



Corso Luigi Einaudi, 55 - Torino

Appunti universitari

Tesi di laurea

Cartoleria e cancelleria

Stampa file e fotocopie

Print on demand

Rilegature

NUMERO: 1580A -

ANNO: 2015

A P P U N T I

STUDENTE: Girardi

MATERIA: Bioreattori. Prof.Massai

Il presente lavoro nasce dall'impegno dell'autore ed è distribuito in accordo con il Centro Appunti.

Tutti i diritti sono riservati. È vietata qualsiasi riproduzione, copia totale o parziale, dei contenuti inseriti nel presente volume, ivi inclusa la memorizzazione, rielaborazione, diffusione o distribuzione dei contenuti stessi mediante qualunque supporto magnetico o cartaceo, piattaforma tecnologica o rete telematica, senza previa autorizzazione scritta dell'autore.

**ATTENZIONE: QUESTI APPUNTI SONO FATTI DA STUDENTIE NON SONO STATI VISIONATI DAL DOCENTE.
IL NOME DEL PROFESSORE, SERVE SOLO PER IDENTIFICARE IL CORSO.**

BIOREATTORI

ESAME: 90% di frequenza alle esercitazioni
Domande aperte e a risposta multipla,
correggere parti errate... (max 15 righe,
con schemi...)

20 GENNAIO ESONERO

CODICE LABVIEW

M79X41844

- IN VIVO = studio i meccanismi che nel corpo permettono alle cellule di rigenerarsi x stimolazioni, devo tenere conto di molti meno fattori.

- MATRICE EXTRACELLULARE = tutto ciò che non è cellula in un tessuto, è il supporto 3D in cui si trovano immerse le cellule, è lo scheletro del tessuto, lo scaffold cerca di riprodurre la funzione.

Per la MR servono • cellule, possibilmente STAMINALI (→ con capacità di diventare specializzate se stimolate). Si trovano in stato quiescente nelle NICCHIE. Le cellule STAMINALI MESENCHIMALI sono nel midollo osseo e non possono diventare cardiache. Quelle cardiache si prendono dalle cellule staminali TOTIPOTENTI, già presenti nel tessuto.

- SCAFFOLD = strutture, impalcature 2D o 3D di biomat. o artificiali su cui mettere le cellule per differenziarle e farle crescere e riprodurre



devono proliferare, espandersi in vitro finché non ne ho abbastanza per sostituire il tessuto → SCAFFOLD A SOSPENSIONE. Le cellule si estraggono come BIOPSIA (= cellule + altro materiali + matrice, da separare) ^{con trattamento enzimatico}.

Gli S. devono essere in materiale Biocompatibile, biomimetico (n alla matrice in vivo) Biodegradabile (deve poter essere eliminato dopo che le cellule hanno prodotto la loro matrice cellulare).

Gli S. forniscono supporto Meccanico, aiutano alla riparazione del tessuto, possono essere costituiti per dare supporto chimico (rivestimenti con cellule native e farmaci x ridurre le infiammazioni)

- STIMOLI e SEGNALI = per permettere alle cellule di interpretarsi con lo scaffold e produrre matrice, bisogna dare e capire qual è lo stimolo fisico che le permette, oltre ai segnali biologici e chimici che sono fisiologicamente presenti nel tessuto che si vuole ottenere.

Dopo la biopsia si ha una cultura primaria per espandere le cellule ed ottenerne la quantità che serve.

LIMITI di questo approccio:

- condizioni di cultura 2D se non si usa lo scaffold
- condizioni statiche del medium → in alcuni punti si consuma di più (dove ci sono + cellule), si creano dei gradienti
- nessuno stimolo fisico, non si può ottenere il tessuto voluto
- scaffold 3D in condizioni statiche non funzionano bene
- tutte le procedure sono manuali, faticose, lunghe, ripetitive, difficile da riprodurre sempre allo stesso modo
- scalabilità, difficile garantire processi su larga scala



BISOGNO DI STANDARDIZZARE I PROCESSI (economici, facili, efficaci, automatizzati, ...)

2 Ottobre 2014

La struttura 2D non è fisiologica, tanto meno la condizione statica, è molto alto il rischio di contaminazione, diminuisce la sicurezza e la riproducibilità della procedura. Richiede tempi tecnici e la produzione di cellule è finita x ogni biologo.



STANDARDIZZARE

soprattutto nel campo nella ricerca → bisogna riprodurre un risultato x renderlo attendibile, ma anche x poterlo fare poi in un ospedale.

BIOREATTORI → permettono di far avvenire delle reazioni biologiche (usati in ≠ campi). Possono essere + o - complessi, ma permettono tutti di far avvenire reazioni in condizioni controllate e monitorate

USI del BIOREATTORE

- 1 - SISTEMI di ESPANSIONE → per far crescere e aumentare il numero di cellule
ES: • piastra basculante → supera i gradienti di medium
(SPINNER FLASK)
• cilindro rotante → con piastre perfuse da un medium che scende dall'alto, utile x cellule che devono stare adese.
(ROTATING WALL) • bottiglie di vetro con pareti rotanti → tengono in sospensione le cellule, le bottiglie sono inserite in un dispositivo x il controllo e il monitoraggio, utile x cellule che devono stare sospese (→ STAMINALI)
(SEEDING)
- 2 - SISTEMI per SEMINARE → sfruttando la perfusione di ciò che si vuole seminare, si può seminare ciò che si vuole → SCAFFOLD (P3D CHAMBERS + U-CELL CUP)
3D PERFUSION BIOREACTORS
- 3 - SISTEMI per DECELLULARIZZARE → si sfrutta la perfusione x asportare le cellule dell'organo. si usano dei reagenti x staccare le cellule dalla matrice extracellulare → rimane solo questa, e' il migliore SCAFFOLD che si possa avere. Gli SCAFFOLD artificiali e' ciò a cui si aspira ad arrivare. → gli SCAFFOLD naturali non danno rigetto, sono senza cellule.
- 4 - SISTEMI MODELLO IN VITRO → x cercare di ricreare in vitro l'ambiente che si ha in vivo. Facendo variare un parametro alla volta si studiano le varie caratteristiche del tessuto.
- 5 - per valutare la qualità degli SCAFFOLD → si progettano ma bisogna testarli prima di impiantarli, bisogna valutarne le performance
- 6 - per DRUG SCREENING → per studiare come un farmaco agisce su un tessuto, prima di provarlo su un animale

scel viene sprecato → serve da segnale x il tessuto che si sta sviluppando.

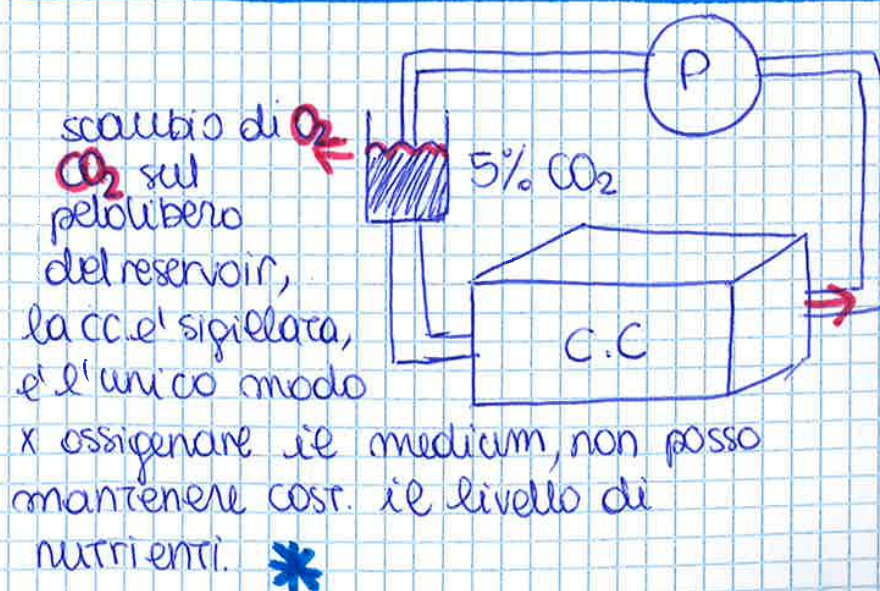
Con il S di perfusione si imposta che gradualmente venga sostituito il medium nuovo con quello vecchio → i parametri rimangono + stabili, processo automatizzato, si risparmia tempo.

serve anche x forzare il medium ^{e le cellule} a passare in uno scaffold particolarmente spesso → MIGLIONE PROCESSO DI SEMINA (→ usato x il tessuto osseo, dove si usano S. 3D, molto porosi). sfruttato anche x la de cellularizzazione

• SIST. DI STIMOLAZIONE FISICA → x un legame bisogna fornire degli sforzi di trazione. Bisogna mimare ciò che avviene nell'organismo, anche solo UNIASSIALE, e' meglio che niente. Lo stimolo deve avere un carico che aumenta gradualmente, seguendo la maturazione del tessuto. (→ bisogna ancora capire come valutare lo stadio di sviluppo del tessuto attraverso le pr. meccaniche). Può anche esserci stimolazione elettrica anziché meccanica.

