprende tutte le forze esterne applicate al sistema. Il membro di sinistra indica l'accelerazione del fluido, data da un contributo transitorio e uno convettivo presente anche a regime. Le forze che determinano l'accelerazione del generico elemento di fluido sono le forze di superficie normali legate alla pressione, le forze di superficie tangenziali legate al gradiente di velocità e le forze di massa, le quali comprendono le forze dovute alla gravità, alla tensione superficiale, ad un contributo esterno all'energia libera e una forza di volume eventualmente definibile.

La (4) è l'equazione di continuità dei fluidi, che indica l'incomprimibilità del fluido.

Per quanto riguarda la definizione delle condizioni di bordo, la velocità del fluido sulla superficie di ingresso è stata definita introducendo un profilo parabolico normale alla superficie di ingresso (eq.5):

$$V(x, z) = \left( -\frac{v_{max}[(x-x_0)^2 - (z-z_0)^2]}{r^2} + v_{max} \right) \quad (5)$$

in cui  $v_{max}$  è la velocità più elevata nel profilo parabolico,  $x_0$  e  $z_0$  sono le coordinate del centro del cilindro,  $r$  è il raggio del cilindro (3,175 mm).

Poiché la velocità media del fluido nel tubo del bioreattore equivale alla velocità di oscillazione del sistema  $v_{osc}$ , si ottiene la seguente relazione:

$$v_{max} = 2v_{media} = 2v_{osc}$$

Sulla superficie di uscita è stata imposta un pressione di 0 Pa in assenza di stress viscoso.

Sono state impostate le simmetrie sulle pareti interne del sistema, per cui è valida la seguente espressione:

$$\mathbf{u} \cdot \mathbf{n} = 0 \quad (6)$$

in cui  $\mathbf{u}$  è la velocità e  $\mathbf{n}$  il vettore normale alla superficie. Questa condizione al contorno stabilisce che non ci sono velocità perpendicolari alla superficie selezionata.

Sulle superfici esterne, che dovrebbero rappresentare la camera in silicone, e sulle pareti delle fibre dello scaffold è stata impostata la condizione “*No slip*”, cioè di velocità nulla.

Nel sistema non sono state inserite forze esterne, trascurando le forze di gravità, ipotizzando che in un tratto così breve come quello considerato per la simulazione la forza di gravità non modifica in modo significativo la sua linea d’azione.

La parte cellulare sospesa nel mezzo di coltura è stata simulata con l’utilizzo del modulo fisico del “Particle tracing for fluid”.

Il calcolo delle traiettorie è eseguito assegnando alla singola particella un diametro di 20  $\mu\text{m}$  (29) e una densità pari a 1020  $\text{kg}/\text{m}^3$  (30), proprietà sulla base delle quali è possibile calcolare la forza di trascinamento agente sulla particella ad opera del fluido e il loro effetto sulla traiettoria.

Le particelle sono sottoposte a una forza di trascinamento (“*Drag Force*”) da parte del fluido in cui sono sospese. La forza è definita in questo modo:

$$\mathbf{F} = m_p F_d (\mathbf{u} - \mathbf{v}) \quad (9)$$

$$F_d = \frac{18\mu}{\rho_p d_p^2} \quad (10)$$

in cui  $\mu$  è viscosità del fluido,  $\rho_p$  è la densità delle particelle,  $m_p$  la massa delle particelle,  $\mathbf{v}$  è la velocità delle particelle e  $\mathbf{u}$  la velocità del fluido, ricavata in condizioni stazionarie.

Per quanto riguarda le condizioni iniziali si è ipotizzata una distribuzione uniforme su tutto il volume di mezzo di coltura nell’istante iniziale, con concentrazione pari a  $0,2 \cdot 10^6$  cell/ml che equivalgono a 2 milioni di cellule sospese in 10 ml di mezzo di coltura.

All’istante iniziale le particelle disperse, nel numero di 9500, sono state posizionate, uniformemente distribuite, nel cilindro a monte dello scaffold

Alle pareti della geometria sono state impostate le condizioni di interazione con le particelle:

- sulle pareti delle fibre si è impostata la condizione di “*Freeze*”, cioè di adesione con mantenimento dei valori di velocità e di energia cinetica delle particelle nell’istante precedente all’attacco. Le equazioni sono:

$$\mathbf{q}' = \mathbf{q}_c \quad (11)$$

$$\mathbf{v}' = \mathbf{v}_c \quad (12)$$

- sulle altre pareti (parete del tubo in silicone) è stata scelta un'interazione di tipo “*Bounce*”, cioè di rimbalzo, in quanto si è ipotizzato che l'adesione di cellule a tali pareti sia relativamente rara. Le equazioni relative a questa condizione sono:

$$\mathbf{q}' = \mathbf{q} \quad (13)$$

$$\mathbf{v}' = \mathbf{v} - 2(\mathbf{n} \cdot \mathbf{v})\mathbf{n} \quad (14)$$

## 2.4 Generazione della mesh

La generazione di una mesh consiste nella suddivisione del dominio in elementi costituenti una griglia sulla quale sono discretizzate e risolte le equazioni del modello. Il procedimento di verifica di sensitività della mesh è un passaggio obbligato, che permette di verificare l'indipendenza della soluzione dal grado di infittimento della griglia.

L'accuratezza del risultato delle simulazioni CFD dipende dal grado di discretizzazione del dominio. È opportuno scegliere una dimensione degli elementi adeguata alla dimensione del dominio e al grado di accuratezza richiesta. La procedura di verifica della sensitività della mesh permette di selezionare il grado di infittimento della griglia, per trovare un compromesso tra accuratezza della soluzione e costo computazionale. Sono state pertanto eseguite simulazioni preliminari con successivo infittimento della griglia su una geometria di prova.

La discretizzazione a elementi quadratici scelta prevede un infittimento maggiore nel dominio interno allo scaffold rispetto a quello riservato ai tubi a monte e a valle dello scaffold, le cui dimensioni sono riportate in tabella 4. Per il dominio centrale in cui è presente lo scaffold sono state eseguite diverse discretizzazioni (Tabella 4).

Per i domini fluidi all'esterno dello scaffold è stata scelta una discretizzazione diversa rispetto a quella dello scaffold solo nel terzo e nel quarto caso, in cui è stata scelta una discretizzazione di tipo Normale, in cui la dimensione massima è di 0,216 mm e la minima 0,0644 mm, perché ritenuta abbastanza raffinata per descrivere i domini stessi. Per i domini fluidi all'esterno dello scaffold è stata scelta una discretizzazione diversa rispetto a quella dello scaffold solo nel terzo e nel quarto caso, in cui è stata scelta una discretizzazione di tipo Normale, in cui la

dimensione massima è di 0,216 mm e la minima 0,0644 mm, perché ritenuta abbastanza raffinata per descrivere i domini stessi.

I rispettivi valori di sforzo di taglio sono stati plottati su un grafico per valutare la differenza delle soluzioni di ciascuna mesh rispetto alle altre (Grafico 3).

	Mesh 1	Mesh 2	Mesh 3
Dimensione max [mm]	0,2	0,185	0,171
Dimensione min [mm]	0,04	0,035	0,0322
N° elementi poroso [ $10^3$ ]	872	980	1328
N° elementi totali [ $10^3$ ]	1053	1085	1488

Tabella4: In tabella sono riportati i diversi parametri relativi alle mesh realizzate.

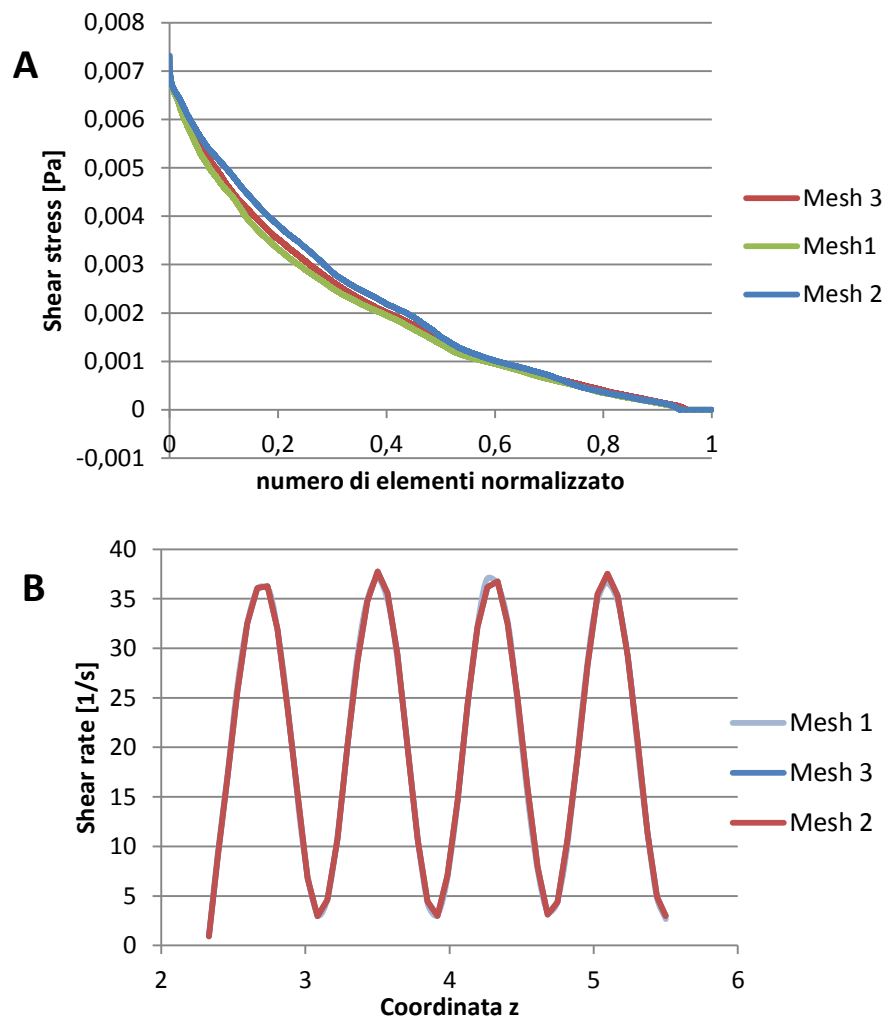
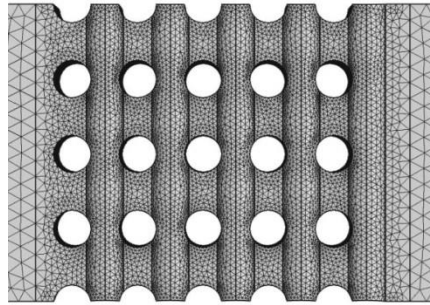


Grafico 3: A) Valori di sforzo di taglio nelle pareti dello scaffold rispettivamente a ciascuna mesh quadratica. In ordinata vi sono i valori di sforzo di taglio puntuali espressi in Pa, in ascissa il numero di elementi della mesh normalizzato. B) Shear rate calcolato su una linea dello scaffold con le mesh quadriche e lineari utilizzate per il confronto.

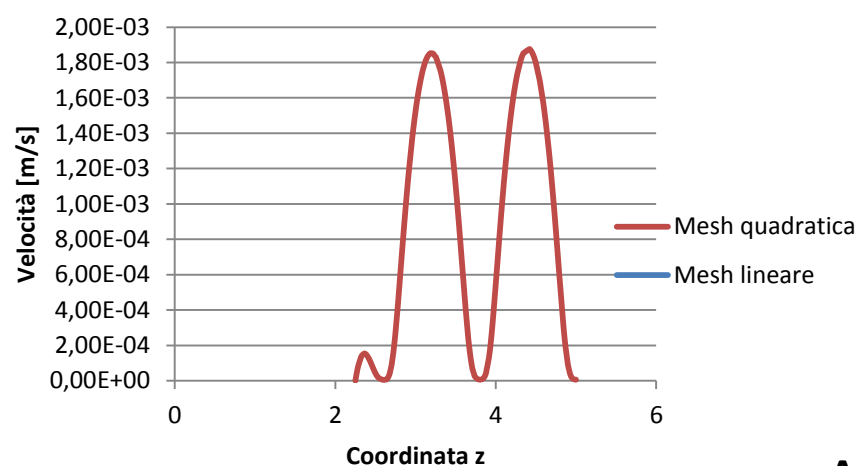
È stata scelta la prima discretizzazione, la meno fitta, poiché lo scostamento dalle altre più fitte è perlopiù trascurabile e risulta avere il minimo numero di elementi necessari per evitare un'eccessiva distorsione di alcuni di essi. Un esempio della mesh quadratica utilizzata è riportato in figura 20.



*Figura 20: Esempio della mesh utilizzata nello scaffold 1.*

Per implementare la simulazione relativa al moto delle particelle, è stato necessario utilizzare una mesh con caratteristiche differenti. L'utilizzo di questo modello era infatti eccessivamente oneroso in termini di potenza di calcolo richiesta.

Per ovviare al problema, mantenendo un grado di accuratezza accettabile, è stata implementata una mesh a elementi lineari, ma circa 1,2 volte più fitta. È stato verificato che i profili di velocità calcolati su una linea (superficie di fibra esposta al flusso) sono equivalenti a quelli ottenuti nelle precedenti simulazioni di solo fluido (Grafico 4).



**A**

*Grafico 4: Confronto tra i profili di velocità calcolati lungo una linea con la mesh quadratica meno fitta e la mesh lineare più fitta.*

## 2.5 Studio

Lo studio si suddivide in due parti, una relativa al flusso laminare e una relativa al moto delle particelle. Il flusso laminare è stato studiato in condizioni stazionarie, mentre il modulo relativo alle particelle è stato studiato in condizioni tempo-dipendenti. Per entrambe sono stati utilizzati dei solutori iterativi.

La traiettorie e velocità delle particelle sono state calcolate per un intervallo di tempo pari a 40 secondi. Il modello utilizzato calcola la soluzione delle variabili appartenenti alle particelle sulla base del campo fluidodinamico calcolato a priori con una simulazione dedicata. Non esiste nessun feedback che permetta alla presenza o al moto delle particelle di interagire e di modificare il campo fluidodinamico. Ne risulta che il modello utilizzato considera i due fenomeni come “debolmente” accoppiati.



### 3 Caratterizzazione geometrica degli scaffold

Gli scaffold sono stati classificati da un punto di vista geometrico in base ai valori di porosità, di tortuosità, di permeabilità e di superficie, parametri dipendenti dalla distanza delle fibre e dall'orientamento di esse e che influenzano le caratteristiche fluidodinamiche degli stessi scaffold (31).

#### 3.1 Calcolo della porosità

La porosità è definita come il rapporto tra il volume vuoto,  $V_{vuoto}$ , e il volume pieno,  $V_{pieno}$ , :

$$\phi = \frac{V_{vuoto}}{V_{pieno}}$$

Il volume pieno è stato ricavato dal file di progettazione tramite il software Creo (Parametric Technology Corporation, PTC), mentre il volume vuoto è stato ottenuto come differenza tra il volume di un cilindro con diametro 8 mm e altezza 4 mm e il volume pieno.

#### 3.2 Calcolo della tortuosità

La tortuosità ( $\tau$ ) è definita come il rapporto tra la distanza percorsa dalle particelle di fluido ( $L$ ) e la minima lunghezza lineare che connette il punto di entrata e di uscita, detta anche distanza euclidea ( $L_0$ ) (Figura 21) :

$$\tau = \frac{L}{L_0}$$

Il calcolo della tortuosità è stato effettuato ricavando dalle simulazioni computazionali la distanza percorsa dalla particelle di fluido.

Tramite il software Comsol sono state ricavate le linee di flusso (“Streamlines”) relative alla velocità (Figura 22), impostando la densità uniforme e la distanza tra una linea di flusso e l'altra pari a 0,015 mm, e sono state esportate le coordinate x,y,z dei punti appartenenti a ciascuna linea di flusso.

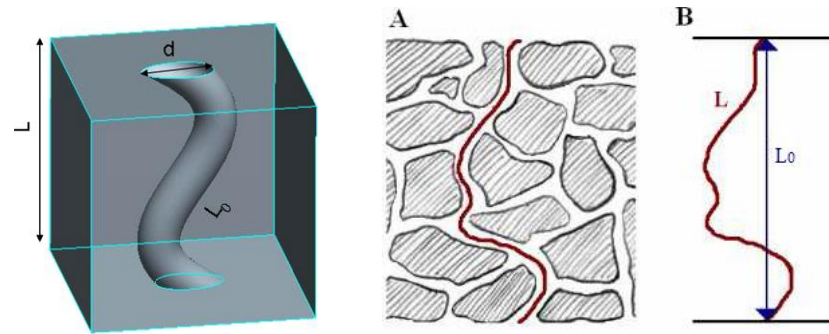


Figura 21: Definizione di tortuosità (31).

