POLITECNICO DI TORINO

Corso di Laurea Magistrale In Ingegneria Biomedica

Tesi di Laurea Magistrale

Scaffold biomimetici elettrofilati a base di poliuretano per la rigenerazione del tessuto tendineo



Relatori

prof. Gianluca Ciardelli prof. Monica Boffito prof. Irene Carmagnola prof. Carla Divieto **Candidato** Elisa Recchi

A.A. 2017/2018

Alla mia famiglia

Sommario

Abstract	1
1. Introduzione	3
1.1 Elettrospinning	5
1.1.1 La tecnica dell'Elettrospinning	7
1.1.2 Fattori che influenzano il processo di Elettrospinning	9
1.1.3 Caratteristiche della fibra ottenuta con Elettrospinning	12
1.1.4 Polimeri processati tramite la tecnica dell'Elettrospinning	14
1.2 Poliuretani	16
1.2.1 Struttura del poliuretano	17
1.2.2 Sintesi dei poliuretani	20
1.2.3 Proprietà dei poliuretani	21
1.3 Cellule staminali	22
1.3.1 Cellule staminali mesenchimali (MSC)	24
1.3.2 Colture cellulari	26
1.3.3 Droplet Digital PCR	31
1.4 Fibre allineate: stato dell'arte	32
2. Materiali e metodi	37
2.1 Sintesi del KHC2000	37
2.2 Preparazione delle fibre	39
2.3 Caratterizzazione delle fibre	41
2.3.1 Microscopio elettronico a scansione (SEM)	41
2.3.2 Microscopio a forza atomica (AFM)	42
2.3.3 Microscopio a fluorescenza	45
2.3.4 Prove meccaniche	46
2.3.5 Prove di degradazione	48
2.4 Prove cellulari	48
3. Risultati e discussione	53
3.1 Effetto della concentrazione di KHC2000	53
3.2 Valutazione dell'allineamento delle fibre	56
3.3 Analisi del comportamento meccanico delle membrane nanofibrose	57
3.4 Analisi microscopica delle fibre	58
3.5 Prove di degradazione	62
3.6 Prove cellulari	66
4. Conclusioni e sviluppi futuri	68
Bibliografia/Sitografia	71
Ringraziamenti	75

Abstract

L'Ingegneria tissutale prevede l'utilizzo di biomateriali al fine di realizzare un'impalcatura per le cellule; questa strategia ha un grande potenziale per la rigenerazione dei tessuti mediante scaffold e fornisce le basi per lo sviluppo degli organi.

Scaffold biomimetici tridimensionali sono stati impiegati nell'Ingegneria tissutale in virtù della loro architettura alla nanoscala, simile a quella della matrice extracellulare (ECM).

Tra le tecniche sviluppate per la fabbricazione di scaffold nanofibrosi tali da essere impiegati come sostituti della matrice extracellulare, l'elettrospinning è risultato di particolare interesse dal momento che permette di produrre fibre di dimensioni nanometriche simili alle strutture fibrose native della ECM e di processare un gran numero di materiali con costi relativamente contenuti. In più, scaffold basati su nanofibre elettrospinnate non mimano soltanto la micro/nano struttura della ECM ma anche la sua organizzazione spaziale su scala mesoscopica (controllo dell'orientazione delle fibre e loro posizionamento nello spazio).

In questo lavoro di tesi è stato impiegato un poliuretano biodegradabile a base di caprolattone, il KHC2000, per la realizzazione di membrane nanofibrose mediante elettrofilatura.

Tale poliuretano è stato sintetizzato a partire dall'1,6-esametilendiisocianato (HDI) utilizzato come diisocianato, il policaprolattone (PCL) con peso molecolare di 2000 Da come macrodiolo e l'estere etilico della lisina impiegato come estensore di catena, attraverso una sintesi a due step.

I parametri di processo dell'elettrospinning sono stati ottimizzati in modo da ottenere fibre allineate distribuite in maniera omogenea, che non presentassero difetti ed i cui diametri avessero dimensioni pressoché simili e dell'ordine del centinaio di nanometri, al fine di riprodurre in maniera il più fedele possibile la struttura naturale della ECM.

L'allineamento delle fibre è stato ottenuto utilizzando due diversi set up sperimentali: (i) due collettori piani paralleli e (ii) il collettore cilindrico messo in rotazione. Quest'ultimo ha permesso di produrre fibre allineate ed allo stesso tempo più spesse di quelle ottenute con i collettori piani paralleli, rendendole ideali per le colture cellulari realizzatevi in seguito.

Sono stati indagati due valori di concentrazione del KHC2000, 8% wt/v e 10% wt/v; dal momento che non sono state riscontrate sostanziali differenze nelle caratteristiche delle fibre prodotte, si è optato per il valore di concentrazione pari all'8% wt/v.

I parametri relativi alla tensione (27 kV), al flusso (2 mL/h) ed alla velocità del collettore rotante (3000 rpm) sono stati invece ricavati da una tesi precedente.

La morfologia delle fibre è stata valutata attraverso analisi in microscopia elettronica a scansione (SEM), che ha permesso di valutare i diametri delle fibre ottenute nonché il loro allineamento, mentre le proprietà meccaniche sono state studiate attraverso test a trazione su provini ad osso di cane per ottenere informazioni riguardo il modulo di Young alla macroscala e mediante Force spectroscopy per una valutazione alla nanoscala.

Le prove meccaniche hanno evidenziato l'elevata rigidità delle fibre allineate, con modulo elastico medio pari a $38,5 \pm 15$ MPa, rispetto alle random, aventi invece modulo elastico medio di $7,2 \pm 1,9$ MPa.

Sono state condotte in parallelo prove di degradazione in PBS e di degradazione enzimatica in lipasi su un intervallo temporale totale di 4 settimane, che hanno evidenziato come le strutture fibrose tendano a perdere più velocemente la loro geometria e continuità nella soluzione con l'enzima in quanto la lipasi rompe i legami esteri del polimero.

Infine, le prove cellulari hanno dimostrato come le membrane nanofibrose allineate ottenute con il collettore rotante siano dei buoni candidati per l'adesione cellulare e che favoriscano dunque l'allineamento delle cellule secondo la direzione delle fibre.

In aggiunta, tali fibre in poliuretano promuovono il differenziamento delle cellule staminali mesenchimali e favoriscono l'espressione genica di alcuni markers specifici del tendine quali la scleraxis e la tenascina.

1. Introduzione

L'ingegneria tissutale è il settore terapeutico interdisciplinare che si pone l'obiettivo di soddisfare le esigenze mediche legate a tessuti e organi ricreandoli, ingegnerizzandoli o favorendone la riparazione (nel caso siano danneggiati, stimolando gli auto-meccanismi di riparazione dell'organismo); in questo modo si ristabiliscono, si ricreano o si migliorano le loro originarie funzioni biologiche. (1)



Figura 1. Principi base dell'ingegneria tissutale.

Come definito da Langer e Vacanti, l'Ingegneria tissutale è "un campo di ricerca interdisciplinare che applica i principi dell'ingegneria e delle scienze della vita verso lo sviluppo di sostituti biologici che ripristinino, mantengano o migliorino la funzione dei tessuti". In contrasto con l'approccio classico dei biomateriali, è basato sul comprendere la formazione e la rigenerazione dei tessuti e si propone di indurre la sintesi di nuovi tessuti funzionali, piuttosto che impiantare nuove singole parti. I ricercatori mirano a raggiungere questo obiettivo combinando conoscenze dalla fisica, chimica, ingegneria, scienza dei materiali, biologia e medicina. (2)

L'ingegneria dei tessuti prevede l'uso di biomateriali al fine di realizzare un'impalcatura per le cellule; questa strategia ha un grande potenziale per la rigenerazione dei tessuti mediante scaffold e fornisce le basi per lo sviluppo degli organi.

Scaffold biomimetici tridimensionali sono stati impiegati nell'Ingegneria tissutale in virtù della loro architettura alla nanoscala, simile a quella della matrice extracellulare (ECM). (3)

In genere la tecnica consiste in tre fasi:

- Isolamento delle cellule dall'ambiente biologico naturale;
- Espansione in colture *in vitro* e semina di queste su scaffold polimerici;
- Impianto del sistema nel corpo del paziente.

Per scaffold si intende un supporto tridimensionale poroso, realizzato con un materiale biocompatibile e bioriassorbibile, in grado di favorire l'adesione e la proliferazione cellulare fino alla formazione del nuovo tessuto.

Durante la produzione della matrice extracellulare da parte delle cellule, lo scaffold tende a biodegradarsi e a farsi sostituire dal tessuto biologico rigenerato ripristinando la funzione compromessa, evitando così di reintervenire chirurgicamente per la rimozione dell'elemento protesico.

Il successo di questo processo è determinato dalla similitudine biologica e funzionale tra il tessuto ingegnerizzato ed il tessuto naturale da sostituire.

Le tre componenti principali nell'ingegneria tissutale sono:

- Le cellule
- Gli scaffold
- I fattori di crescita

Gli scaffold in particolare giocano un ruolo fondamentale dal momento che facilitano la migrazione, la formazione ed il movimento delle cellule assicurando un supporto primario e mimando la forma e la struttura della matrice extracellulare (ECM). (4)

Pertanto, l'obiettivo principale del design di scaffold per l'ingegneria tissutale è creare una struttura che possa simulare la matrice extra-cellulare originaria.

Lo scaffold deve garantire i seguenti requisiti:

- Biocompatibilità: capacità di un materiale di determinare da parte di un sistema vivente una favorevole reazione alla sua presenza in una specifica applicazione.

La compatibilità presenta tre aspetti: può essere morfologica (riguarda le interfacce dimensionali, di forma e relative alle masse), funzionale (riguarda il ruolo svolto dal tessuto rispetto al ruolo atteso) e biologica.

- Biodegradabilità: progressiva disgregazione del materiale mediata dall'attività biologica. Il tasso di degradazione deve essere confrontabile con quello di formazione del tessuto ed i prodotti di degradazione non devono essere tossici né indurre infiammazioni *in vivo*.
- Porosità: la presenza dei pori risulta necessaria per favorire la migrazione delle cellule all'interno della struttura 3D, il passaggio delle sostanze nutritive e dei gas e la

rimozione dei prodotti di scarto del metabolismo. La porosità determina la possibilità che lo scaffold sia dapprima colonizzato ed in seguito vascolarizzato.

- Proprietà meccaniche: la struttura deve mantenere la propria forma *in vivo* e possedere una sufficiente integrità. Gli scaffold devono avere buona resistenza meccanica per supportare il tessuto in formazione e resistere alle varie forze.
- Topografia e chimica di superficie: deve essere adeguata al tipo cellulare che si sta coltivando, deve garantire l'adesione, la proliferazione e la differenziazione cellulare.
- Anisotropia: i materiali nelle diverse direzioni rispondono in modo differente alle sollecitazioni; questo consente di promuovere la formazione di un tessuto con un'architettura anatomicamente corretta.

1.1 Elettrospinning

Varie tecniche sono state sviluppate per la fabbricazione di scaffold nanofibrosi tali da essere impiegati come sostituti della matrice extracellulare; tra queste, l'elettrospinning è risultato di particolare interesse dal momento che permette di produrre fibre simili alle strutture fibrose native della ECM e di processare un gran numero di materiali con costi relativamente contenuti. Diversamente dalle convenzionali tecniche di filatura che permettono di produrre fibre di polimero con diametri dell'ordine dei micrometri, l'elettrospinning è un processo mediante il quale è possibile ottenere fibre i cui diametri raggiungono dimensioni nanometriche. In più, scaffold basati su nanofibre elettrospinnate non mimano soltanto la micro/nano struttura della ECM ma anche la sua organizzazione spaziale su scala mesoscopica (controllo dell'orientazione delle fibre e loro posizionamento nello spazio).

Processo	Il processo può essere variato	Controllo sulla dimensione delle fibre	Vantaggi	Svantaggi
Estrazione	×	×	Minima strumentazione richiesta	Processo discontinuo
Self-assembly	×	×	Buono per ottenere nanofibre molto piccole	Processo complesso
Separazione di fase	×	×	Minima strumentazione richiesta	Limitato a polimeri specifici

Sintesi dei	×	✓	Fibre di diverso	-
template			diametro posso essere	
template			ottenute utilizzando	
			template differenti	
Elettrospinning	~	~	Costi contenuti. Possono	Instabilità del getto
			essere prodotte	
			nanofibre lunghe e	
			continue	

Tabella 1. Confronto tra differenti metodi di produzione di nanofibre.

L'area superficiale elevata delle nanofibre elettrospinnate, insieme alla loro struttura porosa, favorisce l'adesione, la proliferazione, la migrazione e la differenziazione cellulare. Inoltre, se necessario, le nanofibre possono essere successivamente funzionalizzate con delle specie bioattive (enzimi, DNA, fattori di crescita).

Queste caratteristiche delle nanofibre (area superficiale elevata, porosità e struttura dei pori interconnessa) le rendono adatte per il trasporto di nutrienti, per la comunicazione cellulare e per ottenere risposte cellulari efficienti, dunque ideali per la realizzazione di scaffold per l'ingegneria tissutale. (5)

Le applicazioni principali riguardano la produzione di scaffold per applicazioni biomediche, l'immobilizzazione di enzimi ed il rilascio di farmaci (6), medicazioni (7), indumenti protettivi (8), filtrazione e generazione di energia (9).



Figura 2. Alcuni esempi di tessuti la cui rigenerazione potrebbe trarre beneficio dall'uso di scaffold basati su nanofibre fabbricate mediante elettrospinning.

1.1.1 La tecnica dell'Elettrospinning (10)

Il principio base dietro questo processo consiste nell'applicazione di una tensione sufficiente a superare la tensione superficiale della soluzione polimerica, che porta la goccia di polimero che si forma sulla punta dell'ago ad allungarsi in modo da generare fibre molto sottili che, depositandosi, creano un intreccio non tessuto. (11)



Figura 3. Rappresentazione schematica degli elementi costitutivi del sistema.

Elementi costitutivi del sistema:

- Siringa: contiene la soluzione polimerica da elettrofilare.
- Pompa: attaccata al pistone della siringa, che deve generare una pressione costante, regolata in modo tale da mantenere la soluzione sulla punta del tubo capillare.
- Generatore DC (direct current) di tensione ad alto potenziale (di solito ≤30kV), collegato all'ago della siringa per mezzo di un contatto elettrico.
- Collettore metallico, disponibile in diverse geometrie (rettangolare o cilindrica), posto a terra, che ha la funzione di raccogliere le fibre. Lo schermo viene montato su un sostegno isolante così che il suo potenziale possa essere controllato.

Nel processo di elettrospinning tradizionale i polimeri utilizzati per la formazione di fibre sono dissolti in appropriati solventi, nel processo di melt elettrospinning invece i polimeri sono fusi. Il solvente utilizzato per la preparazione delle soluzioni polimeriche ha una significativa influenza nel processo di elettrospinning. Fondamentalmente, esso svolge due ruoli principali: in primo luogo scioglie le molecole di polimero per formare il getto elettrificato ed in secondo luogo le trasporta verso il collettore. Le interazioni intermolecolari in un sistema binario polimero-solvente sono infatti o attrattive o repulsive e questo specifico comportamento dipende unicamente dal tipo di solvente utilizzato.

Il polimero viene introdotto nel tubo capillare solo quando si dissolve completamente nel solvente. Si applica quindi un campo elettrico ad alto voltaggio (3-30kV) tra il capillare dotato di ugello di dimensioni millimetriche ed il collettore.

All'inizio del processo la repulsione elettrostatica controbilancia la tensione superficiale e la goccia è tesa; all'aumentare dell'intensità del campo elettrico la superficie emisferica del fluido alla cima del capillare tende ad allungarsi fino a raggiungere una forma conica. Questo cono è chiamato "cono di Taylor".

Lo stress elettrico si concentra sulla punta del cono di Taylor ed il fluido tende ad essere eiettato per l'attrazione esercitata dal campo esterno che risulta maggiore sulla punta rispetto al bulk. Grazie ad una coesione molecolare elevata non si verifica il distacco della cresta e si determina un getto continuo di liquido carico.

Dopo un certo percorso il getto sarà vulnerabile a fattori di instabilità, in particolare l'instabilità per bending che è dovuta alle perturbazioni che intercorrono nella traiettoria lineare della fibra, agenti sull'asse della fibra stessa, tramite una forza perpendicolare generata dalla repulsione tra le cariche, che nasce quando viene persa la perfetta simmetria della struttura. Mentre nelle prime fasi di volo questa forza è trascurabile perché bilanciata dalla natura viscoelastica della soluzione, che oppone resistenza al riassestamento della forma e ne mantiene l'originale, in posizioni più avanzate questo bilancio diventa negativo e determina la distorsione del getto.

Contemporaneamente l'ampia area superficiale permette una veloce evaporazione del solvente, che lascia dietro di sé una fibra polimerica carica molto tirata e con un diametro ridotto.

Senza uno specifico controllo le fibre elettrofilate sono deposte sul collettore casualmente; sono state però sviluppate diverse tecniche per disporre ordinatamente le fibre, sia in modo allineato sia sotto forma di array 2D o 3D.

La configurazione del sistema di alimentazione è tale che espellere la soluzione di polimero determina la composizione delle fibre elettrofilate e la distribuzione dei vari componenti all'interno della fibra e della matrice finale. Prodotti su misura possono essere ottenuti utilizzando:

 Aghi singoli: fibre monocomponenti sono disponibili presso i liquidi polimerici omogenei e fibre a più componenti può essere elettrofilate da miscele, emulsioni e sospensioni.

- Aghi coassiali: due fluidi differenti scorrono tra due capillari coassiali, generando una morfologia core-shell.
- Sistemi Multijet: le membrane composte da diversi tipi di fibre possono essere prodotte da concomitanza di diverse soluzioni polimeriche. (12)

I progressi nell'elettrospinning hanno reso possibile la fabbricazione di strutture fibrose con un allineamento controllato. Per raggiungere questo risultato sono disponibili diversi metodi, ma i più sfruttati sono due: il primo prevede l'utilizzo di un collettore dinamico come ad esempio un mandrino rotante (a), mentre il secondo consiste nel controllare il getto dell'elettrospinning intervenendo sul campo magnetico applicato (b).



