



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

FACOLTÀ DI SCIENZE

Corso di Laurea triennale in Scienze Biologiche

Tessuto cartilagineo ingegnerizzato usando bioreattore dinamico a condizioni di ossigeno definite.

Daly AC, Sathy BN, Kelly DJ (2018) Engineering large cartilage tissues using dynamic bioreactor culture at defined oxygen conditions. *J Tissue Eng*; 9.

Relatore:

Prof.ssa Adriana Canapa

Tesi di laurea di:

Lorenzo Ceccacci

Sezione straordinaria aa 2018/2019

SOMMARIO

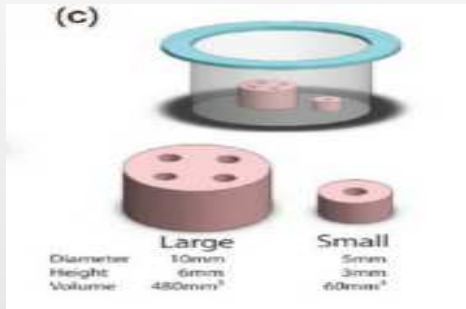
L'obiettivo è quello di determinare se le condizioni presenti in un bioreattore dinamico a determinate concentrazioni di ossigeno possono facilitare lo sviluppo di vasti e omogenei tessuti cartilaginei utilizzando cellule staminali mesenchimali su idrogel.

L'influenza dell'ossigeno su di un bio-reattore dinamico è stata studiata svolgendo esperimenti a 3% pO₂ e al 20% pO₂.

Con una concentrazione di 20% pO₂ una coltura dinamica sopprime la condrogenesi in tessuti ingegnerizzati di ogni grandezza, invece con 3% pO₂ in coltura dinamica incrementa notevolmente la distribuzione e la quantità delle componenti della matrice cartilaginea in ampi tessuti rispetto a condizioni statiche.

Presi insieme questi risultati dimostrano che una coltura dinamica permette un'adeguata disponibilità di nutrienti, mentre una bassa concentrazione di ossigeno ambientale può essere utilizzata per ingegnerizzare grandi tessuti cartilaginei.

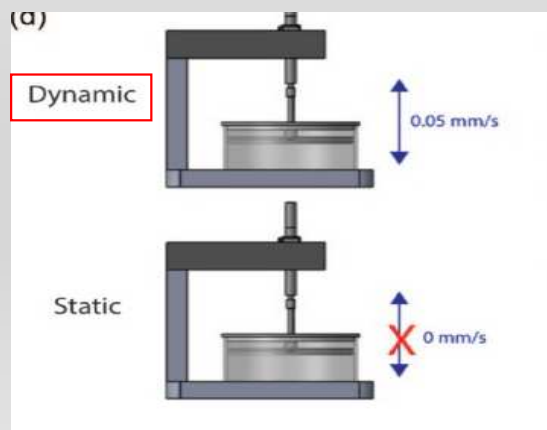
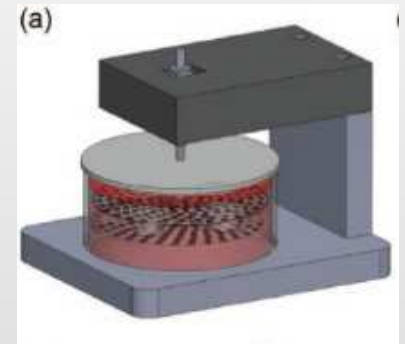
PROGETTAZIONE BIOREATTORE



Filtri cellulari
con all'interno idrogel seminati
con MSC

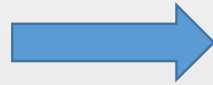
Piattaforma in acciaio
inossidabile porosa

Bioreattore completo



ISOLAMENTO ED ESPANSIONE MSC

- Isolamento MSC da femore di maiale di età 4 mesi



hgDMEM GlutaMAX integrato con 10% v/v siero fetale bovino (FBS)

100 U mL⁻¹ Penicillina/100 µg mL⁻¹ Streptomicina

2,5 µg mL⁻¹ Amfotericina B

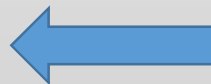
Formazione di colonie



- Trattamento con Tripsina
- Conta
- Semina con densità pari a 5000 cellule/cm²

Fiasca da 500 cm² con:

- hgDMEM 10% v/v FBS
- Penicilina 100 U mL⁻¹/100 µg Streptomicina
- Amfotericina B 2,5 µg mL⁻¹
- Fattore di crescita fibroblastico umano-2 5 ng mL⁻¹ (FGF-2)



IDROGEL DI ALGINATO CARICATI CON MSC

Si risospendono le cellule MSC in una soluzione al 2% di alginato.
Si versa in uno sezionme solida di agarosio 4%/50nM CaCl
con la suddetta soluzione, si lascia gelificare e si ricopre con una
sezione di agarosio.
Si procede alla formazione di costrutti di idrogel caricati con MSC
piccoli e grandi. (Tab.1)

Table 1.