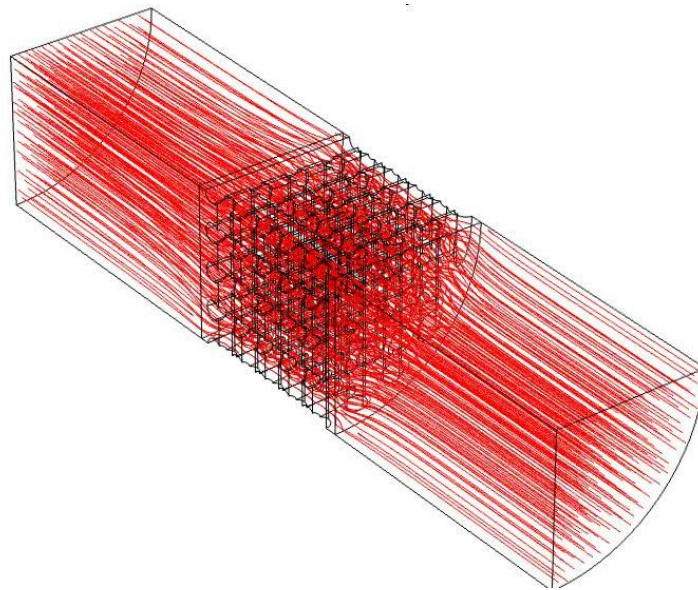


Figura 22: Le Streamline tracciate lungo una delle geometrie studiate (poroso n° 2), impostando la densità di distribuzione uniforme e la distanza tra i punti di inizio di 0,015mm.

La lunghezza di ciascuna linea è stata calcolata e approssimata come somma delle distanze lineari tra i punti che la compongono, note le coordinate.

La tortuosità è stata calcolata come segue:

$$T = \frac{\sum_{i=1}^N \frac{\sum_{i=1}^M \sqrt{(x_{1,i} - x_{2,i})^2 + (y_{1,i} - y_{2,i})^2 + (z_{1,i} - z_{2,i})^2}}{L_n}}{N}$$

dove 1 e 2 indicano le coordinate relative a due punti consecutivi che definiscono un singolo tratto lineare, N il numero di linee di flusso per ciascuna geometria, M è il numero di punti in ciascuna linea di flusso,  $L_n$  è la lunghezza normalizzata.

È stata poi calcolata la lunghezza media delle linee di flusso e divisa per la lunghezza del percorso più breve per ottenere la tortuosità.

L'elaborazione dei dati è stata effettuata con un algoritmo implementato in Matlab.

### 3.3 Calcolo della permeabilità

La permeabilità è un parametro che indica la facilità con cui un mezzo poroso si lascia attraversare da un fluido ed è pertanto indice dell'interconnessione tra i pori. Essa è definita tramite la legge di Darcy:

$$k = \frac{\mu \cdot Q \cdot L}{A \cdot \Delta P}$$

in cui  $k$  è la permeabilità,  $\mu$  la viscosità del fluido,  $Q$  la portata massica,  $L$  la distanza percorsa dal fluido,  $A$  la sezione percorsa dal fluido,  $\Delta P$  il gradiente di pressione tra l'ingresso e l'uscita del fluido, ottenuto dalle simulazioni computazionali.

### 3.4 Calcolo dell'area superficiale dello scaffold

L'area superficiale dello scaffold è la somma di tutte le superfici che lo compongono. È un parametro indicativo di quanta superficie sia disponibile per l'adesione cellulare.

In questo lavoro l'area superficiale è stata stimata con il software utilizzato per le simulazioni computazionali, Comsol 4.3.

### 3.5 Selezione degli scaffold

La selezione degli scaffold ha come obiettivo quello osservare l'effetto della variazione di singoli parametri nell'efficienza di semina cellulare influenzandone la fluidodinamica locale.

Una prima selezione degli scaffold è stata fatta in base al valore della porosità. Sono stati scelti gli scaffold numero 1, 2 e 4, i quali hanno valori di porosità attorno al 60%, e gli scaffold numero 7, 8 e 10, i cui valori di porosità sono attorno al 74%. Questi sei scaffold sono stati oggetto delle simulazioni computazionali, sono stati realizzati e sono stati classificati secondo i valori di tortuosità, di permeabilità e di area superficiale, parametri ricavati come descritto precedentemente (Tabella 4).

## 4 Probabilità di adesione

Le simulazioni computazionali hanno permesso di effettuare delle simulazioni della fase di semina, introducendo nel modello utilizzato per valutare la fluidodinamica le particelle che rappresentano le cellule.

Le simulazioni tempo-dipendenti relative al movimento delle particelle analizzano un tempo di semina di 40 secondi, pari al tempo necessario perché il fluido con una velocità di flusso di 500  $\mu\text{m/s}$  attraversi tutto il domino di lunghezza 16 mm.

La durata delle simulazioni varia a seconda della geometria e va da un tempo pari a 60 minuti a un tempo pari a 20 ore circa, se eseguita su workstation con processore i7 e 16 Gb di RAM.

Per valutare la probabilità di adesione nelle simulazioni è opportuno valutare il numero di particelle che sono rimaste sulla superficie dello scaffold al termine della simulazione e dividerlo per il numero di particelle iniziali.

La particella si considera aderita quando la sua velocità scende al di sotto del valore limite di  $1,5 \cdot 10^{-8}$  m/s: questo valore è stato stabilito sulla base dei risultati delle simulazioni. Infatti sebbene nessuna particella raggiunga un stato a velocità nulla, esiste una popolazione di particelle che, raggiunto lo strato di fluido in prossimità delle pareti dello scaffold assume velocità  $1,49^{-8}$  m/s, rimanendo pertanto “intrappolata” all’interno dello strato limite in una condizione di velocità quasi nulla.

Pertanto il numero di particelle che si considerano “aderite” è meglio definibile come il numero di particelle che è entrato in una zona “con alta probabilità di contatto” con la parete. Sebbene questo numero sia lontano dal rappresentare il numero di cellule che nelle medesime condizioni potrebbero aderire alle superfici, rappresenta sicuramente un valido parametro di confronto tra diversi scaffold in termini di possibilità di interazione cellula/scaffold. Uno modello che coinvolga una descrizione più complessa dell’interazione superficiale, con una mesh dedicata, potrebbe fornire ulteriore dettaglio a proposito delle singole particelle classificate come “intrappolate”.

È stato fatto un campionamento in diversi istanti della simulazione (ogni 5 secondi), esportando i dati relativi alla coordinata y (direzione del flusso) e la velocità delle particelle all'interno del fluido nei rispettivi istanti.

Dopo avere limitato i dati della y all'interno del dominio in cui è presente lo scaffold, le particelle sono state suddivise per intervalli di velocità e i dati ottenuti sono stati plottati per effettuare il confronto.

La probabilità di adesione è stata calcolata come rapporto tra il numero di particelle con velocità minore di  $1,5 \cdot 10^{-8}$  m/s e il numero di particelle totale.

## 5 Analisi statistica

I dati ottenuti sperimentalmente e computazionalmente sono stati analizzati statisticamente per trovare una correlazione tra loro che potesse permettere di validare il modello computazionale.

La correlazione effettuata tra i valori della probabilità di adesione e i dati geometrici e fluidodinamici dello scaffold è stata valutata sulla base del coefficiente di correlazione di Spearman ( $\rho_s$ ), una misura non parametrica della dipendenza statistica tra 2 variabili, la quale viene descritta con una funzione monotona. Il coefficiente di Spearman è compreso tra 1 e -1 e quanto più si avvicina a questi valori tanto più le variabili sono correlate tra loro in modo rispettivamente diretto e inverso. Se il valore è nullo le due variabili non sono correlate.

L'analisi statistica è stata effettuata per trovare una correlazione tra le variabili geometriche e fluidodinamiche degli scaffold, tra esse e la probabilità di adesione per individuare quali di esse hanno un'influenza più marcata rispetto alle altre.

Inoltre è stata calcolata la correlazione tra la probabilità di adesione e l'efficienza di semina per validare il modello computazionale utilizzato sulla base degli esperimenti condotti.

## 6 Metodi sperimentali

### 6.1 Colture cellulari

Le cellule utilizzate per le prove di validazione del modello computazionale sono le MG63, cellule tumorali da osteosarcoma umano. Sono delle cellule di linea, acquistate da banche cellulari che ne certificano l'omogeneità della popolazione. Essendo cellule di linea, sono in grado di duplicarsi indefinitamente in coltura senza andare incontro a senescenza dopo un certo numero di passaggi di espansione.

Il vantaggio di utilizzare cellule di linea consiste nel fatto che esse hanno un comportamento più stabile e riproducibile, che conferisce perciò una buona riproducibilità agli esperimenti.

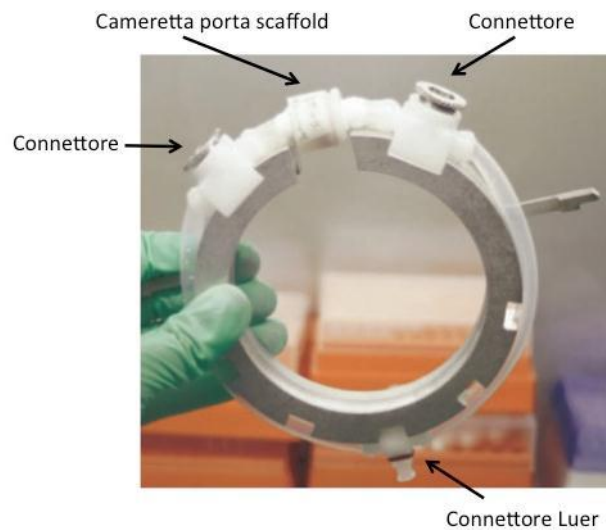
Le cellule vengono crioconservate in azoto liquido a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  all'interno di appositi contenitori chiamati Dewar, in una soluzione di FBS (Fetal Bovine Serum) con l'aggiunta del 10% di DMSO (dimetilsofossido).

Per effettuare lo scongelamento la sospensione cellulare viene centrifugata a 1400 rpm per 5 minuti e il pellet depositato viene risospeso con il mezzo di coltura in quantità adeguata per effettuare la conta cellulare tramite la tecnica "trypan blue dye exclusion".

Per la fase di espansione le cellule vengono seminate su delle T-flask con una densità di  $10000\text{ cells/cm}^2$ . Il mezzo di coltura usato per le MG63 è costituito da DMEM a basso contenuto di glucosio con L-glutamina e sodio piruvato con l'aggiunta del 10% di FBS, l'1% di PenStrep. Le T-flask contenenti la sospensione cellulare vengono poste in incubatore ad una temperatura di  $37^{\circ}\text{C}$ , in saturazione di vapore e concentrazione di  $\text{CO}_2$  pari al 5%. Una volta raggiunta la confluenza, le cellule possono essere staccate dalla flask usando la tripsina, un enzima proteolitico, che ha un tempo di azione di 5 minuti a  $37^{\circ}\text{C}$ . A questo punto le cellule possono essere utilizzate per gli esperimenti di semina.

## 6.2 Protocollo di semina dinamica

Per svolgere gli esperimenti di semina cellulare nel bioreattore oscillante a perfusione OPB, è stato utilizzato il protocollo di semina (SOP, standard operating procedure) messo a punto nel lavoro di tesi precedentemente svolto all'ospedale Galeazzi.



*Figura 23: Camera di coltura dell'OPB assemblata.*

La camera di coltura (Figura 23), dopo essere stata assemblata, deve essere sterilizzata prima dell'utilizzo. Essa viene posta aperta all'interno di una busta da sterilizzazione e subisce un ciclo completo a 121°C per 20 minuti in autoclave.

Gli scaffold vengono inseriti con una pinzetta sterile in un porta-scaffold di PDMS (polidimetilsilossano, Sylgard 184, Dow Corning Corporation, Midland, Michigan, USA).

Lo scaffold all'interno del porta-scaffold viene alloggiato all'interno della camera di coltura utilizzando pinzette sterili e la camera viene chiusa. Essa viene riempita con 8 ml di mezzo di coltura, introdotto tramite una pipetta da uno dei connettori, lasciando l'altro svitato per permettere la fuoriuscita dell'aria. Vengono avvitati poi tutti gli accessi e la camera è posta in incubatore (37 °C, saturazione di vapore, 5% CO<sub>2</sub>) in attesa che sia pronta la sospensione cellulare.



Le cellule vengono staccate dalle T-flask secondo la procedura descritta nel paragrafo precedente e si esegue la conta. Si prepara una sospensione a densità di 1 milione cells/ml dalla quale vengono prelevati 2 ml per ogni camera da seminare. Ulteriori 2 ml vengono prelevati e conservati per avere un'aliquota di riferimento. La sospensione cellulare ben miscelata va introdotta nella camera nello stesso modo utilizzato per il mezzo di coltura (Figura 24).



*Figura 24: A destra un'immagine della fase di riempimento della camera di coltura, a sinistra la camera di coltura pronta per essere inserita nell'incubatore.*

A questo punto le camere chiuse vengono poste in rotazione nel bioreattore all'interno dell'incubatore (a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> e saturazione di vapore).

La velocità di flusso (500 µm/s) è impostata nel sistema di controllo del bioreattore, esterno all'incubatore. L'angolo di oscillazione è pari a 270°.

### **6.3 Protocollo di semina statica**

Per valutare i vantaggi della semina cellulare dinamica rispetto a quella statica è necessario confrontare i risultati ottenuti con i dati forniti dalla semina in statico. Oltre a questo, la semina statica svolge anche il ruolo di controllo, cioè a parità di condizioni, escluso il movimento del fluido, valuto se e come aderiscono le cellule sullo scaffold.

Gli scaffold per la semina statica vengono anch'essi inseriti all'interno del porta-scaffold in PDMS e posti all'interno di un pozzetto di una multiwell da 6.

Il numero di cellule seminate è lo stesso utilizzato negli scaffold per la semina dinamica (2M di cellule).

Per la semina statica le cellule vengono sospese in 70  $\mu$ l di mezzo, che vengono depositati con una pipetta sulla superficie dello scaffold. Terminata la semina, la multiwell contenente gli scaffold viene messa in incubatore per due ore, in modo che le cellule abbiano il tempo di penetrare nello scaffold e rimanere adese ad esso. Trascorse le due ore, in ogni pozzetto della MultiWell vengono aggiunti 10 ml di mezzo di coltura in modo che le cellule abbiano i nutrienti di cui necessitano. Il tempo di semina dei controlli statici è il medesimo della semina in dinamico effettuata nelle camere del bioreattore.

#### **6.4 Protocollo di termine dell'esperimento**

Una volta terminata la fase di semina (24 ore) gli scaffold vengono estratti dalle camere di coltura e dalle multiwell e analizzati tramite due saggi: CyQuant, per valutare il numero di cellule aderite sullo scaffold ed MTT, per verificare la distribuzione delle cellule attraverso lo scaffold.

Dal momento che una parte delle cellule seminate potrebbe essere rimasta in sospensione nel mezzo di coltura o potrebbe aver aderito alle superfici della camera invece che allo scaffold, sia il mezzo di coltura che la camera vengono analizzate per determinare questi contributi.

In particolare il mezzo di coltura viene prelevato dalla camera di coltura o dalla multiwell e centrifugato. La camera di coltura viene poi tripsinizzata e il mezzo utilizzato viene anch'esso centrifugato. In questo modo si avranno per i campioni seminati dinamicamente tre contributi (cellule su scaffold, cellule nel mezzo di coltura, cellule aderite sulla camera). Per i campioni seminati staticamente si avranno invece due contributi (cellule su scaffold e cellule recuperate dal mezzo di coltura e dal pozzetto della multiwell). I contributi vengono quindi analizzati anch'essi tramite CyQuant.

## 6.5 Tecniche di analisi

### 6.5.1 Analisi di proliferazione cellulare: saggio Cyquant

Il kit CyQuant (Invitrogen Corporation, Isbad, CA, USA) possiede una sonda fluorescente, in grado di legarsi in maniera specifica agli acidi nucleici presenti all'interno della cellula. È possibile perciò quantificare il DNA cellulare attraverso un saggio spettrofotometrico.

