

Indice

INTRODUZIONE.....	1
CAPITOLO 1 – Il Diabete e lo Stato dell’Arte.....	3
1.1 IL METABOLISMO ENERGETICO	3
1.1.1 Il metabolismo del glucosio.....	3
1.1.2 Regolazione del metabolismo del glucosio.....	4
1.2 IL DIABETE MELLITO (DM).....	6
1.2.1 Il Diabete Mellito di tipo 1.....	7
1.2.2 Il Diabete Mellito di tipo 2.....	7
1.3 IL TESSUTO ADIPOSO.....	9
1.4 ORGANO COLTURA DI TESSUTO ADIPOSO.....	9
1.5 OBIETTIVI DEL LAVORO DI TESI.....	10
CAPITOLO 2 – Materiali e Metodi.....	13
2.1 PREPARAZIONE E MANTENIMENTO DEI CAMPIONI DI TESSUTO ADIPOSO.....	13
2.1.1 Preparazione dei singoli campioni di tessuto adiposo.....	13
2.1.2 Le colture in statica.....	15
2.2 METODI DI ANALISI.....	18
2.2.1 Analisi del glucosio.....	18
2.2.2 Pesatura dei campioni.....	19
2.2.3 Analisi di vitalità cellulare tramite test MTT.....	20
2.2.4 Analisi istologica.....	21
2.2.3.1 Colorazione tramite Ematossilina ed Eosina (EE).....	22
2.3 ELABORAZIONE DEI DATI.....	23
2.3.1 Vitalità cellulare.....	23
2.3.2 Consumo di glucosio.....	23
CAPITOLO 3 – Sviluppo di un Sistema di Coltura per il Tessuto Adiposo.....	25
3.1 LE COLTURE IN PERFUSIONE.....	25
3.1.1 Il macro-bioreattore (mL).....	27
3.1.1.1 Sviluppo del sistema.....	27
3.1.1.2 Validazione del sistema.....	31
3.1.2 Il mini-bioreattore (µL).....	32
3.1.2.1 Sviluppo del sistema.....	33
3.1.2.2 Validazione del sistema.....	36

3.1.3	Il micro-bioreattore (nL).....	40
3.1.3.1	Sviluppo del sistema.....	40
3.1.3.2	Validazione del sistema.....	43
3.1.5	Prove sperimentali preliminari in presenza di insulina.....	49
3.1.5.1	Sviluppo del sistema.....	50
3.1.5.2	Validazione del sistema.....	51
CAPITOLO 4 – Risultati	57
4.1	COLTURE IN STATICA.....	57
4.1.1	Vitalità cellulare.....	58
4.1.2	Consumo di glucosio.....	62
4.1.3	Controllo biologico mediante analisi istologica.....	66
4.2	COLTURE IN PERFUSIONE vs COLTURE IN STATICA.....	67
4.2.1	Il macro-bioreattore (mL).....	67
4.2.1.1	Vitalità cellulare.....	68
4.2.1.2	Consumo di glucosio.....	69
4.2.2	Il mini-bioreattore (μL).....	70
4.2.2.1	Vitalità cellulare.....	70
4.2.2.2	Consumo di glucosio.....	71
4.2.3	Il micro-bioreattore (nL).....	72
4.2.3.1	Vitalità cellulare.....	73
4.2.3.2	Consumo di glucosio.....	74
CONCLUSIONI	75
APPENDICE	77
RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI	111

Introduzione

Il Diabete Mellito di tipo 2 è assai diffuso in tutto il mondo e il numero delle persone adulte affette da tale patologia è in costante aumento.

Il DM di tipo 2 è una disfunzione metabolica che consiste nella ridotta, se non addirittura assente, risposta all'insulina degli organi target di questo ormone (muscolo scheletrico, fegato e tessuto adiposo), ciò causa l'innalzamento del livello glicemico del sangue ben oltre i livelli fisiologicamente tollerati dall'organismo con complicanze anche gravi che possono interessare l'apparato cardiovascolare e il sistema nervoso..

Le molteplici cause che conducono all'insorgenza della malattia sono spesso concomitanti e solitamente non chiaramente determinabili ne deriva la difficoltà di trovare terapie universali ed efficaci, si necessita dunque di avere a disposizione terapie mirate per il paziente.

In questo contesto si inserisce l'importanza di perseguire e potenziare la sperimentazione farmacologica con l'obbiettivo di sviluppare cure ad hoc con il fine ultimo di abbassare l'incidenza della malattia e le gravi conseguenze che da essa ne possono derivare.

Uno screening farmacologico paziente-specifico fatto direttamente sull'interessato oltre a poter risultare pericoloso per il soggetto trattato si rivela anche estremamente costoso e difficilmente sostenibile, dunque si è costretti a cercare vie alternative ma comunque valide che permettano di perseguire negli scopi voluti.

La sperimentazione su linee cellulari, murine e umane, delle specie interessate dall'azione dell'insulina non ha offerto risultati soddisfacenti poichè spesso non applicabili all'uomo.

Anche i modelli animali non appaio adatti in quanto non completamente rappresentativi della fisiologia e fisiopatologia umana.

Alla luce di quanto detto nasce l'idea di ricorrere all'uso di biopsie umane.

Nel contesto descritto si inserisce questo lavoro di tesi che si incentra sulla capacità di fare organo coltura di tessuto *in vitro*. Il tessuto oggetto dello studio è quello adiposo in quanto facilmente asportabile dal paziente senza alcun rischio di complicanze o disfunzioni.

Nell'affrontare il problema si ricorre alla microfluidica in quanto la sua praticità e versatilità la rendono uno strumento estremamente utile nel campo della ricerca in quanto permette di condurre prove con costi e tempi bassi ed analizzare in contemporanea condizioni sperimentali differenti.

L'intento è quello di sviluppare una piattaforma microfluidica per organo coltura di tessuto adiposo derivato da biopsie umane che permetta innanzitutto di mantenere le funzioni vitali del tessuto anche *in vitro* e poi che si presti a essere idoneo per rilevamenti e misure del consumo di glucosio da parte della specie cellulare presente in coltura.

A questo scopo vengono investigate tre diverse tipologie configurazionali non microfluidiche, sviluppate e validate fino ad ottenere il dispositivo più funzionalmente adatto ai nostri scopi.

Nel primo capitolo si fornisce una panoramica del quadro generale in cui tale lavoro di tesi si inserisce, la descrizione della patologia e le sue complicanze, le terapie e l'esigenza di ricorrere all'organo coltura per screening farmacologici.

Nel secondo si passa alla spiegazione dei materiali e metodi utilizzati, comprese le colture in statica in presenza di insulina, mentre nel terzo si affronta lo sviluppo del dispositivo con la descrizione dei vari apparati e i principi di validazione seguiti.

Il quarto invece riporta i risultati ottenuti, sia in statica che in perfusione con i tre dispositivi investigati, mostrando i valori di vitalità cellulare e up-take di glucosio.

I numerosi esperimenti condotti non vengono tuttavia riportati all'interno del capitolo e per essi si rimanda all'Appendice.

Capitolo 1

Il Diabete e lo Stato dell'Arte

In questo capitolo viene innanzitutto descritta la malattia metabolica nota con il nome di Diabete Mellito, le principali terapie attualmente impiegate e le problematiche ad esse collegate. Si passa poi a spiegare il ruolo del tessuto adiposo nello studio di metodologie di cura alternative e l'esigenza di sviluppare sistemi *in vitro* per organo coltura di tessuto adiposo. In questo contesto verranno quindi descritte le motivazioni e gli obiettivi del presente lavoro di tesi.

1.1 Il metabolismo energetico

Il termine metabolismo è usato per indicare tutte le trasformazioni chimiche che avvengono nell'organismo o in parte di esso.

Il metabolismo comprende i processi di demolizione delle molecole organiche in molecole più semplici (catabolismo), con liberazione di energia che viene utilizzata nelle molteplici attività dell'organismo, e i processi di sintesi di composti organici a partire da molecole più semplici (anabolismo), con l'utilizzazione dell'energia liberata nei processi catabolici.

Nei processi catabolici il nostro corpo ossida glucidi, lipidi e proteine, producendo principalmente CO_2 e H_2O e liberando l'energia necessaria per i processi vitali. Tale energia può essere immediatamente utilizzata dalla cellula oppure immagazzinata. L'energia liberata dall'ossidazione delle molecole nutritive viene conservata sotto forma di energia di legame chimico in molecole vettrici tra le quali la più importante risulta essere l'ATP.

Nel seguito ci si sofferma in particolare sul metabolismo del glucosio.

1.1.1 Il metabolismo del glucosio

Il principale glucide circolante nel nostro corpo è il glucosio $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$.

A digiuno, il normale livello del glucosio nel sangue è 70-110 mg/dl.

Il $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ a livello cellulare può fungere da fonte primaria di energia oppure può essere stoccato come forma di deposito nell'ambiente citoplasmatico cellulare sotto forma del suo polimero, il glicogeno, presente in quasi tutti i tessuti ma in maggiore quantità nel fegato e nei muscoli scheletrici.

Il catabolismo del glucosio riveste un ruolo essenziale per la produzione di energia. Una volta entrato nelle cellule il $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ viene degradato a piruvato mediante un processo citoplasmatico chiamato glicolisi, nei mitocondri poi il piruvato è convertito ad acetil-CoA il quale a sua volta

attraverso il ciclo dell'acido citrico o ciclo di Krebs viene convertito a CO_2 e H_2O con la produzione del vettore energetico ATP.

1.1.2 Regolazione del metabolismo del glucosio

Il glucosio entra in tutte le cellule mediante diffusione facilitata, carrier proteici mediano il trasporto della sostanza nel senso del suo gradiente elettrochimico senza necessità di apporti energetici dato che il trasporto non avviene contro gradiente. L'ormone insulina svolge un'importante ruolo nella regolazione del metabolismo del glucosio in quanto agisce aumentando il numero di tali trasportatori sulla membrana cellulare.

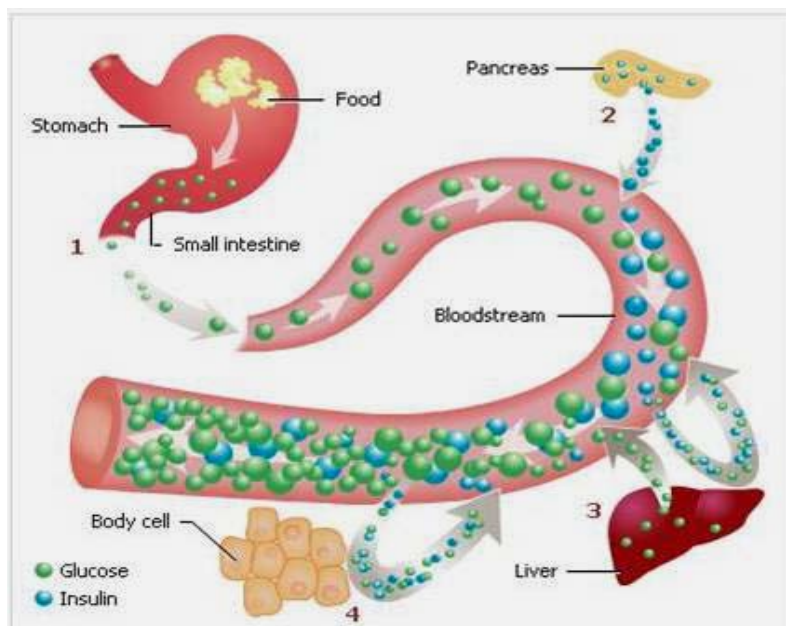


Figura 1.1 *Regolazione della glicemia mediante rilascio di insulina da parte delle cellule pancreatiche delle isole di Langerhans.*

L'insulina è un polipeptide costituito da due catene aminoacidi che legate con ponti disolfuro, che viene secreto da cellule dedicate presenti nelle isole di Langerhans del pancreas, le così dette cellule B. Questo ormone viene sintetizzato nel reticolo endoplasmatico ruvido di tali cellule e viene quindi, trasportata nell'apparato del Golgi dove viene stipata in vescicole membranose, chiamate granuli B, per poi all'occorrenza essere secreto nel circolo sanguigno mediante esocitosi.

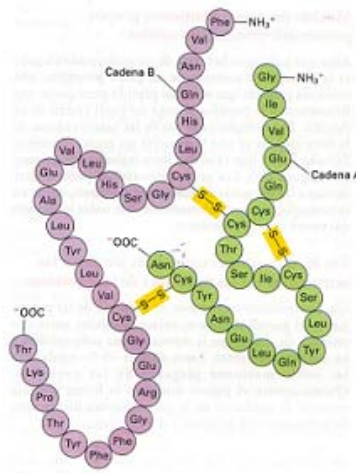


Figura 1.2 *Struttura chimica dell'insulina.*

Il recettore per l'insulina è un tetramero costituito da 2 subunità glicoproteiche α e β collegate mediante ponti disolfuro; le subunità α legano l'insulina e sono extracellulari, mentre le subunità β attraversano la membrana. Quando l'insulina si attacca ai suoi recettori dà avvio ad un pathway interno che porta alla traslocazione del GLUT4 in membrana.

L'insulina si lega ai recettori specifici presenti nella membrana plasmatica delle cellule, il complesso insulina-recettore viene poi internalizzato per endocitosi attivando la cascata di segnali che regola l'internalizzazione del glucosio. Mentre il recettore viene riciclato l'insulina va incontro a distruzione nei lisosomi; da notare che circa l'80% dell'insulina secreta viene normalmente degradata nel fegato e nei reni. Nell'organismo umano la normale concentrazione di insulina nel sangue a digiuno è 0-70 $\mu\text{U/ml}$ che aumenta di 5-10 volte dopo i pasti; la vita media dell'insulina nel circolo sanguigno è di circa 5 minuti.

L'insulina esplica i propri effetti principalmente su tre tipi di tessuto:

- Adipe
- Muscolo
- Fegato

Il GLUT4 è il trasportatore nel muscolo scheletrico, nel cuore e nel tessuto adiposo; una riserva di queste molecole è presente nel citoplasma e nel momento in cui le cellule sono esposte all'insulina si muovono rapidamente verso la membrana plasmatica per esocitosi per poi ritornarvi per endocitosi una volta cessata la stimolazione insulinica, nuovamente disponibili.

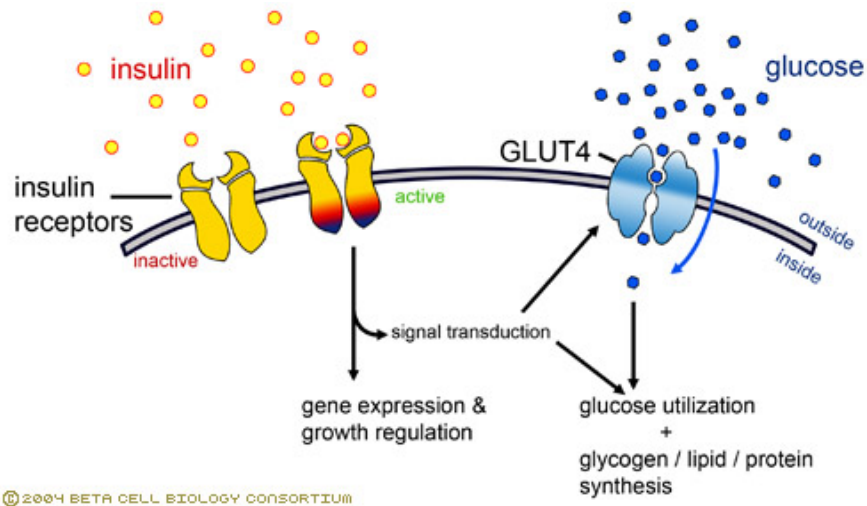


Figura 1.3 *Meccanismo d'azione dell'insulina.*

La patologia metabolica chiamata Diabete Mellito è caratterizzata da un minor up-take di glucosio da parte dei tessuti che porta a un conseguente aumento del suo valore nel sangue, la glicemia, oltre ai valori fisiologicamente tollerati. Inoltre essendo il $C_6H_{12}O_6$ la principale fonte di energia per i processi cellulari in presenza di deficienza intracellulare i processi catabolici vanno ad interessare risorse alternative quali lipidi e proteine, dopo esaurimento delle riserve di glicogeno, per far fronte al fabbisogno energetico richiesto.

1.2 Il diabete mellito (DM)

Secondo la definizione dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), il Diabete Mellito (DM) comprende un gruppo di disordini metabolici a diversa eziologia, che influenza il metabolismo glucidico, lipidico e proteico ed è caratterizzato da iperglicemia cronica, per un difetto della secrezione di insulina o dell'azione dell'insulina, presenti in differente grado.

Le manifestazioni cliniche del DM sono molteplici. I sintomi principali sono quelli legati all'iperglicemia (poliuria, polidipsia, calo ponderale) ma possono anche manifestarsi sintomi di complicanze croniche da esso derivanti; il DM infatti, induce a lungo termine allo sviluppo progressivo di complicanze a carico dell'apparato vascolare e del sistema nervoso (retinopatia, neuropatia, nefropatia, aterosclerosi) che sono causa di disabilità e di più elevata mortalità (Mlinar et al. 2007).

L'attuale classificazione dell'OMS e dell'American Diabetes Association (ADA) si basa sull'eziopatogenesi del DM, in particolare se ne riconoscono di due tipi fondamentali:

- Diabete Mellito di tipo 1
- Diabete Mellito di tipo 2

La patogenesi del DM è multifattoriale e coinvolge meccanismi profondamente differenti nei diversi tipi di malattia.

Il valore soglia della glicemia sopra il quale si è in presenza della patologia diabetica è stato definito in base al livello di glicemia al quale si possono manifestare le prime complicanze croniche del DM.

I valori di riferimento vengono riportati in Tabella 1.1 e si basano sulla glicemia a digiuno.

Tabella 1.1 *Criteri diagnostici per il Diabete Mellito.*

Glicemia < 110 mg/dl	Normale
Glicemia > 110 mg/dl ma < 126 mg/dl	Alterata glicemia a digiuno
Glicemia > 126 mg/dl	Diabete mellito

1.2.1 Il Diabete Mellito di tipo 1

Il DM di tipo 1, noto anche come diabete mellito insulinoindipendente, rappresenta la tipica forma autoimmune di diabete. Nei pazienti affetti da tale patologia vi è una progressiva diminuzione del numero delle cellule B che vanno incontro a distruzione da parte del sistema immunitario attraverso vari anticorpi anti-cellule B.

Gli individui affetti da DM tipo 1 hanno una chiara predisposizione genetica a questa patologia. Il DM di tipo 1 rappresenta circa il 10% di tutti i casi di diabete. L'insorgenza è tipica dell'età giovanile, ma può comunque essere possibile ad ogni età, e in particolare nel 5-10% dei soggetti che sviluppano diabete in età adulta viene riconosciuta una eziologia autoimmune.

L'esordio clinico della malattia è in genere improvviso e avviene con la comparsa dei sintomi tipici dell'iperglicemia dovuta alla grave carenza di insulina.

I pazienti con DM di tipo 1 devono essere trattati tutta la vita con terapia insulinica intensiva, che prevede tre o più iniezioni giornaliere sottocutanee. Il mantenimento di livelli glicemici ottimali è in grado di ritardare significativamente l'insorgenza e di rallentare la progressione delle complicanze. Punto fondamentale nella gestione della patologia diabetica rimane comunque un adeguato stile di vita; una dieta equilibrata e un'attività fisica regolare sono un'importante integrazione alle cure farmacologiche.

1.2.2 Il Diabete Mellito di tipo 2

Il DM di tipo 2, noto anche come diabete mellito non insulinoindipendente, rappresenta la tipica forma di diabete caratterizzata principalmente dall'insulinoresistenza (IR), accoppiata quest'ultima ad una alterata secrezione insulinica.

L'insulinoresistenza è l'incapacità dell'insulina di esplicare il proprio compito per far aumentare l'up-take di $C_6H_{12}O_6$ e mantenere quindi la glicemia a valori fisiologicamente tollerati, in sostanza si ha un alterato comportamento da parte delle cellule target che manifestano una parziale, se non addirittura assente risposta all'ormone.

Succede che l'IR fa innalzare la glicemia che a sua volta, stimola la secrezione di insulina fino a che la riserva di cellule B non viene superata; l'insulina nel sangue dunque aumenta ma non a tal punto da far fronte e avere effetto compensatorio all'alto valore di glicemia.

La malattia in genere esordisce dopo i 40 anni di età, raramente si manifesta in età infantile.

Questa forma di DM può non essere riconosciuta per anni, in quanto l'iperglicemia è frequentemente asintomatica: la diagnosi viene effettuata in corso di malattie intercorrenti e spesso le complicanze croniche del diabete sono già presenti.

Le cause di IR e quindi di DM di tipo 2 sono molteplici e ancora in gran parte sconosciute.

La malattia è strettamente collegata a fattori ambientali, tra i quali quello universalmente riconosciuto è l'obesità (Antuna-Puente et al. 2008), legata ad elevati apporti calorici durante i pasti e sedentarietà. L'80% dei pazienti con DM di tipo 2 è obeso, ciò causa o peggiora l'IR anche se il rapporto causa-effetto non è ancora stato totalmente spiegato.

Le cause dell'IR sono svariate e possono essere concomitanti, si possono avere alterazioni del pathway interno dell'insulina, una minor traslocazione sulla membrana citoplasmatica dei carrier del glucosio o una deficitaria attivazione degli enzimi intracellulari che controllano il metabolismo del glucosio.

Il DM tuttavia non si sviluppa se alle aumentate richieste corrisponde un'adeguata secrezione insulinica; la ridotta capacità secretoria delle cellule B a compensare l'IR, le quali non sono però sottoposte a distruzione autoimmune, ha quindi un ruolo chiave nella patogenesi del DM di tipo 2.

Se la carenza è severa il DM di tipo 2 è sovrapponibile al DM di tipo 1.

I pazienti che presentano DM di tipo 2 vengono sottoposti anch'essi a terapia insulinica intensiva o a trattamento farmacologico con farmaci ipoglicemizzanti. Tali farmaci ipoglicemizzanti si differenziano per il tipo di azione che producono e vengono compresi in tre categorie:

- Regolatori della secrezione insulinica
- Insulinosensibilizzanti
- Regolatori dell'assorbimento del glucosio

È da sottolineare che anche in questo tipo di DM dieta ed esercizio fisico rappresentano un'importante integrazione terapeutica, in particolar modo un'alimentazione equilibrata risulta assai importante in quanto il calo ponderale e il suo mantenimento riducono l'insulinoresistenza. Si raccomanda infatti di mantenere l'indice di massa corporea BMI (*Body Mass Index*) < 25 [Kg/m^2], tale indicatore si ottiene dividendo il peso corporeo [Kg] per il quadrato dell'altezza [m]. Valori normali per tale indice sono 20-25.

Le terapie di cura per il DM di tipo 2 non sono universali come per il DM di tipo 1 ma la loro efficacia varia da paziente a paziente. L'IR può aver origine da molteplici cause e appunto questa concomitanza di fattori fa sì che l'effetto terapeutico possa essere incerto, ne deriva la necessità di perseguire in sperimentazioni volte a testare nuovi farmaci che possano avere proprietà curative sempre più efficaci.

Lo screening di farmaci antidiabetici sugli animali non risulta economicamente vantaggioso e spesso non poi applicabile per l'uomo (van de Venter et al. 2008). Sono comunque possibili studi

specifici su pazienti malati ma anch'essi si rivelano estremamente costosi con il rischio oltretutto di effetti negativi sulla salute (Basu et al. 2009).

In letteratura sono riportati anche studi su sperimentazioni condotte su linee cellulari murine e umane (van de Venter et al. 2008), l'utilizzo però di colture cellulari risulta essere una metodologia limitativa se utilizzata come modello di comportamento dei tessuti.

Alla luce di quanto detto una buona alternativa è rappresentata dalla possibilità di condurre sperimentazioni su organo colture di tessuto ma relativamente a questo non sono ad oggi presenti studi in letteratura.

1.4 Il tessuto adiposo

Il tessuto adiposo come si è detto sopra è uno degli organi su cui l'ormone dell'insulina esplica i propri effetti. Volendo dunque riprodurre *in vitro* la patologia diabetica a fini di studio questo tessuto appare il più adatto in quanto facilmente asportabile dal corpo senza alcuna conseguenza sul paziente. Questo gran vantaggio che esso presenta motiva dunque la scelta di tale organo come target dello studio a scapito degli altri (muscolo e fegato) anch'essi bersaglio dell'insulina.

Il tessuto adiposo è un organo composto da molti depositi, che vengono distinti in viscerali e sottocutanei.

La sua funzione principale è quella di deposito di energia, ma svolge anche funzioni di termogenesi e di organo endocrino.

Il tessuto adiposo viene classificato in base a colore e funzioni in :

- tessuto adiposo bianco (WAT): ha principalmente funzione di riserva energetica
- tessuto adiposo bruno (BAT): riveste un ruolo molto importante nella termoregolazione

Nell'organismo umano adulto quello bruno è scarsamente presente.

La sperimentazione viene condotta su tessuto adiposo bianco (WAT) poiché presente in maggiore quantità nel corpo umano.

1.5 Organo coltura di tessuto adiposo

Il mantenimento delle funzioni vitali di un organo o di una parte di esso al di fuori dell'organismo umano può risultare la via alternativa alla sperimentazione di farmaci su pazienti affetti da qualche particolare patologia.

La coltura *in vitro* di tessuti derivanti da biopsie umane può permettere di riprodurre le caratteristiche fisiologiche dell'organo di derivazione, e da qui la possibilità di effettuare uno screening farmacologico ad hoc.

In particolare il tessuto adiposo può essere mantenuto in coltura per valutarne la risposta in presenza o meno di insulina. La manifestazione della patologia diabetica di insulinoresistenza anche al di fuori del corpo umano permette di testare farmaci antidiabetici e valutarne l'effetto sul comportamento del tessuto stesso.

Riuscire dunque a sviluppare sistemi *in vitro* che permettano di mantenere vitale il tessuto derivante dall'organo risulta essere l'obiettivo principale, tale sistema però deve inoltre permettere la misura della risposta da parte del tessuto nel momento in cui questo venga sottoposto a stimoli esterni per valutarne il comportamento.

La molteplicità di tipologie cellulari presenti e la loro quantità relativa ne rende assai variabile e disomogeneo il comportamento anche all'interno di campioni provenienti da una stessa biopsia, questo ci espone al reale rischio di insuccesso durante le prove ma presenta anche l'enorme vantaggio rispetto alle colture cellulari di poter valutare la risposta del tessuto nel suo complesso, e quindi in sede di sperimentazione farmacologica avere dei riscontri molto più verosimili.

Sin dal momento dell'asportazione si deve essere efficienti nel trattare la biopsia in modo che non venga innanzitutto sottoposta a traumi durante il passaggio dall'ambiente fisiologico intracorporeo a quello artificiale extracorporeo e poi successivamente mantenuta in condizioni tali per cui non sia alterata la sua attività metabolica e possa essere perciò funzionale per i nostri utilizzi. A questo punto si può procedere oltre e sottoporre il tessuto alle prove sperimentali di interesse senza la possibilità che una sua cattiva conservazione ci precluda la riuscita del lavoro in quanto lo sviluppo di un buon dispositivo di coltura nasce ed è permesso in prima analisi da una buona gestione della biopsia, scarsa cura in questo potrebbe inficiare la bontà o addirittura la riuscita delle prove.

1.6 Obiettivi del lavoro di tesi

Il lavoro svolto in questa tesi si pone per obiettivo lo sviluppo di un sistema di coltura microfluidico per il tessuto adiposo che mantenga le funzionalità vitali dell'organo e si presti alla misura del consumo di glucosio da parte della specie cellulare presente. L'esigenza di mantenere vitale l'organo richiede la capacità di ricreare *in vitro* condizioni idonee alla sua sopravvivenza dal momento dell'asportazione durante l'intervento fino all'utilizzo, dato che le valutazioni delle prestazioni del sistema e l'analisi del comportamento cellulare tramite le misure di glucosio richiedono innanzitutto il trattamento appropriato.

Preliminarmente le colture sono state condotte solamente in statica per verificare la capacità di mantenere effettivamente una buona vitalità del tessuto dato che non sono stati trovate in letteratura pubblicazioni che trattassero di lavori su organo coltura di tessuto adiposo umano.

Successivamente, dopo aver riscontrato buone vitalità nei campioni trattati in statica si è iniziato a sviluppare il sistema in perfusione.

Particolare attenzione va posta anche relativamente alla preparazione dei campioni i quali devono potersi presentare adatti alla prova che si desidera realizzare e funzionali alle esigenze dell'esperimento.

Dunque i fattori su cui si può agire per affrontare un problema di organo coltura al fine di migliorarne il risultato sono da ricercarsi in primo luogo nella caratterizzazione dimensionale e morfologica del campione e poi nello studio della migliore configurazione del sistema ;

Il lavoro svolto in questa sede si è focalizzato sulla parte di sviluppo configurazionale della camera di coltura, si sono investigati in sequenza vari sistemi fino a giungere a quello microfluidico più funzionale agli scopi desiderati.

Inoltre si sono condotti esperimenti, solamente in statica, in presenza di insulina per verificare la presenza o meno di insulinoresistenza.

Nell'affrontare il lavoro, l'utilizzo di materiale umano ha richiesto numerose prove sperimentali a causa dell'elevata variabilità sperimentale che ha reso difficile sia l'ottenimento dei dati sia la loro interpretazione.

Capitolo 2

Materiali e Metodi

In questo capitolo ci si ripropone di spiegare in modo puntuale ed esaustivo le metodologie di preparazione e mantenimento dei campioni di tessuto adiposo dal momento dell'arrivo in laboratorio fino al loro utilizzo nelle prove sperimentali di organo coltura.

Nella seconda parte del capitolo invece ci si dedica alla descrizione dei metodi di analisi per l'acquisizione dei valori di consumo di glucosio, peso e vitalità cellulare. A seguire si illustra la procedura di elaborazione dei dati ottenuti da tali misurazioni.

2.1 Preparazione e mantenimento dei campioni di tessuto adiposo

Al paziente sottoposto ad operazione chirurgica viene asportata una piccola porzione (circa 1 cm³) di tessuto adiposo bianco (WAT); il prelievo può interessare la regione viscerale o quella sottocutanea.

La cospicua quantità di massa adiposa presente nella cavità addominale a protezione degli organi interni ne garantisce la disponibilità all'asportazione senza complicanze o disfunzioni nel soggetto interessato. Allo stesso modo, il prelievo avviene anche dallo strato sottocutaneo, pur essendo quest'ultimo meno voluminoso e quindi quantitativamente meno abbondante l'accumulo di massa grassa si presenta comunque notevole in quanto solitamente i pazienti trattati appaiono sovrappeso e caratterizzati da problemi di obesità.

Non sempre i soggetti sottoposti al prelievo sono affetti da diabete, le biopsie che ci giungono possono provenire anche da pazienti sani.

L'asportazione di una parte di tessuto da un organo vivente al fine di effettuare colture in vitro richiede un adeguato trattamento fin dal momento dell'estrazione, una scorretta o inadatta gestione ne pregiudicherebbe le funzionalità e l'utilizzo.

In sala operatoria la biopsia è stata posta in falcon sterili contenenti medium e conservata a 4°C. L'utilizzo deve avvenire il prima possibile.

2.1.1 Preparazione dei singoli campioni di tessuto adiposo

All'arrivo in laboratorio la biopsia si presenta tendenzialmente di 3-4 cm³, in Figura 2.1 si riporta la foto di un piccolo pezzo di tale tessuto.

Il tessuto adiposo è caratterizzato da un'abbondante irrorazione da parte dei vasi sanguigni, quelli di dimensioni maggiori sono visibili anche ad occhio nudo

Visivamente più difficili da osservare ma senz'altro generalmente sempre presenti sono anche i residui del tessuto di interconnessione tra adipe e organi interni, costituiti da materiale cartilagineo, tali zone sono facilmente riscontrabili al momento del taglio perché di consistenza differente rispetto al tessuto adiposo.

La biopsia non può ovviamente essere utilizzata tal quale ma deve essere opportunamente preparata per soddisfare al meglio i requisiti di:

- omogeneità di struttura cellulare tra campioni diversi della stessa biopsia e tra campioni di biopsie diverse
- dimensioni dei singoli campioni nell'intervallo compreso tra 3-5 mm di diametro



Figura 2.1 *Pezzo di biopsia fresca.*

Il primo punto fa riferimento all'omogeneità macroscopica. Si vogliono quindi eliminare le zone di biopsia caratterizzate da maggiore densità di vasi sanguigni o da esteso tessuto connettivo. A livello microscopico oltre agli adipociti è riscontrabile una varietà di specie cellulari interferenti e non eliminabili, a tal proposito si rimanda alla sezione risultati in cui al paragrafo 4.1 vengono riportate le sezioni istologiche.

L'altro aspetto su cui focalizzarsi è rappresentato dalla scelta della dimensione che deve essere ragionata e non casuale. Le valutazioni da fare sono molteplici ed è soprattutto da considerarsi il fatto che dimensioni inadatte possono indurre ad implicazioni sfavorevoli nella coltura in vitro e nella misurazione del consumo di glucosio.

I fattori da considerarsi nella scelta sono:

- trasporto dei nutrienti all'interno del tessuto
- up-take di glucosio

Il campione deve presentarsi di dimensioni appropriate affinché il flusso diffusivo dei nutrienti attraverso la superficie del campione sia maggiore o uguale del loro consumo

nell'intero volume. In questo modo si assicura una concentrazione sufficientemente elevata di nutrienti in ogni zona del campione evitando la formazione di zone necrotiche. Il glucosio è uno dei principali nutrienti da considerare.

Per contro, non è possibile neppure scendere troppo nelle dimensioni seppur per quanto appena detto risulterebbe la scelta più conveniente: minori sono le dimensioni dei campioni e minore è il numero di moli di glucosio consumate. Un basso consumo di glucosio ne rende impossibile la misurazione della variazione di concentrazione nel terreno di coltura anche impiegando volumi di liquido di pochi microlitri.

Oltre a ciò si deve anche tener presente delle dimensioni dei dispositivi nei quali si intende far la coltura, la caratterizzazione dimensionale del pezzo deve essere fatta compatibilmente con il sistema nel quale lo si vuole poi trattare. Tale aspetto anche se da considerarsi viene comunque a coda delle altre problematiche, decisamente più importanti e quindi vincolanti.

In base a queste considerazioni e a prove preliminari di vitalità svolte prima del presente lavoro di tesi, i campioni sono stati tagliati delle dimensioni di circa 2-3 mm³.

A questo punto, passiamo alla descrizione della procedura standard di preparazione dei campioni.

La biopsia (Fig. 2.1), conservata a 4 °C, viene posta su una superficie sterile adatta al taglio, solitamente una piastra Petri, e bagnata con del medium per non lasciarla a secco e per sciacquarla dagli eccessi di sangue. Per mezzo di due lamette, sterili e monouso, si procede al taglio; una la si utilizza per l'incisione vera e propria l'altra come aiuto nello staccare il pezzo tagliato dalla massa; le punte sottili e affilate delle lamette e le loro piccole dimensioni permettono un buon controllo nel taglio e una buona precisione di esecuzione. I campioni mediante pinze o micropipette Gilson vengono riposti in multiwell da 24 pozzetti con terreno di coltura e messi in coltura come spiegato più puntualmente nel paragrafo successivo.

