



POLITECNICO DI TORINO

LAUREA MAGISTRALE IN INGEGNERIA BIOMEDICA

Corso di BIOREATTORI

Bioreattore per studio in vitro di tessuto cartilagineo

Docente:

Diana Nada Caterina Massai

Autori: Gruppo 13

Gianmarco Arnesano - 281541

Greta Bosco - 239671

Domenico Ficili - 279931

Ofelia Labriola - 289551

Alessandro Ligas - 248920

ANNO ACCADEMICO 2020/2021

Indice

1	Introduzione	2
1.1	Motivazione Clinica	2
1.2	Obiettivo Bioreattore	2
2	Descrizione bioreattore	2
2.1	Componenti	2
2.2	Montaggio	2
2.3	Punti di forza	3
3	Circuito	3
3.1	Stimolazione meccanica	4
3.1.1	Perfusione forzata	4
3.1.2	Pressione idrostatica	4
4	Materiali e tecniche di fabbricazione	4
5	Requisiti di progetto	5
6	Vantaggi, limiti e sviluppi futuri	5
6.1	Vantaggi	5
6.2	Limiti	5
6.3	Sviluppi futuri e conclusioni	5
A	Disegni Tecnici	6
A.1	Camere	6
A.2	Altri componenti	7
	Bibliografia e sitografia	8

Elenco delle figure

1	Bioreattore	2
2	Basi interne intercambiabili	3
3	Schema del circuito	4
4	Contenitore esterno	6
5	Basi interne	6
6	Pistone, o-ring, soffietto, tappo	7

1 Introduzione

1.1 Motivazione Clinica

Il tessuto cartilagineo è soggetto a numerose sollecitazioni durante il ciclo vitale di ogni essere vivente. Tali sollecitazioni possono, negli anni, provocare lesioni al tessuto, inoltre, anche malattie degenerative delle articolazioni, come l'osteoartrite o l'artrite reumatoide, possono degenerare la cartilagine. Il nostro corpo risponde attraverso l'autoriparazione, ma la natura avascolare e la bassa cellularità della cartilagine presentano un grande ostacolo. Le tecniche classiche utilizzate per ripristinare la cartilagine articolare sono principalmente di natura chirurgica che tuttavia, presentano importanti limiti tra cui costi elevati e necessità di riabilitazione. Pertanto si cerca di trovare dei metodi alternativi e ancora sperimentali per realizzare in vitro tessuto cartilagineo da impiantare in vivo.

1.2 Obiettivo Bioreattore

La cartilagine in vivo deve essere in grado di sopportare una serie di carichi, in particolare forze di compressione e taglio. Il modello di bioreattore proposto mira quindi a studiare in vitro il comportamento di costrutti di cartilagine articolare (scaffold solidi, hydrogel) sottoposti a sforzi di taglio dati dalla perfusione forzata e di pressione idrostatica dati dalla compressione attuata dal pistone sul medium. La valutazione del tessuto cartilagineo serve a comprendere più in dettaglio le specifiche caratteristiche che deve possedere il costrutto affinché possa diventare applicabile clinicamente dunque impiantabile.