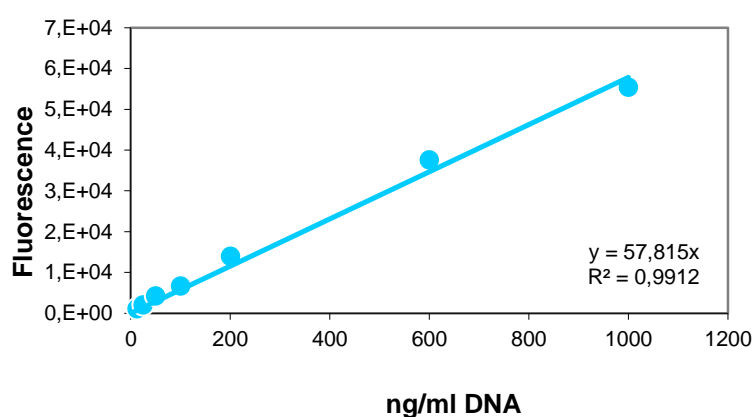
Prima di effettuare il saggio è necessario lisare le membrane cellulari cosicché gli acidi nucleici siano liberi di poter agganciare la sonda fluorescente.

Gli scaffold e i pellet cellulari vengono digeriti con la proteinasi K, una serina proteasi ad ampio spettro. A ogni campione sono stati aggiunti 250  $\mu$ l di soluzione di proteinasi K, nel caso di pellet cellulari, e 500  $\mu$ l, nel caso degli scaffold e dell'aliquota di riferimento.

Dopo essere stati agitati in un Vortex (VELP scientifica, Usmate, Italy), sono posti in un termo-agitatore a 56°C per 16 ore, per mettere l'enzima nelle condizioni ideali di attività.

Il kit di analisi è composto dai seguenti reagenti:

- CyQuant GR dye (componente A);
- cell-lysis buffer (componente B);
- $\lambda$  DNA standard necessario a costruire la curva di calibrazione.



**Grafico 5 : Curva di calibrazione a 8 punti, realizzata con il kit Cyquant utilizzato per i saggi effettuati. In ascissa è riportata la concentrazione di DNA in ng/ml , mentre in ordinata i valori di fluorescenza relativi ai valori di concentrazione di DNA.**

Per ogni kit si realizza una curva di calibrazione a 8 punti necessaria per la conversione dei valori di intensità di fluorescenza letti dallo spettrofotometro in valori di concentrazione del DNA (Grafico 4).

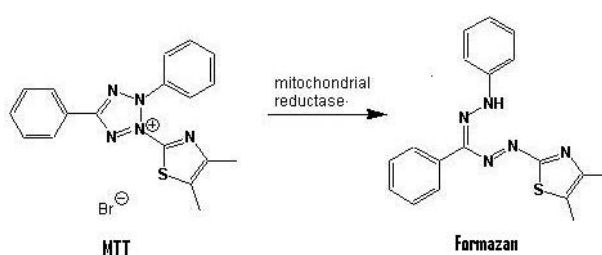
La lettura viene effettuata in triplicato: per ogni campione sono necessari 585  $\mu$ l di soluzione costituita da acqua bidistillata sterile ( $H_2O$  RNA-ase e DNA-ase free, GIBCO), sonda intercalante al 400X (componente A) e lisante cellulare al 20X (componente B).

Per la lettura in fluorescenza, in questo caso alla lunghezza d'onda di 520 nm, è necessario porre, in un pozzetto di una multiwell da 96 pozzetti a fondo nero, 5  $\mu$ l di soluzione prelevati dal campione digerito a cui vengono aggiunti 195  $\mu$ l della soluzione preparata con il kit. Dalla lettura di fluorescenza, ottenuta mediante spettrofotometro (Victor X3, PerkinElmer, Waltham, MA, USA) e, utilizzando la curva di calibrazione, è stata ricavata la concentrazione di DNA presente nel campione.

L'efficienza di semina è ricavata facendo il rapporto tra il numero di cellule sullo scaffold e il numero di cellule presenti nell'aliquota di riferimento, ottenuti con il saggio descritto.

### 6.5.2 Analisi qualitativa della distribuzione cellulare sullo scaffold: saggio MTT

L'MTT è un saggio colorimetrico volto alla valutazione della vitalità cellulare.



*Figura 25: Reazione di riduzione dell'MTT in formazano, che avviene all'interno dei mitocondri di cellule vive.*

Il principio su cui si basa questo test è misurare l'attività degli enzimi che riducono l'MTT (bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, Sigma-Aldrich

Corporation, St. Louis, Missouri, USA) a formazano (Figura 25), conferendo alla sostanza un colore blu/violaceo.

L'enzima responsabile di questa reazione di riduzione è il succinato deidrogenasi, che si trova all'interno dei mitocondri ed è attivo solo nelle cellule vive. Il suo ruolo è quello di tagliare l'anello di tetrazolio dell'MTT (sostanza di colore giallo) per formare, di conseguenza, il formazano (un sale blu). Esso è sensibile alla luce.

Per effettuare il saggio si scioglie la polvere di MTT in DMEM senza rosso fenolo con una concentrazione pari a 0,5 mg/ml e si immerge lo scaffold nella soluzione ottenuta per 3 ore in incubatore (37 °C, saturazione di vapore, 5% CO<sub>2</sub>), all'interno di un pozzetto di una Multiwell coperto da un foglio di carta stagnola, per essere al riparo dalla luce.

In questo lavoro di tesi tale saggio è stato usato solo in modo qualitativo, cioè si è valutata la distribuzione delle cellule nello scaffold con lo stereomicroscopio.

# Capitolo III

## Risultati

### 1 Risultati computazionali

#### 1.1 Caratterizzazione geometrica degli scaffold

Gli scaffold progettati tramite CAD sono stati classificati in base al valore di porosità. Tra quelli progettati ne sono stati scelti 6, di cui tre con porosità intorno al 60% e tre intorno al 74%, per effettuare le successive caratterizzazioni in termini di porosità, permeabilità, area superficiale e tortuosità (Tabella 5).

Scaffold	Porosità	Tortuosità	Permeabilità [mm <sup>2</sup> ]	Area superficiale [mm <sup>2</sup> ]
1	59,68%	1,06	0,06885	447,2
2	59,80%	1,14	0,05175	443,6
4	60,14%	1,5	0,05625	489,6
7	73,94%	1,06	0,2538	305,56
8	73,19%	1,15	0,14895	307,28
10	76,19%	1,49	0,1476	346,8

*Tabella 5: Valori di porosità, permeabilità, tortuosità e area superficiale di ciascuno scaffold scelto.*

##### 1.1.1 La tortuosità

I valori di tortuosità riportati mostrano che gli scaffold con la stessa disposizione delle fibre hanno una tortuosità simile. La distanza tra le fibre non interferisce su questo parametro. Ciò che influenza i valori di tortuosità è la geometria dello scaffold.

Valori di tortuosità maggiori potrebbero indicare una maggiore permanenza delle cellule all'interno dello scaffold e di conseguenza una maggiore probabilità di adesione delle cellule sulla sua superficie. Da questo punto di vista lo scaffold 4 sembrerebbe quello migliore.

### **1.1.2 La permeabilità**

La permeabilità è stata calcolata con la legge di Darcy, considerando i valori di perdita di carico estratti dalle simulazioni computazionali.

Nella tabella 5 si può osservare che permeabilità e porosità hanno trend indipendenti uno dall'altro. In generale uno scaffold più poroso dovrebbe offrire meno resistenza al flusso, lasciandosi attraversare più facilmente, ma la geometria dei pori può introdurre altre variabilità. Gli scaffold meno porosi (1,2,4) hanno una permeabilità più bassa di quelli più porosi (7,8,10). Ma si vede che gli scaffold 8 e 10 hanno permeabilità simili seppure la porosità sia leggermente diversa. Lo scaffold 7, con porosità intermedia tra i 2 precedenti, ha il valore di permeabilità più alto e pertanto sembrerebbe quello meno adatto.

### **1.1.3 L'area superficiale**

L'area superficiale è stata calcolata con Comsol, valutando l'area della mesh sulle superfici delle fibre dello scaffold.

Anche in questo caso non si nota alcun andamento riferibile a quello di altri parametri indagati. Gli scaffold con fibre distanti 800  $\mu\text{m}$  hanno valori minori di quelli con fibre distanti 400  $\mu\text{m}$ . Essa raggiunge il valore massimo nello scaffold 4 e il valore minimo nello scaffold 7.

Un'area superficiale maggiore è preferibile perché le cellule hanno una maggiore superficie dove tentare l'adesione. Perciò ancora una volta lo scaffold 4 sembrerebbe essere il miglior candidato.

## 1.2 Caratterizzazione fluidodinamica degli scaffold

Le simulazioni computazionali sono state utilizzate per ricavare informazioni sulla fluidodinamica di ciascuno scaffold permettendone la caratterizzazione. In particolare sono stati ricavati i valori di sforzo di taglio e velocità massima e media all'interno dello scaffold e di differenza di pressione tra l'ingresso e l'uscita (Tabella 6).

Scaffold	Max Shear Stress [mPa]	Max velocità [mm/s]	Velocità media [mm/s]	$\Delta P$ [Pa]
1	32,94	2,62	0,84	0,42462
2	31,275	2,56	0,91	0,566325
4	34,425	2,93	0,83	0,53568
7	18,99	2,16	0,68	0,114975
8	20,565	1,88	0,77	0,195795
10	22,815	2,66	0,74	0,20376

*Tabella 6: Nella tabella sono riportati i valori di massimo shear stress in mPa, di massima velocità in mm/s e la differenza di pressione tra ingresso e uscita in Pa.*

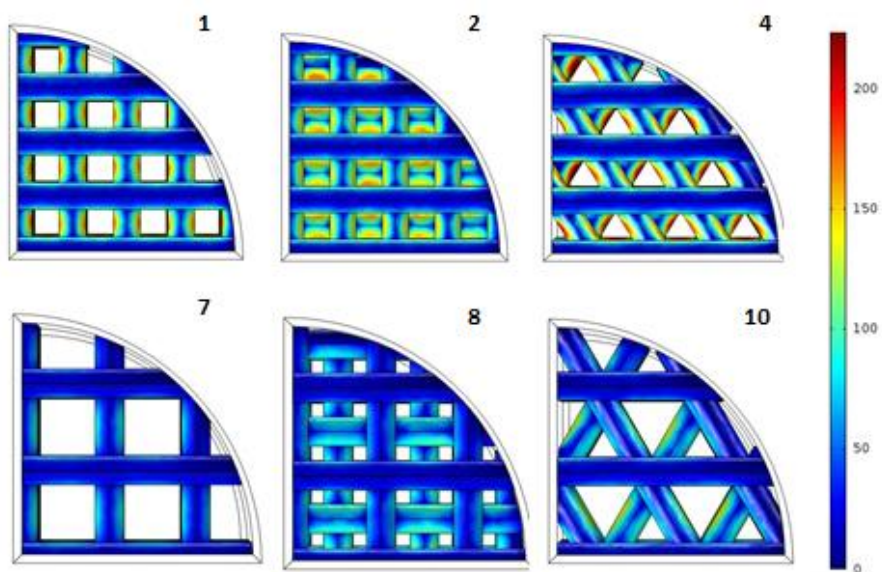
I valori massimi di shear stress ottenuti sono tutti al di sotto dei valori fisiologici di shear stress a cui sono sottoposte le cellule del tessuto osseo *in vivo* (0,8-3,8 Pa (32)). Con il software Comsol 4.3 è stato possibile ottenere le immagini di distribuzione degli sforzi di taglio.

Nelle figure 26, 27 e 28 sono riportate le mappe di distribuzione degli shear stress sulla superficie dello scaffold utilizzando un'unica scala dei valori che ha come massimo il massimo valore di shear stress ottenuto.

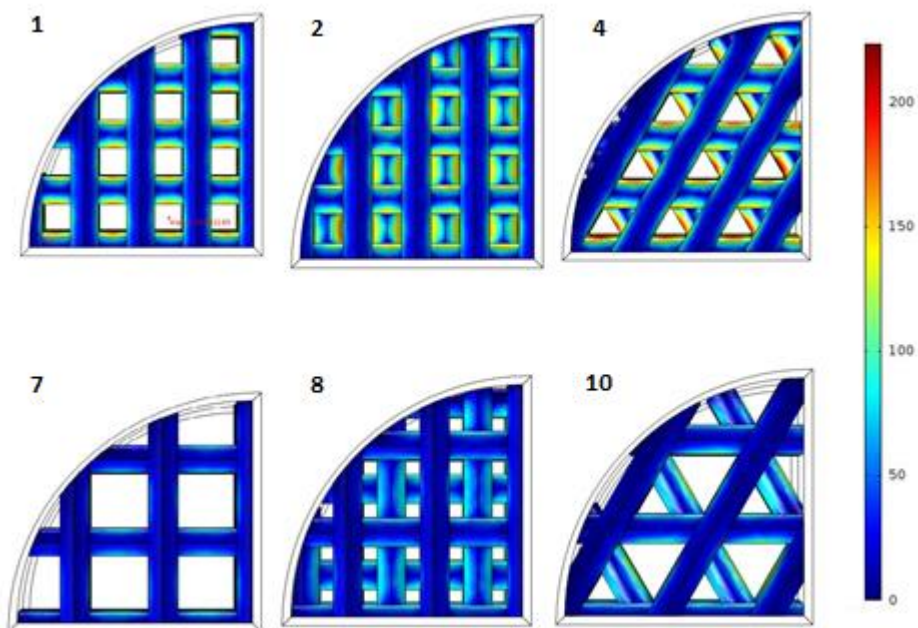
Possiamo osservare nella figura 26 la distribuzione degli shear nelle superfici di ingresso dello scaffold, nel grafico 27 nelle superfici in uscita e nella figura 28 è data una visione di insieme di tutta la superficie dello scaffold.

Dalle immagini emerge che lo scaffold 4 è quello che possiede dei punti con shear stress maggiore. Questo dato in sé non dà molte informazioni sulla fluidodinamica dello scaffold, perché i punti con maggior shear stress non sono rappresentativi della distribuzione di shear stress a valori intermedi. Pertanto è stata valutata anche la distribuzione degli shear stress in ciascuno scaffold.

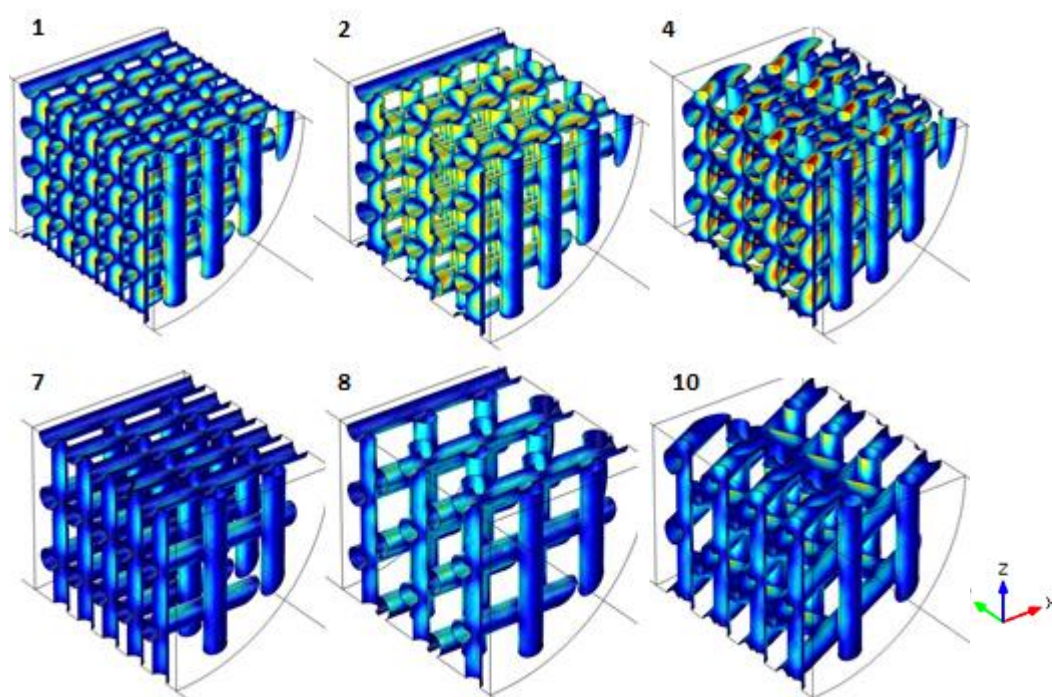




*Figura 26: Sforzo di taglio sulle superficie di ingresso degli scaffold, utilizzando per tutti una unica legenda di colore che ha come massimo il valore massimo di sforzo di taglio, e cioè quello relativo allo scaffold 4.*



*Figura 27: Sforzo di taglio sulle superficie di uscita degli scaffold, utilizzando per tutti una unica legenda di colore che ha come massimo il valore massimo di sforzo di taglio, e cioè quello relativo allo scaffold 4.*



*Figura 28: Confronto tra gli scaffold, visti tridimensionalmente, relativamente allo sforzo di taglio sulla superficie delle fibre, utilizzando una unica legenda che ha come valore massimo il massimo valore di sforzo di taglio trovato.*

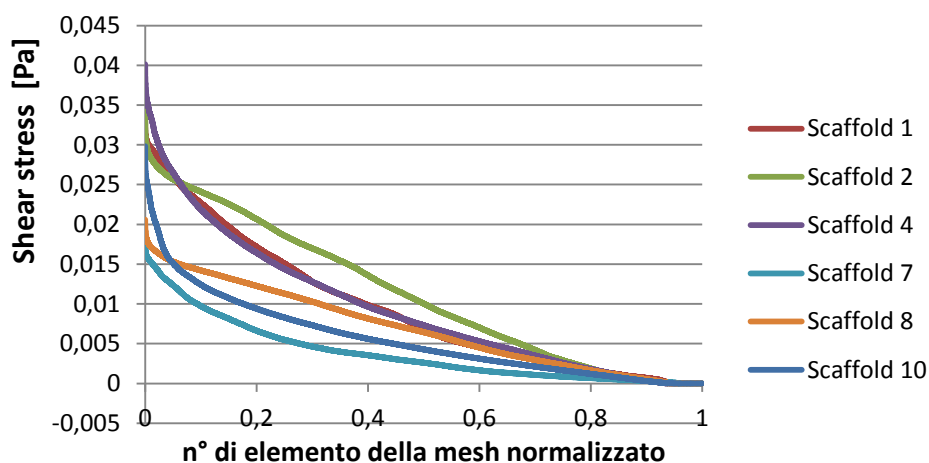
Nel grafico seguente (Grafico 5) è riportato in ordinata il valore in Pa dello shear stress calcolato dal software in ogni elemento della mesh sulle fibre dello scaffold e in ascissa è riportato il numero di elementi normalizzato rispetto a quello totale.