Il tutto deve avvenire in totale sterilità, per tal motivo ogni operazione sopra descritta viene eseguita sotto cappa laminare facendo gran attenzione a non esporre il tessuto a possibili fenomeni di contaminazione che rendono la biopsia inutilizzabile.

2.1.2 Le colture in statica

In questo paragrafo si affronta la descrizione delle procedure di mantenimento della biopsia dal momento dell'asportazione fino al momento dell'utilizzo nelle prove sperimentali.

Dopo il taglio, i campioni preparati vengono avviati alla coltura per farne riprendere e mantenerne la vitalità in previsione dei successivi utilizzi.

I campioni vengono riposti in multiwell da 24 pozzetti con 800µl di terreno di coltura.

La composizione base del terreno di coltura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich) viene riportata in Tabella 2.1.

A questo viene addizionato il 10% di siero fetale bovino (FBS), lo 0.5% di penicillina e lo 0.5% di streptomina (Invitrogen).

In alcuni casi (vedi Biopsia N°11 in Appendice) è stato utilizzato medium con il 20 % di FBS.

Tabella 2.1 *Composizione base del terreno di coltura.*

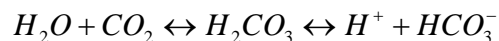
Sostanza	Funzione
<i>Cloruro di Sodio</i>	Regolazione della pressione osmotica
<i>Sali Inorganici</i>	Bilancio elettrolitico simile a quello presente nel sangue
<i>Bicarbonato di Sodio</i>	Assieme ad un corretto apporto di CO ₂ mantiene il pH del medium a livelli ottimali per la crescita cellulare
<i>Glucosio</i>	Fonte di energia
<i>Aminoacidi</i>	Fornitori di azoto per la sintesi proteica
<i>Vitamine</i>	Cofattori in alcune reazioni biochimiche
<i>Rosso di Fenolo</i>	Indicatore di pH

La piastra con i campioni viene riposta in incubatore per tutto il periodo di tempo durante il quale si intende conservarli in coltura.

L'incubatore consente di operare in condizioni caratterizzate da:

- temperatura di 37 °C
- umidità relativa del 95 %
- aria arricchita con il 5 % di CO₂

Gradualmente il medium si impoverisce in O₂ a causa dell'attività cellulare ma tuttavia grazie all'atmosfera controllata dell'incubatore che permette un reintegro dell'ossigeno disciolto, il tessuto ha comunque disponibile il sufficiente apporto di O₂ necessario al mantenimento del proprio stato metabolico. Al contempo l'incubatore soddisfa anche l'esigenza di stabilizzare il pH del medium ad un valore pari a 7.2, ideale per il mantenimento cellulare, attraverso un fine controllo della concentrazione della CO₂. La connessione tra anidride carbonica e acidità del terreno di coltura è esplicata attraverso la reazione di equilibrio qui riportata:



La respirazione cellulare porta all'eliminazione di cataboliti tra i quali proprio la CO₂ il cui accumulo nel medium comporterebbe un'acidificazione del terreno, volendo scongiurare quest'evenienza l'incubatore al 5 % di CO₂ si dimostra funzionale al nostro scopo in quanto il raggiungimento dell'equilibrio imposto dalla reazione causa la diminuzione della sua concentrazione e conseguentemente la stabilizzazione del pH.

La scelta di un quantitativo di medium pari a 800 µl è stata fatta perchè si ritiene che esso possa essere sufficiente per il sostentamento del tessuto per almeno 2 giorni in quanto prove

sperimentali preliminari hanno mostrato una buona sopravvivenza della biopsia. In caso di non utilizzo della biopsia dopo i 2 giorni, o al massimo 3 si procede ad un cambio di medium che ci salvaguarda nel caso i nutrienti necessari siano effettivamente insufficienti.

Relativamente alla concentrazione di glucosio il medium si classifica in:

- *High Glucose* (HG) 4.5 mg/ml
- *Low Glucose* (LG) 1 mg/ml

Il medium HG è quello che spesso viene usato in colture di adipociti, mentre l'LG è quello normalmente impiegato per la maggior parte delle colture.

Nei nostri studi l'utilizzo dell'uno o dell'altro è servito per riscontrare possibili variazioni nella vitalità. Nella sezione risultati al Capitolo 4 vengono riportati i risultati relativi all'utilizzo dei due tipi di medium, e uno studio sulla capacità di adattamento da parte del tessuto in coltura.

Prima del loro impiego nelle prove i campioni vengono lasciati in incubatore per 2-3 giorni in modo che le cellule si adattino alle nuove condizioni in cui si trovano. Si possono raggiungere i 6-7 giorni nel caso in cui si sia interessati a valutarne la ripresa ed eventualmente il declino, evidenziato da un abbassamento dell'attività cellulare che preannuncia la morte del tessuto.

Trascorsa la fase di adattamento i campioni sono pronti per essere impiegati nelle varie prove in coltura statica o dinamica. Prima di procedere si misura per ciascun pozzetto contenente il campione la concentrazione di glucosio, per le modalità di misurazione si rimanda al paragrafo successivo. Ciò permette di avere un riscontro sullo stato di vitalità del tessuto il quale manifesterà un diverso consumo in relazione al suo stato metabolico e alle sue dimensioni.

Per le prove in statica, il campione viene lasciato nel pozzetto della multiwell da 24 in cui era stato messo per la fase di adattamento. Viene tolto tutto il terreno, il campione ed il pozzetto vengono lavati con PBS e poi viene aggiunto il nuovo terreno di coltura (800 µl). I campioni vengono rimessi in incubatore. Alla fine della prova (che può durare da 1 giorno fino ad un massimo di 3 giorni) vengono effettuate tutte le analisi (§2.2).

Le prove in coltura statica sono state impiegate:

- per studiare il comportamento del tessuto sottoposto a terreni di coltura a composizione diversa
- come coltura di riferimento per valutare l'efficacia delle colture in perfusione

In particolare per quanto riguarda la composizione dei terreni di coltura sono stati variati i seguenti due parametri: concentrazione di glucosio e concentrazione d'insulina.

Le concentrazioni di glucosio impiegate sono quelle dei già descritti terreni HG e LG. In merito a questo si sottolinea come l'utilizzo del medium HG richieda l'impiego di volumi di terreno di coltura inferiori (500 µl invece di 800 µl) affinché una variazione di concentrazione di glucosio possa essere rivelata, a parità di consumo da parte del campione.

Per quanto riguarda la concentrazione d'insulina i valori impiegati sono:

- 20 nM
- 40 nM
- 100 nM
- 200 nM

2.2 Metodi di analisi

Una volta portate a termine le prove , siano esse in statica oppure in perfusione, si effettuano misure su:

- Medium
 - Glucosio
- Campioni
 - Peso
 - Vitalità cellulare

L'obiettivo di rilevare e valutare il consumo di glucosio da parte della specie cellulare presente in coltura conduce a misure di concentrazione nel terreno.

Tali misure però non possono essere utilizzate tal quali in quanto poco significative essendo esse conseguenza di:

- dimensione del campione
- comportamento del tessuto

Per tal motivo il campione viene pesato e sottoposto a test MTT per valutarne la vitalità.

2.2.2 Analisi del glucosio

La determinazione quantitativa del glucosio nel medium viene eseguita mediante il rilevatore glicemico Accu-Chek® Compact Plus dotato di strisce reattive Accu-Chek® Compact (Roche Diagnostics) mostrato in Figura 2.2.

Tale dispositivo è quello normalmente in uso per nei pazienti diabetici per l'autocontrollo della glicemia nel sangue .



Figura 2.2 Glucometro Accu-Check®.

Lo strumento è di piccole dimensioni e automatico quindi molto pratico nell'utilizzo.

Il principio di funzionamento è di tipo enzimatico spettrofotometrico e si basa sulla quantificazione della reazione enzimatica di ossidazione del glucosio $C_6H_{12}O_6$ in acido gluconico $C_6H_{12}O_7$ mediante glucosio-ossidasi.

Ogni striscia reattiva presenta una zona sensibile biologicamente attiva contenente l'enzima, questa zona reattiva assorbe la soluzione per azione capillare e avvia la reazione chimica che modifica il colore della zona stessa. Lo strumento mediante fotometria a riflessione registra il cambiamento di colore e converte il segnale ottenuto nel corrispondente valore glicemico.

Lo strumento necessita per la misurazione soltanto di un volume di soluzione di circa 1.5 μ l, può effettuare misure nell'intervallo 10-600 mg/dl con una imprecisione < 4%.

Il tempo di risposta dello strumento è di 5 secondi.

Ad ogni time point prescelto la misura viene così effettuata:

il medium viene adeguatamente mescolato e ne vengono prelevati 4 μ l. Una goccia di questi 4 μ l viene deposta su un vetrino e la striscia reattiva Accu-Check® viene appoggiata sulla goccia mantenendo lo strumento in posizione verticale. Per capillarità la striscia assorbe solo il quantitativo di medium necessario per la misurazione e lo strumento fornisce il valore.

Quando queste misure sono effettuate al termine della coltura possono essere svolte in condizioni di non sterilità, in caso contrario vanno effettuate sotto cappa a flusso laminare impiegando materiale sterile.

2.2.1 Pesatura dei campioni

Le limitate dimensioni del campione e le sue caratteristiche meccaniche ne rendono poco pratica la pesatura.

Una determinazione diretta del peso risulta pressoché impossibile a causa delle difficoltà di manipolazione del pezzo, il problema si aggira ponendo il campione in soluzione.

La scelta delle procedure operative è sostanzialmente dovuta a questioni di immediatezza e praticità.

Viene presa un'ependorf da 1.5 ml riempita con 200 μ l della stessa soluzione che sarà successivamente impiegata per il test MTT, per la cui descrizione si rimanda ai successivi paragrafi; il tutto viene pesato utilizzando una bilancia analitica con precisione pari a 10^{-4} g (bilancia ATL-224, Acculab) e considerato tara. Dopo di ciò si inserisce il campione e si procede ad un'ulteriore pesatura.

Al fine di eliminare possibili fonti di errore e non avere interferenze indesiderate nella determinazione della misura che causerebbero l'ottenimento di un valore falsato si mette in atto un piccolo ma efficace accorgimento che consiste nell'asciugare i campioni prima di procedere con la pesatura. Una volta tolti dal mezzo di coltura i pezzi vengono appoggiati su un foglio di carta assorbente che per capillarità li depura dai residui di medium; l'ottenimento di valori di peso meno dispersi dà un'indicazione del fatto che tali valori siano più attendibili. Le operazioni di pesatura non necessitano di avvenire in ambiente sterile essendo praticate a fine coltura.

2.2.3 Analisi di vitalità cellulare tramite test MTT

Il test MTT (Sigma-Aldrich) è un saggio colorimetrico standard per la misurazione della funzionalità enzimatica mitocondriale. L'analisi si presta bene ai nostri scopi in quanto l'attività enzimatica fornisce un'indicazione della vitalità cellulare. L'enzima mitocondriale succinato deidrogenasi è attivo infatti soltanto nelle cellule vive.



Figura 2.3 Conversione del sale di tetrazolo MTT in sale di formazano.

L'analisi si basa sulla conversione da parte dell'enzima suddetto del composto chimico MTT (sostanza di colore giallo) in formazano (sostanza di colore blu/violacea) mediante taglio dell'anello di tetrazolo come mostrato in Figura 2.3.

L'entità di tale reazione e quindi l'attività enzimatica è valutata e misurata mediante la lettura spettrofotometrica del campione. Il sale di formazano ha un picco di assorbimento centrato alla lunghezza d'onda di 580 nm.

Il sale di formazano si accumula all'interno delle cellule non essendo solubile in acqua e permeabile alla membrana plasmatica. Il tessuto deve essere perciò trattato con una soluzione estraente affinché il sale sia solubilizzato per essere successivamente analizzato allo spettrofotometro.

Riportiamo nel seguito le procedure operative di esecuzione del test.

Il campione da sottoporre ad analisi viene inserito in un eppendorf da 1.5 ml nella quale viene aggiunto 1 ml di soluzione MTT (MTT in PBS 1x alla concentrazione di 0.5 mg/ml) e posto in incubazione per 3 ore a 37 °C.

Dopo incubazione i campioni, che appaiono ora di colore blu nelle zone che contenevano cellule vitali vengono trasferiti in una multiwell da 24 dove si lasciano per circa un'ora con 2 ml di una soluzione estraente composta dal 10% di DMSO (Dimetil-solfossido) e dal 90% di isopropanolo. Per facilitare il processo di estrazione si tagliano con le forbici i campioni in pezzetti molto piccoli.

Dopo aver lasciato riposare il tutto per il tempo indicato i pezzetti di tessuto appaiono bianchi. Nel caso ci fossero ancora tracce violacee nei campioni sarebbe necessario prolungare il tempo di incubazione e possibilmente ridurre ulteriormente le dimensioni dei frammenti di campione.

La soluzione di estraente e Sali di formazano può quindi essere analizzata allo spettrofotometro. La baseline viene tracciata utilizzando come riferimento l'acqua, poi si passa alla lettura dell'assorbanza rispettivamente dell'estraente "puro" e delle varie soluzioni.

2.2.4 Analisi istologica

L'analisi istologica permette di valutare visivamente la morfologia dei tessuti e delle cellule che lo compongono.

Il campione necessita di essere tagliato in fettine sottili e opportunamente colorato per mettere in evidenza le varie caratteristiche del tessuto.

I campioni vengono fissati in OCT mediante congelamento in N₂ liquido e conservati a -80 °C.

Per tagliare i campioni è stato utilizzato il criostato Leica CM 1850. La temperatura della camera criostatica è stata posta a -20 °C in modo che il campione rimanga ben compatto per il taglio.

Sono state fatte fette dello spessore di 10, 14 e 20 µm. Le fette così preparate vengono montate su vetrini portaoggetto superfrost e possono essere conservate a -80 °C prima di essere sottoposte a colorazione.

La scelta della tipologia di colorazione dipende dalle caratteristiche del tessuto che si vogliono analizzare. In questo lavoro è stata effettuata la colorazione tramite Ematossilina ed Eosina in quanto permette di osservare la struttura base di un tessuto.

Le istologie sono state osservate mediante microscopio Olympus BX60.

2.2.4.1 Colorazione tramite Ematossilina ed Eosina (EE)

La colorazione ematossilina ed Eosina (EE) è la colorazione di base nello studio microscopico dei tessuti. L'ematossilina colora in blu/violaceo i nuclei cellulari mentre l'eosina colora in rosa il citoplasma.

I vetrini congelati a -80 °C vengono lasciati a RT per 5 minuti circa. Successivamente vengono fissati con metanolo (conservato a -20 °C) per 10 minuti a +4 °C.

Le successive fasi della procedura di colorazione vengono riportate in Tabella 2.2.

Tabella 2.2 *Procedura di colorazione tramite EE.*

Operazioni	Tempo [min]
Idratazione:	
• EtOH 100 %	5'
• EtOH 95 %	3'
• EtOH 80 %	3'
• H2O milliQ	3'
Colorazione:	
• Ematossilina	15'
• H2O corrente	1'30''
• Eosina	4x5'
• H2O milliQ	
Disidratazione:	
• EtOH 80 %	3'
• EtOH 95 %	5'
• EtOH 100 %	15'
• Xilene	

Le sezioni vanno fissate usando l'Eukitt, si deposita una goccia di soluzione di fissaggio su un lato del vetrino e si copre con un coprivetrino, con una leggera pressione si cerca di stendere uniformemente il fissatore su tutta la superficie. Lasciare quindi asciugare a RT.

2.3 Elaborazione dei dati

Per comodità si riportano nuovamente qui di seguito le misure condotte a fine coltura:

- Medium
 - Glucosio
- Campioni
 - Peso
 - Vitalità cellulare

I dati ottenuti vengono opportunamente elaborati mediante fogli di calcolo Excel al fine di ricavarne delle valutazioni sulla sperimentazione effettuata.

2.3.1 Vitalità cellulare

Le misure di vitalità cellulare si ottengono tramite test MTT come riportato al paragrafo 2.2.3. Il valore di *Optical Density* (OD) letto allo spettrofotometro viene normalizzato rispetto al peso del campione nel modo seguente:

$$\frac{MTT}{Peso_{campione}} = \frac{OD_{campione} - OD_{estraente}}{Peso_{campione}}$$

Il valore assoluto di MTT di due campioni diversi può differire o per un'effettiva differenza di vitalità delle cellule o per una differenza nel numero di cellule che compongono il campione.

Il peso di un campione fornisce una misura indiretta del numero di cellule che lo compongono ed il valore di MTT normalizzato per il peso permette di analizzare esclusivamente le differenze di vitalità cellulare.

2.3.2 Consumo di glucosio

Le misure di consumo di glucosio vengono ottenute con misurazioni Accu-Chek® come già spiegato al paragrafo 2.2.2.

I valori di concentrazione di glucosio vengono normalizzati rispetto a:

- Vitalità cellulare in termini di MTT

$$\frac{GlucosioConsumato}{MTT} = \frac{c - c_{controllo}}{MTT}$$

- Peso del campione

$$\frac{GlucosioConsumato}{Peso_{campione}} = \frac{c - c_{controllo}}{Peso_{campione}}$$

dove:

c = concentrazione nel medium [mg/dl]

$c_{controllo}$ = concentrazione del medium di controllo [mg/dl]

Il medium di controllo è costituito dallo stesso medium impiegato per la coltura e posto in un analogo pozzetto senza campione. L'utilizzo di tale medium come riferimento consente di tener conto di eventuali fenomeni di evaporazione a cui è soggetto il medium nell'incubatore essendo esposto ad una temperatura di 37 °C per tutto il tempo di durata della coltura.

Utilizzando come riferimento la concentrazione del medium a inizio coltura (1 mg/ml oppure 4.5 mg/ml) si otterrebbero valori di consumo negativi da imputarsi esclusivamente alla diminuzione del volume di terreno con conseguente aumento della concentrazione.

Analogamente a quanto descritto nel paragrafo precedente per i valori di vitalità si lavora con i valori normalizzati e non con quelli assoluti per gli stessi motivi già discussi sopra.

Capitolo 3

Sviluppo di un Sistema di Coltura per il Tessuto Adiposo

In questo capitolo si affronta lo sviluppo di un sistema di coltura in flusso per organo coltura che permetta anche l'analisi dell'up-take di glucosio.

Il lavoro svolto si ripropone di sviluppare e validare diverse configurazioni strutturali di bioreattori col fine di arrivare a quella funzionalmente più adatta ai nostri scopi.

Si riporta a fine capitolo anche uno studio sperimentale preliminare sull'uso dell'insulina in colture dinamiche.

3.1 Le colture in perfusione

Nel lavoro di sviluppo di un sistema di organo coltura l'obiettivo che ci si prefigge è quello di riuscire a mantenere le funzioni fisiologiche del tessuto anche al di fuori del corpo umano.

I sistemi di coltura ricreano artificialmente *in vitro* condizioni tali da permettere la sopravvivenza dell'organo e il mantenimento delle sue funzionalità.

In particolare nel tessuto adiposo si è interessati a valutare oltre alla vitalità anche il consumo di glucosio; il sistema che in questo lavoro di tesi si vuole sviluppare deve dunque avere una configurazione appropriata e funzionale tale da poter permettere anche il rilevamento e la misura della variazione di concentrazione di glucosio nel medium di coltura.

Le metodologie impiegate per organo coltura si distinguono in:

- statiche
- dinamiche

Le colture in statica sono state descritte al secondo capitolo.

In questo capitolo ci si dedica allo sviluppo di un sistema dinamico volto a migliorare le condizioni di coltura proprie dei sistemi in statica che assumono di certo gran utilità nello studio preliminare del problema ma che appaiono piuttosto limitanti in sede di ottimizzazione.

La caratterizzazione fluidodinamica in questo genere di sistemi deriva dal fatto che il medium è sottoposto a movimentazione attraverso l'organo in coltura.

I diagrammi a blocchi in Figura 3.1 e 3.2 presentano lo schema concettuale di un apparato sperimentale in flusso.

Si individuano due approcci nello sviluppo del sistema :

- sistema in flusso con ricircolazione (Fig. 3.1)
- sistema in flusso unidirezionale (Fig. 3.2)

Entrambi gli apparati presentano due identiche sezioni, quella di pompaggio e la camera di coltura. Un organo che permetta la movimentazione del medium è ovviamente necessario per mantenere il flusso, quanto allo scambiatore di gas si rimanda al paragrafo 2.1.2 in qui si è discusso del ruolo di O_2 e CO_2 nella gestione delle colture.

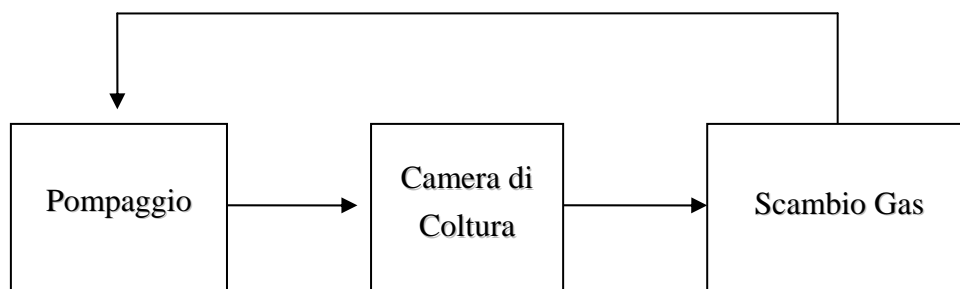


Figura 3.1 Schema concettuale di un apparato sperimentale in flusso con ricircolazione.

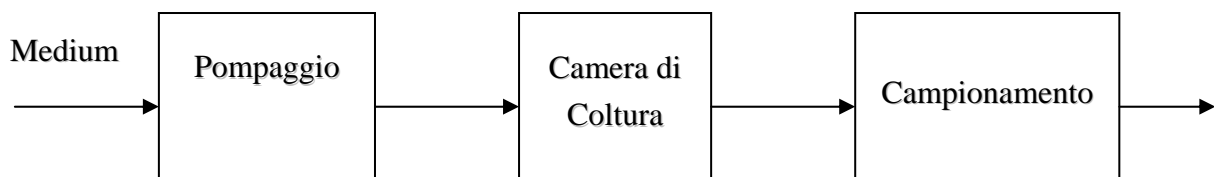


Figura 3.2 Schema concettuale di un apparato sperimentale in flusso unidirezionale.

Emerge dall'osservazione dei diagrammi sopra riportati l'importante peculiarità che contraddistingue il secondo sistema dal primo e che consiste nella possibilità di fare analisi anche a prova in corso.

Un sistema come quello mostrato in Figura 3.1 chiuso e ricircolante è limitativo in quanto il medium può essere sottoposto ad analisi solo a fine coltura senza la possibilità di monitorare la grandezza di interesse in continuo o con campionamenti ravvicinati a time point prestabiliti durante l'intervallo di tempo di durata della prova.

Un sistema aperto unidirezionale come quello in Figura 3.2 invece dimostra un potenziale maggiore perché permette il controllo temporale della variabile.

Il lavoro di tesi qui affrontato è focalizzato sullo sviluppo della camera di coltura e l'adeguato accoppiamento con il sistema di pompaggio utilizzando principalmente analisi effettuate a fine coltura. Tale lavoro si inserisce all'interno di un progetto più ampio che prevede anche lo

sviluppo di sistemi di misura *on line* e la loro integrazione nei sistemi di coltura dinamici per ottenere informazioni relativa alla dinamica del comportamento cellulare durante la coltura.

Il regime di flusso risulta molto importante in quanto i fenomeni di trasporto coinvolti possono influenzare l'acquisizione di glucosio da parte del tessuto; caratterizzante dei sistemi dinamici è il trasporto di materia convettivo dal mezzo di coltura all'organo che si affianca e supporta il classico trasporto diffusivo proprio delle colture in statica.

Le configurazioni che questi sistemi di coltura possono assumere sono molteplici, dispositivi diversi si dimostrano egualmente adatti ed efficienti prestandosi bene nell'adempiere alla loro funzione di mantenimento della vitalità dell'organo. Nonostante ciò però non tutti i sistemi si dimostrano in pratica utilizzabili poiché oltre a mantenere una buona vitalità del tessuto si vuole assicurare la possibilità di rilevare e misurare variazioni di composizione nel medium a valle della biopsia; non tutti i sistemi permettono di riscontrare un consumo di glucosio seppur l'organo a fine coltura si presenti ancora vitale.

Nel seguito si riportano i diversi sistemi presi in esame che hanno portato allo sviluppo di un dispositivo di organo coltura ottimale per il rilevamento dell'up-take di glucosio in biopsie di tessuto adiposo.

3.1.1 Il macro-bioreattore (mL)

Il primo dispositivo di coltura investigato è un sistema chiuso con ricircolazione (Fig. 3.1).

Questo sistema era stato progettato in precedenza nel laboratorio dell'Ing. Elvassore (Sbalchiero 2005) ed è stato impiegato con alcune modifiche alla camera di coltura.

3.1.1.1 Sviluppo del sistema

La configurazione completa del l'impianto comprende le seguenti sezioni:

- unità di movimentazione del terreno di coltura
- unità di scambio gas
- camera di coltura

Si individua il cuore del sistema rappresentato dalla camera di coltura (Fig.3.3) e le sezioni di servizio costituite dalle strumentazioni di pompaggio e di scambio gas.

Il bioreattore come è possibile notare nella foto in Figura 3.4 riportata nel seguito è costituito da più camere ciascuna utilizzabile per l'organo coltura di un singolo campione di tessuto, ci si appresta ora a descrivere la configurazione della camera al fine di renderne più chiaro il principio di funzionamento.

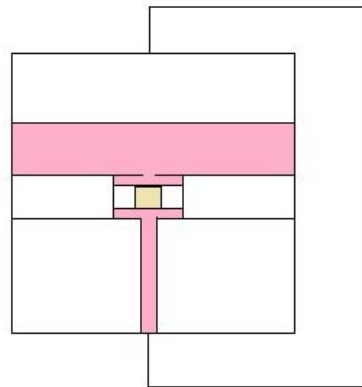


Figura 3.3 *Rappresentazione schematica della camera di coltura del macro-bioreattore. All'interno è posto il porta campione con la biopsia. È evidente l'elevato hold up.*

Naturalmente il campione di biopsia non può essere semplicemente immerso tal quale nelle camere riempite di medium ma richiede lo sviluppo e l'utilizzo di un idoneo sistema di ancoraggio che permetta al campione di rimanere immobile in una precisa e prestabilita posizione per tutta la durata della coltura di modo che sia possibile avere un accurato controllo del flusso di terreno che lambisce il campione e che non vi siano rischi di trascinamento di frammenti di biopsia.

L'idea perseguita è stata quella di inserire all'interno un'ulteriore camera di volume inferiore in cui ingabbiare il campione per mantenerlo fisso in posizione.

Si è individuata come tipologia di porta campione l'holder mostrato in Figura 3.4.

Un disco in silicone forato costruito ad hoc per questo tipo di utilizzo permette l'alloggiamento dell'holder nella camera.

L'holder fatto in teflon è costituito da un volume cilindrico apribile che presenta nelle basi due aperture per il passaggio del medium; si fa notare la presenza di un o-ring nel coperchio per scongiurare il rischio di corto circuitazioni del terreno. Questo holder era stato progettato e realizzato per mantenere in coltura scaffold porosi del diametro di 15 mm.

Per adattare questo holder alla coltura dei campioni di biopsia che hanno dimensioni minori di 15 mm di diametro è stato messo a punto un protocollo che prevede l'impiego di due sottili dischi di materiale biocompatibile nel centro del quale viene allocato il campione. Tra i diversi biomateriali disponibili la scelta è ricaduta sull'uso di spugne di collagene che oltre alla biocompatibilità presenta anche la caratteristica di essere poroso permettendo il passaggio del terreno all'interno e che era stato già ampiamente impiegato in questo bioreattore.



Figura 3.4 *Holder con collagene e biopsia.*

Il volume della camera funge da riserva di medium necessario per la coltura della biopsia, si mantiene quindi un hold-up di terreno sufficiente ad alimentare una coltura per il tempo desiderato. In particolare sono state effettuate colture di 2 giorni introducendo nel bioreattore 8 ml di terreno.

Per tutte le altre caratteristiche tecniche dell'impianto si rimanda a Sbalchiero 2005.



Figura 3.5 *Bioreattore con pompa peristaltica per la movimentazione del medium e sezione di scambio gas.*

A questo punto, dopo aver riportato la descrizione dell'impianto si passa alla fase di descrizione delle procedure operative di allestimento delle prove.

Prima di procedere con l'avvio della prova si procede con la sterilizzazione del sistema di coltura. Camere di coltura con relativi scambiatori di gas e tubi di collegamento vengono posti in una busta da autoclave. I componenti degli holder e supporti in silicone vengono chiusi in buste separate. Tutte le buste vengono sterilizzate in autoclave a 121 °C per un tempo di 35 minuti.

I componenti sterili possono a questo punto essere assemblati operando in condizioni di assoluta sterilità per evitare possibili fenomeni di contaminazione.

Il giorno precedente all'avvio della prova è necessario avviare in incubatore il bioreattore con solo medium in quanto alcuni componenti del terreno mostrano la tendenza ad essere adsorbiti dalle superfici dei tubi per cui risulta necessario condizionare il dispositivo prima della messa in coltura dei campioni di biopsia. Una volta controllato sotto cappa laminare che tutti i tubi siano correttamente collegati, che le guarnizioni siano ben fissate e dopo aver riempito le camere di coltura con 10 ml di terreno, il tutto viene portato in incubatore dove già è stata posta la pompa peristaltica, si attaccano i tubi alla pompa e si procede ad avviare la prova ad una portata di circa 1 ml/min. il componente elettronico di regolazione della portata corredato alla pompa viene lasciato fuori in quanto l'ambiente presente in incubatore potrebbe danneggiarlo.

Il giorno dell'inizio della prova il bioreattore condizionato viene portato sotto cappa laminare assieme agli scaffold di collagene e la multiwell con i campioni da porre in coltura nell'esperimento.

Si procede a questo punto con l'allestimento della coltura, si prepara il bioreattore nelle cui camere viene inserita la parte inferiore dell'holder nell'incastro del disco di silicone, sopra si appoggia il disco di collagene nel cui centro si adagia la biopsia, dopo averci messo il secondo disco di collagene si chiude l'holder, si aggiunge un hold-up di 8 ml di medium e si chiude con il coperchio il bioreattore.

Si fa notare che i tubi e lo scambiatore sono già stati collegati il giorno precedente nel momento della preparazione per il condizionamento, per cui l'impianto si trova già pronto.

A questo punto il dispositivo è pronto per essere messo in funzione.

Il tutto viene portato in incubatore dove già è stata posta la pompa peristaltica, si attaccano i tubi alla pompa e si procede ad avviare la prova.

L'utilizzo dell'incubatore si ricorda è necessario per condurre le prove in ambiente controllato per i motivi sopra detti.

La scelta della durata temporale delle prove è a nostra discrezione in funzione delle motivazioni e degli scopi per i quali tale prova è condotta. Si ritiene che al fine di valutare la vitalità dell'organo e l'abbassamento di $C_6H_{12}O_6$ una durata pari a 2 giorni possa essere sufficiente.

Una volta portata a termine la prova la pompa viene fermata e scollegata dal bioreattore e si procede con le valutazioni sperimentali di nostro interesse.

In particolare vengono eseguite misure su:

- Tessuto adiposo
 - Test MTT
 - Peso
- Medium
 - Concentrazione di glucosio

D'ora in avanti non si rivela più necessario proseguire in sterilità ma per praticità e per scongiurare possibili contaminazioni visto soprattutto che si opera con tessuto umano, si lavora nuovamente sotto cappa laminare.

Il bioreattore viene smontato e gli holder estratti dalla loro sede nel disco di silicone; una volta aperti si estrae il campione inglobato nel collagene e lo si posa su una superficie di lavoro, ad esempio una piastra Petri. Il collagene si presenta privo di consistenza perché imbevuto di medium e completamente adeso al pezzo, con l'aiuto di pinze monouso sterili si recupera il tessuto aprendo l'involucro di collagene che lo contiene.

Il tessuto viene pesato e sottoposto a test MTT secondo le procedure spiegate nel capitolo 2.

Il medium invece contenuto in ciascuna camera viene sottoposto ad analisi per rilevarne la concentrazione di glucosio (§2.2.2). Onde evitare di incappare in misurazioni errate si adotta l'accortezza di rimescolare il terreno prima di procedere al prelievo del quantitativo necessario, in modo da omogeneizzare la composizione ed escludere il rischio di attuare il prelievo in zone non rappresentative della reale composizione.

In previsione di ulteriori esperimenti l'impianto viene ripulito e preparato per le successive utilizzazioni. Il bioreattore, viene avviato prima con H₂O poi con etanolo al 70 % e poi nuovamente con H₂O, gli holder invece, non inseriti nelle camere vengono puliti a parte sempre con il triplo passaggio H₂O-etanolo-H₂O. Il tutto viene quindi sterilizzato in autoclave.

3.1.1.2 Validazione del sistema

Il bioreattore sopra descritto è stato impiegato innanzitutto per valutare che biopsie di tessuto adiposo poste in flusso di terreno di coltura mantenessero una buona vitalità. A quanto risulta, infatti, da studi di letteratura nessuno ha mai effettuato organo colture di tessuto adiposo umano in sistemi in flusso.

Da questo punto di vista il bioreattore si dimostra essere un buon dispositivo di coltura per il tessuto adiposo; tramite analisi MTT si verifica che l'organo dopo due giorni di prova mantiene elevata la propria attività metabolica (si rimanda al Capitolo 4 dove sono riportati i risultati).

L'obiettivo di mantenere l'organo vitale viene dunque raggiunto.

Secondo obiettivo di fondamentale interesse per questa tesi è la misurazione del consumo di glucosio.

A fine coltura la misura della concentrazione non ha fornito valori minori rispetto a quella di inizio prova misurata nel medium fresco, anzi il suo valore risulta addirittura più elevato a causa dell'evaporazione del terreno in quanto si ricorda, la prova è condotta in ambiente con temperatura pari a 37°C. L'effetto dell'evaporazione è stato superato mantenendo nel bioreattore una camera senza biopsia e usando il terreno di questa camera come riferimento per investigare il consumo cellulare. Nonostante questo accorgimento la variazione di concentrazione di glucosio è stata paragonabile all'errore di misurazione non consentendo di impiegare il bioreattore in questione per lo scopo finale del presente lavoro.

Teoricamente il problema può essere risolvibile attraverso due vie alternative che presuppongono un'azione su:

- dimensioni della biopsia
- caratteristiche del sistema di coltura

Volendo un maggiore up-take da parte del tessuto si può pensare di aumentarne le dimensioni; tale soluzione però non è attuabile poiché avere un campione con un volume maggiore comporta il rischio di non mantenerlo vitale all'interno, i nutrienti, tra cui anche il glucosio, che penetrano per diffusione all'interno del campione possono essere completamente consumati dagli strati più esterni prima di giungere al centro. Ne risulta una soluzione non percorribile in quanto non si otterrebbero effetti migliorativi sul consumo totale di glucosio.

Un'azione sul sistema appare l'unica via percorribile.