Description of construct parameters used for each group.

	Small	Large
Diameter (mm)	5	10
Height (mm)	3	6
Volume (mm ³)	58.9	471.2
Cross-sectional area (mm ²)	19.6	78.5
Channel area (mm ²)	0.785	0.785
Number of channels	1	4
Total channel area (mm ²)	0.785	3.141
Ratio cross-sectional area to channel area	25	25

CONDROGENIC MEDIUM

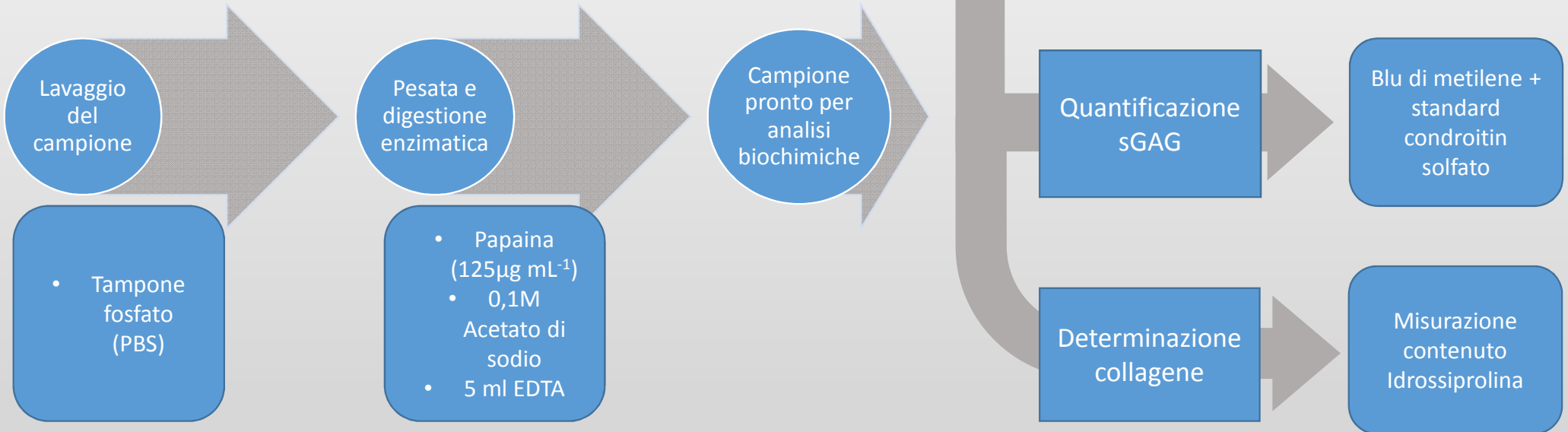
- hgDMEM
- Penicillina/Streptomicina 100U mL⁻¹
- Piruvato di sodio 100μ mL⁻¹
- L-Prolina 40 μg mL⁻¹
- Sodio ascorbil 2-fosfato 50 μg mL⁻¹
- Acido linoleico 4,7 μ mL⁻¹
- Siero bovino 1,5 mg ml
- 1x Insulina-Transferrina_Selenio
- Desametasone 100 nM
- Anfotericina B 2,5 μg mL⁻¹
- Fattore di crescita umano trasformante b3 10 ng mL⁻¹

A 3% pO₂ o a 20% pO₂ a 37 °C

ANALISI BIOCHIMICHE

Si procede con analisi biochimiche dopo 4 settimane in coltura condrogenica.

