

POLITECNICO DI TORINO

Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica



IMPLEMENTAZIONE DI UN SISTEMA DI COLTURA CELLULARE DINAMICO IN GRADO DI MIMARE IN VITRO LA STIMOLAZIONE MECCANICA FISIOLÓGICA DELLA BARRIERA ALVEOLO-CAPILLARE

Relatore

Prof. Gianluca Ciardelli

Correlatori

Prof.ssa Chiara Tonda-Turo

Dr. Michela Licciardello

Candidato

Stefano Nocera

Anno Accademico 2020-2021

*Alla mia famiglia e a tutti coloro che hanno
anche solo in piccola parte migliorato la mia vita*

INDICE

ABSTRACT.....	5
1. INTRODUZIONE.....	6
1.1 Barriera alveolo-capillare.....	6
1.2 Modelli <i>in vivo</i>	10
1.3 Modelli <i>in vitro</i> : dagli approcci 2D a 3D.....	11
1.3.1 Sferoidi.....	13
1.3.2 Organoidi.....	15
1.3.3 Bioreattori.....	17
1.3.4 Organ-on-chip.....	18
1.4 Ingegneria tissutale.....	20
1.5 Ruolo degli scaffold nell'ingegneria tissutale.....	21
1.5.1 Scaffold.....	21
1.5.1.1 Polimeri naturali.....	22
1.5.1.2 Polimeri sintetici.....	22
1.5.2 Matrice extracellulare.....	23
1.5.2.1 Matrice extracellulare polmonare.....	24
1.6 Elettrospinning: processo e produzione di membrane elettrofilate.....	25
1.6.1 Parametri di sistema.....	27
1.6.2 Parametri di processo.....	28
1.6.3 Difetti di filatura.....	28
1.6.4 Materiali sottoposti ad elettrospinning.....	29
1.6.4.1 Membrane PCL-gelatina.....	29
1.7 Bioreattori per applicazioni di modelli <i>in vitro</i>	30
1.8 Scopo del lavoro.....	33
2. MATERIALI E METODI.....	35
2.1. Materiali.....	35

2.1.1. Bioreattore LiveBox2.....	35
2.1.2. Membrane PET 0.45, NY 100 e PCL-Gel.....	38
2.1.3. LivePa.....	38
2.1.4. Sensore di pressione.....	39
2.1.5. Software “Digital Transducer Application”	40
2.1.6. Linea cellulare epiteliale A549.....	42
2.1.7. Linea cellulare endoteliale HULEC-5a.....	42
2.1.8. Paraformaldeide/Formalina al 4%.....	43
2.1.9. Triton X-100.....	44
2.1.10. PBS-BSA.....	45
2.1.11. DAPI, Falloidina con FITC, Falloidina con Rodamina.....	45
2.1.12. FITC-Destrano 70 kDa.....	47
2.2. Metodi.....	48
2.2.1. Protocollo di misurazioni pressorie con modulatore LivePa.....	48
2.2.2. Ottimizzazione del protocollo di semina	52
2.2.3. Staining tramite dyes fluorescenti.....	54
2.2.4. Valutazioni di permeabilità di membrana.....	56
3. RISULTATI E DISCUSSIONE.....	57
3.1. Grafici delle acquisizioni a incrementi pressori crescenti.....	57
3.2. Valutazione della co-coltura mediante staining.....	66
3.3. Analisi della permeabilità di membrana.....	68
4. CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI.....	71
BIBLIOGRAFIA.....	75

ABSTRACT

The alveolar-capillary barrier is a structure in which the actual gas exchanges take place in the lungs: in particular, it acts as a link between the alveolar compartment (containing the air) and the capillary lumen (where the blood circulates) and is made up of three layers: alveolar epithelium, basal lamina and capillary endothelium. In the biomedical field, *in vitro* models offer the possibility of studying and investigating several aspects of cellular function by attempting to reproduce a tissue or organ at a physiological level. Bioreactors allow cultures to be grown under dynamic conditions and biomimetic experimental models to be obtained, overcoming the limitations of animal models and two-dimensional cultures.

The aim of this work is to implement a dynamic system that can recreate the *in vivo* conditions of the alveolar-capillary barrier environment, inside the commercial bioreactor produced by IVTech s.r.l. with LiveBox2 (LB2) culture chamber. Through this system it is possible to mimic certain conditions of constant overpressure, i.e. all those physiological conditions where there is a persistent local increase in pressure. The LB2 chamber consists of a double compartment: the apical mimics the conditions of the alveolar environment, while the basal replicates the capillary lumen. The two compartments are typically separated by commercial porous membranes. In this thesis work, the experimental set up was initially optimised: the complete system consisting of the LB2 chamber, the LiveFlow peristaltic pump, the LivePa pressure modulator and a pressure transducer that monitors the pressure over time was placed inside the incubator. Using the special software "Digital Transducer Application", a series of measurements were taken and analysed starting from the system in static conditions and with only flow motion, then at various successive incremental steps. In this study, polyethylene terephthalate membranes (PET, with a porosity of 0.45 μm) were initially used, obtaining data used to calibrate the system; subsequently, the effects of overpressure on cellularized constructs will be assessed.

In literature and on the market, there are devices that tend not to mimic the characteristics of the alveolar-capillary barrier, since cell seeding takes place on non-biomimetic substrates. From this point of view, the importance of manufacturing cell culture substrates (scaffolds) with increasingly biomimetic characteristics that favour cell adhesion and proliferation emerges.

The results obtained in this thesis work will be exploited to carry out new tests using an electrospun biomimetic membrane based on polycaprolactone (PCL) and gelatine (GL) developed at the Politecnico di Torino, housed inside the LB2 chamber. This membrane makes it possible to obtain a matrix with a morphology and composition similar to that of the extracellular matrix and able to host cells. The membrane has been characterised with some preliminary tests in the bioreactor under static conditions: it is housed inside the bioreactor and cultivated with pulmonary epithelial and endothelial cells, in the apical and basal part of the system respectively. The adhesion and viability of the cells within the system was confirmed by staining the nuclei and cytoskeleton.

INTRODUZIONE

1.1 Barriera alveolo-capillare

L'apparato respiratorio è costituito da un insieme di organi e strutture che hanno il compito di consentire gli scambi gassosi tra l'ambiente circostante (ad alto contenuto di ossigeno) e l'organismo umano (il cui sangue è ricco di anidride carbonica). Più specificatamente, la funzione principale di tale apparato è quella di rifornire tutti gli organi e i tessuti dell'organismo di ossigeno, mediante l'ossigenazione del sangue ¹.

All'interno del corpo umano gli organi deputati a favorire gli scambi gassosi tra aria e sangue sono i *polmoni*: essi, infatti, sono essenziali per la respirazione. Questi organi respiratori primari assumono un ruolo fondamentale nel corpo e presentano strutture di tessuti complicate e precise: comprendono infatti le vie aeree conduttive formate (nell'ordine) dalla *trachea*, dai *bronchi*, dai *bronchioli* e da un ingente numero di *alveoli*, ove questi ultimi sono le unità funzionali più piccole in cui lo scambio di gas avviene tramite l'esclusiva interfaccia di scambio gas-liquido nota come *membrana alveolo-capillare*. In quest'ottica, le molecole di ossigeno attraversano determinati elementi tissutali, quali l'*epitelio alveolare*, l'*interstizio* e l'*endotelio capillare*. L'epitelio che riveste la superficie alveolare è ricoperto da uno strato di rivestimento liquido sottile e continuo; inoltre, il tensioattivo polmonare agisce su questa interfaccia aria-liquido: in virtù delle sue funzioni biofisiche e immunomodulatrici, il tensioattivo consente di mantenere gli alveoli aperti, asciutti e puliti.

Andando a considerare la struttura delle vie aeree conduttive, diramandosi dalla trachea ognuno dei due bronchi principali raggiunge il polmone corrispondente a livello dell'ilo e vi penetra dirigendosi in basso, in fuori e indietro. Da ciascun bronco si staccano una serie di rami collaterali: in pratica, il bronco tende a non perdere generalmente la propria individualità, ma semplicemente diminuisce via via di calibro; questo tipo di ramificazione viene definita *monopodica* e si ripete anche nelle successive divisioni fino al livello dei bronchioli terminali, dove a quel punto la ramificazione si dice *dicotomica* (ogni ramo si sdoppia in rami di calibro uguale che tendono a dividersi a forma di "T"). In termini composizionali, i bronchi principali hanno una struttura simile a quella della trachea (formata da anelli cartilaginei collegati mediante tessuto connettivo); nelle successive ramificazioni di vario ordine la loro struttura tende a mutare grazie alla progressiva diminuzione della componente cartilaginea ed il contemporaneo aumento della componente elastica e muscolare: in tal modo la parete dei bronchi, a mano a mano che ci si allontana dal tronco di origine, si presenta sempre più flessibile e, di conseguenza, adattabile ai cambiamenti di volume dell'intero albero bronchiale che avvengono in relazione a fasi ed intensità degli atti respiratori. Inoltre, con il progredire delle ramificazioni, la parete dei bronchi diventa sempre più sottile ¹.

Dettagliando invece di più il sistema a livello microscopico, l'ultima porzione delle vie aeree è il *bronchiolo terminale*, il quale si dirama fino agli *alveoli* (presenti all'interno dei *sacchi alveolari*), che sono la struttura più importante del polmone, poiché svolgono le funzioni più fini. Come riportato in precedenza, l'alveolo presenta la parete costituita da un epitelio di rivestimento (epitelio alveolare) e da un sottostante strato connettivale ricco in vasi. In particolare, le cellule che caratterizzano l'epitelio sono:

- *Pneumociti di I tipo*
- *Pneumociti di II tipo*

Oltre alle cellule epiteliali si possono trovare nella parete alveolare dei macrofagi provenienti dai setti intralveolari, definiti *macrofagi alveolari*.

Gli *pneumociti di I tipo* sono cellule epiteliali pavimentose appiattite, la cui lamina basale si fonde con quella dell'adiacente endotelio capillare andando a formare la porzione dei setti interalveolari. Tendono a ricoprire gran parte della superficie alveolare (97%) e il loro citoplasma è sottile e ambisce a facilitare la diffusione dei gas tra il lume dell'alveolo e i capillari. Gli *pneumociti di II tipo*, invece, sono cellule tondeggianti, le quali sporgono nel lume dell'alveolo. Si possono trovare isolati e in piccoli gruppi; sono meno numerosi e dimensionalmente più piccoli rispetto ai corrispettivi di I tipo (infatti tendono a ricoprire una percentuale di superficie alveolare minore, circa il 5%). Il citoplasma degli pneumociti di II tipo contiene numerosi e caratteristici corpi lamellari secretori, i quali sono i precursori del surfattante alveolare: quest'ultimo possiede il ruolo fondamentale di protezione dei polmoni dalle infezioni ^{1 2}.

Per quanto riguarda i *macrofagi alveolari*, essi sono elementi voluminosi tondeggianti derivanti dai monociti; sono cellule fagocitarie che tendono a ripulire gli spazi respiratori da particelle inalate, sufficientemente piccole da aver raggiunto gli alveoli. Date le loro caratteristiche di cellule migranti, si ritrovano tra le cellule dell'epitelio alveolare o libere (nel lume degli alveoli). Al di sotto dell'epitelio alveolare si trova una lamina basale che in più punti si mette in contatto o si fonde con la lamina basale dei capillari alveolari ².

Entrando più nello specifico del sistema, si può evidenziare come il capillare si ponga proprio vicino all'alveolo, al fine di facilitare gli scambi gassosi. Tra alveolo e capillare, infatti, vi è una struttura nota come *interstizio* e l'insieme di pneumociti di I tipo (alveolare), interstizio ed endotelio del capillare costituisce pertanto la *barriera alveolo-capillare*. I capillari alveolari sono molto sottili e nel loro lume (di circa 5-6 micron di diametro) passano i globuli rossi. La barriera alveolo-capillare risulta formata da diversi strati, nell'ordine: l'epitelio alveolare, la lamina basale dell'epitelio, la lamina basale dell'endotelio e l'endotelio del capillare sanguigno. In alcuni punti le due lamine basali sono fuse (al fine di permettere lo scambio di gas), in altri si interpongono tra esse fibre e cellule del connettivo interstiziale. Lo spessore della barriera varia tipicamente tra 0.2 e 0.7 micron ².

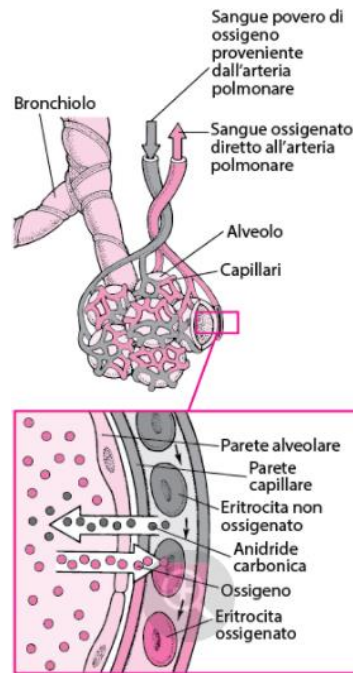


Fig. 1: Rappresentazione schematica della barriera alveolo-capillare ²

Il materiale tensioattivo (*surfactante*) che ricopre la superficie alveolare è costituito principalmente da fosfolipidi, proteine e lipidi neutri. Viene secreto dagli pneumociti di II tipo e può o essere riciclato dagli stessi, o in alternativa viene rimosso tramite endocitosi dai macrofagi alveolari ³.

In merito alla *vascolarizzazione*, il polmone riceve due grossi vasi: l'arteria polmonare (la quale porta sangue venoso) e la vena polmonare (quest'ultima si divide in vena polmonare superiore e inferiore) portatrice di sangue arterioso: questa caratteristica è peculiare in quanto contraria rispetto a ciò che avviene normalmente nel corpo umano, ossia che le arterie portano sangue arterioso e le vene sangue venoso. Le arterie polmonari si ramificano decorrendo a lato dei bronchi: esse seguono esattamente le suddivisioni dei bronchi fino a che, a livello degli alveoli, forniscono reti capillari. Le arterie bronchiali, i vasi linfatici ed i nervi si ramificano insieme ai vasi polmonari seguendo strettamente l'albero bronchiale ¹.

Più nello specifico, come accennato in precedenza, questa arteria (penetrando e seguendo la struttura dei bronchi) ha il compito di portare il sangue venoso (povero di ossigeno) nel capillare; quindi il sangue, a questo punto ossigenato, continuerà a fluire nella vena polmonare ed è proprio qui, a livello della barriera alveolo-capillare, che avverranno gli scambi: l'ossigeno presente nell'alveolo passerà nel sangue venoso e l'anidride carbonica dal sangue venoso passerà nell'alveolo (il sangue venoso sarà perciò ricco in CO₂ e povero in ossigeno, nel capillare si ossigena e quindi diventerà sangue arterioso ricco in ossigeno e povero in CO₂ e continuerà così nella vena polmonare). Il processo di scambio di ossigeno che avviene tra capillare e alveolo prende il nome di *ematosi*.

Considerando che le vie aeree sono ripetutamente esposte a molecole ambientali, il mantenimento dell'omeostasi delle stesse deve essere strettamente controllato. Basato su proprietà strutturali, funzionali e biochimiche, l'epitelio delle vie aeree umane è costituito dalle cellule epiteliali ciliate

predominanti, dalle cellule caliciformi che secernono muco, dalle club cells e dalle cellule basali delle vie aeree ⁴ (Fig. 2 e 3).

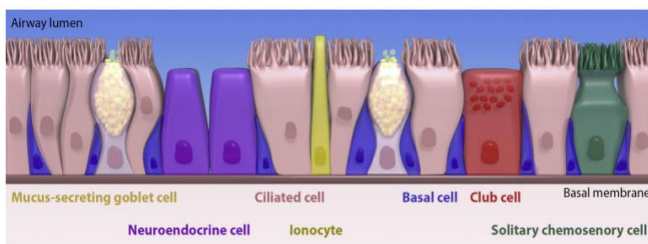


Fig. 2: Tipi di cellule comuni nell'epitelio delle vie aeree ⁴

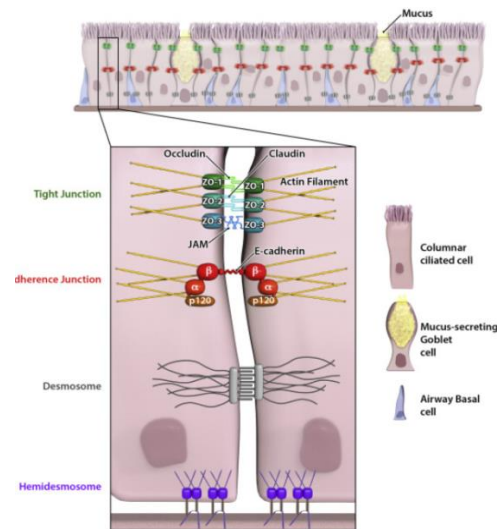


Fig. 3: Illustrazione delle diverse giunzioni cellulari nell'epitelio delle vie aeree ⁴

Tuttavia, possono presentarsi determinate condizioni patologiche a seguito di malfunzionamenti associati alla barriera alveolo-capillare: in generale, infatti, l'epitelio respiratorio fornisce una barriera fisica, funzionale e immunologica che ha il compito di proteggere l'individuo dai potenziali effetti nocivi delle particelle ambientali inalate, in modo tale da garantirgli il mantenimento di uno stato sano. Se tale barriera dovesse però essere compromessa, potrebbe verificarsi l'attivazione di risposte immunitarie o infiammatorie contro allergeni esogeni, sostanze microbiche e inquinanti, rendendo di conseguenza gli individui inclini a sviluppare un'inflammatione cronica come si osserva (ad esempio) nella *rinite allergica (AR)*, nella *rinosinusite cronica* e nell'*asma* ⁴. In particolare, l'epitelio delle vie aeree nell'asma e nelle malattie delle vie aeree superiori è disfunzionale a causa della formazione di giunzioni strette non corrette: secondo alcuni studi presenti in letteratura, è stato dimostrato come allergeni, agenti patogeni e inquinanti scindano le *giunzioni strette (TJ)* tra le cellule epiteliali, facilitando così il loro accesso alle cellule immunitarie che risiedono in prossimità delle cellule epiteliali ⁵. Pertanto, le malattie delle vie aeree come AR, asma o malattia cronica ostruttiva delle vie aeree (BPCO) sono caratterizzate da una disfunzione della barriera epiteliale, inclusi difetti nelle TJ e un'aumentata permeabilità epiteliale.

Più in generale, il tumore originante da cellule polmonari è denominato *carcinoma polmonare primario*: si può sviluppare nelle vie aeree che si ramificano dalla trachea per irrorare i polmoni (bronchi) oppure nelle piccole cavità aeree del polmone (alveoli). Questo tipo di tumore si può suddividere in due principali categorie:

- *Carcinoma polmonare non a piccole cellule* = è la categoria più diffusa, in cui rientra circa l'85% dei carcinomi polmonari. Questo tumore tende a proliferare più lentamente rispetto al corrispettivo a piccole cellule, tuttavia ha un potenziale metastatico maggiore (considerazioni effettuate su 40% dei pazienti nel momento in cui viene posta la diagnosi) ⁶

- *Carcinoma polmonare a piccole cellule* = viene anche detto microcitoma, rappresenta il 15% di tutti i carcinomi polmonari. Anche in questo caso è un tumore aggressivo e che porta, in breve tempo, a metastasi in altre sedi dell'organismo ⁶

1.2 Modelli *in vivo*

Inizialmente, il metodo principale e maggiormente utilizzato per studiare l'insorgenza di malattie e testare nuove terapie farmacologiche era quello di basarsi su *modelli animali*: all'interno di essi vi è effettivamente un'organizzazione migliore rispetto a quella che ci può essere in un costrutto bidimensionale *in vitro*, anche in funzione dell'interazione presente *in vivo* tra i vari organi. Tuttavia, vi sono tre principali problematiche associate all'uso dei modelli animali:

1. Il problema più importante è a livello *etico*: l'utilizzo di animali per lo studio di una patologia o dell'efficacia di un nuovo farmaco richiede il sacrificio dello stesso, al termine della validazione. L'idea principale per fronteggiare questo problema è quella di seguire il *principio delle 3R* ⁷:
 - ✓ **Reduction**: si ha la necessità di ridurre al minimo la sperimentazione sugli animali; tuttavia, è di fondamentale importanza che ci sia un numero di animali che sia comunque sufficiente per poter proseguire le fasi di ricerca: per questo motivo, l'obiettivo è quello di avere il più possibile pochi animali, ma abbastanza che siano necessari per determinate ricerche. La *reduction* include metodi che permettano di massimizzare informazioni raccolte animale per animale, in modo ovviamente da ridurre l'uso di altri animali: tra i vari esempi di reduction si possono citare le *tecniche di imaging*, in grado di effettuare misure nel lungo tempo sullo stesso animale (su tutte: ecografie, MRI) ed è anche importante incentivare lo scambio di dati e di risorse tra i vari gruppi di ricerca per concentrare una maggior quantità di informazioni su uno specifico lotto di animali
 - ✓ **Refinement**: letteralmente "affinare, perfezionare"; si intende l'intento di minimizzare la sofferenza degli animali coinvolti in ricerca, ma al contempo aumentare la qualità dei dati ottenibili da queste sperimentazioni: l'aumento della qualità dei dati consiste nel ridurre il numero di esperimenti da fare per ottenere dei risultati utili. In generale fa riferimento ai metodi che minimizzano il dolore, lo stress e la sofferenza che gli animali potrebbero provare a causa della sperimentazione, per cui l'obiettivo preponderante è quello di migliorare l'*animal welfare*, cercando di venire incontro alle esigenze dell'animale stesso: infatti, è stato notato in diverse prove effettuate come il dolore e lo stress possano alterare il comportamento degli animali da laboratorio, la loro fisiologia ed immunologia: è stato notato come variazioni nei risultati sperimentali compromettano l'affidabilità e la ripetibilità degli esperimenti.
In questo contesto, esempi di *refinement* sono i metodi che assicurano che gli animali siano provvisti di giusti alloggiamenti, che consentano loro di esprimere al meglio i tipici comportamenti e che assicurino l'uso di appropriati anestetici o analgesici per minimizzare il dolore a cui sono sottoposti
 - ✓ **Replacement**: l'obiettivo in questo caso è quello di rimpiazzare, ove possibile, la sperimentazione animale e i modelli animali, ricorrendo ad altre opzioni: tipicamente il

replacement può essere di due tipi, *totale* o *parziale*. Nel primo caso si usano modelli *in vitro* o *in silico* che non utilizzano affatto animali (per questo motivo il rimpiazzo è totale), mentre per quanto riguarda il replacement parziale si intende il ricorso a modelli animali più distanti dall'uomo, in termini di capacità di provare dolore: in questo contesto, un esempio possono essere i vermi *C. Elegans* o i "moscerini della frutta" *Drosophila*, che hanno il vantaggio di condividere buona parte del genoma umano (circa il 70%) e spesso se un loro gene è mutato in modo da perdere il fenotipo, quest'ultimo può essere recuperato inserendo l'omologo umano ⁷

2. Un ulteriore problema è a livello di *efficacia*: usando un modello animale si effettuano delle semplificazioni, vi sono differenze a livello fisiologico ed anatomico rispetto ad un individuo. È un problema di forte rilevanza, in quanto specialmente nell'ambito della validazione di nuovi composti si perdono molte caratteristiche nel passaggio da modello animale a modello umano che influenzano l'efficacia del trovato in esame, che rischia appunto di non passare le fasi successive di trial clinico e quindi di non essere validato ⁸
3. L'ultima limitazione è lo sviluppo di *patologie*: è vero che determinati animali sono in grado di sviluppare alcune patologie associate all'uomo (per cui si cercano delle cure), ma dall'altro lato è anche vero come ne esistano di altre che attualmente hanno una minor probabilità di cura (fra tutte, malattie tumorali e neurodegenerative): al netto di ciò, andrebbero implementati modelli animali che richiedono modifiche geniche per poterli rendere in grado di sviluppare determinate patologie, ma con la conseguenza che spesso non vi è affinità con ciò che accadrebbe nell'uomo ⁷ (si andrebbe a introdurre nell'animale una patologia che, da solo, non sarebbe in grado di sviluppare)

Di conseguenza, per tutti i motivi sopra citati, si è cercato di adoperare delle alternative all'uso di questi modelli animali (ove possibile) cercando di sviluppare dei modelli sperimentali 2D e 3D che presentassero caratteristiche di biomimetività sempre crescenti e via via più simili all'ambiente *in vivo*.

1.3 Modelli *in vitro*: dagli approcci 2D a 3D

Frequentemente in ambito biomedico si effettuano sperimentazioni su modelli costituiti da colture cellulari, le quali possono essere di derivazione umana o animale: tali colture sono definite *in vitro* ed offrono la possibilità di poter studiare e investigare più aspetti delle funzioni cellulari cercando di riprodurre il più fedelmente possibile un tessuto o un organo a livello fisiologico.

In generale, per la messa in commercio di dispositivi medici (oppure di farmaci) è necessario seguire determinati processi sequenziali che ne consentano la validazione. Nell'ordine si ha:

- *Fase preclinica* = avviene al di fuori dell'uomo e dell'ambiente fisiologico; in questo contesto vi rientrano, per l'appunto, studi *in vitro* (utilizzando sistemi cellulari) e studi svolti su animali
- *Fase 1* = corrisponde all'inizio della fase clinica, definisce ed analizza la sicurezza del materiale in esame e in genere viene svolta su una popolazione limitata di individui sani

- *Fase 2* = valuta l'efficacia del nuovo trovato e viene effettuata su una popolazione maggiore (il numero di pazienti in questo contesto può rasentare le centinaia di persone)
- *Fase 3* = si massimizza il numero di individui, si hanno centinaia di migliaia di pazienti coinvolti; in questo stadio vi è una valutazione più accurata dell'efficacia e della sicurezza del trovato rispetto alla terapia standard, o al controllo, o al placebo, nel caso in cui non vi fosse un trattamento standard
- *Fase 4* = è la fase di post-market, in cui vi è una lunga sorveglianza del prodotto al fine di rilevare alcuni eventuali effetti collaterali tardivi (follow-up clinico) ⁷

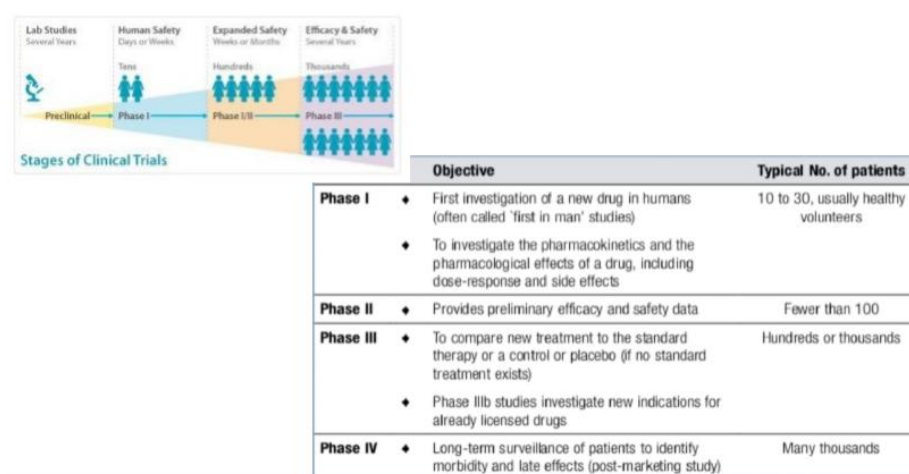


Fig. 4: Rappresentazione schematica degli stage dei trial clinici ⁷

In ragione di ciò, come definito in precedenza, i modelli *in vitro* rientrano nella categoria della *fase preclinica*: in questa fase si effettuano delle semplificazioni rispetto all'individuo umano e bisogna cercare di ridurre al minimo l'insorgenza di eventuali rischi, al fine di poter garantire la validazione anche nelle fasi successive di trial clinico.

In passato, nelle fasi precliniche si tendeva ad usare colture cellulari umane; andando ad analizzare quelle che sono le caratteristiche di un semplice modello 2D *in vitro*, come per ogni modello, si hanno dei pro e dei contro.

VANTAGGI	SVANTAGGI
Possibilità di effettuare osservazioni mirate ad una non elevata tossicità di un composto	Non vi è modo di ricostruire con completezza la funzionalità di un organo o un tessuto
Valutazione dell'abbassamento della vitalità cellulare	Non vi è interazione cellula-cellula
Sono semplici, ad alto rendimento e con costi relativamente contenuti	Non vi è interazione cellula-matrice extracellulare (ECM)

Tab. 1: Vantaggi e svantaggi modelli bidimensionali *in vitro*

Dunque, attraverso questi sistemi si può notare come la riproduzione di determinati fenomeni osservati nei processi biologici sia piuttosto bassa, infatti vi è la possibilità di imitare solo alcune funzionalità presenti nel corpo umano: in generale, per valutare il grado di mimesi di determinati sistemi rispetto agli ambienti in vivo si parla di *biomimeticità*.