La normalizzazione è valida nell'ipotesi, confermata, che la mesh di superficie sia omogenea.

Si osserva dal grafico che gli scaffold hanno pochi punti della loro superficie in cui lo shear stress raggiunge il valore massimo relativo a ciascuno, poi i valori decrescono e nella maggior parte della superficie i valori sono minori.

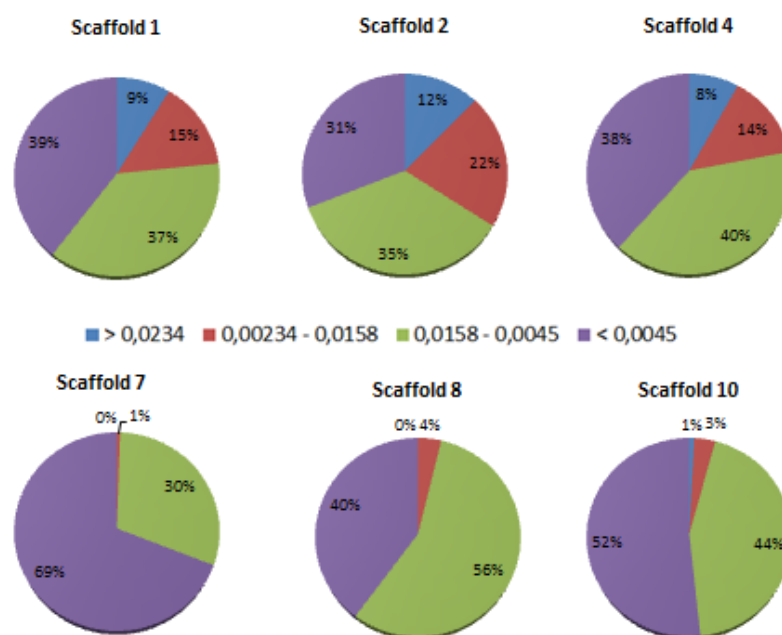
In particolare si osserva che lo scaffold 4, il quale presenta il valore massimo di shear stress, in realtà ha una quantità di shear stress con valori minori molto simili a quelli dello scaffold 1, così come lo scaffold 2 si ritrova ad avere i valori di shear stress maggiori di tutti gli altri scaffold per una superficie maggiore.

Lo scaffold 7 è quello con valori di shear stress minori, data la sua struttura con pori più grande.



**Grafico 6:** Andamento degli shear stress per ogni scaffold, calcolati su ogni elemento della mesh sulle fibre degli scaffold stessi. In ordinate ci sono i valori di shear stress in Pa, mentre in ascisse il numero dell'elemento della mesh normalizzato rispetto al numero totale degli elementi.

È sembrato utile pertanto scegliere quattro range di shear stress significativi ( $>0,0234$ ,  $0,0234 < \text{shear stress} < 0,0158$ ;  $0,0045 < \text{shear stress} < 0,0158$ ,  $\text{shear stress} < 0,0045$ ) per valutare la distribuzione degli shear stress di ciascuno scaffold e valutare per ciascuno scaffold la percentuale di ogni range.



**Grafico 7:** Distribuzione in percentuale degli shear stress sugli scaffold, considerando quattro range, riportati nella legenda, i cui valori sono espressi in Pa.

Dal Grafico 6 si osserva che gli scaffold con porosità minore (1, 2, 4) hanno più punti della superficie in cui lo shear stress è maggiore rispetto a quelli con porosità minore, dove le percentuali sono minori del 5%.

Lo scaffold 1 risulta avere il 23% di superficie con valori di shear stress maggiori di 0,0158 Pa, lo scaffold 2 raggiunge il 32% e lo scaffold 4 il 22%.

La percentuale di superficie degli scaffold meno porosi con shear stress minore di 0,0045 Pa invece è maggiore per lo scaffold 1 e minore per lo scaffold 2.

La superficie effettiva con i valori di shear stress più alti è ricavabile moltiplicando la percentuale di superficie con shear stress alti e il valore dell'area superficiale.

Scaffold	Area con shear stress maggiore [mm <sup>2</sup> ]
<b>1</b>	107,32
<b>2</b>	141,5
<b>4</b>	107,7
<b>7</b>	30,5
<b>8</b>	12,29
<b>10</b>	13,87

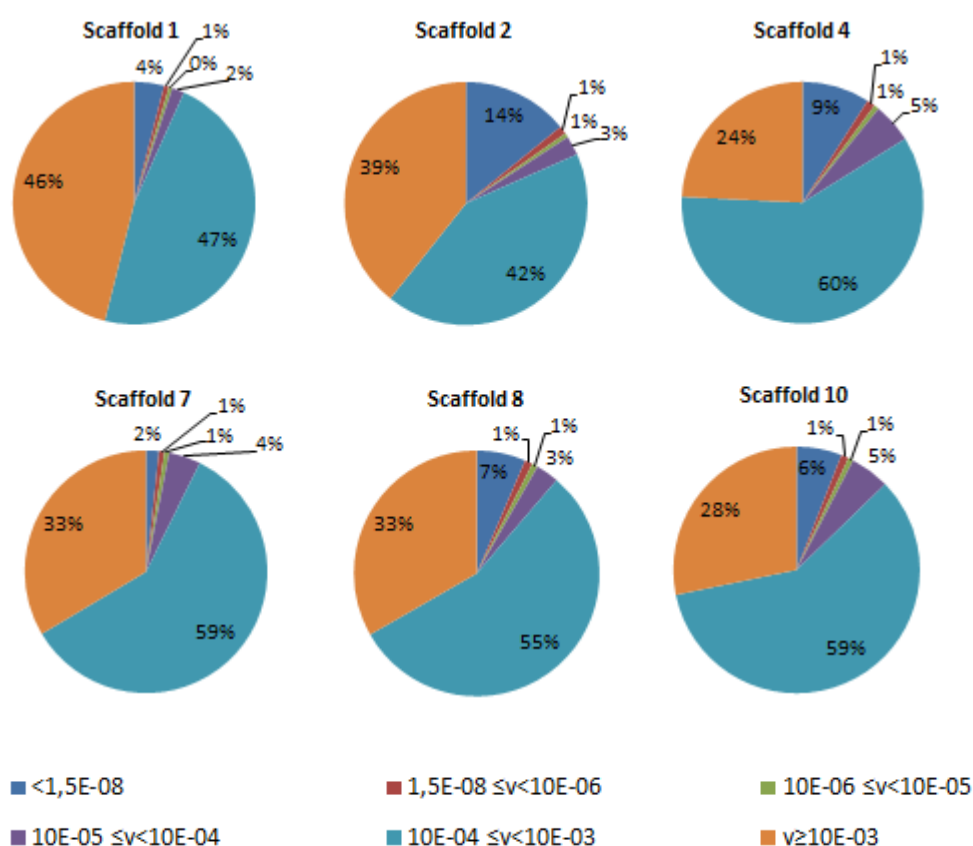
*Tabella 7: Area superficiale di ciascuno scaffold con valori alti di shear stress.*

Dall'analisi dello shear stress è difficile individuare quale scaffold sia migliore, poiché in letteratura non esistono ipotesi condivise riguardo i valori di shear stress che ottimizzano il processo di semina.

### 1.3 Probabilità di adesione

I dati ricavati dalle simulazioni computazionali della fase di semina relativi alla velocità di ciascuna particella a determinati istanti sono stati analizzati per determinare la probabilità di adesione delle cellule allo scaffold. In particolare è stato fatto un campionamento in diversi istanti della simulazione (ogni 5 secondi) e sono stati esportati i dati relativi alla velocità delle particelle all'interno del fluido nei rispettivi istanti.

Sono quindi stati individuati alcuni intervalli di velocità ritenuti significativi ed è stato calcolato il numero di particelle all'interno di ciascun intervallo (Grafico 7).



*Grafico 8: Distribuzione delle cellule per intervalli di velocità. Nella legenda i valori sono espressi in m/s.*

La probabilità di adesione è stata definita come il rapporto tra il numero di cellule con velocità considerate nulle (la soglia è stata posta a  $1,5 \cdot 10^{-8}$  m/s) e il numero di cellule totali. Dal confronto tra i valori di probabilità di adesione delle particelle su ciascuno scaffold (Tabella 7), emerge che lo scaffold che presenta la maggior

probabilità di adesione risulta essere il 2, mentre lo scaffold 7 è quello che presenta minor probabilità di adesione.

Scaffold	Probabilità di adesione
1	4%
2	14%
4	9%
7	2%
8	7%
10	6%

Tabella 8: Valori di probabilità di adesione ottenuti per ciascuno scaffold.

Nelle immagini seguenti sono riportate le particelle all'interno del modello con lo scaffold 2 a tempo 0, 10s, 20s, 30s, 40s, con la scala di colori relativa alla loro velocità.

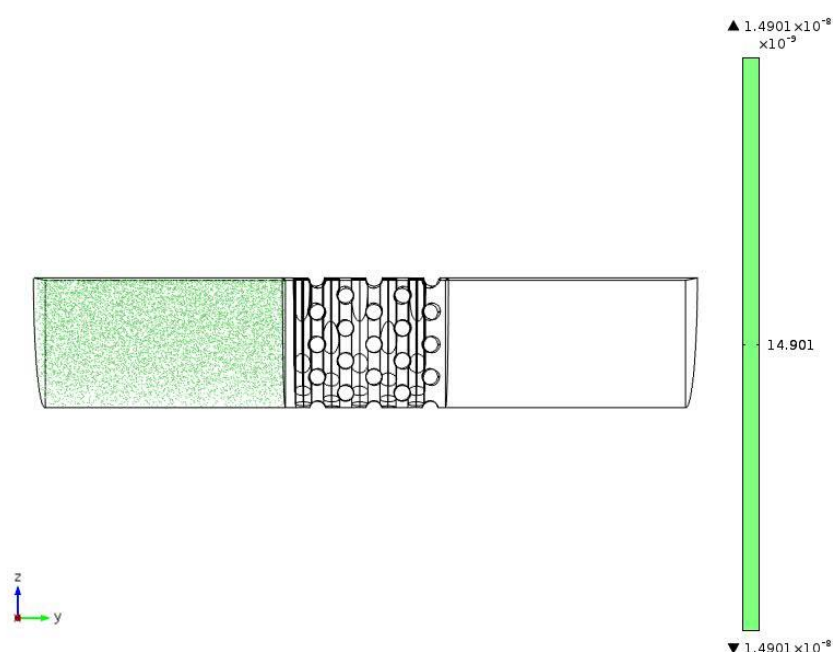
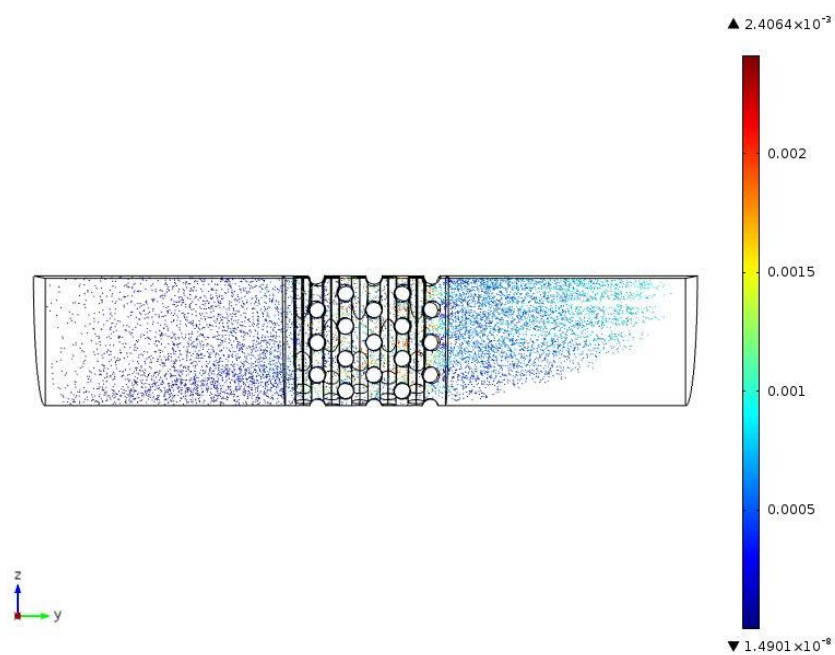
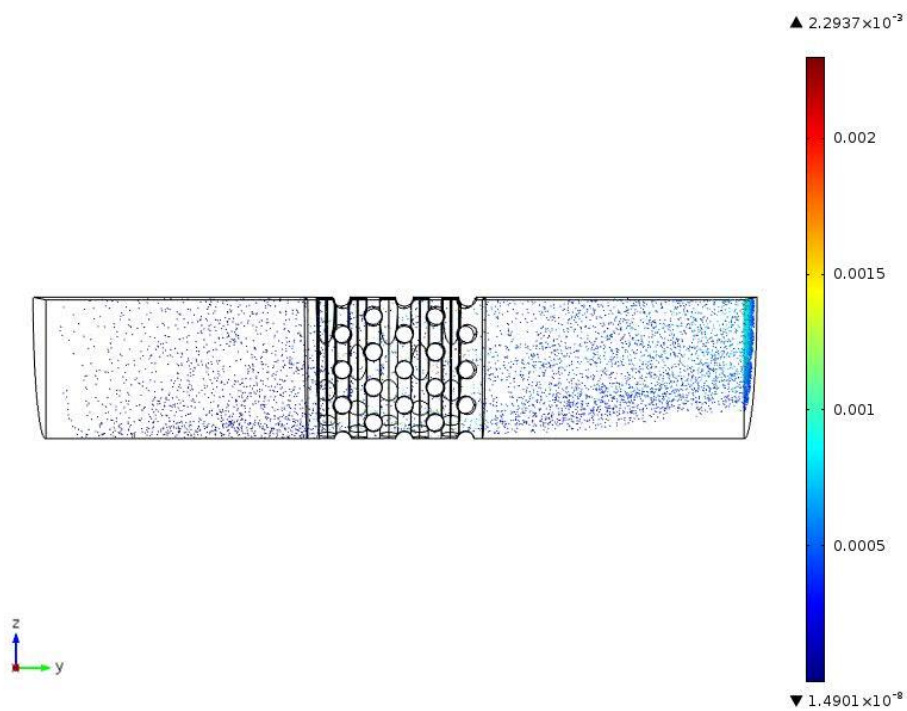


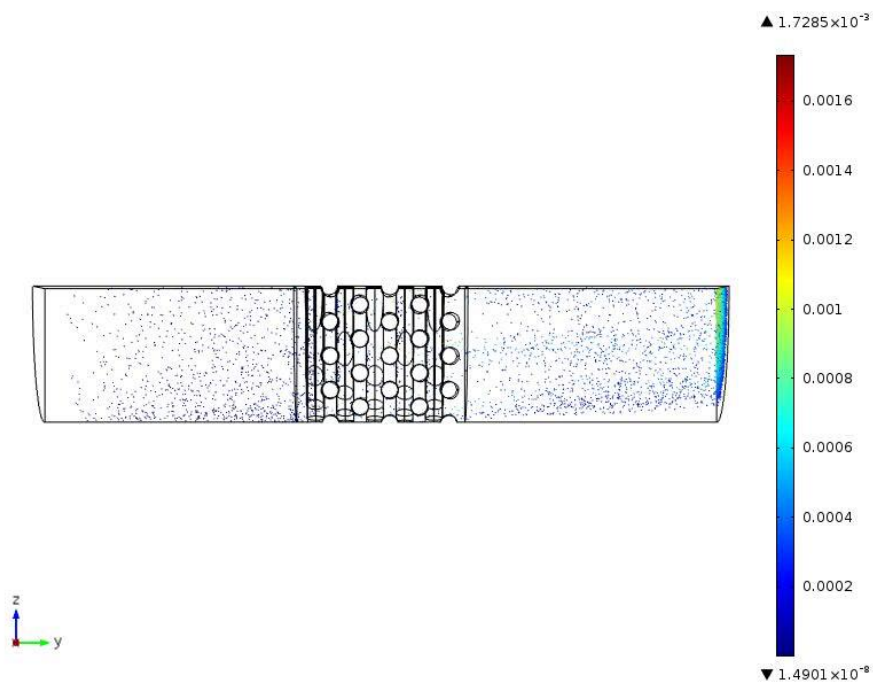
Figura 29: Particelle distribuite nel dominio a monte dello scaffold al tempo 0.