2 Descrizione bioreattore

2.1 Componenti

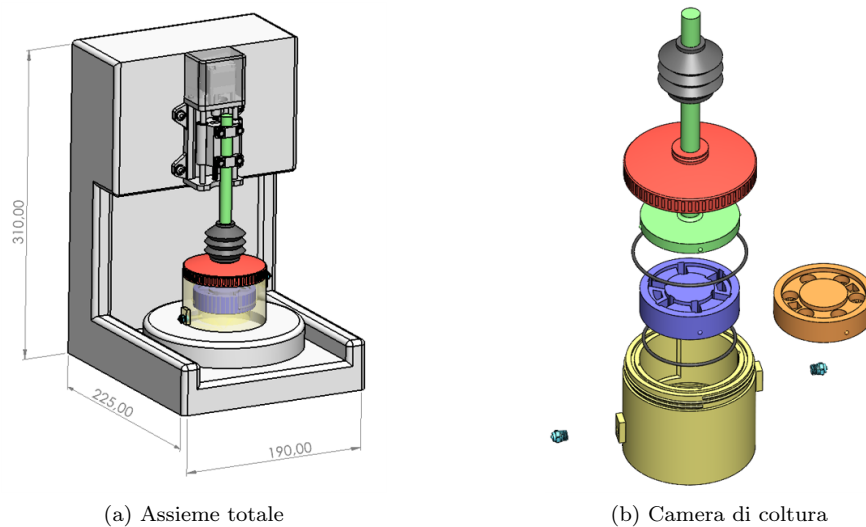


Figura 1: Bioreattore

Il bioreattore è composto da: una camera di coltura, un telaio e un attuatore lineare ancorato al telaio tramite delle viti che consente il movimento del pistone. La camera di coltura si compone di: un contenitore esterno dove è possibile alloggiare due diversi tipi di base interna (base interna HY per hydrogel cellularizzati, base interna SC per costrutti solidi), dal pistone (con quattro semisfere per il posizionamento lungo le guide), dal tappo e dal soffietto per mantenere la sterilità, da due o-ring per garantire la tenuta.

2.2 Montaggio

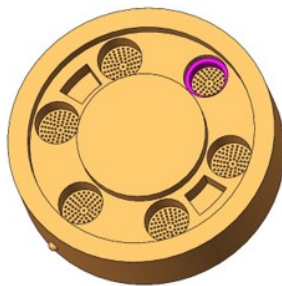
1. Si fissa l'attuatore lineare al telaio attraverso l'uso di quattro viti e il tappo del motore stepper.

2. Si inserisce il primo o-ring tra la base interna e il contenitore esterno e successivamente si posiziona la base interna scelta, contenente i costrutti, all'interno del contenitore attraverso l'utilizzo di guide a L. Si attua quindi una traslazione verticale dall'alto verso il basso e una successiva rotazione per ancorare le due parti e si inserisce anche il secondo o-ring nelle guide presenti sulla parte superiore del contenitore esterno.
3. Si inserisce il tappo sull'albero del pistone e si ancorano le due parti con il soffietto. Si fa scorrere il pistone su guide presenti all'interno del contenitore esterno per evitare problemi durante l'accoppiamento pistone-motore.
4. Si chiude il tappo del contenitore esterno tramite delle guide filettate mantenendo il tutto sterile (procedura sotto cappa). Infine si fissa l'albero del pistone all'attuatore tramite altre quattro viti, per permettere la stimolazione meccanica desiderata.

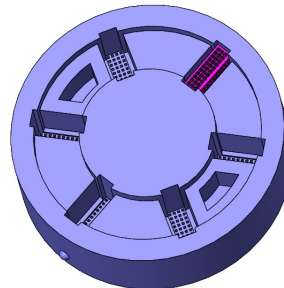
2.3 Punti di forza

I componenti innovativi e versatili del nostro bioreattore sono le due basi interne intercambiabili a seconda delle esigenze dell'operatore, entrambe le strutture consentono anche di ospitare fino a sei costrutti contemporaneamente. Per facilitare l'inserimento e l'estrazione delle basi interne nel contenitore sono presenti due afferraggi sulla superficie superiore di esse. Le basi interne sono state progettate in modo tale da ridurre la quantità di medium da utilizzare. Queste differiscono per:

- **Base interna 1 (HY):** adatta per hydrogel, ha la possibilità di alloggiare costrutti di diametro differente (diametro massimo di 10mm) utilizzando delle guarnizioni in silicone. La perfusione forzata avviene tramite dei fori dal diametro di 0.5mm.
- **Base interna 2 (SC):** adatta per scaffold solidi rettangolari di dimensioni 12x12x4mm. La presenza di scanalature permette di mantenere e facilitare il posizionamento degli scaffold. La perfusione forzata avviene attraverso una griglia con fori quadrati (0.5 x 0.5mm).