Sulla base di tali incongruenze tra ambienti *in vitro* ed *in vivo*, lo sviluppo dei modelli 3D è risultato di fondamentale importanza per poter mimare al meglio la complessità 3D degli ambienti *in vivo* ⁸. Tra i modelli più rappresentativi, in ordine di grado di biomimeticità crescente, vi sono:

- *Sferoidi*
- *Organoidi*
- *Bioreattori*
- *Organ-on-chip*

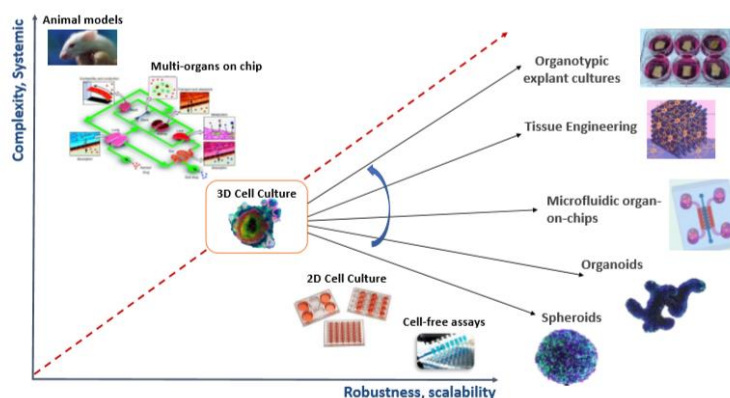


Fig. 5: Grafico che rapporta i vari modelli sperimentali in base alla loro complessità e scalabilità ⁷

1.3.1 Sferoidi

La coltura 3D (rispetto a quella 2D) consente di simulare meglio le interazioni cellula-cellula e cellula-matrice extracellulare in vivo e permette di fornire un microambiente più realistico per la coltura cellulare in vivo. Gli sferoidi sono i modelli 3D più semplici, costituiti da aggregati di cellule e vengono spesso usati come modelli per lo studio in vitro di condizioni neoplastiche; il processo di formazione degli *sferoidi multicellulari (MCS)* si divide prevalentemente in tre fasi:

- Inizialmente, vi è una prima aggregazione in cui le cellule si avvicinano e c'è un'interazione tra l'integrina e i frammenti di ECM che rimangono sulla superficie di ogni cellula
- Quindi, una volta che le cellule sono compattate, inizia a esprimersi la caderina epiteliale, che tende ad accumularsi: si entra nella fase ritardata di sospensione e di compattazione
- Infine, gli aggregati cellulari sciolti formano sferoidi densi sotto la forza delle interazioni caderina-caderina ⁷

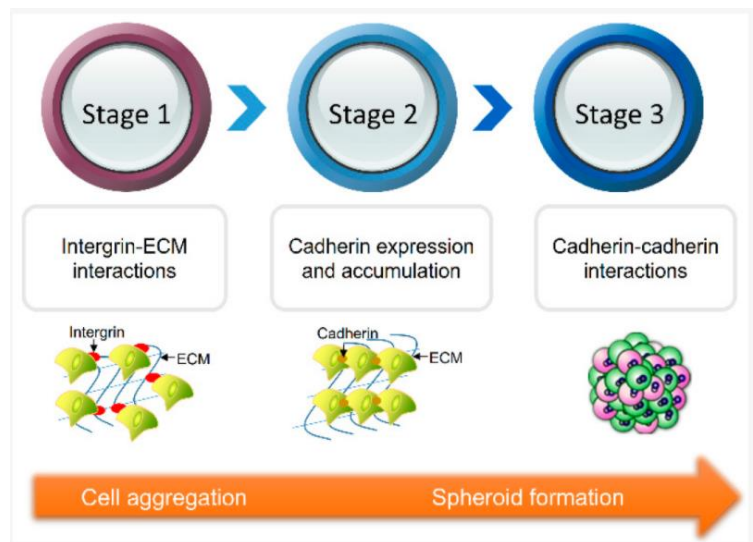


Fig. 6: Fasi del processo di formazione degli sferoidi multicellulari (MCS) ⁷

Per quanto riguarda il tipo di cellule utilizzate, nel caso di sferoidi non si utilizzano cellule staminali, bensì *linee cellulari generalmente immortalizzate* oppure *cellule primarie umane*: nel primo caso è possibile eseguire test per lungo tempo, ma si rischia di avere un basso grado di biomimetività rispetto al tessuto umano; nel caso delle cellule primarie vi è invece un grado di biomimetività maggiore, ma ovviamente non risulta possibile effettuare colture cellulari per molto tempo, in quanto le cellule primarie presentano il rischio di essere sottoposte a senescenza (ossia al punto in cui non sono più in grado di dividersi e subiscono l'apoptosi) ⁹.

Gli sferoidi a livello compositivo hanno una geometria sferica caratterizzata principalmente da tre regioni:

- *Zona proliferante*: è la zona più esterna, ci sono le condizioni migliori in termini di diffusione dell'ossigeno e dei nutrienti, mentre i rifiuti possono essere rimossi molto rapidamente
- *Zona quiescente*: è una sorta di area ibrida, in cui la maggior parte delle cellule sono vive ma la loro attività metabolica è molto bassa; le cellule presenti in questa zona possono ristabilire la loro vitalità sotto determinate condizioni
- *Core necrotico*: i nutrienti non possono diffondersi nella parte interna degli sferoidi, a causa di un limite nella diffusione dell'ossigeno. Pertanto, vi è molta difficoltà per l'ossigeno e per le sostanze nutritive di entrare nel core e, al contempo, anche per i rifiuti di essere rimossi. Questo accumulo di tali prodotti e la mancanza di sostanze nutritive causano la morte cellulare

Tuttavia, oltre al grosso problema relativo al core necrotico, tramite gli sferoidi è possibile solo imitare qualche semplice tessuto del corpo: per questo motivo sono state effettuate ulteriori scoperte che fossero migliorative principalmente dal punto di vista biomimetico.

In letteratura, come si può evincere dalla ricerca di Zuchowska et al. ¹⁰, è stato presentato un microchip completamente integrato che fosse in grado di valutare l'efficienza delle procedure di terapia fotodinamica (PDT) su colture di sferoidi polmonari 3D; questo specifico tipo di terapia viene effettuato per il trattamento del cancro al polmone, in alternativa ai metodi più convenzionali quali

radioterapia, chemioterapia e interventi chirurgici: più in dettaglio, la PDT si basa sull'utilizzo di composti fotoattivi che si attivano in presenza di ossigeno, a seguito di un'irradiazione ad una specifica lunghezza d'onda.

Andando a considerare i risultati che sono stati ottenuti in questo lavoro, è possibile evidenziare come gli sferoidi garantiscano una maggior resistenza a diverse terapie, rispetto alle cellule coltivate come monostrato; anche per quanto riguarda la fototossicità sulle cellule di carcinoma osservato 24 ore dopo il trattamento con PDT, se ne è notata un livello basso: questa viene attribuita alle condizioni di coltura degli sferoidi, in cui le cellule sono cresciute nella disposizione spaziale con interazioni che tendono ad imitare il microambiente tissutale. Tuttavia, anche negli organismi viventi è difficile trovare una corretta concentrazione del farmaco e dei parametri PDT ottimali che possano essere appropriati per trattare il cancro.

In generale, quando i medici applicano una terapia antitumorale, una dose di farmaco viene introdotta nell'organismo e vi rimane per un tempo prolungato fino a quando non viene metabolizzata: in questo lavoro si è cercato di riprodurre lo stesso procedimento.

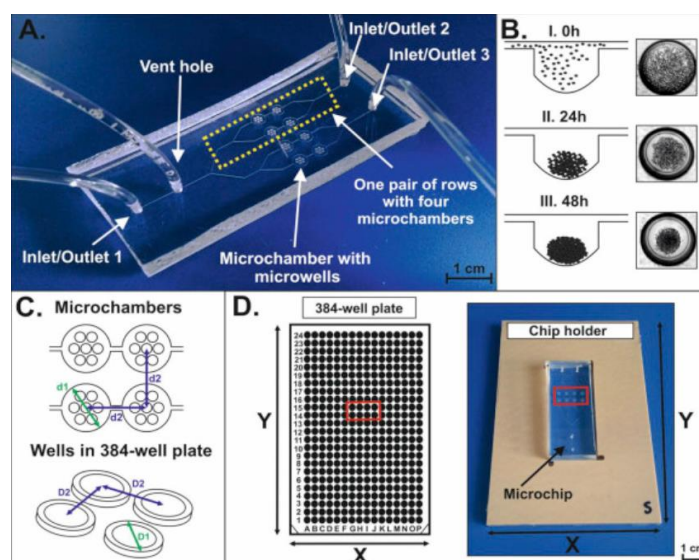


Fig. 7: A. Rappresentazione del microchip fabbricato; B. Schema rappresentativo di aggregazione cellulare e formazione degli sferoidi nel micropozzetto, dopo 0h, 24h e 48h; C. Schema della disposizione delle microcamere: d1 e d2 sono le dimensioni dei pozzetti nella piastra standard da 384 pozzetti; D. Confronto chip con la piastra da 384 pozzetti ¹⁰

1.3.2 Organoidi

Sono costruiti 3D composti da più tipi di cellule (anche in questo caso si tratta di assemblaggi 3D di cellule).

Nello specifico, hanno origine da *cellule staminali* oppure da *tessuti primari*: grazie alla capacità degli organoidi di autorganizzarsi, essi sono in grado di simulare l'architettura e la funzionalità di un organo attivo. In questo caso, inoltre, si ha un più alto livello di biomimetività rispetto agli sferoidi. Per quanto riguarda le dimensioni, essi tendono ad essere abbastanza simili agli sferoidi (forma

sferica tra i 300 e i 400 micrometri) ed esattamente come loro possono soffrire del problema del core necrotico interno ⁵.

Tra le varie potenzialità degli organoidi vi è la possibilità di studiare i tessuti umani allo stesso livello di controllo scientifico e di profondità di analisi come possibile solo con modelli di organismi non umani. Inoltre, consentono di ricapitolare ed investigare gli eventi morfogenetici nello sviluppo umano che portano alla formazione di tessuti e organi e al contempo è anche possibile adottarli per studi di meccanismi di particolari malattie. Oltretutto possono essere usati da più laboratori e sono facilmente manipolabili e sottoponibili ad analisi biomolecolari e facilitano la transizione da modelli animali alla biologia umana con vincoli etici accettabili. Ultimo ma non per importanza, è il fatto che molti organoidi possono subire un'ampia espansione in coltura e mantenere la stabilità del genoma, rendendoli così adatti per gli screening high-throughput e per le biobanche: quest'ultime sono delle strutture che raccolgono in maniera organizzata del materiale biologico utile per ciò che sarà la ricerca clinica.

Contrariamente a quanto detto fino ad ora, come ogni modello che si rispetti, anche gli organoidi presentano degli svantaggi: oltre al problema condiviso con gli sferoidi del core necrotico interno (accennato precedentemente), in questi ambienti si ha una mancanza di rappresentazione di importanti processi fisiologici tra cui (su tutti) la vascolarizzazione e l'innervazione, così come la mancanza di un microambiente. Queste caratteristiche di per sé tendono ad aumentare la biomimetici del sistema ed il fatto che non siano presenti è sicuramente una carenza cui bisogna far fronte; tuttavia, per poter superare questa complicazione, negli ultimi anni sono stati sviluppati e studiati gli *assembloidi*: organoidi complessi in cui è possibile effettuare delle co-colture, ad esempio insieme alle cellule staminali che formano gli organoidi si coltivano cellule endoteliali (le quali compongono i vasi sanguigni). Introducendo queste cellule vi è la possibilità di iniziare il self-assembling e di far formare capillari, che rimangono all'interno della struttura degli organoidi (in questo modo è stato possibile progettare un organoide vascolarizzato). Un ulteriore svantaggio è legato al fatto che il materiale di partenza (quindi o il tessuto del paziente, oppure le cellule staminali dello stesso) e il protocollo di coltura che viene utilizzato per la creazione degli organoidi può introdurre ingenti variabilità ⁷.

Nel contesto della mimesi dell'apparato respiratorio, ovviamente vi è la possibilità di creare sia organoidi derivanti da cellule estratte da tessuti tumorali del polmone (organoidi tumorali), sia da tessuti non-neoplastici prelevati da campioni polmonari e che vengono resecati chirurgicamente.

Dagli studi condotti da Barkauskas et al. ¹¹, sono stati sviluppati degli organoidi polmonari molto promettenti dal punto di vista delle ricerche di nuovi farmaci e utili per lo sviluppo di terapie che migliorino la riparazione endogena. Questi organoidi non ricapitolano ancora tutte le strutture complesse e le interazioni cellulari delle diverse regioni del polmone, in particolare la regione alveolare (altamente vascolarizzata e delicata); tuttavia, nell'ultimo decennio sono diventati uno strumento indispensabile per la ricerca di base e traslazionale.

In questo lavoro si mettono in evidenza le scoperte e i progressi compiuti utilizzando organoidi polmonari derivati da tre delle popolazioni di cellule staminali/progenitrici epiteliali del polmone adulto: cellule basali, cellule club secretorie delle vie aeree (precedentemente note come cellule Clara) e cellule AEC2.

Di seguito, viene riportato un esempio di rappresentazione degli organoidi (Fig. 8) derivati da cellule basali di topo: questi primi organoidi furono chiamati tracheosfere ¹¹ e sono stati utilizzati per applicazioni di screening ad alto rendimento.

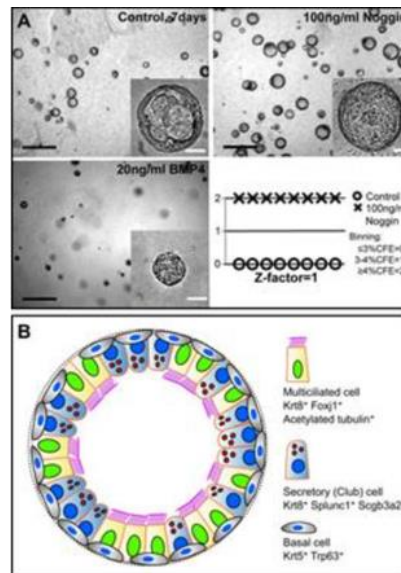


Fig. 8: A. Tracheosfere di topo dopo 7 giorni di coltura, con e senza 100 ng/ml di Noggin e 20 ng/ml di BMP4; il pannello in basso a destra mostra l'efficienza di formazione delle colonie (CFE) su 8 wells di controllo; B. Schema rappresentativo di una tipica tracheosfera di topo dopo circa 14 giorni di coltura ¹⁰

In particolare, tali tracheosfere di topo sono state utilizzate per lo screening di piccole molecole e farmaci che regolano la proliferazione e la differenziazione delle cellule basali: queste tipologie di screening sono molto importanti per trovare nuove terapie per la cura delle malattie polmonari: ad esempio, nei pazienti affetti da asma (associato a infiammazione) e con produzione di citochine immunitarie e stress cellulare, la proporzione di cellule che producono muco è notevolmente aumentata a scapito delle cellule multiciliate.

1.3.3 Bioreattori

Un bioreattore è un dispositivo in grado di fornire un ambiente dinamico altamente controllato e riproducibile ¹². In particolare, è in grado di garantire un adeguato scambio di nutrienti e la rimozione di sostanze di scarto, l'applicazione di opportuni stimoli fisici e chimici che possano essere misurabili e controllabili e soprattutto vi è la possibilità di promuovere in maniera efficiente una distribuzione spaziale delle cellule su supporti 3D. Le caratteristiche fondamentali dei bioreattori devono essere le seguenti:

- Ripetibilità
- Sicurezza
- Scalabilità
- Riproducibilità

- Produzione su larga scala

Oltre ad assicurare il controllo e il monitoraggio delle condizioni di coltura, è fondamentale che un bioreattore permetta un'automazione di ogni step del processo: tutto ciò risulta essenziale sia per poter ottenere degli studi controllati, riproducibili e statisticamente rilevanti, sia per future indagini e applicazioni dei processi di produzione dei tessuti in clinica ¹³.

La componente principale di un bioreattore è la camera di coltura, che consente l'alloggiamento e il mantenimento di cellule o costrutti in un ambiente sterile: specialmente per quest'ultimo motivo, si tende a sviluppare componenti che siano facilmente modulabili e autoclavabili; in alcune circostanze, al fine di monitorare meglio le condizioni di coltura in real time, si sviluppano camere di coltura con materiali trasparenti (PDMS su tutti). La progettazione di tali camere deve garantire che si evitino contaminazioni e perdite di fluido (tipicamente, mezzo di coltura) e, inoltre, deve essere creata con materiali che non favoriscano rilasci di sostanze o che possano eventualmente essere soggetti a qualsiasi tipo di deformazione durante il loro utilizzo ¹³. Tutto ciò è di rilevante importanza in ottica di non suscitare reazioni avverse nei tessuti che vengono coltivati. Le caratteristiche comuni principali che devono presentare i materiali di progettazione di un bioreattore sono:

- Biocompatibilità
- Resistenza alle colonizzazioni batteriche

Tipicamente, i canonici sistemi che vengono utilizzati per favorire la fase di perfusione all'interno di un bioreattore sono le pompe peristaltiche: variano da modello a modello, ma di base consentono (mediante l'azione di un rotore) di promuovere un flusso continuo e costante di medium, al netto di qualche momentanea strizione dovuta al moto peristaltico della pompa ¹². Quest'ultimo infatti, a livello fisiologico, è tipico ad esempio nei sistemi di extracircolazione corporea o nel tratto gastrointestinale ¹².

1.3.4 Organ-on-chip

Gli organ-on-chip sono dispositivi ottenuti in un chip microfluidico, sotto perfusione di liquidi: grazie a questa stimolazione aggiuntiva e anche ad altri tipi di stimolazioni nel dispositivo microfluidico, l'organ-on-chip può raggiungere un buon grado di maturazione e modellizzare alla microscala un organo umano. Più in dettaglio, andando a ricapitolare le architetture multicellulari, le interfacce tessuto-tessuto, i microambienti fisiologici e la perfusione vascolare del corpo, questi dispositivi producono livelli di funzionalità dei tessuti e degli organi non possibili con i sistemi di coltura 2D o 3D convenzionali ^{6 14}.

Un ulteriore aspetto fondamentale è la possibilità di *monitoraggio in tempo reale*: infatti gli organ-on-chip oltre ad essere molto piccoli (centinaia di μm di dimensioni), sono convenzionalmente sviluppati in un dispositivo di polidimetilsilossano (PDMS), che è completamente trasparente. Per questo motivo, il dispositivo di coltura è compatibile con le normali tecniche di caratterizzazione che si utilizzano negli esperimenti in vitro (quali ad esempio la microscopia confocale o a fluorescenza, o la spettroscopia visibile UV) e in questo modo vi è anche la possibilità di seguire lo stato della cellula in diretta. All'interno di questi dispositivi è possibile integrare

l'immunocompetenza, il che significa che all'interno di essi si può ricreare la vascolarizzazione e di conseguenza provare a riprodurre la tipica perfusione dei capillari e dei vasi sanguigni del corpo umano. Favorendo la perfusione, infatti, vengono introdotte cellule immunitarie, per cui questo modello è immunocompetente e molto vicino alla realtà. L'utilizzo di tale modello ha svariati scopi: su tutti vi è la possibilità di studiare i farmaci (drug screening) per la valutazione della sicurezza delle sostanze chimiche sugli organi umani. Tuttavia, l'inconveniente principale è che tutti questi vantaggi hanno un costo, a fronte delle miglione sopra citate.

Tra i vari modelli di organ-on-chip, di particolare rilevanza è il *lung-on-chip*: si tratta di uno specifico modello 3D complesso di polmone umano che possa simulare con accuratezza il corrispettivo ambiente *in vivo*; tutto ciò è fondamentale, specialmente per raggiungere una conoscenza migliore dei meccanismi che riguardano le condizioni fisiologiche e patologiche del sistema in esame.

All'interno della categoria dei *lung-on-chip*, di spiccato interesse vi è la modellazione in vitro della barriera alveolo-capillare, il cui scopo principale è quello di sviluppare un innovativo micro/nano-modello biomimetico che assomigli il più possibile al microambiente alveolo-capillare, consentendo la co-coltura di cellule epiteliali ed endoteliali su substrati porosi e andando a ricreare le caratteristiche della barriera fisiologica ^{15 16}.

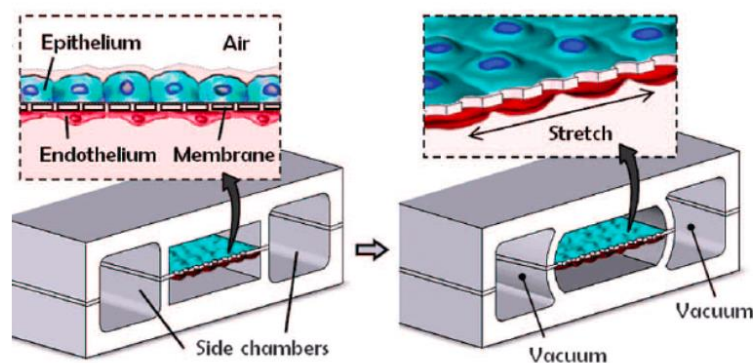


Fig. 9: Rappresentazione di una sezione del modello lung-on-chip ¹⁵

Come è possibile apprezzare dalla rappresentazione sopra riportata (lavoro di Ingber et al.), il dispositivo microfabbricato che va a simulare il polmone è costituito da dei microcanali compartimentalizzati realizzati in polidimetilsilossano (PDMS), per ricreare la barriera alveolo-capillare. Tra le due camere del dispositivo è posta una membrana sottile di PDMS, porosa e flessibile, rivestita con ECM. Il dispositivo in questione tende a ricreare i movimenti respiratori fisiologici applicando il vuoto nelle camere laterali e provocando lo stiramento meccanico della membrana in PDMS, in maniera ciclica ¹⁵.

Sono molteplici gli scopi del lung-on-chip: vi è la possibilità di prevedere la valutazione della risposta infiammatoria innescata da patogeni microbici, testare la sicurezza e l'efficacia di nuovi farmaci o gli effetti delle tossine ambientali ¹⁷.

1.4 Ingegneria tissutale

L'ingegneria tissutale (TE) è un campo multidisciplinare che applica i principi dell'ingegneria e delle scienze della vita per la realizzazione di sostituti biologici che ripristino, mantengano e migliorino le funzioni di tessuti o organi ¹⁸. La TE è necessaria in quanto la maggior parte dei tessuti non è in grado di rigenerare in seguito ad una lesione, oppure a causa di una patologia (ed anche nel caso in cui i tessuti riuscissero a rigenerarsi spontaneamente potrebbero non farlo completamente); gli approcci di TE vengono frequentemente utilizzati per l'ottenimento di modelli in vitro (quali, ad esempio, bioreattori ed organ-on-chip).

In funzione di ciò, l'ingegneria tissutale si occupa della progettazione e della creazione di organi e tessuti dal punto di vista dell'interazione tra materiale sintetico e sito biologico, in modo da poter realizzare la rigenerazione di un tessuto o di un organo, ottenendo una sorta di replicato biologico naturale dove il supporto artificiale (quando presente) si degradi nel tempo ¹⁸.

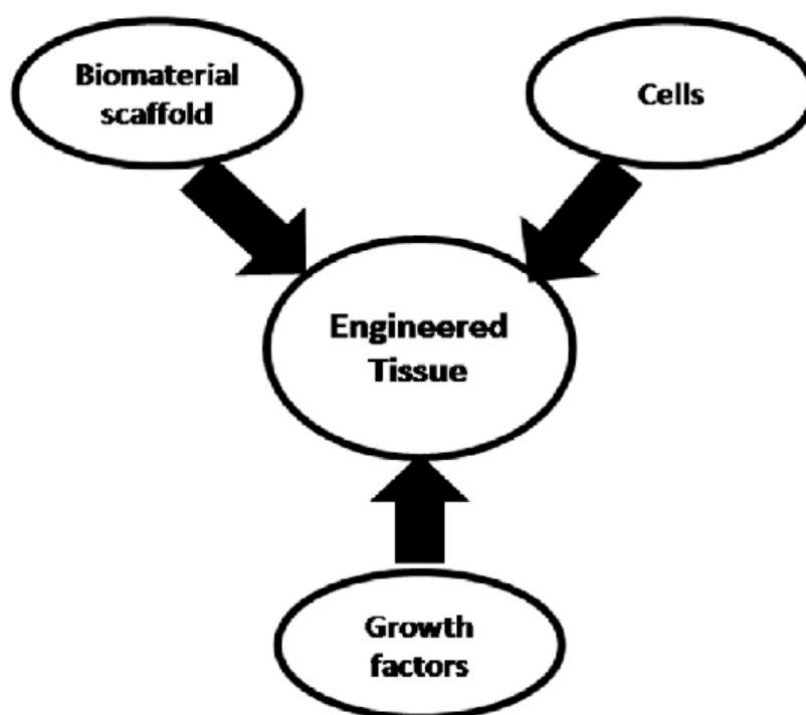


Fig. 10: Triade rappresentativa dell'ingegneria tissutale ¹⁸

Al fine di progettare le strategie di TE si hanno tre elementi preponderanti:

- *Scaffold*
- *Cellule*
- *Fattori di segnalazione*

Lo *scaffold* è un substrato 3D che ha il compito di mimare la matrice extracellulare (ECM): fornisce supporto fisico alle cellule, consente di rigenerare un tessuto (sia che lo si impianti con o senza le cellule) e deve essere inoltre biologicamente valido.

Le *cellule* con cui lo scaffold interagisce devono essere in grado di aderire, proliferare e differenziarsi, in ottica di produrre la nuova ECM desiderata. Si cerca di utilizzare il più possibile cellule autologhe del paziente (per ridurre il rischio di rigetto) oppure cellule staminali (approfitando delle loro grandi capacità differenziative e di autorinnovamento).

I *fattori di regolazione* influenzano ed indirizzano le cellule ad esprimere il fenotipo desiderato e la loro funzione; inoltre, possono includere stimoli chimici, inseriti nel mezzo di coltura, o anche stimoli elettrici, meccanici o una coltura dinamica piuttosto che statica (tramite l'ausilio di un *bioreattore*).

1.5 Ruolo degli scaffold nell'ingegneria tissutale

1.5.1 Scaffold

Come reso noto in precedenza, gli *scaffold* sono delle impalcature che hanno il compito di andare a mimare idealmente la composizione chimica, le caratteristiche meccaniche e la struttura della ECM del tessuto nativo: in quest'ottica, forniscono un supporto iniziale per l'adesione, la proliferazione e la differenziazione delle cellule fino alla formazione della ECM.

I requisiti più importanti degli scaffold sono:

- ✓ Proprietà meccaniche: simili a quelle del tessuto del sito di impianto
- ✓ Biodegradabilità: degradazione a contatto con i fluidi biologici
- ✓ Biorisassorbibilità: i prodotti della degradazione devono essere riassorbibili dall'organismo
- ✓ Biomimeticità: al fine di minimizzare la risposta infiammatoria e favorire una determinata integrazione del costruito
- ✓ Bioattività: deve avere un'opportuna chimica superficiale al fine di garantire l'adesione cellulare
- ✓ Biocompatibilità: i prodotti rilasciati in fase di degradazione non devono essere tossici ¹³

Inoltre, i ruoli fondamentali di uno scaffold (a seconda delle applicazioni) possono ricondursi ai seguenti:

- Facilitano e regolano determinati processi cellulari (tra cui sintesi e migrazione)
- Rinforzano strutturalmente eventuali difetti al fine di mantenerne la forma, prevenendo una distorsione circostante del tessuto
- Rigenerano un tessuto, sia che lo si impianti con, sia senza cellule
- Fungono da barriera per impedire ad altre cellule di penetrare nella regione che si deve rigenerare
- Servono come veicoli di rilascio per GF, geni o cellule

A livello compositivo, la maggior parte degli scaffold attualmente utilizzati sono polimeri, ceramici e compositi e possono essere iniettabili o rigidi (da impiantare direttamente nel sito desiderato). Per quanto concerne i ceramici e i compositi, tipicamente il loro utilizzo maggiore è in ambito ortopedico ¹⁹; tuttavia, non presentano le medesime caratteristiche peculiari dei polimeri, soprattutto perché difficilmente processabili e con gradi di biodegradabilità evidentemente minori.

Pertanto, per la progettazione degli scaffold, si tende preferibilmente a scegliere *polimeri* che siano biodegradabili e biorisorbibili, in quanto:

- non necessitano una rimozione mediante operazioni
- offrono un supporto temporaneo per la rigenerazione tissutale
- possono essere degli importanti carrier nel caso di rilascio controllato di farmaci

Oltre a queste caratteristiche, è necessario cercare di garantire il più possibile la biocompatibilità, la sterilità e la atossicità (sia iniziale, sia dei prodotti di degradazione).

I polimeri sono macromolecole ad elevato peso molecolare e si possono dividere in base alla provenienza in due macro categorie principali: **naturali** e **sintetici**.

