

POLITECNICO DI TORINO

Facoltà di Ingegneria

Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica

Tesi di Laurea Magistrale

**Idrogel di collagene biomimetici per la stampa 3D  
di modelli in vitro del tessuto polmonare**



**Relatori:**

Prof. Gianluca Ciardelli

Dott.ssa Chiara Tonda-Turo

**Correlatore:**

Dott.ssa Michela Licciardello

**Candidata:**

Irene Giovanetto

Anno accademico 2018/2019

*Al sorriso di quei piccoli gesti,*

*troppe volte dimenticati.*

## *Abstract*

---

The fields of tissue engineering and regenerative medicine aim at promoting the regeneration of tissues or replacing failing or malfunctioning organs, by means of combining a scaffold, adequate cells and bioactive molecules. Scaffolds are intended to replicate the natural three-dimensional (3D) environment, like the extracellular matrix (ECM).

In particular, the goal of this work is to achieve biomimetic collagen-based hydrogels for 3D-printed *in vitro* lung tissue models. Collagen type I, being the most abundant and most investigated for biomedical applications, is the major structural component in the ECM, provide to maintain the mechanical integrity of the alveoli and is widely used as a hydrogel. Polymers of natural origin are one of the most attractive options, mainly due to their chemical versatility as well as typically good biological performance.

To evaluate the physical (viscosity, mechanical) properties of bioinks, rheological and compression tests were conducted.

The main task of this thesis work was developing and evaluating a method of printing collagen hydrogel, this material is biomimetic and biocompatible, but is less applicable for 3D bioprinting due to low viscosity and slow polymerization.

Two different methods of printing were tested: one characterized by printing the bioink on a surface at 37 °C and with a stop between every layer, so the transition of collagen solution takes place and the layer just printed can carry the weight of the structure; the other one is realized at room temperature with a gelatin microparticle support bath, As the nozzle of the 3D printer moves through the support bath, the bath flows out of the way; after the collagen solution, is deposited, the support bath returns to its rigid state; when the printer process is over, the sample is heated to body temperature so the gelatin microparticle melt and the collagen solution turns into gel.

The printing without support bath allow you to realize a detailed structure, with thin filament (100  $\mu\text{m}$ ), but wasn't possible gain the CAD model width (5  $\text{mm}$ ) due to lost of water content of hydrogel. The support bath prevents this problem, but the model printed (with the same thin filament) should be more density compared to previous method because during the gelatin melt the geometry of the structure isn't steady.

<b>I. INTRODUZIONE</b> .....	<b>1</b>
1.1 INGEGNERIA TISSUTALE .....	1
1.1.1 Definizione .....	1
1.1.2 Matrice extracellulare.....	3
1.1.3 Scaffold per <i>tissue engineering</i> .....	4
1.1.3.1 Materiali impiegati per la realizzazione degli scaffold.....	5
1.1.3.2 Polimeri.....	5
1.1.3.3 Approcci in <i>vivo</i> ed in <i>vitro</i> .....	7
1.1.4 Metodi di realizzazione degli scaffold .....	8
1.2 IDROGELI.....	10
1.2.1 Definizione e caratteristiche.....	10
1.2.2 Tipologie .....	10
1.3 BIOPRINTING .....	11
1.4 COLLAGENE .....	13
1.4.1 Definizione e struttura.....	13
1.5 BIOPRINTING DI IDROGELI IN COLLAGENE.....	15
1.5.1 Fibrillogenesi del collagene in <i>vitro</i> .....	15
1.5.2 Idrogeli a base di collagene.....	16
1.5.3 Vantaggio di una struttura stampata piuttosto che un idrogel.....	18
<b>II. SCOPO TESI</b> .....	<b>19</b>
<b>III. MATERIALI E METODI</b> .....	<b>20</b>
3.1 COMPONENTI DELLA SOLUZIONE.....	20
3.1.1 Collagene.....	20
3.1.2 DMEM .....	20
3.1.3 Gelatina .....	20
3.2 PREPARAZIONE DELLA SOLUZIONE A BASE DI COLLAGENE.....	21
3.3 PREPARAZIONE MATERIALE DI SUPPORTO.....	22
3.4 SWELLING E STABILITÀ .....	24
3.5 CARATTERIZZAZIONE SOLUZIONE.....	24
3.5.1 Tube Inverting Test .....	24
3.5.2 Reometro .....	24
3.5.3 QCM-D.....	26
3.6 RELIZZAZIONE DELLO SCAFFOLD .....	28

