

POLITECNICO DI TORINO



Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica

Membrane nanofibrose a base di collagene ottenute per elettrofilatura e loro applicazione nell'ingegneria tissutale e nella realizzazione di modelli d'organo *in vitro*

Relatore

Prof. Gianluca Ciardelli

Candidato

Laura Sini

Correlatore

Prof.ssa Chiara Tonda-Turo

Dott.ssa Michela Licciardello

Anno Accademico 2018/2019

INDICE

I. INTRODUZIONE	1
1. INGEGNERIA TISSUTALE.....	1
1.1 Matrice extracellulare: caratteristiche e composizione	3
1.2 Scaffold per ingegneria tissutale	4
<i>1.2.1 Proprietà dello scaffold</i>	4
1.3 Materiali per lo scaffold	5
<i>1.3.2 Degradazione dei polimeri</i>	7
<i>1.3.3 Polimeri sintetici</i>	8
<i>1.3.4 Polimeri naturali</i>	9
<i>1.3.5 Collagene</i>	10
1.4 Electrospinning	13
<i>1.4.1 Scaffold nanofibrosi</i>	13
<i>1.4.2 Strumentazione e fisica del processo di elettrofilatura</i>	14
<i>1.4.3 Parametri che influenzano il processo dell'electrospinning</i>	16
<i>1.4.4 Difetti di filatura</i>	18
1.5 Membrane elettrofilate in collagene	19
<i>1.5.1 Effetto dei solventi</i>	19
<i>1.5.2 Metodi di reticolazione</i>	20
<i>1.5.3 Nanofibre composite a base di collagene</i>	21
2. SCOPO DEL LAVORO.....	22
II. MATERIALI E METODI	23
1. MATERIALI.....	23
1.1 Collagene di tipo I	23
1.2 Polietilenossido (PEO)	24
1.3 Fosfato di sodio dibasico (DSP)	25

1.4 γ-glicidossipropiltrimetossisilano (GPTMS)	25
1.5 <i>Rose bengal</i>	26
2. METODI	28
2.1 Ottimizzazione della soluzione	28
2.1.1 <i>Preparazione delle soluzioni polimeriche</i>	29
2.1.1.1 <i>Preparazione delle soluzioni polimeriche con <i>Rose bengal</i></i>	29
2.2 Realizzazione delle membrane	30
2.2.1.1 <i>Preparazione delle membrane nanofibrose</i>	32
2.3 Caratterizzazione morfologica delle membrane	32
2.3.1 <i>Microscopia a scansione elettronica (SEM)</i>	32
2.2.3 <i>Analisi delle immagini</i>	34
2.3 Caratterizzazione chimico/fisica	35
2.3.1 <i>Spettroscopia infrarossa FTIR-ATR</i>	35
2.4 Analisi termica	36
2.4.1 <i>Calorimetria differenziale a scansione (DSC)</i>	36
2.5 Prove di degradazione	37
2.6 Prove meccaniche	39
2.7 Bioreattore IVTech	40
2.8 Prove cellulari	42
III. RISULTATI E DISCUSSIONE	44
1.1 Ottimizzazione dei parametri	44
2.2 Caratterizzazione morfologica	47
2.3 Prove di degradazione	53
2.4 Bioreattore IVTech	55
2.5 Prove meccaniche	56
2.6 Caratterizzazione chimico/fisica	57
2.7 Calorimetria differenziale a scansione (DSC)	58
IV. CONCLUSIONI	60

ABSTRACT

Tissue engineering is a multidisciplinary field that aims at replacing and restoring biological tissues to preserve or improve their functionality. Certainly, scaffold represents the most important element of tissue engineering, as it can mimic the ECM by providing three-dimensional environment that supports cell attachment and growth. One of the main components of ECM is collagen, a structural protein that presents a rather complex hierarchical structure. Collagen is a biodegradable, biocompatible and non-immunogenic material, which makes it suitable for various biomedical applications.

The aim of this work involves the fabrication by electrospinning and the characterization of nanofibrous collagen type I/ polyethylenoxide (COLL/PEO) membranes, able to reproduce the basement membrane of the pulmonary alveolus. Solution and electrospinning parameters were optimized in order to obtain defect-free nanofibers. For this purpose, effects of DSP, GPTMS and rose bengal as collagen crosslinkers were evaluated, by testing different combinations of the agents in solution. The fibres morphology was characterized by electronic scanning microscopy (SEM) and membrane stability in water was analysed both in static and dynamic conditions, using a bioreactor resembling the physiological conditions of the blood-air barrier. Furthermore mechanical tests were performed to evaluate membrane Young module and a chemical characterisation by FTIR-ATR and DSC was carried out to analyse the triple helical structure of collagen. Preliminary cellular tests with fibroblasts (3T3) were also done to assess cell viability.

I. INTRODUZIONE

1. INGEGNERIA TISSUTALE

L'ingegneria tissutale (Tissue engineering) è un settore di ricerca multidisciplinare nato, all'inizio degli anni 90, dall'esigenza di trovare una valida alternativa terapeutica per sopperire ai limiti di alcuni approcci utilizzati in medicina per la cura di tessuti e organi danneggiati, come l'autotrapianto, l'allograpianto e gli impianti protesici [1]. Queste tecniche infatti presentano diverse criticità: nel caso dell'autotrapianto il problema risulta la scarsa disponibilità di tessuti; mentre negli altri due casi il problema fondamentale è il possibile rigetto dell'impianto dovuto ad una risposta immunitaria che si potrebbe innescare se l'organismo considera l'innesto come estraneo. Quest'ultima problematica viene risolta dall'ingegneria tissutale grazie all'utilizzo di cellule autologhe [2].

L'ingegneria dei tessuti venne definita nel 1993 da Langer e Vacanti come “un campo interdisciplinare che applica i principi dell'ingegneria e delle scienze della vita per la realizzazione di sostituti biologici che ripristinino, mantengano o migliorino le funzioni originali di tessuti o organi” [3].

Questa nuova disciplina favorisce quindi la rigenerazione dei tessuti avvalendosi di tre elementi fondamentali [4]:

- **Lo scaffold**, substrato tridimensionale che mima la matrice extracellulare (ECM) favorendo l'adesione, la proliferazione e differenziamento cellulare;
- **Le cellule**, che colonizzano lo scaffold e variano in base all'applicazione;
- **I fattori di segnalazione**, molecole solubili presenti in natura nella ECM che rendono lo scaffold biomimetico;

Gli elementi sopracitati possono essere utilizzati per l'ingegnerizzazione dei tessuti secondo approcci di tissue engineering in *vitro* o in *vivo*.

In entrambe le strategie le cellule autologhe giocano un ruolo fondamentale, principalmente vengono utilizzate:

- **Cellule di linea**, sono cellule differenziate che subiscono delle mutazioni geniche in modo da proliferare indefinitamente;
- **Cellule primarie**, sono cellule differenziate molto delicate che vanno in contro a senescenza, hanno una proliferazione limitata;

- **Cellule staminali**, sono cellule indifferenziate presenti in tutti gli organismi viventi. Si distinguono dalle altre cellule essenzialmente per la capacità di autorinnovarsi e per l'elevato potenziale differenziativo che, sotto particolari condizioni, gli permette di dare origine a tipi cellulari specializzati e a nuovi tessuti [5].

Come mostrato in fig.1 nella primissima fase di ogni approccio di ingegneria tissutale le cellule vengono prelevate in piccolissime quantità dal paziente mediante biopsia, isolate e fatte espandere.

Nel caso di una soluzione *in vitro* la matrice di supporto (*scaffold*) viene prima seminata con le cellule, segue poi una fase di coltura o di tipo statico, nel caso in cui il costrutto non venga sottoposto ad alcuno stimolo esterno, o di tipo dinamico, che prevede l'impiego di un bioreattore. Questo primo approccio viene utilizzato sia per realizzare tessuti in laboratorio che in un secondo momento verranno impiantati sul paziente, sia per la creazione di modelli di organi, impiegati principalmente per valutare l'evoluzione di una determinata patologia e per lo screening dei farmaci. Nel caso invece di tissue engineering *in vivo* lo scaffold può essere seminato con le cellule e poi successivamente impiantato nel corpo, oppure direttamente impiantato privo di cellule in modo da reclutarle *in vivo* [6].

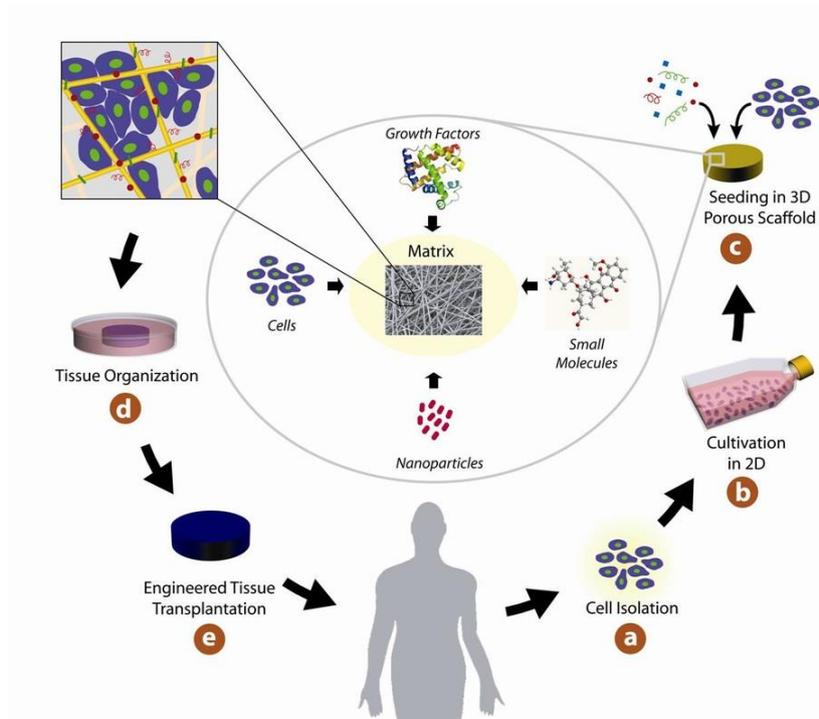


Figura 1: Illustrazione schematica di un tipico approccio di ingegneria tissutale.

1.1 Matrice extracellulare: caratteristiche e composizione

Tutti i tessuti e gli organi sono costituiti da cellule ma una parte rilevante del loro volume è occupata da un reticolo tridimensionale estremamente organizzato detto **matrice extracellulare (ECM)**. La composizione e la struttura della ECM variano a seconda del tessuto di appartenenza e inevitabilmente ne influenzano le proprietà fisiche e chimiche. La ECM non ha unicamente una funzione di supporto passivo per le cellule, come erroneamente si credeva un tempo; essa è **bioattiva**, ciò vuol dire che comunica con le cellule e lo fa grazie a specifici recettori, prevalentemente integrine, attraverso le quali modula le funzioni cellulari. Le interazioni cellula-ECM influenzano la risposta cellulare in termini di sopravvivenza, adesione, spread, proliferazione, differenziamento e omeostasi [7]. Il rapporto tra le cellule e il substrato è dunque bidirezionale: la cellula percepisce un segnale fisiologico dall'ECM e in risposta modifica la sua morfologia.

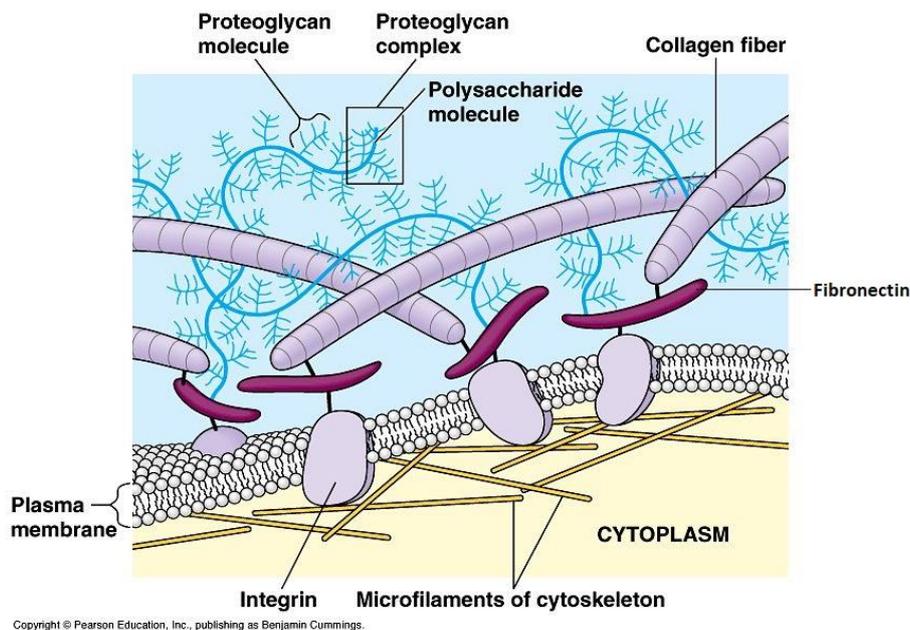


Figura 2: Composizione matrice extracellulare

La matrice extracellulare è composta da due classi principali di macromolecole secrete dalle cellule: i proteoglicani e le proteine fibrose. I proteoglicani, catene di eteropolisaccaridi legati covalentemente ad una proteina, sono macromolecole idrofiliche che mantengono l'ambiente extracellulare idratato. I proteoglicani formano gel con dimensioni dei pori e densità di carica variabili, possono quindi servire da setaccio selettivo per regolare il passaggio di cellule e di molecole in base alla carica e alle dimensioni di queste [8]. Le

proteine fibrose si dividono in proteine strutturali (collagene e elastina) e proteine adesive (laminina e fibronectina). Le fibre di collagene rinforzano l'ECM e le conferiscono una buona resistenza meccanica a trazione. L'elastina le assicura elasticità, infatti è abbondante in tutti quei tessuti che hanno la necessità di contrarsi in maniera ciclica. Infine le proteine adesive promuovono l'ancoraggio delle cellule sulla matrice [9].

1.2 Scaffold per ingegneria tissutale

Come già accennato un elemento fondamentale per gli approcci di ingegneria tissutale è lo *scaffold*. Il suo ruolo è quello fungere da template tridimensionale, che sostituisca temporaneamente la ECM, per guidare la crescita cellulare e la rigenerazione del tessuto. Un punto focale nella progettazione dello scaffold è riuscire a mimare le caratteristiche della ECM di un particolare tessuto. Uno scaffold biomimetico ideale infatti dovrebbe indurre l'adesione di cellule specifiche, favorirne la crescita e preservarne le funzionalità.

1.2.1 Proprietà dello scaffold

Indipendentemente dal tipo di tessuto che si vuole rigenerare, quando si progetta uno scaffold è importante considerare alcune peculiarità che il costruito deve avere:

- **Biocompatibilità:** si riferisce alla capacità di un materiale ad essere ben tollerato dall'organismo. Lo scaffold deve rappresentare un substrato favorevole per le cellule e garantirne una corretta attività cellulare senza innescare alcuna reazione immunitaria, locale o sistemica [10].
- **Composizione chimica:** deve essere simile a quella della matrice extracellulare. Nel caso in cui si utilizzino polimeri sintetici lo scaffold viene in genere funzionalizzato con proteine adesive o sequenze peptidiche in modo da facilitare l'adesione cellulare, lo spreading e la proliferazione.
- **Porosità:** il grado di porosità e la dimensione dei pori sono dei parametri fondamentali in uno scaffold. Pori con dimensioni superiori ai 300 μm aumentano il livello di vascolarizzazione; mentre porosità intorno ai 50 μm favoriscono la colonizzazione dello scaffold e la migrazione cellulare. In generale un'elevata porosità (90%) promuove oltre alla colonizzazione dello scaffold la diffusione dei nutrienti e l'eliminazione dei prodotti di scarto ma, allo stesso tempo, ne riduce le

proprietà meccaniche [11]. L'interconnessione dei pori è un altro aspetto importante; idealmente si vorrebbe progettare uno scaffold con il 100% dei pori interconnessi in modo da supportare sia la migrazione cellulare che l'infiltrazione della ECM del tessuto desiderato [10].

- **Biodegradabilità:** gli scaffold non sono degli impianti permanenti, ma devono essere biodegradabili in modo che sia favorita la formazione di nuova ECM. La cinetica di degradazione dello scaffold deve coincidere con la velocità di formazione del nuovo tessuto. In aggiunta i prodotti di degradazione non devono essere tossici e dovrebbero essere eliminati dal corpo senza interferire con gli altri organi.
- **Proprietà meccaniche:** qualsiasi scaffold deve fornire una rigidità e una resistenza meccanica simili a quelle del tessuto originale in modo da garantire una certa integrità in vivo. Molti scaffold sono stati prodotti in modo da avere delle buone proprietà meccaniche a discapito della porosità; tali substrati hanno dimostrato un buon potenziale *in vitro* ma hanno fallito *in vivo*, a causa della scarsa angiogenesi. È quindi chiaro che per avere uno scaffold ottimale è necessario trovare il giusto equilibrio tra le proprietà meccaniche e la porosità in modo da garantire la colonizzazione da parte delle cellule e una certa vascolarizzazione del tessuto [2].

1.3 Materiali per lo scaffold

Per oltre due decenni, i progressi nella scienza dei polimeri e nell'ingegneria dei tessuti hanno spianato la strada alla generazione di biomateriali all'avanguardia per ottimizzare i trattamenti clinici esistenti e sviluppare cure più sicure ed efficaci per una migliore qualità della vita umana [12]. Nell'ambito dell'ingegneria tissutale per la fabbricazione di scaffold si adoperano principalmente *polimeri naturali*, *polimeri sintetici* e *materiali ceramici*. Ognuno di questi materiali presenta vantaggi e svantaggi, sta diventando quindi sempre più comune l'uso di materiali *compositi*, ossia materiali composti da due o più fasi le cui proprietà complessive sono superiori a quelle dei materiali che costituiscono le singole fasi.

1.3.1 *Materiali polimerici*

I polimeri sono una classe di materiali ampiamente utilizzata nel *tissue engineering*. Si contraddistinguono dalle altre classi di biomateriali per l'ampia scelta dei materiali aventi proprietà chimico-fisiche diverse, per la processabilità e per la possibilità di funzionalizzarli superficialmente attraverso varie tecniche. I polimeri sono macromolecole costituite da un gran numero di unità ripetitive uguali, dette monomeri, unite tra loro da legami chimici in modo da formare strutture lineari, ramificate o reticolate ad alto peso molecolare.

I polimeri utilizzati per la fabbricazione di scaffold devono necessariamente essere degradabili. In base al comportamento che assumono in relazione alla degradazione, distinguiamo:

- ***Polimeri biostabili***, materiali che una volta impiantati non degradano e conservano le loro proprietà inalterate nel tempo;
- ***Polimeri bioinerti***, materiali che hanno interazioni minime con l'ambiente circostante, quindi non degradano. In termini di comunicazione tra la cellula e il biomateriale, quest'ultimo non ha alcuna capacità di stimolare le funzionalità cellulari;
- ***Polimeri biorisorbibili***, materiali che subiscono una progressiva degradazione in vivo, i cui prodotti di degradazione vengono rimossi o metabolizzati dalla cellula senza che vi siano effetti tossici. I materiali biorisorbibili vengono gradualmente rimpiazzati da nuovo tessuto biologico;
- ***Polimeri biodegradabili***, materiali che subiscono modificazioni chimiche quando entrano in contatto con l'ambiente biologico;
- ***Polimeri bioerodibili***, sono polimeri biodegradabili la cui degradazione inizia dalla superficie che viene gradualmente erosa.

I polimeri biodegradabili e biorisorbibili sono i più ricercati per la realizzazione di scaffold, questo perché oltre a fornire un supporto temporaneo per la rigenerazione dei tessuti non necessitano di essere rimossi dopo l'impianto. Il tutto avviene senza innescare alcuna risposta infiammatoria dovuta generalmente dalla presenza dei prodotti di scarto. Questo è tanto più vero quanto più la cinetica di degradazione del polimero è controllata rispetto alla ricrescita del tessuto, poiché se il materiale degrada velocemente rilascia nel tempo maggiori prodotti di degradazione aumentando la possibilità d'infiammazione.

1.3.2 *Degradazione dei polimeri*

Vi sono diversi fattori che influenzano la degradazione dei polimeri, alcuni dei quali necessitano di essere menzionati per capire meglio i meccanismi di degradazione. La composizione chimica sicuramente è un elemento da considerare come anche il peso molecolare. Quando un materiale degrada vengono spezzati i legami tra le unità monomeriche e la catena riduce la sua lunghezza; dunque catene più lunghe, con peso molecolare maggiore, impiegano più tempo a degradare a parità di composizione chimica. È importante inoltre conoscere la morfologia del polimero valutando la presenza di zone cristalline o amorfe, poiché un polimero amorfo degrada più velocemente rispetto ad un polimero cristallino. Quest'ultimo infatti presenta una densità maggiore e oppone superiore resistenza all'agente degradativo (es. l'acqua) che non riesce a penetrare all'interno del costruito. Anche il sito d'impianto influenza la cinetica di degradazione perché in base al tessuto varia la quantità e la tipologia di enzimi degradativi presenti. Ad esempio nel caso delle ferite croniche si ha un'abbondanza di enzimi proteolitici e una risposta infiammatoria elevata per cui le condizioni di impianto per uno scaffold sono avverse e potrebbero portare ad una degradazione molto veloce.

I meccanismi di degradazione in base alla chimica del materiale possono essere classificati come:

- ***Degradazione omogenea (in bulk)***, viene mantenuta la forma durante la degradazione fino a che il peso molecolare non diventa abbastanza basso da causare il collasso della struttura. In questo caso la parte superficiale del materiale, a contatto con l'ambiente biologico, degrada più lentamente mentre in bulk il materiale tende a dissolversi in maniera uniforme ma molto più velocemente.
- ***Degradazione eterogenea (superficiale)***, è tipica delle strutture idrofobiche dove l'acqua non riesce a penetrare all'interno del materiale che degrada a partire dalla superficie perdendo gradualmente la forma e le proprietà meccaniche, mentre il peso molecolare viene mantenuto fino alla fine.

