



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

Dottorato in Medicina Cardiovascolare e Biotecnologie Chirurgiche ed Urologiche

Indirizzo in Biotecnologie Chirurgiche e Medicina Rigenerativa nell'Insufficienza d'Organo

Dipartimento di Discipline Chirurgiche, Oncologiche e Stomatologiche

Settore Scientifico Disciplinare MED/18

SISTEMA DI COLTURA DINAMICA PER CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI DI DERIVAZIONE ADIPOSA: STUDIO PRELIMINARE

LA DOTTORESSA
ALIDA ABRUZZO

IL COORDINATORE
PROF. ATTILIO IGNAZIO LO MONTE

IL TUTOR
PROF. ATTILIO IGNAZIO LO MONTE

CICLO XXVI
ANNO 2016

INDICE

1. INTRODUZIONE	2
1.1 La coltura dinamica: stato dell'arte	2
1.2 La medicina rigenerativa	7
1.3 L'ingegneria tissutale	9
1.4 Materiali impiegati in ingegneria tissutale	11
1.5 Cellule staminali mesenchimali.....	14
1.6 Bioreattore	16
1.7 Obiettivi.....	20
2. PARTE SPERIMENTALE.....	22
2.1 Materiale.....	22
2.2 Metodi	22
2.3 Isolamento di CSM da tessuto adiposo e mantenimento in coltura	23
2.4 Controlli microbiologici	24
2.5 Semina e coltura statica	25
2.6 Progettazione di un bioreattore a flusso continuo	26
2.7 Semina e coltura dinamica	28
2.8 Tecniche istologiche.....	29
3. RISULTATI E DISCUSSIONE	31
3.1 Produzione degli scaffold mediante DIPS.....	31
3.2 Caratterizzazione fisica degli scaffold	34
3.3 Isolamento e mantenimento in coltura di CSM da tessuto adiposo	36
3.4 Controlli microbiologici	36
3.5 Analisi istologica.....	37
4. CONCLUSIONI	41
BIBLIOGRAFIA	42

1. INTRODUZIONE

1.1 La coltura dinamica: stato dell'arte

Recentemente l'interesse della comunità scientifica si è rivolto verso l'utilizzo delle cellule staminali mesenchimali in virtù di alcune loro proprietà che risultano fondamentali per lo sviluppo di costrutti ingegnerizzati come l'elevata capacità proliferativa, l'autorinnovamento e il mantenimento di uno stato indifferenziato.

La buona resa quantitativa e l'elevato potenziale differenziativo rendono le cellule staminali mesenchimali una promettente risorsa cui far riferimento per lo sviluppo in vitro di nuovi tessuti¹. La realizzazione di costrutti tridimensionali richiede necessariamente un bioreattore che supporti la crescita tissutale e ne promuova l'uniforme ed omogenea formazione. Un sistema di tal genere è in grado di ricreare il microambiente nativo delle cellule staminali e di garantire l'azione sinergica dei diversi fattori che regolano il loro comportamento. E' ormai noto che i fattori che influenzano il destino di una cellula staminale hanno natura eterogenea e comprendono fattori biochimici, interazioni cellula-cellula, interazioni cellula-matrice e stimoli meccanici (fig. 1). Le sollecitazioni meccaniche, in particolare, possono essere tramutate dalle cellule in segnali biochimici modificando in tal modo non solo le loro funzioni ma anche la loro distribuzione.

Alla luce di ciò gli stimoli meccanici che vengono forniti all'interno di un bioreattore risultano fondamentali almeno per due motivi: preparare il costrutto a sopportare i carichi presenti in vivo e stimolare le cellule ad assumere le funzionalità necessarie alla sopravvivenza ed allo sviluppo nell'ambiente fisiologico (fig. 2).

Alcuni studi hanno dimostrato che, tra gli stimoli di natura meccanica, lo sforzo di taglio (forza di attrito esercitata dal flusso sanguigno in parallelo alla superficie cellulare) presente in condizioni fisiologiche, può far sì che le cellule endoteliali vadano incontro a cambiamenti morfologici, si orientino lungo l'asse del flusso applicato e rimodellino le fibre dello stress (fasci di actina presenti nelle cellule non muscolari che regolano la contrattilità cellulare)^{2,3}.

Il ruolo chiave dello sforzo di taglio nella regolazione del comportamento cellulare è emerso ancora di più quando si è visto che esso può determinare un'alterazione

dell'espressione genica, il rilascio di ossido nitrico e di altre sostanze coinvolte nella vasoregolazione⁴.

E' stato evidenziato, inoltre, che in una condizione di flusso turbolento tale forza può provocare un'alterazione del metabolismo delle cellule endoteliali e indurre il turnover e la proliferazione a causa della perdita di inibizione da contatto⁵. I progenitori delle cellule endoteliali si comportano in modo simile mostrando un aumento della proliferazione e del differenziamento in risposta al flusso applicato⁶.

Evidenze sperimentali recenti hanno messo in luce che lo sforzo di taglio risulta in grado di alterare in maniera diretta i pathways di differenziamento delle cellule staminali⁷. All'interno di un sistema in cui viene immesso un fluido in movimento si genera infatti uno sforzo di taglio che può indirizzare il differenziamento delle cellule staminali mesenchimali in senso endoteliale⁸. In modo analogo, le cellule staminali embrionali poste in coltura dinamica possono andare incontro ad un aumento dell'espressione dei markers endoteliali ed ematopoietici⁹⁻¹¹.

Uno studio effettuato da Huang et al.¹² nel 2005 ha evidenziato che cellule staminali embrionali (ESC) di topo poste in coltura sulla superficie luminale di un tubo microporoso con una compliance simile a quella di un'arteria umana mostravano un comportamento diverso a seconda della presenza o assenza di una forza meccanica agente. Quando messe in coltura in presenza di un terreno di differenziamento che rimaneva statico, le ESC presentavano un fenotipo assimilabile a quello delle cellule muscolari lisce. Tuttavia, quando poste in coltura con terreno di differenziamento che fluiva attraverso il tubo in maniera pulsatile simulando il flusso sanguigno venoso, le ESC esposte al lume differenziavano in cellule endotelio-simili, mentre le ESC trovate negli interstizi delle pareti del tubo differenziavano in cellule muscolari-simili. Sulla base di questi primi risultati, da cui si è potuto evincere che lo sforzo di taglio è in grado di modulare il fenotipo di una cellula staminale e la sua funzione, è cresciuto sempre più l'interesse verso lo studio della risposta delle colture tridimensionali agli ambienti idrodinamici⁴.

Diversi studi hanno mostrato che la coltura statica non risulta adeguata per la costituzione tridimensionale di un tessuto in vitro in quanto non permette una distribuzione omogenea delle cellule sulla superficie dello scaffold utilizzato.

In condizioni di coltura statica lo scaffold presenta poche cellule in corrispondenza della sua regione centrale¹³ e questo può essere dovuto, a seconda dei casi, a scarsa penetrazione cellulare durante la semina, a migrazione cellulare verso la periferia dello scaffold durante la coltura o a morte cellulare nell'area centrale dello scaffold¹⁴⁻¹⁸. La diffusione è il solo meccanismo che consente il trasporto dei nutrienti e la rimozione delle sostanze di scarto e risulta insufficiente per i costrutti tridimensionali. Queste evidenze hanno spinto verso la realizzazione di sistemi di coltura dinamica in grado di garantire una più uniforme distribuzione cellulare lungo lo scaffold e un più efficace trasferimento dei nutrienti e delle sostanze di scarto.

Zhao et al.¹⁹ hanno evidenziato che la semina e la coltura di cellule staminali mesenchimali su scaffold in polietilene tereftalato (PET) all'interno di un bioreattore dava luogo ad una più uniforme distribuzione lungo il supporto e dopo 40 giorni di coltura consentiva la replicazione mantenendo inalterato il potenziale differenziativo. Un gruppo di ricercatori dell'Università del Maryland ha sottolineato ulteriormente come la coltura dinamica sia più efficace rispetto alla coltura statica per i costrutti tridimensionali²⁰. Visti i risultati ottenuti da diversi studi la coltura dinamica ha richiamato l'interesse del mondo della ricerca che ha concentrato tutta la sua attenzione verso la realizzazione di tessuti ingegnerizzati in vitro con conseguenti importanti futuri risvolti nel settore della pratica clinica.

Nel caso dei difetti ossei sono stati ottenuti dei risultati molto incoraggianti in quanto si è visto che cellule staminali mesenchimali seminate su scaffold di natura polimerica si organizzavano in modo più omogeneo grazie alle condizioni dinamiche di coltura ed inoltre dopo 1 settimana nel bioreattore venivano indirizzate verso il differenziamento in senso osteogenico senza utilizzo di fattori solubili²¹. Dati positivi sono stati raccolti anche nell'ottica del trattamento delle ustioni e della ricostruzione dell'ipodermide grazie all'utilizzo di cellule staminali di derivazione adiposa seminate su scaffold di acido poli lattico-co-glicolico (PLLG) che sottoposte a coltura dinamica mantenevano la loro vitalità e conservavano il loro potenziale differenziativo²².

In campo tumorale un sistema di coltura dinamica può consentire lo sviluppo di nuovi farmaci dal momento che esso è in grado di ricreare il microambiente in cui hanno normalmente sede le cellule.

Ferlin *et al*²³ hanno messo a punto una piattaforma in cui la combinazione di diversi elementi tra cui la presenza di interazioni con la matrice, la possibilità di modulare le proprietà meccaniche e il rilascio dinamico di nutrienti o farmaci l'hanno resa idonea per la sperimentazione in vitro di nuovi farmaci. Essa è stata progettata con due parti: un materiale biomimetico sul quale far aderire le cellule staminali mesenchimali e un sistema di coltura dinamica che mima le proprietà meccaniche e di trasporto del flusso sanguigno. Un microambiente così costituito può consentire di supportare efficacemente l'adesione, l'espansione delle cellule staminali mesenchimali e di condurre studi in vitro volti a monitorare l'effetto di un farmaco o la sua distribuzione attraverso il sistema.

Per i vasi sanguigni, in particolare, si è evidenziato che è possibile ingegnerizzare il tessuto muscolare liscio aprendo così la strada a nuove strategie terapeutiche per tutte quelle patologie in cui la funzione del tessuto muscolare risulta compromessa. Le cellule muscolari sono state poste su matrici di acido poliglicolico (PGA) e sono state sottoposte a coltura statica e coltura dinamica. E' stato messo in luce che le matrici poste nel bioreattore avevano una maggiore densità cellulare e percentuali maggiori di elastina e collagene rispetto a quelle in condizioni statiche. Dopo 5 settimane di coltura i neotessuti sviluppati in vitro avevano una percentuale di elastina e di cellule comparabili a quelle del tessuto muscolare liscio nativo²⁴. Song *et al.*²⁵ hanno dimostrato che la coltura dinamica di cellule muscolari lisce per 14 giorni su scaffold di poli trimetilene carbonato (PTMC) permetteva di ottenere un numero cinque volte più elevato di cellule rispetto alla tradizionale coltura statica ed inoltre i costrutti avevano delle proprietà meccaniche migliori.

Altri approcci si sono focalizzati sull'uso di una co-coltura di mioblasti e cellule della frazione vascolare stromale all'interno di un bioreattore senza alcuno scaffold. e hanno dimostrato che questa combinazione può permettere alle cellule di non costituire aree necrotiche grazie alla vasta disponibilità di ossigeno e può condurre i mioblasti al differenziamento²⁶. Le recenti evidenze sperimentali raccolte dimostrano, dunque, come sia necessaria attualmente la progettazione di nuovi dispositivi, definiti bioreattori, in grado di mimare le condizioni fisiologiche presenti in vivo. All'interno di un bioreattore le cellule vengono fatte crescere favorendone la proliferazione, ed inoltre, la continua perfusione del mezzo di coltura nelle strutture porose dello scaffold inserito, permette un nutrimento ciclico di ogni parte del costrutto,

facilitando il trasporto di massa ed in particolare consentendo all'ossigeno di essere disponibile a tutte le cellule, anche a quelle più nascoste. Questo continuo rimescolamento del nutrimento, che avviene in diversi modi a seconda del tipo di bioreattore, guida lo sviluppo della composizione biochimica dei tessuti ed è considerato fattore determinante nel differenziamento e nella crescita delle cellule in vitro.

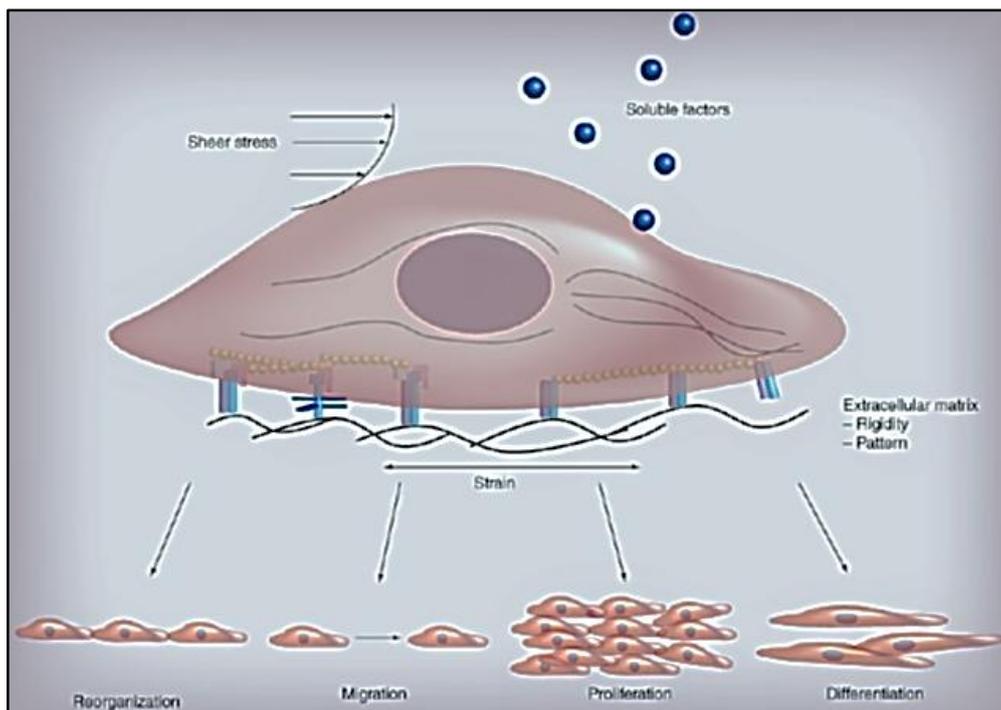


Figura 1. Fattori microambientali che possono influenzare il comportamento di una cellula staminale mesenchimale

