



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIRURGICHE E GASTROENTEROLOGICHE

“P.G. CEVESE”

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE MEDICHE CLINICHE E
SPERIMENTALI

INDIRIZZO: SCIENZE CHIRURGICHE ED APPLICAZIONI TECNOLOGICHE
XXIII CICLO

TESI DI DOTTORATO

**REALIZZAZIONE MULTISTEP DI NEO-COSTRUTTI EPATICI
CON APPORTO VASCOLARE ATTRAVERSO TECNICHE DI
*TISSUE ENGINEERING***

Direttore della Scuola: Ch. mo Prof. GAETANO THIENE
Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. UMBERTO CILLO
Supervisore: Ch.mo Prof. UMBERTO CILLO

Dottorando: Dr. AMEDEO CARRARO

INDICE

ABSTRACT	pag. 7
RIASSUNTO	11
PREMESSA	15
1. Scopo della Tesi	17
CAPITOLO 1	
INTRODUZIONE:	19
1. Approcci e paradigmi della Ingegneria Tissutale	19
2. Approcci operativi	20
3. Cellule	22
4. Citochine	25
5. Scaffolds e Biomateriali	25
6. Sistemi di coltura e Bioreattori	27
7. Ingegneria Tissutale del Fegato	29
8. Bibliografia	37
CAPITOLO 2	
INTRODUZIONE	43
MATERIALI E METODI:	45
1. Ingegnerizzazione degli “scaffolds”	45
2. Microscopia Elettronica	51
3. Studi di pressione	52
4. Studi cellulari	54
5. Analisi Statistica	57
RISULTATI	57
1. Fabbricazione e testing del bioreattore	57
2. Studio di vitalità cellulare	58
BIBLIOGRAFIA	63
CAPITOLO 3	
INTRODUZIONE	65
MATERIALI E METODI:	66
1. Realizzazione dei bioreattori	66
2. Animali	67
3. Allestimento e preparazione degli epatociti	67
4. Procedura chirurgica	68
5. Disegno dello studio	69
6. Laser Doppler Scanning	71
7. Vitalità e Morfologia Cellulare	71
8. Determinazione albumina e α FP	71
9. Analisi Statistica	72

RISULTATI	72
1. Impianto del bioreattore e Doppler Scanning	72
2. Vitalità epatocitaria e morfologia	74
BIBLIOGRAFIA	79
CAPITOLO 4	
INTRODUZIONE	81
MATERIALI E METODI:	83
1. Modello matematico del bioreattore	83
2. Colture cellulari e protocollo di differenziamento	86
3. Colture 3D	87
4. Test MTT	88
5. Test ELISA	88
6. Studi istologici e morfologici	88
7. Analisi Statistica	89
RISULTATI	90
1. Bioreattore	90
2. Analisi morfologiche	92
3. Test di proliferazione	94
4. Produzione di albumina	94
BIBLIOGRAFIA	97
CAPITOLO 5	
INTRODUZIONE	99
MATERIALI E METODI:	101
1. Disegno dello studio	101
2. Animali	101
3. Allestimento e preparazione delle cellule	101
4. Preconditioning nel bioreattore	103
5. Procedura chirurgica	103
6. Analisi morfologiche, vitalità e proliferazione	104
7. Analisi Statistica	106
RISULTATI	106
1. Analisi morfologiche	106
2. Analisi di proliferazione	107
BIBLIOGRAFIA	109
DISCUSSIONE	111
BIBLIOGRAFIA	125

Lista delle abbreviazioni

AHS, Alginate-entrapped Hepatocyte Spheroid

BAL, BioArtificial Liver

BLSS, Bioartificial Liver Support System

CK, citocheratina

DMSO, DiMetilSulfOxane

ECM, Extra Cellular Matrix

ESC, Embryonic Stem Cells

ELAD, Extracorporeal Liver Assist Device

GGTP, GammaGlutamylTranspeptidasi

HFB, Hollow Fiber Bioreactor

HALSS, Hybrid Artificial Liver Support System

HLSC, Human Liver Stem Cell

HMSC, human Mesenchymal Stem Cell

HSC, Hepatic Stellate Cell

LLS, Liver Lobule-like Structure

LSS, Liver Support System

MEMS, MicroElectroMechanic Systems

NPC, Non Parenchymal Cells

PDMS, PolyDiMethylSiloxane

PEG, PoliEtilenGlicole

PLA, PoliLactid Acid

PLG, PoliLactid Glicole

SH, Small Hepatocytes

ABSTRACT

INTRODUCTION:

This multistep work has investigated tissue engineering of the liver as approach for treating end-stage liver diseases by different projects.

Engineering of hepatic tissue based on primary hepatocytes offers new perspectives in this field. However, generation of thick, 3D liver tissue has been limited by the lack of vasculature in the engineered constructs; hepatocyte survival is transient if limited by insufficient vascular-network formation. To overcome this limitation and establish a vascularized construct, we firstly worked on designing a novel microfluidic-based bilayer device with a discrete parenchymal chamber modeled upon hepatic organ architecture. The design enables the device concept to serve as both a platform technology for drug discovery and toxicity, and for the continuing development of an improved liver-assist device.

Thereafter the designed device has been moved to an *in vivo* animal model (project 2), evaluating the liver-assist device platform with a microfluidic-modeled vascular network in a femoral arteriovenous shunt model in rats.

On this basis, we proceeded with efficiently differentiating precursor liver cells into mature cells within 3D bioreactor systems in different culture conditions. Combined and distinct methods have been tested to enhance the *in vitro* differentiation of liver precursor cells (project 3).

Finally, new smart 3D scaffolds cultured with a mixed population of hepatocytes and mesenchymal stem cells have been implanted *in vivo* (project 4), after adequate preconditioning in the previous bioreactor system, to induce angiogenesis processes. These different approaches can be efficiently put together for the final realization of an *in vivo* bio-artificial liver construct.

METHODS:

Project 1: 18 assembled devices with continuous flow have been tested for the capability of transporting of metabolites and small proteins while protecting an adjacent cell culture from the effects of shear stress. Devices were seeded with HepG2/C3A and primary hepatocytes in different culture conditions to test the final capability of the system to maintain an efficient dynamic culture.

Project 2: 16 devices (assembled in project 1) with rat primary hepatocytes and 12 with human HepG2/C3A cells were tested in athymic rats in a femoral arteriovenous shunt

model. Several parenchymal tube configurations were evaluated for pressure profile and cell survival. The blood flow pattern and perfusion status of the devices was examined by laser Doppler scanning. Cell viability and serum protein secretion functions were assessed.

Project 3: Pluripotent Human Liver Stem Cells (HLSCs) were seeded onto 18 3D "smart scaffolds" composed by a biocompatible collagen-sponge. The scaffold was connected to a novel perfusion bioreactor able to ensure long-term uniform flow of medium through the material sponges; stem cells medium and co-culture with hepatic stellate cells (HSCs) were added in different conditions. Tissue engineering strategies based on the co-cultivation of HLSCs with hepatic stellate cells (ITO) and with several combinations of medium were applied. Morphological and functional assays were performed at day 3, 5 and 7 of the *in vitro* perfusion condition

Project 4: 12 scaffolds composed by 3D hyaluronan-derivative [a benzyl ester of hyaluronan (HYAFF®)], seeded with a population of human mesenchymal stem cells (HMSCs) and hepatocytes in different ratio, were firstly cultured in the previous bioreactor system to induce a preconditioning stimulus for proliferation and regeneration. The scaffolds were then implanted onto the omentum of 12 nude rats and then rolled into a 3-D pocket structure. Morphological assays were performed to test the neoangiogenesis properties of HMSCs and establish hepatocytes viability after 7 days.

RESULTS:

Project 1: The assembled device was able to sustain both human hepatoma cells and primary rat hepatocytes by continuous *in vitro* perfusion of medium, allowing proliferation and maintaining hepatic functions such as serum protein synthesis and metabolism. The mathematical model estimated the best flow rate for perfused cultures lasting up to 14 days.

Project 2: The testing in femoral arteriovenous shunt model was successfully established in all animals. Blood flow was homogeneous through the vascular bed and replicated native flow patterns. Survival of seeded liver cells was highly dependent on parenchymal chamber pressures. The tube configuration that generated the lowest pressure supported excellent cell survival and function.

Project 3: The hepatic differentiation of HLSCs from adult liver has been improved in 3D collagen scaffolds, confirmed by morphological and functional assays; the flow of perfusion medium (assured by the bioreactor system) enabled the *in vitro* organization of the cells into liver clusters even in the deeper levels of the sponge. This preliminary

experiment has shown that collagen sponge and dynamic *in vitro* condition not only promote formation of cellular bodies of HLSCs but also enhance a more rapidly functional differentiation into a mature hepatic population.

Project 4: The final ongoing project moved to the *in vivo* model. After a *preconditioning* period in the bioreactor assembled in project 3, cultured HYAFF®) 3D scaffold (with hepatocytes *plus* HMSCs or hepatocytes alone) have been implanted in rats. New tissues consisting of neo-angiogenesis' clusters organized in vessel-like structures formed by 1 week, and the hepatocyte mass survived during all the study-time. Vascular structures, identified by H&E staining, were positive for von Willebrand factor. Hepatocytes were immunohistochemically positive for albumin and CK8-18-19. These results suggest that our "bio-engineered-reactor" is characterized by a steady neo-vasculature potentiality and keeps capacity for supporting hepatocyte viability.

CONCLUSIONS:

A preliminary multistep approach to generate *in vivo* morphologically and functionally complex new tissue has being constituted from simple monolayer. This ongoing work represents a preliminary step toward the final engineer of liver-organoid vascularized construct.

RIASSUNTO

INTRODUZIONE:

Il progetto oggetto di questa tesi si è proposto di applicare le tecniche di ingegneria tissutale come approccio alla realizzazione di costrutti epatici per il supporto metabolico delle malattie del fegato; la realizzazione del lavoro si è sviluppata attraverso la successione multistep di diversi progetti tra loro complementari.

L'ingegnerizzazione di tessuto epatico attraverso colture di epatociti primari infatti offre nuove prospettive in questo ambito; tuttavia la realizzazione di strutture 3D è spesso limitata dalla mancanza di una struttura vascolare in grado di costituire un adeguato supporto nutritivo. D'altra parte gli epatociti sono cellule ad alto metabolismo e la loro sopravvivenza è limitata in condizioni ipossiche, in mancanza di una sufficiente rete vascolare. Al fine di superare questo problema e di ottimizzare le condizioni per il supporto di nutrienti, abbiamo innanzi tutto rivolto l'attenzione alla realizzazione di un bioreattore bilayer, sviluppato nelle 2 dimensioni, e ingegnerizzato partendo da dati noti di microfluidodinamica; inoltre in grado di proporre un sistema di coltura basato sulla anatomia microscopica del fegato. Tale design ha permesso la realizzazione di un bioreattore in grado di costituire una piattaforma da utilizzare come unità di *drug-testing*, ma anche per la successiva realizzazione di un sistema di assistenza epatica (progetto 1).

Sulla base dei dati ottenuti, il progetto è stato in seguito traslato nel modello *in vivo* e il bioreattore è stato testato nel piccolo animale; l'impianto del device è stato realizzato *ex vivo* mediante il confezionamento di uno shunt artero-venoso femoro-femorale (progetto 2).

Il lavoro è stato quindi implementato sviluppando sistemi di coltura nelle 3 dimensioni (progetto 3); diverse combinazioni di coltura su scaffolds 3D in perfusione continua, all'interno di nuovi bioreattori, sono state testate per l'induzione differenziativa di cellule staminali (precursori epatocitari di origine umana).

I successi ottenuti hanno spinto alla realizzazione dell'ultimo step (progetto 4). *Smart scaffolds* 3D di nuova generazione sono stati utilizzati per allestire colture 3D attraverso diverse combinazioni di popolazioni cellulari (epatociti primari + cellule mesenchimali staminali o soli epatociti primari), inducendo processi di neoangiogenesi. Dopo adeguato *preconditioning* in bioreattori *in vitro*, lo scaffold è stato in seguito impiantato *in vivo*, nel piccolo animale.

METODI:

Progetto 1: 18 bioreattori ingegnerizzati a flusso continuo sono stati testati per la loro capacità di trasporto di metaboliti all'interno di un compartimento parenchimale ove le colture cellulari sono state protette dagli effetti nocivi di shear stress. I bioreattori sono stati sottoposti a semina con cellule HepG2/C3A ed epatociti primari in diverse condizioni di coltura, al fine di testare la capacità del sistema di mantenere *in vitro* una coltura dinamica, vitale ed efficiente dal punto di vista metabolico.

Progetto 2: 16 bioreattori (precedentemente ingegnerizzati nel progetto 1) sono stati utilizzati e sottoposti a coltura con epatociti primari e 12 con cellule umane HepG2/C3A; i bioreattori sono stati impiantati *ex vivo* in ratti atimici attraverso la realizzazione di uno shunt artero-venoso femoro-femorale. Il setting del bioreattore *ex vivo* ha previsto diverse configurazioni, testate sotto il profilo dei parametri di vitalità cellulare sulla base dei relativi dati di pressione e di flusso nelle diverse configurazioni. Il pattern di flusso ematico e la perfusione del sistema sono stati esaminati attraverso laser Doppler scanning. La vitalità cellulare e la funzionalità metabolica sono state inoltre verificate.

Progetto 3: una popolazione di Pluripotent Human Liver Stem Cells (HLSCs) è stata coltivata su 18 "smart scaffolds" 3D, composti da spugne di collagene biocompatibile. Lo scaffold è stato inserito in un nuovo bioreattore per la perfusione di strutture 3D in grado di garantire flussi uniformi di medium; medium per cellule staminali e colture miste con cellule stellate del fegato (HSCs) sono state aggiunte in diverse condizioni di coltura. Le diverse combinazioni sono state testate attraverso l'esecuzione di studi morfologici e funzionali rispettivamente nei giorni 3, 5 e 7 della perfusione *in vitro*.

Project 4: 12 scaffolds 3D, costituiti da un derivato dell'acido ialuronico [a benzyl ester of hyaluronan (HYAFF®)] sono stati sottoposti a semina con popolazioni di cellule staminali mesenchimali di origine umana (HMSCs) ed epatociti in diverse combinazioni; è stata allestita una coltura in perfusione continua nel bioreattore precedentemente descritto (*preconditioning*). In seguito gli scaffolds sono stati impiantati nell'omento di 12 ratti atimici, costituendo una tasca "rolled" 3D. Studi morfologici sono stati eseguiti al fine di valutare i processi di neoangiogenesis sostenuti dalle cellule HMSCs e valutare la vitalità epatocitarie a 7 giorni dall'impianto.

RISULTATI:

Progetto 1: Il bioreattore ingegnerizzato si è dimostrato in grado di sostenere entrambe le popolazioni cellulari in studio, comprese colture primarie di epatociti (notoriamente più sensibili), attraverso la realizzazione di una perfusione continua di medium sovrapponibile a flussi fisiologici. Tale circostanza ha favorito sia i processi di proliferazione cellulare che la funzione metabolica epatocitaria (sintesi proteica). Il modello matematico del sistema ha permesso di sostenere una coltura dinamica fino a 14 giorni.

Progetto 2: Il bioreattore, collegato all'animale attraverso il confezionamento di uno shunt femorale artero-venoso, ha realizzato un sistema di perfusione *ex vivo*. Il flusso ematico all'interno del network vascolare si è dimostrato omogeneo nel tempo ed ha ricostituito il fisiologico pattern di flusso artero-venoso del fegato. La sopravvivenza cellulare ha dimostrato alti valori dipendentemente dai valori pressori raggiunti all'interno della camera parenchimale. La configurazione del sistema che ha generato la minore pressione all'interno della camera parenchimale ha dimostrato anche i migliori risultati in termini di sopravvivenza cellulare.

Progetto 3: con l'intenzione di costituire strutture 3D, la differenziazione epatica di cellule HLSCs da fegato umano è stata indotta in scaffolds di collagene; i test morfologici e gli assays funzionali hanno confermato la maturazione. Il flusso continuo di perfusione del medium (garantito dal bioreattore) ha favorito *in vitro* la distribuzione delle cellule in clusters organizzati fino alle porzioni più profonde dello scaffold. Gli esperimenti hanno dimostrato che la spugna di collagene e le condizioni di coltura dinamica *in vitro* sono in grado di promuovere non solo la formazione di aggregati di HLSCs ma anche di favorire una più rapida maturazione verso fenotipi epatici maturi.

Progetto 4: lo step finale, ancora in corso, ha previsto l'induzione della neoangiogenesi *in vivo*. Dopo un processo di *preconditioning* della coltura cellulare nel bioreattore precedentemente ingegnerizzato (progetto 3), scaffolds 3D di HYAFF® con combinazioni diverse di epatociti primari e MSCs, sono stati impiantati nei ratti. Il costrutto così ottenuto a 7 giorni dall'impianto ha dimostrato, alla immunofluorescenza, la formazione di iniziali clusters in cui si sono identificati eventi neoangiogenetici con formazione di strutture simil-vascolari. Gli epatociti sono sopravvissuti durante tutto il periodo di studio; positiva la ricerca, alla immunofluorescenza, per albumina, CK8-18-19. Le strutture vascolari, identificate dapprima con colorazione EE, si sono dimostrate positive alla immunofluorescenza per il fattore di von Willebrand.

I dati sono suggestivi per ulteriori studi nell'ambito dei processi di neoangiogenesi.

CONCLUSIONI: Gli approcci preliminari ci hanno permesso di raggiungere e ottenere *in vivo* risultati promettenti nella ricostituzione di costrutti epatici caratterizzati da processi neoangiogenetici, partendo da semplici layers 2D. I risultati sono suggestivi per sviluppi futuri di ingegnerizzazione di organoidi epatici.

PREMESSA

L'ingegneria tissutale rappresenta un campo interdisciplinare di recente sviluppo che combina i principi dell'ingegneria con quelli delle bioscienze, al fine di creare dei costrutti biologici che sostituiscano, riparino, mantengano o migliorino la funzione di un tessuto o di un organo leso.¹

In questa accezione essa si affianca ad altre e distinte strategie che rientrano, secondo la definizione elaborata dal National Institute of Health, nell'ambito della cosiddetta "Medicina Rigenerativa" e che sono essenzialmente rappresentate da:

- la sostituzione di una parte dell'organismo con un'altra parte dello stesso organismo;
- la riparazione di parti dell'organismo con strutture non viventi, spesso sintetiche;
- il trapianto allogenico o xenogenico;
- l'uso di sistemi extracorporei per migliorare o sostituire la funzione deficitaria di un organo;
- *drug-testing*, ovvero lo studio del metabolismo di tossici/farmaci e valutazione della loro capacità metabolica;

Il significato della parola "*Tissue Engineering*" (Ingegneria dei Tessuti o Ingegneria Tissutale), coniato nel 1987 dalla National Science Foundation (USA), tuttavia, non è di immediata comprensione, e neppure a livello europeo esiste una definizione universalmente condivisa. Una ipotesi di lavoro stilata dalla stessa Commissione Europea suggerisce che per prodotto ottenuto attraverso l'ingegneria dei tessuti umani si intenda specificamente ogni prodotto autologo (ottenuto dal paziente stesso) o eterologo (ottenuto da un altro essere umano) che:

- contenga, consista o comporti come risultato tessuti o cellule umane trattati tramite l'ingegneria;
- abbia proprietà, o sia descritto come avente proprietà, di rigenerazione, riparazione o sostituzione di tessuti, nel caso in cui i nuovi tessuti o cellule, in tutto o in parte, siano strutturalmente e funzionalmente analoghi al tessuto originale rigenerato, riparato o sostituito;

La possibilità di disporre di sostituti biologici con caratteristiche morfo-funzionali analoghe a quelle del tessuto originario, pertanto, si presenta come una affascinante prospettiva.

Infatti, nonostante le opzioni terapeutiche in ambito clinico abbiano dimostrato un significativo passo in avanti nella storia della medicina, salvando o migliorando la vita di un numero rilevante di pazienti negli ultimi 40-50 anni, esse presentano a tutt'oggi problemi di difficile superamento ed ancora condizionati da numerosi limiti.

Nello specifico:

- il tessuto trasferito da una sede all'altra dell'organismo può non essere in grado di svolgere tutte le funzioni del tessuto originario e può comunque comportare il rischio di complicanze nella sede donatrice;
- l'impiego di materiale protesico non biologico è associato al rischio di infezione, scarsa biocompatibilità e durata limitata nel tempo;
- il ricorso al trapianto d'organo è fortemente penalizzato dalla scarsa disponibilità di donatori e, nonostante tutti gli sforzi impiegati per incrementare il pool di organi disponibili, la domanda eccede notevolmente l'offerta; la mortalità dei pazienti durante l'attesa di trapianto si aggira attorno al 15% per procedure salvavita, come il trapianto di fegato;²
- l'utilizzo di dispositivi meccanici non è in grado di fornire tutte le funzioni espletate dall'organo vicariato e perciò non può essere prevenuto il deterioramento delle condizioni cliniche del paziente;

A fronte di questi limiti, è dunque evidente che la possibilità di disporre di strutture ingegnerizzate ottenute da cellule tessuto- od organo-specifiche, seminate su una matrice e con caratteristiche biologiche analoghe a quelle del tessuto originario, appaia come un'accattivante prospettiva. Questo, peraltro, rappresenta dal punto di vista concettuale, la soluzione più efficiente e duttile per la riparazione di organi o tessuti. Tuttavia, pur parlando di prodotti finali tangibili, tale disciplina sembra essere legata a tutt'oggi più alla biologia cellulare, alla chimica dei materiali piuttosto che a ciò che nel sentire comune si associa al termine vero e proprio di "medicina rigenerativa dei tessuti". Secondo alcuni autori, proprio questa incompienza metodologica sta alla base del fatto che, dopo quasi 20 anni, l'ingegneria tissutale non si sia ancora imposta in modo definitivo in ambito clinico e commerciale.³

Infatti accade spesso che nella risoluzione dei problemi di questo settore, si trascuri un approccio realmente interdisciplinare e metodologico a favore di modalità *trial-and-error* per lo più settoriali.

Scopo della tesi

Il percorso oggetto di questo elaborato aspira ad essere un *excursus* sulla esperienza personale nell'ambito delle modalità di approccio alla ingegneria di costrutti epatici in grado di esprimere, in futuro e come fine ultimo, capacità sostitutive d'organo.

Uno degli scopi fondamentali del progetto è stato quello di affrontare in modo metodologico, ma con sguardo multidisciplinare, i diversi problemi che si devono affrontare nella ricostituzione di strutture parenchimali complesse come quella del fegato. Ad oggi, infatti, anche se diversi tipi di tessuto sono stati sviluppati nei laboratori di tutto il mondo, rimangono ancora problematiche aperte che ostacolano una successiva evoluzione.

Le potenzialità dei costrutti ottenuti con tecniche di *Tissue Engineering* sono fortemente condizionate da due aspetti:

- limiti correlati alla ricostituzione di strutture 3D;
- limiti nei sistemi di trasporto di nutrienti e ossigeno (attualmente confinati a modalità di carattere per lo più diffusivo);

Come già accennato, i tessuti biologici fino ad oggi realizzati *in vitro* a livello sperimentale, raggiungono spessori dell'ordine dei pochi millimetri. L'impianto di supporti (scaffolds) cellularizzati è infatti condizionato dal fatto che le cellule presenti su di essi consumano entro poche ore le proprie scorte di ossigeno e nutrienti, mentre il processo di angiogenesi richiede diversi giorni prima di poter provvedere alle esigenze metaboliche del nuovo costrutto. La ricerca ha raggiunto tuttavia diversi risultati positivi, nel campo dei sostituti cutanei e cartilaginei, che richiedono costrutti di spessore poco rilevante o poca vascolarizzazione; mentre gli studi mirati alla creazione di un letto capillare artificiale, integrato in un tessuto, sono condizionati dalla necessità di una fitta rete di microvasi. Pertanto i risultati preliminari sono ancora incompatibili con la realizzazione di tessuti che presentino rilevanti volumi parenchimali (e.g. fegato, reni, intestino).

Possibili approcci alla soluzione di questi limiti sono stati ottenuti con la biologia delle cellule staminali, la scienza dei materiali, le tecnologie di microfabbricazione e lo sviluppo di sistemi dinamici di coltura cellulare.

Anche in questa prospettiva, ovvero nell'ottica di ingegneria che deriva dalla parola latina "ingenium" cioè ingegno, creatività, è stato affrontato il progetto di ricerca in oggetto.

Il contributo di questa Tesi ad un ambizioso ma realistico obiettivo, si pone dunque nel punto dove tecniche e *problem solving*, di carattere tipicamente ingegneristico, incontrano gli approcci tipici delle scienze biologiche, in un processo multistep che ha visto i seguenti e preliminari traguardi:

1. studio e realizzazione *in vitro* di strutture microvascolari da utilizzare nelle applicazioni di Tissue Engineering del fegato (i.e. neotessuti, *drug-testing*);
2. studi per la ottimizzazione dei bioreattori realizzati: selezione ed ottimizzazione della popolazione cellulare e delle condizioni di coltura;
3. applicazione e traslazione *in vivo* degli *insights* ottenuti dagli studi *in vitro*;

La stesura del progetto di ricerca è stato suddiviso in vari capitoli, a mio parere, capisaldi dei componenti che costituiscono il paradigma della ingegneria tessutale del fegato.

Dopo aver riportato le teorie e le evidenze sperimentali che hanno spinto all'"idea del progetto" ed esposto le finalità del lavoro, verranno descritti i materiali e le procedure implementate per realizzare l'apparato sperimentale, che ha permesso di eseguire gli esperimenti di ciascuna sezione.

I risultati di ciascuno di essi sono stati criticamente discussi nel paragrafo finale dell'elaborato.

INTRODUZIONE

1.1 Approcci e paradigmi della ingegneria tissutale

Come già descritto, in senso classico, l'ingegneria dei tessuti si propone di impiegare cellule organo-specifiche per popolare *in vitro* una struttura artificiale (detta *scaffold*, letteralmente: impalcatura) che verrà successivamente impiantata in un organismo per sopperire ai danni tissutali o di interi organi.

Tale approccio nasce dalle osservazioni dei comportamenti di tessuti e cellule, che per sommi capi riassumiamo:¹

- alcuni tessuti sono capaci di rigenerarsi;
- in condizioni opportune, cellule mature isolate riescono a riorganizzarsi *in vitro* nella loro struttura istologica naturale;
- l'organizzazione delle cellule in certe strutture necessita di *templates* in grado di guidare la riorganizzazione;
- diversi tipi di tessuto non possono essere prodotti in grandi volumi per motivi legati al trasporto diffusivo di gas e nutrienti;

L'approccio più comunemente utilizzato in ingegneria tissutale consiste quindi nel combinare determinati tipi cellulari con particolari geometrie di scaffolds realizzati in diversi materiali, naturali o sintetici, biodegradabili o no, e tali da fornire *in vitro* strutture "viventi". Da questi costrutti artificiali, le cellule proliferano ed elaborano la matrice extracellulare (ECM, *Extra-Cellular Matrix*), formando così neo-tessuto.

I processi che si verificano durante la formazione e la maturazione del tessuto sono dunque di:

- proliferazione e differenziazione cellulare;
- produzione e organizzazione della ECM;
- eventuale degradazione dello scaffold;
- rimodellamento *in vivo* e crescita del tessuto;

Pertanto ricostruire un tessuto od un organo o favorirne la rigenerazione, comporta la comprensione e la riproduzione dei complessi fenomeni che si verificano in natura nel corso dell'istogenesi. Le cellule per proliferare, differenziarsi e mantenere le loro caratteristiche fenotipiche e funzionali devono essere in qualche modo guidate da un

costante flusso di informazioni provenienti dal microambiente. L'applicazione delle conoscenze acquisite sulle interazioni cellula-cellula, cellula-ECM e sulle molecole che forniscono alla cellula segnali chimici-guida (citochine, fattori di crescita) costituisce uno dei paradigmi dell'ingegneria tissutale.

Sulla base di tali affermazioni, i limiti di fronte a cui si trova la bioingegneria possono dunque essere schematicamente ricondotti ai seguenti quesiti unanimemente riconosciuti:

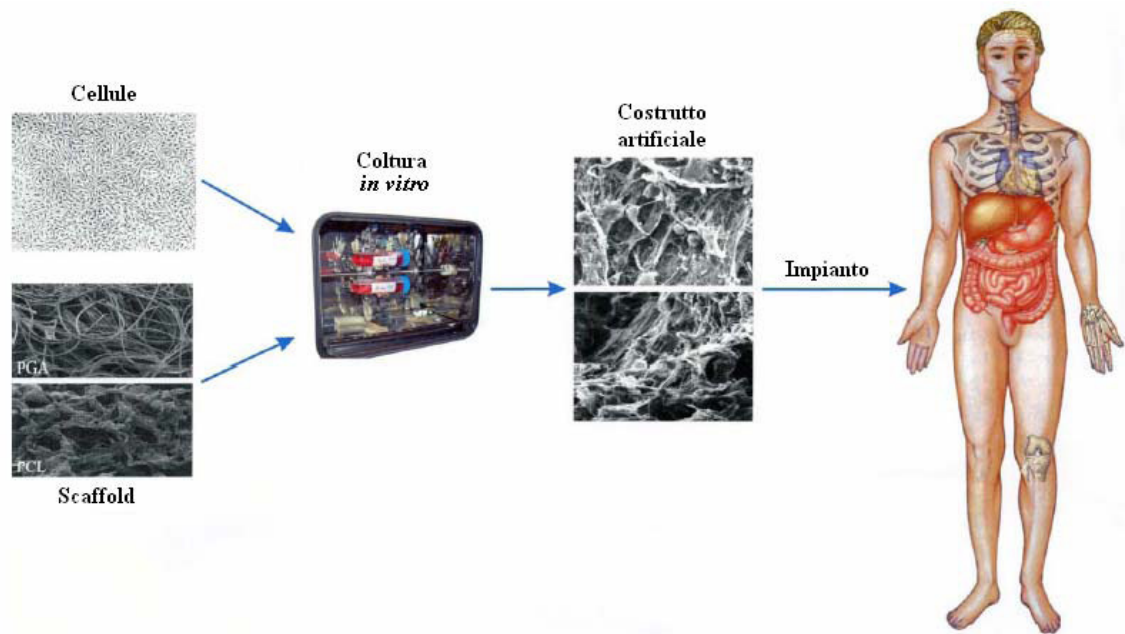
- come favorire la rigenerazione di un tessuto? cellule isolate tendono a riformare una corretta e funzionale struttura tissutale solo se poste in un adeguato *environment*;
- come determinare un *template* che guidi la loro organizzazione architettonica?
- come garantire la vitalità dei costrutti? volumi di tessuto relativamente grandi (> 2-3 mm³) non possono essere impiantati con successo poiché la sopravvivenza delle cellule è condizionata dal loro approvvigionamento di nutrienti ed ossigeno, garantiti da processi di diffusione dal capillare più vicino, che pertanto deve distare non più di poche centinaia di micron dalla cellula.

1.2 Approcci operativi

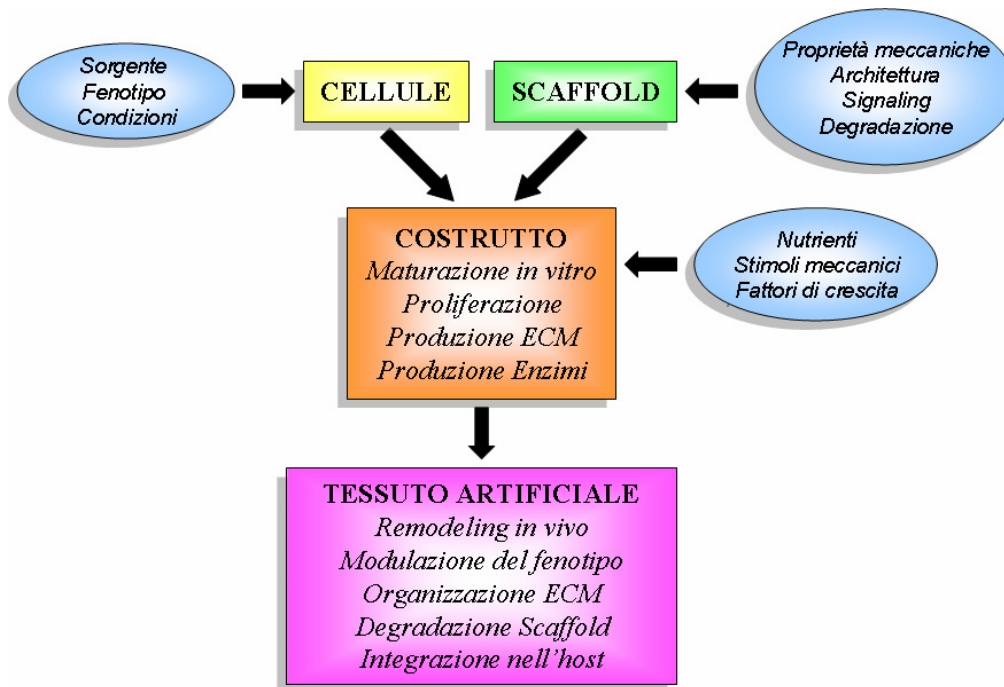
Gli approcci impiegati dall'ingegneria tissutale sono molteplici e vanno dalla costruzione ex novo *in vitro* di tessuti fino all'induzione della rigenerazione tissutale *in vivo*. L'approccio classico fino ad ora descritto viene chiamato anche *Sistema Aperto* in quanto le cellule dell'impianto possono venire in contatto con le cellule dei tessuti circostanti. Attualmente, tuttavia, sono particolarmente utilizzati anche i cosiddetti *Sistemi Chiusi*, nei quali le cellule impiantate sono isolate dai tessuti circostanti tramite membrane polimeriche semipermeabili che permettono il passaggio di metaboliti, farmaci e ormoni, ma bloccano le molecole più grandi, come le cellule del sistema immunitario.

I sistemi chiusi trovano applicazione ad esempio, nel rilascio controllato di farmaci o nei dispositivi extracorporei per assistenza alla funzione epatica o all'attività renale.⁴

Il paradigma classico della Tissue Engineering è schematizzato in Figura 1.1 (a, b).



a)



b)

Figura 1.2: a e b, Paradigma classico del Tissue Engineering

Schematizzando, le strategie comunemente adottate per la creazione di un nuovo tessuto sono dunque le seguenti:

1. impiego di cellule isolate o di sostituti cellulari: tale approccio permette la sostituzione delle sole cellule che esprimano la funzione richiesta;
2. impiego di cellule associate a matrici in sistemi chiusi od aperti:

Nei sistemi chiusi le cellule sono isolate dall'ambiente circostante da una membrana semipermeabile, che consente la diffusione dei nutrienti e dei metaboliti, ma impedisce viceversa il passaggio di grosse molecole (anticorpi) o cellule immunocompetenti, prevenendo le risposte immunitarie dell'ospite.

Le diverse e possibili configurazioni di questi sistemi vengono dunque a costituire veri e propri "bioreattori", comprendenti:⁵

- a. *fibre cave costituite da una membrana tubulare*: le cellule vengono poste all'esterno, mentre all'interno scorre il sangue/plasma (device vascolare);
- b. *macrocapsule*;
- c. *microcapsule*: con cellule poste in microsfere di materiale variabile (es. idrogel di alginato);
- d. *sistemi* cosiddetti a "*bilayer*", ove esiste una struttura parenchimale ed una struttura "vascolare" (flusso di medium), separate dalla membrana

Tali strutture possono essere impiantate *in vivo*, oppure impiegate come sistemi di supporto extracorporeo (ad esempio BAL "Bio-Artificial Liver" system).