I materiali polimerici in ambiente biologico degradano per idrolisi, ossidazione o sotto l'azione di enzimi. La degradazione idrolitica è tipica dei polimeri che presentano in catena dei gruppi idrolizzabili, ad esempio polimeri che hanno un carbonile legato ad un gruppo che contiene azoto, ossigeno o zolfo. L'agente degradante in questo caso è l'acqua quindi i materiali idrofilici sono più suscettibili a idrolisi poiché l'acqua penetra facilmente al loro interno e si ha dunque una degradazione in bulk. È importante considerare che lo scaffold

degrada molto più velocemente *in vivo* che *in vitro*. Quando si impianta un materiale in ambiente fisiologico la presenza di una risposta infiammatoria, di enzimi e di una serie di ioni come il fosfato PO_4^{3-} che catalizzano la reazione di idrolisi sono tutti fattori che accelerano il meccanismo di degradazione.

Un altro tipo di degradazione a cui sono soggetti i polimeri è la degradazione ossidativa, si parla ad esempio di degradazione ossidativa diretta quando, in presenza di una risposta infiammatoria, lo scaffold viene attaccato dai macrofagi che producono sostanze molto aggressive per i polimeri come perossidi e particelle ossidanti. L'ossidazione può anche essere promossa da ioni metallici, questo fenomeno è riscontrabile in presenza di un dispositivo metallico accoppiato con un polimero. Il metallo, soggetto a fenomeni corrosivi *in vivo*, rilascia nell'ambiente biologico ioni metallici che favoriscono l'ossidazione. Infine la degradazione ossidativa nei polimeri può essere dovuta a fattori esterni come l'esposizione ai raggi UV; pertanto, nel caso in cui lo scaffold sia destinato ad un'applicazione in una regione più superficiale del corpo come la cute o gli occhi bisogna fare attenzione a questo aspetto.

La degradazione enzimatica invece è dovuta alla presenza di enzimi idrolitici che catalizzano in maniera specifica l'idrolisi senza partecipare alla reazione; questo consente di sfruttare la loro azione catalitica più volte. L'idrolisi enzimatica è un meccanismo di degradazione superficiale in cui gli enzimi non riuscendo a penetrare all'interno del biomateriale, a causa dell'elevato peso molecolare, ne degradano la parte esterna. Nella progettazione di un materiale che sia degradabile enzimaticamente ci si ispira a particolari enzimi detti proteolitici presenti nella ECM responsabili della sua degradazione e del rimodellamento necessario per garantire la migrazione cellulare. Gli enzimi proteolitici degradano le proteine della ECM attaccando specifiche sequenze amminoacidiche. Tra questi ricordiamo la collagenasi che degrada il collagene, la plasmina che degrada la rete di fibrina del coagulo e l'elastasi ossia l'enzima deputato alla rottura dei legami tra le sequenze di alanina tipiche dell'elastina. È possibile dunque produrre un biomateriale degradabile enzimaticamente inserendo in esso delle sequenze specifiche che lo rendano suscettibile all'azione di particolari enzimi.

1.3.3 Polimeri sintetici

I polimeri sintetici rappresentano una valida alternativa ai polimeri naturali offrendo interessanti opzioni nella scelta della forma, dell'architettura e della chimica per generare

delle strutture che mimino al meglio la ECM. I polimeri sintetici maggiormente utilizzati per la rigenerazione dei tessuti appartengono alla classe dei poli(α -idrossiacidi) che comprende l'acido polilattico (PLA), l'acido poliglicolico (PGA), il policaprolattone (PCL) e i loro copolimeri come il PLGA. La degradazione di questi polimeri avviene per idrolisi e i prodotti di scarto vengono facilmente eliminati attraverso dei *pathway* metabolici. Nel caso del PLGA alcune proprietà come la resistenza a trazione, il modulo elastico o la cinetica di degradazione si possono facilmente adattare in base alle esigenze di una specifica applicazione andando a variare il rapporto di lattide per glicolide usato per la polimerizzazione. Infatti, questi polimeri sono stati applicati con successo ad esempio nella realizzazione di tessuto uretrale per la sostituzione della vescica in pazienti con vescica neurogena [13]. Molti polimeri sintetici (es. PEG, PLGA, PCL, PEO) devono la loro applicazione in ambito biomedico all'elevata processabilità, che consente di ottenere fibre biomimetiche alla micro e nano scala, e alla loro biocompatibilità. Sebbene i biomateriali sintetici vengano largamente utilizzati per fabbricare scaffold alcuni di essi possono rilasciare prodotti di degradazione acidi che causano un'alterazione del pH nell'ambiente circostante. Il cambiamento del pH può a sua volta influenzare la vitalità cellulare e causare reazioni avverse nei tessuti come risposte infiammatorie. Un'altra limitazione dei polimeri sintetici è rappresentata dalla mancanza di affinità delle catene laterali nel legare peptidi regolatori, fattori di crescita e altri segnali biologici che non favorisce né l'adesione cellulare né l'espressione diretta di un determinato fenotipo. Tuttavia, per ovviare a questo problema sono state sviluppate e ottimizzate varie tecniche di sintesi per includere domini bioattivi negli scaffold realizzati con polimeri sintetici. Funzionalizzare le superfici con agenti bioattivi è il modo migliore per ottenere un'interazione tra la cellula e il substrato [12].

1.3.4 Polimeri naturali

I polimeri naturali sono una famiglia di materiali largamente utilizzata nella produzione di scaffold per l'ingegneria dei tessuti. A differenza dei polimeri sintetici i polimeri naturali sono bioattivi e promuovono in maniera eccellente l'adesione e la crescita cellulare. Inoltre, sono biodegradabili così da consentire alle cellule, nel tempo, di produrre nuova ECM e sostituire lo scaffold degradato [2]. I biopolimeri naturali vengono processati con solventi acquosi. Al momento dell'applicazione, in ambiente biologico, durante la degradazione non rilasciano prodotti citotossici e la loro cinetica di degradazione può essere modificata variando la formulazione di partenza o i parametri di processo. I biomateriali di naturale derivazione

possono essere suddivisi in due gruppi principali: le proteine (es. collagene, elastina, fibronectina, gelatina) e i polisaccaridi (cellulosa, alginato, chitina, chitosano). I biomateriali a base proteica sono tipicamente di origine animale e contengono molecole bioattive che mimano l'ambiente extracellulare, mentre i biomateriali a base di polisaccaridi sono ottenuti generalmente: da alghe, come nel caso dell'alginato; da fonti batteriche, come nel caso del gellano e del dextrans; da piante, come nel caso della cellulosa. In applicazioni biomediche i polimeri naturali vengono processati attraverso diverse tecniche per essere poi utilizzati sotto forma di scaffold nanoporosi, idrogeli e membrane sottili che degradano in vivo principalmente per via enzimatica. Gli svantaggi dei polimeri di origine naturale comprendono generalmente scarse proprietà meccaniche e difficoltà nell'ottenere risultati riproducibili in termini di composizione e proprietà [12]. Un altro aspetto importante da considerare quando si usano materiali naturali è che, essendo per la maggior parte di origine animale, possono indurre una risposta immunitaria indesiderata causata dalla presenza di impurità e endotossine. Inoltre, molti polimeri naturali sono idrofili, ciò li rende poco stabili in ambiente acquoso quindi prima di essere impiantati hanno bisogno di essere reticolati. Tuttavia, poiché la conoscenza di questi materiali è in continuo aumento, si stanno sviluppando nuovi approcci per la loro produzione, purificazione e per il controllo delle proprietà in modo da progettare biomateriali migliori per la realizzazione di scaffold che supportino lo sviluppo di tessuti più funzionali [14].

1.3.5 *Collagene*

Il collagene è la proteina più abbondante nei mammiferi, costituendo più di un terzo della massa proteica totale dei tessuti. Il collagene è una proteina strutturale biodegradabile, biocompatibile e non immunogenica, il che la rende un biomateriale adatto a svariate applicazioni biomedicali [15]. Sono stati identificati 28 tipi di collagene diversi, tra questi il più diffuso nella ECM è il collagene di tipo I, specialmente in tessuti come i tendini e le ossa.

Come mostrato in Fig.3, il collagene presenta una conformazione gerarchica complessa che può essere divisa in quattro strutture:

- **Struttura primaria:** è costituita da una sequenza di tre amminoacidi (glicina-prolina-idrossiprolina) legati tra loro da legami peptidici. La glicina si ripete in sequenza ogni tre residui amminoacidici lungo tutta la lunghezza della catena costituita da circa 1000

amminoacidi, mentre la prolina stabilizza la conformazione ad elica di ciascuna catena α .

- **Struttura secondaria:** le singole catene polipeptidiche, sinistrorse, sono sintetizzate dai ribosomi e iniettate nel lume del reticolo endoplasmatico (ER) come precursori chiamati catene pro- α . Questi precursori presentano degli amminoacidi addizionali, i propeptidi, alle estremità C- e N- terminali. Alcune proline e lisine vengono idrossilate in modo da formare idrossiprolina e idrossilina, quest'ultima viene a sua volta glicolisata [8]. Le catene α formate dalla ripetizione del tripeptide $-(\text{Gly-X-Y})_n$, in cui X e Y sono generalmente prolina e idrossiprolina, si assemblano formando strutture a tripla elica (procollagene).
- **Struttura terziaria:** le tre catene formano una tripla elica destrorsa dove i residui di glicina, più piccoli, si trovano attorno a un asse centrale mentre gli amminoacidi più grandi come prolina e idrossiprolina occupano posizioni più esterne. Le catene sono legate l'una all'altra tramite legami idrogeno dovuti alla presenza dei gruppi ossidrilici dell'idrossiprolina. La carenza di idrossiprolina, caratteristica di alcune malattie come lo scorbuto, porta ad avere triple eliche poco stabili che vengono degradate immediatamente all'interno della cellula inibendo la produzione di nuovo collagene e, così facendo, andando a bloccare il turn over del collagene tipico dei tessuti sani.
- **Struttura quaternaria:** Le molecole di procollagene vengono secrete nell'ambiente extracellulare dove avviene la rimozione dei propeptidi per mezzo di specifici enzimi proteolitici. Le molecole di procollagene, divenute ormai tropocollagene, tendono ad auto-assemblarsi in fibrille disposte in fasci paralleli secondo una struttura molto precisa in cui le molecole di tropocollagene sono sfalsate di 67 nm. I telopeptidi costituiti da regioni non elicoidali hanno un ruolo importante nella fibrillogenesi contribuendo alla stabilità delle fibrille di collagene con la formazione di cross-link covalenti tra i residui di lisina di questi segmenti [16]. Infine, le fibrille di collagene spesso si aggregano in fasci più grandi, molto simili a cavi, formando le fibre di collagene, caratterizzate da un diametro tra 0,5-3 μm .

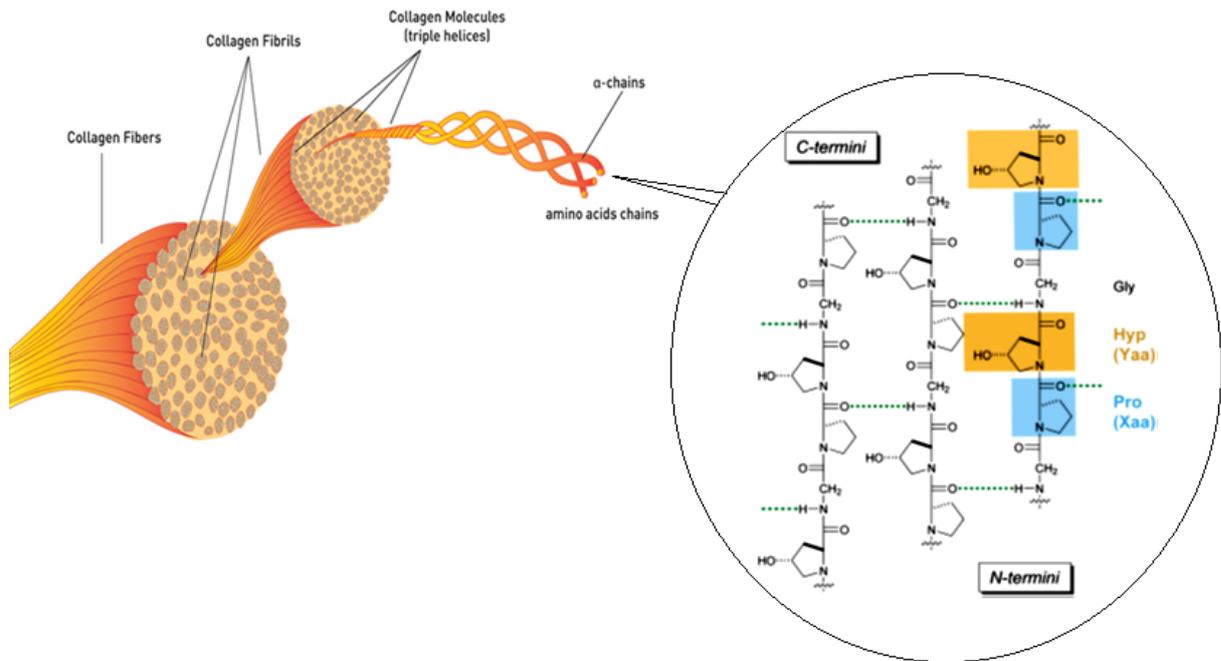


Figura 3: Organizzazione multiscala del collagene

Le fibrille di collagene non sono presenti in tutte le tipologie di collagene ma solo in quelli detti collagene fibrillari di cui fanno parte:

- Collagene di tipo I, presente nella pelle, ossa, tendini, vasi sanguigni e nella cornea.
- Collagene di tipo II, abbondante nella cartilagine e nei dischi intervertebrali.
- Collagene di tipo III, presente nei vasi sanguigni.

Altre tipologie di collagene come il tipo IV (abbondante nelle lamine basali) e il tipo VII formano strutture reticolate, mentre i collagene di tipo IX e XII sono chiamati collagene associati alle fibrille perché mediano l'organizzazione delle fibrille aiutandole ad assumere una struttura ordinata [8].

Negli ultimi decenni il collagene è stato ampiamente utilizzato in applicazioni biomediche in quanto, oltre ad essere il principale componente delle ECM, presenta delle eccellenti caratteristiche biologiche e buone proprietà fisico-chimiche. Infatti, può essere facilmente modificato sfruttando i suoi gruppi funzionali in modo da aumentare i *cross-links* o legare biomolecole per creare un'ampia varietà di materiali con proprietà meccaniche e biologiche su misura [16].

Il collagene utilizzato come biomateriale presenta però anche diversi svantaggi, molti dei quali legati ai costi di produzione. Essendo un materiale altamente delicato i processi di

isolamento e purificazione sono lunghi e costosi. Il collagene viene estratto generalmente dalla pelle e dai tendini di mammiferi o da pesci. Le condizioni di estrazione influenzano la conformazione delle fibre di collagene di cui si vuole preservare la struttura quaternaria, infatti l'estrazione deve essere fatta in condizioni non aggressive per evitare che la proteina denaturi. Generalmente, le molecole di collagene possono essere estratte e purificate dai tessuti mediante una varietà di tecniche come trattamenti acidi (comunemente, acido acetico diluito), alcalini (di solito usando NaOH), o mediante enzimi proteolitici, tutti seguiti da trattamenti con sali neutri, dialisi, precipitazione e centrifugazione [17]. Inoltre, tutte le procedure devono essere eseguite a basse temperature, in un *range* tra 0°- 4°. Il processo di purificazione del collagene è importante perché si deve ridurre al minimo la risposta immunitaria e la citotossicità. Il collagene è un biomateriale altamente idrofilico perciò, se si vuole utilizzare uno scaffold fibroso *in vivo*, per evitare un eccessivo rigonfiamento e la conseguente perdita di morfologia, è necessario reticolare il materiale sfruttando i gruppi laterali del polimero (ossidrilici e amminici) in modo da legare covalentemente le catene polimeriche. Variando il grado di reticolazione si riesce ad avere una struttura più rigida, con migliori proprietà meccaniche e con una maggiore stabilità in ambiente acquoso [6].

1.4 Electrospinning

1.4.1 Scaffold nanofibrosi

L'architettura dello scaffold governa la risposta cellulare portando a cambiamenti nelle vie di segnalazione intracellulare, che si traducono in una modifica dell'espressione genica e, di conseguenza, del comportamento cellulare. Come mostrato in figura, in base alla morfologia dello scaffold si possono distinguere diversi tipi di interazione tra la cellula e il substrato. Su un substrato microporoso o microfibrato, caratterizzato da una dimensione dei pori dell'ordine delle decine di micron, le cellule tendono ad aderire e ad appiattirsi come se fossero coltivate su una superficie bidimensionale. Tale condizione è chiaramente differente rispetto a quella che si verifica all'interno della ECM naturale. Al contrario, gli scaffold nanofibrosi sono caratterizzati da due ordini di grandezza in meno rispetto alle cellule, ciò gli consente di mimare più fedelmente l'architettura della matrice nanofibrosa naturale in cui le cellule tendono a disporsi in maniera tridimensionale. Infatti, gli scaffold nanofibrosi presentano un rapporto superficie/volume molto più elevato, in questo modo è possibile avere più siti di legame per le cellule e può essere adsorbito un numero maggiore di proteine.

Avere una coltura 3D modifica radicalmente la stimolazione meccanica rispetto a quella riscontrata in un ambiente bidimensionale, influenzando così il comportamento delle cellule che adottano morfologie più simili a quelle assunte *in vivo*.

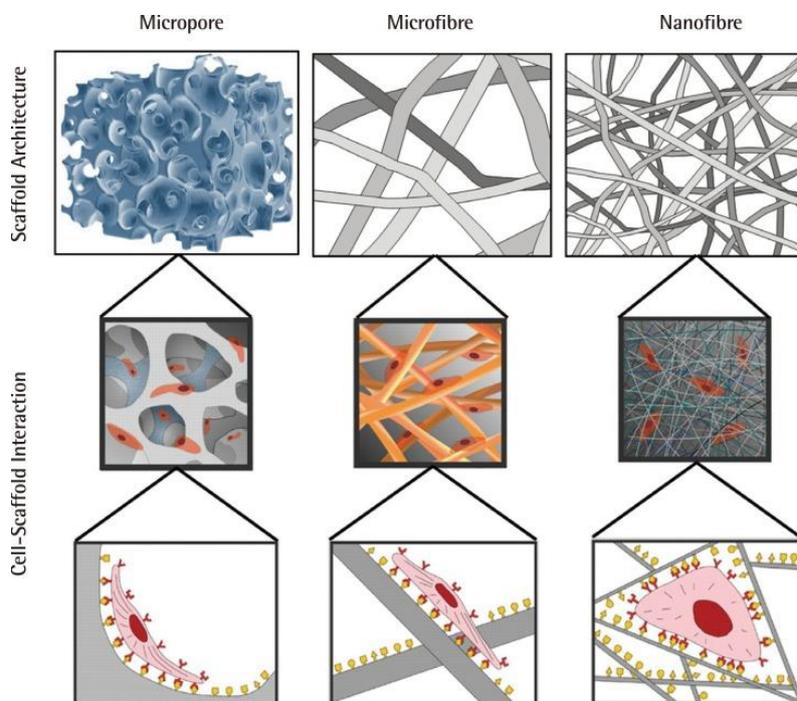


Figura 4: Influenza della morfologia dello scaffold sulla conformazione cellulare

1.4.2 Strumentazione e fisica del processo di elettrofilatura

La realizzazione di scaffold nanofibrosi tridimensionali che mimino la struttura della ECM è uno dei settori più indagati dell'ingegneria tissutale. Sono stati sviluppati diversi metodi che consentissero la produzione di nanofibre tra cui la nanolitografia [18], self-assembly [19] e l'*electrospinning*. Rispetto alle altre tecniche l'*electrospinning* ha il vantaggio di avere un costo relativamente basso se comparato alla resa. L'*electrospinning* è un processo dal quale nanofibre polimeriche possono essere prodotte usando un sistema di guida elettrostatica che consente la loro deposizione controllata su un substrato. Diversamente dalle altre tecniche di elettrofilatura, capaci di produrre fibre con diametri dell'ordine dei micrometri, l'*elettrospinning* permette di scendere alla nanoscala e di realizzare scaffold nanofibrosi aventi pori interconnessi. Con questa tecnica si possono processare sia polimeri naturali che sintetici con sufficiente peso molecolare.

Come mostrato in figura 4 l'apparecchiatura usata per l'elettrospinning è un sistema molto semplice che si compone di quattro elementi:

- **Siringa:** contenente la soluzione polimerica;
- **Pompa:** collegata alla siringa, spinge la soluzione polimerica attraverso l'ugello metallico fornendole una certa velocità di flusso;
- **Generatore di tensione:** genera una differenza di potenziale molto elevata tra l'ugello e il collettore, per effetto del quale si ha la formazione della fibra;
- **Collettore:** substrato metallico, generalmente in alluminio, su cui si depositano le fibre polimeriche.

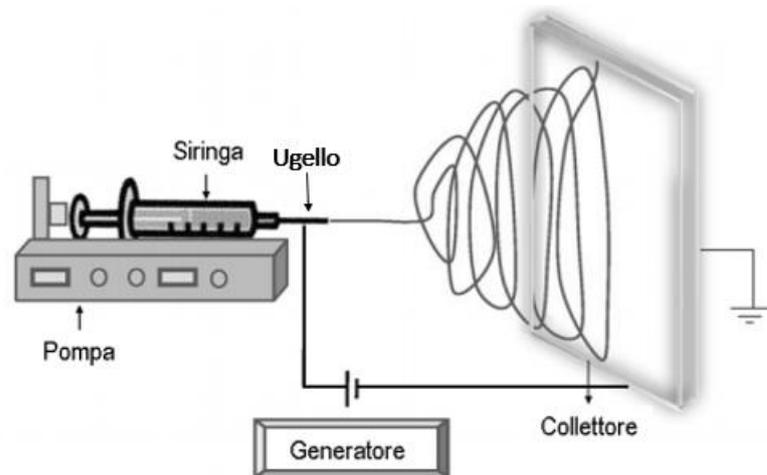


Figura 5: schematizzazione del processo di electrospinning

La soluzione polimerica viene mantenuta all'interno dell'ugello dalla sua tensione superficiale. Nel momento in cui viene applicato un campo elettrico ad alto voltaggio (0-30 kV) tra ugello e collettore, questo agisce sulla parte finale del capillare inducendo una carica elettrica sulla superficie del liquido. All'aumentare dell'intensità del campo elettrico la superficie emisferica del fluido sulla cima del capillare tende ad allungarsi assumendo una forma conica denominata **cono di Taylor**. Esiste un valore critico d'intensità del campo elettrico tale per cui la forza elettrostatica supera la tensione superficiale provocando la fuoriuscita dalla punta del cono di Taylor di un getto fluido carico elettricamente. Lungo il percorso tra ugello e collettore il solvente con cui era stata preparata la soluzione evapora e le fibre nanometriche neoformate si vanno a depositare sul collettore [20].