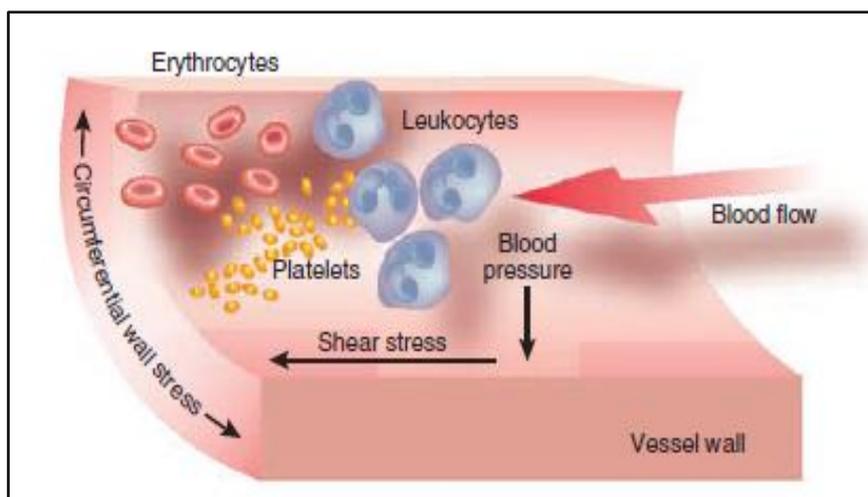


Figura 2. Rappresentazione grafica delle principali forze emodinamiche presenti a livello vascolare

1.2 La medicina rigenerativa

La medicina rigenerativa è un settore interdisciplinare emergente della ricerca e delle applicazioni cliniche focalizzato sul riparo, la sostituzione, la rigenerazione di cellule, tessuti o organi per ripristinare la funzionalità danneggiata derivante da una qualsiasi causa, compresi i difetti congeniti, le malattie e i traumi^{27,28}. Questo campo comprende aree terapeutiche che inizialmente si credevano separate, come la terapia cellulare e l'ingegneria tissutale (creazione in vitro di tessuti/organi per un successivo trapianto come organi perfettamente funzionanti o innesti di tessuto)²⁹. In particolare, si parla di "terapia cellulare" quando non è richiesto l'uso di uno scaffold e di "ingegneria tissutale" quando invece esso è necessario per supportare la rigenerazione del tessuto danneggiato³⁰ (fig. 3). Questi due settori comprendono la sostituzione (trapianto), la riparazione (terapia cellulare esogena) o la rigenerazione di un tessuto (mobilizzazione del pool di cellule endogene, come per esempio le staminali)³¹⁻³³.

La medicina rigenerativa utilizza, dunque, una combinazione di diversi approcci che la proiettano oltre il trapianto tradizionale e le terapie di sostituzione. Alcune tra le strategie utilizzate possono includere, ma non sono solo limitate ad esse, l'uso di cellule staminali, di molecole solubili, l'ingegneria genetica, l'ingegneria tissutale e la terapia cellulare avanzata.

Il suo scopo non è solo rimpiazzare ciò che funziona male ma fornire gli elementi richiesti per la riparazione in vivo, progettando sostituti che interagiscano con

l'organismo vivente e allo stesso tempo ne stimolino le capacità intrinseche per la rigenerazione.^{34,35} Sebbene sia ancora un campo emergente, la medicina rigenerativa ha già generato un certo numero di terapie, compreso il sostituto di pelle ingegnerizzata Apligraf^{36,37} e la terapia rigenerativa dell'osso con cellule staminali adulte Osteocel³⁸.

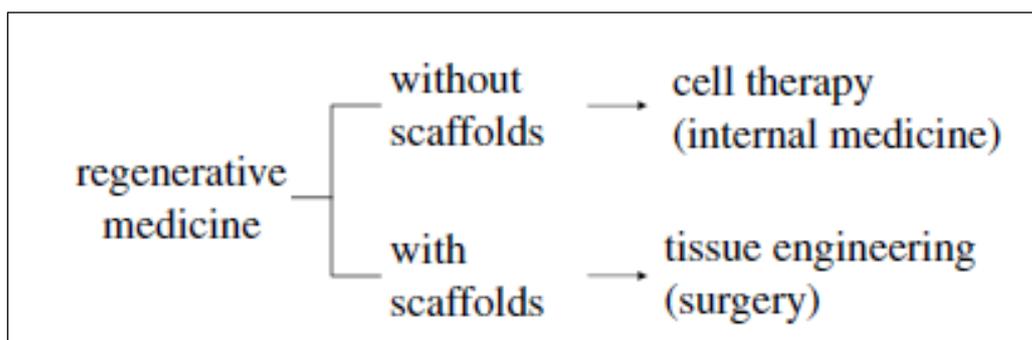


Figura 3. Classificazione della medicina rigenerativa

Le cellule e i materiali rappresentano le fondamenta della medicina rigenerativa. Diversi tipi cellulari sono stati utilizzati e sono attualmente utilizzati nella medicina rigenerativa³⁹. Prima dell'isolamento e dell'identificazione delle cellule staminali umane venivano impiegate le cellule isolate dai tessuti adulti. Queste erano usate in combinazione con dei materiali naturali o sintetici e rappresentavano un mezzo per valutare in base alla modalità d'azione dei materiali le loro proprietà rigenerative⁴⁰. Le cellule staminali di topo sono state isolate nel 1981⁴¹ mentre le cellule staminali embrionali (ES) nel 1998⁴².

A partire dalla loro identificazione, l'interesse si è focalizzato su un potenziale utilizzo di queste cellule per la medicina rigenerativa proprio perché esse hanno la capacità di differenziarsi nelle linee cellulari dei tre foglietti embrionali (endoderma, mesoderma ed ectoderma)⁴³. Queste cellule, proprio per la loro spiccata capacità di proliferare e differenziarsi in tutti i tipi cellulari dei tre foglietti embrionali (pluripotenti) hanno un enorme potenzialità per la medicina rigenerativa. Purtroppo, i problemi etici e la loro origine allogenica limitano il loro potenziale. Una fonte alternativa di cellule staminali pluripotenti che offre meno problematiche di natura etica è stata proposta recentemente³³. Nel 2006, Takahashi e Yamanaka hanno dimostrato che le cellule della pelle derivanti sia dall'embrione che dal topo adulto

possono essere riprogrammate a cellule staminali pluripotenti (iPS) attraverso l'uso dei cosiddetti "fattori di Yamanaka": Oct4, Sox 2, Myc e Klf4⁴⁴.

La medicina rigenerativa ha indubbiamente trasformato il modo di fare medicina. Con la medicina rigenerativa, la riparazione di un tessuto non sano o il ripristino delle funzioni dell'organismo si possono ottenere tramite un trattamento definitivo differendo in tal modo completamente dalle attuali pratiche mediche basate sull'utilizzo di procedure farmacologiche o chirurgiche. Con i tradizionali approcci farmacologici, infatti, il paziente ha bisogno di una terapia per un periodo di tempo considerevole se non per sempre. Nonostante la terapia cellulare sia costosa per la produzione e/o la somministrazione, l'obiettivo sarà dare luogo ad un ripristino permanente della funzione perduta del tessuto o dell'organo, ragion per cui in ultima analisi risulta più economica e più benefica rispetto alle attuali pratiche mediche³³. Le applicazioni della medicina rigenerativa sono molteplici specialmente tenendo conto del fatto che il livello di invecchiamento della popolazione va aumentando sempre più di pari passo con le malattie. Per esempio, le cellule possono essere usate come veicoli per la terapia genica e le cellule in coltura possono essere utilizzate per studiare uno specifico processo patologico o lo sviluppo di un farmaco in vitro⁴⁵. La scoperta delle iPS offre anche la possibilità di creare modelli di malattia per sostenere la scoperta di nuovi farmaci e per ottenere cellule specifiche del paziente a scopi terapeutici⁴⁶.

1.3 L'ingegneria tissutale

L'ingegneria tissutale, come branca della medicina rigenerativa, è emersa come un nuovo approccio versatile per la riparazione/rigenerazione di tessuti danneggiati con la potenzialità di superare i limiti delle terapie tradizionali⁴⁷.

L'ingegneria tissutale è un campo interdisciplinare che applica i principi dell'ingegneria e delle scienze della vita al fine di sviluppare sostituti biologici che ripristinino, mantengano o migliorino le funzioni tissutali⁴⁸.

Una delle principali sfide della traslazione dell'ingegneria tissutale alla clinica è la difficoltà di ricreare la complessità dei tessuti e degli organi e la loro dimensione corretta dal punto di vista clinico⁴⁹. I tessuti sono costituiti da cellule e matrice

extracellulare (ECM), e differiscono tra loro per tipologia, contenuto e organizzazione dei costituenti cellulari e dei componenti della ECM. In ingegneria dei tessuti, queste differenze devono essere considerate prima di scegliere biomateriali e progettare scaffold per una specifica applicazione.

I risultati di numerosi studi di valutazione delle interazioni cellula-biomateriale suggeriscono che i biomateriali su scala micro/nanometrica possono anche agire come un "segnale" fisico che può influenzare il comportamento delle cellule, come l'adesione, la diffusione, la motilità, la sopravvivenza e differenziamento⁵⁰.

L'adesione, la proliferazione e il differenziamento delle cellule sono, dunque, fortemente influenzati dal microambiente associato allo scaffold così come dalla dimensione, dalla geometria, dalla densità dei pori, dalle finestre che connettono i pori e dalle proprietà della superficie⁵¹.

Si possono adottare differenti strategie che sfruttano l'ingegneria tissutale per la rigenerazione di tessuti persi, danneggiati o malati ma, in genere, il tessuto di interesse determina il tipo di approccio scelto. Questi comprendono: l'inseminazione di cellule su uno scaffold impiantato, l'impianto di tessuti cresciuti *in vitro* su uno scaffold oppure l'impianto di scaffold senza cellule per supportare la rigenerazione tissutale *in situ* (fig. 4).

Per tutti i tipi di approcci, lo scaffold risulta avere un ruolo chiave in quanto ha il compito di prestarsi quale struttura tridimensionale che supporterà la crescita di un tessuto nuovo al suo interno con proprietà simili al tessuto che deve essere sostituito⁵². Negli ultimi due decenni, il ramo vascolare è emerso come un settore importante dell'ingegneria tissutale e ha avuto un rapido sviluppo a causa dell'elevata incidenza di malattie cardiovascolari e del ruolo critico dell'angiogenesi nella rigenerazione tissutale. L'ingegneria tissutale vascolare si basa sulla fusione di approcci e sull'integrazione di conoscenze e tecnologie di diverse discipline quali la bioingegneria, l'ingegneria tissutale, la biologia vascolare, la scienza dei biomateriali, la biologia delle cellule staminali^{53,54}.

In generale, essa si fonda su tre diversi approcci per la rigenerazione dei vasi sanguigni: *in vitro*, *in vivo* e *in situ*. L'ingegneria tissutale vascolare *in vitro* si basa su un approccio di ingegneria tissutale tradizionale realizzando protesi vascolari funzionali *ex vivo* mediante l'utilizzo di cellule, scaffold e bioreattori. Per la strategia

in vivo una protesi vascolare autologa viene realizzata usando il microambiente tissutale presente nel corpo come bioreattore (ad esempio la cavità peritoneale o il sottocute). L'approccio *in situ* evita il lungo periodo di coltura *in vitro* realizzando una protesi cellularizzata o decellularizzata (che presenta tutte le proprietà essenziali di una protesi) che si serve del potenziale migratorio delle cellule dell'ospite per la rigenerazione di un vaso sanguigno *in situ*.

Per realizzare sostituti vascolari funzionali *ex vivo* è necessario scegliere il tipo cellulare, lo scaffold e il bioreattore più appropriati. A partire dagli anni '80 diversi studi hanno mostrato l'utilizzo di cellule endoteliali e cellule muscolari lisce per realizzare graft vascolari. Tuttavia, dal momento che le cellule endoteliali e le cellule muscolari lisce hanno un potenziale di replicazione limitato l'interesse si è spostato sull'uso di cellule staminali adulte o cellule staminali pluripotenti.

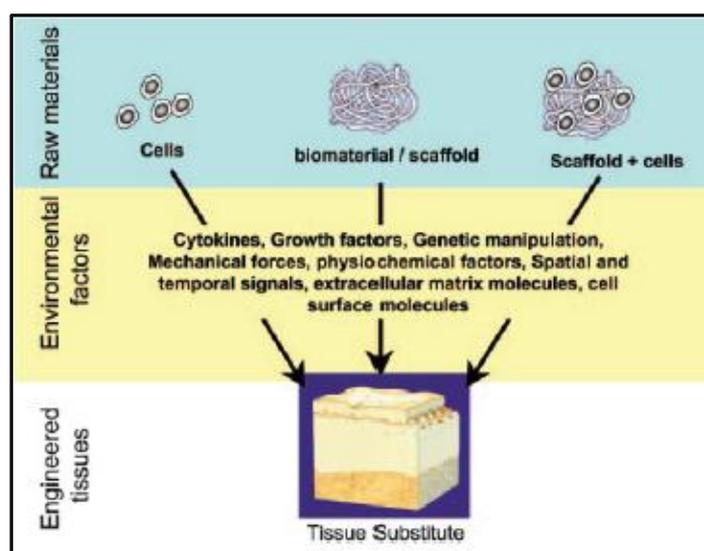


Figura 4. I diversi approcci utilizzati in ingegneria tissutale

1.4 Materiali impiegati in ingegneria tissutale

La ricerca sui biomateriali ha assunto una crescente importanza negli ultimi anni e si è posta l'obiettivo di progettare ed ingegnerizzare materiali in grado di mimare le funzioni delle strutture naturali e di interagire positivamente con le cellule. Si definisce, infatti, *biomateriale* un materiale concepito per interfacciarsi con i sistemi

biologici per dare supporto o sostituire un qualsiasi tessuto, organo o funzione del corpo⁵⁵.

I biomateriali possono essere utilizzati sia in impianti permanenti o protesi (campo biomedico), sia in dispositivi che sono a contatto con il corpo umano per un periodo di tempo limitato (campo farmaceutico)⁵⁶. Nell'ingegneria tissutale, i biomateriali offrono una struttura tridimensionale alle cellule per permettere ad esse di formare nuovi tessuti con un'appropriata struttura e funzione e, in alcuni casi, permettono il rilascio di fattori bioattivi (peptidi coinvolti nel processo di adesione cellulare, fattori di crescita), nelle sedi di interesse all'interno dell'organismo⁵⁷.