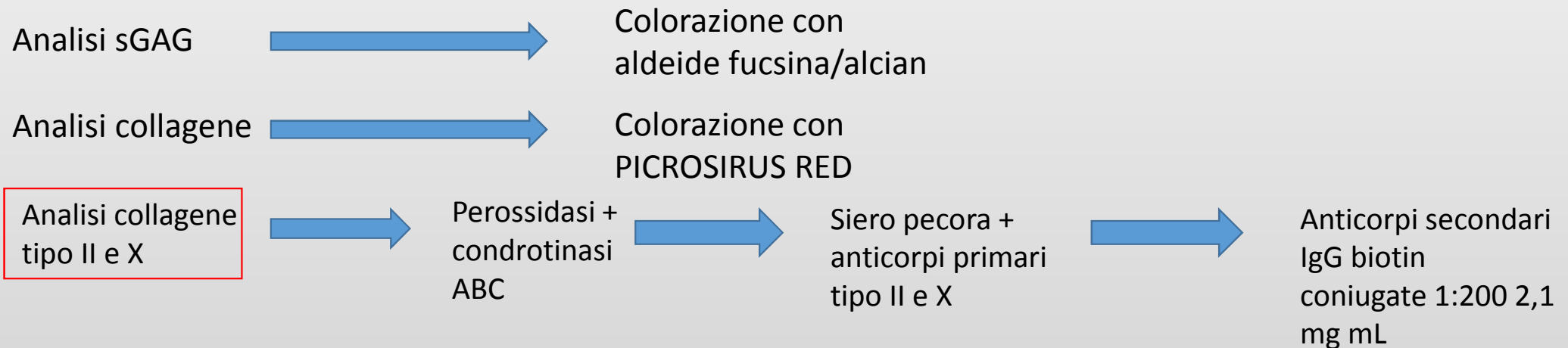
Preparazione campione:



ANALISI ISTOLOGICHE E IMMUNOISTOCHIMICHE

Preparazione del campione tramite fissazione in paraformaldeide 4% deidratato con soluzioni in serie di etanolo a [C] crescente.

Inclusione in paraffina, fette di 8 μ m.



MICROSCOPIA CONFOCALE LIVE/DEAD

Dopo 24 h, vitalità cellulare analizzata con LIVE/DEAD viability/cytotoxicity kit

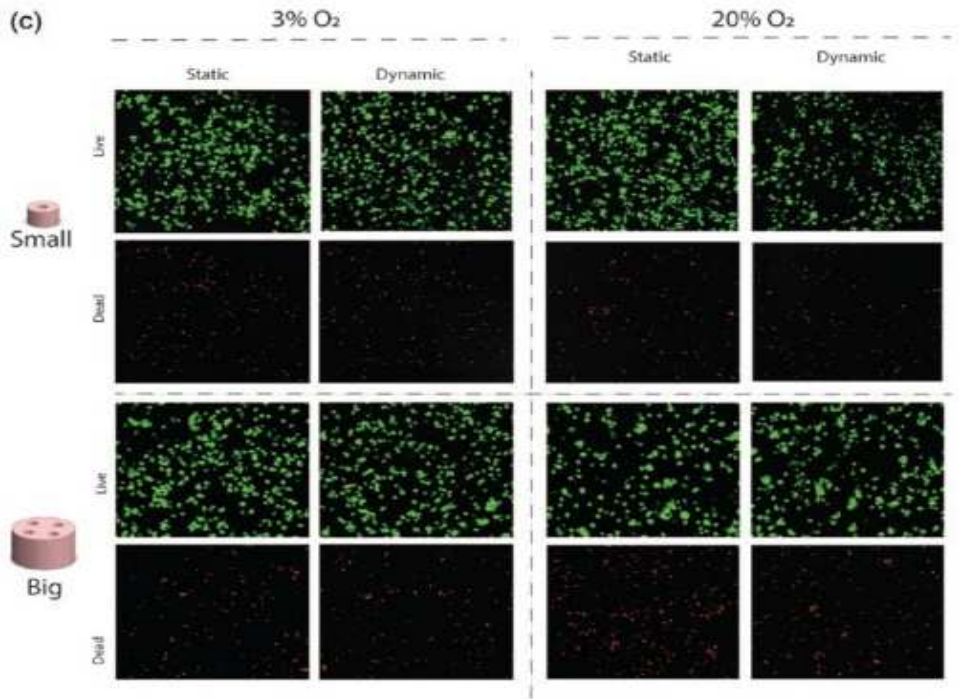
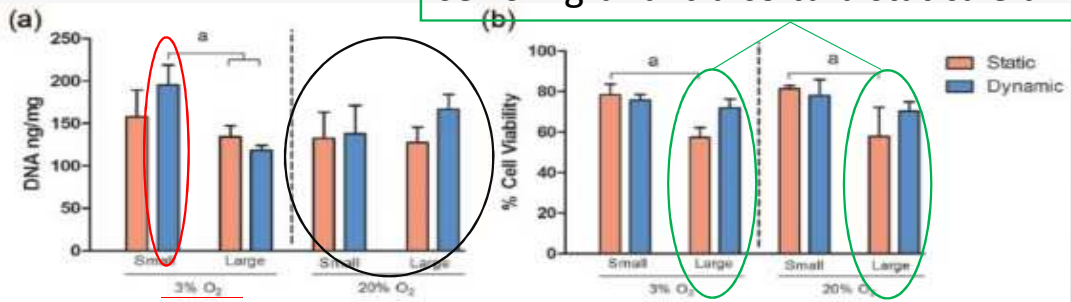
Campione sezionato a metà