La modalità con cui vengono raccolte le fibre, ovvero la geometria e la distribuzione delle nanofibre dello scaffold dipende dal tipo di collettore utilizzato. Infatti, è possibile ottenere

delle fibre distribuite in maniera random usando un collettore piano, mentre si producono fibre allineate lungo una certa direzione utilizzando un collettore cilindrico rotante (mandrino rotante) o in alternativa due collettori piani posti ad una certa distanza. La disposizione delle fibre è importante perché influenza le proprietà meccaniche dello scaffold e l'attività delle cellule poste in coltura.

1.4.3 Parametri che influenzano il processo dell'elettrospinning

Malgrado il funzionamento dell'elettrospinning sia abbastanza semplice, è necessario ottimizzare una serie di parametri per ottenere delle fibre con le caratteristiche desiderate. Infatti, l'insufficiente ottimizzazione di questi parametri può causare una scarsa produzione di fibre, la discontinuità di queste e la presenza in esse dei cosiddetti difetti di filatura. Bisogna comunque tenere conto del fatto che solo alcuni fattori possono essere controllati dall'operatore, altri dipendo principalmente dalle proprietà della soluzione e dai parametri ambientali, non sempre gestibili [21].

I **parametri di processo** incidono sulla morfologia delle fibre e sono caratteristici dell'apparecchiatura utilizzata, tra questi troviamo:

- ***Voltaggio***: è necessario applicare un voltaggio minimo al di sopra del quale le fibre possono formarsi. Aumentando la tensione le fibre mostrano inizialmente dei diametri progressivamente minori poiché le forze di repulsione all'interno del getto aumentano favorendone l'assottigliamento. In molti studi però questa dipendenza del diametro dalla differenza di potenziale applicata risulta ambigua, probabilmente perché ci sono altri parametri che vi incidono maggiormente, capita dunque che l'aumento della tensione possa portare ad avere fibre più spesse [22].
- ***Flow rate***: il flusso della soluzione influenza la velocità del processo. A bassi flow rate, il processo di elettrofilatura è più lento e permette l'evaporazione del solvente prima che le fibre raggiungano il collettore. Se il flusso è troppo elevato, il solvente non riesce ad evaporare totalmente e si ottengono fibre poco omogenee caratterizzate da difetti [23][24].
- ***Distanza tra l'ugello e il collettore***: esiste una distanza minima al di sotto della quale le fibre non si formano perché il solvente non ha il tempo di evaporare. È stato riscontrato in diversi studi che aumentando la distanza di lavoro si ottengono fibre con diametro ridotto [25].

I **parametri di sistema** dipendono dalla soluzione polimerica. In questo caso è difficile capire l'influenza dei singoli parametri sull'elettrospinning poiché la variazione di uno di essi può andare a sua volta a modificare un altro parametro della soluzione (ad esempio la variazione del peso molecolare del polimero influisce sulla viscosità della soluzione) [25].

I principali parametri di sistema sono:

- **Concentrazione e viscosità:** il livello di concentrazione di soluto nella soluzione polimerica è un parametro molto importante per l'elettrospinning, se tale valore è al di sotto di una soglia minima si instaura un processo chiamato *electrospray* in cui, a causa della scarsa viscosità della soluzione, il getto si rompe in goccioline. Allo stesso tempo la soluzione non deve essere neanche troppo concentrata perché l'eccessiva viscosità non garantirebbe un processo continuo in quanto il getto avrebbe difficoltà a formarsi. L'aumento della concentrazione e quindi della viscosità della soluzione riducono la formazione di *beads*, ma incrementano le dimensioni delle fibre [26].
- **Tensione superficiale:** è un parametro fortemente correlato al solvente. Generalmente, riducendo la tensione superficiale si va a minimizzare la formazione goccioline e di difetti sulle fibre [26]. Infatti, se la tensione superficiale è elevata si incrementa la presenza di difetti sulle fibre, che vengono prodotte in maniera discontinua.
- **Conduttività:** è legata al tipo di polimero utilizzato, al solvente e alla presenza di sali in soluzione. Sali come il cloruro di sodio e cloruro di calcio, possono essere aggiunti alle soluzioni polimeriche per aumentare la conduttività [27]. All'aumentare della conduttività il diametro delle fibre decresce, mentre se la conduttività è troppo bassa non si producono fibre continue ma caratterizzate da difetti. Tuttavia, le soluzioni che presentano un livello di conducibilità eccessivo sono instabili in presenza di campi elettrici molto intensi, questo porta alla formazione di fibre poco uniformi.
- **Peso molecolare:** è un parametro che ha un effetto significativo sulle proprietà reologiche, sulla tensione superficiale, la viscosità e la conduttività della soluzione. Mantenendo la concentrazione costante, se il peso molecolare del polimero viene aumentato, la viscosità della soluzione aumenta in modo significativo. Pertanto, la velocità di evaporazione del solvente può essere ridotta all'aumentare del peso molecolare. In questo caso, le fibre relativamente bagnate che raggiungono il collettore vengono appiattite dall'impatto. Al contrario, a bassi pesi molecolari la velocità di evaporazione del solvente è elevata e le fibre arrivano sul collettore prive

di solvente [28]. Inoltre maggiore è il peso molecolare del polimero maggiore è il diametro delle fibre ottenute.

Anche i **parametri ambientali** influenzano la morfologia delle fibre, la temperatura ad esempio riduce la viscosità della soluzione, di conseguenza il diametro delle fibre viene ridotto [29]. L'umidità invece gioca un ruolo importante nella porosità, vi sono alcuni materiali, soprattutto idrofilici, che ad elevati livelli di umidità non consentono la formazione di strutture nanoporose. Tale comportamento non viene riscontrato nei materiali idrofobici [30].

1.4.4 Difetti di filatura

Nelle fibre nanometriche prodotte con la tecnica dell'elettrospinning si possono osservare una serie di difetti quali:

- **Beads:** rigonfiamenti della fibra che assume una conformazione a “pallone collassato”. Sono dovuti ad una lenta evaporazione del solvente, avvenuta solo dopo la deposizione nel collettore.
- **Nastri:** sono fibre ancora piene di solvente che collassano perdendo la loro geometria.
- **Difetti superficiali:** al fine di ridurli è necessario ottimizzare i parametri di processo e di sistema.

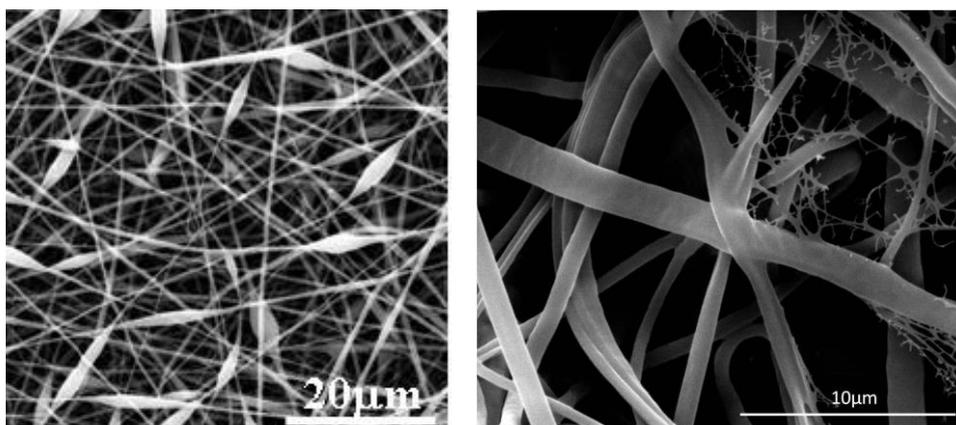


Figura 6: Immagini al SEM (microscopio a scansione elettronica) di membrane elettrofilate con difetti di filatura

1.5 Membrane elettrofilate in collagene

Il collagene è un materiale molto versatile, può quindi essere processato per ottenere diverse geometrie. In ambito biomedicale il collagene può essere usato per la produzione di membrane, tubi, schiume, spugne, nanofibre, gel, polveri, soluzioni viscosi iniettabili e dispersioni. Gli scaffold che forniscono un microambiente il più simile possibile alla ECM avranno sicuramente maggiori possibilità di favorire la rigenerazione dei tessuti. Ciò ha portato grande interesse nei confronti del collagene e della possibilità di produrre con esso fibre alla nanoscala in modo da mimare la morfologia dell'ambiente fisiologico e realizzare dei substrati di gradimento per le cellule. L'elettrospinning è una delle tecniche più promettenti per produrre nanofibre di collagene. Le fibre in collagene sono superiori alle fibre prodotte con altri polimeri per diversi aspetti. Infatti, il collagene è il principale componente della ECM di molti tessuti umani quindi le sue fibre riescono a mimare meglio la composizione reale della matrice. Inoltre, il collagene ha una scarsa immunogenicità e un'elevata biocompatibilità di conseguenza in vivo uno scaffold in collagene è ben tollerato dal corpo. Lo svantaggio più ovvio delle fibre in collagene è rappresentato dalle scarse proprietà meccaniche; nonostante ciò queste possono essere migliorate tramite reticolazione o realizzando dei *blend* con materiali più resistenti.

1.5.1 Effetto dei solventi

Il solvente è un elemento che condiziona fortemente la spinnabilità del collagene. Un solvente ideale dovrebbe facilitare la formazione delle fibre senza compromettere l'integrità del collagene o denaturarlo. I solventi più utilizzati per l'elettrospinning del collagene sono HFP (esafluoroisopropanolo) [31], TFE (2,2,2-trifluoroetano) [32], acido acetico, acido idrocloridrico [33] e PBS/EtOH (tampone fosfato salino e etanolo) [34]. Come è possibile riscontrare in letteratura il più utilizzato è l'HFP. L'HFP è un solvente organico altamente volatile con basso punto di ebollizione (59°), ciò lo rende un solvente ideale per l'elettrofilatura poiché evapora rapidamente prima che le fibre arrivino sul collettore. Come l'HFP anche il TFE appartiene alla classe degli alcoli fluorurati altamente volatili e anch'esso facilita la formazione delle fibre di collagene. Sebbene favorisca la generazione delle fibre, è stato dimostrato che l'HFP denatura il collagene ed è tossico per le cellule. Dunque è possibile l'elettrofilatura di soluzione di collagene in HFP possa portare alla produzione di fibre in gelatina, ossia una forma denaturata di collagene in cui viene persa la

conformazione a tripla elica [35]. Riprodurre delle fibre che si avvicinino il più possibile alle fibre native è molto importante per avviare una corretta rigenerazione tissutale, in quanto le membrane in collagene presentano una maggiore risposta cellulare rispetto a quelle in gelatina [36]. Un'alternativa all'HFP è rappresentata dall'acido acetico; è stato infatti dimostrato che questo preserva maggiormente la struttura elicoidale del collagene [35].

1.5.2 Metodi di reticolazione

Le fibre in collagene elettrofilate sono meccanicamente deboli e facilmente solubili in acqua. Nelle applicazioni d'ingegneria tissutale avere una rapida degradazione non è l'ideale perché lo scaffold scomparirà prima che le cellule abbiano avuto il tempo di depositare la propria matrice extracellulare. Pertanto, le fibre di collagene devono essere reticolate per ridurre la solubilità in acqua, per migliorare la resistenza alla degradazione enzimatica e per migliorare le proprietà meccaniche. Il collagene può essere reticolato chimicamente (es. Glutaraldeide, genipina, carbodiimmidi) [37], enzimaticamente (es. Transglutaminasi, tirosinasi, laccasi) [38] o fisicamente (es. Radiazioni UV, radiazioni gamma, trattamento deidrotermico). Ciascun metodo di reticolazione presenta dei limiti. Il trattamento chimico rilascia residui tossici nel materiale, rendendolo poco adatto per le applicazioni biomediche. Il trattamento fisico invece produce un basso grado di reticolazione poiché la reazione avviene solo sulla superficie del materiale [39]. Infine il trattamento enzimatico ha come target solo aminoacidi specifici e il processo di cross-linking è più difficile da controllare [40]. La glutaraldeide e l'EDC (1-etil-3-(3-dimetilamminopropil) carbodiimmide cloridrato) sono i *cross-linker* più utilizzati per la reticolazione delle fibre di collagene. Tuttavia la glutaraldeide in quanto citotossica compromette la biocompatibilità dello scaffold ed inoltre è correlata alla calcificazione nei tessuti [39]. L'EDC è un agente reticolante non citotossico tuttavia, in alcuni casi, le matrici di collagene reticolate con EDC perdono la struttura porosa a causa del rigonfiamento delle fibre e dell'occlusione dei pori [41]. La genipina è un agente reticolante naturale che rappresenta una valida alternativa alla glutaraldeide e all'EDC in quanto meno tossico. Questo reticolante forma legami tra le fibre e ne aumenta la resistenza alla degradazione enzimatica; riesce inoltre ad incrementare le proprietà fisiche dello scaffold senza modificarne la composizione chimica [42]. Vi sono altre possibilità di cross-link che comprendono reticolanti altamente biocompatibili il cui effetto sulle membrane elettrofilate a base di collagene non è stato ancora indagato. Tali cross-linker sono il DSP, il GPTMS e la combinazione di questi. A differenza dei precedenti agenti reticolanti che

prevedono un bagnetto di reticolazione una volta che le fibre sono state electrospinnate, il DSP e il GPTMS vengono inseriti direttamente nella soluzione polimerica prima che questa venga processata.

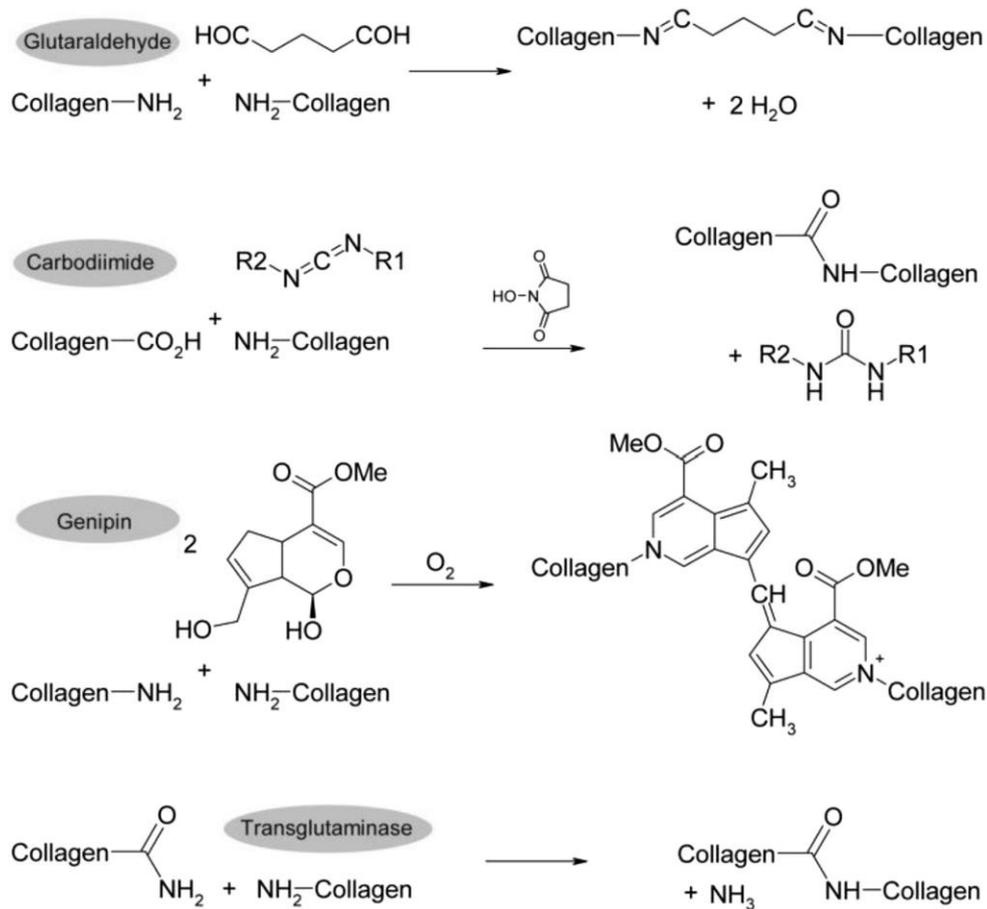


Figura 7: Principali metodi di cross-link utilizzati per il collagene

1.5.3 Nanofibre composite a base di collagene

Le nanofibre in solo collagene presentano scarse proprietà meccaniche *in vivo* pertanto, normalmente il collagene viene utilizzato in combinazione con altri polimeri in modo da produrre nanofibre composite più resistenti. L'aggiunta di ulteriori materiali in soluzione aiuta a modificare la morfologia, le proprietà meccaniche e biologiche delle nanofibre senza comprometterne la biocompatibilità. In letteratura si trovano diversi esempi di *blend* realizzati con collagene e polimeri sintetici come: l'idrossiapatite, usata per favorire la rigenerazione del tessuto osseo; il PCL, largamente adoperato per l'ingegnerizzazione di tessuti vascolari [43]; il PLA, utilizzato per aumentare l'idrofobicità dello scaffold in modo ad esempio da favorire il rilascio prolungato di farmaci *in vivo* [31]. Un altro materiale

largamente usato in combinazione con il collagene è il PEO. Secondo uno studio di L. Buttafoco et al. nel quale veniva prodotta una soluzione di collagene e PEO in rapporto 1:1 in peso, l'aggiunta del PEO consente di avere una soluzione più viscosa così da facilitarne il processo di elettrofilatura [33].

Al contrario, la preparazione di nanofibre composite in collagene con polimeri naturali è meno comune, principalmente sono state prodotte delle miscele in cui il collagene si interfaccia con materiali come il chitosano [44] o l'elastina [33].

2. SCOPO DEL LAVORO

Questo lavoro di tesi ha come scopo la realizzazione e la caratterizzazione di membrane nanofibrose elettrofilate a base di collagene che siano stabili in ambiente acquoso e meccanicamente resistenti. L'idea fondamentale è quella di produrre degli *scaffold* in grado di mimare la lamina basale degli alveoli polmonari. In particolare la stabilità delle membrane in ambiente acquoso sarà valutata *in vitro* sia in condizioni dinamiche, simulando *flow rate* fisiologici con l'ausilio di un bioreattore, sia in condizioni statiche.

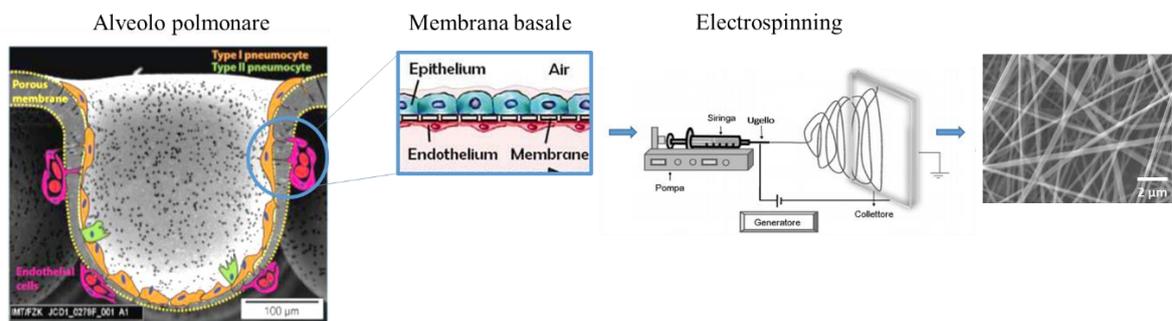


Figura 8: Schema riassuntivo dello scopo del lavoro

II. MATERIALI E METODI

Nel seguente capitolo sono riportati i materiali utilizzati per la realizzazione delle membrane elettrofilate, i processi di produzione e tipi di caratterizzazione effettuati.

1. MATERIALI

1.1 Collagene di tipo I

In questo lavoro di tesi è stato utilizzato collagene di tipo I di origine bovina commercializzato da Blafar Ltd. (Ireland) (codice prodotto COL02), le cui proprietà sono riportate in tabella 1.

<i>Collagene tipo I - BLAFAR</i>	
Forma	Polvere
Purezza	>85%
Origine	Tendine bovino

Tabella 1: Proprietà del collagene di tipo I usato.

Come già accennato il collagene di tipo 1 è la forma più diffusa di collagene fibrillare nel tessuto connettivo. Tipicamente la struttura terziaria del collagene di tipo 1 si compone di due catene $\alpha 1(I)$ e una $\alpha 2(I)$, ciascuna costituita da circa 1000 amminoacidi, che assumono una conformazione a tripla elica stabilizzata da legami idrogeno [15]. Le fibrille di collagene di tipo 1 sono caratterizzate da una forte resistenza a trazione, ciò gli consente allungarsi senza spezzarsi.

1.2 Polietilenossido (PEO)

In questo lavoro di tesi è stato utilizzato il polietilenossido con peso molecolare medio di 900 kDa, acquistato dalla Sigma-Aldrich (prodotto n.189456), le cui proprietà sono riportate in Tabella 2.

<i>PEO-Sigma-Aldrich</i>	
Forma	Polvere
PM medio	900 kDa
Viscosità	8800-17600 cps

Tabella 2: Proprietà PEO Sigma-Aldrich.

Il PEO, di cui si riporta la struttura chimica in figura 8, è un polimero termoplastico, biocompatibile, altamente idrofilico e solubile in ambiente acquoso. Il PEO si distingue dal polietilenglicole (PEG) per il peso molecolare, superiore a 40 kDa. Viene ottenuto dalla polimerizzazione anionica dell'ossido di etilene in presenza di un catalizzatore [45].

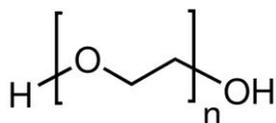


Figura 9: struttura chimica del PEO

L'utilizzo del PEO per la realizzazione di *blend* con polimeri naturali è stato largamente indagato. Nel caso del collagene in uno studio di Buttafoco *et al.* la soluzione di PEO viene unita alla soluzione di collagene per aumentarne la viscosità in modo da rendere la miscela maggiormente processabile con la tecnica dell'electrospinning [33].