Nei sistemi aperti le cellule adese alle matrici di supporto (*scaffolds*), che spesso sono biodegradabili e costituite da materiale naturale come collagene oppure da polimeri sintetici, possono essere utilizzate sia come sistemi *in vitro* sia come sistemi *in vivo*. In quest'ultimo caso sono posti a diretto contatto con i tessuti dell'ospite con i quali si sviluppa un processo di integrazione, ovvero proliferazione ed invasione dei tessuti circostanti, per lo più dei vasi sanguigni.⁶

In un sistema impiantabile di tipo aperto, l'impiego di supporti tridimensionali (3D) costituiti da polimeri sintetici altamente porosi facilita la crescita, l'organizzazione strutturale e la caratterizzazione fenotipica cellulare attraverso la diffusione di nutrienti alle cellule.⁷

3. impiego di sostanze in grado di indurre la crescita e la rigenerazione tissutale.

1.3 Cellule

Le cellule svolgono un ruolo preminente nel processo di rigenerazione e riparazione tissutale, correlato alle loro caratteristiche di proliferazione e differenziazione, alle interazioni che si instaurano tra cellula e cellula, alla produzione di biomolecole ed alla formazione di ECM.⁸

Concettualmente la cellula ideale dovrebbe essere prontamente accessibile, proliferare senza perdere le sue caratteristiche fenotipiche e funzionali, non comportare il rischio di

trasmissione di patogeni specie-specifici, avere la potenzialità di differenziarsi o trans-differenziarsi in una varietà di linee cellulari tessuto- od organo-specifiche con funzione specializzata ed essere il meno immunogena possibile.

Questo non è sempre possibile, ad esempio è noto che gli epatociti umani maturi, una volta estratti ed isolati dal campione tissutale, seppur vitali, perdano le loro capacità funzionali (metaboliche), e vengono difficilmente mantenuti in coltura per lunghi periodi.

Anche sulla base di tale considerazione, è stato proposto di utilizzare, come fonte universale di cellule, le cellule staminali. E' doveroso evidenziare che le cellule staminali possiedono tuttavia un diverso grado di potenzialità. Questo grado varia dalla totipotenzialità dell'uovo fecondato, lo zigote, in grado di dare origine all'embrione e al trofoblasto della placenta; alla pluripotenzialità delle cellule staminali embrionali (Embryonic Stem Cells, ESC) derivanti dalla Massa Cellulare Interna della blastocisti, che sono capaci di differenziarsi in tutti i tipi cellulari derivanti dai tre foglietti (endoderma, mesoderma, ectoderma); infine alla multipotenzialità (differenziamento solo in alcune linee cellulari) di certe cellule staminali adulte e quindi all'unipotenzialità di cellule staminali tessuto-specifiche che originano un unico tipo di cellula specializzata.⁹

Le conoscenze acquisite negli ultimi anni sulla biologia delle cellule staminali hanno creato dunque molto interesse.¹⁰ Per quanto al momento attuale rimanga ancora molto da scoprire circa la loro biologia e la vera potenzialità, è comunque opportuno ricordare, da un punto di vista pratico, che le cellule staminali totipotenti, presentano vari problemi legati alla difficoltà del loro isolamento, alla preparazione di colture pure e, soprattutto, al controllo della loro differenziazione permanente verso il tipo cellulare desiderato. Inoltre, benché queste linee cellulari dimostrino in teoria infinite potenzialità, forti vincoli etico-morali e legali, ancora oggi motivo di dibattito, ne impediscono l'utilizzo e lo studio in molte nazioni, non permettendo in questo modo la comprensione delle loro effettive capacità.

Le cellule staminali adulte (ad esempio da midollo osseo, tessuto-specifiche) sono una possibile scelta alternativa anche se con capacità differenziative piu' limitate. Dato che il loro impiego in medicina sembra avere meno contrasti etici, si sta aumentando il loro studio sebbene l'isolamento e il controllo differenziativo, comunque, rimangano tecnicamente molto complessi e meritevoli di ulteriori studi.

Di fatto, fino a poco tempo fa, si pensava che gli epatociti potessero derivare solo da cellule di origine endodermica e da loro progenitori. Tuttavia studi recenti suggeriscono che anche cellule di origine non-endodermica possano dare origine ad epatociti *in vivo* ed *in vitro*.¹⁰ Sembra infatti che il *microenvironment* o la nicchia della cellula staminale costituisca uno dei fattori in grado di condizionare maggiormente la successiva maturazione funzionale cellulare. L'originale idea di una "nicchia" di staminalità deriva dal concetto che le cellule staminali risiedono all'interno di un microambiente di induzione (*inductive microenvironment*) in grado di dirigere la loro successiva replicazione, la differenziazione e lo sviluppo, sia in condizioni fisiologiche che in corso di patologia.¹¹⁻¹³ Sono diversi i fattori di *signaling* alla base della regolazione di questo comportamento cellulare [ad esempio Wnts, Bone Morphogenic Proteins (BMP), Fibroblast Growth Factors (FGFs), Notch e molti altri].

La riproposizione di un *signaling* regolato tra la componente cellulare e lo scaffold, in particolare il contatto diretto cellula-cellula o la ricostituzione di una nicchia di staminalità, rappresentano dunque elementi di un rapporto iterattivo-dinamico essenziali nel determinare il destino maturativo cellulare; e questo tanto più in un adeguato ed integrato sviluppo spazio-temporale.^{14,15}

Nel caso degli epatociti, il microambiente "di sviluppo" rappresenta infatti un sistema in continuo cambiamento ove si succedono eventi biologici successivi.¹⁶ Ciascuno step di crescita e di differenziazione è strettamente regolato dalla comunicazione intra- ed extracellulare così come da meccanismi autonomi: Activina, Fibroblastic Growth Factor (FGF), Hepatocyte Growth Factor (HGF) ed Oncostatina M (OSM) rappresentano alcuni dei fattori essenziali di segnale;¹⁷ ancora, da un punto di vista intracellulare, fattori di trascrizione epatici come Hepatocyte Nuclear Factor (HNF) 3 α , β , HNF4 α , HNF1 α , β , e HNF6 agiscono in maniera consequenziale e con modalità cross-regolatoria organizzata in altrettante e specifiche vie differenziative.¹⁴⁻¹⁵

Lo stesso ambiente cellulare circostante gioca un ruolo sempre più importante: una parte rilevante è sicuramente sostenuta dalle cosiddette cellule non-parenchimali (NP) del fegato (cellule endoteliali, cellule stellate di ITO etc.); diversi studi hanno infatti dimostrato che colture miste con cellule NP favoriscono una marcata tendenza alla proliferazione ed alla polarizzazione epatocitaria, sostenendo dunque che anche tali popolazioni cellulari partecipino alla ricostituzione del *microenvironment* embriogenico durante il processo di organogenesi.^{18,19}

E' dunque intuitivo pensare che la identificazione e la simulazione di questi patterns del segnale *in vivo* rappresentino punti cruciali di partenza per la riprogrammazione della rigenerazione tissutale *in vitro*.

1.4 Citochine

Le citochine sono per lo più polipeptidi che agiscono come ormoni locali regolando selettivamente la proliferazione, la differenziazione, la migrazione e la funzione di specifiche cellule bersaglio.

I fattori di crescita sono delle citochine di particolare importanza in ingegneria tissutale, in quanto possono stimolare la crescita di cellule incluse in un costrutto bioingegnerizzato impiantato.²⁰

Tutte le tecniche di coltura cellulare si avvalgono dell'impiego *in vitro* di fattori di crescita addizionati al mezzo di coltura. La diretta applicazione di molecole ricombinate è già stata impiegata clinicamente.²¹ I fattori di crescita possono anche essere aggiunti ai materiali di supporto sia come semplici additivi che legati ai polimeri, al fine di ottenerne un rilascio più controllato nel tempo.²²⁻²³

Nonostante i vantaggi riportati con il loro uso, essi hanno potenziali effetti collaterali da un punto di vista clinico, riportati ad esempio nel caso del β FGF, e comprendenti anche eventi di cancerogenesi. Effetti tossici soprattutto a carico del rene e del midollo sono stati raramente descritti, mentre dopo distribuzione sistemica di β FGF si sono verificati casi di stenosi vascolari, dovute all'ispessimento intimale in seguito ad una eccessiva proliferazione delle cellule muscolari lisce.²⁴

1.5 Scaffolds e Biomateriali

Lo scaffold non è solo un materiale di supporto che fornisce un pattern topologico, ma è anche un mezzo per somministrare alle cellule stimoli ben precisi al fine di attivare determinati processi cellulari. I supporti sui quali vengono seminate le cellule possono essere formati da materiale sintetico, quale propilene (Marlex, Prolene), politetrafluoroetilene (Teflon e Gore-Tex), poliestere (Dacron) e poliammide (Nylon), oppure naturali, quali collagene, gel di fibrina e acido ialuronico.²⁵ I fattori di crescita, eventualmente legati al supporto, sono in grado di attivare in modo differenziale i geni, i cui prodotti sono responsabili per la crescita e il differenziamento del tessuto. Attualmente, è entrato nella pratica clinica comune l'impiego di lamine di cheratinociti umani coltivati *in vitro* e supportate da biomateriali, in modo da ottenere un prodotto

finale pratico e di facile applicazione. L'introduzione dell'uso di un supporto bioattivo derivato dall'acido ialuronico, ha reso possibile la creazione *in vitro* di un tessuto originale nel quale le cellule epiteliali interagiscono attivamente con l'acido ialuronico stesso, costituendo così in laboratorio un vero tessuto ingegnerizzato.²⁶

In generale biomateriali impiegati in Ingegneria Tissutale devono possedere specifici requisiti. Essi devono essere biocompatibili, non tossici (compresi i prodotti del loro metabolismo), non carcinogenici, sterilizzabili e maneggevoli chirurgicamente, con caratteristiche meccaniche intrinseche adeguate rispetto a quelle del tessuto da sostituire. Nella maggior parte dei casi dovrebbero essere riassorbibili per essere con il tempo rimpiazzati dalla ECM prodotta dalle cellule; dovrebbero inoltre favorire la migrazione e la proliferazione cellulare (tessuto-conduttivi); favorire il legame con le cellule mediante la presenza di siti specifici (fibronectine); essere permeabili ai nutrienti, ai prodotti del catabolismo cellulare ed alle citochine.²⁷

Molti di questi requisiti sono espressi da materiali di origine naturale (collagene, fibrina, idrossiapatite, alginato, glicosaminoglicani) che rispetto ai polimeri di sintesi più frequentemente impiegati (PLA, PLG, PEG e vari idrogel) hanno lo svantaggio di avere una disponibilità limitata e caratteristiche non modificabili.

In genere, dunque, si preferiscono i materiali naturali poiché riproducono più fedelmente l'ambiente cellulare nativo. Tuttavia i vantaggi offerti dai materiali sintetici, in termini di controllo delle proprietà meccaniche, rendono la scelta molto difficile e strettamente legata al tipo di applicazione.

Recentemente, gli studi su geometria, materiali, porosità e caratteristiche superficiali degli scaffolds hanno permesso di ottenere *in vitro* strutture cartilaginee di forma anche complessa.²⁸ Inoltre, lo sviluppo delle ricerche nel campo specifico ha portato alla realizzazione dei cosiddetti materiali di III generazione, materiali di sintesi resi ancora più bioattivi mediante incorporazione di molecole regolatrici presenti nella matrice extracellulare ed in grado di elicitare specifiche risposte cellulari a livello molecolare. Un notevole interesse è stato generato in particolare dai biomateriali cosiddetti "smart", ossia polimeri in grado di modificare le loro proprietà in risposta ai cambiamenti che si producono nell'ambiente esterno.²⁹⁻³⁰

Infine, per quanto riguarda la geometria degli scaffolds, sono stati sviluppati metodi di microfabbricazione e di RP (*Rapid Prototyping*) che permettono di ottenere geometrie complesse, anche nella scala dei micrometri, partendo da dati acquisiti con tecniche di imaging (e.g. tomografia computerizzata, risonanza magnetica) dal tessuto originale;

proprio su questa scorta, lo scaffold ideale dovrebbe avere, infine, una struttura tridimensionale con proprietà meccaniche adeguate ed alta porosità per una adeguata interazione con l'ambiente esterno.

1.6 Sistemi di coltura e Bioreattori

In passato la coltura cellulare avveniva in condizioni statiche che simulavano solo in parte l'ambiente interno di un organismo. Con tali metodi non era possibile ottenere densità cellulari elevate poiché la velocità di ricambio del terreno di coltura e le condizioni di diffusione dei nutrienti non erano adeguate. Lo sviluppo di sistemi di coltura dinamici, chiamati bioreattori, per la coltivazione cellulare in condizioni dinamiche ha comportato considerevoli vantaggi in termini di controllo dei flussi e del rimescolamento di nutrienti, gas, metaboliti e molecole di regolazione, come pure della regolazione delle dimensioni e della struttura del tessuto in formazione.³¹ (Figura 1.2).

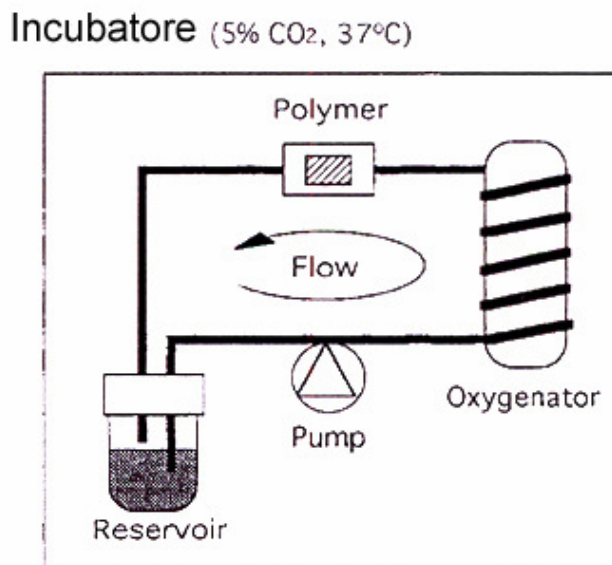


Figura 1.2: Schema semplificato di bioreattore

da Kaihara s, Kim S et al., "Survival and function of rat hepatocytes cocultured with non-parenchymal cells or sinusoidal or endothelial cells on biodegradable polymers under flow conditions *Journal of Ped Surg* 2000; 35:1287-1290

Nel bioreattore dovrebbe venirsi a creare un ambiente che simula la complessa situazione fisiologica esistente *in vivo* in termini di parametri chimico-fisici (pH, temperatura, concentrazione di nutrienti e prodotti del metabolismo), trasferimento di massa e situazione biomeccanica, variabili da tessuto a tessuto, con un intrinseco beneficio in termini di organizzazione e funzione cellulare rispetto alle cellule coltivate in condizioni statiche.³² (Figura 1.3)

I bioreattori, infatti, aggiungono al regime di flusso diffusivo delle colture statiche una componente convettiva che porta sicuramente notevoli vantaggi rispetto alle precedenti modalità e permette di ottenere densità cellulari maggiori. Parametri come il flusso e la concentrazione delle varie sostanze possono essere attentamente controllati, in modo da migliorare i trasferimenti di gas e di altri metaboliti.

Si possono citare almeno quattro caratteristiche sulle quali è possibile intervenire per migliorare l'*environment* del sistema di coltura:

- pattern di flusso per ottimizzare la vitalità della semina;
- trasporto di nutrienti e gas per ottimizzare il metabolismo cellulare;
- stimolazione fisica per favorire la meccano-trasduzione dello stimolo;
- controllo dei parametri per automatizzare il sistema;

Sono state sviluppate diverse tipologie di bioreattore ma alcuni elementi, in quanto fondamentali, sono comuni a tutti i sistemi. L'elemento base di un bioreattore è la cella di coltura, una camera sterile nella quale sono contenute le cellule. Il mezzo di coltura si trova in un reservoir nel quale, tramite una elettropompa (centrifuga, peristaltica, ecc.), viene immesso in circuito il terreno di coltura arricchito con una miscela CO₂ ed O₂.

La rilevazione del pH avviene tramite un pH-metro ed è possibile mantenere tale parametro in un range predefinito, agendo sull'apertura e la chiusura dei sistemi di immissione di CO₂ ed aria. La coltura viene quindi mantenuta in condizioni ottimali ed è possibile implementare varie tipologie di test atte, ad esempio, a valutare gli effetti di farmaci o altre molecole sulla fisiologia cellulare.

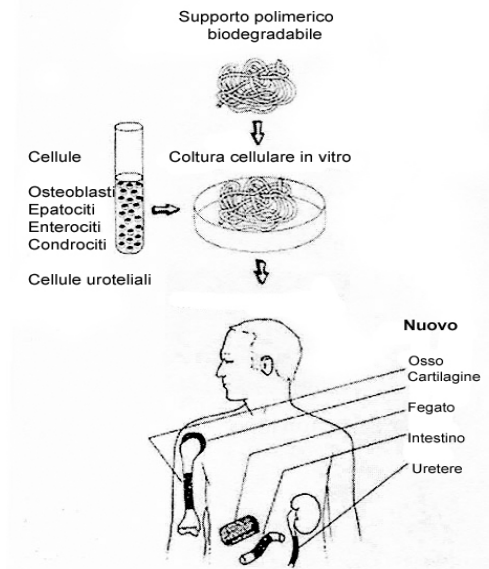


Figura 1.3: Approcci più comuni alla ingegneria tissutale (schema).

da: Langer R, Vacanti J. *Tissue Engineering. Science* 1993, 260:920-6

1.7 Ingegneria Tissutale del fegato

L'ingegneria tissutale ha rivolto grande attenzione in questi ultimi anni alla possibilità di offrire valide alternative al trapianto di fegato sia in termini di risultati che di costi, mediante lo sviluppo di metodiche interne di supporto aggiuntivo della funzione epatica come il trapianto di epatociti o l'impiego di sistemi impiantabili contenenti cellule epatiche, oppure mediante tecniche extracorporee di supporto temporaneo della funzione epatica come il fegato bioartificiale.

Esistono tuttavia ancora molti limiti alla realizzazione di un costrutto 3D in grado di avere funzioni totalmente vicarianti rispetto all'organo nativo.

1.7.1 Anatomia

Il fegato: struttura e funzione

Il fegato è un organo parenchimoso, suddivisibile in segmenti da un punto di vista anatomico-chirurgico; attraverso l'ilo epatico la vena porta e l'arteria epatica raggiungono il fegato mentre da questo si diparte il coledoco.

Il parenchima epatico è ricoperto da una membrana sierosa, la capsula di Glisson, che lo riveste senza interruzioni e si continua nel connettivo interlobulare, fornendo supporto ai vasi sanguigni, ai dotti biliari, ai vasi linfatici e ai nervi.

L'unità strutturale del fegato è rappresentata dal *lobulo epatico*, apparentemente cilindrico o esagonale, del diametro di circa 1-2mm. Ogni lobulo è attraversato

assialmente dalla vena centrolobulare e presenta alla periferia degli spazi connettivali, gli *spazi portali*, distanziati tra di loro e contenenti un'arteriola, un ramo della vena porta ed un dotto escretore interlobulare (triade portale), nervi e vasi linfatici.

L'*acino epatico* invece, costituito dalla massa del parenchima di due lobuli adiacenti, è considerato l'unità funzionale del fegato. L'acino è un'unità microvascolare in cui gli epatociti, che si trovano vicino al ramo terminale della vena porta e all'arteriola epatica vengono refusi direttamente dal sangue, mentre quelli che si trovano vicino alla vena centrolobulare vengono perfusi in un secondo momento con sangue modificato dagli epatociti sovrastanti. Ciascun altro acino viene diviso in tre zone, basate sulla distanza dai vasi nutritivi: la zona 1 (periportale), che riceve le maggiori concentrazioni di ossigeno e soluti; la zona 3 (pericentrale), perfusa da sangue scarsamente ossigenato e la zona 2 che lega le due zone precedenti.

Il parenchima epatico è una massa compatta costituita da cellule epatiche, endoteliali, reticolari di Kupffer e da fibre reticolari. Gli epatociti occupano l'80-90% del volume totale del fegato; sono cellule epiteliali poliedriche, altamente polarizzate, di circa 30-40µm di diametro e organizzate in lamine, che si irradiano da ciascuna triade portale verso le vene centrolobulari adiacenti. Queste lamine sono separate tra loro da spazi, le lacune epatiche, nelle quali si trovano sospesi capillari specializzati, denominati sinusoidi epatici. La parete dei sinusoidi è costituita da cellule endoteliali e da cellule reticolari di Kupffer, con funzione fagocitaria, e da cellule perisinusoidali che accumulano lipidi.

L'endotelio appare fenestrato ed è privo di membrana basale; questa discontinuità permette al plasma, ma non alle cellule, di passare nello spazio perisinusoidale e quindi di prendere diretto contatto con una o più facce delle cellule epatiche.

La membrana plasmatica è di fondamentale importanza nei rapporti tra la cellula e l'ambiente circostante e la matrice extracellulare. La sua superficie presenta tre aree specializzate:

- la porzione basolaterale o sinusoidale;
- la porzione intercellulare;
- la superficie canalicolare;

L'organizzazione strutturale implica che la polarità della secrezione biliare sia orientata verso un anello periferico che circonda il parenchima epatico, mentre gli scambi metabolici avvengono in corrispondenza della superficie che si affaccia sui sinusoidi, implicando un'attività secretoria bidirezionale. (Figura 1.4)

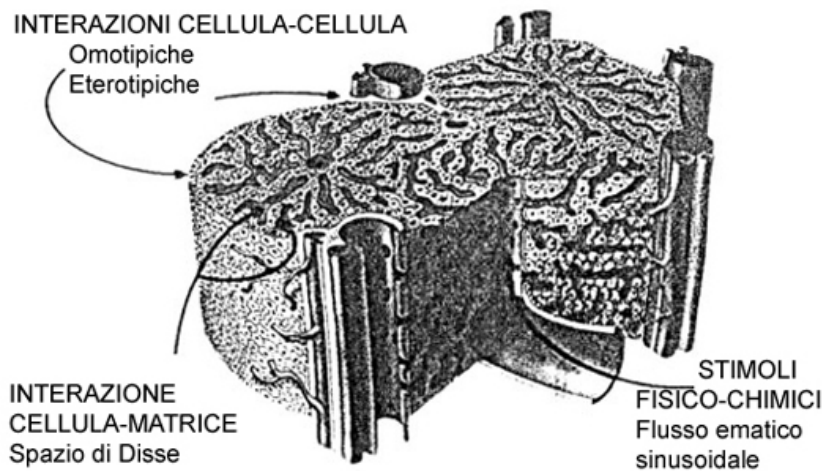


Figura 1.4: Microarchitettura dei lobuli epatici.

Da: Allen JW, Bateia SN. *Engineering liver therapies for the future* Tissue Engineering 2002; 8:725-737

L'ECM svolge un ruolo di estremo rilievo, poiché non si limita ad essere semplicemente un supporto meccanico ed inerte come inizialmente si credeva; piuttosto, riveste un ruolo complesso nel regolare lo sviluppo, la migrazione, la proliferazione e le funzioni cellulari.

In particolare, le componenti dell'ECM sono proteine strutturali che rientrano fondamentalmente in 3 classi distinte.

- Collageni;
- Glicoproteine non collagenose;
- Proteoglicani;

L'ECM epatica garantisce un mezzo di ancoraggio per le cellule e consentendo loro di ottenere trazione per la migrazione, ma anche ricezione di segnali da fattori di crescita che in essa sono presenti. Le proteine della matrice extracellulare infatti giocano un ruolo fondamentale durante la proliferazione e la differenziazione cellulare poiché sono in grado di guidare la morfogenesi dell'organo.

Funzioni del fegato: metabolismo e liver tissue engineering come drug-testing

Più di ogni altro tessuto il fegato dispone di un'ampia versatilità metabolica. La sua stessa localizzazione anatomica riflette la sua funzione di organo intermediario fra i processi di assorbimento intestinale ed i processi metabolici da altri organi o tessuti.

Un ruolo particolarmente importante è il metabolismo dei carboidrati o zuccheri, indispensabili per la produzione di energia; il fegato è il principale organo di accumulo di zuccheri sotto forma di glicogeno.

Esso interviene anche nel metabolismo delle proteine: scissione degli aminoacidi e loro utilizzazione per produzione di ulteriori proteine o energia. Tra le proteine di produzione epatica si ricordano le albumine del plasma, la ceruloplasmina, e fattori della coagulazione (protrombina, fibrinogeno, antitrombina III, fattori VII, IX e XI ect.).

Il fegato concorre in massima parte a disintossicare l'organismo da varie sostanze nocive, rimuovendole e allontanandole direttamente attraverso processi chimici ben definiti. Grazie soprattutto al sistema enzimatico P450 i metaboliti, dopo inattivazione, vengono sottoposti a processi di biotrasformazione attraverso cui si rendono maggiormente idrofili e, dunque, eliminabili. Tale processo consta di: Fase I: eventi ossidativi (formazione di sostanze più polari), a carico delle mono-ossigenasi citocromo P-450 dipendenti e delle flavine mono-ossigenasi; una Fase II in cui i metaboliti sono sottoposti a processi di coniugazione (glucoronidazione, metilazione, acetilazione etc).

I processi di bio-trasformazione seguono generalmente i processi di inattivazione del metabolita; tuttavia molti prodotti intermediari rimangono spesso altamente reattivi e tossici, determinando fenomeni di epatotossicità.

Capacità rigenerativa e colture cellulari

Le cellule epatiche rappresentano una popolazione piuttosto stabile; la vita media degli epatociti è di circa 150 giorni e nel fegato sano è difficile riscontrare cellule in divisione. Studi effettuati su animali da laboratorio hanno dimostrato come anche dopo un'epatectomia estesa (2/3 del fegato) l'organo viene completamente rigenerato in breve periodo di tempo.

I meccanismi coinvolti sono numerosi e non ancora completamente noti, ma fondamentalmente legati a:

- iperplasia rigenerativa o compensatoria (ipertrofia);
- rigenerazione da parte di epatociti;
- rigenerazione da parte di cellule staminali differenziate in epatociti;

É ormai assodato che alla ricostituzione del pool cellulare epatico contribuisca la proliferazione di diversi tipi cellulari in relazione al tipo e all'entità del danno epatico occorso; in particolare è noto che epatociti maturi possano derivare dalla proliferazione di epatociti esistenti nel fegato oppure dalla differenziazione di cellule ovali o di cellule staminali di derivazione midollare.^{33,34}

La replicazione di *epatociti maturi* è ovviamente la modalità più rapida ed efficiente nella ricostituzione del tessuto epatico; tali cellule, normalmente quiescenti, possiedono un'enorme capacità replicativa, come dimostra il processo di rigenerazione epatica dopo epatectomia parziale in fegati sani, sebbene i meccanismi molecolari e biologici, che coinvolgono numerose citochine e fattori di crescita, non siano del tutto ancora chiari.

Molteplici studi *in vivo*, dimostrano invece che almeno alcuni epatociti possiedano una capacità clonogenica, ossia la capacità di dar luogo a molteplici linee cellulari discendenti, capacità peculiare delle cellule staminali.³³ Tale capacità replicativa risulta tuttavia limitata nei casi di cirrosi epatica e di epatopatia cronica, come dimostrano studi condotti su topi.³⁴

Cellule con caratteristiche clonogeniche sono state isolate da fegato fetale di ratto; gli epatociti che esprimono CD49f (integrina $\alpha 6$) e CD29 (integrina $\beta 1$) ma non c-kit, CD45, o Ter1 19, ossia antigeni caratteristici dei precursori della linea eritroide, presentano maggiore capacità di formare colonie.^{35,36}

Piccoli epatociti

All'interno del fegato sono presenti anche altre cellule, con maggiore attività replicativa rispetto agli epatociti maturi. Possono essere suddivise in almeno due gruppi distinti, uno maggiormente caratterizzato da un punto di vista fenotipico a cui appartengono i piccoli epatociti (small hepatocytes - SH), l'altro rappresentato invece da cellule staminali derivate da midollo osseo emopoietico. Non meno importante peraltro la loro interazione con cellule non parenchimali del fegato (NPC) (fibroblasti, endotelioцитi, cell. di Kuppfer) nei processi di induzione della rigenerazione epatica e nell'organogenesi.³⁷

1.7.2 Sistemi di bioreattori: differenti design

Studi in vitro

I primi lavori in ingegneria tissutale del fegato si sono basati su studi *in vitro* anche se in realtà ancora oggi vi è la necessità di disegnare lavori in condizioni statiche per cercare di semplificare e limitare il più possibile i potenziali bias.

Una delle maggiori difficoltà incontrate nella morfogenesi di tessuto epatico *in vitro* rimane legato alla polarizzazione cellulare. Vi è evidenza infatti che, malgrado gli epatociti giochino un ruolo fondamentale nel processo di rigenerazione di tessuto epatico, essi non operano in maniera isolata, come Matsumoto et al. hanno già dimostrato, ma piuttosto sono coinvolti in un complesso meccanismo di interazione tra cellule parenchimali e non parenchimali, tra cellule e fattori solubili (citochine, fattori di crescita) e tra cellule ed ECM. Come già detto, infatti, il microambiente è estremamente importante ai fini della modulazione della crescita cellulare, della migrazione e della differenziazione. Epatociti e cellule non parenchimali, come endotelioцити e cellule stellate, agiscono come unità funzionali e comunicano tra di loro attraverso segnali solubili: è lecito supporre che la loro interazione abbia un ruolo chiave nello sviluppo di strutture tissutali epatiche polarizzate e istologicamente strutturate.³⁸

Proprio per questo motivo, molti studi hanno dimostrato che la differenziazione di cellule epatiche immature è molto più evidente su scaffold 3D piuttosto che sulla bi-dimensione; gli scaffold 3D sono solitamente costituiti con modalità *nanotech* su materiali inerti come Matrigel (membrana basale estratta da campioni di sarcoma di topi Engelbreth-Holm-Swarm), in grado di agire costituendo una complessa matrice EC.^{39,40} Al momento attuale, in realtà vari *coatings* (rivestimenti di scaffolds) come ad esempio fibronectina, collagene o lo stesso Matrigel, sono stati utilizzati nel supportare anche la maturazione di cellule staminali pur nei limiti di questo processo differenziativo.⁴¹⁻⁴³

A tale riferimento è stato recentemente riportato in letteratura la differenziazione di cellule staminali somatiche da sangue cordonale verso cellule cosiddette *hepatocyte-like* su complesse strutture *nanotech*, costituite da nano fibre [poly (epsilon-Caprolactone) nanofiber].⁴⁴

Kazemnejad et al (2009) hanno riportato in letteratura vari dati, dimostrando dapprima una differenziazione di hBMSCs (human Bone Marrow Stem Cells) in cellule simil-epatocitarie su matrici artificiali di nano fibre costituite da PCL, collagene e PES. Inoltre gli stessi autori hanno dimostrato che materiali in nanofibra come PCL/collagene/

PES non solo sono in grado di stimolare la differenziazione cellulare ma anche di favorire la funzionalità epatocitaria.⁴⁵

Tutti questi lavori, tuttavia, hanno ottenuto solo risultati parziali e spesso speculativi; per tale motivo è opinione comune la necessità di ulteriori studi per meglio definire i sistemi di coltura e la architettura degli scaffolds nei processi di maturazione cellulare.

Studi in vivo

I primi studi *in vivo* hanno previsto l'impianto di popolazioni cellulari, a loro volta seminate o meno all'interno di scaffolds (i.e. matrici di *hydrogel*), in diversi compartimenti dell'organismo (sistema vascolare, cavità, organi del corpo).⁴⁶

Tra gli altri, il fegato è stato sede di impianti cellulari attraverso il sistema portale, anche se in questo caso la quantità di cellule trapiantate è limitato dal fatto che la iniezione intraportale può determinare eventi di embolismo con necrosi epatocitaria.

Per questo è stata considerata, come sito alternativo, la milza; in questo caso gli impianti hanno dimostrato una buona vitalità con discreta conservazione anche delle capacità funzionali.^{47,48} Anche in questo caso, tuttavia, il numero delle cellule impiantabili è limitato dalle capacità volumetriche dell'organo. Per questo motivo sono state suggerite possibili altre opzioni, come la cavità peritoneale, che non richiedono trattamenti estremamente invasivi e garantisce un'ampia superficie di impianto; in questo caso, tuttavia, lo svantaggio è legato alle limitate capacità di mantenere una adeguata vitalità a lungo termine.

Per cercare di superare questo problema, gli studi *in vivo* hanno previsto la semina su scaffolds dotati di design innovativi, caratterizzati da strutture precedentemente dotate elementi "simil-vascolari", come spugne polimeriche, al fine di favorire la diffusione di O₂ e metaboliti.

Nonostante questo approccio abbia dimostrato un netto vantaggio, tuttavia il successo di tali supporti rimane comunque legato ai limiti di diffusione delle sostanze, a causa della mancanza di un vero network vascolare del costruito; questo aspetto ha fortemente limitato la possibilità di implementare le dimensioni dei primi scaffolds.

La realizzazione di strutture 3D polimeriche biodegradabili ha invece permesso la costituzione di costrutti complessi e riproducenti le naturali strutture attraverso ricostruzioni 3D della normale anatomia vascolare e parenchimale del tessuto originario. Epatociti isolati su foglietti di PGA sono stati inizialmente impiantati sul foglietto mesenteriale e sull'omento di topi singenici: in queste condizioni le cellule

hanno espresso funzioni metaboliche epato-specifiche prima del trapianto e sono sopravvissute per un periodo esteso dopo l'impianto, costituendo strutture istologicamente organizzate.^{49,50} E' stata comunque notata una significativa perdita di cellule dopo trapianto; questo è stato interpretato come dovuto a (a) incapacità di garantire comunque un adeguato supporto metabolico e di O₂, (b) mancanza di uno stimolo sufficiente, o entrambe questi motivi.

Stein et al hanno realizzato uno scaffold prevascolarizzato composto da alcohol polivinico su cui è stata realizzata la coltura cellulare, successivamente trapiantato in animale; lo stimolo rigenerativo e proliferativo dello scaffolds è stato favorito dalla contestuale realizzazione di una epatectomia parziale e di uno shunt porto-cavale.⁵¹ Il rilascio di fattore epatotropi nel circolo sistemico hanno determinato un significativo aumento della sopravvivenza cellulare.

Higashiyama et al hanno invece trapiantato epatociti di ratto su dischi di idrossiapatite (HA) nella cavità peritoneale di ratti Nagase knockout per la produzione di albumina (NARs). Processi di angiogenesi sono stati osservati all'interno dei pori dei dischi, e la vitalità cellulare si è mantenuta per un minimo di 3 settimane, come evidenziato da un aumento dei livelli di albumina.⁵² Peraltro gli autori hanno tentato di mantenere vitale e funzionante la coltura attraverso la realizzazione di colture miste con cellule non parenchiamli (NPLCs).^{53,54}

Sulla scorta di questi primi risultati, molti autori sono dunque traslati alla realizzazione di questi design sul grande animale.⁵⁵ I dati preliminari, pur dimostrando risultati suggestivi, indicano tuttavia la necessità di implementari e migliorare i design finora proposti prima di una reale e possibile applicazione clinica.