Poiché la maggior parte dei tipi cellulari necessitano di un substrato per l'ancoraggio e vanno incontro a morte se questo non è presente i biomateriali fungono da supporto per l'adesione delle cellule e, al contempo, offrono anche un sostegno di tipo meccanico contro le forze che agiscono in vivo garantendo il mantenimento della struttura tridimensionale durante lo sviluppo del nuovo tessuto. Generalmente, due tipologie di biomateriali vengono utilizzate per l'ingegneria tissutale^{58,59}: i materiali di origine naturale come il collagene⁶⁰, l'alginato⁶¹ e la fibroina; i polimeri sintetici (acido poliglicolico, acido polilattico)⁶². I materiali di natura biologica sono derivati da parti di tessuti funzionali umani o animali, come gli alginati, il chitosano, l'acido ialuronico ed il collagene. Questa classe di materiali esibisce il cosiddetto "riconoscimento cellulare", ossia la capacità di instaurare specifiche interazioni con le cellule (assenti in qualunque altro tipo di materiale). Malgrado questa peculiarità, vi sono restrizioni per il loro utilizzo dovute alla possibilità che causino reazioni immunitarie indesiderate, alle loro scarse proprietà meccaniche ed alla difficile reperibilità. I polimeri sintetici, invece, possono essere prodotti su larga scala con proprietà controllate (resistenza, tasso di degradazione, microstruttura) e risultano facilmente manipolabili.

A seconda del loro comportamento dopo l'impianto o quando sono in contatto con i fluidi biologici i polimeri biomedici possono essere classificati in: non degradabili o biodegradabili. Tipici polimeri non degradabili sono: polietilene ad elevato peso molecolare, usato in ortopedia; polimetilmetacrilato, polimerizzato *in situ* per i cementi ossei o utilizzato per lenti a contatto; polidimetilsilossano, usato per tessuti molli e lenti intraoculari.

I polimeri biodegradabili sono materiali polimerici che si degradano in ambiente fisiologico attraverso un meccanismo basato sull'idrolisi del legame estereo⁶³.

Aspetto cruciale della degradazione è la sua tempistica, che dipende dalla qualità dei legami chimici nelle catene polimeriche, dall'idrofilicità, dal peso molecolare, dalla cristallinità, dalla composizione nel caso dei copolimeri e dalla presenza di composti a basso peso molecolare (diluenti). Fondamentale è anche il fenomeno di perdita di stabilità meccanica durante la degradazione, che può avvenire troppo in fretta per gli scopi previsti e può portare all'accumulo di prodotti delle degradazioni in concentrazioni tali da risultare tossici.

Tra le famiglie di biomateriali macromolecolari sintetici, particolare interesse è rivolto ai poliesteri per via della loro facile degradazione per idrolisi del legame estereo, senza richiedere la presenza di un catalizzatore; è possibile regolare la velocità di degradazione del polimero operando sui parametri strutturali (ad esempio sul peso molecolare) e morfologici (cristallinità e orientazione); i prodotti di degradazione possono essere smaltiti per via metabolica sotto forma di acqua e biossido di carbonio. A questa classe appartengono il poli-acido lattico (PLA), il poli-acido glicolico (PGA), i loro copolimeri (PLGA) ed il poli-acido mandelico (PMA).

In particolare, il PLA è un α -idrossiestere ottenuto dalla polimerizzazione dell' α -idrossiacido corrispondente (l'acido 2-idrossipropoico, comunemente detto acido lattico) catalizzata da zinco o stagno⁶⁴(fig. 5).

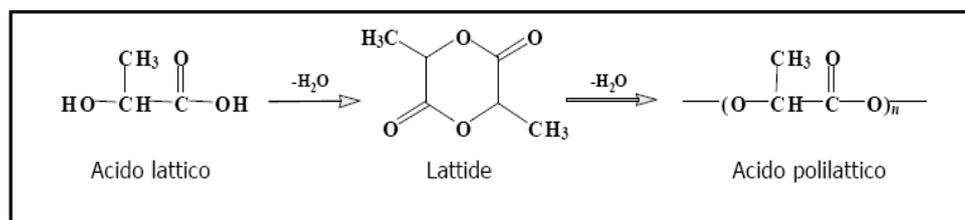


Figura 5. Reazione di polimerizzazione dell'acido lattico

Il composto di base per la produzione di PLA è l'acido lattico: esso è ottenuto tramite distillazione di biomasse e da processi di conversione di altri composti presenti in esse, i quali creano forme cicliche dell'acido lattico. Il PLA ha ricevuto l'approvazione della Food and Drug Administration (FDA) per usi clinici. In campo

biomedico è usato per suture, placche e viti ossee, rigenerazione dei tessuti e per sistemi a rilascio controllato dei farmaci.

Oltre alle applicazioni in campo medico, questo polimero è impiegato come alternativa eco-compatibile ai metodi di imballaggio convenzionali. Tra i motivi che accompagnano la sua crescente applicazione ricordiamo l'elevata trasparenza, l'ottima termoformabilità, e, soprattutto, il fatto che può essere ricavato da fonti rinnovabili. Poiché il PLA presenta un carbonio chirale, durante i processi di produzione del monomero, in base alle condizioni operative, può avvenire la formazione dello stereoisomero levogiro L-LA, più diffuso in natura, e di quello destrogiro D-LA. La differente struttura stereochimica avrà ripercussioni sulle proprietà meccaniche del polimero finale (fig. 6), dato che esse dipendono dai parametri morfologici del polimero stesso: in base all'impiego si preferirà dunque il PLLA semicristallino oppure il PDLA amorfo. Per la maggior parte delle applicazioni si preferisce l'isomero levogiro perché è metabolizzato più facilmente dall'organismo. Inoltre, le proprietà meccaniche del PDLA sono talmente scadenti da non suggerirne l'impiego per applicazioni di tissue engineering⁶⁵.

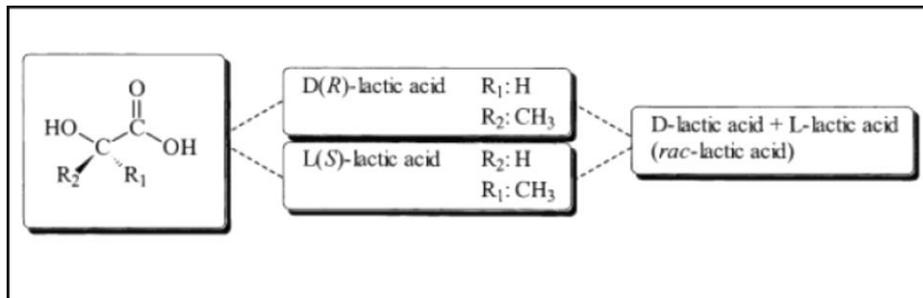


Figura 6. Stereoisomeri L e D dell'acido lattico

1.5 Cellule staminali mesenchimali

Le cellule staminali mesenchimali, altrimenti definite come CSM o MSC, sono cellule staminali adulte, in grado di autorigenerarsi e differenziare in diversi tessuti di origine mesenchimale.

Hanno una morfologia simil-fibroblastica e in condizioni normali di coltura aderiscono al materiale plastico⁶⁶. Dal momento che derivano dal mesoderma, il foglietto embrionale intermedio, sono in grado di differenziare in tessuti di origine mesenchimale come ad esempio lo stroma midollare, il tessuto adiposo, osseo, cartilagineo, tendineo, muscolare scheletrico ed il mesoderma viscerale. Tuttavia, diverse evidenze sperimentali indicano che sono in grado di differenziare anche in cellule di origine non mesodermica, quali neuroni, cellule epiteliali, endoteliali, epatociti, cellule renali e cellule del polmone⁶⁷.

Le cellule staminali mesenchimali (MSCs) adulte vennero scoperte da Friedenstein *et al*⁶⁸ nel 1966 che descrissero per la prima volta una popolazione di cellule, isolate dallo stroma di midollo osseo di topo, clonogeniche, aderenti alle piastre e in grado di andare incontro in vitro a differenziamento in osso, tessuto adiposo e cartilagine. L'intenso lavoro di ricerca mirato all'identificazione e all'isolamento di tali cellule, effettuato negli anni successivi, evidenziò come esse risiedano all'interno non solo del midollo osseo ma anche della maggior parte dei tessuti connettivi di un organismo come sangue periferico⁶⁹, tessuto adiposo⁷⁰, osso trabecolare⁷¹, derma⁷², membrana sinoviale⁷³, liquido sinoviale⁷⁴, tendini⁷⁵, muscolo scheletrico⁷⁶, così come nel sangue, fegato e midollo osseo fetali⁷⁷. Altre popolazioni di cellule staminali mesenchimali sono, poi, state isolate da sangue e matrice di cordone ombelicale⁷⁸; villi placentari⁷⁹, liquido amniotico⁸⁰. Tra le varie fonti riportate, il tessuto adiposo si configura, in modo particolare, come un ottimo candidato per l'isolamento di tali cellule vista la sua distribuzione quasi ubiquitaria nel corpo e i notevoli vantaggi forniti che hanno portato al superamento delle problematiche connesse all'utilizzo del midollo osseo⁸¹.

Il prelievo da midollo, infatti, era una procedura piuttosto invasiva, consentiva di ottenere un esiguo numero di cellule e presentava una diminuzione della resa quantitativa all'aumentare dell'età del soggetto.^{82,83}

L'utilizzo del tessuto adiposo come fonte permette di ottenere cellule staminali sia da liposuzioni sia da tessuto prelevato mediante dissezione chirurgica sotto anestesia locale. Si è visto che in 1 g di grasso ci sono 50 volte più cellule che in 1 g di agospirato midollare. Un grammo di tessuto adiposo consente di ricavare 5.000 cellule/ml mentre la quantità di cellule ricavate dal midollo va da 100 a 1000 cellule/ml. *In vitro*, inoltre, queste cellule presentano molte delle caratteristiche delle CSM ottenute da midollo osseo: l'aderenza al materiale plastico, la morfologia

fibroblastoide, la formazione di CFU-F (Unità Formanti Colonie Fibroblastoidi), l'espressione di alcuni markers superficiali ed il potenziale differenziativo in senso osteogenico, adipogenico e condrogenico indotto da opportune stimolazioni^{84,85}.

Negli ultimi anni, si è avuto un interesse sempre più crescente nei confronti delle MSC dal momento che esse possiedono delle proprietà che potranno essere sfruttate per lo sviluppo futuro di terapie cellulari e geniche: 1) sono facilmente ottenibili da tessuti adulti e quindi il loro utilizzo non presenta problematiche di carattere etico, a differenza delle staminali embrionali; 2) possono essere rapidamente espanse, senza perdere il fenotipo o la capacità differenziativa; 3) sono in possesso di un fenotipo superficiale scarsamente riconosciuto da cellule di tipo T (assenza di MHC II)⁸⁶. La loro natura ipo-immunogenica consente il trapianto allogenico che viene ben tollerato⁸⁷⁻⁸⁹. Inoltre, la plasticità mostrata da tali cellule può essere sfruttata nell'ambito della medicina rigenerativa per lo sviluppo di protocolli clinici applicativi di terapia cellulare e, in particolare, per la completa rigenerazione di tessuti danneggiati.

1.6 Bioreattore

L'ingegneria tissutale rappresenta un'alternativa interessante al classico approccio per lo sviluppo di impianti protesici. Essa, infatti, si pone l'obiettivo di sviluppare sostituti biologici per i tessuti danneggiati che, a differenza degli innesti convenzionali, possiedono la capacità di crescere, rimodellarsi, autoripararsi e integrarsi completamente con i tessuti biologici.

Nel perseguire il fine ultimo dell'ottenimento in vitro di un nuovo tessuto ingegnerizzato con proprietà meccaniche e funzionali adeguate si è reso necessario riprodurre un ambiente "biomimetico" ossia un ambiente di coltura tridimensionale che sia in grado di simulare le condizioni fisiologiche presenti *in vivo*.

I bioreattori vengono generalmente definiti come dispositivi che consentono lo svolgimento di processi biologici e/o biochimici in condizioni ambientali e operative monitorate, automatizzate e strettamente controllate (pH, temperatura, pressione, apporto di nutrienti e rimozione di cataboliti, etc.).

Sono strumenti nati inizialmente per la fermentazione e la coltivazione dei batteri e, in seguito utilizzati per diverse applicazioni come il trattamento delle acque di

scarico, la trasformazione dei prodotti alimentari e la produzione di prodotti farmaceutici e proteine ricombinanti (ad esempio anticorpi, fattori di crescita, vaccini e antibiotici)⁹⁰.

Nel campo dell'ingegneria tissutale sono stati introdotti con il fine di permettere la realizzazione di tessuti ingegnerizzati *in vitro*^{91,92}.

Infatti, la comunità scientifica si è scontrata con diverse difficoltà nel momento in cui ha tentato di affiancare alla coltura in piastra Petri dei tessuti monostrato (come il tessuto epiteliale o cartilagineo) la creazione *in vitro* di tessuti di maggiore spessore o formati da più linee cellulari⁹³.

Tra le principali problematiche riscontrate si potevano evidenziare un non adeguato trasporto di massa (ovvero apporto di ossigeno e di nutrienti e rimozione di cataboliti) e de-differenziamento cellulare, (passaggio dalla linea cellulare di interesse ad una indesiderata) legato alla coltura priva di stimoli esterni (meccanici o elettrici)⁹⁴. La necessità di superare queste limitazioni ha spinto verso la progettazione di un innovativo dispositivo che consente di ricreare *in vitro* le condizioni tipiche dell'ambiente biologico presente all'interno dell'organismo, permettendo il controllo dei parametri chimico-fisici e meccanici che ne influenzano lo stato, quali il pH, la concentrazione di gas (ossigeno e anidride carbonica), l'umidità e la temperatura; e in alcuni casi permette anche la stimolazione fisica e meccanica del costrutto tissutale durante il periodo di coltura⁹⁵.

I progressi legati all'utilizzo di questo tipo di sistema potrebbero essere enormi in quanto consentirebbe di monitorare le caratteristiche di un costrutto ingegnerizzato in tempo reale e fornirebbe la possibilità di modulare i parametri di coltura.

Inoltre, potrebbe essere utilizzato come modello *in vitro* per valutare l'effetto delle forze fisiche durante lo sviluppo di un tessuto e per predire la risposta del costrutto una volta impiantato *in vivo*.