3.6.1 Stampante .....	28
3.6.1.1 Realizzazione del modello .....	28
3.6.1.2 Inizializzazione Stampante .....	29
3.6.1.3 Primo metodo di Stampa.....	30
3.6.1.4 Secondo metodo di stampa .....	32
3.7 CARATTERIZZAZIONE SCAFFOLD .....	33
3.7.1 FE-SEM.....	33
3.7.2 Nanoindentazione.....	34
3.7.3 MTS - Prove di compressione .....	35
<b>IV. RISULTATI E DISCUSSIONE .....</b>	<b>36</b>
4.1 STABILITÀ.....	36
4.1.1 <i>Swelling</i> e degradazione .....	37
4.2 TUBE INVERTING TEST.....	39
4.3 REOMETRO .....	39
4.3.1 Strain .....	40
4.3.2 Time .....	41
4.3.3 Frequency .....	42
4.4 QCM-D .....	43
4.5 NANOINDENTER.....	44
4.6 MTS-EM COMPRESSIONE .....	45
4.7 FE-SEM .....	48
4.8 ROKIT INVIVO .....	49
4.8.1 Primo Metodo.....	49
4.8.2 Secondo Metodo.....	54
<b>V. CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI.....</b>	<b>56</b>
5.1 CONCLUSIONI .....	56
5.2 SVILUPPI FUTURI .....	57
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>58</b>

### 1.1 INGEGNERIA TISSUTALE

#### 1.1.1 Definizione

L'ingegneria tissutale ("tissue engineering", TE) è "un campo multidisciplinare che applica i principi dell'ingegneria e delle scienze della vita per la realizzazione di sostituti biologici che ripristinino, mantengano o migliorino le funzioni di tessuti o organi" [1].

Il settore dell'ingegneria tissutale nasce dalla necessità di superare i limiti dell'organismo umano, il quale presenta proprietà rigeneranti che non sono, però, efficaci e complete nel caso di problematiche o patologie estese. La perdita o il fallimento di un tessuto o di un organo è un evento molto frequente e che comporta un costo elevato a livello sanitario.

I tessuti e gli organi sono costituiti da cellule e da componenti non-cellulari, quest'ultimi formano un reticolo tridimensionale organizzato detto matrice extracellulare (ECM). I tessuti presentano caratteristiche che dipendono dal numero, dalla tipologia e dalle proprietà chimico-fisiche delle cellule e da come queste ultime interagiscono con i diversi costituenti della matrice extracellulare [2].

L'obiettivo dell'ingegneria tissutale è, soprattutto, quello di sostituire le tecniche attualmente impiegate nell'ambito della medicina rigenerativa. Ad esempio, l'autograft, l'allograft e lo xenograft, utilizzando rispettivamente tessuti prelevati dal paziente stesso, da donatore e da specie animali diverse, l'impiego di protesi e il trapianto di organi; ognuno di questi approcci presenta importanti aspetti negativi (quantità di tessuto prelevabile, risposta immunologica, problematiche etiche) che ne limita notevolmente l'applicazione.

L'approccio principale del TE è la realizzazione di scaffold in grado di supportare e promuovere la differenziazione e la proliferazione delle cellule al fine di formare nuovo tessuto [3].

L'equivalente biologico a cui si fa riferimento per la realizzazione degli scaffold è la matrice extracellulare, che interagisce costantemente con le cellule e ne guida lo sviluppo e l'omeostasi [4].

Di conseguenza gli elementi su cui si basa l'ingegneria tissutale risultano:

- scaffold o matrice;
- cellule;
- molecole bioattive.