L'idea è di riuscire a diminuire i volumi di medium in gioco; avendo quantità di terreno piccole il consumo seppur esiguo appare elevato in termini di concentrazione. Il problema dunque nasce dall'aver in camera un hold-up di 8 ml, il terreno passa per l'holder in cui avviene l'acquisizione da parte del tessuto e dopo aver percorso il circuito esterno ritorna in camera e qui per mescolamento assume la concentrazione di bulk propria dell'hold-up.

Il miglioramento si ottiene pensando ad una configurazione del sistema in cui non ci sia ricircolazione di medium ma semplicemente un flusso unidirezionale.

3.3.2 Il mini-bioreattore (μL)

La necessità di superare le limitazioni riscontrate nel dispositivo precedentemente descritto, intervenendo con azioni volte a eliminare le criticità apparse conduce allo sviluppo di un nuovo sistema di coltura, non più con ricircolazione ma unidirezionale (Fig. 3.2).

Le prove di coltura preliminari eseguite nel macro-bioreattore hanno fatto emergere le problematiche connesse con l'utilizzo di elevati hold up di medium evidenziando l'esigenza di ridurre i volumi in gioco. Si è indirizzati dunque a testare una configurazione di più ridotte dimensioni.

3.3.2.1 Sviluppo del sistema

L'evoluzione rispetto al precedente sistema consiste nel mantenere comunque l'utilizzo dell'holder come supporto per la biopsia ma scorporandolo dalla camera, questo ci permette di svincolarci dalle problematiche connesse con l'avere un'hold up di medium elevato.

La configurazione di questo nuovo impianto (Fig. 3.6) comprende le seguenti sezioni:

- unità di movimentazione del terreno di coltura
- camera di coltura
- raccolta del terreno di coltura condizionato

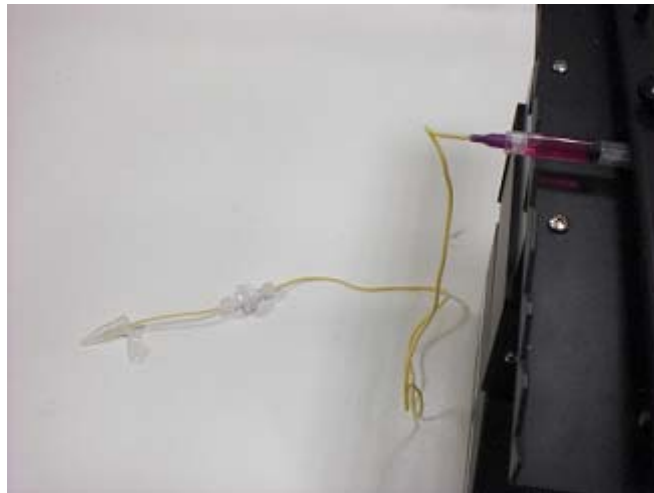


Figura 3.6 Impianto completo del mini-bioreattore.

La foto del sistema mostrata in Figura 3.6 permette una agevole comprensione dell'evoluzione impiantistica messa in atto, la semplicità dell'apparato permette l'immediata visualizzazione qualitativa del principio di funzionamento.

L'ambiente di coltura si è ridotto al solo holder, il campione all'interno è alimentato da un flusso di medium fresco mantenuto questa volta dall'azione di una pompa a siringa (PHD22/2000 HPSI, Harvard Apparatus).

A valle della camera di coltura il terreno viene raccolto in un'ependorf per le successive analisi di composizione.

La descrizione dettagliata dell'holder e delle sue funzioni è già stata affrontata ma si ritiene importante far notare che il dispositivo non può essere usato tal quale ma devono essere apportate delle modifiche per adattarsi all'utilizzo in un sistema di questo tipo. Ai fori presenti nelle due basi del supporto sono stati avvitati dei raccordi Luer® (Cole Parmer) compatibili con i tubi Pharmed® (Cole Parmer) del diametro interno di 0.5 mm impiegati per l'ingresso e l'uscita del terreno. Il particolare è visibile nella foto in Figura 3.7.

Per assicurare la corretta concentrazione di ossigeno e CO₂ in questo sistema, non essendo presente un sistema di scambio dei gas, il terreno viene messo a condizionare in incubatore il giorno precedente all'inizio della prova, risulta quindi già in equilibrio con l'atmosfera dell'incubatore e non necessita di un'unità di scambio.



Figura 3.7 *Holder.*

Si procede con l'affrontare la descrizione delle procedure di allestimento delle prove.

Si preparano in buste separate la parte inferiore degli holder, quella superiore e i tubi di ingresso e di uscita, le estremità vengono avvolte con carta alluminio in modo tale che durante il montaggio siano protetti fino al momento dell'assemblaggio, poi si sottopone il tutto ad un ciclo in autoclave.

Il giorno precedente l'avvio della prova si procede al condizionamento dei tubi e del terreno.

Si procede al montaggio, viene usato un rack come supporto su cui appoggiare la parte inferiore e con la stessa procedura vista per il bioreattore, vengono inseriti gli scaffold di collagene e la biopsia..

Al momento della chiusura è consigliato introdurre dal Luer® superiore mediante Gilson qualche goccia di medium allo scopo di evitare la presenza di bolle d'aria inglobate all'interno vicino al campione in modo da far sì che il collagene assorba il suo massimo possibile e si arrivi al riempimento completo del volume, solitamente quando è visibile la goccia dal Luer® si presume che l'interno sia pieno.

Preparati gli holder si passa alle siringhe e ai tubi di ingresso.

Le siringhe utilizzate sono solitamente da 3 cc o 5 cc, dopo aver applicato l'ago si aspira il terreno precedentemente condizionato in incubatore. Il numero di siringhe deve essere pari al numero di campioni che si intende mettere in coltura.

Il riempimento delle siringhe è un'operazione che per quanto banale richiede un'importante accortezza, molta attenzione va infatti posta nell'eliminare le bolle di aria presenti, di norma si percuote la siringa in modo che le bolle avendo densità inferiore al medium salgano verso la punta, diventando così facilmente eliminabili.

L'aria eventualmente presente potrebbe entrare nel sistema di coltura causando in primo luogo dei percorsi preferenziali del medium al suo passaggio in camera e in secondo luogo il loro ristagno in prossimità del campione potrebbe provocare una riduzione della superficie del tessuto lambita dal terreno con conseguente perdita della possibilità di acquisizioni di nutrienti e quindi morte di porzioni di tessuto.

Una volta preparate le siringhe, dopo aver tolto l'ago si procede al collegamento di ognuna con i tubi di ingresso e quindi alloggiare nella pompa a siringa.

Prima di procedere con l'attacco agli holder bisogna accertarsi che da tutti i tubi e contemporaneamente ci sia flusso di medium poiché sebbene si sia cercato di riempire le siringhe con la stessa quantità di terreno piccole imprecisioni creano disomogeneità nella spinta della pompa fin tanto che non si siano portate tutte le siringhe ad avere lo stesso preciso volume. Si lascia fluire per un po' in modo da ripulire i tubi dal medium già presente per il loro condizionamento ed eliminare l'aria eventualmente presente che entrerebbe in camera quando si attaccano i raccordi.

A completamento del sistema si devono attaccare i tubi d'uscita e inserirli nelle eppendorf di raccolta.

Fatto ciò si può procedere col collegare i tubi d'ingresso agli holder per dare avvio alla prova, non prima però di aver deciso la portata di esercizio ed averne impostato il valore nella pompa.

Il tutto ad eccezione della pompa siringa viene trasferito in incubatore.

La durata della coltura è stata precedentemente stabilita con le prove del macro-bioreattore e continua ad essere mantenuta di 2 giorni per permetterne il confronto con il sistema precedentemente usato.

A fine prova la pompa viene fermata e i tubi scollegati. Si porta tutto sotto cappa nonostante, si ripete la sterilità non sia più necessaria, e si procede con l'apertura dei supporti come già descritto.

Le misure fatte sono le stesse viste per il macro-bioreattore:

- Tessuto adiposo
 - Test MTT
 - Peso
- Medium
 - Concentrazione di glucosio

Le eppendorf contenenti il medium condizionato vengono chiuse e siglate, si preleva, dopo opportuno rimescolamento il quantitativo necessario per le misure di glucosio e si procede se si ritiene necessario al congelamento del medium a -20 °C per eventuali analisi in seconda battuta.

Tubi e holder, come da prassi vengono puliti con H₂O-etanolo al 70 %-H₂O e poi autoclavati per il successivo utilizzo.

3.1.2.2 Validazione del sistema

La portata di esercizio è la variabile operativa caratterizzante dei sistemi in flusso perché sottende al meccanismo di trasporto convettivo di materia dal medium al campione, è quindi importante soffermarsi a spiegare le modalità di scelta di tale grandezza e le implicazioni sperimentali da essa derivanti.

Alla luce delle considerazioni fatte sull'importanza della scelta del valore di portata si rende necessario intraprendere uno studio dettagliato sui fenomeni di trasporto di materia propri della configurazione impiegata al fine di determinare le condizioni sperimentali di consumo che da un lato consentano una portata di glucosio alla biopsia pari o maggiore al consumo cellulare e che, dall'altro lato, massimizzi la variazione di concentrazione di glucosio nel medium per renderla misurabile.

In un sistema dinamico unidirezionale del tipo preso in esame i meccanismi di trasporto di materia al campione risultano essere due:

- trasporto convettivo assiale
- trasporto diffusivo radiale

In figura 3.8 si riporta anche una rappresentazione con vista dall'alto per rendere più intuitiva la comprensione delle dimensioni del dispositivo.

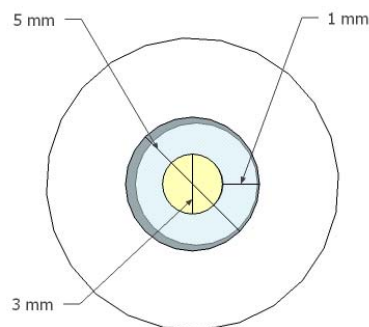


Figura 3.8 Rappresentazione schematica dell'holder con vista dall'alto.

La rappresentazione schematica dell'holder mostrata in Figura 3.9 mostra come avvengono i due flussi all'interno del dispositivo di coltura.

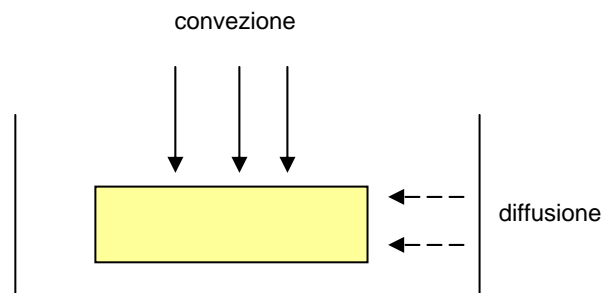


Figura 3.9 Flusso convettivo e flusso diffusivo all'interno dell'holder.

La portata erogata dalla pompa a siringa sostiene il moto convettivo assiale, il medium giunge in camera e passa per convezione affianco al tessuto, poi esce.

Si nota che le dimensioni del campione inferiori a quelle del foro di ingresso permettano di operare in condizioni tali per cui il medium che perfonde nel sistema non incorre nel rischio di avere alte perdite di carico con conseguenti problemi di tenuta.

Il flusso convettivo dipende dalla portata scelta e dalla sezione di passaggio:

$$\langle v \rangle = \frac{\dot{V}}{A}$$

Qui si origina il problema su quale sia da considerarsi la reale sezione di passaggio del medium attraverso l'holder, la considerazione che il medium passi soltanto per la corona circolare esterna è un'astrazione teorica che permette una semplificazione nella trattazione ma che non rispecchia il vero stato delle cose, la biopsia non presenta una forma regolare e compatta per cui la sezione di passaggio può in realtà essere anche maggiore. Queste considerazioni conducono ad una biforcazione nella trattazione dello studio.

La sezione di passaggio può considerarsi quella relativa a:

- intera sezione del foro di passaggio (*1° Caso*)
- corona circolare esterna (*2° Caso*)

Ipotizziamo di lavorare nella condizione in cui la concentrazione sulla superficie della biopsia è nulla, cioè tutto il glucosio che giunge alla biopsia viene istantaneamente consumato.

Per massimizzare la variazione di concentrazione di glucosio tra medium in ingresso nella camera e medium in uscita si deve lavorare in condizioni nelle quali non ci sia un regime di trasporto dominante. A tale scopo non risulterebbe corretto imporre l'uguaglianza dei due flussi, convettivo e diffusivo, in quanto le dimensioni caratteristiche interessate dai due fenomeni non risultano essere uguali.

La verifica si basa invece sulla valutazione dei tempi caratteristici, in particolare la condizione di esercizio ottimale corrisponde a quella per cui:

$$\tau_{convezione} = \tau_{diffusione}$$

Di seguito vengono riportate le equazioni per il calcolo dei tempi per i due fenomeni.

$$\tau_{convezione} = \frac{L}{\langle v \rangle}$$

La dimensione caratteristica è quella interessata dal fenomeno in esame, nel nostro caso è rappresentata dall'altezza della biopsia.(Fig. 3.9) considerata di 1 mm.

$$\tau_{diffusivo} = \frac{L^2}{D}$$

dove:

$$D = 1E-04 \text{ mm}^2/\text{s}$$

In questo caso invece la dimensione caratteristica è rappresentata dalla larghezza della corona circolare (Fig.3.8).

Si riporta nelle Tabelle 3.1-3.4 i valori dei tempi caratteristici calcolati nel caso “base” ed in sistemi con opportune variazioni di parametri coinvolti.

Il caso base considerato è quello relativo a:

- portata = 16.7 $\mu\text{l}/\text{h}$
- dimensione foro = 5 mm
- diametro campione = 3 mm

La scelta del valore della portata deriva dalla similitudine con le colture in statica. Per poter confrontare i dati ottenuti sperimentalmente in statica e in dinamica il volume di medium che attraversa l'holder nell'arco di 2 giorni deve essere pari a quello impiegato per 2 giorni di coltura statica:

$$Portata = \frac{800[\mu\text{l}]}{48[\text{h}]} = 16.7\left[\frac{\mu\text{l}}{\text{h}}\right]$$

*1° Caso: Tempi caratteristici con convezione calcolata su tutta la sezione***Tabella 3.1** *Tempi caratteristici con convezione calcolata su tutta la sezione.*

	Convezione	Diffusione
Velocità [mm/s]	2.36E-04	1E-04
Dimensione [mm]	1	1
τ [s]	4.23E+03	1E+04
τ [h]	1.18	2.78

Tabella 3.2 *Analisi di sensitività.*

Modifiche	$\tau_{\text{convezione}} = \tau_{\text{diffusione}}$ [h]
Portata 9.67 [$\mu\text{l/h}$]	1.69
Diametro holder 4.56 [mm]	
Portata 7.06 [$\mu\text{l/h}$]	2.78
Portata 14.66 [$\mu\text{l/h}$]	1.34
Diametro campione 3.61 [mm]	
Diametro campione 3.70 [mm]	1.18
Diametro holder 4.06 [mm]	0.77

*2° Caso: Tempi caratteristici con convezione calcolata solo sulla corona circolare***Tabella 3.3** *Tempi caratteristici con convezione calcolata solo sulla sezione libera.*

	Convezione	Diffusione
Velocità [mm/s]	3.69E-04	1E-04
Dimensione [mm]	1	1
τ [s]	2.71E+03	1E+04
τ [h]	0.75	2.78

Tabella 3.4 Analisi di sensitività.

Modifiche	$\tau_{\text{convezione}} = \tau_{\text{diffusione}}$ [h]
Portata 6.56 [$\mu\text{l/h}$]	1.08
Diametro holder 4.25 [mm]	
Portata 4.52 [$\mu\text{l/h}$]	2.78
Portata 9.39 [$\mu\text{l/h}$]	0.80
Diametro campione 3.93 [mm]	
Diametro campione 4.37 [mm]	0.28
Diametro holder 3.44 [mm]	0.13

Nel caso base i tempi caratteristici sono diversi di un ordine di grandezza e affinché risultino uguali si può agire sulla portata, sul foro dell'holder o sulla dimensione della biopsia.

In sostanza l'interpretazione dei dati porta alla necessità di diminuire il volume del sistema, se si decide di lasciare inalterata la portata.

3.1.3 Il micro-bioreattore (nL)

L'esigenza di dover apportare al precedente sistema dei miglioramenti per poter lavorare in condizioni di maggiore efficienza funzionale conduce all'idea di non perseguire in ulteriori modifiche sugli holder ma di testare un sistema alternativo dotato di una caratterizzazione configurazionale totalmente diversa che consenta una maggiore versatilità e un maggiore controllo dei parametri appena discussi in relazione ai tempi di permanenza..

Abbandonati i sistemi di coltura sopra visti ci si addentra nell'ambito della microfluidica.

I sistemi microfluidici hanno come caratterizzazione principale l'essere costituiti da volumi molto piccoli, dell'ordine dei nL.

Ne deriva oltre al superamento di problemi sperimentali propri dei precedenti dispositivi anche una maggiore praticità sia nella preparazione che nella gestione delle prove sperimentali di coltura, con la possibilità di operare con molti più campioni in parallelo ma con spazi e costi minori.

3.1.3.1 Sviluppo del sistema

La configurazione dell'impianto comprende le seguenti sezioni:

- unità di movimentazione del terreno di coltura
- piattaforma microfluidica
- unità di raccolta del terreno di coltura condizionato

La foto del sistema mostra come il principio di funzionamento sia il medesimo già messo in pratica negli holder.

La movimentazione del medium è sostenuta dalla solita pompa a siringa che ne mantiene il flusso attraverso la piattaforma contenente il campione. Come in precedenza il medium condizionato viene raccolto a valle in una eppendorf.

All'interno della piattaforma microfluidica (Fig. 3.10) sono presenti le camere di coltura in cui vengono inseriti i campioni di tessuto.

La piattaforma microfluidica è fatta in poli-dimetilsilossano (PDMS), un polimero siliconico che presenta due importanti caratteristiche quella della biocompatibilità e quella della permeabilità ai gas (CO_2 e O_2 in particolare). La piattaforma è di lunghezza complessiva circa pari a 5 cm, presenta 5 canali di flusso rettangolari di altezza 100 μm , larghezza 800 μm e lunghezza 3.5 cm. Le camere di coltura sono costituite da cilindri con diametro di 4 mm e altezza che può variare da 1.5 a 5 mm e sono posizionate a metà della lunghezza dei canali microfluidici. La scelta del diametro delle camere di coltura è stata basata sulle conoscenze acquisite tramite le colture statiche sulle dimensioni di campioni da mantenere in coltura: il diametro della camera ha dimensioni paragonabili a quelle dei campioni.

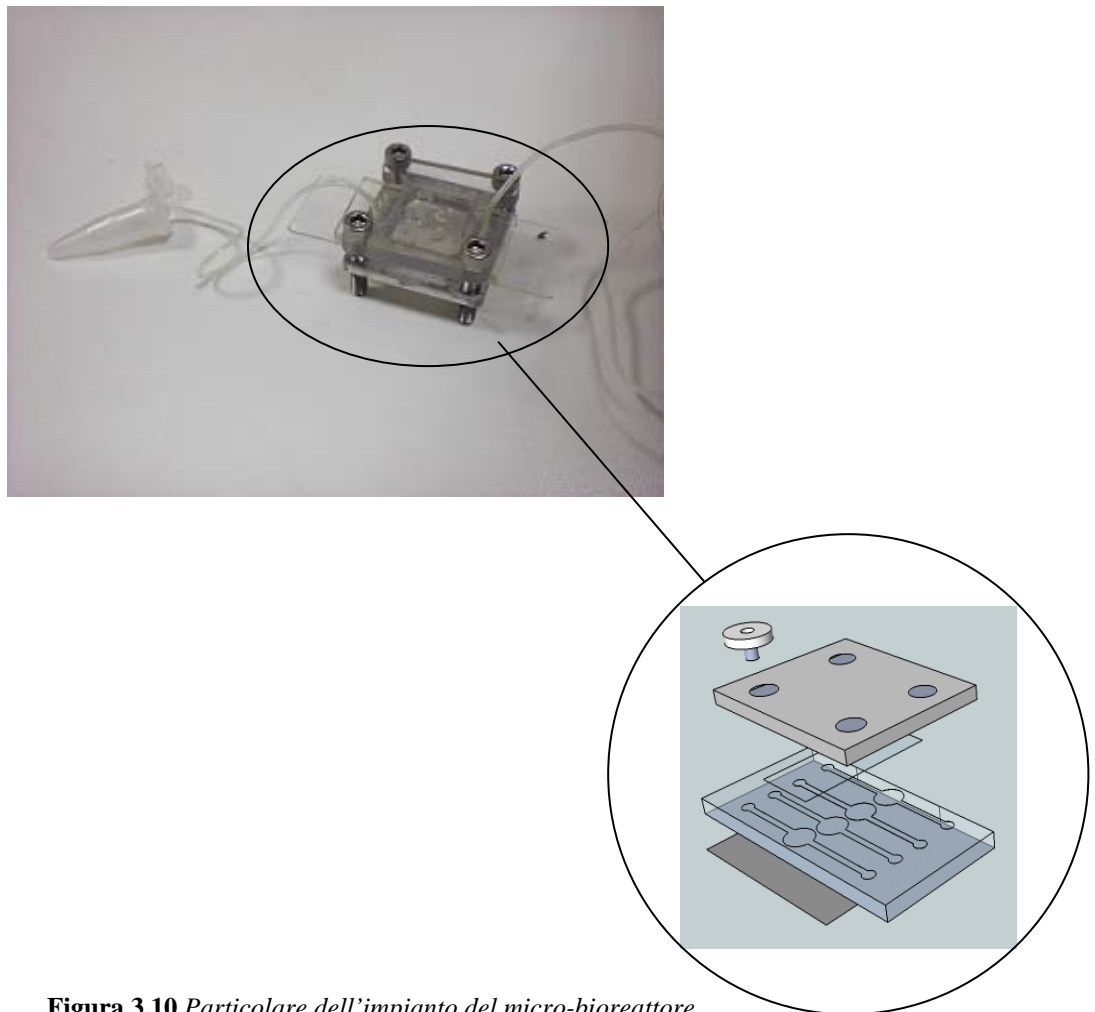


Figura 3.10 Particolare dell'impianto del micro-bioreattore.

In Figura 3.11 si mostra la piattaforma microfluidica in cui una delle quattro corsie è stata riempita con il colorante per renderla meglio visibile.

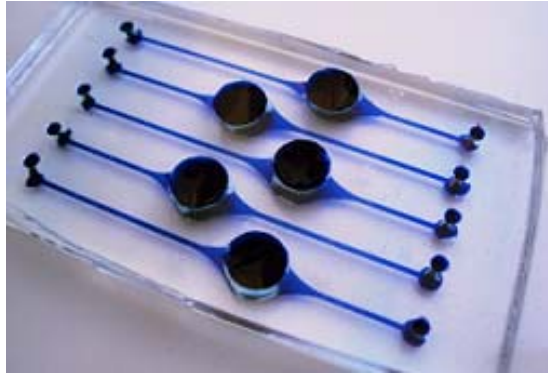


Figura 3.11 Piattaforma microfluidica.

Essendo la piattaforma forata per potervi inserire la biopsia, si necessita di un sistema di chiusura che oltre a proteggere il campione da contaminazioni ne garantisce anche la tenuta idraulica. Sopra la piattaforma in corrispondenza della camera viene appoggiato uno strato sottile (pochi micrometri) di silicone. Sopra di questo e sotto il vetrino vengono poste due lamine in metallo dotate di appositi fori filettati per consentire il fissaggio con 4 viti. Il particolare di Figura 3.10 aiuta la visualizzazione del sistema di chiusura.

I tubi di collegamento sono di tipo Tygon® (Cole Parmed) di diametro 0.5 mm.

Affrontiamo a questo punto la descrizione dell'allestimento della piattaforma.

Si preparano come al solito le buste separate con i tubi e la piattaforma da sterilizzare in autoclave e poi il giorno precedente l'inizio della prova si mettono i tubi, la piattaforma e il medium a condizionare in incubatore.

Si porta il tutto sotto cappa dove si procede con le operazioni di montaggio.

Ci si occupa separatamente della preparazione della piattaforma e dei tubi per poi alla fine fare l'assemblaggio.

Mediante una micropipetta Gilson il terreno condizionato viene fatto fluire nella piattaforma per eliminare il medium di incubazione e riempirla con medium fresco, dopo di ciò si inserisce il campione e si appoggia delicatamente lo strato di PDMS di copertura prestando attenzione a non intrappolare bolle d'aria all'interno; si chiude il tutto con l'apparato in polycarbonato, accertandosi di fissare al punto giusto le viti, una chiusura troppo debole non permetterebbe di realizzare una buona tenuta ma di contro un fissaggio troppo spinto potrebbe causare la chiusura dei canali della piattaforma.

I tubi d'uscita vengono collegati alla piattaforma da un lato e ad un'ependorf di raccolta dall'altro.

Fatto ciò si passa al riempimento delle siringhe e alla preparazione dei tubi d'ingresso in modo del tutto analogo a quanto descritto nel paragrafo 3.1.2.

Quando anche siringhe e tubi d'ingresso sono pronti, viene impostata la portata prescelta per la prova ed i tubi vengono collegati alla piattaforma. Dopo l'assemblaggio finale si trasferisce tutto l'impianto in incubatore dove lo si lascia per la durata della prova.

La portata impiegata per le prove sperimentali di questa tesi è sempre di 16.7 $\mu\text{l/h}$.

A prova terminata le siringhe vengono scollegate dalla pompa e si comincia sotto cappa l'opera di smontaggio ed estrazione dei campioni.

Le analisi da effettuare a fine coltura sono le stesse sopra viste che qui si riportano per comodità:

- Tessuto adiposo
 - Test MTT
 - Peso
- Medium
 - Concentrazione di glucosio

Il medium condizionato in eccesso viene congelato a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ per analisi future.

I tubi d'uscita vengono buttati e tutto il resto pulito e autoclavato.

3.1.3.2 Validazione del sistema

La camera di coltura presente nel sistema microfluidico appena descritto è interessata dagli stessi fenomeni di trasporto già analizzati relativamente agli holder.

Il campione di biopsia è interessato da:

- flusso convettivo assiale
- flusso diffusivo radiale

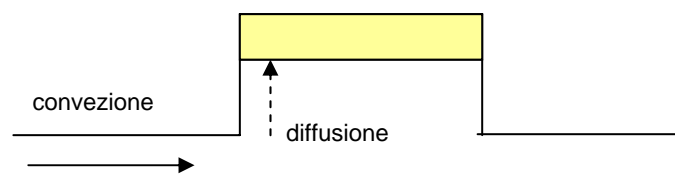


Figura 3.12 Schema flussi convettivo e diffusivo in piattaforma microfluidica.

La progettazione e la scelta delle variabili operative del sistema microfluidico viene supportata dal calcolo dei tempi caratteristici propri dei fenomeni in gioco. In particolare come detto nel paragrafo precedente si desidera:

$$\tau_{convezione} = \tau_{diffusione}$$

Per il calcolo dei tempi caratteristici di convezione e diffusione si rimanda al paragrafo 3.1.2.2 in cui la procedura è stata spiegata puntualmente.

La velocità convettiva può essere calcolata su:

- sezione del canale microfluidico d'ingresso (*1° Caso*)
- sezione massima della camera (*2° Caso*)

1° Caso: velocità convettiva calcolata sulla sezione del canale microfluidico

In Tabella 3.5 si riporta il caso base relativo alla piattaforma utilizzata con altezza pari a 2 mm..

Tabella 3.5 *Tempi caratteristici.*

	Convezione	Diffusione
velocità [mm/s]	5.80E-02	6.67E-05
Dimensione [mm]	4	2
τ [s]	6.90E+01	2.25E+04
τ [h]	0.02	6.25

Si procede con un'analisi di sensitività sui tempi caratteristici variando portata e altezza della camera per vagliarne le migliori configurazioni.

Si indagano le altezze:

- 5 mm
- 3 mm
- 1.5 mm

Tabella 3.6 Altezza 5 mm

Portata [$\mu\text{l/h}$]	$\tau_{\text{convezione}}$ [s]	$\tau_{\text{diffusione}}$ [s]	$\tau_{\text{diffusione}}/\tau_{\text{convezione}}$
8	1.44E+01	2.50E+05	1736
10	1.15E+01	2.50E+05	2174
12	9.60E+01	2.50E+05	2604
16.7	6.90E+01	2.50E+05	3623
18	6.40E+01	2.50E+05	3906
25	4.61E+01	2.50E+05	5423

Tabella 3.7 Altezza 3 mm

Portata [$\mu\text{l/h}$]	$\tau_{\text{convezione}}$	$\tau_{\text{diffusione}}$	$\tau_{\text{diffusione}}/\tau_{\text{convezione}}$
8	1.44E+01	9E+04	625
10	1.15E+01	9E+04	783
12	9.60E+01	9E+04	938
16.7	6.90E+01	9E+04	1304
18	6.40E+01	9E+04	1406
25	4.61E+01	9E+04	1952

Tabella 3.8 Altezza 1.5 mm

Portata [$\mu\text{l/h}$]	$\tau_{\text{convezione}}$	$\tau_{\text{diffusione}}$	$\tau_{\text{diffusione}}/\tau_{\text{convezione}}$
8	1.44E+01	2.25E+04	156
10	1.15E+01	2.25E+04	196
12	9.60E+01	2.25E+04	234
16.7	6.90E+01	2.25E+04	326
18	6.40E+01	2.25E+04	352
25	4.61E+01	2.25E+04	488

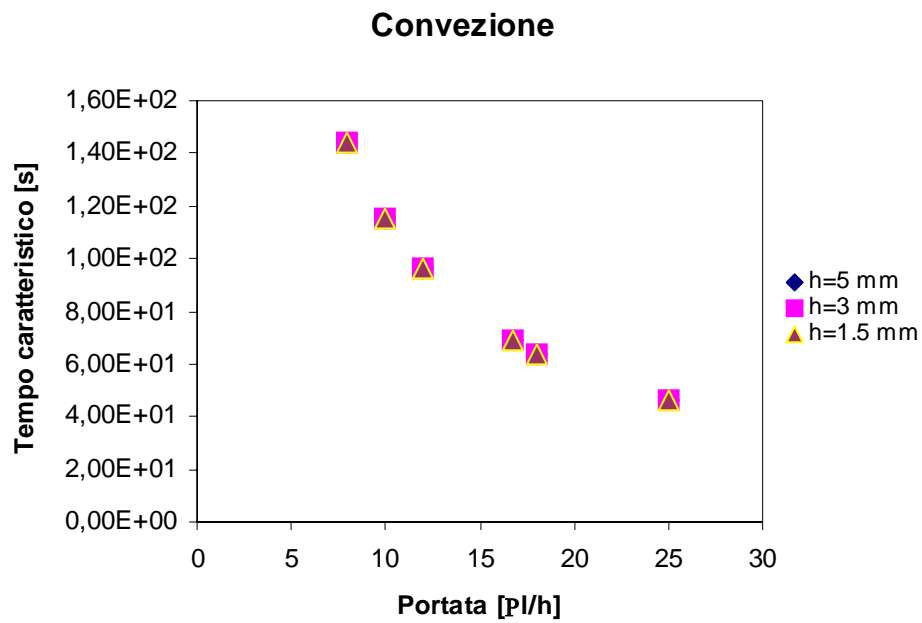


Figura 3.13 Tempo di convezione in funzione della portata.

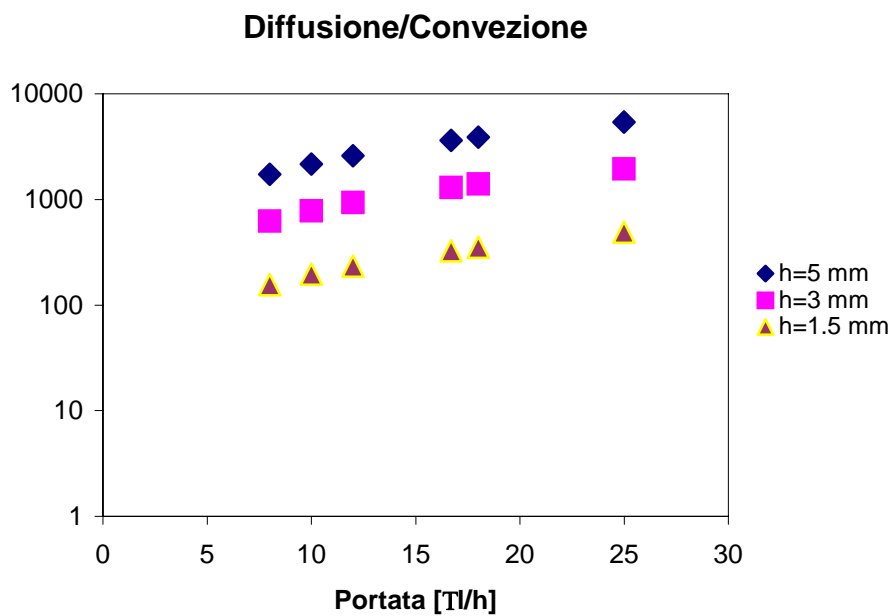


Figura 3.14 Rapporto dei tempi caratteristici.

2° Caso: velocità convettiva calcolata sulla sezione massima della camera

In analogia a quanto fatto per il 1° caso in Tabella 3.9 si riporta i valori dei tempi caratteristici per il caso base.

Tabella 3.9 Tempi caratteristici.

	Convezione	Diffusione
Velocità [mm/s]	5.80E-04	6.67E-05
Dimensione [mm]	4	2
τ [s]	6.90E+03	2.25E+04
τ [h]	1.92	6.25

Si attua un'analisi di sensitività sui tempi caratteristici variando portata e altezza della camera.

Si indagano le altezze

- 5 mm
- 3 mm
- 1.5 mm

Tabella 3.10 Altezza 5 mm

Portata [μ l/h]	$\tau_{\text{convezione}}$	$\tau_{\text{diffusione}}$	$\tau_{\text{diffusione}}/\tau_{\text{convezione}}$
8	3.60E+04	2.50E+05	7
10	2.88E+04	2.50E+05	9
12	2.40E+04	2.50E+05	10
16.7	1.72E+04	2.50E+05	15
18	1.60E+04	2.50E+05	16
25	1.15E+04	2.50E+05	22

Tabella 3.11 Altezza 3 mm

Portata [μ l/h]	$\tau_{\text{convezione}}$	$\tau_{\text{diffusione}}$	$\tau_{\text{diffusione}}/\tau_{\text{convezione}}$
8	2.16E+04	9E+04	4
10	1.73E+04	9E+04	5
12	1.44E+04	9E+04	6
16.7	1.03E+04	9E+04	9
18	9.60E+03	9E+04	9
25	6.91E+03	9E+04	13

Tabella 3.12 Altezza 1.5 mm

Portata [$\mu\text{l/h}$]	$\tau_{\text{convezione}}$	$\tau_{\text{diffusione}}$	$\tau_{\text{diffusione}}/\tau_{\text{convezione}}$
8	5.17E+03	2.25E+04	4
10	7.20E+03	2.25E+04	3
12	8.64E+03	2.25E+04	3
16.7	1.08E+04	2.25E+04	2
18	4.80E+03	2.25E+04	5
25	3.46E+03	2.25E+04	7

Nei diagrammi di Figura 3.15 e 3.16 si diagrammano gli andamenti.