Dal momento che tale dispositivo può ricreare il microambiente in cui risiedono le cellule staminali ed è in grado di influenzare il loro comportamento grazie all'azione combinata di tutti i fattori normalmente presenti al suo interno quali l'ossigeno, la matrice extracellulare, i meccanismi di signaling paracrino/autocrino e i segnali di tipo fisico (come ad esempio la forza meccanica, la forza elettrica, e lo sforzo di taglio) può consentire un'efficiente espansione e differenziamento cellulare⁹⁶. Un

sistema che permette di raggruppare insieme e regolare diversi parametri critici di coltura quali la tensione di ossigeno, la presenza di uno scaffold tridimensionale, l'azione di forze fisiche come ad esempio le forze idrodinamiche, lo sforzo di taglio, la stimolazione elettrica gioca, dunque, un ruolo fondamentale nell'ottenimento di popolazioni cellulari funzionali a partire da cellule staminali. Inoltre, grazie al controllo e alla riproducibilità dei diversi fattori ambientali si configura quale strumento adeguato per guidare in vitro il differenziamento delle cellule staminali e la formazione di un nuovo tessuto. Esistono varie tipologie di bioreattori a seconda della dimensione, della complessità e dell'ambiente fisiologico del tessuto da ingegnerizzare. In genere, a prescindere dalla tipologia devono però adempiere ad almeno una delle seguenti funzioni fondamentali:

- la sopravvivenza dell'impianto attraverso l'apporto ed il mantenimento di specifiche concentrazioni di nutrienti e gas;
- la distribuzione uniforme delle cellule sullo scaffold tridimensionale;
- la somministrazione di adeguati stimoli per preparare il graft alle condizioni biologiche in vivo.

Si possono suddividere i bioreattori in quattro principali categorie⁹⁷ (fig. 7):

- **Mixed Flasks:** uno o più scaffold sono immersi tramite degli aghi in una camera riempita con medium di coltura. Tramite la rotazione di una barretta magnetica, posta all'interno della camera, viene messo in movimento il medium attorno allo scaffold. Il moto convettivo del fluido che si genera, favorisce il trasporto di massa di ossigeno e metaboliti e la rimozione di cataboliti. Questo tipo di bioreattori presenta molte limitazioni: le cellule che sono penetrate più in profondità nello scaffold non ricevono sufficiente apporto di nutrienti e ossigeno e, quindi, o vanno incontro ad apoptosi o migrano verso la superficie dello scaffold. Inoltre, non è possibile applicare stimoli di tipo meccanico o elettrico se non lo sforzo di taglio sulle pareti dello scaffold generato dal moto del medium.
- **Rotating Wall Vessels:** in questa tipologia di bioreattore è il costruito a muoversi all'interno del medium e non viceversa. Lo scaffold, alloggiato su un supporto cilindrico e immerso nel medium, è messo in rotazione tramite un attuatore posto all'esterno della camera di coltura. Questo permette una semina e, quindi, una

colonizzazione cellulare più omogenea nello scaffold rispetto agli spinner flask anche se permane il problema del non adeguato trasporto di massa per elevate densità cellulari o maggiori spessori del costruito.

- **Bioreattori a perfusione diretta:** un costruito viene fissato in una camera di coltura e il medium gli fluisce attraverso, messo in moto da una pompa posta a monte della camera. La perfusione può essere di due tipi: confinata o meno. Nel primo caso il medium è costretto a fluire attraverso i pori dello scaffold mentre nel caso di costrutti tubolari il medium scorre all'interno ed all'esterno del vaso.
- **Bioreattori che applicano stimoli meccanici:** fanno parte di questa classe innumerevoli dispositivi molto diversi tra loro a causa della loro alta specificità. In generale, sono formati da una camera contenente medium, in cui sono posti gli scaffold fissati ad un supporto e ad un attuttore in grado di fornire uno stimolo meccanico. La maggioranza di questi bioreattori hanno un controllo online dei parametri e sono in grado di sviluppare un pattern di stimolazione predeterminato e variabile nel tempo.

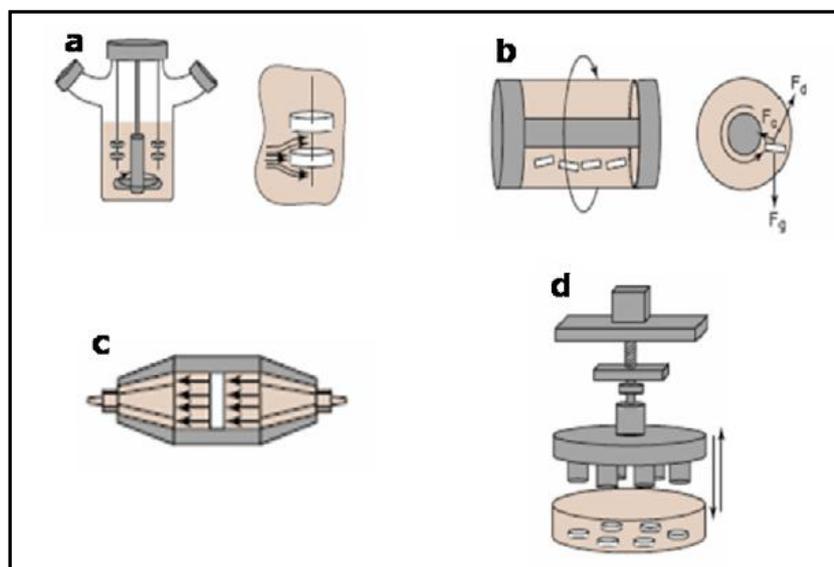


Figura 7. Bioreattori per l'ingegneria tissutale: a) Bioreattore Spinner Flask utilizzato sia per la semina di scaffold 3D che per la successiva coltura; b) Rotating wall vessel fornisce un ambiente di coltura dinamico ai costrutti con bassi sforzi di taglio ed elevate velocità di trasferimento di massa; c) Bioreattore a perfusione diretta nel quale il mezzo fluisce direttamente attraverso i pori dello scaffold, può essere usato per la semina e/o la coltura di costrutti 3D; d) Bioreattori che applicano forze meccaniche controllate, quali compressioni dinamiche, a costrutti ingegnerizzati che possono essere usati come modello dello sviluppo di tessuti sotto condizioni di carico fisiologico e per generare innesti tissutali funzionali.

1.7 Obiettivi

La rigenerazione del tessuto vascolare si è dimostrata, fin dagli albori dell'ingegneria tissutale, uno dei più rilevanti ambiti di studio, a causa dell'alta incidenza e dell'ampia gamma di malattie a carico del sistema circolatorio, che risultano essere la prima causa di decessi nei paesi più sviluppati, Europa compresa.

I problemi a carico di vasi di grande calibro sono generalmente ovviati con protesi di materiale sintetico come Dacron® (polietilentereftalato) o ePTFE (politetrafluoroetilene espanso) il cui impiego ha portato a buoni risultati sul medio-lungo termine, ma non per i vasi di piccolo calibro, cioè quelli inferiori a 6 mm di diametro, i quali vanno generalmente incontro a stenosi ed occlusione del lume provocando il fallimento dell'impianto.

Per i vasi di piccolo calibro è quindi necessario trovare delle soluzioni alternative che si traducono spesso in trapianti autologhi effettuati solitamente con la vena safena, per la chirurgia del sistema circolatorio periferico, o con l'arteria mammaria, per l'esecuzione di bypass coronarici. Tuttavia, in circa il 10% dei casi, non è possibile reperire tessuti autologhi nel paziente, a causa di traumi estesi, patologie vascolari o precedenti interventi. Per questo motivo, è sorta la necessità di creare impianti biocompatibili in grado di adattarsi ed autorigenerarsi con l'obiettivo di risolvere il problema sul lungo termine con un'alta affidabilità.

In un contesto di tal genere, il presente lavoro si propone di valutare gli effetti della semina e del mantenimento in coltura dinamica di cellule staminali mesenchimali di derivazione adiposa all'interno di un sistema nel quale è stato inserito un supporto tubulare di natura polimerica. Il sistema predetto è stato preliminarmente allestito per permettere la coltura in condizione dinamica, migliorare il trasporto di massa e ricreare le forze meccaniche agenti *in vivo*.

Per valutare l'efficienza del sistema dinamico rispetto al sistema di coltura statico è stata effettuata in parallelo una coltura in condizione statica.

Uno scaffold tubulare di acido poli-L-lattico (PLLA) è stato scelto quale substrato per l'adesione e la crescita cellulare in entrambe le condizioni di coltura. Come fonte per il reperimento delle cellule staminali mesenchimali è stato scelto il tessuto adiposo

data la sua distribuzione ubiquitaria, la metodica poco invasiva con cui può realizzarsi il suo prelievo e la buona resa quantitativa.

L'adesione delle cellule staminali al supporto polimerico consentirebbe, in una fase successiva, di ottenere la costituzione di un *monolayer* endoteliale funzionale ed omogeneo che potrebbe gettare le basi per la costituzione di un neovasolo dalle caratteristiche anatomiche e funzionali sovrapponibili a quelle dei condotti vascolari nativi dell'ospite.

Nell'ambito della realizzazione di questo studio preliminare si è proceduto ad effettuare i seguenti step:

- Allestimento del bioreattore per la coltura dinamica delle cellule staminali
- Estrazione di cellule staminali da campioni di tessuto adiposo prelevato da ratti Wistar tenuti in regime ipercalorico
- Coltura dinamica delle cellule isolate all'interno del bioreattore
- Coltura statica delle cellule isolate in piastra Petri
- Analisi istologica dei campioni ottenuti

2. PARTE SPERIMENTALE

2.1 Materiale

Gli scaffold polimerici sono stati realizzati presso il Dipartimento di Ingegneria Chimica, Gestionale, Informatica, Meccanica (DICGIM) dell'Università degli Studi di Palermo. Il polimero di partenza utilizzato è l'acido poli-L-lattico (PLLA) derivato dalla polimerizzazione degli enantiomeri di tipo L dell'acido lattico.

2.2 Metodi

Il sistema ternario utilizzato in questo studio è composto dal polimero: PLLA RESOMERR L 209 S (Boehringer-Ingelheim) con viscosità 3 dl/g, dal solvente: dioxane 1,4 (Sigma-Aldrich) e dal non-solvente: acqua.

Il protocollo di preparazione dello scaffold può essere suddiviso in tre step:

1. Dip-coating (rivestimento di un supporto in vetro con una soluzione polimerica diossano/PLLA);
2. Immersione in uno o più bagni di coagulazione;
3. Essiccamento

Il primo step consiste nell'estrazione di un'anima di vetro delle dimensioni di 15x50 mm e spessore di 5 mm dalla soluzione diossano-PLLA. In questo modo il supporto viene rivestito da uno strato omogeneo di soluzione polimerica con spessore costante. La concentrazione della soluzione, la velocità di estrazione e la temperatura utilizzate sono state 8% wt PLLA, 5cm/min e 30°C, rispettivamente. Il secondo step prevede l'immersione consecutiva in due bagni mantenuti ad una temperatura costante di 30°C per un tempo di 5 minuti.

Il terzo step si basa sull'essiccamento del PLLA per 24 h in un ambiente con temperatura ed umidità controllate.

La microscopia elettronica a scansione (Philips SEM quanta FEI, at 10 kV) è stata usata per analizzare la struttura dello scaffold realizzato.

2.3 Isolamento di CSM da tessuto adiposo e mantenimento in coltura

Il tessuto adiposo sottocutaneo è stato prelevato dai ratti tramite ago-aspirazione, previa anestesia, effettuata con l'uso di Medetomidina 0,5 mg/ml al dosaggio di 15 mcg/kg. Tale procedura è stata eseguita secondo quanto previsto dal D.L. 116/92 e dalla Direttiva 201/63/UE. Il tessuto adiposo prelevato è immerso in soluzione salina addizionata di antibiotici e antimicotici al 5% (penicillina, streptomina ed amfotericina b) e mantenuto un'ora a temperatura ambiente per favorire la decontaminazione da eventuali agenti microbici. Il campione viene pesato, frammentato meccanicamente e sottoposto a ripetuti lavaggi (almeno 3) con Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, *PAA the Cell Culture Company*) addizionata di antibiotici e antimicotici al 2%. Dopo aver eliminato la soluzione salina, il campione viene posto in una beuta con una soluzione di collagenasi tipo 1A (*GIBCO*) allo 0,2% (20 ml di enzima/grammo di tessuto da digerire), in Phosphate Buffered Saline (PBS) addizionato di antibiotici all'1%. La collagenasi agisce sul collagene, che compone la matrice extracellulare, permettendo l'isolamento cellulare dallo stroma che compone il tessuto adiposo. Il PBS è una soluzione salina a base acquosa contenente cloruro e fosfato di sodio o, in alcune formulazioni, cloruro e fosfato di potassio. I gruppi fosfato del buffer permettono di mantenere costante il pH. Il campione viene posto a 37°C in bagno termostatico, in agitazione, per 2-3 ore fino a completa digestione. Al termine del processo, l'attività dell'enzima viene neutralizzata aggiungendo Siero Fetale Bovino (SFB, *Euro Clone*) al 20%. Quindi, il tessuto digerito viene filtrato attraverso garze sterili, posto in tubi da 50 ml e centrifugato a 2700 giri per 10 minuti a temperatura ambiente. Il surnatante, ricco di goccioline lipidiche derivate dalla disgregazione degli adipociti, è eliminato. Il pellet cellulare ottenuto viene risospeso in 10 ml di Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (1 g/L di glucosio), addizionato di SFB al 20% e contenente una soluzione di antibiotici-antimicotici al 1%, e centrifugato 2 volte a 1400 giri per 10 minuti a temperatura ambiente. Il pellet viene risospeso in 10 ml di terreno nuovo, filtrato attraverso filtri da 70 µm e

centrifugato nuovamente, seguendo le precedenti condizioni, al fine di eliminare ogni residuo di soluzione enzimatica.

Il pellet, infine, viene risospeso in 3 ml di terreno e viene eseguita una conta di vitalità cellulare con Trypan Blue in camera di Burker. Poiché il colorante è in grado di penetrare solo all'interno delle cellule la cui membrana cellulare è disgregata, alla visione al microscopio, le cellule vive avranno un citoplasma chiaro, mentre quelle non vitali si coloreranno di blu. Le cellule vengono poste in fiasche da 25 cm² ad una concentrazione di 50.000 cellule/ml di terreno ed incubate a 37°C in atmosfera di CO₂ al 5%.

Dopo 48 ore di incubazione, viene eseguito il primo cambio di terreno per eliminare la componente cellulare non adesa (cellule ematiche fisiologicamente presenti nel tessuto). Quando le cellule mesenchimali in coltura hanno raggiunto una confluenza di circa l'80% vengono effettuate le subcolture (passaggi cellulari) che prevedono un preliminare trattamento enzimatico. Il terreno viene aspirato e le piastre vengono sottoposte a lavaggio con PBS. La soluzione viene eliminata, si aggiunge la soluzione enzimatica tripsina 0,05% - EDTA 0,02% in modo da indebolire le interazioni cellulari, consentendo il distacco delle cellule dalla plastica a cui aderiscono. La tripsina, un enzima proteolitico, ha specificità per lisina e arginina, mentre l'EDTA è un chelante degli ioni bivalenti implicati nell'interazione cellulare. Le cellule vengono incubate per qualche minuto a 37°C e successivamente l'azione della tripsina viene bloccata con terreno contenente SFB. La sospensione cellulare viene raccolta in tubi da 15 ml e centrifugata. Il pellet ottenuto è risospeso in DMEM (1g/L di glucosio) addizionato di SFB al 20% e una soluzione di antibiotici-antimicotici al 1%. Al termine di ogni passaggio cellulare si effettua la conta con camera di Burker e si seminano 50.000 cellule/ml di terreno e vengono incubate a 37°C al 5% di CO₂.