BIBLIOGRAFIA

1. Langer R, Vacanti JP "Tissue engineering" *Science* 1993;260:920-6;
2. Neuberger J "Liver Transplantation" *J Hepatology* 2000;32(Suppl.1):198-207;
3. Williams DF "To engineer is to create: the link between engineering and regeneration". *Trends in Biotechnology* 2006;24(1):4-8;
4. Giusti P Dispense del corso "Nuove Tecnologie in Chirurgia – Modulo I: Realizzazione e impianto di dispositivi biomedici" 2005/2006; Facoltà di Ingegneria, Pisa;
5. Christenson L, Dionne KE, Lysaght MJ "Fundamentals of animal cell encapsulation and immobilization MFA" Goosen Ed. 1993:7-41;
6. Chan C, Berthiaume F, Nath BD "Hepatic tissue engineering for adjunct and temporary liver support: critical technologies" *Liver transplantation* 2004;10(11):1331-1342;
7. Vacanti JP, Morse MA, Saltzman WM, Domb AJ, Perez-Atayde A, Langer R "Selective cell transplantation using bioabsorbable artificial polymers as matrices" *J Pediatr Surg* 1988; 23(1Pt2):3-9;
8. Walgenbach KJ, Voigt M, Riabikhin AW, Andree C "Tissue engineering in plastic reconstructive surgery" *The Anatomical Record* 2001;263:372-378;
9. Stocum DL "Stem cell in regenerative biology and medicine" *Review Wound Rep* 2001 9(6): 429-442;
10. Snykers S, De Kock J, Rogiers V, Vanhaecke T "In vitro differentiation of embryonic and adult stem cells into hepatocytes: State of the art" *Stem Cells* 2009;27(3):577-605;
11. Theise ND "Gastrointestinal stem cells. III. Emergent themes of liver stem cell biology: niche, quiescence, self-renewal, and plasticity" *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 290(2):189-193;
12. Naveiras O, Daley GQ "Stem cells and their niche: a matter of fate" *Cell Mol Life Sci* 2006;63(7-8): 760-766;

13. Benayahu D, Akavia UD, Shur I "Differentiation of bone marrow stroma-derived mesenchymal cells" *Curr Med Chem* 2007;14(2):173-179;
14. Moore KA, Lemischka IR "Stem cells and their niches" *Science* 2006;311(5769):1880-1885;
15. Shafritz DA, Oertel M, Menthen A, Nierhoff D, Dabeva MD "Liver stem cells and prospects for liver reconstitution by transplanted cells" *Hepatology* 2006;43(2Suppl1):S89-98;
16. Zhao R, Duncan SA "Embryonic development of the liver" *Hepatology* 2005;41(5):956-967;
17. Kinoshita T, Miyajima A "Cytokine regulation of liver development" *Biochim Biophys Acta* 2002; 1592(3):303-312;
18. Lazaro AC, Croager JE, Mitchell C "Establishment, characterization and long-term maintenance of cultures of human fetal hepatocytes" *Hepatology* 2003 38(5):1095-1106;
19. Satoshi K, Stephen K, Byung-Soo K, Mooney DJ "Survival and function of rat small hepatocytes cocultured with non-parenchymal cells or sinusoidal endothelial cells on biodegradable polymers under flow conditions" *J. of pediatric Surgery* 2000 35(9):1287-1290;
20. Walgenbach KJ, Riabikhin AW et al. "Analysis of the proliferative effect of angiogenic growth factors on a 3D endothelial cell culture in collagen matrix" *Langenbecks Arc Surg* 1999; 384:491-514;
21. Vogt PM "Zum Einsatz von Wachstumsfaktoren in der Therapie chronischer Wunde- Experimentelle, klinische und finanzielle Aspekte" *Chirurg* 1998;69:1197-1206;
22. Folkman J "Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease" *Nat Med* 1995; 1:27-31;
23. Vernon RR, Sage EH "A novel quantitative model for study of endothelial cells migration and sprout formation within three-D collagen matrices" *Microvasc Res* 1999; 57: 118-133;

24. Lazarous DF, Scheinowitz M, Shou M, Hodge E “Effects of chronic systemic administration of basic fibroblast growth factor on collateral development in the canine heart” *Circulation* 1995; 91: 145-153;
25. Werkmeister JA, Edwards GA, Casagrande F, White JF, Ramshaw JA “Evaluation of collagen-based biosynthetic material for the repair of abdominal wall defects” *J Biomed Mater Res* 1998 39: 429-436;
26. Vindigni V, Cortivo R, Iacobellis L, Abatangelo G, Zavan B. “Hyaluronan benzyl ester as a scaffold for tissue engineering” *Int J Mol Sci.* 2009;10(7):2972-85;
27. Hubbel JA “Biomaterials in tissue engineering” *Biotechnology* 1995; 13: 565-576;
28. Shieh SJ, Terada S, Vacanti JP “Tissue engineering auricular reconstruction: in vitro and in vivo studies” *Biomaterials* 2004;25:1545-57;
29. Hench LL, Polak JM “Third-generation biomedical materials” *Science* 2002; 255:1014-1017;
30. Jeong B, Gurowska A “Lessons from nature: stimuli-responsive polymers and their biomedical applications” *Trends in Biotechnol* 2002; 20:305-311;
31. Vacanti JP, Langer R. “Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation” *Lancet* 1999; 345(Suppl1):S132-4;
32. Shieh SJ, Vacanti JP “State of the art tissue engineering: from tissue engineering to organ building” *Surgery* 2005; 137(1):1-7;
33. Alison MR, Poulsom R, Forbes S, Wright NA “An introduction to stem cells” *Journal Pathol*, 2002; 197:419;
34. Fausto N “Liver regeneration and repair: hepatocytes, progenitor cells and stem cells” *Hepatology* 2004; 39:1477-1487;
35. Suzuki A, Zheng Y, Kondo R, Kusakabe M, Takada Y, Fukao K, Nakauchi H, Taniguchi H “Flow-cytometric separation and enrichment of hepatic progenitor cells in the developing mouse liver” *Hepatology* 2002;32:1230-9;
36. Overturf K, Al-dhalimy M, Ou CN, Finegold M, Grompe M “Serial transplantation reveals the stem-cell-like regenerative potential of adult mouse hepatocytes” *Am Journal Pathology*, 1997; 151(5):1273-9;

37. Bhatia SN, Balis UJ, Yarmush ML, Toner M “Effect of cell-cell interaction in preservation of cellular phenotype: cocultivation of hepatocytes and non-parenchymal cells” *FASEB Journal* 1999;13:1883-1900;
38. Harada K, Mitaka T, Miyamoto S et al. “Rapid formation of hepatic organoid in collagen sponge by rat small hepatocyte and hepatic nonparenchymal cells” *Journal of Hepatology* 2003 39: 716-723;
39. Kamiya A, Kojima N, Kinoshita T, Sakai Y, Miyajima A “Maturation of fetal hepatocytes in vitro by extracellular matrices and oncostatin M: induction of tryptophan oxygenase. *Hepatology* 2002;35(6):1351-1359;
40. Kazemnejad S, Allameh A, Soleimani M, Gharehbaghian A, Mohammadi Y, Amirizadeh N, et al. ”Development of a novel three-dimensional biocompatible nanofibrous scaffold for the expansion and hepatogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells” *Iran J Biotechnol* 2007;5(4):201-211;
41. Ouchi H, Otsu K, Kuzumaki T, Iuchi Y, Ishikawa K. “Synergistic induction by collagen and fibronectin of liver-specific genes in rat primary cultured hepatocytes” *Arch Biochim Biophys* 1998;358(1):58-62;
42. Shu SN, Wei L, Wang JH, Zhan YT, Chen HS, Wang Y. “Hepatic differentiation capability of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells” *World J Gastroenterol* 2004;10(19):2818-2822;
43. Shi XL, Qiu YD, Li Q, Xie T, Zhu ZH, Chen LL, et al. “Hepatocyte like cells from directed differentiation of mouse bone marrow cells in vitro” *Acta Pharmacol Sin* 2005;26(4):469-476;
44. Hashemi S, Soleimani M, Zargarian S, Haddadi-Asl V, Ahmadbeigi N, Soudi S, et al. “In vitro differentiation of human cord blood-derived unrestricted somatic stem cells into hepatocyte-like cells on poly(-Caprolactone) nanofiber scaffolds.Cells” *Tissues Organs* 2009;190(3):135-149;
45. Kazemnejad S, Allameh A, Soleimani M, Gharehbaghian A, Mohammadi Y, Amirizadeh N, et al. “Biochemical and molecular characterization of hepatocyte-like cells derived from human bone marrow mesenchymal stem cells on a novel threedimensional biocompatible nanofibrous scaffold” *J Gastroenterol Hepatol* 2009;24(2):278-287;
46. Gupta S, Malhi H, Gorla GR. “Re-Engineering the liver with natural biomaterials” *Yonsei Med J* 2000;41(6):814-824;

47. Ikebukuro H, Inagaki M, Mito M, Kasai S, Ogawa K, Nozawa M “Prolonged function of hepatocytes transplanted into the spleens of Nagase analbuminemic rats” *Eur Surg Res* 1999;31(1):39-47;
48. Mito M, Ebata H, Kusano M, Onishi T, Saito T, Sakamoto S “Morphology and function of isolated hepatocytes transplanted into rat spleen” *Transplantation* 1979;28(6):499-505;
49. Mooney D, Johnson L, Cima L. “Principles of tissue engineering and reconstruction using polymercell constructs” *Mat Res Soc Symp Proc* 1992; 252:345-352;
50. Mikos AG, Sarakinos G, Lyman MD, Ingber DE, Vacanti JP, Langer R “Prevascularization of porous biodegradable polymers” *Biotechnol Bioeng* 1993;42(6):716-723;
51. Cima LG, Ingber DE, Vacanti JP, Langer R “Hepatocyte culture on biodegradable polymeric substrates” *Biotechnol Bioeng* 1991;38(2):145-158;
52. Higashiyama S, Noda M, Muraoka S, Hirose M, Ohgushi H, Kawase M, et al “Transplantation of hepatocytes cultured on hydroxyapatite into Nagase analbuminemia rats” *J Biosci Bioeng* 2003;96(1):83-85;
53. Yagi K, Sumiyoshi N, Yamada C, Michibayashi N, Nakashima Y, Kawase M, et al “In vitro maintenance of liver function in hierarchical co-culture of hepatocytes and non-parenchymal liver cells” *J Ferment Bioeng* 1995;80(6):575-579;
54. Higashiyama S, Noda M, Muraoka S, Uyama N, Kawada N, Ide T, et al “Maintenance of hepatocyte functions in co-culture of hepatic stellate cells” *Biochem Eng J* 2004;20(2-3):113-118;
55. Takeda T, Murphy S, Uyama S, Organ GM, Schloo BL, Vacanti JP “Hepatocyte transplantation in swine using prevascularized polyvinyl alcohol sponges” *Tissue Eng* 2007;1(3):253-262;

2.1 INTRODUZIONE

Il seguente capitolo espone una delle fasi progettuali e sperimentali che contraddistinguono il carattere bio-ingegneristico del progetto.

Tale lavoro è il risultato di una collaborazione con il Center for Regenerative Medicine (Prof. J.P. Vacanti), Massachusetts General Hospital, Harvard University, Boston (USA).

Particolare attenzione è stata dedicata agli studi di fattibilità, al dimensionamento delle varie parti e all'integrazione tra teoria e pratica, nell'ottica di una progettualità multistep.

Per ottenere delle strutture ingegnerizzate epatiche funzionali, ovvero che presentino lo stesso "comportamento" del tessuto naturale, occorre realizzare innanzi tutto un adeguato sistema di coltura. La realizzazione di tale sistema, tuttavia, prevede la vitalità della coltura cellulare attraverso opportuni scambi metabolici. Normalmente il parametro che maggiormente limita gli scambi metabolici è sicuramente lo spazio che le sostanze devono attraversare; la risposta fisiologica a questo problema è la realizzazione di una adeguata componente vascolare in grado di supportare la coltura cellulare.

Negli interspazi di tessuto ben vascolarizzato, tra arteriole e vene si diparte, infatti, una fitta rete capillare la cui sezione ha una densità di 1300 capillari per mm^2 e la distanza intercapillare è di circa 34 μm . Questa distanza è ben inferiore alla massima distanza di diffusione di ossigeno, glucosio, anidride carbonica e altri prodotti di scarto. Fisiologicamente, dunque, arteriole e venule viaggiano appaiate formando un efficiente sistema "contro-corrente".¹ Inoltre, studi hanno dimostrato che un lembo di tessuto (biologico o ibrido) se opportunamente posizionato in prossimità di un peduncolo artero-venoso, dopo un periodo dell'ordine delle settimane, viene vascolarizzato.²

Sulla scorta di queste osservazioni questo step del progetto ha previsto un primo approccio *in vitro*; in particolare lo sviluppo di strutture polimeriche, dotate di micropattern canalicolari che mimino realisticamente la geometria delle fisiologiche reti microvascolari, con il fine di realizzare un sistema di coltura adeguato e potenzialmente impiantabile.

Per avere *in vitro* delle condizioni di coltura che siano più vicine possibili a quelle *in vivo* la soluzione più, pratica è stata l'utilizzo di un bioreattore, caratterizzato dalla presenza di una "camera microvascolare" (*vascular chamber*) preformata, che permetta di mantenere vitale una coltura cellulare adiacente, posta in una camera cosiddetta "parenchimale" (*parenchymal chamber*); la realizzazione di tale sistema richiede la ingegnerizzazione di neostrutture vascolari *ad hoc*, ovvero in grado di simulare un flusso pulsatile di valore paragonabile a quello biologico e, pertanto, capace di offrire un adeguato supporto alla coltura epatocitaria adiacente.

In questo progetto siamo intervenuti soprattutto su due aspetti per migliorare la struttura e la funzione del prodotto finale:

- pattern di flusso, con studi di fluidodinamica su parametri fisiologici noti;
- trasporto di nutrienti e gas, per ottimizzare il metabolismo cellulare;

Il fine ultimo, e d'altra parte oggetto del capitolo successivo, è stato quello di realizzare un device epatico potenzialmente impiantabile *in vivo* e caratterizzato dalla presenza di un sistema micro-vascolare preformato.

Il bioreattore è stato ottenuto adottando le metodiche *biotech* MEMS (Micro-Electro-Mechanical Systems (MEMS)). Il campo in continuo sviluppo delle nanotecnologie ha infatti aperto in questi ultimi anni nuovi fronti, in grado di provvedere e di creare, in micro risoluzione, piattaforme per il controllo del microambiente di colture cellulari.³

Già molti lavori sono stati eseguiti con queste tecniche, in questo caso con lo scopo di realizzare studi di analisi di epatotossicità e saggi di funzione metabolica epatica.⁴⁻⁷

L'approccio MEMS, attraverso tecnica fotolitografica, ha reso possibile nel nostro caso la realizzazione di un bioreattore in biopolimeri costituito da due camere (vascolare e cellulare) adiacenti tra loro ma separate da una membrana semipermeabile in grado di permettere una diffusione selettiva di soluti; il network microvascolare ha permesso a sua volta di garantire la perfusione del medium con caratteristiche di flusso e stress meccanico controllate.

Le tecniche di microfabbricazione (*soft lithography*) hanno realizzato dapprima un prototipo del modello in silicone, che poi ha permesso la realizzazione definitiva degli scaffolds in materiale biocompatibile. Iniettando infatti il biopolimero in fase fluida nel prototipo di stampo precedentemente ottenuto, si ottiene una struttura su scala naturale del modello progettato, dotata di una rete microvascolare con canali che simulano realisticamente il complesso ambiente fisiologico.

La stessa tecnica è stata utilizzata anche per costituire una camera parenchimale per la coltura epatocitaria; le due camere così ottenute e organizzate in un bilayer costituiscono in questo modo un bioreattore per coltura dinamica a flusso continuo di medium.

Il design così ottenuto ha dimostrato di essere in grado di provvedere *in vitro* ad un adeguato supporto di O₂ e nutrienti, mantenendo vitali e funzionanti colture cellulari primarie di epatociti di ratto e linee di epatoblastima.

(Lavoro pubblicato su *Biomedical Microdevices* 2008;10(6):795-805)

2.2 MATERIALI E METODI

2.2.1 Ingegnerizzazione degli “scaffolds” in Polydimethylsiloxane (PDMS) con nanotecnologia MEMS e realizzazione del bioreattore

Al fine di ricreare l'ambiente naturale in cui si trovano normalmente gli epatociti, si è progettato un supporto che potesse aderire il più possibile alle condizioni fisiologiche; tale obiettivo è stato realizzato considerando la densità e le dimensioni cellulari, la necessità del design di un network vascolare che simuli strutture capillari e che garantisca distribuzione di sangue e nutrienti (in questo caso medium), mantenendo allo stesso tempo alte concentrazioni e funzionalità epatocitaria.

Il fegato umano presenta normalmente le seguenti caratteristiche: circa 60,000,000 capillari con flusso di 1L/min ed un range pressorio di 10mmHg; capacità di sintesi di 96 mg di albumina/Kg peso corporeo/die; produzione di circa 12-36g di bile/die; sono infine richiesti livelli di shear stress di ~1 dyne/cm² per gli epatociti e 1-10 dyne/cm² per le cellule endoteliali.

Il device realizzato per lo studio è un sistema composto da una camera vascolare e da un compartimento parenchimale separati tra di loro da una membrana porosa, selettivamente permeabile.

Il compartimento vascolare è stato realizzato a partire da un algoritmo basato su modelli frattali, in grado di riprodurre, con un network capillare unidirezionale (inlet → outlet), un flusso “fisiologico” di medium, ottimizzando la distribuzione e il trasferimento di nutrienti e di ossigeno nelle 2 dimensioni; la sovrapposizione di più

compartimenti prevede la finalità ultima di realizzare un modello 3D con una architettura vascolare complessa, asimmetrica e non-intersecante.

La distribuzione dei diametri dei canali vascolari del nostro sistema, secondo la definizione del “diametro-definito” di Strahler, ripropone la normale anatomia, anche se in maniera semplificata: abbiamo, infatti, considerato, per la realizzazione del design, elementi già noti di anatomia microscopica, oltre che di reologia e fluidodinamica.

I risultati preliminari hanno dimostrato che la struttura, costituita da elementi canalicolari altamente interconnessi tra di loro e con morfologia esagonale, è in grado di garantire una alta densità di strutture capillari (Grafico 2.1): il design iniziale (cosiddetto Hextak), prevede infatti oltre 1×10^6 capillari.

L’uso dei frattali nella ingegnerizzazione del sistema vascolare, ha permesso peraltro di poter adattare facilmente le dimensioni dello stesso alle esigenze della coltura, fino a raggiungere scale potenzialmente macroscopiche capaci di supportare in linea teorica il 30% della massa epatica.

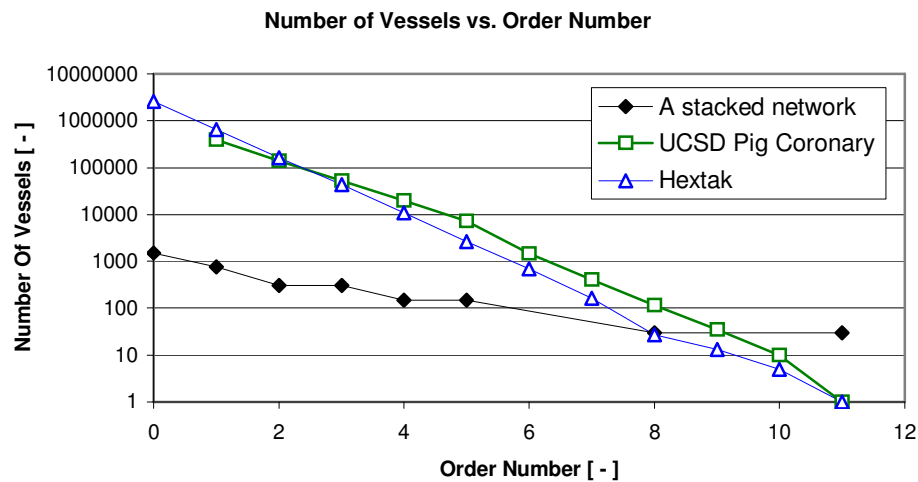


Grafico 2.1: Numero di canali vascolari vs “order number” di un network vascolare standard; il design Hextak si basa sul sistema arterioso vascolare coronarico del maiale.

Scopo di questo design è stato dunque di garantire alle cellule un continuo ed adeguato apporto di nutrienti ed ossigeno; l’analisi dettagliata del trasporto di tali elementi ha rappresentato un nostro importante impegno in tutto il progetto.

La camera parenchimale è adibita, invece, per la coltura delle cellule epatiche, che, attraverso la membrana semipermeabile, sono mantenute vitali dai nutrienti del medium che diffondono dal compartimento vascolare.

Nel suo insieme il bioreattore così ingegnerizzato, si presenta come esemplificato nello schema rappresentato in Figura 2.1

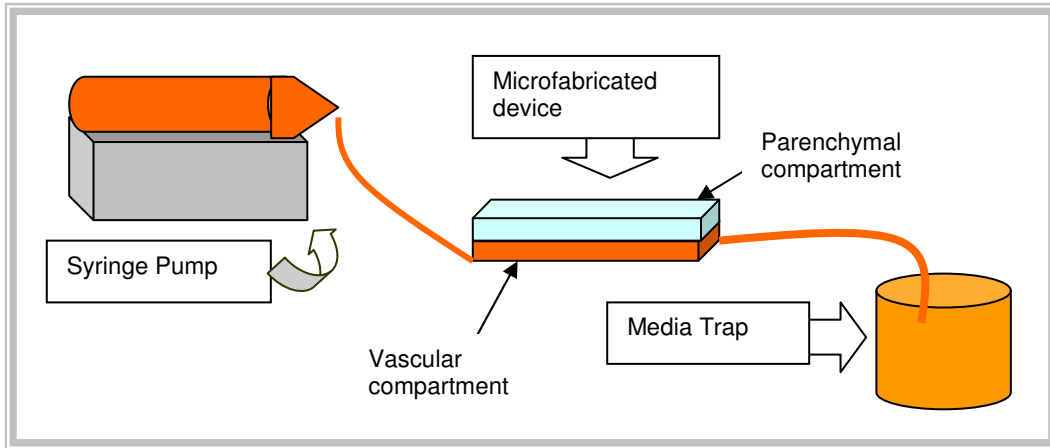


Figura 2.1: Esempificazione del setting del bioreattore *in vitro*

A dimostrazione della efficacia del sistema, precedenti studi hanno già dimostrato che tale struttura può essere sottoposta a processi di endotelizzazione del compartimento vascolare, attraverso semina di endotelioцитi ottenuti da aorta di ratto.⁸ (Figura 2.2)

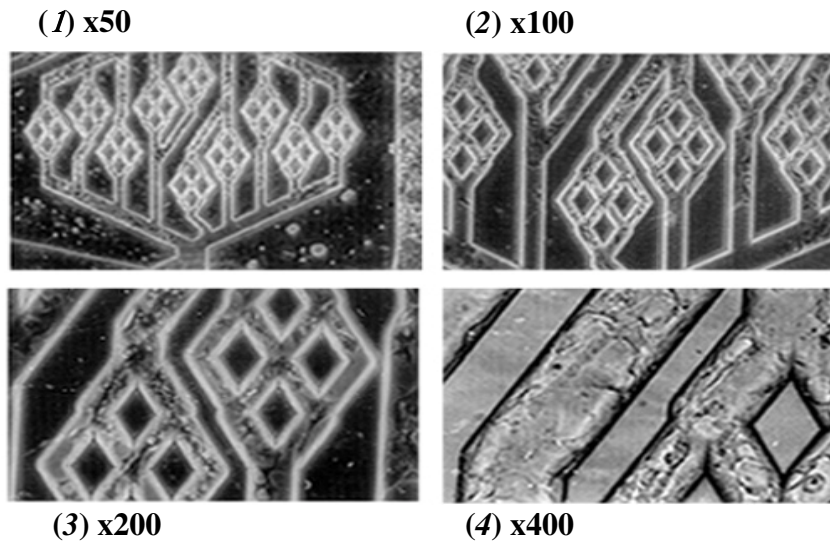


Figura 2.2: Adesione e crescita di cellule endoteliali nei canali del compartimento vascolare in condizioni di flusso. Ingrandimento x50 (1), x100 (2), x200 (3), x400 (4)

Modello computazionale

Il network microvascolare è stato ingegnerizzato sulla base di un modello computazionale precedentemente descritto dal gruppo di ricerca, impostato sul modello reologico di microcircolazione multifasica non-Newtoniana.⁹

Nella realizzazione del modello matematico, il volume cellulare e la variazione del volume ematico sono stati mantenuti come parametri costanti per ciascun punto di biforcazione dei canali vascolari, mentre il momento è stato conservato lungo ciascun canale. La differenza di pressione in ciascun tratto vascolare è in relazione alla viscosità del fluido (terreno di coltura o sangue) che a sua volta varia con il diametro del vaso e con il valore di ematocrito. L'ematocrito in ciascun vaso dipende invece dal flusso e dal grado di separazione cellulare a livello delle biforcazioni.

La dinamica non-lineare del flusso ematico proposta nel network vascolare è stata calcolata utilizzando un algoritmo che prevede a sua volta due sotto-schemi, il “calcolo del flusso” e il “calcolo reologico”. L'ematocrito è stato valutato nell'intero network vascolare e la conduttanza è stata calcolata in ciascun vaso del sistema utilizzando la relazione empirica di Pries.¹⁰

E' stato progettato un modello matematico governato da equazioni lineari per il flusso vascolare e la pressione nei punti di biforcazione dei vasi, in relazione ai parametri reologici, alla conduttanza ed alla continua variazione dei parametri di flusso e della velocità lungo ciascun vaso.¹¹ Il flusso frazionale in ciascun vaso [numero di globuli rossi (RBCs) per unità di lunghezza] risulta correlato alla percentuale di flusso frazionale del sangue intero e dal rapporto globuli rossi/diametro vascolare.

Il design frattale del network microfluidico [Fig. 2.3(a)] e la conseguente implementazione nel device micro-ingegnerizzato permettono di ottenere in questo modo un sistema dotato di flusso uniforme e laminare lungo il network vascolare, con valori fisiologici di *shear stress* [Fig. 2.3(a)]. Le caratteristiche topologiche e geometriche nel design dei frattali sono state opportunamente scelte proprio per ottimizzare le caratteristiche di flusso e *shear stress* del device.

I parametri così ottenuti sono stati verificati e confermati dalle osservazioni sperimentali.

Pattern vascolare e design del modello

Una descrizione dettagliata del processo di *micromachining* del biomateriale è stata realizzata precedentemente da J. Borenstein et al.¹²

I vasi principali in entrata ed in uscita sono di 2,650 μm , tali da poter essere collegati a sistemi di perfusione esterna. I vasi si suddividono progressivamente in canali minori fino a raggiungere 35 μm in profondità, formando strutture vascolari sempre più piccole, approssimativamente comparabili a sinusoidi epatici per diametro e lunghezza; successivamente gli stessi vasi convergono tra di loro per formare, a questo punto, la rete vascolare “venosa” di uscita, fino a costituire un unico canale di *outlet* [Fig. 2.3(a)]. Il disegno del modello così generato dal software è stato traslato con tecnica litografica MEMS sulla superficie di una piattaforma, utilizzata come prototipo standard, di 100 mm di diametro in materiale siliconato semiconduttore.

Pertanto, una pellicola fotoresistente di circa 2.4 μm di spessore è stata posta sulla superficie del modello in silicone e poi esposta a luce UV; quindi un incisore a ioni è stato utilizzato per riproporre il modello in configurazione isotropica, con canalicoli profondi circa 100 μm . Il prototipo così ottenuto è stato utilizzato per la riproduzione serietà di molteplici camere vascolari.

Lo stesso processo è stato utilizzato per la realizzazione della camera parenchimale di 100 μm di profondità: un compartimento rettangolare con dimensioni e orientazione speculare rispetto alla camera vascolare. All'interno della camera parenchimale è stata realizzata anche una distribuzione ordinata di piccole colonne cilindriche di 20 μm di diametro, a 100 μm l'una dall'altra lungo la superficie, per garantire l'integrità strutturale della stessa e della membrana di appoggio (Fig. 2.3(b)); ciò ha evitato deformazioni e avvallamenti della superficie di semina.

Allestimento del bioreattore

L'elastomero in silicone Sylgard 184 (polydimethylsiloxane, PDMS) e un agente solidificante (Dow Corning, Midland, MI) sono stati miscelati in rapporto 10:1. La soluzione così ottenuta è stata disposta sui prototipi vascolare e parenchimale dei modelli precedentemente descritti fino a raggiungere superfici (layers) di spessore pari a 1.2 mm, e successivamente posti su piastre Petri di 150 mm. La miscela è stata dunque lasciata degasare a temperatura ambiente per 6h prima di avviare il processo di solidificazione, a 65°C per 24h. Una volta completamente solidificati, i layers di PDMS sono stati separati dai modelli in silicone.

Si è proceduto dunque ad assemblare il prodotto finale: ciascun bioreattore è costituito da un bilayer composto da un compartimento vascolare ed uno parenchimale, separati tra di loro da una membrana semipermeabile in policarbonato (nanopori con

diametro medio di 0.4 μm , 12% porosità) (Isopore, Millipore, Billerica, MA, USA). Tale membrana viene sigillata al compartimento vascolare con colla in silicone (Dow Corning 3140) e lasciata solidificare per 24h. Il compartimento vascolare e parenchimale sono a loro volta adesi tra di loro con modalità “plasma oxygen”. (Fig. 1(c)).

Per poter connettere il bioreattore ai sistemi di flusso (pompe), 2 tubi 04 Silastic (ID 0.76 mm and OD 1.65 mm, Dow Corning, Midland, MI) sono stati inseriti a livello dei punti di ingresso e di egresso del sistema vascolare, attraverso l’uso di punches dermatologici (Miltex, York, PA, USA) con la formazione di piccoli fori di inserimento (1.65 mm diametro). Altri 2 tubi Silastic, delle stesse dimensioni, sono stati inseriti nella camera parenchimale con modalità simili, mentre una colla ad alta tenuta è stata utilizzata per mantenere i tubi in posizione.

Tutti i bioreattori sono stati sterilizzati con gas all’ossido di etilene e lasciati degasare per 24h prima dell’utilizzo; nel corso degli esperimenti alcuni dei bioreattori realizzati sono stati sottoposti, random, a tests di controllo di qualità. In tal caso, sono stati perfusi con soluzione di Trypan 0.4% e valutati al microscopio ad inversione per verificare eventi di delaminazione della membrana o *leakage* all’interno dei canali microvascolari [Fig. 2.3(c)].

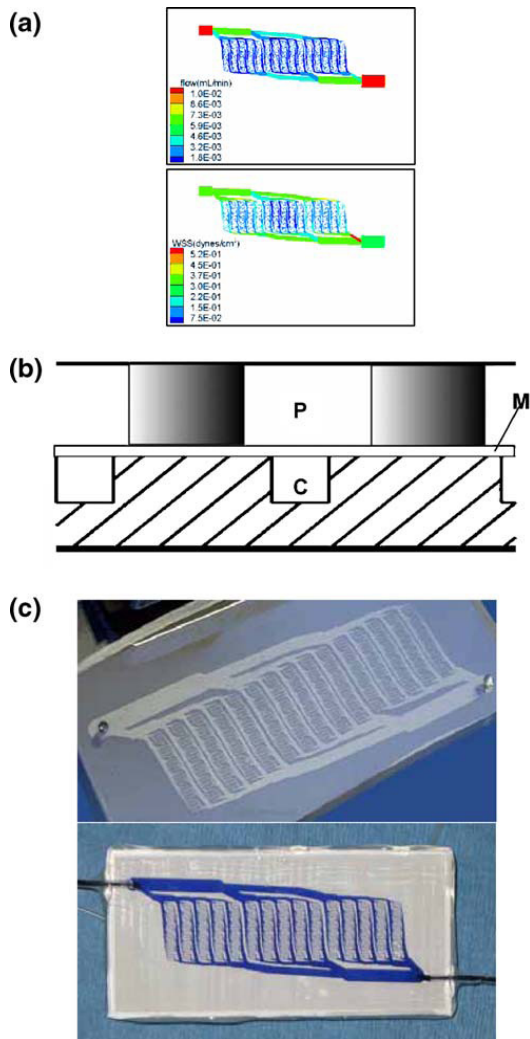


Fig. 2.3 (a) Modello matematico con descrizione del flusso e dello shear stress del network vascolare con canali profondi $100\ \mu\text{m}$ a $10\ \mu\text{l}/\text{min}$. (b) Sezione trasversale del device bilayer con evidenza dei canali microvascolari (C) e strutture cilindriche di supporto della camera parenchiale (P). I due layers di PDMS sono connessi tra di loro con interposizione di una membrane semipermeabile di policarbonato (M). (c) I device assemblato è stato testato con soluzione Trypan Blue per verificare la pervietà del network vascolare

2.2.2 Microscopia elettronica

I campioni per l'analisi di microscopia elettronica (SEM) sono stati allestiti manualmente, sezionando i layers dei bioreattori in modo da ottenere un adeguato spessore di taglio. Le sezioni ottenute sono state allestite con sputter coating di oro/palladio per 12 sec, (*sputter coater* Model 108, Cressington Scientific Instruments, Watford, UK), realizzando un film di rivestimento di spessore compreso tra 10 e 15 nm. Le immagini sono state ottenute utilizzando un microscopio elettronico a scansione a pressione variabile (Model S-3500N, Hitachi High Technologies America, Pleasanton, CA) ed accelerazione di 5 kV (Fig. 2.4).

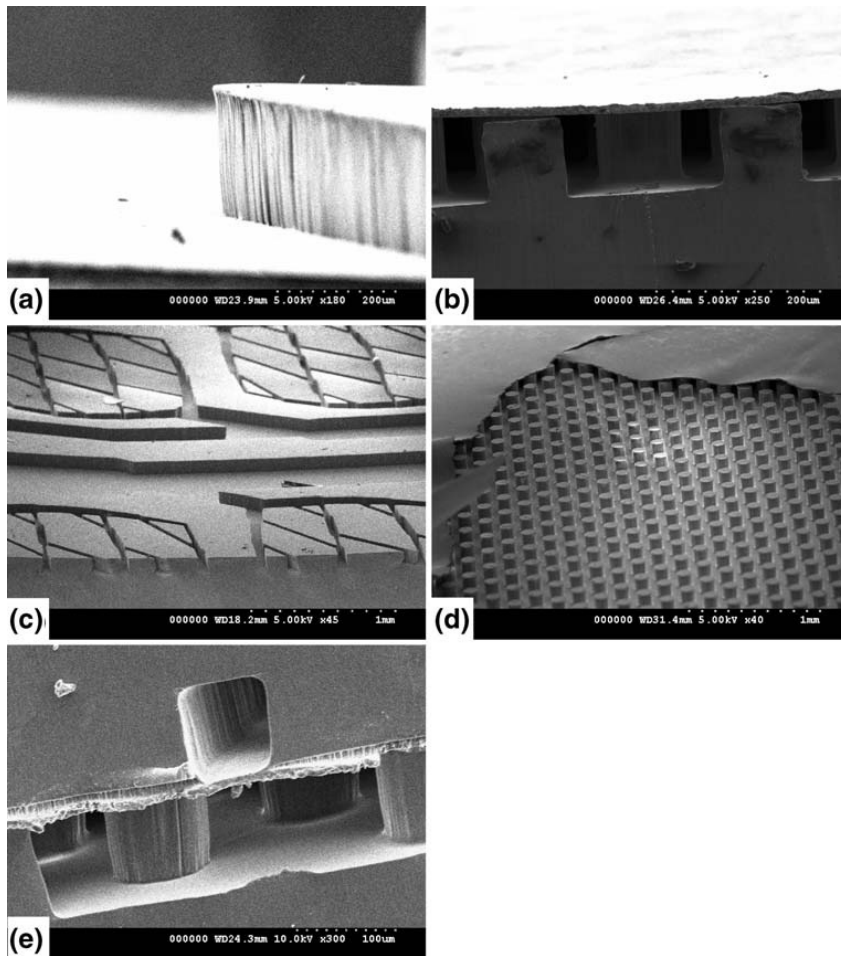


Fig. 2.4 Immagini di microscopia elettronica dei layers in PDMS del bioreattore; la microscopia è stata utilizzata per testare qualitativamente la appropriata geometria dei modelli (a), la adeguata adesione della membrana dalla parte del network vascolare (b), la pervietà individuale dei microcanali nella struttura (c, d) e l'allineamento degli strati finali del bioreattore (e)

2.2.3 Studi di pressione del bioreattore a microflusso

La riproducibilità del movimento di flusso attraverso il bioreattore è stato testato attraverso l'incremento di flusso in rapporto alla differenze di pressione lungo la superficie del device stesso. Il bioreattore è stato peraltro sottoposto alle stesse condizioni sperimentali più volte al fine testare la tolleranza di pressioni costanti e crescenti senza subire deformazioni e/o delaminazioni. La perfusione è stata garantita da un sistema a pompa-siringa da 30 ml, riempita con un buffer di soluzione salina, in infusione continua (PHD 2000 Infusion Pump, Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA). Il sistema di infusione è stato collegato ai tubi Silastic di *inlet* ed *outlet* precedentemente descritti; nel punto di ingresso è stata inoltre posta una valvola a tre

vie, in modo da poter collegare tutto il sistema ad un trasduttore di pressione, con un monitor per la registrazione-dati calibrato a 1 ATM [Fig. 2.5 (a)].