Figura 4. Metodi di fabbricazione di strutture fibrose allineate: mandrino rotante (a), controllo del getto dell'elettrospinning intervenendo sul campo magnetico applicato.

In ogni caso, i materiali che vengono raccolti attraverso queste due tecniche possono raggiungere lo spessore di pochi strati di fibre. All'aumentare dello spessore, infatti, le fibre diventano disordinate a causa della carica residua accumulata sulle fibre depositate, la quale interferisce con l'allineamento delle altre fibre.

1.1.2 Fattori che influenzano il processo di Elettrospinning (13)

Sebbene sia sempre descritto come una tecnica di processo semplice, l'elettrospinning è governato da un numero di parametri che influenzano la formazione delle fibre e la loro struttura.

Il processo di filatura è governato da molti fattori, classificati in parametri della soluzione, parametri di processo e parametri ambientali. Ciascuno di questi parametri influenza in modo significativo la morfologia delle fibre ottenute e dalla corretta manipolazione di questi si possono ottenere nanofibre di morfologia e diametro desiderato.

PARAMETRI DELLA SOLUZIONE

- Concentrazione: per ottenere un risultato ottimale è necessario che la concentrazione della soluzione di partenza vari entro un certo range utile. Si ha infatti che per concentrazioni inferiori ad un minimo si ottiene un insieme di fibre e granelli (beads) mentre oltre una concentrazione massima diventa impossibile mantenere un flusso costante a livello della punta dell'ago perché la soluzione diventa eccessivamente viscosa. All'interno del range esiste una concentrazione ottimale che consente di ottenere fibre in quantità e dimensioni desiderate. Al crescere della concentrazione cresce il diametro della fibra.
- Viscosità: anch'essa deve variare in un range; il minimo valore indica la viscosità sotto la quale non si ottengono più fibre continue, mentre il massimo è il valore oltre il quale non è più possibile estrudere agevolmente il materiale. Il range dipende fortemente dal tipo di materiale utilizzato, bisogna inoltre tenere presente che la viscosità dipende fortemente dal peso molecolare e dalla concentrazione e viceversa da cui la possibilità di ottenere fibre continue.
- Conducibilità: all'aumentare della conducibilità elettrica della soluzione si verifica un significativo aumento del diametro delle nanofibre elettrospinnate. Al contrario, una conducibilità insufficiente comporta una altrettanto insufficiente forza elettrica che non consente l'elongazione del getto e la formazione di una fibra uniforme, per questo si possono osservare granuli. Anche soluzioni altamente conduttive risultano instabili in presenza di campi elettrici elevati per l'insorgenza di elevati sforzi di bending e distribuzioni di diametri molto più ampie. È stato osservato che il raggio del getto varia inversamente con la radice cubica della conducibilità elettrica della soluzione. Per variare la conducibilità della soluzione vengono talvolta impiegati ioni di sali.
- Peso molecolare: influisce sulle proprietà elettriche e reologiche e quindi sulle caratteristiche morfologiche delle fibre. Il peso molecolare (PM) infatti riflette il numero di legami tra le catene polimeriche in soluzione. Si osserva generalmente che al crescere del PM delle catene si riduce la formazione di granelli ed aumenta il diametro finale della fibra. Non sempre un elevato PM è essenziale per il processo di elettrospinning se è presente un numero sufficiente di interazioni intermolecolari in grado di sopperire alla connettività intercatena caratteristica delle soluzioni ad alto peso molecolare.
- **Tensione superficiale**: dipende sostanzialmente dal tipo di solvente; riducendo la tensione superficiale è possibile ottenere fibre prive di granuli ed operare con campi

elettrici inferiori. Ad elevata tensione superficiale, infatti, il getto è instabile e si possono formare difetti, come gocce o beads.

PARAMETRI DI PROCESSO

- **Campo elettrico applicato**: il processo di elettrospinning inizia ad una tensione di soglia in grado di indurre la polarizzazione del pelo del fluido o della soluzione. Gli effetti della variazione di tensione applicata oltre il valore di soglia sono oggetto di dibattito.



Figura 5. Variazione delle fibre all'aumentare del voltaggio applicato.

- Flusso: la velocità con cui viene alimentata la siringa influenza la velocità del getto ed il processo di evaporazione del solvente. Generalmente, basse velocità di alimentazione sono maggiormente desiderabili poiché il solvente ha più tempo per evaporare, mentre flussi troppo elevati si risolvono nella formazione di fibre granulose per l'inadeguatezza del livello di evaporazione raggiunto.
- Tipo di collettore: il collettore funge da substrato conduttivo per la raccolta delle fibre prodotte. I più comuni sono fogli di alluminio e relative declinazioni determinate dalle diverse necessità realizzative quali l'ottenimento di fibre parallele o granulari. Alternative sono fogli di carta o tessuti conduttivi, reti metalliche, barre parallele, cilindri rotanti, torni, bagni liquidi di non solventi.
- **Distanza**: è necessaria una distanza minima per consentire l'evaporazione del solvente dalla fibra prima che questa raggiunga il collettore, evitando in questo modo la formazione di granuli indesiderati nella struttura finale. Non influenza significativamente altri aspetti realizzativi.

PARAMETRI AMBIENTALI

- Umidità: influisce sulla volatilità e quindi sulla velocità di evaporazione del solvente, la quale a sua volta influisce sulla porosità e sulla dimensione finale dei pori che si formano. Al diminuire dei tassi di umidità la velocità di evaporazione del solvente aumenta fino a superare la velocità di estrusione dalla punta dell'ago rendendo il processo di elettrofilatura impossibile per ostruzione dell'ago, mentre all'aumentare della stessa dapprima si formano piccoli pori circolari superficiali che poi coalescono. L'umidità influisce infine sulla carica e tensione superficiale promuovendo la scarica della fibra estrusa.

 Temperatura dell'ambiente: influenza il processo agendo sulla viscosità del soluto o del fuso. Ad un aumento della temperatura segue una diminuzione della viscosità con conseguente diminuzione del diametro della fibra.

1.1.3 Caratteristiche della fibra ottenuta con Elettrospinning

 CARATTERISTICHE GEOMETRICHE: le proprietà geometriche di interesse sono forma e diametro della sezione della fibra, rugosità della superficie, porosità e dimensione dei pori e cristallinità. Per l'analisi vengono impiegati generalmente microscopi a scansione elettronica (SEM), microscopi a trasmissione elettronica (TEM) e microscopi a forza atomica (AFM).

Il SEM è utilizzato da molti ricercatori per osservare la morfologia delle fibre prodotte, in quanto il suo potere di risoluzione si aggira intorno ai 5 nm. Il microscopio non sfrutta la luce come sorgente di radiazioni ma un fascio di elettroni primari focalizzati che colpiscono il campione. Il fascio primario non è fisso ma viene fatto scandire, viene cioè pilotato in sequenza su una piccola zona rettangolare del campione. Nell'interazione tra il fascio primario e gli atomi costituenti il campione, vengono emesse numerose particelle fra le quali gli elementi secondari. Questi elettroni sono catturati da uno speciale rilevatore e convertiti in impulsi elettrici che vengono inviati in tempo reale ad uno schermo dove viene eseguita simultaneamente una scansione analoga. Il risultato è un'immagine in bianco e nero ad elevata risoluzione e grande profondità di campo. Per un'analisi al SEM i campioni devono possedere una superficie conduttiva, per questo si rivestono le nanofibre con un coating in oro o platino.

La TEM è un'alternativa per caratterizzare diametri di fibre estremamente piccoli (<300nm). Gli elettroni che costituiscono il fascio attraversano una sezione dove è stato creato precedentemente il vuoto per poi passare completamente attraverso il campione. Il microscopio a forza atomica consiste di una microleva (cantilever) alla cui estremità è montata una punta acuminata (tip) in silicio o nitruro di silicio, che presenta un raggio

di curvatura dell'ordine dei nanometri. La punta investigatrice viene collocata nelle strette vicinanze della superficie del campione di cui si vuole effettuare la scansione; le forze di Van der Waals che agiscono tra la punta ed il campione provocano una deflessione della microleva in accordo con la legge di Hooke.

L'analisi della cristallinità si avvale di tecniche di diffrazione ai raggi X ad ampia e piccola angolatura o calorimetria a scansione differenziale (DSC); il principio di base di questa tecnica consiste nel ricavare informazioni sul materiale riscaldandolo o raffreddandolo in maniera controllata. In particolare il DSC si basa sulla misura della differenza di flusso termico tra il campione in esame e uno di riferimento mentre i due sono vincolati ad una temperatura variabile definita da un programma prestabilito.

Alcune tecniche come la misura dell'angolo di contatto e la spettroscopia infrarossi (ATR-FTIR) vengono utilizzate anche per determinare la chimica di superficie delle nanofibre elettrofilate.

Per quanto riguarda lo studio delle porosità, questo può essere condotto attraverso porosimetri a flusso capillare o porosimetri a mercurio. Generalmente le fibre prodotte attraverso elettrospinning sono altamente porose (91,63%), le dimensioni dei pori però possono non essere sufficienti a seconda dell'impiego.

CARATTERISTICHE MECCANICHE: comuni test di caratterizzazione meccanica su fibre ottenute per elettrospinning sono nano indentazione, bending tests, misure di frequenza di risonanza, test di tensione alla microscala.

Tutte queste misure si avvalgono di AFM, in particolare delle interazioni tra gusci atomici caratteristici su scala nanometrica.

L'eventuale anisotropia delle fibre dipende dal tipo di collettore impiegato. È stata inoltre evidenziata talvolta una dipendenza delle caratteristiche meccaniche dalla dimensione della fibra: il modulo elastico tendeva a diminuire al diminuire del diametro della fibra.

 CARATTERISTICHE CHIMICHE: la caratterizzazione della struttura molecolare della nanofibra viene operata normalmente attraverso ATR-FTIR e risonanza magnetica nucleare (NMR). Queste tecniche sono in grado di evidenziare anche la composizione e le interazioni intermolecolari di blend polimerici.

Per quanto riguarda lo studio delle proprietà chimiche superficiali, queste possono essere rilevate attraverso l'angolo di contatto con solventi polari e/o apolari (interazioni idrofiliche o idrofobiche).

1.1.4 Polimeri processati con la tecnica dell'Elettrospinning

Per raggiungere tali scopi, il materiale con cui si realizza lo scaffold elettrofilato deve essere attentamente selezionato. Polimeri sia naturali che sintetici e materiali di tipo minerale che presentano proprietà bioattive e meccaniche simili a quelle del tessuto e composizione chimica e morfologia tipiche della ECM sono candidati ideali per questo tipo di strutture.

I polimeri sintetici vengono impiegati in sostituzione di quelli naturali perché possono essere sviluppati ad hoc in modo che presentino le caratteristiche desiderate per la particolare applicazione (caratteristiche meccaniche, velocità di degradazione, ecc.).



Figura 6. Alcuni esempi di fibre ottenute mediante elettrospinning impiegando polimeri differenti.

I polimeri sintetici tipicamente impiegati in applicazioni biomediche sono: l'acido poliglicolico (PGA), l'acido polilattico (PLA), il policaprolattone (PCL), i poliuretani (PU), il polietilene tereftalato (PET), il poli-etilen-co-vinil alcol (PEVA) e il poli-etilen ossido (PEO).

- PGA: è un polimero biodegradabile termoplastico ed è il più semplice membro della famiglia di poliesteri lineari alifatici. Viene utilizzato come materiale per la preparazione di suture riassorbibili ed è anche al centro di studi in campo biomedico. Il polimero possiede un'elevata cristallinità ed in generale è insolubile in solventi organici; l'unica eccezione sono i solventi altamente fluorurati.
- PLA: è il polimero dell'acido lattico. Esiste in due forme enantiomeriche (L e D) ma il polimero cristallino è ottenibile soltanto dall'isomero otticamente attivo L.
 È il materiale più usato nella realizzazione di prodotti mediante l'utilizzo di macchine di prototipazione rapida che utilizzano tecniche produttive quali la FDM (Fused Deposition Modeling), meglio note come stampanti 3D.

Le proprietà dei vari polimeri di PLA sono determinate dalla stereochimica degli isomeri PLA. Il PLLA è un polimero cristallino, il PDLLA è un polimero amorfo. Entrambi però durante il processo di preparazione sono solubili in solventi organici.

 PCL: è un polimero semicristallino, sintetico e biodegradabile. Essendo dotato di caratteristiche di biocompatibilità e di un'elevata stabilità termica, è molto utilizzato nel campo delle applicazioni biomedicali.

Si ottiene per polimerizzazione con apertura ad anello utilizzando l'ottanoato stannoso come catalizzatore. Rispetto agli altri poliesteri è stato utilizzato meno frequentemente come materiale per la fabbricazione di scaffold o come biomateriale, soprattutto a causa della sua lenta cinetica di degradazione. Tuttavia, possiede una migliore resistenza idrolitica ed un basso costo rispetto ad altri polimeri biodegradabili.

- PU: si intende la vasta famiglia di polimeri in cui la catena polimerica è costituita da legami uretanici –NH-(CO)-O-. I polimeri uretanici sono largamente impiegati nella produzione di una grande varietà di materiali. Il PU è un biomateriale con una buona biocompatibilità ed emocompatibilità. Viene utilizzato principalmente nelle protesi vascolari e in Ingegneria Tissutale. Il PU viene elettrofilato con diversi solventi a diverse concentrazioni.
- PET: viene indicato anche con il nome commerciale di Dacron ed è stato utilizzato ampiamente in applicazioni biomediche come biomateriale ad esempio per le protesi vascolari (il PET infatti non interagisce con le cellule del sangue).
- PEVA: è un polimero non biodegradabile, semicristallino e biocompatibile. È idrofilo ed insolubile in soluzione acquosa per la presenza di gruppi etilenici.
- PEO: è un biomateriale comunemente usato in Ingegneria Tissutale nella forma di idrogelo. Le proprietà fisiche del polimero infatti variano in base alla lunghezza media delle macromolecole, ovvero al numero medio n di unità ripetitive, mentre le proprietà chimiche rimangono pressoché inalterate. Il PEO sotto forma di gel può essere iniettato direttamente nel difetto e fatto fotopolimerizzare, in modo da aiutare e velocizzare la riparazione dei tessuti.

Poliesteri classici quali PGA, PLA ed i suoi copolimeri (PLGA) sono materiali relativamente rigidi e non elastici e quindi non ideali per l'ingegneria dei tessuti soft quali quello cardiovascolare, urologico e gastrointestinale. (14)

Al contrario, il poliuretano risulta di particolare interesse a causa delle sue proprietà meccaniche e delle sue caratteristiche di processabilità, flessibilità e biocompatibilità, in associazione alla sua struttura versatile che migliora l'integrazione del tessuto artificiale.

La separazione tra i segmenti hard e quelli soft nella sua struttura microscopica permette al poliuretano di sopportare stress fisici e gli conferisce una elevata tensione di snervamento ed una resistenza a fatica tali da permettergli di sopportare cicli ripetuti di sollecitazioni meccaniche senza modificare le sue proprietà e con un'isteresi bassa o addirittura nulla. (15) In particolare, i poliuretani hanno dimostrato di avere buone proprietà di barriera e permeabilità all'ossigeno, ideali per applicazioni di membrana.

Essendo dotati di compliance simile a quella di un'arteria ed essendo non trombogenici, i poliuretani sono stati studiati al fine di essere applicati come materiale protesico di sostituzione vascolare.

I poliuretani sono anche spesso usati per produrre delle pellicole adesive semipermeabili, film o medicazioni, dal momento che presentano buone proprietà di permeabilità all'ossigeno e di efficiente barriera contro batteri e patogeni. Il poliuretano può essere l'unico componente della membrana, ma spesso la medicazione contiene diversi agenti farmacologici come antibatteri: clorexidina o iodio, anestetici topici, agenti batteriostatici e antifungini.

1.2 Poliuretani

Poliuretani è il nome generico che indica una famiglia di copolimeri sintetici contenenti gruppi uretano nella loro struttura chimica. Vennero sintetizzati per la prima volta nel 1937 da Otto Bayer ed il loro impiego nei dispositivi medici è documentato già dal 1965 (1). Più di recente, gli sforzi si sono concentrati sulla realizzazione di formulazioni biodegradabili da utilizzare come scaffold per l'ingegneria tissutale ed altri impianti riassorbibili. I poliuretani biodegradabili presentano una serie di requisiti che includono l'uso di componenti biocompatibili, proprietà meccaniche simili a quelle del tessuto, bioattività ed una velocità di degradazione appropriata.

Le reazioni che coinvolgono i poliuretani sono polimerizzazioni per condensazione. In questo processo, monomeri bi-funzionali reagiscono in maniera graduale per produrre lunghe catene del monomero che reagisce. Tipicamente, le reazioni di polimerizzazione per condensazione prevedono l'espulsione di piccole molecole come ad esempio acqua o CO₂; in ogni caso, non c'è alcun sottoprodotto nella sintesi dei poliuretani segmentati.

Questi comprendono un segmento soft a bassa temperatura di transizione vetrosa T_g , costituito da un macrodiolo caratterizzato da basso peso molecolare (dai 400 ai 6000 kg/mol) ed un segmento hard vetroso o semicristallino, ovvero il diisocianato. Durante la sintesi, il macrodiolo reagisce con un eccesso diisocianato per formare il prepolimero, il quale reagisce dunque con un estensore di catena che contribuisce ad aumentare il peso molecolare e porta alla formazione di una catena lineare.

1.2.1 Struttura del poliuretano (16) (17)

I poliuretani segmentati possono essere rappresentati mediante tre componenti come nella formula che segue:

$P-(D(CD)_n-P)_n$

dove P è il poliolo, D il diisocianato e C l'estensore di catena.

Diisocianato ed estensore di catena formano il segmento rigido (hard), mentre il poliolo costituisce il segmento morbido (soft). Le due fasi si differenziano tra loro sostanzialmente per le caratteristiche chimico-fisiche.