2.4 Controlli microbiologici

I controlli microbiologici, atti ad escludere la presenza di agenti contaminanti quali batteri e miceti vengono eseguiti sul tessuto, immediatamente dopo il prelievo dall'animale e sulle cellule ottenute mediante la procedura di isolamento. Batteri e miceti possono contaminare sia i substrati cellulari che i mezzi di coltura mentre i

micoplasm, batteri endocellulari sprovvisti di parete, sono usualmente responsabili della contaminazione delle colture.

In particolare, la presenza di batteri e miceti è rilevata mediante controllo macroscopico del mezzo di coltura, che se inquinato si presenta torbido e virato di colore per acidificazione del pH rilevata da un opportuno indicatore. Per escludere del tutto eventuali contaminazioni, il materiale in esame viene seminato in substrati che consentono la crescita di batteri e miceti, quali Agar Sangue, Plate Coun Agar (PCA) e Agar Sabouraud.

2.5 Semina e coltura statica

Nel lume dello scaffold tubulare sono state seminate 5×10^5 cellule/ml di terreno all'interno di una piastra Petri con l'aggiunta di 6 ml di Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (1 g/L di glucosio), addizionato di SFB al 10% e contenente una soluzione di antibiotici-antimicotici al 1%. Il mezzo di coltura è stato cambiato ogni due giorni (fig. 8-9).

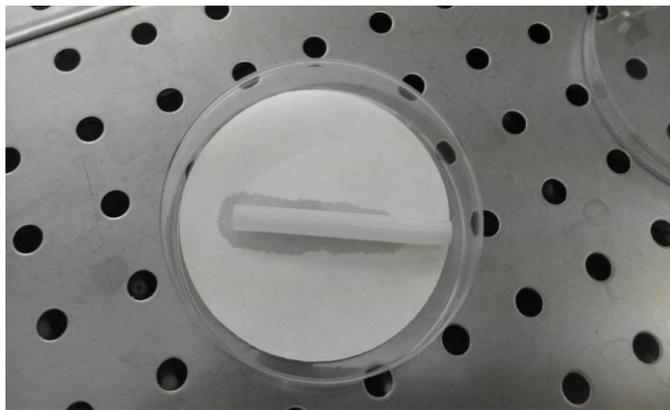


Figura 8. Rappresentazione grafica dello scaffold posto all'interno della piastra Petri

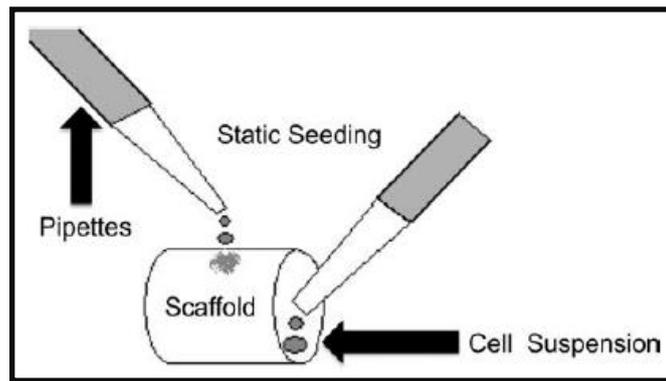


Figura 9. Semina statica

2.6 Progettazione di un bioreattore a flusso continuo

Il bioreattore è stato realizzato tenendo conto di alcuni aspetti quali la possibilità di perfondere il lume dello scaffold durante la coltura; l'ottimizzazione del trasporto di massa; la modularità dei componenti; la minimizzazione degli ingombri del dispositivo necessaria per consentire il posizionamento dello stesso nell'incubatore. L'utilizzo dell'incubatore è stato necessario per consentire il mantenimento della temperatura costante a 37 °C e dell'atmosfera di CO₂ al 5%.

Il circuito proposto risulta costituito da (fig. 10):

- pompa roller;
- tubi;
- reservoir;
- camera di supporto
- piastra agitante

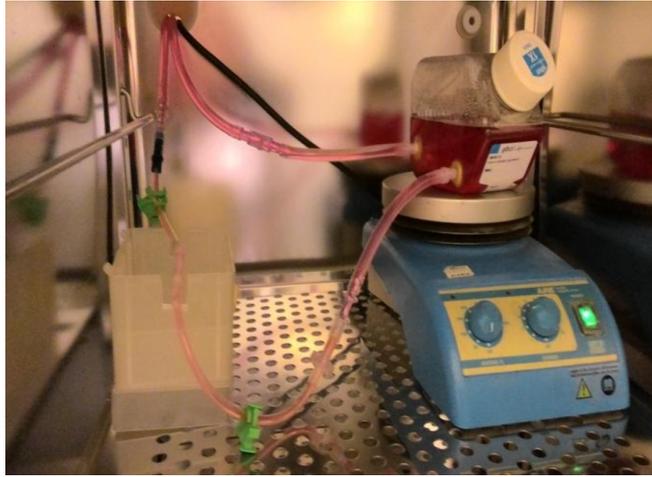


Figura 10. Rappresentazione grafica del circuito utilizzato

La pompa ha la funzione di generare un flusso di medium senza compromettere la sterilità dello stesso. Le caratteristiche generali ricercate sono state: ampio range di flusso, adattabilità alla specifica applicazione; ridotto sviluppo di calore con l'uso prolungato.

Tra le pompe prese in esame, è stata scelta la Sarns 8000 Roller Pump Terumo che viene in genere utilizzata per la circolazione extracorporea del sangue nella perfusione arteriosa, regionale, e in caso di bypass cardiopolmonare (fig. 11).

Le dimensioni di questa pompa sono molto contenute (35.6 x 20.8 x 50.0 cm) ed il voltaggio è 220/240 V. Consente di ottenere una portata superiore ai 6 L/min .



Figura 11 Pompa collegata al circuito

I tubi proposti per il circuito sono in P.V.C. NO-DEHP (senza ftalati) così come i connettori (Smiths Medical). I tubi sono collegati al reservoir per permettere la circolazione continua del terreno di coltura all'interno del lume dello scaffold polimerico.

Al di sotto del reservoir si pone una piastra agitante per consentire il rimescolamento continuo del medium di coltura.

La camera del bioreattore rappresenta l'elemento di supporto dello scaffold, in quanto, oltre ad alloggiare lo stesso, funge da sostegno per i componenti del sistema. Essa è costituita da una base rettangolare con due accessi laterali che permettono l'inserimento dello scaffold tubulare e il passaggio dei tubi e (fig. 12).

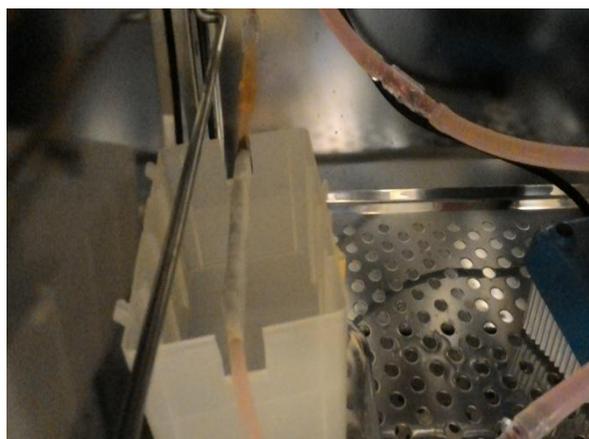


Figura 12. Scaffold alloggiato all'interno della camera di supporto

All'interno della camera quindi è alloggiato lo scaffold e dalle sue estremità si dipartono due tubicini: uno che dal costruito raggiunge il reservoir e l'altro che partendo dalla pompa raggiunge il costruito.

2.7 Semina e coltura dinamica

Nel bioreattore precedentemente descritto sono state seminate 2.0×10^6 cellule/ml di terreno. Il mezzo di coltura è stato fatto fluire nel lume dello scaffold per un periodo di 3 giorni ad una temperatura costante di 37°C e un'atmosfera di CO_2 al 5%.

2.8 Tecniche istologiche

Al termine della procedura sperimentale si procede all'estrazione del costrutto dal bioreattore e al campionamento dei vari pezzi. I campioni sono stati posti in formalina neutra tamponata secondo Lillie al 10% v/v (pH 6,8-7) per 24 h in rapporto volumetrico tessuto/fissatore di 1/20. I pezzi sono stati quindi lavati e sottoposti ai processi di disidratazione e di diafanizzazione. La disidratazione prevede i seguenti passaggi in: alcool 70 per 2 ore, alcool 96° per 12 ore, alcool 100° per 3 ore. Una volta allontanata l'acqua, i pezzi sono stati posti in xilolo per 3 ore. Tappa successiva dopo la disidratazione e la diafanizzazione dei pezzi, è stata l'inclusione in paraffina. Questa ha richiesto due momenti: 1) imbibizione (o colata) in paraffina molle a 37°C e 2) l'inclusione vera e propria, in paraffina dura a 56-60°C. La prima fase, della durata 2 ore, è stata eseguita in termostato a 60°C, ponendo il pezzo in appositi recipienti contenenti paraffina liquida, tale passaggio determina che lo xilolo possa evaporare facilmente e cedere il posto alla paraffina per ottenere la completa imbibizione del preparato. In seguito, il preparato è stato posto in un apposito stampo metallico in cui si è colata precedentemente paraffina liquida; il blocchetto così ottenuto si lascia solidificare a temperatura ambiente o, meglio, in frigorifero a 4°C. A questo punto si effettua il taglio al microtomo a slitta. Eseguito il taglio la sezione viene depositata in una vaschetta a circa 40-44° C contenente soluzione fisiologica (o acqua distillata) a temperatura ambiente; questa operazione è stata eseguita con un pennelletto, per evitare che la sezione resti adesa alla lama. La sezione è stata raccolta mediante un vetrino portaoggetti che successivamente è stato posto sull'apposito cestello per le successive fasi di colorazione. Il cestello porta vetrini è stato immerso in una bacinella di Schiefferdecker contenente xilolo (o toluolo) per circa 10 minuti; avvenuta la sparaffinatura, per procedere alla colorazione, occorre che i preparati siano di nuovo idratati, per creare affinità con le sostanze coloranti, che, in genere, sono in soluzione acquosa. I vetrini sono stati quindi posti in vaschette contenenti alcool 100°, alcool 96°, alcool 80°, alcool 50°. I passaggi sono stati eseguiti per pochi minuti ciascuno, agitando il cestello. Per togliere l'eccesso di alcool dai preparati il cestello è stato immerso in un recipiente con acqua di fonte, ed è stato agitato finché le tracce di alcool non sono scomparse. A questo punto il preparato è stato poi colorato. La colorazione con Ematossilina-Eosina ha previsto l'uso delle seguenti soluzioni: Emallume di Meyer, Eosina allo 1 % in acqua distillata. Metodo:

l'ematossilina è stata lasciata ad agire per 15 minuti, successivamente, si è effettuato un lavaggio in acqua corrente per 15 minuti per consentire il differenziamento dei nuclei. È stata quindi aggiunta l'eosina per 1 minuto; la sezione è stata, poi, lavata in acqua, disidratata e chiarificata. I vetrini sono stati montati con il coprioggetto utilizzando una goccia di balsamo del Canada e sono stati lasciati ad aderire in stufa.

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 Produzione degli scaffold mediante DIPS

Il polimero di partenza utilizzato per la preparazione degli scaffold è stato l'acido poli-L-lattico (PLLA) ottenuto dalla polimerizzazione degli enantiomeri di tipo L dell'acido lattico.

Gli scaffold sono stati preparati mediante una tecnica detta Separazione di fase indotta dalla diffusione (DIPS). Si procede tramite la preparazione di una soluzione all'8% in peso di PLA.

Il polimero distribuito sotto forma di pellets, viene disciolto in diossano tramite agitatore magnetico sotto cappa ad una temperatura di 90°C. Nell'arco di due ore la sua dissoluzione è completa. La soluzione viene inserita in un bagno termostato a 35°C, temperatura sufficiente a mantenere una buona viscosità ed omogeneità della soluzione stessa.

Viene quindi immersa al suo interno un'anima di vetro che serve da supporto su cui realizzare lo scaffold. Il supporto viene estratto verticalmente a velocità costante e su esso aderisce un certo spessore di soluzione polimerica.

La velocità di estrazione è regolabile tramite un software (lab view) che consente di agire direttamente sulla velocità di rotazione del motore elettrico su cui il supporto è fissato.

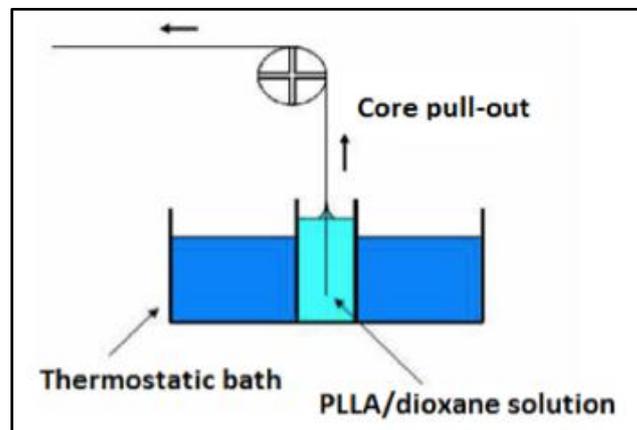


Figura 13. Rappresentazione schematica del processo di dip coating nella fase iniziale

Al fine di effettuare un'estrazione verticale del supporto dal bagno contenente la soluzione, la sua estremità è stata legata ad un piccolo peso di piombo che si adagia sul fondo del recipiente in cui è presente la soluzione. Il supporto così preparato viene fissato sull'albero motore e viene estratto a velocità costante. In questo caso, la velocità di estrazione è risultata pari a 5 cm/min. Con questo meccanismo di "dip coating", l'anima di vetro che viene estratta si presenta bagnata da uno strato di soluzione viscosa come schematicamente mostrato in figura 13. Lo strato di soluzione presenterà uno spessore dipendente da diversi fattori; fra questi si devono sicuramente annoverare la viscosità (e tutto ciò che la influenza come la sua temperatura e la concentrazione di polimero) e la velocità di estrazione.