Se uso il B. x capire come si comportano le cellule in det. situazioni → le sottopongo a stimoli provenienti da CM, senza dover fare le stesse cose in vivo su animali.

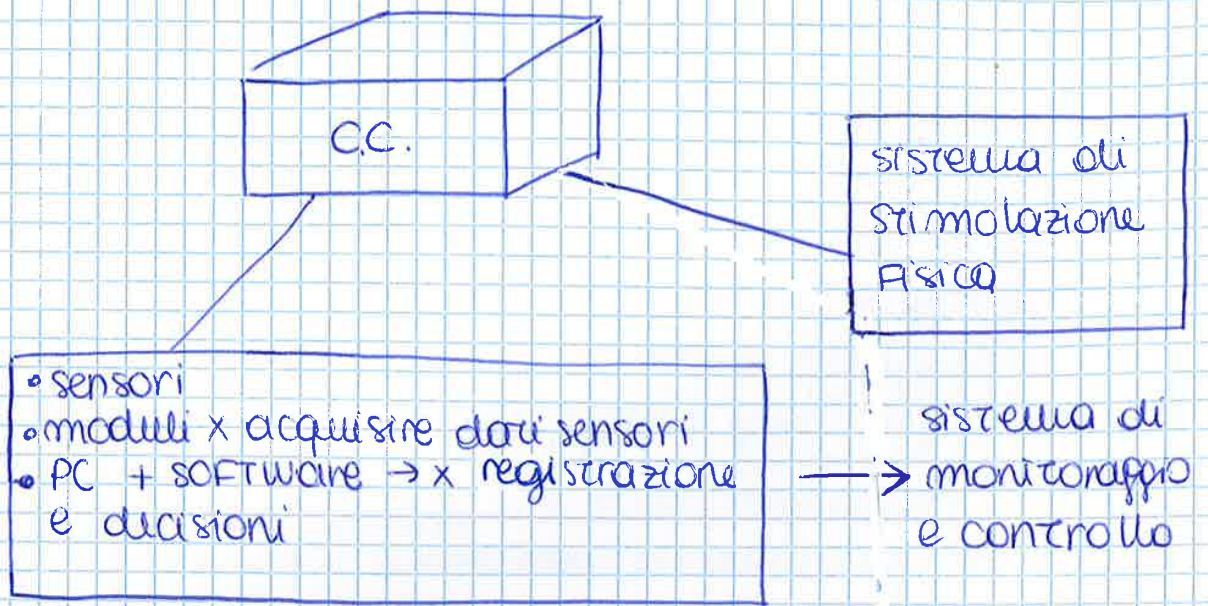
Il B. mi permette di automatizzare il processo → sempre meglio usare.



SCHEMA RICIRCOLO e OSSIGENAZIONE

Può esserci un OSSIGENAZIONE x fornire O_2 al medium? VEDI SLIDE

VEDI SLIDE



CARATTERISTICHE SINGOLI COMPONENTI

CAMERA CULTURA → serve per mantenere in una posizione, grazie a degli afferaggi o alloggiare le cellule e è costruita in un ambiente sterile e sigillata.

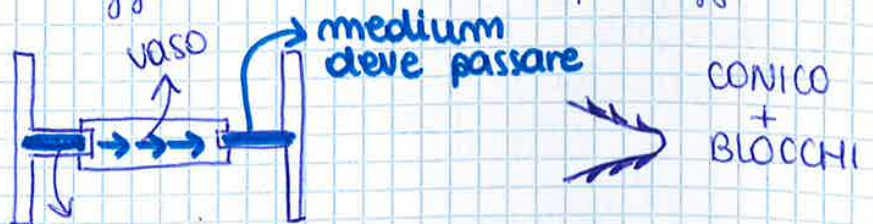
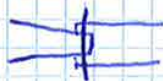
Deve essere STERILIZZABILE → così si può riutilizzare. Deve essere in materiale che sopporti i sist. di sterilizzazione → AUTOCLAVE a 121°C per 20-30 minuti, all'interno di una busta, così la busta si contamina quando si apre l'autoclave.

se non fosse sigillata non manterrebbe la sterilità.

Requisiti:

- deve avere delle forme che consentano di contenere i costrutti
- avere degli afferaggi che consentano il passaggio del medium

CHIUSURA A FASCETTA



afferaggi devono facilitare l'incastro ed impedire che il vaso si speli

Gli afferraggi dipendono anche dal tipo di stimolo che devo fornire → es: TESSUTO OSSEO deve essere compresso, posso usare dei pistoni x comprimere orizzontalmente e la forza di gravità per comprimere verticalmente.

- afferraggio x afferrare degli ANELLINI → non sono pinzati ma solo infilati. Posso mettere in trazione l'anellino mettendolo in funzione uno dei 2 alberi. Molto semplice anche x il biologo posizionare l'anellino. (POLITO EHT)
- Le cell scale Biorake ^{francare subito il modulo di Young dello scaf.} serve x caratterizzare meccanicamente lo scaf collego gli aghetti a celle di carico → va bene x certi materiali, non ge

CIRCUITO DI PERFUSIONE o RI CIRCOLO

- 1 - reservoir di medium ^{S. CHIUSO} (singolo o ^{S. APERTO} molteplici per F.M / E.M)
- 2 - pompa (di solito peristaltica)
- 3 - tubi: permeabili all'O₂ oppure non permeabili

↓
 inseriti nell'incubatore, la superficie dei tubi diventa zona di scambio di O₂ con l'atm. dell'incubatore → si ossigena il medium anche lungo i tubi, oltre che nei reservoir

↓
 tubi in silicone, se non devo stare nell'incubatore all'esterno dell'incubatore non ho la CO₂ = 5% controllata.

↓
MODULO DI OSSIGENAZIONE = creo una bobine di tubi per ↑ lo scambio di O₂ con l'atmosfera.

Se metto un tappo al reservoir → non posso avere scambio di O₂ con l'atmosfera. I Reservoir possono avere dei tubi collegati a dei filtri dell'aria → permettono all'aria di entrare e al fluido di non uscire → ossigeno il medium nel reservoir.

* REQUISITI DI PROGETTO * SIST. PERFUSIONE

- quale profilo di FLUSSO?

- garantire che il flusso sia $\left\{ \begin{array}{l} \text{pulsatile} \\ \text{costante} \end{array} \right.$

• FLUSSO PULSATILE (\rightarrow tessuto vascolare) = creo delle onde di pressione con VALVOLE

• FLUSSO COSTANTE (\rightarrow tessuto da seminare)

- quale portata e' da garantire? $Q = l/min$

Durante lo semina del tessuto devo dare il tempo alle cellule di aderire \rightarrow PORTATE BASSE

Durante la cultura posso avere una PORTATA + ALTA.

La pompa deve avere un intervallo di portate variabile e adattabile

- quale pressione devo imporre?

importante per il tessuto vascolare, devo riprodurre le condizioni del tessuto nativo.

- come dimensiono il circuito?

quanto medium ho in circolo, nei tubi, nei reservoir?

quanto medium serve alle cellule? quanto O_2 consumano le cellule? Considerando le richieste + stringenti, per soddisfare + richieste possibili

- no contatto pompa-medium.

il medium x le cellule staminali costa di più perché è ricco di Fdc \rightarrow devo cercare di usarne il meno possibile



dimensionare bene il circuito.

collego un albero al motore e si muoverà lungo una guida in maniera lineare.

Miglior motore ROTAZIONE che LINEARE perché posso ridurre le dimensioni del motore, → bioreattore piccolo

LEZIONE RECUPERO

17 ottobre 2014

CITOSCHELETRO → Forma, segnali, protezione al nucleo

INTERNO CELLULA → assemblabile / disassemblabile

ADESIONE → la cellula applica una forza al punto in cui aderisce.

ECM → strutture in cui si trovano le cellule.