Nei poliuretani lineari, le tre componenti presentano due funzionalità. Se si desidera un materiale ramificato o con dei crosslink, possono essere incorporati nella formulazione polioli, isocianati e a volte estensori di catena multifunzionali.

La reazione chimica principale coinvolta nella sintesi dei poliuretani è quella di formazione del gruppo uretano, ovvero la reazione fra l'isocianato ed il gruppo idrossile del macrodiolo.



Questa è una reazione di addizione nucleofila, dunque è catalizzata da composti basici quali le ammine terziarie e composti metallici come l'organotina. La formazione del gruppo uretano è in realtà una reazione all'equilibrio; la presenza del catalizzatore dunque aumenta la velocità della reazione inversa alle alte temperature.

Un'altra importante reazione è quella di estensione della catena che avviene tra l'estensore di catena (diolo o diammina) ed il gruppo isocianato del prepolimero formato. L'uretano sarà formato in modo diverso a seconda che l'estensore di catena sia un diolo o una diammina. L'isocianato non reagisce solo con l'ammina primaria, ma può inoltre reagire con l'ammina secondaria come l'N-H nei gruppi uretano o urea, anche se la velocità della reazione è molto

più bassa se comparata con quella dell'ammina primaria. L'addizione nucleofila con l'ammina secondaria rimane la stessa e dunque la struttura chimica dei prodotti può essere facilmente ipotizzata in base alla Figura 7:



Figura 7. La reazione di allungamento della catena avviene tra l'estensore di catena (diolo o diammina) e l'isocianato. Quando un diolo viene utilizzato come estensore di catena (a) si forma un uretano, mentre (b) l'urea si forma se viene impiegata una diammina.

Oltre alle due reazioni base raffigurate sopra, la reazione dell'acqua con l'isocianato deve inoltre essere menzionata. L'isocianato è molto reattivo, quindi reagisce quasi istantaneamente con idrogeni attivi o acidi.

Tale reazione in due step con l'acqua è la più importante reazione secondaria che dovrebbe essere evitata o quantomeno minimizzata, a meno che non sia richiesto un alto contenuto di urea.



Figura 8. La reazione dell'acqua con l'isocianato deve inoltre essere considerata, dal momento che l'isocianato è così attivo, questi reagisce quasi istantaneamente con idrogeni attivi. Questa reazione con l'acqua avviene in due step ed è la più importante reazione secondaria che dovrebbe essere evitata o quantomeno minimizzata, a meno che non si desideri una schiuma o un alto contenuto di

I gruppi amminici che si formano durante il secondo step reagiranno in seguito con l'isocianato restante per produrre gruppi urea. Il biossido di carbonio che si forma nella reazione (b) può essere impiegato per realizzare una schiuma in poliuretano.

L'effetto principale di questa reazione è l'utilizzo di un'unità di isocianato e la formazione di un gruppo amminico; la successiva reazione del gruppo amminico con un isocianato porta alla formazione dell'urea.

Riassumendo quindi i poliuretani segmentati sono costituiti da tre reagenti: poliolo, diisocianato ed estensore di catena, il quale può essere una diammina o un diolo. Le proprietà finali del poliuretano dipendono largamente dalla natura chimica e fisica di questi tre blocchi.

REAGENTI

DIISOCIANATO: polimero a basso peso molecolare che può reagire con il poliolo e con l'estensore di catena. È costituito da due gruppi isocianato per ciascuna molecola.
 I due gruppi funzionali lavorano per creare una catena lineare, ma se le funzionalità sono maggiori di due si formano delle reticolazioni fra le molecole.

Per la sintesi dei poliuretani possono essere utilizzati diisocianati aromatici o alifatici. Quelli aromatici (i più utilizzati sono il diisocianato di toluene TDI ed il difenilmetano diisocianato MDI) producono polimeri più rigidi con punto di fusione più alto, ma sviluppano prodotti di degradazione tossici (diammine aromatiche).

Per questo motivo sono stati introdotti i diisocianati alifatici (i più utilizzati sono il diisocianato della L-lisina LDI e l'esametilendiisocianato HDI). Nel caso di LDI, il rilascio causa l'idrolisi del legame uretano che porta alla produzione di L-lisina estere etilico, che non risulta tossico. I poliuretani a base di diisocianati alifatici mostrano maggiore stabilità verso la luce e resistenza all'idrolisi e degradazione termica rispetto a quelli a base di diisocianati aromatici, ma proprietà meccaniche inferiori.

A causa della struttura ad anello del diisocianato e delle forti interazioni intermolecolari come il legame idrogeno tra i gruppi uretano, i quali danno origine alla reazione tra l'isocianato e l'estensore di catena, i segmenti che contengono questi due reagenti sono più rigidi di quelli costituiti dal poliolo e a temperatura ambiente risultano vetrosi, dunque vengono chiamati segmenti hard.

 POLIOLO: è un macromonomero oligomerico che possiede una catena a bassa temperatura di transizione vetrosa (<25°C). Convenzionalmente i polioli sono generalmente un polietere (-RO-R'-) o un poliestere (-R-CO-O-R'), le cui estremità della catena terminano con un gruppo –OH.

Proprietà fondamentali: flessibilità della struttura e peso molecolare intorno ai 400-500 Da, i quali influenzano le proprietà del polimero finale ed il suo grado di reticolazione. A temperatura ambiente, i polioli possono essere liquidi o solidi (con un comportamento simile a quello della cera) in base al loro peso molecolare. A causa della loro struttura alifatica e delle basse interazioni intermolecolari, le molecole possono ruotare e piegarsi facilmente: ciò permette di considerare le sequenze di poliolo all'interno della catena del poliuretano segmentato come soft segment.

ESTENSORE DI CATENA: la reazione diretta del poliolo con il diisocianato produce un prepolimero con basso peso molecolare e scarsa resistenza meccanica. Per migliorare le proprietà del polimero si utilizza un estensore di catena, il quale produce una sequenza nel copolimero costituito da un alternarsi di estensori di catena e isocianati. Le sequenze estese agiscono sia come particelle di riempitivi sia come siti di crosslink fisici per aumentare la resistenza meccanica.

Gli estensori di catena servono inoltre ad aumentare la densità ed il peso molecolare del poliuretano ed agiscono come agenti reticolanti.

Gli estensori di catena possono essere classificati in due categorie in base al loro gruppo terminale (amminico o idrossile): diammine e dioli. La selezione di una diammina o un diolo determina la formazione di gruppi urea o uretano, che influenza l'organizzazione della catena polimerica e di conseguenza le proprietà meccaniche.

Tipici estensori di catena sono l'1,4-butandiolo, il glicol etilenico e l'1,6-esandiolo.

1.2.2 Sintesi dei poliuretani (18)

Il metodo di sintesi dei poliuretani può influenzare la struttura del polimero, la distribuzione dei pesi molecolari ed il grado di ramificazione delle catene polimeriche. In laboratorio, il solvente è di solito utilizzato per ridurre la viscosità e promuovere la formazione di copolimeri ad alto peso molecolare.

La procedura di polimerizzazione può essere:

 "one step" (fase unica): tecnica di produzione più veloce e semplice. Viene utilizzata per la sintesi di poliuretani commerciali ed è un processo in cui tutti e tre i monomeri sono mescolati simultaneamente. "metodo prepolimero" (più fasi): conferisce un maggiore controllo sulla chimica della reazione, influenzando struttura, proprietà fisiche, reattività e processabilità del materiale risultante. Vie di sintesi multistep sono dunque preferite.

La sintesi del poliuretano si ottiene mediante reazione tra il poliolo ed il diisocianato; in particolare, se il poliolo ha una struttura di polietere si ottiene un poliuretano a base di polietere, viceversa se ha una struttura di tipo poliestere.

Il prepolimero ha origine dalla reazione tra il poliolo ed un eccesso di diisocianato; è generalmente un composto a basso peso molecolare sotto forma di liquido viscoso e con un basso punto di fusione solida. La successiva reazione di questo prepolimero con un diolo o una diammina a basso peso molecolare (estensore di catena) produce un polimero a blocchi e di conseguenza allunga la catena.

La formazione del poliuretano è facilitata dalla presenza di catalizzatori (ammine terziarie alifatiche o composti organostannici). In particolare l'ottoato stannoso viene generalmente utilizzato come catalizzatore durante la sintesi dei poliuretani per applicazioni biomediche, grazie alla sua approvazione della FDA come additivo per alimenti; questo composto promuove inoltre la reazione del gruppo funzionale isocianato con il diolo al posto dell'acqua. Particolare attenzione deve essere posta nella caratterizzazione dei catalizzatori metallorganici e delle ammine che spesso comportano stringenti limiti nelle soglie di esposizione.

La sintesi può inoltre avvenire:

- In umido (wet): avviene in solvente organico, dunque i reagenti si trovano allo stato di soluzione. La temperatura influenza le cinetiche ma non è una *conditio sine qua non* affinché la reazione avvenga.
- In bulk: avviene senza solventi. Per far avvenire la rimescolazione e affinché sia omogeneo si lavora in condizioni di fuso; la temperatura è dunque essenziale per far avvenire la reazione e serve per giocare con la viscosità della soluzione.

1.2.3 Proprietà dei poliuretani

I poliuretani sono polimeri termoplastici ed elastomerici che manifestano "rubber elasticity", ovvero se sottoposti a sollecitazione sono in grado di deformarsi fino al 700-800% di allungamento percentuale e alla rimozione del carico recuperano totalmente la deformazione con un brevissimo tempo di ritardo.

Nei poliuretani segmentati, il comportamento termico dovuto alla struttura bifasica si caratterizza per la presenza di due transizioni vetrose: quella dei segmenti flessibili a bassa temperatura e quella della fase rigida a temperatura più elevata.

Per T<T_g i segmenti rigidi agiscono da crosslink di natura fisica dando quindi consistenza al materiale.

Per T>T_g i legami intercatena si rompono permettendo al polimero di essere lavorato come un normale termoplastico. Riportandolo poi a temperatura inferiore si conserva la forma conferitagli mediante il processo di lavorazione attraverso la riformazione di legami idrogeno. Le regioni soft a T_g molto bassa rappresentano la parte flessibile del polimero che risponde alle sollecitazioni meccaniche, mentre le regioni hard con T_g superiore alla T di utilizzo rappresentano la parte rigida del polimero, che agisce come un crosslink fisico bloccando la posizione relativa delle catene impedendone scorrimenti plastici. I crosslink fisici sono termolabili, in quanto le regioni hard diventano amorfe al di sopra della loro T_g.

Le proprietà meccaniche dei poliuretani sono fortemente dipendenti da diversi parametri che regolano la loro produzione. La resistenza a trazione è variabile (25-62 MPa), mentre l'allungamento percentuale varia tra 355-800%, dunque la loro elasticità è superiore a quella della maggior parte degli altri polimeri.

La morfologia superficiale dei poliuretani è influenzata dall'ambiente in cui interagiscono, pertanto questa tenderà a cambiare in risposta all'ambiente circostante:

- Ambiente polare (acqua, sangue): hard segment all'interfaccia in proporzione maggiore.
- Ambiente non polare (aria, sotto vuoto): soft segment in proporzione maggiore.

BIOCOMPATIBILITÀ DEI POLIURETANI

La biocompatibilità di un materiale viene valutata attraverso test biologici. La biocompatibilità dei poliuretani ed in particolare la loro emocompatibilità è legata alla struttura composta da hard e soft segment. A seguito di studi, i segmenti hard sono risultati altamente trombogenici e questo comportamento era dovuto in primo luogo all'elevata cristallinità dei polimeri ed in secondo luogo ai forti legami idrogeno che mostravano sulla superficie.

1.3 Cellule staminali

L'utilizzo delle cellule staminali rappresenta oggi uno dei settori della medicina di maggior interesse in medicina rigenerativa, ovvero la branca della medicina che ha come scopo quello di sostituire il tessuto danneggiato o modificato dal processo dell'invecchiamento con cellule dello stesso tipo, con l'obiettivo di ripristinare la funzionalità di questi organi e tessuti. La medicina rigenerativa identifica dunque l'insieme delle terapie che, nel perseguire l'obiettivo della rigenerazione, utilizzano o comunque sfruttano le potenzialità delle cellule staminali, sia stimolate localmente alla duplicazione e differenziazione, sia trasferite dopo opportuna selezione ed estrazione. Le staminali a tal proposito hanno dimostrato una grande capacità di rigenerazione dei tessuti e di rimodulazione del sistema immunitario.



Figura 9. Panoramica sulle cellule staminali ed esempi di applicazioni.

Esistono quattro tipi di cellule staminali: embrionali, fetali, degli annessi embrionali ed adulte. Le cellule staminali embrionali sono cellule indifferenziate. Le cellule staminali fetali si trovano negli stadi tardivi dell'embrione e nel feto e sono le cellule che in utero provvedono all'accrescimento dei tessuti. Altre cellule con caratteristiche che vanno dalla multipotenza all'unipotenza si possono trovare negli annessi embrionali (cordone ombelicale, placenta, sacco amniotico).

Le cellule staminali embrionali sono totipotenti, ossia possono differenziarsi in tutti i tessuti, fino allo stadio di morula a 8 blastomeri, dopodiché diventano pluripotenti, e sono quindi in grado di differenziarsi in uno qualsiasi dei tre foglietti embrionali ma non negli annessi embrionali.

Con *cellule staminali adulte* vengono indicate le cellule staminali derivate dai tessuti di organismi adulti, per distinguerle da quelle di origine embrionale. Le cellule staminali adulte a loro volta possono essere suddivise in cellule staminali ematopoietiche (HSC) e cellule staminali mesenchimali (MSC). Le prime sono cellule che risiedono prevalentemente nel midollo osseo ma si posso trovare anche nel circolo sanguigno, possono differenziare in eritrociti (globuli rossi), piastrine e cellule del sistema immunitario (globuli bianchi).

Le proprietà delle cellule staminali si possono riassumere in statiche e dinamiche. Le proprietà statiche sono l'essere indifferenziate, avere capacità proliferativa, avere la possibilità di automantenimento e di generare progenitrici differenziate. Le proprietà dinamiche invece includono l'abilità di proliferare ed automantenersi e la flessibilità nella differenziazione.



Figura 10. Proprietà delle cellule staminali: autorinnovamento (capacità di crescere ed espandersi) e differenziazione (capacità di crescere in tipi diversi di cellule).

1.3.1 Cellule staminali mesenchimali (MSC)

Le cellule staminali mesenchimali sono state isolate dalla componente stromale del midollo osseo, dove rappresentano circa lo 0,01% di tutte le cellule nucleate, per la prima volta negli anni '70 da Friedenstein e collaboratori. (19)

Le cellule staminali mesenchimali (MSC) posso differenziare in condrociti (cellule della cartilagine), in adipociti (cellule che compongono il tessuto grasso) e osteoblasti (cellule del tessuto osseo).

La principale fonte di MSC è il midollo osseo, le cellule vengono prelevate tramite un'agoaspirazione di midollo, successivamente per isolare solo le MSC il midollo viene centrifugato (secondo gradiente di Ficoll), le cellule nucleate vengono fatte moltiplicare in vitro e dopo 15 giorni vengono rimosse le cellule non aderenti alla piastra di coltivazione; le cellule rimanenti sono MSC.



Figura 11. Estrazione di MSC dal midollo osseo.

In alternativa le MSC possono essere anche estratte da sangue del cordone ombelicale, dalla placenta, da sangue periferico e dal tessuto adiposo (tessuto grasso); questa ultima fonte di MSC è considerata molto promettente dato che è possibile ottenere una grande quantità di cellule attraverso lipoaspirazione mantenendo lo stesso potenziale differenziativo delle MSC da midollo.

Grazie alle loro particolari caratteristiche le MSC vengono utilizzate in medicina rigenerativa, in terapia cellulare ed in ingegneria dei tessuti da sole o in associazione con biomateriali che funzionino da impalcatura. L'elevato potenziale proliferativo in vitro, il trofismo, la capacità antinfiammatoria ed in modo particolare la possibilità di differenziare e trans differenziare verso cellule specializzate se impiantate nel giusto contesto e microambiente, fanno sì che le MSC possano essere uno strumento per la rigenerazione e la riparazione di tessuti. La cellula staminale è infatti una cellula capace di autorigenerarsi infinite volte, spesso per dare vita all'organismo a cui appartiene. Nelle opportune condizioni ed in seguito a stimoli specifici queste cellule possono generare diversi citotipi differenziati nei tessuti che le ospitano.

Cellule specializzate del tessuto scheletrico



Figura 12. Differenziazione delle cellule staminali mesenchimali: le MSC possono produrre le cellule del grasso, della cartilagine e dell'osso.

Le funzioni principali delle cellule staminali mesenchimali sono tre:

1) Supportano l'ematopoiesi: in altri termini, interagiscono con le cellule staminali ematopoietiche nel midollo (attraverso interazione cellule-cellule a secrezione di fattori di crescita) e favoriscono la loro differenziazione in cellule del circolo sanguigno (globuli rossi, globuli bianchi e piastrine).

2) Richiamo delle cellule staminali ematopoietiche circolanti nel midollo (homing).

3) Effetto immunosoppressivo su linfociti T, B e NK (inibiscono la risposta del sistema immunitario dovuta ai linfociti). (20)

Le cellule sono definite in funzione alle molecole di superficie, per lo più glicoproteine, espresse sulla loro membrana cellulare. Queste molecole sono usate comunemente come marker cellulari e sono dette "cluster di differenziazione" (CD). Ad oggi sono stati identificati più di 320 CD. Generalmente una combinazione di marker è in grado di caratterizzare un solo tipo cellulare, che viene quindi descritto come avente questi marker.

La classificazione cellulare mediante l'uso di CD è stata applicata anche alle cellule staminali. Fenotipicamente le MSCs esprimono un certo numero di marcatori che, sfortunatamente però, non sono specifici per ciascuna MSC. Le MSCs adulte possono esprimere i marker CD105 (SH2), CD73 (SH3/a), CD44, CD90 (Thy-1), CD71, Stro-1, molecole di adesione CD106 (vascular cell adhesion molecule [VCAM]-1), CD166 (activated leukocyte cell adhesion molecule [ALCAM]), molecole di adesione intracellulare (ICAM)-1 e CD29. (21)

1.3.2 Colture cellulari

Per preparare una coltura a partire da un organo o da un tessuto è necessario ricorrere all'uso di mezzi meccanici o enzimatici per ottenere una sospensione omogenea di cellule. Quasi sempre viene preferita la digestione enzimatica che seleziona le cellule che sono in grado di resistere al trattamento con l'enzima conservando la capacità di aderire al substrato e di proliferare.