In un altro lavoro, Whang e colleghi riportano che all'aumentare della percentuale di PEO nella *blend* il diametro delle fibre elettrofilate in collagene/PEO diminuisce. Nello stesso studio, considerando i risultati ottenuti dalla caratterizzazione chimico-fisica tramite FTIR, è stato supposto che i due materiali interagiscano attraverso forti legami idrogeno [46].

1.3 Fosfato di sodio dibasico (DSP)

Per la reticolazione del collagene e per aumentare il pH della soluzione, è stato usato fosfato di sodio dibasico fornito dalla Sigma-Aldrich.

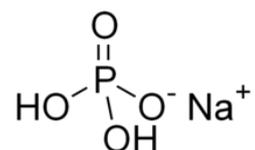


Figura 10: Struttura chimica del DSP

Il DSP è un sale non tossico che in ambiente acquoso si carica negativamente. Si suppone che il sale interagisca con le molecole di collagene elettrostaticamente formando dei legami ionici con i gruppi amminici protonati di quest'ultimo. In questo lavoro, è stato indagato l'utilizzo del DSP, posto direttamente in soluzione, come cross-linker per il collagene.

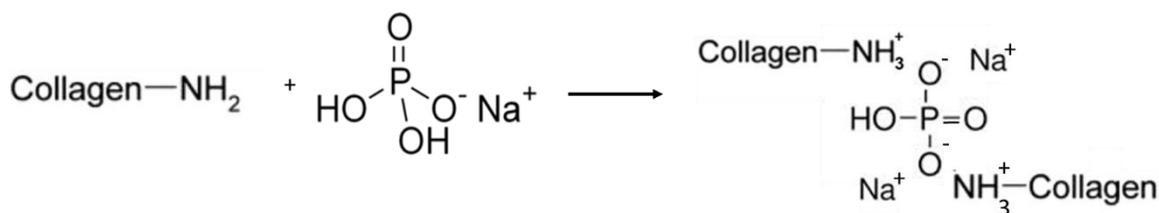


Figura 11: Interazione tra collagene e DSP

1.4 γ -glicidossipropiltrimetossisilano (GPTMS)

Come ulteriore reticolante per il collagene è stato impiegato il γ -glicidossipropiltrimetossisilano, commercializzato dalla Sigma-Aldrich.

Il GPTMS è un agente di reticolazione non citotossico di natura siliconica. In questo studio è stato indagato il comportamento del GPTMS come *cross-linker* per il collagene, posto direttamente in soluzione, per aumentare la stabilità delle membrane in ambiente acquoso. Si ipotizza che la natura dell'interazione tra il GPTMS e il collagene sia la stessa di quella instaurata tra il GPTMS e la gelatina, essendo la gelatina un derivato del collagene.

Analogamente a quanto riportato da Tonda-Turo e colleghi nel caso della gelatina [47], si suppone che gli anelli di ossirano delle molecole di GPTMS reagiscano con i gruppi

amminici delle molecole di collagene. Inoltre, la reazione di idrolisi dei gruppi trimetossi (Si-H₃CO) del *cross-linker*, catalizzata da acidi, consente la formazione dei gruppi pendenti silanolo (Si-OH). Successivamente, durante l'evaporazione del solvente, grazie alla condensazione di due gruppi silanolo vengono generati dei legami covalenti inter-catena del tipo Si-O-Si, ottenendo così una struttura reticolata.

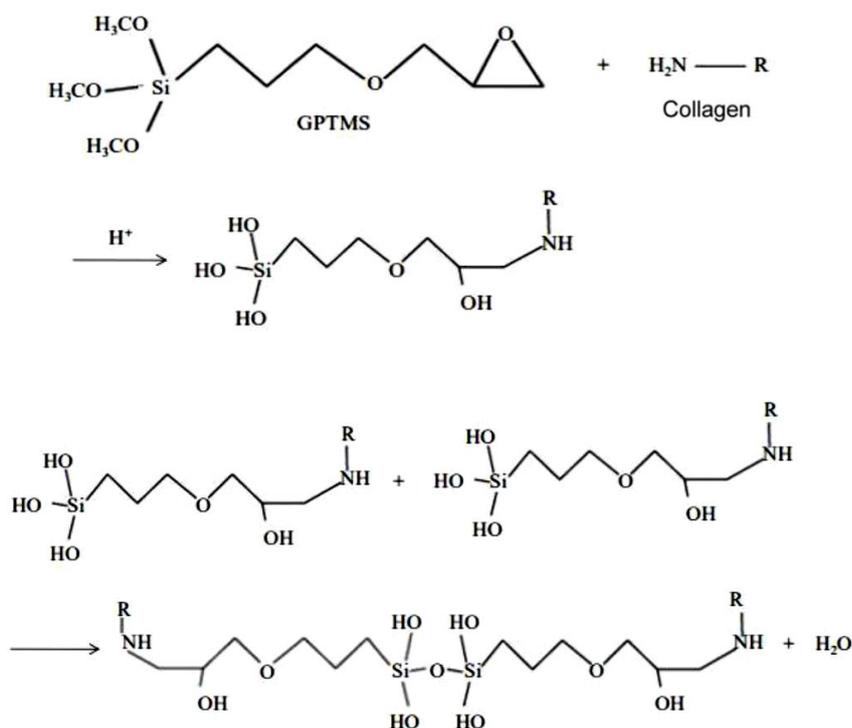


Figura 12: Passaggi del meccanismo di reticolazione del GPTMS

1.5 *Rose bengal*

Il *rose bengal* è un sale sodico 4,5,6,7-tetracloro-2',4',5',7'-tetraiodo derivato dalla fluoresceina. Il *rose bengal* è un colorante tendente al rosso, largamente utilizzato in medicina per la diagnosi di malattie oftalmologiche.

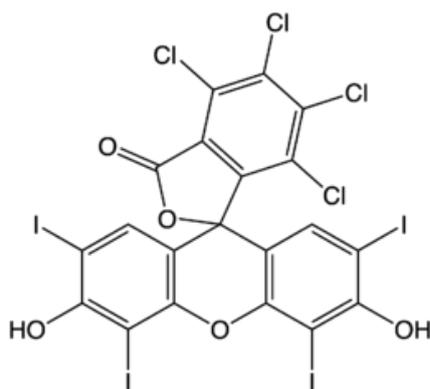


Figura 13: Struttura chimica del *Rose bengal*

In letteratura sono presenti diversi casi di *scaffold* di collagene reticolati fotochimicamente utilizzando: un raggio laser ad argon, con lunghezza d'onda pari a 514 nm, e il *rose bengal*, come fotoiniziatore della reazione, che presenta un elevato coefficiente di assorbimento a 514 nm. È stato dimostrato infatti che in presenza della luce e di reagenti fotosensibilizzanti, come il *rose bengal*, le proteine si leghino tra di loro formando *crosslink*.

La fotoreticolazione può avvenire secondo due *pathway* distinti:

- Nel ***meccanismo diretto***, il reagente attivato dalla luce reagisce in maniera diretta con le molecole circostanti legandosi covalentemente con esse. Inoltre, il fotoiniziatore una volta attivato produce specie reattive dell'ossigeno come perossido di idrogeno e radicali liberi che a loro volta reagiscono con le molecole proteiche presenti.
- Nel ***meccanismo indiretto***, il reagente fotosensibile, attivato dalla luce, interagisce con l'ossigeno allo stato fondamentale, producendo ossigeno singoletto, specie molto reattiva dell'ossigeno, che ossida le molecole circostanti.

Si ipotizza che gli amminoacidi vulnerabili a questo tipo di reticolazione siano il triptofano, la cisteina, la tirosina, l'istidina e la metionina (questi ultimi tre contenuti nel collagene)[48].

Il *rose bengal* utilizzato in questo lavoro è stato prodotto dalla Sigma Aldrich (numero prodotto: 330000), le cui specifiche sono riassunte in tabella.

<i>Rose Bengal-Sigma-Aldrich</i>	
Forma	Polvere
Colore	Da rosso a marrone
Purezza	> 95%
Coefficiente di assorbimento molare (514 nm)	> 98000

Tabella 3: Caratteristiche del *Rose bengal* della Sigma-Aldrich

2. METODI

2.1 Ottimizzazione della soluzione

Per la realizzazione delle membrane è stato necessario ottimizzare i parametri di soluzione. In un primo momento, partendo da un protocollo presente in letteratura di Buttafoco e colleghi [33], è stato realizzato un *blend* in cui le polveri sia di collagene che di PEO sono state disciolte in acido cloridrico. A seguito di diverse prove, effettuate variando la concentrazione dei polimeri (da 1% a 3% wt/v) e del solvente (10mM a 50mM), a causa della scarsa processabilità delle soluzioni, l'acido cloridrico è stato sostituito con l'acido acetico. Anche in questo caso, sono state indagate diverse concentrazioni di collagene e di PEO, è stato inoltre necessario variare le percentuali dei reticolanti, aggiunti in soluzione per aumentare la stabilità delle membrane in ambiente acquoso. Come già descritto nel paragrafo precedente i *cross-linker* investigati sono stati il DSP e il GPTMS, usati sia in combinazione sia singolarmente.

2.1.1 Preparazione delle soluzioni polimeriche

In figura sono raffigurati i passaggi fondamentali del protocollo ottimizzato per la preparazione del *blend* in collagene e PEO. Sono state preparate due soluzioni, una di collagene al 9% w/v e una di PEO al 4.5% w/v entrambe disciolte in A.A al 20% (v/v). Le soluzioni sono state mantenute in agitazione per 24 ore rispettivamente a 50 rpm e 250 rpm. Le due soluzioni sono state successivamente miscelate e mantenute in agitazione a 50 rpm per le successive 2h. È stato poi inserito il DSP 1M in una concentrazione pari al 15% v/v rispetto al volume della soluzione di collagene; dopo circa un'ora è stato aggiunto il GPTMS in quantità pari a 150 μ l per grammo di collagene. La miscela è stata posta nuovamente in agitazione a 50 rpm per ulteriori 20 minuti. Per prevenire la denaturazione del collagene, come riportato sulla scheda tecnica del materiale, l'intero processo è stato svolto ad una temperatura di 4°C, posizionando *stirrer* all'interno del frigorifero.

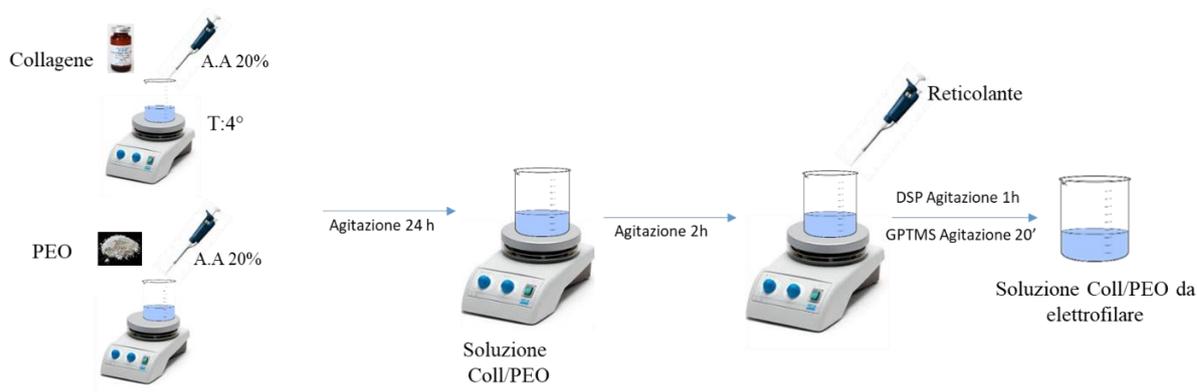


Figura 14: Schematizzazione dei passaggi del processo di preparazione della soluzione di Collagene e PEO da elettrofilare

2.1.1.1 Preparazione delle soluzioni polimeriche con Rose bengal

La preparazione del *blend* contenente il fotoiniziatore differisce dal protocollo appena descritto solo nella fase di preparazione della soluzione di collagene al 9% wt/v disciolto in acido acetico al 20% v/v. Inizialmente il rose bengal è stato disciolto ad una concentrazione pari a 0,1% wt/v in A.A al 20%, è stato poi mantenuto in agitazione per 20 minuti e solo successivamente la polvere di collagene è stata aggiunta alla soluzione. A causa dell'elevata fotosensibilità del rose bengal l'intero processo di preparazione della soluzione (schematizzato in figura 14) è stato svolto evitando l'esposizione di quest'ultima a fonti luminose, ciò ha permesso di ridurre al minimo la possibilità di una prematura reticolazione.

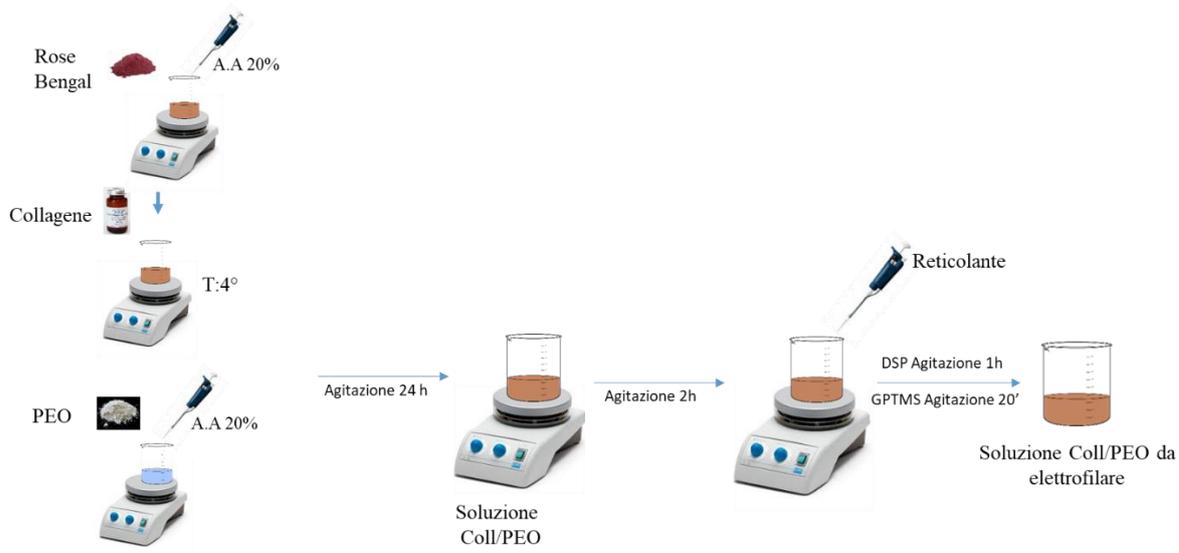


Figura 15: Rappresentazione schematica delle fasi di preparazione del *blend* contenente *rose bengal*

2.2 Realizzazione delle membrane

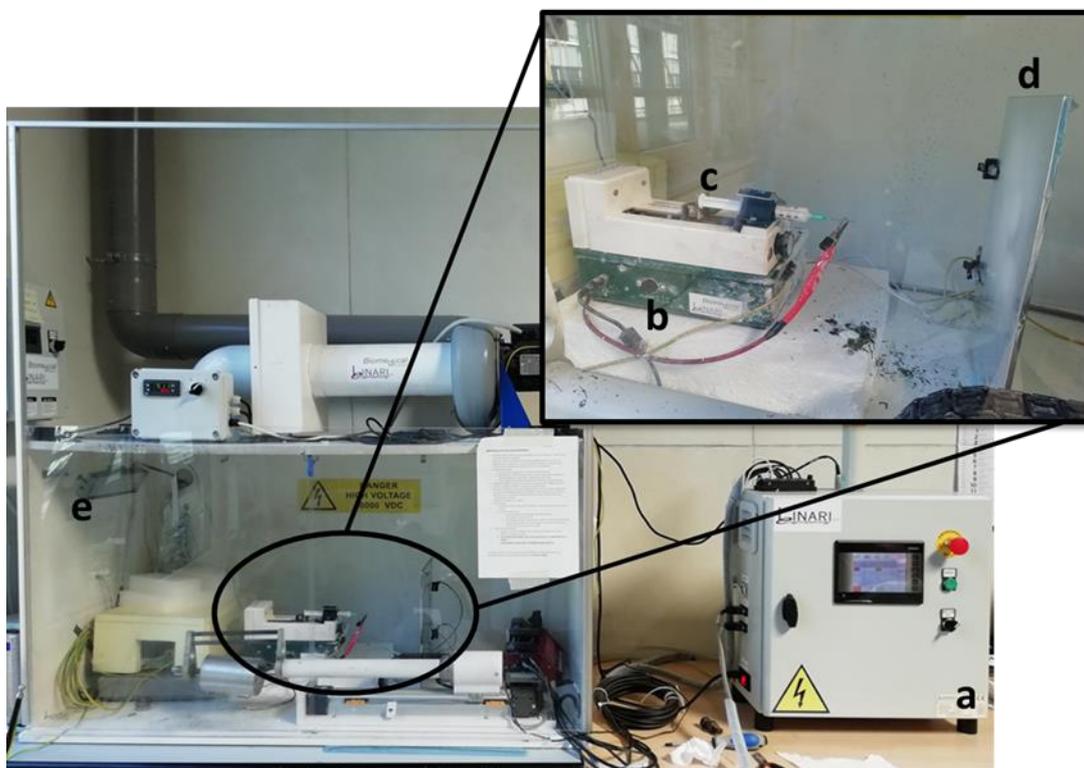


Figura 16: Apparecchiatura dell'electrospinning usata per la produzione delle membrane

Le soluzioni ottenute seguendo il protocollo descritto al paragrafo precedente sono state elettrofilate con la tecnica dell'electrospinning. L'apparecchiatura utilizzata per il processo di elettrofilatura è stata messa a disposizione dai laboratori del DIMEAS (Dipartimento di Ingegneria Meccanica e Aerospaziale) del Politecnico di Torino.

Il dispositivo dell'electrospinning, riportato in figura 15, presenta diverse componenti:

- a) Il **generatore di tensione** (Lineari Engineering s.r.l) che consente di impostare una differenza di potenziale tra 0 kV e 60 kV;
- b) La **pompa volumetrica** (Lineari Engineering s.r.l) che permette di estrarre la soluzione, attraverso l'ugello, applicando una pressione continua sullo stantuffo della siringa in base alla velocità impostata.
- c) La **siringa in plastica** da 5ml in cui viene inserita la soluzione polimerica da estrarre avente un ago da 0.8 mm (21 G)
- d) Il **collettore piano** di dimensioni 200 mm x 300 mm ricoperto da un foglio di alluminio utilizzato per la deposizione di nanofibre random.
- e) La **cappa di ventilazione**, dotata di un sistema di regolazione della temperatura e di ventilazione. Come illustrato in figura l'intero processo si svolge all'interno della cappa, l'unica parte dello strumento situata al di fuori di questa è il generatore.

2.2.1 Ottimizzazione dei parametri di processo

In questo lavoro di tesi, per la produzione di nanofibre random in collagene e PEO, è stato necessario ottimizzare i parametri di processo dell'electrospinning. Per ogni soluzione preparata sono stati testati diversi valori di tensione, di velocità del flusso e di distanza tra l'ugello e il collettore. Al fine di avere una maggiore confrontabilità dei risultati in ogni prova effettuata è stato variato un solo parametro. Nello specifico, si riportano i *range* di valori delle grandezze fisiche indagate:

- **Differenza di potenziale** tra 15 kV e 30 kV;
- **Flow rate** tra 1,53 ml/h e 2,54 ml/h;
- **Distanza collettore ugello** da 6 cm a 15 cm;

I parametri relativi alle prove più significative, che hanno portato all'ottimizzazione del processo, verranno illustrati nel capitolo 3.

2.2.1.1 Preparazione delle membrane nanofibrose

A seguito dell'ottimizzazione dei parametri del processo di elettrofilatura, riassunti in tabella 4, sono state realizzate delle membrane nanofibrose che, in un secondo momento, sono state caratterizzate morfologicamente, chimicamente e meccanicamente.

<i>Parametri di processo</i>	
Voltaggio	30 kV
Flow rate	1,5 ml/h
Distanza ugello collettore	10 cm
Ventilazione	10

Tabella 4: Parametri ottimizzati del processo di electrospinning

In seguito all'elettrofilatura le membrane in collagene e PEO, contenenti come reticolante *rose bengal*, sono state irradiate utilizzando un raggio laser con lunghezza d'onda pari a 514 nm. Al fine di valutare il tempo di irraggiamento ottimale per la reticolazione, sono state effettuate delle prove irraggiando i campioni per 3 e 6 minuti.

2.3 Caratterizzazione morfologica delle membrane

2.3.1 Microscopia a scansione elettronica (SEM)

La caratterizzazione morfologica della fibre è stata effettuata attraverso il microscopio a scansione elettronica. Tale dispositivo sfrutta un fascio di elettroni che colpendo il campione permette di ottenere delle immagini, in formato digitale, ad elevati ingrandimenti (fino a 100000x) aventi una risoluzione sino a 5nm.

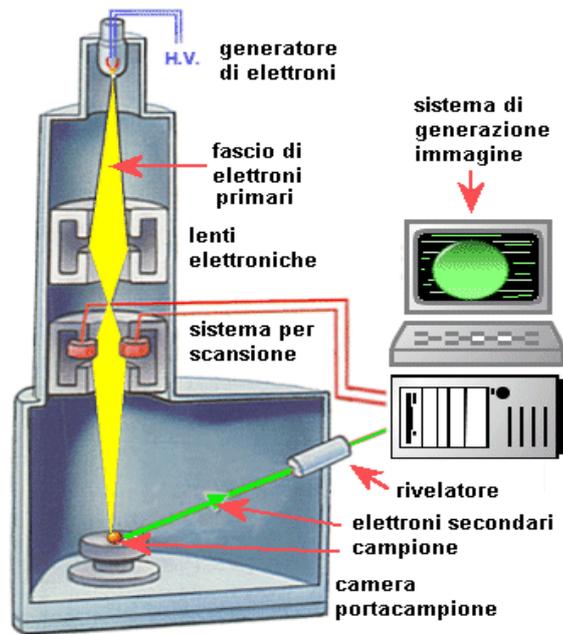


Figura 17: Principio di funzionamento del SEM

Il fascio è prodotto da una sorgente di elettroni, ossia un filamento metallico in tungsteno portato ad alte temperature. L'emissione degli elettroni avviene per effetto termoionico. L'applicazione di un'elevata differenza di potenziale consente di accelerare il fascio in direzione della base dove sono alloggiati i campioni da analizzare. Successivamente, il fascio, a cui è associata un'energia dell'ordine dei keV, viene focalizzato passando attraverso un sistema di lenti elettromagnetiche che ne riducono le dimensioni fino al nm. La collimazione del fascio è molto importante perché garantisce una migliore risoluzione dello strumento. La traiettoria degli elettroni viene poi deviata da deflettori elettrostatici consentendo la scansione del fascio lungo un'area del provino.