Lavaggio con PBS+ Acetossi-metil calceina (cell. vive)

Lavaggio con PBS+ omodimero di Etidio-1 (cell. morte)

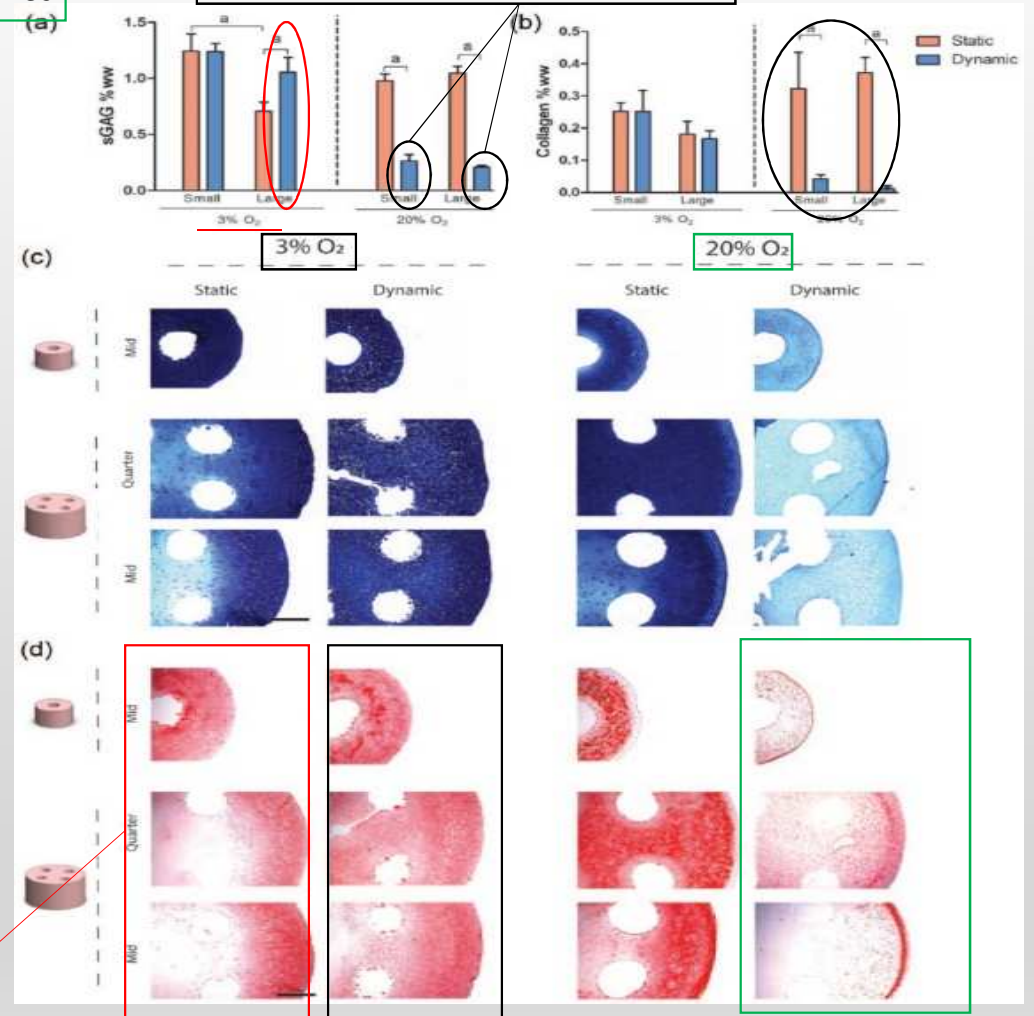
Osservazione con microscopio confocale ad una lunghezza d'onda di 515 nm e 615 nm