- proteine (collagene, elastina, laminina, fibronectina)
 - H₂O → diffusione nutrienti
 - polisaccaridi
 - (componenti inorganici)
- ↓
riconosciute dalle
integrine

Prodotto dalle cellule stesse, soprattutto fibroblasti)

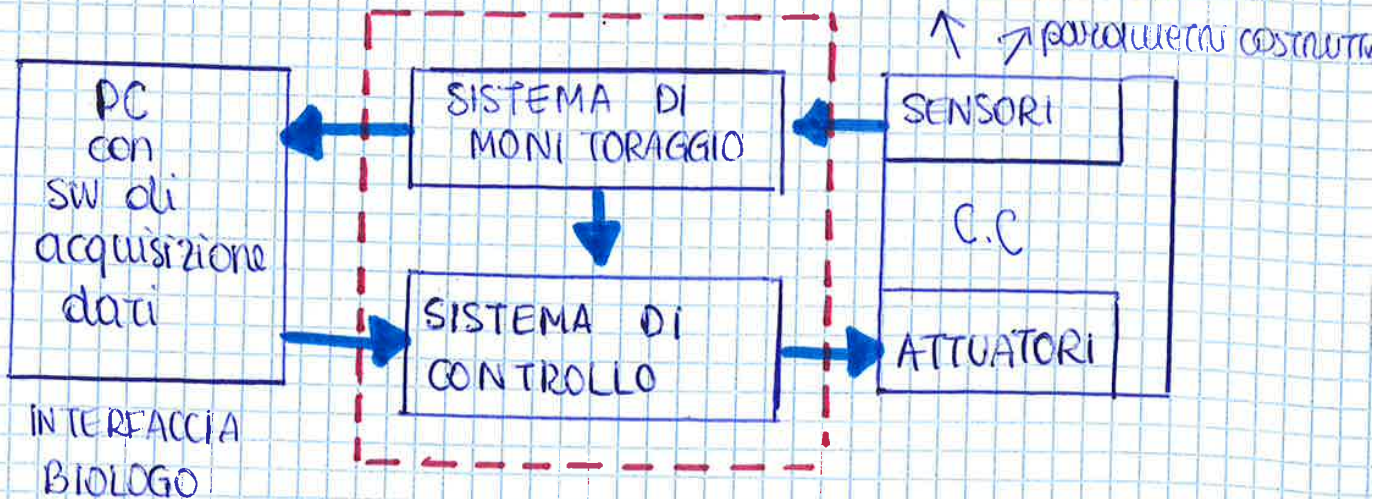
Tutte le cellule sono ANCORAGGIO DIPENDENTI, tranne il sangue.

Gli SCAFFOLD vanno funzionalizzati con le stesse molecole dell'ECM native → questo serve l'adesione

La migrazione serve a colonizzare lo scaffold.

Le integrine si legano e riconoscono le sequenze di AA RGD presenti nelle proteine.

ZONE di adesione focale → integrine attivate che interagiscono con il substrato. condizioni ambientali



SIST. DI MONITORAGGIO

- * valutare l'evoluzione, tracciare il processo (→ valut. QUANTIT.)
- * identificare problemi e/o miglioramenti
- * quantificare i risultati

Senza SAM, i biologi usano misure qualitative → il colore del medium valutato x vedere se il pH è cambiato e quindi è necessario cambiare il medium.

Non è affidabile x ottenere un risultato ripetibile → devo fornire dei numeri, non delle valutazioni qualitative ed appettive.

- * implementa strategie di controllo feedback
- * automatizza e aumenta la scalabilità del sistema.

Valuto P_{O_2} , P_{CO_2} , glucosio e lattato per valutare il metabolismo cellulare e lo stato di sviluppo del sistema.

Si monitorano 2 tipi di parametri

- COND. AMBIENTALI: (cioè che sta attorno al costruito medium)

* FISICI (T_{emp} pressione, flusso, portata che attraversa lo scaffold x la semina e la cellularizzazione dello scaffold)

* CHIMICI (pH , P_{O_2} , P_{CO_2} , glucosio, lattato, proteine)

↓
molto richiesto dalle cellule cardiache
si lavora in ipossia, xk si vede che alcune proliferano di +.

* biologici (possibili contaminazioni batterica → da segnalare x bloccare la cultura. Bisogna mantenere la STERILITÀ).
↓
MOLTO RARI

+ SENSORI SI METTONO, + È DIFFICILE CONTROLLARE E COSTOSO!

- invasivi

- MOLTO SPECIFICI
- MOLTO SENSIBILI

◦ devono essere sterili
usa e getta → sterilizzabili*

◦ DIFFICILE CALIBRAZIONE
devo calibrarli nella dove andranno ad usare → nelle cc non posso → li calibro in un ambiente simile

- non invasivi

- NO STERILITÀ
- Facile calibrazione

◦ Bisogno di una camera TRASPARENTE
(di solito tutti i prototipi di cc. e Bioreattori sono in materiali non trasparenti, il vetro è costoso e FRAGILE, non lavorabile)

i prototipi non si fanno su larga scala, non vale la pena farli in prestampaggio con uno stampo X averli trasparenti

- ↓ sensibilità
- ↓ specificità

- indiretti

- ↑ specificità
- ↑ sensibilità

◦ misurazione differita, non è in tempo reale, lasso di tempo che implica errori e artefatti

◦ Feedback non diretto della cc

Mettono il a valle e il a monte, faccio la differenza e vedo la situazione nella cc.

REQUISITI PROGETTO X scegliere i sensori:

- dimensioni ridotte xk le cc sono spesso piccole (→ poco medicati, poche cellule, costi bassi)
- sterilizzabili con le tecniche a disposizione dei biologi
- risoluzione compatibile con la variazione minima di interesse x la grandezza
- range di linearità nel campo di misura
- garantire stabilità nel tempo
- costo!

Il BISOGNO di un prodotto genera una DOMANDA, una RICHIESTA x trarne dei vantaggi.



La RICERCA deve riuscire a trovare una soluzione x soddisfare i bisogni. Si indaga e si studia, si si documenta sui prodotti a disposizione al momento. Si fa una ricerca di mercato: prezzi, prodotti, clienti, ...
Si trova un elenco di soluzioni disponibili → si devono osservare vantaggi e svantaggi → x vedere che cosa non è soddisfatto o come si sono soddisfatte alcune richieste: accumulo INFORMAZIONI



Sviluppo un CONCETTO nuovo da aggiungere alle soluzioni del mercato → devo riuscire a risolvere almeno qualche svantaggio → avrò un prodotto vincente e competitivo, anche solo con un costo di produzione minore



Si passa alla fase di DESIGN: devo avere un elenco delle necessità da soddisfare con il mio prodotto (sia di chi le usa, sia di chi produce il pezzo).



Durante lo SVILUPPO posso accorgermi di avere nuove necessità (tomo indietro) o aver bisogno di un prototipo x capire se funziona o meno (vado avanti)



Devo sempre produrre una DOCUMENTAZIONE del PROGETTO (CAD, file, descrizioni, FCA) necessaria x realizzare ciò che sto producendo. Contiene i dati, la ricerca e le idee con le quali si giustifica e si può spiegare il lavoro svolto

FCA = fluido dinamica computazionale → può aiutarci x simulare il prototipo

REQUISITI DI PROGETTO

tengono conto delle
= necessita' del cliente +
limiti del prodotto

- PROGETTO + semplice possibile:

- facile da spiegare e capire
- facile da produrre
- facile da gestire e controllare, da pulire

- TROPPIA CREATIVITA' NON E' PRODUTTIVA ED EFFICIENTE!
(si parte dal progetto complesso e lo si semplifica)
Fa la differenza cio' che aiuta nel lavoro e soddisfa
un bisogno, non la creativita'

- Fornire una distribuzione cellulare UNIFORME
(nello scaffold) non solo durante la semina ma
anche nelle fasi successive le cellule possono muoversi
se sentono gradienti.

- distribuzione controllata e costante di gas e
nutrienti (→ garantito a tutto il costrutto, anche
in profondita' con un sistema di trasporto della
MASSA)

- riprodurre STIMOLI FISICI che ci sono in-vivo, oltre a
quelli CHIMICI

- fornire INFO x permettere di ricavare informazioni
su cio' che si sta' coltivando, sui parametri del costrutto

REQUISITI DI PROGETTO

- cito compatibilita' e sterilita' dei componenti
- scelta dei materiali
- compatibilita' con le procedure di laboratorio (GLP
= good laboratory procedures)
- montaggio semplice (sottocappa), modulare x
sterilizzazione a pezzi, facile da pulire
- stabile e affidabile nel tempo (x riprodurre i
risultati e gli esperimenti + volte)
- facilmente regolabile nei parametri fisici che
il biologo deve imporre

* RADIAZIONE (microonde, X, γ , UV)

metodi di sterilizzazione industriale x richiedono apparecchi costosi

possono essere integrati nella cappa con una LAMPADA - UV: e' necessario colpire tutta la superficie x sterilizzare, difficile sterilizzare una superficie complessa. Obbligatoria x i sensori di P_{O_2} xk ad alte temperature gli elettroliti evaporano.