Lo **scaffold** è un elemento fondamentale per la rigenerazione dei tessuti sia dal punto di vista morfologico sia dal punto di vista funzionale. Per questo deve presentare determinate caratteristiche, come una topografia superficiale tale da promuovere l'interazione, l'adesione e la proliferazione

cellulare. Esso deve, inoltre, poter sopportare le forze meccaniche e degradare con tempistiche comparabili con la specifica applicazione.

Lo scaffold viene realizzato cercando di mimare la matrice extracellulare, la quale costituisce il materiale naturale che presenta già le proprietà ottimali per supportare l'adesione cellulare e la crescita di tessuto, in modo specifico (la morfologia e la composizione dell'ECM cambiano per ogni tessuto). Per questi motivi negli ultimi anni si è studiato in modo approfondito la struttura, la composizione dell'ECM e l'interazione con le cellule, in modo tale da ricreare tale ambiente [5].

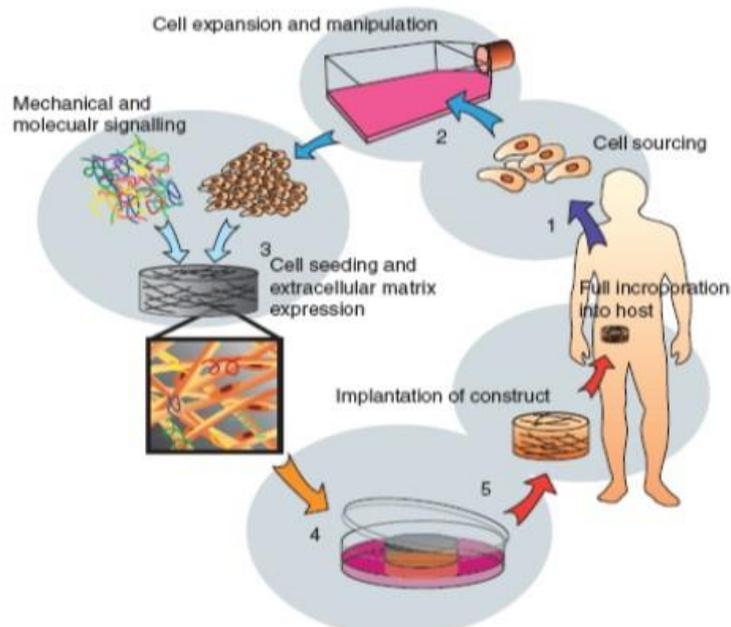
Oggi non è comunque ancora possibile ottenere una matrice extracellulare completa e sintetica, poiché non sono del tutto noti i meccanismi di self-assembly e di interazione tra i componenti che permettono la generazione di tale struttura biologica [6].

Le **cellule** devono poter interagire in modo efficace con il substrato per poter rigenerare nuovo tessuto. Il comportamento cellulare è, infatti, influenzato dal fenomeno di dipendenza da ancoraggio, per il quale le cellule per poter crescere e proliferare devono aderire in modo uniforme e stabile al substrato.

In ingegneria tissutale le cellule utilizzate possono essere cellule primarie, cellule di linea (prodotte industrialmente, non hanno limiti di proliferazione, ma derivano da cellule tumorali o da cellule primarie modificate) o cellule staminali. L'ideale sarebbe quello di poter utilizzare cellule primarie autologhe, in modo tale da evitare risposte immunitarie, ma tali cellule hanno capacità proliferative ridotte, di conseguenza risulta problematico reperirne un numero sufficiente per la rigenerazione tissutale. È necessario tenere conto, inoltre, che nel caso di patologie le cellule derivanti dai tessuti che devono essere rigenerati o sostituiti possono essere soggette a difetti. Proprio per questi limiti si è sviluppato l'impiego di cellule staminali, le quali hanno capacità di proliferazione a lungo termine e possono generare tutti i tipi cellulari. Le cellule staminali si dividono in cellule staminali embrionali (Embryonic Stem Cells, ESC) e cellule staminali adulte (Adult Stem Cells, ASC). Le ESC sono prelevate direttamente dalla massa cellulare della blastocisti (fase di sviluppo embrionale) possono autorigenerarsi, sono pluripotenti, in grado, cioè, di differenziare in tutti i tipi cellulari e nei tre strati germinali dell'embrione (endoderma, mesoderma, ectoderma) e possono essere mantenute in coltura indifferenziate per un tempo indefinito. Le ASC sono isolate dai singoli tessuti, si trovano in particolari ambienti, detti nicchie (nelle quali le cellule mantengono un fenotipo indifferenziato) e sono multipotenti, possono, cioè differenziare solo in alcuni tipi cellulari [4][5].