L'interazione tra il fascio di elettroni e gli atomi del campione causa l'emissione di elettroni *backscattered*, facenti parte del fascio primario, di raggi X e di elettroni secondari, appartenenti al campione stesso. Questi ultimi vengono catturati dal rivelatore e convertiti in segnali elettrici utilizzati per generare l'immagine mostrata sul monitor [49]. Il limite del dispositivo è rappresentato dalla necessità di trattare i campioni prima che di osservarli al SEM. La preliminare preparazione dei campioni gli permette di resistere sia al vuoto spinto generato nel macchinario, necessario affinché gli elettroni si propaghino, sia all'irraggiamento. I provini non conduttivi vengono quindi ricoperti da un sottile strato di materiale conduttore (generalmente oro) depositato sul campione attraverso un processo di *sputtering*.

In questo lavoro di tesi, dalle membrane realizzate, sono stati prelevati dei campioni di dimensioni ridotte, in seguito tali campioni sono stati posizionati su *stub* precedentemente ricoperti di nastro biadesivo conduttivo. Prima di posizionare gli *stub* nel supporto della camera porta-campione del SEM si è proceduto alla deposizione di un sottile strato d'oro sui campioni. Il processo di sputtering è stato eseguito con lo strumento Agar Auto Sputter Coater impostando un tempo di lavoro pari a 50 s e una corrente di 30 mA. A seguito della preparazione, i provini sono stati inseriti nella camera-porta campione del microscopio a scansione elettronica LEO 435VP SEM per essere poi analizzati. Per un adeguata ricostruzione delle immagini a diversi ingrandimenti (1000x, 2000x e 5000x) sono state impostate dall'operatore una distanza lente-campione pari a 15mm e una tensione del fascio di 20 kV. Entrambe le apparecchiature, di cui si riportano le immagini in figura 17, sono state messe a disposizione dal laboratorio di Alessandria del Politecnico di Torino.



Figura 18: Agar Auto Sputter Coater e LEO 435VP SEM

2.2.3 Analisi delle immagini

Per valutare le dimensioni dei diametri delle fibre, le immagini ottenute al SEM sono state esaminate attraverso il software ImageJ (National Institute of Health, USA). Usando il comando *measure*, sulle immagini ad ingrandimenti maggiori (5000x), sono stati ricavati 50 diametri per ogni campione. Successivamente, i dati acquisiti, riportati in un foglio di lavoro Excel, sono stati utilizzati per calcolare il diametro medio, la deviazione standard e realizzare i grafici relativi alle distribuzioni dei diametri.

2.3 Caratterizzazione chimico/fisica

2.3.1 Spettroscopia infrarossa FTIR-ATR

La spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FTIR) in riflettanza totale attenuata (ATR) è una tecnica spettroscopica di assorbimento utilizzata per lo studio dei legami chimici del campione preso in esame.

La radiazione infrarossa è la parte dello spettro elettromagnetico compresa tra la zona del visibile e le microonde; la regione di maggior interesse per la caratterizzazione chimico/fisica è compresa tra i 4000 e i 400 cm^{-1} . Quando una molecola viene investita da una radiazione IR ad una certa frequenza questa passa dal suo stato vibrazionale fondamentale ad uno stato vibrazionale eccitato, acquisendo energia.

I moti vibrazionali possono essere di due tipi:

- **Stretching** (stiramento): movimento periodico lungo l'asse di legame tra gli atomi, con conseguente aumento o diminuzione della distanza interatomica;
- **Banding** (piegamento): dovuta ad una variazione dell'angolo di legame o ad uno spostamento di più atomi rispetto al resto della molecola. Le vibrazioni di tipo *banding* possono a loro volta essere classificate in vibrazioni di *twisting* (torsione), *rocking* (oscillazione nel piano) e *wagging* (oscillazione fuori dal piano)

Lo spettro IR si presenta come una serie di bande di assorbimento (picchi), di diversa intensità, posizionate in funzione del numero d'onda. L'intensità delle bande può essere espressa sia in termini di assorbanza che di trasmittanza. Quest'ultima è definita come il rapporto tra la potenza radiante trasmessa dal campione e la potenza radiante incidente sul campione.

Nella spettroscopia FTIR-ATR la radiazione infrarossa passa attraverso un particolare cristallo (Germanio, Diamante o ZnSe), trasparente agli IR, all'interno del quale viene riflessa totalmente. Per effettuare la caratterizzazione si posiziona il campione a contatto con la superficie del cristallo, in modo che ogni qual volta la radiazione si riflette all'interno del cristallo, essa penetri nel materiale per qualche frazione di micron attenuandosi. Dopo diverse riflessioni, la radiazione attenuata in uscita dal cristallo viene rilevata attraverso un interferometro, che trasforma l'onda in un interferogramma, in cui l'assorbimento è descritto in funzione del tempo. In seguito, il software associato al macchinario calcola la trasformata

di Fourier dell'interferogramma trasformandolo nel tipico spettro IR in funzione del numero d'onda della radiazione.

In questo lavoro di tesi è stato utilizzato il dispositivo Frontier FT-IR Spectrometer prodotto dalla Perkin Elmer messo a disposizione dalla sede di Alessandria del Politecnico di Torino. Grazie a questo dispositivo, raffigurato figura 18, è stata effettuata la caratterizzazione chimico/fisica delle membrane in collagene e PEO per valutare l'effettiva presenza dei picchi di assorbanza caratteristici dei due materiali puri. Tale dispositivo consente di visualizzare i picchi di assorbanza, caratteristici delle vibrazioni dei legami, compresi tra i 4000 e i 600 cm^{-1} . Le dimensioni del *range* spettrale analizzabile sono dovute a limitazioni intrinseche del cristallo ATR presente nel dispositivo, che in questo caso è il diamante.



Figura 19: Fotografia dell'apparecchiatura Frontier FTIR Spectrometer adoperata per la caratterizzazione delle membrane

2.4 Analisi termica

2.4.1 Calorimetria differenziale a scansione (DSC)

La calorimetria a scansione differenziale (DSC) è un'efficace strumento analitico per la caratterizzazione delle proprietà fisiche di un polimero. Tale tecnica permette di misurare la differenza di energia fornita al campione e al materiale di riferimento, per mantenerli alla stessa temperatura riscaldando o raffreddando il campione in esame e il riferimento in maniera controllata. I risultati vengono forniti sotto forma di grafico in funzione della temperatura. La DSC è una tecnica di analisi termica molto utilizzata per lo studio del

comportamento dei materiali perché le caratteristiche energetiche misurate tramite calorimetria hanno un chiaro significato fisico.

Infatti tale tecnica consente di valutare le transizioni termiche, siano esse fenomeni esotermici o endotermici, che diversi materiali presentano, come: la temperatura di transizione vetrosa (T_g); la temperatura di fusione (T_m); la temperatura di cristallizzazione (T_k) e la temperatura di ossidazione.

In questo lavoro di tesi la DSC è stata usata sulle membrane a base di collagene e PEO per valutare la temperatura di denaturazione (T_d) del collagene e la corrispondente variazione di entalpia (ΔH).

Il macchinario presenta due crogioli, in uno dei quali viene posizionato il campione da esaminare, mentre l'altro, mantenuto vuoto, viene utilizzato come riferimento per la misura differenziale. La fornace all'interno della quale è stato posizionato il campione viene chiusa ermeticamente dall'unità di controllo. L'esperimento si svolge in atmosfera inerte ottenuta, nel caso in esame, con un flusso continuo di azoto (N_2) di 50 ml/min. Per effettuare le prove, sul calcolatore collegato al dispositivo, è stato impostato il seguente programma termico:

- Rampa di temperatura da 25°C a 200°C con velocità pari a 10°C/min;
- 200°C per 5min;
- Rampa di temperatura da 200°C a 25°C con velocità pari a -10°C/min;
- 200°C per 5 min;
- Rampa di temperatura da 25°C a 200°C con velocità pari a 10°C/min.

Nel corso dell'esperimento i dati relativi alla temperatura sono stati trasferiti al calcolatore ed elaborati per mezzo di un apposito software in modo da ottenere come *output* la curva caratteristica del campione esaminato (T_{sample} [°C], *Heat flow* [J/g]).

Il test è stato svolto con la DSC presente nei laboratori del KTH Royal Institute of Technology di Stoccolma.

2.5 Prove di degradazione

Le membrane realizzate sono state sottoposte a prove di degradazione idrolitica per valutarne la stabilità in ambiente acquoso. I test sono stati effettuati prelevando dal collettore dei campioni di circa 2 cm x 2cm che sono stati poi immersi in PBS (tampone fosfato salino) e mantenuti in incubatore a 37° per diversi periodi di tempo. Terminato il periodo di incubazione, la soluzione tampone è stata rimossa dai campioni; in seguito sono stati effettuati 3 risciacqui in acqua bidistillata per eliminare eventuali residui di PBS.

Successivamente le membrane sono state congelate. Una volta congelati, i campioni sono stati inseriti nel liofilizzatore, messo a disposizione dai laboratori del DIMEAS del Politecnico di Torino. Il liofilizzatore presenta:

- Una ***cabina*** per alloggiare il materiale resistente a condizioni di sottovuoto;
- Un ***sistema refrigerante*** in grado di abbassare drasticamente la temperatura;
- Un ***sistema di elettrovalvole e pompa a vuoto*** in grado di generare e controllare il vuoto all'interno della cabina.

Durante il processo di liofilizzazione i campioni vengono mantenuti ad una temperatura di -53°C e ad una pressione di 0,01 mbar. In tali condizioni, l'acqua congelata contenuta nei campioni tende a sublimare trasformandosi in vapore.

Successivamente, la morfologia dei campioni degradati a 30', 24h e 72h è stata osservata al SEM e confrontata con la morfologia della membrana originale non degradata.



Figura 20: a) Liofilizzatore Scanvac Coolsafe 55-4; b) Pompa a vuoto; c) Incubatore

2.6 Prove meccaniche

Per valutare la resistenza meccanica delle membrane elettrofilate sono state svolte diverse prove di trazione mediante il dispositivo MTS QTest/10 disponibile nel Laboratorio del DIMEAS del Politecnico di Torino.



Figura 21: MTS QTest/10 utilizzato per le prove meccaniche

Come mostrato in figura 20, la membrana viene posizionata verticalmente tra i due afferraggi montati su altrettante traverse. Il primo afferraggio è collegato, tramite una cella di carico, alla traversa mobile presente nella parte superiore del dispositivo, mentre il secondo viene fissato alla traversa inferiore fissa. Durante la prova la traversa mobile si allontana dalla traversa inferiore, ad una velocità costante preimpostata, esercitando una forza di trazione sul provino e causandone la deformazione. Sul campione si genera una forza crescente, opposta alla forza di trazione, che viene misurata dalla cella di carico. Inoltre, l'estensimetro contenuto nella cella misura anche l'allungamento del campione. A seguito del termine della prova, decretato dalla rottura del campione, il software del dispositivo, Testworks 4, restituisce i valori della forza in funzione dell'allungamento.

Le prove sono state effettuate su campioni rettangolari delle membrane nanofibrose caratterizzate da diverse concentrazioni di reticolante. Per ogni tipologia di membrana sono state effettuate 4 prove. Le dimensioni dei campioni in termini di larghezza, spessore e tratto

utile (distanza tra i due afferraggi) sono state misurate con un calibro digitale. Per le prove è stata utilizzata una cella di carico del valore di 10N ed è stata impostata una velocità di spostamento della traversa mobile pari a 2 mm/ min.

I dati acquisiti durante il test sono stati in seguito esportati su Excel per essere elaborati e per ricavare, di ogni prova, la curva sforzo-deformazione corrispondente ed il relativo modulo elastico, calcolato sulla parte lineare della suddetta curva. In seguito dai moduli di Young ottenuti per i 4 campioni di ogni tipologia di membrana sono state ricavate media e deviazione standard.

2.7 Bioreattore IVTech

La stabilità delle membrane in condizioni dinamiche *in vitro* è stata valutata attraverso il Bioreattore IVTech (Figura 17) presente nel laboratorio del DIMEAS del Politecnico di Torino.

<i>IVTech Bioreactor</i>	
Dimensioni [w×l×h, cm]	21.5×16×14.5
Alimentazione	12 V; 7.2 W
Flow rate range [μ L/min]	100-450
Peso	1.2 Kg
Diametro delle membrane [mm]	25
Spessore delle membrane [mm]	> 0.1

Tabella 5: Specifiche Bioreattore IVTech

Tale bioreattore si compone, nella sua configurazione più semplice, di una pompa peristaltica, un *reservoir* e una camera di coltura. La pompa peristaltica, denominata LiveFlow dalla casa produttrice, si presenta come un apparecchiatura compatta, di dimensioni e peso ridotti, con due teste rimovibili che guidano quattro circuiti fluidici

indipendenti. Il sistema è dotato di un interfaccia *user friendly* attraverso la quale è possibile impostare il *flow rate* desiderato in un *range* tra i 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ e i 450 $\mu\text{l}/\text{min}$.

La camera di coltura adoperata, Livebox2 (LB2), è stata sviluppata per modellare *in vitro* le barriere fisiologiche presenti, ad esempio, nell'intestino e nei polmoni. LB2 è una camera trasparente che presenta due inlet e due outlet per il medium e un supporto (*holder*) per la membrana. Tale membrana viene posizionata al centro della camera dividendo quest'ultima in due sezioni attraverso cui è possibile far fluire il medium in direzione tangenziale o trasversale.

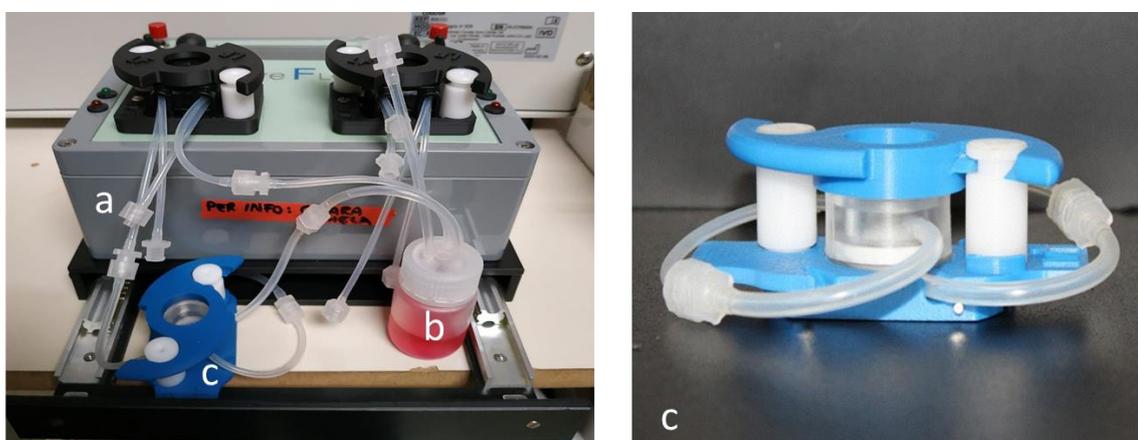


Figura 22: Bioreattore IVTech, (a) pompa peristaltica (b) reservoir (c) camera di coltura

In questo studio, il design della camera di coltura ha permesso di mimare le condizioni fisiologiche presenti nella barriera aria-sangue degli alveoli polmonari.

Si riporta una semplice spiegazione del funzionamento del sistema descritto nel suddetto caso di applicazione. Inizialmente la membrana è stata fissata al supporto (*holder*) ed inserita all'interno del bioreattore. Dopo l'impostazione del flow rate, il medium viene prelevato dal *reservoir* e, grazie all'azione della pompa peristaltica, viene fatto fluire attraverso il circuito collegato alla parte inferiore della camera; la membrana viene quindi perfusa dal medium che, attraverso l'outlet, esce dalla camera di coltura per ritornare nel *reservoir*. Più nello specifico, come mostrato in figura 18, nella parte inferiore della camera è stato impostato un flusso tangenziale con velocità tipiche dei capillari sanguigni polmonari ($\approx 1 \text{ cm/s}$); mentre, nella parte superiore della camera, la membrana è stata interfacciata con l'aria.

La membrana è stata mantenuta all'interno del bioreattore per 72h. Successivamente, è stata caratterizzata tramite SEM, in modo da confrontarne la morfologia con il campione iniziale e con una membrana identica posta in DMEM per 72h in condizioni statiche.

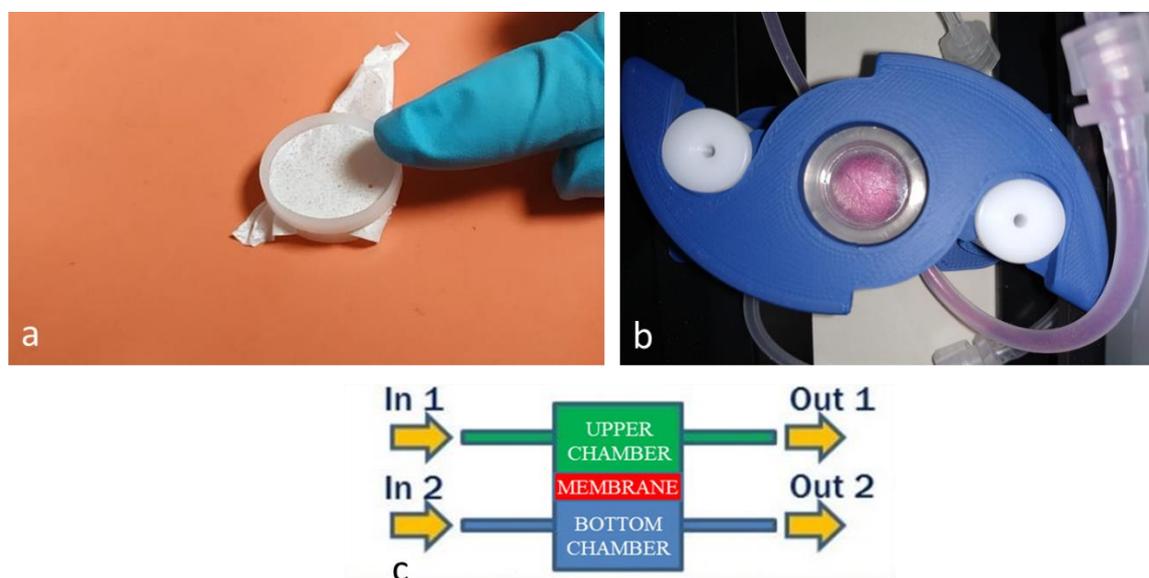


Figura 23: a) Posizionamento della membrana nell'*Holder*; b) membrana all'interno della camera di coltura; c) schematizzazione del flusso tangenziale attraverso la camera

2.8 Prove cellulari

In questo lavoro di tesi sono stati svolti dei test preliminari di coltura cellulare con fibroblasti di topo (3T3) commercializzati da ATCC, per valutarne la vitalità nelle membrane *random* prodotte. Le prove sono state svolte unicamente sulle membrane ottimizzate, ottenute partendo da una soluzione avente una concentrazione di collagene pari al 9% wt/v, di PEO pari al 4,5% wt/v e contenenti il 15% v/v di DSP e 150 μ l/g in soluzione di GPTMS. La membrana è stata staccata dal foglio di alluminio e da essa sono stati ricavati i campioni, di dimensioni ridotte, successivamente inseriti nei pozzetti di una *multiwell* da 24 in cui sono stati fissati con l'ausilio delle *CellCrownTM* 24. Successivamente le cellule sono state coltivate all'interno dei pozzetti delle multiwell, contenenti le membrane, per 24 e 72 ore.



Figura 24: Multiwell da 24 preparate per le prove cellulari

Il saggio di vitalità è stato condotto con **resazurina**, un indicatore colorimetrico in grado di valutare la vitalità cellulare tramite reazioni di ossido riduzione. Infatti, in presenza dell’NADH (nicotinammide adenina dinucleotide) rilasciato dalle cellule vitali in soluzione, la resazurina si riduce variando il suo colore da blu a rosa.

Prima di effettuare il test di vitalità, le cellule vengono seminate sulle membrane e mantenute in coltura per 24 e 72 ore. Al termine dei rispettivi *time point*, il terreno di coltura viene cambiato e sostituito con il medium contenente la resazurina (un’ora di incubazione). Infine l’emissione della resazurina a 590 nm a seguito di un eccitazione a 530 nm è stata valutata per mezzo del *plate reader* (*VICTOR X3* prodotto da *Perkin Elmer*) presente nei laboratori della sede di Alessandria. Infatti l’intensità del segnale che viene misurato dallo strumento è direttamente proporzionale al numero di cellule ancora vive.

Il LIVE/DEAD test effettuato è invece un test fluorimetrico che consente di discriminare le cellule vive da quelle morte avvalendosi di immagini in fluorescenza. Le immagini vengono ottenute utilizzando due coloranti: la **calceina** e l’**etidio** che si legano rispettivamente alle cellule vive (colorandole di verde) e alle cellule morte (colorandole di rosso). In quest’ultimo caso l’etidio viene internalizzato dalle cellule, aventi la membrana cellulare danneggiata, legandosi agli acidi nucleici e non interagisce dunque con le cellule vive.

III. RISULTATI E DISCUSSIONE

1.1 Ottimizzazione dei parametri

Per la realizzazione delle membrane nanofibrose, come già accennato nel capitolo precedente, è stato necessario ottimizzare sia i parametri di soluzione che i parametri di processo della tecnica dell'electrospinning.

Le prime prove sono state effettuate partendo da un *blend* contenente collagene e PEO disciolti in acido cloridrico. Le concentrazioni indagate sia dei soluti sia del solvente sono riportate nella tabella sottostante.