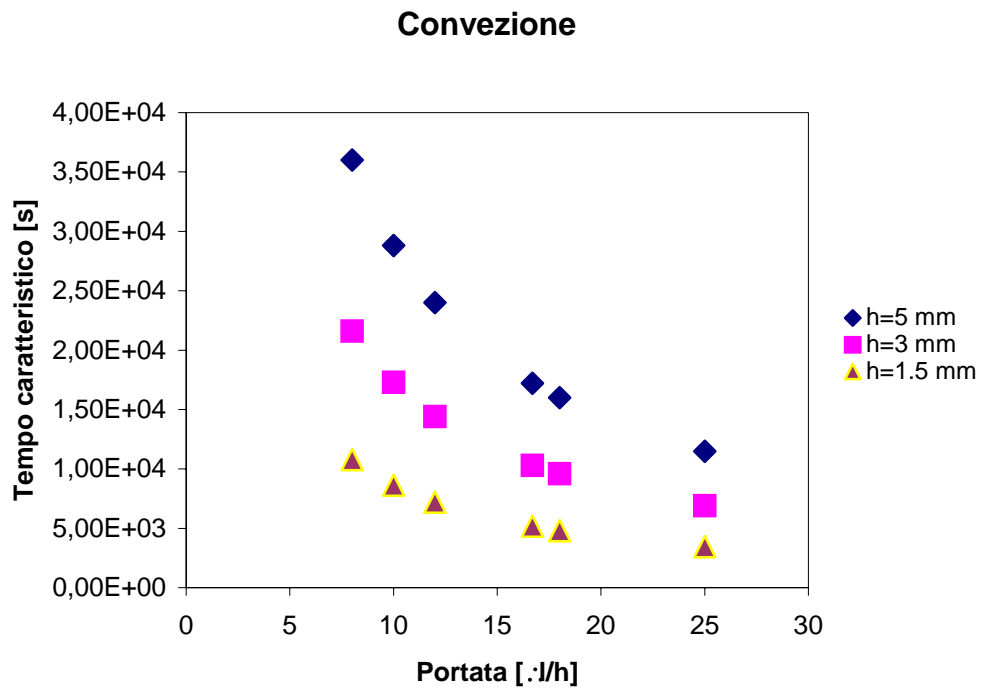


Figura 3.15 Tempo di convezione.

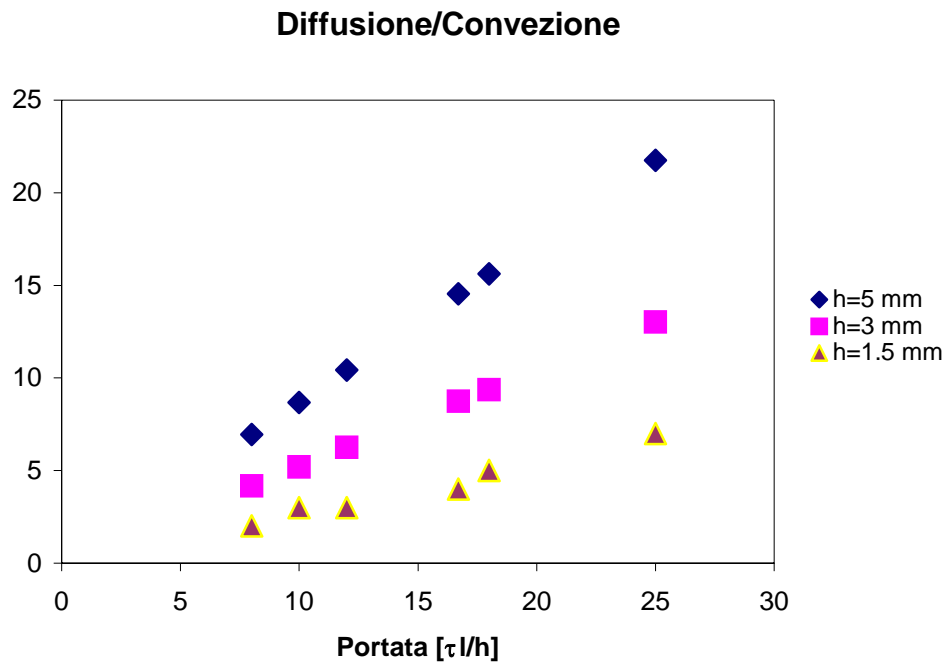


Figura 3.16 Rapporto dei tempi caratteristici.

Dall'analisi dei dati e dei grafici risulta che solo operando con le minime portate ed impiegando la configurazione con altezza pari a 1.5 mm sia possibile ottenere tempi caratteristici di diffusione e convezione paragonabili.

Il primo caso esaminato sottostima i tempi caratteristici mentre il secondo li sovrastima.

Dunque la configurazione ottimizzata della piattaforma avrà un'altezza di 1mm.

Prima di procedere oltre e affrontare la descrizione dell'ultimo sistema microfluidico messo appunto seguendo le indicazioni risultanti dallo studio dei tempi caratteristici, introduciamo le prove preliminari realizzate con la piattaforma in questione per la somministrazione d'insulina.

3.1.4 Prove sperimentali preliminari in presenza di insulina

Finora le prove sperimentali con insulina sono state condotte solamente in statica, ma non si sono mai tentate prove in un sistema di coltura dinamico.

Nei precedenti dispositivi l'esigenza di una buona messa a punto del sistema aveva posticipato la sperimentazione dell'insulina in quanto si mostrava necessario essere prima in possesso di un sistema che permettesse di rilevare la caduta della concentrazione di glucosio per poi poter vedere l'effetto causato dall'insulina.

La piattaforma microfluidica è apparsa idonea per tentare la prova.

3.1.4.1 Sviluppo del sistema

Uno dei vantaggi dell'utilizzo di un sistema microfluidico è la possibilità di creare degli impulsi di concentrazione, la prova è stata quindi impostata nel seguente modo: ogni campione è stato sottoposto inizialmente ad un flusso di medium senza insulina per valutare il consumo di glucosio basale proprio del campione, successivamente gli è stato fornito un impulso d'insulina e ne è stato misurato il consumo di glucosio; infine il campione è stato riportato nuovamente alla condizione senza insulina. Il parametro fondamentale è il rapporto di consumo di glucosio del campione con e senza insulina. Operando in questo modo si elimina una fonte di errori dovuti alla variabilità tra campione e campione.

Gli obiettivi che ci si pone con questa prova preliminare sono:

- riscontrare insulino-dipendenza da parte del tessuto
- riscontrare un ritorno al comportamento basale pre-insulina

Ciò è attuabile mettendo i campioni in flusso e sottoponendoli ad un impulso di insulina per un'ora dopo di che si ritorna alle condizioni normali di coltura.

L'attuazione sperimentale di tale idea è permessa attraverso l'utilizzo di un apparato in cui ogni canale microfluidico è collegato attraverso un giunto a T a due siringhe, una contenente terreno senza insulina ed una con terreno con insulina.

La presenza della T permette lo switch del flusso nel momento in cui si decide di dare avvio all'impulso.

L'allestimento della prova avviene sempre come sopra descritto, tuttavia la necessità di avere il tubo pieno di insulina al momento dell'avvio della pompa richiede degli accorgimenti durante il montaggio.

Dopo collegamento dei tubi alle siringhe si lasciano entrambi in flusso in modo tale da ripulire dal medium residuo di incubazione, il mescolamento dei due medium non è in questa fase un problema. A questo punto si ferma il flusso di insulina ma si lascia scorrere l'altro per un tempo consono con la pulitura.

Fatto ciò, si riporta la pompa 1 alla portata di esercizio da noi voluta e si collegano i tubi alla piattaforma, così facendo il tratto pre-T rimane riempito di insulina la quale però non giunge in camera e neppure quindi alla biopsia se non al momento dell'azionamento dell'impulso.

Passiamo alla descrizione della prova presentandosi un po' più laboriosa di quelle normalmente eseguite.

Di norma prima di applicare l'insulina si lasciano i campioni in coltura per un giorno, il medium viene raccolto nella solita eppendorf e sottoposto ad analisi come consuetudine.

Si procede con il cambio di terreno spegnendo la pompa, si lascia fluire per un'ora il medium addizionato di insulina a questo punto si spegne nuovamente la pompa e si fa fluire medium senza insulina per le successive 3 ore.

Qui nasce la novità nella procedura operativa di gestione della prova che consiste nel monitorare in continuo la composizione del medium in uscita dalla coltura poiché si è

interessati oltre che a vedere se c'è o meno una risposta insulino-dipendente anche a vedere il transiente di concentrazione e il recupero del metabolismo basale.

Si applicano misurazioni in continuo a time point abbastanza ravvicinati su un'intervallo di tempo sufficientemente ampio da poter vedere il consumo normale, il transiente e il successivo recupero.

Ovviamente necessitiamo di avere un'indicazione relativamente al tempo di uscita dell'impulso di risposta. Affrontiamo lo studio del sistema attraverso i tempi di permanenza.

Sotto le ipotesi di moto a pistone dell'impulso e di assenza di fenomeni diffusivi assiali il tempo di uscita della risposta sarà pari alla somma dei tempi di permanenza nei vari tratti:

$$\tau_{TOT} = \tau_{tuboIN} + \tau_{canaleIN} + \tau_{camera} + \tau_{canaleOUT} + \tau_{tuboOUT}$$

Tale discorso lo si riporta specularmente relativamente all'impulso negativo di concentrazione di glucosio in uscita dalla camera, stante l'idea che la biopsia risponda istantaneamente allo stimolo non appena arriva in camera.

Tale ipotesi non rappresenta comunque un problema in quanto i campionamenti vengono cominciati un'ora prima del tempo così calcolato, e si protraggono fino a due ore dopo la fine dell'impulso.

3.1.4.2 Validazione del sistema

La prova è risultata insoddisfacente. Non si è riusciti a vedere alcuna variazione sensibile di consumo, le oscillazioni registrate nelle misurazioni sono da ritenersi proprie delle condizioni sperimentali in cui si opera.

Le ipotesi a questo punto sono due:

- la mancata risposta da parte del tessuto esaminato
- la non efficienza della configurazione del sistema o le condizioni operative scelte

Sulla prima ipotesi si è abbastanza certi che presentando il campione una buona vitalità a fine coltura, cosa per altro verificata, la risposta allo stimolo ci sia e sia immediata. Oltretutto si lavora con concentrazioni di insulina notevolmente più alte di quelle fisiologiche.

Si ricade quindi nella seconda ipotesi.

Si rileva necessario uno studio fluidodinamico sul sistema per rilevare la deformazione dell'impulso, si ritiene che un'eventuale problema di dispersione causi una risposta non percepibile perché troppo attenuata. Per analizzare sperimentalmente come un impulso si deforma nel passaggio attraverso tubi e piattaforma, è stato impiegato un tracciante fluorescente (fluoresceina diluita in PBS 1x alla concentrazione 0.001% p/v).

Prima di procedere con tale studio si è deciso di apportare alcune modifiche migliorative ai fini di abbassare il tempo di permanenza dell'impulso nel sistema prima del suo arrivo in

camera in modo da minimizzare i tempi di azione dei fenomeni dispersivi che sono la fonte primaria della deformazione dell'impulso:

- utilizzo di tubi con diametro inferiore (0.25 mm)
- impulso inviato direttamente all'ingresso della piattaforma
- tubi in uscita di lunghezza minimizzata (5 cm)

La configurazione del sistema è sostanzialmente quella mostrata in Figura 3.19 con la modifica che la piattaforma presenta due ingressi uno per il PBS e uno per la fluoresceina.

Nella piattaforma viene fatto fluire il PBS fino al momento dell'avvio dell'impulso. Il secondo ingresso viene tappato con un piccolo tappo in silicone che viene tolto nell'istante dell'avvio per l'inserimento del tubo di fluoresceina. L'impulso di fluoresceina è di un'ora, per simulare quello insulinico. Al termine dell'ora stabilita si blocca la pompa e si riavvia il flusso di PBS 1x.

Con l'avvio dell'impulso si iniziano anche i campionamenti a time point di 10 minuti: i tubicini in uscita vengono fatti gocciolare per 10 min nei pozzetti di una multiwell da 96 che vengono poi portati a 200 ml aggiungendo PBS 1x e tenuto tutto in ghiaccio. L'intensità di fluorescenza di ogni pozzetto è stata misurata tramite lettore tipo Fusion.

Per poter procedere ad una quantificazione in termini di concentrazione di fluoresceina in soluzione è stata fatta la retta di taratura mostrata in Figura 3.20, si è partiti da una concentrazione del 0.001% p/v e si è andati a diluizioni sempre maggiori. Si è constatato che il range di lettura dello strumento è compreso tra $1.5E-08$ e $2.5E-04$. La taratura e tutte le successive analisi sono state fatte con una quantità di soluzione pari a $200 \mu\text{l}$ in quanto minori volumi portano a misurazioni inesatte.

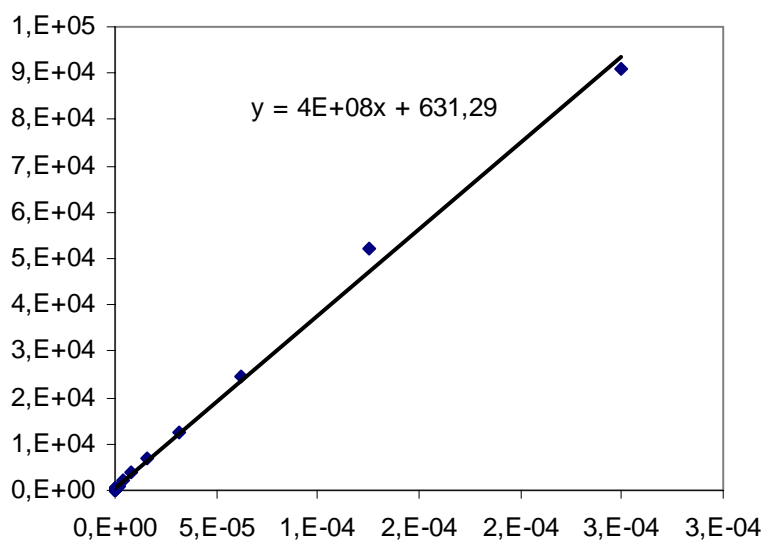
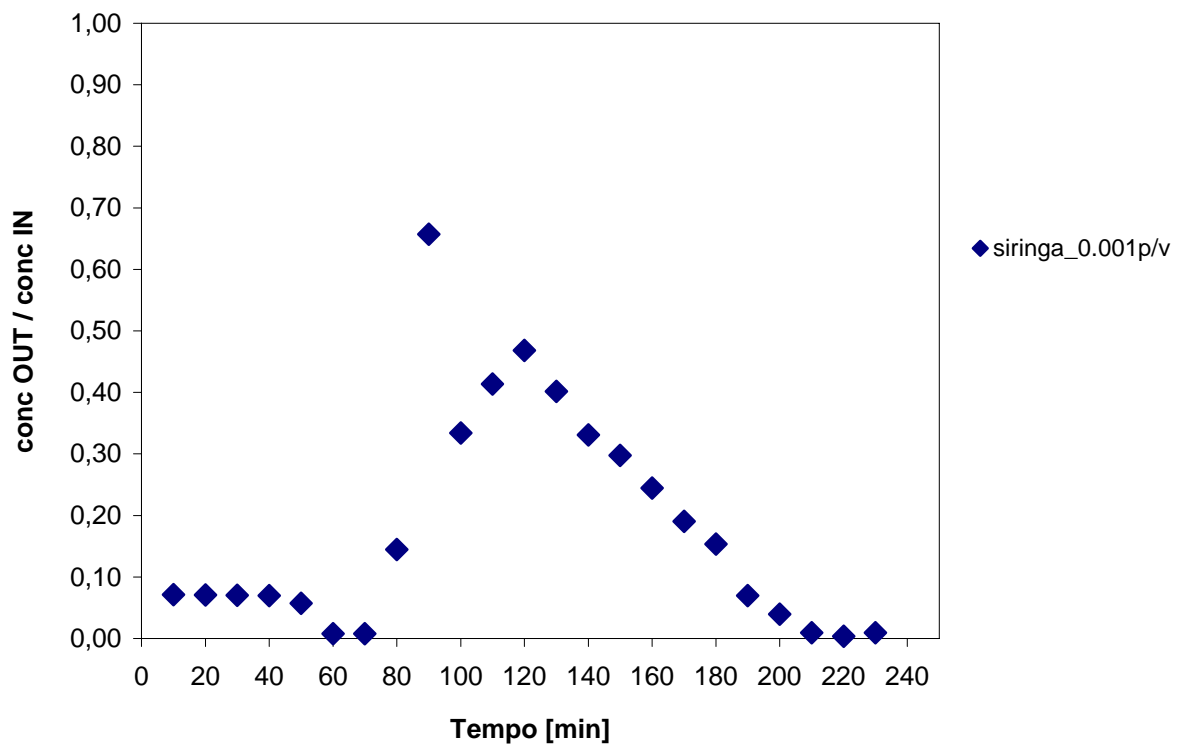
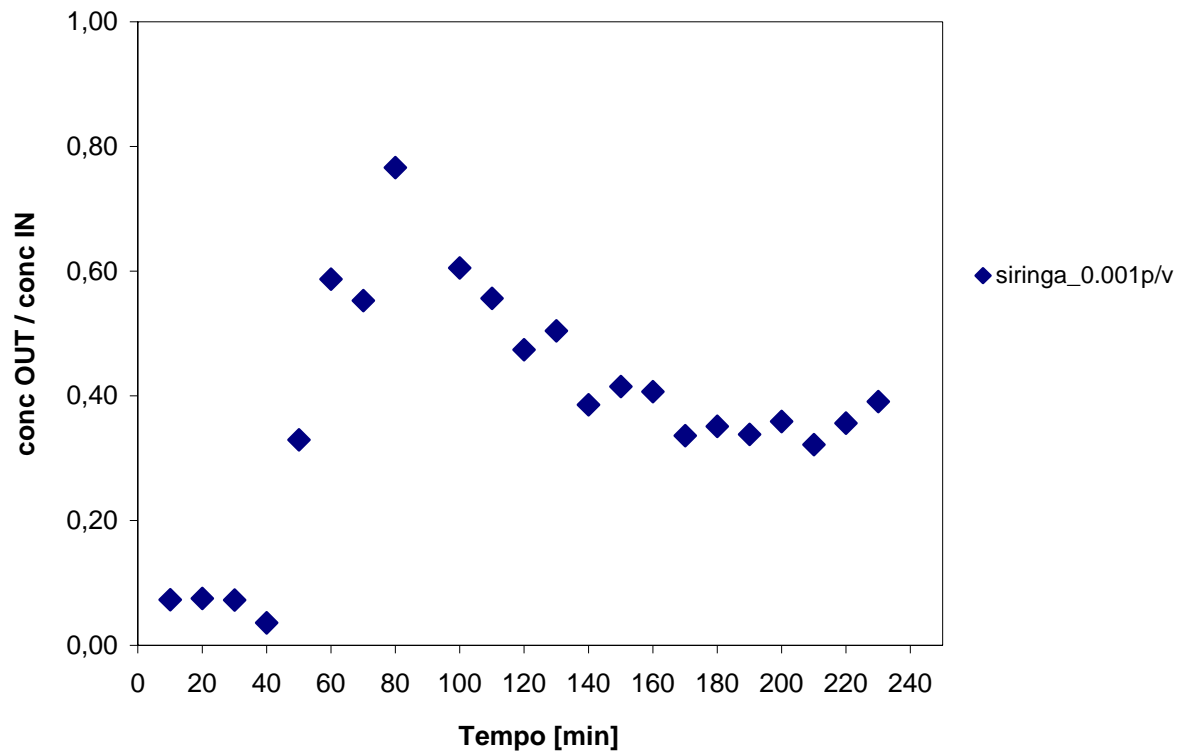


Figura 3.17 Retta di taratura.

Vengono analizzate due portate e tre altezze e i risultati sono riportati nelle figure 3.19 e 3.20.

20 $\mu\text{l/h}$



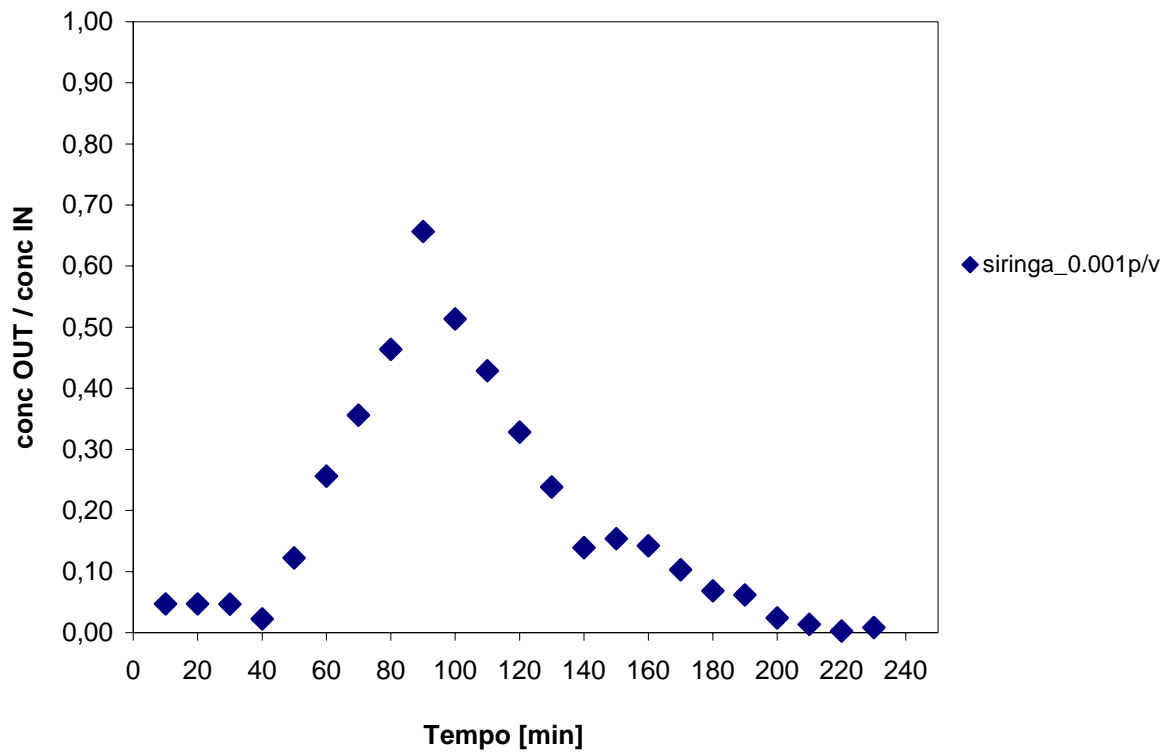
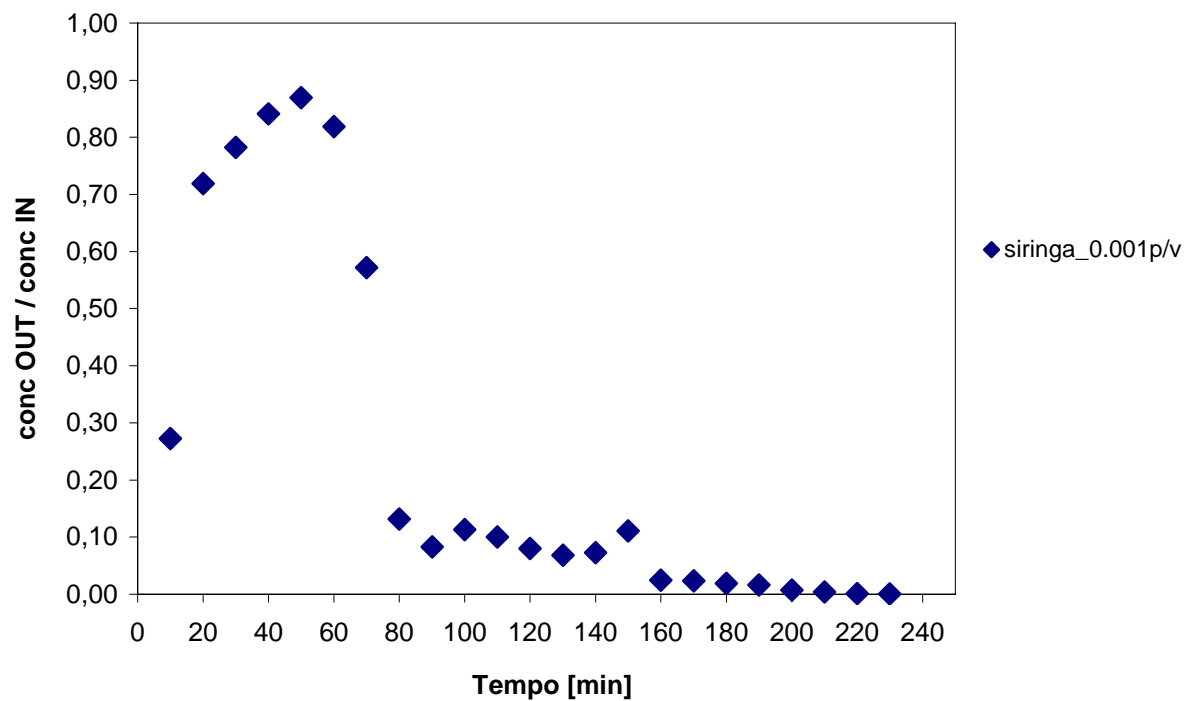
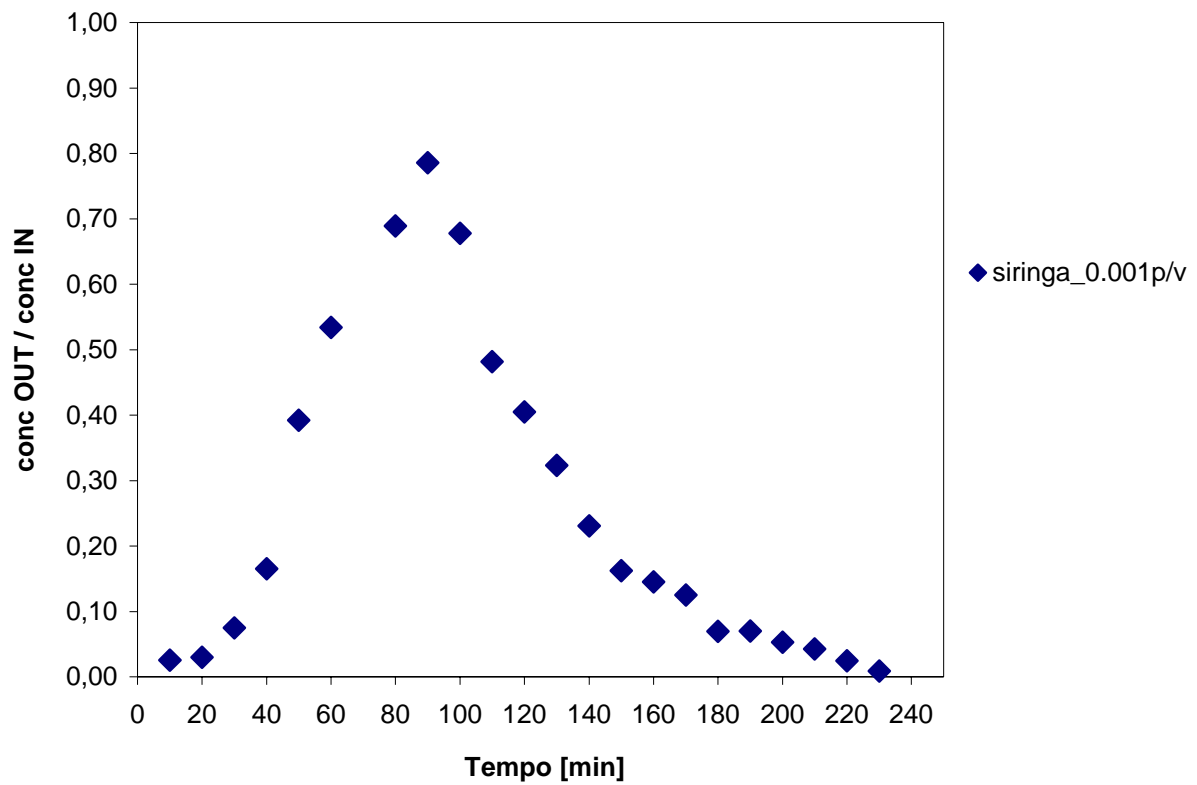


Figura 3.18 Portata 20 $\mu\text{l/h}$ altezza 3 mm 2 mm e 1 mm.

40 $\mu\text{l/h}$ 

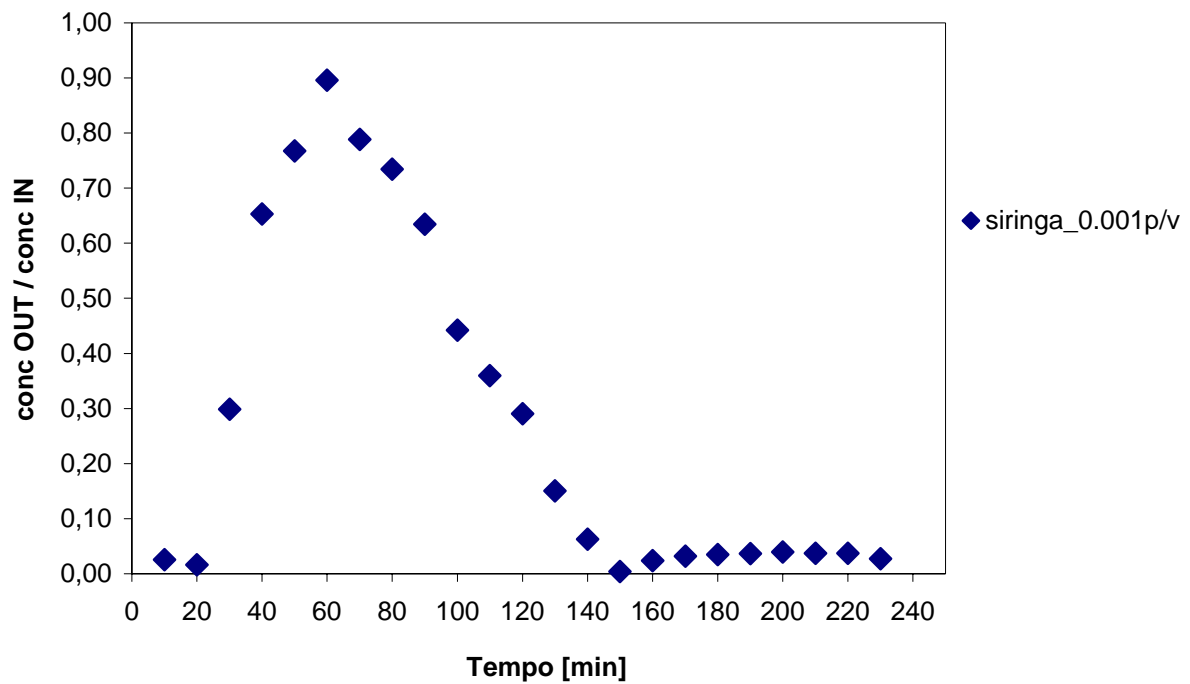


Figura 3.19 Portata 40 $\mu\text{l/h}$ altezza 3 mm 2 mm e 1 mm.

Le prove col tracciante fluorescente hanno mostrato che i fenomeni dispersivi possono essere attenuati nel momento in cui si renda la camera di coltura il più bassa possibile.

Dunque al fine di perseguire in sperimentazioni di insulina in sistemi dinamici occorre apportare modifiche al sistema per renderlo idoneo al lavoro.

Capitolo 4

Risultati

In questo capitolo vengono presentati i risultati di vitalità e di up-take di glucosio relativi alle colture in statica e alle colture in perfusione per le tre tipologie di bioreattori sviluppati.

4.1 Colture in statica

In questo paragrafo si presentano i risultati ottenuti nelle prove di organo coltura di tessuto adiposo condotte in statica.

Gli esperimenti sono stati condotti sia per il tessuto viscerale che per quello sottocutaneo, testando condizioni diverse di coltura.

Inoltre si è testato l'effetto dell'insulina sull'up-take di glucosio, oltre a verificare l'esistenza o meno di insulino-dipendenza da parte del tessuto in coltura si è anche provato a valutarne il comportamento in risposta a concentrazioni differenti.

I risultati completi di tutte le biopsie trattate durante il lavoro di tesi vengono riportati in Appendice, qui per comodità si riporta la Tabella 4.1 che riassume solamente le prove fatte in statica, tali prove sono presenti comunque anche in Appendice. Si sono eseguite in totale 9 prove sperimentali, ma in questo paragrafo si mostrano solo quelli relativi a tre differenti colture.

Nel seguito si danno i risultati suddivisi in:

- Vitalità cellulare
- Consumo di glucosio

Per ogni prova sperimentale eseguita.

Tabella 4.1 Prove di organo coltura eseguite in statica.

	Data	Tessuto	Medium	Volume	Insulina	Durata exp	Diabete
Biopsia N°1	20/01/2010	Viscerale	HG	500 μ l	0-20-100- 200 nM	2 giorni	/
Biopsia N°2	20/01/2010	Sottocute	HG	500 μ l	0-20-100- 200 nM	2 giorni	/
Biopsia N°3	17/02/2010	Viscerale	LG	800 μ l	0-20-100 nM	2 giorni	SI
Biopsia N°4	26/02/2010	Viscerale	LG	800 μ l	0-20-100 nM	2 giorni	NO
Biopsia N°5	15/03/2010	Viscerale	LG	800 μ l	0-20-40-100 nM	2 giorni	SI
Biopsia N°6	22/03/2010	Viscerale	LG	800 μ l	0-20-100 nM	2 giorni	SI
Biopsia N°7	22/03/2010	Viscerale	LG	400 μ l	0-20-100 nM	1 giorno	SI
Biopsia N°8	26/04/2010	Viscerale	LG-HG	800 μ l	0-20 nM	3 giorni	/
Biopsia N°9	26/04/2010	Viscerale	LG-HG	800 μ l	NO	8 giorni	/

4.1.1 Vitalità cellulare

I diagrammi riportati nel seguito mostrano i valori di vitalità cellulare ottenuti mediante il test MTT per le tre differenti colture.

Biopsia N°1

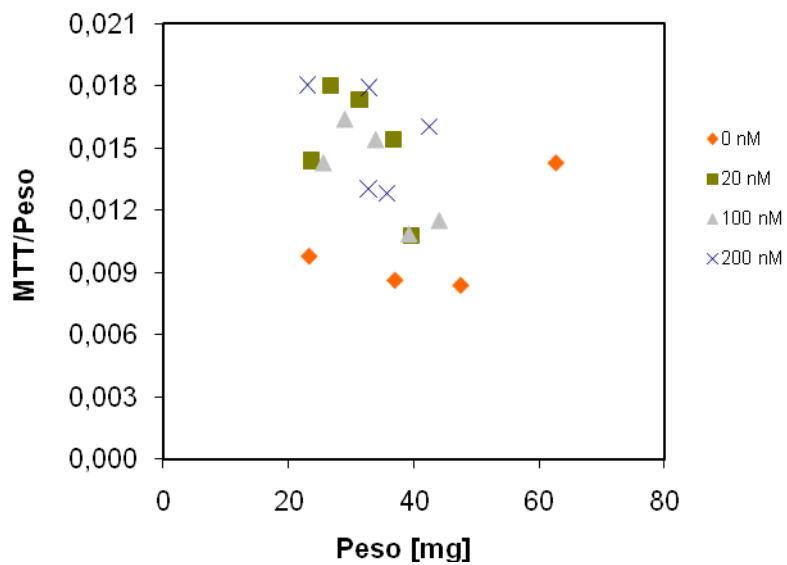


Figura 4.1 Valori di vitalità cellulare ottenuti tramite test MTT per la biopsia N°1.