Una volta estratta tutta l'anima immersa nella soluzione si arresta il motore e molto rapidamente il supporto ricoperto viene immerso completamente in un recipiente contenente una miscela diossano/acqua per 5 minuti. Successivamente, si effettua un passaggio in un secondo bagno contenente il non solvente, l'acqua, alla stessa temperatura della soluzione polimerica per un tempo di 10 minuti.

All'interno di questo recipiente il processo di separazione di fase indotto dalla diffusione (DIPS) si avvia immediatamente (fig. 14). L'acqua diffonde attraverso la soluzione polimerica e, sciogliendosi in essa, genera un sistema ternario polimero/diossano/acqua che tende a smiscelare in due fasi: una ricca in polimero (fase continua) ed una ricca in solventi (fase dispersa).

Mentre il fenomeno prosegue, per via della differenza di concentrazione tra la fase liquida esterna (acqua) e la fase liquida interna (acqua e altri componenti), avviene anche una contro-diffusione del diossano verso l'esterno, che abbassa ulteriormente la solubilità del polimero, favorendo così la cristallizzazione. Il tempo di mantenimento del sistema nel bagno di acqua determina le caratteristiche finali dello scaffold prodotto, in quanto influenza la cinetica di separazione di fase con il conseguente accrescimento della fase dispersa, responsabile della porosità e dell'interconnessione all'interno dello scaffold.

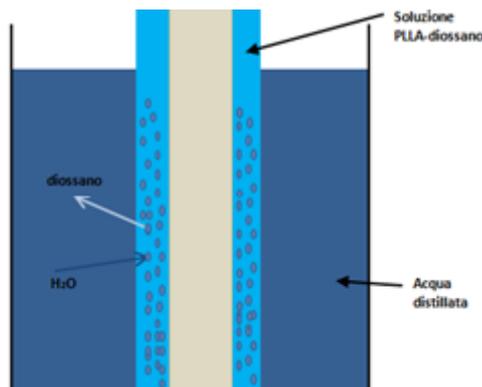


Figura 14. Rappresentazione schematica del processo di DIPS

Trascorso il tempo di mantenimento prestabilito, il campione estratto dal bagno contenente acqua viene lasciato all'atmosfera a temperatura ambiente per tre giorni al fine di consentire l'evaporazione del diossano e dell'acqua.

Al termine di questa procedura si ottiene un supporto di vetro avvolto da un sottile strato di PLLA che dovrà essere estratto con opportuni metodi, cercando di ottenere uno scaffold tubolare il più integro possibile. Il diametro interno dello scaffold tubolare che si ottiene è pari al diametro dell'anima di vetro utilizzata.

La scelta del vetro come materiale costituente il supporto inerte è stata effettuata sulla base delle informazioni fornite da test preliminari con diversi materiali (metalli o altri polimeri). Si è osservato come questi ultimi fornissero scaffold con porosità decrescente lungo lo spessore e talvolta inesistente in corrispondenza della superficie interna. Al contrario, per il vetro si è riscontrata una notevole bagnabilità del supporto con la soluzione polimerica. Nel caso specifico del PLLA è stata rilevata una buona porosità sulla superficie interna dello scaffold, quella a contatto con il supporto, ed una porosità distribuita piuttosto omogeneamente lungo tutto lo spessore. Inoltre, il vetro è facilmente reperibile ed anche economico.

Come solvente per realizzare la soluzione di PLLA è stato scelto l'1,4-diossano, poichè esso presenta un elevato potere solvente nei confronti del polimero utilizzato ed è sufficientemente volatile ($T_{eb}=101^{\circ}\text{C}$) per permettere un'evaporazione relativamente rapida. Il terzo componente, scelto come cattivo solvente, è stato l'acqua; scelta per la facile reperibilità, il basso costo, l'atossicità, il bassissimo potere solvente nei confronti del PLLA e la completa miscibilità nel diossano in tutte le proporzioni. In letteratura vengono riportati anche metanolo ed etanolo, come

sostanze impiegabili come cattivi solventi in soluzioni contenenti PLLA; in questa fase della ricerca, anche a causa della maggiore volatilità rispetto all'acqua, non sono stati presi in considerazione.

3.2 Caratterizzazione fisica degli scaffold

Alcuni parametri tra cui la concentrazione del polimero, la viscosità e la densità della soluzione, la velocità di formazione della struttura giocano un ruolo importante nel determinare lo spessore della parete dello scaffold. Diverse prove hanno dimostrato che lo spessore dipende esponenzialmente dalla velocità di estrazione (fig. 15).

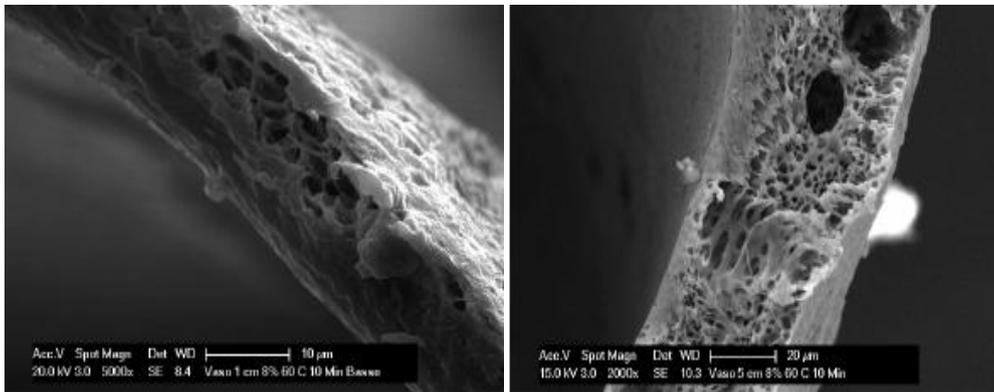


Figura 15. Microscopia SEM dello scaffold preparato con diverse velocità di estrazione dalla soluzione PLLA/diossano. A sinistra: 2,4 cm/min; a destra: 14,4 cm/min.

Gli scaffold ottenuti nel presente studio presentano un lume di 5 mm di diametro, la loro superficie interna risulta omogenea e presenta dei micropori del diametro di 1-2 μm (fig. 16). Hanno morfologia tubulare e presentano una lunghezza variabile da circa 5 a 7 cm.

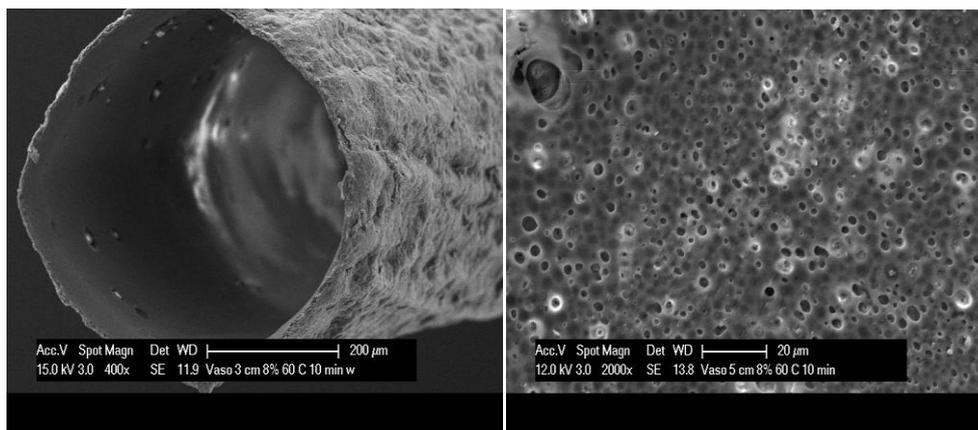


Figura 16. Microscopia SEM del lume e della superficie interna dello scaffold

Nell'ambito dell'ingegneria dei tessuti il PLLA è un polimero ampiamente utilizzato nella preparazione di presidi biomedicali e le sue caratteristiche di biocompatibilità sono ormai note dalla letteratura. Sulla base di ciò è stato utilizzato come materiale di partenza per la costruzione dello scaffold impiegato nel presente studio. Studi effettuati in precedenza hanno messo in luce che questo materiale può consentire la crescita e la riorganizzazione spaziale di cellule endoteliali di origine umana poste in coltura sulla sua superficie per 21 giorni (fig. 17).

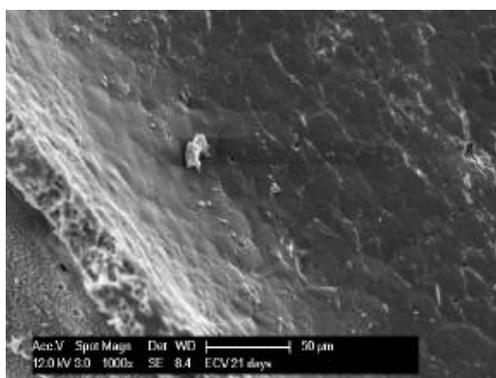


Figura 17. Microscopia SEM di cellule endoteliali cresciute all'interno dello scaffold
dopo 21 giorni di coltura

Queste evidenze hanno spinto all'impiego di tale supporto quale impalcatura per cellule staminali poste in coltura all'interno del bioreattore messo a punto e, al contempo, per le stesse nel tradizionale metodo di coltura statica.

3.3 Isolamento e mantenimento in coltura di CSM da tessuto adiposo

Le CSM sono state isolate con successo dal tessuto adiposo, hanno raggiunto la semiconfluenza (80%) in fiasche da 25 cm² in 5-6 giorni, mantenendo il tipico aspetto fibroblastoide. Sono state effettuate subcolture fino al passaggio cellulare al quale è stato possibile osservare il mantenimento del fenotipo caratteristico e apprezzabili livelli di vitalità in coltura. Per 4 campioni, è stato possibile osservare crescita cellulare fino al decimo passaggio (fig. 18), per gli altri campioni si è proceduto, in media, fino alla quinta subcoltura.

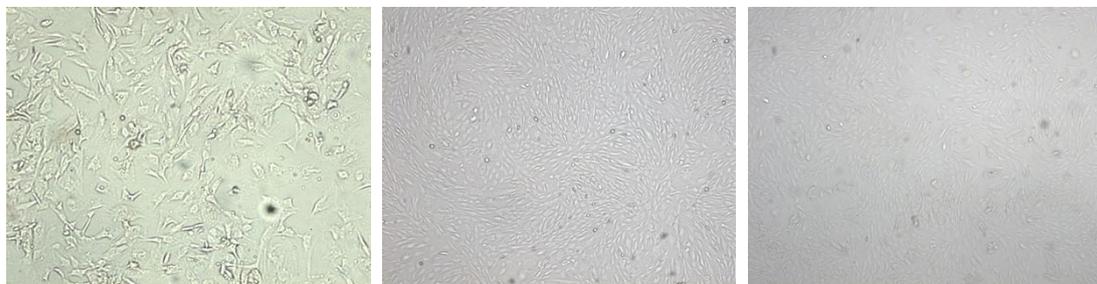


Figura 18. CSM estratte da tessuto adiposo a diversi passaggi cellulari. A sinistra il passaggio 0, al centro il passaggio 6 e a destra il passaggio 10.

È stata eseguita una conta di vitalità cellulare con Trypan Blue in camera di Burker. Le cellule sono state poste ad una concentrazione di 5×10^5 cellule/ml sulla superficie interna dello scaffold all'interno di una piastra Petri con la successiva aggiunta del mezzo di coltura e ad una concentrazione di 2×10^6 cellule/ml all'interno del sistema di coltura dinamica realizzato all'interno di un incubatore per permettere il mantenimento di una temperatura costante e la presenza di un'atmosfera di CO₂ al 5%.

3.4 Controlli microbiologici

I controlli microbiologici, eseguiti sui campioni di tessuto adiposo, al momento del prelievo, e sulle cellule, eseguito il protocollo di estrazione, sono risultati negativi a contaminazioni da batteri e miceti. Si ha, quindi, conferma che il prelievo del tessuto e la manipolazione delle colture cellulari sono stati condotti in condizioni di sterilità.

3.5 Analisi istologica

Sono state ricavate delle sezioni sia dello scaffold inserito all'interno del sistema dinamico sia dello scaffold posto in coltura in piastra Petri.

Come controllo sono state utilizzate delle sezioni contenenti solo PLLA (fig. 19).



Figura 19. Sezioni ricavate dallo scaffold tubulare prima dell'effettuazione della coltura

Nel caso del sistema dinamico, dopo 3 giorni di coltura è stato possibile prelevare dei campioni associabili alla presenza di una struttura ben organizzata con pori strettamente interconnessi tra di loro ma non è stata rilevata la presenza di cellule sul materiale.

Questo dato è da ricondurre probabilmente al breve periodo di coltura all'interno del sistema utilizzato legato ad una limitata resistenza meccanica dello scaffold sottoposto alla pressione di un flusso continuo di medium di coltura. Si presuppone che una permanenza più lunga dello scaffold all'interno del bioreattore avrebbe potuto consentire l'adesione cellulare e quindi l'ottenimento di sezioni con uno strato cellulare dalla presenza apprezzabile. I campioni derivati dalla coltura in piastra sono stati prelevati a due diversi intervalli di tempo: 7 giorni e 17 giorni. Dopo 7 giorni è stata rilevata la presenza in alcuni punti di cellule dalla morfologia fibroblastoide adese alla superficie interna dello scaffold (figg. 20-21).