1.5.1.1 Polimeri naturali

Una parte di essi sono derivanti da fibrina, acido ialuronico e collagene; mostrano una buona biocompatibilità, osteoconduttività e bassa immunogenicità. Tuttavia, offrono poca stabilità dal punto di vista meccanico. Andando a citare alcuni esempi di polimeri naturali ¹³, vi sono:

- *Chitosano*: derivante dalla deacetilazione della chitina, ha diversi vantaggi, tra cui le caratteristiche antibatteriche (legate alla presenza di gruppi amminici protonati); è utilizzato ad ampio spettro grazie al suo basso costo
- *Alginato*: utilizzato spesso per la formazione di idrogel in quanto presenta nella sua struttura diversi gruppi carbossilici; tuttavia, non essendo bioattivo viene spesso usato in combinazione con altri polimeri
- *Collagene*: proteina sintetizzata dai fibroblasti ed altri tipi di cellule; è il componente principale dei tessuti umani e ha funzione di supporto meccanico, controllo dell'adesione e della migrazione cellulare; inoltre, è facilmente modificabile a livello chimico, biodegradabile e biocompatibile, però per essere usato come scaffold ha bisogno di essere processato (da solo non possiede le caratteristiche adatte)
- *Gelatina*: è un derivato del collagene, può essere ottenuta attraverso trattamenti in soluzione acida o alcalina, che tendono a denaturare il collagene e degradarlo parzialmente. Alla fine di questo processo, la gelatina conserva la biocompatibilità e la presenza di sequenze peptidiche di adesione per le cellule, inoltre ha un costo basso perché viene isolata da tessuti animali di scarto. A differenza del collagene, la gelatina è direttamente solubile in acqua a pH fisiologico: pertanto, in questo caso, è necessaria e fondamentale la fase di reticolazione, altrimenti il materiale tenderebbe a sciogliersi in ambiente acquoso
I processi che permettono di passare da collagene a gelatina portano a due tipi diversi di gelatina e tale diversità riguarda sia la fonte, sia le condizioni di processo coinvolte:
 - ✓ Gelatina di tipo A: derivazione da pelle porcina, soluzione acida a contatto con il collagene per poche ore (10-48h)
 - ✓ Gelatina di tipo B: derivazione da tessuto bovino, soluzione alcalina a contatto con il collagene per tempi lunghi (30-100 giorni)

1.5.1.2 Polimeri sintetici

Presentano diversi vantaggi in quanto sono facilmente degradabili e offrono migliori proprietà meccaniche rispetto ai corrispettivi naturali; inoltre, posso essere caricati negativamente favorendo l'attecchimento cellulare ed hanno un costo più ridotto, oltre che una maggiore durata. D'altro canto, però, hanno una minore capacità di interazione con le cellule rispetto ai polimeri naturali (i quali possiedono migliori proprietà biologiche). I polimeri sintetici più utilizzati in ambito biomedico sono ¹³:

- *PGA – acido poliglicolico*: è un polimero idrofilo, adatto a produrre fibre; è molto rigido, presenta
- *PLA – acido polilattico*: scarsamente idrofilo, ma comunque più idrofobico del PGA; esiste in due forme enantiomeriche (L-D) ed ha buona resistenza meccanica
- *PEG – polietilenglicole*: ha un peso molecolare generalmente inferiore a 40000 Da, per pesi maggiori viene chiamato PEO (polietilenossido); è altamente idrofilico e solubile in acqua, spesso adoperato come polimero per rivestimenti antifouling (evita l'adesione delle proteine)
- *Poli(idrossialcanoati) – PHB*: polimero prodotto da fermentazione batterica di carboidrati, da parte di microrganismi; nello specifico, il PHB è un semicristallino con elevata velocità di cristallizzazione, presenta caratteristiche tendenzialmente idrofobiche
- *PU – poliuretani*: sono copolimeri lineari a blocchi che contengono il legame uretanico; la loro sintesi avviene mediante l'unione di diisocianato e macrodiolo: a questo prepolimero si aggiunge successivamente un estensore di catena che può essere un diolo o una diammina; in genere, sono costituiti da segmenti hard (più rigidi) e segmenti soft (meno rigidi) e di conseguenza le proprietà meccaniche dei PU dipenderanno dalla quantità e dalla presenza di tali segmenti
- *PCL – policaprolattone*: polimero tendenzialmente idrofobico, ma idrolizzabile grazie alla presenza del gruppo estereo; è un materiale semicristallino, non tossico, con buone caratteristiche di biocompatibilità ed elevata stabilità termica. La degradazione è lenta e tipicamente avviene in bulk, per idrolisi

1.5.2 Matrice extracellulare

La matrice extracellulare (ECM) è una rete organizzata di materiali extracellulari che sono presenti nelle vicinanze della membrana plasmatica ed assume un ruolo fondamentale nel determinare la forma e le attività di una cellula ¹.

Essa consiste essenzialmente di un insieme di fibre proteiche insolubili, glicoproteine adesive e complessi solubili formati da polimeri di carboidrati uniti a molecole proteiche (*proteoglicani* e *glicosaminoglicani*), capaci di legare molecole di acqua ²⁰. Inoltre, distribuisce gli stress meccanici sui tessuti e fornisce lo stroma alle cellule in essa contenute, andando a formare una rete alla quale esse aderiscono e sulla quale possono muoversi.

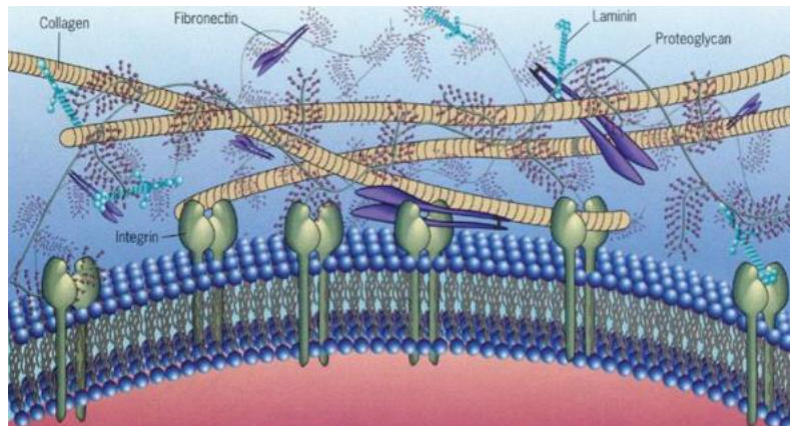


Fig. 11: Schema compositiva della matrice extracellulare ²⁰

La ECM si divide in:

- *Proteine fibrose* = anche dette proteine strutturali, di questa famiglia fanno parte collagene ed elastina; le fibre di collagene tendono a conferire maggior resistenza a trazione, pur mantenendo un'integrità biologica e strutturale per la ECM, mentre le fibre di elastina presentano proprietà elastiche di deformazione
- *Eteropolisaccaridi* = di essi fanno parte i proteoglicani e i glicosaminoglicani (GAGs): i primi sono delle macromolecole composte da un asse proteico principale che presenta legami covalenti con lunghe catene di disaccaridi e GAGs; i proteoglicani presenti in matrice, a loro volta, si associano non covalentemente (e in gran numero) ad una singola molecola di acido ialuronico. I GAGs invece sono lunghe catene lineari idrofile formate da unità disaccaridiche che continuano a ripetersi in ordine determinato
- *Proteine adesive* = le principali proteine appartenenti a questa categoria sono la fibronectina e la laminina; queste proteine hanno un ruolo di mediazione, in particolare della connessione che si ha tra cellule tissutali e matrice
- *Liquido interstiziale* = è la componente principale della ECM, nello specifico costituisce il 70% del totale. È una soluzione prevalentemente acquosa presente fra le cellule di un tessuto ed è strettamente legata alla vicinanza di vasi sanguigni e vasi linfatici: a tal proposito, la funzione primaria è quella di mediare gli scambi tra le componenti cellulari dei vasi sanguigni e le cellule di un determinato tessuto ²¹

1.5.2.1 Matrice extracellulare polmonare

La matrice extracellulare del polmone, fornendo supporto strutturale alle cellule, è fondamentale nella regolazione dell'organogenesi dello sviluppo, dell'omeostasi e risposte di riparazione dei danni. La composizione e la funzione dell'ECM polmonare si alterano notevolmente nel rimodellamento tissutale patologico: in riferimento a ciò, le terapie basate sulla ECM e gli approcci di bioingegneria rappresentano nuove strategie promettenti per la rigenerazione e la riparazione del polmone e il trattamento delle malattie polmonari croniche ²².

Tipicamente, l'ECM nel polmone è limitata a due compartimenti fondamentali: le *membrane basali* e gli *spazi interstiziali*. Le prime sono strati sottili e specializzati di ECM che si trovano sotto tutti gli strati di cellule epiteliali ed endoteliali, mentre gli spazi interstiziali vanno a formare il parenchima del polmone. Il tipo di cellule più comunemente identificato all'interno dell'interstizio polmonare sono i fibroblasti (principali responsabili della produzione di ECM) che servono anche come cellule effettrici durante la riparazione delle lesioni ²².

Tra le malattie croniche progressive più influenti, di causa attualmente sconosciuta, vi è la *fibrosi polmonare idiopatica (IPF)*: è caratterizzata da un'eccessiva formazione e deposizione di ECM, che comporta l'annullamento della struttura originale fisiologica dell'organo, e da un'ingente formazione di fibroblasti sottoforma di cluster ²³. Secondo alcune evidenze presenti in letteratura, in particolare effettuando prove *in vivo*, si è riscontrato come la presenza di una matrice extracellulare danneggiata vada ad alterare e modificare le condizioni di alcuni tipi di cellule, in particolare epiteliali e mesenchimali.

Nel complesso, i dati attuali presenti in letteratura suggeriscono che l'ECM polmonare contribuisce attivamente sia allo sviluppo polmonare di tessuto sano, sia in condizioni patologiche ²⁴; negli ultimi anni si sta cercando di promuovere nuove terapie mirate al fine di affrontare e migliorare tali malattie, come ad esempio l'approvazione di determinati farmaci a scopo terapeutico.

1.6 Elettrospinning: processo e produzione di membrane elettrofilate

Tra i metodi di fabbricazione più importanti, come tecnica di tipo convenzionale per favorire il processamento dei polimeri vi è senza alcun dubbio l'*elettrospinning*; si divide principalmente in due sottocategorie:

- *Solution elettrospinning*: vengono impiegate soluzioni polimeriche in solvente volatile
- *Melt elettrospinning*: in questo ambito si tratta il fuso polimerico

Attraverso questo processo si riescono a produrre nanofibre polimeriche (con lo scopo di andare a mimare la ECM in vivo) usando un sistema di guida elettrostatica che consenta una loro deposizione controllata su di un substrato; si generano quindi sistemi con percentuali di porosità molto alte, ma con pori piccoli ²⁵.

Questa tecnica si realizza applicando un campo elettrico ad alto voltaggio ad un capillare (solitamente è un ago di una siringa), dotato di un ugello di dimensione millimetriche, che è riempito con il polimero sciolto in un solvente (*solution electrospinning*) ²⁶. Le fibre che attraversano il campo elettrico sono poi raccolte su un collettore. Al netto di ciò, i componenti fondamentali dell'elettrospinning sono essenzialmente i seguenti:

- **Siringa** = contiene la soluzione polimerica
- **Pompa** = genera il flusso di soluzione polimerica in uscita dalla siringa stessa
- **Generatore di tensione** = genera la differenza di potenziale tra l'ugello e il collettore
- **Collettore metallico** = raccoglie le fibre elettrofilate

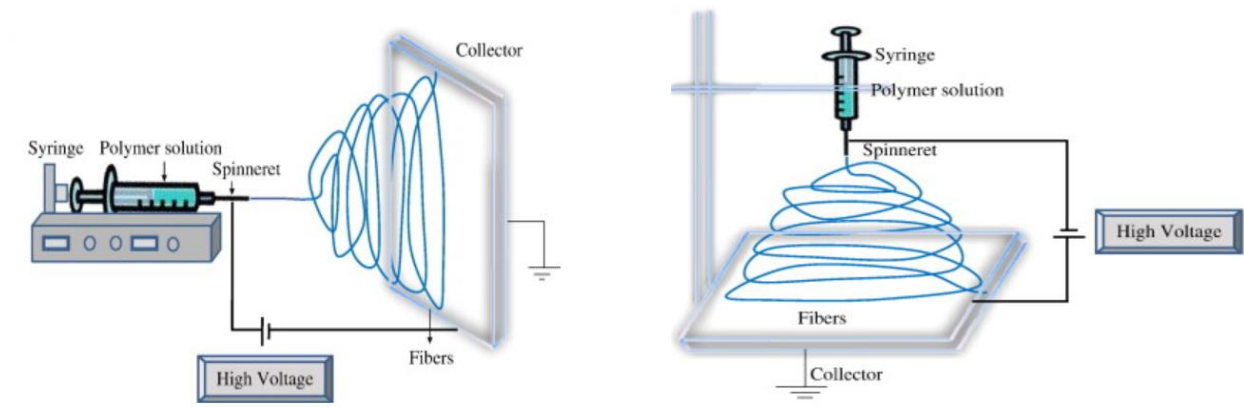


Fig. 12: Rappresentazione in configurazione orizzontale (a sinistra) e verticale (a destra) di un elettrospinning

Si può operare in due configurazioni: nella *configurazione orizzontale* la struttura si sviluppa sullo stesso piano dove alla fine si trova il collettore; invece, in *configurazione verticale* la siringa è orientata verso il basso e il collettore si trova sotto.

Andando a dettagliare il sistema, seguendo ad esempio la configurazione orizzontale sopra riportata, si può notare come la pompa tenda a spingere la soluzione polimerica tramite l'azione di un pistone all'interno della siringa e da quest'ultima la soluzione stessa verrà espulsa dall'ugello; focalizzandosi sul sistema di eiezione, si evidenzia come la soluzione polimerica in uscita venga sottoposta ad un campo elettrico mediante un generatore di tensione continua: vi è un elettrodo positivo (posto all'altezza dell'ugello) per cui si carica positivamente il getto in uscita. Inizialmente, tale getto esce con il medesimo diametro dell'ago, ma poi nel campo elettrico tende ad assottigliarsi di volta in volta a formare una zona conica (*cono di Taylor*: all'aumentare dell'intensità del campo elettrico la superficie emisferica del fluido alla cima del capillare tende ad allungarsi a forma conica). Successivamente vi è una *zona di instabilità*: in questa fase il getto inizia a barcollare descrivendo traiettorie circolari e curva in un crescendo di spirali. Mentre i cerchi si allargano, i diametri diventano sempre più sottili. Infine, si ha la raccolta delle fibre su di un collettore, il quale può essere di diversi tipi (a seconda delle applicazioni):

- Cilindro rotante
- Due aste metalliche parallele
- Due anelli equidistanti dalla filiera e paralleli tra loro

In tutti i casi questi sistemi di raccolta producono delle fibre orientate ^{19 27}.

Come ogni sistema, anche l'elettrospinning è un processo che necessita di essere ottimizzato; infatti, è molto variabile e tale variabilità dipende sostanzialmente da due macro-categorie di parametri: *parametri di sistema* e *parametri di processo*. I primi sono legati al tipo di materiale che si va a trattare e contemporaneamente si hanno anche le proprietà della soluzione (per cui si ha dipendenza dal solvente e dal polimero), mentre i parametri di processo fanno riferimento alle variazioni che riguardano le specifiche del macchinario ¹⁹.

PARAMETRI DI SISTEMA	PARAMETRI DI PROCESSO
Distribuzione pesi molecolari	Potenziale elettrico
Struttura del polimero (lineare, ramificato)	Distanza capillare-collettore
Proprietà della soluzione (concentrazione, viscosità, tensione superficiale, conduttività)	Flusso della soluzione polimerica
	Parametri ambientali (temperatura, umidità, velocità dell'aria nella camera)
	Movimentazione dello schermo di raccolta

Tab. 2: Riferimento ai parametri di sistema e di processo dell'elettrospinning

1.6.1 Parametri di sistema

Parametri di sistema riferiti alle proprietà della soluzione:

- *Concentrazione* = è presente una concentrazione minima al di sotto della quale si instaura un processo differente da quello di elettrospinning, noto come “electrospray” (in cui, invece di fibre, vengono generate delle sferette) ed una concentrazione massima oltre la quale la soluzione è eccessivamente viscosa per poter garantire un processo continuo; la concentrazione della soluzione determina i limiti per la formazione di fibre elettrofilate a causa delle variazioni di viscosità e tensione superficiale ²⁰
- *Viscosità* = andando a considerare viscosità troppo basse non si riescono a formare fibre continue, mentre a viscosità troppo elevate il getto polimerico ha difficoltà a generarsi: è necessario che vi sia una viscosità ottimale
- *Tensione superficiale* = questo parametro dipende prevalentemente dal solvente. Andando a diminuire la tensione superficiale, generalmente, si riduce la formazione di fibre con difetti ²⁰. D'altra parte, ad elevata tensione superficiale il getto è instabile e si possono formare difetti, come gocce o beads
- *Conduttività* = ha una dipendenza multipla: dal polimero, dal solvente e dalla presenza di sali in soluzione. Al crescere della conduttività generalmente il diametro delle fibre decresce, se però la conduttività è eccessivamente bassa, non si formano fibre continue ma fibre con difetti. Tuttavia, le soluzioni eccessivamente conduttive sono instabili in campi elettrici intensi e la regione di instabilità è molto marcata, portando a fibre con diametri molto disomogenei ^{19 21}

Parametri di sistema riferiti alle proprietà del polimero:

- *Peso molecolare*: influenza la viscosità, la tensione superficiale, la conduttività e la resistenza dielettrica. Generalmente i polimeri più facilmente filabili hanno un alto peso molecolare, mentre i polimeri a basso peso molecolare tendono a formare difetti. Un alto peso molecolare aumenta infatti le interazioni intercatena e causa maggiori “attorcigliamenti” fisici di catena (*entanglements*) che contribuiscono a stabilizzare il getto polimerico. Inoltre, maggiore è il peso molecolare del polimero e maggiore è il diametro delle fibre

- *Struttura del polimero*: un polimero a struttura lineare è più facilmente filabile, a seguito delle maggiori interazioni intercatena ¹⁹

1.6.2 Parametri di processo

- *Voltaggio*: esiste un voltaggio minimo al di sopra del quale le fibre possono formarsi. Aumentando il voltaggio al di sopra della soglia minima, le fibre mostrano inizialmente diametri progressivamente minori ¹⁹ (in quanto crescono le forze repulsive all'interno del getto che ne favoriscono l'assottigliamento). È stato evidenziato come ad alti voltaggi sia possibile avere un aumento dei diametri causato dalla maggiore quantità di getto eiettata
- *Flusso*: influenza la velocità del processo. A bassi flussi, il processo è più lento e ciò consente l'evaporazione del solvente prima che le fibre raggiungano il collettore. Se il flusso è eccessivo, si ottengono fibre con difetti. Il diametro delle fibre e i pori delle membrane elettrofilate crescono al crescere del flusso
- *Distanza della punta dal collettore*: esiste una distanza minima al di sotto della quale le fibre non possono formarsi perché il solvente non ha tempo di evaporare, in questo caso si formerebbero difetti superficiali ²¹

1.6.3 Difetti di filatura

Tuttavia, all'interno di queste membrane nanofibrose elettrofilate è possibile riscontrare la presenza di determinati difetti di filatura, in particolare:

- *Beads*: sono dovuti ad alcuni rigonfiamenti delle fibre; questa forma a "pallone collassato" è indice di un'evaporazione del solvente lenta, che è avvenuta solo dopo la deposizione sul collettore. In quest'ottica, quando il filo contatta il collettore non è ancora completamente secco
- *Nastri*: in questo caso le fibre ancora ricche di solvente collassano su sé stesse perdendo la geometria cilindrica
- *Difetti superficiali*: presenza di difetti in superficie che si possono vedere mediante immagini al SEM e che, al fine di essere ridotti, necessitano di un'ottimizzazione dei parametri ¹⁹

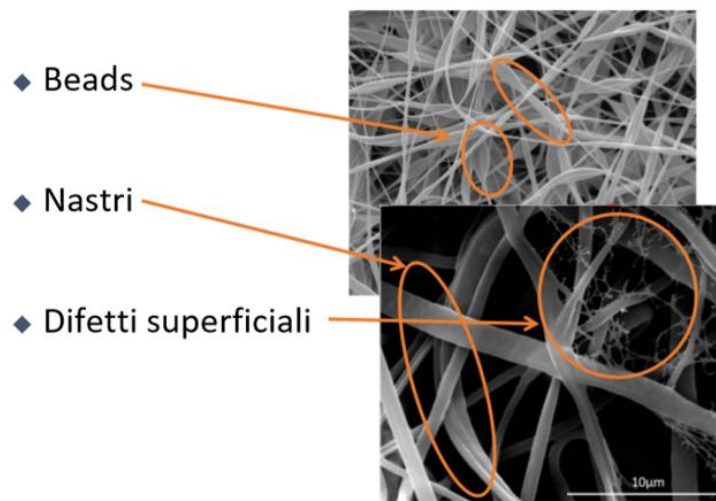


Fig. 13: Rappresentazione grafica dei difetti di filatura riscontrabili nell'elettrospinning

1.6.4 Materiali sottoposti ad elettrospinning

È stata utilizzata un'ampia gamma di polimeri mediante questa tecnica, al fine di realizzare scaffold per diverse applicazioni. Come già precedentemente accennato, i materiali possono essere di origine naturale o sintetica: tuttavia, negli ultimi anni l'idea è stata quella di proporre dei materiali ibridi che potessero concentrare al loro interno i vantaggi sia dei polimeri naturali, sia dei sintetici. Nello specifico, questa tipologia di polimeri viene definita *bioartificiale*: consiste quindi nell'accostamento, tipicamente, di un polimero sintetico e di uno naturale, al fine di ottenere uno scaffold che racchiuda ottime componenti dal punto di vista meccanico (proprietà cardine dei polimeri sintetici) e che al contempo mantenga le caratteristiche naturali dei componenti fisiologici (dove ciò garantirebbe una miglior biomimetici   al sistema).

Grazie soprattutto ai loro profili di biocompatibilit  ,    stato dimostrato come i polimeri naturali elettrofilati promuovano con successo l'adesione, la migrazione e la proliferazione cellulare. Tuttavia, da soli non riescono a raggiungere le caratteristiche meccaniche desiderate, non essendo in grado di mantenere la loro integrit   strutturale e il rigonfiamento in ambiente acquoso: per questo motivo, infatti, mediante l'elettrofilatura di polimeri sintetici    possibile acquisire queste caratteristiche mancanti.

1.6.4.1 Membrane PCL-gelatina

Tra le varie possibilit   che vi sono in letteratura, un costruito bioartificiale che ben ricapitola le caratteristiche della membrana basale del polmone (nell'ambito della mimesi della barriera alveolo-capillare)    costituito dal blend tra PCL e gelatina.

- *PCL*: polimero semicristallino tendenzialmente idrofobico, ma idrolizzabile grazie alla presenza del gruppo estereo; non    tossico ed    biocompatibile, inoltre presenta una elevata stabilit   termica (per questo motivo    molto utilizzato nelle applicazioni biomedicali) ¹³;
- *Gelatina*:    un derivato del collagene, si pu   ottenere mediante trattamenti in soluzione acida o soluzione alcalina (che denaturano o degradano parzialmente il collagene) ¹³; la

gelatina tende quindi a conservare le caratteristiche di biocompatibilità ed anche la presenza di sequenze peptidiche di adesione per le cellule, oltre ad avere un costo non molto elevato. È direttamente solubile in acqua a pH fisiologico

Di spiccato interesse in questo contesto vi è lo studio di N. Higuita-Castro et al.²⁸, in cui sono stati prodotti quattro differenti tipi di matrici usando diversi rapporti PCL/gelatina e tre di questi (PCL 100%, 75-25 e 50-50 PCL-gelatina) sono stati soggetti ad allungamento meccanico monoassiale, effettuando delle prove di trazione; la robustezza delle nanofibre è stata modulata con successo andando a variare la composizione del blend polimerico: i test di trazione hanno evidenziato come l'aggiunta di gelatina al blend moduli significativamente la relazione sforzo-deformazione, in particolare l'aumento di gelatina riduce il modulo elastico delle reti fibrose. In aggiunta a ciò, la dimensione delle fibre tende ad incrementare significativamente in proporzione al contenuto di gelatina e la morfologia delle fibre cambia anche in dipendenza dalla concentrazione della gelatina stessa, dove l'uso di maggiori concentrazioni di quest'ultima produce fibre con una struttura più simile ad un nastro, viceversa l'incremento della concentrazione di PCL porta ad una struttura con filamenti più densi.

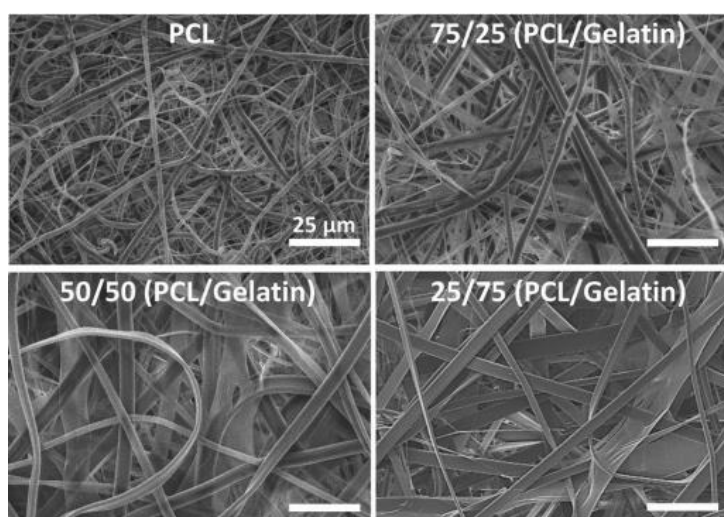


Fig. 14: Distribuzione delle fibre elettrospinnate considerando diversi rapporti PCL-gelatina²⁸

1.7 Bioreattori per applicazioni di modelli *in vitro*

Per definizione, un bioreattore è un dispositivo in cui processi biologici e/o biochimici si sviluppano in condizioni ambientali e operative strettamente controllate e monitorate. I parametri caratteristici che vengono controllati sono (tra i tanti) il pH, la temperatura, la concentrazione di gas, i nutrienti, la rimozione degli scarti e gli stimoli fisici¹⁵.

Grazie a questi dispositivi è possibile migliorare e superare le limitazioni associate alle colture bidimensionali statiche, specialmente in quanto è possibile avere condizioni di coltura tridimensionali e dinamiche (in termini di perfusione dei flussi), e l'ambiente di coltura rimane monitorato e controllato in maniera autonoma; tutto ciò consente di migliorare l'efficienza dei processi, mediante protocolli che siano sicuri, riproducibili, scalabili e standardizzati¹⁴.

Nell'ambito delle applicazioni dei modelli *in vitro*, le tecnologie basate sui bioreattori costituiscono un approccio ottimale per il mantenimento di colture tridimensionali a lungo termine e delle caratteristiche simil-fisiologiche presenti nel corrispettivo ambiente *in vivo*.

Ad esempio, tra i vari esempi presenti in letteratura vi è lo sviluppo di modelli epatici *in vitro*, per diverse applicazioni: modellizzazione delle malattie epatiche, comprensione della fisiologia del fegato e valutazioni di drug screening ²⁹. In questo contesto, la coltura degli epatociti all'interno dei bioreattori è garantita dal controllo e dal monitoraggio dei parametri di coltura (pH, temperatura ed ossigeno), in modo che le cellule siano in condizioni ottimali per favorire la loro riproducibilità ²⁹.

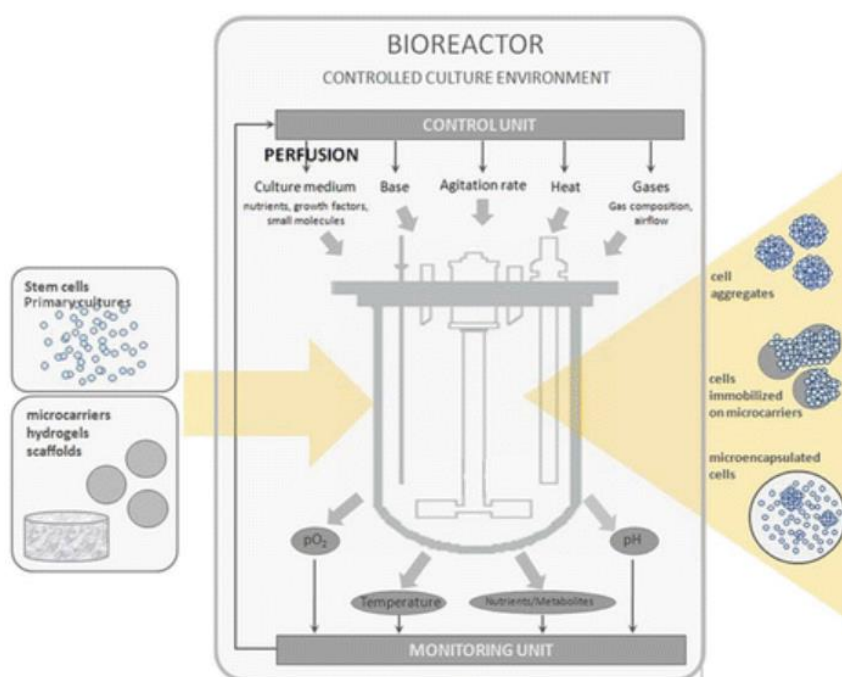


Fig. 15: Rappresentazione schematica del bioreattore a serbatoio agitato (STB) utilizzato nel lavoro di Rebelo et al. ²⁹. Nell'illustrazione sono presenti le principali caratteristiche di tale bioreattore, su tutte la scalabilità e la riproducibilità, che consentono la produzione di grandi numeri di cellule

Sono presenti, inoltre, innumerevoli lavori in letteratura che fanno riferimento all'utilizzo di bioreattori per modelli polmonari: nel progetto sviluppato da Petersen et al. ³⁰, è stato progettato e validato un bioreattore per la coltura *in vitro* di un intero tessuto polmonare di roditori. Tale bioreattore è stato validato al fine di fornire un apporto nutritivo e una stimolazione meccanica che possano supportare la sopravvivenza e la differenziazione cellulare nel tessuto polmonare in coltura

³⁰.