Il successo di una coltura primaria è maggiore impiegando tessuti embrionali, nei quali è alto il numero di cellule indifferenziate e proliferanti.

Le colture primarie trovano molte applicazioni in ambito farmacologico, tossicologico e naturalmente biologico. Ad esempio la valutazione della tossicità di nuovi farmaci su cellule umane e di roditore può essere utile nella fase di studio e sviluppo di nuove molecole. Per questo si utilizzano test che valutano la sopravvivenza-mortalità e la crescita cellulare.

Oltre ai test farmacologici le colture cellulari sono state indispensabili per l'osservazione di infezioni virali, per la genetica umana e quindi per evidenziare la posizione e la funzione dei geni sui cromosomi nonché il ciclo cellulare, per lo studio dei tumori attraverso cellule trasformate in coltura, per la caratterizzazione di canali ionici ed infine per la produzione di proteine e di anticorpi di interesse biomedico.

L'AMBIENTE ADATTO PER LA VITA DELLE CELLULE (22)

Un ambiente idoneo e tale da garantire la sopravvivenza e l'accrescimento delle cellule in coltura deve fornire un substrato adatto, la temperatura ottimale, un'adeguata fase gassosa ed un mezzo di coltura in cui siano presenti tutte le molecole necessarie.

Quasi tutte le cellule crescono in vitro come un monostrato adeso ad un substrato artificiale. Il polistirene è il materiale plastico di più largo consumo ma le cellule crescono bene anche su altre plastiche quali ad esempio polivinilcloruro, policarbonato, politetrafluoruro etilene. In casi particolari (colture di cellule epiteliali, di neuroni, di cellule muscolari) per migliorare l'adesione, la morfologia e la crescita cellulare e mantenere funzioni cellulari differenziate, la plastica può essere pretrattata con collagene, fibronectina, gelatina o matrici tridimensionali che permettono interconnessioni fra le cellule, simili a quelle che si hanno nei tessuti.

Per quanto riguarda i recipienti di coltura, invece, ne esistono moltissimi e la loro scelta dipende da vari fattori tra cui:

- La resa cellulare, per le cellule monostrato essa è direttamente proporzionale alla superficie del recipiente.
- La modalità di crescita delle cellule, in sospensione o in monostrato.
- Il tipo di atmosfera, se ventilata o meno.
- Il tipo di analisi da effettuare: piastre con più pozzetti sono ideali per esperimenti in cui tutti i campioni devono essere rimossi simultaneamente ed analizzati con lo stesso metodo.

Altri limitanti importanti per costituire delle colture cellulari ottimali sono la temperatura di incubazione, la fase gassosa ed il pH. La maggior parte delle linee cellulari, derivando da mammiferi, cresce ad una temperatura ottimale di 37 °C, mentre le cellule che derivano dagli uccelli si accrescono a 38 °C. I costituenti principali della fase gassosa, invece, sono l'ossigeno, che viene mantenuto in concentrazioni simili a quelle atmosferiche, e l'anidride carbonica, la cui concentrazione viene regolata in base alla concentrazione atmosferica della stessa, alla concentrazione cellulare e alla presenza di altri ioni.

LA STERILITÀ: REQUISITO PER LA COLTURA CELLULARE (23)

La sterilità è un requisito fondamentale in tutte le fasi della coltura di cellule. Infatti, i terreni di coltura, particolarmente nutrienti, possono costituire un eccellente substrato per la crescita di numerosi microrganismi contaminanti, i quali potrebbero compromettere in modo definitivo ed inevitabile la vitalità della coltura stessa. Gli agenti contaminanti che possono infestare una coltura cellulare sono generalmente: virus, batteri, miceti (lieviti e muffe) e micoplasmi, oltre che cellule di tipo diverso (contaminazioni crociate). In ogni caso, le infezioni virali sono piuttosto rare e non costituiscono il primo motivo di allarme nell'ambito delle contaminazioni. Per le colture cellulari, invece, le contaminazioni batteriche sono di gran lunga le più frequenti. A scopo preventivo, spesso, si può aggiungere ai terreni di coltura una miscela di penicillina e streptomicina.

IL TERRENO DI COLTURA CELLULARE (23)

Le cellule, isolate dai tessuti con mezzi meccanici o enzimatici, devono essere messe in terreni di coltura che permettano la loro crescita; questi terreni contengono infatti molti prodotti necessari alla crescita cellulare e al mantenimento delle condizioni fisico-chimiche quali il pH e l'osmolarità. Per crescere le cellule in vitro è necessario che l'ambiente sia il più vicino possibile a quello in cui le cellule si ritrovano in vivo.

Ogni coltura cresce in un opportuno terreno: i diversi terreni di coltura differiscono tra loro per il contenuto in amminoacidi e sali e per la concentrazione di glucosio.

Le sostanze nutritizie sono quelle che vengono utilizzate dalle cellule, ma che esse non possono sintetizzare; sono dunque essenziali per le cellule e comprendono gli amminoacidi, le vitamine (che vengono usate soprattutto quando vi sono basse concentrazioni di siero), i gas disciolti, gli ioni (che servono a mantenere i potenziali di membrana e per il bilancio osmotico nonché il pH a 7), il carbonio organico (sotto forma di glucosio o glutammina), lipidi (come i fosfolipidi e i trigliceridi che molto spesso si trovano nel siero e quindi non vengono aggiunti), ormoni (come l'insulina, il glucagone o il progesterone che sono, però, contenuti già nel siero e quindi vengono aggiunti solo in mancanza del precedente), fattori di crescita (come l'EGF, epidermal growth factor e l'FGF, fibroblast growth factor, che hanno la funzione di stimolare la proliferazione cellulare), antibiotici (per prevenire eventuali contaminazioni batteriche) ed elementi in traccia (come ferro, zinco, selenio).

Il sistema tampone utilizzato è il bicarbonato/acido carbonico; quest'ultimo deve essere fornito alle cellule in forma di CO2, infatti le cellule sono incubate proprio in presenza di anidride carbonica.

Oggi si utilizzano terreni che richiedono l'aggiunta di siero (2-20%) o terreni, detti definiti o sintetici, che non richiedono l'aggiunta di siero, in quanto contengono fattori di crescita purificati.

In ogni caso entrambi i tipi di terreno devono avere i seguenti requisiti:

- Fornire vitamine e minerali in traccia e ioni inorganici.
- Mantenere i parametri fisiologici.
- Non essere tossici per le cellule.

Comunque, il siero è una variabile molto importante per la sua natura complessa; esso è una miscela di fattori di crescita che favoriscono la proliferazione cellulare, fattori di adesione come la fibronectina, ormoni, trasportatori come la transferrina, che trasporta il ferro all'interno della cellula, ed elementi minerali in tracce utili come cofattori di enzimi cellulari (Cu, Fe, Zn, ecc.). I sieri più comunemente usati sono il siero bovino fetale, che contiene una maggiore concentrazione di fattori di crescita, il siero di cavallo adulto e il siero umano.

Le principali funzioni del siero sono:

- Stimolare le funzioni e la crescita cellulare tramite fattori ormonali.
- Stimolare l'adesione al substrato con formazione di una biomatrice.
- Provvedere al trasporto di ormoni, minerali e lipidi. In molti casi un terreno molto "generale" o molto semplice è adeguato.

Il siero bovino fetale (FBS, fetal bovine serum o FCS, fetal calf serum) è il siero più comunemente utilizzato nelle colture cellulari.

Come per antibiotici ed L-glutammina, il siero non è un componente già incluso nel terreno liquido di coltura a causa della sua instabilità, e deve quindi essere aggiunto prima dell'uso.

Il siero bovino è una miscela complessa di proteine plasmatiche, fattori di crescita e minerali.

La proteina globulare albumina del siero bovino è uno dei maggiori componenti del prodotto.

La ricca gamma di proteine del siero bovino fetale mantiene le cellule coltivate in un ambiente in cui queste possano sopravvivere, crescere e dividersi.

Il primo terreno a composizione definita è stato il BME o Eagle's Basal Medium; altri terreni sono stati sviluppati a partire da questo, come ad esempio il DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), che prevede una maggiore quantità di vitamine e aminoacidi rispetto al BME, o il MEM (Minimum Essential Medium), il quale è stato messo a punto per cellule più esigenti per le quali il BME non andava bene.

Una volta scongelate le cellule ed ottenuta la sospensione cellulare, le cellule vengono contate e ne viene valutata la vitalità, dunque si procede all'utilizzazione della preparazione delle cellule come tali, cioè in sospensione, oppure alla semina su piastre. La crescita delle cellule in vitro viene assicurata dalla presenza di elementi nutritivi di base (glucosio, aminoacidi, sali minerali) e fattori di crescita (presenti nel siero).

La sospensione viene seminata su piastre di Petri in plastica. L'adesione cellulare si completa di solito in 90 minuti di incubazione a 37°C in presenza di CO2 al 5%; per gli epatociti umani l'adesione risulta migliore dopo 3 ore di incubazione. Al termine di questa fase le piastre vengono lavate con soluzione fisiologica per asportare le cellule morte non adese. Una volta ottenuta la coltura cellulare per poter sopravvivere nel tempo, necessita di alcune cure: bisogna provvedere al ricambio del terreno di coltura quando esso sia divenuto inutilizzabile per le cellule e bisogna provvedere ad effettuare una "espansione" o "subcoltura" quando le cellule siano giunte ad occupare tutto lo spazio disponibile all'interno del recipiente di coltura, per cui si dice che sono giunte a confluenza (contatto).



Figura 13. Passaggi principali nel processo di crescita di cellule animali in coltura.

A causa dell'inibizione da contatto, in una coltura confluente, le moltiplicazioni cessano e si ha quindi un rallentamento del metabolismo, con conseguente accumulo di prodotti tossici. Per permettere alle cellule di continuare a crescere è quindi necessario procedere a periodici trapianti in terreni freschi. A tale scopo si utilizza un procedimento indicato come tripsinizzazione, che consente di staccare le cellule dal substrato al quale sono adese, risospenderle in soluzione e quindi trapiantarle in mezzo fresco, ricco di tutti quei componenti necessari alle cellule per le loro attività metaboliche (vitamine, sali inorganici, proteine e costituenti sierici). Tale procedimento si serve della tripsina, un enzima proteolitico, che digerisce il materiale glicoproteico presente sulla membrana cellulare, responsabile dell'adesione, senza distruggere o uccidere le cellule. In primo luogo bisogna rimuovere il terreno di coltura residuo il quale contiene un inibitore della tripsina (alfa-1 antitripsina), poi lavare le cellule con soluzione salina e aggiungerci la tripsina che staccherà le cellule. (1) Le cellule vengono poi seminate sulle fibre di interesse, posizionate su degli appositi supporti. In giorni stabiliti, generalmente al 2°, 5° e 12° giorno di esperimento, vengono effettuati dei controlli riguardo la proliferazione cellulare e l'allineamento delle cellule secondo la direzione delle fibre; si procede inoltre all'estrazione dell'RNA.

1.3.3 Droplet Digital PCR (24)

La reazione a catena della polimerasi (PCR) è un sistema relativamente semplice e largamente usato in biologia molecolare per amplificare ed individuare sequenze di DNA e RNA. In particolare, la Droplet Digital PCR è una tecnica che si basa su metodi di amplificazione della PCR tradizionale e sulla fluorescenza per fornire una quantificazione altamente sensibile degli acidi nucleici.

La Droplet Digital PCR (ddPCR) rappresenta un metodo digitale di PCR che utilizza un sistema di gocce formate a partire da un'emulsione acqua-olio per creare delle separazioni che dividono le molecole di DNA. Le gocce hanno essenzialmente la stessa funzione dei pozzetti delle multiwell in cui ha luogo la PCR, sebbene in un formato molto più piccolo.

La separazione del campione è un aspetto chiave della tecnica della ddPCR: gli acidi nucleici vengono suddivisi in 20000 gocce con volume dell'ordine del nanolitro, e l'amplificazione della PCR è portata avanti in ciascuna goccia. Nel caso in cui si partisse da un campione di RNA, questi deve essere retrotrascritto in DNA complementare (cDNA) ad opera della trascrittasi inversa prima di essere amplificato tramite la PCR. Una volta eseguita l'amplificazione, le gocce contenenti la sequenza di target sono individuate mediante la fluorescenza e segnate come positive, mentre quelle senza fluorescenza sono marcate come negative; attraverso l'analisi delle gocce positive e negative si ottiene una quantificazione della sequenza di target. Questa tecnica richiede una quantità minore di campione rispetto ad altri sistemi di PCR digitale disponibili sul mercato, permettendo quindi di ridurre i costi e preservare campioni preziosi.



Figura 14. Gli step della ddPCR: A) formazione delle gocce; B) PCR; C) lettura ed analisi dei risultati.

1.4 Fibre allineate: Stato dell'arte

Le nanofibre ottenute tramite elettrospinning sono tipicamente raccolte in una membrana non tessuta, la quale presenta generalmente un'orientazione casuale delle fibre e scarse proprietà meccaniche. Al contrario, la maggior parte delle matrici extracellulari native presenti nei tessuti o negli organi (ad esempio nervo sciatico, cuore, tendine e vasi sanguigni) presenta un'architettura anisotropa, importante per la funzione tissutale. Si rende dunque necessaria una precisa architettura al fine di imitare la matrice extracellulare per guidare la crescita delle cellule o la rigenerazione tissutale. (25)

A causa della flessibilità nella selezione dei materiali così come all'abilità di controllare le proprietà dello scaffold, le strutture ottenute mediante elettrospinning possono essere impiegate in numerose applicazioni tissutali.

Per ciò che concerne l'ingegneria tissutale del tessuto osseo, la sfida più grande è quella di trovare dei sostituti biologici adatti che agiscano come scaffold.

Lyu et al. hanno ad esempio dimostrato nel loro studio il vantaggio di usare nanofibre orientate ed organizzate come scaffold per la riparazione e la ricostruzione del tessuto osseo. Se confrontate con le fibre random, le cellule staminali del midollo osseo (BMSC) presentano rispetto a quelle allineate una maggiore espressione di OSX e RUNX2, fattori di trascrizione necessari per la differenziazione degli osteoblasti. (26)



Figura 15. Espressioni dei geni OSX e RUNX2 al giorno 10 e al giorno 21.

L'osso naturale presenta significative proprietà meccaniche anisotrope con una ECM e cellule ossee altamente orientate. Dunque, nanofibre allineate elettrospinnate mostrano grande potenziale in qualità di scaffold per l'ingegneria tissutale ossea.

Jose et al. hanno dimostrato che membrane composite nanofibrose allineate in maniera uniassiale di PLGA/idrossiapatite fungono da scaffold ideali per l'ingegneria tissutale dell'osso; in particolare si ha un aumento del diametro medio delle fibre all'aumentare della quantità di nano-idrossiapatite utilizzata. (27)

L'ingegneria tissutale del tessuto muscolare scheletrico rappresenta invece un approccio allettante per superare i problemi dovuti al trasferimento autologo di tessuto muscolare ed una valida alternativa nel potenziamento della rigenerazione muscolare.

Choi et al. hanno dimostrato che le nanofibre orientate unidirezionalmente, in confronto a quelle random, inducono l'allineamento delle cellule muscolari e la formazione dei miotubi. Gli scaffold di nanofibre composite allineate seminate con cellule muscolari scheletriche possono essere sfruttati come tessuti funzionali impiantabili in pazienti con grossi difetti muscolari. (28) Gli studi condotti da Zhu et al. per quanto concerne il tessuto vascolare hanno concluso che le fibre orientate e rivestite di fibrina biofunzionale inducono le cellule muscolari ad allinearsi lungo la direzione della fibra. Le fibre elettrospinnate orientate macroscopicamente rappresentano un materiale adatto per la fabbricazione di scaffold che possono essere impiegati per la realizzazione di vasi sanguigni funzionali. (29)

Per quanto riguarda invece l'ingegneria tissutale del tessuto nervoso, Ghasemi-Mobarakeh et al. hanno dimostrato come la direzione dell'elongazione delle cellule nervose e la crescita dei neuriti sugli scaffold nanofibrosi siano parallele alla direzione delle fibre. Scaffold nanofibrosi a base di PCL/gelatina 70:30 hanno dimostrato essere un supporto bioartificiale adatto per la rigenerazione tissutale del nervo.


Figura 16. PCL/gelatina 70:30 prima (C) e dopo il test di biodegradabilità a due settimane (D).

Sebbene gli scaffold nanofibrosi con orientazione random siano utili in ingegneria tissutale, i risultati hanno indicato che le nanofibre allineate supportano in maniera sostanziale le cellule nervose e migliorano lo sviluppo dei neuriti ed il processo di differenziamento cellulare. (30) Schnell et al. hanno invece esaminato l'abilità degli scaffold nanofibrosi allineati a dirigere la crescita degli assoni e la migrazione delle cellule gliali durante la rigenerazione del nervo periferico. In questo studio, gli scaffold prodotti mediante elettrospinning con PCL e collagene/PCL hanno mostrato una buona capacità di guidare gli assoni. (31)

La somiglianza degli scaffold nanofibrosi elettrospinnati con la matrice extracellulare naturale li ha resi uno strumento largamente utilizzato nello studio del comportamento cellulare. Dal momento che molte matrici extracellulari sono costituite da fibre di collagene organizzate, questo ha portato a molti studi sull'effetto delle fibre allineate elettrospinnate su vari tipi di cellule. Diversi studi hanno dimostrato che le cellule coltivate su substrati fibrosi allineati vengono influenzate dalla direzione delle fibre; ciò è particolarmente utile nell'ingegneria neurale dove l'adattabilità dello scaffold è in parte determinata dalla lunghezza del neurite. Nei substrati costituiti da nanofibre altamente allineate, la crescita dei neuriti può essere fino al 20% superiore di quella sulle fibre random.