(a) Base interna (HY)



(b) Base interna (SC)

Figura 2: Basi interne intercambiabili

3 Circuito

Il reservoir e la camera sono posti all'interno di un incubatore per permettere il mantenimento di un ambiente di coltura favorevole (37 °C, 5% CO₂). La camera di coltura è collegata ad un circuito di perfusione chiuso che permette il ricircolo del terreno attraverso l'utilizzo di una pompa peristaltica che preleva il medium dal reservoir. Vengono utilizzate delle pinchvalves, che comprimono il tubo ad intervalli di tempo desiderati e l'ossigenazione del terreno è resa possibile tramite l'utilizzo di tubi permeabili all'ossigeno e di filtri appositi nel tappo del reservoir. A monte e a valle della camera, in una deviazione del circuito, sono inseriti dei sensori shunt che permettono di misurare ossigeno, pH, lattato e glucosio. L'informazione dei sensori viene inviata al sistema di monitoraggio consentendo di osservare il comportamento metabolico delle cellule. E' presente un'interfaccia utente attraverso la quale è possibile regolare i parametri desiderati. Il sistema di controllo agirà sulla pompa, sul motore e sulle pinch valves.

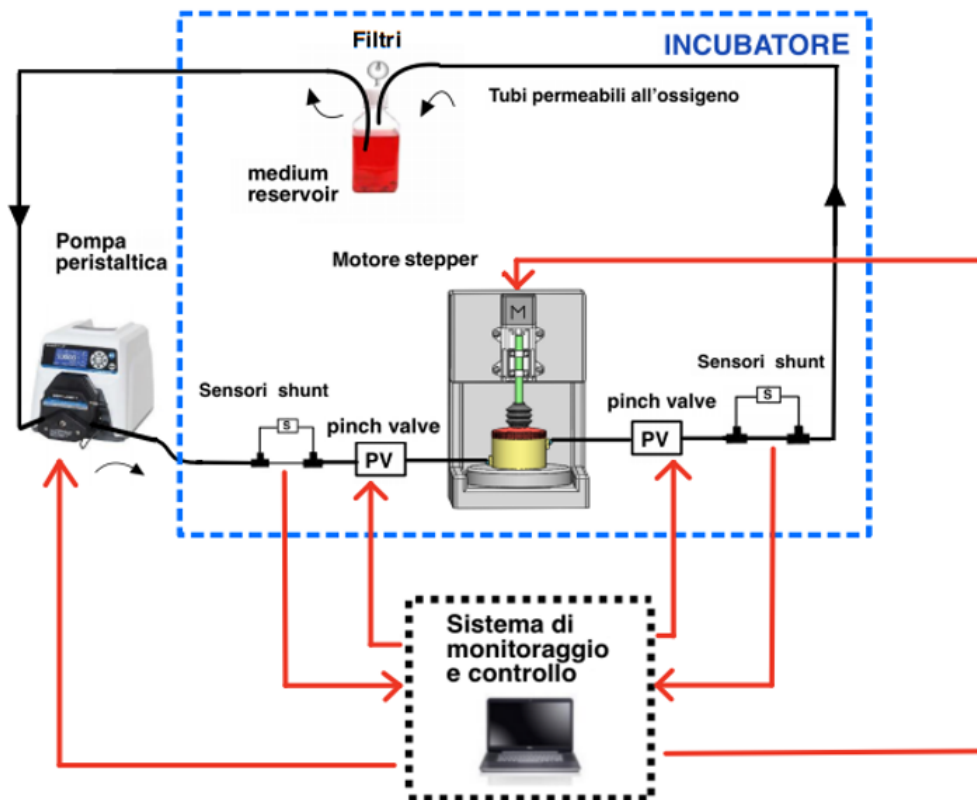


Figura 3: Schema del circuito

3.1 Stimolazione meccanica

Per riuscire ad applicare la pressione idrostatica viene mantenuta la tenuta della camera e quindi isolato l'ambiente esterno da quello interno. Prima di iniziare il normale funzionamento, entrambe le valvole vengono aperte per riempire l'intero sistema del bioreattore con il terreno prelevato dal reservoir, e all'interno della camera non viene generata alcuna pressione.