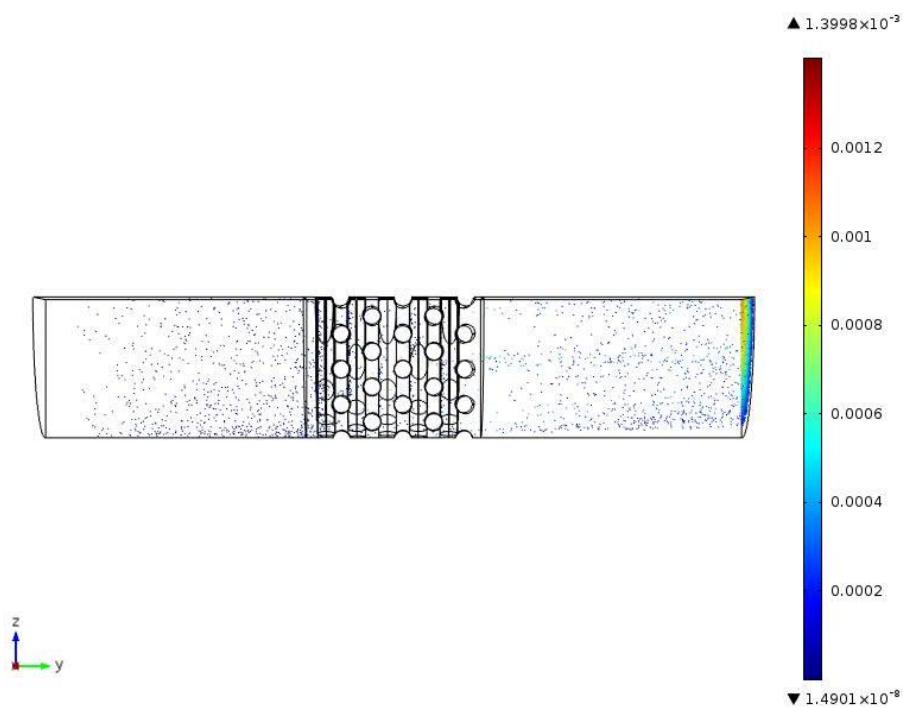
*Figura 30: Particelle trascinate dal fluido al tempo 10 secondi.*



*Figura 31: Particelle trascinate dal fluido al tempo 20 secondi*

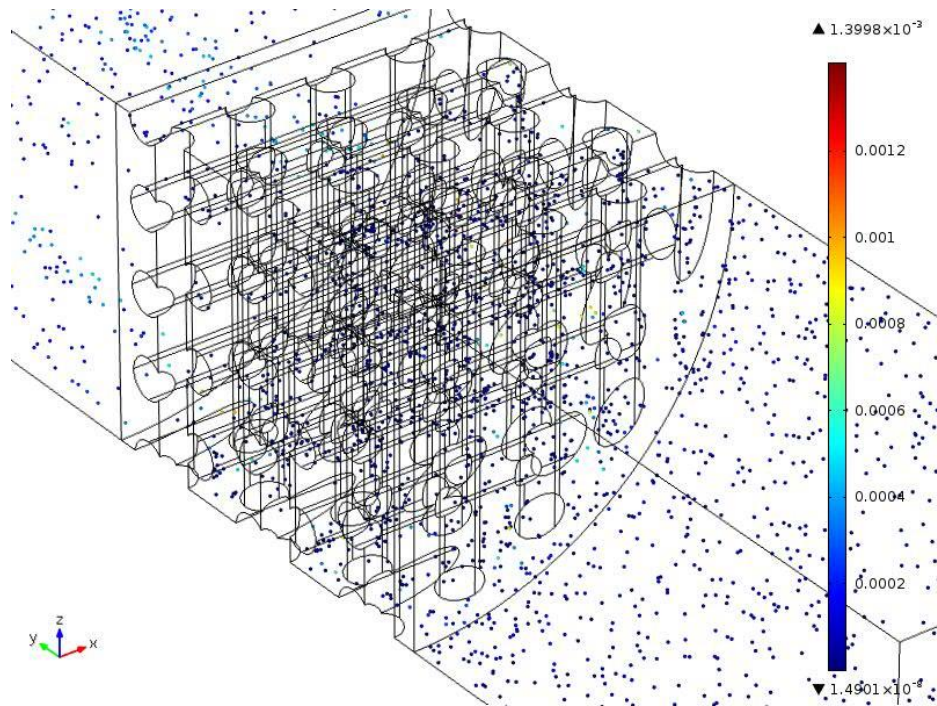


*Figura 32: Particelle trascinate dal fluido al tempo 30 secondi.*



*Figura 33: Particelle trascinate dal fluido al tempo 40 secondi.*





*Figura 34: Dettaglio delle particelle trascinate dal fluido al tempo 40 secondi.*

## 2 Risultati sperimentali

Gli esperimenti di semina cellulare dinamica, volti a confrontare le diverse geometrie dello scaffold e validare il modello computazionale, sono stati eseguiti utilizzando il bioreattore oscillante a perfusione OPB.

I parametri di processo sono stati mantenuti costanti e pari ai valori utilizzati per le simulazioni:

- velocità del flusso pari a 500  $\mu\text{m/s}$ ;
- densità cellulare pari a 2M di cellule per scaffold;
- tempo di semina pari a 24 ore;
- angolo di oscillazione pari a  $270^\circ$ .

In questo modo l'unica variabile risulta essere lo scaffold con tutte le sue proprietà geometriche e fluidodinamiche che ne conseguono.

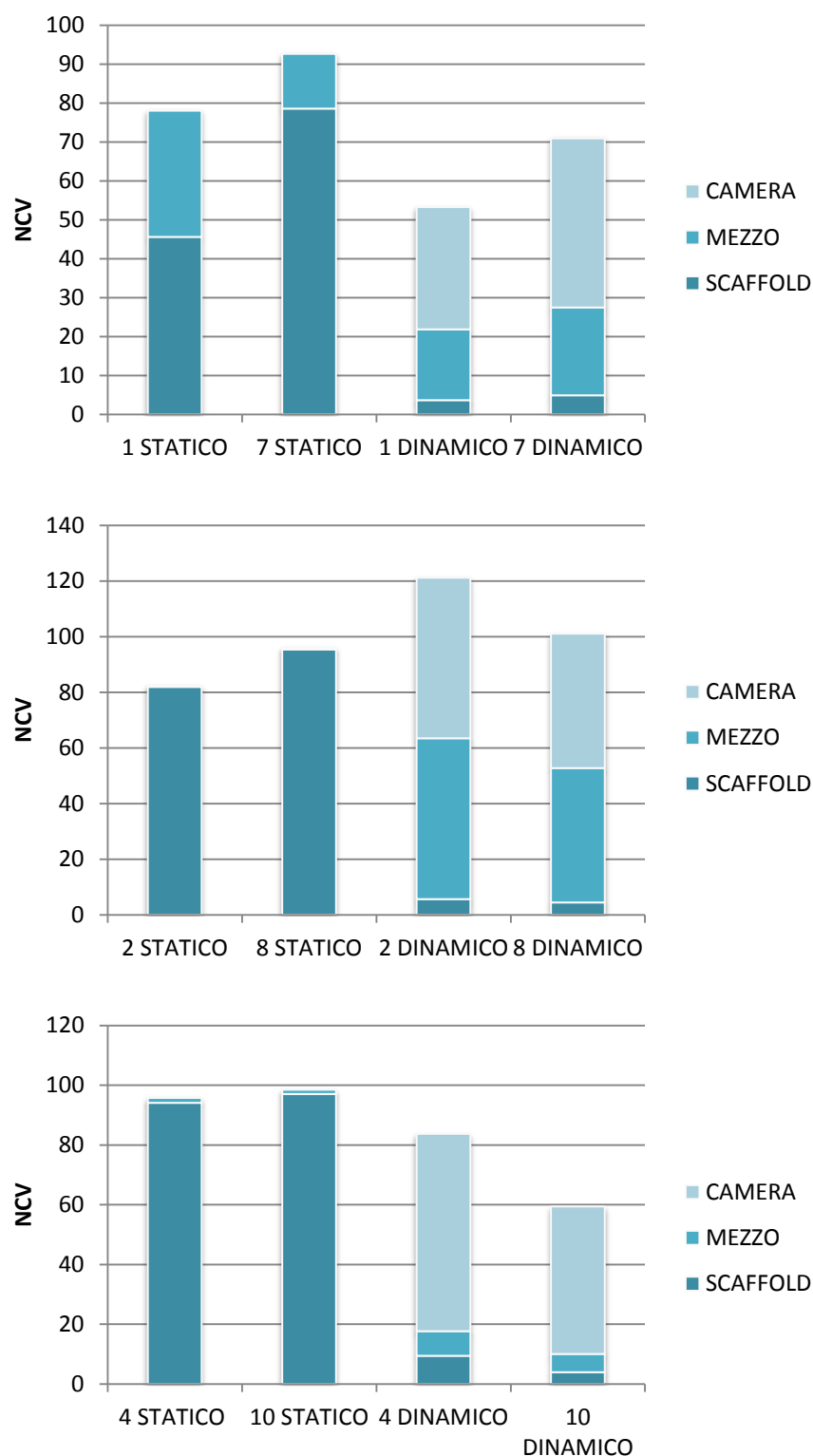
Sono stati utilizzati gli stessi scaffold scelti per le simulazioni.

### 2.1 Analisi quantitativa: saggio Cy-Quant

Di seguito sono riportati grafici relativi ai risultati del saggio Cy-Quant effettuato su tutti i campioni sia statici che dinamici, per permettere di quantificare il numero di cellule che ha aderito allo scaffold, quella che è rimasta sospesa nel mezzo di coltura e quella che ha aderito alle pareti della camera.

I grafici mettono a confronto le coppie di scaffold con disposizione uguale delle fibre, ma diverse distanze tra loro (Grafici 8).

Sono state calcolate le percentuali di cellule raccolte rispetto all'aliquota di riferimento distinguendo i vari contributi di scaffold, mezzo di coltura e camera di coltura. L'aliquota di semina di riferimento è stata calcolata per ogni esperimento.



**Grafici 9: Percentuale di cellule raccolte su ciascun campione normalizzata rispetto all'aliquota di riferimento relativa (NCV). Sono state calcolate le percentuali di cellule adese sullo scaffold, sulla camera e sospese nel mezzo.**

Confrontando le percentuali di efficienza di semina tra statici e dinamici è evidente che sugli scaffold statici l'efficienza di semina è superiore.

Una prima osservazione sui dati relativi ai dinamici ci permette di dire che le cellule tendono ad aderire anche sulle pareti delle camere di coltura.

Nella tabella 9 sono riportati i valori di efficienza di semina di ciascun campione statico e dinamico rispetto all'aliquota di riferimento rispettivamente statica e dinamica.

	Scaffold	Efficienza di semina
<b>Statici</b>	1	45,57%
	2	81,93%
	4	94,12%
	7	78,36%
	8	95,35%
	10	97,08%
<b>Dinamici</b>	1	3,67%
	2	5,48%
	4	9,52%
	7	4,93%
	8	4,44%
	10	4,01%

**Tabella 9:** Efficienza di semina ottenuta per ciascuno scaffold utilizzato per la semina statica o dinamica.

Si osserva che l'efficienza di semina degli scaffold utilizzati per la semina statica raggiunge dei valori percentuali elevati. Questo dato ci permette di affermare che le cellule utilizzate aderiscono al PLA.

Per quanto riguarda gli scaffold utilizzati per la semina dinamica, i valori di efficienza di semina risultano inferiori rispetto ai precedenti. Questo è dovuto al fatto che le cellule sono sospese nel mezzo di coltura in movimento e pertanto le condizioni di adesione sono diverse rispetto ai test statici.

I valori di efficienza di semina più alti sono relativi alle prove sugli scaffold 4 e 2, mentre gli altri stanno intorno al 4% (Grafico 9).

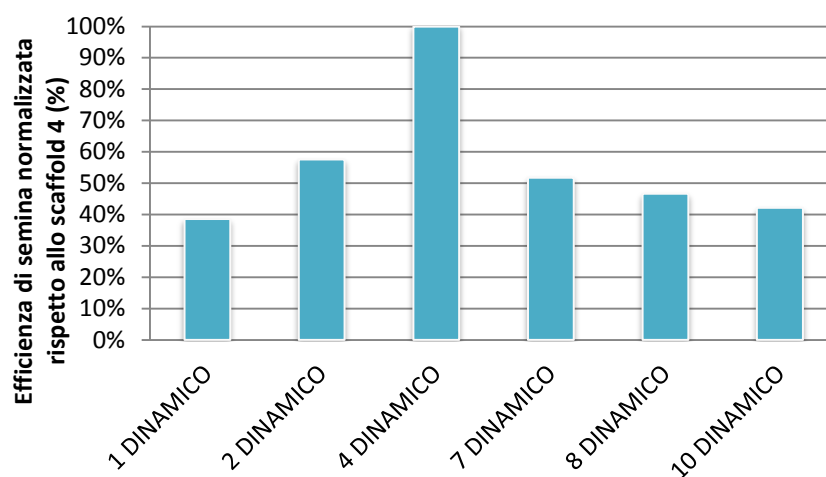
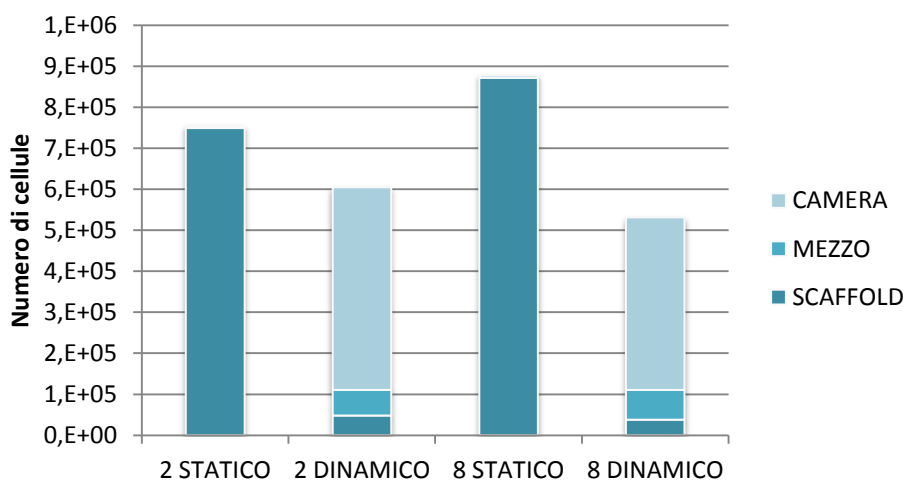
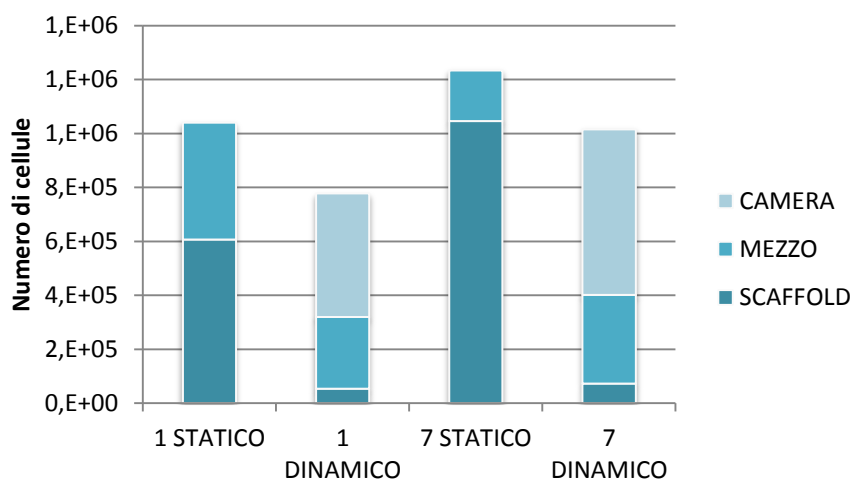
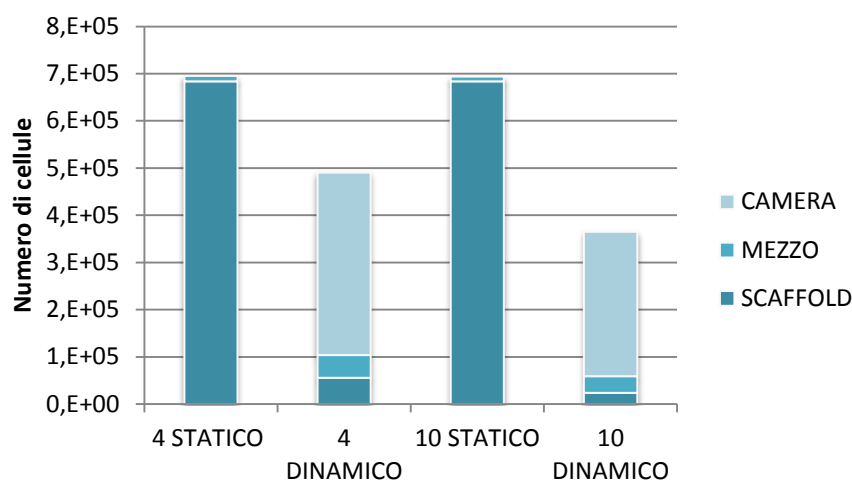