Per evitare bias nel sistema di registrazione dei valori pressori, una valvola di sfiato-aria è stata infine posta nel circuito; questo ha permesso la rimozione di qualsiasi bolla d'aria intrappolata nel sistema. Infine l'eluato di perfusione dal bioreattore è stato raccolto in un reservoir aperto, a pressione atmosferica.

L'iniziale perfusione del circuito è stato realizzata a basso flusso (0.025 ml/min) per prevenire la formazione di bolle; tuttavia una volta ottenuto il priming e calibrato il sistema, si è raggiunto un flusso di 0.1 ml/min con incrementi successivi di 0.5 ml/min. Dopo 30 s di stabilizzazione del sistema, la pressione è stata registrata con il variare della velocità di fusso fino al raggiungimento di un valore max di 325 mmHg.

Il bioreattore è stato esaminato in microscopia elettronica, dopo ciascun incremento di flusso, per verificarne la qualità (delaminazione della membrana o separazione dei layers). La stabilità è stata testata con calibrazioni successive, misurandone lo spessore, prima, durante e dopo il test; in questo modo sono state individuate eventuali distensioni anomale del bilayer. Dopo il raggiungimento di una pressione max di 325 mmHg, il flusso è stato interrotto ed il device riassetato a pressione atmosferica.

La ripetizione dei tests ci ha permesso di generare profili addizionali dei parametri di qualità pressione/flusso, che sono stati successivamente analizzati per la verifica delle proprietà microfluidiche del sistema in condizioni di flusso variabili.

Dopo il completamento del test, ciascun bioreattore è stato sterilizzato con ossido di etilene. Anche questa manovra è stata considerata potenzialmente destabilizzante per il sistema, pertanto ulteriori test di qualità sono stati ripetuti anche dopo il processo di sterilizzazione.

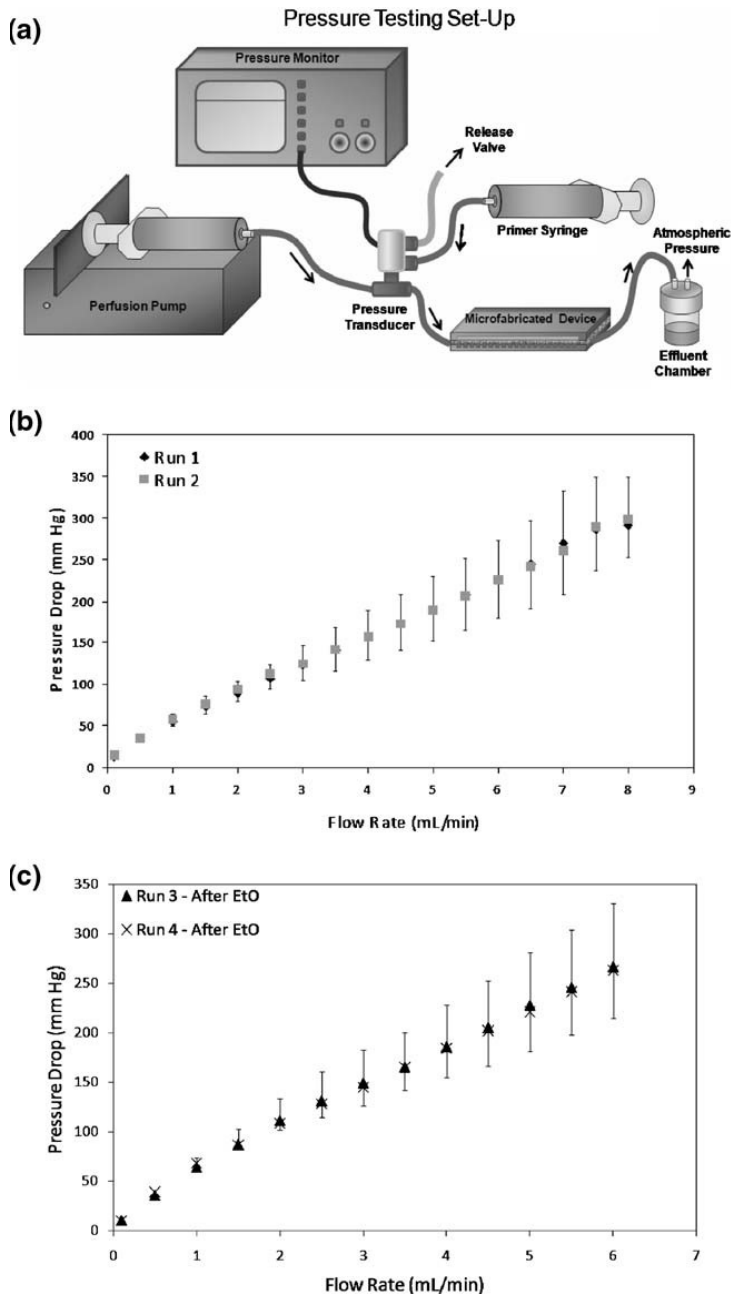


Fig. 2.5 (a) Trasduttore di pressione posto tra la pompa-siringa ed il device, e *pressure testing* (a) per la verifica di possibili effetti delle alte pressioni (b), e della sterilizzazione con ossido di etilene (EtO) (c) sulla proprietà di flusso.

2.2.4 Studi cellulari

Set-up di perfusione della coltura cellulare

La membrana in policarbonato dei devices è stata sottoposta ad un *coating overnight* con 0.2 ml di soluzione collagene ottenuto da coda di ratto e diluita in 70% di etanolo allo 0.25%, (3D Matrix, Cambridge, MA, USA). Una pompa-siringa da 30mL è stata utilizzata per la infusione unidirezionale del medium nel bioreattore; il circuito è stato

allestito come precedentemente descritto, attraverso il collegamento dell'infusore ai tubi Silastic [Fig. 2.6(a)]; l'eluato dal punto di outlet del bioreattore è stato raccolto in un reservoir.

Isolamento e coltura degli epatociti

I vari esperimenti hanno previsto l'utilizzo di due popolazioni cellulari distinte.

Alcuni sono stati realizzati con linee cellulari stabilizzate di epatoblastoma HepG2/C3A ottenute da ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA).

Altri, invece, sono stati realizzati con cellule primarie di epatociti di ratto, ottenute dalla perfusione dell'organo dell'animale con collagenasi, secondo protocolli standard.¹³

In questo ultimo caso sono stati utilizzati ratti maschi Lewis (Charles River Laboratories, Willington, MA, USA) del peso compreso tra 150 e 300 g. Gli animali sono stati stabulati nella Animal Research Facility del Massachusetts General Hospital in accordo con le linee guida del National Institute of Health (NIH). Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti solo dopo approvazione del Comitato Etico locale.

I bioreattori, nelle diverse condizioni sperimentali, sono stati seminati ciascuno con densità cellulari variabili ($0.1-0.2 \times 10^6$ HepG2/C3A, 0.6×10^6 epatociti primari).

Le cellule HepG2/C3A sono state perfuse con Minimum Essential Medium α (MEM α , Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) addizionato con 10% di siero bovino fetale (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); gli epatociti primari sono stati perfusi con medium di mantenimento per epatociti privo di siero (HMM, Cambrex, East Rutherford, NJ, USA).

Determinazione della vitalità cellulare e della densità

La vitalità cellulare è stata determinata attraverso kit Live/Dead Viability/Cytotoxicity (Invitrogen) in accordo con il protocollo del fornitore. Per la microscopia a fluorescenza si è ricorso al microscopio Eclipse E600 microscope (Nikon, Melville, NY, USA) e per l'acquisizione delle immagini alla Cool Snap CCD camera (Micro Video Instruments, Avon, MA, USA). La conta cellulare del bioreattore è stata realizzata attraverso l'uso di assays per la quantificazione del DNA. Le cellule sono state dapprima lisate *in situ* e successivamente processate con il kit DNeasy (Qiagen, Alameda, CA) in accordo con le istruzioni del fornitore. L'aliquota del DNA isolato è stato quantificato con analisi spettrofotometrica a 260 nm.

La curva standard è stata generata attraverso diluizioni successive del DNA partendo da un range noto di cellule compreso tra 10^3 e 10^6 .

Assays funzionali epato-specifici

Le concentrazioni *steady-state* extracellulari di albumina, α -fetoproteina (α FP) e transferrina sono state utilizzate come markers di sintesi proteica epatocitaria e sono state determinate attraverso test immunoenzimatico (ELISA).

Il medium MEM α è stato dapprima sostituito con medium HMM *serumfree* per evitare la contaminazione dei campioni raccolti con proteine di altra origine. L'eluato del medium è stato raccolto periodicamente durante il periodo di coltura cellulare e conservato a -80°C fino al momento della determinazione analitica.

La determinazione dei livelli proteici è stata effettuata su aliquote di 0.1 ml di medium. Kits standard ELISA per la determinazione di α FP umana e di ratto (Bethyl Labs, Montgomery, TX, USA), e transferrina (Alpha Diagnostics, San Antonio, TX, USA) sono stati utilizzati in accordo con il protocollo previsto dal fornitore. Per la determinazione della albumina si è ricorso all'uso di anticorpi primari policlonali di coniglio anti-albumina umana e di ratto (rabbit anti-albumin, Dako, Carpinteria, CA, USA), anche in questo caso secondo protocolli standard;¹⁴ da diluizioni seriate di albumina umana (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA), a concentrazione nota, si è realizzata la curva standard. La determinazione della attività perossidasi è stata sottoposta a lettura con sistema Wallac Victor² 1420 Multilabel Counter plate reader a 450 nm.

La sintesi dell'urea è stata determinata ricorrendo al QuantiChrom Urea Assay Kit (BioAssay Systems, Hayward, CA, USA).

Determinazione della attività di P450

L'attività cellulare di P450 è stata misurata attraverso la somministrazione di un substrato nel sistema di perfusione. Il medium di coltura MEM α è stato dapprima sostituito con terreno *serum-free* HMM per eliminare i fattori di contaminazione dell'assay e legami non-specifici con il substrato stesso. Quindi il nuovo terreno addizionato con 35 μM 7-etossicumarina (Indofine Chemical, Belle Mead, NJ, USA) è stato perfuso nel bioreattore per 10 gg ad un flusso di 0.5 ml/h; campioni dell'eluato sono stati raccolti a *end-points* prestabiliti ed analizzati.

Il metabolita Etossicumarina O-deetilasi (ECOD) è stato separato con cromatografia liquida, Supelcosil LC-8 column (5 μm ; 5 \times 0.46 cm). La concentrazione del substrato e del prodotto finale è stata determinata attraverso la misurazione della assorbanza a 325 nm. Curve standard sono state generate dai valori di concentrazione di 7-etossicumarina

purificata, il metabolita di Fase I 7-idrossicumarina (7-HC), ed i metaboliti di Fase II 7-HC-glucuronato e 7-HC-solfato (Sigma-Aldrich).

2.2.5 Dati ed analisi statistica

Tutti i campioni sono stati sottoposti a tre determinazioni successive ad eccezione dell'analisi del metabolismo di ECOD per il quale ci si è limitati ad una unica determinazione. I risultati delle analisi sono state espresse come media +/- deviazione standard di 3 esperimenti successivi. Per la analisi statistica si è ricorso al test *t* di Student's con Excel (Microsoft, Redmond, WA). Valori $P < 0.05$ sono stati considerati significativi.

2.3 RISULTATI

Il presente lavoro ha ideato e realizzato un bioreattore costituito da un sistema bilayer con un network vascolare intrinseco, basato sulla fisiologica vascolarizzazione epatica, ed un compartimento parenchimale, separati tra loro da una membrana semipermeabile.

La realizzazione del network micro-vascolare in polimeri biocompatibili è stata ottenuta ricorrendo a tecnica *soft lithography*.^{15,16}

L'integrità e la realizzabilità del bioreattore sono stati verificati per la sua capacità intrinseca di supportare colture cellulari in condizioni dinamiche di flusso continuo. Avendo selezionato le condizioni ottimali per la sopravvivenza cellulare, il bioreattore è stato testato per la sua capacità di favorire condizioni di coltura cosiddette "funzionali", ovvero integranti la vitalità cellulare e la attività metabolica degli epatociti (sintesi proteica, detossificazione).

I risultati ottenuti confermano che il sistema ideato è effettivamente in grado di supportare colture epatocitarie (anche colture primarie, notoriamente più sensibili e tendenti a morte precoce) a 14 gg, favorirne la proliferazione e stimolarne la funzione.

2.3.1 Fabbricazione e testing del bioreattore

La microscopia elettronica a scansione è stata eseguita random su parti singole del device o sul bioreattore assemblato per verificare l'integrità spaziale del sistema (ad esempio angolazioni dei layers) e la conformità della dimensione rispetto al limite di risoluzione previsto dal progetto [Fig. 2.4 (a), (b)]. Le immagini colorimetriche con Trypan hanno confermato la pervietà dei micro canali, garantendo la distribuzione del flusso come previsto nella progettazione iniziale.

Studi di pressione del microflusso nel bioreattore

I tests di flusso e di pressione hanno confermato la integrità strutturale del sistema, in particolare del network vascolare e della giustapposizione della membrana anche durante la esposizione ad elevate pressioni e ad alti flussi. Il differenziale di pressione lungo il bioreattore è stato calcolato sulla base dei valori di flusso, poiché vi è un incremento lineare proporzionalmente alla velocità. I dati ottenuti dimostrano che le proprietà fluidodinamiche del bioreattore non vengono inficiate da alterazioni delle condizioni di flusso nonché dai processi di sterilizzazione [Fig. 2.5(b)].

I risultati dei test hanno confermato dunque una sostanziale integrità, ovvero la mancanza di eventi di delaminazione della membrana o di franca deformazione dei layers, conservando una appropriata geometria anche dopo sollecitazioni ad elevate pressioni. La distensione dei layers, durante i test di flusso, è stata sostanzialmente impercettibile, con una lieve e transiente deflessione (2 to 3 μm), identificabile peraltro soltanto ad elevate pressioni. Infine, la solidità della geometria e le capacità elastiche dimostrano che, una volta ricostituite le condizioni standard (statiche, a pressione atmosferica), qualsiasi impercettibile alterazione precedentemente identificata non è stata più evidente.

2.3.2 Studio di vitalità cellulare

Il bioreattore realizzato è stato testato per la sua capacità intrinseca di supportare e mantenere una coltura cellulare.

In un primo set di esperimenti, le camere parenchimali di 18 devices sono state seminate con 0.5ml di soluzione contenente linee cellulari di epatoblastoma HepG2/C3A con densità di 0.2×10^6 cells/ml.

Dopo 14 giorni di coltura dinamica a flusso continuo di medium, variabile da 0.16 a 1.0 ml/h (0.16, 0.25, 0.5 e 1 ml/h), è stata testata la vitalità cellulare. Tra le diverse velocità di perfusione utilizzate, 0.5 ml/h ha dato i migliori esiti in termini di vitalità cellulare a 14 giorni [Fig. 2.6 (b)]. Abbiamo anche verificato la capacità del *coating* di collagene sulla membrana di garantire un adeguato supporto di semina.

A tale scopo, bioreattori sottoposti a *coating* con collagene e non, sono stati sottoposti a semina con 0.1×10^6 cellule HepG2/C3A e perfusi a 0.5 ml/h. Dopo una settimana di coltura, le cellule all'interno del device sono state testate per vitalità secondo le modalità precedentemente descritte (estrazione del DNA genomico etc.). Il coating di collagene si è dimostrato favorire in maniera significativa sia il numero sia la vitalità

cellulare [Fig. 2.6 (c)]. Peraltro le cellule di epatoblastoma hanno anche acquisito un fenotipo morfologico più fisiologico (esagonale), e realizzato una distribuzione cellulare “organizzata” ed omogenea nelle 2D lungo tutta la membrana; nel gruppo “*non-coated*”, viceversa, le cellule si sono disperse casualmente nella camera parenchimale, talvolta con raggruppamenti non organizzati, e mantenendo morfologia rotondeggiante.

Il bioreattore è stato inoltre sottoposto a test per verificare la capacità di supportare colture primarie di epatociti, notoriamente più sensibili e difficili da mantenere in condizioni *in vitro*. Una sospensione di epatociti primari di ratto (soluzione di 0.5ml con 0.6×10^6 cellule/ml) è stata seminata rispettivamente in 12 bioreattori di cui 6 sottoposti a *coating* di collagene della membrana e sei senza; come controllo, altrettante cellule sono state coltivate su piastre standard da 12 pozzetti con *coating* di collagene. Nel caso degli epatociti primari si è scelto di utilizzare una maggiore densità di semina in considerazione delle minori potenzialità di proliferazione. Dopo 7 giorni di coltura dinamica in flusso continuo (0.5 ml/h), i test di vitalità hanno dimostrato i seguenti risultati: gran parte delle cellule nel bioreattore si presentava vitale ed in maniera significativamente maggiore rispetto alle condizioni di coltura statica [Fig. 2.6(d)].

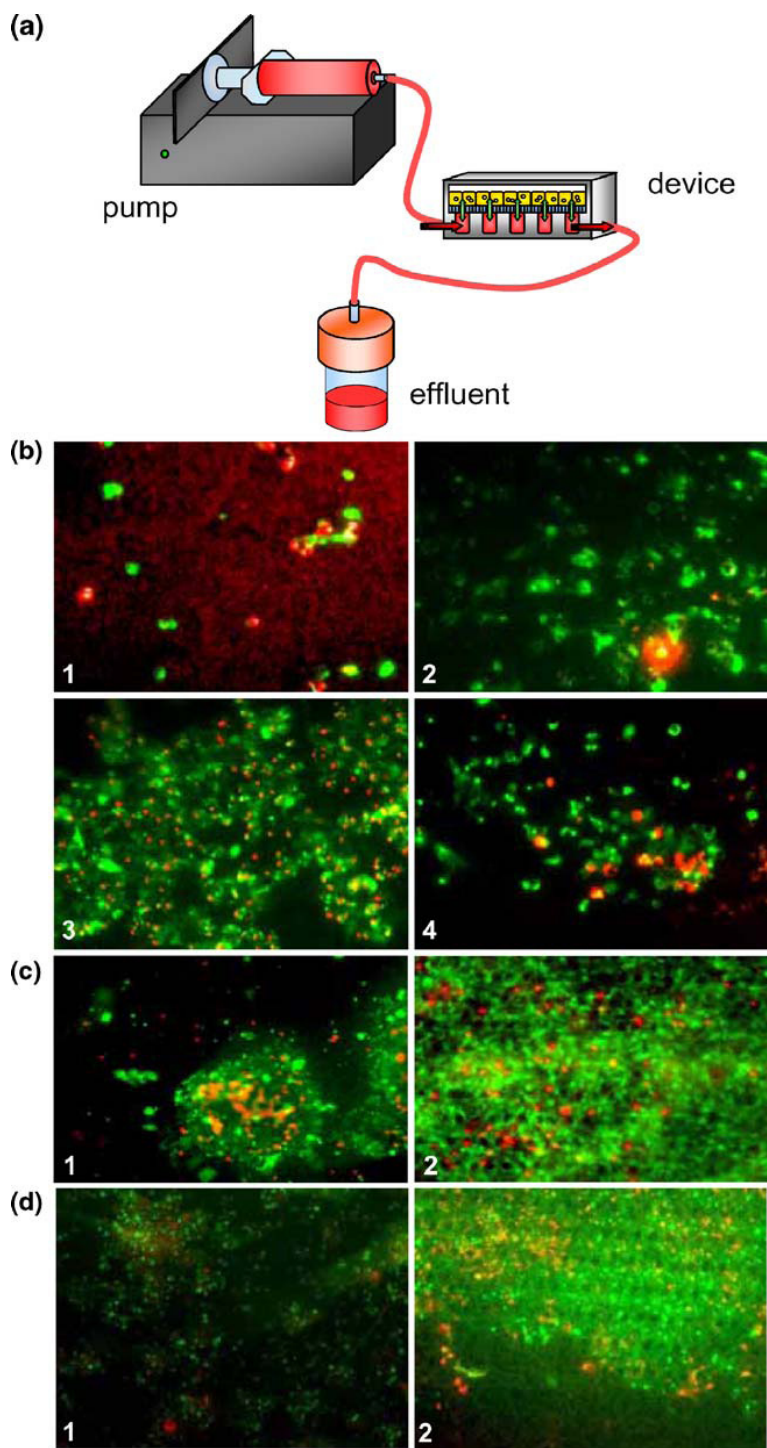


Fig. 2.6 (a) Ottimizzazione della coltura nel bioreattore. (b) semina con cellule HepG2/C3A nel compartimento parenchimale, e perfusione del network vascolare a velocità di (ml/h): 0.16 (1), 0.25 (2), 0.5 (3), e 1.0 (4). Test di vitalità: verde (cellule vive), rosso (cellule morte). (c) HepG2/C3A dopo 2 settimane nel bioreattore a 0.5 ml/h di flusso senza coating di collagene sulla membrana (1), e con coating di collagene (2) per 10 giorni. (d) Vitalità degli epatociti primari. Bioreattore con epatociti primari nel compartimento parenchimale, e network vascolare perfuso a velocità di 0.5 ml/h. Test vitalità: verde (cellule vive), rosso (cellule morte). Epatociti dopo 1 settimana nel bioreattore a 0.5 ml/h di flusso senza coating (1), e con coating (2) sulla membrana

Assays di funzionalità epatica

Dopo aver stabilito che la coltura dinamica a flusso continuo del bioreattore è in grado di supportare la vitalità cellulare, abbiamo analizzato anche le capacità metaboliche della coltura epatocitaria.

Le cellule HepG2/ C3A sono state mantenute nel bioreattore fino a 10 giorni di coltura; durante tale periodo sono state determinate le concentrazioni di diverse proteine attraverso l'uso di test immunoenzimatici ELISA su campioni di eluato.

I risultati dei test funzionali sono stati normalizzati per n° cellulare, al fine evitare bias interpretativi, sulla scorta dei dati di estrazione del DNA cellulare e la determinazione della variabilità del numero cellulare (cellule morte vs cellule vitali).

Albumina, transferrina e α FP sono state sintetizzate dalle popolazioni cellulari coltivate nel bioreattore durante tutto il periodo di perfusione [Fig. 2.7 (a)].

L'attività ossidasica e di coniugazione epatocitaria è stata determinata attraverso l'attività metabolica ECOD; negli epatociti umani, in particolare, l'attività ECOD riflette la funzione enzimatica dei citocromi CYP2B6 (Fase I), CYP2E1 e CYP1A2.^{17,18}

La Fase I di biotrasformazione di 7-etossicumarina è stata piuttosto evidente nella popolazione HepG2/C3A fin dall'inizio della coltura; viceversa, la Fase II di attività è diventata più sostanziale a 10 giorni, con la produzione del metabolita glucuronidato [Fig. 2.7 (a)].

E' stata dunque confrontata la capacità delle colture primarie di epatociti nel mantenere la capacità di sintesi rispettivamente in condizioni di flusso dinamico nel bioreattore e in colture statiche standard. Gli epatociti primari hanno dimostrato una produzione costante di albumina in condizioni statiche durante tutto il periodo di coltura. Nelle condizioni di coltura dinamica gli epatociti hanno espresso concentrazioni sovrapponibili di albumina durante le prime 40 ore di coltura, dopodiché si è assistito ad un significativo incremento della produzione ($P < 0.05$) [Fig. 2.7 (b)].

Allo stesso modo, la produzione di urea ha presentato andamento simile, soprattutto intorno al settimo giorno di coltura [Fig. 2.7 (b)].

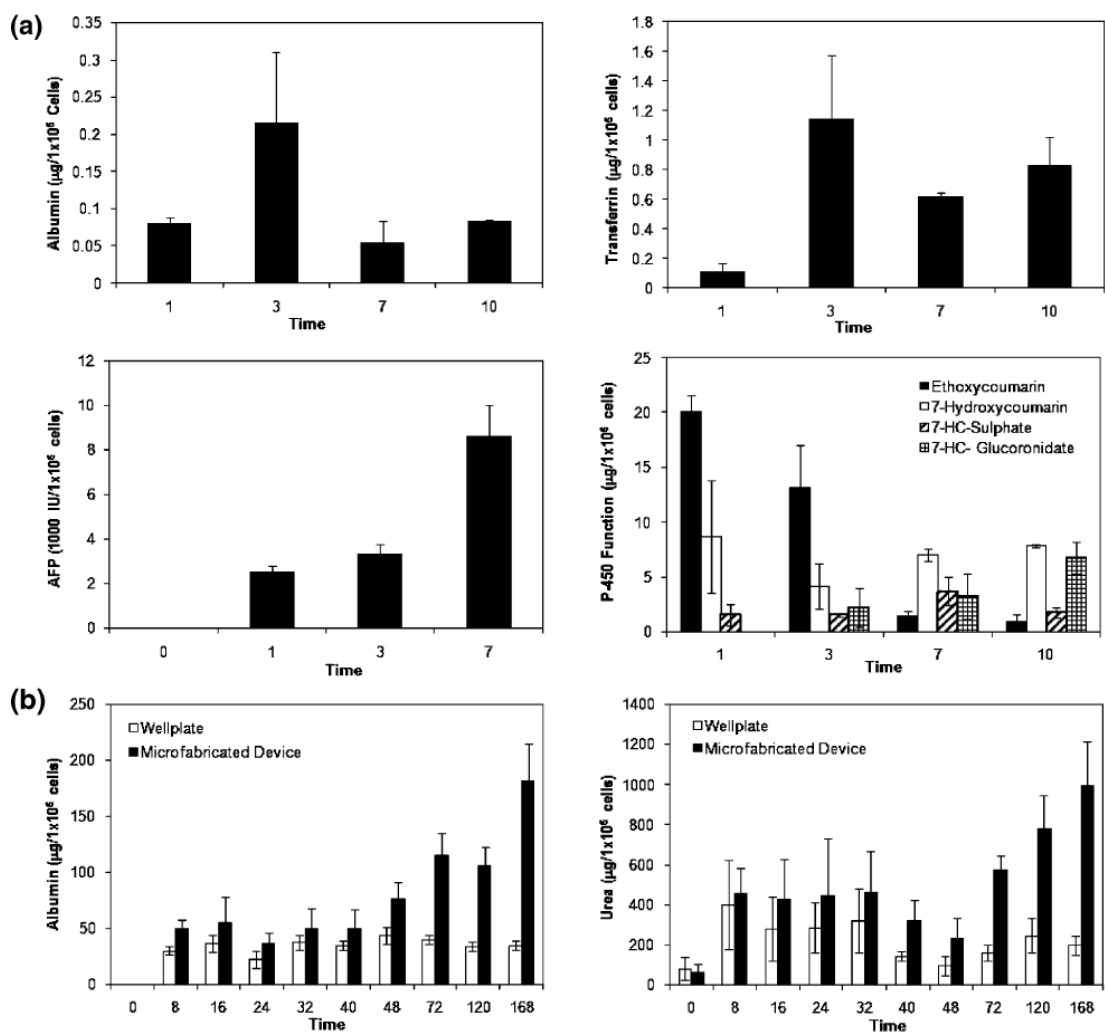


Fig. 2.7

Assays di funzionalità epatica di HepG2/C3A (a) ed epatociti primari di ratto (b) coltivati in bioreattore con coating di collagene a velocità di perfusione di 0.5 ml/h. Le colture di epatociti primari in condizioni statiche standard (12-well plates) sono state analizzate in parallelo (colonne vuote). Aliquote dell'eluato di perfusione sono state raccolte in tempi prestabiliti come indicato, ed analizzate con test ELISA. Campioni di eluato di medium di perfusione arricchito con il substrato ECOD sono stati raccolti in intervalli di tempo prestabiliti come indicato e sottoposti alla determinazione della attività di P450 per le cellule HepG2/C3A. I prodotti del metabolismo della Fase I [7- idrossicumarina (7-HC)] e della Fase II [7-HC-solfato e 7-HC-glucuronato] sono state separate con metodica HPLC e le concentrazioni misurate come assorbanza. Il metabolismo dell'urea in ammonio è stato analizzato per gli epatociti primari.

BIBLIOGRAFIA

1. Harris NR “Arteriovenous pairing: a determinant of capillary exchange”. *News Physiol Sci* 2003;18:83–7;
2. Can Z, Apaydin I, Ercocen AR, Demirseren ME, Sabuncuoglu B “Prefabrication of a high-density porous polyethylene implant using a vascular induction technique” *Ann Plast Surg* 1998;41:264–9;
3. Bhadriraju K, Chen CS “Engineering cellular microenvironments to improve cell-based drug testing” *Review Drug Discov Today*. 2002;7(11):612-20;
4. Leclerc E, Sakai Y, Fujii T “Microfluidic PDMS (polydimethylsiloxane) bioreactor for large-scale culture of hepatocytes” *Biotechnol Prog*. 2004;20(3):750-5;
5. Ostrovidov S, Jiang J, Sakai Y, Fujii T “Membrane-based PDMS microbioreactor for perfused 3D primary rat hepatocyte cultures” *Biomed Microdevices* 2004;6(4):279-87;
6. Kane BJ, Zinner MJ, Yarmush ML, Toner M “Liver-specific functional studies in a microfluidic array of primary mammalian hepatocytes” *Anal Chem*. 2006;78(13):4291-8;
7. Lee PJ, Hung PJ, Lee LP “An artificial liver sinusoid with a microfluidic endothelial-like barrier for primary hepatocyte culture” *Biotechnol Bioeng*. 2007;97(5):1340-6;
8. Cheung W, Borenstein J, Kaazempur-Mofrad M, Shin M, Kulig K, Vacanti JP “Development of an implantable tissue-engineered liver device with a vascular network of channels co-cultured with human hepatocytes and human microvascular endothelial cells” Presented at the American Transplant Congress 2003;May 30-June 4; Washington DC;
9. Kaazempur-Mofrad MR, Vacanti JP, Kamm RD *Comp. Fluid Solid Mech*. 2001 2:864–867;
10. Pries AR, Neuhaus D, Gaehtgens P “Blood viscosity in tube flow: dependence on diameter and hematocrit” *Review Am J Physiol*. 1992;263(6 Pt 2):H1770-8;
11. Weinberg EJ, Borenstein JT, Kaazempur-Mofrad MR, Vacanti BJP *MRS Symp. Proc*. 2004;820:126–127;
12. Borenstein J, Terai H, King KR, Weinberg EJ, Kaazempur-Mofrad MR, Vacanti JP *Biomed. Microdevices* 2002;4(3):167–175;

13. Seglen PO "Preparation of isolated rat liver cells" *Methods Cell Biol* 1976;13:29-83;
14. Coligan JE (ed.), *Current protocols in protein science* (John Wiley & Sons Inc., Brooklyn, N.Y., 1996);
15. Kaihara S, Borenstein J, Koka R, Lalan S, Ochoa ER, Ravens M, et al. Silicon Micromachining to tissue engineer branched vascular channels for liver fabrication. *Tissue Eng* 2000;6:105-117;
16. McDonald JC, Chabinyc ML, Metallo SJ, Anderson JR, Stroock AD, Whitesides GM "Prototyping of microfluidic devices in poly(dimethylsiloxane) using solid-object printing" *Anal Chem.* 2002;74(7):1537-45;
17. Wrighton SA, Stevens JC "The human hepatic cytochromes P450 involved in drug metabolism" *Review Crit Rev Toxicol.* 1992;22(1):1-21;
18. Yamazaki H, Inoue K, Mimura M, Oda Y, Guengerich FP, Shimada T "7-Ethoxycoumarin O-deethylation catalyzed by cytochromes P450 1A2 and 2E1 in human liver microsomes" *Biochem Pharmacol* 1996;51(3):313-9;

3.1 INTRODUZIONE

Il seguente capitolo espone la fase di applicazione *in vivo*, sul piccolo animale, dei risultati sperimentali e bio-ingegneristici della prima fase del progetto.

Anche in questo caso, il lavoro è il risultato di una collaborazione con il Center for Regenerative Medicine (Prof. JP Vacanti), Massachusetts General Hospital, Harvard University, Boston (USA).

Il bioreattore precedentemente descritto e utilizzato per gli esperimenti *in vitro* è stato dunque utilizzato per traslare la fase sperimentale del modello *in vivo*, nella fattispecie nel roditore (ratto). Particolare attenzione è stata dedicata agli studi di fattibilità, al dimensionamento delle varie parti e all'integrazione tra teoria e pratica.

Anche in questo caso, dunque, vi è l'utilizzo di un bioreattore, caratterizzato dalla presenza di una camera ("chamber") microvascolare preformata che mantiene vitale una coltura cellulare adiacente, posta in una camera cosiddetta "parenchimale". Il bioreattore è stato ottenuto sempre adottando le metodiche *biotech* MEMS (Micro-Electro-Mechanical Systems (MEMS), come già descritto precedentemente.

In questo caso tuttavia il sistema è stato connesso *ex-vivo* al piccolo animale attraverso la costituzione di una fistola artero-venosa e, dunque, perfuso da sangue.

In questa parte del progetto siamo intervenuti soprattutto su due aspetti per migliorare la struttura e la funzione del prodotto finale:

- analisi e studio del design del bioreattore in condizioni *in vivo*, con flusso ematico all'interno della camera vascolare;

- ottimizzazione delle condizioni favorevoli la vitalità della coltura cellulare nella camera parenchimale con particolare riferimento agli studi di pressione;

Il fine ultimo è stato quello di realizzare e testare un bioreattore epatico definitivamente impiantabile per il mantenimento di una coltura cellulare metabolicamente vitale.

(Lavoro pubblicato su *Annals of Surgery* 2010;252 (2):351-7)

3.2 MATERIALI E METODI

3.2.1 Costituzione dei bioreattori in Polydimethylsiloxane (PDMS) con nanotecnologia MEMS

Come già descritto, l'ingegnerizzazione del sistema ha ricorso al campo delle nanotecnologie MEMS (Micro-Electro-Mechanical Systems (MEMS)), in grado di provvedere e di creare, in microrisoluzione, piattaforme per il controllo del microambiente di colture cellulari.

L'approccio MEMS, attraverso tecnica fotolitografia, ha reso possibile la realizzazione del bioreattore in biopolimeri precedentemente descritto, costituito da due camere (vascolare e cellulare) adiacenti tra loro ma separate da una membrana semipermeabile; il network microvascolare ha permesso a sua volta di garantire la perfusione ematica, con caratteristiche di flusso e stress meccanico definite.^{1,2} In questo caso il design del bioreattore è stato adattato alle caratteristiche reologiche e fluidodinamiche tipiche del sangue.

Il compartimento vascolare è stato costituito a partire dallo stesso algoritmo precedentemente descritto ma adeguato alla nuova soluzione di perfusione, sempre con flusso unidirezionale (inlet → outlet).

La camera parenchimale è stata utilizzata per la coltura delle cellule epatiche.