3.1.1 Perfusione forzata

Con entrambe le valvole aperte, il bioreattore funziona come un sistema a perfusione forzata e il medium può circolare (flusso di volume costante: 0.2-0.5 mL/min) [1] a pressione ambiente entrando dall'inlet in basso del contenitore, giungendo direttamente ai costrutti tramite delle griglie e uscendo dall'outlet in alto.

3.1.2 Pressione idrostatica

Durante la modalità di compressione, le valvole sono chiuse, così il medium all'interno della camera viene compresso dal pistone movimentato dall'attuatore; il pistone ha una velocità di avvicinamento e retrazione sulla coltura cellulare rispettivamente di -0,0116 e 0,002 m/s [6]. Sulla base degli sforzi fisiologici a cui è sottoposta la cartilagine, le sollecitazioni applicate sono comprese in un range tra 5 e 10 MPa con frequenze tra 0.5 e 1 Hz con durata di 4 h/d per 5 d/week (costrutti hydrogel) e 2 h/d per 7d (costrutti scaffold) [5].

4 Materiali e tecniche di fabbricazione

Per la scelta dei materiali e annesse tecniche di fabbricazione si è data inizialmente priorità a componenti quali il contenitore esterno, le due basi interne e il tappo poichè vengono a contatto con il medium e a tal proposito si è deciso di optare per la Stereolitografia (SLA) utilizzando resina biomedicale certificata Medical Grade. Il pistone invece è fabbricato in POMC attraverso fresatura CNC mentre le guarnizioni per hydrogel sono in silicone. La FDM (Fused Deposition Modelling) è stata scelta per la prototipazione

del telaio che, non necessitando di sterilizzazione, è realizzato in ABS (materiale con buone proprietà meccaniche). Infine, i restanti componenti quali o-ring, luer, tubi, soffietto e attuatore sono acquistabili da terze parti.

5 Requisiti di progetto

- La citocompatibilità e sterilizzabilità dei componenti a contatto con medium e costrutti cellulari (scaffold o hydrogel) è garantita dall'utilizzo di materiali Medical Grade e autoclavabili più volte.
- La tenuta idraulica e di sterilità sono ottenute attraverso l'uso di o-ring, connettori luer, soffietto e dalle guide per la chiusura del tappo.
- Il sistema è composto da semplici componenti modulabili mentre la presenza di due basi interne intercambiabili e delle guarnizioni per l'alloggiamento di costrutti (in hydrogel) di varie dimensioni rende il tutto più versatile.
- Le numerose guide presenti per il posizionamento di alcuni componenti sono pensate per rendere il sistema compatibile con le procedure di laboratorio.
- I costi di produzione sono minimizzati da un dimensionamento finalizzato ad ottimizzare gli spazi, soprattutto nelle basi interne per evitare spreco di medium e dalla scelta di determinati materiali e tecniche di produzione.
- L'intero sistema prevede un telaio, per il posizionamento dei vari componenti, il cui dimensionamento è stato fatto per inserire il tutto in incubatore.
- L'affidabilità del sistema e la facilità della regolazione dei parametri di coltura e di stimolazione fisica è garantita da un sistema di monitoraggio e controllo.
- Il ricambio continuo del mezzo di coltura è garantito dal circuito idraulico.