Le **molecole bioattive**, come citochine e fattori di crescita, modulano il comportamento cellulare e stimolano la sintesi della matrice extracellulare.

Le difficoltà maggiori nell'utilizzo di tali molecole negli scaffold ingegnerizzati sono quelle di riuscire a controllarne in modo preciso la localizzazione, l'attivazione o l'inattivazione e il rilascio per ottenere la rigenerazione tissutale [4].



**Figura 1.1: Strategia dell'ingegneria tissutale.**

La strategia ideale del TE, come si vede nella **Figura 1.1**, può, quindi, essere riassunta in pochi passaggi. Innanzitutto, si procede con il prelievo di cellule specifiche del paziente, le quali vengono espanse e poste in coltura. Le cellule in questo modo proliferano e producono matrice extracellulare. Successivamente le cellule sono combinate con molecole bioattive in uno scaffold poroso o iniettabile e sono coltivate in vitro in un ambiente compatibile alla formazione di nuovo tessuto. Il tessuto così ingegnerizzato può essere impiantato.

### 1.1.2 Matrice extracellulare

La matrice extracellulare (ECM) è un network dinamico e complesso di proteine che costituisce un supporto meccanico e biochimico per le cellule dell'ambiente circostante. Essa fornisce stimoli apotattici e chemotattici, cioè segnali meccanici, topografici e biochimici che influenzano l'adesione, la vitalità, la morfologia, la proliferazione, la migrazione e il differenziamento cellulare [5].

I principali componenti dell'ECM sono eteropolissacaridi (es. glicosamminoglicani, proteoglicani), proteine strutturali e funzionali (es. collagene, elastina, fibronectina, laminina) e liquido interstiziale.

L'ECM può, quindi, essere definita come un idrogel multicomponente [6].

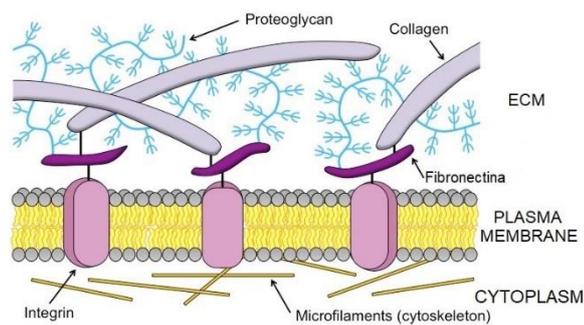
I glicosamminoglicani (GAGs) sono polimeri lineari, unità ripetenti disaccaridiche idrofiliche. Nei tessuti i GAGs sono legati a proteine extracellulari per formare i proteoglicani, aggregati di natura covalente e non covalente.

I proteoglicani presentano numerose funzioni, tra cui il mantenimento di un ambiente idratato intorno e fra le cellule, potendo, infatti, costituire un gel con porosità e densità di carica variabili. Rappresentano dei veri e propri setacci selettivi, legano, attraverso i GAGs, molte molecole segnale inibendo o attivando l'attività di segnalazione dei fattori di crescita, permettono, quindi, la segnalazione chimica tra le cellule e regolano il rimodellamento dell'ECM.

Alcuni proteoglicani, come le integrine, non fanno parte della matrice extracellulare, ma si trovano sulla membrana plasmatica delle cellule e svolgono la funzione di recettori, legano la cellula all'ECM ed interagiscono con molecole segnale extracellulari.

Le proteine fibrose dell'ECM, collagene ed elastina, sono inframezzate ai proteoglicani e formano un reticolo di legami trasversali che impartisce consistenza e resistenza a tutta la matrice [2].