Differenze notevoli di cellule vitali nelle sezioni grandi tra coltura statica e dinamica

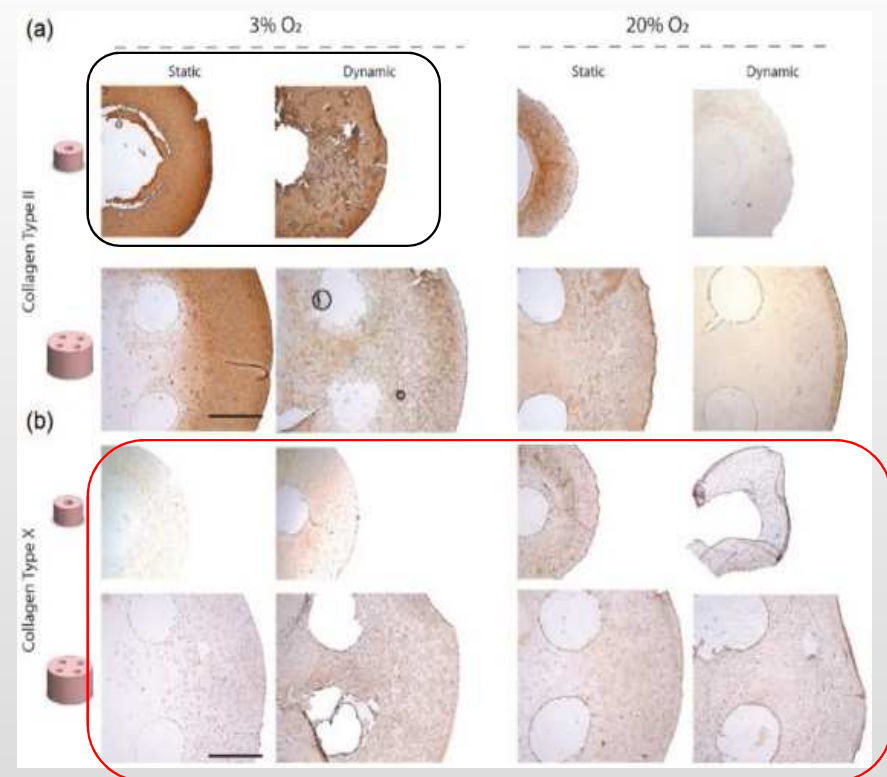


Distribuzione non omogenea fibre collagene in condizioni statiche

Soppressione sintesi sGAG

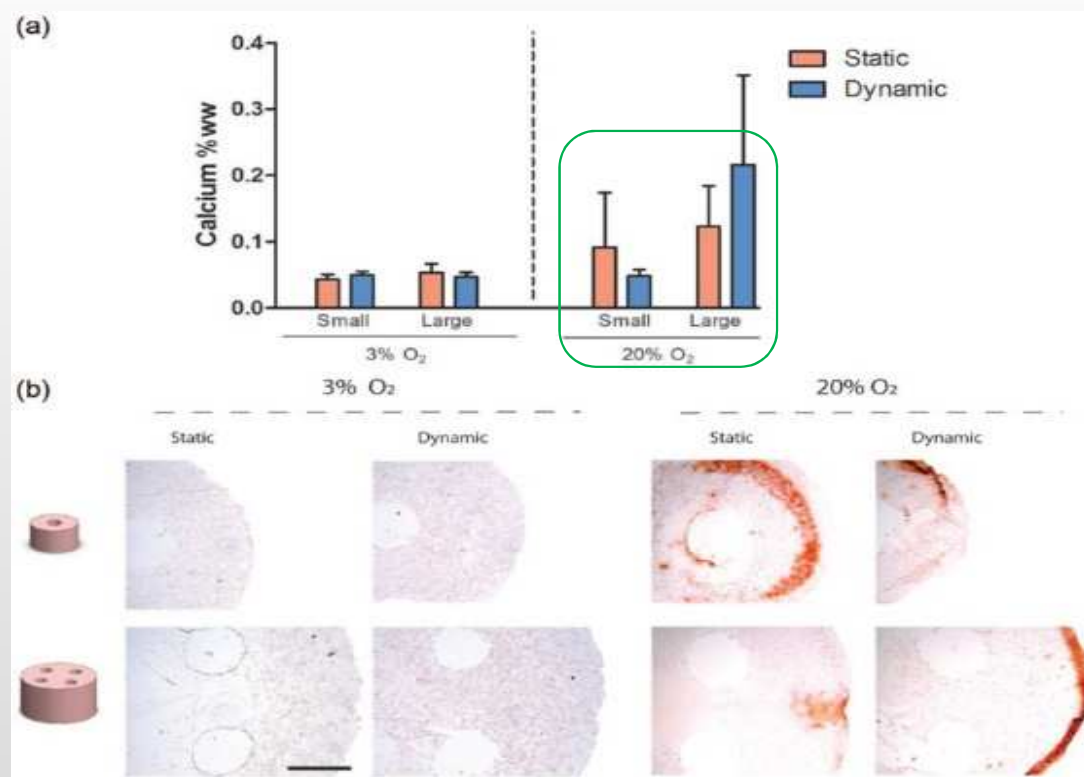


Distribuzione omogenea in condizioni dinamiche



Colorazione intensa collagene tipo II per piccoli costrutti a 3% pO₂ in statico e dinamico.

Tracce di collagene tipo X trovate in ogni condizione.

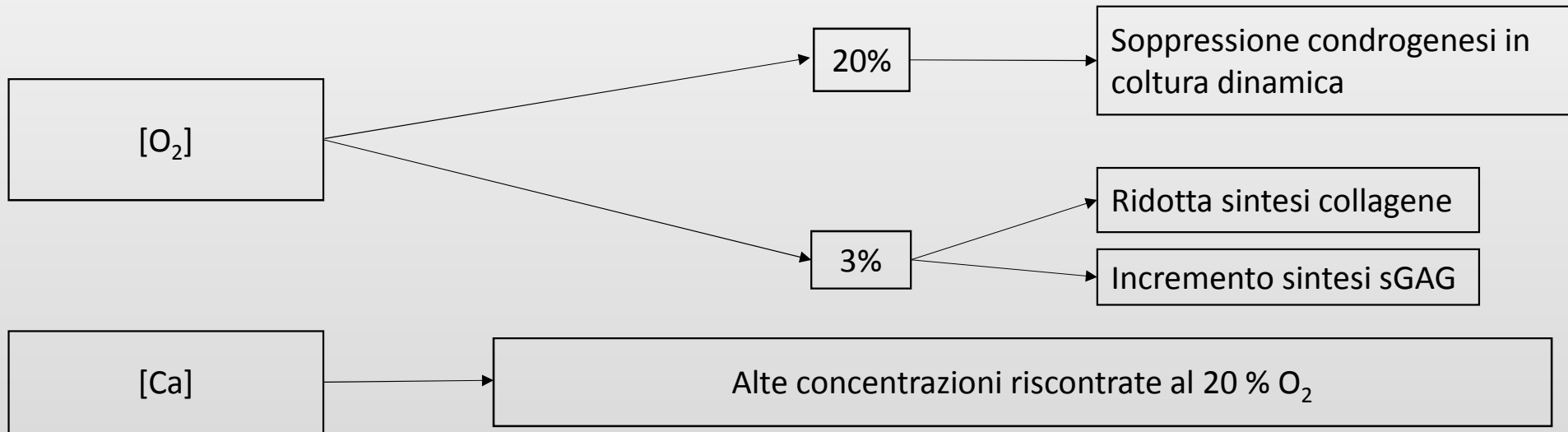


Alti livelli di calcio ritrovati sia in condizioni statiche e dinamiche a 20 % pO₂

OSSERVAZIONI

Piccoli costrutti → Nessun beneficio riscontrato in coltura dinamica

Grandi costrutti → Ridotta vitalità nelle regioni core.



CONCLUSIONI

Lo studio dimostra che le condizioni presenti all'interno un bioreattore dinamico possono essere utilizzate per la creazione di grandi porzioni di tessuto cartilagineo omogeneo, purché siano mantenute delle specifiche condizioni di concentrazione di ossigeno in quanto la condrogenesi è fortemente influenzata da essa.



Grazie dell'attenzione