6 Vantaggi, limiti e sviluppi futuri

6.1 Vantaggi

Tra i vantaggi si ha la presenza di due basi interne intercambiabili ed entrambe consentono di ospitare fino a 6 scaffold contemporaneamente, utile se si vogliono studiare e confrontare più costrutti tra loro. E' anche possibile utilizzare hydrogel di dimensioni diverse tramite guarnizioni di diametro variabile. La quantità di medium utilizzato durante la perfusione è ridotta grazie alla forma e dimensionamento delle basi interne. Il montaggio del sistema è semplificato dalla presenza di guide. La presenza di quattro semisfere sulla superficie laterale della base del pistone, oltre a evitare problemi durante la fase di accoppiamento albero-motore, impedisce che il medium fuoriesca dalle guide del contenitore.

6.2 Limiti

La base interna per costrutti solidi è adatta solo per scaffold di dimensioni 12x12x4 mm. Inoltre, a causa del diametro del pistone, che coincide con quello della camera, non è possibile usare sensori invasivi attraverso dei fori sul tappo ma solo sensori non invasivi o shunt.

6.3 Sviluppi futuri e conclusioni

Al fine di ottimizzare il bioreattore, in futuro si potrebbe: migliorare il sistema utilizzando un sensore che misuri la pressione idrostatica; usare delle guarnizioni nella base interna per scaffold solidi per poter utilizzare costrutti di dimensioni differenti. Infine, si potrebbero effettuare delle analisi CFD per studiare i fenomeni fluidodinamici coinvolti e ulteriormente ottimizzare il dimensionamento della camera.

Nonostante alcuni limiti e possibili miglioramenti, il prototipo presentato potrebbe essere valido per diversi studi che coinvolgono la cartilagine articolare.