- COMPONENTI METALLICI (+ resistenti, meglio se devo trasmettere un moto con un albero) → devo rispettare solo FOOD - MEDICAL GRADE, no problemi x la temperatura
 ↳ ACCIAI ← (304, 316, 316L) (non posso sterilizzarli con le microonde).
- COMPONENTI POLIMERICI (- resistenti, ma + facilmente lavorabili, x coprecchi, ...). se devono essere autoclavabili non devono fondere a $121^{\circ}C$ + essere FOOD - MEDICAL GRADE. (Policarbonato [trasparente], poliossimetilene, Teflon, nylon, silicone biomedicale)

|| X prima cosa → chiedere la tecnica di sterilizzazione ||
 || poi si sceglie il materiale ||

TECNICHE LAVORAZIONE

4 novembre 2014

Bisogna pensare a progettare dei pezzi che siano lavorabili con le tecniche a disposizione.

- 1) si progetta un file con sistemi CAD (= SW) + scelta MATERIALE (policarbonato)
- 2) Nelle macchine CNC (= computer numerical control) la realizzazione dei componenti e' altamente automatizzata usando sistemi CAD & CAM.
- 3) La macchina produce un file da inviare al macchinario designato per la realizzazione del componente

5 CLASSIFICAZIONE BIOREATTORI

Sono dispositivi x dare vita, mantenere ed indirizzare lo sviluppo cellulare in un ambiente fisico-chimico definito, nelle 3D, altamente controllato e sterile, con la possibilità

- 1) seminare delle cellule in maniera dinamica
- 2) superare i limiti delle culture statiche
- 3) stimolare il coscritto

- NON FISIOLGICI → non riproducono un ambiente ~ a quello fisiologico dal pto di vista chimico e di stimoli, permettono solo di superare i limiti delle culture statiche:
 - SPINNER FLASK
 - ROTATING WALL
 (medium in movimento, non è statico)
- FISIOLGICI → riproducono un ambiente simile a quello fisiologico grazie agli stimoli fisici che forniscono. Possono avere tutte e 3 le caratteristiche, cioè fornire stimoli di compressione/trazione, un sistema di perfusione e fornire una pressione idrostatica, oppure solo uno di questi 3.
 - trazione / compressione
 - pressione idrostatica
 - flow perfusion

NON FISIOLGICI 50-80 rpm

SPINNER FLASK → composto da 1 bottiglia + un tappo cui è collegato un albero con al fondo un'elica. L'albero trasmette il moto dal motore all'elica. Serve x mantenere in sospensione ciò che è contenuto nel medium che è messo in rotazione. → bisogna bilanciare bene le forze x avere una sospensione dinamica delle particelle, anche xk quando aumentano di n° e di peso hanno bisogno di velocità maggiori

* VANTAGGI

- poco costosi ~ 500 / 700 €

- Facile da usare

NON hanno:

- SIST. monitoraggio

- SIST. di perfusione (inseparabile)

Solo sistema di controllo che controlla il motore
e sistema di stimolazione fisica c'è in parte
(medium in movimento), ma non direttamente
sulle cellule

15-30 rpm

ROTATING WALL (Syntecon - RCCS)

Il fluido è messo in moto dalle pareti della camera
di coltura di forma cilindrica. → devo valutare la
giusta velocità di rotazione x mantenere in sospensio-
ne le cellule, o sperimentalmente o con le CFD.

La velocità iniziale impostata non sarà + sufficiente
x mantenere la sospensione se la massa di cellule ed
EMC aumenta (vale anche x lo SPINNER). La velocità
di rotazione deve cambiare con il passare del tempo →
potrei pensare di usare tecniche di imaging (telecamera)
x adattare la velocità alle dimensioni del costrutto.

Sistema + costoso e + complesso dello SPINNER.

Sviluppato a seguito di uno studio compiuto dalla
NASA x studiare gli osteociti in assenza di gravità.
Dovevano poter studiare le cellule anche sulla Terra
come se si trovassero in una sorta di microgravità.

* SVANTAGGIO:

- + costoso dello SPINNER
- scarsa perfusione O₂

* VANTAGGIO:

- può avere un sist. di perfusione
- il fluido si muove con moto laminare, basse
velocità imposte → BASSI SPORZI DI TAGLIO
- assenza di corpi estranei vicini alle cellule →
no trasmissione di carichi

Non si riesce a calcolare bene la deformazione che si crea, costoso, ha bisogno della pompa per creare il vuoto e deve andare in incubatore.

* MECHANOCULTURE B1

Il sist. di controllo è inserito nel Biorreatore, non ha bisogno di cavi, posso inserirlo direttamente nell'incubatore, ha una batteria interna, si passano i parametri di stimolazione con un cavo e poi si rimuove. Permette una stimolazione bidirezionale grazie alla struttura a croce, nonostante il moto sia uniassiale.

Non si monta bene: la spugna non va bene!

Non divide la $^{+}cc.$ (sterile) dal motore (non sterile).

* MULTI-WELL MECHANOCULTURE

Sfrutta la deformazione del supporto x fornire una stimolazione alle cellule, come il 1° esempio.

L'albero ha un soffietto per separare la cc. dalla camera con il sist. di controllo e di stimolazione.

Ha 2 coperchi separati. Il moto è trasmesso a tenuta.

L'albero deforma una parte in silicone che contiene delle camerette x le cellule. Si deforma il supporto per stimolare le cellule → dopo l'adesione sono adese al supporto: se si deforma il supporto si deformano le cellule → non va bene se devo stimolare un tessuto: devo poterlo affermare, non aderisce al supporto.

Inoltre la deformazione non è uguale in tutti i pozzi → i risultati non sono confrontabili tra di loro. Posso conoscere la deformazione del supporto: quello + vicino all'albero si deforma di più di quello all'altra estremità.

P3D CHAMBERS, EBERS

CC. a perfusione sono usa e getta, lo scaffold è bloccato tra supporto e cappuccio → il tutto collegato a dei tubi x la perfusione forzata. I tubi sono montati su un supporto di acciaio. È dotato di un incubatore con una pompa peristaltica inserita nel fondo x permettere la perfusione → pompa integrata, si comunica con la pompa attraverso un'interfaccia presente sull'incubatore.

Montaggio sul supporto di acciaio lungo!

AFFERRAGGIO PER COSTRUTTO VASCOLARE, EBERS

Costruito in vetro, il costrutto viene montato su 2 estremità leggermente rastremate. Viene perfuso internamente ed esternamente. Stimolo con il flusso che attraversa il costrutto.

BOSE 5170

Sistema che permette di fare tutto: trazione/compressione/perfusione (→ pulsatilità del flusso data da una pompa DINAMICA ≠ dalla pompa peristaltica che permette il ricircolo del medium.

Medium all'interno e all'esterno del flusso. Il medium che è passato all'interno del costrutto viene rimmesso nella cc.

→ è un componente a parte

- Il coperchio è montato con viti da stringere a mano.
- Alcune versioni permettono pulsatilità e trazione.

Si tende a progettare bioreattori economici e non troppo costosi, se costano troppo non li compra nessuno.

uguali in tutti gli esperimenti. → escludo delle variabili
 BOSE 5170
I MULTICAMERA costano di più. (350'000€)

↓
 se scelgo il BOSE 3D c'è meno differenza di prezzo tra il monocamera e il multicamera.

BIOREATTORI PER ESPANSIONE CELLULARE

TRATT. AUTOLOGO

I) Dal paziente prelievo una porzione di tessuto che mi interessa (n° cellule x n° cellule che mi servono)

BIOPSIA

II) Dalla biopsia isolo le cellule che mi servono → la biopsia preleva tutti i tipi di cellule che il tessuto contiene. Se necessario le posso poi ri-assemblare in una co-cultura. → ISOLAMENTO = 1 solo tipo di cellula in piccole quantità (→ si usano centrifugazione + metodi chimici (anticorpi, tecniche magnetiche, ...))

III) espansione cellulare x ottenere quante me ne servono → qui serve la tecnologia del BIOREATTORE

BIOREATTORE
 x
 ESPANSIONE

xk riduce il lavoro manuale, automatizza il prelievo di campioni x controllare il livello di espansione, standardizza il processo (→ si svolge il processo sempre allo stesso modo), consente un apporto e un ricambio continuo di medium.

IV) SEEDING
cellule + scaffold scelto → bisogna seminare lo scaffold facendo in modo che sia interamente colonizzato (→ potrei usare un bioreattore a perfusione forzata → seeding migliore)

BIOREATTORE
 x
 SEEDING

V) maturazione cellule e tessuto → le cellule devono sostituire lo scaffold biodegradabile con EMC → devono ricevere stimoli fisici e chimici per attivarsi e produrre EMC. Il bioreattore può

BIOREATTORE
 x
 COLTIVARE

tiche che se ne occupano → si hanno problemi di spazio e dimensioni x la produzione, anche di costi.

Problemi CBT:

- 1°) espansione x avere tante
- 2°) costi di produzione x fare in modo di renderlo economico, efficiente e sicuro.