Abbiamo già dimostrato in precedenti studi che tale sistema è in grado di mantenere vitali e funzionanti colture epatocitarie all'interno della camera parenchimale.³

L'elastomero in silicone (PDMS) Sylgard 184[®] ed un agente di solidificazione (Dow Corning, Midland, MI), sono stati miscelati in rapporto 9:1 e successivamente posti sul prototipo precedentemente inciso con tecnica fotolitografia. Il mix è stato dunque lasciato degasare a temperatura ambiente per 6 ore prima avviare il processo di solidificazione, a 65°C per 24h. Le due superfici del bilayer sono state separate da una membrana semipermeabile; in questo caso, le caratteristiche fisiche del sangue (in termini di parametri fluidodinamici) ci hanno indotto a selezionare una membrana con diversa porosità (nanopori, 0.22 µm diametro), in materiale sintetico polietere sulfone (PES) (Millipore, Billerica, MA). Tale membrana è stata adesa al compartimento vascolare con colla in silicone (Dow Corning 3140). Il compartimento vascolare e parenchimale sono a loro volta stati adesi tra di loro con tecnica "plasma oxygen".

Successivamente, 2 tubi 04 Silastic (ID 0.76mm and OD 1.65 mm, Dow Corning, Midland, MI) sono stati inseriti nel sistema a livello dei punti di ingresso e di egreso del sistema vascolare; questo è stato realizzato con l'uso di punches dermatologici (Miltex, Bethpage, NY) che realizzano piccoli fori di inserimento (2 mm diametro).

Una colla ad alta tenuta è stata utilizzata per mantenere i tubi in adeguata posizione. Allo stesso modo, altri 2 tubi Silastic, delle stesse dimensioni, sono stati inseriti nella camera parenchimale.

Per gli esperimenti *in vivo*, un ulteriore tubo Silastic 04 è stato inserito nell'ingresso ed egreso del compartimento vascolare (tubo a Y) per permettere rispettivamente il collegamento ad un sistema di infusione continua di eparina e il *sampling* venoso durante gli esperimenti.

Tutti i bioreattori sono stati sterilizzati con gas etilene e lasciati evaporare per 24h.

Prima dell'uso e dell'impianto degli epatociti è stata inoltre realizzato il *coating* della camera parenchimale con 0.1% di soluzione di gelatina (St Louis, MO) per 1 ora a 37°C.

3.2.2 Animali

Gli esperimenti sono stati realizzati con:

- 8 ratti Lewis di sesso maschile, del peso compreso tra 200 e 350 mg, sacrificati per la perfusione del fegato e l'ottenimento delle cellule epatiche primarie;
- 28 ratti Lewis di sesso maschile, del peso corporeo compreso tra 250 e 400 mg, utilizzati per l'impianto dei bioreattori.

Tutti gli animali sono giunti dai laboratori Charles River (Wilmington, MA – USA) e sono stati stabulati nella “Animal Research Facility” del Mass General Hospital, Boston, Massachusetts USA, secondo le modalità previste dal NIH (National Institute of Health) per la cura degli animali da laboratorio. I ratti sono stati stabulati in condizioni standard, con adeguata temperatura e ciclo luce-buio, cibo ed acqua ad libitum. Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti solo dopo approvazione del Comitato Etico locale.

3.2.3 Allestimento e preparazione degli epatociti

Il bioreattore è stato testato utilizzando epatociti primari di ratto e la linea cellulare umana di epatoblastoma HepG2/C3A.

Gli epatociti primari sono stati isolati utilizzando la modalità di perfusione epatica *in situ* a 2 steps successivi secondo modalità precedentemente descritte da

Seglen et Al.⁴ La vitalità cellulare degli epatociti, determinata attraverso il test colorimetrico Trypan blue, ha dimostrato un valore medio > 90%.

La linea cellulare tumorale umana stabilizzata da epatoblastoma HepG2/C3A è invece stata ottenuta da ATCC (Manassas, VA); le cellule sono state coltivate in flasche T75 (Corning, Corning, NY) utilizzando il terreno di coltura Minimum Essential α (MEM α , Invitrogen Gibco, Calsbad, CA) addizionato con siero bovino 10%.

Prima della semina nel bioreattore, entrambe le popolazioni cellulari sono state sospese in soluzione UW (Ringer Lattato 500 ml, 25% mannitolo 50 ml, ed eparina 1 unità/mL) a densità di 3×10^6 /ml e conservate in ghiaccio fino al momento della semina nella camera parenchimale.

3.2.4 Procedura chirurgica

Gli animali sono stati anestetizzati con 75 mg/Kg intramuscolo di ketamina (Ketalar, Monarch Pharmaceuticals, Bristol, TN) e 1 mg/Kg intramuscolo di metedomidina idrocloridrato (Domitor, Pfizer Animal Health, NY, NY) in rapporto 1:1.

Si è proceduto con inguinotomia bilaterale, seguita da isolamento ed esposizione di vena e arteria femorali. Dopo posizionamento di loop elastico sui vasi, un tubo Silastic 02 (ID 0.51 mm, OD 0.94 mm, Dow Corning) è stato introdotto per la cannulazione della arteria femorale e successivamente connesso al tubo di ingresso del bioreattore con ago cannula 20GA (BD medical Systems, Sandy, Utah); quindi il tubo di egresso del compartimento vascolare è stato collegato alla vena femorale. Questo ha permesso di completare il confezionamento dello shunt artero-venoso femoro-femorale.

Ogni bioreattore, precedentemente all'impianto, è stato sottoposto a *priming* ed eliminazione delle bolle d'aria all'interno del network vascolare, con perfusione continua ad alto flusso di soluzione eparinata (20 unità/mL di Ringer Lattato).

La pressione differenziale tra il punto di ingresso e di egresso è stata mantenuta sufficientemente elevata per garantire la perfusione ottimale del compartimento vascolare.

La formazione di trombi e coaguli è invece stata evitata attraverso l'infusione endovena di bolo di eparina (0.5 unità/mg di peso corporeo) seguita da infusione continua della stessa (20 unità/ml Ringer Lattato) attraverso il tubo ad Y collegato ad una pompa-siringa ad infusione continua (Harvard Apparatus PHD 2000 Infusion System), a velocità di 1.0 ml/ora.

Il bioreattore è stato posizionato dunque *ex-vivo*, e le incisioni chirurgiche sono state suturate con filo non-riassorbibile (seta 4.0); l'animale è stato mantenuto in anestesia generale con monitoraggio intensivo non invasivo. I parametri vitali ed i bilanci idrici sono stati controllati ad intervalli orari; dosi di anestetico ed antidolorifico sono state adeguatamente iniettate a scopo antalgico e per prevenire qualsiasi movimento inconsulto a rischio di dislocazione dei tubi. La temperatura corporea è stata mantenuta costante attraverso l'uso di una lampada termica.

Dopo impianto del bioreattore e setting del sistema con stabilizzazione del flusso, un volume pari a 0.2 ml di sospensione cellulare (3×10^6 cellule/ml), per una quantità totale di 6×10^5 , è stata iniettata nella camera parenchimale attraverso il tubo di ingresso; i tubi parenchimali sono stati dunque chiusi per 2 ore, al fine di favorire l'*attachment* cellulare al supporto parenchimale del sistema.

Dopo 2 ore gli stessi sono stati aperti nuovamente per favorire la fuoriuscita e la raccolta dell'eluato di perfusione in un sistema di reservoir. Al fine di prevenire il passaggio e/o la perdita di cellule lungo il tubo, è stato inoltre interposto un filtro selettivo con porosità di 0.45 μm di diametro [membrana PES (0.45 μm , 09-719B, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA).

L'end-point dello studio è stato settato a 24h dopo l'impianto cellulare, seguito dal sacrificio degli animali con iniezione intracardiaca di soluzione letale, 0.1 ml Fatal-Plus (Pentobarbitol, Vortech Pharmaceuticals, Dearborn, Michigan).

3.2.5 Disegno dello studio

Gruppo di studio: 16 bioreattori: impiantati con colture di epatociti primari di ratto;

Gruppo di controllo: 3 bioreattori: impiantati con colture di epatociti primari di ratto (clampaggio dell'inlet arterioso);

Al fine di studiare e capire la relazione e l'effetto della pressione *in vivo* sulla vitalità e la funzionalità cellulare, abbiamo inoltre allestito altri 12 bioreattori con semina di cellule HepG2/C3A, e 4 diversi setting di collegamento dei tubi parenchimali per un totale di 12 esperimenti (3 esperimenti per ogni gruppo):

- gruppo 1, i tubi parenchimali vengono lasciati drenare liberamente;
- gruppo 2, i tubi parenchimali vengono connessi alla vena femorale controlaterale;
- gruppo 3, i tubi parenchimali vengono connessi all'*outlet* del device (vena femorale omolaterale) mediante un tubo a Y;

- gruppo 4, i tubi parenchimali vengono mantenuti chiusi (Fig. 3.1).

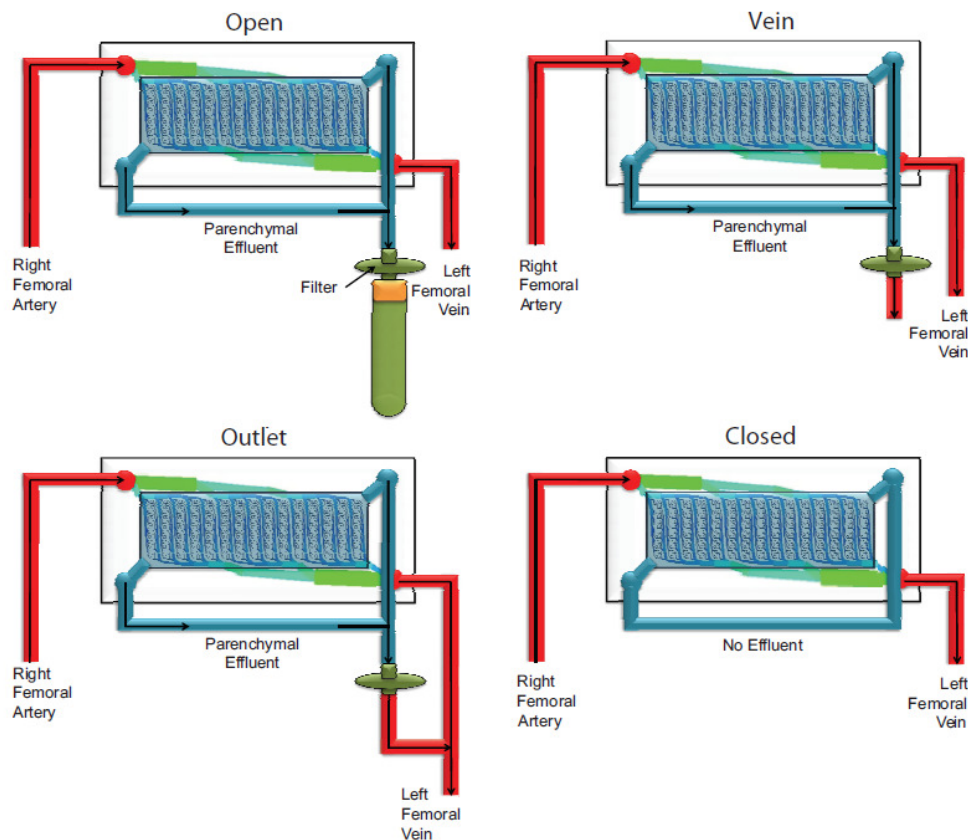


Figura 3.1. Modello animale con 4 diverse connessioni dei tubi: (A) tubi parenchimali aperti, (B) tubi parenchimali drenano in vena femorale contro laterale, separatamente, (C) tubi parenchimali drenano in un “outlet Y-tube” in vena femorale omolaterale, (D) tubi parenchimali chiusi.

Prima e dopo l’apertura dell’*inlet* arterioso, le pressioni femorali arteriose e venose sono state rilevate su monitor (Hewlett-Packard 78354A, Palo Alto, CA), in modo da costituire un database con la registrazione anche dei successivi valori pressori lungo il compartimento vascolare del bioreattore. Allo stesso modo, una volta stabilizzato il setting, si è proceduto alla registrazione delle pressioni della camera parenchimale.

I dati ottenuti hanno permesso di realizzare gli studi di pressione del sistema.

Samples venosi sono stati inoltre raccolti per le analisi biumorali prima dell’iniezione cellulare e, successivamente, ogni 6 ore; infine sono stati raccolti samples dell’eluato prima e dopo (ogni due ore) la semina cellulare (limitatamente al gruppo 1, con tubi parenchimali aperti).

3.2.6 Laser Doppler scanning della perfusione ematica attraverso il device

Lo stato di perfusione ematica e il pattern di flusso attraverso il bioreattore sono stati registrati e rilevati anche mediante modalità Laser Doppler Imager (Moor Instruments Inc, Wilmington, Del).

3.2.7 Vitalità e morfologia cellulare

La vitalità cellulare è stata determinata attraverso kit Live/Dead Viability/Cytotoxicity (Invitrogen) in accordo con il protocollo del fornitore. Per la microscopia a fluorescenza si è ricorso al microscopio Eclipse E600 microscope (Nikon, Melville, NY, USA) con ingrandimento 100X per ogni bioreattore e l'uso del programma Metamorph (Research Precision Instruments, Natick, MA); per l'acquisizione delle immagini è stata utilizzato Cool Snap CCD camera (Micro Video Instruments, Avon, MA, USA).

3.2.8 Determinazione dei livelli di albumina e di α -FP

L'eluato ottenuto e i samples ematici sono stati inviati al laboratorio di patologia clinica del Massachusetts General Hospital per la determinazione dei livelli di albumina.

Viceversa, le cellule dei bioreattori, una volta rimossi dalla sede di impianto, sono state fissate con 4% paraformaldeide e Triton X-100 1%.

Per il saggio di immunofluorescenza della albumina sono stati utilizzati anticorpi primari di coniglio anti-albumina umana (rabbit anti-albumin, 1:25, DAKO, Carpinteria, CA), incubati nella camera parenchimale del bioreattore per 20 min. a temperatura ambiente. Successivamente sono stati somministrati gli anticorpi secondari IgG (anti-rabbit, 1:40, Sigma, St. Louis, MI) per 45 min. a temperatura ambiente. La fluorescenza è stata letta con il microscopio Nikon Eclipse E600 e le immagini acquisite con Cool Snap HQ.

Per la determinazione della α FP, campioni ematici e dell'eluato drenato sono stati raccolti a tempi prestabiliti dopo l'impianto del bioreattore; dunque centrifugati a 6000 rpm 5min., e successivamente sottoposti a test immunoenzimatico per α -FP umana con kit ELISA, AFP ELISA Kit, (0500-AFP, San Antonio, TX), secondo protocollo standard del fornitore. I plates così ottenuti sono stati sottoposti a lettura spettrofotometrica con sistema Wallac Victor² 1420 Multilabel Counter plate reader a 450 nm.

Sezioni normali di fegato di ratto sono state infine utilizzate come controllo positivo; i nuclei cellulari sono stati sottoposti a colorazione DAPI.

3.2.9 Analisi Statistica

L'analisi statica è stata eseguita attraverso l'uso di SPSS 10.0 per Microsoft Windows (SPSS, Chicago, IL). I risultati delle analisi sono state espresse come media +/- deviazione standard. Il confronto dei campioni è stato eseguito attraverso al test t di Student's. Valori P uguali o <0.05 sono stati considerati significativi.

3.3 RISULTATI

3.3.1 Impianto del bioreattore e scanning con Laser Doppler

Tutti i 28 device sono stati impiantati con successo. Il sangue ha perfuso in maniera ottimale i compartimenti microvascolari (Fig. 3.2 A-D).

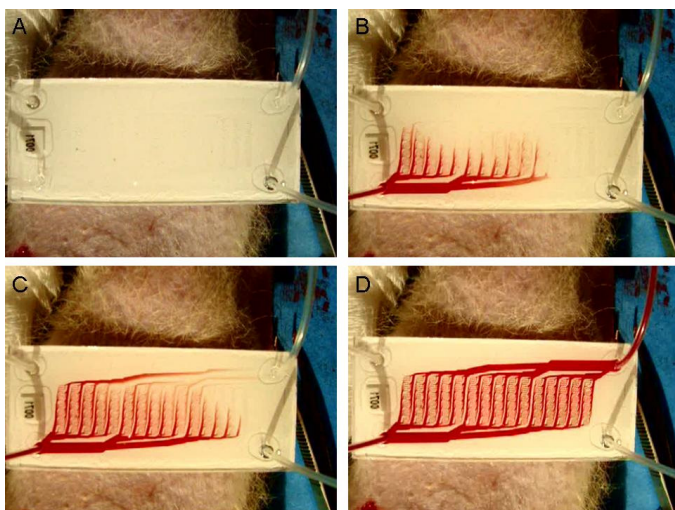


Fig. 3.2. Immagini in serie da (A) a (D): perfusione omogenea della camera vascolare attraverso il network microvascolare.

Grazie alla eparinizzazione del sistema, tutti i bioreattori sono rimasti completamente pervi fino alla fine dell'esperimento, tranne 2 coltivati con cellule primarie di ratto, che sono andati incontro a trombosi e dunque rimossi dopo 10 ore dell'impianto.

Il Laser Doppler scanning del bioreattore impiantato ha dimostrato un flusso omogeneo attraverso il sistema (fig. 3.3). Peraltro, il pattern del flusso ematico attraverso il punto di ingresso, il letto capillare così come il punto di egresso venoso, ha mimato il normale flusso ematico in condizioni fisiologiche (Fig. 3.3), ovvero un alto picco arterioso, con normale distribuzione del flusso doppler, ed il consueto thrilling-flow-pattern a livello capillare.

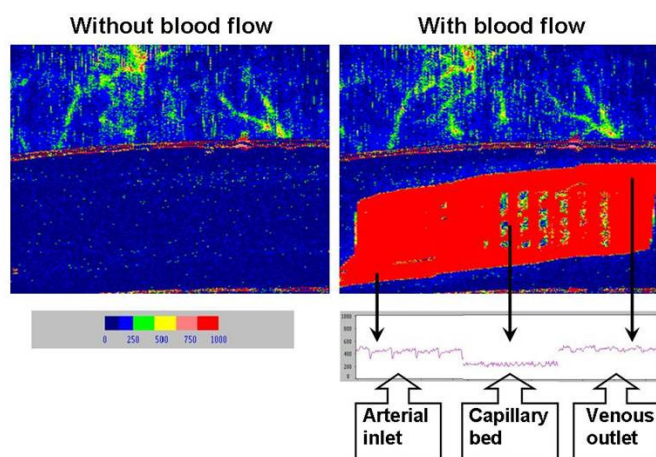


Fig. 3.3. Laser Doppler scanning del device impiantato; il flusso ematico perfonde omogeneamente il device con un pattern di flusso “fisiologico”. La color scale bar rappresenta il range di flusso relativo in crescendo (colore blue fino al colore rosso).

Profilo pressorio della perfusione del sistema

Il profilo pressorio della arteria, vena e della camera parenchimale, prima e dopo la connessione, è riassunta nella tabella 3.1:

	Prima impianto device	Dopo impianto device
Pressione arteria femorale	98 – 132 mmHg (media=119)	65 – 111 mmHg (media=93)
Pressione vena femorale	6 – 7 mmHg (media=6.3)	11 – 12 mmHg (media=11.3)
Pressione compartimento parenchimale	0 mmHg	19 – 22 mmHg (media=20.3)

Tabella 3.1. Profilo pressorio della arteria femorale, vena femorale, e compartimento parenchimale prima e dopo impianto del device

Tale studio dimostra che dopo il collegamento con il bioreattore, la pressione arteriosa scende bruscamente da 119 mmHg a 93 mmHg, la pressione venosa da 6.3 mmHg sale a 11.3 mmHg. La pressione parenchimale, sostanzialmente non determinabile a tubi aperti (0.3 mmHg), sale a 20.3 mmHg nel momento in cui, viceversa, vengono chiusi.

La determinazione di tale valore è stato ottenuto attraverso il calcolo della pressione differenziale venosa.

3.3.2 Vitalità epatocitaria e morfologia

Tutti gli epatociti primari coltivati nei bioreattori ove sia stato mantenuto un flusso costante ed omogeneo nel tempo, hanno dimostrato vitalità >95% (valore medio); viceversa la vitalità cellulare degli epatociti nel gruppo di controllo (ovvero senza flusso arterioso) è stata <1%.

In particolare, eccellenti livelli di vitalità sono stati ottenuti nei bioreattori ove l'eluato della camera parenchimale è stato lasciato drenare all'esterno (vitalità >95%, 81%, e 72% rispettivamente nel gruppo con tubi parenchimali aperti, connessi alla vena femorale, connessi all'outlet del device tramite tubo a Y, gruppo 1, 2, 3).

Il clampaggio del compartimento parenchimale dopo la semina è invece esitato nella morte della coltura cellulare (vitalità <5%) (Fig. 3.4B)

Peraltro gli epatociti, di forma rotondeggiante dopo l'isolamento enzimatico dal fegato nativo, hanno progressivamente assunto, dopo semina nel bioreattore impiantato, una morfologia più sferoidale, cosiddetta "*flattened morphology*" (Fig. 3.4A), ed alcuni si sono presentati con doppio nucleo.

Si è proceduto inoltre alla somministrazione nella camera di coltura di un colorante con un noto fluoroforo, calceina (generata dalla catalisi enzimatica del sistema Live/Dead indicator), e nota anche come *ABCBI* (apical multidrug resistance-associated protein 1) *activity indicator*. In considerazione del suo metabolismo cellulare, la calceina è stata pertanto metabolizzata e secreta dal polo apicale epatocitario; gli studi morfologici hanno evidenziato un franco accumulo del fluoroforo in aree ben circoscritte da epatociti, e compatibili con strutture tipo "laghi-biliari" verosimilmente dovute a processi di polarizzazione cellulare (ricostituzione di tight-junctions intercellulari). (Fig. 3.4 A)

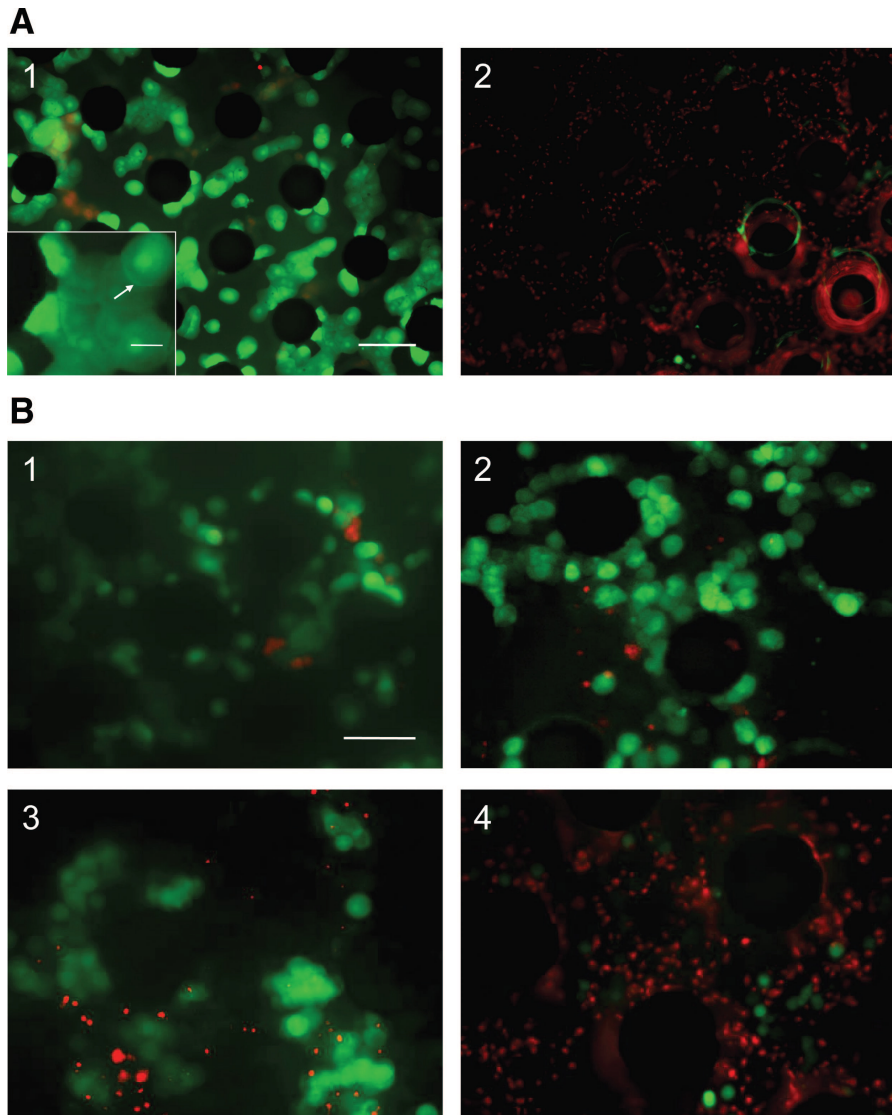


Figura 3.4 Studio della fluorescenza relativo alla sopravvivenza delle colture di epatociti primari nei bioreattori (A) 24 ore dopo l’impianto del bioreattore con (1) e senza flusso ematico (2), e delle linee stabilizzate di epatoblastoma (B) con le diverse condizioni di coltura dei tubi della camera parenchimale: Aperti (1), connessi alla vena femorale omolaterale (2) o all’outlet del device tramite tubo a Y (3), e chiusi (4). La vitalità cellulare è stata determinata attraverso saggio enzimatico “*calcein AM (greenliving) and ethidium homodimer (red-dead)*”. Ingrandimento in A1, evidenzia l’accumulo di calceina da formazione di strutture simil-biliari per la costituzione di tight-junction intercellulari.
 Scale bar: 25μm inset = 10 μm.

Espressione proteica

Gli alti livelli endogeni di albumina di ratto non hanno permesso di determinare con sicurezza i livelli di albumina prodotta dalle sole colture epatocitarie del bioreattore.

Peraltro non è stata identificata una differenza realmente significativa nella determinazione dell'albumina a livello ematico e nei campioni di eluato dalla camera parenchimale per tutta la durata dello studio (così come per i livelli di bilirubina diretta).

Tuttavia gli assays di immunofluorescenza a 24h dall'impianto hanno chiaramente indicato che gli epatociti hanno conservato la capacità di sintesi proteica (ed in particolare di albumina).

L' α FP umana secreta dalle linee primarie di HepG2/C3A è stata identificata invece sia nei campioni di sangue che nei campioni dell'eluato raccolti; in particolare, nel gruppo di studio cosiddetto "open" (Fig. 3.5 A). Questo indica che le cellule HepG2/C3A hanno mantenuto nel tempo una costante capacità di sintesi di α FP, sia a livello sistemico sia nella camera parenchimale.

I livelli ematici di α FP sono stati simili nel gruppo di studio con i tubi parenchimali aperti, e/o connessi alla vena femorale omolaterale ($P > 0.05$), per tutti i campionamenti, ma significativamente maggiori rispetto al gruppo di studio in cui i tubi erano connessi all'outlet con tubo a Y ($P < 0.05$), rispettivamente a 12, 18, e 24 ore dopo l'impianto. Non è invece stato possibile determinare l' α FP ematica nel gruppo di studio in cui la camera parenchimale era chiusa; in questo caso l'incremento della pressione all'interno della camera stessa ha determinato morte cellulare (Fig. 3.5 B).

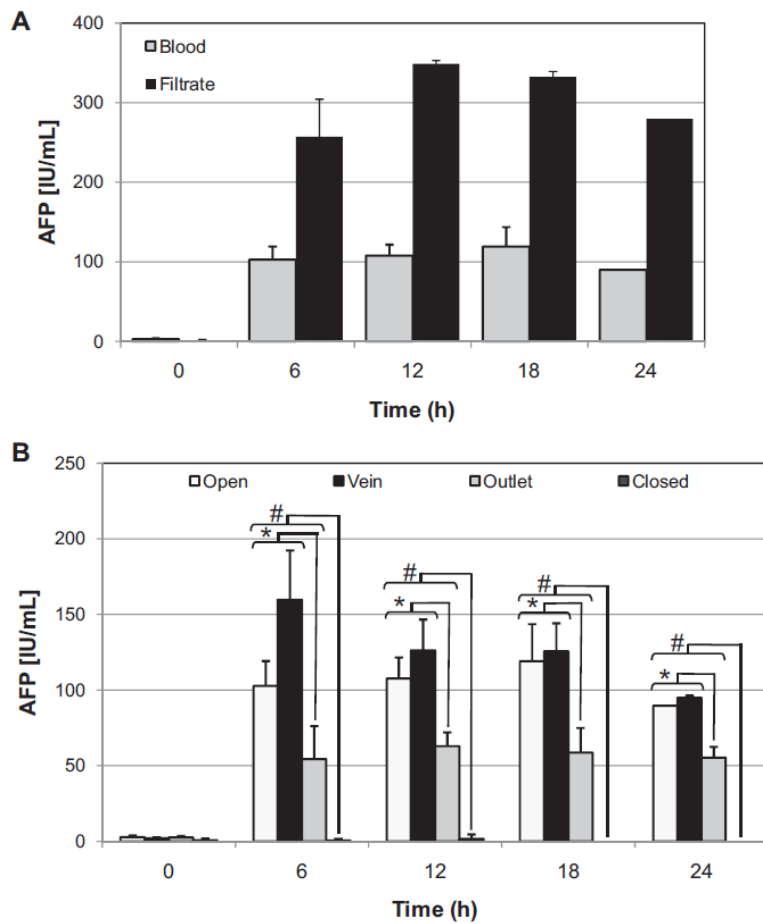


Figura 3.5. A, livelli di α FP umana nei campioni di eluato dalla camera parenchimale e di sangue, raccolti da esperimenti con impianti di bioreattori con coltura di cellule HepG2/C3A, sulla base di determinati intervalli di tempo (A) e sulla configurazione della camera parenchimale (B).

BIBLIOGRAFIA

1. Kaihara S, Borenstein J, Koka R, Lalan S, Ochoa ER, Ravens M, et al. "Silicon Micromachining to tissue engineer branched vascular channels for liver fabrication" *Tissue Eng* 2000;6:105-117;
2. Shin M, Matsuda K, Ishii O, Terai H, Kaazempur-Mofrad M, Borenstein J, et al. "Endothelized networks with a vascular geometry in microfabricated poly(dimethyl siloxane)" *Biomed Microdevices* 2004;6:269-278;
3. Cheung W, Borenstein J, Kaazempur-Mofrad M, Shin M, Kulig K, Vacanti JP "Development of an implantable tissue-engineered liver device with a vascular network of channels co-cultured with human hepatocytes and human microvascular endothelial cells" Presented at the American Transplant Congress 2003;May 30-June 4; Washington DC;
4. Seglen PO "Preparation of isolated rat liver cells" *Methods Cell Biol* 1976;13:29-83;

4.1 INTRODUZIONE

Il seguente capitolo espone una evoluzione successiva delle fasi progettuali e sperimentali del progetto.

Come spesso accade in questo campo, la parte progettuale non può prescindere in modo assoluto dalla parte pratico-realizzativa poiché il trattare problemi nuovi in campo *biotech* pone spesso degli ostacoli che non possono essere previsti, e quindi affrontati nella fase di *design*, ma si presentano nella successiva pratica sperimentale.

Gli approcci di tissue engineering affrontati nella prima fase del progetto, hanno previsto la realizzazione di esperimenti *in vitro* e *in vivo*; essi hanno permesso la configurazione di strutture polimeriche dotate di micropattern che mimassero la geometria delle reti microvascolari.

La realizzazione di questi progetti ha permesso di ottenere molte ed utili informazioni nell'ambito della tecniche di ingegnerizzazione, in particolare diversi *insights* sono stati raccolti sia per quanto riguarda i processi microfabbricazione, da una parte, sia per condizioni dei sistemi di coltura, dall'altra.

Ciò nonostante, i bioreattori realizzati non hanno dato sufficienti garanzie, nella pratica, di ottenere strutture tridimensionali con una risoluzione sufficiente per la applicazione clinica, limitandosi prevalentemente ad uno sviluppo di microvasi per lo più in ambito planare e dimostrandosi più adatti a studi di *drug-testing*.

I suggestivi risultati, tuttavia, ci hanno permesso di giungere ad importanti considerazioni nella progettazione dei successivi steps del progetto:

- seppur nelle 2D, i primi dati hanno permesso di presumere che per la formazione di reti capillari 3D non basti solo ingegnerizzare un adeguato pattern vascolare ma sia necessario anche ottimizzare il materiale con il quale verrà realizzato lo scaffold di semina, al fine di favorire un adeguato *attachment* ed una omogenea distribuzione cellulare;
- altra importante evidenza sottolinea come nei processi di *tissue engineering* il network vascolare non sia l'unico protagonista: anche le condizioni di coltura cellulare (tipo cellulare, pressione, medium), svolgono un ruolo determinante nel governare i processi di maturazione (proliferazione e funzione) della popolazione cellulare in oggetto.

D'altra parte è noto che la *specificità strutturale* dei tessuti rende particolarmente difficile la riproduzione in laboratorio di tessuti biologici anche semplici.^{1,2}

Sulla scorta di queste considerazioni abbiamo realizzato un nuovo bioreattore 3D in grado di garantire, il più possibile, un adeguato supporto meccanico mediante l'utilizzo di scaffolds 3D microstrutturati e di orientare la proliferazione e la differenziazione cellulare mediante fattori di crescita e opportuni stimoli forniti dall'ambiente di coltura.³

Un altro aspetto fondamentale dell'ingegneria tissutale, infatti, concerne proprio la differenziazione cellulare: l'ottenimento di nuovo tessuto prevede anche la differenziazione delle cellule durante la loro proliferazione ed espansione *in vitro*.

Si è già accennato al fatto che ci sono sostanzialmente due possibilità a riguardo.⁴ La prima prevede la formazione di neo-tessuto a partire da cellule già differenziate; in questo caso le cellule proliferano *in vitro* andando incontro a un processo iniziale di de-differenziazione a seconda delle condizioni fisico-chimiche che si sperimentano.

La seconda possibilità riguarda l'utilizzo di cellule staminali indifferenziate e comporta la conoscenza adeguata e approfondita dei fattori in grado di indurre la maturazione delle cellule utilizzate.

Purtroppo uno dei limiti di molti sistemi è rappresentato dal fatto che gli epatociti sono cellule ad alta attività metabolica ed in grado di proliferare inizialmente, ma con la tendenza a perdere successivamente molte delle caratteristiche differenziate che li caratterizzano nell'ambito del tessuto epatico.^{5,6} Proprio per questo motivo molti autori hanno fatto riferimento in questi anni alle cellule staminali (cfr Cap. 1).

Per quanto riguarda questo step del progetto, l'idea è stata di combinare la precedente esperienza personale con i concetti già noti, creando un bioreattore contenente un substrato (scaffold) 3D, su cui procedere con stimoli combinati per la differenziazione di cellule staminali epatiche.

Le diverse condizioni sperimentali hanno previsto la realizzazione di colture miste [associazione con cellule non-parenchimali del fegato (cellule stellate o di ITO)] e arricchimenti dei media, per favorire i processi di maturazione di "Human Liver Stem Cells" (HLSC) *in vitro*. Herrera et al. hanno, infatti, recentemente isolato con successo una popolazione adulta di cellule staminali epatiche umane (HLSCs, human liver stem cell).⁷ Tali cellule hanno già dato risultati promettenti, dimostrando di essere in grado di differenziare parzialmente verso epatociti maturi e di contribuire *in vivo* a stimolare la rigenerazione di fegato in topi immunocompromessi.

Le due fasi, progettuale e realizzativa, verranno quindi descritte in parallelo.

Particolare attenzione è stata dedicata, oltre alla scelta dei materiali, agli studi di fattibilità, al dimensionamento delle varie parti e all'integrazione tra teoria e pratica. Gran parte degli approcci sono stati pienamente affrontati sotto il punto di vista pratico. In questo caso la realizzazione del progetto è il risultato della collaborazione con l'Istituto di Embriologia ed Istologia (Prog. G. Abatangelo) ed l'Istituto di Ingegneria Chimica (Ing. N. Elvassore) dell'Università di Padova.