A Disegni Tecnici

A.1 Camere

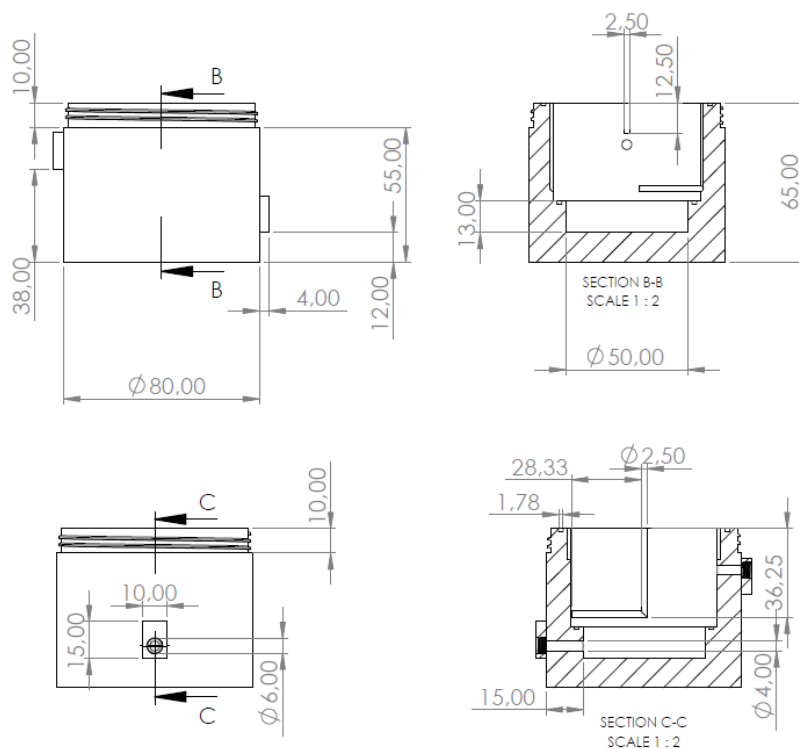


Figura 4: Contenitore esterno

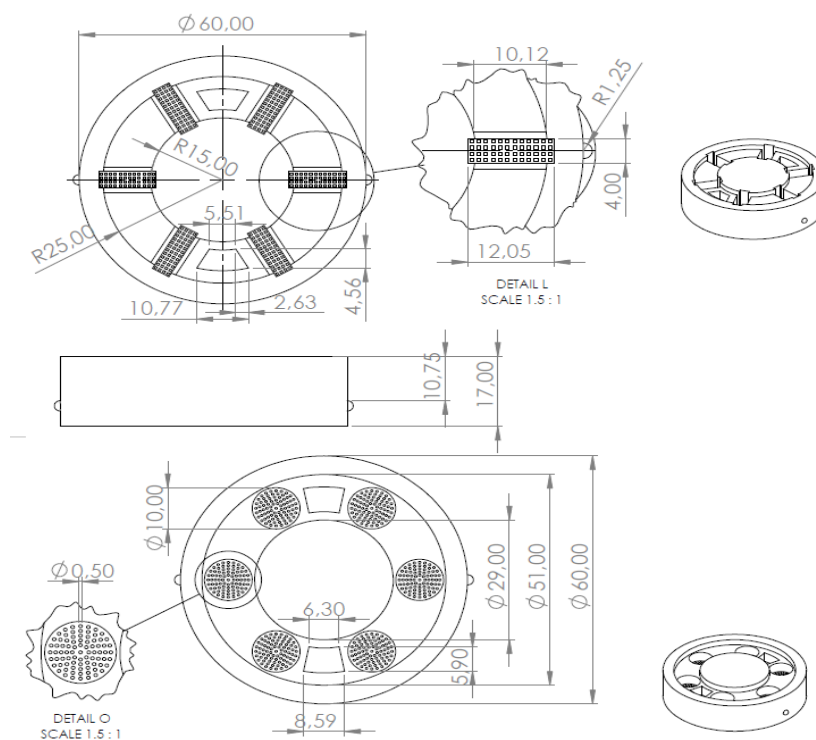


Figura 5: Basi interne

A.2 Altri componenti

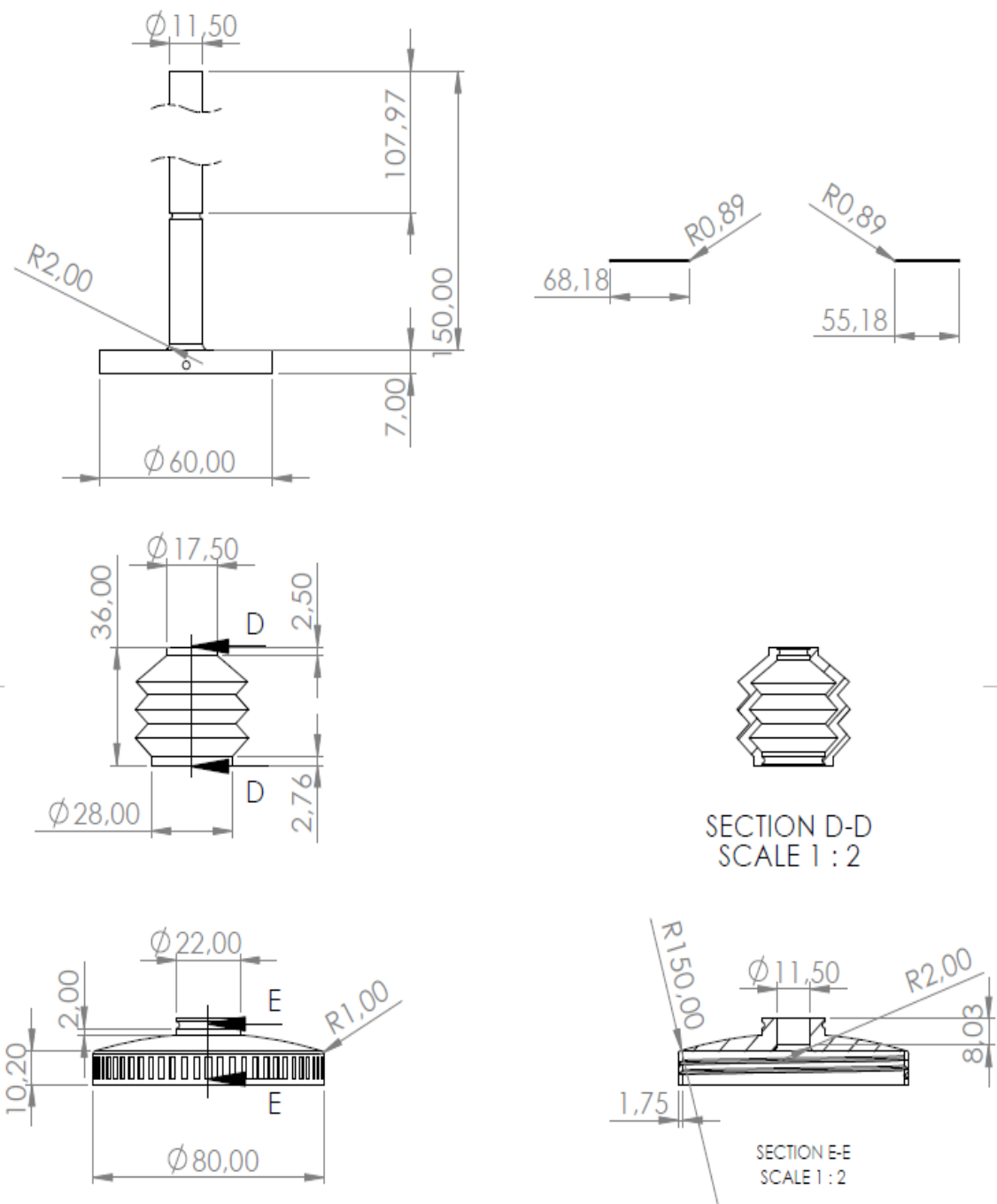


Figura 6: Pistone, o-ring, soffietto, tappo

Bibliografia e sitografia

- [1] João C. Silva et al. “Extruded Bioreactor Perfusion Culture Supports the Chondrogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem/Stromal Cells in 3D Porous Poly(-Caprolactone) Scaffolds”. In: *Biotechnology Journal* 15.2 (2020), p. 1900078. DOI: <https://doi.org/10.1002/biot.201900078>. eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/biot.201900078>. URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/biot.201900078>.
- [2] Carolina Gamez et al. “Bioreactor for mobilization of mesenchymal stem/stromal cells into scaffolds under mechanical stimulation: Preliminary results”. In: *PLOS ONE* 15.1 (gen. 2020), pp. 1–17. DOI: 10.1371/journal.pone.0227553. URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227553>.