I bioreattori sono fondamentali x riuscire a rendere standard il processo (→ sicuro, riproducibile), e anche abbastanza economico.

Con i sist. di monitoraggio e controllo posso ricavare il tasso di produzione di cellule, ma anche flessibilità nel tipo di espansione cellulare che posso ottenere, a seconda del tessuto che mi serve.

B. utili x la RICERCA ma anche x la PRODUZIONE

REQUISITI BIONEATTIONE X CS:

- 1) • 1° REQUISITO → alte dosi di CS. → **BIONEATTIONE** e' la soluzione del tipo:
- c. mesenchimali → $1-9 \cdot 10^6$ cellule/kg
 - c. ematopoietiche → $2 \cdot 10^5$ cellule/kg

- 2° REQUISITO → in maniera sicura, riproducibile ed economico

1) ALTE DOSI DI CELLULE

Attualmente a livello di ricerca si usano fiasche → si inserivano cellule + medium → in incubatore, si hanno problemi di spazio se ne devo produrre molte. Alcune devono rimanere adese x proliferare → un limite e' l'area a disposizione della fiasca

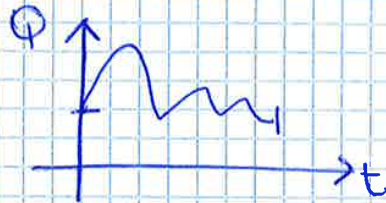
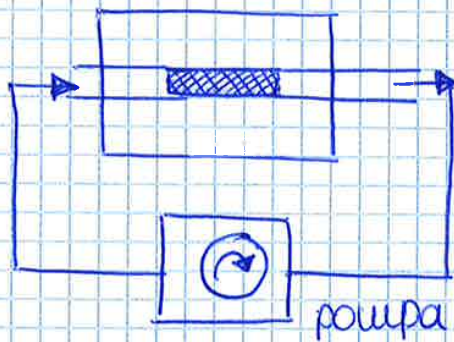


x rendere il processo scalabile non va bene. Inoltre e' difficile controllare i parametri e il monitoraggio (→ devo prelevare medium e analiz-

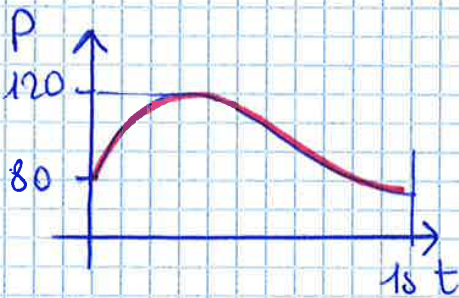
25 novembre 2014

DIMENSIONAMENTO SIST. PERFUSIONE

- * Per prima cosa bisogna conoscere bene l'ambiente e il sistema fisiologico di quella specifico tipo di cellule.
- * Poi deve venire un'IDEA x decidere come progettare il bioreattore.
- * Poi si possono usare le simulazioni computazionali x studiare al meglio la fluidodinamica del sistema.



Forma d'onda della pompa che riproduce il ciclo cardiaco



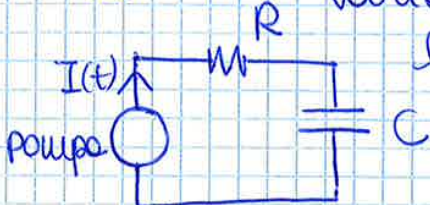
pressione nel costrutto → deve essere quella fisiologica

Con il display della pompa scelgo la portata da immergere. Il circuito deve essere dimensionato in modo che data la portata Q , si produce la pressione P nel costrutto, tenendo conto delle perdite di carico.

La pompa è come un generatore di corrente

$\int Q \rightarrow I$ Nota la portata, la resistenza
 $\int P \rightarrow V$ (perdite di carico) e la compliance

$C \frac{\Delta V}{\Delta P} = C \rightarrow$ volume in grado di accumularsi ad ogni variazione di pressione, posso ricavare la tensione, cioè la PRESSIONE.



E' un bilancio di massa → bisogna isolare un volume di controllo del tubo.

$$\Phi C_{O_2}^{IN} + N_{AVG} = \Phi C_{O_2}^{OUT}$$

Sistema bifasico (H₂O + ARIA) → debb aggiungere la condiz. di equilibrio aria - liquido

LEGGE DI HENRY

$$P_{O_2}^{ARIA} = H C_{O_2}^{LIQUIDO}$$

↑
costante di Henry

∃ una relazione lineare tra la p_{O₂} nell'aria e l'O₂ disciolto nella fase liquida.

$$\frac{\Phi}{H} p_{O_2}^{IN} + N_{AVG} = \frac{\Phi}{H} p_{O_2}^{OUT}$$

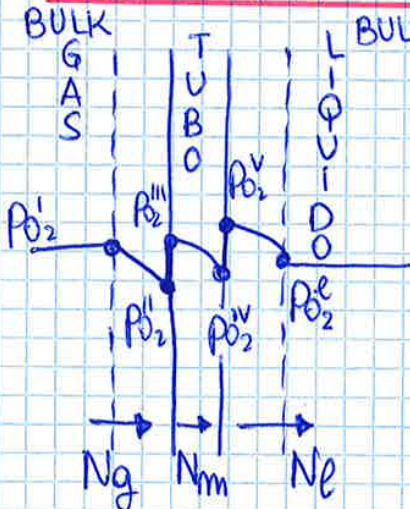
Φ = impostata
H = nota dalle lett.

↓
dipende dal salto motore e da una costante

$$N_{AVG} = K (p_{O_2}^I - p_{O_2}(x))$$

↓ x determinarlo

TEORIA DEI 2 FILM = a ridosso della parete del tubo



ci sono due film di gas/liquido completamente fermi. Nel gas e nel liquido ho dei valori di p_{O₂} = cost., tranne in alcuni punti, dove ho dei gradienti:

- FILM gas
- tubo (membrana)
- FILM liquido

in generale: (N_i)
N_i = K_i Δp_{O₂}

$$\begin{cases} N_g = K_g (p_{O_2}^{III} - p_{O_2}^I) \\ N_m = K_m (p_{O_2}^{IV} - p_{O_2}^{III}) \\ N_l = K_l (p_{O_2}^E - p_{O_2}^V) \end{cases}$$

Integro $\int_{P_{O_2}(0)}^{P_{O_2}(x)} \frac{dP_{O_2}}{(P_{O_2}^i - P_{O_2}(x))} = \frac{K_{O_2} H}{\Phi} \int_0^x dx$

uscita c.c.

quello che voglio avere

$$x = \frac{\Phi}{K_{O_2} H W} \cdot \ln \frac{(P_{O_2}^i - P_{O_2}(x))}{(P_{O_2}^i - P_{O_2}(0))}$$

lunghezza tubo ossigenazione

$P_{O_2}(0)$ → si determina considerando il consumo cellulare

$$P_{O_2}(0) = P_{O_2\text{ in}} - \frac{\Gamma_m H V_{cc}}{\Phi}$$

Γ_m → considera il consumo della specie cellulare

$$\Gamma_m = \gamma_c \cdot \rho_c$$

↑
consumo cellulare
 $\left[\frac{\text{mol}}{\text{cell} \cdot \text{s}} \right]$

↑
densità cellulare
 $\left[\frac{\text{cell}}{\text{me}} \right]$

Le facce si espandono in:

- piastre
 - Flasche
 - sacche del sangue
- } ancoraggio
- } sospensione
-] POCO COSTOSI
-] IL MEDIUM È COSTOSO

Il medium è ciò che costa, specie se devo aggiungere FDC x farne differenziazione → strumenti x contenere sono economici, ma STATICI → non x facile espandere

↓
e i parametri di cultura da controllare?

- scambio di gas avviene solo sul pelo libero di medium per di + statico → gradienti di gas e pH → non ho parametri costanti nel tempo e nello spazio.

Il medium è cambiato MANUALMENTE. Processo non automatizzato e neanche SCALABILE → sarebbe richiesto + spazio. ↑ rischio di contaminazione e anche ↑ costi

ROBOT x la CULTURA

Alternativa: introduzione di sistemi robotici x sostituire il biologo nell'espansione delle cs. Sono compresi nello stesso sistema:

• CELL^{HOST} SYSTEM

- cappa
- bracci robot
- incubatore

↓

sistema { costoso
 } ingombrante
 } limitato, xk aumentano il n° di piastre, ma non all'∞.

↓
ha avuto poco successo.

• COMPACT SELECT → altro robot x cercare di automatizzare il processo.

Di x se il robot non cambia il modo di coltivare, semplicemente sostituisce il biologo con le macchine. I robot usano sempre Flasche, medium statico, ecc...

circolato di perfusione, anche con un reservoir di medium fresco.