(Pubblicazione su *Tissue Engineering Part C – Methods*;16(6):1543-51).

4.2 MATERIALI E METODI

4.2.1 Modello matematico del bioreattore a flusso continuo

Abbiamo utilizzato un bioreattore costituito da 8 scaffolds porosi, a loro volta inseriti in 8 diverse camere di coltura (pertanto indipendenti l'una dall'altra).

Per ciascuna camera di coltura il flusso del medium attraverso lo scaffold 3D è unidirezionale, rispettivamente dalla estremità apicale a quella basale. Anche in questo caso la realizzazione del bioreattore si è basata su un modello matematico.

Il modello applicato in questa parte del progetto deriva da un precedente lavoro, già oggetto di pubblicazione.⁸ La geometria di uno scaffold altamente poroso, come la spugna di collagene (Avitene Ultrafoam Collagen Hemostat, Davol Inc) utilizzata in questo esperimento, è stata approssimata alla geometria di un cilindro con canali cilindrici paralleli e priva di interconnessioni (Fig 4.1a).

Per i calcoli di distribuzione è stato considerato un diametro medio dei canali di circa 200 μ m, sulla scorta dei dati ottenuti dalle immagini microscopiche e sulla analisi d'immagine dello scaffold stesso; per quanto riguarda la porosità, invece, si è considerata, per le nostre valutazioni, la massima possibile per questo tipo di geometria.

Il modello prevede un layer cellulare uniforme (Dominio II) aderente alla parete delle strutture canalicolari; il medium invece scorre lungo la porzione centrale dei canali di flusso (Dominio I) come esemplificato in Fig. 4.1b. E' prevista una crescita dello spessore del layer cellulare proporzionalmente con la crescita cellulare; viceversa la velocità assiale del medium, v_z , dipende dal valore del flusso totale e dal diametro del Dominio I.

L'ossigeno è stato considerato come parametro di riferimento poiché la sua concentrazione condiziona in maniera consistente la crescita cellulare.⁹

I fenomeni che governano la concentrazione dell'ossigeno per ciascun layer, e conseguentemente anche la crescita cellulare, sono riassunti in Fig. 4.1b.

Assumendo che nessuno dei fenomeni dipende da coordinate angolari, le equazioni che governano il modello matematico derivano dalla geometria cilindrica dello scaffold in termini di coordinate assiali e radiali, come segue:

Dominio I: layer di flusso del medium

$$\frac{\partial c_{O_2}^I}{\partial t} = - \left[\frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} (r N_{O_2,r}^I) \right] - \frac{\partial N_{O_2,z}^I}{\partial z} \quad (1)$$

$$N_{O_2,r}^I = - \mathcal{D}_{O_2}^I \frac{\partial c_{O_2}^I}{\partial r} \quad (2)$$

$$N_{O_2,z}^I = v_z c_{O_2}^I \quad (3)$$

dove $c_{O_2}^I$ è la concentrazione di ossigeno, $N_{O_2,r}^I$ è la diffusione radiale molare del flusso e $N_{O_2,z}^I$ è il flusso molare convettivo assiale. $\mathcal{D}_{O_2}^I$ è il coefficiente di diffusione dell'ossigeno nel medium e v_z è la velocità assiale del medium. Il profilo di velocità è stato assunto essere di tipo parabolico.

Dominio II: layer cellulare

$$\frac{\partial c_{O_2}^{II}}{\partial t} = - \left[\frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} (r N_{O_2,r}^{II}) \right] + R_{O_2} \quad (4)$$

$$N_{O_2,r}^{II} = - \mathcal{D}_{O_2}^{II} \frac{\partial c_{O_2}^{II}}{\partial r} \quad (5)$$

$$R_{O_2} = - \frac{1}{V_{cell}} \frac{Q_m c_{O_2}^{II}}{C_m + c_{O_2}^{II}} \quad (6)$$

$$\frac{dn}{dt} = F k_{cell} c_{O_2}^{II} n \quad (7)$$

$$F = \frac{1}{\pi} \left\{ \frac{\pi}{2} + \arctan \left[k_{damp} (c_{O_2}^{II} - c_{O_2}^{lim}) (S(z,t) - S^{lim}) \right] \right\} \quad (8)$$

$$S^{lim} = \left(\frac{4\mu Q}{\pi \tau_{shear}} \right)^{1/3} \quad (9)$$

dove $c_{O_2}^H$ è la concentrazione di ossigeno, $N_{O_2,r}^H$ è il flusso molare radiale diffusivo, R_{O_2} è la percentuale di uptake di ossigeno, $\mathcal{D}_{O_2}^H$ è il coefficiente di diffusione di ossigeno nel layer cellulare, n è il numero totale di cellule, Q_m e C_m sono parametri dipendenti dal tipo cellulare, k_{cell} , e V_{cell} sono il tempo di replicazione cellulare e il volume cellulare. F è una funzione di inibizione che descrive la fine della crescita cellulare quando la concentrazione di ossigeno sia al di sotto del limite fisiologico $c_{O_2}^{lim}$ (corrispondente a 40 mmHg) o quando lo shear stress sia superiore a τ_{shear} (0.5 Pa). S^{lim} è la dimensione del Dominio II corrispondente allo shear stress limite, k_{damp} è il coefficiente di damping che determina lo steepness di variazione di F da 1 a 0, μ è la viscosità del medium, e Q è il flusso nelle strutture canalicolari.

La concentrazione di ossigeno in ciascun canale di inlet ($c_{O_2}^I$ at $z = 0$) equivale alla concentrazione di equilibrio in aria ambiente ($c_{O_2,0}$). E' stata applicata la condizione iniziale di uniformità della concentrazione di ossigeno ($c_{O_2}^I = c_{O_2,0}$ at $t = 0$) in entrambi i domini. I valori dei parametri e le rispettive referenze sono riferite nella Tabella 4.1.

Il sistema di equazioni (1), (4) e (7) è stato calcolato utilizzando MATLAB (The MathWorks, Natick, MA) attraverso il metodo dei volumi finiti. Ciascun canale è stato discretizzato sia in direzione assiale che radiale.

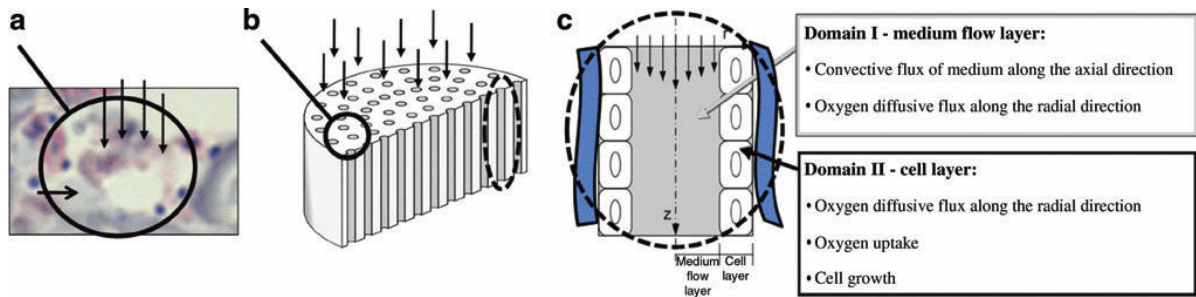


Fig. 4.1. Modello del bioreattore. (a) Immagine *in vitro* di un canale dello scaffold utilizzato per il modello matematico. Freccie verticali: direzione del flusso del medium; freccia orizzontale: fibre dello scaffold. (b) Schema della struttura dello scaffold con canali cilindrici paralleli (area in bianco è collagene). Freccie verticali: direzione del flusso del medium. Area circolare: area corrispondente all'ingrandimento in a. (c) Schema di un canale dello scaffold. Dominio I (grigio): layer di flusso del medium lungo la coordinata assiale z , mentre l' O_2 si distribuisce lungo la coordinata radiale r . Dominio II (bianco): layer uniforme della coltura ove le cellule aderiscono alla parete del canale. Non ci sono effetti di convezione di medium nel Dominio II, ma c'è diffusione di ossigeno. Lo spessore del Dominio II aumenta con la crescita cellulare. Aree blue: aree di collagene per la adesione cellulare.

Parameter	Symbol	Value
Cell growth kinetic constant	k_{cell}	$2.55e^{-5} \text{ m}^3/(\text{mol s})$
Cell specific volume	V_{cell}	$4.19e^{-15} \text{ m}^3/\text{cell}$
Damping coefficient	k_{damp}	$10 \text{ m}^2/\text{mol}$
Diffusion coefficient oxygen—cell	$D_{O_2}^{II}$	$2.0e^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$
Diffusion coefficient oxygen—medium	$D_{O_2}^I$	$3.29e^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$
Dissolved oxygen concentration in equilibrium with air	$c_{O_2,0}$	$2.1e^{-1} \text{ mol}/\text{m}^3$
Maximal oxygen consumption rate	Q_m	$2.5e^{-16} \text{ mol}/(\text{cell s})$
Medium viscosity	μ	$7.7e^{-4} \text{ Pa s}$
Oxygen concentration at half-maximal oxygen consumption	C_m	$6.9e^{-3} \text{ mol}/\text{m}^3$
Threshold oxygen concentration	$c_{O_2}^{lim}$	$5.26e^{-2} \text{ mol}/\text{m}^3$
Threshold shear stress	τ_{shear}	0.50 Pa

Tab. 4.1. Parametri utilizzati nel modello, simboli, valori utilizzati nelle simulazioni

4.2.2 Colture cellulari e protocollo di differenziamento cellulare

Epatociti umani

Gli epatociti umani sono stati isolati, purificati e caratterizzati come già descritto da Herrera et Al.⁷ In particolare le cellule HLSCs sono state ottenute dalla semina di vials criopreservati ottenuti da Lonza Group Ltd., Basilea, Svizzera (approvazione IRB non richiesta).

I campioni cellulari criopreservati sono stati posti in bagno termostato a $37.1 \text{ }^\circ\text{C}$ e successivamente seminati su flasche per favorirne l'espansione cellulare. La vitalità dei campioni è stata determinata attraverso la colorazione vitale Trypan blue, mentre la

caratterizzazione cellulare è stata effettuata secondo il protocollo già proposto da Herrera et al.⁷ Tests di immunofluorescenza sono stati utilizzati per confermare la purezza della popolazione cellulare di HLSCs, dopo aver allestito le colture cellulari. La assenza di CD34, c-kit, e CK19 o di markers per le cellule epatiche non parenchimali (α smooth muscle actin [α SMA]) hanno confermato la loro purezza. Ciascuno di questi assays è stato eseguito random su tre campioni ottenuti da cellule criopreservate. I risultati confermano una purezza delle HLSCs del 98% circa.

Le cellule sono state successivamente espanse in flasche in presenza di cosiddetto medium per cellule epatiche (HCm), così costituito: α -minimum essential medium/endothelial cell basal medium-1 (rapporto 3:1) (Gibco, Carlsbad, CA/Cambrex, Charles City, IA) implementato con l-glutamina (5 mM), Hepes (12mM, pH 7.4), penicillina (50 IU/mL), streptomicina (50 mg/mL), desometasone 1 mM, glucagone 0.014 mg/mL, insulina 0.16U/mL (Sigma, St. Louis, MO), siero fetale bovino (10%), e siero equino (10%) (da Gibco). Per gli esperimenti di differenziazione cellulare, le HLSCs sono state seminate in diverse condizioni di coltura, ovvero con il sopradescritto medium per epatociti (HCm) o, in alternativa con medium per cellule staminali (SCm) Amniomed® Plus (Euroclone, Milano, Italy).

Cellule di ITO

Le cellule di ITO sono state isolate e caratterizzate utilizzando il protocollo di perfusione con collagenasi a 2 steps come descritto da Paik et al.¹⁰ Campioni cellulari sono stati ottenuti da semine di cellule criopreservate procurate dal Laboratorio del Dr. M. Pinzani Università di Firenze, Italy (approvazione IRB non richiesta). Le cellule di ITO sono state risospese ad una concentrazione di 1×10^5 cellule/mL con terreno di coltura Dulbecco's modified Eagle's medium addizionato con siero fetale bovino (20%), penicillina (50 IU/mL), e streptomicina (50 mg/mL) (Sigma) e coltivate su piastre rivestite con collagene tipo I (10 mg/mL) (Sigma) in ambiente umidificato 5% CO₂.

Colture 3D

Per tutti gli esperimenti di differenziazione, sono state allestite colture 3D nel bioreattore a perfusione già descritto, in accordo con il protocollo precedentemente pubblicato.¹¹ Le cellule, tra il 3° e 8° passaggio su piastra, sono state staccate dalla flasca di coltura con tripsina e sottoposte a lavaggio con EDTA, e successivamente

contate; 5×10^5 cellule sono state seminate su spugna di collagene (Avitene® Ultrafoamtm_Collagen Hemostat; Davol, Inc.) del diametro di 5mm e spessore di 3mm.^{12,13} Fino a 8 spugne sono state allestite per ciascun esperimento. Il giorno seguente alla semina, ciascuna delle spugne è stata posta in una singola camera nel bioreattore, ed è stata mantenuta una perfusione di medium controllata con flusso di 0.5 mL/min attraverso ciascun scaffold.¹¹ Le diverse condizioni di coltura utilizzate nel bioreattore sono mostrate in Tabella 4.1. Tutte le colture sono state eseguite 3 volte e gli scaffolds sono stati sottoposti ad analisi biochimiche e morfologiche a tempi definiti; i tests biochimici sono stati realizzati nei giorni 1, 3, 5, 7 di coltura e gli studi morfologici nei giorni 3 e 7 di coltura.

				Medium di perfusione		
				<i>Hepatic Cell medium</i>	<i>Stem cell medium</i>	<i>(HCm)+ (SCm) (1:1)</i>
				<i>(HCm)</i>	<i>(SCm)</i>	
Cellule		HLSC		HLSC		HLSC
		ITO		ITO		ITO
		HLSC + ITO (3:1)		HLSC + ITO (3:1)		HLSC + ITO (3:1)

Tabella 4.1 condizioni di coltura sperimentali

Test MTT

La percentuale di proliferazione cellulare è stata determinate attraverso il test MTT [(3-4,5-dimethylthiazol-2yl-2,5-diphenyltetrazoliumbromide)-based cytotoxicity test], second il protocollo di Denizot e Lang con lievi variazioni.¹⁴

Le colture cellulare in 3D, rimosse dal bioreattore, sono state poste su una piastra di coltura con l'aggiunta di 1mL di soluzione MTT (0.8mg/mL in buffer-fosfato di soluzione salina). Le colture sono dunque state incubate ed il surnatante eliminato dopo 3h. Ciascun scaffold è stato dunque trasferito in microtubi Eppendorf, ed è stato aggiunto 1mL di soluzione di estrazione (0.01N di HCl in isopropanolo). Il microtubo Eppendorf è stato dunque agitato per 5min in modo da favorire il rilascio completo di

pigmento dallo scaffold e centrifugato a 15,000 g per 5 min; la densità del supernatante è stata letta a 540 nm.

Test ELISA per albumina

La produzione di albumina dalle cellule HLSCs è stata determinata attraverso il test ELISA. Campioni di medium sono stati raccolti giornalmente dall'eluato di perfusione e congelati a - 20°C. La concentrazione di albumina è stata misurata utilizzando il kit human albumin AssayMax Human Albumin ELISA (Gentaur, Brussels, Belgium).

Studi istologici e morfologici

I campioni raccolti sono stati fissati in formalina e successivamente in paraffina, colorati con ematossilina ed eosina. Sezioni al criostato di 7 mm sono state utilizzate per i test di immunohistochimica e per gli studi morfologici. Le sezioni sono state poste su vetrini rivestiti di gelatina, fissati con acetone assoluto per 10 minuti a temperatura ambiente, e criopreservati a -2°C fino all'uso. La proteina CK19 è stata identificata su cellule HLSCs con il metodo di fosfatasi acida/antifosfatasi acida. Le procedure sono state condotte in camera umidificata a temperatura ambiente. Dopo saturazione non specifica dei siti antigenici con siero di coniglio a diluizione 1:20 in 0.05M Maleate TRIZMA (pH 7.6; Sigma) per 20 min, l'anticorpo primario è stato aggiunto al campione (1:20 mouse anti-human CK19; Dako, Milano, Italy). Dopo incubazione per 2 h, i campioni sono stati sciacquati con soluzione buffer, e l'anticorpo secondario è stato aggiunto per 30 min (Link Ab [Dako], rabbit antimouse). Dopo un secondo lavaggio, le sezioni del criostato processate sono state incubate per 30 min con mouse acid phosphatase anti-acid phosphatase Ab (Dako) in diluizione 1:50, sciacquati ancora e, infine, posti a regire per 20 min con substrato Fast Red (Sigma). La colorazione è stata effettuata con ematossilina (Sigma).

Analisi Statistica

I valori statistici sono stati espressi con media e deviazione standard. L'analisi dei dati è stata formulata con il test di varianza oneway di Excel software package. La significatività statistica è assunta per valori $p < 0.05$.

RISULTATI

Bioreattore

Il modello del bioreattore è stato ingegnerizzato come descritto precedentemente nel paragrafo Materiali e Metodi (Fig. 4.1). Abbiamo considerato il profilo tempo-dipendente del volume cellulare e della concentrazione di ossigeno lungo ciascun canale così come l'output principale del sistema.

Sono state testate diverse velocità di flusso nel modello: le Figure 4.2 e 4.3 mostrano i risultati dei 3 valori considerati, rispettivamente 0.1, 0.5, e 2.5 mL/min. I risultati ottenuti confermano che la crescita cellulare dipende fundamentalmente dal valore di flusso del medium di perfusione. Il ricorso al flusso minore (0.1 mL/min) favorisce una rapida crescita cellulare a livello del canale di ingresso (Fig. 4.2, linea continua) dove la concentrazione di ossigeno rimane alta, a livelli >80% del valore di saturazione. D'altra parte, un flusso di 0.1 mL/min non è in grado di favorire un adeguato gradiente di ossigeno lungo la lunghezza dei canali: la concentrazione di O₂ tende infatti a decrescere progressivamente dal punto di *inlet* al punto di *outlet* del sistema canalicolare. La concentrazione a livello dell'*outlet* dei canali (Fig. 4.2, linea puntata e tratteggiata) tende a scendere a livelli critici di $5.26e^{-2}$ mol/m³ dopo 7 giorni di coltura. Tale gradiente di ossigeno comporta una crescita cellulare più lenta nelle porzioni centrali ed alla base dello scaffold (linea tratteggiata, e linea tratteggiata e puntata) e di conseguenza ad una distribuzione disomogenea del volume cellulare lungo la direzione z.

Un flusso di 0.5 mL/min permette invece di mantenere una concentrazione di ossigeno >80% del livello di saturazione lungo i canali. Il gradiente di ossigeno si mantiene sufficiente e costante nei giorni a seguire, ed è correlato al gradiente in percentuale del volume cellulare. L'ulteriore aumento della velocità di flusso permette di ottenere una distribuzione ancora più omogenea del volume cellulare e della concentrazione di ossigeno lungo la direzione z (Fig. 4.2). Tuttavia, tale valore risulta essere associato ad un maggiore *shear stress* sulla superficie cellulare e tale profilo può essere causa di una riduzione della crescita cellulare (Fig. 4.3).

La Figura 4.3 espone il modello predittivo sui valori medi in percentuale di volume occupato dalle cellule nell'intero scaffold in tre *time points* e con tre diverse velocità di flusso. Per brevi tempi di coltura delle cellule epatiche, una bassa velocità di flusso (intorno a 0.5 mL/min e <) può determinare la maggiore percentuale di volume

cellulare poiché la concentrazione media di O_2 non dipende strettamente dal valore di flusso quando comunque il volume cellulare è modesto. Nella coltura a lungo termine invece (5 giorni o >), una velocità di flusso ottimale (intorno 0.5 mL/min) raggiunge il massimo risultato in termini di percentuale di volume cellulare ottenuto. Ancora, come mostrato in Figura 4.2, una distribuzione omogenea della crescita cellulare lungo la direzione z può essere ottenuta solo con velocità di flusso pari a 2.5 mL/min o >. Noi abbiamo considerato ottimale una velocità di flusso di 0.5 mL/min, poiché ha permesso di ottenere i migliori risultati di crescita cellulare a scapito di una bassa eterogeneità nella distribuzione cellulare.

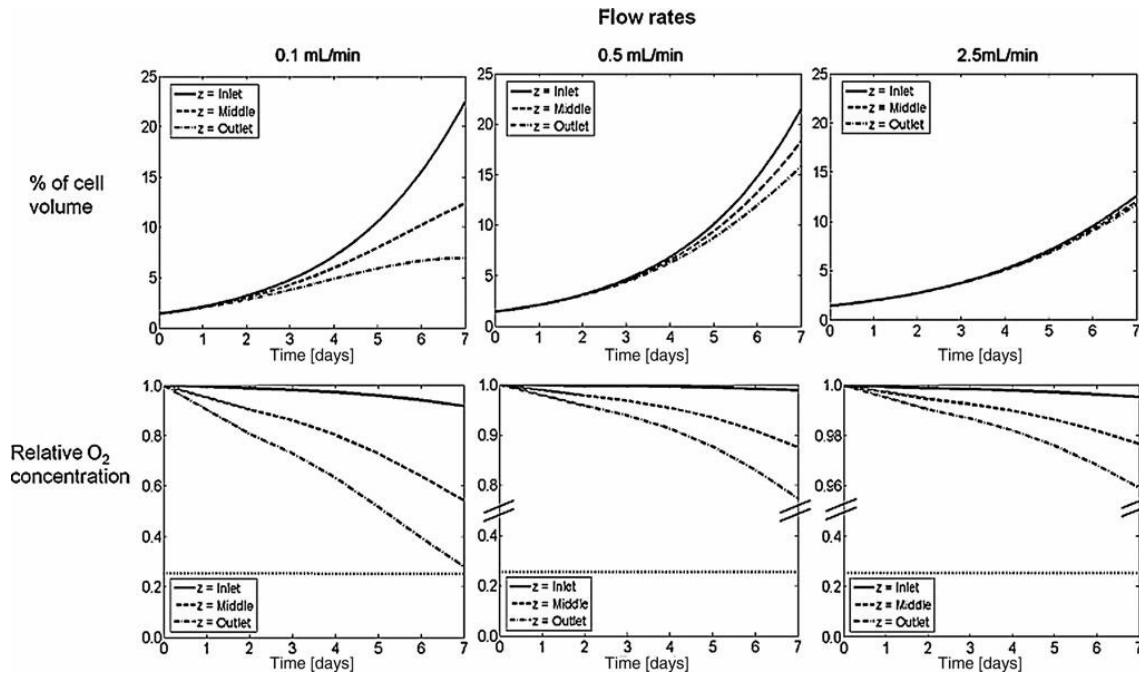


Fig 4.2 Variazione percentuale nel tempo del volume occupato dalle cellule (linea superiore) e concentrazione di O_2 relativa al valore di saturazione (linea inferiore). Dati relative a 3 diverse velocità di flusso, 0.1 mL/min (sin), 0.5 mL/min (centro), e 2.5 mL/min (dx). Ciascun grafico mostra i dati nelle 3 coordinate z , ovvero al punto di inlet (linea continua), nel mezzo (linea tratteggiata), e al punto di outlet (linea tratteggiata e puntata). La linea orizzontale puntata nel grafico di O_2 corrisponde al limiti dalla concentrazione di ossigeno di $5.26 \times 10^{-2} \text{ mol/m}^3$.

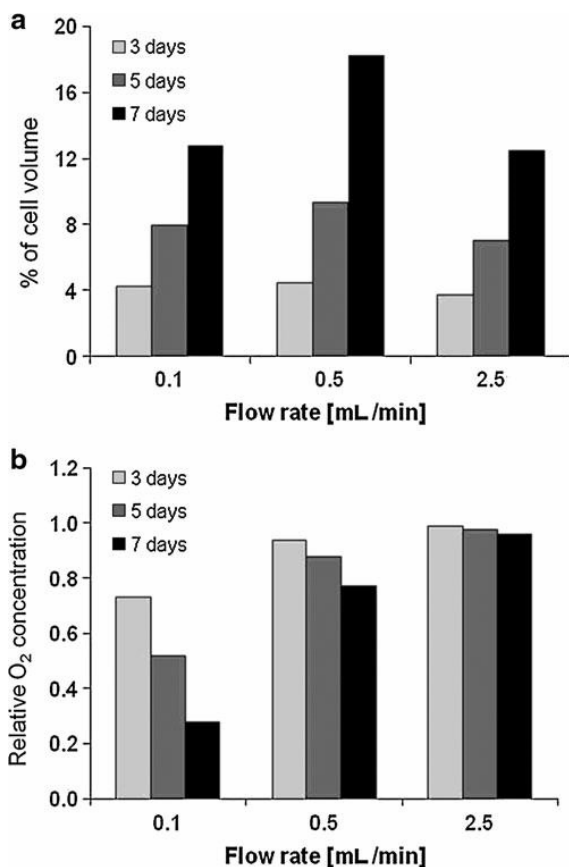


Fig 4.3 Media del volume cellulare (%) (a) e concentrazione minima di O₂ raggiunta in relazione al valore di saturazione (b) per 3 valore di velocità di flusso, 0.1, 0.5, e 2.5 mL/min. I dati sono registrati a 3 time points, dopo 3 giorni (grigio chiaro), 5 giorni (grigio scuro), e 7 giorni (nero).

Analisi morfologiche

La Figura 4.4 (colonna sinistra) mostra le caratteristiche morfologiche delle cellule HLSCs al giorno 3 di coltura nel bioreattore precedentemente descritto, in condizioni dinamiche (0.5mL/min) ed in presenza di HCM. In queste condizioni, le cellule mostrano chiaramente una organizzazione a clusters all'interno dei piccoli compartimenti della spugna. E' conservato il fenotipo, come dimostrato anche dalla colorazione in rosso (positivo), per i markers biliari (CK19) e dalla presenza di cellule binucleate (cellule indicate dal circolo).

La direzione del flusso del medium di perfusione viene indicato dalle frecce, mentre la presenza delle fibre di biomateriale (frecce orizzontali nere) indica la organizzazione compartimentale delle HLSCs, a simulare strutture epato-simili.

La Figura 4.4 (colonna di destra) mostra la coltura cellulare al giorno 7. In questo caso, di nuovo, le cellule sono state colorate con colorazione standard EE e sottoposte a immunocolorazione per markers biliari (CK19; cellule rosse). Le cellule seminate

inizialmente a livello della porzione di inlet del flusso di medium (frecche bianche) cominciano presto a assumere una organizzazione a strati multipli, migrando attraverso la spugna di collagene (frecche orizzontali). Intorno al giorno 7 di coltura (Fig. 4.4), alcuni clusters si presentano insediati all'interno della spugna (clusters rossi), mostrando layers sovrapposti di cellule all'interno dei pori. Il fenotipo morfologico differenziato si presenta con forma "esagonale", spesso associato a doppio nucleo (cellule nel cerchio) in contrasto con la forma piatta ed allungata identificata inizialmente identificata nella coltura a monostrato.

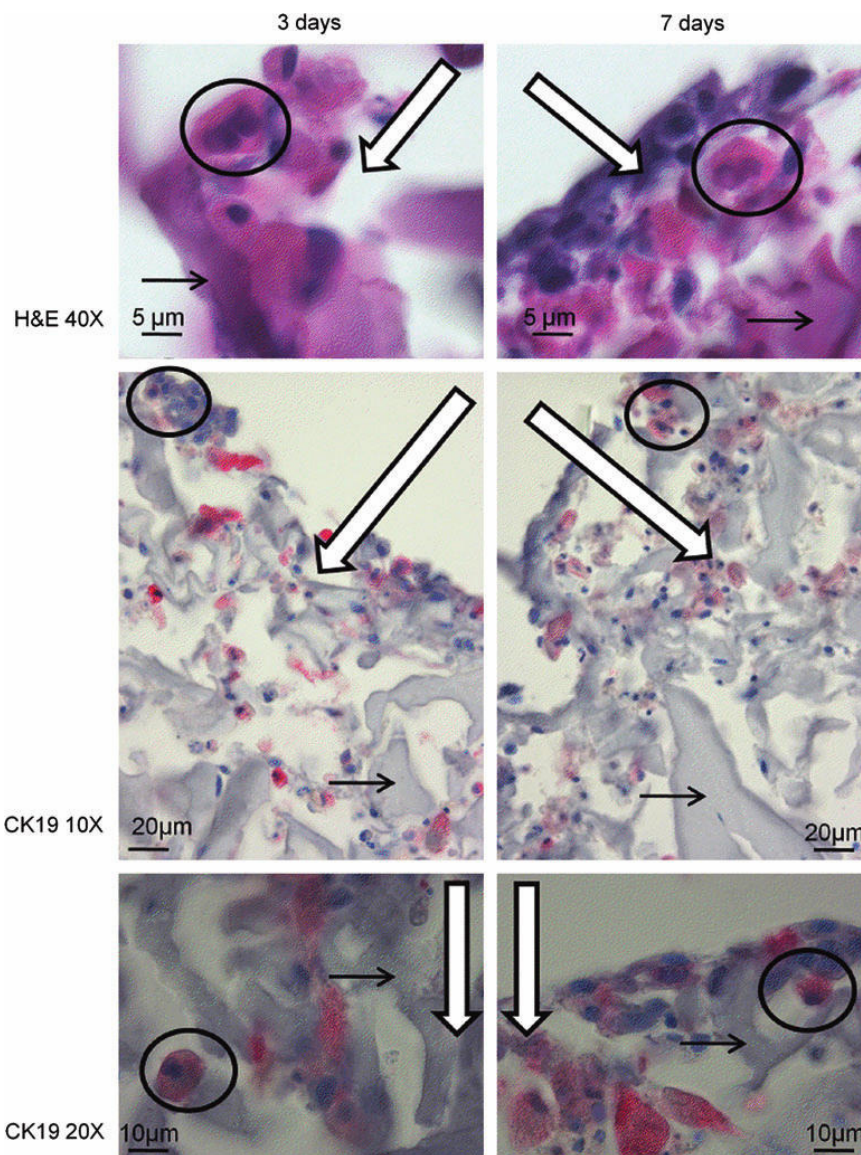


Fig. 4.4. Analisi morfologiche delle cellule HLSCs nello scaffold 3D nelle diverse condizioni di coltura al giorno 3 (sin) e 7 (dx). Le cellule sono colorate con colorazione standard EE e per i markers biliari (CK19) (cellule in rosso). Frecche bianche: direzione del flusso del medium; frecche nere orizzontali: fibre di collagene. Cerchi: cellule con doppio nucleo. HLSC, human liver stem cell; EE: ematossilina ed eosina.

Test di proliferazione

Le cellule seminate sulla spugna sono state mantenute in coltura nel bioreattore fino a 7 giorni in diverse condizioni, principalmente correlate al tipo di medium utilizzato nella perfusione (cfr sezione Materiali e Metodi).

I parametri biologici sono stati analizzati rispettivamente al giorno 1, 3, 5, e 7, (determinazione proliferazione cellulare con test MTT e determinazione produzione di albumina per valutare il grado di differenziazione cellulare). Il grado di proliferazione (come da test MTT) è mostrato in Figura 4.5a, dove si apprezza come le cellule siano sopravvissute fino al giorno 7 in tutte le condizioni di coltura, a conferma della validità del sistema di perfusione. Una analisi più dettagliata ha evidenziato che non vi è stato un franco incremento della proliferazione durante il periodo di coltura quando le HLSCs siano state coltivate come popolazione pura; viceversa, un modesto incremento è stato notato in presenza di SCm medium. Un maggiore incremento del valore MTT nel tempo, invece, è stato osservato negli scaffolds seminati con cellule di ITO da sole o in coltura mista con HLSC, indipendentemente dal tipo di medium utilizzato.

Il valori maggiori in termini di incremento nella proliferazione cellulare sono stati ottenuti quando HLSC ed ITO siano state coltivate in co-coltura ed in presenza di SCm medium.

Produzione di albumina

Avendo dimostrato che il flusso continuo di medium è in grado di mantenere vitale nel tempo la coltura cellulare, abbiamo dunque valutato la funzionalità epatica. In particolare è stata determinata la secrezione di albumina per ciascuna delle condizioni di coltura sopradescritte attraverso il test immunoenzimatico ELISA da campioni di eluato del medium.

L'analisi del DNA cellulare estratto dagli scaffold seminati nelle diverse condizioni di coltura è stata utilizzata per la determinazione dei valori funzionali. I risultati in Figura 4.5b confermano che la albumina è stata sintetizzata dalle cellule epatiche cresciute nel bioreattore durante tutto l'esperimento. Abbiamo peraltro confrontato la capacità da parte delle cellule HLSCs di conservare la capacità di sintesi nelle diverse condizioni (Fig. 4.5b). Le colture pure di HLSCs hanno dimostrato una capacità di sintesi proteica strettamente correlate al tipo di medium utilizzato, e la presenza di SCm ha determinato una maggiore produzione. Lo stesso trend è stato notato in condizioni di co-coltura, in cui una maggiore secrezione di albumina è coincisa di nuovo con la presenza di SCm

medium. Viceversa, non è stata determinata come previsto alcuna produzione di albumina nelle colture pure di cellule di ITO (cellule non parenchimali).