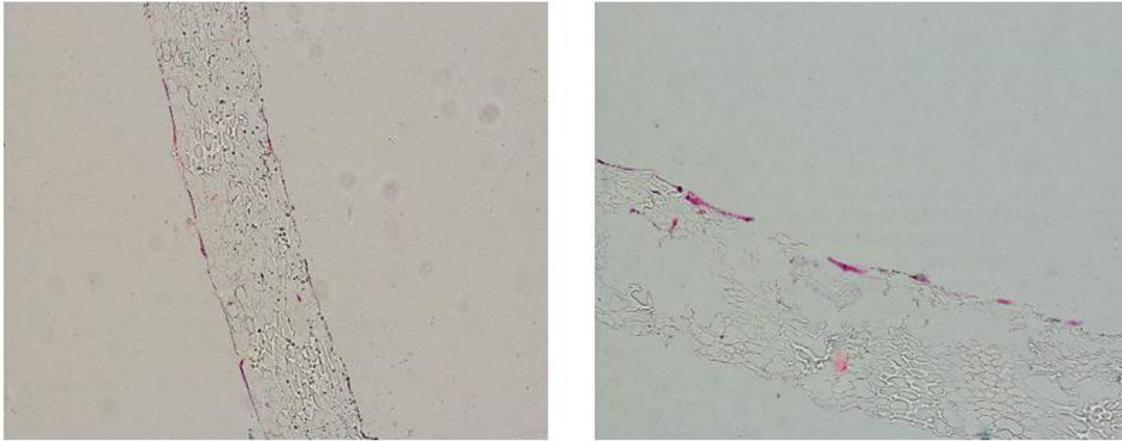


Figura 20. Ematossilina-Eosina (10x) PLLA dopo 7 giorni di coltura in piastra Petri

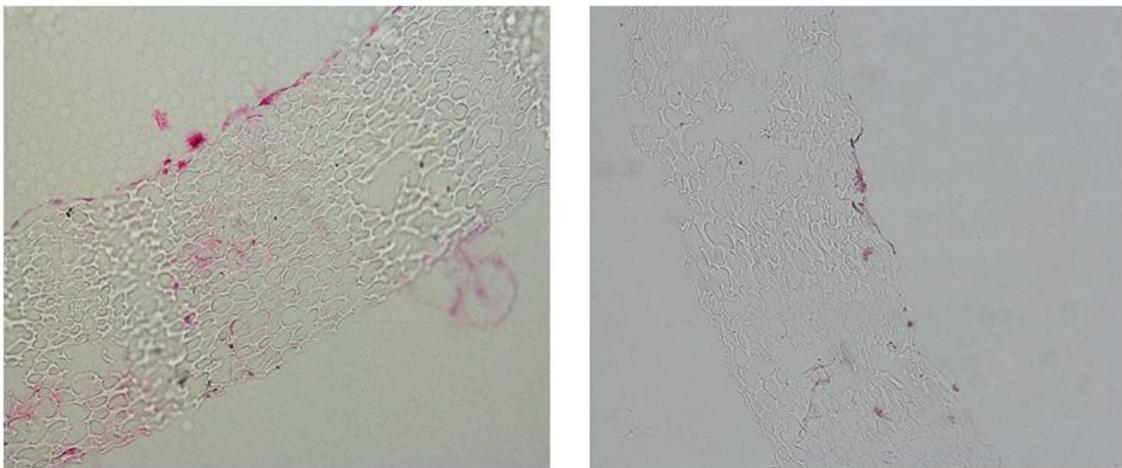


Figura 21. Ematossilina-Eosina (20x) PLLA dopo 7 giorni di coltura in piastra Petri

Allo stesso modo nei campioni prelevati dopo 17 giorni è stata osservata la presenza di cellule adese in alcune zone superficiali del materiale (figg. 22 -23).

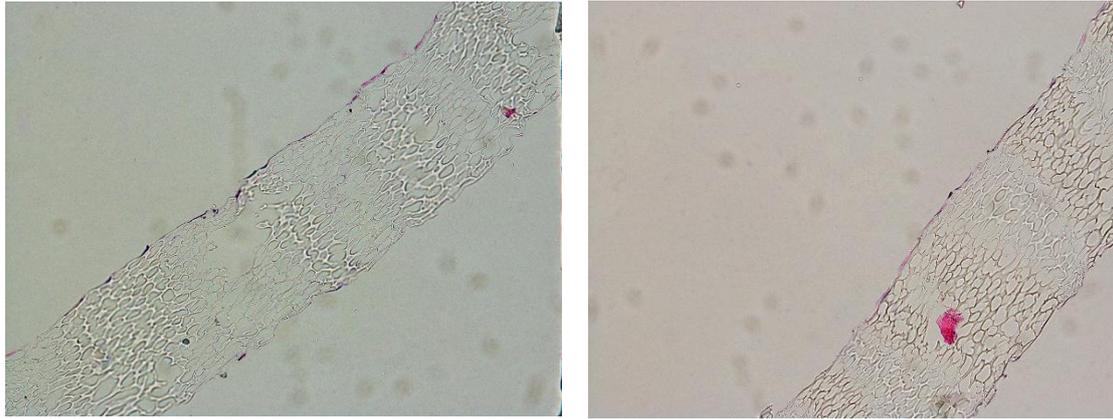


Figura 22. Ematossilina-Eosina (10x) PLLA dopo 17 giorni di coltura in piastra Petri

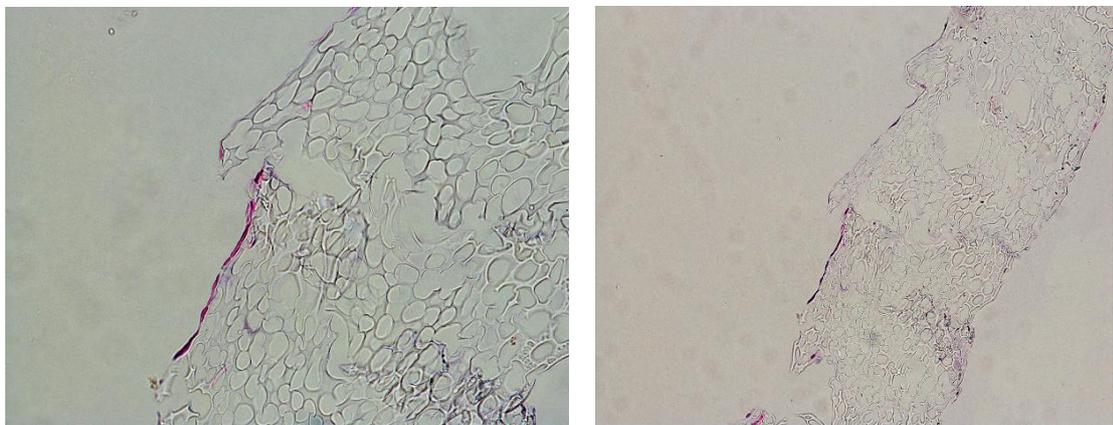


Figura 23. Ematossilina-Eosina (20x) PLLA dopo 17 giorni di coltura in piastra Petri

E' stato osservato che sui campioni derivati dalla coltura statica prelevati a due diversi time point (7 giorni e 17 giorni) è possibile rilevare la presenza in alcuni punti di cellule dalla morfologia fibroblastoide. Tali cellule tendono ad ancorarsi sulla superficie interna dello scaffold senza penetrare all'interno della struttura porosa. I dati ottenuti dalle due condizioni di coltura hanno lasciato presupporre che l'assenza di cellule nei campioni derivati dal sistema dinamico sia da imputare al breve periodo di coltura all'interno del bioreattore causato da un'insufficiente resistenza meccanica del materiale sottoposto ad un certo regime pressorio per garantire un flusso continuo del medium di coltura. Sebbene ci sia senz'altro ancora molta strada da fare per ottenere un vaso ingegnerizzato che sia simile ad un vaso nativo, lo studio preliminare oggetto di questa tesi ha permesso di ottenere dei primi risultati indicativi senza i

quali non ci si potrebbe orientare verso l'ottimizzazione dei diversi parametri coinvolti mostrando come sia possibile combinare insieme diverse conoscenze e coordinare tutti gli step che stanno alla base della costituzione di un nuovo tessuto in vitro: la fabbricazione di uno scaffold, il prelievo delle cellule da un modello animale, l'isolamento e l'espansione in coltura, l'allestimento di un bioreattore.

Il bioreattore è stato ideato su scala ridotta per consentirne il posizionamento all'interno di un incubatore. La modularità dei vari componenti che lo costituiscono ha permesso di effettuare in modo agevole in un primo tempo la sterilizzazione e, in un secondo tempo, il settaggio del flusso e la semina cellulare. La configurazione del sistema è stata pensata per permettere l'alloggiamento di uno scaffold tubulare e per consentire il ricircolo continuo del medium di coltura.

L'isolamento delle cellule staminali mesenchimali da tessuto adiposo di ratto è stato effettuato con successo e ha consentito di ottenere un buon numero di cellule. Il materiale è stato realizzato con una tecnica basata sulla separazione di fase ed, in studi precedenti, era stato già utilizzato quale supporto per la crescita cellulare. Nel complesso, è possibile dire che il materiale ha mostrato di interagire positivamente con le cellule staminali estratte da tessuto adiposo tuttavia, quando sottoposto al regime pressorio applicato per consentire il flusso del medium di coltura, ha mostrato una limitata resistenza meccanica. Sulla base di ciò è auspicabile una prosecuzione degli studi in futuro realizzando un *coating* del materiale utilizzato con collagene, fibrina o laminina. Infatti, l'utilizzo di uno di questi componenti della matrice extracellulare per il rivestimento della superficie luminale dello scaffold potrebbe far incrementare in modo significativo l'adesione iniziale, ma anche lo *spreading* e la proliferazione cellulare. Un'altra strada da percorrere potrebbe essere quella di effettuare un piccolo ridimensionamento del sistema utilizzando un volume minore di medium e un reservoir di dimensione più piccola. Infatti, si ritiene che il volume di medium utilizzato in questo studio, pari a 350 ml, abbia probabilmente esercitato una certa influenza sulla scarsa densità cellulare finale.

4. CONCLUSIONI

Le sfide che l'ingegneria tissutale deve affrontare per la realizzazione in vitro di sostituti vascolari prima e per accertarne la funzionalità in vivo poi sono molteplici. Tuttavia, vi è ancora oggi una forte necessità di impianti utilizzabili in ambito clinico per cui la ricerca deve tentare di trovare sempre nuove soluzioni alle problematiche che si presentano.

La definizione della configurazione ideale di bioreattore deve prendere in considerazione diversi aspetti e cercare di realizzare un equilibrio perfettamente bilanciato tra la velocità di flusso del mezzo, l'apporto di ossigeno e nutrienti e la forza meccanica a cui le cellule sono sottoposte.

Sulla base di ciò, la messa a punto di un bioreattore risulta estremamente complessa in quanto è necessario valutare tutta una serie di fattori, tra cui la tipologia di scaffold da utilizzare, la fonte cellulare, l'influenza dei fattori fluidodinamici e il mantenimento costante della temperatura e del grado di umidità.

Il presente studio preliminare è stato condotto grazie all'unione di diverse competenze interdisciplinari in ambito biotecnologico, medico, ingegneristico, e ha avuto come scopo quello di valutare gli effetti che possono derivare da una coltura di tipo dinamico rispetto ad una coltura di tipo statico. Le condizioni prescelte per la coltura di tipo dinamico non si sono rivelate tali da consentire l'adesione e la crescita cellulare. Al contrario, la coltura di tipo statico ha permesso di individuare in alcuni punti della superficie luminale del materiale cellule di natura staminale.

Questa esperienza preliminare, nonostante la mancata presenza di cellule, rappresenta il primo fondamentale passo che ha consentito di evidenziare che il materiale può interagire positivamente con le cellule staminali e che il bioreattore allestito può supportare la coltura di tali cellule migliorando il trasporto di massa e ricreando le forze meccaniche presenti in vivo. Ci si propone in futuro di proseguire gli studi effettuando un *coating* del materiale con collagene, ridimensionando il reservoir e il volume di medium utilizzati oppure valutando un possibile uso di cellule staminali già differenziate in senso endoteliale.

BIBLIOGRAFIA

1. Caplan AI, Bruder SP. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends Mol Med*. 2001; 7(6):259-64.
2. Levesque MJ and Nerem RM. The elongation and orientation of cultured endothelial cells in response to shear stress. *J Biomech Eng* 1985; 107(341).
3. Franke RP, Grafe M, Schnittler H, Seiffge D, Mittermayer C, Drenckhahn D. Induction of human vascular endothelial stress fibres by fluid shear stress. *Nature* 1984; 307(648).
4. Kinney MA, Sargent CY, McDevitt TC. The Multiparametric Effects of Hydrodynamic Environments on Stem Cell Culture. *Tissue Engineering Part B*. 2011; 17(4).
5. Davies PF, Remuzzi A, Gordon EJ, Dewey CF, Gimbrone MA. Turbulent fluid shear stress induces vascular endothelial cell turnover in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83:2114.
6. Yamamoto K, Takahashi T, Asahara T, Ohura N, Sokabe T, Kamiya A, et al. Proliferation, differentiation, and tube formation by endothelial progenitor cells in response to shear stress. *J Appl Physiol* 2003; 95(5):2081-8.
7. Meng X, Leslie P, Zhang Y, Dong J. Stem cells in a three-dimensional scaffold environment. *SpringerPlus* 2014; 3:80.
8. Wang H, Riha GM, Yan S, Li M, Chai H, Yang H, et al. Shear stress induces endothelial differentiation from a murine embryonic mesenchymal progenitor cell line. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25:1817.
9. Yamamoto K, Sokabe T, Watabe T, Miyazono K, Yamashita JK, Obi S, et al. Fluid shear stress induces differentiation of Flk-1-positive embryonic stem cells into vascular endothelial cells in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 288(H1915).
10. Adamo L, Naveiras O, Wenzel PL, McKinney-Freeman S, Mack PJ, Gracia-Sancho J, et al. Biomechanical forces promote embryonic haematopoiesis. *Nature* 2009; 459(1131).
11. Ahsan T and Nerem RM. Fluid shear stress promotes an endothelial-like phenotype during the early differentiation of embryonic stem cells. *Tissue Eng Part A* 2010; 16(3547).
12. Huang H, Nakayama Y, Qin K, Yamamoto K, Ando J, Yamashita J, Itoh H, Kanda K, Yaku H, Okamoto Y, Nemoto Y. Differentiation from embryonic stem cells to vascular wall cells under in vitro pulsatile flow loading. *J Artif Organs* 2005; 8(2):110-118.
13. Cartmell SH, Porter BD, Garcia AJ & Guldberg RE. Effects of Medium Perfusion Rate on Cell-Seeded Three-Dimensional Bone Constructs in Vitro. *Tissue Eng* 2003; 9:1197-1203.
14. Glowacki J, Mizuno S, Greenberger JS. Perfusion Enhances Functions of Bone Marrow Stromal Cells in Three-Dimensional Culture. *Cell Transplant* 1998; 7:319-326.