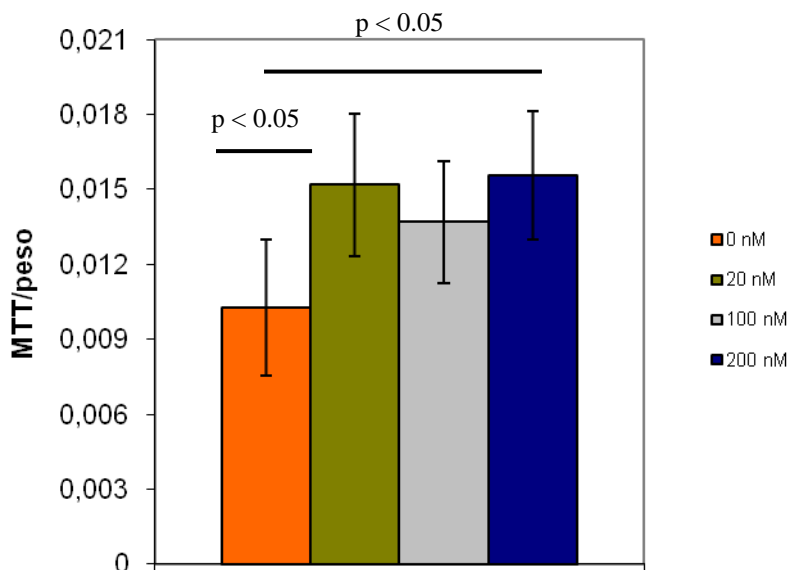


Figura 4.2 Istogramma di vitalità cellulare con le relative deviazioni standard per la biopsia N°1.

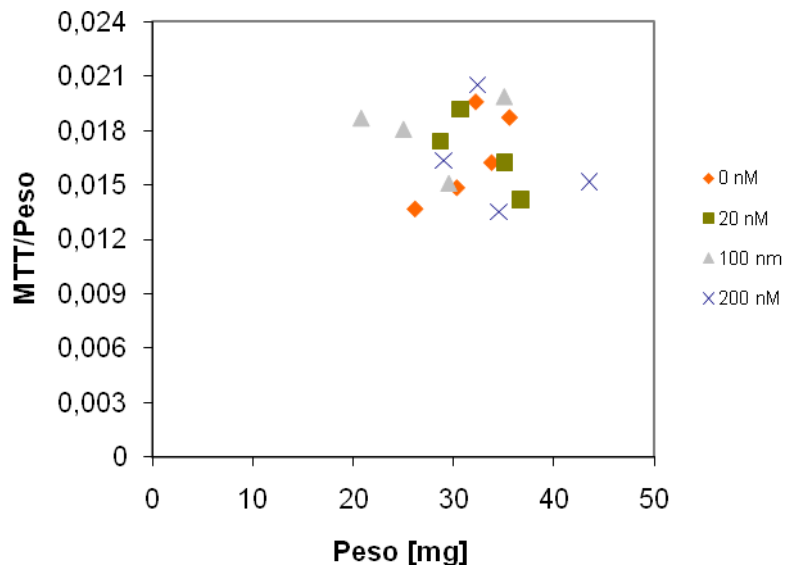
Biopsia N°2

Figura 4.3 Valori di vitalità cellulare ottenuti tramite test MTT per la biopsia N°2.

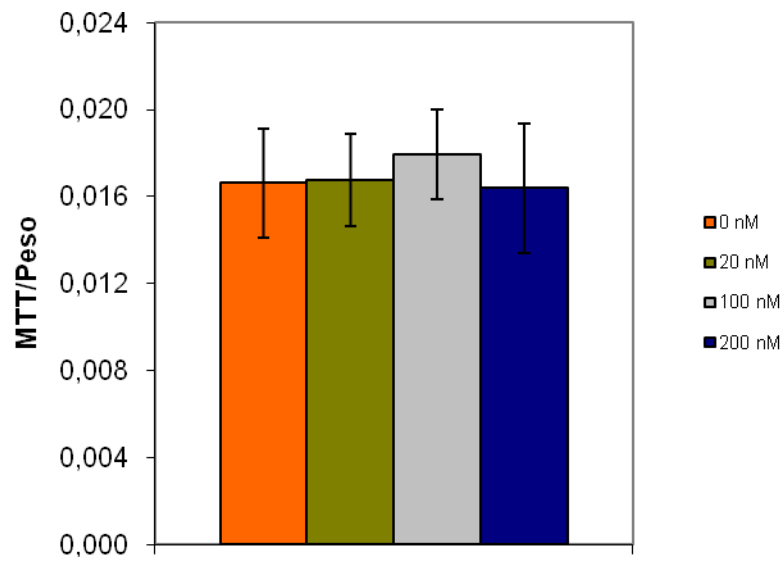


Figura 4.4 Istogramma di vitalità cellulare con le relative deviazioni standard per la biopsia N°2.

Biopsia N°5

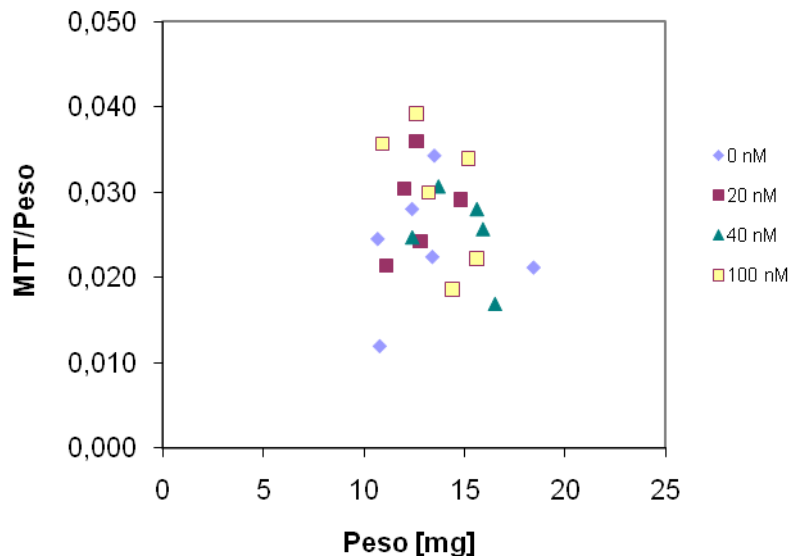


Figura 4.5 Valori di vitalità cellulare ottenuti tramite test MTT per la biopsia N°5.

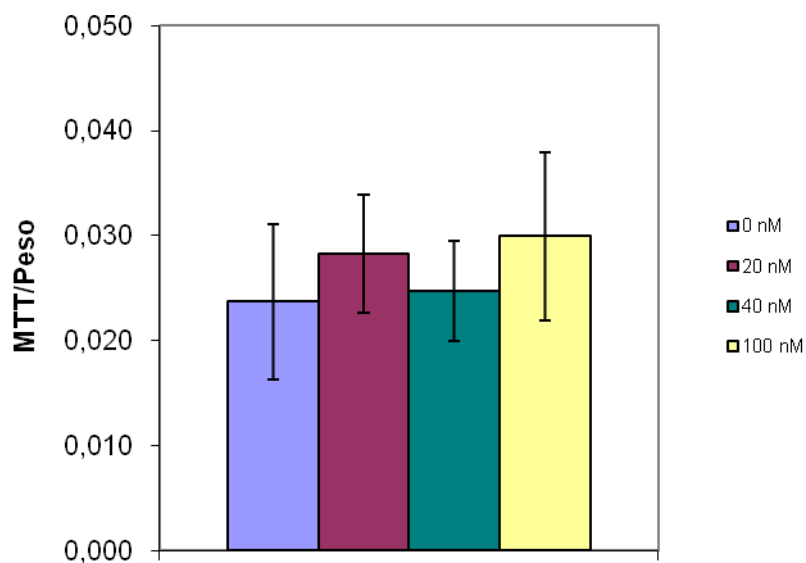


Figura 4.6 Istogramma di vitalità cellulare con le relative deviazioni standard per la biopsia N°5.

Di norma si considera che la biopsia abbia buona vitalità se presenta valori di MTT/Peso maggiori di 0.006. Si nota una accentuata dispersione dei valori dovuta ad un'alta variabilità sperimentale nonostante si stia trattando campioni provenienti da una stessa biopsia.

La presenza dell'insulina nel medium di coltura non pare avere effetti rilevanti sulla vitalità del tessuto in coltura.

4.1.2 Consumo di glucosio

Dopo aver mostrato i valori di vitalità cellulare si riportano ora quelli relativi al consumo di glucosio per le medesime colture.

I diagrammi nel seguito mostrano i valori di consumo normalizzati sia per la vitalità che per il peso del tessuto preso in esame.

Biopsia N°1

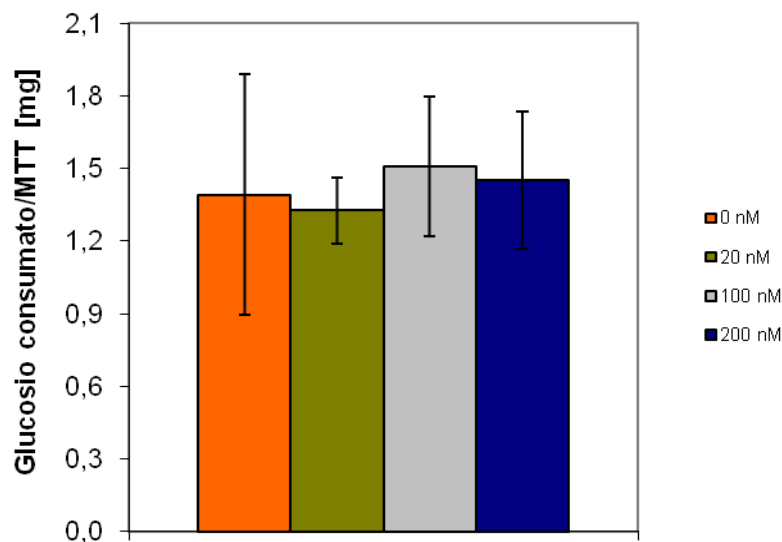


Figura 4.7 Istogramma di consumo di glucosio normalizzato su MTT con le relative deviazioni standard per la biopsia N°1.

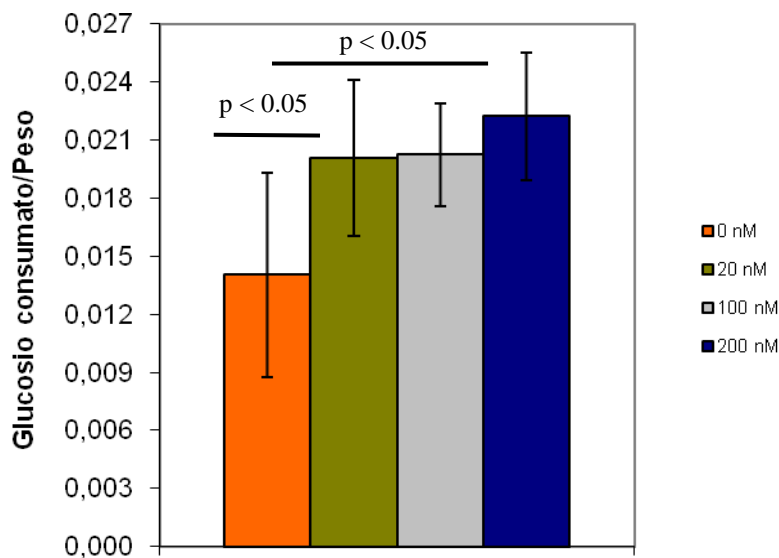


Figura 4.8 Istogramma di consumo di glucosio normalizzato sul peso con le relative deviazioni standard per la biopsia N°1.

Biopsia N°2

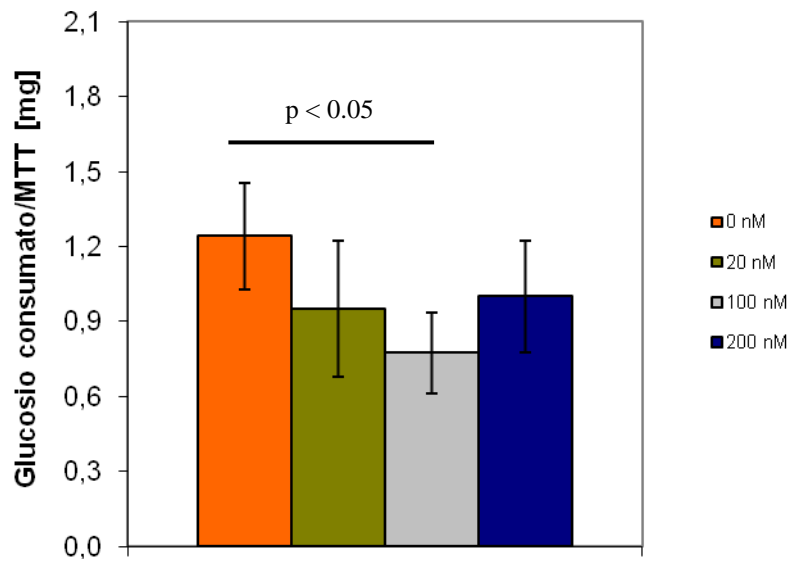


Figura 4.9 Istogramma di consumo di glucosio normalizzato su MTT con le relative deviazioni standard per la biopsia N°2.

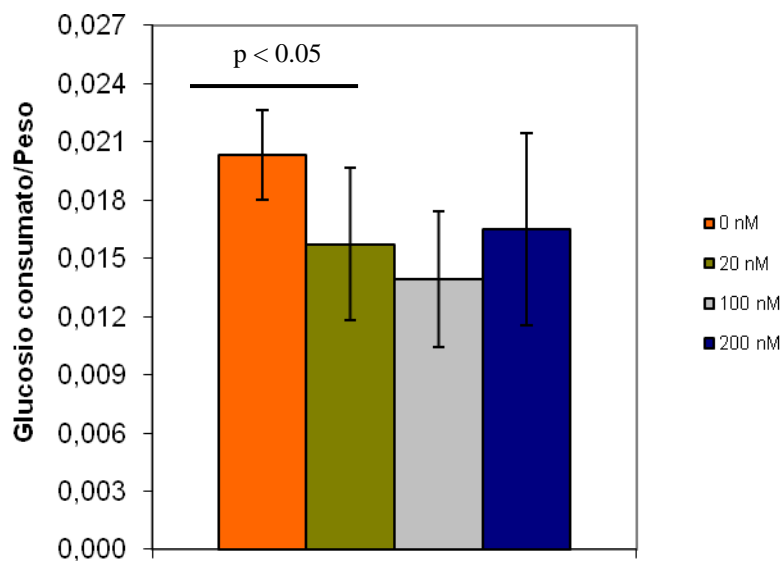


Figura 4.10 Istogramma di consumo di glucosio normalizzato sul peso con le relative deviazioni standard per la biopsia N°2.

Biopsia N°5

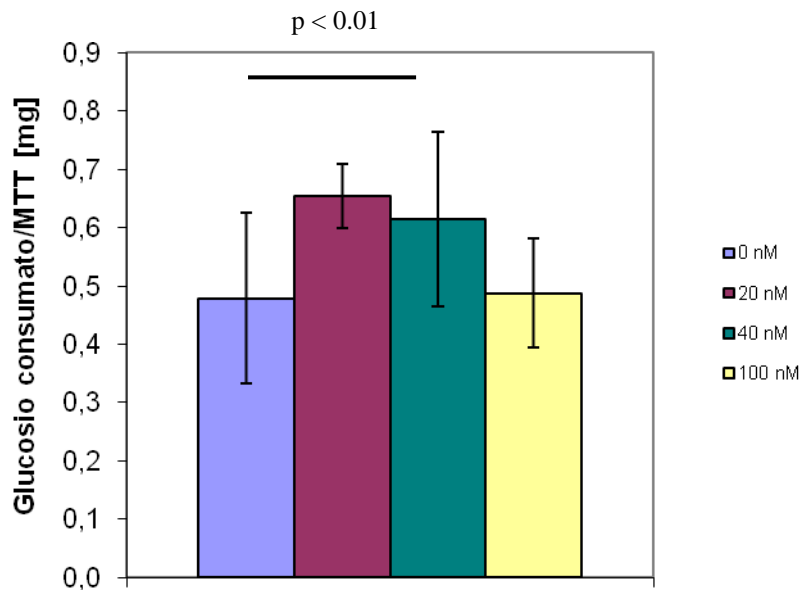


Figura 4.11 Istogramma di consumo di glucosio normalizzato su MTT con le relative deviazioni standard per la biopsia N°5.

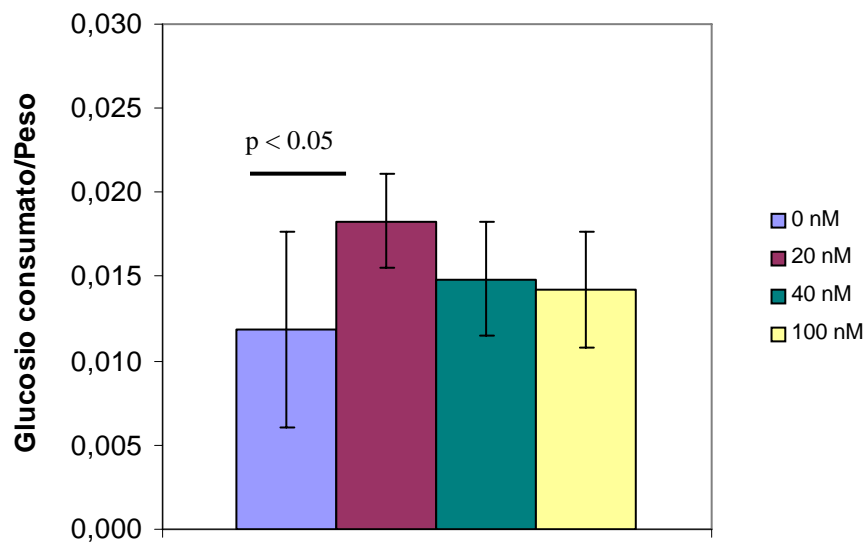


Figura 4.12 Istogramma di consumo di glucosio normalizzato sul peso con le relative deviazioni standard per la biopsia N°5.

Gli istogrammi mostrano la presenza di differenti up-take in relazione all'uso di insulina ma non è però possibile stabilire un effetto dose-dipendente da parte del tessuto.

Riportiamo ora uno studio sull'adattamento del tessuto in condizioni di medium diverso.

Si nota come l'uso di medium LG comporti un adattamento più lento e un consumo che cresce dal terzo giorno in poi, contrariamente a quanto accade con l'HG in cui si riscontra un consumo elevato fin da subito ma che si abbassa nei giorni successivi.

Biopsia N°9

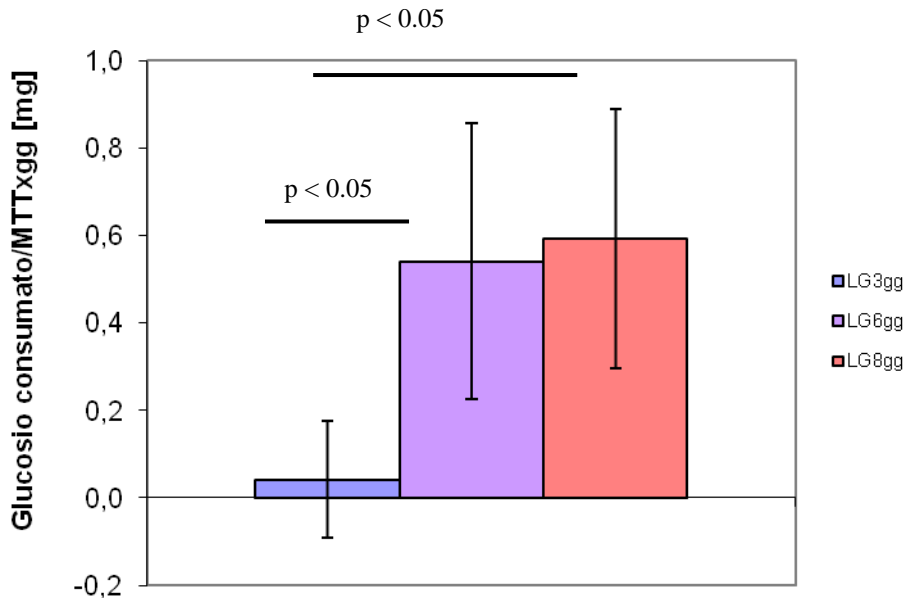


Figura 4.13 Istogramma di consumo di glucosio giornaliero normalizzato su MTT con le relative deviazioni standard per la biopsia N°9.

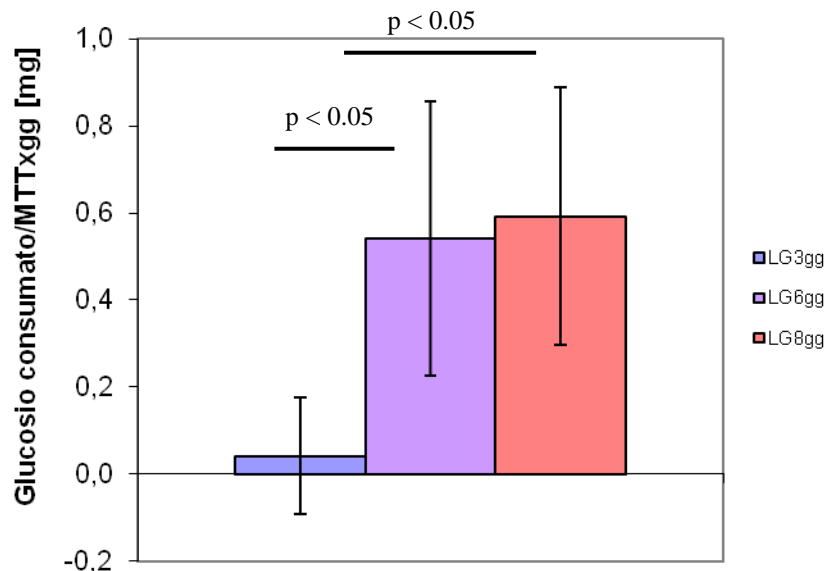


Figura 4.14 Istogramma di consumo di glucosio giornaliero normalizzato su MTT con le relative deviazioni standard per la biopsia N°9.

4.1.3 Controllo biologico mediante analisi istologica

A supporto del test MTT di vitalità cellulare e delle misure di glucosio si è deciso di valutare lo stato del tessuto attraverso delle colorazioni EE per vederne la morfologia.

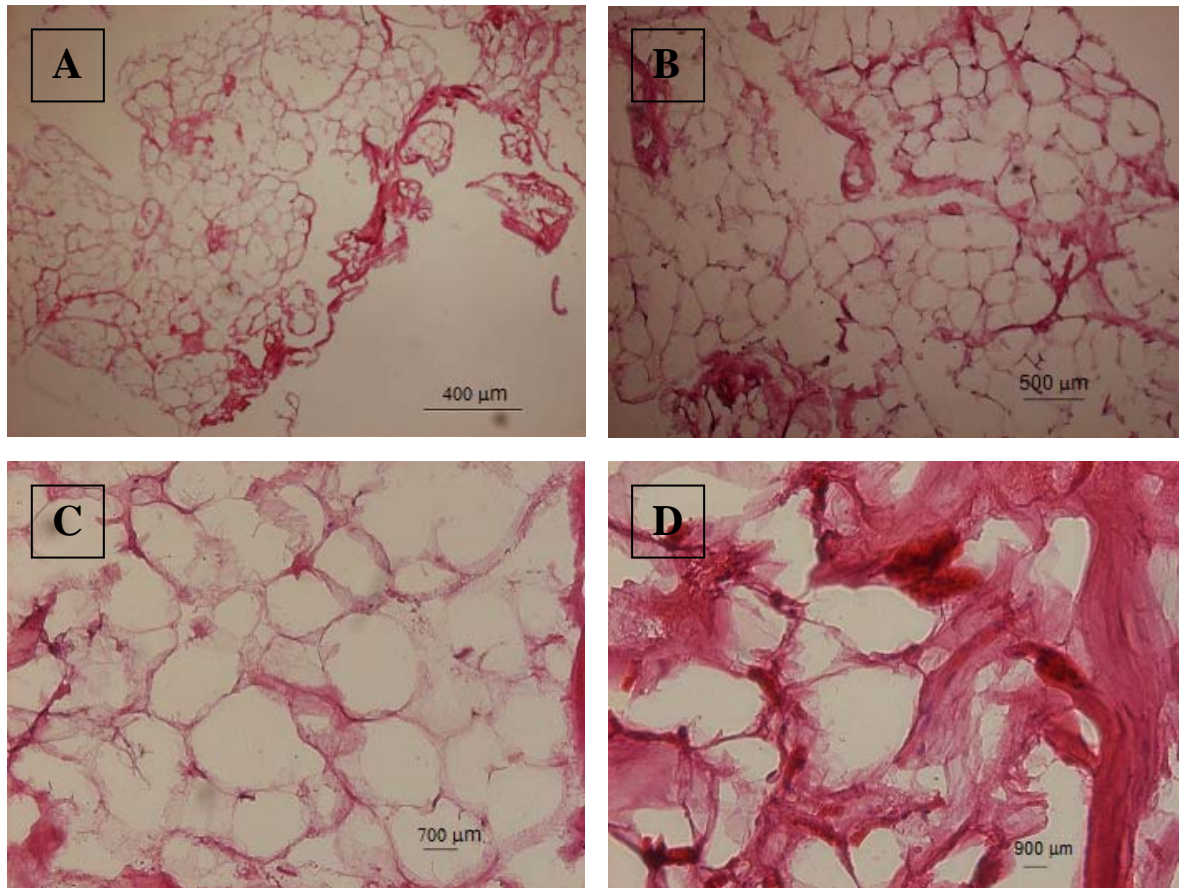


Figura 4.15 Istologia di tessuto adiposo da 20 μm . Ingrandimento: A) 2x; B) 4x; C) 10x; D) 20x.

Le foto mostrano l'aspetto tipico del tessuto adiposo bianco, la maggior parte della cellula è occupata da lipidi e il citoplasma è ridotto ad una sottile striscia nelle periferia.

Il nucleo si presenta dislocato sulla membrana plasmatica e non in posizione centrale.

4.2 Colture in perfusione vs colture in statica

In questo paragrafo si passano in rassegna i risultati ottenuti nelle prove di organo coltura di tessuto adiposo condotte in perfusione nei sistemi presi in esame:

- Macro-bioreattore (mL)
- Mini-bioreattore (μ L)
- Micro-bioreattore (nL)

Gli esperimenti sono stati condotti solamente per il tessuto viscerale.

Non sono state eseguite prove in presenza di insulina.

Per ogni apparato utilizzato si riportano i risultati suddivisi in:

- Vitalità cellulare
- Consumo di glucosio

Le prove si conducono contemporaneamente anche in statica per poter avere un controllo di riferimento, i risultati delle due colture vengono messi a confronto.

In Appendice vengono riportate tutte le prove sperimentali condotte in questo lavoro di tesi, comprese quelle presenti in questo paragrafo, per comodità per ogni dispositivo si riassumono nelle Tabelle 4.2-4.4 le prove eseguite.

4.2.1 Il macro-bioreattore (mL)

Nel seguito si mostrano i risultati ottenuti nel macro-bioreattore confrontati con il controllo in statica. Si riportano inoltre le specifiche sperimentali della coltura.

Tabella 4.2 Prove di organo coltura eseguite nel macro-bioreattore.

	Data	Tessuto	Medium	Volume	Insulina	Durata exp	Diabete
Biopsia N°1	02/02/2010	Viscerale	LG	8 ml	NO	2 giorni	NO

4.2.1.1 Vitalità cellulare

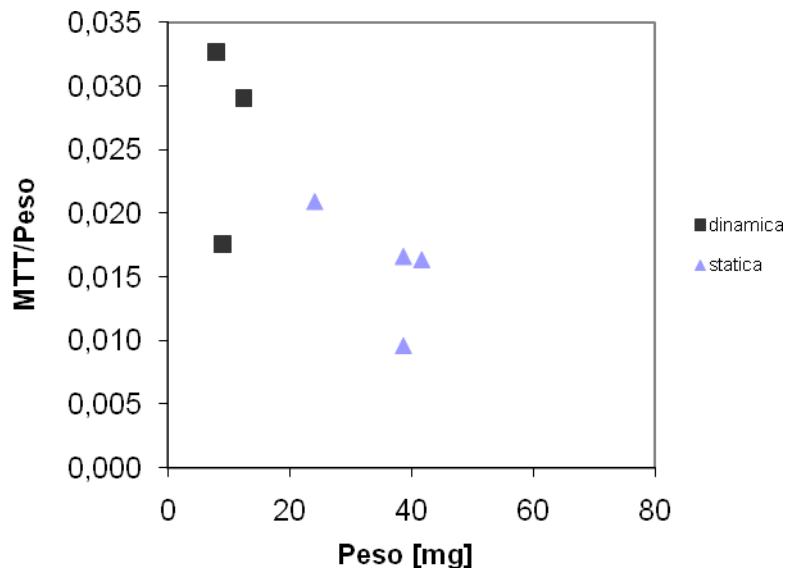


Figura 4.16 Valori di vitalità cellulare ottenuti tramite test MTT per la biopsia N°1..

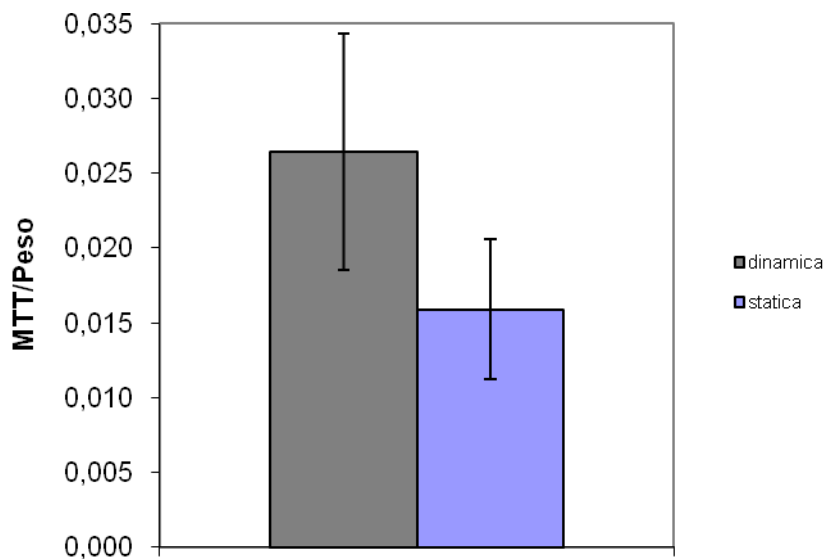


Figura 4.17 Istogramma di vitalità cellulare con le relative deviazioni standard per la biopsia N°1.

I grafici riportati evidenziano come il macro-bioreattore permetta al tessuto di mostrare una buona vitalità a fine coltura, maggiore di quella riscontrata in statica.

Dunque tale sistema si presenta un buon dispositivo per organo coltura ma le sue prestazioni devono essere valutate anche in termini di misurabilità di consumo di glucosio, passiamo dunque a vederne i risultati.

4.2.1.2 Consumo di glucosio

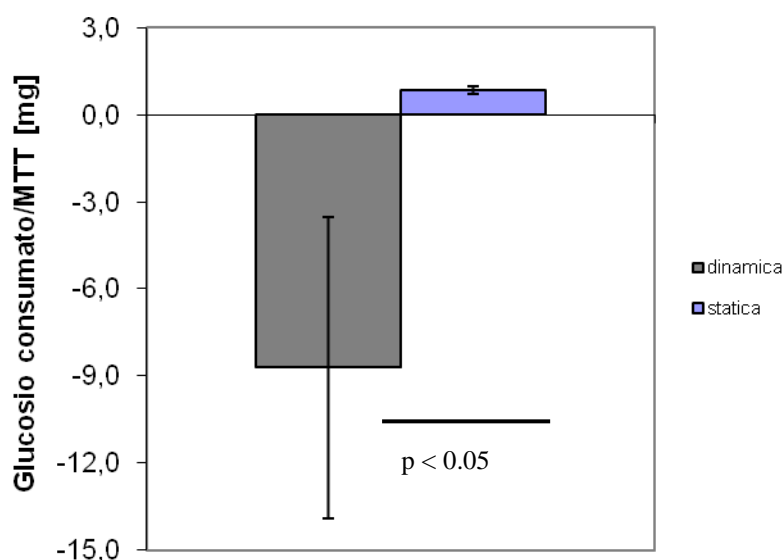


Figura 4.18 Istogramma di consumo di glucosio normalizzato su MTT con le relative deviazioni standard per la biopsia N°1.

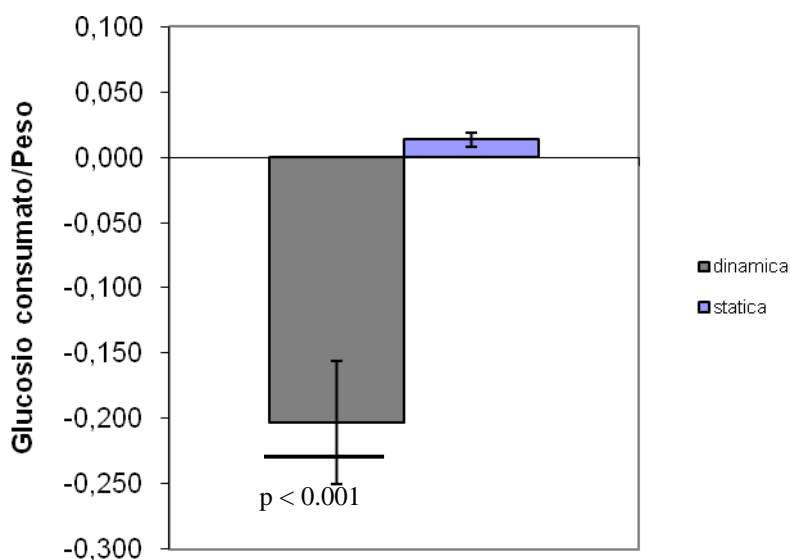


Figura 4.19 Istogramma di consume di glucosio normalizzato sul peso con le relative deviazioni standard per la biopsia N°1.

Il consumo di glucosio misurato presenta dei valori anomali. Si ritiene che la coltura nel bioreattore porti ad un'evaporazione dell'H₂O con conseguente aumento della concentrazione di glucosio. Questo problema può essere ovviato tenendo un pozzetto di controllo.

In ogni caso per i problemi discussi al capitolo 3 si è passati a condurre gli esperimenti su bioreattori più piccoli.

4.2.2 Il mini-bioreattore (μL)

Nel seguito si mostrano i risultati ottenuti nel mini-bioreattore confrontati con il controllo in statica. Si riportano inoltre le specifiche sperimentali della coltura.

Tabella 4.2 Prove di organo coltura eseguite nel mini-bioreattore.