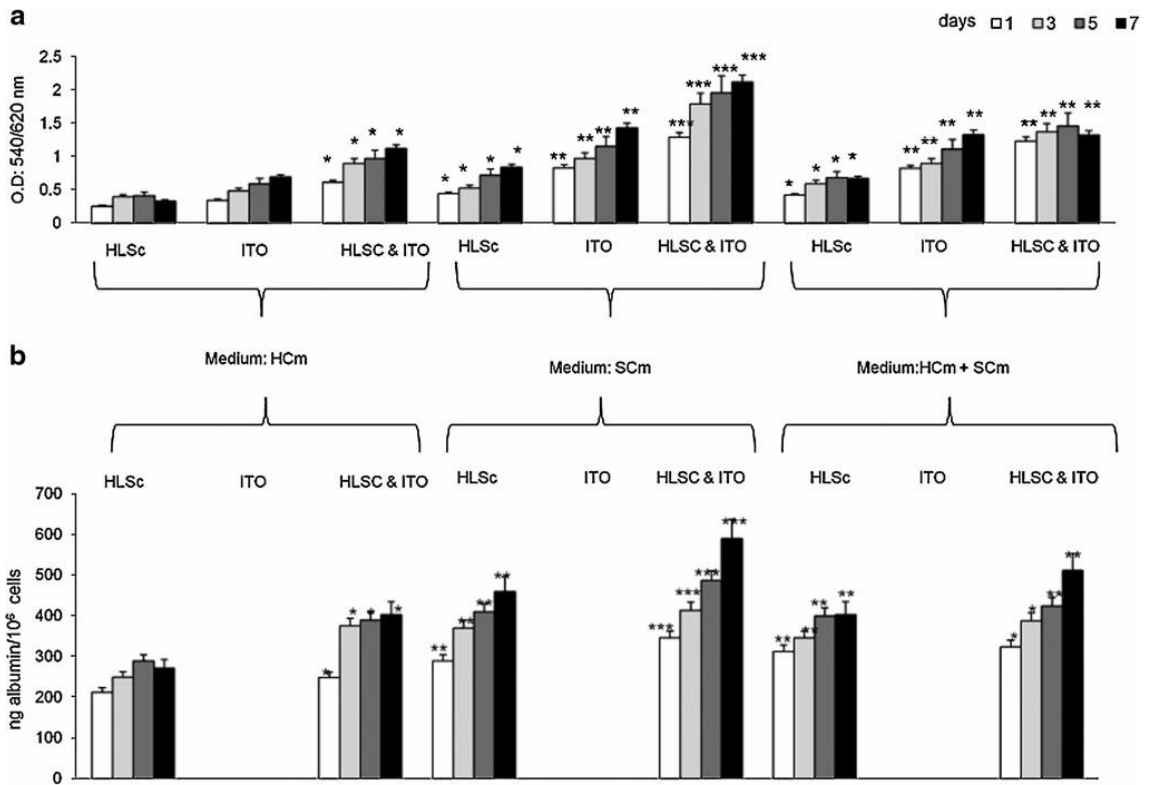


Fig. 4.5. (a) Tests MTT per la attività proliferative, al giorno 1, 3, 5, e 7 in HCm (hepatic cell medium), SCm (stem cell medium), ed in combinazione HCm+SCm (hepatic cell+stem cell media). I dati sono stati confrontati con analisi di varianza con i valori delle HLSCs in HCm negli stessi giorni (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001). (b) Secrezione di albumina, determinata per HLSCs in coltura pura, cellule di ITO in coltura pura e in coltura mista (HLSC+ITO), all'interno del bioreattore (assenza di produzione di albumina nella coltura delle cellule di ITO, come previsto). I dati sono stati confrontati con la analisi di varianza per le HLSCs in HCm negli stessi giorni (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

BIBLIOGRAFIA

1. Mantero S., Remuzzi A., Raimondi M. T., Ahluwalia A. *Fondamenti di ingegneria dei tessuti per la medicina rigenerativa*. Bologna: Pàtron Editore, Sett 2009
2. Jackson AR, Gu WY “Transport properties of cartilaginous tissues” *Curr Rheumatol Rev* 2009;1:1-18;
3. Meyer U, Nazer N, Buchter A, Wiesmann HP “Design and performance of a bioreactor system for mechanically promoted three-dimensional tissue engineering” *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 2006;44:134-140;
4. Rotter N, Bucheler M, Haisch A, Wollenberg B, Lang S “Cartilage tissue engineering using resorable scaffolds” *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 2007;1:411-416;
5. Catapano G, Patzer JF 2nd, Gerlach JC “Transport Advances in Disposable Bioreactors for Liver Tissue Engineering” *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2010;115:117-143;
6. Tilles AW, Berthiaume F, Yarmush ML, Toner M “Critical issues in bioartificial liver development” *Review Technol. Health Care* 2002;10(3-4):177-186;
7. Herrera MB, Bruno S, Buttiglieri S, Tetta C, Gatti S, Deregibus MC, Bussolati B, Camussi G. Isolation and characterization of a stem cell population from adult human liver. *Stem Cells* 2006;24(12): 2840-50;
8. Flaibani M., Magrofuoco E., Elvassore N. Computational modeling of cell growth heterogeneity in a perfused 3D scaffold. *IECR* 2010;49:859;
9. Lewis M, MacArthur B, Malda J, Pettet G, Please C “Heterogeneous proliferation within engineered cartilaginous tissue: the role of oxygen tension” *Biotechnology and Bioengineering* 2005;91(5):607-15;
10. Paik YH, Schwabe RF, Bataller R, Russo C, Jobin C, Brenner DA „Toll-like receptor 4 mediates inflammatory signalling by bacterial lipopolysaccharide in human hepatic stellate cells” *Hepatology* 2003;37(5):1043-45;
11. Flaibani M, Luni C, Sbalchiero E, Elvassore N “Flow cytometric cell cycle analysis of muscle precursor cells cultured within 3D scaffolds in a perfusion bioreactor” *Biotechnol Prog* 2009; 25:286-295;

12. Cannizzaro C, Tandon N, Figallo E, Park H, Gerecht S, Radisic M, Elvassore N, Vunjak-Novakovic G “Practical aspects of cardiac tissue engineering with electrical stimulation” *Methods Mol Med* 2007;140:291-307;
13. Cimetta E, Flaibani M, Mella M, Serena E, Boldrin L, Coppi PD, Elvassore N “Enhancement of viability of muscle precursor cells on 3D scaffold in a perfusion bioreactor” *Int J Artif Organs* 2007;30(5):415-28;
14. Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability *J Immunol Methods* 1986;89(2):271-7;

5.1 INTRODUZIONE

Il seguente capitolo espone la fase di applicazione *in vivo*, sul piccolo animale, dei risultati sperimentali ottenuti nei precedenti lavori insieme ad una nuova prospettiva di lavoro, ancora in corso.

Anche in questo caso, il progetto si sviluppa in collaborazione con l'Istituto di Istologia ed Embriologia (Prof. G. Abatangelo) e l'Istituto di Ingegneria Chimica (Ing. N. Elvassore) dell'Università di Padova.

La possibilità di poter ricostituire *in vivo* costrutti con vasi di diametro capillare o di microvasi (per definizione con diametro interno minore di 1 mm) può potenzialmente offrire un importante ventaglio nella applicazione clinica delle conoscenze raggiunte nell'ambito della ingegneria tissutale di organi parenchimali. Come già evidenziato, il primo ostacolo nel *tissue engineering* è mantenere la vitalità cellulare: neocostrutti di tessuto, una volta impiantati nell'organismo ospite, consumeranno entro poche ore le proprie scorte di ossigeno e nutrienti, mentre il processo di angiogenesi richiederà alcuni giorni prima di poter provvedere alle esigenze metaboliche del nuovo impianto.

Gli *insights* ottenuti fino ad ora suggeriscono che l'effetto di induzione nei confronti di una coltura cellulare, da parte di un bioreattore, sia in grado di determinare un importante stimolo proliferativo; tuttavia la riproduzione della complessità dell'ambiente naturale, *in vivo*, rimane tuttora di difficile riproduzione.

Il disegno di questo progetto, ancora in fase di studio, prevede la realizzazione multifasica di neocostrutti, ovvero a) realizzazione *in vitro* di semine su scaffolds integrati in bioreattori, e, dopo adeguata induzione, b) successivo impianto *in vivo* in compartimenti anatomici ove lo scaffold possa integrarsi come neo-tessuto e dare definitivamente avvio a processi fisiologici di neoangiogenesi. In questo caso infatti la fase di coltura *in vitro* permette di ottenere un importante effetto di *preconditioning*, ovvero di stabilizzazione ed induzione della coltura 3D con particolare riferimento all'*attachment* ed alla disposizione spaziale, oltreché alla vitalità cellulare, induzione proliferativa etc.

Il presente progetto, ancora in fase di sperimentazione e con svariati punti nodali ancora da implementare, prevede l'applicazione pratica di tale concetto.

In questo caso abbiamo voluto utilizzare il modello di bioreattore precedentemente progettato, particolarmente efficace nella induzione di colture 3D; essendo il processo di neoangiogenesi uno degli end-points principali di questa parte del progetto, oltreché il mantenimento di una coltura epatocitaria, abbiamo inoltre selezionato popolazioni cellulari e biomateriali di nuova generazione, adatti allo scopo.

In questo caso sono stati utilizzati scaffolds costituiti da materiale HYAFF®; lo HYAFF® è un estere dell'acido ialuronico, ottenuto mediante un processo di esterificazione del gruppo carbossilico dell'acido glucuronico con alcol benzilico. Il processo di esterificazione riduce l'idrofilia della molecola e trasforma l'acido ialuronico in una molecola meno solubile in acqua. Sfruttando questa differenza di solubilità, è possibile produrre dei dispositivi costituiti da puro acido ialuronico in diverse forme "solide"; nel nostro caso abbiamo utilizzato delle spugne.¹

L'acido ialuronico ha anche un ruolo definito nel controllo del processo angiogenetico. E' stato dimostrato che l'acido ialuronico ad alto peso molecolare ha una attività inibitoria sull'angiogenesi.² D'altra parte, gli oligosaccaridi dell'acido ialuronico a basso peso molecolare hanno dimostrato un notevole effetto angiogenetico in una serie di modelli sperimentali.^{3,4} Gli stessi oligosaccaridi si legano al CD44 presente sui macrofagi e stimolano l'espressione di diversi peptidi infiammatori, come TNF- α e IL-1b. Questi inducono una maggiore espressione del recettore ICAM-1 e predispongono ulteriormente le cellule allo stimolo da parte degli oligosaccaridi dell'acido ialuronico.

La scelta della popolazione è stata dettata dalla esigenza di avere a disposizione cellule altamente duttili e potenzialmente in grado di sostenere e rispondere ad uno stimolo angiogenetico; pertanto, la scelta si è rivolta all'uso, insieme ad epatociti primari, di cellule staminali mesenchimali.¹

Dopo *preconditioning* in bioreattore dello scaffold 3D, con diverse condizioni di semina, si è proceduto all'impianto dello stesso nell'omento dell'animale, allestendo una tasca nella quale è stato inserito. Questa fase dello studio ha permesso, da una parte, di garantire al sistema un apporto vascolare omentale (come noto il tessuto omentale è particolarmente vascolarizzato), dall'altra offrire un supporto ottimale e fisiologico per favorire il processo neoangiogenetico. L'endpoint primario è stato quello di testare il ruolo delle MSCs nei meccanismi di neovascolarizzazione dello scaffold, verificando le loro effettive potenzialità.

5.2 MATERIALI E METODI

5.2.1 Disegno dello studio

Lo studio prevede il confronto tra i seguenti gruppi:

Gruppo di studio

- 12 scaffolds: semina di colture miste di epatociti e hMSCs (ratio 1:1);

Gruppo di controllo

- 12 scaffolds: semina con soli epatociti primari;

Dopo preconditioning nel bioreattore e successivo impianto nell'animale, si vuole verificare a) l'effetto pro-angiogenetico delle MSCs b) vantaggio in termini di proliferazione e vitalità epatocitaria della coltura mista vs coltura pura.

5.2.2 Animali

Gli esperimenti di impianto dello scaffolds sono stati realizzati con:

- 24 ratti atimici (RNU rat) di sesso maschile, del peso compreso tra 200 e 350 mg, suddivisi in due gruppi di studio. Tutti gli animali sono giunti dai laboratori Charles River (Willington, MA – USA) e sono stati stabulati presso il Dipartimento di Chimica Biologica della Università di Padova, secondo le modalità previste dalla normativa italiana per la cura degli animali da laboratorio. I ratti sono stati stabulati in condizioni standard, con adeguata temperatura e ciclo luce-buio, cibo ed acqua *ad libitum*.

5.2.3 Allestimento e preparazione delle cellule

Gli scaffolds sono stati inizialmente seminati nel bioreattore per la fase di *preconditioning*, utilizzando due diverse popolazioni cellulari, epatociti primari di ratto e cellule staminali mesenchimali umane (hMSCs) da tessuto adiposo in diverse condizioni di semina.

Epatociti

Gli epatociti primari sono stati isolati utilizzando la modalità di perfusione epatica *in situ* a 2 steps successivi secondo protocollo precedentemente descritto da Seglen et Al.⁷ La vitalità cellulare degli epatociti, determinata attraverso il test colorimetrico Trypan blue, ha dimostrato un valore medio > 95%.

Cellule staminali mesenchimali (HMSCs)

Le HMSCs sono state messe a disposizione dal laboratorio di Istologia ed Embriologia della Università di Padova, conservate in *criovials* a -80° secondo protocollo standard. Tale popolazione è stata originariamente isolata da tessuto adiposo viscerale ottenuto da pazienti soggetti ad intervento elettivo di chirurgia. È stato richiesto il consenso informato ad ogni soggetto secondo la Dichiarazione di Helsinki.

La massa adiposa prelevata dal paziente è stata grossolanamente selezionata e suddivisa in contenitori sterili contenenti terreno DMEM. I frammenti di tessuto ottenuti sono stati raccolti in falcon sterili da 50 ml contenuti il terreno DMEM (Gibco Invitrogen cell culture, Milano, Italia) e collagenasi di tipo II (1 mg/ml, Sigma-Aldrich, Mo, USA) e messe ad incubare in un bagno termostato a 37° gradi per 1 ora. Dopo la digestione, la sospensione ottenuta è stata sottoposta a centrifugazioni seriate al fine di isolare la popolazione cellulare di nostro interesse. Nello specifico la sospensione è stata dapprima centrifugata a 350 g per 8 minuti ed il pellet ottenuto è stato risospeso in un tampone di lisi per globuli rossi e quindi filtrato. Per completare il procedimento di isolamento della HMSCs, si è proceduto con una nuova centrifugazione a 350g per 8 min. Il pellet ottenuto contenente le cellule vasculo stromali è stato risospeso in terreno di coltura DMEM/F12 (Gibco invitrogen cell culture, Milano, Italy) con FBS al 10% (Tab. 5.1). Dopo essere state contante, le cellule sono state seminate in piastre da 24 pozzetti (CellStar, Greiner Bio-One International AG, Kremsmmuenster, Austria) alla concentrazione di $\sim 0.7 \times 10^6$ cellule per pozzetto.

Tab. 3A: DMEM/F12		
Per litro:		
DMEM/F12 (Gibco invitrogen cell culture, Milano, Italy)	1	l
FBS (Gibco invitrogen cell culture, Milano, Italy)	10	%
Biotina (Gibco invitrogen cell culture, Milano, Italy)	33	μmol
Streptomicina (Gibco invitrogen cell culture, Milano, Italy)	0,15	U
Penicillina (Gibco invitrogen cell culture, Milano, Italy)	0,2	U
Glutammina (Gibco invitrogen cell culture, Milano, Italy)	2	mmol
Hepes (Gibco invitrogen cell culture, Milano, Italy)	1	mmol

Tabella 5.1 Medium cellule MSCs

Prima della semina nel bioreattore, entrambe le popolazioni cellulari sono state sospese in soluzione UW (Ringer Lattato 500 ml, 25% mannitolo 50 ml, ed eparina 1 unità/mL) a densità di 3×10^6 /ml e conservate in ghiaccio fino al momento dell'impianto nello scaffold.

5.2.4 Preconditioning nel bioreattore

Le cellule così ottenute, epatociti primari e MSCs (tra il 3° e 8° passaggio su piastra) sono state staccate dalla flasca di coltura con tripsina, sottoposte a lavaggio con EDTA, e successivamente contate; una sospensione cellulare in 1,5ml di DMEM con 6×10^5 cellule è stata seminata su spugna di HYAFF® (Fidia Farmaceutici s.p.a., Padova, Italia) delle dimensioni di circa 1x1x0.5cm. Sono state realizzate due diverse combinazioni di semina [epatociti+MSCs (ratio 1:1) ed epatociti], come schematizzato in Tab.5.2

Fino a 24 spugne sono state allestite per ciascun esperimento. Il giorno seguente alla semina, ciascuna delle spugne è stata posta in una singola camera nel bioreattore, ed è stata mantenuta una perfusione di medium controllata con flusso di 0.5 mL/min attraverso ciascun scaffold per 4 gg.¹¹

Bioreattore		
<i>Scaffold (HYAFF)</i>		
Cellule	Epatociti+MSCs	Epatociti

Tabella 5.2 Diverse condizioni di coltura

Gli scaffolds così allestiti sono stati dunque sottoposti a *preconditioning* nel bioreattore a perfusione dinamica continua per 4 giorni. Successivamente ciascun scaffold è stato sottoposto ad impianto nell'animale.

5.2.5 Procedura chirurgica

Gli animali sono stati anestetizzati con inalazione di isoflurano (miscela di 30% v / v isoflurano in glicole propilenico). L'incisione chirurgica è stata realizzata con laparotomia mediana, isolamento della struttura omentale e allestimento di una tasca

omentale, all'interno della quale è stato impiantato lo scaffold – precedentemente avvolto su sé stesso (wrapped) (Fig. 5.1)

Successiva sintesi della parete addominale e risveglio dell'animale.

L'end-point dello studio è stato settato a 7gg dopo l'impianto cellulare, seguito quindi dal sacrificio degli animali con iniezione intracardiaca di soluzione letale, 0.1 ml Fatal-Plus (Pentobarbitol, Vortech Pharmaceuticals, Dearborn, Michigan) ed espianto dello scaffold.

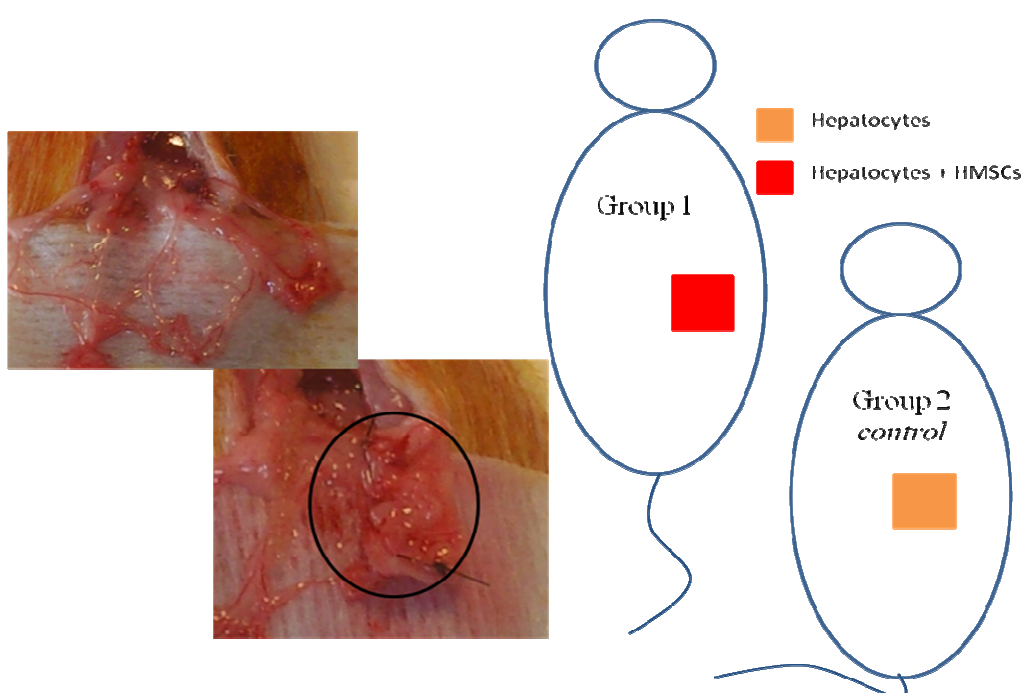


Fig. 5.1 Impianto dello scaffold dopo preconditioning. Scaffold “wrapped”(circolo nero)

5.2.6 Analisi morfologiche, vitalità e proliferazione

Dopo adeguata preparazione dello scaffold espantato, si è proceduto alla preparazione di sezioni dello stesso per la esecuzione degli studi morfologici. Dunque i campioni sono stati dapprima sottoposti ad una prima fissazione in soluzioni per analisi istologiche e immunistochemiche e successivamente lavati con soluzione PBS (0.02% NaN₃) e mantenuti a 4°C fino al momento della colorazione finale.

Ciascun campione è stato dunque sottoposto a disidratazione con etanolo (70–99.5%), e successivamente paraffinato. Dai vari scaffolds sono state ottenute al microtomo sezioni di 5 µm di spessore, per le successive colorazioni.

- *Studi istologici*

sono state eseguite colorazioni standard con ematossilina ed eosina (EE) per valutare il grado di infiltrazione e distribuzione cellulare e colorazione di Weigert per la determinazione della elastina e la infiltrazione delle cellule dell'ospite.

- *Studi di immunofluorescenza*

sono stati utilizzati diversi saggi di immunofluorescenza per la colorazione di: albumina (rabbit anti-albumin, DAKO, Carpinteria, CA), Collagene tipo III (rabbit anti-collagen III, Sigma, Milano, Itali), fattore di von Willebrand (anti-vWF, Dako, Carpinteria,CA, USA), VEGF (rabbit anti-FLK1, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz,CA, USA), CD 133 (mouse anti-CD133, GeneTex, Irvine, CA, USA) e per la proliferazione cellulare PCNA (mouse anti-PCNA Dako, Carpinteria,CA, USA).

I controlli negativi sono stati realizzati utilizzando siero con soluzione buffer senza soluzione con anticorpo primario. La immuno-reazione è stata rilevata con il substrato fast red (Sigma-Aldrich Corp, St. Louis, MO, USA) e colorata con ematossilina (Sigma).

Test MTT

La percentuale di proliferazione cellulare è stata determinate attraverso il test MTT [(3-4,5-dimethylthiazol-2yl-2,5-diphenyltetrazoliumbromide)-based cytotoxicity test], second il protocollo di Denizot e Lang con lievi variazioni.¹⁴ Le colture cellulare in 3D, rimosse dal bioreattore, sono state poste su una piastra di coltura con l'aggiunta di 1mL di soluzione MTT (0.8mg/mL in buffer-fosfato di soluzione salina). Le colture sono dunque state incubate ed il surnatante eliminato dopo 3h. Ciascun scaffold è stato dunque trasferito in microtubi Eppendorf, ed è stato aggiunto 1mL di soluzione di estrazione (0.01N di HCl in isopropanolo). Il microtubo Eppendorf è stato dunque agitato per 5min in modo da favorire il rilascio completo di pigmento dallo scaffold e centrifugato a 15,000 g per 5 min; la densità del supernatante è stata letta a 540 nm.

Numero cellulare

La conta cellulare del bireattore è stata realizzata attraverso l'uso di assays per la quantificazione del DNA. Le cellule sono state dapprima lisate *in situ* e

successivamente processate con il kit DNeasy (Qiagen, Alameda, CA) in accordo con le istruzioni del fornitore. L'aliquota del DNA isolato è stato quantificato con analisi spettrofotometrica a 260 nm.

Il numero cellulare è stato ottenuto dalla determinazione di una curva standard ($\mu\text{gr.DNA}$ vs numero cellulare) ottenuta dalla estrazione di DNA da una popolazione nota.

5.2.7 Analisi Statistica

I valori statistici sono stati espressi con media e deviazione standard. La analisi dei dati è stata formulata con il test di varianza oneway di Excel software package. La significatività statistica è assunta per valori $p < 0.05$.

5.3 RISULTATI

5.3.1 Analisi morfologiche

La Figura 5.1 mostra le caratteristiche morfologiche della coltura mista (gruppo di studio) dopo espianto dall'animale. In queste condizioni, lo scaffold presenta, al suo interno, la formazione di strutture a carattere *vessel-like* già visibili alla colorazione standard in EE. I processi di neoangiogenesi sono stati peraltro confermati e sostenuti dai saggi di immunofluorescenza per il fattore di vWF, presente ai capi della parete endoteliali dei nuovi vasi (Fig. 5.2), e dal collagene di tipo III (Fig. 5.3), che si presenta circonferenzialmente ed omogeneamente distribuito intorno agli stessi. La ricerca per il CD133, caratteristico marcatore di staminalità presenta, infine, una distribuzione omogenea ma particolarmente concentrata intorno a queste nuove strutture "vascolari".

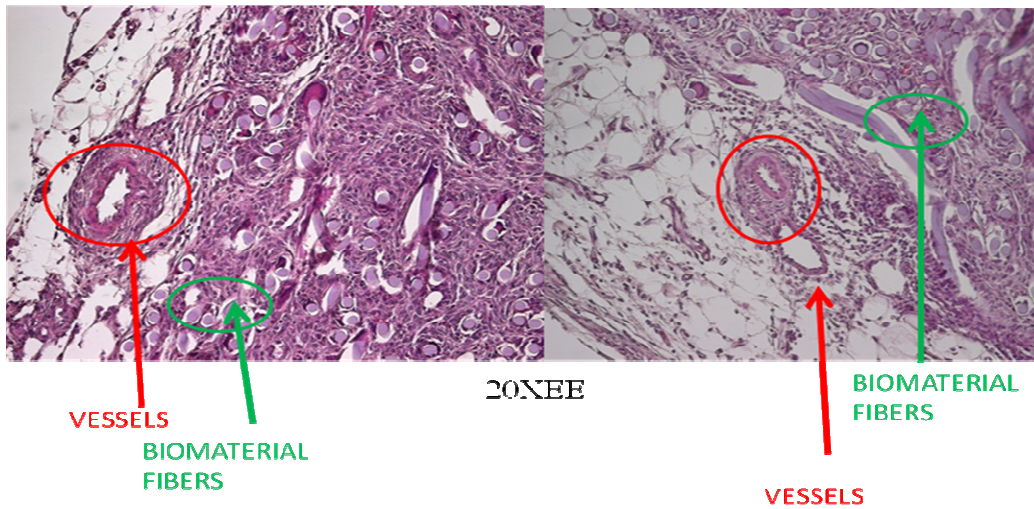


Fig. 5.1. Analisi morfologiche delle cellule nello scaffold 3D dopo espianto dall'animale; le cellule sono colorate con colorazione standard EE. Frecche rosse: strutture vessel-like; frecche verdi: fibre scaffold. Ingrandimento 20X

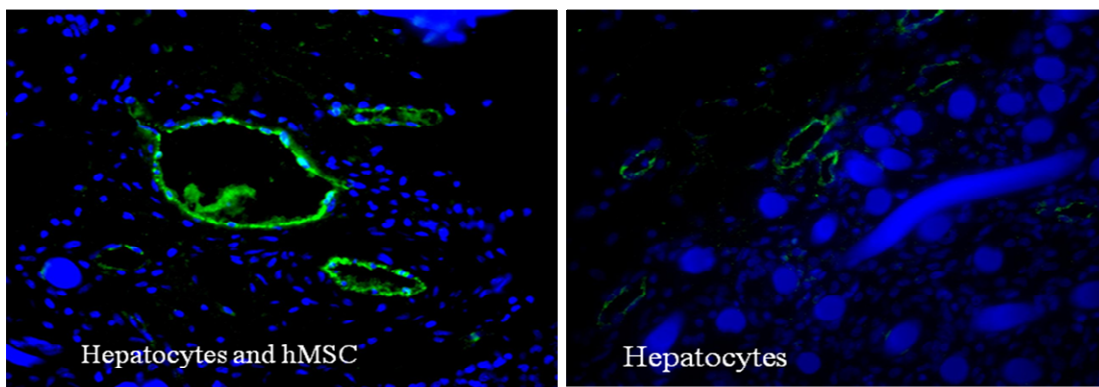


Fig. 5.2. Analisi morfologiche delle cellule nello scaffold 3D dopo espianto dall'animale; le cellule sono state sottoposte ad immunofluorescenza per vWF; distribuzione del fluoro cromo lungo il polo endoteliale dei vasi, che risultano meglio definiti nel caso di coltura mista (epatociti+hMSCs vs epatociti)

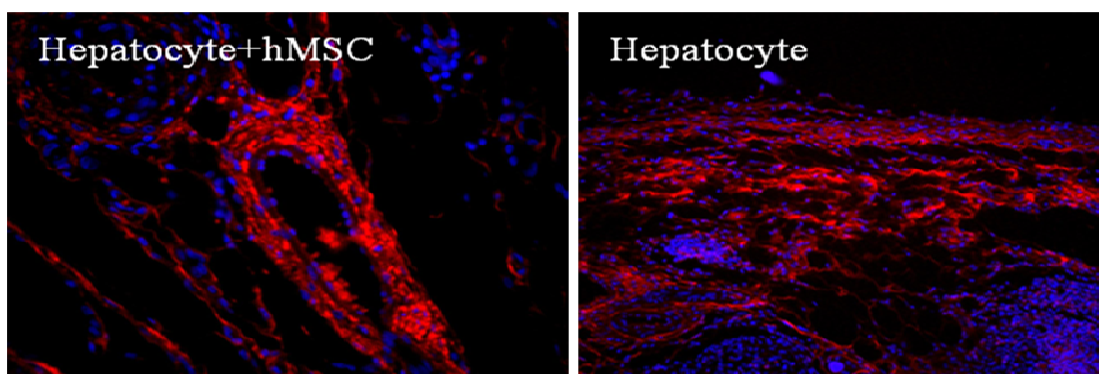


Fig. 5.2. Analisi morfologiche delle cellule nello scaffold 3D dopo espianto dall'animale; le cellule sono state sottoposte ad immunofluorescenza per collagene di tipo III; distribuzione del fluorocromo intorno ai vasi risulta essere molto più evidente nel caso di coltura mista (epatociti+hMSCs vs epatociti)

Il fenotipo delle cellule epatiche è conservato, senza franche differenze tra i due gruppi, anche se la espressione di albumina risulta essere lievemente superiore nella coltura mista (p NS), ma non in maniera significativamente differente. Le cellule di presentano variamente distribuite lungo lo spessore dello scaffold ed alcuni clusters, insediati all'interno della spugna (clusters rossi), mostrano layers sovrapposti all'interno dei pori. Il fenotipo morfologico differenziato si presenta con forma "esagonale".

5.3.2 Analisi di proliferazione

Le cellule seminate sullo scaffold sono state mantenute *in vivo* fino a 7 giorni dopo l'impianto.

I parametri biologici sono stati analizzati pertanto al solo giorno 7, dopo espianto della spugna dall'animale sacrificato. Il grado di proliferazione (come da test MTT) ha dimostrato come le cellule siano sopravvissute fino al giorno 7 in tutte le condizioni di coltura, a conferma della validità sia del sistema di perfusione sia della modalità di impianto nell'animale. Una analisi più dettagliata ha evidenziato che non vi sono stati incrementi significative della proliferazione durante il periodo di coltura nel gruppo di controllo (epatociti); viceversa, i maggiori valori in termini di proliferazione cellulare sono stati ottenuti quando HMSC ed epatociti sono stati coltivate in co-coltura..

BIBLIOGRAFIA

1. Pasquinelli G, Orrico C, Foroni L, Bonafè F, Carboni M, Guarnieri C, Raimondo S, Penna C, Geuna S, Pagliaro P, Freyrie A, Stella A, Caldarera CM, Muscari C “Mesenchymal stem cell interaction with a non-woven hyaluronan-based scaffold suitable for tissue repair” *J Anat.* 2008 Nov;213(5):520-30;
2. Vindigni V, Cortivo R, Iacobellis L, Abatangelo G, Zavan B. Hyaluronan benzyl ester as a scaffold for tissue engineering. *Int J Mol Sci.* 2009 Jul 3;10(7):2972-85.
3. Pandis L, Zavan B, Abatangelo G, Lepidi S, Cortivo R, Vindigni V Hyaluronan-based scaffold for in vivo regeneration of the rat vena cava:Preliminary results in an animal model. *J Biomed Mater Res A.* 2010;93(4):1289-96;
4. Pasquinelli G, Vinci MC, Gamberini C, Orrico C, Foroni L, Guarnieri C, Parenti A, Gargiulo M, Ledda F, Caldarera CM, Muscari C. Architectural organization and functional features of early endothelial progenitor cells cultured in a hyaluronan-based polymer scaffold. *Tissue Eng Part A.* 2009 Sep;15(9):2751-62;
5. Cristino S, Grassi F, Toneguzzi S, Piacentini A, Grigolo B, Santi S, Riccio M, Tognana E, Facchini A, Lisignoli G. Analysis of mesenchymal stem cells grown on a three-dimensional HYAFF 11-based prototype ligament scaffold. *J Biomed Mater Res A.* 2005 Jun 1;73(3):275-83;
6. Turner NJ, Kielty CM, Walker MG, Canfield AE. A novel hyaluronan-based biomaterial (Hyaff-11) as a scaffold for endothelial cells in tissue engineered vascular grafts. *Biomaterials.* 2004 Dec;25(28):5955-64;
7. Seglen PO “Preparation of isolated rat liver cells” *Methods Cell Biol* 1976;13:29-83;

DISCUSSIONE

Uno dei maggiori problemi nella ricostruzione del tessuto di organi parenchimali è correlato alla costituzione di un adeguato supporto vascolare per la diffusione dei nutrienti. Normalmente negli interspazi di tessuto ben vascolarizzato, tra arteriole e vene, si diparte infatti una fitta rete capillare la cui sezione ha una densità di 1300/capillari per mm^2 e la distanza intercapillare è di circa 34 μm . Questa distanza è ben inferiore alla massima distanza di diffusione di ossigeno, glucosio, anidride carbonica e altri prodotti di scarto; fisiologicamente, dunque, arteriole e venule viaggiano appaiate formando un efficiente sistema “contro-corrente”.¹

Riuscire a garantire questo apporto e superare il problema di una adeguata vascolarizzazione, significa anche avere realisticamente maggiori possibilità nella ricostituzione di neocostrutti 3D, aspetto ancora fortemente limitato non solo dalla mancanza di adeguati network vascolari, ma anche dalla scarsa capacità dei biomateriali di costituire un adeguato supporto di crescita, proliferazione e differenziazione cellulare. Per questo motivo, nonostante la disponibilità in commercio di scaffolds ad alta porosità, al momento attuale i risultati sono ancora circoscritti a neostrutture sottili, raggiungendo spessori dell'ordine dei pochi millimetri; questo limite è tanto maggiore, nella fattispecie, per tessuti ad elevata attività metabolica ed altamente sensibili a condizioni ipossiche, come ad esempio il fegato.²

Molti approcci di ricostruzione di tessuto epatico *in vivo* sono dipesi dai tentativi di favorire inizialmente processi di neo-angiogenesi da parte dell'ospite, per facilitarne il successivo *engraftment* cellulare; anche in questo caso, tuttavia, il processo di angiogenesi non è immediato (circa 3-5 giorni), e nel frattempo molte delle cellule che si trovano all'interno dei supporti, soprattutto ai limiti spaziali del processo di diffusione, vengono perse.³

La possibilità invece di favorire una perfusione vascolare attraverso un supporto dotato di network vascolare predeterminato, rappresenta una soluzione razionale per mantenere inizialmente vitali gli elementi cellulari e favorirne la crescita per un successivo impianto nell'ospite.

Sulla scorta di queste iniziali osservazioni è nata la prima fase del progetto, descritta nel capitolo 2; inizialmente è stata rivolta attenzione agli aspetti progettuali e sperimentali che contraddistinguono il carattere bio-ingegneristico tipico delle tecniche di *Tissue*

Engineering, ritenendo opportuno ottimizzare innanzi tutto le modalità di perfusione *in vitro* di una coltura cellulare.

Attraverso l'uso della tecnologia MEMS, si è fabbricato un nuovo bioreattore composto da PDMS e caratterizzato da un network vascolare intrinseco, in grado di riproporre le caratteristiche vascolari fisiologiche di un sistema artero-venoso con un letto capillare intrinseco.

L'*endpoint* primario, in questo caso, è stato quello di costituire un *environment* vascolare più fisiologico rispetto alle consuete condizioni di coltura *standard*, al fine di implementare la vitalità cellulare, mantenendone le caratteristiche e le intrinseche funzioni metaboliche.

Tra i dati peculiari, a differenza delle altre piattaforme basate sulla costituzione di network microfluidici, gli epatociti in questo bioreattore non sono stati direttamente esposti al flusso e dunque non sono stati sottoposti ad eccessivi valori di *shear stress*, che risultano nocivi per valori >0.33 dynes/cm²; nel nostro caso dunque la membrana semipermeabile rappresenta innanzi tutto un sistema di protezione ad insulti meccanici, che hanno raggiunto valori addirittura maggiori rispetto al limite massimo.⁴

Nella camera parenchimale, tuttavia, la membrana semipermeabile non ricopre soltanto un ruolo protettivo ma anche di supporto alla crescita cellulare, determinando peraltro i meccanismi di convezione e di diffusione delle sostanze dalla soluzione di perfusione adiacente, in risposta alle esigenze metaboliche della coltura. Sotto questo profilo, quindi, la membrana simula anatomicamente l'endotelio sinusoidale, favorendo il normale scambio cosiddetto *two-way* di O₂, metaboliti e proteine epato-specifiche. L'*attachment* a tale supporto è stato implementato da un *coating* di collagene che, pur nella sua semplicità, si è dimostrato adeguato a garantire un discreto supporto simulando la EMC, da una parte, e lo spazio di Disse, dall'altra.

Questo *setting* si è dimostrato in grado di promuovere il processo di orientamento spaziale degli epatociti lungo la superficie di *attachment*, favorendo inizialmente la formazione di un dominio basolaterale orientato verso il network vascolare; tale configurazione ha pertanto indotto, a sua volta, i naturali processi di polarizzazione cellulare, configurando un polo di *up-take* dei soluti e un polo di escrezione dei "metaboliti plasmatici". Sotto questo profilo, l'eluato di perfusione del bioreattore rappresenta, pertanto, il secreto di rilascio di proteine di sintesi epatica, come albumina; d'altra parte, il progressivo accumulo di prodotti catabolici di scarto è stato eluso dal flusso continuo del medium attraverso il sistema.