Grafico 10: Efficienza di semina degli scaffold utilizzati per la semina dinamica rapportata al massimo valore di efficienza trovato (9,52% relativo allo scaffold 4).

Di seguito sono riportati i grafici che confrontano i valori medi del numero di cellule recuperate su ciascun campione (Grafico 10).





*Grafico 11: Numero medio di cellule raccolte nei diversi campioni statici e dinamici, considerando il contributo sullo scaffold, nel mezzo di coltura e nella camera.*

## 2.2 Analisi qualitativa: MTT

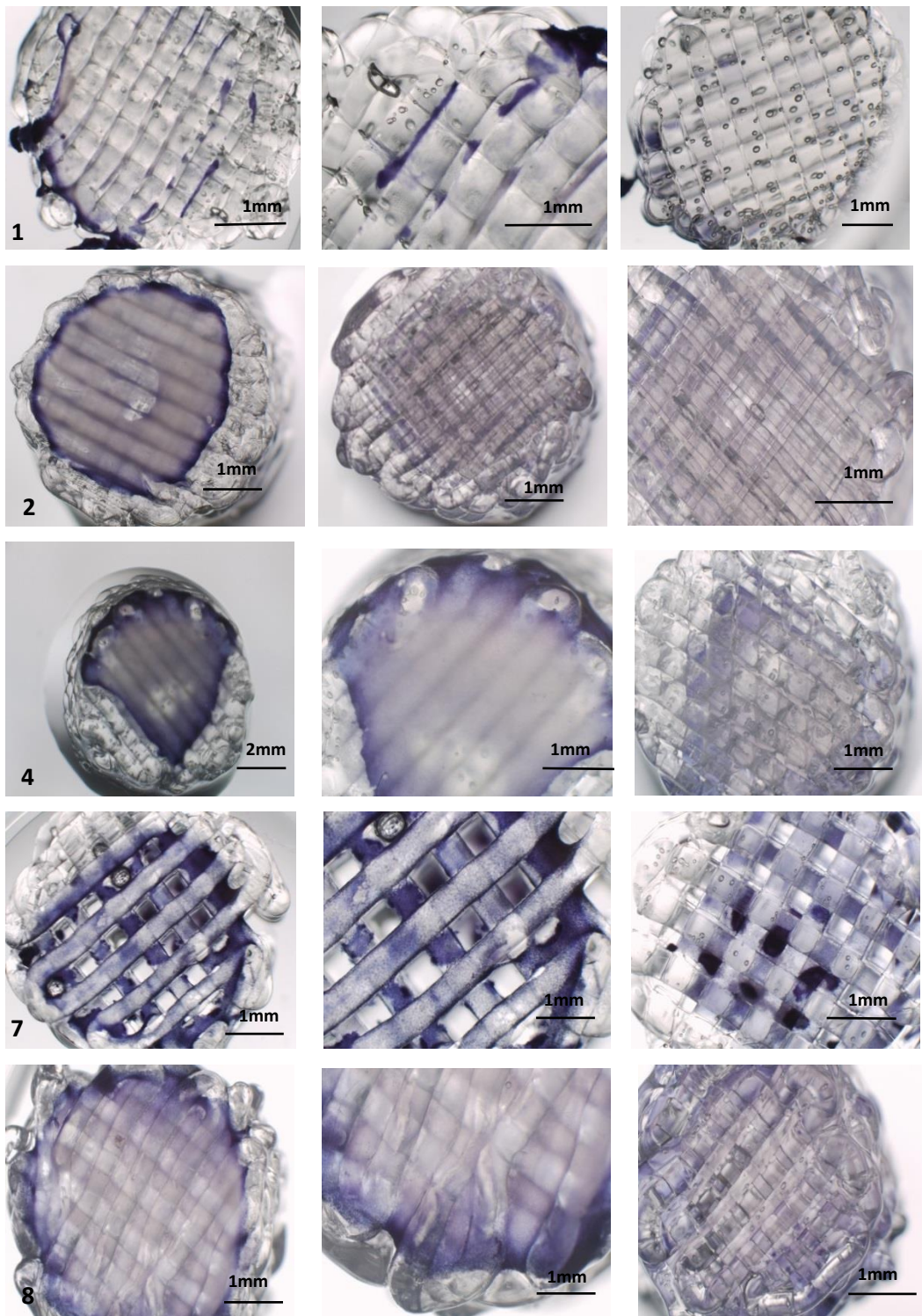
Con il saggio MTT è possibile valutare quali sono le cellule vitali e visualizzare dove si trovano per poter definire qualitativamente l'uniformità di semina.

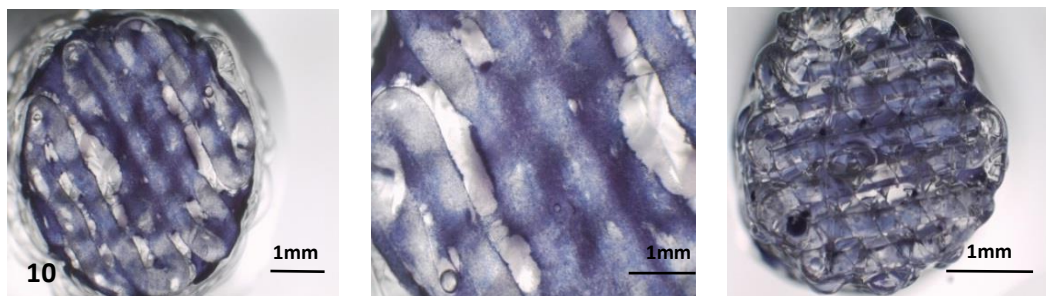
Di seguito sono riportate le immagini (Figura 29), ottenute allo stereomicroscopio, di ciascuno scaffold utilizzato per la semina statica, osservando sia il lato dove è stata deposta la sospensione cellulare che quello opposto.

Come si osserva le cellule non penetrano nello scaffold, ma formano uno strato sul lato dove sono poste le cellule.

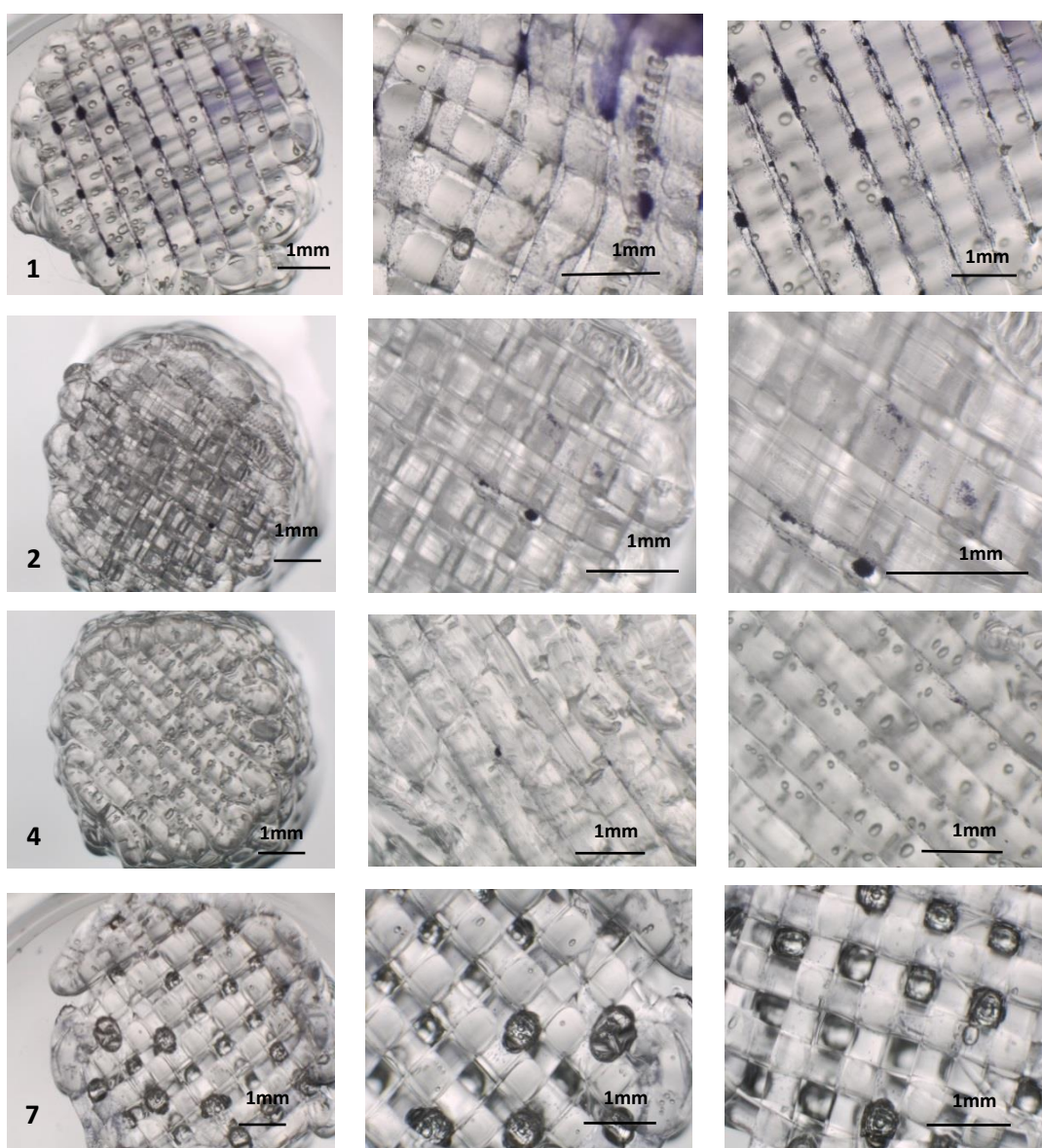
Di seguito sono riportate le immagini (Figura 30) per i campioni utilizzati per la semina dinamica.

Si osserva in questo caso che le poche cellule sono omogeneamente distribuite sulle fibre. Lo stereomicroscopio non consente di visualizzare l'interno del campione e gli scaffold risultano difficili da sezionare senza causare un disassemblamento delle fibre. Non è possibile perciò un'analisi dell'interno dello scaffold.

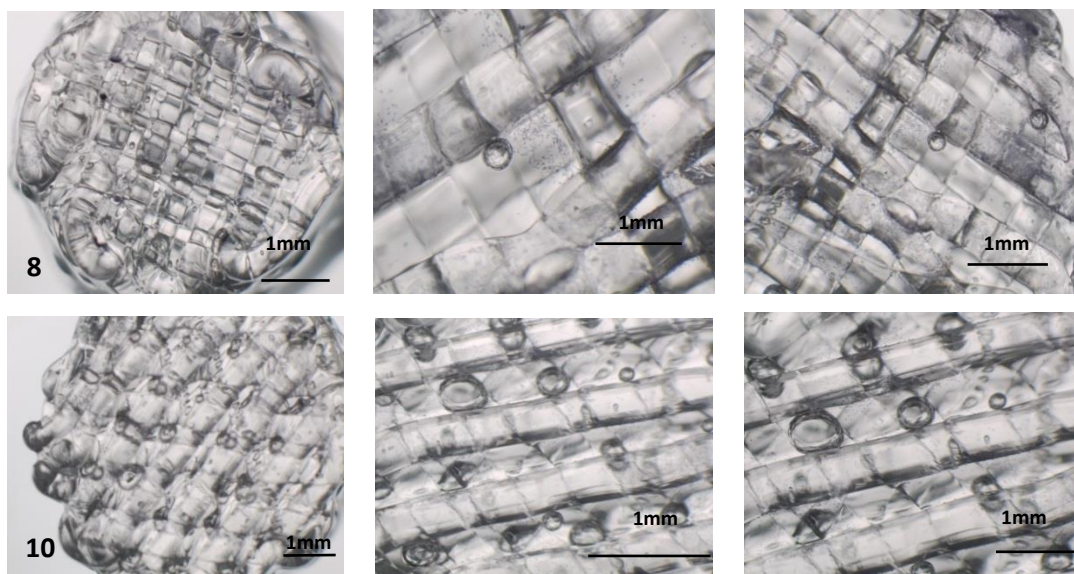




**Figura 35:** Immagini ottenute allo stereomicroscopio relative a ciascuno scaffold utilizzato per la semina statica, mettendo in evidenza la superficie in cui è stata deposta la sospensione cellulare e quella opposta. In ciascuna immagine è riportato il numero dello scaffold raffigurato nella riga.







*Figura 36: Immagini ottenute allo stereomicroscopio relative a ciascuno scaffold utilizzato per la semina dinamica, mettendo in evidenza la superficie in cui è stata deposta la sospensione cellulare e quella opposta. Nelle immagini a sinistra è riportato il numero dello scaffold raffigurato nella riga.*

### 3 Correlazione statistica tra le variabili

Nella tabella 10 sono riportati i dati relativi al coefficiente di Spearman ottenuti confrontando i parametri dello scaffold tra loro e con il valore della probabilità di adesione. I parametri geometrici e fluidodinamici presi in considerazione sono stati la porosità, la tortuosità, la permeabilità, l'area superficiale, l'area con massimo shear stress, la velocità massima e la velocità media.