Lo studio di Yang et al. ha invece descritto l'efficacia degli scaffold nano/micro fibrosi allineati di acido poli(L-lattico) PLLA nell'ingegneria tissutale neurale rispetto agli scaffold di PLLA con orientazione random. I risultati mostrano che la direzione dell'elongazione nelle cellule staminali neurali e la crescita dei neuriti vanno in parallelo con la direzione delle fibre di PLLA per gli scaffold allineati. In base ai risultati sperimentali ottenuti, gli scaffold costituiti da nanofibre allineate di PLLA possono essere impiegati come potenziali carrier cellulari nell'ingegneria tissutale neurale. (32)

Le proprietà fisiche dei substrati, come la rigidezza e la topografia, inducono la differenziazione delle cellule staminali mesenchimali in lignaggi ossei, muscolari o neuronali. Le cellule

staminali pluripotenti indotte (hiPSCs) rappresentano una risorsa molto promettente per la medicina rigenerativa; ciononostante, le proprietà fisiche non hanno dimostrato di indurre le cellule staminali pluripotenti a differenziarsi in lignaggi specifici, come ad esempio quelli tendinei.



Figura 17. Diagramma schematico del processo di differenziazione del lignaggio tendineo mediante l'utilizzo di substrati topografici.

Lo studio portato avanti da Zhang et al. ha avuto dunque come scopo quello di sviluppare una graduale strategia topografica robusta per indurre le cellule hiPSCs a differenziarsi in lignaggi specifici del tendine, sfruttando la tecnica dell'elettrospinning per fabbricare fibre ultrasottili e ben allineate che mimino la microstruttura nativa dei tendini e le loro proprietà meccaniche. (33)

Shang et al. hanno supposto che per la rigenerazione di strutture altamente organizzate quali tendini e legamenti solo gli scaffold fibrosi allineati possano agire da guida topografica adeguata per le cellule.

L'allineamento delle fibre influisce sulle proprietà meccaniche degli scaffold e ne migliora la stabilità strutturale. Negli esperimenti di coltura cellulare, gli scaffold allineati hanno diretto l'orientazione delle cellule dei legamenti periodontali, aumentandone allo stesso tempo la proliferazione e la migrazione. Questi risultati suggeriscono che le fibre allineate elettrospinnate possano rappresentare un buon candidato in qualità di scaffold per applicazioni di rigenerazione tissutale periodontale. (34)

La riparazione del tendine rappresenta spesso una sfida clinica dal momento che mancano dei biomateriali che presentino caratteristiche ideali per questo scopo. Le fibre allineate elettrospinnate presentano una struttura simile a quella tendinea e ciò favorisce la tenogenesi; il meccanismo non risulta però ancora chiaro e tali fibre, da sole, non sono in grado di promuovere la teno-differenziazione delle cellule staminali. Per questo motivo, Zhang ha proposto una strategia per aumentare l'effetto tenogenetico delle fibre allineate andando ad incorporare la Trichostatina A (TSA) nelle fibre di PLLA ottenute mediante elettrospinning; in

questo modo è stato dunque dimostrato che tale molecola ha un effetto additivo nel dirigere la differenziazione tenogenica. (35)

Gli studi precedentemente elencati hanno dimostrato che, se comparati con scaffold non allineati, gli scaffold polimerici elettrospinnati allineati presentano una maggiore anisotropia ed un effetto tenogenico più elevato. Nonostante questo, raggiungere una rapida infiltrazione cellulare attraverso tutto lo spessore dello scaffold risulta ancora una sfida. Nel lavoro portato avanti da Orr et al., gli scaffold allineati hanno evidenziato una espressione di tenomodulina significativamente maggiore rispetto a quelli non allineati ed hanno mostrato inoltre la presenza di fibre di collagene allineate lungo tutto lo spessore dello scaffold, indice di un aumento della tensione di snervamento e del modulo di Young degli scaffold allineati lungo l'asse di allineamento delle fibre. (36)

I futuri progressi nell'Ingegneria tissutale dipenderanno dallo sviluppo di nuovi sistemi di scaffold capaci di modulare attivamente i comportamenti delle cellule per la rigenerazione tissutale funzionale.



Figura 18. Alcuni esempi di utilizzo delle cellule staminali mesenchimali all'interno del corpo umano.

2. Materiali e metodi

2.1 Sintesi del KHC2000

Il poliuretano utilizzato per questo lavoro di tesi è il KHC2000, sintetizzato presso il laboratorio del Politecnico di Torino nella sede distaccata di Alessandria.

Tale materiale deve il suo nome ai reagenti utilizzati nel processo:

- MACRODIOLO: PCL diolo con peso molecolare pari a 2000 Da;
- DIISOCIANATO: 1,6-esametilendiisocianato (HDI), un isocianato alifatico. In alternativa si può usare anche l'1,4-butandiisocianato (BDI), ma si predilige il primo perché è più economico nonostante il BDI si degradi molto bene in putrescina, la quale favorisce l'adesione cellulare. HDI e BDI hanno comunque le stesse proprietà e sono entrambi biocompatibili.
- ESTENSORE DI CATENA: estere etilico della lisina. È una diammina di derivazione amminoacidica che non presenta gruppi pendenti o sequenze particolari ma conferisce proprietà elastomeriche. In confronto ad altre sostanze che possono essere utilizzate come estensori di catena (1,4-cicloesandimetanolo, N-Boc-serinolo o il peptide H-Ala-Ala-NH-(CH₂)₄-NH₂), la lisina presenta proprietà meno rigide ma elastomeriche (modulo elastico: 10 MPa, deformazione a rottura: 800-900%) e garantisce buone prestazioni meccaniche, le quali sono inferiori se le zone cristalline e quelle amorfe risultano più distinguibili. (37)

Quello che si ottiene è un poliestere uretano urea che prende il nome di KHC2000, dove K indica la lisina, H sta per HDI e C2000 si riferisce al PCL con peso molecolare di 2000 Da. La reazione eseguita avviene in due step con formazione del prepolimero ed è di tipo wet (in umido): avviene cioè in un solvente organico, dunque i reagenti si trovano allo stato di soluzione. La temperatura influenza le cinetiche ma non è indispensabile affinché la reazione avvenga.



Figura 19. KHC2000 ottenuto alla fine del processo di sintesi.

Poiché in generale i gruppi –OH (dati dalla presenza di acqua) competono con il diisocianato per reagire con il macrodiolo, la reazione deve avvenire in ambiente anidro. Per questo motivo il macrodiolo è stato messo in stufa sottovuoto a 100°C per 8 ore e raffreddato sempre sottovuoto a 40°C. Il diisocianato è stato distillato sottovuoto per eliminare l'acqua e gli stabilizzanti che ne limitano la reattività. La lisina è stata invece fatta essiccare a temperatura ambiente e conservata sottovuoto.

Oltre a questi tre reagenti principali, vengono inoltre utilizzati un catalizzatore, il dibutiltindilaurato a base stagno (DBTDL), il quale permette la formazione del legame uretanico nel primo step, e la trietilammina (TEA), la quale viene aggiunta nel secondo step ed è necessaria per desalificare la lisina, i cui gruppi -NH₂ altrimenti non sarebbero reattivi. Infine la vetreria utilizzata (pallone, siringhe, ecc.) è stata posta overnight in stufa a 120°C.

PROCESSO WET

Il primo step della sintesi avviene a 80°C. All'interno di un pallone il macrodiolo è stato fatto solubilizzare in 1,2 dicloroetano (DCE) (la concentrazione deve essere pari al 25% wt/v). A questo punto, mediante delle micropipette, si aggiunge il diisocianato in rapporto 2:1 rispetto alle moli di macrodiolo. Dal momento che si lavora a temperatura ambiente, non è più necessario il condensatore.

Successivamente è stato addizionato il catalizzatore DBTDL in gocce e si è lasciato solubilizzare per 2,5 ore, al termine delle quali può ritenersi concluso il primo step.

In parallelo si prepara l'estensore di catena che si addiziona al prepolimero, costituito dal macrodiolo e dal diisocianato, solo dopo aver raffreddato il sistema.

Il secondo step ha una durata di 16 ore ed avviene a temperatura ambiente. Alla soluzione preparata nel primo step è stato aggiunto l'estensore di catena con un rapporto molare 1:1 con il macrodiolo, disciolto in DCE con una concentrazione pari al 3% wt/v.

Infine è stata aggiunta la TEA, la quale in base ai protocolli (37) deve essere 2 mL ogni 15 g di PCL. La TEA è stata aggiunta circa un'ora prima della fine del primo step e la soluzione Lys-DCE-TEA è stata tenuta a circa 50-60°C.

Alla fine di questo step diventa importante interrompere la sintesi; i gruppi isocianato risultano infatti reattivi soprattutto con l'umidità, perciò occorre eliminare i gruppi che non hanno reagito. Si utilizza dunque l'alcol, in particolare il metanolo, per far reagire il suo gruppo -OH con quello -NCO e dunque chiudere i gruppi isocianato. Dal momento che non si conosce il numero preciso di tali gruppi, il metanolo viene aggiunto in eccesso: 6 mL ogni 16 g teorici di polimero ottenuto, per un totale di 18 mL.

Al termine della sintesi, al fine di eliminare il solvente, il polimero è stato fatto precipitare in un non solvente, l'etere di petrolio, in rapporto 4:1 (volume:volume) con il DCE.

Il processo di purificazione è legato al peso molecolare poiché le catene più lunghe precipitano più velocemente. Sono state effettuate due precipitazioni, nella seconda si utilizza la dimetilformammide (DMF) precipitata in metanolo in rapporto 1:5 con il DCE. Si utilizza tale rapporto perché il metanolo è più selettivo dell'etere e quindi il rapporto va aumentato rispetto al precedente 1:4.

Dopo ogni precipitazione si lascia la soluzione in agitazione per 10 minuti, facendola poi decantare ad agitazione spenta. Dopo aver eliminato il non solvente, il polimero è stato fatto asciugare sotto cappa a temperatura ambiente.

2.2 Preparazione delle fibre

Le fibre sono state ottenute mediante la tecnica dell'elettrofilatura, utilizzando l'elettrospinning (Linari Engineering s.r.l.) presente nel laboratorio di Bioingegneria Industriale del Politecnico di Torino.



Figura 20. Elettrospinning (Linari Engineering s.r.l.) del laboratorio di Bioingegneria Industriale.

Il KHC2000 è stato disciolto (concentrazione pari all'8% wt/v) in una miscela di esafluoropropanolo ed acido formico in rapporto 80/20 (v/v). I solventi sono stati acquistati da Sigma-Aldrich ed utilizzati senza bisogno di ulteriori processi di purificazione.

I parametri di processo impostati per ottenere le nanofibre sono stati ottimizzati in lavori di tesi precedenti (38) e sono:

- tensione: 27 kV;
- velocità del flusso: 2 mL/h;
- numero di giri del collettore rotante: 3000 rpm.

Attraverso tale tecnica sono stati prodotti tre tipi di fibre utilizzando tre diversi collettori:

- Fibre random mediante collettore piano;
- Fibre allineate sottili mediante collettori paralleli;
- Fibre allineate spesse mediante mandrino rotante.



Figura 21. Collettori utilizzati: a) piano; b) collettori paralleli; c) mandrino rotante.

2.3 Caratterizzazione delle fibre

2.3.1 Microscopio elettronico a scansione (SEM)

Il microscopio elettronico a scansione (scanning electron microscope, SEM) è uno strumento elettro-ottico. Si basa sull'emissione di un fascio elettronico e sulla successiva analisi dei segnali prodotti dall'interazione del fascio con il campione in esame. Con il SEM si possono analizzare campioni di varie tipologie, sia per natura (unica eccezione i materiali contenenti fluidi), che per forma e dimensioni (fino a circa 1 dm³). Il vincolo è che i campioni siano conduttivi: se non lo sono naturalmente è sufficiente ricoprirli con un sottilissimo strato di materiale conduttore (oro o grafite).

Il SEM è costituito dai seguenti elementi:

- una colonna elettronica, dove viene generato il fascio di elettroni;
- una camera da vuoto, dove il fascio elettronico interagisce con il campione;
- vari tipi di rilevatori, che acquisiscono i segnali dell'interazione fascio campione e li trasferiscono agli elaboratori;
- uno schermo, in cui l'immagine viene ricostruita.

La sorgente elettronica, posta in cima alla colonna, è costituita da un filamento, comunemente di tungsteno, che portato ad elevata temperatura produce elettroni per effetto termoionico. Gli elettroni vengono accelerati ad energia variabile tra alcune centinaia e alcune decine di migliaia di eV (in genere da 200 eV a 30 keV), grazie a un anodo posto sotto il filamento. Il fascio che emerge è divergente, ma viene fatto riconvergere e focalizzato da numerose lenti elettromagnetiche e da fenditure all'interno della colonna. All'estremità inferiore di quest'ultima, una serie di bobine di scansione deflette il fascio fornendogli un movimento alternato lungo linee parallele ed equidistanti, di modo che, una volta raggiunta la superficie del campione, vada a colpirne un'area predefinita. Il materiale da esaminare si trova all'interno della camera da vuoto. Penetrando all'interno del campione, gli elettroni del fascio perdono energia, che viene riemessa dal materiale in varie forme: elettroni (secondari, retrodiffusi, assorbiti, trasmessi, Auger), coppie elettrone-lacuna, radiazione elettromagnetica (nello spettro UV-IR) e radiazione X. A differenza del microscopio ottico, che fornisce un'immagine reale del preparato in esame, il SEM restituisce un'immagine virtuale a partire dai segnali emessi dal campione. Essi variano di intensità, punto per punto, in funzione delle anisotropie morfologiche, chimiche e strutturali del campione. Tali segnali vengono raccolti, convertiti in digitale, elaborati e visualizzati su uno schermo a tubo catodico (cathode ray tube, CRT). L'intensità del segnale selezionato modula il pennello del CRT, la cui deflessione avviene in

sincronia con il fascio. In questo modo, il sistema riporta il segnale sul monitor, facendo corrispondere ad ogni punto un pixel. (39)



Figura 22. Schema generale del microscopio elettronico a scansione (SEM).

La morfologia delle nanofibre ottenute con l'elettrospinning è stata analizzata con il microscopio SEM (Leo 1450 MP) ottenendo immagini a diversi ingrandimenti (500x, 1000x, 2000x). I campioni prima di essere osservati sono stati rivestiti con un sottile film d'oro attraverso lo strumento Agar Auto sputter coater.

L'analisi dimensionale delle fibre a partire dalle immagini al SEM è stata effettuata tramite il software ImageJ.

2.3.2 Microscopio a forza atomica (AFM)

Il microscopio a forza atomica appartiene alla famiglia di microscopi genericamente indicata con l'acronimo SPM (Scanning Probe Microscopes o microscopi a scansione di sonda). Questo tipo di microscopio rappresenta un metodo molto efficace per l'imaging di polimeri, blend polimerici e polimeri compositi con una risoluzione laterale nanometrica. Per applicazioni polimeriche, l'AFM si aggiunge alla microscopia ottica e a quella elettronica (SEM e TEM) come strumento essenziale per la caratterizzazione morfologica. Il microscopio a forza atomica presenta dei vantaggi rispetto agli altri microscopi perché prevede un'interazione meccanica tra

la punta ed il campione, che permette di fare imaging in situazioni in cui i microscopi basati su elettroni o fotoni faticano o addirittura falliscono. (40)

Nell'AFM, una piccola punta (tip) di materiale conduttivo molto rigido è fissata all'estremità di una barretta o microleva (cantilever) che preme la punta sul campione durante il processo di misura. Nell'AFM la punta (della dimensione di pochi µm) scorre sulla superficie di un campione che si muove lungo i tre assi cartesiani mediante un movimento indotto da un meccanismo piezoelettrico. Un sistema di servocontrollo (feedback) consente di tenere la punta in condizioni di "forza costante" (per acquisire informazioni sulla forza di interazione tra la superficie del campione e la punta) o di "altezza costante" (per acquisire informazioni sulle variazioni in altezza del campione). Le oscillazioni del cantilever sono rilevate da un sistema ottico che registra anche lievissimi movimenti della barretta che sostiene la punta. Un diodo laser è focalizzato sulla parte posteriore riflettente della barretta.



Figura 23. Schema di funzionamento dell'AFM.

In base alla modalità di interazione della punta con la superficie del campione gli AFM possono essere impiegati in modalità:

- *repulsive* o *contact* (se la punta tocca effettivamente il campione, ossia la distanza tra punta e campione è inferiore alla dimensione media di un raggio atomico);
- *attractive* o *non-contact* se, pur essendo prossima alla superficie del campione, la punta non lo tocca effettivamente;
- *tapping* nel caso in cui la punta esplora il campione in modo da avere un contatto discontinuo determinato da una successione regolare di movimenti oscillatori (passando cioè continuamente dalla condizione *contact* a quella *non-contact*).



Figura 24. Curva forza-distanza tra la punta dell'AFM ed il campione, con rappresentazione delle interazioni maggiori che intervengono durante la misura.

Nell'AFM tipologie differenti di forze che si stabiliscono tra campione e punta possono essere impiegate per produrre immagini. Nella modalità *non-contact* (con distanze tra punta e campione superiori a 1 nm) le immagini sono prodotte da forze di van der Waals, o da forze



elettrostatiche, magnetiche e capillari. Nella modalità *contact* prevalgono le forze di repulsione ionica. Oltre a tali forze particolarmente importante ai fini di un'analisi completa e dettagliata del campione è la forza di attrito che agisce tra punta e superficie. Oltre ad essere un indicatore delle proprietà del campione, l'attrito o "forza laterale" o "deflessione laterale" fornisce informazioni circa le modalità di interazione tra punta e superficie. (41) In questo lavoro di tesi le immagini in microscopia a forza atomica sono state ottenute tramite l'AFM Jpk Nanowizard 3 presente presso l'I.N.Ri.M. di Torino.