	Data	Tessuto	Medium	Portata	Insulina	Durata exp	Diabetico
Biopsia N°1	26/02/2010	Viscerale	LG	16.7 $\mu\text{L/h}$	NO	2 giorni	NO
Biopsia N°2	15/03/2010	Viscerale	LG	16.7 $\mu\text{L/h}$	NO	2 giorni	NO
Biopsia N°3	22/03/2010	Viscerale	LG	16.7 $\mu\text{L/h}$	NO	2 giorni	SI

4.2.2.1 Vitalità cellulare

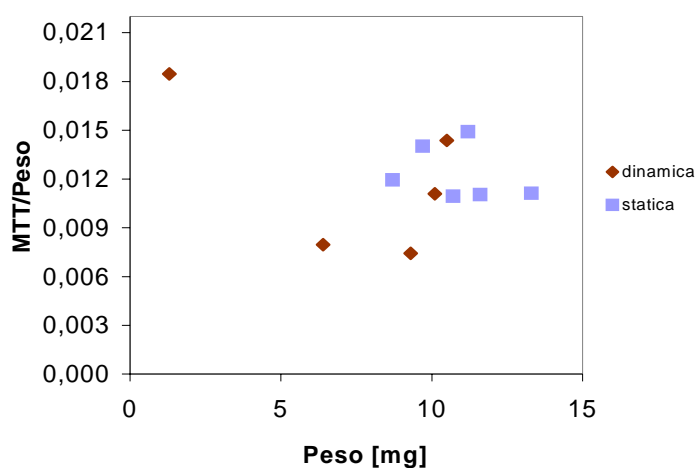


Figura 4.20 Valori di vitalità cellulare ottenuti tramite test MTT per la biopsia N°3.

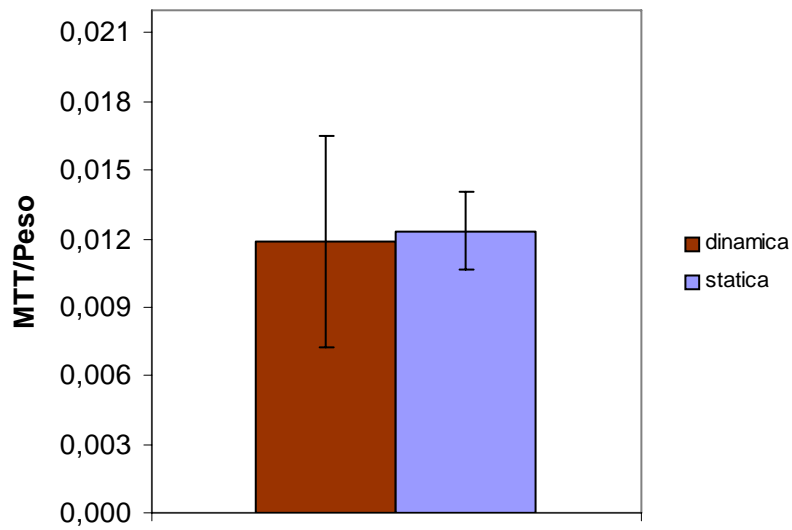


Figura 4.21 Istogramma di vitalità cellulare con le relative deviazioni standard per la biopsia N°3.

Il mini-bioreattore mostra di riuscire a mantenere una buona vitalità del tessuto, paragonabile a quella realizzata nel controllo in statica.

4.2.2.2 Consumo di glucosio

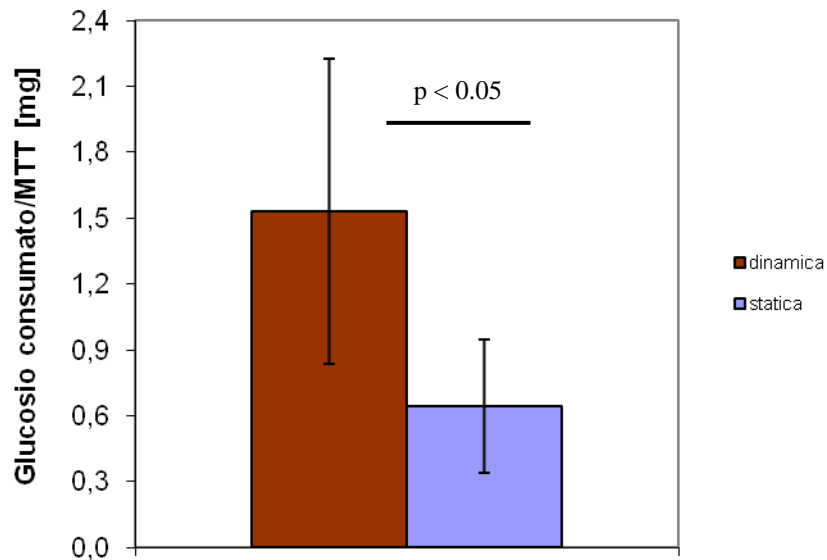


Figura 4.22 Istogramma di consumo di glucosio normalizzato su MTT con le relative deviazioni standard per la biopsia N°3.

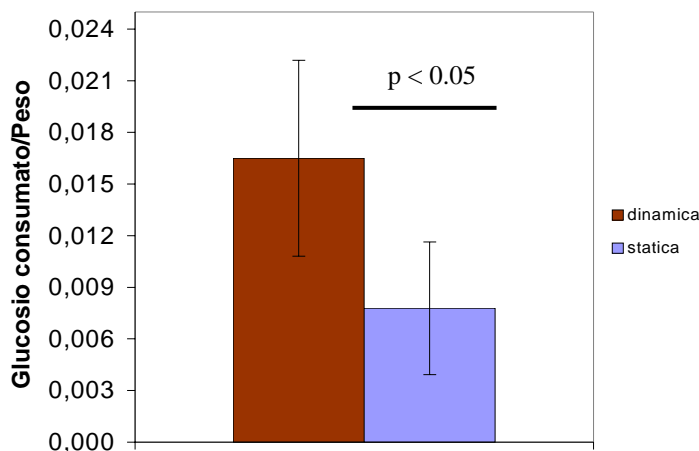


Figura 4.23 Istogramma di consumo di glucosio normalizzato sul peso con le relative deviazioni standard per la biopsia N°3.

Il dispositivo si mostra adatto a misurare il consumo di glucosio, mostrando un up-take maggiore rispetto al controllo in statica. I problemi di evaporazione sono stati risolti.

Le migliori prestazioni rispetto alla coltura in statica sono da imputarsi ad un miglior trasporto della specie al tessuto che ne permette una maggior acquisizione.

In ogni caso come specificato nel capitolo 3 una riduzione di scala del sistema dovrebbe aumentare la sensibilità della misura.

4.2.3 Il micro-bioreattore (nL)

Nel seguito si mostrano i risultati ottenuti nel micro-bioreattore confrontati con il controllo in statica. Si riportano inoltre le specifiche sperimentali della coltura.

Tabella 4.3 Prove di organo coltura eseguite nel micro-bioreattore.

	Data	Tessuto	Medium	Portata	Insulina	Durata	Diabete
						exp	
Biopsia N°1	21/04/2010	Viscerale	LG	16.7 μ l/h	NO	2 giorni	NO
Biopsia N°2	26/04/2010	Viscerale	LG	16.7 μ l/h	NO	3 giorni	/
Biopsia N°3	04/05/2010	Viscerale	LG	16.7 μ l/h	NO	2 giorni	NO

4.2.3.1 Vitalità cellulare

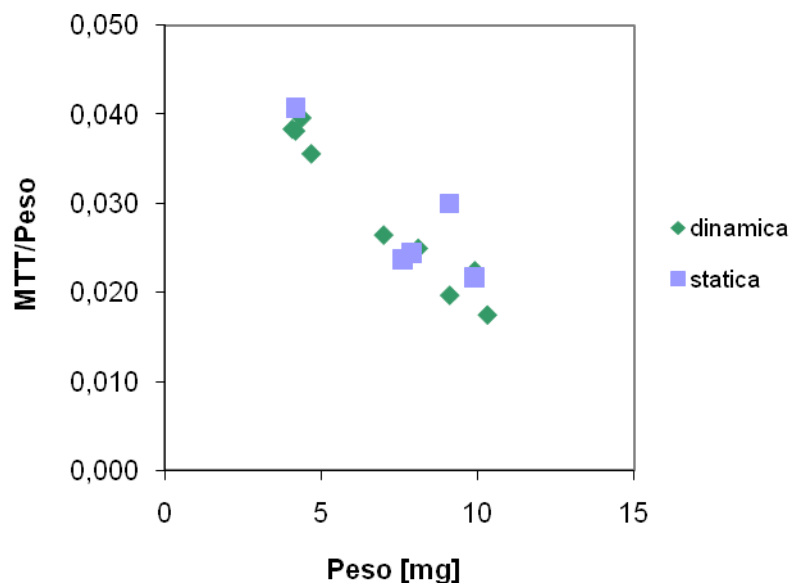


Figura 4.24 Valori di vitalità cellulare ottenuti tramite test MTT per la biopsia N°3.

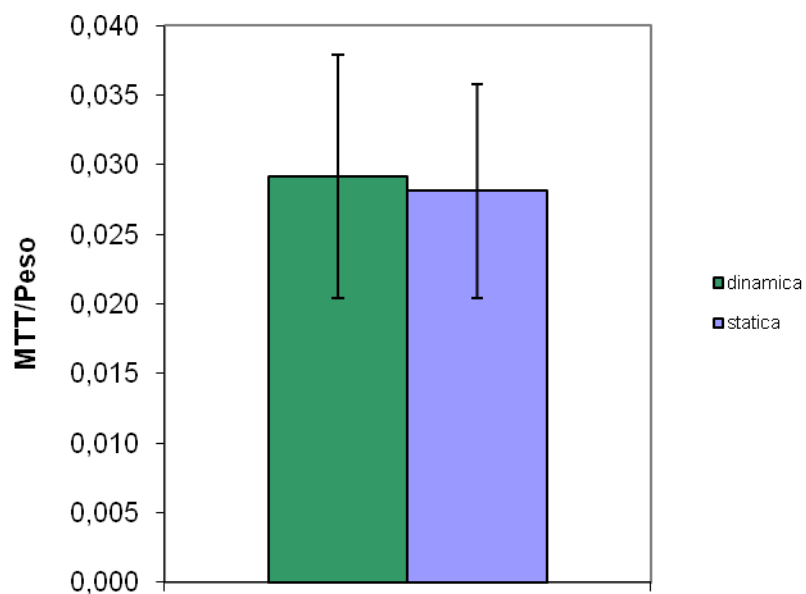


Figura 4.25 Istogramma di vitalità cellulare con le relative deviazioni standard per la biopsia N°3.

La piattaforma microfluidica mantiene una buona vitalità del campione che risulta paragonabile a quella ottenibile nelle colture in statica.

4.2.3.2 Consumo di glucosio

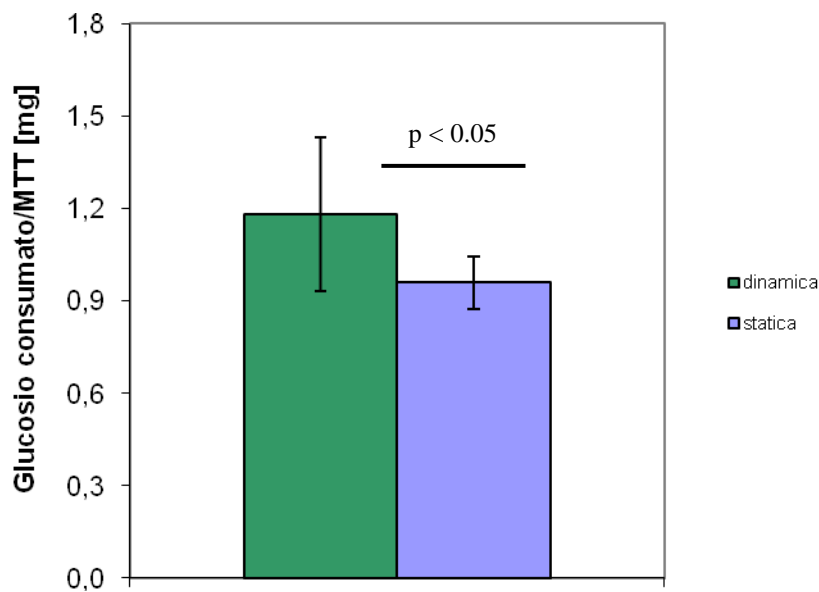


Figura 4.26 Istogramma di consumo di glucosio normalizzato su MTT con le relative deviazioni standard per la biopsia N°3.

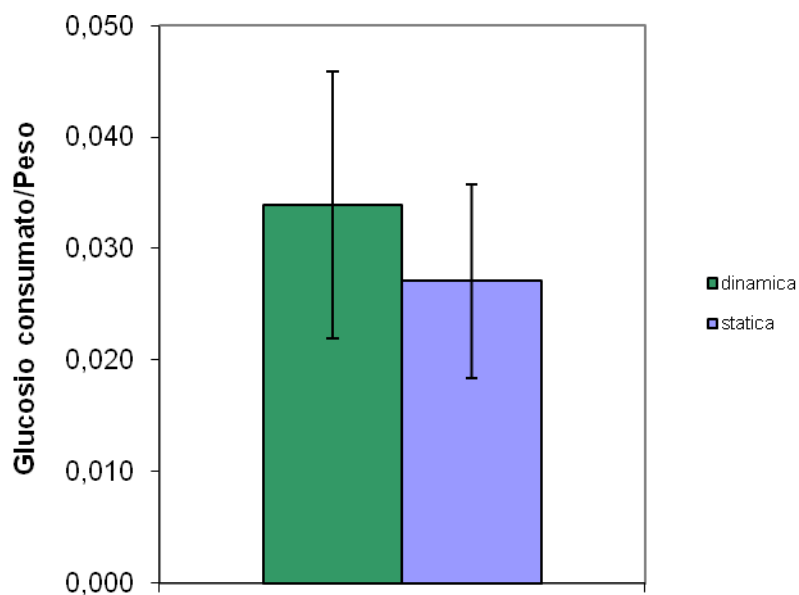


Figura 4.27 Istogramma di consumo di glucosio normalizzato sul peso con le relative deviazioni standard per la biopsia N°3.

Notiamo anche per questo dispositivo la buona capacità nel prestarsi alle misurazioni di consumo. Alla stregua del mini-bioreattore anche il micro permette una maggior acquisizione da parte del tessuto in coltura rispetto alla statica grazie a delle migliori condizioni di trasporto della specie.

Conclusioni

Alla luce della grande utilità che l'organo coltura può rivestire in sede di sperimentazione farmacologica, questo lavoro di tesi si inserisce all'interno di un progetto più ampio volto a determinare nuove terapie di cura per il Diabete Mellito di tipo 2.

Si è giunti a sviluppare un sistema che riesce a mantenere nel campione di tessuto adiposo posto in coltura una buona capacità funzionale. Inoltre il sistema suddetto permette di rilevare e misurare l'up-take di glucosio consumato dalla specie cellulare.

Nei campioni messi in coltura statica si è anche riusciti a vedere un comportamento insulino-dipendente ma senza notare differenze significative sull'uso di dosaggi diversi.

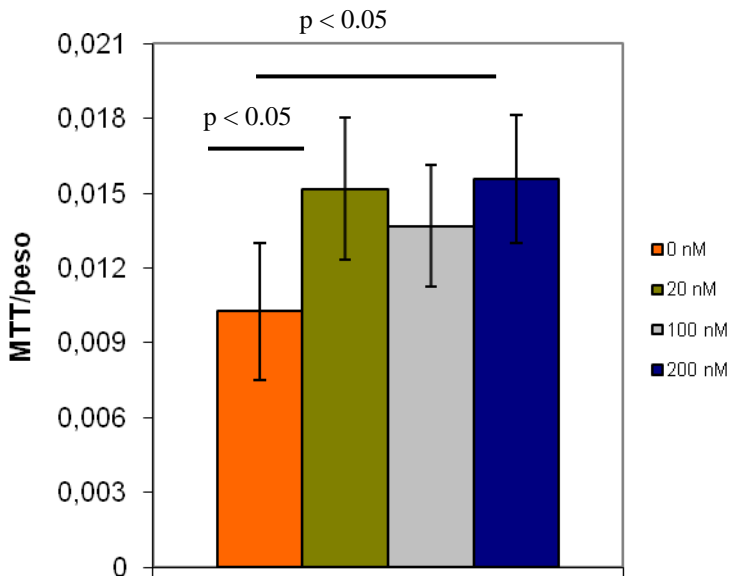
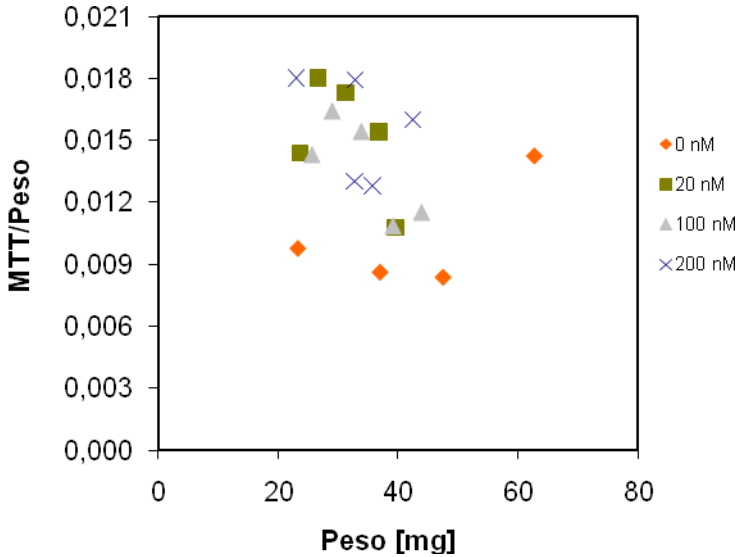
E' importante sottolineare quanto l'uso di un tessuto e non di semplici colture cellulari crei difficoltà nella buona riuscita delle prove sperimentali in quanto si rileva una forte variabilità anche intrinseca a campioni provenienti da una stessa biopsia.

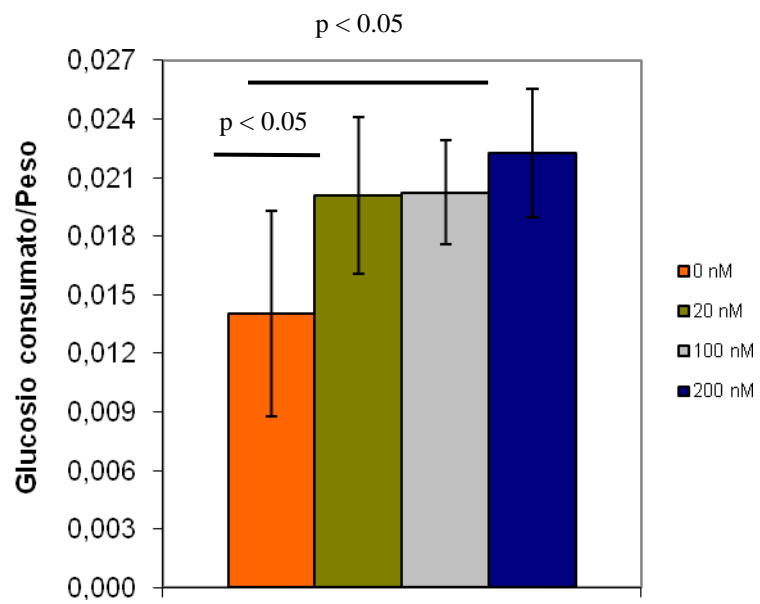
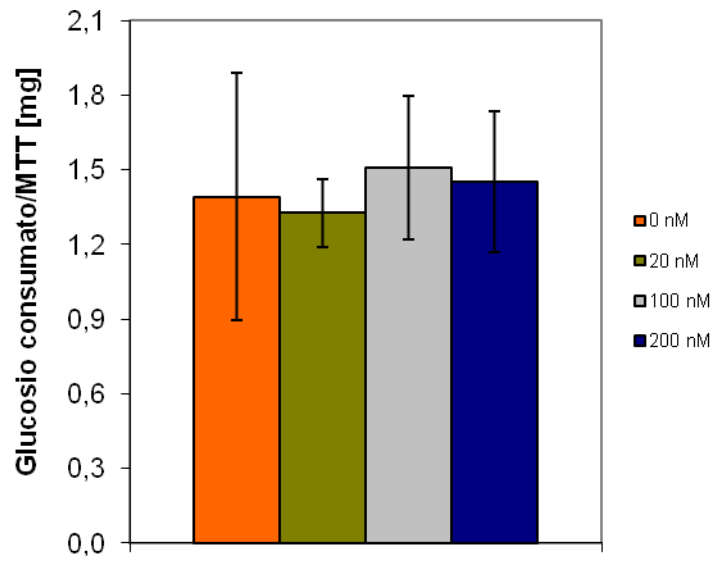
I risultati ottenuti sono comunque da considerarsi ottimi in quanto oggigiorno l'organo coltura di tessuti umani a scopi terapeutici non è applicata e in letteratura non si trovano pubblicazioni relative a questo.

Appendice

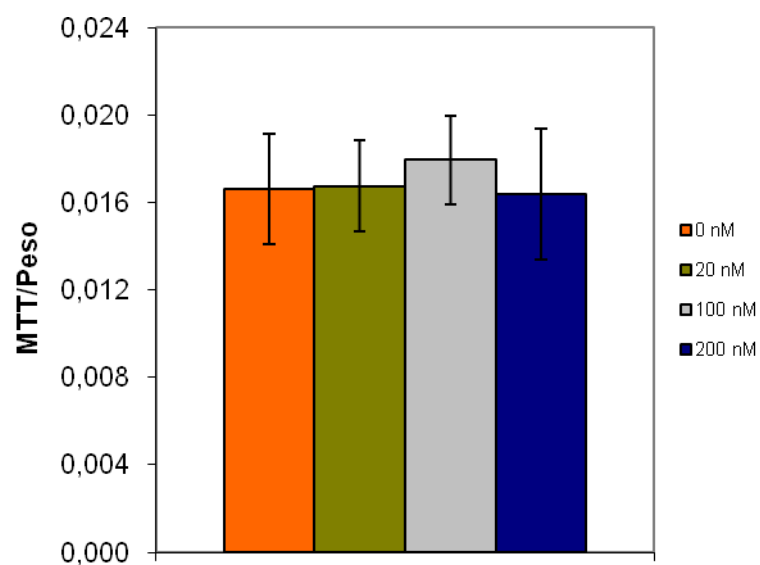
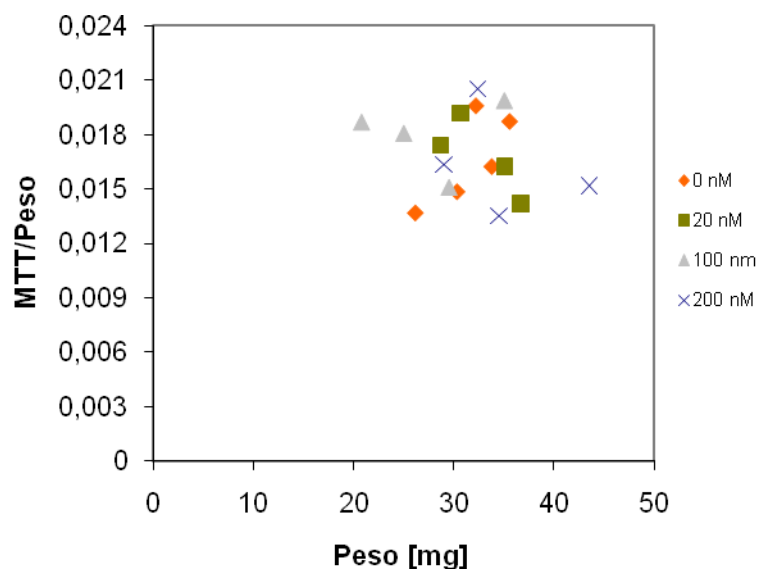
Biopsia	Data biopsia	Diabetico	Età	Sesso	BMI
N° 1	20 Gennaio 2010	/	/	/	/

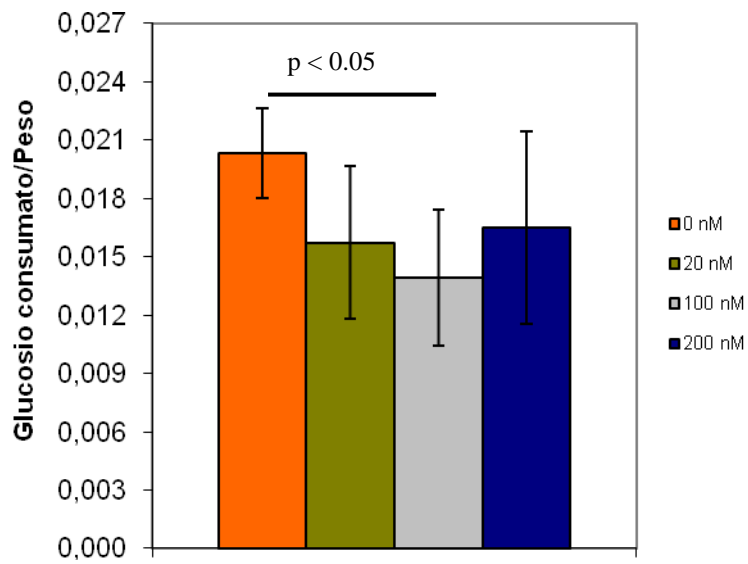
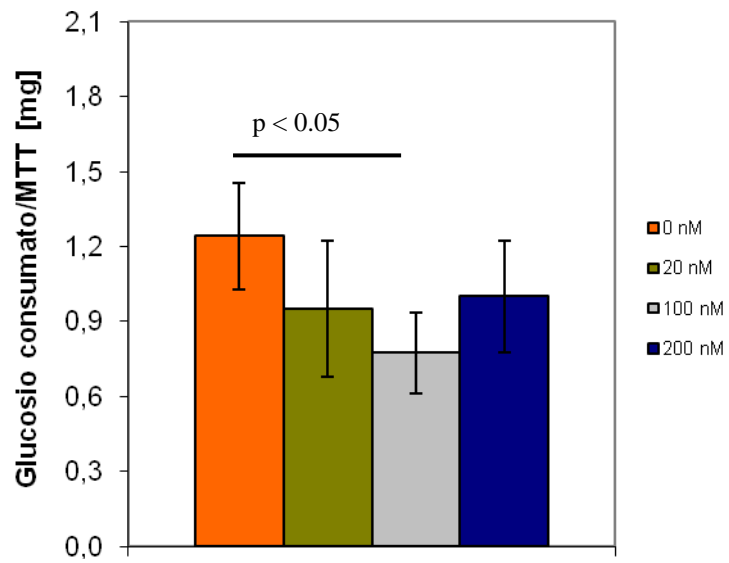
- Prova:
 - Statica
 - Durata esperimento: 2 giorni
- Medium:
 - HG
 - Volume impiegato: 500 µl per pozzetto
 - Insulina: 0-20-100-200 nM
- Tessuto Adiposo:
 - Viscerale





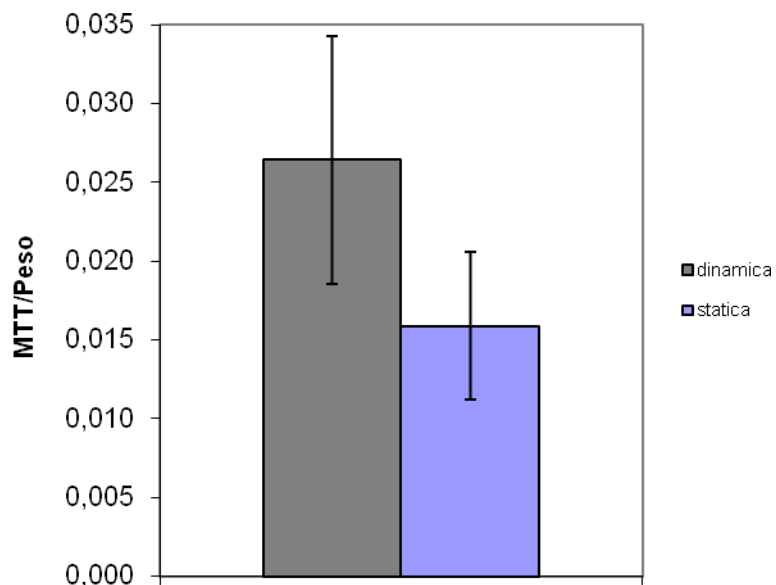
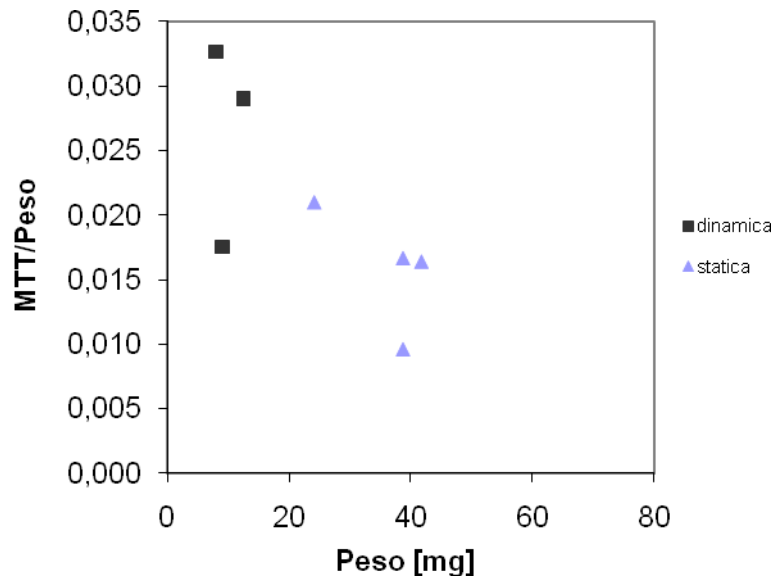
- Prova:
 - Statica
 - Durata esperimento: 2 giorni
- Medium:
 - HG
 - Volume impiegato: 500 μ l per pozzetto
 - Insulina: 0-20-100-200 nM
- Tessuto Adiposo:
 - Sottocutaneo

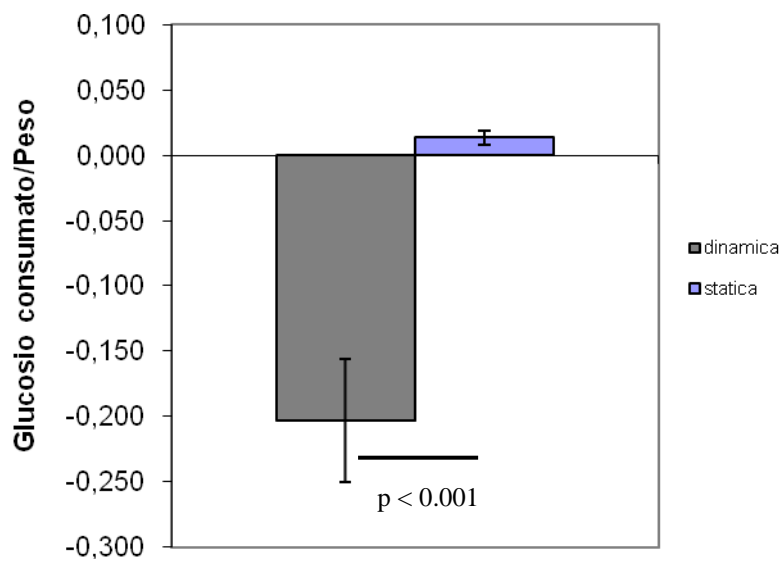
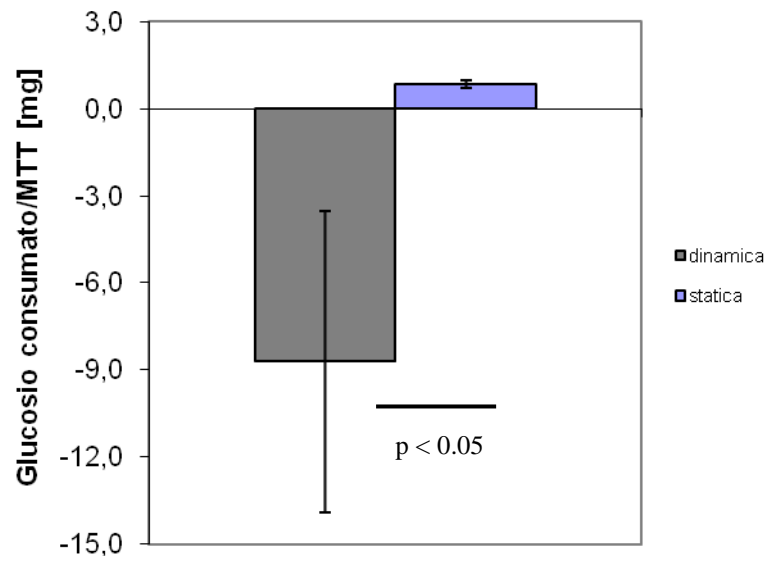




Biopsia	<i>Data biopsia</i>	<i>Diabetico</i>	<i>Età</i>	<i>Sesso</i>	<i>BMI</i>
N° 2	2 Febbraio 2010	<i>NO</i>	/	/	/

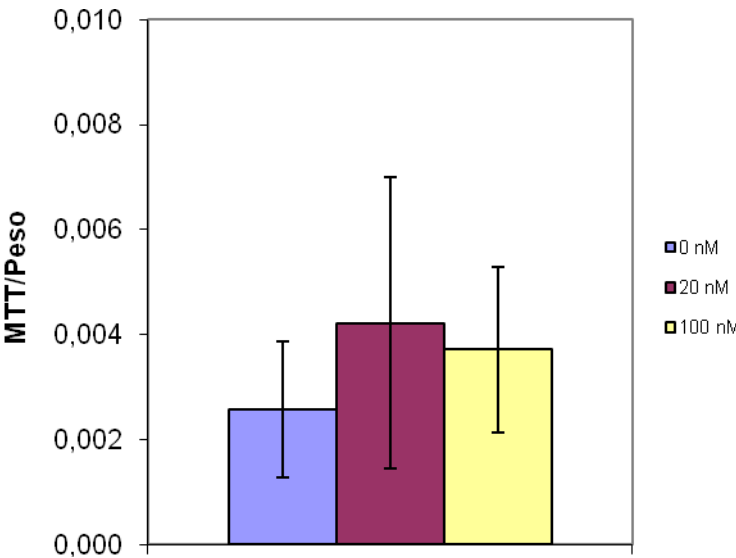
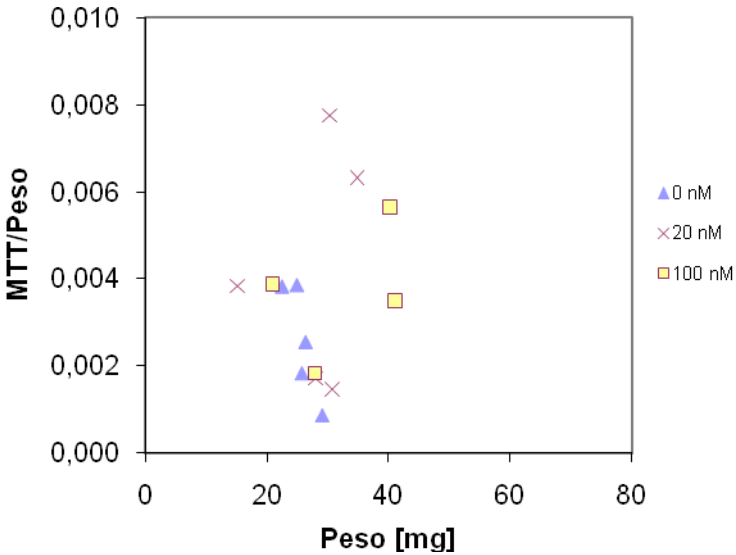
- Prova:
 - Statica + Macro-bioreattore
 - Durata esperimento: 2 giorni
- Medium:
 - LG
 - Volume impiegato: 800 µl per pozzetto / 8 ml hold up bioreattore
 - Insulina: NO
- Tessuto Adiposo:
 - Viscerale