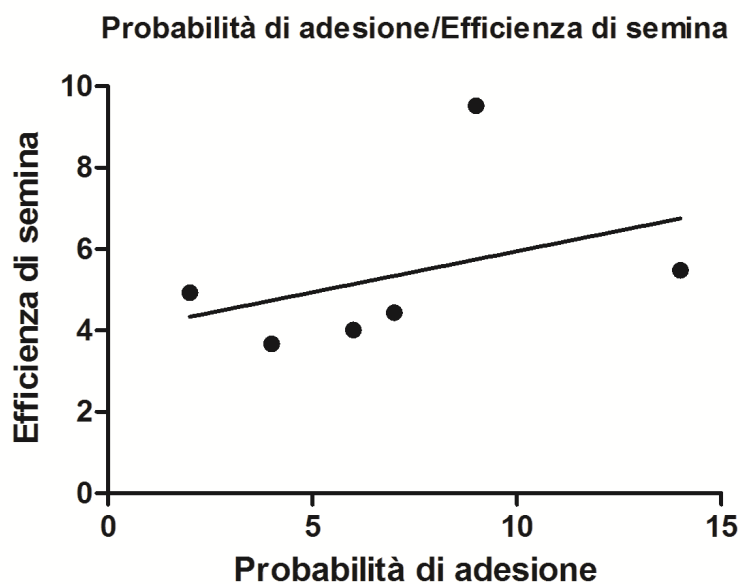
	Porosità	Tortuosità	Permeabilità	Area superficiale	Probabilità di adesione	Efficienza	Area con max shear	Velocità max	Velocità media
Porosità	1	0,319	0,657	-0,657	-0,314	-0,029	-0,66	-0,86	-0,886
Tortuosità	0,319	1	-0,29	0,377	0,58	0,406	-0,58	0,551	-0,29
Permeabilità	0,657	-0,29	1	-0,829	-0,77	-0,371	-0,83	0,257	-0,886
Area superficiale	-0,657	0,377	-0,829	1	0,486	0,2	0,657	-0,543	0,714
Probabilità di adesione	-0,314	0,58	-0,77	0,486	1	0,6	0,486	0,771	0,657
Efficienza	-0,029	0,406	-0,371	0,2	0,6	1	0,543	0,543	0,143
Area con max shear	-0,657	-0,58	-0,829	0,657	0,486	0,543	1	0,143	0,714
Velocità massima	-0,86	0,551	-0,543	0,771	0,2	0,143	0,371	1	0,2
Velocità media	-0,88	-0,29	-0,886	0,714	0,657	0,143	0,714	0,2	1

*Tabella 10: Valori del coefficiente di correlazione di Spearman calcolato per ciascuna coppia di parametri.*

Per quanto riguarda il confronto dei parametri dello scaffold tra loro i valori di correlazione mostrano una “forte” correlazione negativa tra la permeabilità e l'area con massimo shear stress, tra la permeabilità e l'area superficiale, tra la velocità massima e media e la porosità, tra la velocità media e la permeabilità.

Una forte correlazione positiva invece è presente tra velocità massima e l'area con il massimo shear stress.

Dal confronto tra la probabilità di adesione e i diversi parametri dello scaffold emerge che i fattori che hanno un'influenza maggiore su di essa sono la velocità massima e la tortuosità in modo diretto e la permeabilità in modo inverso.



*Grafico 12: Correlazione tra probabilità di adesione e efficienza di semina*

Inoltre è stato calcolato il coefficiente di Spearman per valutare la correlazione tra la probabilità di adesione e l'efficienza di semina (Grafico 11) ed è stato ottenuto un valore pari a 0,6.

# Capitolo IV

## Discussione dei risultati

Tra le fasi di ingegnerizzazione di un tessuto la semina cellulare è una delle più importanti dell'intero processo perchè pone le basi per l'ottenimento di costrutti ingegnerizzati funzionali e riproducibili. Essa determina il numero e la distribuzione spaziale delle cellule adese al costrutto e influenza la proliferazione, la migrazione e la differenziazione delle cellule nel costrutto ingegnerizzato.

Per questi motivi è auspicabile che la tecnica di semina utilizzata sia quanto più possibile riproducibile e affidabile. In quest'ottica le tecniche di semina dinamica hanno dimostrato di raggiungere risultati più promettenti rispetto a quelle tradizionali di semina statica (11), (10).

Nel processo di semina dinamica diversi parametri influiscono sul risultato finale, come il tipo e la densità cellulare, il tempo di semina, la velocità del flusso, il tipo di scaffold e la sua geometria. Uno degli obiettivi della ricerca è capire in che modo ciascun fattore influenzi la fase di semina. Tradizionalmente si effettuano gli esperimenti variando un singolo fattore alla volta, partendo dal presupposto che siano indipendenti tra di loro, e, una volta individuati per ciascuno di essi i valori che ottimizzano il processo, si crea una combinazione per ottenere il miglior risultato. Per la maggior parte dei bioprocessi è noto che molte variabili siano interdipendenti e che esistano rilevanti interazioni tra di esse.

Lo scaffold ha un ruolo non trascurabile nel processo di semina e le sue proprietà geometriche influenzano la fluidodinamica e, di conseguenza, il risultato della semina dinamica. Risulta però difficile studiare con strumenti non invasivi e non distruttivi nei punti all'interno dello scaffold la fluidodinamica e valutare gli sforzi di taglio che si generano per stabilire quali siano i valori che ottimizzano il processo di semina in termini di uniformità e efficienza.

Per capire come le proprietà geometriche dello scaffold influenzino il processo di semina in questo lavoro di tesi è stato utilizzato un modello computazionale che ha

permesso di caratterizzare scaffold con caratteristiche geometriche differenti e di valutare la probabilità di adesione su ciascuno di essi.

Con questo tipo di approccio è possibile ottimizzare il processo già in fase di progettazione del sistema e prevedere il risultato della semina senza dover eseguire una quantità elevata di esperimenti. Questo comporta non solo un risparmio di tempo, ma anche un vantaggio economico. Questo tipo di approccio consente di modificare i parametri fondamentali nel modello computazionale e, una volta identificate le condizioni ottimali, di eseguire gli esperimenti per la validazione del modello.

La caratterizzazione geometrica degli scaffold progettati è stata eseguita analizzando diversi parametri quali la porosità, la permeabilità, l'area superficiale e la tortuosità.

Gli scaffold sono stati classificati in base al valore di porosità: per gli scaffold 1, 2 e 4 si aggira intorno al 59-60%, mentre per gli scaffold 7, 8 e 10 si aggira intorno al 73-76%. Un valore elevato di porosità è preferibile nel processo di semina per permettere alle cellule e al mezzo di coltura di avere a disposizione un volume maggiore per i processi di adesione cellulare e di scambi metabolici. L'interconnessione dei pori è altresì importante perché permette alle cellule e al mezzo di coltura di attraversare lo scaffold senza incontrare dei vicoli ciechi nei quali potrebbe essere limitato lo spazio per la successiva proliferazione cellulare e l'apporto di sostanze nutritive. Tutti gli scaffold progettati hanno dei pori altamente interconnessi.

Per quanto riguarda la permeabilità, essa ha dei valori mediamente più alti negli scaffold con porosità maggiore. Sarebbe opportuno che essa non fosse troppo elevata perché la componente cellulare avrebbe meno possibilità di aderire.

L'area superficiale mostra dei valori più alti negli scaffold con porosità minore con una differenza rispetto a quella degli scaffold con porosità maggiore di circa 100 mm<sup>2</sup>. Un'area superficiale elevata aumenta la probabilità di adesione delle cellule sullo scaffold ed è pertanto un parametro da massimizzare per ottenere una maggior efficienza di semina.

La tortuosità è un parametro indicativo del percorso che una cellula può compiere all'interno dello scaffold e quindi della probabilità che essa ha di aderire alle

superfici dello scaffold. Quanto più la tortuosità è alta, maggiore sarà la probabilità che le cellule stiano all'interno dello scaffold e che quindi possano entrare in contatto con le sue superfici o con altre cellule già adese e aderire a loro volta. Pertanto è un parametro da massimizzare per ottenere uniformità e efficienza migliori. Dai valori ottenuti (Tabella 11) si nota che scaffold con organizzazione geometrica delle fibre uguale ma distanza tra le fibre diversa hanno gli stessi valori di tortuosità.

La tortuosità assume valori massimi per gli scaffold 4 e 10, ossia quelli con le fibre orientate a  $0^{\circ}$ - $60^{\circ}$ - $120^{\circ}$  e questo porta a pensare che essi abbiano una maggior probabilità di adesione.

Scaffold	Porosità	Tortuosità	Permeabilità [mm <sup>2</sup> ]	Area superficiale [mm <sup>2</sup> ]
1	59,68%	1,06	0,06885	447,2
2	59,80%	1,14	0,05175	443,6
4	60,14%	1,7	0,05625	489,6
7	73,94%	1,06	0,2538	305,56
8	73,19%	1,15	0,14895	307,28
10	76,19%	1,49	0,1476	346,8

*Tabella 11: Valori dei parametri relativi a ciascuno scaffold.*

Le simulazioni fluidodinamiche eseguite con il software Comsol sono state svolte su una geometria che rappresenta il sistema semplificato: è stato considerato un intorno dello scaffold, tralasciando il resto della camera di coltura e la sua curvatura. Inoltre è stato considerato solo un quarto della sezione dello scaffold disegnato, sfruttando le simmetrie. Le simulazioni fluidodinamiche hanno permesso di determinare i valori degli sforzi di taglio all'interno dello scaffold, sulla superficie delle fibre.

I valori di sforzi di taglio trovati negli scaffold sono tutti all'interno dei valori fisiologici di shear a cui sono sottoposte le cellule del tessuto osseo (0,8-3,8 Pa), da cui origina la linea cellulare utilizzata per gli esperimenti (MG63).

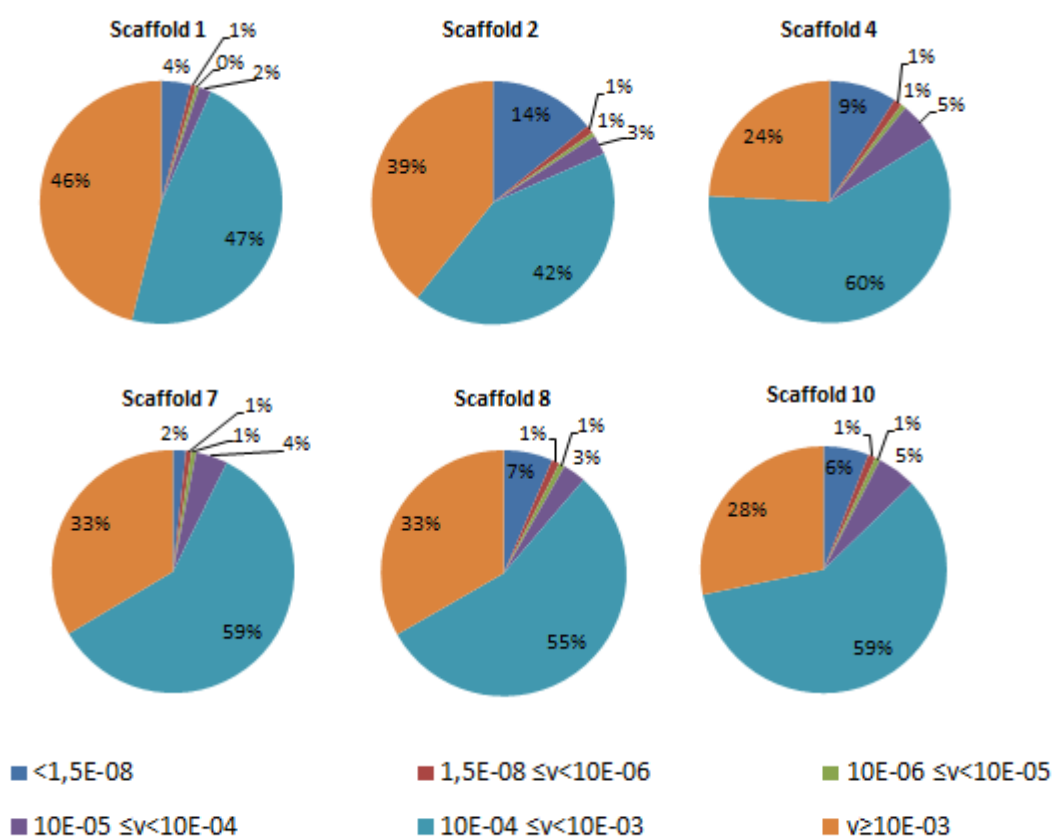
Confrontando gli scaffold tra loro, è emerso che quelli con porosità intorno al 60% hanno dei valori di shear stress più alti rispetto a quelli con porosità maggiore. Lo scaffold 4 mostra il valore massimo di shear stress, ma, considerando la

distribuzione degli shear stress sulle superfici, lo scaffold 2 è quello ad avere i valori più alti distribuiti su una superficie maggiore.

Possiamo dedurre pertanto che lo shear stress dipenda sia dall'orientamento delle fibre che dalla distanza tra di loro.

È difficile stabilire quali valori di shear stress siano più adatti a migliorare l'efficienza di semina, non essendo presenti dei valori in letteratura.

L'analisi della probabilità di adesione con il modello computazionale è stata effettuata semplificando il sistema rispetto alla realtà, sia da un punto di vista geometrico, fisico e biochimico e, vista l'impossibilità di determinare le particelle adese sulle fibre con velocità nulla, è stata fatta l'ipotesi secondo cui particelle con velocità sotto una certa soglia ( $1,5 \cdot 10^{-8}$  m/s) risultino essere in prossimità delle fibre e perciò siano quelle con una maggior probabilità di contatto e di adesione.



**Grafico 13:** Percentuale di particelle con valori di velocità all'interno del range riportato nella legenda in cui le velocità sono espresse in m/s.

Si osserva nel Grafico 12 che lo scaffold 2 risulta quello migliore in termini di probabilità di adesione in quanto presenta un valore del 15%, mentre lo scaffold 7 è quello con una probabilità di adesione minore pari al 2%.

In generale osserviamo che per geometrie uguali, gli scaffold con maggior distanza tra le fibre presentano una minor probabilità di adesione. In generale gli scaffold 1, 2, 4 hanno una probabilità di adesione maggiore rispetto agli scaffold 7, 8 e 10. Dal confronto degli scaffold sembrerebbe quindi che, a parità di disposizione delle fibre, i parametri che influenzano maggiormente il risultato della semina dinamica siano l'area superficiale, la permeabilità e lo shear stress.

Parallelamente alle simulazioni computazionali sono stati svolti degli esperimenti di semina statica e dinamica per validare il modello.

Gli scaffold sono stati realizzati con la stampante 3D e utilizzati per il processo di semina a perfusione all'interno dell'OPB.

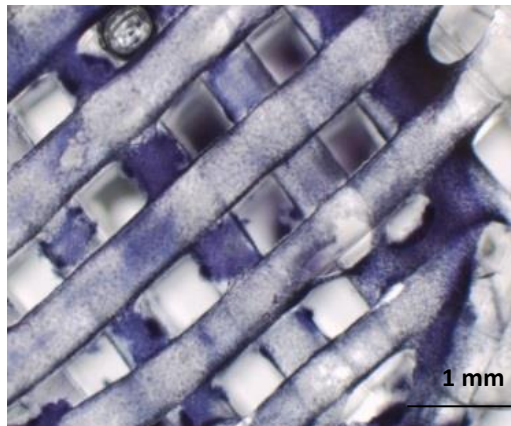
I campioni utilizzati per la semina statica hanno mostrato dei risultati migliori riguardo l'efficienza di semina, che va dal 45% dello scaffold 1 al 97% dello scaffold 10 (Tabella 12). Questi dati dimostrano che le cellule utilizzate aderiscono sul materiale utilizzato per gli scaffold.

Nonostante gli scaffold seminati staticamente abbiano valori di efficienza di semina elevati, essi presentano una bassa uniformità di semina. Infatti le cellule aderiscono solamente sul lato dello scaffold dove sono state depositate (Figura 31).

	Scaffold	Efficienza di semina
<b>Statici</b>	1	45,57%
	2	81,93%
	4	94,12%
	7	78,36%
	8	95,35%
	10	97,08%
<b>Dinamici</b>	1	3,67%
	2	5,48%
	4	9,52%
	7	4,93%
	8	4,44%
	10	4,01%

*Tabella 12: Efficienza di semina relativa a ciascun campione utilizzato nella semina statica e dinamica.*





*Figura 37: Dettaglio dello strato cellulare adeso sullo scaffold 7 utilizzato per la semina statica nel lato in cui è stata deposta la sospensione cellulare.*

Per quanto riguarda i campioni utilizzati per la semina dinamica si osserva che lo scaffold 4 ha avuto il miglior risultato (Tabella 11).

In generale l'efficienza di semina per i campioni seminati dinamicamente presenta valori bassi: i valori vanno da un massimo di 9,52% dello scaffold 4 a un minimo di 3,67% dello scaffold 1.

La correlazione statistica, effettuata ponendo in relazione la probabilità di adesione con gli altri parametri geometrici e fluidodinamici attraverso il coefficiente di Spearman, ci permette di ipotizzare che i parametri che influenzano maggiormente la probabilità di adesione siano la tortuosità ( $\rho_s=0,58$ ) e la velocità massima ( $\rho_s=0,77$ ) in modo diretto e la permeabilità ( $\rho_s=-0,77$ ) in modo inverso.