LIMITE: non posso prelevare campioni XK il sistema è chiuso

La base su cui sono inserite le cellule ha delle scanalature in cui possono aderire e il medium le lambisce.

STIRRED BIOREACTORS ~ spinner flasks

Hanno una turbina (= stirred) sul fondo, messo in movimento da un motore esterno. Ha molti inlet x la perfusione, x i sensori (→ sistema di controllo)

SONO I BIOREATTORI + USATI x espansione di cs. → posso monitorare/controllare e perfondere
Posso usare con:

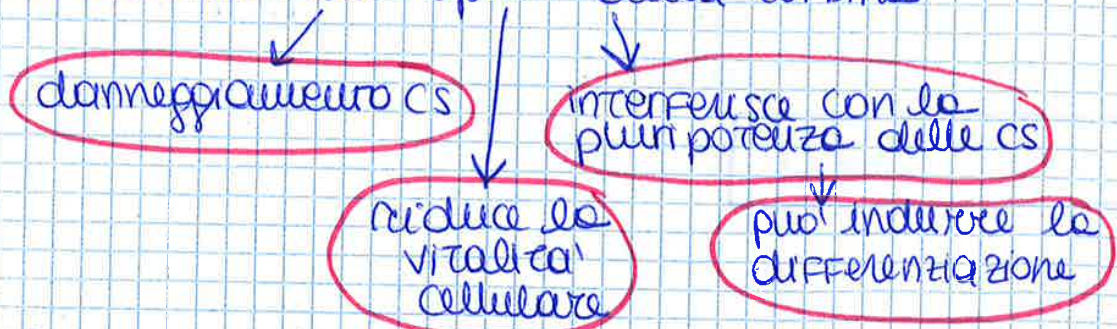
- singole cellule
- aggregati cellulari
- cellule adese a microcarrier (→ sfere di

materiali che facilitano l'adesione cellulare) → espandono come cellule adese in sospensione.

Ricaricchio completo del medium (FED-BATCH) o ricambio di medium a perfusione. (→ sistema di perfusione)

Sistema molto facile da scalare → posso ingrandirlo, basta scalare tutto il resto.

LIMITE: • creazione di ↑ sforzi di taglio e moto turbolento ad opera della turbina



• Non posso controllare le dimensioni degli aggregati cellulari → dimensioni eterogenee.

x mantenere la staminalità devo mantenere certe

Con alcune tecnologie inseribili nel B. posso dare delle condizioni di coltura omogenee → non devo far creare dei gradienti → uso un flusso dinamico

- TRIDIMENSIONALITA' (→ spazio)
- OMOGENEITA' (→ flusso dinamico)
- STIMOLI FISICI e MECCANICI

Prima devo seminare le cellule nello scaffold (spesso) → sfrutto la PERFUSIONE e Bioreattori a PERFUSIONE
A questo punto posso farlo maturare, fornendo STIMOLI

- elettrici
- elettromagnetici
- chimici
- cellula - cellula
- cellule - substrato
- meccanici

A seconda del tessuto alcuni possono essere + preponderanti di altri. Devo capire quali sono forniti in vivo.

ES: { sforzi taglio → vascolazione
campi elettrici → pelle.

in generale CARICHI
↑

BIOREATTORI PER TESSUTO OSSEO

Per il t. osseo devo fornire compressione, trazione e torsione ^{di fluidi}
È poroso e il medium che contiene, nel momento in cui viene compresso lo scaffold, trasmette sforzi di taglio alle cellule.
→ Fatti x colmare grandi difetti ossei, di x se si rigenererebbe, non è come il cuore
Sono parecchio spessi → problemi per la perfusione di O₂, nutrienti e cellule. La diffusione avviene solo nei primi 100 - 200 μm, ma lo scaffold è + spesso → devo forzare il passaggio del medium con una cultura dinamica, altrimenti le cellule interne muoiono.
Se metto cellule e scaffold in una cultura statica, esse sopravvivono solo sulla superficie → CATTIVA DISTRIBUZIONE CELLULARE DI PARTENZA
Con il bioreattore risolvo

- ↗ STIMOLAZIONE
- ↔ SEEDING
- ↘ PERFUSIONE

e della cristallizzazione della EMC, grazie alle τ .

Per capire in cosa differenziano valuto l'espressione genica del fenotipo voluto e la composizione della EMC

LIMITI

- Lo strato di cellule che si forma sulla superficie, può bloccare O_2 e nutrienti
- sforzi τ solo sulla superficie \rightarrow ma è stato utile x capire l'importanza di fornire τ alle cellule x farle differenziare in T. osseo, oltre alle cond. omogenee di medium.

- BIOREATTORE PARETE ROTANTE \rightarrow usato dalla NASA x studiare il comp. degli osteociti in ambiente di microgravità. Uso scaffold con la stessa densità del medium, così galleggiano

SYNTHECAN \rightarrow bioreattore con microcarrier rotanti. Alcuni gruppi dimostrano che funziona x il tessuto osseo, altri invece no.

\rightarrow viene modificato inserendo dei supporti x bloccare gli scaffold in modo che non sbattono tra di loro o contro la parete. Modificato poi a LETTO ROTANTE \rightarrow ruota d'asse centrale e non la parete. Sull'asse sono inseriti dei dischi con gli scaffold. Si riempie solo a metà di medium, il resto è aria \rightarrow posso avere tubi x il medium e x misurare il pH. È stato creato un incubatore intorno. È dotato di reservoir, di pompe, sist. di controllo + interfaccia grafica. Ampia superficie di adesione e molto spazio x gli scaffold.

LIMITI

- nutrienti e O_2 solo sulla superficie $\rightarrow \neq$ mineralizzazione e crescita del tessuto \rightarrow solo sulla superficie.

• BIOREATTORI A PERFUSIONE

Sistema di perfusione a circuito aperto / chiuso. Migliore perfusione interna. A seconda del tipo di flusso impostato si hanno risposte \neq :

Oscillatorio \rightarrow stimolo meno che unidirezionale o

(Flessione)
4p-BENDING

→ aumenta EMC mineralizzata e marker T. Osseo

Devo anche capire il modo di deformazione e il carico

- stress ciclico = ↑ proliferazione, ma differenziazione costante, quindi dovuto poi ↓ la freq se voglio un differenziale
- costante, oscillatorio

• STRETCH UNIASSIALE → carico applicato unidirezionalmente cellule ed EMC orientate lungo la direzione

• BIOREATTORI a COMPRESSIONE (intermittente / continua)
↓
meglio, ~ al carico fisiologico che è dinamico

• BIOREATTORE BIASSIALE → stimoli come composizione ~ al vivo. Produzione di proteoglicani ed EMC mineralizzati
COMPRESSIONE ⇕ + TRAZIONE ⇔, + fisiologico → deposito EMC + proteoglicani.

16 dicembre 2014

vedi confronto scaffold in piastra vs scaffold in Bioreattori

• EMF - based bioreactors → T. Osseo ha caratt. ~ simili piezo elettriche → si riproducono in vitro i campi elettrici che si creano durante l'attività muscolare. Si usano onde di stimolazione → deve essere ciclica, ripetitiva xk fisiologica e non è sottoposto a sollecitazioni continue

CAMPI MAGNETICI PULSATI → le T. Osseo li sente, si riduce il riassorbimento e la crescita ↑ (→ anche in vivo si stimola con campi elettromagnetici x far guarire).

2 spinali di Helmholtz collegare ad un generatore → si sviluppano le linee di campo e tra le 2 spinali si inserisce il campione.

↑
Aumento EMC e proteine tipiche del T. Osseo

BIOREATTORI X CARTILAGINE ARTICOLARE

CA → bassa capacità rigenerative

- poche cellule
- avascolare, non aiuta la rigenerazione
- priva di nervi
- condrociti si rigenerano poco



quando si danneggia non si rigenera, anzi, degrada.
Si può trapiantare da una parte del corpo all'altra → scarsa disponibilità

Approccio eterologo / autologo poco efficienti



CA ingegnerizzata



all'inizio ha la giusta composizione, ma scarsa pr. meccaniche → si usano bioreattori x farla maturare meglio e farla diventare nativa. Deve contenere CONDROCITI (10% volume totale) ma soprattutto COLLAGENE II + PROTEGLI CANI (90%)

si valuta x capire in che cosa sta evolvendo il tessuto

↓ (10-30%) (I-III tipico del ♥)

↓ (3-10%) trattengono H₂O xk hanno cariche ⊖

Il resto del 90% della EMC e' H₂O → x questo la CA e' in grado di assorbire e catturare gli ioni → non la ricompongono!

• Può essere divisa in: 3 zone

- CONDROCITI + PROGENITORI, superficiale
- zona intermedia
- zona calcificata, oltre c'è l'osso.