Il microscopio è stato utilizzato in *tapping mode*, più precisamente in *intermittent contact mode*, per riuscire ad acquisire immagini fino a 2x2µm.

È stata inoltre effettuata una Force spectroscopy mediante lo stesso strumento ma utilizzando una punta diversa, di forma sferica e di raggio pari a 3,75µm, al fine di ottenere informazioni

riguardanti il modulo elastico delle fibre. In questa modalità, il sistema laser-fotodiodo misura la deflessione del cantilever e la rapporta allo spostamento verticale della punta attraverso l'espansione di un trasduttore piezoelettrico. Il risultato è una differenza nella tensione misurata tra le due metà del foto-detettore, che viene in seguito convertito nella deflessione del cantilever. Dal momento che quest'ultima può essere convertita in forza tramite la legge di Hooke, se la costante della molla del cantilever è nota, le curve forza-spostamento (comunemente chiamate curve di forza) possono essere riportate. (42)

Mediante il software JPKSPM Data Processing, dalle curve di forza è stato poi possibile ricavare il modulo elastico alla nanoscala delle fibre.

2.3.3 Microscopio a fluorescenza

L'immunofluorescenza consiste nella visualizzazione della reazione antigene-anticorpo marcando uno dei due reagenti con sostanze, chiamate fluorocromi (es.: fluoresceina, rodamina) che emettono fluorescenza se osservate al microscopio a luce UV.



Figura 25. Principio di funzionamento dell'immunofluorescenza.

È applicabile su colture cellulari e sospensioni di cellule animali, batteriche e protozoarie. Le sezioni congelate e le colture cellulari rappresentano i substrati ottimali per questo tipo di microscopia.

Gli scopi di questa tecnica sono:

- Individuazione di microrganismi patogeni nei tessuti infetti
- Individuazione di complessi antigene-anticorpo (malattie autoimmuni)
- Rilevazione di anticorpi specifici nel siero di sangue
- Identificazione di strutture di superficie o markers tumorali

La fluorescenza è la proprietà di alcuni atomi e molecole di assorbire la luce ad una particolare lunghezza d'onda ed emettere luce ad una lunghezza d'onda maggiore. (43)

Alcuni materiali biologici, soprattutto vegetali come la cellulosa, colpiti da radiazione UV emettono naturalmente fluorescenza: si parla in tal caso di fluorescenza primaria o autofluorescenza. La maggior parte dei campioni biologici però emette fluorescenza solo dopo marcatura con fluorocromi: in tal caso si parla di fluorescenza secondaria o indotta. (44)



Figura 26. Immagine schematica di un microscopio a fluorescenza.

In un microscopio a fluorescenza, la luce di eccitazione proviene da sopra il campione (o da sotto, nei microscopi invertiti) e attraversa prima l'obiettivo, poi il campione stesso. La fluorescenza che origina dal campione crea la cosiddetta luce di emissione, che viene focalizzata su un rivelatore dallo stesso obiettivo attraverso cui è passato il fascio di eccitazione. La luce di eccitazione è rimossa dal segnale emesso dal campione mediante un filtro, posto tra l'obiettivo e il rivelatore. (1)



In questo lavoro di tesi è stato utilizzato un microscopio Zeiss 2 Axioplan presente nei laboratori dell'I.N.Ri.M. di Torino; attraverso tale strumento è stato indagato l'allineamento delle cellule nella direzione delle fibre di KHC2000, dopo aver trattato i campioni con calceina per renderli fluorescenti.

2.3.4 Prove meccaniche

Le proprietà meccaniche delle fibre sono state valutate mediante prove meccaniche a trazione, che permettono di caratterizzare il materiale alla macroscala. La prova di trazione (o prova di

trazione uniassiale) è una prova di caratterizzazione dei materiali che consiste nel sottoporre un provino di dimensioni standard (normale) di un materiale in esame ad un carico F monoassiale inizialmente nullo che viene incrementato fino a un valore massimo che determina la rottura del materiale. (1)

Per fare ciò è stata utilizzata una macchina elettromeccanica di trazione MTS QTEST Elite presente nei laboratori del Politecnico di Torino. I provini sono stati ottenuti posizionando le fibre sotto una pressa per ottenere la tipica forma ad osso di cane, con lunghezza iniziale del provino pari a 3,7 cm, larghezza della parte centrale pari a 0,3 cm e spessore misurato di volta in volta per ogni campione attraverso un calibro.



Figura 27. Forma del provino ad osso di cane utilizzato per le prove meccaniche.

Le prove a trazione sono state effettuate mediante una cella di carico di 10 N ad una velocità di trazione di 5 mm/min. I dati raccolti riguardanti le tensioni e le deformazioni dei provini sono stati elaborati poi in Excel per ottenere i valori del modulo elastico a partire da curve sforzo-deformazione. Una tipica curva ingegneristica sforzo-deformazione di un materiale polimerico termoplastico è la seguente:



Figura 28. Curva sforzo-deformazione tipica dei polimeri termoplastici.

Il grafico si può dividere in zone: la prima regione è quella elastica, in cui il materiale segue la legge di Hooke e dunque lo sforzo è proporzionale alla deformazione. Successivamente si incontra la regione plastica, nella quale il materiale non segue più la legge di Hooke e,

rimuovendo lo sforzo applicato, se non si arriva a rottura nel provino rimane una deformazione residua permanente detta *deformazione plastica*.

2.3.5 Prove di degradazione

Per studiare la velocità di degradazione delle fibre di KHC2000 è stata effettuata la valutazione della perdita di peso dei campioni. La degradazione è stata valutata a 4 settimane in soluzione tampone fosfato (PBS) e in condizione enzimatica, utilizzando la lipase (0,03% w/w in PBS) a 37°C. I campioni sono stati analizzati nei seguenti time step: 1, 3, 7, 14, 21, 28 giorni. Ogni tre giorni è stato effettuato un refresh di soluzione contenente lipasi ed ogni settimana un refresh di soluzione contenente PBS.

Le fibre sono state tagliate in rettangoli di dimensioni 1x3 cm, ognuno pesato ed inserito all'interno di una bijou, anch'essa dal peso noto. Sono stati preparati 4 campioni per ogni intervallo di tempo considerato (1-3 giorni, 1÷4 settimane), per un totale dunque di 48 campioni. Metà delle bijou è stata riempita con una soluzione di acqua bidistillata e PBS (una pastiglia ogni 200 mL di acqua) e l'altra metà con una soluzione di lipase allo 0,03% w/w disciolta in acqua bidistillata e PBS. Al termine di ogni intervallo temporale di interesse, i campioni hanno subito un lavaggio in acqua biodistillata e sono stati lasciati ad asciugare in stufa a 37°C prima di essere nuovamente pesati.

La perdita di peso percentuale è stata calcolata con la seguente formula:

$$\Delta w\% = \frac{peso\ iniziale - peso\ finale}{peso\ iniziale} \times 100$$

Inoltre la morfologia delle fibre degradate è stata osservata al SEM.

2.4 Prove cellulari

Una volta prodotte le fibre, si è indagato se queste potessero rappresentare uno scaffold ideale per la rigenerazione dei tessuti soft, in particolare di quello tendineo. Per fare tali valutazioni sono state effettuate delle prove cellulari sulle fibre in KHC2000, confrontando il comportamento di quelle allineate (spesse e sottili) e delle random.

Le prove sono state effettuate presso l'I.N.Ri.M. di Torino con l'utilizzo di cellule staminali mesenchimali (HMSC).

Per la conservazione delle cellule per lunghi periodi si ricorre alla conservazione in azoto liquido (-196°C). Il raffreddamento graduale comporta il mantenimento del campione dapprima

in ghiaccio, poi si arriva lentamente a temperature di -70°C e quindi il campione viene trasferito in azoto liquido.

Lo scongelamento, al contrario, deve essere rapido: il campione viene trasferito in un bagnetto termostatato a 37°C per pochi minuti e le cellule si risospendono in medium completo per la piastratura.

Una volta scongelate le cellule ed ottenuta la sospensione cellulare, si procede alla semina delle cellule su piastre. In particolare vengono utilizzate delle Petri in polistirene, con rivestimento in poli-L-lisina o poli-D-lisina. La poli-D-lisina (PDL) e la poli-L-lisina (PLL) sono composti sintetici che migliorano l'adesione cellulare e l'assorbimento proteico alterando le cariche in superficie sul substrato della coltura. Essendo i trattamenti PDL e PLL molecole sintetiche, non stimolano l'attività biologica nelle cellule in coltura presenti su di esse e non introducono le impurità trasportate dai polimeri naturali.

Al termine della semina delle cellule, le Petri vengono messe in incubatore a 37°C in presenza di CO2 al 5%.

Si procede dunque alla tripsinizzazione per permettere alle cellule di continuare a crescere. Protocollo:

- Osservazione della piastra al microscopio per effettuare la valutazione della confluenza
- Aspirazione del terreno di coltura
- Lavaggio con PBS (tampone fosfato salino) per eliminazione detriti cellulari, cellule morte e residui di terreno che potrebbero altrimenti inibire l'azione della tripsina.
- Aspirazione del PBS.
- Aggiunta di 3 mL di tripsina.
- Quando le cellule adese iniziano a staccarsi (distaccamento aiutato anche da azione meccanica, con battitura della piastra) si procede con la neutralizzazione della tripsina con 6 ml di terreno fresco (ovvero il doppio della quantità di tripsina aggiunta) che offrendo un nuovo substrato alla tripsina inibisce la sua azione sulle cellule.
- Trasferimento del contenuto della piastra in una falcon e centrifugazione della sospensione.
- Terminata la centrifugazione, si aspira il surnatante e si risospende il pellet nel terreno fresco.
- Semina di 1 mL di tale sospensione in una nuova piastra con aggiunta di terreno fresco.
- Conservazione della piastra in incubatore a 37°C ed al 5% di CO2.

A questo punto le cellule vengono seminate sulle fibre, posizionate su particolari supporti creati mediante stampaggio 3D.

Si utilizzano:

- fibre random;
- fibre allineate sottili;
- fibre allineate spesse;
- controlli su vetrino 2D.



Figura 29. Schema che rappresenta la disposizione dei campioni per le prove cellulari sulle multiwell.

A questo punto, ai giorni 2, 5 e 12 di esperimento, vengono effettuati dei controlli sulle fibre. Su alcuni campioni viene effettuato un imaging tramite colorazione con colorante fluorescente utilizzando la calceina.

La calceina-AM è un composto idrofobico in grado di attraversare facilmente la membrana cellulare e portarsi nel citoplasma. L'idrolisi della calceina-AM ad opera di esterasi endogene produce calceina, un composto idrofilico fortemente fluorescente che viene trattenuto all'interno del citoplasma. Il segnale di fluorescenza ottenuto è proporzionale al numero di cellule vive presenti nella sospensione cellulare, infatti la calceina-AM viene trattenuta molto bene dalle cellule vive.

La calceina-AM risulta essere un ottimo "probe" per lo studio dell'integrità di membrana cellulare, per gli studi di citotossicità e per la quantificazione del numero cellulare. La colorazione con calceina-AM è particolarmente indicata per cellule che crescono adese al substrato. Va sottolineato inoltre che, al fine di ottenere una buona colorazione, è necessario rimuovere tracce del terreno di coltura, in quanto il "phenol red" e il siero fetale comunemente presenti nel terreno di coltura possono interferire con l'accuratezza della colorazione. (45)

Da alcuni campioni viene estratto l'RNA, che verrà in seguito analizzato. Per effettuare questa operazione viene utilizzato il Qiazol, in grado di rompere le membrane e permettere quindi l'estrazione.

Il protocollo per l'estrazione dell'RNA è il seguente:

- Aspirazione del terreno
- Aggiunta di 1 ml di Qiazol e trasferimento nelle provette. Da questo passaggio in poi si lavora sempre in ghiaccio
- Aggiunta di 200 µl di cloroformio; si agita bene per permettere la formazione delle fasi
- Centrifuga a 4°C e 12400 rpm per 30 minuti
- Prelievo del surnatante e trasferimento in una nuova provetta da 2 ml
- Aggiunta di 500 µl di isopropanolo
- Il giorno seguente, centrifuga con isopropanolo a 4°C per 30 minuti a 12400 rpm
- Aspirazione del surnatante lasciando il pellet di RNA e risospensione in 1000 μl di etanolo al 70%. Centrifuga a 4°C e 7400 rpm per 20 minuti
- Si ripete il passaggio precedente per 15 minuti. Rimozione dell'etanolo, si lascia asciugare per 15-20 minuti e si aggiungono 25 µl di acqua DNAsi free

Una volta estratto l'RNA, si procede con la quantificazione degli acidi nucleici mediante il microplate reader Tecan Spark M10, dopodiché una volta assicuratisi che sia presente una quantità sufficiente di RNA ha inizio la ddPCR.

Per prima cosa si uniscono il campione di RNA estratto in precedenza, il master mix che contiene gli elementi necessari alla PCR ed i primer e i probes di cui si necessita.



Figura 30. Componenti dei campioni che vengono sottoposti a ddPCR.

Il protocollo utilizzato per la retrotrascrizione è l'High capacity cDNA reverse transcription (Thermofisher), che comprende i seguenti passaggi:

- Preparazione del master mix per la RT
- Aggiunta dell'RNA alla reazione della RT
- Svolgimento della RT all'interno del thermal cycler
- Conservazione del cDNA DA -25°C a -15°C per un lungo periodo

I geni utilizzati sono: l'RPL13a come housekeeping, ovvero come gene che codifica per importanti proteine o enzimi necessari al corretto svolgimento delle funzioni cellulari, la scleraxis che è un gene che si esprime specificamente nelle cellule del tessuto tendineo, la tenomodulina che viene espressa in generale in tutti i tessuti connettivi densi e la cui espressione viene regolata dalla scleraxis, la tenascina che è un atro marker specifico per tendini e legamenti e il CD29, che serve a valutare la staminalità. Per ogni marker si effettua un'analisi in triplicato. Una volta preparati questi campioni, a partire da questi sono state ottenute delle gocce uniformi in dimensioni e volume utilizzando il QX200 Droplet Generator (Biorad); queste sono state poi posizionate su una multi-well ed inserite all'interno del T100 Thermal cycler (Biorad) per far avvenire la PCR.

Al termine di questo processo, le gocce sono state analizzate mediante il QX1000 Droplet Reader (Biorad), il quale analizza ogni goccia individualmente attraverso un sistema di detezione a due colori, permettendo l'analisi di target differenti all'interno dello stesso campione. Tutti i macchinari precedentemente elencati sono presenti presso i laboratori dell'I.N.Ri.M. di Torino.



Figura 31. Gli step della ddPCR: 1) formazione delle gocce; 2) PCR; 3) lettura ed analisi dei risultati.

3. Risultati e discussione

In questo capitolo sono presentati i risultati dei test condotti sulle fibre ed elencati nel capitolo precedente, ai fini di valutare l'adeguatezza delle stesse come scaffold per l'Ingegneria tissutale.

3.1 Effetto della concentrazione di KHC2000

Partendo da parametri ottimizzati in tesi precedenti (38), si è proceduto con la valutazione del miglior valore di concentrazione del KHC2000, essendo questo prodotto a partire da materiali di laboratorio. Le concentrazioni indagate sono state due: 8% wt/v e 10 % wt/v.

Membrane nanofibrose sono state fabbricate mediante elettrospinning utilizzando le due soluzioni a diversa concentrazione; le fibre ottenute sono state analizzate al SEM al fine di valutarne la morfologia.



Figura 32. Fibre in KHC2000 8% wt/v allineate (1.a) e random (1.b). Fibre in KHC2000 10% wt/v allineate (2.a) e random (2.b).

Dalle immagini riportate in Figura 32 si può notare come non ci siano sostanziali differenze nell'aspetto microscopico delle fibre, infatti in entrambi i casi sono state ottenute fibre omogenee e prive di difetti. Per una più accurata analisi si è inoltre proceduto alla misura dei

diametri delle fibre, per poter confrontare le due soluzioni a differente concentrazione non solo dal punto di vista visivo ma anche quantitativo.

Tramite le immagini ottenute al SEM è stato possibile valutare il diametro delle fibre elettrospinnate per stabilire se ci fossero differenze rilevanti per le due soluzioni di partenza a concentrazione 8% wt/v e 10% wt/v. A tale scopo è stato utilizzato il programma ImageJ, che a partire da un campione di 30 fibre selezionate sull'immagine ha restituito i valori dei diametri. Successivamente i dati sono stati elaborati al fine di ottenere il valore di diametro medio e la distribuzione dei diametri nel range di interesse.



Figura 33. Distribuzione dei diametri: fibre allineate KHC2000 8% wt/v (1.a), fibre allineate KHC2000 10% wt/v (1.b), fibre random KHC2000 8% wt/v (2.a), fibre random KHC2000 10% wt/v (2.b).

Come si può vedere dai grafici in Figura 33, per quanto riguarda le fibre allineate in entrambi i casi i diametri hanno dimensioni che si aggirano soprattutto intorno ai 200-300 nm ed arrivano al massimo a 400-500 nm. Il diametro medio è pari a $292 \pm 0,08$ nm nel caso di fibre in

KHC2000 con concentrazione all'8% wt/v e 270 \pm 0,06 nm per le fibre in KHC2000 con concentrazione al 10% wt/v.

Per le fibre random si nota come il diametro delle fibre, per entrambe le concentrazioni, sia eterogeneo con valori che oscillano tra i 200-300 nm ed i 900-1000 nm. Il valore medio misura $567 \pm 0,19$ nm nelle fibre in KHC2000 con concentrazione pari all'8% wt/v e $564 \pm 0,20$ nm nelle fibre in KHC2000 con concentrazione pari al 10% wt/v.

È inoltre importante notare come, nel caso delle fibre random, i diametri siano in media più grandi rispetto a quelli delle allineate. L'intervallo con maggiore frequenza è infatti quello che va dai 600 ai 700 nm: ciò è indice del fatto che i diametri delle fibre random abbiano dimensioni pari a circa il doppio dei diametri delle fibre allineate.

Nonostante ciò, non sono state riscontrate sostanziali differenze nelle caratteristiche delle fibre prodotte, dunque si è optato per il valore di concentrazione pari all'8% wt/v dal momento che essendo minore dell'altro permette di risparmiare materiale.