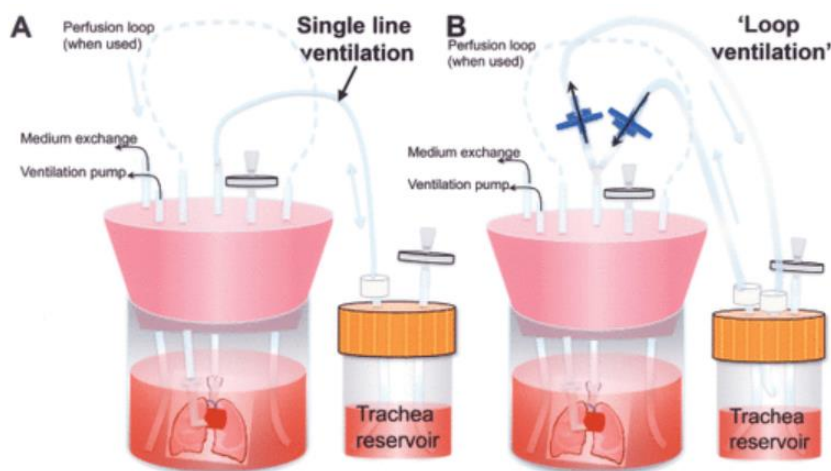


Fig. 16: diagrammi schematici del bioreattore validato nel lavoro di Petersen et al.; il polmone è contenuto all'interno del bioreattore principale, insieme alla presenza di cannule nella trachea e nell'arteria polmonare.

- A. **Ventilazione a linea singola**: durante la fase di ventilazione il mezzo segue il medesimo percorso dentro e fuori il polmone; B. **Ventilazione ad "anello"**: il mezzo segue un percorso diverso durante la fasi di inspirazione ed espirazione, fornendo medium fresco ad ogni nuova fase di respirazione ³⁰

È stato dimostrato come questo bioreattore sia in grado di replicare gli aspetti più importanti del corrispettivo ambiente *in vivo*. Durante la fase di ventilazione ad "anello", le condizioni di coltura di polmone nativo per 7 giorni hanno consentito di mantenere la sopravvivenza cellulare ed anche il fenotipo sia endoteliale, sia epiteliale. Inoltre, la possibilità di effettuare una coltura dell'intero tessuto polmonare in laboratorio fino ad una durata di 7 giorni, potrebbe favorire molteplici studi a livello della fisiologia polmonare che non erano possibili in precedenza ³⁰.

Un ulteriore studio rilevante di modello polmonare *in vitro* è stato condotto da Doryab et al. ³¹, in cui si valutano gli effetti particocinetici di micro e nanoparticelle (NP) in condizioni di allungamento ciclico e di interfaccia ALI. Spesse volte nell'aria sono presenti particelle sospese di polveri di sigarette, agenti patogeni o polveri urbane, che possono causare malattie a livello polmonare (ad esempio, asma o broncopneumopatia cronica ostruttiva): in particolare, è stato dimostrato come le NP con diametri tra 100 e 300 nm tendano a subire la traslocazione epiteliale-endoteliale, rischiando quindi di immettersi nella circolazione sanguigna e finire, di conseguenza, in altri organi ³¹.

Questo modello polmonare *in vitro* è stato sviluppato con lo scopo di esercitare un allungamento meccanico ciclico alle cellule (in modo tale da mimare le medesime condizioni indotte dalla respirazione nell'ambiente *in vivo*) e la configurazione ALI fornisce condizioni più simil-fisiologiche, favorendo la polarizzazione delle cellule e la secrezione di tensioattivo (condizioni che non è possibile verificare in configurazione di interfaccia liquido-liquido, LLI) ³¹.

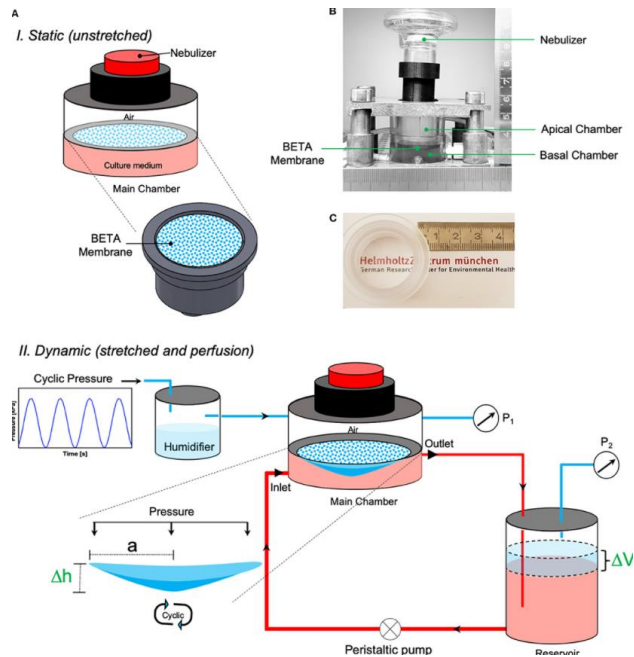


Fig. 17: diagrammi schematici del bioreattore sviluppato nel lavoro di Doryab et al.; il sistema è stato definito CIVIC, acronimo di “Cyclic in vitro cell stretched”.

A. Rappresentazione schematica del sistema CIVIC in condizioni statiche non stirate (in alto, I.) e dinamiche, con allungamento e perfusione (in basso, II.) con il sistema di monitoraggio della deformazione ciclica basato sulla pressione; la membrana BETA permeabile ed estensibile, posizionata nella camera principale, separa il compartimento apicale dal basale; B. Istantanea della camera principale del bioreattore CIVIC; C. Fotografia della membrana BETA posizionata sull’holder: è trasparente, favorendo così applicazioni dirette di imaging cellulare ³¹

Sono stati effettuati degli studi sulla membrana BETA, in cui si evidenzia come le cellule epiteliali A549 siano cresciute sulla membrana in 4-5 giorni andando a formare un monostrato confluyente che ha portato alla formazione di E-caderine (proteine di adesione transmembranali), che hanno un ruolo fondamentale nelle interazioni cellula-cellula. Inoltre, le cellule hanno mostrato un’interazione maggiore ed una miglior integrazione con la membrana BETA, rispetto ad un inserto transwell ³¹.

Successivamente, è stato valutato l’assorbimento cellulare e il trasporto transepiteliale di NP sotto allungamento meccanico ciclico fisiologico, applicato per 2h: in questo contesto, l’attività metabolica delle cellule non ha mostrato evidenze di ridotta vitalità dovuta a condizioni di esposizione di NP (mediante aerosol). Infine, in questo studio, è stato evidenziato come lo stiramento ciclico fisiologico condotto dal bioreattore CIVIC tenda a migliorare significativamente l’assorbimento di NP di dimensioni tra 100 e 300 nm e la loro traslocazione attraverso la barriera alveolo-capillare ³¹.

1.8 Scopo del lavoro

L’obiettivo di questo lavoro è quello di implementare un sistema dinamico, all’interno del bioreattore *LiveBox2* (IVTech S.r.l), che sia in grado di ricreare la stimolazione fisiologica del tessuto

che compone l'alveolo polmonare. Il sistema ingegnerizzato ha l'obiettivo di stimolare ciclicamente una membrana elettrospinnata a base di PCL-gelatina, al fine di mimare la composizione e la morfologia del tessuto e la fisiologia della respirazione polmonare.

L'azienda IVTech ha sviluppato un prototipo per la stimolazione della membrana all'interno del loro bioreattore commerciale *LiveBox2* che permetta di movimentare la membrana in modo da mimare il movimento respiratorio. Durante questa tesi si è valutata la capacità del prototipo sviluppato da IVTech di generare una sovrappressione costante sulla membrana, utilizzando come modello iniziale una membrana commerciale in polietilentereftalato (PET) con porosità pari a $0,45\ \mu\text{m}$.

Più in dettaglio, Il sistema *LiveBox2* viene implementato in configurazione ALI, al fine di poter rappresentare nella maniera più fisiologica possibile il corrispettivo ambiente *in vivo* (ricreando quindi la condizione di flusso d'aria nel comparto superiore e di flusso sanguigno in quello inferiore). Infine, come già accennato in precedenza, la presenza della pompa peristaltica *LiveFlow* associata al bioreattore *LiveBox2* consente di compiere delle valutazioni in dinamico e superare i problemi associati alle colture bidimensionali e statiche.

Al fine di migliorare la biomimeticità del modello sperimentale, la membrana commerciale sarà sostituita con una membrana ingegnerizzata *ad hoc* a base di policaprolattone (PCL) e gelatina (GL). In questo lavoro di tesi si sono validate le caratteristiche biologiche della membrana prodotta mediante elettrospinning tramite una co-coltura di cellule epiteliali (*A549*) ed endoteliali (*HULEC-5a*), rispettivamente sul lato superiore e inferiore della membrana (di conseguenza, le cellule epiteliali saranno esposte sul comparto apicale, viceversa le endoteliali sul comparto basale).

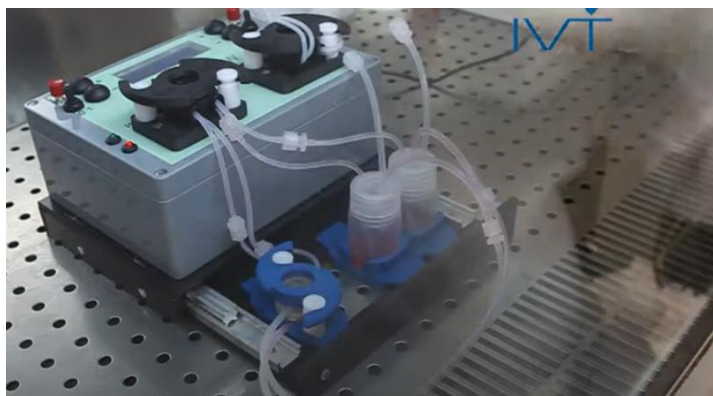


Fig. 18: Connessione del circuito completo, LB2 e LF²³

MATERIALI E METODI

2.1 Materiali

2.1.1 Bioreattore LiveBox2

IVTech è un'azienda biotecnologica italiana che produce camere di coltura cellulare avanzate per perfezionare modelli *in vitro*; i sistemi costruiti consentono un aggiornamento significativo dei classici test *in vitro*, al fine di rappresentare meglio l'ambiente *in vivo* e le condizioni simil-fisiologiche. Inoltre, questi sistemi avanzati di coltura cellulare consentono di essere utilizzati per eseguire modelli dinamici 3D *in vitro*, seguendo i protocolli standard. La strategia IVTech è quella di offrire la tecnologia attraverso una rete di distributori e offrire dei servizi di supporto a livello di design ingegneristico dell'esperimento legati allo sviluppo di modelli matematici, piuttosto che la simulazione dell'ambiente fluidodinamico per la valutazione a priori dei parametri corretti (a livello di flusso, per esempio) da utilizzare per simulare il caso reale. È anche possibile offrire come servizio lo sviluppo biologico di un modello *in vitro* ³².

Tra i moduli di maggior interesse forniti dall'azienda vi è *LiveBox2 (LB2)* ²³, il quale può essere utilizzato per imitare le barriere fisiologiche (quali ad esempio polmone, pelle, epiteli intestinali) in condizioni dinamiche o per mantenere gli sferoidi in condizioni di galleggiamento. A livello compositazionale, l'area della membrana che si inserisce nell'holder del bioreattore (andando a considerare come diametro $d=25$ mm, misura indicata da specifiche IVTech) è di 4.91 cm^2 .

Di seguito sono riportati, rispettivamente, il bioreattore e la pompa peristaltica associata (entrambi di produzione IVTech).



Fig. 19: LiveBox2 (LB2) ²³



Fig. 20: LiveFlow (LF) ²³

Andando a dettagliare *LB2*:

- Consiste di una camera trasparente che permette di modellare le barriere biologiche, tra cui la barriera alveolo-capillare
- In questo sistema è possibile effettuare una co-coltura: tale sistema è infatti costituito da due camere (apicale e basale) in cui è possibile effettuare la coltura di diverse linee cellulari

- Strutturalmente è progettato per colture cellulari dinamiche interconnesse ed è dotato di una doppia entrata ed una doppia uscita per il flusso di medium, oltre che ad un supporto (holder) in cui alloggiare una membrana porosa
- Vi è la possibilità di utilizzo in una doppia configurazione:
 - ✓ *Air-liquid interface (ALI)* = con questa configurazione e grazie all'utilizzo di uno specifico modulo è possibile effettuare colture in due condizioni differenti, nelle due camere del bioreattore: a livello apicale vi è aria, a livello basale invece mezzo di coltura; attraverso il modulo ALI si è in grado di sostituire una parte nel comparto superiore della camera LB2 e consentire inoltre di avere un accesso diretto dall'esterno alla stessa. Tra le varie possibilità, nel caso dell'epitelio polmonare, è possibile effettuare una nebulizzazione all'interno della camera utilizzando un nebulizzatore commerciale, in quanto le dimensioni a livello di diametro di questo modulo sono compatibili con le dimensioni commerciali dei diametri dei tubi montati sui nebulizzatori

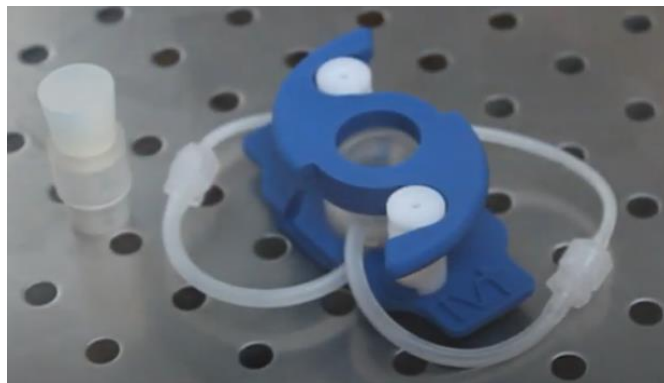


Fig. 21: Rappresentazione del modulo ALI. Il tappo (sulla sinistra) viene inserito direttamente sul lato apicale della camera, consentendo condizioni più favorevoli anche per successive fasi di coltura ²³

- ✓ *Liquid-liquid interface (LLI)* = mediante questa configurazione è possibile avere un flusso di medium nella camera apicale e uno nella camera basale; inoltre, i flussi possono essere differenti tra loro

Volume umido [mL]	2.5
Condizioni dell'interfaccia	ALI, LLI
Diametro della membrana suggerito [mm]	25
Spessore della membrana suggerito [mm]	Fino a 0,1

Tab. 3: Specifiche LiveBox2 ²³

La pompa peristaltica associata a questo sistema è il *LiveFlow* ²³:

- È molto compatta e leggera, presenta un'interfaccia user-friendly ed ha il grande vantaggio di essere compatibile con l'ambiente dell'incubatore
- Per una miglior mimesi di ciò che avviene nell'ambiente *in vivo*, questa pompa peristaltica favorisce un tipo di coltura dinamica, grazie alla continua perfusione del flusso di mezzo di coltura (facilità di ricircolo del medium)
- Ogni testa pompante è rimovibile, sterilizzabile e riutilizzabile
- La pompa peristaltica LF consente di impostare il flusso iniziale del sistema: i range complessivi considerati spaziano tipicamente tra 50 e 500 $\mu\text{L}/\text{min}$

Dimensioni [w × l × h, cm]	21,5 × 16 × 14,5
Alimentazione (tramite cavo fornito)	12 V; 7,2 W
Intervallo di portata [$\mu\text{L} / \text{min}$]	100-450
Peso	1.2 Kg

Tab. 4: Specifiche LiveFlow²³

In questo lavoro di tesi è stata utilizzata una camera LB2 in configurazione leggermente diversa rispetto a quella standard; in base alla camera che si va a considerare (inizialmente basale, successivamente apicale) è presente un tubicino silconico in uscita: questo tipo di assemblaggio favorisce il collegamento tra la camera del bioreattore presa in esame ed il sensore.



Fig. 22: Configurazione del bioreattore con collegamento sporgente dal lato apicale



Fig. 23: Configurazione del bioreattore con collegamento sporgente dal lato basale

2.1.2 Membrane PET 0.45, NY 100 e PCL-Gel

L'azienda IVTech ha fornito un set di membrane in polietilentereftalato (PET, con dimensione dei pori pari a $0,45\ \mu\text{m}$) e Nylon (NY, con pori di $100\ \mu\text{m}$) che presentano un pore size tale da ricapitolare indicativamente i valori più piccoli e più grandi di porosità sviluppati su membrane utilizzate per questi esperimenti: una volta acquisita una serie di dati, si andrà successivamente per interpolazione, ad effettuare misure intermedie alle due.

I risultati ottenuti a partire da tali membrane commerciali saranno sfruttati per effettuare nuove prove utilizzando una membrana biomimetica sviluppata al Politecnico di Torino. La membrana viene fabbricata processando il policaprolattone (PCL) e la gelatina (GL) attraverso la tecnica dell'elettrospinning e consente di ottenere una matrice dalla morfologia e dalla composizione simile a quella dell'ECM; essa presenta, infatti, una struttura nanofibrosa in conformazione random e con pori delle dimensioni di qualche μm . Verrà effettuata eventualmente una verifica rispetto alla regressione lineare valutata sulle membrane in PET e NY.

2.1.3 LivePa



Fig. 24: Rappresentazione del modulatore di pressione LivePa

Il modulo LivePa (LP) è un modulatore di pressione che consente di incrementare localmente la pressione all'interno della camera; questo sistema è formato da un pistone che va a comprimere il tubo di uscita della camera su cui si vuole valutare la differenza pressoria. Questa azione comporta un incremento di pressione all'interno della camera stessa.

Il sistema funziona nel seguente modo:

- In una prima fase è possibile scegliere - mediante il tasto "Browse" - il range di flusso; quest'ultimo, tipicamente, viene preimpostato mediante LF e successivamente (in base al range in cui ricade il flusso scelto) si seleziona il range corrispondente. LivePa consente quattro possibili finestre scelte:
 - 50-90 $\mu\text{l}/\text{min}$

- 100-190 $\mu\text{l}/\text{min}$
- 200-290 $\mu\text{l}/\text{min}$
- 300 o più $\mu\text{l}/\text{min}$
- A questo punto si accede alla selezione della pressione incrementale (p. incr) desiderata, grazie al tasto "Selector". Le possibilità sono le seguenti:
 - "0" = non viene imposto alcun incremento di pressione
 - "0.5" = la pressione viene aumentata del 50%
 - "1" = la pressione viene aumentata del 100%
 - "2" = la pressione viene aumentata del 200%
 - "3" = la pressione viene aumentata del 300%
 - "4" = la pressione viene aumentata del 400%
 - "5" = la pressione viene aumentata del 500%
 - "6" = la pressione viene aumentata del 600%
 - "7" = la pressione viene aumentata del 700%
 - "8" = la pressione viene aumentata dell'800%
 - "9" = la pressione viene aumentata del 900%
 - "10" = la pressione viene aumentata del 1000%

LivePa offre la possibilità di mantenere costante la sovrappressione che viene selezionata, l'attuatore in questa fase non effettua altri movimenti: a livello pratico, c'è anche la garanzia di poter lavorare a LivePa spento, in quanto anche in questa condizione l'attuazione rimarrà costante per tutta la durata dell'esperimento.

2.1.4 Sensore di pressione

Il sensore PX409-USBH-525171 fornito dall'azienda "Omega", è un trasduttore di pressione con uscita USB che consente campionamenti ad alta velocità. Viene equipaggiato con uno specifico connettore metallico e un tubicino in silicone.

È possibile mantenere il sensore sia in posizione verticale, sia orizzontale: entrambe le configurazioni sono valide; tuttavia, in orizzontale vi è la tendenza delle bolle d'aria a rimanere all'interno della parte metallica del sensore, perché è leggermente più grande del tubo (di conseguenza la presenza di bolle potrebbe essere maggiormente favorita, in queste condizioni).



1000 Readings/Second
 Micro-Machined Silicon Sensor
 316L SS Wetted Parts
 High $\pm 0.08\%$ BSL Accuracy
 Excellent Long Term Stability
 USB 2.0 and Below Compatible
 Standard USB Connector Termination
 Shock and Vibration Rated
 Ruggedized with Secondary Containment

2.1.5 Software “Digital Transducer Application”

Il software “Digital Transducer Application” (fornito dall’azienda Omega) è stato utilizzato in questo lavoro di tesi per acquisire i dati relativi alla variazione di pressione all’interno delle camere. Dopo aver effettuato la connessione del sensore al computer tramite cavo USB, la prima interfaccia grafica che si nota presenta quattro schede principali:

- *Configuration* = permette di settare i parametri per il sensore che si va a configurare; per questo esperimento, sono stati impostati i parametri riportati in tabella (Tab. 12):

Campionamento	10 campioni/s
Rate di frequenza	10 Hz
Unità di misura ingegneristica	kPa

Tab. 6: parametri impostati sul software Digital Transducer Application

- *Channels* = permette di monitorare in tempo reale i dati di ogni sensore che viene collegato, in un unico screen. Oltre al valore attuale che viene misurato di volta in volta, sempre nella stessa schermata vengono riportati il valore massimo e minimo misurati fino a quell’istante, così come l’unità di misura scelta precedentemente in fase di configurazione del sistema
- *Charting* = permette di visualizzare e valutare graficamente in *real time* i dati che vengono acquisiti dal sensore; è possibile impostare la finestra di acquisizione dei dati, fino ai 30 minuti: in alternativa, per misurazioni superiori ai 30 minuti, è possibile scegliere di avere tutto il grafico cumulativo. Una volta stoppata l’acquisizione, è possibile marcare tutti i punti rilevati (tramite apposito pulsante) e fare eventualmente degli zoom locali per ingrandire qualche zona di particolare interesse
- *Logging* = è la finestra più importante, in cui si registrano tutti i dati delle acquisizioni valutate di volta in volta; i dati vengono accumulati in maniera continuativa, vi sono inoltre altre informazioni utili riguardanti il conteggio di campioni fino ad un determinato istante, il valore più basso, più alto e l’ultimo valore rilevato. Quando si stoppa l’acquisizione, può essere visualizzato il tempo di inizio e di fine, ma anche il numero totale di campioni analizzati fino a quel momento (nella parte destra). I dati possono essere esportati mediante Excel e successivamente sono pronti per essere analizzati

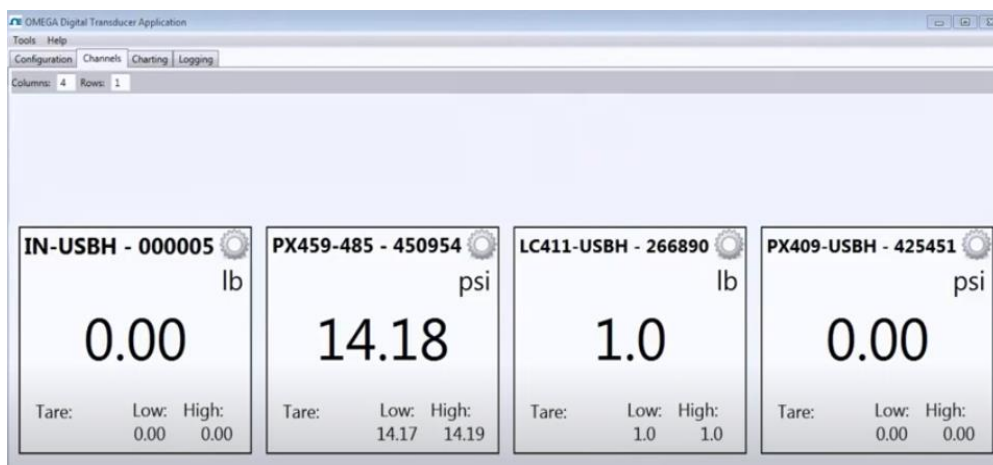


Fig. 26: Rappresentazione della schermata "Channels"

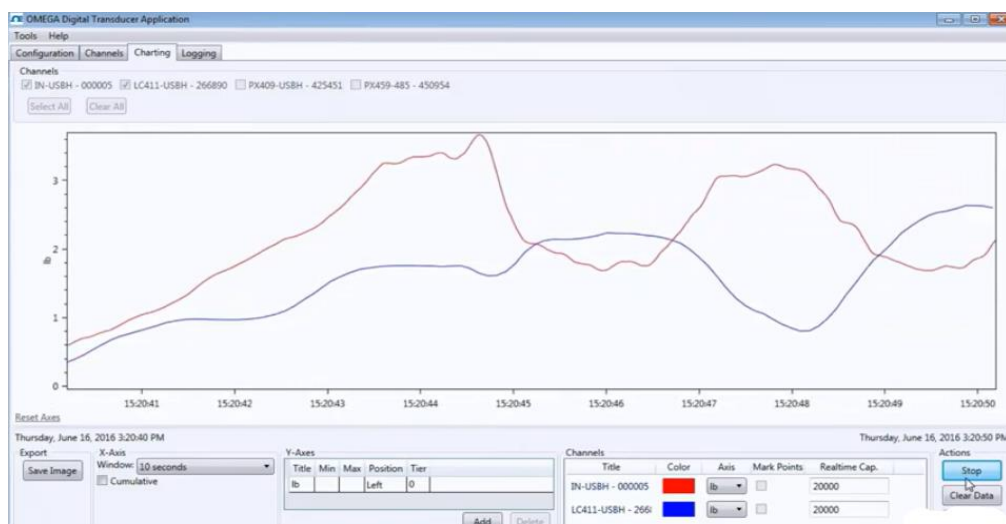


Fig. 27: Rappresentazione della schermata "Charting"

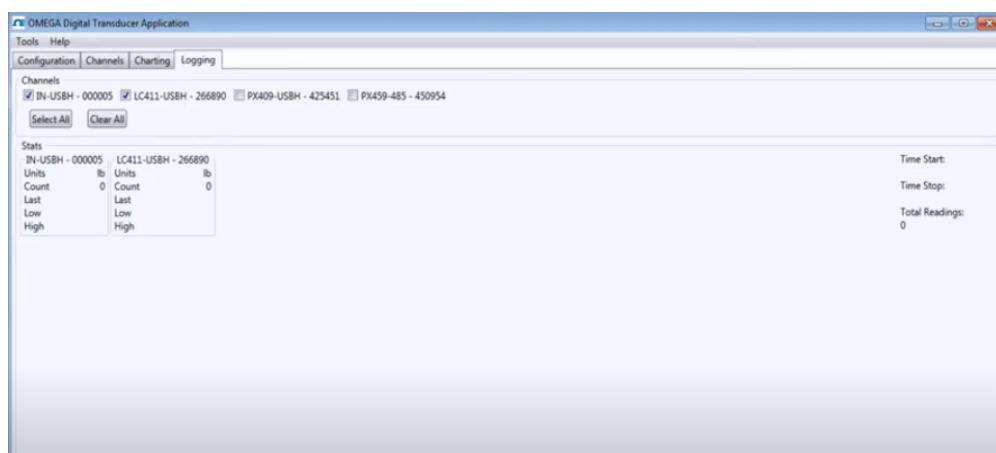


Fig. 28: Rappresentazione della schermata "Logging"

2.1.6 Linea cellulare epiteliale A549

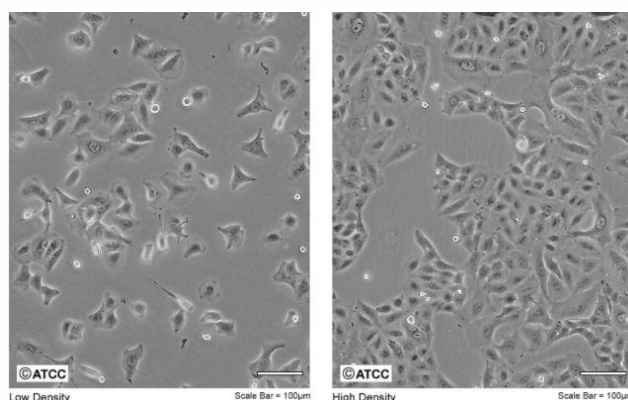
In questo lavoro di tesi, come linea cellulare di tipo epiteliale è stata utilizzata la A549: è stata isolata per la prima volta da tessuto polmonare adenocarcinomico nel tumore espiantato da un maschio caucasico di 58 anni ³³.

Le A549 sono cellule basali epiteliali alveolari che tendono a crescere preferenzialmente sottoforma di monostrato aderente *in vitro* (soprattutto in coltura ALI) e a produrre surfactante (il quale ha il compito di proteggere il polmone da infezioni), tuttavia sono prevalentemente carenti nella formazione di tight junctions (TJ) ³⁴ e ciò va ad inficiare le caratteristiche di permeabilità della membrana su cui vengono coltivate.

Questa linea cellulare adenocarcinomica è classificata come *carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC)*, che tende ad essere meno aggressivo e a diffondersi meno rapidamente rispetto al *carcinoma polmonare a piccole cellule (SCLC)*; ciononostante, risulta essere più comune andando a rappresentare l'85-88% di tutti i casi di cancro ai polmoni. La linea cellulare A549 viene ampiamente utilizzata come modello di adenocarcinoma polmonare, nonché come modello *in vitro* per cellule epiteliali polmonari di tipo II ³⁵.