Lo scaffold non può essere omogeneo in struttura, porosità e materiale → la cartilagine e' complessa. nello scaffold deve avere la stessa divisione della cartilagine naturale

• E' un tessuto BIFASICO:

- parte FLUIDA = liquido interstiziale
- parte SOLIDA = collagene + proteoglicani →

↑ causati dal moto turbolento dello stimed non sono adatti xk troppo elevati!

• BIOREATTORE A COLONNA

Bioreattore con 2 cc perfusi forzatamente, con il fluido che arriva da 2 valvole → Fornisco anche τ , dalle CFD si ricava che $\tau \sim 3 \cdot 10^{-3} Pa$

- Gli sforzi di taglio danno effetti migliori delle compressioni, ma non devono essere troppo elevati, altrimenti si genera **APOPTOSI**
- Pistone che comprime su una piastra contenente i costrutti bloccati $0,1 \div 1 Hz$ di frequenza

CARICATI DINAMICAMENTE

VS

STATICI

↓
stimolo ciclico, intermittente, nel corpo non è costante

> qn di aggregarsi

↑ E

E ~ COSTANTE

CARICO / PRESSIONE CONTINUA è CONTINUAMENTE

↑ SFORZI TAGLIO → utili x il seeding (SPINNER)

↓ SFORZI TAGLIO → x la coltura (ROTATING WALL)

Si cerca di caratterizzare il comp. meccanico del costrutto durante la maturazione con una CELLA DI CARICO

E interno → lineare

E esterno → aum. velocim., grazie ai τ , ai nutrienti >

A seconda della sezione che si considera si avranno E ≠

(a-b) superficie
(c-d) interno

} → ha strutture ≠ come succede in natura, grazie al bioreattore

sewono:

- cardiomiociti → connessi dai dischi intercalari
- Fibroblasti cardiaci
- nervi
- vasi sanguigni
- T. connettivo

cardiomiociti

Ho molte cellule nel volume del tessuto (al contorno della cavità) → ho bisogno di molto O₂ → VASI → devo stimolare l'angiogenesi, specialmente se il costrutto è spesso

75% cardiomiociti disposti in file o formare fibre, connessi dai dischi intercalari (→ giunzioni cellulari x il passaggio di stimoli meccanici ed elettrici)

SONO cellule MUSCOLARI + MONONUCLEARI, con una forma ramificata x creare + associazioni. Ci sono GIUNZIONI GA che contengono **connexina-43** (unica x il T. cardiaco) e

↓
Fattore da osservare x capire la differenziazione delle cellule.

permettono una rapida conduzione elettrica

Fibroblasti cardiaci

Producono e rigenerano EMC (in bassa percentuale), per permettere la trasmissione dello sforzo meccanico. Fatta specialmente da collagene III.

ALTA DENSITA' CELLULARE → devo produrre tante, ma non proliferano → ho bisogno di CS da far differenziare. E' molto difficile fare differenziare in \heartsuit . Si usano di più le IPS x KE + facile fare differenziare.

SORGENTE CELLULARE?

COME LE DIFFERENZIO?

ANGIOGENESI?

↓
deve procedere con lo sviluppo del tessuto
Inoltre deve riuscire contrarsi all'unisono con il tessuto nativo → deve avere capacità adattative anche dal punto di vista elettrico, oltre che dal punto di vista VASCOLARE → devono integrarsi elettromeccanicamente

di neutrano
Focolai di
ARITMIE ↑

si abbassa la soglia di stimolazione e \uparrow i marker del τ cardiaco (connessina 43 e troponina 1)

BIOREATTORE A PERFUSIONE che sfrutta una mesh

(pompa peristaltica + valvola possibile)

Inlete outlet inclinati di 60° per non avere MOTO TURBOLLENZA

Griglia x bloccare gli scaffold e perforarli

buona vitalità cellulare

Nel mio cuore la parete è pulsata a seconda delle fasi cardiache si dilata e si rilassa \rightarrow x riprodurre un fluido pulsatile, creato attraverso una VALVOLA. La pulsatilità è \neq dai bioreattori x τ vascolari, serve x comprimere gli scaffold, deve rilasciare degli sforzi meccanici

PINCH VALVE \rightarrow comprime a $f = 1\text{Hz}$ i costrutti

è una stimolazione MECCANICA 8 gennaio 2015

Avere ossigenazione + stimolazione meccanica è la condiz. ideale.

il passaggio del fluido viene bloccato con una $f = 1\text{Hz}$ tipico del τ cardiaco. Il flusso bloccato crea uno sforzo sul tessuto \rightarrow stimolo meccanico. \uparrow contrazione \downarrow soglia di eccitazione.

Si capisce che la sola diffusione di O_2 non basta \rightarrow perfusione \rightarrow poi stimolazione meccanica.

\downarrow

studiata dal gruppo Eschenhagen, gruppo che si occupa di farmaci \rightarrow sviluppano tessuti in vitro x fare disease modeling e test di drug screening.

1997 \rightarrow coltura c.c. in gel/marrigel x creare una str. 3D che contenga EMC + cellule.

2 tubicini di vetro in un piastra di vetro, messi // su cui è incollato con silicone del velcro. Sul velcro

posso riprendere l'esperimento. È stato integrato un organ bath in bioreattore.

Si misura dopo 10 giorni.

Tensione a riposo $1.15 \pm 0.03 \text{ mN}$

Inoltre nel sistema ci sono anche 2 elettrodi → si stimola il tessuto dall'esterno x misurare una tensione + verosimile → come reagisce il tessuto ad uno stimolo v a quello del cuore? (il pretensionamento)

Aumentando la tensione, la F. del tessuto ↑

↑ PRETENSIONAMENTO $2.81 \pm 0.14 \text{ mN}$

Nel 2000 si stimola meccanicamente i costrutti ottenuti con gli studi del 1997.

4 giorni in coltura statica e poi stretch ^(x 6 di) Fasico unidirezionale =

zionale come stimolo meccanico → deformazione 14% - 20% (v a quella del cuore nativo) x capire la + adatte

↑ Proteine sintetizzate

I tessuti stretchati meccanicamente hanno una > smizione e si vede che le cellule sono + concentrate + in alcuni punti (→ non è ⊕, ma indica che si sono organizzate, anche se non è il massimo). Istologicamente le fibre sono + organizzate e v al tessuto nativo.

Valutando la F. di contrazione si vede che se stretchato // aumenta notevolmente //

Le cellule crescono in dimensione e ampiezza → sono cellule muscolari che ipertrofizzano!

Si è arrivati alla creazione di anellini → ottenuti colando collagene + cellule in forme ad anello, si fa solidificare un po', poi 4 giorni di statica, poi stretch e organ bath. x caratterizzare il tessuto.

Si passa ad anelli x evitare che le cellule si distribuiscano sulla superficie e x fare in modo che gli sforzi siano + distribuiti.

ciò che si ottiene, pur partendo da cardiomiociti neonatali, sono tessuti con caratteristiche v al tessuto di adulti maturi.

Mano a mano che si organizza, + comunico e migliore sono' la conduzione elettrica. 9 gennaio 2015

Nel 2009 sviluppo di un microchip cardiaco.

Struttura di canali (0,5 μm) e colline (0,5 μm) → la topografia e la struttura deve essere simile a quella del tessuto nativo → le cellule se ne accorgono

elettrodi d'oro x + la stimolazione elettrica.