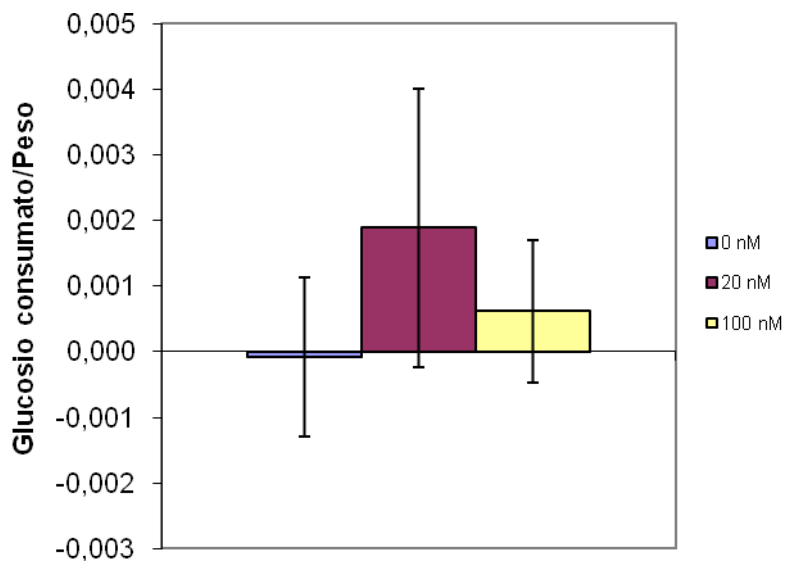
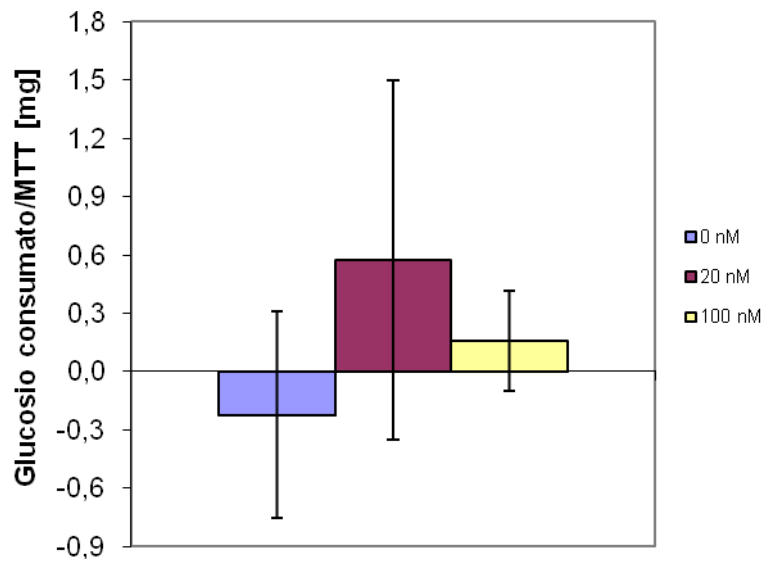




Biopsia	<i>Data biopsia</i>	<i>Diabetico</i>	<i>Età</i>	<i>Sesso</i>	<i>BMI</i>
N° 3	17 Febbraio 2010	SI	/	/	/

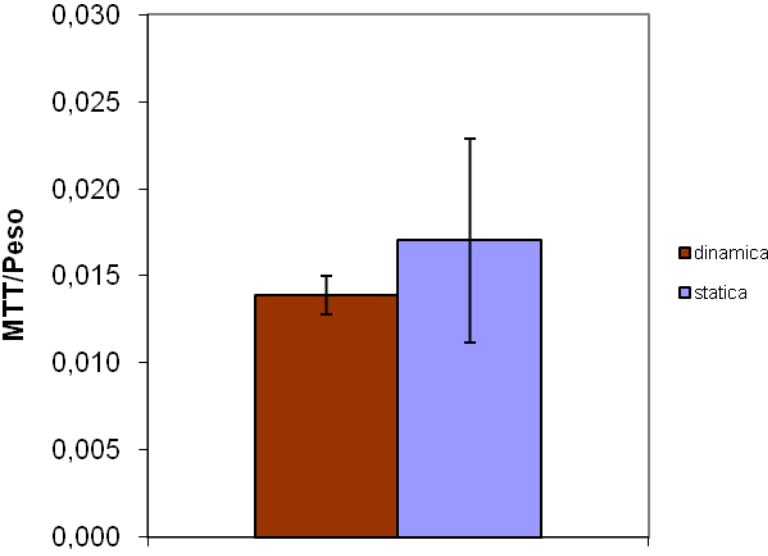
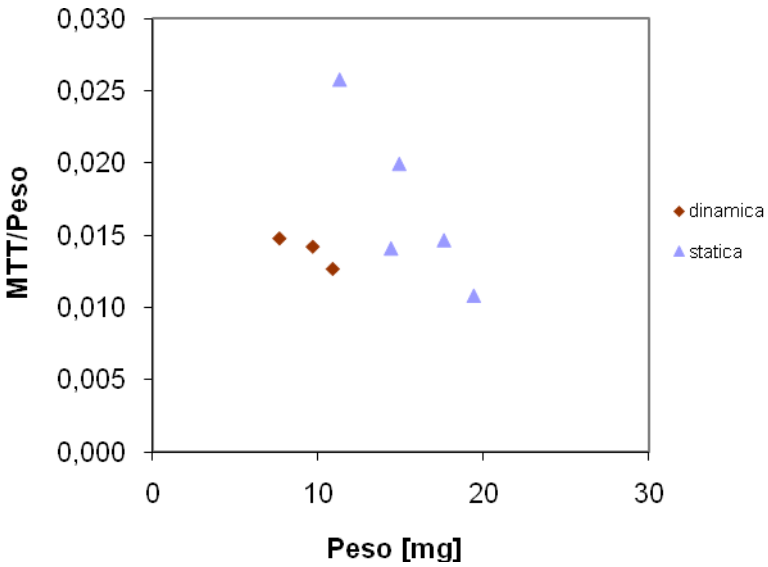
- Prova:
 - Statica
 - Durata esperimento: 2 giorni
- Medium:
 - LG
 - Volume impiegato: 800 µl per pozzetto
 - Insulina: 0-20-100 nM
- Tessuto Adiposo:
 - Viscerale

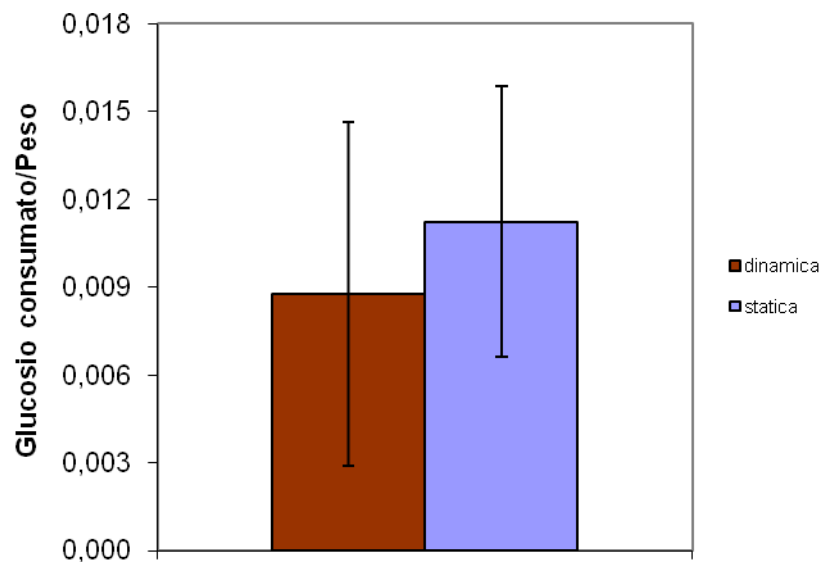
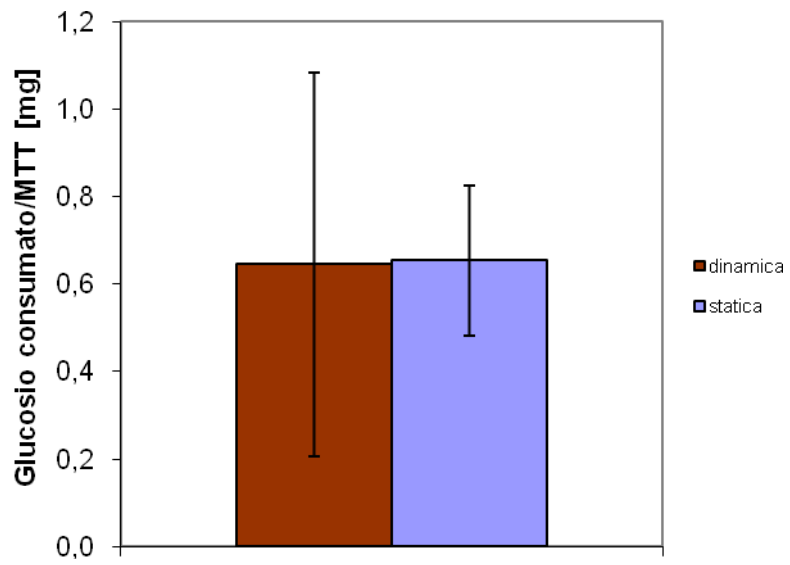




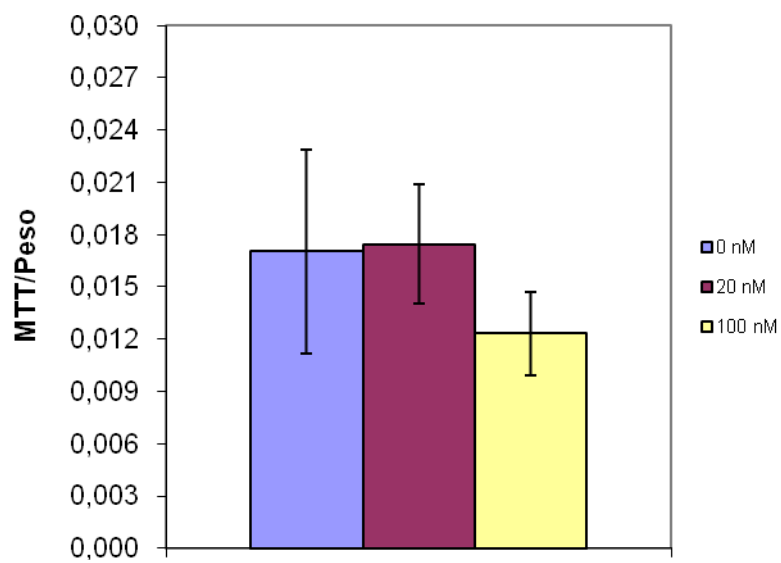
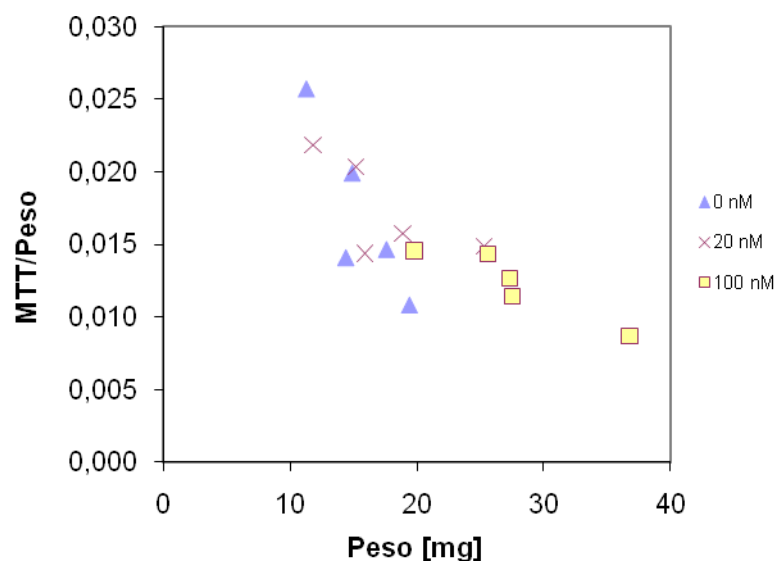
Biopsia	<i>Data biopsia</i>	<i>Diabetico</i>	<i>Età</i>	<i>Sesso</i>	<i>BMI</i>
N° 4	26 Febbraio 2010	<i>NO</i>	<i>53</i>	<i>F</i>	<i>56.2</i>

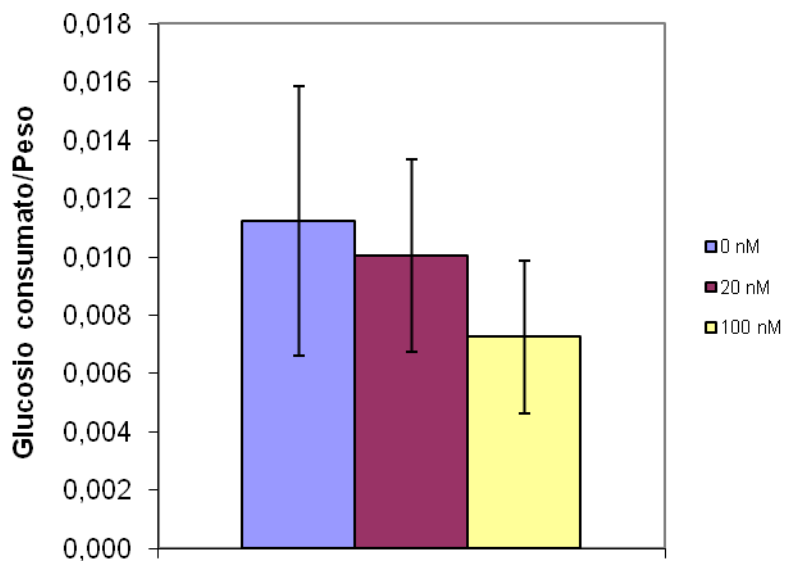
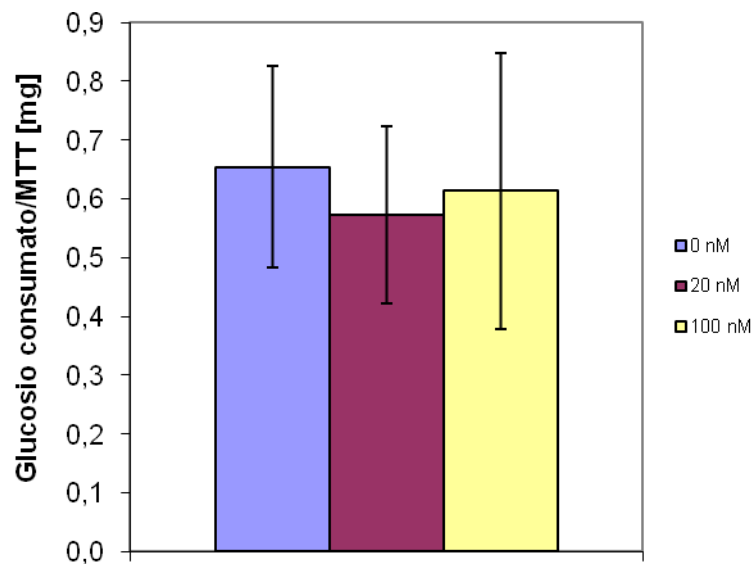
- Prova:
 - Statica + Mini-bioreattore
 - Durata esperimento: 2 giorni
- Medium:
 - LG
 - Volume impiegato: 800 µl per pozzetto / portata negli holder 16.7 µl/h
 - Insulina: NO
- Tessuto Adiposo:
 - Viscerale





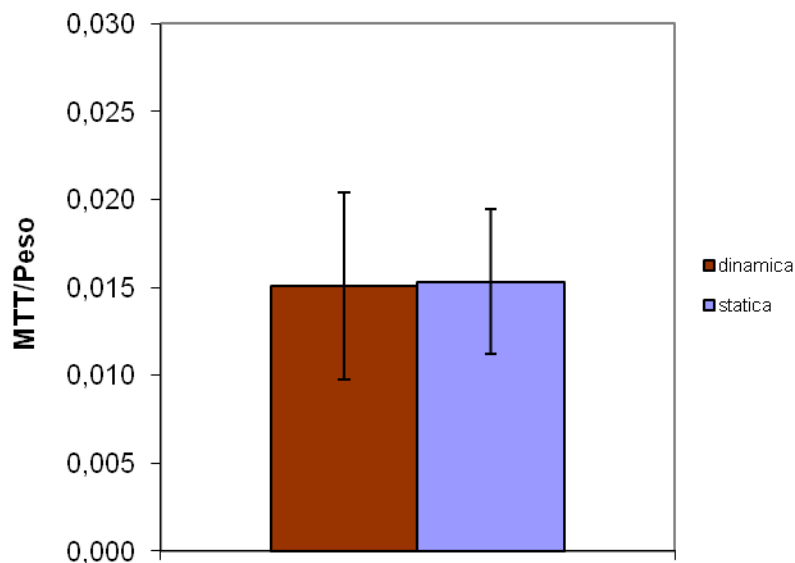
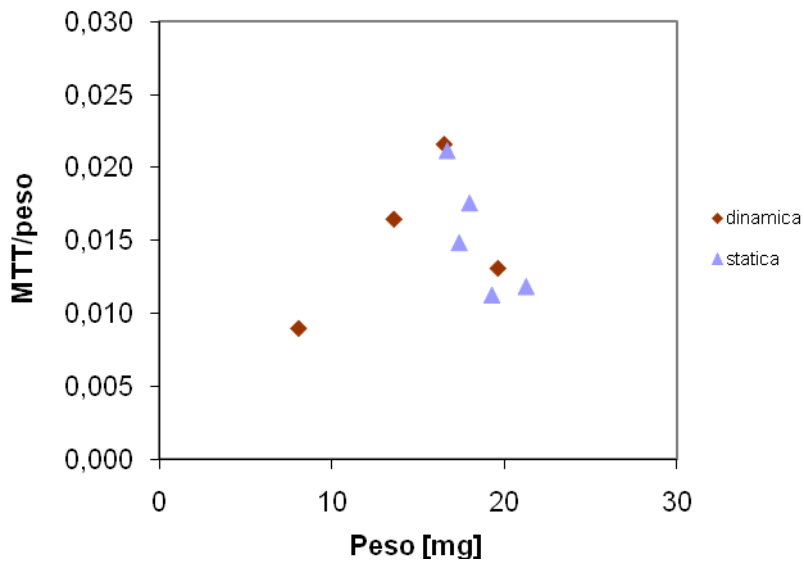
- Prova:
 - Statica
 - Durata esperimento: 2 giorni
- Medium:
 - LG
 - Volume impiegato: 800 μ l per pozzetto
 - Insulina: 0-20-100 nM
- Tessuto Adiposo:
 - Viscerale

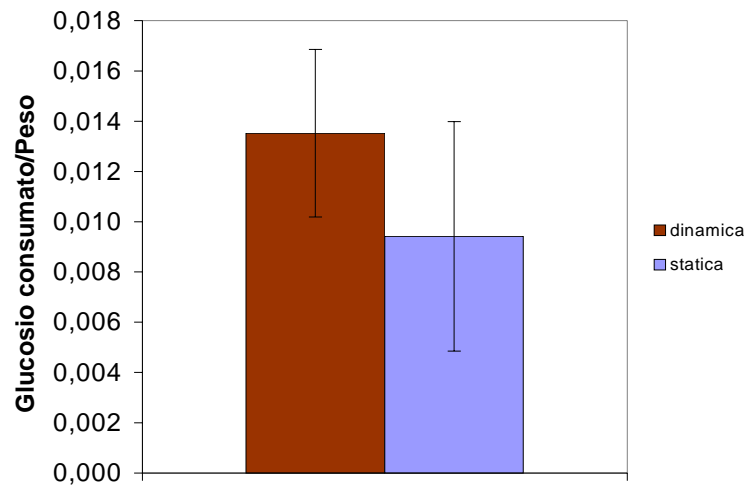
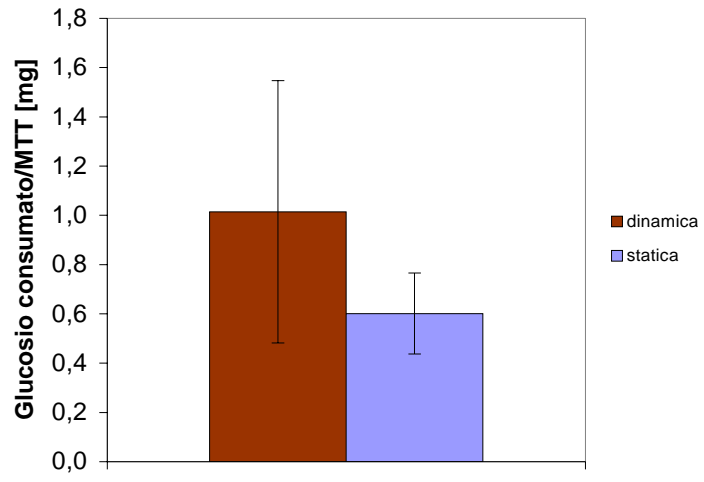




Biopsia	<i>Data biopsia</i>	<i>Diabetico</i>	<i>Età</i>	<i>Sesso</i>	<i>BMI</i>
N° 5	15 Marzo 2010	<i>NO</i>	<i>61</i>	<i>F</i>	<i>39.7</i>

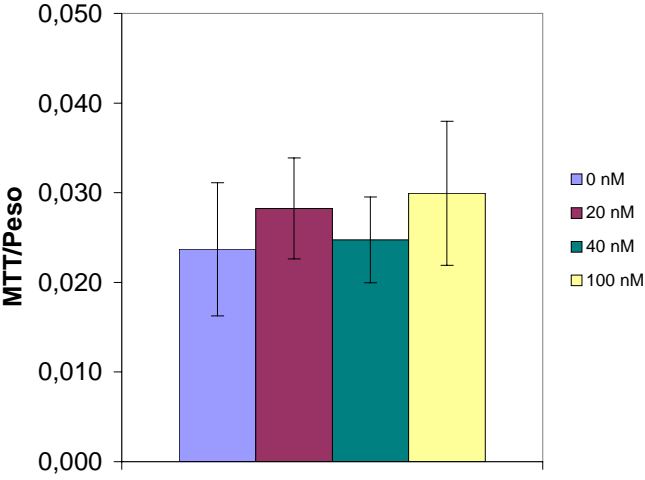
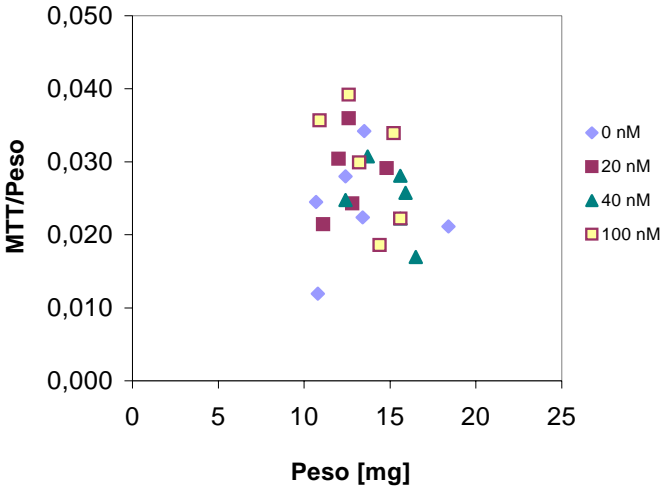
- Prova:
 - Statica + Mini-bioreattore
 - Durata esperimento: 2 giorni
- Medium:
 - LG
 - Volume impiegato: 800 µl per pozzetto / portata negli holder 16.7 µl/h
 - Insulina: NO
- Tessuto Adiposo:
 - Viscerale

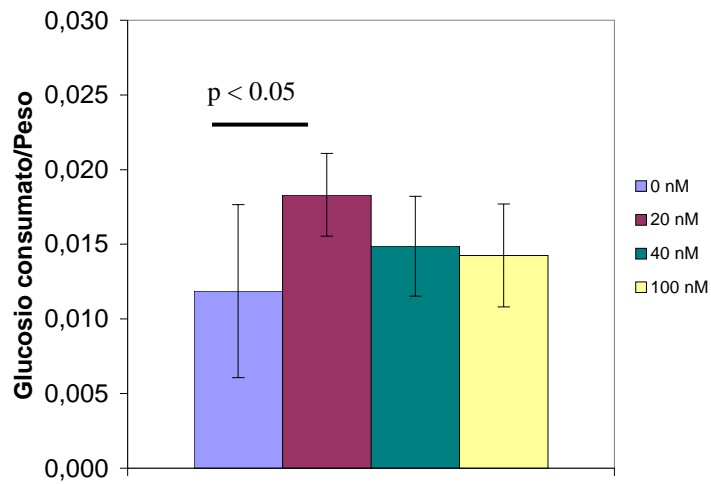
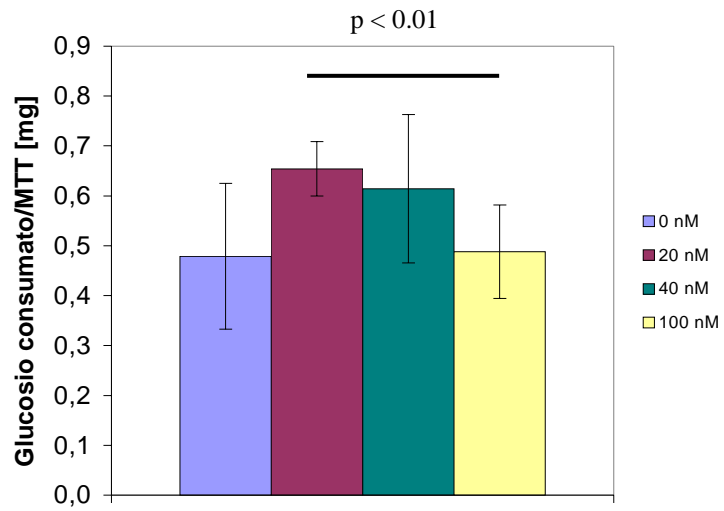




Biopsia	<i>Data biopsia</i>	<i>Diabetico</i>	<i>Età</i>	<i>Sesso</i>	<i>BMI</i>
N° 6	15 Marzo 2010	SI	/	/	/

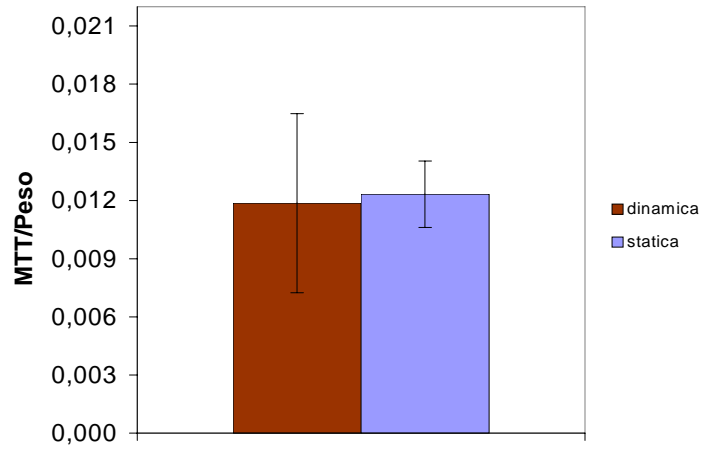
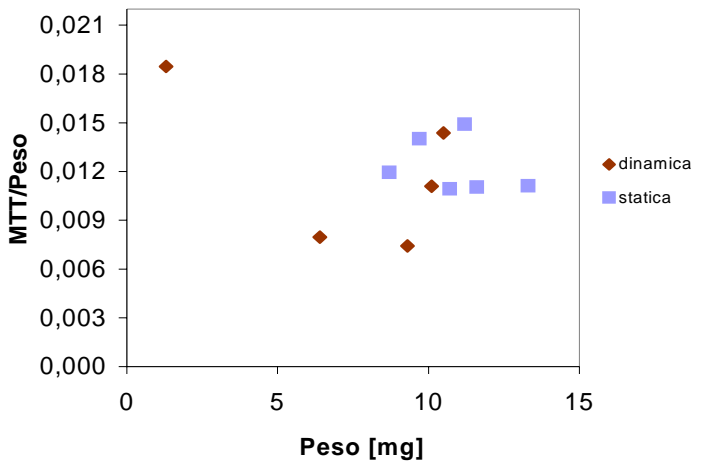
- Prova:
 - Statica
 - Durata esperimento: 2 giorni
- Medium:
 - LG
 - Volume impiegato: 800 µl per pozzetto
 - Insulina: 0-20-40-100 nM
- Tessuto Adiposo:
 - Viscerale

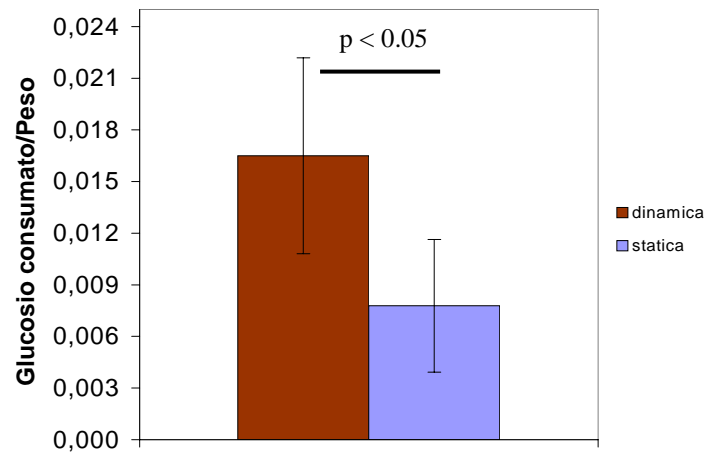
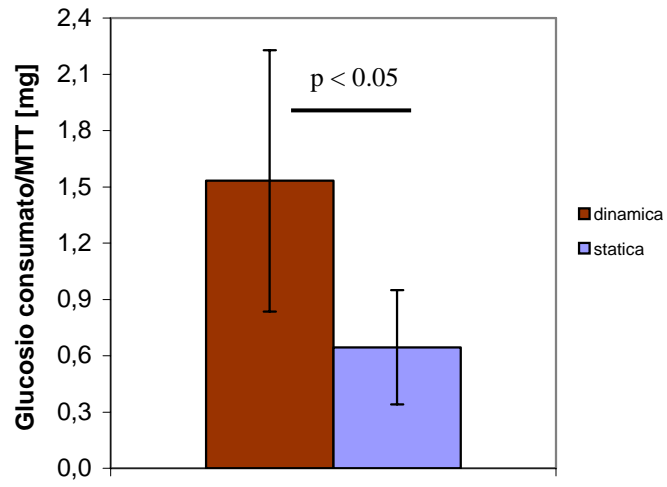




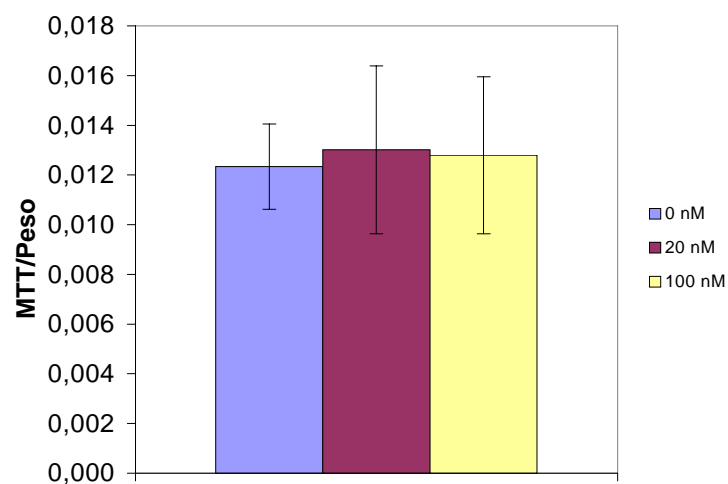
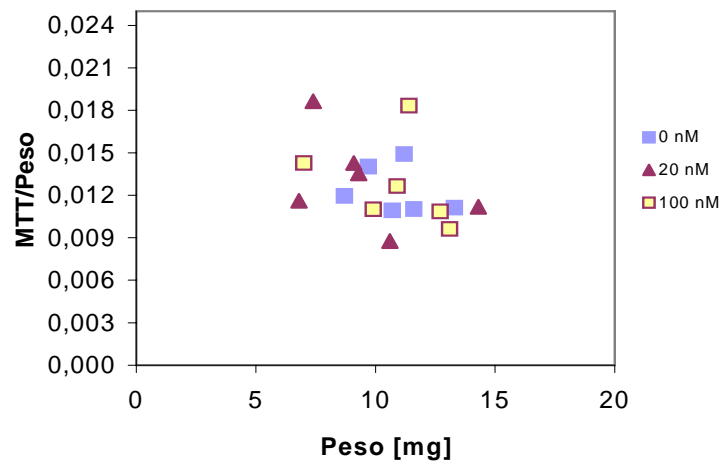
Biopsia	<i>Data biopsia</i>	<i>Diabetico</i>	<i>Età</i>	<i>Sesso</i>	<i>BMI</i>
N° 7	22 Marzo 2010	<i>SI</i>	38	<i>M</i>	/

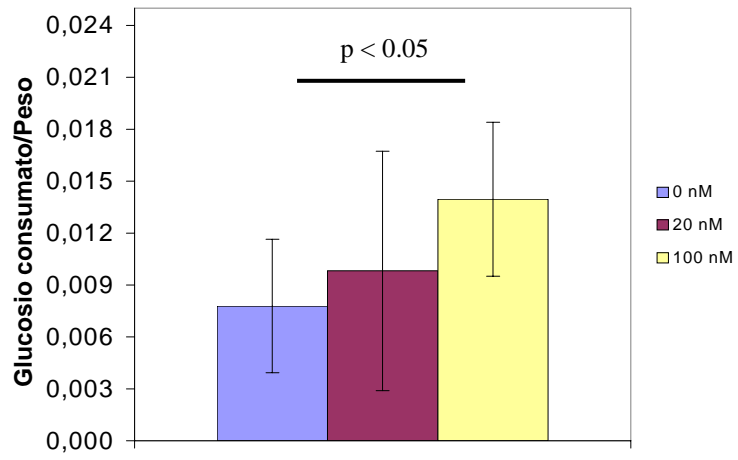
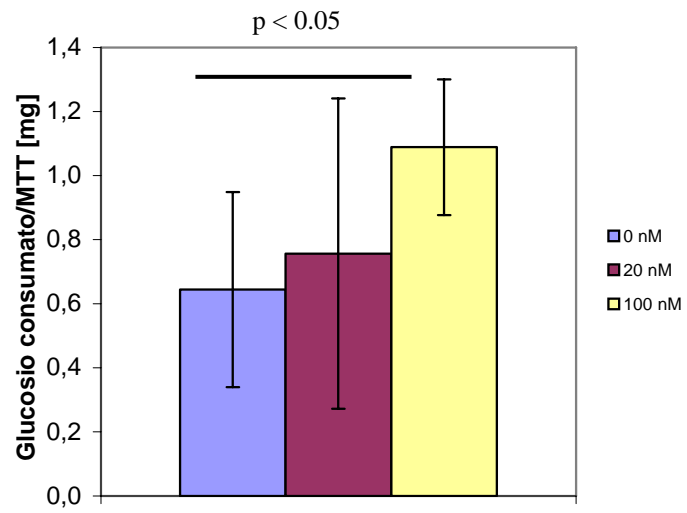
- Prova:
 - Statica + Mini-bioreattore
 - Durata esperimento: 2 giorni
- Medium:
 - LG
 - Volume impiegato: 800 µl per pozzetto / portata negli holder 16.7 µl/h
 - Insulina: NO
- Tessuto Adiposo:
 - Viscerale