In ragione di ciò, le cellule A549 sono state ben caratterizzate nel corso degli anni e sono preziose per i ricercatori che le usano abitualmente come modelli *in vitro* e *in vivo*: infatti, esse presentano caratteristiche di natura squamosa e sono responsabili della diffusione di sostanze come acqua ed elettroliti attraverso gli alveoli dei polmoni. Possono essere coltivate (da sole o in combinazione con altri fenotipi) in strutture che presentano interfaccia LLI (liquido-liquido), ma anche ALI (aria-liquido) ³⁵: quest'ultima caratteristica è peculiare per valutare eventuali indagini tossicologiche e drug screening di determinati composti.

Categoria di prodotto	cellule umane Human
Organismo	<i>Homo sapiens</i>
Tipo di cella	cellula epiteliale
Morfologia	epiteliale
Tessuto	Polmone
Malattia	Carcinoma
Applicazioni	Coltura cellulare 3D Ricerca sul cancro Screening ad alto rendimento Tossicologia
Formato del prodotto	Congelato
Condizioni di archiviazione	Fase vapore di azoto liquido



Tab. 7: Specifiche della linea cellulare A549 ³⁵

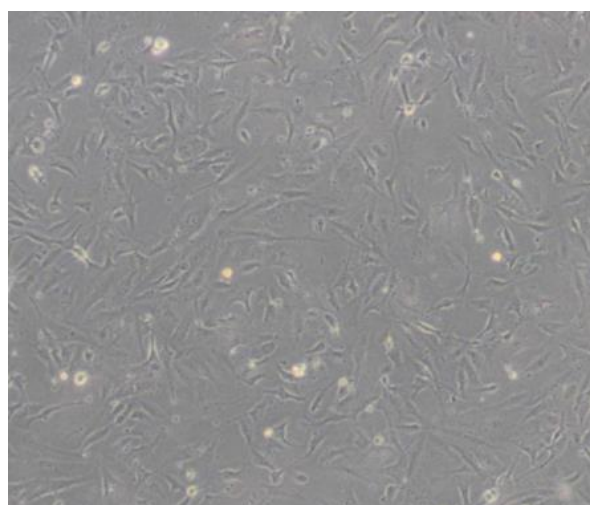
Fig. 29: Caratterizzazione morfologica di A549 a diverse densità cellulari (a sinistra minori, a destra maggiori) ³⁵

2.1.7 Linea cellulare endoteliale HULEC-5a

Per quanto riguarda le cellule di tipo endoteliale, è stata considerata la linea cellulare *HULEC-5a*: sono cellule immortalizzate (le quali tendono ad acquisire caratteristiche tumorali ed hanno la capacità di crescere indefinitamente) ed inoltre sono una fonte continuamente rinnovabile di cellule microvascolari endoteliali umane; derivano da tessuto neonatale umano e possono essere utilizzate come sostituto delle cellule endoteliali polmonari umane primarie per molti studi di ricerca ³⁶.

Presentano buone caratteristiche adesive e sono spesso impiegate in co-coltura con le cellule epiteliali, per particolari applicazioni di mimesi della barriera alveolo-capillare (nello specifico, andrebbero a ricapitolare il corrispettivo *in vivo* del lume capillare). Tra le altre applicazioni, vi è la possibilità di indagare il ruolo dell'endotelio nell'infezione da virus e batteri, effettuare ricerche su cancro, metastasi tumorali e sulla funzione dell'endotelio ³⁶.

Categoria di prodotto	cellule umane Human
Organismo	<i>Homo sapiens</i>
Tipo di cella	cellula endoteliale microvascolare
Morfologia	simil-endoteliale
Tessuto	Polmone
Applicazioni	Coltura cellulare 3D Ricerca sulle malattie cardiovascolari
Formato del prodotto	Congelato
Condizioni di archiviazione	Fase vapore di azoto liquido



Tab. 8: Specifiche della linea cellulare *HULEC-5a* ⁵⁴

Fig. 30: Caratterizzazione morfologica di *HULEC-5a* ⁵³

2.1.8 Paraformaldeide/Formalina al 4%

La paraformaldeide (PFA) è un poliacetale in forma di gas solubile in acqua, il più piccolo poliossimetilene; è il prodotto di polimerizzazione della formaldeide con un grado di polimerizzazione tipico di 8-100 unità, legate tra loro a formare una catena polimerica ³⁷.

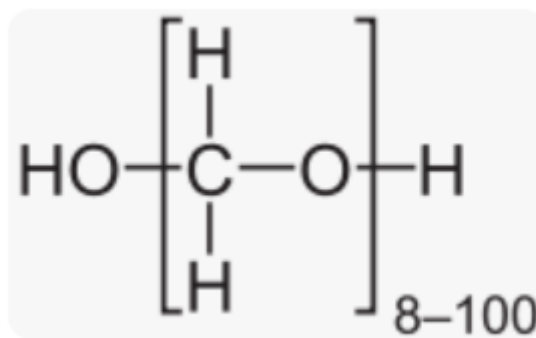


Fig. 31: Formula chimica della Paraformaldeide ⁵⁵

La paraformaldeide, di base, non è un fissativo: necessita di essere depolimerizzato in soluzione a formaldeide. Infatti, specialmente nelle fasi di coltura cellulare, una tipica procedura di fissazione della formaldeide comporterebbe l'uso di una soluzione di *formalina al 4%* in soluzione salina tamponata con fosfato (PBS) su ghiaccio per 10 minuti ³⁷: la formalina al 4% favorisce questa fase di fissazione in quanto tende a perseverare la morfologia tissutale e cellulare, determinando il crosslinking delle strutture proteiche tra loro, stabilizzando la struttura e prevenendo fenomeni di autolisi; per questi motivi, è fondamentale che la quantità di fissativo sia il più possibile ottimale.

In linea di principio, tutti i fissativi devono necessariamente essere preparati come soluzioni isotoniche e a pH 7.4, per impedire fenomeni di collasso o di rigonfiamento dei campioni, legati agli stress osmotici. È necessario evitare eventuali variazioni di pH che possano alterare le proprietà antigeniche, che renderebbero difficoltose, ad esempio, le procedure immunoistochimiche ³⁸.

A seconda della applicazioni, il mantenimento del fissativo può passare da alcuni minuti fino anche a diversi giorni.

2.1.9 Triton X-100

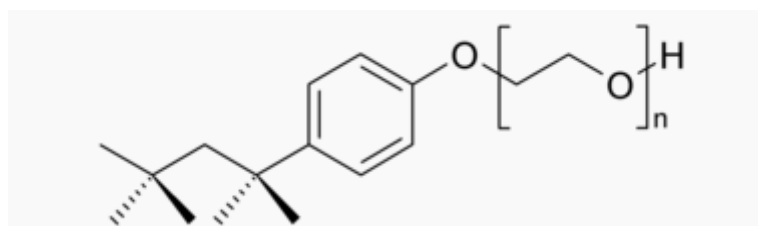


Fig. 32: Formula chimica del Triton X-100 ⁵⁶

È un tensioattivo puro non ionico, utilizzato nella fase di permeabilizzazione della membrana cellulare; a livello chimico, presenta una catena di ossido di polietilene idrofilo, in media ha circa 9,5 unità di ossido di etilene ed un gruppo idrocarburico aromatico lipofilo o idrofobo ³⁹.

È un detergente piuttosto aggressivo, comunemente usato in laboratorio; in forma non diluita presenta caratteristiche di fluido viscoso trasparente ed è solubile ad una temperatura pari a 25°C,

prevalentemente in acqua (ma anche in altre soluzioni, quali ad esempio etere etilico, alcol etilico e dicloruro di etilene).

In applicazioni immunoistochimiche e immunocitologiche viene usato in basse concentrazioni (0.1%-0.5%) e consente di disgregare la membrana cellulare, solubilizzare le proteine di membrana, facilitare l'ingresso dell'anticorpo nella cellula e ridurre la tensione superficiale delle soluzioni acquose.

Bisogna avere particolare accortezza quando si lavora con questo tipo di prodotti: infatti, poiché presenta determinate caratteristiche aggressive come accennato in precedenza, c'è il rischio che l'aggiunta di un quantitativo maggiore di Triton X-100, piuttosto che l'esposizione alle cellule per un tempo più prolungato del necessario, causino apoptosi.

2.1.10 PBS-BSA

Come delineato nella spiegazione dell'ottimizzazione del protocollo di semina, il PBS è una soluzione tampone spesso utilizzata che consente di effettuare lavaggi e diluizioni in più esperimenti di ricerca biologica.

L'albmina di siero bovino (BSA) è una proteina sierica di derivazione animale, che in applicazioni di laboratorio viene comunemente usata per effettuare valutazioni su adsorbimento proteico ed è presa come riferimento standard quando si tratta di quantificare le proteine durante analisi colorimetriche ⁴⁰.

Il BSA viene talvolta aggiunto al PBS per aumentare la concentrazione proteica e contemporaneamente ridurre la colorazione non specifica, saturando i siti di legame aspecifici ⁴¹.

2.1.11 DAPI, Falloidina con FITC e Falloidina con Rodamina

Il DAPI è un colorante organico fluorescente che viene utilizzato per lo staining dei nuclei, poiché in grado di legarsi fortemente a determinate regioni del DNA; nello specifico, la colorazione nucleare emette fluorescenza nel blu quando si lega fortemente alle specifiche regioni A-T del DNA.

Viene ampiamente utilizzato in applicazioni di microscopia a fluorescenza; può passare attraverso una membrana cellulare intatta; quindi, essere utilizzato per le colorazioni sia di cellule vive, sia fissate: nel primo caso la membrana viene attraversata in modo meno efficiente; pertanto, *in vivo* si ha un'efficacia minore a livello di staining.

I valori massimi di eccitazione ed emissione sono rispettivamente pari a $\lambda = 358 \text{ nm}$ e $\lambda = 461 \text{ nm}$ ⁴².

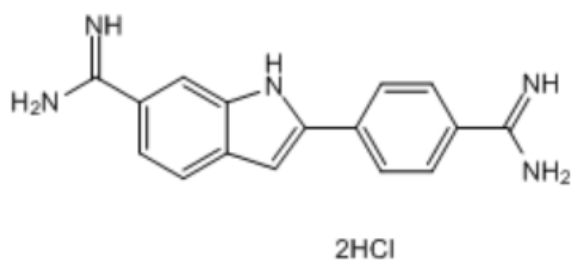


Fig. 33: Formula chimica del DAPI ⁵⁷

Eccitazione/Emissione:	358/461
Condizioni di spedizione:	Temperatura ambiente
Localizzazione subcellulare:	Nucleo, acidi nucleici
Metodo di rilevamento:	Fluorescente
Da utilizzare con (attrezzatura):	Microscopio a fluorescenza
Colore:	Blu
Permeabilità cellulare:	Cell-impermeabile

Tab. 9: Tabella relativa alle specifiche riferite al DAPI ⁴²

La Falloidina è una micotossina che lega e va a colorare con elevata selettività la F-actina; è coniugata al colorante fluorescente verde, la fluoresceina (FITC) ⁴³. Dimostra una colorazione aspecifica particolarmente ridotta, infatti la falloidina con fluoresceina consente una discriminazione della colorazione dell'actina ad alto contrasto.

È molto utilizzata sia per campioni fissi, sia permeabilizzati e presenta rispettivamente, come spettri di eccitazione ed emissione, 496 nm e 516 nm.

In generale, tra le varie applicazioni, la falloidina-FITC può essere utilizzata a scopo di ricerca per visualizzare e quantificare l'F-actina non solo per colture cellulari, ma anche per sezioni di tessuto oppure preparazioni che non adottano l'utilizzo di cellule ⁴³. Inoltre, questo tipo di colorazione è completamente compatibile con altre colorazioni fluorescenti utilizzate nelle analisi cellulari, come ad esempio proteine fluorescenti, nanocristalli e anticorpi secondari.

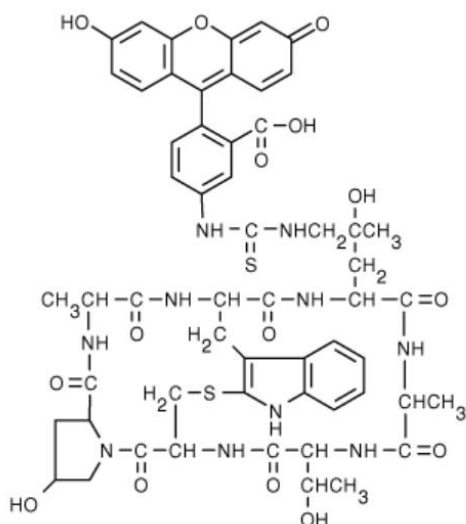


Fig. 34: Formula chimica della Falloidina ⁵⁷

Eccitazione/Emissione:	496/516
Condizioni di spedizione:	Temperatura ambiente
Localizzazione subcellulare:	Actina, Citoscheletro
Tipo di etichetta:	Coloranti classici
Etichetta o colorante:	FITC (fluoresceina)

Tab. 10: Tabella relativa alle specifiche riferite alla Falloidina con FITC ⁴³

La Falloidina-Rodamina è una sonda F-actina ad alta affinità coniugata al colorante fluorescente rosso-arancio tetrametilrodamina (TRITC) ⁴⁴. Presenta come spettri di eccitazione ed emissione, rispettivamente, 540 nm e 565 nm.

In questo contesto, la falloidina va a legare l'F-actina con un'elevata selettività, mentre TRITC ha il compito di fornire una fluorescenza di colore tra il rosso e l'arancio, con buone caratteristiche di luminosità e fotostabilità.

L'utilizzo di questo composto è svariato, per applicazioni multiple: così come per la Falloidina-FITC, anche in questo caso è possibile utilizzare la Falloidina con Rodamina per visualizzare e quantificare l'F-actina sia in colture cellulari, sia sezioni di tessuto, sia preparazioni prive di materiale cellulare.

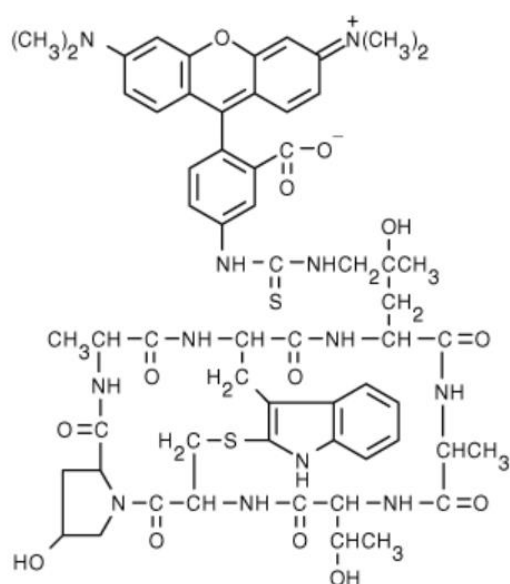


Fig. 35: Formula chimica della Falloidina Rodamina⁵⁷

Eccitazione/Emissione:	540/565
Condizioni di spedizione:	Temperatura ambiente
Localizzazione subcellulare:	Actina, Citoscheletro
Tipo di etichetta:	Coloranti classici
Etichetta o colorante:	TRITC (Tetrametilrodamina Isotiocianato)

Tab. 11: Tabella relativa alle specifiche riferite alla Falloidina con Rodamina ⁴³

2.1.12 FITC-Destrano 70 kDa

Il FITC-Destrano 70 kDa (commercializzato dalla Sigma-Aldrich) è utilizzato principalmente come probe per poter effettuare particolari studi di rilasci biomolecolari, meccanismi come la fagocitosi o l'endocitosi e fare anche delle valutazioni di permeabilità di membrana sia in presenza, sia in assenza di cellule⁴³.

I destrani sono dei polisaccaridi di tipo idrofilo, con un peso molecolare relativamente alto e ottime qualità in termini di solubilità in acqua e atossicità, oltre che un basso grado di immunogenicità⁴³. Esistono in commercio più di 50 coniugati destrano fluorescenti e biotinilati, presenti in diversi intervalli di peso molecolare.

Tipo di etichetta:	Coloranti classici
Condizioni di spedizione:	Temperatura ambiente
Eccitazione/Emissione:	494/521

Tab. 12: Tabella relativa alle specifiche riferite al
FITC-Destrano 70 kDa ⁴³

2.2 Metodi

2.2.1 Protocollo di misurazioni pressorie con modulatore LivePa

La parte più importante del lavoro di tesi verte sull'acquisizione e sulla valutazione di incrementi pressori all'interno del LB2, attraverso l'aumento puntuale di pressione sul tubo di uscita delle camere del bioreattore grazie al modulatore LivePa.

Innanzitutto, è necessario determinare uno specifico set-up sperimentale: a livello pratico, si assembla innanzitutto il bioreattore LiveBox2, secondo le specifiche indicate dall'azienda; a questo punto si va a riempire fisicamente in condizioni statiche il sistema con acqua: si utilizza l'acqua per il riempimento e non il DMEM, in quanto è stato notato da precedenti prove come non ci sia molta differenza in termini di viscosità tra i due materiali e nemmeno per quanto riguarda i dati acquisiti, per cui la scelta ricade sull'acqua per una questione di comodità e risparmio di risorse; per questa operazione è necessario preimpostare un volume di partenza che sia uguale per entrambi i compartimenti, considerando sia le camere, sia i riferimenti circuitali: tipicamente si considerano circa 10 ml.

Si inizia la fase di riempimento del bioreattore mediante o una siringa luer-lock oppure una pipetta (nel primo caso si è più sicuri di minimizzare il passaggio di bolle d'aria, in quanto il collegamento siringa-tubicino calza in maniera ottimale), prima dalla camera basale e successivamente da quella apicale, andando ad attingere il liquido direttamente dai rispettivi reservoir; nel frattempo, si controlla visivamente che l'acqua fluisca completamente nei due compartimenti e che si limitino le bolle d'aria all'interno del sistema. Conclusa questa fase, si provvede quindi al riempimento del tubicino sporgente dal bioreattore e che sarà successivamente connesso al sensore: in questo caso non si utilizzerà una siringa luer-lock oppure una pipetta tradizionale, bensì una siringa ad ago, con l'obiettivo di riempire il tubicino fino all'orlo al punto, anche in questo caso, di creare un menisco.

Una volta che il bioreattore è pieno di liquido, in parallelo si effettua il collegamento di una delle due teste pompanti della pompa peristaltica LF con i due reservoir in dotazione, con l'obiettivo di far fluire il circuito in maniera continuativa: questa operazione tipicamente ha la durata di qualche minuto e serve per rendersi conto se il moto della pompa peristaltica sia efficace e duraturo o meno: tipicamente, si fa in modo di far progredire il flusso fino a che non ci siano (o ce ne siano il meno possibile) bolle nel circuito.

A questo punto si effettua la connessione del bioreattore LB2 con la pompa peristaltica LF: poiché la procedura avviene manualmente e prevede l'allentamento e la successiva connessione dei tubicini in silicone, rimarrà indubbiamente dell'aria all'interno del circuito e per questo motivo si effettuano nuovamente delle flussate successive. L'ultima connessione (la più importante) è quella tra bioreattore e sensore, la quale deve essere fatta con la massima cura e rifatta ogniqualvolta rimangano anche solo delle piccole bolle presenti all'interno del sistema.

Concluse queste prime fasi, si va ad assemblare tutto il sistema all'interno dell'incubatore: quest'operazione è fondamentale, in quanto mantenendo la temperatura costante a 37°C si evita il fenomeno di rilascio di bolle d'aria (come detto in precedenza, ciò può alterare i dati che vengono acquisiti di volta in volta).

Pertanto, la struttura completa all'interno dell'incubatore sarà la seguente (Fig. 34 e 35): il bioreattore è stato montato in una delle due configurazioni (tipicamente il primo run di acquisizioni viene effettuato per più giornate e mantenendo una configurazione, piuttosto che un'altra: solitamente si comincia con le acquisizioni della camera basale e successivamente per quella apicale), il quale verrà collegato alla pompa peristaltica e ai reservoir mediante gli appositi tubicini; al fine di mantenere la direzionalità dei flussi, i collegamenti sono i medesimi per entrambe le camere, favoriti dal parallelismo dei tubicini all'interno della testa pompante.

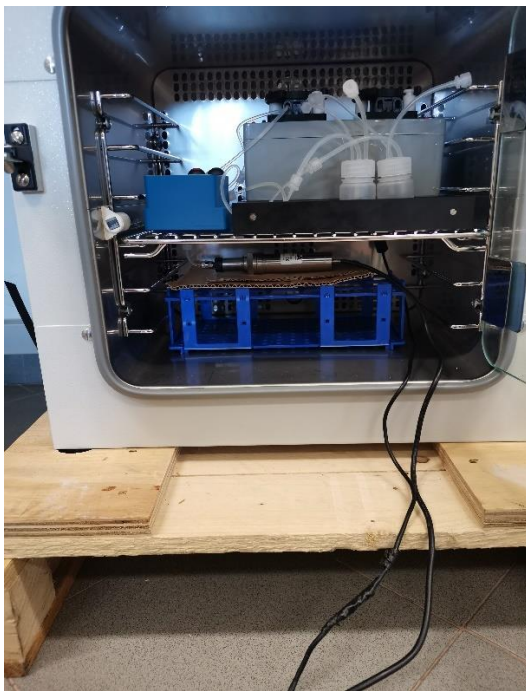


Fig. 36: Rappresentazione completa del sistema all'interno dell'incubatore – vista frontale

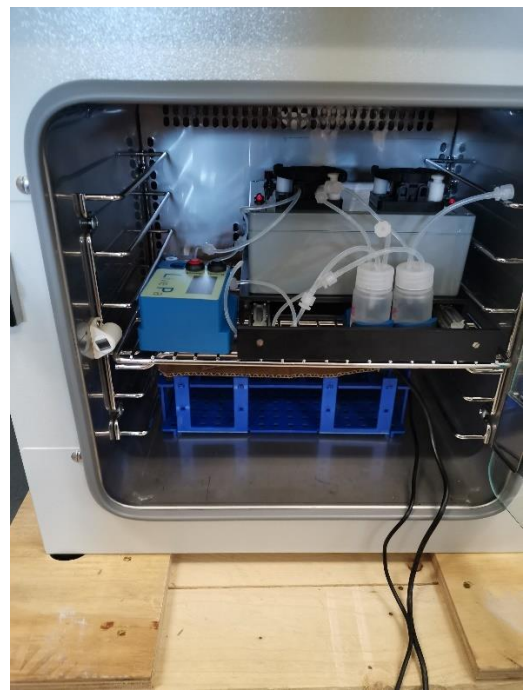


Fig. 37: Rappresentazione completa del sistema all'interno dell'incubatore – vista dall'alto

Come ultimo step, si va ad agganciare il tubo in uscita dal bioreattore (in questo caso della camera basale) nell'alloggiamento superiore a "C" del modulatore di pressione LivePa: quest'ultimo consente di impostare una serie di passi incrementali che, mediante l'azione di un pistone, favoriscono un aumento di pressione locale sul tubicino (fino a 10000 volte in più rispetto alla pressione normale).

Il sensore viene quindi connesso tramite cavo USB al computer e mediante il software *Digital Transducer Application* è possibile monitorare le acquisizioni sia a livello grafico, sia in termini di valori campionati (è stato impostato di default un campionamento pari a 10 campioni al secondo).

Una volta messo a punto il set-up di misura, è necessario considerare separatamente diverse condizioni di lavoro, le quali sono riportate nella tabella presente in seguito (Tab. 13).

Data	Flusso	Membrana	P incr	Camera	kPa media	Dev. Standard
23-set	0 µl/min	PET 0,45	0 (30 min)	BASALE	1,066	0,050
23-set	50 µl/min	PET 0,45	0 (30 min)	BASALE	1,161	0,037
23-set	50 µl/min	PET 0,45	5 (1h)	BASALE	1,227	0,086
24-set	0 µl/min	PET 0,45	0 (30 min)	BASALE	0,833	0,022
24-set	50 µl/min	PET 0,45	0 (30 min)	BASALE	1,010	0,035
24-set	50 µl/min	PET 0,45	2 (1h)	BASALE	1,296	0,035
24-set	50 µl/min	PET 0,45	0 (15 min)	BASALE	0,989	0,060
24-set	50 µl/min	PET 0,45	7 (1h)	BASALE	1,398	0,023

Tab. 13: parametri considerati per le prove effettuate in laboratorio

Dalla tabella è possibile esplicitare i parametri selezionati:

- *Flusso* = la pompa peristaltica LF consente di impostare i flussi all'interno di un range che parte dai 50 µl/min fino a 500 µl/min; per effettuare le valutazioni in questa prova sono stati scelti i valori di 50 µl/min e 100 µl/min, in modo da dare più variabilità al sistema e seguirne il comportamento su range di flussi diversi
- *Membrana* = considerando le due tipologie di membrane fornite dall'azienda IVTech e la membrana prodotta mediante elettrospinning nei laboratori del Politecnico di Torino, in questo lavoro di tesi sono state effettuate acquisizioni con la membrana in PET (porosità pari a 0,45 µm); verranno successivamente ripetute le medesime acquisizioni con la membrana in NY, poi in PCL-gelatina
- *Passo incrementale* = come già spiegato precedentemente, il modulo LivePa permette di selezionare più passi incrementali: considerata la scarsa compressione ottenuta impostando passi incrementali bassi (0.5 e 1) si è scelto di partire considerando valori pari a 2, 3, 5 e 7, al fine di avere un quadro più completo delle varie compressioni intermedie del tubo
- *Camera* = la connessione sensore-bioreattore avviene per entrambe le camere, tipicamente si inizia con quella basale; in esperimenti successivi verrà poi effettuato il *run* di acquisizioni con la camera apicale

Indicativamente, in termini di tempistiche utili, si acquisisce:

- per 30 minuti in statico, ossia con il circuito interamente connesso e collegato, ma a pompa spenta: questo ci permetterà di avere lo zero del sistema; i dati che si ottengono dalle misurazioni a passi incrementali > 0 verranno normalizzati utilizzando i valori ottenuti in questa prima fase
- per 30 minuti in dinamico, ma con attuatore spento: questa seconda acquisizione corrisponde alla fase di controllo e verrà rapportata, di volta in volta, alle acquisizioni

che si fanno a passi incrementali maggiori (per valutare i cambiamenti di pressione all'interno del sistema)

- per almeno 1h ogni acquisizione a passo incrementale crescente: in seguito alle due acquisizioni precedenti, grazie al modulo LivePa è possibile impostare di volta in volta il range di flusso considerato e successivamente il passo incrementale da valutare per le diverse acquisizioni

Un'acquisizione, per essere considerata utile, deve durare per i tempi precedentemente descritti e mantenere un range di deviazione standard tale per cui quest'ultima sia $< 10\%$ (meglio ancora se $< 5\%$) del corrispettivo valore in media. Successivamente vengono considerati i rapporti incrementali dei diversi passi incrementali in funzione delle medesime acquisizioni in statico e con pompa accesa ma sistema non attuato, al fine di valutare l'incremento netto di pressione relativo ad un dato passo incrementale. L'obiettivo è quello di aumentare la numerosità delle acquisizioni, in modo da avere una serie di dati che sarà possibile processare, in seguito, mediante valutazioni di significatività statistica.

L'analisi statistica dei dati è stata condotta attraverso *t-test*. L'obiettivo di questa tipologia di test statistico è verificare se il valor medio di una distribuzione si discosti in maniera statisticamente significativa da un dato valore di riferimento ⁴⁵.

Il *t-test* è stato realizzato andando ad inserire i dati sul sito *GraphPad*, che consente di fornire nei risultati il valore di probabilità statistica p (*p value*) in relazione ad un valore soglia α (per convenzione, posto pari a 0,05). La limitazione associata a questa gamma di test è legata al fatto che è possibile confrontare solo coppie di dati di medie e deviazioni standard: il *p-value* che risulterà dalla correlazione tra le coppie di medie e deviazioni standard ai diversi passi incrementali acquisiti fornirà una differenza statisticamente significativa solo se $p < \alpha$; se il risultato dovesse essere nell'intorno superiore di α (fino ad un massimo di 0,08 circa), le differenze saranno classificate come "non abbastanza statisticamente significative"; infine, per valori di $p > \alpha$ la differenza risulterà non statisticamente significativa.

A livello pratico, viene definito il formato di immissione dei dati e per questo particolare tipo di confronto si considerano le medie (*mean*) e le deviazioni standard (*SD*) degli N dati considerati (Tab.). Quindi, si va a valutare la tipologia di test per effettuare la comparazione: in questo caso si seleziona il test non accoppiato, in quanto le acquisizioni che sono state ottenute sono tra di loro indipendenti (non solo tra un passo incrementale ed un altro, ma anche tra i medesimi passi incrementali).

Label:	P incr 2 a 50	P incr 3 a 50
Mean:	2,378	2,369
SD:	0,95	0,826
N:	3	3

Tab. 14: esempio rappresentativo dell'inserimento di dati da confrontare per i passi incrementali 2 e 3 a flusso 50 μ l/min. Il confronto è stato effettuato per tutte le coppie di passi incrementali

In seguito all'inserimento dei dati riportati in tabella viene automaticamente eseguito il calcolo del *p value* e verranno successivamente effettuate le conseguenti valutazioni in funzione del risultato di *p* rispetto al valore soglia α , come anticipato in precedenza.

2.2.2 Ottimizzazione del protocollo di semina

La procedura di semina cellulare è stata effettuata su una membrana precedentemente ottimizzata in laboratorio presso il Politecnico di Torino, costituita da un blend *PCL-gel* in rapporto 80-20 (w/w) e ottenuta mediante la tecnica dell'elettrospinning. Questo processo di coltura è stato ripetuto per entrambe le linee cellulari A549 (epiteliali) e HULEC-5a (endoteliali), iniziando con la semina proprio di quest'ultime nella camera basale del bioreattore LB2.