↓
cellule ben allineate + sarcomeri e dischi ben visibili

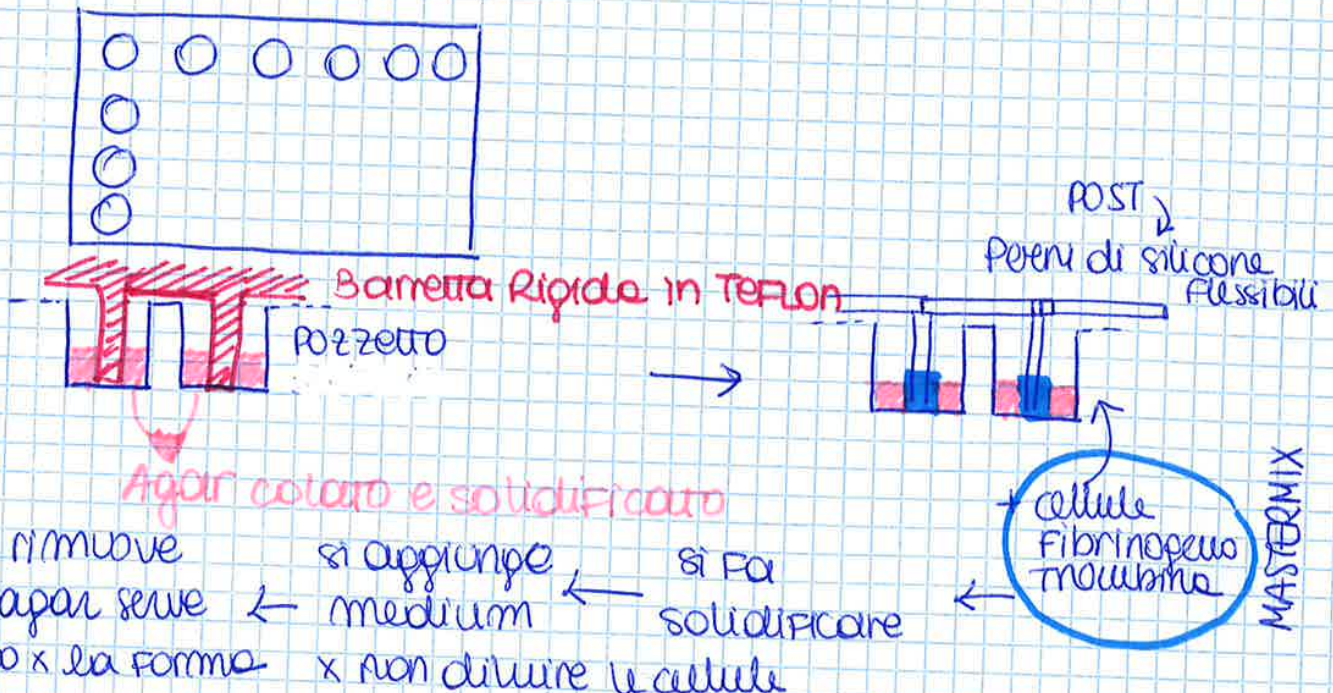
Dimensioni Micro permettono di risparmiare spazio, medium, sostanze, cellule → usato x gli studi in modello in vitro. x la rigenerazione e' troppo piccolo

Micro → studi x ricattare tutti dati in poco tempo, utile x testare i farmaci. Posso portare avanti + test con condizioni ≠.

MICROBIOREACTORS (possono essere applicati a tutti i tessuti).

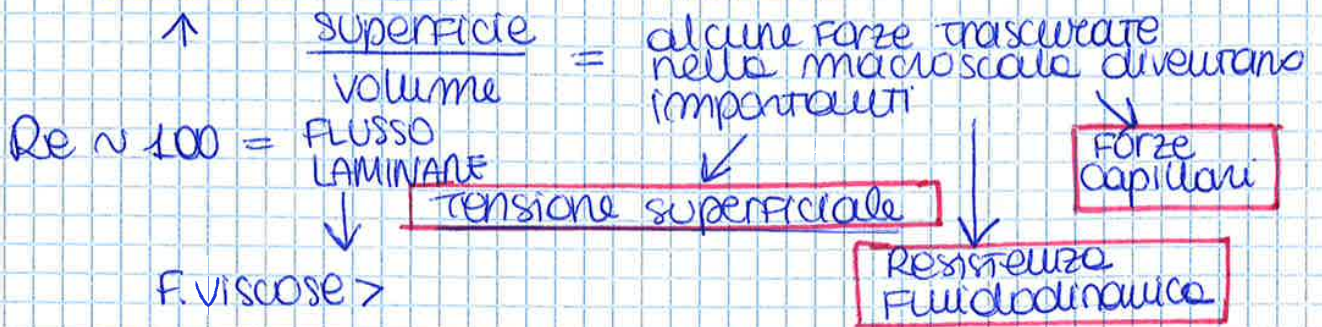
costruiti MINIATURIZZATI presentati dal gruppo di Eschenaghe → cellule + Fibrina e Fibrinogeno, inseriti in una multi-well da 24.

Supporti di silicone rigidi con perni flessibili



REQUISITI DI PROGETTO

- compatibilità materiali
- compatibilità sterilizzazione
- EFFETTO DI SCALA → i fenomeni fisici cambiano:



- valutare la temperatura → in scale piccola posso avere GRANDI GRADIENTI

Micromixers: x il mescolamento dei fluidi, che possono essere ≠ → devo avere condizioni omogenee. Alla micro non si mescolano, xk ho ↓ F. di INERZIA. Solo sulla sup. di divisione riescono ad interagire grazie alla DIFFUSIONE

non è sufficiente

MICROMIXER

ATTIVI

USO forze esterne x indurre un mixing caotico (vs, termiche...)

↑ COSTO

↑ a causa del mixing attivo

Adatto x i MICROBI

PASSIVI

Sfruttano la geometria del canale (serpentina, canali 3D che si intersecano → risparmio anche spazio)

↓ COSTO

↑ DIFFICOLTÀ DI PRODUZIONE

- serpentine

- F-type mixer

Microvalvole: se si deve realizzare flusso pulsatile e x bloccare x poco il passaggio del fluido

ATTIVO

↑ COSTOSO
controllo migliore su portata, durata, direzione del flusso. DIFFICILE da realizzare

PASSIVO

si rompe meno, costa meno:

- polimeri

- tensione superficiale

- iohopel

13 gennaio 2015

Per superare la parte idrofobica devo applicare una pressione dall'esterno → supero l'interfaccia e sono nella parte idrofilica

Micropompe

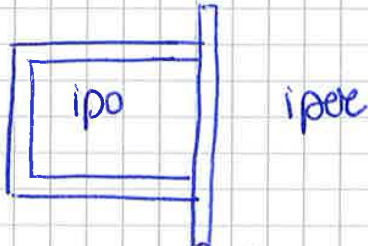
Il loro sviluppo è ancora limitato dalla tecnologia → difficili da realizzare quelle ATTIVE

ATTIVE

PASSIVE

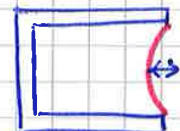
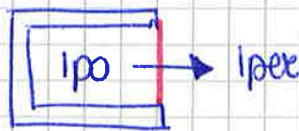
Di solito anche x microbioreattori si usano quelle a pompa o a siringa x microbioreattori e poi le si dilata → deve avere una buona risoluzione x piccole portate

PASSIVE: possono sfruttare la p. OSMOTICA, si sfrutta un principio chimico x mettere in movimento il fluido.



membrana semipermeabile →

H₂O tende a ristabilire l'eq. osmotico passando verso dx. Svuotando il contenitore la membrana si muove:



nel tempo si muove e fluisce.

Sfruttata x una **microsiringa** x il rilascio di **insulina** a pazienti diabetici. Inietta insulina a seconda delle condizioni esterne di glucosio

conversione di pot. CHIMICO x movimento meccanico

Sensing Elements

METODI

OTTICI

ELETTRONICI

Fluorescenza

pH → monitorato con FLUORESCENZA. I coloranti sono
 ↑ sensibili, ↓ costo

pH → controllo con soluzioni tampone = resistono alle variazioni di pH e lo mantengono costante. Devo diluire nel medium → va bene x Fare RICERCA non x costruiti impiantabili, ma intanto non li realizzo con i microbireattori.

O₂ → monitorato con coloranti a fluorescenza o metodi elettrochimici

O₂ → controllo → attraverso materiali o membrane di ossigenazione che permettono lo scambio con l'atmosfera (PDMS)

Microfabbricazione - Tecniche

• FOTOLITOGRAFIA → ^{larga scala a basso costo} permette di produrre tanti di microbireatt.

Materiali fotosensibili + maschere

• SOFT LITOGRAFIA → materiali elastomerici colati su stampei che sono il negativo della forma che voglio ottenere
 x prototipo

• HOT embossing → stampo + polimero + calore → si dà la forma al polimero

• stampaggio x micro iniezione (~ alla tecnica x i macro bireattori.)
 E' molto costoso fare lo stampo, dev'essere sicuro che la forma sia quella definitiva → non lo uso x il prototipo

• micromilling = microfresatura → posso sviluppare delle tensioni nel materiale che portano alla deformazione del PDMS.

Microbireattori x ottimizzazione di bioprocessi

SUPPORTO x EPATOCITI → soluzione x trapianto di fegato

{ ↑ O₂, non viene fatto scendere nel medium x avrei ↑
 ↓
 }

Si sviluppa un materiale con canali x alloggiare le cellule, sono protette dalle pareti del canale e sopra scorre il flusso di medium.



Alla fine in ogni pozzetto ho singole cellule su cui fare studi

Microbireattori impiantabili x terapia contro patologie

Se uso CS x il rilascio di insulina → problemi di rigetto. !

Devo inserirle in contenitori che isolino le CS, ma lascino fuori uscire l'INSULINA.

Si impiantava localmente x il rilascio di sostanze dove serve, senza problemi di rigetto. Il microbireattore deve mantenere le cellule vitali → deve far avvenire delle reazioni biologiche

MICROCAPSULE x bloccare le CS. O in microbireattori a fibre
CAVE