3.2 Valutazione dell'allineamento delle fibre

Le fibre allineate sono state ottenute utilizzando due tipi di collettori, uno a piatti paralleli per le fibre allineate sottili ed un collettore rotante per le fibre allineate spesse; per quest'ultimo sono state testate due velocità di rotazione, ovvero 800 rpm e 3000 rpm.



Figura 34. Immagini SEM e grafico per la valutazione dell'allineamento delle fibre in KHC2000 8% wt/v ottenute mediante collettori paralleli (1.), collettore rotante a 800 rpm (2.) e collettore rotante a 3000 rpm (3.).

L'allineamento delle fibre è stato valutato mediante il medesimo software ImageJ, tramite l'utilizzo del plugin Oval profile, che prende una regione circolare dell'immagine e campiona N angoli uguali in tutta la superficie considerata. Successivamente, lungo i raggi dal centro del cerchio ai bordi della figura, le intensità dei pixel interpolati vengono sommate e plottate per ottenere i grafici in figura, relativi al KHC2000 con concentrazione pari all'8% wt/v. La Figura 34 riporta l'immagine SEM delle fibre allineate e i corrispettivi grafici ottenuti con il software ImageJ.

Le fibre risultano allineate quando nei grafici sono ben distinguibili due picchi, posti a 180° l'uno rispetto all'altro e con la minore interferenza possibile. Ciò è evidente soprattutto nel grafico riferito alle fibre ottenute con collettore rotante a 3000 rpm (Figura), coerentemente con quanto ci si aspettava (46). Il collettore rotante, infatti, garantisce l'allineamento delle fibre e permette di ottenere inoltre spessori maggiori rispetto a quelli ottenibili mediante collettori paralleli, tramite i quali non sarebbe possibile ottenere fibre troppo spesse perché all'aumentare dello spessore verrebbe compromesso l'allineamento delle stesse.

3.3 Analisi del comportamento meccanico delle membrane nanofibrose

A livello macroscopico sono state analizzate le proprietà meccaniche delle fibre; in particolare attraverso delle prove di trazione sono state ottenute le curve sforzo-deformazione da cui è stato possibile ricavare il modulo di Young delle fibre elettrofilate.

Le proprietà meccaniche rappresentano una caratteristica chiave per ogni biomateriale; quelle dei poliuretani biodegradabili possono essere ottenute su misura alternando in maniera opportuna i segmenti soft e quelli hard ed intervenendo inoltre sul grado di cristallinità. Questi fattori influenzano variabili come il modulo di Young, l'elongazione, la forza di trazione e quella di compressione. Una componente rilevante nella modulazione delle proprietà meccaniche dei poliuretani è il grado di mobilità della catena, che dipende dalla flessibilità molecolare. (17)

Al fine di ricavare informazioni relative al modulo di Young delle fibre allineate, sono state effettuate prove meccaniche a trazione lungo la direzione di allineamento delle fibre, sfruttando provini ad osso di cane. Dai dati è stato possibile ottenere le curve sforzo-deformazione, tramite le quali sono stati ricavati i parametri caratteristici dei campioni considerati. La Tabella 2 riporta le medie e le deviazioni standard relative a modulo elastico, sforzo massimo e deformazione dei campioni di fibre considerati.

	E [MPa]	σ max [N]	ε [mm/mm]
Random	7,2 ± 1,9	5,3 ± 1,1	94,2 ± 28,8
Allineate	38,5 ± 15	28,5 ± 9,5	75,1 ± 24,4

Tabella 2. Media e deviazione standard relative a modulo di Young, sforzo massimo e deformazionedelle fibre random e allineate.

Come si evince dalla Tabella 2, i valori dei moduli elastici delle fibre allineate sono di gran lunga più elevati rispetto a quelli delle fibre random: ciò è coerente con quanto ipotizzato facendo riferimento a quanto riportato in letteratura. (47)

Mentre queste strutture fibrose sottili possono essere usate per studiare il comportamento cellulare, non potranno mai essere impiegate come scaffold reali di supporto alle cellule. Gli scaffold per la rigenerazione dei tessuti dovrebbero essere capaci di resistere a carichi fisiologici rilevanti; gli scaffold allineati presentano stress tensili e modulo di Young più elevati rispetto a quelli random poiché la densità delle fibre nella direzione della forza di carico è un fattore primario nella determinazione della risposta meccanica.

Allo stesso tempo, è stato osservato che l'allineamento delle fibre influisce inoltre sull'orientazione delle cellule, guidandole nel fenomeno della migrazione.

Oltre quanto detto riguardo il modulo elastico, è anche importante notare come l'allungamento a rottura sia inferiore nelle fibre allineate rispetto alle random: ciò può essere dovuto ad un grado di orientamento elevato di tali fibre. (48)

3.4 Analisi microscopica delle fibre

Attraverso le immagini in microscopia a forza atomica è possibile indagare la struttura microscopica delle fibre a base di KHC2000, in particolare trattandosi di un poliuretano si possono andare a distinguere i domini hard da quelli soft, caratteristici di tale materiale.



Figura 35. Mappe di altezza di un'area di dimensioni 2x2 μm² ottenute tramite l'AFM: fibre allineate sottili (1.a), fibre allineate spesse (2.a), fibre random (3.a), film (4.a). Immagini di fase di un'area di dimensioni 2x2 μm² ottenute tramite l'AFM: fibre allineate sottili (1.b), fibre allineate spesse (2.b), fibre random (3.b), film (4.b).

Le mappe di altezza danno informazioni sulla topografia delle fibre, fornendo una misura quantitativa della distanza tra la punta del cantilever e la superficie: nelle immagini riportate in Figura 35 si può notare come l'allineamento dei domini sia visibile, sia per le fibre spesse che per quelle sottili, anche per aree molto piccole come quella considerata, pari a $2x2 \ \mu m^2$.

Le nanofibre si allungano e si allineano lungo la direzione di rotazione del collettore cilindrico. I parametri che determinano la morfologia delle nanofibre includono la concentrazione della soluzione polimerica, il potenziale applicato, la velocità del flusso e quella di rotazione del collettore. (49)

Le immagini di fase riflettono invece i cambiamenti nelle proprietà di viscosità ed adesione della superficie. In base a queste differenze, è possibile individuare i diversi domini che caratterizzano il materiale: le aree più chiare e quelle più scure corrispondono a fasi differenti, in particolare si attribuiscono le regioni più chiare ai domini hard e quelle più scure ai domini soft del polimero, ovvero zone che presentano modulo di Young rispettivamente più alto e più basso.

La distribuzione e la densità dei segmenti hard e soft del poliuretano influenzano enormemente le sue proprietà quali la rigidezza, la forza, l'elasticità e l'assorbimento di proteine. Dalle immagini si vede come tali domini si dispongano lungo la direzione di allineamento delle fibre, mentre nel film vadano a posizionarsi in maniera random su tutta la superficie. (49)

Attraverso il microscopio a forza atomica è stato inoltre possibile quantificare il modulo di Young alla nanoscala delle fibre mediante la tecnica della force spectroscopy. Il modulo di Young alla nanoscala è in grado di promuovere l'adesione e lo spreading cellulare, fattori fondamentali per una strategia di Ingegneria tissutale di successo. (49)

	Vetro	Fibre allineate coll. rotante	Fibre allineate coll. paralleli	Fibre random
Modulo elastico [MPa]	846,67	0,86	73,03	10,60

Tabella 3. Confronto fra moduli di Young alla nanoscala.

Nella Tabella 3 sono riportati i valori di modulo elastico di un vetrino da laboratorio, usato come controllo, e delle fibre allineate e random a base di poliuretano deposte su vetrino. È possibile notare come alla nanoscala sia possibile trovare un discriminante tra il modulo elastico del vetrino su cui poggiano le fibre durante le misurazioni all'AFM e quello delle fibre in KHC2000, in quanto il primo sia dell'ordine del centinaio di MPa, mentre le seconde abbiano

moduli elastici di gran lunga inferiori, dell'ordine delle decine di MPa. Nello specifico, le fibre allineate ottenute con il collettore rotante risultano le meno rigide, con valori di modulo di Young inferiori all'unità; le allineate ottenute con i collettori paralleli presentano invece un modulo elastico di circa 73 MPa, ma la misura potrebbe essere falsata a causa del ridotto spessore delle fibre, che potrebbe esser stato di difficile rilevazione da parte del microscopio. Nella caratterizzazione del comportamento dei materiali, la Force spectroscopy è meno accurata rispetto alle prove meccaniche a trazione. La sua popolarità è basata sulla semplicità della preparazione del campione, a cui si contrappone la complessa interpretazione dei dati, che spesso necessita di modelli numerici. Inoltre, la presenza del vetrino che supporta il campione può rappresentare una fonte di errore, la quale deve essere tenuta in considerazione per una corretta analisi. (50)

Per questo motivo risulta un'apparente discordanza tra i valori del modulo di Young alla macroscala e alla nanoscala. Le proprietà meccaniche alla macroscala sono fortemente influenzate dalla presenza di pori nello scaffold, mentre la caratterizzazione alla nanoscala è limitata alla parete dei pori. (49)

3.5 Prove di degradazione

Al fine di valutare la perdita di peso delle fibre nel tempo, è stata effettuata una degradazione a 4 settimane in soluzione tampone fosfato (PBS) e in condizione enzimatica, utilizzando la lipase (0,03% w/w in PBS) a 37°C. Attraverso le immagini ottenute al SEM è stato possibile valutare nei time-step di interesse la degradazione delle fibre dovuta sia all'azione del PBS che a quella della lipasi, per poter confrontare le due condizioni di degradazione.





Figura 36. Immagini SEM relative alla degradazione in PBS ed in lipase delle fibre di KHC2000 8% wt/v allineate ottenute mediante collettore rotante a 3000 rpm nei vari time-step considerati.



Figura 37. Confronto fra la perdita di peso percentuale delle fibre trattate in PBS e quelle trattate in lipase nei time-step considerati.

Coerentemente con i risultati attesi, nel grafico in Figura 37 si osserva una perdita di peso delle fibre nel tempo ed in particolar modo una differenza maggiore nei campioni in lipasi. In percentuale, la differenza di peso media riscontrata nei campioni in PBS al giorno 1 è pari all'6,53%, mentre in quelli in lipasi è pari al 9,26%.

Dopo 3 giorni, la struttura delle fibre risulta meno definita rispetto alla situazione precedente, indice del fatto che le fibre abbiano continuato a degradarsi. Anche in questo time-step, come nel precedente, la maggiore differenza percentuale di peso si riscontra nelle fibre in lipasi, con una perdita di peso media del 15,82% contro una percentuale del 9,29% per le fibre degradate in PBS.

Trascorsa una settimana, si può notare come le fibre in lipasi non siano più distinguibili le une dalle altre a causa del processo di degradazione, mentre quelle in PBS risultino meno degradate. A conferma di quanto si può vedere nelle immagini al SEM, è possibile notare dai grafici come la perdita di peso sia maggiore nelle fibre in lipasi; in percentuale, si ha una perdita di peso media del 14,34% in lipasi contro un 13,09% in PBS.

Dopo la seconda settimana di degradazione, le fibre in lipasi perdono la loro struttura fibrosa, mantenendo però un'integrità macroscopica. Anche in questo caso, infatti, quest'ultime hanno subito una perdita di peso maggiore rispetto a quelle in PBS. La percentuale media per i campioni considerati è pari al 27,06% in lipasi contro un 21,17% di perdita di peso media per le fibre in PBS.

Alla fine della terza settimana, la differenza nella perdita di peso tra le fibre in PBS e quelle in lipasi è ancora più accentuata. Quanto detto è visibile già dalle immagini al SEM, supportate dai grafici. In percentuale, la perdita di peso media per i campioni considerati è del 19,06% per le fibre in PBS (dato molto simile a quello trovato per le stesse fibre ma dopo due settimane di degradazione) e del 51,08% nel caso della lipasi.

Alla fine della quarta settimana di degradazione, le fibre in PBS sono ancora piuttosto distinguibili nelle immagini al SEM, mentre quelle in lipasi risultano molto più degradate. Ciò è riscontrabile anche nell'andamento dei grafici, infatti si può vedere come la perdita di peso sia molto maggiore nel caso della lipasi rispetto al PBS. A conferma di quanto detto, la differenza di peso percentuale media per i campioni considerati è del 18,72% per il PBS e del 68,78% per la lipasi.

È stato quindi possibile osservare che la degradazione in PBS è significativamente più lenta rispetto alla degradazione in presenza della lipasi. Quest'ultima infatti è un enzima in grado di effettuare l'idrolisi dei grassi, trasformando i trigliceridi in glicerolo e in acidi grassi, nel processo di lipolisi. Sono classificate come un sottoinsieme delle esterasi. (1)

Sebbene nei primi time-step non si notino grosse differenze tra le due condizioni di degradazione, già a partire dalla prima settimana le differenze di peso percentuali delle fibre in lipasi sono significativamente maggiori rispetto a quelle in PBS, fino ad arrivare alla quarta settimana in cui il divario risulta molto più elevato. Ciò è coerente con quanto ipotizzato all'inizio della prova sperimentale, dal momento che ci si aspettava che l'azione di degradazione di un enzima come la lipasi fosse notevolmente maggiore rispetto a quella del PBS, che è un buffer salino.

La velocità di degradazione dipende dalla struttura del poliuretano. Nello specifico, l'effetto dei domini soft è legato alla concentrazione dei gruppi instabili, all'idrofilicità ed alla cristallinità. La composizione chimica dei segmenti soft influisce sul grado di diffusione dell'acqua nel polimero. Per quanto riguarda i domini hard, invece, il loro numero all'interno della struttura del poliuretano più che la loro composizione chimica ha effetti sul rate di degradazione enzimatica. (17)

3.6 Prove cellulari

Una volta prodotte le fibre, si è indagato se queste potessero rappresentare uno scaffold ideale per la rigenerazione del tessuto tendineo. Per fare tali valutazioni sono state effettuate delle prove cellulari sulle fibre in KHC2000, confrontando il comportamento di quelle allineate e delle random.



Figura 38. Immagini al microscopio a fluorescenza delle cellule seminate su fibre allineate spesse (a), allineate sottili (b) e random (c). Le immagini sono acquisite al giorno 5 di esperimento con ingrandimento 5x.

Dalle immagini ottenute attraverso il microscopio a fluorescenza si evince come le cellule prediligano le fibre allineate ottenute con il collettore rotante e si allunghino infatti nella direzione di orientamento di quest'ultime, mentre nel caso delle fibre ottenute mediante collettori paralleli (più sottili rispetto alle altre) si nota come le cellule non abbiano trovato in questi substrati un ambiente favorevole per l'adesione. Dalla Figura 38 (b) infatti si nota come non solo le cellule non si allunghino nella direzione delle fibre, ma anche come esse siano presenti in numero notevolmente inferiore rispetto agli altri due casi (a) e (c). Ciò potrebbe essere dovuto allo spessore troppo esiguo delle membrane utilizzate.

Nel caso (c), invece, le cellule sono presenti in numero consistente nella regione selezionata, ma queste non assumono una direzione preferenziale di allungamento in quanto poste appunto su fibre random.



Figura 39. Immagini al microscopio a fluorescenza delle cellule seminate su fibre allineate spesse al giorno 2 (d)(ingrandimento 20x), 5 (e) (ingrandimento 5x) e 12 (f) (ingrandimento 5x) giorno di esperimento.

Una volta trovato che le membrane che favoriscono maggiormente l'adesione e la proliferazione cellulare sono quelle costituite da fibre allineate ottenute con l'utilizzo del collettore rotante, come si nota in Figura 39 dove si può vedere come le cellule già dal secondo giorno di esperimento si allunghino lungo la direzione delle fibre (d) ed aumentino di numero tra il giorno 5 (e) ed il giorno 12 (f), si è proceduto con la valutazione dell'espressione genica. Nello specifico, attraverso la ddPCR è stata quantificata l'espressione di alcuni markers specifici del tendine e reperiti in letteratura: la scleraxis (51), la tenascina (51) la tenomodulina ed il collagene (52). Oltre a questi è stato impiegato anche il CD29 per valutare la staminalità ed l'RPL13a come housekeeping. I dati ottenuti alla fine del processo di ddPCR ed elaborati in Excel hanno fornito i seguenti risultati, riportati in Figura 40:



Figura 40. Grafici ottenuti elaborando i dati della ddPCR per valutare l'espressione nelle membrane nanofibrose di: CD29 (1), collagene (2).

In base a quanto riportato nei grafici in Figura 40, si nota come l'espressione del CD29 nel grafico (1) diminuisca nelle cellule coltivate sulle fibre rispetto al controllo, in particolare nelle cellule coltivate su fibre allineate. Ciò indica che la staminalità è diminuita e che quindi le cellule si sono differenziate.

Per quanto riguarda il collagene, gene specifico per il tessuto tendineo, si può vedere nel grafico (2) come l'espressione genica sia maggiore nelle cellule coltivate sulle fibre allineate piuttosto che nel controllo. Questo sta ad indicare che le cellule coltivate su fibre allineate sono più stimolate a differenziarsi in cellule del tessuto tendineo.

4. Conclusioni e sviluppi futuri

In questo lavoro di tesi sono state realizzate delle membrane nanofibrose a base di poliuretano (KHC2000) tramite la tecnica dell'elettrospinning con l'obiettivo di ottenere un substrato modello per il differenziamento di cellule staminali verso cellule del tessuto tendineo.