Inizialmente è stata prelevata dall'incubatore la flask contenente la sospensione cellulare, composta da cellule e da mezzo di coltura: si aspira, quindi, quest'ultimo e si procede con successivi sciacqui in tampone fosfato salino (PBS), cercando di distribuirlo in maniera omogenea per tutta la flask.

Dopo aver rimosso il PBS vengono inseriti 1 o 2 ml di tripsina nella flask e si rimette quest'ultima in incubatore per 3 minuti (corrispondenti al tempo di attivazione della tripsina): una volta passato questo tempo, si riprende dall'incubatore la flask e se ne scuotono fisicamente le pareti, al fine di promuovere il distacco cellulare (per un'ulteriore conferma, si va a controllare al microscopio l'avvenuto distacco). A questo punto viene disattivata la tripsina andando ad aggiungere nella flask 4 o 5 ml del nuovo mezzo di coltura: per la linea cellulare epiteliale si usa il mezzo RPMI, mentre per le endoteliali si utilizza il MCDB131; la sospensione cellulare viene pipettata più volte e su tutta la superficie: il contenuto viene poi inserito totalmente in una falcon.

Per evitare la formazione di aggregati cellulari, all'interno della falcon si effettuano ripetutamente trattenute e rilasci del mezzo (mediante micropipetta); quindi, si prelevano 10 μ l di sospensione cellulare e si adagiano sulla cameretta dedicata alla conta cellulare, la camera di Burkert: è costituita da un vetrino rettangolare e presenta 4 quadranti; per ognuno di essi si conta effettivamente quante cellule sono presenti e, per convenzione, si considerano anche le cellule presenti in uno dei quattro lati (per ogni quadrante si andrà a considerare un lato diverso).

La formula utilizzata per contare il quantitativo di cellule totali è la seguente:

$$totale\ cellule = \frac{somma\ delle\ cellule\ nei\ 4\ quadranti}{4} \times 10'000 \times volume\ totale$$

Per la linea cellulare HULEC-5a è stata seminata una densità cellulare pari a 160'000 cell/cm². Si impostano quindi le proporzioni per la membrana (IVT) e per pozzetti di una multiwell (MW) da 24 well usati come controllo.

Al netto di ciò, per valutare quale sia il volume necessario da considerare in funzione del quantitativo di cellule, vengono impostate ulteriori proporzioni per IVT e MW. Il volume di sospensione cellulare, che consente di ottenere un'opportuna densità cellulare, viene centrifugato per 8 minuti e a T=25°C. Passati gli 8 minuti, si va a controllare se sia rimasto effettivamente il pellet di cellule al fondo: facendo attenzione a non rimuovere quest'ultimo, si rimuove il surnatante e lo si scarta. Dunque, si prelevano i 100 µl di medium fresco per IVT, li si inseriscono nella vial/falcon e si prosegue nuovamente a successive trattenute e rilasci per più volte, in modo da risospendere le cellule ed evitare di creare aggregati.

Pertanto, si procede alla semina delle cellule endoteliali nella camera basale (nei modelli a barriera si parte sempre dalla semina delle cellule endoteliali) e si mette il tutto in incubatore per mezz'ora.

Viene ripetuto il procedimento per i pozzetti, in questo caso la risospensione è in 200 µl (50 µl a pozzetto), andando ad inserire il mezzo in maniera omogenea; per gli altri 3 pozzetti in cui vi sono solo cellule vengono aggiunti poi 500 µl di mezzo. I campioni vengono quindi posti in incubazione per 1h, al fine di promuovere l'adesione delle cellule.

Dopo aver aggiunto 400 µl di medium fresco, la camera LB2 viene ribaltata per consentire la semina delle cellule A549 nella camera apicale. Le cellule epiteliali vengono quindi staccate, seguendo il medesimo procedimento descritto per le HULEC-5a e seminate ad una densità cellulare pari a 120'000 cellule/cm². In questa fase, è rilevante specificare che a livello strutturale il bioreattore LB2 è stato sviluppato in configurazione air-liquid interface (ALI): pertanto, la semina delle cellule epiteliali è avvenuta direttamente tramite micropipetta nella camera apicale del bioreattore.

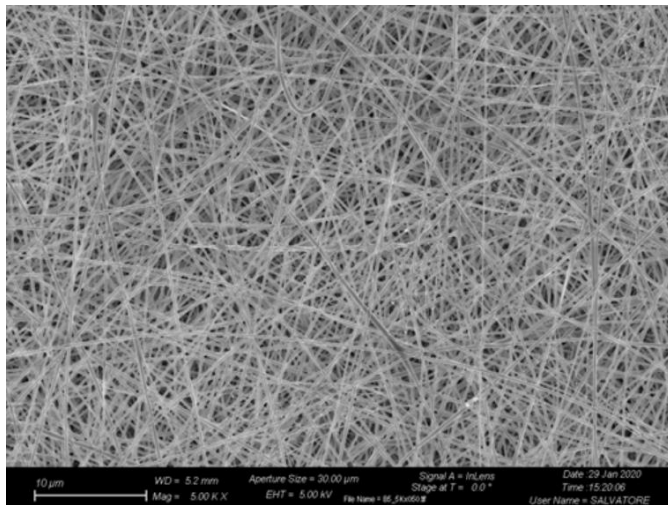


Fig. 38: Acquisizione al SEM della membrana elettrospinnata (blend PCL-gelatina 80-20) su cui sono state coltivate le cellule

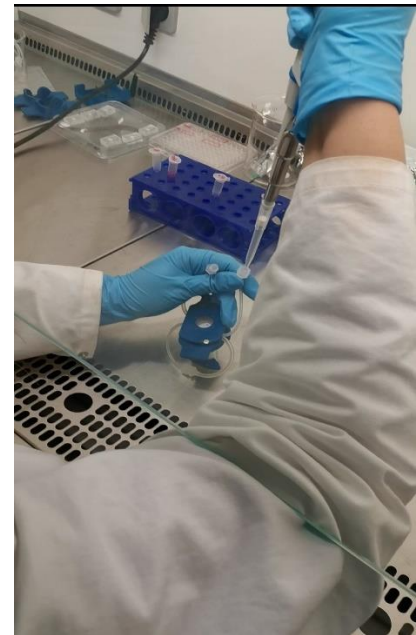


Fig. 39: Istantanea della procedura della fase di semina delle cellule endoteliali HULEC-5a nella camera basale del bioreattore LiveBox2

2.2.3 Staining tramite dyes fluorescenti

Il protocollo seguito prevede di partire prelevando il mezzo di coltura esausto dalle camere del bioreattore. Si effettua per ogni camera un lavaggio in PBS, il quale verrà poi eliminato.

Un quantitativo pari a 0.5 ml e 1.5 ml di fissativo viene inserito, rispettivamente, nella camera apicale e nella camera basale; il sistema viene quindi incubato per 40 minuti a temperatura ambiente. Una volta rimosso il fissativo, la membrana viene posizionata su un pozzetto di una MW da 6 pozzetti e viene quindi eseguito uno sciacquo in PBS per 5 minuti.

In contemporanea si va a preparare il Tryton, il quale serve per permeabilizzare il campione: in questo esperimento, la concentrazione a cui lo si utilizza è pari allo 0.5%. Dopo aver mantenuto per 5 minuti il PBS, lo si toglie e si inserisce il Tryton per 10 minuti. Successivamente, dopo l'eliminazione del Tryton, per ridurre le interazioni aspecifiche si immette una soluzione composta di BSA all'1% w/v in PBS per un tempo pari a circa 20-30 minuti (inizialmente sulla base della MW a contatto con le epiteliali e poi sulla superficie delle endoteliali).

In questo esperimento, per la preparazione dei dyes fluorescenti sono stati considerati, rispettivamente, i rapporti 1:1000 µl per il DAPI, 1:60 µl per la Phalloidina coniugata con il dye FITC e 0,5:200 µl per la Phalloidina coniugata con Rodamina (quest'ultimo, da protocollo del produttore). Dopo i 10 minuti di permanenza del Tryton, lo si rimuove dal pozzetto e si effettuano degli sciacqui in PBS, il quale, successivamente, verrà rimosso.

Si inizia con la preparazione del DAPI: una volta che è stato inserito il corretto quantitativo nella provetta contenente PBS, tramite la siringa si effettuano più trattenute e rilasci successivi delle due soluzioni coinvolte, in modo da rendere più omogeneo il composto finale. A livello pratico, si va

successivamente ad inserire sul fondo di un pozzetto della MW da 12 la soluzione ottenuta; a questo punto si inverte la membrana (facendo in modo che il lato con le epiteliali sia rivolto verso il basso e le endoteliali verso la superficie): in questo modo, si va a porre la soluzione sulla superficie in cui sono presenti le HULEC-5a. Il tutto va mantenuto in incubazione al buio per 5 minuti.

Si procede quindi con la preparazione della soluzione phalloidina-FITC: è importante in questa fase ricordarsi di fare due sciacqui in PBS da almeno 5 minuti ciascuno, al fine di risciacquare il DAPI che non è rimasto legato.

Infine, si prepara la soluzione contenente phalloidina-Rodamina: si è deciso di effettuare la colorazione dei citoscheletri con la phalloidina-FITC per la parte delle epiteliali e la Rodamina per il lato delle endoteliali. Per questo motivo, una volta eliminato il PBS a seguito del secondo risciacquo, si preleva la soluzione contenente Falloidina-FITC e la si dispone sul pozzetto della MW dal lato delle A549, mantenendo questa condizione per 20 minuti al buio.

Lo stesso procedimento con cui è stata trattata la membrana viene ripetuto, in parallelo, con i pozzetti della MW contenenti le linee cellulari epiteliali ed endoteliali come controllo.

Passati i 20 minuti, si effettua nuovamente un doppio sciacquo in PBS e a questo punto si inserisce la soluzione che presenta Rodamina sul lato in cui sono presenti le cellule endoteliali: anche in questa circostanza il tempo di mantenimento è il medesimo, trascorso il quale si procede ad un altro paio di sciacqui in PBS della durata indicativa di 5 minuti.

Una volta terminato l'ultimo risciacquo, si pone la membrana su di un vetrino (ricordandosi i corrispettivi lati di dove ci sono le cellule) e si effettua un taglio al fine di ottenere un dischetto di membrana; dopo aver fatto ciò, si va a chiudere il tutto con un altro vetrino. Mediante apposito software "ZOE Fluorescent Cell Imager" (Fig. 38) ⁴⁶ si procede all'acquisizione delle immagini in fluorescenza.



Fig. 40: Rappresentazione grafica del software ZOE Fluorescent Cell Imager, una piattaforma che consente di gestire tre diversi canali di fluorescenza detectati e che presenta una fotocamera digitale integrata ⁴⁶

2.2.4 Valutazioni di permeabilità di membrana

Mediante questo esperimento è possibile andare a misurare il rate diffusivo di Fluoresceina Isocianato (FITC)-Destrano (70 kDa), commercializzato dall'azienda Sigma-Aldrich, seguendone il flusso dalla camera apicale a quella basale del bioreattore LB2.

Il protocollo prevede di considerare un determinato quantitativo di FITC-Destrano in combinazione con PBS: per questo esperimento, la scelta del volume di PBS di partenza è stata valutata in funzione dello spazio presente all'interno delle camere fluidiche e dei tubicini del bioreattore LB2. Poiché si è impostata la soluzione all'1% w/v, di conseguenza si otterrà il quantitativo corrispondente in grammi di FITC-Destrano.

Di base, questo composto assume una colorazione tendente al giallo e si presenta sottoforma di polvere; a livello pratico, per favorire la miscelazione e l'omogeneizzazione del solvente e del soluto, si immette la soluzione completa all'interno di un becher e la si mantiene in agitazione (grazie alla presenza di un magnete) per pochi secondi. Tuttavia, bisogna tenere conto del fatto che il FITC-Destrano (così come i composti fluorescenti descritti in precedenza, per le valutazioni di staining) è un prodotto sensibile alla luce, per cui necessita di essere trattato secondo particolari condizioni.

Una volta ottimizzata la miscela, si va a prendere in considerazione il sistema *IVTech* andando a riempire inizialmente i tubi della pompa peristaltica LF con PBS-Destrano ed effettuando tutti i collegamenti tra loro in modo da avere il sistema completamente connesso (bioreattore e circuito).

Si procede con l'inserimento della soluzione FITC-Destrano nella camera apicale, dopo essersi assicurati della continuità del flusso: questo processo avviene fisicamente, andando direttamente ad aprire il tappo siliconico superiore del bioreattore, in quanto il sistema era stato precedentemente sviluppato in configurazione ALI. Inoltre, bisogna ricordarsi di mantenere al buio anche i due reservoir, sempre per il medesimo motivo relativo alla sensibilità alla luce del composto.

Dopo 1h, si versa il contenuto del reservoir in uscita all'interno di una provetta per poter effettuare delle valutazioni successive; questa procedura viene ripetuta a diversi time step crescenti: le valutazioni vengono effettuate a distanza di 1h, 3h, 6h dal momento in cui iniziano le acquisizioni. In seguito, il processo verrà riproposto allo stesso modo anche per la camera basale.

RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 Grafici delle acquisizioni a incrementi pressori crescenti

Nelle prime due raffigurazioni, sotto riportate, si evidenzia il medesimo grafico (corrispondente al passo incrementale pari a 2 e flusso 50 $\mu\text{l}/\text{min}$): in questo modo, è possibile apprezzare sia la configurazione completa dell'acquisizione (Fig. 41), ossia partendo dalla fase iniziale di assestamento e successiva riequilibrio della pressione fino ad arrivare ad un determinato plateau, sia lo sviluppo dell'ultima ora utile (Fig. 42), che è stata selezionata e considerata in termini di valori di media e di deviazione standard.

In quest'ottica, è di fondamentale rilevanza tener conto del trend del grafico; tipicamente, anche solo alcune variazioni di decimi di kPa possono compromettere la bontà di un'acquisizione, rischiando di rendere la deviazione standard non ottimale ai fini statistici: è necessario, quindi, stimare visivamente il grafico fin dai primi minuti e, nel caso in cui il trend subisca un decremento o uno sviluppo maggiormente variabile, si blocca l'acquisizione e si cerca di far fronte al problema in questione. In funzione dell'esperienza maturata nel processo di acquisizione dei dati svolto in questo lavoro di tesi, per le acquisizioni da 30 minuti (relativi alla fase statica e di controllo) il range grafico limite che è conveniente considerare al fine di avere un'acquisizione utile si aggira indicativamente intorno a 0,2/0,25 kPa, mentre per le acquisizioni da 1h a diversi passi incrementali (poiché è presente una finestra temporale maggiore) il range può salire fino ad un valore pari a 0,4 kPa.

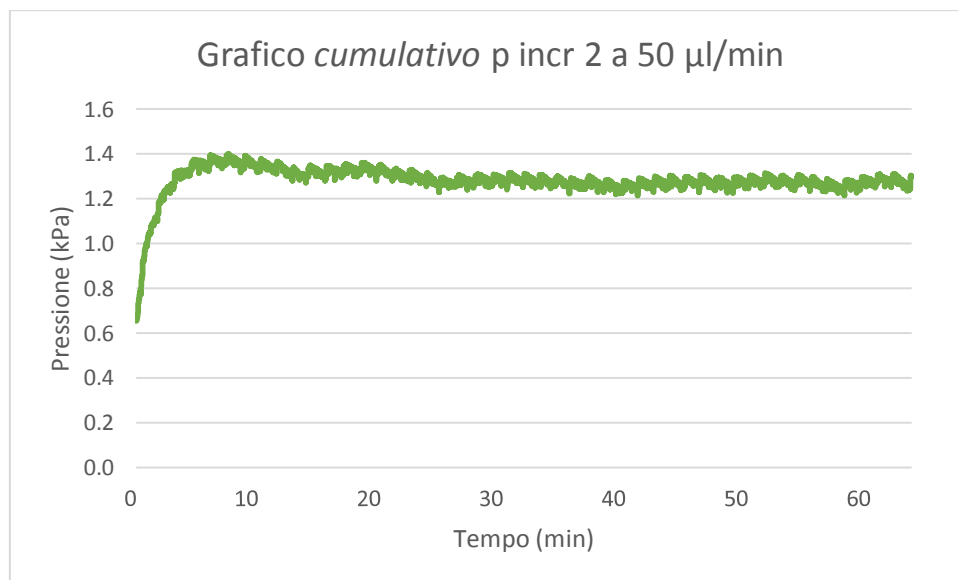


Fig. 41: rappresentazione grafica completa di una acquisizione a passo incrementale pari a 2 e flusso 50 $\mu\text{l}/\text{min}$

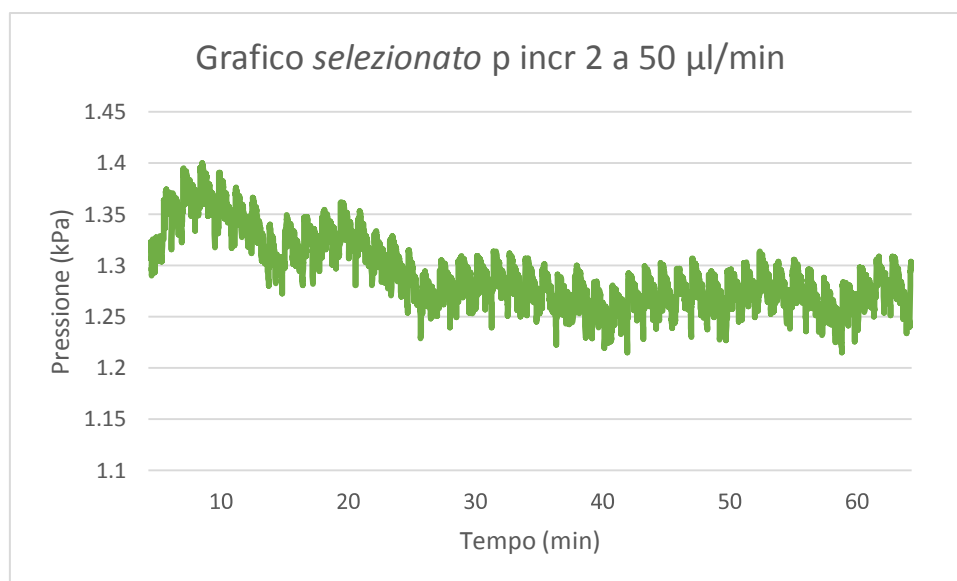


Fig. 42: rappresentazione grafica della sola parte di acquisizione selezionata a passo incrementale pari a 2 e flusso 50 µl/min

Al fine di effettuare gli esperimenti nelle medesime condizioni è stato impostato di default che ogni secondo vengano acquisiti 10 campioni, per cui in fase di analisi, per mantenere la costanza dei dati acquisiti, si va a considerare l'ultima acquisizione ad un determinato istante temporale e si risale a ritroso esattamente di mezz'ora (nel caso dell'acquisizione in statico e in fase di controllo) e di un'ora (per acquisizioni a diversi passi incrementali), in modo tale da perdere meno informazioni possibili: è possibile fare ciò in quanto il software consente di salvare i campioni in un foglio Excel, in cui vengono sviluppate in parallelo le informazioni del tempo di acquisizione e del relativo valore pressorio (espresso in kPa) per quel dato istante.

In totale sono state eseguite venti acquisizioni utili: dodici per i passi incrementali 2, 3, 5 e 7 (tre acquisizioni per ogni passo incrementale, con flusso pari a 50 µl/min) e otto per i medesimi passi incrementali, ma a flusso 100 µl/min (in questo caso, sono state considerate solo due acquisizioni per ogni passo incrementale). In seguito, vengono mostrati i grafici più rilevanti ottenuti dalle acquisizioni relative ai passi incrementali 2, 3, 5 e 7, in riferimento ai flussi: 50 µl/min (rappresentazioni in verde) e 100 µl/min (sviluppati graficamente in arancione).

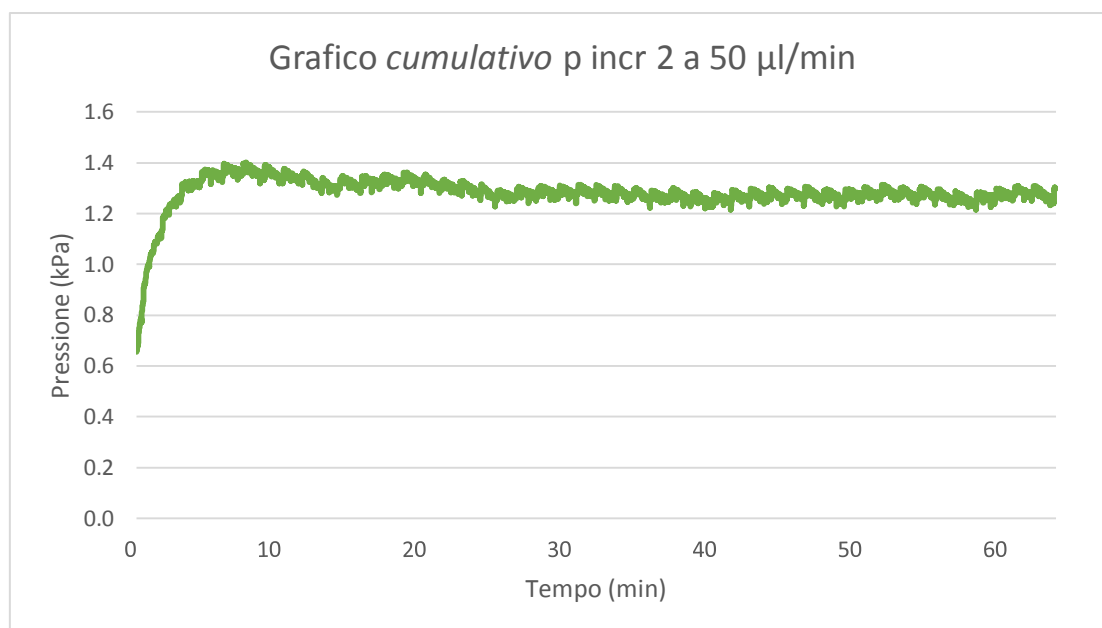


Fig. 43: rappresentazione grafica completa di una acquisizione a passo incrementale pari a 2 e flusso 50 $\mu\text{l}/\text{min}$

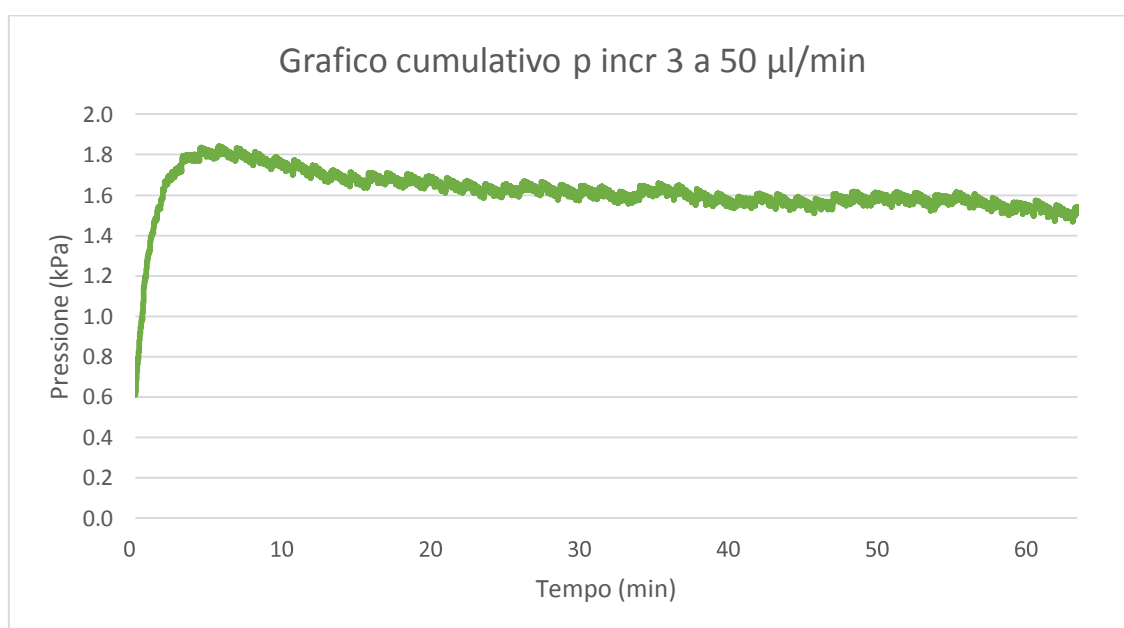


Fig. 44: rappresentazione grafica completa di una acquisizione a passo incrementale pari a 3 e flusso 50 $\mu\text{l}/\text{min}$

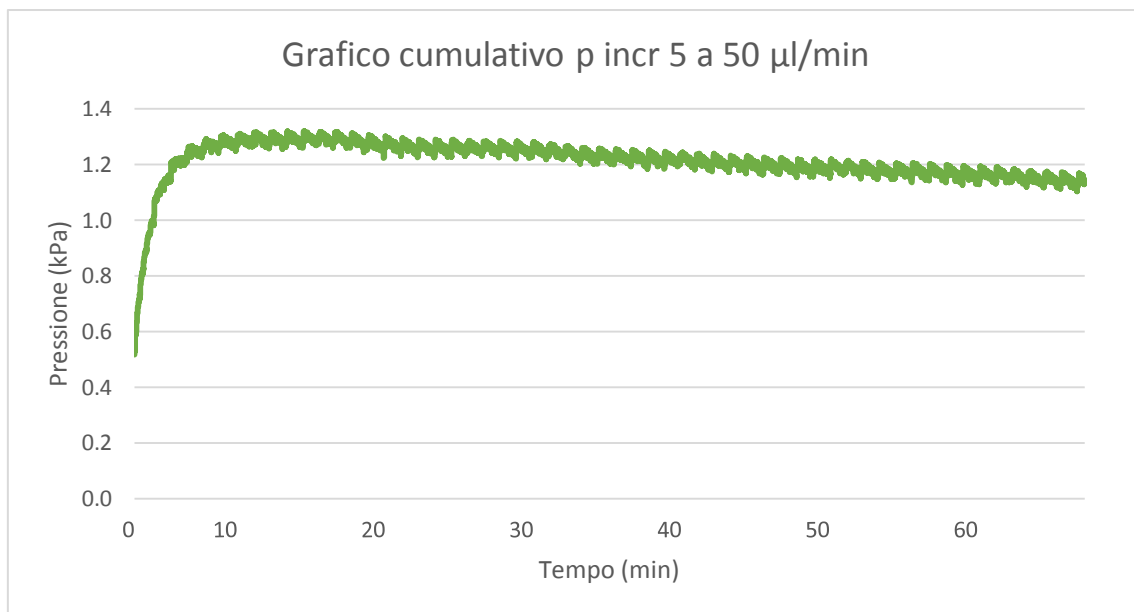


Fig. 45: rappresentazione grafica completa di una acquisizione a passo incrementale pari a 5 e flusso 50 $\mu\text{l}/\text{min}$

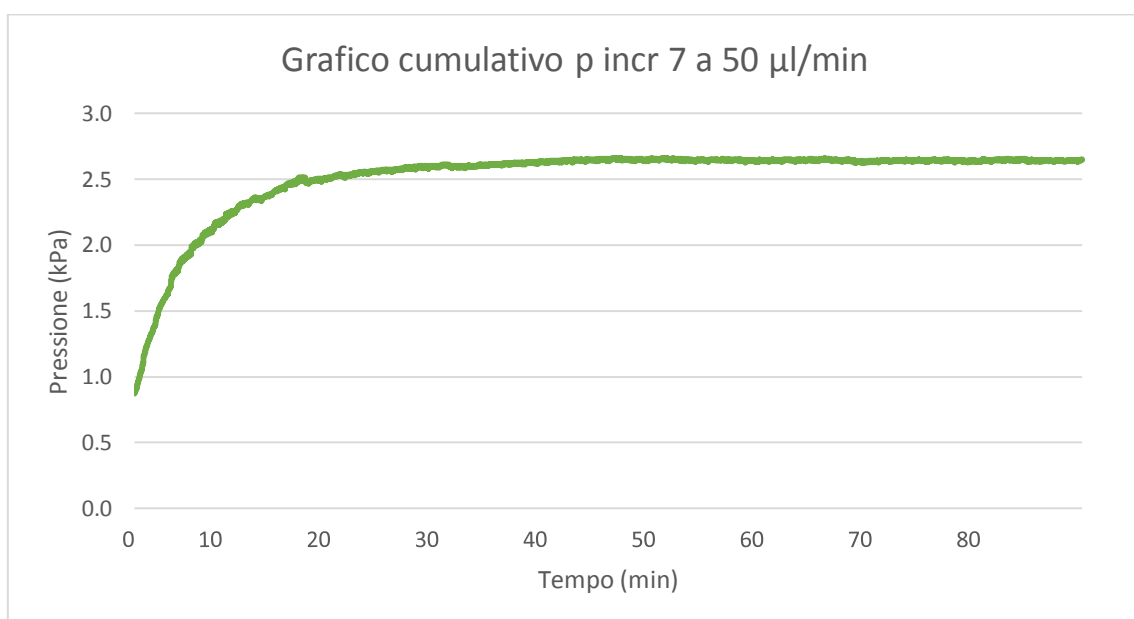


Fig. 46: rappresentazione grafica completa di una acquisizione a passo incrementale pari a 7 e flusso 50 $\mu\text{l}/\text{min}$