<i>Collagene</i> [%w/v]	<i>PEO</i> [%w/v]	<i>Solvente</i>	<i>Reticolante</i>	<i>Codice</i>
2	2	HCl 10mM	DSP 1M 7,5% v/v _{Col}	COLL1
2	1	HCl 10mM	DSP 1M 7,5% v/v _{Col}	COLL2
3	3	HCl 10mM	DSP 1M 7,5% v/v _{Col}	COLL3
3	3	HCl 50mM	DSP 1M 7,5% v/v _{Col}	COLL4
2	2	HCl 50mM	DSP 1M 7,5% v/v _{Col}	COLL5

Tabella 6: Miscele realizzate usando come solvente HCl

Al fine di ottenere le nanofibre, per ogni soluzione è stato necessario variare i parametri di processo dell'electrospinning in termini di:

- Tensione: da 20 a 30 kV
- Distanza tra ugello e collettore: da 10 a 20 cm
- *Flow rate*: da 1,04 a 4,58 ml/h

Malgrado l'elevato *range* di valori investigati, le prove effettuate, partendo dalle soluzioni sopracitate, non hanno portato alla formazione di fibre. La mancata processabilità delle soluzioni attraverso la tecnica dell'*electrospinning* è stata attribuita al tipo di solvente utilizzato per le concentrazioni di soluto testate.

È stato dunque necessario cambiare il solvente in cui le polveri di collagene e PEO sono state disperse. Pertanto, partendo da un protocollo presente in letteratura di *Liu* e colleghi

[35] sono state preparate diverse soluzioni utilizzando come solvente acido acetico al 20% (v/v). Le soluzioni prodotte con l'utilizzo di tale solvente che hanno consentito di ottimizzare il *blend*, sono riportate in tabella.

<i>Collagene</i> [%w/v]	<i>PEO</i> [%w/v]	<i>Solvente</i>	<i>Reticolante</i>	<i>Codice</i>
7.5	3.75	A.A 20%	DSP 1M 10% v/v _{Col}	COLL7.5
8	4	A.A 20%	DSP 1M 15% v/v _{Col}	COLL8
9	4.5	A.A 20%	DSP 1M 15% v/v _{Col}	COLL9
9	4.5	A.A 20%	GPTMS 92 µl per g di Col	COLL10
9	4.5	A.A 20%	DSP 1M 15% v/v _{Col} + GPTMS 92 µl per g di Col	COLL11
9	4.5	A.A 20%	DSP 1M 10% v/v _{Col} + GPTMS 150 µl per g di Col	COLL12
9	4.5	A.A 20%	DSP 1M 15% v/v _{Col} + GPTMS 150µl per g di Col	COLL13
9	4.5	A.A20%	DSP 1M 20% v/v _{Col} + GPTMS 150µl per g di Col	COLL14
9	4.5	A.A 20%	DSP 1M 10% v/v _{Col} + GPTMS 150 µl per g di Col + <i>Rose bengal</i>	COLL15
9	4.5	A.A 20%	<i>Rose bengal</i>	COLL16

Tabella 7: Schematizzazione delle principali prove effettuate per l'ottimizzazione della soluzione

I *blend* sopra elencati sono stati ottenuti mantenendo un rapporto 2:1 v/v tra le soluzioni di collagene e di PEO in quanto precedenti test avevano mostrato una viscosità troppo elevata delle miscele realizzate a partire da un rapporto 1:1 v/v (collagene/PEO). Queste soluzioni risultavano pertanto difficilmente processabili tramite *electrospinning*.

Un'ottimizzazione dei parametri di processo è stata necessaria per favorire l'elettrofilatura delle soluzioni preparate e, successivamente, per migliorare la morfologia delle fibre ottenute riducendone i difetti.

In tabella 8 sono state riassunte le prove più significative effettuate con il processo dell'*electrospinning* a partire dalle soluzioni sopra elencate. In particolare, per ogni prova sono stati riportati la distanza, il voltaggio e il *flow rate* impostati nell'apparecchiatura.

<i>Codice Soluzione</i>	<i>Tensione [kV]</i>	<i>Flow rate [ml/h]</i>	<i>Distanza [cm]</i>	<i>Codice membrana</i>
COLL7.5	12	1,02	6	
COLL7.5	15	1,02	6	
COLL7.5	15	1,78	6	
COLL7.5	18	1,78	8	
COLL7.5	18	1,78	10	
COLL7.5	20	1,78	10	COLL7.5_best
COLL8	20	1,78	10	COLL8_best
COLL9	20	1,78	10	COLL9
COLL9	18	2,54	10	
COLL9	20	2,54	10	COLL9_best
COLL10	20	2,54	10	COLL10
COLL11	20	2,54	10	COLL11
COLL12	30	1,5	10	COLL12
COLL13	30	1,5	10	COLL13
COLL14	30	1,5	10	COLL14
COLL15	30	1,5	10	COLL15
COLL16	30	1,5	10	COLL16

Tabella 8: Parametri di processo indagati nelle diverse soluzioni elettrofilate

Come già accennato nel capitolo precedente le prove sono state effettuate modificando un solo parametro per prova. Nel caso del COLL7.5 la morfologia migliore è stata ottenuta impostando un voltaggio di 20kV, un *flow rate* di 1,78 ml/h e una distanza tra collettore e ugello di 10 cm. In seguito, mantenendo costanti i parametri di processo, sono state variate le concentrazioni dei polimeri in soluzione al fine di valutarne l'influenza sulla formazione e sulla morfologia delle fibre. Pertanto sono state ottenute membrane nanofibrose a partire da soluzioni con concentrazione di collagene rispettivamente pari all' 8% wt/v (COLL8) e al 9% wt/v (COLL9). Al fine di ottenere una migliore ottimizzazione del protocollo di

fabbricazione delle membrane polimeriche, i parametri di processo sono stati ulteriormente variati (tabella 8 codice COLL9_best).

2.2 Caratterizzazione morfologica

Di seguito vengono riportate le immagini ottenute al microscopio a scansione elettronica delle prove effettuate e le relative distribuzioni dei diametri, ricavati con il software ImageJ descritto nel paragrafo 2.2.3 del capitolo precedente.

Inizialmente sono state indagate diverse concentrazioni dei polimeri (come evidenziato in tabella 7). Confrontando le immagini SEM delle membrane (Figura 25) è stato possibile determinare la concentrazione che permette di ottenere fibre uniformi e con pochi difetti.

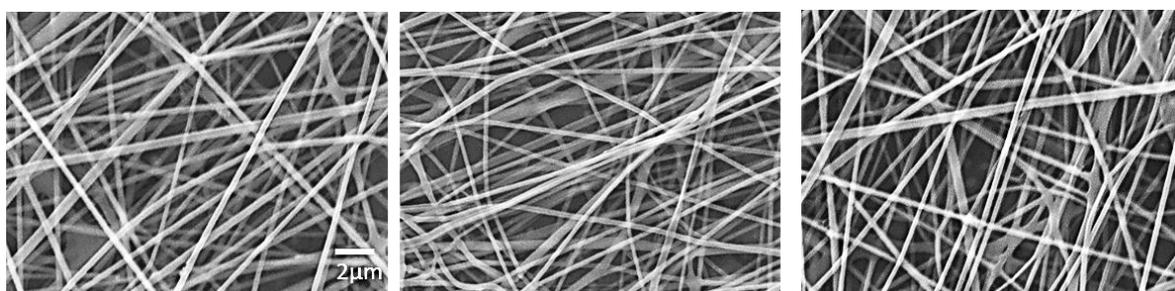
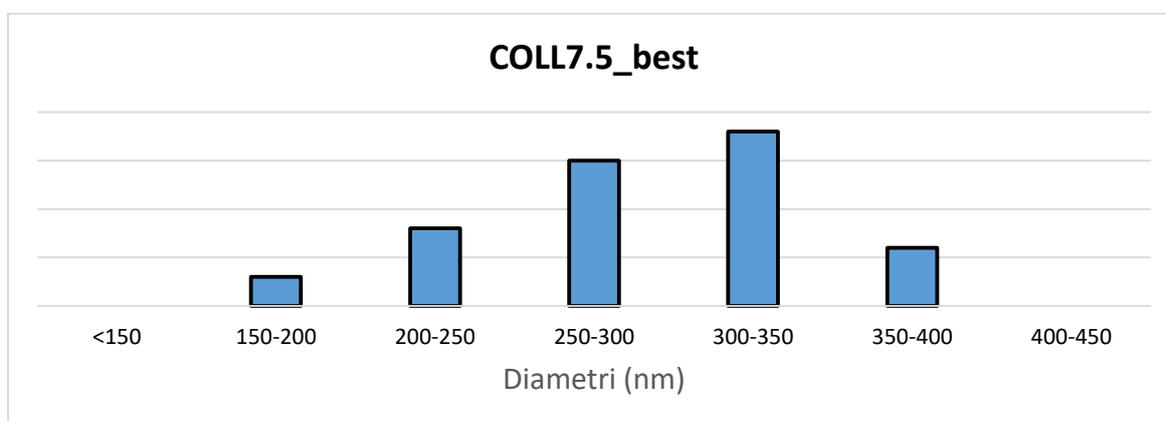


Figura 25: Immagini SEM 5000x delle membrane a) COLL9_1, b) COLL8_best e c) COLL7.5_best

Le immagini mostrano le fibre ottenute partendo da una concentrazione iniziale di collagene rispettivamente del a) 9%, b) 8% e c) 7,5% (wt/v). I risultati migliori sono stati ottenuti con una concentrazione iniziale di collagene del 9% wt/v e di PEO pari al 4.5% wt/v (Codice COLL9_best). Si riportano le distribuzioni dei diametri corrispondenti alle membrane *random* appena illustrate:



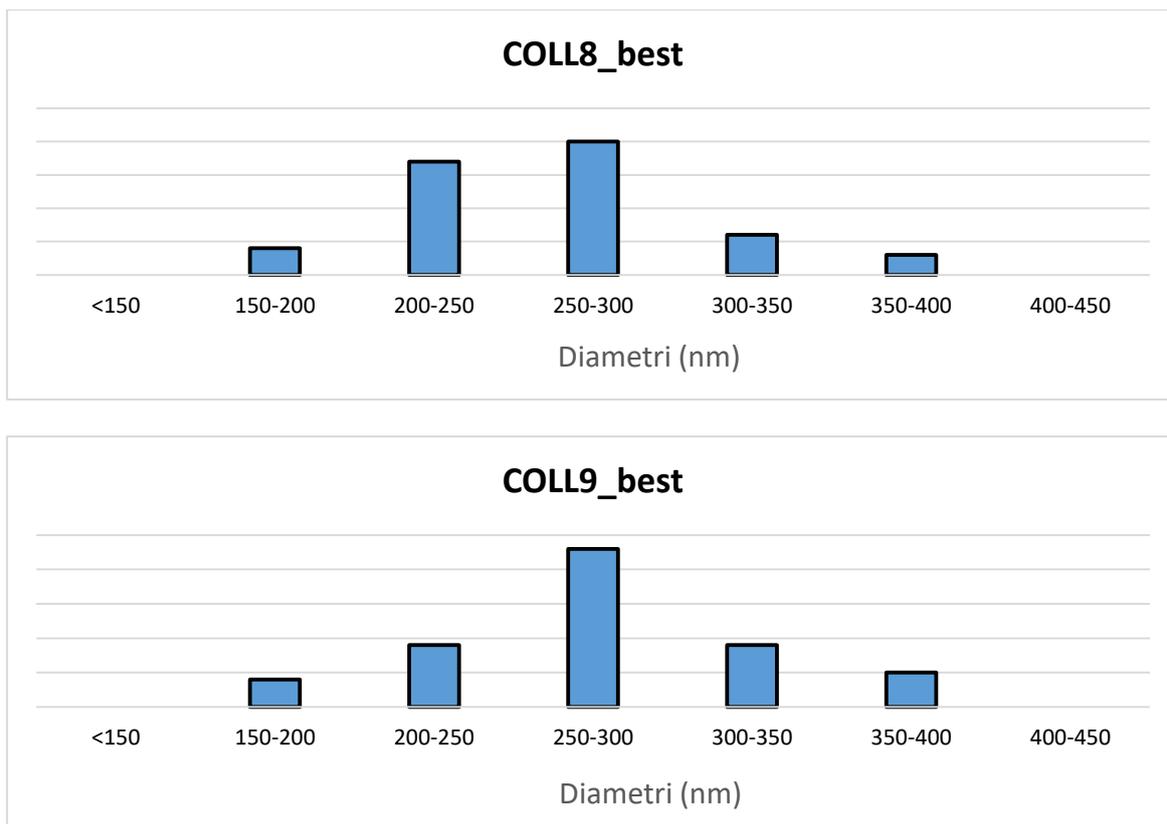


Figura 26: Distribuzione dei diametri delle fibre a) COLL7.5_best, b) COLL8_best, c) COLL9_best

Dai grafici della distribuzioni dei diametri si può notare come questa sia molto più uniforme nel caso delle fibre prodotte con una soluzione avente concentrazione iniziale di collagene pari al 9%. Si può inoltre osservare che in tutte e tre le tipologie di nanofibre la variazione dei diametri è contenuta in un *range* tra i 150 e i 400 nm, con un elevata concentrazione intorno ai 250-300 nm. Ciò porterebbe a pensare che le dimensioni delle fibre siano indipendenti dalla concentrazione iniziale di soluti.

Malgrado i buoni risultati ottenuti in termini di morfologia delle nanofibre, tali membrane non risultavano stabili in ambiente acquoso, perciò è stato necessario modificare le concentrazioni di DSP e aggiungere come ulteriore reticolante il GPTMS. Si riportano le immagini SEM delle membrane realizzate usando come reticolante il solo GPTMS (COLL10), la combinazione di GPTMS e DSP (COLL11), il caso precedente in cui era stato utilizzato solo DSP (COLL9_best) e le corrispondenti distribuzioni dei diametri (Figure 27 e 28).

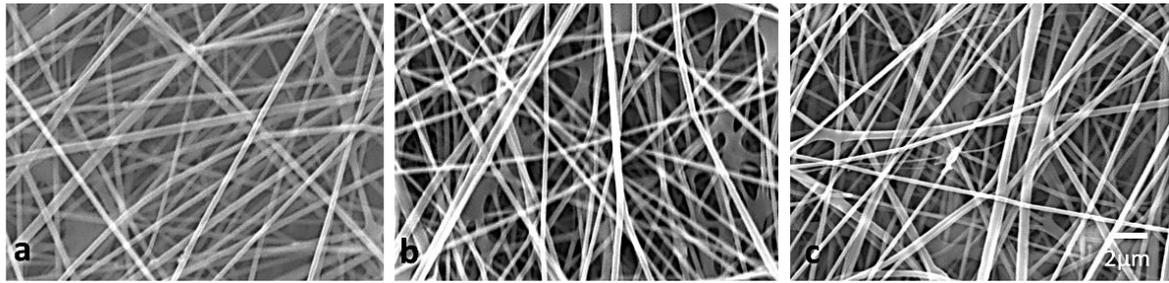


Figura 27: immagini SEM a) COLL9_best; b) COLL10; c) COLL11

La morfologia migliore rimane quella ottenuta nel caso precedente (COLL9_best), mentre negli altri due casi si può notare la presenza di diversi difetti superficiali.

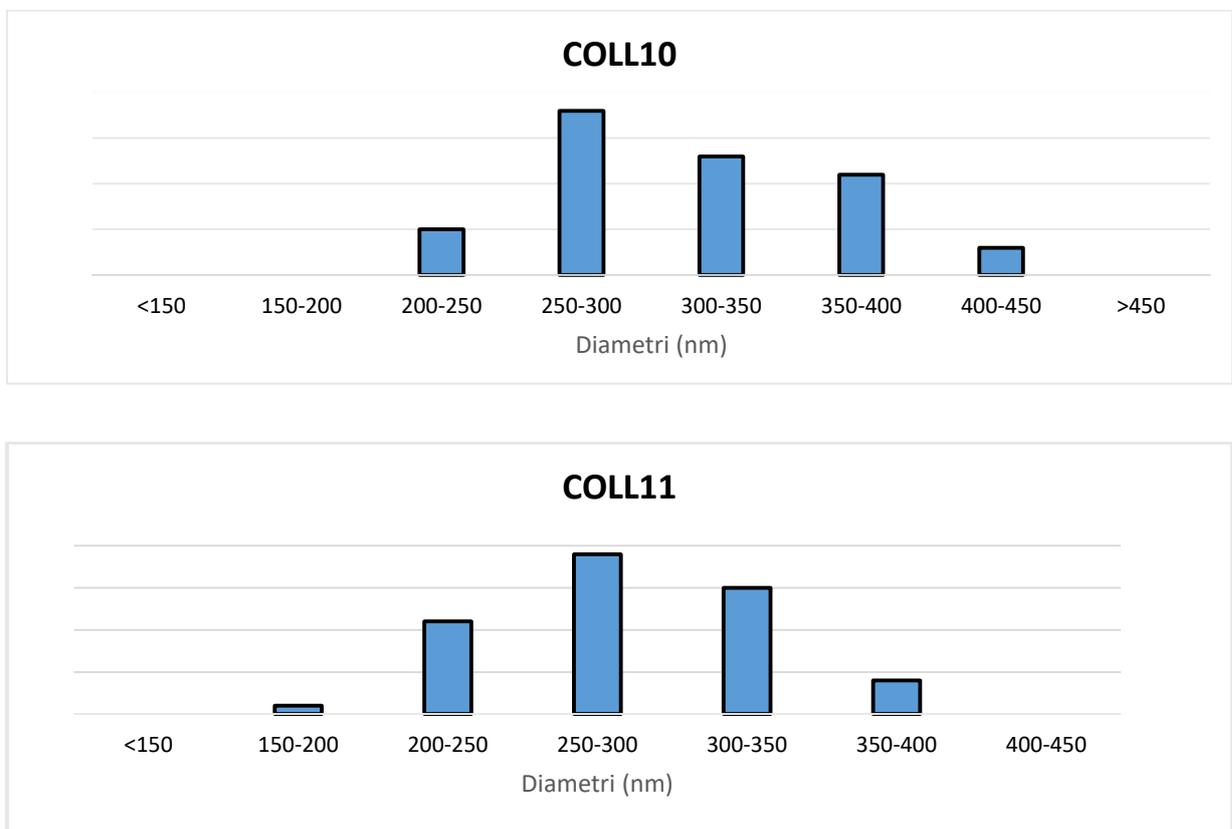


Figura 28: Distribuzione dei diametri di COLL10 e COLL11

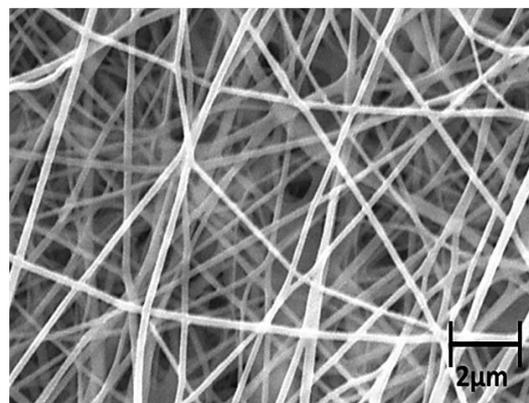
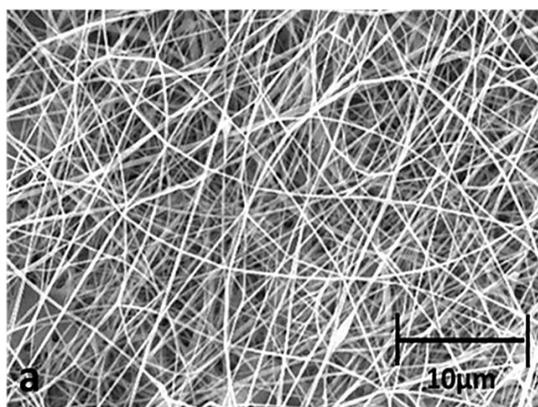
Gli istogrammi della distribuzione dei diametri non evidenziano significative variazioni rispetto ai casi precedenti. Anche in questo caso si riscontra una maggiore concentrazione dei diametri nel range compreso tra i 250 e i 300 nm. Per completezza si riportano i valori medi dei diametri delle fibre nei diversi casi studiati.

	COLL7.5_best	COLL8_best	COLL_9best	COLL10	COLL11
<i>Diametro fibre (nm)</i>	287 ± 24	328 ± 26	266 ± 25	286 ± 22	313 ± 25

Tabella 9: Diametri medi delle membrane nanofibrose *random*

Le variazioni dei diametri sono poco confrontabili in quanto potrebbero essere dovute a diversi fattori legati principalmente alla tecnica dell'electrospinning tra cui i parametri ambientali quali umidità e temperatura, difficilmente controllabili, e la conseguente bassa riproducibilità del processo. Inoltre, negli ultimi 3 casi, ossia le membrane con concentrazione iniziale pari al 9% contenenti solo il 10% (v/v) di DSP, il 15% di DSP e 92µl/g di GPTMS e solo GPTMS nella suddetta concentrazione, l'aumento del diametro delle fibre potrebbe essere dovuta sia alla variazione di reticolante utilizzato che all'aumento della concentrazione di DSP in soluzione.