I parametri di processo sono stati ottimizzati in modo da ottenere fibre allineate distribuite in maniera omogenea, che non presentassero difetti ed i cui diametri avessero dimensioni pressoché simili e dell'ordine del centinaio di nanometri, al fine di riprodurre in maniera il più fedele possibile la struttura naturale della ECM. A tale scopo sono stati utilizzati due diversi set up sperimentali: (i) due collettori piani paralleli e (ii) il collettore cilindrico messo in rotazione. È stato riscontrato che il modo più efficace per ottenere fibre allineate con uno spessore adeguato a permettere l'utilizzo delle stesse come scaffold per colture cellulari consiste nell'impiego di un collettore rotante. Infine è stato evidenziato come la concentrazione della soluzione non influenzi significativamente il diametro delle fibre e che quindi sia preferibile optare per la concentrazione minore di KHC2000, al fine di ottenere un risparmio di materiale. Inoltre, coerentemente con quanto riportato in letteratura (53), il diametro delle fibre risulta minore nelle fibre allineate rispetto alle random a causa dell'effetto di attrazione dovuto al mandrino rotante nel momento in cui il getto aderisce alla superficie del collettore.

La caratterizzazione meccanica delle fibre mediante prove a trazione ha messo in evidenza il fatto che i valori dei moduli elastici delle fibre allineate siano di gran lunga più elevati rispetto a quelli delle fibre random poiché la densità delle fibre nella direzione della forza di carico è un fattore primario nella determinazione della risposta meccanica; coerentemente con quanto riportato in letteratura (47), è stato riscontrato un allungamento a rottura inferiore nelle fibre allineate piuttosto che nelle random.

Mentre le strutture fibrose sottili possono essere usate per studiare il comportamento cellulare, non potranno mai essere impiegate come scaffold reali di supporto alle cellule. Gli scaffold per la rigenerazione dei tessuti dovrebbero essere capaci di resistere a carichi fisiologici rilevanti rispetto ai valori emersi dalle prove meccaniche.

Allo stesso tempo, è stato osservato che l'allineamento delle fibre influisce inoltre sull'orientazione delle cellule, guidandole nel fenomeno della migrazione.

Proprio per questi motivi è stato ipotizzato che le fibre più adatte per le colture cellulari fossero le allineate ottenute con l'utilizzo del collettore rotante, in grado di favorire la proliferazione cellulare ma anche di sopportare carichi fisiologici rilevanti. Tale ipotesi è stata avvalorata dai risultati delle prove cellulari, mediante le quali è stato evidenziato come le cellule si allunghino lungo la direzione delle fibre e si moltiplichino maggiormente sulle membrane costituite da fibre allineate più spesse piuttosto che quelle sottili o random.

Nello specifico, è stato visto come gli scaffold costituiti da fibre allineate ottenute tramite collettore rotante promuovano il differenziamento delle cellule staminali mesenchimali in cellule del tessuto tendineo, dal momento che la ddPCR ha evidenziato come nelle cellule coltivate su tali membrane si esprimano i geni specifici per tendini e legamenti quali la scleraxis e la tenascina.

Studi recenti nel campo dell'Ingegneria tissutale hanno mostrato come l'utilizzo di scaffold biodegradabili possa promuovere la rigenerazione del tessuto tendineo. Ciononostante, ingegnerizzare uno scaffold per tale scopo rappresenta ancora una sfida a causa della complessità della composizione, struttura e comportamento meccanico di quest'ultimo.

In questo lavoro di tesi è stato dimostrato che l'elettrospinning costituisce una tecnica valida per la fabbricazione di membrane per la rigenerazione del tessuto tendineo, in quanto tale tecnica permette di ottenere nanofibre che mimino l'architettura della matrice extracellulare, che rappresenta un aspetto critico per l'adesione cellulare ed il trasporto di nutrienti.

Ad oggi, pochi studi hanno esaminato l'utilizzo di nanofibre elettrospinnate per la riparazione di danni nel sito di inserzione tendine-osso. Uno studio (54) ha dimostrato che un tessuto non-tessuto in chitina potrebbe migliorare la guarigione del tendine in un modello di cuffia dei rotatori di coniglio, anche se l'effetto dell'allineamento delle fibre non è stato considerato. Un'altra ricerca (55) ha studiato l'allineamento e l'espressione genica dei fibroblasti della cuffia dei rotatori umana su uno scaffold nanofibroso in PLGA. Comunque, nessuno di questi lavori ha provato a riprodurre la composizione (ad esempio il contenuto minerale) e la struttura (ad esempio l'organizzazione delle fibre di collagene) dell'inserzione tendine-osso non danneggiata.

Una soluzione rispetto a questo problema è stata prospettata da uno studio finalizzato alla realizzazione di scaffold "aligned-to-random" (56), ovvero strutture che riproducano il cambiamento nell'orientazione delle fibre presente nel sito di inserzione tendine-osso. Nello specifico, questi scaffold sono costituiti da una porzione di fibre allineate, in grado di mimare il livello di allineamento delle fibre di collagene in un tendine sano, e da fibre random capaci di riprodurre la struttura meno organizzata delle fibre di collagene nell'osso.

Nonostante le recenti scoperte, lo studio in questo campo dà ancora molto spazio per sviluppi futuri: bisognerebbe dunque ottimizzare i processi di coltura cellulare ed estenderli ad un range più elevato di substrati che presentino proprietà meccaniche e morfologiche che vadano a riprodurre in maniera sempre più accurata quelle proprie del tessuto tendineo.
Nello specifico si potrebbe andare ad investigare qual è lo spessore ideale delle membrane che garantisca l'allineamento delle nanofibre ed allo stesso tempo permetta di sopportare carichi fisiologici rilevanti come quelli a cui è soggetta la zona di inserzione tendine-osso.

Infine, dal momento che la superficie del materiale svolge un ruolo fondamentale nelle interazioni in quanto ha una grande influenza sulla risposta biologica del corpo verso l'impianto, si potrebbero effettuare delle modificazioni superficiali sugli scaffold.

La mancanza di stabilità chimica superficiale nell'ambiente umano da parte dei poliuretani rende infatti necessario eseguirne una modifica superficiale. Nessun poliuretano disponibile è per lungo tempo emocompatibile o biocompatibile e a contatto con i tessuti molli si verifica una reazione di difesa da corpo estraneo con il coinvolgimento dei macrofagi.

Lo scopo degli studi di modifica superficiale è quindi quello di mantenere le proprietà meccaniche dei poliuretani, fornendo una superficie con migliorata biocompatibilità per la colonizzazione cellulare. Un esempio potrebbe consistere nell'impiego di carrier, ovvero di sostanze che rivestendo la superficie del materiale ne migliorino le interazioni con l'ambiente biologico. In queste applicazioni rimangono comunque delle criticità come ad esempio le dimensioni delle nanoparticelle, la loro stabilità a contatto con i fluidi biologici e la loro durata.

Bibliografia/Sitografia

1. Wikipedia.

2. *Bone tissue engineering: state of the art and future trends.* Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL. 743-65, s.l. : Macromol Biosci, 2004, Vol. 4.

3. *Electrospun polyurethane membranes for Tissue Engineering applications.* Gabriel LP, Rodrigues AA, Macedo M, Jardini AL, Macel Filho R. 113-117, s.l. : Materials Science and Engineering, 2017, Vol. 72.

4. Engineered electrospun polycaprolactone (PCL)/octacalcium phosphate (OCP) scaffold for bone tissue engineering. Heydari Z, Mohebbi-Kalhori D, Afarani MS. 127-132, 2017, Vol. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.

5. *The Potential of Biomimetic Electrospun-Nanofibrous Scaffolds for Bone Tissue Engineering.* Na Park, Ha & Bok Lee, Jung & Moon, Ho-Jin & Yang, Dae Hyeok & Kwon, Il Keun. 2011.

6. *Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering.* Sill TJ, Von Recum HA. 13, s.l. : Biomaterials, 2008, Vol. 29.

7. *Electrospun nanofibers for phamaceutical and medical applications.* Sridhar R, Venugopal JR, Sudarrajan S, Ravichandran R, Ramalingam B, Ramakrishna S. 6, s.l. : Journal of Drug Delivery Science and Technology, 2011, Vol. 21.

8. *Review for application of electrospinning and electrospun nanofibers technology in textile industry.* Mirialili M, Zohoori S. 207-213, s.l. : J Nanostruct Chem, 2016, Vol. 6.

9. *Electrospun porous nanofibers for electrochemical energy storage.* Li Z, Zhang J, Yu L. 6173, s.l. : J Mater Sci, 2017, Vol. 52.

10. *Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique*. Bhardwaj N, Kundu SC. 3, s.l. : Biotechnology Advances, 2010, Vol. 28.

11. *Solvent-dependent properties of electrospun fibrous composites for bone tissue regeneration.* Patlolla A, Collins G, Arinzeh TL. s.l. : Acta Biomater, 2010, Vol. 6, p. 90-101.

12. http://www.spinbow.it/tecnologia-electrospinning/. [Online]

13.

http://dionisio.centropiaggio.unipi.it/gvozzi/Shared%20Documents/Micro%20e%20Nano%20Siste mi/Electrospinning/Electrospinning.pdf. [Online]

14. *Electrospinning of novel biodegradable poly(ester urethane)s and poly(ester urethane urea)s for soft tissue-engineering applications.* Caracciolo, Pablo & Thomas, Vinoy & K Vohra, Yogesh & Buffa, Fabian & Abraham, Gustavo. 2129-37, s.l. : Journal of materials science. Materials in medicine, 2009, Vol. 20.

15. *Electrospun polyurethane/hydroxyapatitebioactive scaffolds for bone tissue engineering: the role of solvent and hydroxyapatite particles.* Tetteh G, Khan AS, Delaine-Smith RM, Reilly GC, Rehman IU. 95-110, s.l. : J Mech Behav Biomed Mater, 2014, Vol. 39.

16. *Biomedical Applications of Polyurethanes Tissue Engineering Intelligence.* Vermette P, Griesser HJ, Laroche G, Guidoin R. Vol. Unit 6.

17. Advances in Polyurethane Biomaterials. Cooper SL, Guan J. s.l. : Woodhead Publishing.

18. http://www.whatischemistry.unina.it/it/maglpolyuretan.html . [Online]

19. http://www.staminafoundation.org/section/biologia-staminali-mesenchimali/. [Online]

20. http://www.biotecnologiepertutti.it/le-cellule-staminali-che-cosa-sono-e-ache-cosa-servono/816/. [Online]

21. http://www.docvadis.it/fabiano-svolacchia/document/fabianosvolacchia/le_cellule_staminali_mesenchimali_adulte_nella_medicina_rigenerativa/fr/metadata/f iles/0/file/LE. [Online]

22. https://www.tesionline.it/appunti/257/Biotecnologie_cellulari . [Online]

23. https://www.tesionline.it/appunti/257/Biotecnologie_cellulari . [Online]

24. http://www.bio-rad.com/it-it/applications-technologies/droplet-digital-pcr-ddpcr-technology?ID=MDV31M4VY. [Online]

25. *Biomimetic electrospun nanofibrous structures for tissue engineering*. Xianfeng W, Bin D, Bingyun L. 6, s.l. : Materials today, 2013, Vol. 16.

26. *Electrospun Fibers as a Scaffolding Platform for Bone Tissue Repair*. Lyu S, Huang C, Yang H, Zhang X. 1382-1389, s.l. : Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society, 2013, Vol. 31.

27. *Aligned PLGA/HA nanofibrous nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering.* Jose MV, Thomas V, Johnson KT, Dean DR, Nyairo E. 305-15, s.l. : Acta Biomater, 2009, Vol. 5.

28. The influence of electrospun aligned poly(ε -caprolactone)/collagen nanofiber meshes on the formation of self-aligned skeletal muscle myotubes. Choi JS, Lee SJ, Christ GJ, Atala A, Yoo JJ. 2899-2906, s.l. : Biomaterials, 2008, Vol. 29.

29. *Macro-alignment of electrospun fibers for vascular tissue engineering.* Zhu Y, Cao Y, Pan J, Liu Y. 508-16, s.l. : J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2010, Vol. 92.

30. *Electrospun poly*(ε-caprolactone)/gelatin nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering. Ghasemi-Mobarakeh L, Prabhakaran MP, Morshed M, Nasr-Esfahani MH, Ramakrishna S. 4532-9, s.l. : Biomaterials, 2008, Vol. 29.

31. Guidance of glial cell migration and axonal growth o electrospun nanofibers of poly-εcaprolactone and a collagen/poly-ε-caprolactone blend. Schnell S, Klinkhammer K, Balzer S, Brook G, Klee D, Dalton P. 3012-25, s.l. : Biomaterials, 2007, Vol. 28.

32. Electrospinning of nano/micro scale poly(L-lactic acid) aligned fibers and their potential in neural tissue engineering. Yang F, Murugan R, Wang S, Ramakrishna S. 2603-10, s.l. : Biomaterials, 2005, Vol. 26.

33. Well-aligned chitosan based ultrafine fibers committed teno-lineage differentiation of human induced pluripotent stem cells for Achilles tendon regeneration. Zhang C, Yuan H, Liu H, Chen X, Lu P, Zhu T, Yang L, Yin Z, Heng BC, Zhang Y, Ouyang H. 716-30, s.l. : Biomaterials, 2015, Vol. 53.

34. *The effect of electrospun fibre alignment on the behaviour of rat periodontal ligament cells.* Shang S, Yang F, Cheng X, Walboomers XF, Jansen JA. 180-192, s.l. : European Cells and Materials, 2010, Vol. 19. 35. An epigenetic bioactive composite scaffold with well-aligned nanofibers for functional tendon *tissue engineering.* Zhang C, Wang X, Zhang E, Yang L, Yuan H, Tu W, Zhang H, Yin Z, Shen W, Chen X, Zhang Y, Ouyang H. 141-156, s.l. : Acta Biomater, 2018, Vol. 66.

36. *Aligned multilayered electrospun scaffolds for rotator cuff tendon tissue engineering.* Orr SB, Chainani A, Hippensteel KJ, Kishan A, Gilchrist C, Garrigues NW, Ruch DS, Guilak F, Little D. 117-26, s.l. : Acta Biomater, 2015, Vol. 24.

37. *Synthesis and structure–property relationship of polyester-urethanes and their evaluation for the regeneration of contractile tissues.* Sartori S, Boffito M, Serafini P, Caporale A, Silvestri A, Bernardi E, Sassi MP, Boccafoschi F, Ciardelli G. s.l. : Reactive & Functional Polymers, 2013.

38. S, Solinas. Membrane nanofibrose a base di poliuretani per la rigenerazione tissutale . 2015.

39. *Physical principles of electron microscopy: an introduction to TEM, SEM, and AEM*. R, Egerton. s.l. : Springer, 2006.

40. https://www.mccrone.com/mm/atomic-force-microscopy-afm-polymer-characterizationanalysis/. [Online]

41. http://www.uco.es/organiza/departamentos/decraf/pdf-edaf/AFM.pdf. [Online]

42. *Measuring The Elastic Modulus Of Polymers By Nanoindentation With An Atomic Force Microscope*. Hoffman, Daniel & Miskioglu, I & Drelich, Jaroslaw & Aifantis, Katerina.

43.

https://elearning.unite.it/pluginfile.php/83204/mod_resource/content/1/IMMUNOFLUORESCENZ A.pdf. [Online]

44. https://www.slideshare.net/Jejina8989/tecniche-e-microscopi. [Online]

45. *Indagini citofluorimetriche nella vitalità e morte cellulare. I. Necrosi, apoptosi e proliferazione cellulare.* Luchetti F, Canonico B, Biagiarelli L, Bucci L, Valentini M, Papa S.

46. *Mechano-morphological studies of aligned nanofibrous scaffolds of polycaprolactone fabricated by electrospinning.* Thomas V, Jose MV, Chowdhury S, Sullivan, Dean DR, Vohra YK. 9, s.l. : J Biomater Sci Polym, 2006, Vol. 17.

47. Characterization of a biodegradable electrospun polyurethane nanofiber scaffold: Mechanical properties and cytotoxicity. Yeganegi M, Kandel RA, Santerre JP. 10, s.l. : Acta Biomaterialia, 2010, Vol. 6.

48. *Electrospinning of PLGA/gelatin randomly-oriented and aligned nanofibers as potential scaffold in tissue engineering.* Meng ZX, Wang YS, Ma C, Zheng W, Li L, Zheng YL. s.l. : Materials Science and Engineering C, 2010.

49. *A mechanical characterization of polymer scaffolds and films at the macroscale and nanoscale.* Boffito M, Bernardi E, Sartori S, Ciardelli G, Sassi MP. s.l. : Society for Biomaterials, 2013.

50. *Mechanical characterization of materials at small length scales*. Pantano MF, Espinosa HD, Pagnotta L. 2, s.l. : Journal of Mechanical Science and Technology, 2011, Vol. 26.

51. Analysis of the tendon cell fate using Scleraxis, a specific marker for tendons and ligaments. Schweitzer R, Chyung JH, Murtaugh LC, Brent AE, Rosen V, Olson EN, Lassar A, Tabin CJ. s.l. : The Company of Biologists, 2001.

52. *Molecular characterization and function of tenomodulin, a marker of tendons and ligaments that integrate musculoskeletal components.* Shukunami C, Yoshimoto Y, Takimoto A, Yamashita H, Hiraki Y. 84-92, s.l. : Japanese Dental Science Review, 2016, Vol. 52.

53. *Comparison of random and aligned PCL nanofibrous electrospun scaffolds on cardiomyocyte differentiation of human adipose-derived stem cells.* Safaeijavan R, Soleimani M, Divsalar A, Eidi A, Ardeshirylajimi A. s.l. : Iranian Journal of Basic Medical Sciences, 2014.

54. Sato M, Maeda M, Kurosawa H, Inoue Y, Yamauchi Y, Iwase H. s.l. : J. Orthop. Sci., 2000.

55. Moffat KL, Kwei ASP, Spalazzi JP, Doty SB, Levine WN, Lu HH. s.l. : Tissue Eng. A., 2009.

56. "Aligned-to-random" nanofiber scaffolds for mimicking the structure of the tendon-to-bone insertion site. Xie J, Li X, Lipner J, Manning CN, Schwartz AG, Thomopoulus S, Xia Y. s.l. : Nanoscale, 2010.

57. Synthesis and structure-property relationship of polyesther-urethanes and their evaluation for the regeneration of contractile tissues. Sartori S, Boffito M, Serafini P, Caporale A, Silvestri A, Bernardi E, Sassi MP, Boccafoschi F, Ciardelli G. 10, s.l. : Reactive and Functional Polymers, 2013, Vol. 73.