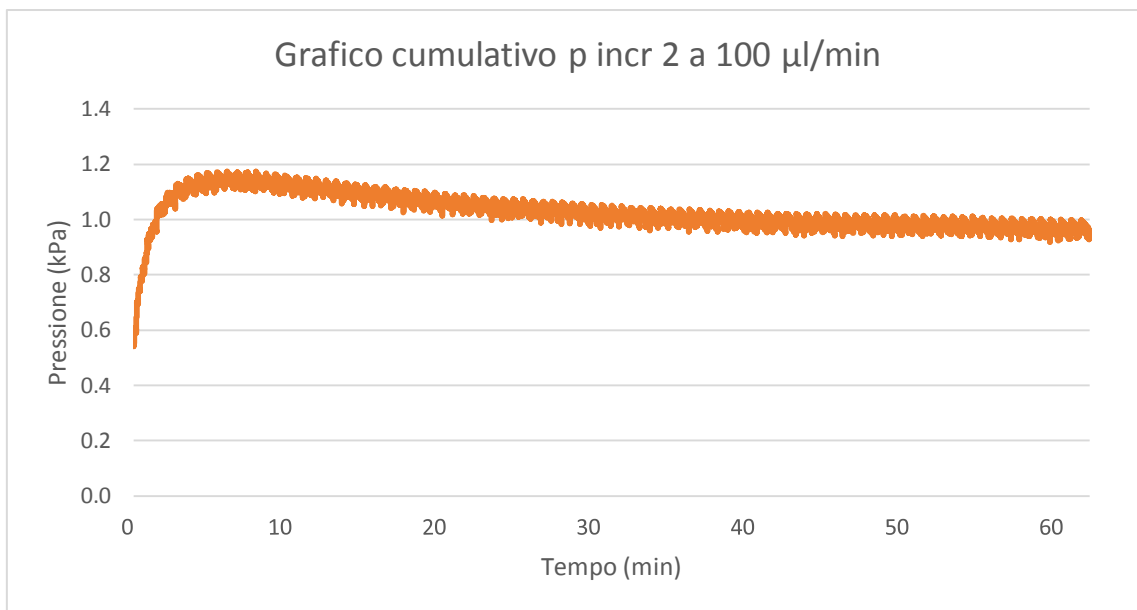


Fig. 47: rappresentazione grafica completa di una acquisizione a passo incrementale pari a 2 e flusso 100 $\mu\text{l}/\text{min}$

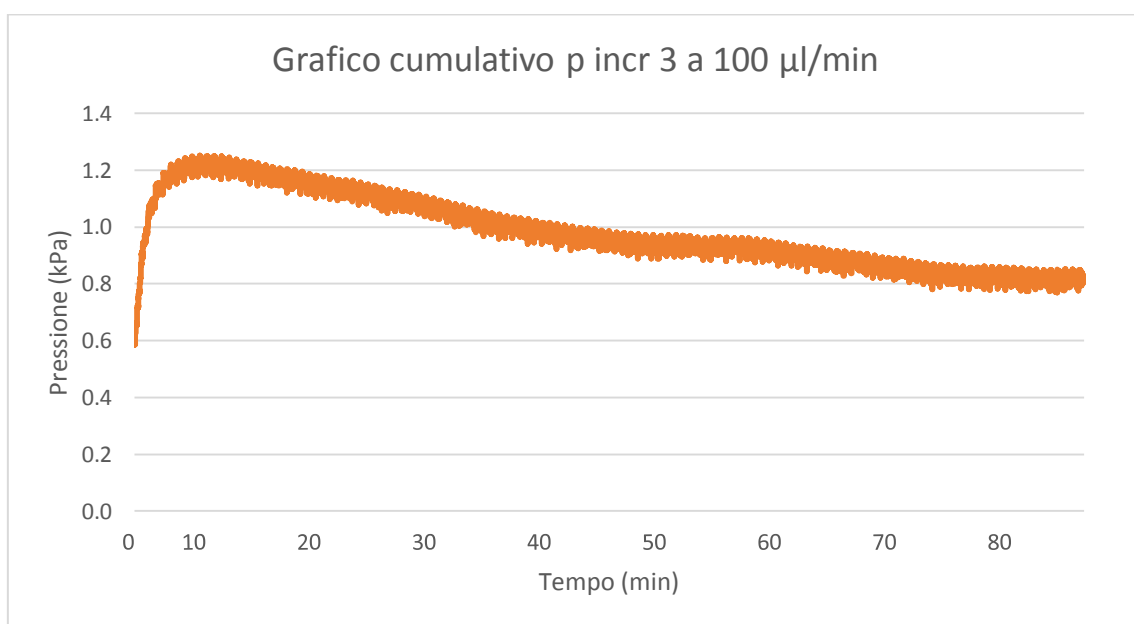


Fig. 48: rappresentazione grafica completa di una acquisizione a passo incrementale pari a 3 e flusso 100 $\mu\text{l}/\text{min}$

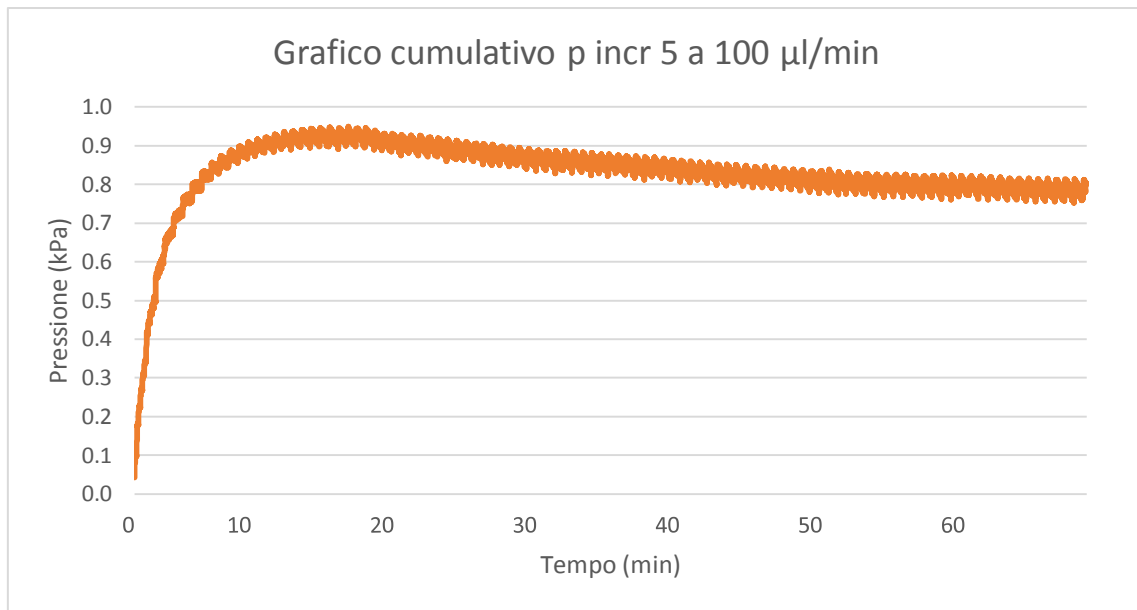


Fig. 49: rappresentazione grafica completa di una acquisizione a passo incrementale pari a 5 e flusso 100 µl/min

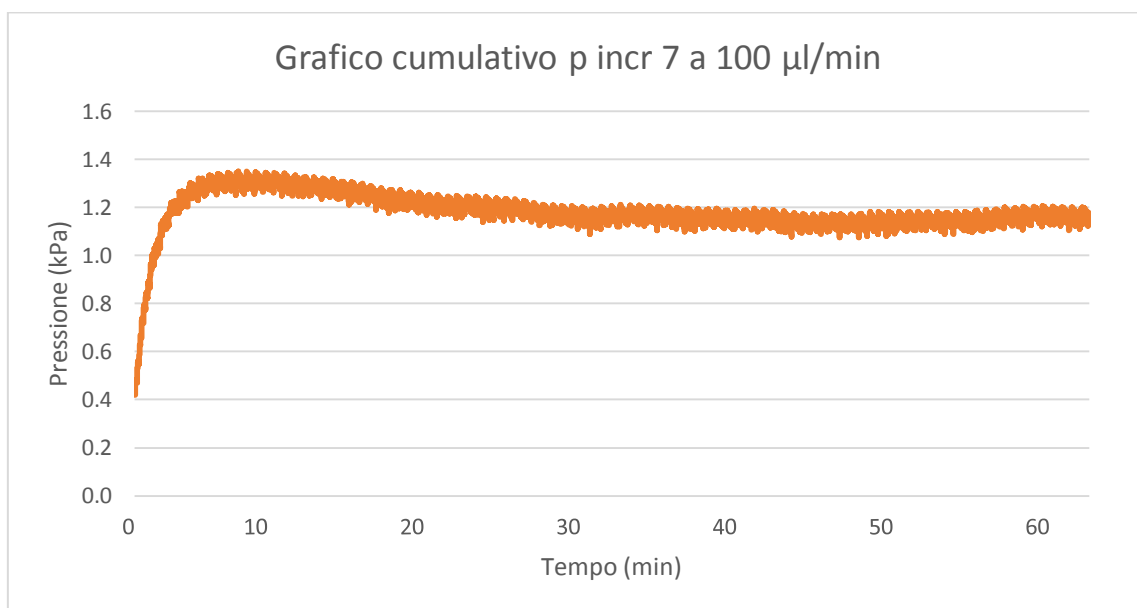


Fig. 50: rappresentazione grafica completa di una acquisizione a passo incrementale pari a 7 e flusso 100 µl/min

Come è possibile stimare dalle precedenti rappresentazioni grafiche, il trend delle acquisizioni risulta simile per le diverse prove ultimate, con la differenza sostanziale che l'ampiezza di oscillazione è ovviamente maggiore nel caso delle acquisizioni a 100 µl/min, poiché il sistema risente di un flusso maggiore. La motivazione per cui questi grafici presentano tra di loro un andamento affine, caratterizzato da un'iniziale risalita ed una successiva fase di stabilizzazione, è legato al fatto che prima di far partire ogni nuova acquisizione si effettua una fase di sfiato, caratterizzata dall'apertura della terza via della mixing chamber all'interno dell'incubatore: in questo modo il

sistema, dopo esser stato sottoposto ad un flusso e una pressione incrementale puntuale per un determinato periodo di tempo, tende a riequilibrarsi e torna ogni volta alle condizioni di pressione iniziali (dovrebbe ristabilizzarsi, nel giro di pochi minuti, al valore di tara iniziale di quando si immette il set-up completo all'interno dell'incubatore). Per avere un riscontro di tale fenomeno viene eseguito un check sul valore della tara rilevato dal software. La successiva acquisizione verrà fatta partire solo quando la cifra visibile sulla schermata del canale sarà pressoché costante (al netto di una minima oscillazione intrinseca del sensore che è sempre presente).

Inoltre, un'ulteriore considerazione che consente di valutare in corso d'opera se effettivamente un'acquisizione sia consona o meno è legata al fatto che la pressione che viene applicata è di tipo locale e puntuale: per tale motivo, ancor più il grafico dovrebbe tipicamente presentare uno sviluppo costante (a meno di piccole oscillazioni dovute alla peristalsi della pompa) e stabilizzarsi fino al raggiungimento di un plateau; in funzione di queste informazioni, pertanto, le acquisizioni utili finali che vengono effettivamente prese in considerazione consistono in una combinazione di una valutazione di una fase che sia il più possibile costante del grafico e di un'analisi del range di kPa su cui si sviluppa l'acquisizione.

Nei successivi grafici (Fig. 51 e 52) vengono riportati gli istogrammi che fanno riferimento ai valori di pressione ottenuti per i singoli rapporti incrementali in funzione delle acquisizioni in fase statica e di sistema con sola pompa accesa ma non attuato (fase di controllo). I valori delle pressioni ottenuti per i singoli rapporti incrementali osservati fanno riferimento alle medie relative a ciascun dato presente nella formula:

$$\text{rapporto incrementale} = \frac{\text{passo incrementale} - \text{statico}}{\text{controllo} - \text{statico}}$$

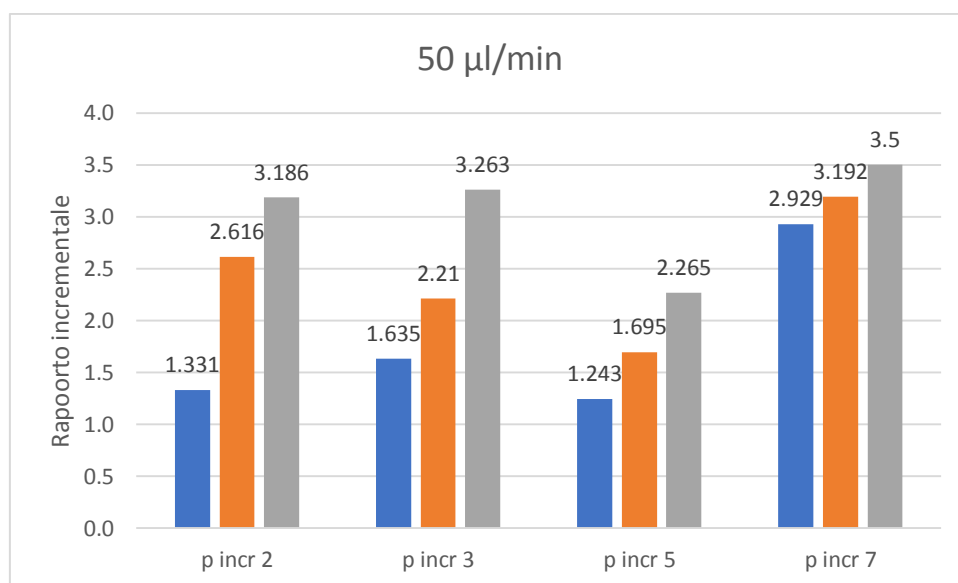


Fig. 51: rappresentazione mediante istogramma delle tre acquisizioni per ogni passo incrementale considerato (2, 3, 5, 7) a flusso 50 µl/min

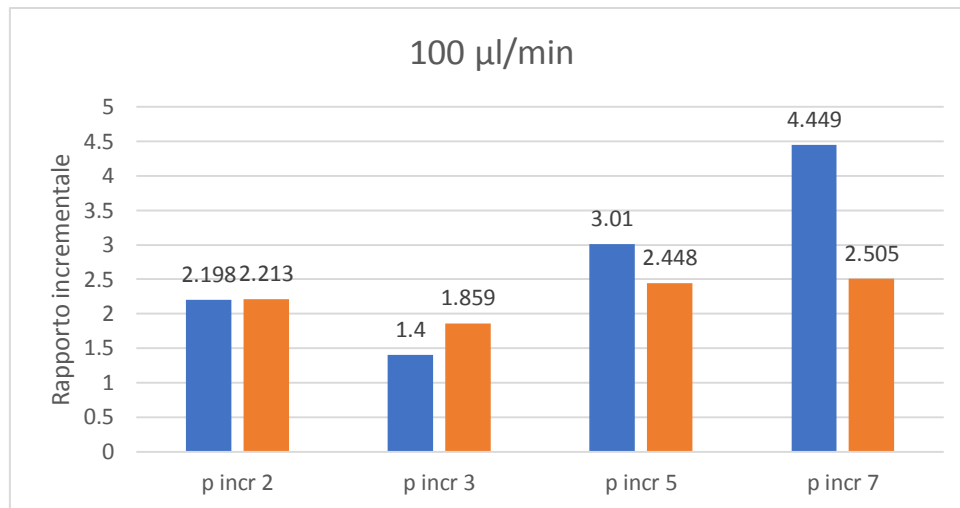


Fig. 52: rappresentazione mediante istogramma delle due acquisizioni per ogni passo incrementale considerato (2, 3, 5, 7) a flusso 100 µl/min

In questo lavoro di tesi, l'acquisizione in fase statica è stata considerata come tara del sistema, per cui tutti i valori sono normalizzati rispetto a tale condizione: in questo modo è possibile andare ad effettuare valutazioni su acquisizioni rilevate in circostanze differenti, senza la necessità di dover acquisire necessariamente più passi incrementali nella medesima giornata.

In ragione di ciò, da questi grafici ci si aspetta, idealmente, uno sviluppo crescente tra le terne di un passo incrementale ed il successivo e che la serie di rapporti incrementali che fanno riferimento al medesimo passo incrementale sia il più possibile simile tra loro. Tuttavia, come si evidenzia dai grafici precedenti e, più in generale, in tutte le circostanze in cui non dovesse risultare effettivamente così, i problemi sono legati in maniera preponderante al set-up del sistema: dall'esperienza maturata in laboratorio, qualsiasi piccola variazione locale (sia dei tubicini siliconici a livello circuitale, sia della connessione sensore-bioreattore) può provocare modifiche fino ad un massimo di 0,6-0,7 kPa e, poiché tipicamente i valori delle medie acquisite tendono a stanziarsi su range bassi (orientativamente, i valori di picco più alti in cui si è sviluppata un'acquisizione arrivano ad un massimo pari a 1-1,2 kPa), queste variazioni sono piuttosto notevoli e influiscono in maniera considerevole il risultato finale. Proprio in funzione delle precedenti considerazioni, in questo lavoro di tesi la fase di organizzazione del set-up del sistema è stata svolta con la massima cura ed attenzione ai dettagli, in modo tale da minimizzare il più possibile gli effetti che possano in alcun modo compromettere la misura dei dati acquisiti.

Inoltre, è importante sottolineare come la minima numerosità necessaria al fine di poter effettuare valutazioni statistiche sia pari a tre: si ricorda che questa cifra è stata raggiunta soltanto per le acquisizioni a passo incrementale pari a 2, 3, 5 e 7 in riferimento al flusso 50 µl/min. Tuttavia, sono state effettuate valutazioni anche a flussi pari a 100 µl/min, ma in questo caso sono state esaminate soltanto le due acquisizioni rilevate per i passi incrementali 2, 3, 5, 7: infatti, poiché la numerosità è solo pari a due, come si può apprezzare dal seguente grafico correlato, non è possibile stabilire quale rapporto incrementale sia più consono alle acquisizioni considerate; sarebbe necessario prendere almeno ancora un'acquisizione per ogni passo incrementale preso in esame, per iniziare a capire quale sia la tendenza dei diversi rapporti incrementali.

Di seguito, vengono riportati i grafici delle medie e delle deviazioni standard delle varie acquisizioni in riferimento al medesimo passo incrementale e le rispettive tabelle con i valori numerici associati (Fig. 53 e 54, Tab. 15 e 16).

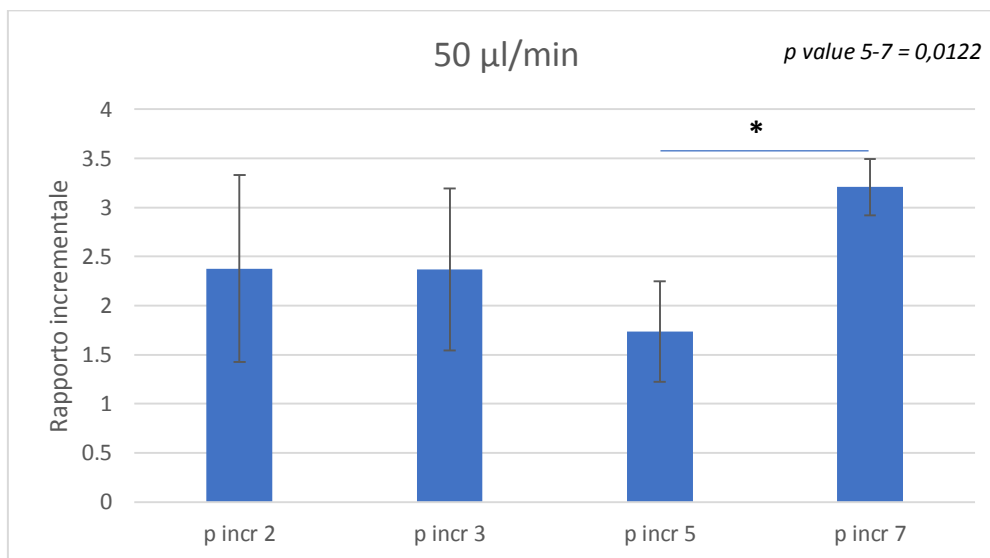


Fig. 53: rappresentazione mediante istogramma delle medie e delle relative deviazioni standard dei diversi rapporti incrementali a 2, 3, 5 e 7 con flusso 50 µl/min

50 µl/min	P incr 2	P incr 3	P incr 5	P incr 7
Media	2,378	2,369	1,734	3,207
Dev. Standard	0,950	0,826	0,512	0,286

Tab. 15: dati rilevati dai rapporti incrementali per i passi 2, 3, 5 e 7 a flusso 50 µl/min

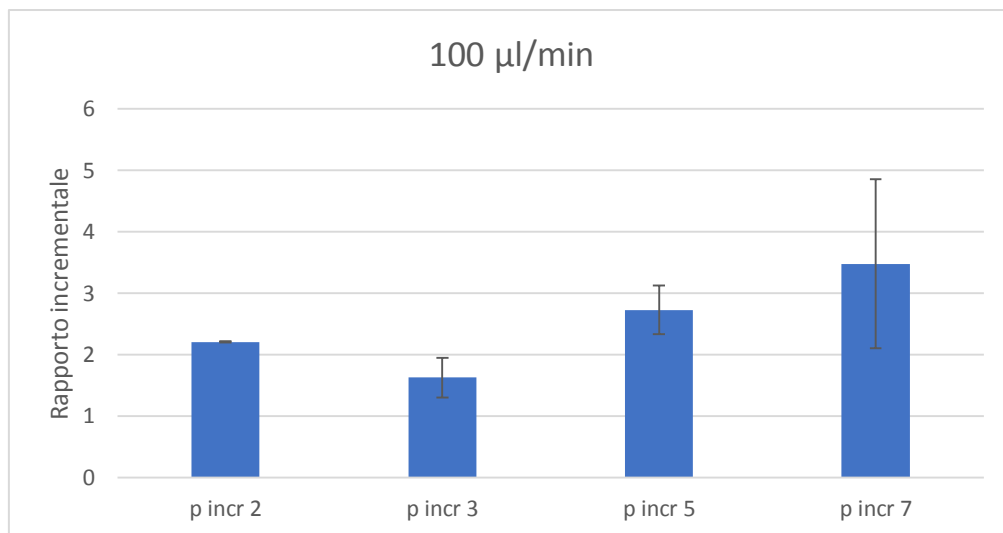


Fig. 54: rappresentazione mediante istogramma delle medie e delle relative deviazioni standard dei diversi rapporti incrementali a 2, 3, 5 e 7 con flusso 100 µl/min

100 µl/min	P incr 2	P incr 3	P incr 5	P incr 7
Media	2,206	1,630	2,729	3,477
Dev. Standard	0,011	0,325	0,397	1,375

Tab. 16: dati rilevati dai rapporti incrementali per i passi 2, 3, 5 e 7 a flusso 100 µl/min

Come si evince dai precedenti grafici e dalle rispettive tabelle, soltanto tra il valore di media delle acquisizioni al passo incrementale 5 e al passo incrementale 7 (per il flusso pari a 50 µl/min) vi è una differenza statisticamente significativa, avendo ottenuto $p < \alpha$. Per quanto riguarda i confronti tra le medie a passo incrementale 3 e 5 per il flusso pari a 100 µl/min risulta che ci sia una differenza non abbastanza statisticamente significativa ($p \text{ value} = 0,078$), mentre per tutte le altre comparazioni risultano differenze non statisticamente significative.

La motivazione principale per cui ci sia poca significatività statistica tra le coppie di dati è prevalentemente correlata alla mediocre numerosità delle acquisizioni: come già accennato, tre è il numero minimo di dati su cui effettuare delle valutazioni statistiche; l'idea di riuscire ad ottenere più dati andando a dare maggior consistenza agli esperimenti e, di conseguenza, fornire più rapporti incrementali tende a favorire un'indicazione più ottimale dei trend su cui tali rapporti incrementali si dovrebbero stanziare, andando a definire via via un'indicazione più precisa dell'effettivo aumento locale di pressione all'interno del bioreattore LB2.

3.2 Valutazione della co-coltura mediante staining

Dopo aver effettuato la fase di coltura cellulare statica della linea endoteliale HULEC-5a ed epiteliale A549, rispettivamente sul compartimento basale ed apicale della membrana elettrospinnata in PCL-gelatina, sono stati eseguiti gli staining del nucleo (Fig. 55A e 55B) e dei citoscheletri (Fig. 55C e 55D), nonché il merge delle immagini in riferimento alla combinazione degli staining del nucleo e dei citoscheletri per la linea A549 (Fig. 55E) e per la HULEC-5a (Fig. 55F).

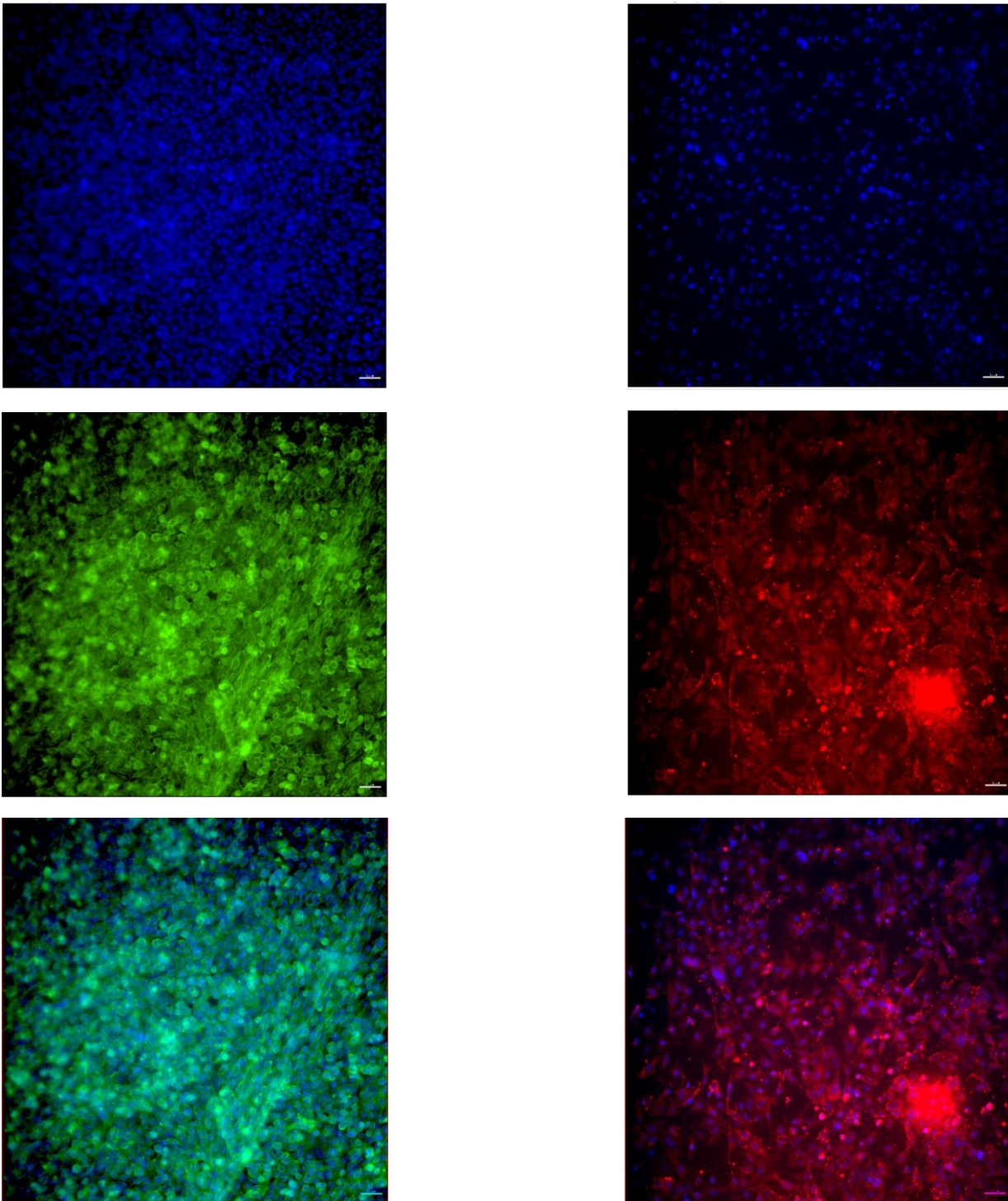


Fig. 55: A. Rappresentazione delle cellule epiteliali A549 con colorazione dei nuclei mediante DAPI; B. Rappresentazione delle cellule endoteliali HULEC-5a con colorazione dei nuclei mediante DAPI; C. Rappresentazione delle cellule epiteliali A549 con colorazione dei citoscheletri mediante Phalloidina-FITC; D. Rappresentazione delle cellule endoteliali HULEC-5a con colorazione dei citoscheletri mediante Phalloidina con Rodamina; E. Rappresentazione del merge tra i nuclei (DAPI, blu) e i citoscheletri (Phalloidina-FITC) delle cellule epiteliali A549; F. Rappresentazione del merge tra i nuclei (DAPI, blu) e i citoscheletri (Phalloidina-Rodamina) delle cellule endoteliali HULEC-5a

Come si evince dalle raffigurazioni precedenti e a conferma della differenza tra le due tipologie cellulari, la linea epiteliale presenta una distribuzione di cellule morfologicamente e dimensionalmente più piccola rispetto all'endoteliale, tuttavia risulta in una densità maggiore a parità di *bar scale*. Le cellule A549 vengono coltivate indicativamente 24h dopo le HULEC-5a e presentano un maggiore rate proliferativo rispetto le cellule HULEC-5a ⁴⁷.