15. Ishaug-Riley SL, Crane-Kruger GM, Yaszemski MJ, Mikos AG. Three-Dimensional Culture of Rat Calvarial Osteoblasts in Porous Biodegradable Polymers. *Biomaterials* 1998; 19:1405-1412.
16. Goldstein AS, Juarez TM, Helmke CD, Gustin MC, Mikos AG. Effect of Convection on Osteoblastic Cell Growth and Function in Biodegradable Polymer Foam Scaffolds. *Biomaterials* 2001; 22:1279-1288.
17. Yu X, Botchwey EA, Levine EM, Pollack SR, Laurencin CT. Bioreactor-Based Bone Tissue Engineering: The Influence of Dynamic Flow on Osteoblast Phenotypic Expression and Matrix Mineralization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101:11203-11208.
18. Gomes ME, Reis RL, Mikos AG. Bone Marrow Stromal Cells Cultured on Starch Based Three-Dimensional Scaffolds in a Flow Perfusion Bioreactor: A Promising in-Vitro Approach for Obtaining Bone Tissue Substitutes. *Trans. Orthop Res Soc* 2005; 1743.
19. Zhao F, Ma T. Perfusion Bioreactor System for Human Mesenchymal Stem Cell Tissue Engineering: Dynamic Cell Seeding and Construct Development. *Biotechnology And Bioengineering* 2005; 91(4).
20. Yeatts AB, Geibel EM, Fears FF, Fisher JP. Human mesenchymal stem cell position within scaffolds influences cell fate during dynamic culture. *Biotechnol Bioeng* 2012; 109(9):2381-91.
21. Kleinhans C, Mohan RR, Vacun G, Schwarz T, Haller B, Sun Y, Kahlig A, Kluger P, Finne-Wistrand A, Walles H, Hansmann J. A perfusion bioreactor system efficiently generates cell-loaded bone substitute materials for addressing critical size bone defects. *Biotechnol J* 2015 doi:10.1002/biot.201400813 [Epub ahead of print]
22. Gugerell A, Neumann A, Kober J, Tammaro L, Hoch E, Schnabelrauch M, Kamolz L, Keck M. Adipose-derived stem cells cultivated on electrospun l-lactide/glycolide copolymer fleece and gelatin hydrogels under flow conditions- aiming physiological reality in hypodermis tissue engineering. *Burns* 2015; 41(1):163-71.
23. Ferlin KM, Prendergast ME, Miller ML, Nguyen BB, Kaplan DS, Fisher JP. Development of a Dynamic Stem Cell Culture Platform for Mesenchymal Stem Cell Adhesion and Evaluation. *Mol. Pharmaceutics* 2014; 11: 2172–2181.
24. Kim BS, Putnam AJ, Kulik TJ, Mooney DJ. Optimizing seeding and culture methods to engineer smooth muscle tissue on biodegradable polymer matrices. *Biotechnology and Bioengineering* 1998; 57(1).

25. Song Y, Wennink JW, Kamphnis MM, Sterk LM, Vermes I, Poot AA, Feijen J, Grijpma DW. Dynamic culturing of smooth muscle cells in tubular poly (trimethylene carbonate) scaffolds for vascular tissue engineering. *Tissue Eng Part A* 2011; 17(3-4):381-387.
26. Cerino G, Gaudiello E, Grussenmeyer T, Melly L, Massai D, Banfi A, Martin I, Eckstein F, Grapow M, Marsano A. Three dimensional multi-cellular muscle-like tissue engineering in perfusion-based bioreactors. *Biotechnol Bioeng* 2015 [Epub ahead of print].
27. Polak DJ. Regenerative medicine: a primer for paediatricians. *Early Hum Dev.* 2009; 85(11):685-9.
28. Atala A. Engineering tissues, organs and cells. *J Tissue Eng Regen Med.* 2007; 1(2):83-96.
29. Baron F., Storb R. Stem cell therapy: past, present, and future. In: J.Polak, S.Mantalaris, S.E. Harding, eds. *Advances in tissue engineering*. London: Imperial College Press, 2008.p. 561–591.
30. Ikada Y. Challenges in tissue engineering. *J R Soc Interface.* 2006;3(10):589-601.
31. Corona BT, Ward CL, Harrison BS, Christ GJ. Regenerative medicine: basic concepts, current status, and future applications. *J Investig Med.* 2010; 58(7):849-58.
32. Fodor WL. Tissue engineering and cell based therapies, from the bench to the clinic: the potential to replace, repair and regenerate. *Reprod Biol Endocrinol.* 2003;1: 102.
33. Polak DJ. Regenerative medicine. Opportunities and challenges: a brief overview. *J R Soc Interface.* 2010; 7(6):S777-81.
34. Greenwood HL, Singer PA, Downey GP, Martin DK, Thorsteinsdóttir H, Daar AS. Regenerative medicine and the developing world. *PLoS Med.*2006; 3(9): e381.
35. Vacanti CA. The history of tissue engineering. *J Cell Mol Med.* 2006;10(3):569-76.
36. Petit-Zeman S. Regenerative medicine. *Nat Biotechnol.* 2001; 19(3):201-6.
37. Eaglstein WH, Falanga V. Tissue engineering and the development of Apligraf, a human skin equivalent. *Clin Ther.* 1997; 19(5):894-905.
38. OsirisTherapeutics(2005).Osteocel.Available:http://www.osiristx.com/products_osteocel.php
39. Howard D, BATTERY LD, Shakesheff KM, Roberts SJ. Tissue engineering: strategies, stem cells and scaffolds. *J Anat* 2008; 213(1):66–72.
40. Salgado AJ, Oliveira JM, Martins A, Teixeira FG, Silva NA, Neves NM, Sousa N, Reis RL. Tissue engineering and regenerative medicine: past, present, and future. *Int Rev Neurobiol.* 2013; 108: 1-33.
41. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981; 292(5819):154-6.

42. Thomson JA, Marshall VS. Primate embryonic stem cells. *Curr Top Dev Biol.* 1998; 38: 133-65.
43. Guillot PV, Cui W, Fisk NM, Polak DJ. Stem cell differentiation and expansion for clinical applications of tissue engineering. *J Cell Mol Med.* 2007; 11(5):935-44.
44. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126(4):663-76.
45. Goldspink G. Gene therapy and cell engineering. *Ann R Coll Surg Engl.* 1997;79(4):245-9.
46. Hollander, AP & Wraith, DC 2008, 'Stem Cell Immunology'. in J Polak (ed.), *Advances in Tissue Engineering.* vol. Chapter 10, World Scientific, pp. 199-213.
47. Massia SP, Hubbell JA. Tissue engineering in the vascular graft. *Cytotechnology* 1992; 10(3):189-204.
48. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993; 260:920-926.
49. Rustad KC, Sorkin M, Levi B, Longaker MT, Gurtner GC. Strategies for organ level tissue engineering. *Organogenesis* 2010; 6:151-157.
50. Singh M, Berklund C, Detamore MS. Strategies and applications for incorporating physical and chemical signal gradients in tissue engineering. *Tissue Engineering Part B Rev* 2008; 14(4):341-66.
51. Choi SW, Zhang Y, Xia Y. Three-dimensional scaffolds for tissue engineering: the importance of uniformity in pore size and structure. *Langmuir* 2010; 26 (24):19001-19006.
52. Day RM, Boccaccini AR, Maquet V, Shurey S, Forbes A, Gabe SM, Jerome R. In vivo characterization of a novel bioresorbable poly(lactide-co-glycolide) tubular foam scaffold for tissue engineering applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2004; 15:729-734.
53. Li S, Sengupta D and Chien S. Vascular tissue engineering: from in vitro to in situ. *WIREs Syst Biol Med* 2014, 6:61-76.
54. Abruzzo A, Fiorica C, Palumbo VD, Altomare R, Damiano G, Gioviale MC, Tomasello G, Licciardi M, Palumbo FS, Giammona G, Lo Monte AI. Using polymeric scaffolds for vascular tissue engineering. *International Journal of Polymer Science* Volume 2014, Article ID 689390, 9 pages.
55. II International Consensus Conference on Biomaterials, Chester, Gran Bretagna, 1991
56. Saltzman WM, Baldwin SP. Materials for protein delivery in tissue engineering. *Adv. Drug Delivery Reviews* 1998; 33:71-86.
57. Kim BS, Mooney DJ. Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering. *Trends Biotechnol* 1998; 16:224-230.

58. Pariente JL, Kim BS, Atala A. In vivo biocompatibility assessment of naturally derived and synthetic biomaterials using normal human urothelial cells. *J Biomed Mater Res* 2001; 55:33-39.
59. Pariente JL, Kim BS, Atala A. In vitro biocompatibility evaluation of naturally derived and synthetic biomaterials using normal human bladder smooth muscle cells. *J Urol* 2002; 167:1867- 1871.
60. Li ST. Biologic biomaterials: Tissue-derived biomaterials (collagen). In: JD. Brozino, FL. Boca Raton eds. *The Biomedical engineering handbook*. CRC Press ,1995. p. 627-647.
61. Smidsrod O, Skjak-Breek G. Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends Biotechnol* 1990; 8:71-78.
62. Gunatillake PA, Adhikari R. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. *Eur Cell Mater*.2003; 5:1-16.
63. Gopferich A. Mechanisms of polymer degradation and erosion. *Biomaterials* 1996; 17:103-114.
64. Rydz J, Sikorska W, Kyulavska M, Christova D. Polyester-based (bio)degradable polymers as environmentally friendly materials for sustainable development. *Int J Mol Sci* 2014; 16(1):564-96.
65. La Carrubba V, Carfi Pavia F, Brucato V. Tubular scaffold for vascular tissue engineering application. *Int J Mater Form* 2010; 3(1):567– 570.
66. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop DJ, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8:315–317.
67. Yarak S, Okamoto OK. Human adipose-derived stem cells: current challenges and clinical perspectives. *An Bras Dermatol* 2010;85(5):647-56.
68. Friedenstein AJP, Petrokova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol* 1966; 16:381-390.
69. Zvaifler NJ, Marinova-Mutafchieva L, Adams G, Edwards CJ, Moss J, Burger JA, Maini RN. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res* 2000; 2: 477-488.
70. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001; 7:211-228.

71. Sottile V, Halleux C, Bassilana F, Keller H, Seuwen K. Stem cell characteristics of human trabecular bone-derived cells. *Bone* 2002; 30:699-704.
72. Chunmeng S, Tianmin C. Effects of plastic-adherent dermal multipotent cells on peripheral blood leukocytes and CFU-GM in rats. *Transplant Proc* 2004; 36:1578-81.
73. De Bari C, Dell'Accio F, Vandenabeele F, Vermeesch JR, Raymackers JM, Luyten FP. Skeletal muscle repair by adult human mesenchymal stem cells from synovial membrane. *J Cell Biol* 2003; 160:909-918.
74. Jones EA, English A, Henshaw K, Kinsey SE, Markham AF, Emery P, McGonagle D. Enumeration and phenotypic characterization of synovial fluid multipotential mesenchymal progenitor cells in inflammatory and degenerative arthritis. *Arthritis Rheum* 2004; 50:817-827.
75. Salingcarnboriboon R, Yoshitake H, Tsuji K, Obinata M, Amagasa T, Nifuji A, Noda M. Establishment of tendon-derived cell lines exhibiting pluripotent mesenchymal stem cell-like property. *Exp Cell Res* 2003; 287:289-300.
76. Bosch P, Musgrave DS, Lee JY, Cummins J, Shuler T, Ghivizzani TC, Evans T, Robbins TD, Huard. Osteoprogenitor cells within skeletal muscle. *J Orthop Res.* 2000; 18(6):933-44.
77. Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver and bone marrow. *Blood* 2001; 98:2396-402.
78. Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol* 2000; 109: 235-242.
79. Igura K, Zhang X, Takahashi K, Mitsuru A, Yamaguchi S, Takashi TA. Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta. *Cytotherapy* 2004; 6: 543-53.
80. In 't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, Noort WA, Claas FH, Willemze R, Fibbe WE, Kanhai HH. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood* 2003; 102(4):1548-9.
81. Dicker A, Le Blanc K, Astrom G, et al. Functional studies of mesenchymal stem cells derived from adult human adipose tissue. *Exp Cell Res* 2005; 308:283-90.
82. Witkowska-Zimny M and Walenko K. Stem cells from adipose tissue. *Cell Mol Biol Lett.*2011; 16(2):236-57.
83. Tuli R, Seghatoleslami MR, Tuli S, et al. A simple, high-yield method for obtaining multipotential mesenchymal progenitor cells from trabecular bone. *Mol Biotechnol* 2003; 23(1):37-49.

84. Giai Via A, Frizziero A, Oliva F. Biological properties of mesenchymal Stem Cells from different sources. *Muscles, Ligaments and Tendons Journal* 2012;2(3): 154-162.
85. Altomare R, Cannella V, Abruzzo A, Palumbo VD, Damiano G, Spinelli G, Ficarella S, Cicero L, Cassata G, Di Bella S, Di Marco P, Purpari G, Gioviale MC, Damiani F, Sinagra E, Pisano C, Marino A, Lo Monte G, Tomasello G, Guercio A, Lo Monte AI. Obtaining Mesenchymal Stem Cells From Adipose Tissue Of Murin Origin: Experimental Study. *IJST*. 2014. 2 (5).
86. Gotherstrom C, Ringden O, Tammik C, Zetterberg E, Westgren M, Le Blanc K. Immunologic properties of human fetal mesenchymal stem cells. *Am J Obstet Gynecol* 2004;190(1):239-45.
87. Liechty KW, MacKenzie TC, Shaaban AF, Radu A, Mosely AM, Deans R, Marshak DR, Flake AW. Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nat Med* 2000;6(11):1282-6.
88. Grinnemo KH, Mansson A, Dellgren G, Klingberg D, Wardell E, Drvota V, Tammik C, Holgersson J, Ringden O, Sylven C, Le Blanc K. Xenoreactivity and engraftment of human mesenchymal stem cells transplanted into infarcted rat myocardium. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2004;127(5):1293-300.
89. Mansilla E, Marin GH, Sturla F, Drago HE, Gil MA, Salas E, Gardiner MC, Piccinelli G, Bossi S, Salas E, Petrelli L, Iorio G, Ramos CA, Soratti C. Human mesenchymal stem cells are tolerized by mice and improve skin and spinal cord injuries. *Transplant Proc* 2005;37(1):292-4.
90. Martin I, Wendt D, Heberer M. The role of bioreactors in tissue engineering. *Trends in Biotechnology* 2004;22 (2).
91. Chen Huang-Chi, Hu Yu-Chen. Bioreactors for tissue engineering. *Biotechnol Lett* 2006; 28:1415–1423.
92. Mertsching H, Hansmann J. Bioreactor technology in cardiovascular tissue engineering. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2009; 112:29-37.
93. Wendt D, Riboldi SA, Cioffi M, Martin I. Potential and bottlenecks of bioreactors in 3D cell culture and tissue manufacturing. *Adv Mater* 2009; 21(32-33):3352-67.
94. Plunkett N and O'Brien FJ. Bioreactors in tissue engineering. *Technol Health Care* 2011; 19(1):55-69.
95. Pörtner R, Heyer SN, Goepfert C, Adamietz P, Meenen NM. Bioreactor Design for Tissue Engineering. *Journal Of Bioscience And Bioengineering* 2005;100(3):235–245.

96. Liu M, Liu N, Zang R, Li Y, Yang ST. Engineering stem cell niches in bioreactors. *World J Stem Cells* 2013; 5(4): 124-135.
97. Salehi-Nik N, Amoabediny G, Behdad P, Tabesh H, Shokrgozar MA, Haghhighipour N, Khatibi N, Anisi F, Mottaghy K, Zandieh-Doulabi B. Engineering Parameters in Bioreactor's Design: A Critical Aspect in Tissue Engineering. *BioMed Research International* Volume 2013, Article ID 762132, 15 pages.