Come già detto in precedenza le successive prove sono state effettuate al fine di migliorare la stabilità delle membrane, tale tematica verrà approfondita nel paragrafo successivo. In questo paragrafo si riportano le immagini SEM delle membrane ottenute, non sottoposte ancora a prove di degradazione, per valutare unicamente la morfologia delle fibre prodotte a seguito dell'ottimizzazione sia della soluzione sia dei parametri di processo. Le immagini sottostanti mostrano le membrane ottenute variando la concentrazione dei reticolanti:



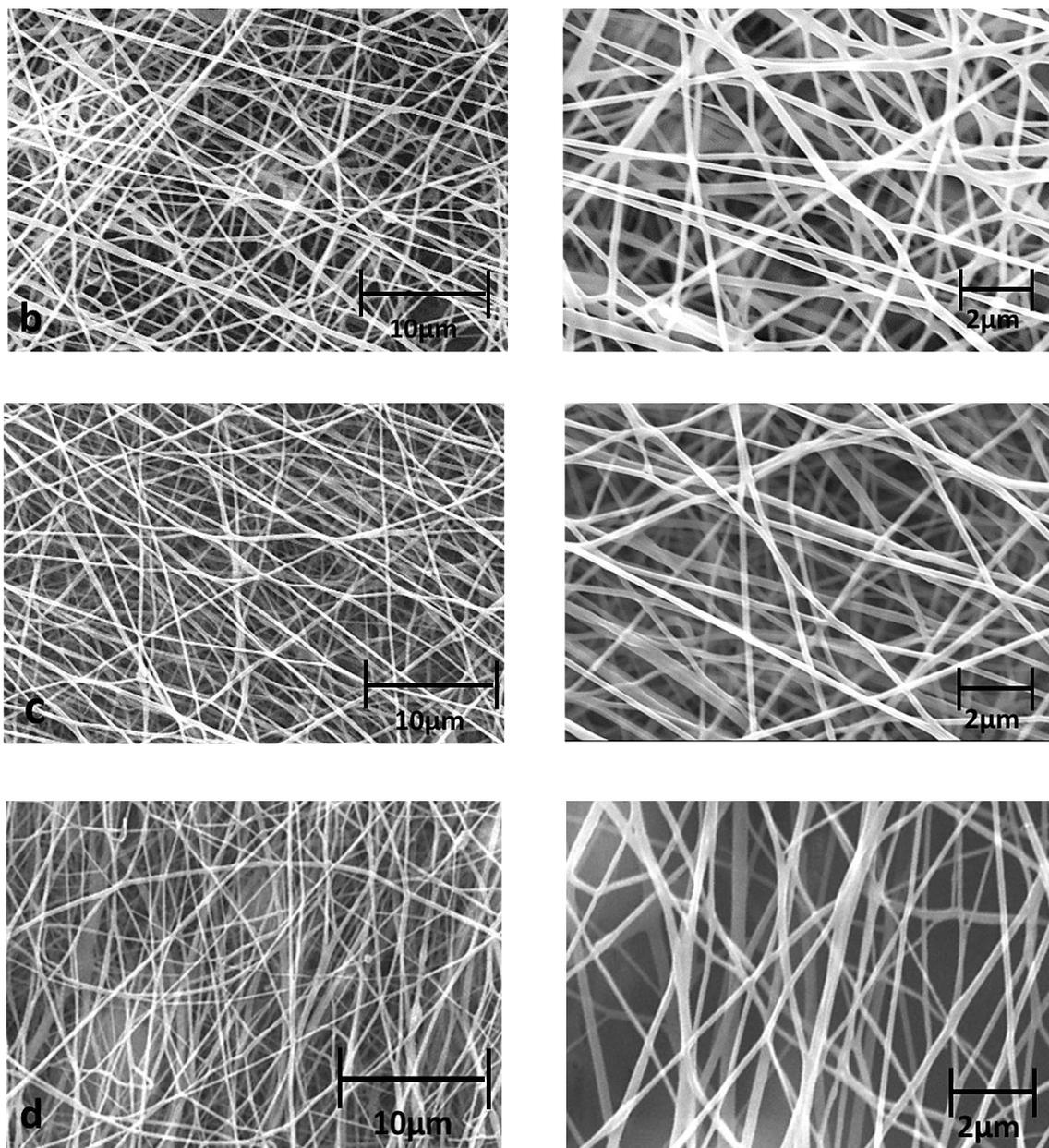
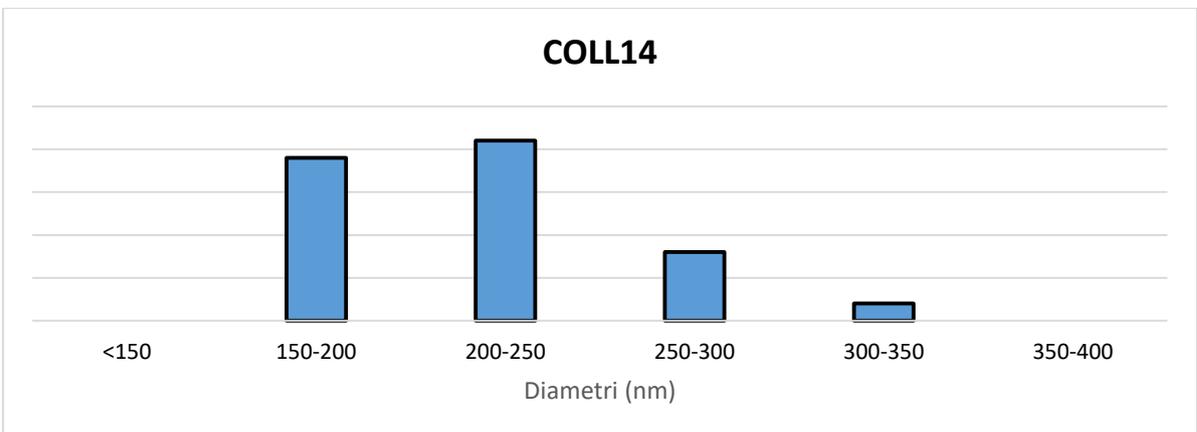
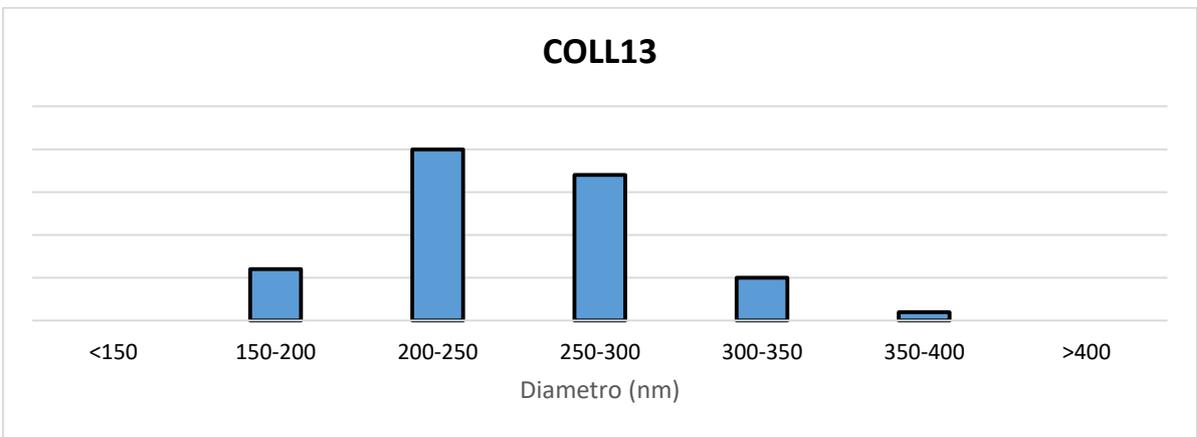
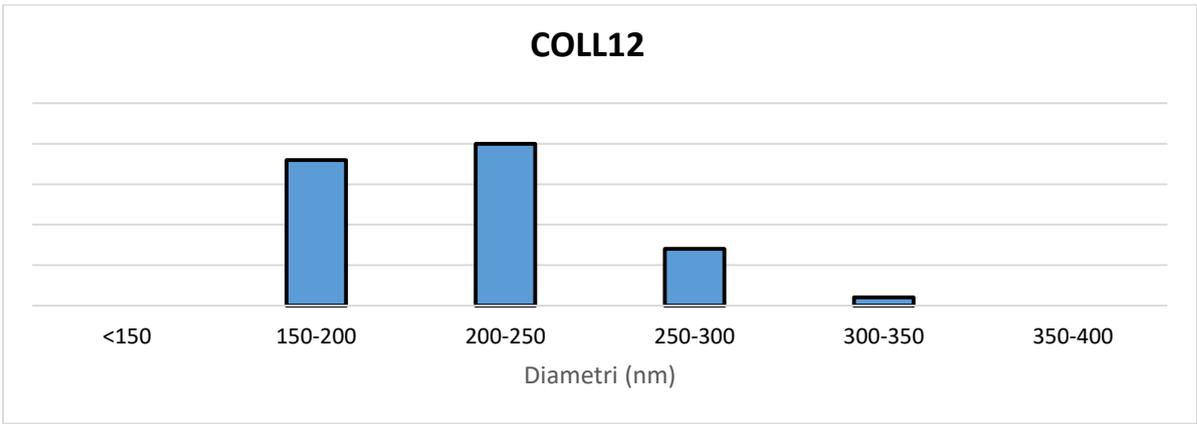


Figura 29: Immagini SEM a 2000x e 5000x di a) COLL12; b) COLL13; c) COLL14; d) COLL15

Si può osservare come in questo caso le membrane aventi fibre con minori difetti superficiali siano quelle corrispondenti al codice COLL14 (DSP 20% e GPTMS 150μl/g). Al contrario, nelle immagini relative alle membrane COLL12, COLL13 E COLL15 si evince come le fibre risultino poco uniformi e siano presenti nastri, dovuti probabilmente ad una scarsa evaporazione del solvente. Saranno dunque necessarie ulteriori prove per migliorare la morfologia delle nanofibre, andando a variare i parametri di processo utilizzati per elettrofilare il materiale.



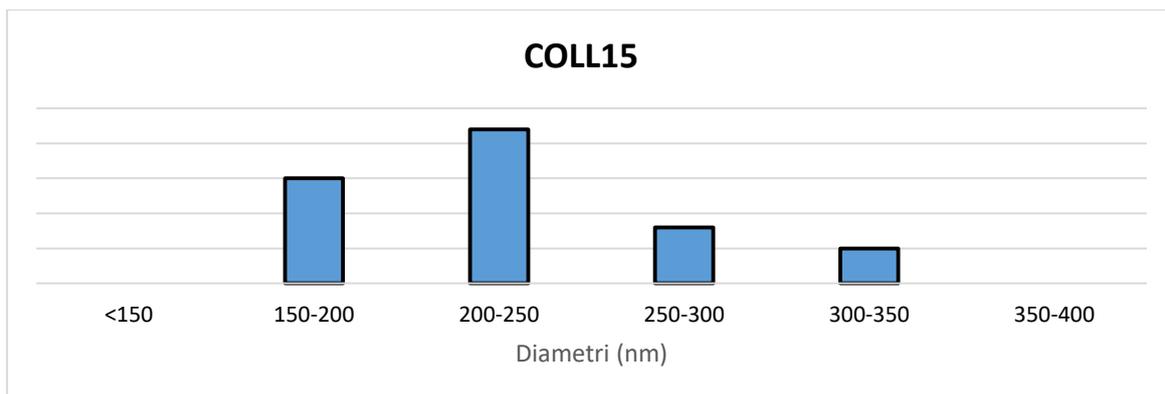


Figura 30: Distribuzioni dei diametri di a) COOL12; b) COLL13; c) COLL14; d) COLL15

	COLL12	COLL13	COLL14	COLL15
<i>Diametro fibre (nm)</i>	217 ± 18	254 ± 23	218 ± 18	229 ± 23

Tabella 10: Diametri medi delle fibre *random*

Come è possibile notare dagli istogrammi relativi alla distribuzione dei diametri e dalla tabella soprastante i diametri sono concentrati principalmente tra i 200 e i 250 nm, c'è dunque una diminuzione della dimensione delle fibre rispetto ai casi precedentemente visti. Tale riduzione potrebbe essere legata ad un aumento della tensione con cui i materiali sono stati processati. Infatti, la differenza di potenziale è stata incrementata da un valore di 20kV a 30kV.

Inoltre, nel caso del COLL15, si può evidenziare come l'aggiunta del *rose bengal* come reticolante non abbia influenzato le dimensioni delle fibre che risultano comparabili con i valori riportati negli altri tre casi.

2.3 Prove di degradazione

In questo lavoro di tesi le membrane nanofibrose sono state immerse in PBS e incubate a 37°C a *time step* di 30 minuti, 24h e 72h, al fine di valutarne la stabilità in ambiente acquoso. Le prove di degradazione sono state effettuate solo sulle membrane prodotte usando sia il DSP che il GPTMS, in quanto la combinazione di tali reticolanti consente di staccare dell'alluminio campioni continui di membrane.

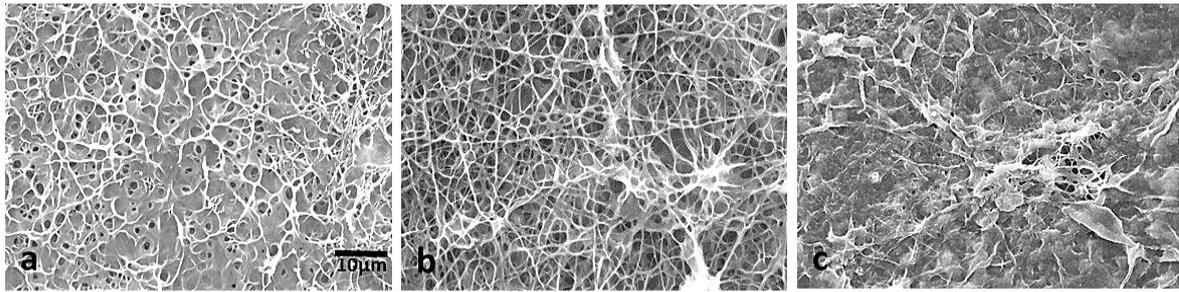


Figura 31: Immagini SEM delle fibre degradate COLL11 a) 30 minuti; b) 24h; c)72h

Le immagini riportate in Figura 31 evidenziano, una progressiva perdita del PEO. Inoltre si evince come a 72h le membrane COLL11 (DSP 15% v/v, GPTMS 92µl/g) perdono quasi totalmente la morfologia iniziale.

Si é resa quindi necessaria una modifica del quantitativo dei reticolanti in soluzione. Nello specifico, è stata incrementata la concentrazione di GPTMS da 92µl a 150µl/g e sono state indagate tre diverse concentrazioni di DSP con valori pari al 10%, 15% e 20% v/v.

Le immagini relative alle prove effettuate (Figura 32) mostrano come aumentando la concentrazione di GPTMS in soluzione, da 92µl/g a 150µl/g, la stabilità delle membrane venga migliorata. Infatti, in tutti e tre i casi sono state ottenute delle membrane stabili fino a 72h. Le immagini hanno messo in luce che i risultati migliori sono stati ottenuti per la membrana COLL13 avente concentrazione iniziale di collagene e di PEO pari rispettivamente al 9% e 4,5% (wt/v), un contenuto di DSP pari al 15% (v/v) e di GPTMS di 150µl/g. Nel suddetto caso l'immagine relativa alle 72 h evidenzia come la morfologia nanofibrosa sia stata preservata, eleggendola la migliore membrana ottenuta tra quelle prodotte.

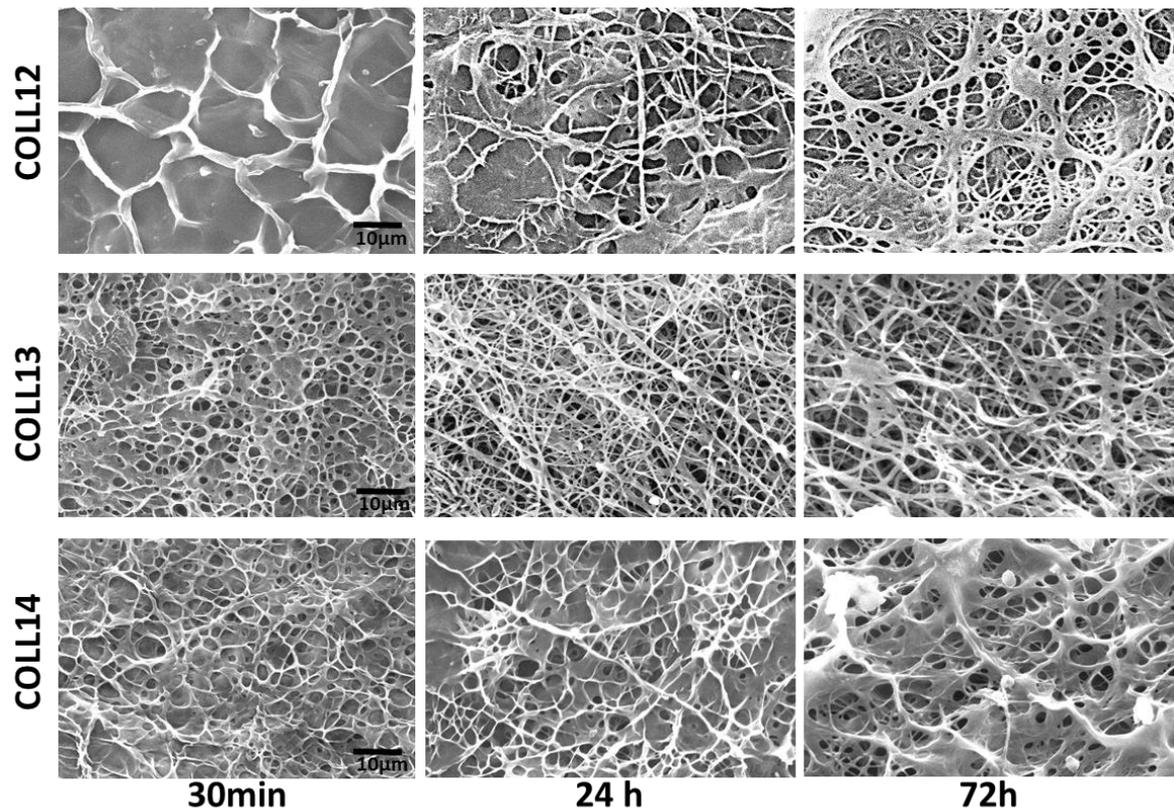


Figura 32: Immagini SEM delle fibre degradate a 30 minuti, 24 ore e 72 ore

2.4 Bioreattore IVTech

La stabilità delle membrane ottimizzate (COLL13) in condizioni dinamiche è stata studiata mediante il bioreattore IVTech descritto nel paragrafo 2.7 del capitolo 2.

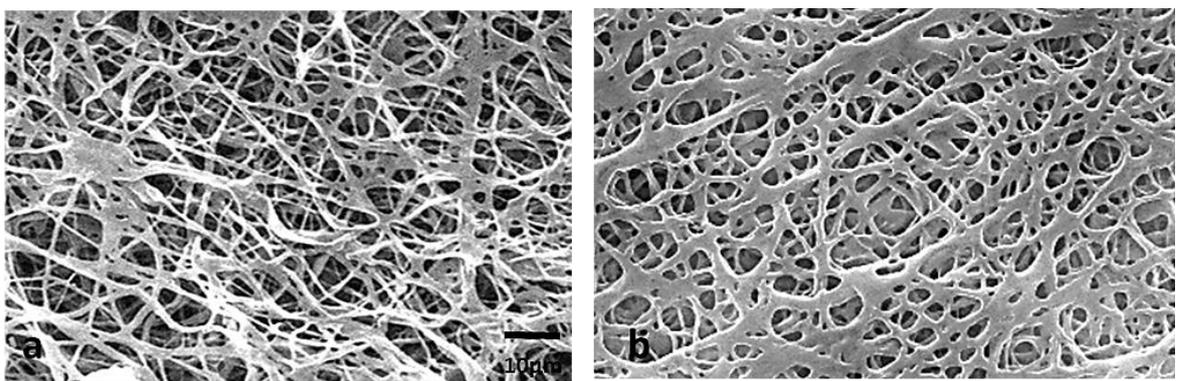


Figura 33: Immagini SEM delle membrane COLL13 degradate mantenute condizioni a) statiche e b) dinamiche

Confrontando le due immagini SEM si può notare che gli sforzi tangenziali dovuti alla continua perfusione della membrana con DMEM, impostando un *flow rate* fisiologico, non sembrano avere influenza sulla struttura delle fibre. La buona resistenza delle membrane suggerisce la possibilità di utilizzarle nella realizzazione di modelli d'organo *in vitro*.

2.5 Prove meccaniche

Le prove meccaniche sono state effettuate su diversi campioni della membrana ottimizzata, corrispondente al codice COLL13. I dati ottenuti dalle prove di trazione sono stati elaborati su Excel per ricavarne il valor medio del modulo di Young e la deformazione percentuale a rottura ($\epsilon\%$), entrambi riportati in tabella 11.

	COLL13
E (MPa)	82 ± 34
ϵ (%)	3 ± 1

Tabella 11: Valor medio del modulo elastico e della deformazione percentuale a rottura

Come si evince dai valori in tabella le fibre prodotte presentano un elevato modulo elastico, che identifica una buona resistenza a trazione del materiale e rispecchia il comportamento fisiologico del collagene di tipo 1 [8]. In contrasto, si nota una ridotta capacità di deformazione del provino che giunge a rottura in corrispondenza di una deformazione percentuale pari al 3%.

I valori del modulo elastico della deformazione percentuale a rottura ottenuti sono concordi con quanto riportato in letteratura per le membrane elettrofilate in collagene nonostante siano stati utilizzati altri cross-linker quali EDC-NHS [41].

Per completezza si riporta la curva sforzo-deformazione ottenuta (Figura 34):

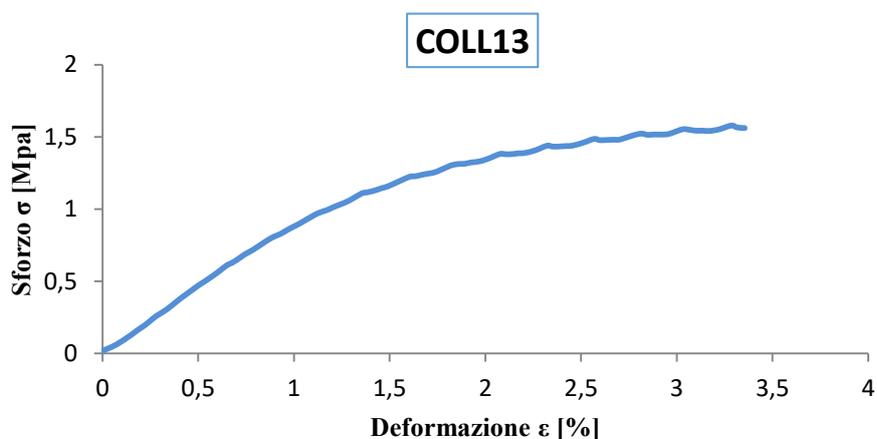


Figura 34: Curva sforzo-deformazione relativa alle membrane ottimizzate

2.6 Caratterizzazione chimico/fisica

In Figura 35 vengono riportati gli spettri FTIR-ATR delle membrane in collagene e PEO COLL13, della polvere di collagene puro e del PEO in polvere.