Inoltre, di particolare interesse è la grande influenza che ha la membrana su cui è avvenuta la fase di coltura: infatti, in base alle differenze di concentrazione di rapporti in PCL-gelatina, vi sono diverse distribuzioni del citoscheletro di actina. In questo lavoro di tesi è stata ottimizzata una membrana in PCL-gelatina con rapporto 80-20, in modo da rappresentare in prevalenza le caratteristiche di proprietà meccaniche fornite dal materiale di origine sintetica, ma considerare anche i benefici derivanti dalla presenza della gelatina, di derivazione naturale; da letteratura, è stato evidenziato come prima del raggiungimento di uno stato di confluenza, le cellule epiteliali esibiscono una minor tendenza nel presentare una morfologia diffusa (*spreading*), anche eventualmente in presenza di superfici più rigide con prevalenza di PCL o meno dense, con un contributo più alto di gelatina; invece, le endoteliali sono favorite ad avere una tendenza a svilupparsi secondo strutture più diffuse a prescindere dalla superficie su cui sono state coltivate ²⁸.

Sempre nel lavoro sperimentale svolto da Higueta-Castro et al. ²⁸, in riferimento alla fase di coltura della linea cellulare A549 su una membrana bifasica in PCL-gelatina, è stato evidenziato come queste siano cresciute sulla membrana in un monostrato di cellule confluenti e abbiano portato alla formazione di proteine di membrana E-caderina, le quali svolgono un ruolo preponderante nel contatto tra cellule e nella polarizzazione delle stesse, in condizioni di coltura ALI ²⁸.

In un'altra ricerca, effettuata da Shibing Yu et al. ⁴⁸, sono state eseguite co-colture di più linee cellulari, tra cui l'endoteliale HULEC-5a: la fase di coltura è avvenuta seguendo i protocolli dell'American Type Culture Collection, è durata 72h e ciò che è stato possibile evidenziare è che le cellule HULEC-5a hanno una tendenza a presentare caratteristiche attrattive per la migrazione, la proliferazione e la sopravvivenza cellulare ⁴⁸.

3.3 Analisi della permeabilità di membrana

La valutazione di permeabilità di membrana è stata effettuata in assenza di coltura cellulare, in condizioni statiche e all'interno del bioreattore commerciale LB2; viene stimata mediante la misura del rate diffusivo di Fluoresceina isocianato (FITC)-Destrano 70 kDa trasportato dal comparto apicale a quello basale del LB2.

In linea di principio, questa tipologia di test viene svolta sia in assenza di cellule, al fine di valutare l'integrità della membrana stessa senza l'influenza di alcuna fase di coltura, sia in presenza di cellule: in quest'ultima circostanza ciò che ci si aspetta è una permeabilità minore, dovuta al fatto che le linee cellulari nel tempo tendono a creare monostrati confluenti e formare TJ tali da infittire la struttura della membrana e renderla meno predisposta al passaggio di molecole ⁴⁹.

Estendendo i riferimenti al sistema LB2 e prendendo ispirazione dal lavoro sviluppato da Huang et al. ⁵⁰ è stata posta una soluzione di FITC-Destrano 70 kDa sul comparto apicale di tale bioreattore commerciale e sono stati successivamente prelevati dei campioni di liquido (dell'ordine dei 100 µl)

dal comparto basale dopo un tempo pari a 1h: al fine di determinare l'intensità della fluorescenza è stato utilizzato uno spettrofluorimetro (ossia un lettore di piastre a fluorescenza), con banda di eccitazione pari a 485 nm e di emissione di 530 nm.

Successivamente, per avere una stima quantitativa del passaggio di fluido, è necessario effettuare il calcolo della permeabilità apparente (P_{app}):

$$P_{app} = \frac{\Delta Q}{A \times \Delta t \times C_0}$$

Dove il contributo $\Delta Q/\Delta t$ corrisponde alla variazione della concentrazione di FITC-Destrano nel compartimento basale in un determinato intervallo di tempo (espresso in secondi, per cui sono stati considerati 3600 s), A è l'area superficiale della membrana (pari a 4,91 cm², poiché il diametro della membrana è di 25 mm) e infine C_0 è il valore della concentrazione di partenza di FITC-Destrano presente nel comparto apicale. Tutti i dati sono noti, ad eccezione del valore di ΔQ che viene determinato mediante una curva di calibrazione (Fig. 56), in cui si relaziona l'intensità della fluorescenza in funzione della concentrazione.

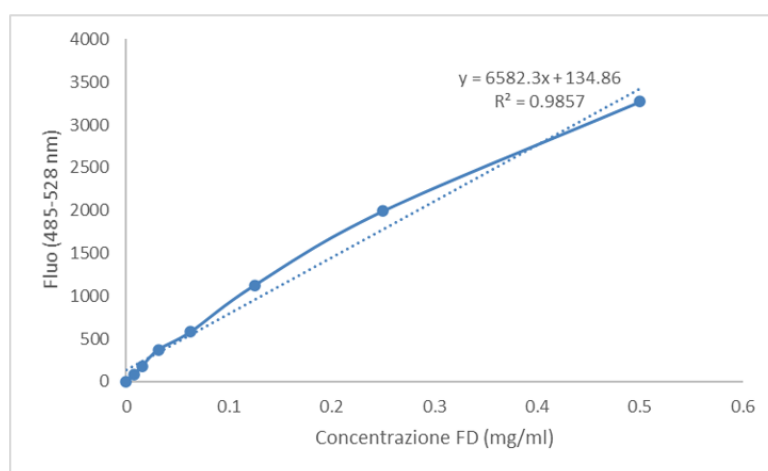


Fig. 56: rappresentazione della curva di calibrazione ottenuta sperimentalmente

Attraverso tale retta è stato possibile ricavare inizialmente il valore di ΔQ pari a 0.34 ± 0.03 mg/ml. Quindi, sfruttando questo dato è stato possibile ricavare la P_{app} pari a $8.6 \times 10^{-5} \pm 6.9 \times 10^{-6}$. Tale risultato è confrontabile con il valore di P_{app} trovato da Higueta-Castro et al.²⁸ per le membrane elettrospinnate in PCL-Gel.

Anche in questa circostanza è necessario porre l'accento sulla dipendenza dal blend dei componenti costitutivi della membrana: infatti, a parità di test in assenza di cellule, se si fossero considerati rapporti di PCL-gelatina con ancor più prevalenza di PCL ci sarebbe stata una permeabilità minore (in quanto la presenza di un maggior quantitativo di materiale sintetico si traduce in uno sviluppo di fibre più fitte all'interno della membrana); viceversa, aumentando la dose di gelatina, si sarebbero sviluppate maglie meno dense e di conseguenza la permeabilità sarebbe stata maggiore²⁸.

Oltre che effettuare test di permeabilità di membrana in assenza ed in presenza di cellule, spesso in letteratura si considerano anche sviluppi a differenti time step, fino ad un massimo di 24h-48h ⁴⁹.

CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI

L'architettura polmonare è talvolta messa a rischio a causa di una forte esposizione a batteri, virus e polveri urbane: tutto ciò in determinate circostanze può provocare una serie di malattie respiratorie che tendono ad inficiare la salute degli esseri umani. In particolare, la zona che risente maggiormente la presenza di questi fattori negativi è proprio la barriera alveolo-capillare, che è l'ambiente in cui avvengono gli scambi di gas a livello polmonare: nello specifico, il comparto alveolare è la sede di questi possibili fattori di rischio e la condizione conseguente è il trasporto di tali fattori nel circolo sanguigno e verso altri organi del corpo umano, causando problematiche importanti in termini di salute ³¹.

L'ingegneria tissutale è un settore terapeutico che convoglia più discipline con l'idea di ricreare, ingegnerizzare e ricostruire determinati organi e tessuti. Nell'ambito della riproducibilità di un tessuto o di un organo, particolare menzione va ai modelli *in vitro*, il cui obiettivo è quello di mimare le condizioni simil-fisiologiche del corrispettivo ambiente *in vivo* andando ad evitare (ove possibile) la sperimentazione su animali e su esseri umani. Oltre a ciò, lo sviluppo di questi modelli può essere testato in diverse applicazioni al fine di validare l'efficacia e la sicurezza di un prodotto farmaceutico o cosmetico prima della sua immissione sul mercato (in questo contesto si parla di sperimentazione preclinica) e favorire la così detta "medicina personalizzata", ossia un modello di medicina che possa, per l'appunto, personalizzare determinate cure e prodotti su misura specifici per un dato paziente.

In questo contesto, l'ingegneria tissutale fa fede a tre pilastri fondamentali: gli scaffold, le cellule e i fattori di regolazione. Gli scaffold hanno il compito di fornire supporto per l'adesione, la proliferazione e il differenziamento cellulare, con l'obiettivo di mimare il più possibile la matrice extracellulare; possono ricapitolare svariate condizioni (sia fisiologiche, sia patologiche) influenzando in maniera particolare il comportamento delle cellule. È di fondamentale importanza la scelta del materiale di sviluppo degli scaffold: tipicamente, le categorie di biomateriali più utilizzate sono i polimeri naturali e i polimeri sintetici. I primi presentano caratteristiche ottimali dal punto di vista della biocompatibilità e della degradabilità (in quanto derivanti da componenti dalla matrice extracellulare), tuttavia sono carenti dal punto di vista delle proprietà meccaniche: viceversa, i materiali sintetici presentano le caratteristiche complementari; per questo motivo, nell'ottica di sviluppare modelli che possano mimare e riprodurre il più fedelmente possibile gli organi e i tessuti *in vivo*, garantendo un grado di biomimetività via via maggiore, si sta cercando di implementare nuove tipologie di materiali che vengono definiti bioartificiali, ossia costituiti da una miscela tra polimeri naturali e sintetici in modo tale da sviluppare substrati che beneficino delle proprietà presenti in entrambe le categorie di polimeri utilizzate. Nell'ambito dell'ingegneria tissutale, un ottimo materiale bioartificiale che viene spesso utilizzato come substrato in differenti applicazioni è il blend costituito da PCL-gelatina: il primo è un polimero sintetico semicristallino con ottime proprietà meccaniche e di biodegradabilità e viene associato alla gelatina (derivato del collagene, componente della matrice extracellulare) che aiuta a migliorare la biocompatibilità e la bioattività del blend polimerico. Negli impieghi di modelli polmonari *in vitro*, questa categoria di membrana rappresenta un ottimo scaffold con lo scopo di mimare nel modo più fisiologico possibile la membrana basale della barriera alveolo-capillare.

L'obiettivo di questo lavoro di tesi è quello di implementare ed ottimizzare un sistema dinamico che consenta di riprodurre le condizioni *in vivo* della barriera alveolo-capillare, andando a valutare

l'influenza di incrementi pressori crescenti imposti sulla membrana commerciale in PET (fornita dall'azienda IVTech S.r.l) con porosità pari a $0,45\ \mu\text{m}$, all'interno del bioreattore LB2. Un'ottima organizzazione del set-up del sistema circuitale completo costituito da bioreattore LB2, pompa peristaltica LF, modulatore di pressione LivePa (forniti dall'azienda IVTech S.r.l) e trasduttore di pressione PX409-USBH-525171 (acquistato presso l'azienda Omega) è il fulcro di questo lavoro: dall'esperienza maturata nel corso dei mesi, ciò che è stato possibile evidenziare è che anche soltanto alcune impercettibili modifiche circuitali del sistema o della connessione tra sensore e bioreattore possono inficiare il risultato delle acquisizioni; il motivo principale di queste variazioni è correlato all'estrema sensibilità del sensore di pressione. In laboratorio sono stati analizzati più passi incrementali (2, 3, 5, 7) ad un medesimo range di flusso ($50\ \mu\text{l/min}$), al fine di aumentare la numerosità e la consistenza dei dati: dai risultati ottenuti è possibile evincere come le medie dei rapporti incrementali presentino un trend crescente a partire dal passo incrementale 2 a salire (come ci si aspetterebbe), al netto del passo incrementale 5 (in cui, in media, le medie dei rapporti incrementali risultano inferiori): una possibile motivazione può essere correlata alla scarsa numerosità delle acquisizioni, in quanto per ogni passo incrementale sono state considerate solamente tre acquisizioni (corrispondenti al numero minimo affinché si possano effettuare valutazioni statistiche). Tuttavia, in alcune circostanze sono state eseguite ulteriori acquisizioni sempre ai medesimi passi incrementali, ma in quei casi il rapporto incrementale era piuttosto rilevante e considerevole rispetto agli altri rapporti incrementali con cui avrebbe dovuto confrontarsi: in queste condizioni specifiche, quel dato valore di rapporto incrementale è stato valutato come un outlier e non considerato ai fini delle valutazioni statistiche di questo lavoro di tesi, poiché si discostava in maniera ingente dagli altri risultati ottenuti (e di conseguenza avrebbe portato ad un aumento significativo in termini di deviazione standard).

Analisi successive verranno svolte focalizzandosi sull'implementazione del sistema a flussi maggiori, quali $100\ \mu\text{l/min}$ (corrispondente al valore di *flow rate* più simil-fisiologico presente nei capillari sanguigni che si interfacciano con gli alveoli polmonari), $200\ \mu\text{l/min}$ e $400\ \mu\text{l/min}$ e andando ad esaminare le prestazioni di membrane commerciali in NY (fornite dall'azienda IVTech) con porosità pari a $100\ \mu\text{m}$ e membrane bioartificiali in PCL-gelatina prodotte nei laboratori presso il Politecnico di Torino: quest'ultime sono state sviluppate mediante la tecnica dell'elettrospinning, che consente di ottenere un'architettura a nanofibre randomiche più simile alla corrispettiva ECM *in vivo*; in funzione di ciò, è estremamente rilevante riuscire ad ottimizzare al meglio i parametri di processo e di sistema, in ottica di ottenere una tipologia di fibre che sia il più possibile ottimale e priva di difetti superficiali o beads. Inoltre, verrà presa in considerazione la possibilità di effettuare acquisizioni mediante l'aggancio (e la successiva impostazione di valori di sovrappressione attraverso il modulatore di pressione LivePa) sul tubicino d'uscita della camera apicale andando così a valutare eventuali differenze di pressione rispetto alla medesima condizione ma agganciando il corrispettivo tubicino basale.

A partire dai risultati conseguiti in questo lavoro di tesi, al fine di rendere sempre più simil-fisiologiche le condizioni di replicazione della barriera alveolo-capillare, sarebbe possibile valutare le prestazioni di un modulatore di pressione programmabile che consideri sia le sovrappressioni costanti, sia quelle cicliche (mimando così le due fasi respiratorie). A tal proposito, nel lavoro di Cei⁵¹ viene descritta la progettazione, la modellazione computazionale e lo sviluppo di una particolare tipologia di bioreattore che possiede la caratteristica di avere un'interfaccia aria-liquido in movimento (MALI); attraverso questo lavoro è stato anche valutato lo studio della deposizione di

particelle di aerosol sul comparto apicale del bioreattore, in cui sono presenti cellule epiteliali coltivate su una membrana elastica e porosa. Inoltre, oltre all'imitazione della fase di coltura ALI, è stato replicato il moto meccanico del tessuto polmonare durante le fasi di inspirazione ed espirazione ⁵¹.

Nello specifico, questo sistema è costituito da una camera basolaterale (ossia inferiore, dal cui lato della membrana verranno alloggiare le cellule endoteliali) che viene perfusa con terreno di coltura ad imitare la circolazione sanguigna nel lume capillare ed una camera apicale che mima il sistema a contatto con l'aria e dove sono stanziati le cellule epiteliali. Sempre in questo comparto superiore sono collegati: un nebulizzatore (a favorire la generazione di aerosol, per effettuare test successivi riguardo applicazioni tossicologiche e terapeutiche) e un sistema di attuazione pressorio che consenta di ciclare la pressione nell'intorno di uno specifico range (tra 0-7 kPa), andando così a mimare la sollecitazione meccanica periodica che risente la membrana durante le fasi respiratorie. È stato dimostrato come la deformazione della membrana può essere monitorata andando a misurare le variazioni pressorie che derivano dal moto del mezzo di coltura stanziato nella camera basolaterale e, inoltre, le cellule epiteliali polmonari che sono state coltivate in questo sistema non risentono della stimolazione meccanica in condizioni di interfaccia ALI, mantenendo le proprie condizioni di vitalità ⁵¹.

Un ulteriore sviluppo futuro in riferimento agli esperimenti ottimizzati in questo lavoro di tesi è stato condotto da Doryab et al. ³¹, dove è stato presentato un bioreattore denominato CIVIC (*Cyclic in vitro cell-stretch*) in cui sono state effettuate prove di stretching ciclico sulla linea cellulare epiteliale nel comparto apicale e sono state verificate le condizioni di allungamento e il modulo elastico della membrana su cui viene effettuata la coltura. Oltre a ciò, è stata ottimizzata una nuova tipologia di membrana, definita BETA: è una membrana copolimerica biomimetica, con ottime caratteristiche in termini di bioattività; è stata modificata in modo tale da cercare di migliorare le caratteristiche di permeabilità ed elasticità, sviluppando un rapporto ottimale di blend tra PCL e gelatina corrispondente, rispettivamente, a 9,35% e 6,34% (w/v). Con la membrana BETA ottimale è stato valutato l'allungamento lineare meccanico ciclico in condizioni fisiologiche, ossia con allungamento pari al 10% e frequenza 0,33 Hz; anche in questo lavoro sono state effettuate valutazioni di trasporto transepiteliale di NP (di dimensioni pari a 100 nm) dal comparto apicale a quello basolaterale, in condizioni ALI. I risultati ottenuti dimostrano come l'allungamento in condizioni fisiologiche tenda a migliorare la condizione di assorbimento cellulare delle NP attraverso la barriera. In ragione di ciò, quest'ultima diventa anche maggiormente permeabile per le NP ed anche per particelle dimensionalmente maggiori (fino a 1000 nm) ³¹.

Applicazioni future potrebbero concentrarsi sull'utilizzo di altri tipi di cellule, non solo cellule di linea, ma anche primarie: quest'ultime hanno il pregio di essere già differenziate, tuttavia presentano degli svantaggi in quanto vanno prima incontro a senescenza e hanno un'alta variabilità in dipendenza da un paziente ad un altro.

In linea generale, per poter sviluppare una barriera alveolo-capillare *in vitro* che sia il più possibile funzionale, è fondamentale che ci siano i presupposti affinché si formino giunzioni strette (TJ) e giunzioni aderenti (AJ) tra cellule adiacenti. A livello epiteliale queste caratteristiche sono più marcate, mentre le cellule endoteliali tendono a non mostrare una chiara differenziazione morfologica in TJ e AJ. Tuttavia, la linea cellulare A549 non presenta intrinseche potenzialità di formare di TJ: per ovviare a questa problematica è possibile trattare le cellule con desametasone

che stimoli la formazione delle TJ. Inoltre, in studi futuri, sarà possibile cercare di utilizzare un'altra tipologia di cellule che possa favorire e indirizzare maggiormente la formazione di TJ, al fine di formare una barriera alveolo-capillare con adeguate caratteristiche di permeabilità. Le cellule A549 sono state utilizzate in molti studi biofarmaceutici e applicazioni di *drug screening*. In letteratura sono presenti alternative alla linea cellulare A549, ad esempio la *NCI-H441*: è in grado di formare un monostrato polarizzato e di stabilire TJ, presentando caratteristiche morfologiche di cellule alveolari di tipo II.

Un'ulteriore linea che potrebbe sostituire la A549 in funzione di tali applicazioni è la *Calu-3*, adenocarcinoma di origine epiteliale ghiandolare. Anche questa tipologia di cellule tende a formare giunzioni strette *in vitro*, inoltre possono essere coltivate all'interfaccia ALI, mostrando un maggior potenziale come modello di strato epiteliale: queste linee cellulari potrebbero essere utilizzate in co-cultura con cellule endoteliali, al fine di affinare sempre di più un modello che mimi la corrispettiva barriera alveolo-capillare *in vivo*.

Infine, nell'ottica di riprodurre condizioni patologiche di questo sistema, è possibile andare a simulare determinate condizioni di occlusione delle vie aeree, come succede *in vivo* durante, ad esempio, lo sviluppo di edemi polmonari: questo esperimento consente di valutare la sopravvivenza di cellule epiteliali anche in funzione del substrato su cui sono coltivate. In riferimento a ciò, la simulazione degli eventi di riapertura delle vie aeree ha portato ad una percentuale più alta di morte cellulare per le cellule coltivate su fibre PCL rispetto a quelle su fibre contenenti solo gelatina o blend PCL-gel. Anche in questo caso, il medesimo esperimento potrebbe essere riprodotto considerando ulteriori tipi di linee cellulari, andando ad ottimizzare altri rapporti di blend copolimerico PCL-gelatina.

BIBLIOGRAFIA

1. Standring, S. Anatomia del Gray 41. **2**,.
2. E., B. G. B. A. B. Anatomia Umana 2. **Edi.Ermes**,.
3. Jones, J. G., Minty, B. D. & Royston, D. The physiology of leaky lungs. *Br. J. Anaesth.* **54**, 705–721 (1982).
4. Hellings, P. W. & Steelant, B. Epithelial barriers in allergy and asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **145**, 1499–1509 (2020).
5. Ochs, M. *et al.* On top of the alveolar epithelium: Surfactant and the glycocalyx. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, (2020).
6. <https://www.msmanuals.com/it-it/casa/disturbi-polmonari-e-delle-vie-respiratorie/tumori-polmonari/tumore-del-polmone>.
7. Chiono, V. Appunti di New Advances in Alternative Preclinical Trials. (2021).
8. Tonda-Turo, C. Appunti di Sistemi Biomimetici. (2020).
9. Shen, H. *et al.* Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture and future development. *Micromachines* **12**, 1–21 (2021).
10. Zuchowska, A., Jastrzebska, E., Chudy, M., Dybko, A. & Brzozka, Z. 3D lung spheroid cultures for evaluation of photodynamic therapy (PDT) procedures in microfluidic Lab-on-a-Chip system. *Anal. Chim. Acta* **990**, 110–120 (2017).
11. Barkauskas, C. E. *et al.* Lung organoids: Current uses and future promise. *Dev.* **144**, 986–997 (2017).
12. Massai, D. Appunti di Bioreattori. (2019).
13. Morbiducci, U. & Turo, C. T. Bioreattori. (2016).
14. Chen, X., Zhang, Y. S., Zhang, X. & Liu, C. Organ-on-a-chip platforms for accelerating the evaluation of nanomedicine. *Bioact. Mater.* **6**, 1012–1027 (2021).
15. Dongeun Huh,^{1,2} Benjamin D. Matthews,^{2,3} Akiko Mammoto,² Martín Montoya-Zavala,^{1,2} Hong Yuan Hsin,² Donald E. Ingber^{1,2, 4*}. Reconstituting Organ-Level Lung. *Science* (80-.). 1662–1668 (2010).
16. Li, K. *et al.* Biomimetic human lung-on-a-chip for modeling disease investigation. *Biomicrofluidics* **13**, (2019).
17. Stucki, A. O. *et al.* A lung-on-a-chip array with an integrated bio-inspired respiration mechanism. *Lab Chip* **15**, 1302–1310 (2015).
18. Chiono, V. Appunti di Ingegneria per la Medicina Rigenerativa. (2019).
19. Trinchese, G. F., Calabrese, E., Calabrò, G. & Lisanti, F. Gli scaffold in medicina rigenerativa Scaffolds in regenerative medicine. *LO SCALPELLO-OTODI Educ.* **33**, 230–236 (2019).
20. Couchman, J. R. & Pataki, C. A. An Introduction to Proteoglycans and Their Localization. *J. Histochem. Cytochem.* **60**, 885–897 (2012).
21. Monesi, V. Istologia. *Piccin* **2**, (2002).
22. Zhou, Y. *et al.* Extracellular matrix in lung development, homeostasis and disease. *Matrix Biology* vol.

73 77–104 (2018).

23. C, S., J, G. & M, K. Extracellular matrix microenvironment contributes actively to pulmonary fibrosis. *Curr. Opin. Pulm. Med.* **19**, 446–452 (2013).
24. Zhou, Y. *et al.* Extracellular matrix in lung development, homeostasis and disease. *Matrix Biol.* **73**, 77–104 (2018).
25. Ciardelli, G. Appunti di Bionanotecnologie. (2020).
26. Bhardwaj, N. & Kundu, S. C. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnol. Adv.* **28**, 325–347 (2010).
27. Wang, X., Ding, B., Sun, G., Wang, M. & Yu, J. Electro-spinning/netting: A strategy for the fabrication of three-dimensional polymer nano-fiber/nets. *Prog. Mater. Sci.* **58**, 1173–1243 (2013).
28. Higueta-Castro, N. *et al.* Using a Novel Microfabricated Model of the Alveolar-Capillary Barrier to Investigate the Effect of Matrix Structure on Atelectrauma. *Sci. Rep.* **7**, 1–13 (2017).
29. Rebelo, S. P., Costa, R., Sousa, M. F. Q., Brito, C. & Alves, P. M. Establishing Liver Bioreactors for In Vitro Research. *Methods Mol. Biol.* **1250**, 189–202 (2015).
30. Petersen, T. H., Calle, E. A., Colehour, M. B. & Niklason, L. E. Bioreactor for the Long-Term Culture of Lung Tissue: <http://dx.doi.org/10.3727/096368910X544933> **20**, 1117–1126 (2011).
31. Doryab, A. *et al.* A Bioinspired in vitro Lung Model to Study Particokinetics of Nano-/Microparticles Under Cyclic Stretch and Air-Liquid Interface Conditions. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **9**, 1–18 (2021).
32. Sbrana, T. IVTech. (2020).
33. https://en.wikipedia.org/wiki/A549_cell.
34. Barosova, H., Drasler, B., Petri-Fink, A. & Rothen-Rutishauser, B. Multicellular human alveolar model composed of epithelial cells and primary immune cells for hazard assessment. *J. Vis. Exp.* **2020**, (2020).
35. <https://www.a549.com/>.
36. <https://www.amsbio.com/hulec-5a-cell-line-amsep-cl-0565>.
37. <https://www.laboratoriumdiscounter.nl/it/sostanze-chimiche/a-z/p/paraformaldeide/>.
38. <https://www.mylavblog.net/test-diagnostici/275-il-corretto-allestimento-di-un-campione-istologico-parte-1-fissazione.html>.
39. https://en.wikipedia.org/wiki/Triton_X-100.
40. <https://www.medicaexpo.it/prod/expedeeon/product-122230-858876.html>.
41. http://www.medicalsystems.it/wp-content/uploads/2015/11/128_Tecniche_Immunoistoc.pdf.
42. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/mp01306.pdf>.
43. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/F432#/F432>.
44. https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/R415?ef_id=CjwKCAjwoZWHBhBgEiwAiMN66RRrg-p8Yev2rlGTdLaChN1XbK2nbbG7KYvO6ICRuOlAw3lBqK40jxoCgmYQAvD_BwE:G:s&s_kwid=AL!3652!3!447292198736!b!lg!!&cid=bid_pca_iva_r01_co_cp1359_pjt0000_bid00000_0se_gaw_dy_p.
45. https://it.wikipedia.org/wiki/Test_t.

46. <https://www.bio-rad.com/it-it/product/zoe-fluorescent-cell-imager?ID=N74CIZE8Z>.
47. Stucki, A. O. *et al.* A lung-on-a-chip array with an integrated bio-inspired respiration mechanism. *Lab Chip* **15**, 1302–1310 (2015).
48. Yu, S. *et al.* Lung cells support osteosarcoma cell migration and survival. *BMC Cancer* **2017** *17*, 1–10 (2017).
49. Huang, Y., Haas, C. & Ghadiali, S. N. Influence of Transmural Pressure and Cytoskeletal Structure on NF- κ B Activation in Respiratory Epithelial Cells. *Cell. Mol. Bioeng.* **2010** *34* **3**, 415–427 (2010).
50. Y, H., C, H. & SN, G. Influence of Transmural Pressure and Cytoskeletal Structure on NF- κ B Activation in Respiratory Epithelial Cells. *Cell. Mol. Bioeng.* **3**, 415–427 (2010).
51. Cei, D. *et al.* Development of a dynamic in vitro stretch model of the alveolar interface with aerosol delivery. *Biotechnology and Bioengineering* vol. 118 (2021).
52. No Title. <https://www.msmanuals.com/it/casa/disturbi-polmon>.
53. <https://www.procell.com.cn/view/915.html>.
54. <https://www.atcc.org/products/crl-3244>.
55. https://www.google.com/search?q=paraformaldeide+formula+chimica&rlz=1C1FHFK_itIT929IT929&sxsrf=ALeKk03tof3TyMkdVe0Voj1Mw3YbAVLPg%3A1625588079167&ei=b4HkYLXCen3qwHQg6qwBw&oq=paraformaldeide+formula+chimica&gs_lcp=Cgdnd3Mtd2l6EAMyBwghEAoQoAE6BwgAEEcQsAM6B.
56. https://it.wikipedia.org/wiki/Triton_X-100.
57. https://www.google.it/search?q=dapi&sxsrf=ALeKk033NzmH3AFn1VNy7fqgwRHQ0-Z2zQ:1625667239304&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=2ahUKEwj18MiyktHxAhUm-yoKHdyOBr4Q_AUoAXoECAIQAw&biw=1280&bih=577#imgsrc=fnFvmLylkto-IM.