Dunque, seppur nelle due dimensioni, la realizzazione di un bioreattore bilayer così costituito, ha permesso innanzi tutto di garantire un supporto *long-term* a popolazioni cellulari ad alto metabolismo, ma anche di acquisire nuovi *insights* sulle ottimizzazioni di coltura di tali popolazioni cellulari. Gli epatociti, in questo caso, hanno dimostrato non solo capacità proliferativa fino a confluenza della semina ma hanno anche mantenuto una elevata capacità metabolica ed, in particolare, di sintesi.

Per quanto riguarda l'aspetto dei materiali, la scelta di realizzare bioreattori in PDMS, un biopolimero idrofobico, non solubile a solventi polari, relativamente inerte e non tossico, è stata fondamentale dettata dalle peculiarità fisiche dello stesso; il PDMS infatti è otticamente trasparente allo spettro UV, favorendo dunque la esecuzione degli assays morfologici previsti nello studio.⁵ Consapevoli infatti della sua relativa inefficienza per la coltura di epatociti (la percentuale di attachment cellulare è sostanzialmente assente), il PDMS ha tuttavia permesso di realizzare tutti gli studi morfologici previsti e di essere sottoposto alle analisi microscopiche, al fine di testare adeguatamente il modello realizzato. Sotto questo profilo il contributo di questa fase del progetto è stato determinante, ponendosi dunque nel punto dove tecniche e *problem solving* incontrano gli approcci caratteristici delle scienze biologiche.

Pertanto, affinati gli aspetti più prettamente legati al design ed alla fabbricazione, il bioreattore precedentemente descritto e utilizzato per gli esperimenti *in vitro* è stato impiegato per traslare la fase sperimentale nel modello *in vivo*, in questo caso nel roditore (ratto). Particolare attenzione è stata dedicata, anche in questo caso, agli studi di fattibilità, al dimensionamento delle varie parti e all'integrazione tra teoria e pratica.

Il bioreattore è stato ottenuto sempre adottando le metodiche *biotech* MEMS (Micro-Electro-Mechanical Systems (MEMS)), come già descritto precedentemente; anche in questo caso si distinguono una camera ("chamber") micro-vascolare preformata, che mantiene vitale una coltura cellulare adiacente, a sua volta in una camera cosiddetta "parenchimale".

In questo caso tuttavia il sistema è stato connesso *ex-vivo* al piccolo animale attraverso la realizzazione di una fistola artero-venosa femoro-femorale e, pertanto, sottoposto ad una perfusione ematica. Questo ha reso necessario l'adattamento del design del micro-pattern vascolare ad una soluzione di perfusione caratterizzata da parametri reologici (ematocrito, viscosità, volumi etc.) completamente diversi rispetto al medium di coltura. In questa seconda parte del progetto (Capitolo 3), dunque, siamo intervenuti soprattutto su due aspetti per migliorare la struttura e la funzione del prodotto finale:

- analisi e studio del design del bioreattore in condizioni *in vivo*, con flusso ematico all'interno della camera vascolare;

- ottimizzazione delle condizioni favorevoli la vitalità della coltura cellulare nella camera parenchimale con particolare riferimento agli studi di pressione;

Il razionale da cui siamo partiti è legato al fatto che non si può prescindere dal fatto che le condizioni di coltura *in vivo* siano completamente diverse dalle condizioni di coltura *in vitro*, normalmente sistematizzate ed ordinate da precisi schemi.

Il fine ultimo è stato quello di realizzare e testare un bioreattore epatico definitivamente impiantabile per il mantenimento di una coltura cellulare metabolicamente vitale.

I risultati hanno confermato una ottimale perfusione ematica del bioreattore, come avviene fisiologicamente nel tessuto epatico, una volta impiantato *ex-vivo*; inoltre, gli epatociti hanno dimostrato di essere in condizioni favorevoli per sopravvivere e mantenere le loro funzioni vitali per tutto il periodo di svolgimento dello studio.

Il device si è mantenuto pervio dopo impianto grazie al mantenimento dell'animale in anestesia generale, condizione che ha evitato movimenti inconsulti e favorito il monitoraggio continuo del sistema. Ciò ha ovviamente permesso di ottimizzare le condizioni sperimentali del lavoro, favorendo il processo di testing e di validazione. Riduci infatti da precedenti tentativi di impianto dello scaffold *in vivo*, nel sottocute dell'animale, si è preferito il mantenimento di un setting *ex vivo*, che ha evitato deformazioni ed alterazioni del bioreattore ed, soprattutto, ha reso possibile l'osservazione dello stato del sistema *de visu* durante tutto il periodo sperimentale.

L'osservazione e lo studio perfusorio del compartimento vascolare ha innanzi tutto evidenziato che la perfusione ematica determina formazione e depositi di fibrina nel sistema; essa si forma immediatamente dopo la connessione dei tubi ed è verosimilmente correlata al contatto diretto del sangue con il PDMS o con la membrana PES, questo a dimostrazione del fatto che il biomateriale utilizzato non è l'ideale. Tuttavia anche in questo caso la necessità di poter verificare l'assetto del design e delle caratteristiche ingegneristiche dei layers, grazie alla trasparenza ottica del materiale, hanno superato inizialmente le altre esigenze di coltura.

A 2-4 ore dalla perfusione della camera parenchimale, il deposito di fibrina tuttavia non è più evidente e tutti i bioreattori si sono mantenuti pervi e ben perfusi fino al completamento dello studio. Questo fenomeno può essere correlato ad un effetto inibitorio pro-coagulante della fibrina: si è supposto che l'iniziale deposito di un film di fibrina (effetto *pre-clotting*) sulla superficie del sistema possa avere paradossalmente un

effetto inibitorio, ovvero limitare ulteriori depositi di materiale, evitando la formazione di trombi occludenti.⁶ Rimane evidente, tuttavia, la necessità di implementare le caratteristiche di biocompatibilità dei materiali.

Peraltro, la pervietà del sistema è da attribuirsi anche al modello computazionale su cui si è basato il design del network vascolare: tenendo conto dei parametri di reologia, si è rivolta una particolare attenzione a limitare le aree di flusso turbolento ed i traumi meccanici degli elementi corpuscolati, fenomeni che hanno di per sé effetti trombogeni. D'altra parte i sistemi di eparinizzazione sistemica oltreché locale, hanno ulteriormente partecipato alla profilassi del sistema, senza inficiare significativamente – almeno nelle 24h di studio– la morbilità dell'animale.

Per quanto concerne i dati riguardanti l'aspetto propriamente flussimetrico, dobbiamo ricordare che normalmente l'arteria epatica origina dal tronco celiaco e presenta una pressione pulsatile compresa tra 120 e 80 mmHg. La pressione diminuisce progressivamente con le arborizzazioni vascolari all'interno del fegato. A livello sinusoidale l'amplitude della pulsazione scende virtualmente a zero e la pressione cade a 2-5 mmHg. La pressione differenziale dalla vena centrolobulare alla vena cava è dunque di 1-3 mmHg, con modeste variazioni legate all'atto respiratorio.

Il bioreattore proposto ripropone in maniera sostanzialmente speculare il pattern perfusorio fisiologico; come dimostrato dal laser doppler scanning in Fig. 3.3, l'elevata amplitude del pattern pulsatile presente nell'inlet arterioso, scende fino quasi a zero nel compartimento capillare con bassi livelli nell'area di outlet venoso. La pressione differenziale artero-venosa non sembra essere invece sufficiente (da 93 a 11.3 mmHg, Tabella 3.1) rispetto alle condizioni pre-impianto, e i valori pressori in camera parenchimale sono pari a 20 mmHg, molto maggiori rispetto alla pressione venosa (20 vs 11.3 mmHg); tale dato, rilevato in più registrazioni, è stato attribuito all'alta porosità della membrana utilizzata tra i due compartimenti. Di fatto, abbiamo osservato che tali standard pressori sono, da una parte, sufficienti per evitare di creare un quadro di shock cardiaco da shunting artero-venoso nell'animale, dall'altra, non ancora ottimali per la vitalità epatocitaria (formazione di una eccessiva pressione parenchimale).

Normalmente infatti gli epatociti sono perfusi dai sinusoidi ad una pressione di 2-5 mmHg; pressioni elevate possono ridurre la vitalità cellulare ed inficiare la loro funzione, così come avviene normalmente in caso di ipertensione portale.⁷ I test effettuati hanno dimostrato che la maggior parte degli epatociti muore a pressioni parenchimali pari a 20 mmHg, raggiunte – nel nostro caso - con tubi parenchimali

chiusi. Quando invece i tubi parenchimali sono lasciati aperti (Fig. 3.1), la pressione all'interno della camera parenchimale si avvicina allo zero, e gli epatociti mostrano una aumentata vitalità con funzionalità conservata. In questo caso, tuttavia, il rischio che l'animale muoia per shock ipovolemico da eccessiva perdita di fluidi è consistente. Abbiamo pertanto contenuto questo rischio connettendo i tubi parenchimali alla vena femorale controlaterale o, in alternativa, realizzando uno scarico omolaterale con tubo ad Y (Fig. 3.1); questo ha evitato una eccessiva perdita di fluidi. Peraltro, quando i tubi parenchimali vengono connessi all'altra vena femorale, la pressione parenchimale giunge a circa 6 mmHg, con vitalità epatocitaria ancora conservata, ma nella condizione in cui si raggiungano valori lievemente superiori, ad esempio 11mmHg (ovvero con connessione ad un tubo a Y), la vitalità e la funzione cellulare mostrano già una significativa riduzione (Fig. 3.4).

Gli epatociti, sia come linee primarie o linee cellulari, hanno rilevato pertanto vitalità variabili nelle 24 ore, sulla scorta delle diverse condizioni di coltura. Gli epatociti primari di ratto dopo semina e perfusione per 24 ore, hanno dimostrato un buon *attachment* con una morfologia di maturazione tipica degli epatociti, ovvero cuboide e multinucleata, senza eventi di trans-differenziazione (Fig. 3.4). Aggregati cellulari hanno costituito isole con clusters ove è possibile riconoscere, in microscopia elettronica, elementi tipici di polarizzazione cellulare, come tight junctions, microvilli o strutture canalicolari di tipo biliare. La capacità di sintesi del costrutto, come l'espressione di albumina, è stata dimostrata attraverso dosaggio ematico e studi di immunofluorescenza. Tali risultati hanno indicato che gli epatociti primari non solo sopravvivono nel bioreattore ma sono anche in grado di mantenere il loro fenotipo funzionale.

Al fine di eliminare potenziali bias, legati al metabolismo epatico endogeno del ratto, la funzionalità della coltura è stata confermata anche dalla determinazione specie-specifica di α FP umana (sostenuta dalla popolazione tumorale umana HepG2/C3A) rispettivamente nel sangue e nell'eluato del sistema; la sintesi si è mantenuta costante nel tempo sino al completamento dello studio (24^h). Non essendo possibile una produzione endogena da parte dell'animale, la presenza di α FP nei campioni ematici dopo 24 ore dalla semina ha confermato una costante attività metabolica degli epatociti seminati.⁸

In letteratura non sono emersi dati riguardanti i tempi di emivita della α FP nel ratto; si ipotizza tuttavia che, avendo essa una struttura molecolare sovrapponibile a quella della

albumina, possa avere una emivita simile, ovvero 3.5-5.2 ore (Fig. 3.5).^{9,10} Abbiamo quindi desunto che i livelli di α FP durante lo studio siano dovuti ad una continua produzione e non, piuttosto, ad un effetto “cumulativo” dovuto ad un refuso di iniziale attività epatocitaria; questo assunto è importante poiché conferma il mantenimento della attività epatocitaria. A conferma, nel gruppo di studio 4 (tubi parenchimali chiusi) - dove la maggior parte delle cellule HepG2/C3A sono inizialmente morte - non è stata rilevata alcuna traccia di α FP umana già a distanza di 6 ore dall’impianto.

Possiamo dunque concludere che il bioreattore realizzato è stato in grado di mantenere epatociti funzionalmente attivi per tempi lunghi, anche maggiori rispetto ai comuni BAL o bioreattori perfusi da plasma.⁴ Questa peculiarità risulta particolarmente vantaggiosa, se si considera che, nella eventuale applicazione clinica, il sistema sarebbe in grado di supportare, per uno stesso periodo di tempo (t), il metabolismo epatico di un paziente utilizzando una massa epatocitaria inferiore rispetto a quella richiesta dai sistemi bioartificiali comunemente in uso [(massa epatocitaria vitale $\times t$ (ove t = periodo di assistenza)].

Questo studio tuttavia ha presentato anche alcuni limiti, legati appunto alla quantità di massa cellulare utilizzabile, in questo caso fortemente limitata dal piccolo volume del compartimento parenchimale e dalla ridotta superficie d’area della membrana. Anche se il modello computazionale prevede la potenziale realizzazione del bioreattore su scala maggiore, tuttavia franchi limiti sterici e di implementazione della struttura rendono poco efficace l’applicazione in ambito clinico del device.

Infatti, nonostante risultati suggestivi, i bioreattori realizzati non hanno dato sufficienti garanzie di poter sostenere strutture 3D con risoluzione di massa sufficiente per supportare forme di insufficienza epatica, presentandosi piuttosto come utili piattaforme per *cell & drug-testing*.

D’altra parte, come spesso accade in questo campo, la parte progettuale non può prescindere in modo assoluto dalla parte pratico-realizzativa poiché il trattare problemi nuovi in campo *biotech* pone spesso degli ostacoli che non possono essere previsti, e quindi affrontati nella fase di *design*, ma si presentano nella successiva pratica sperimentale.

Gli approcci di *tissue engineering* affrontati nelle prime fasi del progetto, hanno innanzi tutto permesso la realizzazione e la configurazione di bioreattori polimerici dotati di micropattern vascolari basati sul modello fisiologico.

La realizzazione di questi progetti ha permesso di ottenere informazioni determinanti nell'ambito delle tecniche di ingegnerizzazione e design; nuovi insights sono stati raccolti sia per quanto riguarda i processi di microfabbricazione, da una parte, sia di ottimizzazione delle condizioni dei sistemi di coltura, dall'altra. Fondamentali in particolare sono state le informazioni di carattere fluidodinamico e di tipo pressorio per i successivi steps del progetto.

I risultati ottenuti infatti ci hanno permesso di giungere alla elaborazione della fase successiva del progetto. Per la formazione di reti capillari tridimensionali, tuttavia, non basta solo ingegnerizzare un adeguato pattern vascolare ma bisogna anche ottimizzare il materiale con il quale verrà realizzato lo scaffold di semina nelle 3D, al fine di favorire l'attachment e la distribuzione cellulare. Anche le condizioni di coltura e la popolazione cellulare, svolgono un ruolo importante nel condizionare e determinare la capacità funzionale (e non solo vitale) del risultato finale; è importante dunque mantenere uno sguardo poliedrico, cercando di affrontare con ordine metodologico le diverse prospettive.

E' noto che la specificità strutturale dei tessuti rende difficile la riproduzione in laboratorio di tessuti biologici anche semplici.^{11,12}

Per questo, nella fase successiva del progetto, è stato dapprima realizzato un nuovo bioreattore sulla scorta dei parametri di fluidodinamica, reologici e pressori precedentemente ottenuti; il nuovo setting ha tuttavia previsto alcune ma sostanziali differenze: a) realizzazione spaziale del sistema nelle 3 dimensioni; b) adeguato supporto meccanico mediante l'utilizzo di scaffolds microstrutturati 3D; c) implementazione con fattori di induzione della proliferazione e differenziazione cellulare.¹³

Con tale prerogativa l'ingegnerizzazione del nuovo bioreattore ci ha permesso di focalizzare la nostra attenzione sui processi finalizzati alla ottimizzazione delle colture cellulari. Particolare attenzione è stata dedicata, oltre alla scelta dei materiali, agli studi di fattibilità, al dimensionamento delle varie parti e all'integrazione tra teoria e pratica.

Sotto questo profilo si deve considerare che uno degli elementi fondamentali nella realizzazione di un bioreattore in Tissue Engineering è la disponibilità di cellule ad alta attività metabolica.

Concettualmente l'epatocita maturo non rappresenta la cellula ideale nel paradigma classico del *tissue engineering*: essa dovrebbe soprattutto proliferare senza perdere le sue caratteristiche fenotipiche e funzionali, avere la potenzialità di differenziarsi o trans-

differenziarsi in una varietà di linee cellulari tessuto- od organo-specifiche etc. E' noto, invece, che gli epatociti umani maturi, una volta estratti ed isolati dal campione tissutale, perdono le loro capacità funzionali (metaboliche) e, seppur inizialmente vitali, vengono difficilmente mantenuti in coltura per lunghi periodi.^{14,15}

Anche sulla base di tale considerazione, abbiamo dunque utilizzato cellule staminali (precursori epatocitari) che, come è noto, possiedono un diverso grado di potenzialità e sicuramente si presentano più duttili nella realizzazione di colture long-term, oltreché funzionalmente modulabili. L'utilizzo di cellule staminali non differenziate comporta la conoscenza adeguata e approfondita dei fattori in grado di indurre il differenziamento delle cellule utilizzate.

Herrera et al. hanno recentemente isolato con successo una popolazione adulta di cellule staminali epatiche umane (HLSCs, human liver stem cell).¹⁶ Tali cellule hanno già dimostrato di essere in grado di differenziare parzialmente verso epatociti maturi e di contribuire *in vivo* a stimolare la rigenerazione di fegato in topi immunocompromessi.

Il nuovo bioreattore 3D, a flusso dinamico continuo, è dunque stato sottoposto a diverse condizioni di coltura, finalizzate alla selezione dell'approccio più vantaggioso nei processi di maturazione epatocitarie della cellula HLSC [colture miste con cellule non-parenchimali del fegato (cellule stellate di ITO) e arricchimenti dei media] *in vitro*. (Tab. 4.1)

Anche in questo caso, i risultati ottenuti dal modello matematico di progettazione del nuovo bioreattore, e sulla scorta dei precedenti dati, hanno suggerito una velocità di flusso a 0.5 ml/min, per 7 giorni.

In queste condizioni le cellule HLSCs in presenza di medium HCm, non solo hanno dimostrato un buon indice di proliferazione (Fig. 4.5a, primo istogramma da destra) e una elevata tendenza a costituire clusters cellulari all'interno degli scaffolds in collagene (Fig. 4.4, freccia nera orizzontale), ma anche un adeguato fenotipo morfologico, riproponendo la tipiche morfologie epatocitarie adulte, con positività per marcatori come CK19 (Fig. 4.4, cellule rosse), la presenza di cellule binucleate e la secrezione di albumina (Fig. 4.5b).

Incoraggiati da questi risultati preliminari abbiamo focalizzato la nostra attenzione nel tentativo di implementare il grado di proliferazione e lo status differenziativo della popolazione HLSCs verso epatociti maturi. Sono state utilizzate diverse condizioni di coltura (Tab 4.1); in particolare l'uso di terreni di coltura diversi, tra cui medium commerciale per cellule staminali (SCm), e la realizzazione di colture miste con una

popolazione non-parenchimale di “supporto” (cellule di ITO o stellate); lo stimolo proliferativo dimostrato dalle cellule di ITO si è dimostrato determinante nel supporto della coltura 3D. E’ già noto in letteratura infatti che le cellule non parenchimali epatiche siano in grado di mimare la nicchia compartimentale e la matrice organizzativa embrionale, favorendo in maniera sostanziale i processi maturativi e morfo-architettonici.¹⁷⁻²⁰ Nel nostro caso, l’effetto di modulazione della crescita, di migrazione e di differenziazione sono stati certamente evidenti, ma diversi dipendentemente dalle differenti condizioni di coltura proposte nel disegno dello studio (Fig. 4.5).

In generale, il medium epatico (HCm) ha indotto una minore proliferazione e funzionalità epatocitaria in tutte le colture; la associazione delle cellule di ITO in coltura mista e medium epatico ha dimostrato invece dei livelli di maggiore proliferazione cellulare e produzione di albumina ($p < 0.05$ vs HLSC in coltura pura); questo fattore è verosimilmente sostenuto dall’effetto stimolatorio sostenuto dalla interazione tra la popolazione staminale e non parenchimale.

D’altra parte il medium per le cellule staminali ha indotto solo un piccolo incremento dei livelli di MTT in confronto alle condizioni di coltura con il HCm ($p < 0.05$) (Fig. 4.5a). Risultati simili sono stati ottenuti anche nel caso della produzione di albumina, ma con differenze maggiori ($p < 0.01$ vs HLSCs con HCm) (fig. 4.5b); questo dato è stato giustificato da una possibile attivazione della popolazione HLSCs da parte del medium. Non a caso, infatti, lo stesso medium ha indotto un evidente aumento dei livelli di MTT per le colture pure di cellule di ITO ($p < 0.01$).

In condizioni di coltura mista (HLSC ed ITO), il medium per cellule staminali ha sicuramente indotto una proliferazione francamente superiore con una produzione di albumina significativamente maggiore ($p < 0.001$ vs HLSCs in HCm), probabilmente dovuta ad una positiva interazione tra HLSCs e cellule di ITO.

La combinazione dei due media ha infine ottenuto i migliori risultati, sia in termini di differenziazione sia di proliferazione cellulare; mentre la proliferazione della HLSCs è decresciuta intorno al 5° giorno di coltura, l’albumina è stata prodotta anche negli ultimi giorni di coltura con concentrazioni in crescita.

Pertanto, l’associazione dei due media e la cocoltura con cellule di ITO ha raggiunto i migliori risultati, anche con effetti additivi nella combinazione. In questo caso le cellule di ITO si sono dimostrate particolarmente efficaci nel determinare un incremento nel processo di differenziazione dei progenitori epatici. I dati ottenuti ci hanno permesso di evidenziare che gli epatociti hanno esibito una morfologia differenziata e livelli molto

maggiori di funzioni metaboliche, come secrezione di albumina, vs condizioni di coltura pura. Gli elevati valori del test MTT (Fig 4.5a) nel caso delle colture miste hanno supportato tali dati.

Ciò nonostante, come rivelato dagli stessi dati di proliferazione, è stato rilevato che, dopo una buona sopravvivenza nei 7 giorni di coltura, si intravede la tendenza a degradare, con una progressiva morte delle cellule di ITO, non in grado di supportare ulteriormente gli epatociti destinati dunque a progressiva morte cellulare.

Questi dati hanno in parte suggerito la progettazione della successiva fase di applicazione *in vivo*, sul piccolo animale, dei risultati sperimentali ottenuti.

La possibilità di poter ricostituire *in vivo* neotessuti dotati di strutture vascolari di diametro capillare o di microvasi (per definizione con diametro interno minore di 1 mm) può aprire un'importante soluzione ai problemi fino ad ora incontrati. Come già evidenziato, il primo problema dell'Ingegneria Tissutale è mantenere la vitalità cellulare: neocostrutti di tessuto, una volta impiantati nell'organismo ospite, consumeranno entro poche ore le proprie scorte di ossigeno e nutrienti, mentre il processo di angiogenesi (crescita di nuovi vasi) richiederà alcuni giorni prima di poter provvedere alle esigenze metaboliche del nuovo impianto.

Gli *insights* ottenuti suggeriscono che l'effetto di induzione nei confronti di una coltura cellulare, da parte di un bioreattore, sia in grado di determinare un importante stimolo proliferativo; tuttavia la riproduzione della complessità dell'ambiente naturale, *in vivo*, rimane tuttora di difficile riproduzione, limitando la possibilità di mantenere colture per periodi definiti.

Il disegno del progetto finale, ancora in fase di studio e di possibili ulteriori implementazioni, prevede un profilo multifasico nella realizzazione di neocostrutti, ovvero a) realizzazione *in vitro* di semine su scaffolds integrati in bioreattori, e, dopo adeguata induzione, b) successivo impianto *in vivo* in compartimenti anatomici ove lo scaffold possa integrarsi come neo-tessuto e dare definitivamente avvio a processi fisiologici di neoangiogenesi. In questo caso infatti la fase di coltura *in vitro* permette di ottenere un importante effetto di *preconditioning*, ovvero stabilizzazione ed induzione della coltura 3D con particolare riferimento ad *attachment* e disposizione spaziale, oltreché vitalità cellulare, induzione proliferativa etc.

Costituendo il processo di neoangiogenesi uno degli aspetti principali del progetto, oltre che il mantenimento di una coltura epatocitaria, abbiamo voluto ottimizzare il design con una attenta: a) selezione delle popolazioni cellulari b) selezione dei biomateriali.

La scelta delle cellule staminali mesenchimali è stata dettata dalle note potenzialità delle stesse nei processi di neoangiogenesi da una parte, ma anche come stimolo di supporto, dall'altra.²¹

La scelta del biomateriale è ricaduta su scaffolds costituiti da materiale HYAFF; lo HYAFF® è un estere dell'acido ialuronico, ottenuto mediante un processo di esterificazione del gruppo carbossilico dell'acido glucuronico con alcol benzilico. Il processo di esterificazione riduce l'idrofilia della molecola e trasforma l'acido ialuronico in una molecola meno solubile in acqua. Sfruttando questa differenza di solubilità, è possibile produrre dei dispositivi costituiti da puro acido ialuronico in diverse forme "solide"; nel nostro caso abbiamo utilizzato delle spugne. L'acido ialuronico ha anche un ruolo definito nel controllo del processo angiogenetico. È stato dimostrato che l'acido ialuronico ad alto peso molecolare ha una attività inibitoria sull'angiogenesi. D'altra parte, gli oligosaccaridi dell'acido ialuronico a basso peso molecolare hanno dimostrato un notevole effetto angiogenetico in una serie di modelli sperimentali^{22,23}, oltre a stimolare la produzione di collagene da parte delle cellule endoteliali.²⁴ Gli oligosaccaridi dell'acido ialuronico possono influenzare la funzione delle cellule endoteliali mediante legame al recettore ICAM-1. Gli stessi oligosaccaridi si legano al CD44 presente sui macrofagi e stimolano l'espressione di diversi peptidi infiammatori, come TNF- α e IL-1 β .^{25,26} Questi inducono una maggiore espressione del recettore ICAM-1 e predispongono ulteriormente le cellule endoteliali allo stimolo da parte degli oligosaccaridi dell'acido ialuronico.

Dopo stabilizzazione della coltura nello scaffold 3D, si è proceduto all'impianto dello stesso nell'omento dell'animale, costituendo una tasca nella quale è stato posto lo scaffold precedentemente sottoposto a *preconditioning*. Questo design ha permesso, da una parte, di supportare sufficientemente la coltura cellulare grazie alle rete vascolare omentale preesistente (come noto il tessuto omentale è particolarmente vascolarizzato), dall'altra si è voluto testare l'induzione ai processi di neoangiogenesi, dipendentemente dalla presenza o meno, nella popolazione cellulare seminata, di hMSCs.

I dati preliminari dimostrano che, in condizioni standard, la presenza di HMSCs determina una significativa induzione angiogenica. La Figura 5.1 mostra le caratteristiche morfologiche della coltura mista (gruppo di studio) dopo espianto dall'animale. In queste condizioni, lo scaffold presenta, al suo interno, la formazione di strutture a carattere *vessel-like* già visibili alla colorazione standard in EE. I processi di neoangiogenesi sono stati peraltro confermati e sostenuti dai saggi di

immunofluorescenza per il fattore di vWF (Fig. 5.2), e dal collagene di tipo III (Fig. 5.3), che si presentano circonfenzialmente distribuiti intorno agli stessi. La ricerca per il CD133, caratteristico marcatore di staminalità presenta, infine, una distribuzione omogenea ma particolarmente concentrata intorno a queste nuove strutture “vascolari”. Una analisi più dettagliata ha inoltre evidenziato, confrontando i due gruppi che a) i dati morfologici di neoangiogenesi sembrano essere molto più definiti nel caso delle colture miste (epatociti+hMSCs) rispetto alla popolazione pura di epatociti (gruppo di controllo) b) la concentrazione delle strutture *vessel-like* si presenta statisticamente superiore per campo ottico nella coltura mista rispetto alla popolazione pure di epatociti. ($p < 0.05$.) Questi dati ancora preliminari sono tuttavia suggestivi di una capacità induttiva, da parte delle HMSC, ai processi di neoangiogenesi.

Si ritiene che la implementazione del design dello studio, possa offrire ulteriori *insights*; avendo dimostrato che le MSCs determinano un effettiva spinta angiogenica, in assenza di ulteriori fattori di stimolo, è nostra intenzione implementare i caratteri di induzione del modello attraverso l’inserimento di ulteriori *boosts* rigenerativi come a) legatura della vena porta (fattore neoangiogenico) b) resezione epatica parziale (fattore di rigenerazione epatocitaria).

Ulteriori approfondimenti sono necessari dunque per convalidare definitivamente tale ipotesi e poter pensare di costituire, in futuro, organoidi epatici su biostrutture neo-vascularizzate.

BIBLIOGRAFIA

1. Kaihara S, Borenstein J, Koka R, Lalan S, Ochoa ER, Ravens M, et al. "Silicon Micromachining to tissue engineer branched vascular channels for liver fabrication" *Tissue Eng* 2000;6:105-117;
2. Shin M, Matsuda K, Ishii O, Terai H, Kaazempur-Mofrad M, Borenstein J, et al. "Endothelized networks with a vascular geometry in microfabricated poly(dimethyl siloxane)" *Biomed Microdevices* 2004;6:269-278;
3. Williams DF "To engineer is to create: the link between engineering and regeneration". *Trends in Biotechnology* 2006;24(1):4-8;
4. Tilles AW, Baskaran H, Roy P, Yarmush ML, Toner M "Effects of oxygenation and flow on the viability and function of rat hepatocytes cocultured in a microchannel flat-plate bioreactor" *Biotechnol. Bioeng* 2001;73(5):379-389;
5. McDonald JC, Chabinyc ML, Metallo SJ, Anderson JR, Stroock AD, Whitesides GM "Prototyping of microfluidic devices in poly(dimethylsiloxane) using solid-object printing" *Anal Chem.* 2002;74(7):1537-45;
6. Cardon A, Chakfé N, Thaveau F, Gagnon E, Hartung O, Aillet S, et al. Sealing of polyester prostheses with autologous fibrin glue and bone marrow. *Ann Vasc Surg* 2000;14:543-552
7. Yagi S, Iida T, Taniguchi K, Hori T, Hamada T, Fujii K, et al. Impact of portal venous pressure on regeneration and graft damage after living-donor liver transplantation. *Liver Transpl* 2005;11:68-75;
8. Li LJ, Du WB, Zhang YM, Li J, Pan XP, Chen JJ, et al. Evaluation of a bioartificial liver based on nonwoven fabric bioreactor with porcine hepatocytes in pigs. *J Hepatol* 2006;44:317-324
9. Shito M, Kim NH, Baskaran H, Tilles AW, Tompkins RG, Yarmush ML "In vitro and in vivo evaluation of albumin synthesis rate of porcine hepatocytes in a flat-type bioreactor" *Artif Organs* 2001;25:571-578;
10. Carvalho JS. Heterogeneous serum albumin as tracer for plasma volume measurements and evaluated in conscious non-dehydrated and 48-hour water-deprived rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989;13:603-7.

11. Mantero S., Remuzzi A., Raimondi M. T., Ahluwalia A. *Fondamenti di ingegneria dei tessuti per la medicina rigenerativa*. Bologna: Pàtron Editore, Sett 2009
12. Jackson AR, Gu WY “Transport properties of cartilaginous tissues” *Curr Rheumatol Rev* 2009;1:1-18;
13. Meyer U, Nazer N, Buchter A, Wiesmann HP “Design and performance of a bioreactor system for mechanically promoted three-dimensional tissue engineering” *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 2006;44:134-140;
14. Catapano G, Patzer JF 2nd, Gerlach JC “Transport Advances in Disposable Bioreactors for Liver Tissue Engineering” *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2010;115:117;
15. Tilles AW, Berthiaume F, Yarmush ML, Toner M “Critical issues in bioartificial liver development” *Review Technol. Health Care* 2002;10(3-4):177;
16. Herrera MB, Bruno S, Buttiglieri S, Tetta C, Gatti S, Deregibus MC, Bussolati B, Camussi G. Isolation and characterization of a stem cell population from adult human liver. *Stem Cells* 2006;**24(12)**: 2840;
17. S.N. Bhatia, U.J. Balis, M.L. Yarmush, M. Toner “Effect of cell-cell interaction in preservation of cellular phenotype: cocultivation of hepatocytes and non-parenchymal cells” *FASEB Journal* 1999; 13:1883-1900
18. K Harada, T Mitaka, S Miyamoto, e coll. “Rapid formation of hepatic organoid in collagen sponge by rat small hepatocyte and hepatic nonparenchymal cells” *Journal of Hepatology* 2003 39: 716-723
19. Alison MR, Poulson R, Jeffrey R, Dhillon AP, Quaglia A, Jacob J, Novelli M, Prentice G, Williams J, Wright NA Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells *Nature* 406; 257, 2000
20. Kaihara S, Borenstein J, Koka R, Lalan S, Ochoa ER, Ravens M, et al. Silicon Micromachining to tissue engineer branched vascular channels for liver fabrication. *Tissue Eng* 2000;6:105-117
21. Pasquinelli G, Orrico C, Foroni L, Bonafè F, Carboni M, Guarnieri C, Raimondo S, Penna C, Geuna S, Pagliaro P, Freyrie A, Stella A, Caldarera CM, Muscari C “Mesenchymal stem cell interaction with a non-woven

- hyaluronan-based scaffold suitable for tissue repair” *J Anat.* 2008 Nov;213(5):520-30;
22. Vindigni V, Cortivo R, Iacobellis L, Abatangelo G, Zavan B. Hyaluronan benzyl ester as a scaffold for tissue engineering. *Int J Mol Sci.* 2009 Jul 3;10(7):2972-85.
 23. Pandis L, Zavan B, Abatangelo G, Lepidi S, Cortivo R, Vindigni V. Hyaluronan-based scaffold for in vivo regeneration of the rat vena cava: Preliminary results in an animal model. *J Biomed Mater Res A.* 2010;93(4):1289-96;
 24. asquinelli G, Vinci MC, Gamberini C, Orrico C, Foroni L, Guarnieri C, Parenti A, Gargiulo M, Ledda F, Caldarera CM, Muscari C. Architectural organization and functional features of early endothelial progenitor cells cultured in a hyaluronan-based polymer scaffold. *Tissue Eng Part A.* 2009 Sep;15(9):2751-62;
 25. Cristino S, Grassi F, Toneguzzi S, Piacentini A, Grigolo B, Santi S, Riccio M, Tognana E, Facchini A, Lisignoli G. Analysis of mesenchymal stem cells grown on a three-dimensional HYAFF 11-based prototype ligament scaffold. *J Biomed Mater Res A.* 2005 Jun 1;73(3):275-83;
 26. Turner NJ, Kielty CM, Walker MG, Canfield AE. A novel hyaluronan-based biomaterial (Hyaff-11) as a scaffold for endothelial cells in tissue engineered vascular grafts. *Biomaterials.* 2004 Dec;25(28):5955-64;

Un particolare ringraziamento:

- *Prof. U. Cillo, Responsabile Unita Operativa di Chirurgia Epatobiliare e Trapianto di Fegato – Università di Padova, Italia*
- *Prof. D.F. D'Amico, Professore Emerito di Chirurgia, Università di Padova*
- *Prof. J.P. Vacanti et Coll., Direttore Laboratorio di Medicina Rigenerativa ed Ingegneria Tissutale, CRP, Università di Harvard, Boston USA*
- *Prof. G. Abatangelo et Coll, Dipartimento di Istologia ed Embriologia, Università di Padova*
- *Ing. N. Elvassore et Coll, Dipartimento di Ingegneria Chimica Università di Padova*