- [3] Martina Sladkova et al. “Segmental Additive Tissue Engineering”. In: *Scientific Reports* 8 (lug. 2018). DOI: 10.1038/s41598-018-29270-4.
- [4] Zohreh Izadifar, Xiongbiao Chen e William Kulyk. “Strategic Design and Fabrication of Engineered Scaffolds for Articular Cartilage Repair”. In: *Journal of Functional Biomaterials* 3 (dic. 2012), pp. 799–838. DOI: 10.3390/jfb3040799.
- [5] Girish Pattappa et al. “Cells under pressure – the relationship between hydrostatic pressure and mesenchymal stem cell chondrogenesis”. In: *European cells materials* 37 (mag. 2019), pp. 360–381. DOI: 10.22203/eCM.v037a22.
- [6] Daniele Mazzei. *SUITE an Innovative Bioreactor Platform for in vitro Experiments*. 2007-2009.
- [7] Materiale/slide corso Bioreattori 2020-2021, Massai, Gabetti, Putame.
- [8] Attuatore lineare: <https://en.nanotec.com/>.
- [9] Idea funzionamento attuatore lineare: http://www.mass-spec.ru/projects/diy/syringe_pump/eng/ <https://grabcad.com/library/cnc2040-spring-loaded-zaxis-nema11-1>.
- [10] Dimensionamento o-ring: <https://www.allorings.com/>.
- [11] Luer: <https://www.nordsonmedical.com/>.
- [12] Cartigen bioreactor: http://www.tissuegrowth.com/prod_cartilage.cfm.