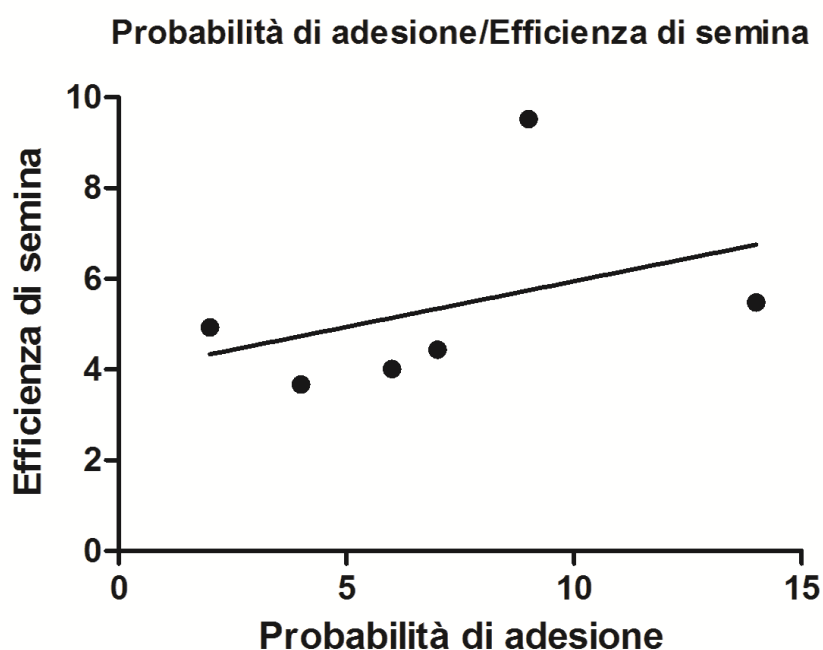
Nella progettazione degli scaffold sarebbe opportuno pertanto focalizzare l'attenzione su questi parametri per ottimizzare il risultato della semina dinamica.

La velocità massima sembra debba essere massimizzata vista la correlazione positiva, ma d'altra parte sarebbe utile determinare quale soglia non garantisce più questa correlazione positiva, poiché valori di velocità troppo elevati non sono tollerati dalle cellule. La permeabilità deve essere invece ridotta per via della correlazione negativa.

Anche la tortuosità è un parametro da tenere in considerazione in fase di progettazione sebbene la sua correlazione non sia statisticamente significativa e essa dovrebbe essere massima per garantire alle cellule un tempo di residenza

all'interno dello scaffold maggiore e di conseguenza una probabilità di adesione maggiore.

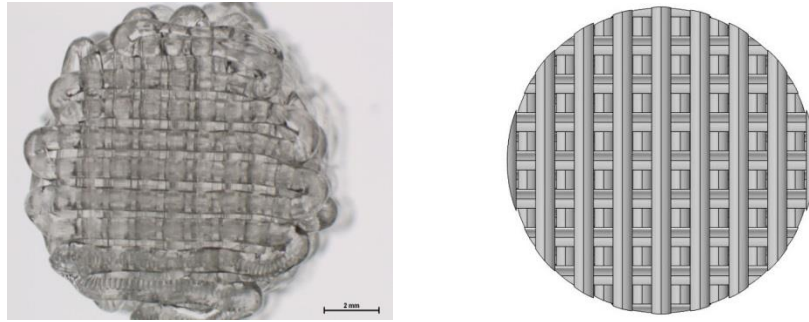
La correlazione tra la probabilità di adesione e l'efficienza di semina trovata sperimentalmente ha dato come risultato un valore di  $\rho_s$  pari a 0,6 ( Grafico 13). Questo ci permette di dire che il modello computazionale risulta utile per lo studio a priori del sistema scaffold/bioreattore per individuare i valori di parametri geometrici e fluidodinamici altrimenti difficili da valutare, seppure la correlazione non sia statisticamente significativa.



*Grafico 14: Correlazione statistica tra la probabilità di adesione e l'efficienza di semina.*

Lo scaffold che mostra una maggior discordanza tra i valori ottenuti computazionalmente e sperimentalmente è il 4.

In generale il discostamento trovato tra i valori computazionali e quelli sperimentali potrebbe essere dovuto da una parte per via delle semplificazioni effettuate sul modello, dall'altra per via degli errori nella realizzazione degli scaffold data la bassa risoluzione della stampante 3-D utilizzata, che non sempre riesce a replicare la geometria desiderata in maniera fedele (Figura 32).



*Figura 38: Confronto tra lo scaffold 2 realizzato con la stampante 3D (a sinistra) e quello realizzato con il CAD (a destra).*

Inoltre è da tenere in considerazione che le simulazioni hanno analizzato il sistema “scaffold”, privato della sua contestualizzazione all’interno del bioreattore.

Pertanto il valore di probabilità di adesione è relativa allo scaffold, l’efficienza di semina tiene conto dello scaffold all’interno del bioreattore utilizzato.

## Conclusione e sviluppi futuri

In questo lavoro di tesi sono state svolte delle simulazioni computazionali per la caratterizzazione geometrica e fluidodinamica dei supporti tridimensionali progettati e la valutazione della probabilità di adesione delle cellule sul supporto. L'obiettivo è quello di mostrare come le variabili relative alla geometria dello scaffold non sono trascurabili nel processo di semina, ma determinano, insieme a tutte le altre variabili di processo, il risultato finale. Devono pertanto essere controllabili e riproducibili per garantire un risultato ottimo nel processo di ingegnerizzazione dei tessuti e, nel nostro caso specifico, della fase del processo di semina.

Sono stati svolti inoltre degli esperimenti di semina dinamica all'interno di un bioreattore a perfusione oscillante sui diversi scaffold realizzati per la validazione del modello computazionale, ma le difficoltà incontrate nella realizzazione degli scaffold legate alla risoluzione della stampante 3D e una numerosità di esperimenti non elevata non permette di trovare una correlazione significativa tra il modello computazionale e gli esperimenti reali.

La caratterizzazione geometrica e fluidodinamica effettuata con tecniche computazionali dello scaffold ha permesso di individuare e misurare alcuni parametri dello scaffold significativi, quali la tortuosità, la porosità e l'area superficiale, parametri difficili da valutare sui campioni reali.

La valutazione della probabilità di adesione delle particelle su ciascuna geometria permette di avere un modello predittivo del risultato del processo di semina dinamica confrontando diverse geometrie.

In questo modo quindi è possibile migliorare e ottimizzare il processo di semina, sia in termini di proprietà geometriche dello scaffold che di parametri di processo in fase di progettazione del sistema di coltura. Capire in che modo un parametro influenza il risultato permette di saltare buona parte della fase sperimentale in cui si confrontano diverse combinazioni dei diversi fattori per determinare la condizione migliore. Sarebbe utile inoltre individuare quali range di valori relativi a velocità massima e media e permeabilità, parametri che hanno mostrato una maggior influenza sul processo, garantiscono la correlazione ottenuta statisticamente. Ci

saranno infatti dei limiti relativi alla velocità massima oltre i quali le cellule saranno sovrastimate e andranno incontro alla morte. Inoltre l'interdipendenza dei parametri non è da trascurare.

A livello del modello computazionale sarebbe opportuno migliorarlo, cercando di riprodurre tutti i fenomeni che caratterizzano il processo.

Ad esempio per simulare il processo di semina dinamica all'interno dell'OPB bisognerebbe introdurre una funzione oscillatoria per la forza di gravità e la pressione, la curvatura della camera di coltura e le leggi che regolano l'interazione delle cellule tra loro e con il materiale di cui è costituito lo scaffold.

La parte sperimentale, invece, potrebbe essere migliorata utilizzando scaffold prodotti con una tecnica differente, che consenta di replicare più fedelmente le geometrie analizzate durante le simulazioni computazionali.

# Bibliografia

1. **Heather L. Greenwood et al.**, *Regenerative Medicine and the Developing.*, PlosMedicine, 2006, Vol. 3, 9, p. e381.
2. **Oragui et al.**, *The Role of Bioreactors in Tissue Engineering for Musculoskeletal.*, The Open Orthopaedics Journal, 2011. pp. 267-270, Vol. 5.
3. **Atala Anthony et al.**, *Engineering organs.*, Current opinion in biotechnology, 2009, pp. 575–592, Vol. 20.
4. **Alberti et al.**, *Tissue engineering as innovative chance for organ replacement in radical tumor surgery.*, European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 2013. pp. 624-631. Vol. 17.
5. **Mantero, Remuzzi, Raimondi, Ahluwalia**, *Fondamenti di ingegneria dei tessuti per la medicina rigenerativa.*, Patron Editore, 2009. Vol. 15.
6. **Cheng et al.**, *Neural stem cells encapsulated in a functionalized self-assembling peptide hydrogel for brain tissue engineering.*, Biomaterials. 2013, Vol. 34, 8, pp. 2005-2016.
7. **Sean Vincent Murphy et al.** *Organ engineering – combining stem cells, biomaterials and bioreactors to produce bioengineered organs to transplantation.*, WILEY Periodicals Inc., 2012, pp. 120-134, Vol. 35.
8. **Martin Ivan et al.**, *The role of bioreactors in tissue engineering.* Trends in Biotechnology, 2004. pp. 80-86. Vol. 22.
9. **Chen et al.**, *Characterization and Optimization of Cell Seeding in Scaffolds by Factorial Design: Quality by Design Approach for Skeletal Tissue Engineering.*, Tissue engineering: part C, 2011, Vol. 17, pp. 1211-1221.
10. **Wendt et al.**, *Oscillating perfusion of cell suspensions through three-dimensional scaffold enhances cell seeding efficiency and uniformity.*, Biotechnology and bioengineering , Wiley InterScience, 2003, Vol. 84, pp. 205-214.
11. **Wendt et al.**, *Uniform tissues engineered by seeding and culturing cells in 3D scaffolds under perfusion at defined oxygen tension.*, IOS Press, Biorheology, 2006, Biorheology, Vol. 43, pp. 481-488.

12. **Zhao et al.**, *Perfusion bioreactor system for human mesenchymal stem cell tissue engineering:dynamic cell seeding and construct development.*, Wiley Interscience, 2004, Biotechnology and bioengineering, Vol. 91, pp. 482-493.
13. **Alvarez-Barreto et al.**, *Flow perfusion improves seeding of tissue engineering scaffold with different architectures.*, Annals of biomedical engineering, 2007, Vol. 35, pp. 431-442.
14. **Schliephake et al.**, *Effect of seeding technique and scaffold material on bone formation in tissue-engineered construct.*, Wiley Interscience. 2008, Journal of biomedical materials research, pp. 429-437.
15. **F. Maes et al.**, *Computational models for wall shear stress estimation in scaffolds: A comparative study of two complete geometries.*, Elsevier, Journal of Biomechanics, 2012, Vol. 45, pp. 1586–1592.
16. **H. Singh et al.**, *Bioreactor Studies and Computational Fluid Dynamics.*, Adv Biochem Engin/Biotechnol , 2009, Vol. 112, pp. 231-249.
17. **Dietmar W. Hutmacher et al.**, *Computational fluid dynamics for improved bioreactor design and 3D culture.*, Elsevier, Trends in Biotechnology, 2008, Vol. 26, pp. 166-172.
18. **Adebayo A. Adebisi et al.**, *The use of computational fluid dynamic models for the optimization of cell seeding processes.*, Biomaterials, 2011, Vol. 32, pp. 8753-8770.
19. **Boschetti et al.**, *Prediction of the micro-fluid dynamic environment imposed to three-dimensional engineered cell systems in bioreactors.* Journal of Biomechanics, 2006, Vol. 39, pp. 418-425.
20. **Michele M. Nava et al.**, *A multiphysics 3D model of tissue growth under interstitial perfusion in a tissue-engineering bioreactor.1.*: Springer, Biomech Model Mechanobiol, 2012.
21. **Araida Hidalgo-Bastida et al.**, *Modeling and Design of Optimal Flow Perfusion Bioreactors for Tissue Engineering Applications.*, Wiley Online Editor, Biotechnology and bioengineering, 2012, Vol. 109, pp. 1095-1099.
22. **Singh et al.**, *Flow Modeling in a Novel Non-Perfusion Conical Bioreactor.* Wiley Online Library, Biotechnology e bioengineering, 2007, Vol. 97, pp. 1291-1299.
23. **Andy L. Olivares et al.**, *Simulation of Cell Seeding Within a Three-Dimensional Porous Scaffold: A Fluid-Particle Analysis.*, Mary Ann Liebert, Tissue Engineering: Part C, 2012, Vol. 18.

24. **Galbusera et al.**, *An in silico bioreactor for simulating laboratory experiments in tissue engineering.*, Springer Science, Biomed Microdevices, 2008 , Vol. 10, pp. 547–554.
25. **Robu et al.** , *Computational modeling of multicellular systems evolution in tissue engineering.* IIEE, 2012, pp. 351-356.
26. **Lin Xiao et al.**, *Poly(Lactic Acid)-Based Biomaterials: Synthesis,Modification and Applications.*, <http://www.intechopen.com>, Biomedical Science and Engineering and Technology , 2012, pp. 247-282.
27. **Raimondi et al.**, *Mechanobiology of engineered cartilage cultured under a quantified fluid-dynamic environment.*, Springer-Verlag, 2002, Biomechan Model Mechanobiol 1, pp. 69 – 82.
28. **Raimondi et al.**, *Comparative chondrogenesis of human cells in a 3D integrated experimental–computational mechanobiology model.* 2010, Biomech Model Mechanobiol, Vol. 10, pp. 259–268.
29. **Perez et al.** , *Osteoblast and MG-63 osteosarcoma cells behave differently when in contact with Proroot MTA and White MTA.* s.l. : International Endodontic Journal, 2003, Vol. 36, pp. 564-570.
30. **Coletti et al.**, *Mathematical Modeling of Three-Dimensional Cell Cultures in Perfusion Bioreactors.* s.l. : American Chemical Society, 2006, Ind. Eng. Chem. Res. , Vol. 45, pp. 8158-8169.
31. **Starly et al.** , *A tracer metric numerical model for predicting tortuosity factors in three-dimensional porous tissue scaffolds.* s.l. : Elsevier, 2007, Computer methods and programs in biomedicine , Vol. 87, pp. 21–27.
32. **Koch,et al.**, *Perfusion cell seeding on large porous PLA/calcium phosphate composite scaffolds in a perfusion bioreactor system under varying perfusion parameters.*,Journal of biomedical materials reserch, 2010, Vol. 95, pp. 1011-1018.
33. **E.Lavik et al.** *Tissue engineering: current state and perspectives.* ,Appl Microbiol Biotechnol, 2004. pp. 1–8. Vol. 65.
34. **Kenneth M. Yamada et al.** *Modeling Tissue Morphogenesis and Cancer in 3D.* , Elsevier Inc., 2007. pp. 601-610. Vol. 130.
35. **Szpalski Caroline et al.** *The influence of environmental factors on bone tissue engineering.* , J Biomed Mater Res Part B, 2013. pp. 663–675. Vol. 101B.
36. **James Childress Catharin Liverman.** *Organ donation: opportunities for action.* The national academies press, 2006.



37. **Anirudh R. Patrachari et al.**, *Application of computational fluid dynamics in tissue engineering*. 2012, Journal of Bioscience and Bioengineering, Vol. 114, pp. 123-132.
38. **Yuan Yao et al.**, *Prediction of Shear Stress Distribution throughout 3D Bone Scaffold in Perfusion Environment*. IEEE, 2010.
39. **Palsson E.**, *A three-dimensional model of cell movement in multicellular systems*. 2001, Future Generation Computer Systems, Vol. 17, pp. 835–852.
40. **Joshua D. Salvi et al.**, *Finite Element Analyses of Fluid Flow Conditions in Cell Culture*. 4, 2010, TISSUE ENGINEERING: Part C, Vol. 16.
41. **Blaise Porter et al.**, *3-D computational modeling of media flow through scaffolds in a perfusion bioreactor*. Elsevier, 2005, Journal of Biomechanics, Vol. 38, pp. 543–549.
42. **Chen et al.**, *Bioreactors for tissue engineering*. Springer, 2006, Biotechnol Lett, Vol. 28, pp. 1415–1423.
43. **Gaspar et al.**, *The role of perfusion bioreactors in bone tissue engineering.*, Landes Bioscience : Landes Bioscience, 2012, Biomatter, Vol. 2, pp. 1-9.
44. **Xiantao el al.**, *Expression and localization of TASK-1, -2 and -3 channels in MG63 human osteoblast-like cells.*, 2013, Oncology letters, Vol. 5, pp. 865-869.