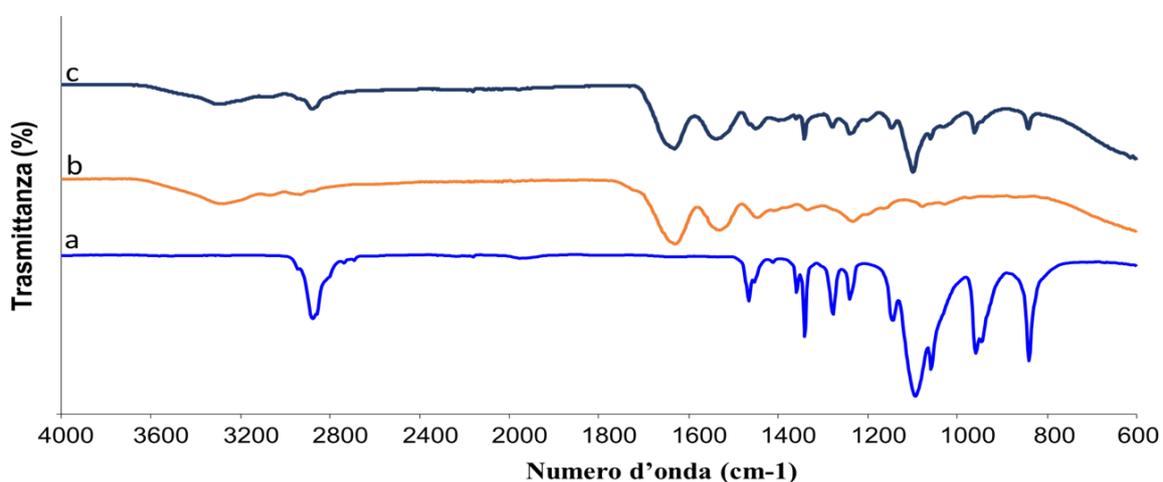


Figura 35: Spettri FTIR-ATR di a) PEO; b) collagene; c) membrana di collagene e PEO

Lo spettro del collagene puro presenta un picco di assorbimento a 3077 cm^{-1} dovuto allo *stretching* dei legami peptidici N-H tra gli amminoacidi in catena. Il picco a 1659 cm^{-1} è invece rappresentativo della banda di assorbimento dell'ammide I e può essere attribuito allo *stretching* di CO- accoppiato a un legame idrogeno, mentre, il picco presente a 1532

cm^{-1} è relativo alla banda di assorbimento dell'ammide 2 ed è dovuto al *bending* del legame N-H in combinazione con lo *stretching* di CN-.

Nello spettro FTIR del PEO sono presenti due picchi caratteristici a 1145 cm^{-1} e 2879 cm^{-1} , dovuti allo *stretching* rispettivamente del legame C-O-C e CH₂. In Figura 35 è inoltre possibile osservare come nello spettro della membrana ottenuta siano preservati tutti i picchi caratteristici del collagene e del PEO. I dati presenti in letteratura supportano i risultati ottenuti nel presente lavoro, dove non si è evidenziata alcuna influenza del PEO sulla struttura del collagene [46]. Inoltre, confrontando gli spettri FTIR-ATR acquisiti con quelli presenti allo stato dell'arte, è possibile associare l'intensità del picco a 1450 cm^{-1} rappresenterebbe una misura dell'integrità della tripla elica del collagene [32].

2.7 Calorimetria differenziale a scansione (DSC)

La DSC è stata utilizzata per valutare il livello di denaturazione del collagene della membrana sottoposta a due cicli di riscaldamento, da 25°C a 200°C con un flow rate di $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

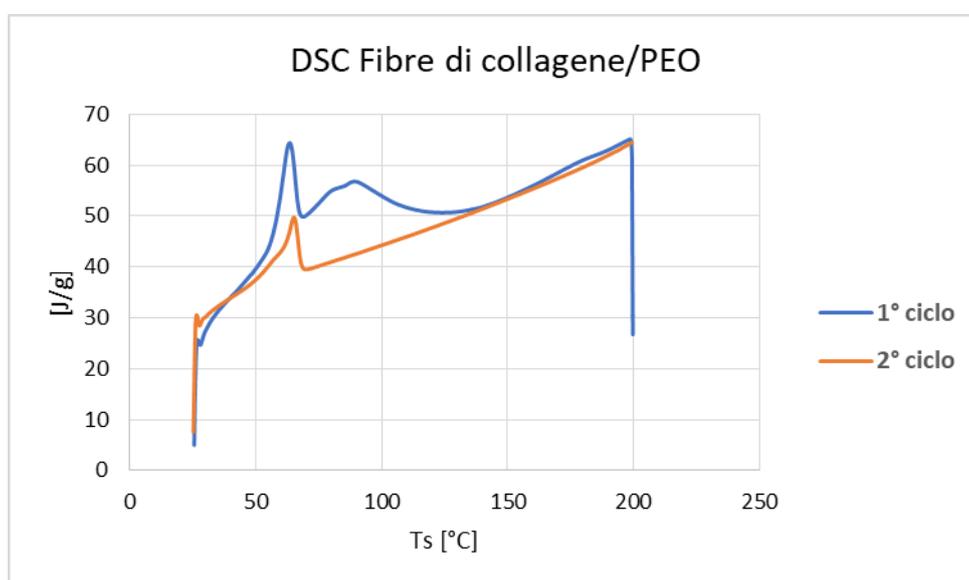


Figura 36: grafico della DSC delle membrane in Collagene e PEO

La curva relativa al primo ciclo di riscaldamento mostra due picchi significativi: il picco intorno ai 65°C , corrispondente alla temperatura di denaturazione del collagene (T_d) e il picco intorno ai 93°C , probabilmente associato all'evaporazione dell'acqua presente nella membrana. Questo picco, infatti non risulta presente nella curva relativa al secondo ciclo di

riscaldamento. Il picco correlato alla Td, invece, è dovuto alla rottura dei legami idrogeno intercatena che stabilizzano la tripla elica del collagene. Il valore ottenuto nel caso esaminato è molto simile ai parametri termici riscontrati in letteratura per il collagene bovino di tipo 1, avente una temperatura di denaturazione pari a 78°C [50]. Più in generale i valori presenti in letteratura relativi alla Td del collagene di tipo 1 sono compresi in un *range* tra 50 e 80 °C, la variabilità dei valori è principalmente legata alle tecniche di reticolazione, al tipo di lavorazione a cui viene sottoposto il materiale e alla diversa origine [51][52].

IV. CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI

L'ingegneria tissutale è un campo di ricerca che da anni si propone di investigare nuovi materiali e strategie per la rigenerazione e la riparazione dei tessuti danneggiati. La necessità di trovare soluzioni alternative che possano essere di ausilio alla medicina tradizionale è strettamente correlata con l'aumento dell'età media della popolazione e la conseguente insorgenza di un maggior numero di patologie. Diventa dunque importante la collaborazione tra diverse figure professionali quali medici, biologi, ingegneri e scienziati dei materiali al fine di trovare soluzioni innovative non solo per ripristinare le funzionalità originali dei tessuti ma anche per la realizzazione di modelli di organo *in vitro* più simili possibile al tessuto originale. Inoltre, in questo modo, si potrebbe ridurre la sperimentazione sugli animali e avere dei risultati che si avvicinino maggiormente a quelli ottenibili se i test venissero effettuati direttamente sull'uomo.

Il modo migliore per mimare il tessuto originale è sicuramente cercare di riprodurlo *in vitro* avvalendosi di materiali naturali presenti in esso o di compositi che ne mimino le proprietà. Un ruolo fondamentale è dunque giocato dallo *scaffold* il cui compito principale è quello di fungere da template per l'adesione, la proliferazione e il differenziamento cellulare andando quindi a mimare la matrice extracellulare presente nei tessuti. Uno dei componenti principali della matrice cellulare è sicuramente il collagene che costituisce più del 25% della massa proteica totale dei tessuti umani. Negli ultimi decenni il collagene è stato ampiamente utilizzato in applicazioni biomediche in quanto, oltre ad essere il principale componente delle ECM, presenta delle eccellenti caratteristiche biologiche e buone proprietà fisico-chimiche. Infatti, può essere facilmente modificato sfruttando i suoi gruppi funzionali in modo da aumentare i *cross-link* o legare biomolecole per creare un'ampia varietà di materiali con proprietà meccaniche e biologiche su misura. Lo scopo di questo lavoro di tesi è quello di realizzare delle membrane nanofibrose elettrofilate a base di collagene di tipo I e PEO che mimino la lamina basale degli alveoli polmonari. In un primo momento è stato necessario ottimizzare il *blend* andando a variare le diverse concentrazioni dei soluti; l'utilizzo del PEO è stato necessario per migliorare la spinnabilità del materiale. Per la produzione delle membrane è stata utilizzata la tecnica dell'*electrospinning*. Di fondamentale importanza è stata l'ottimizzazione dei parametri di processo che ha permesso di ottenere delle fibre abbastanza omogenee con pochi difetti. L'elevata variabilità intrinseca del processo di elettrofilatura in combinazione con una forte dipendenza del materiale dai parametri

ambientali, difficilmente controllabili, non hanno consentito di ottenere delle membrane completamente prive di difetti e stabili in ambiente acquoso; pertanto ulteriori indagini dovranno essere svolte. È importante sottolineare come grazie all'analisi termica sia stato valutato qualitativamente che il processo utilizzato per la realizzazione delle membrane non abbia causato la denaturazione del collagene, preservandone la conformazione a tripla elica. La caratterizzazione morfologica delle fibre è stata valutata attraverso le immagini SEM rendendo possibile l'identificazione della concentrazione ottimale delle polveri di collagene e di PEO in soluzione quale rispettivamente 9% wt/v per il collagene e del 4,5% wt/v per il PEO. Sono stati poi indagati diversi reticolanti quali DSP e GPTMS, aggiunti direttamente in soluzione, al contrario di quanto presente in letteratura dove membrane a base di collagene vengono reticolate tramite bagnetti di reticolazione [29]. La concentrazione ottimale di reticolante è stata individuata a seguito delle prove di degradazione effettuate i cui risultati hanno confermato la stabilità delle membrane fino a 72 ore. In particolare, le membrane con una maggiore stabilità in ambiente acquoso sono quelle ottenute partendo da una soluzione avente una concentrazione iniziale di collagene pari al 9% wt/v, una concentrazione iniziale di PEO pari al 4,5% wt/v e contenente il 15% di DSP (v/v) e una concentrazione di GPTMS di 150 μ l/g. Al fine di valutare il comportamento delle membrane anche in condizioni dinamiche, un campione è stato inserito nel bioreattore IVTech grazie al quale è stato possibile mimare le condizioni fisiologiche della barriera aria sangue. A tal proposito nella sezione inferiore della camera la membrana è stata posta a contatto con un flusso tangenziale di DMEM caratterizzato da un *flow rate* fisiologico, tipico dei capillari sanguigni presenti negli alveoli polmonari. Dalle immagini SEM delle membrane inserite all'interno del bioreattore è stato osservato che gli sforzi tangenziali applicati non influenzano la stabilità delle membrane. È stata inoltre verificata la progressiva dissoluzione del PEO, all'aumentare del tempo di incubazione sia in condizioni dinamiche che statiche seppur questo non si allontani mai del tutto.

Buoni risultati sono stati riscontrati anche nei test meccanici effettuati sulle membrane migliori le quali presentano dei valori del modulo elastico di deformazione percentuale a rottura simili a quanto riportato in letteratura; i risultati ottenuti evidenziano quindi una buona resistenza a trazione del materiale in linea con le aspettative iniziali.

Pertanto, il lavoro svolto ha permesso di ottenere un protocollo per la realizzazione delle membrane nanofibrose a base di collagene stabili in ambiente acquoso e aventi buone proprietà meccaniche.

Ulteriori indagini saranno necessarie al fine di migliorare la morfologia delle fibre ottenute sia variando ulteriormente i parametri di processo che i parametri di soluzione. Sarebbe interessante ad esempio valutare l'effetto sulla spinnabilità del materiale della concentrazione di solvente e del peso molecolare del PEO; si potrebbe infatti testare una differente concentrazione di solvente e utilizzare un PEO con peso molecolare inferiore a 900 kDa. Sono richieste indagini aggiuntive sulla reticolazione del collagene al fine di rendere stabili le membrane per periodi di tempo più lunghi. A tal proposito test preliminari sono stati effettuati al fine di investigare il comportamento del *rose bengal* come reticolante alternativo o aggiuntivo. Sono stati svolti studi preliminari di coltura cellulare con fibroblasti 3T3 per valutare la vitalità e la morfologia delle cellule. Saranno dunque necessari test più approfonditi per avere dei risultati più attendibili sulla compatibilità delle membrane e quindi sulla vitalità cellulare.

In seguito i test di coltura cellulare verranno effettuati con pneumociti di tipo 1 per confermare l'adeguatezza delle membrane ottenute al tipo di applicazione per il quale sono state realizzate.

BIBLIOGRAFIA

- [1] S. J. Hollister, "Porous scaffold design for tissue engineering," vol. 4, no. July, 2005.
- [2] F. J. O. Brien, "Biomaterials & scaffolds Every day thousands of surgical procedures are performed to replace," *Mater. Today*, vol. 14, no. 3, pp. 88–95, 2011.
- [3] R. Langer, J. P. Vacanti, N. Series, and N. May, "Tissue Engineering," vol. 260, no. 5110, pp. 920–926, 1993.
- [4] K. Y. Lee and D. J. Mooney, "Hydrogels for Tissue Engineering," vol. 101, no. 7, 2001.
- [5] J. M. Gimble, A. J. Katz, and B. A. Bunnell, "Adipose-Derived Stem Cells for Regenerative Medicine," 2007.
- [6] V. Chiono, "Appunti Ingegneria della medicina rigenerativa," 2017.
- [7] A. D. Theocharis, S. S. Skandalis, C. Gialeli, and N. K. Karamanos, "Extracellular matrix structure ☆," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 97, pp. 4–27, 2016.
- [8] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter, *Biologia molecolare della cellula*. 2009.
- [9] F. Maniero, "Cellula. Matrice extracellulare," *Treccani*. 2007.
- [10] C. van et al Blitterswijk, *Tissue Engineering*. 2008.
- [11] Iwan Zein, D. W. Hutmacher, K. Cheng Tan, and S. H. Teoh, "Fused deposition modeling of novel scaffold architectures for tissue engineering applications," *Biomaterials*, 2002.
- [12] F. Chen and X. Liu, "Progress in Polymer Science Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 53, pp. 86–168, 2016.
- [13] R. A. Atala A, Bauer SB, Soker S, Yoo JJ, "Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty," *Lancet*, 2006.
- [14] J. F. Mano, G. A. Silva, H. S. Azevedo, and P. B. Malafaya, "Natural origin biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine : present status and some moving trends," no. April, pp. 999–1030, 2007.

- [15] L. Huang, K. Nagapudi, R. P. Apkarian, E. L. Chaikof, L. Huang, K. Nagapudi, R. P. Apkarian, and E. L. Chaikof, "Engineered collagen – PEO nanofibers and fabrics," vol. 5063, no. 2001, 2012.
- [16] A. Marina, P. Gentile, V. Chiono, and G. Ciardelli, "Acta Biomaterialia Collagen for bone tissue regeneration," *Acta Biomater.*, vol. 8, no. 9, pp. 3191–3200, 2012.
- [17] B. E. J. Miller and R. K. Rhodes, *Acquisition and Prelimina ~ Processing of Tissues*, vol. 82, no. 1966. 1982.
- [18] C. T. Tseng AA, Notargiacomo A, "Nanofabrication by scanning probe microscope lithography: A review," *J. Vac. Sci. Technol. B*, 2005.
- [19] B. He, Y. Xiao, and D. Jiang, "Molecular self-assembly guides the fabrication of peptide nanofiber scaffolds for nerve repair," *RSC Adv.*, 2014.
- [20] S. Ramakrishna, K. Fujihara, W. Teo, T. Yong, and R. Ma Z, "Electrospun nanofibers: solving global issues.," *Mater. Today*, 2006.
- [21] D. Pisignano, "Electrospinning," in *Polymer Nanofibers - Building Blocks for Nanotechnology*, 2013.
- [22] F. Liu, R. Guo, M. Shen, S. Wang, and X. Shi, "Effect of Processing Variables on the Morphology of Electrospun Poly [(lactic acid) - co - (glycolic acid)] Nanofibers," pp. 666–672, 2009.
- [23] C. Zhang and X. Yuan, "Study on morphology of electrospun poly (vinyl alcohol) mats," *Eur. Polym. J.*, vol. 41, pp. 423–432, 2005.
- [24] S. Megelski, J. S. Stephens, D. B. Chase, and J. F. Rabolt, "Micro- and Nanostructured Surface Morphology on Electrospun Polymer Fibers," pp. 8456–8466, 2002.
- [25] H. Homayoni, S. Abdolkarim, H. Ravandi, and M. Valizadeh, "Electrospinning of chitosan nanofibers : Processing optimization," *Carbohydr. Polym.*, vol. 77, no. 3, pp. 656–661, 2009.
- [26] J. Zheng, A. He, J. Li, J. Xu, and C. C. Han, "Studies on the controlled morphology and wettability of polystyrene surfaces by electrospinning or electrospraying," vol. 47, 2006.

- [27] S. J. Kim, C. K. Lee, and S. I. Kim, “Effect of ionic salts on the processing of poly(2-acrylamido-2-methyl-1-propane sulfonic acid) nanofibers,” *Appl. Polym. Sci.*, 2005.
- [28] A. Koski, K. Yim, and S. Shivkumar, “Effect of molecular weight on fibrous PVA produced by electrospinning,” vol. 58, pp. 493–497, 2004.
- [29] J. Xian, L. Ling, L. Liau, A. Saim, and Y. Yang, “Electrospun Collagen Nanofibers and Their Applications in Skin Tissue Engineering,” *Tissue Eng. Regen. Med.*, vol. 14, no. 6, pp. 699–718, 2017.
- [30] E. S. Medeiros, L. H. C. Mattoso, R. D. Offeman, D. F. Wood, and W. J. Orts, “Effect of relative humidity on the morphology of electrospun polymer fibers 1,” pp. 590–599, 2008.
- [31] I. J. Hall, E. Paladino, P. Szabó, S. Brozio, P. J. Hall, C. I. Oseghale, M. K. Passarelli, S. J. Moug, R. A. Black, C. G. Wilson, R. Zelkó, and D. A. Lamprou, “Electrospun collagen-based nano fi bres : A sustainable material for improved antibiotic utilisation in tissue engineering applications,” vol. 531, pp. 67–79, 2017.
- [32] A. Fiorani, C. Gualandi, M. Letizia, and F. Adriana, “Comparative performance of collagen nanofibers electrospun from different solvents and stabilized by different crosslinkers,” pp. 2313–2321, 2014.
- [33] L. Buttafoco, N. G. Kolkman, and P. Engbers-buijtenhuijs, “Electrospinning of collagen and elastin for tissue engineering applications,” vol. 27, pp. 724–734, 2006.
- [34] J. Baek, S. Sovani, N. E. Glembotski, J. Du, S. Jin, S. P. Grogan, D. D. D’Lima, and He, “Repair of Avascular Meniscus Tears with Electrospun,” *Tissue Eng.*, 2016.
- [35] T. Liu, W. K. Teng, B. P. Chan, and S. Y. Chew, “Photochemical crosslinked electrospun collagen nanofibers : Synthesis , characterization and neural stem cell interactions,” pp. 276–282, 2010.
- [36] T. A. Telemeco, C. Ayres, G. L. Bowlin, G. E. Wnek, E. D. Boland, N. Cohen, C. M. Baumgarten, J. Mathews, and D. G. Simpson, “Regulation of cellular infiltration into tissue engineering scaffolds composed of submicron diameter fibrils produced by electrospinning,” vol. 1, pp. 377–385, 2005.
- [37] X. Luo, Z. Guo, P. He, T. Chen, L. Li, S. Ding, and H. Li, “International Journal of

- Biological Macromolecules Study on structure , mechanical property and cell cytocompatibility of electrospun collagen nano fi bers crosslinked by common agents,” vol. 113, pp. 476–486, 2018.
- [38] S. Jus, I. Stachel, W. Schloegl, M. Pretzler, W. Friess, M. Meyer, R. Birnergruenberger, and G. M. Guebitz, “Cross-linking of collagen with laccases and tyrosinases,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 31, no. 5, pp. 1068–1077, 2011.
- [39] V. Charulatha and A. Rajaram, “Influence of different crosslinking treatments on the physical properties of collagen membranes,” vol. 24, pp. 759–767, 2003.
- [40] T. Heck, G. Faccio, M. Richter, and L. Thöny-meyer, “Enzyme-catalyzed protein crosslinking,” pp. 461–475, 2013.
- [41] X. Luo, Z. Guo, P. He, T. Chen, L. Li, S. Ding, and H. Li, “Study on structure , mechanical property and cell cytocompatibility of electrospun collagen nano fi bers crosslinked by common agents,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 113, pp. 476–486, 2018.
- [42] R. Subbiah, M. P. Hwang, P. Du, M. Suhaeri, J. Hwang, J. Hong, and K. Park, “Tunable Crosslinked Cell-Derived Extracellular Matrix Guides Cell Fate,” *Macromolecular Biosci.*, pp. 1723–1734, 2016.
- [43] D. Jeong, S. Mi, H. Yeong, H. Min, and R. Lee, “Bioactive fish collagen / polycaprolactone composite nanofibrous scaffolds fabricated by electrospinning for 3D cell culture,” *J. Biotechnol.*, vol. 205, pp. 47–58, 2015.
- [44] Z. G. Chen, P. W. Wang, B. Wei, X. M. Mo, and F. Z. Cui, “Electrospun collagen – chitosan nanofiber : A biomimetic extracellular matrix for endothelial cell and smooth muscle cell,” *Acta Biomater.*, vol. 6, no. 2, pp. 372–382, 2010.
- [45] F. E. Bailey, *Poly (Ethylene Oxide)*. 2012.
- [46] L. Wang and F. Wang, “Collagen-PEO composite nanofibers by electrospinning,” no. March 2015, 2016.
- [47] C. Tonda-turo, E. Cipriani, S. Gnani, V. Chiono, C. Mattu, P. Gentile, and I. Perroteau, “Crosslinked gelatin nano fibres : Preparation , characterisation and in vitro studies using glial-like cells,” *Mater. Sci. Eng. C*, 2013.
- [48] B. P. Chan and K. So, “Photochemical crosslinking improves the physicochemical

- properties of collagen scaffolds,” 2005.
- [49] I. Vittone, “Microscopio a scansione elettronica.” 2004.
- [50] V. Samouillan, F. Delaunay, J. Dandurand, and N. Merbahi, “The Use of Thermal Techniques for the Characterization and Selection of Natural Biomaterials,” *Funct. Biomater.*, pp. 230–248, 2011.
- [51] Z. Zhang, G. Li, B. I. Shi, T. Key, and L. Chemistry, “Physicochemical properties of collagen , gelatin and collagen hydrolysate derived from bovine limed split wastes,” vol. 90, 2005.
- [52] R. Usha and T. Ramasami, “The effects of urea and n -propanol on collagen denaturation : using DSC , circular dicroism and viscosity,” vol. 409, pp. 201–206, 2004.