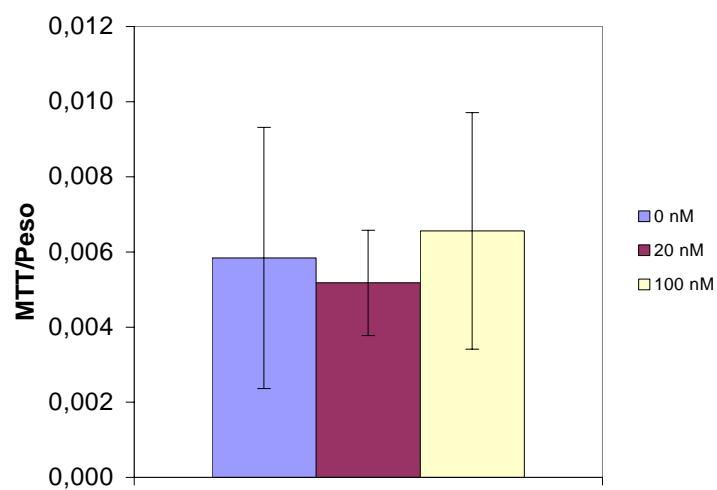
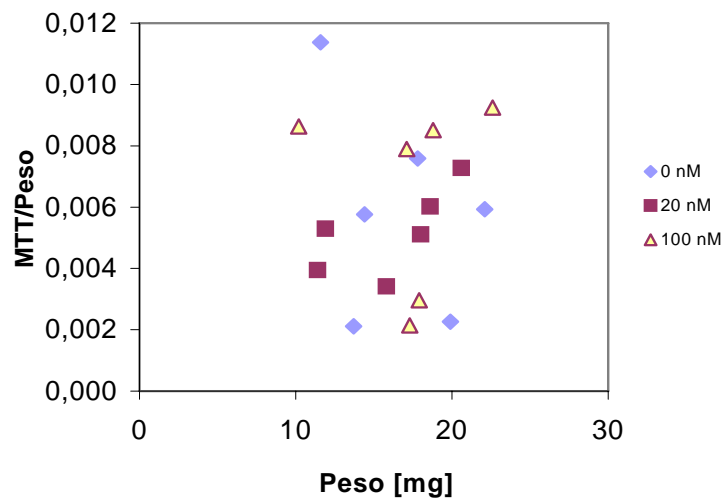


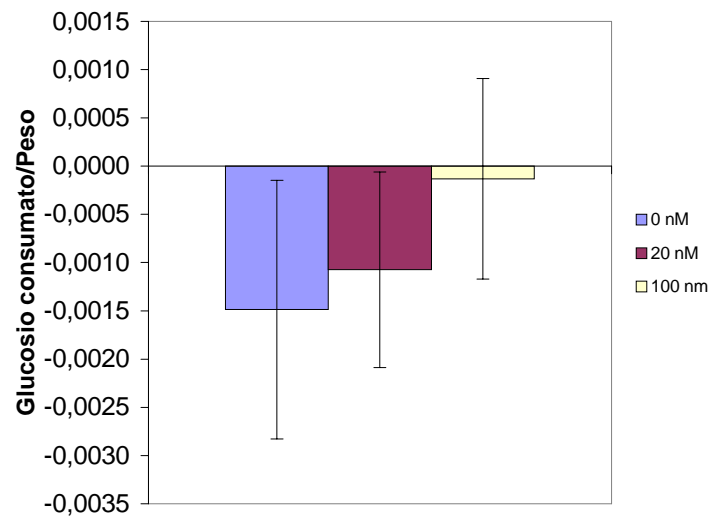
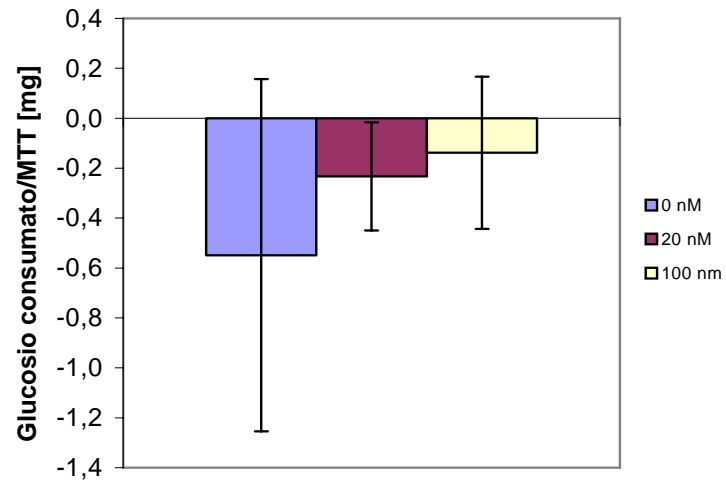
- Prova:
 - Statica
 - Durata esperimento: 2 giorni
- Medium:
 - LG
 - Volume impiegato: 800 µl per pozzetto
 - Insulina: 0-20-100 nM
- Tessuto Adiposo:
 - Viscerale





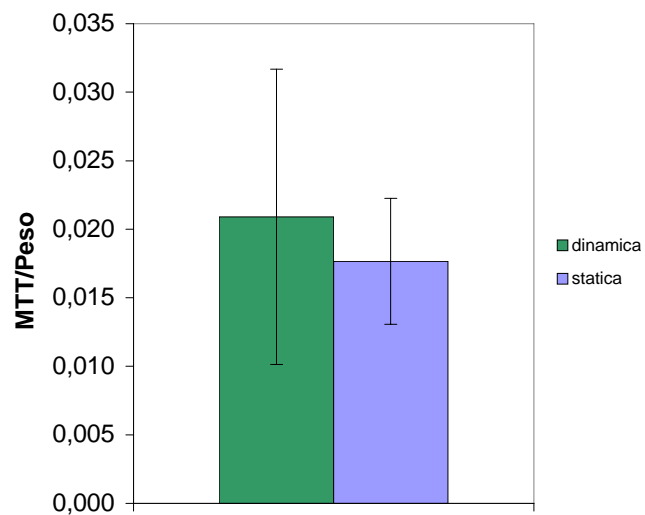
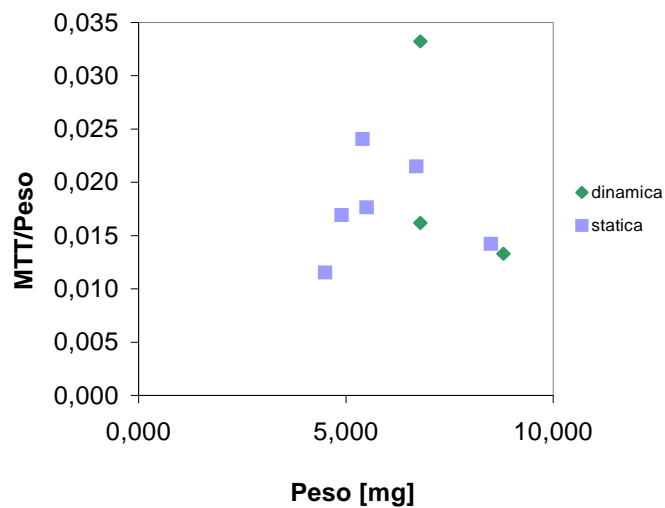
- Prova:
 - Statica
 - Durata esperimento: 1 giorno
- Medium:
 - LG
 - Volume impiegato: 400 μ l per pozzetto
 - Insulina: 0-20-100 nM
- Tessuto Adiposo:
 - Viscerale

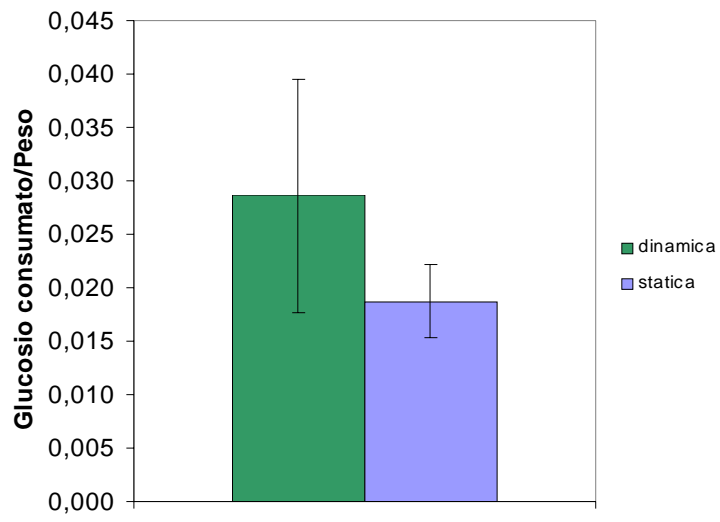
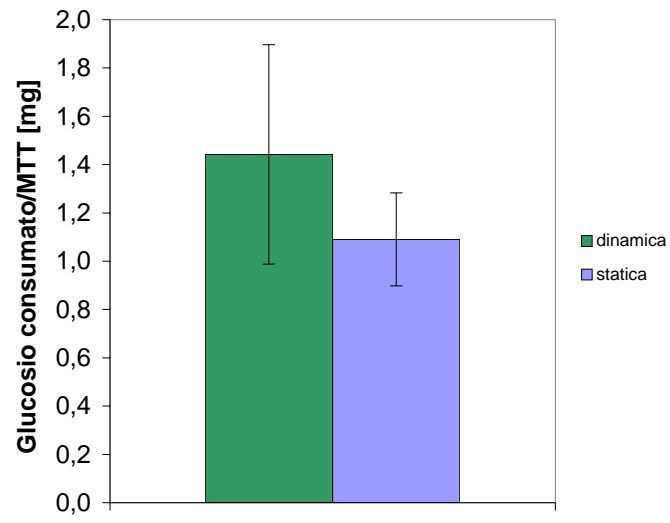




Biopsia	<i>Data biopsia</i>	<i>Diabetico</i>	<i>Età</i>	<i>Sesso</i>	<i>BMI</i>
N° 8	21 Aprile 2010	NO	44	F	64

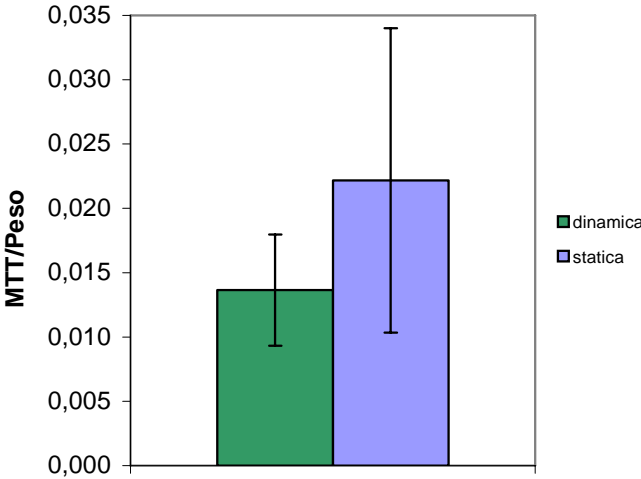
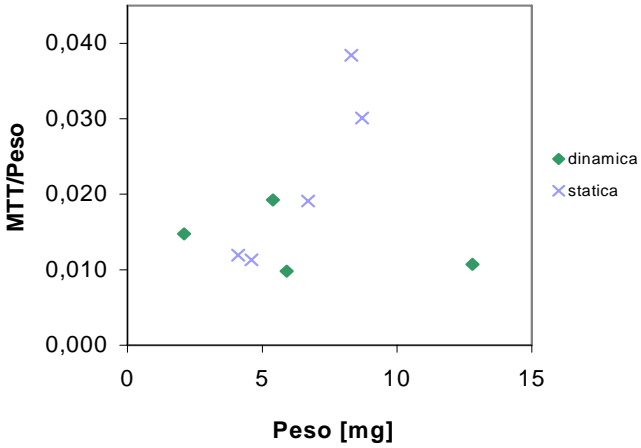
- Prova:
 - Statica + Micro-bioreattore
 - Durata esperimento: 2 giorni
- Medium:
 - LG
 - Volume impiegato: 800 µl per pozzetto / portata 16.7 µl/h
 - Insulina: NO
- Tessuto Adiposo:
 - Viscerale

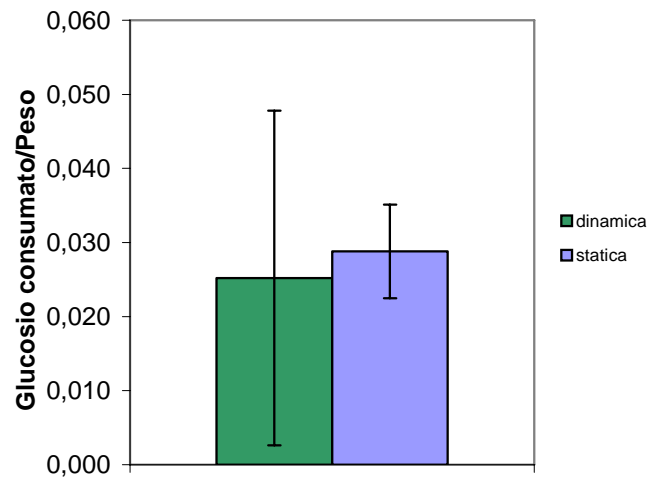
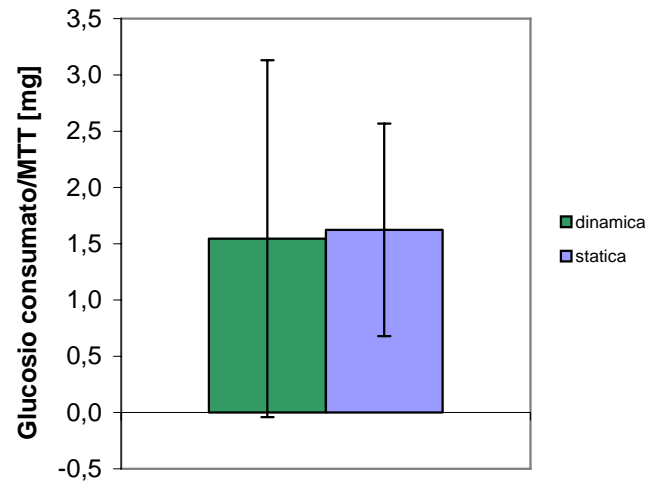




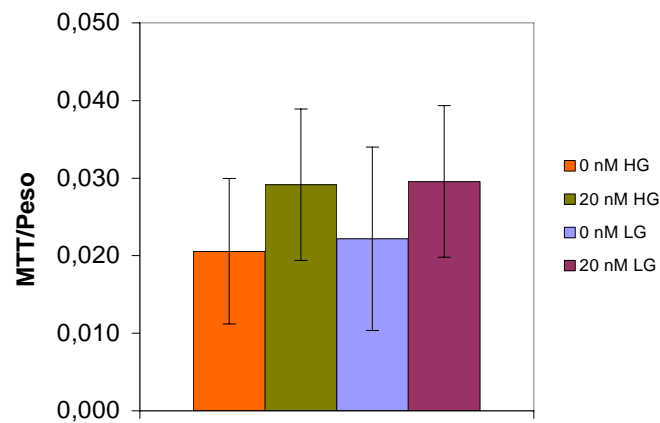
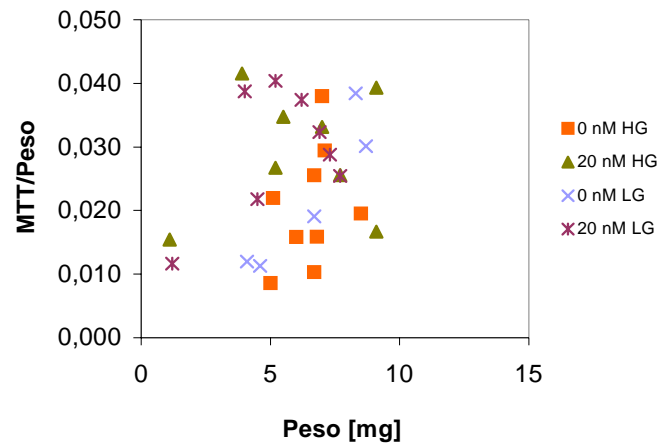
Biopsia	<i>Data biopsia</i>	<i>Diabetico</i>	<i>Età</i>	<i>Sesso</i>	<i>BMI</i>
N° 9	26 Aprile 2010	/	/	<i>M</i>	/

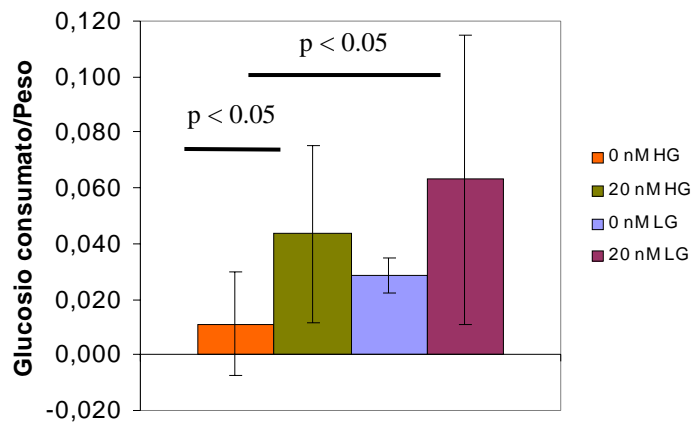
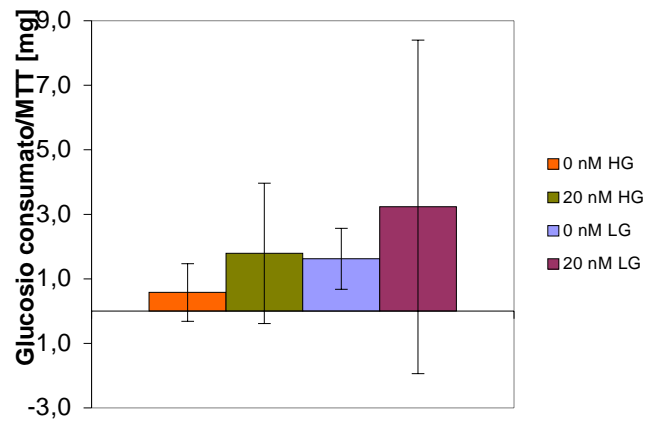
- Prova:
 - Statica + Micro-bioreattore
 - Durata esperimento: 3 giorni
- Medium:
 - LG
 - Volume impiegato: 800 µl per pozzetto / portata 16.7 µl/h
 - Insulina: NO
- Tessuto Adiposo:
 - Viscerale



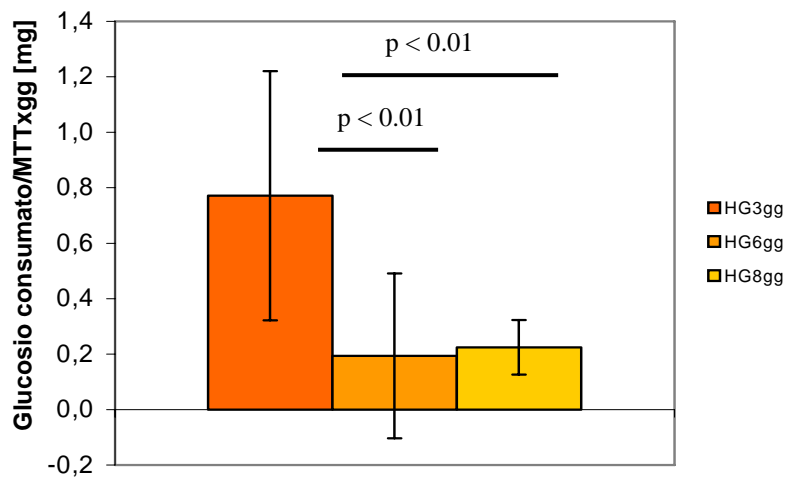
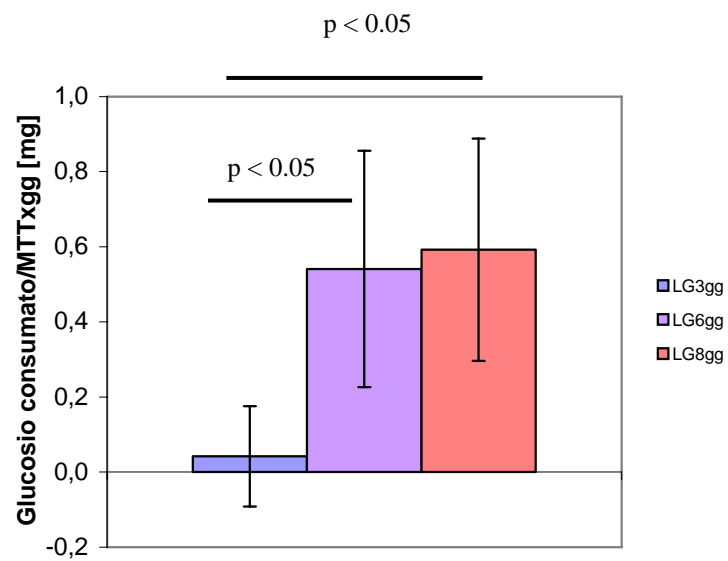


- Prova:
 - Statica
 - Durata esperimento: 3 giorni
- Medium:
 - LG + HG
 - Volume impiegato: 800 μ l per pozzetto
 - Insulina: 0-20 nM
- Tessuto Adiposo:
 - Viscerale



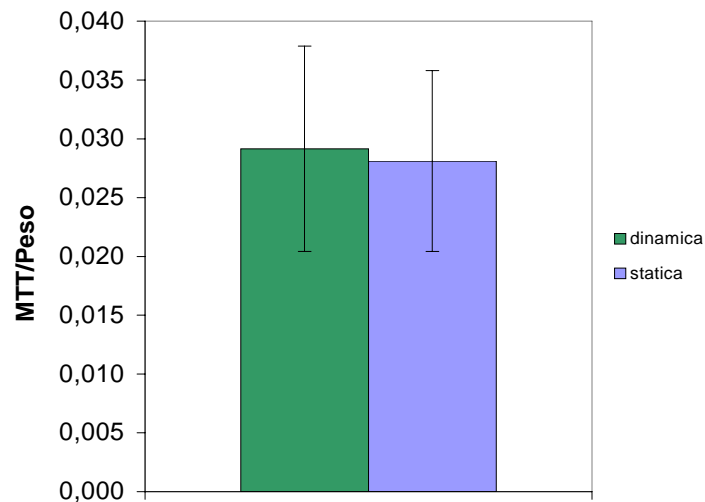
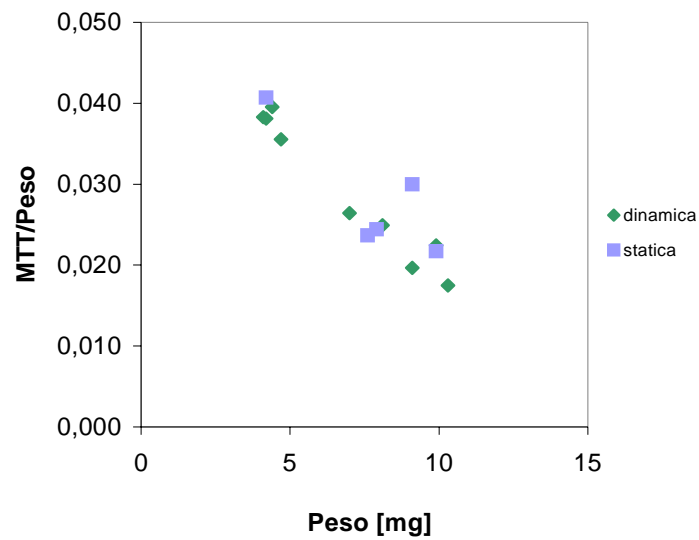


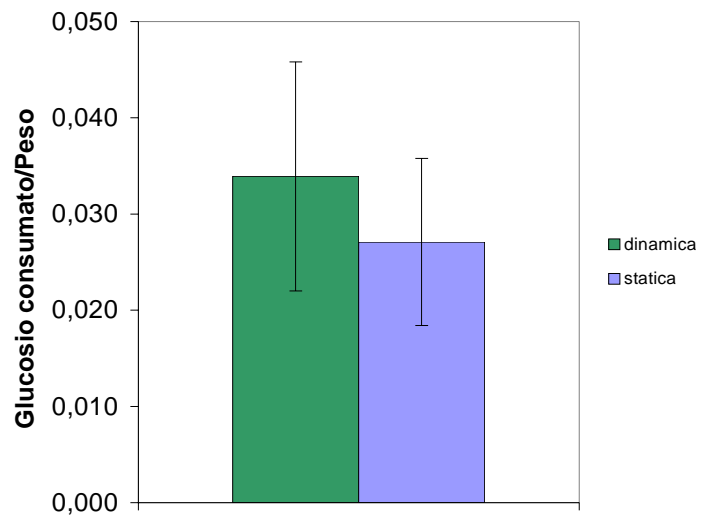
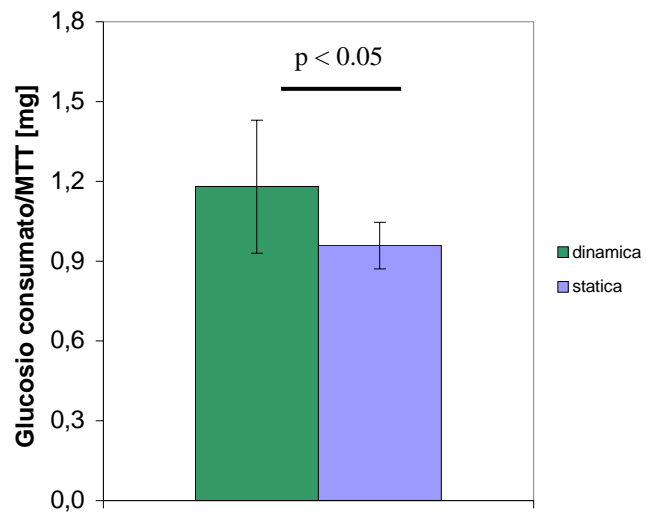
- Prova:
 - Statica
 - Durata esperimento: 3 giorni + 3 giorni + 2 giorni
- Medium:
 - LG + HG
 - Volume impiegato: 800 µl per pozzetto
 - Insulina: NO
- Tessuto Adiposo:
 - Viscerale



Biopsia	<i>Data biopsia</i>	<i>Diabetico</i>	<i>Età</i>	<i>Sesso</i>	<i>BMI</i>
N° 10	4 Maggio 2010	<i>NO</i>	47	<i>M</i>	49

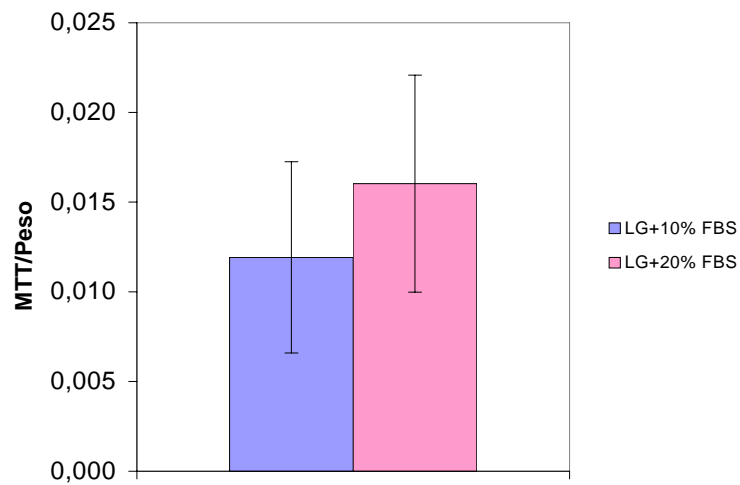
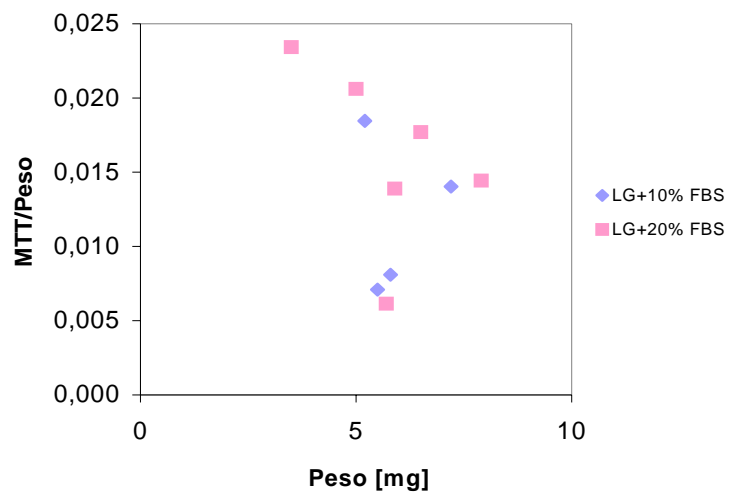
- Prova:
 - Statica + Micro-bioreattore
 - Durata esperimento: 2 giorni
- Medium:
 - LG
 - Volume impiegato: 800 µl per pozzetto / portata 16.7 µl/h
 - Insulina: NO
- Tessuto Adiposo:
 - Viscerale





Biopsia	Data biopsia	Diabetico	Età	Sesso	BMI
N° 11	16 Giugno 2010	NO	/	/	/

- Prova:
 - Statica
 - Durata esperimento: 2 giorni
- Medium:
 - LG 10% FBS / LG 20% FBS
 - Volume impiegato: 800 µl per pozzetto
 - Insulina: NO
- Tessuto Adiposo:
 - Viscerale



	Data	Statica					Dinamica		
		<i>0nM</i>	<i>20nM</i>	<i>40nM</i>	<i>100nM</i>	<i>200nM</i>	<i>Macro</i>	<i>Mini</i>	<i>Micro</i>
Biopsia N°1	20/01/2010	x	x		x	x			
Biopsia N°2	02/02/2010	x					x		
Biopsia N°3	17/02/2010	x	x		x				
Biopsia N°4	26/02/2010	x	x		x			x	
Biopsia N°5	15/03/2010	x						x	
Biopsia N°6	15/03/2010	x	x	x	x				
Biopsia N°7	22/03/2010	x	x		x			x	
Biopsia N°8	21/04/2010	x							x
Biopsia N°9	26/04/2010	x	x						x
Biopsia N°10	04/05/2010	x							x
Biopsia N°11	16/06/2010	x							

Bibliografia

Angel Josabad A., Luis A. S. The anti-diabetic properties of *Guazuma ulmifolia* Lam are mediated by the stimulation of glucose uptake in normal and diabetic adipocytes without inducing adipogenesis. *Journal of Ethnopharmacology*, 2008, 118:252-256

Antuna-Puente B., Feve B. Adipokines: The missing link between insulin resistance and obesity. *Diabetes and Metabolism*, 2008, 34:2-11

Dietze D., Koenen M., Rohring K., Horikoshi H., Hauner H., Eckel J. Impairment of Insulin Signaling in Human Skeletal Muscle Cells by Co-Culture With Human Adipocytes. *Diabetes*, 2002, 51:2369-2376

Domansky K., Inman W., Serdy J., Dash A., Lim M., Griffith L. Perfused multiwell plate for 3D liver tissue engineering. *The Royal Society of Chemistry*, 2010, 10:51-58

Fischbach C., Seufert J., Staiger H., Hacker M., Neubauer M., Gopferich A., Blunk T. Three-Dimensional *in Vitro* Model Adipogenesis: Comparison of Culture Conditions. *Tissue Engineering*, 2004, 10:215-229

Hayata K., Sakano K., Nishinaka S. Establishment of New Highly Insulin-Sensitive Cell Lines and Screening of Compounds to Facilitate Glucose Consumption. *J Pharmacol Sci*, 2008, 108:348-354

Kokta T.A., Dodson M.V., Gertler A., Hill R.A. Intercellular signaling between adipose tissue and muscle tissue. *Domestic Animal Endocrinology*, 2004, 27:303-331

Mlinar B., Marc J., Janez A., Pfeifer M. Molecular mechanisms of insulin resistance and associated diseases. *Clinica Chimica Acta*, 2007, 375:20-35

Motoshima H., Wu X., Sinha M., Elise Hardy V., Rosato E., Barbot D., Rosato F., Goldstein B. Differential Regulation of Adiponectin Secretion from Cultured Human Omental and Subcutaneous Adipocytes: Effects of Insulin and Rosiglitazone. *Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2002, 87:5662-5667

Peng L., Chen L., Dong L., Junbo L., Nailong Y, Yu S., Yuxin X., Yiling F., Xinguo H. Adiponectin Reduces Glucotoxicity-Induced Apoptosis of INS-1 Rat Insulin-Secreting Cells on a Microfluidic Chip. *Tohoku J. Exp. Med.*, 2009, 217:59-65

Renstrom F., Buren J., Svensson M., Eriksson J. Insulin resistance induced by high glucose and high insulin precedes insulin receptor substrate 1 protein depletion in human adipocytes. *Metabolism Clinical and Experimental*, 2007, 56:190-198

Sell H., Dietze-Schroeder D., Eckel J. The adipocyte-myocyte axis in insulin resistance. *Endocrinology and Metabolism*, 2006, 10(17):416-422

Sell H., Eckardt K., Taube A., Tews D., Gurgui M., Echten-Deckert G., Eckel J. Skeletal muscle insulin resistance induced by adipocyte-conditioned medium. *Physiol Endocrinol Metab*, 2008, 294:1070-1077

Trayhurn P., Wang B., Wood I. Hypoxia in adipose tissue: a basis for the dysregulation of tissue function in obesity? *British Journal of Nutrition*, 2008, 100:227-235

Van de Venter M., Roux S., Bungu L., Louw J., Crouch N., Grace O., Maharaj V., Pillay P., Sewnarian P., Bhagwandin N., Folb P. Antidiabetic screening and scoring of 11 plants traditionally used in South Africa. *Journal of Ethnopharmacology*, 2008, 119:81-86

Faglia G., Beck-Peccoz P. (1993). Malattie del sistema endocrino e del metabolismo. *McGraw-Hill*

Sbalchiero E. (2005). Progettazione ed allestimento di un bioreattore a perfusione per l'espansione di colture cellulari su scaffold tridimensionali. *Tesi di laurea in ingegneria chimica*, DIPIC, Università di Padova