Tutti i tipi di cellule (es. fibroblasti, cellule epiteliali, endoteliali), in risposta a diversi segnali, sintetizzano e diffondono nella matrice delle macromolecole, di conseguenza partecipano esse stesse alla formazione dell'ECM [2].



**Figura 1.2: Matrice extracellulare.**

Come si vede dalla **Figura 1.2** vi è un'interazione reciproca tra matrice extracellulare e citoscheletro. Quest'ultimo può, infatti, esercitare forze che orientano le macromolecole secrete dalle cellule e a loro volta le macromolecole dell'ECM possono organizzare il citoscheletro cellulare con cui vengono in contatto. I segnali della matrice si possono propagare da una cellula all'altra, determinando un'organizzazione a lungo raggio. Le integrine sono gli elementi che consentono la trasmissione di questi segnali, mediando l'interazione tra cellule e matrice.

### 1.1.3 Scaffold per *tissue engineering*

Lo scaffold costituisce la struttura di supporto per la migrazione delle cellule dai tessuti circostanti verso il sito di impianto, veicola le biomolecole, rappresenta un supporto strutturale per mantenere

la forma del tessuto originario, evitando distorsioni e, svolge un ruolo di barriera contro infiltrazioni che potrebbero impedirne la rigenerazione.

Le caratteristiche dello scaffold variano sulla base della tipologia di tessuto nel quale viene applicato, anche se vi sono alcune proprietà che ogni scaffold deve presentare, quali:

- *struttura 3D porosa*, in modo tale da riprodurre la struttura fibrotica dell'ECM. L'architettura dello scaffold deve permettere l'adesione e la proliferazione cellulare, consentire il trasporto di sostanze di nutrimento e di scarto;
- *proprietà meccaniche*, paragonabili a quelle del tessuto da sostituire;
- *biodegradabilità*, lo scaffold deve, cioè degradarsi senza produrre frammenti tossici e con tempistiche compatibili con la rigenerazione tissutale;
- *composizione chimica opportuna*, in modo tale da consentire una buona interazione ed integrazione cellulare;
- *facilità di realizzazione e modellazione*, per ottenere strutture riproducibili e con geometrie diverse [7].

#### 1.1.3.1 Materiali impiegati per la realizzazione degli scaffold

Ogni materiale utilizzato nell'ambito dell'ingegneria tissutale deve essere biocompatibile, deve, quindi, integrarsi perfettamente con il sistema biologico senza provocare una risposta immunitaria eccessiva da parte dell'organismo e senza rilasciare sostanze tossiche, in particolare durante la degradazione.

Gli scaffold sono realizzati con biomateriali semplici (polimeri naturali o sintetici, ceramici) o compositi (combinazione di materiali semplici, di cui uno costituisce la matrice e l'altro la fase dispersa). I biomateriali polimerici presentano diversi vantaggi, tra cui la facilità di fabbricazione e modellazione, differenti proprietà meccaniche, possibilità di modifica superficiale sia per via chimica sia per via fisica e differenti metodi di funzionalizzazione.

Modulare le proprietà del costruito finale a partire da materiali di origine naturale è molto complesso. I materiali di origine sintetica non presentano le caratteristiche composizionali dei polimeri naturali, quindi della ECM, ma sono semplici da lavorare e caratterizzare.

#### 1.1.3.2 Polimeri

I polimeri sono macromolecole e si distinguono in naturali (proteine e polisaccaridi) e sintetici (poliesteri, poliammidi, etc.). In ingegneria tissutale vengono impiegate entrambe le tipologie.

Le caratteristiche fisiche dei polimeri dipendono dalla temperatura di transizione vetrosa,  $T_g$ , e dalla temperatura di fusione,  $T_m$ . Solo i polimeri cristallini o semi-cristallini presentano entrambe le transizioni termiche.

I polimeri possono anche essere distinti sulla base dell'interazione con l'ambiente circostante:

- biostabili, non subiscono modifiche né chimiche né fisiche nel tempo;
- bioinerti, stabili dal punto di vista chimico e fisico, presentano una limitata interazione con i tessuti circostanti;
- biodegradabili, il materiale subisce graduali modifiche chimiche, vi è un processo di scissione, durante il quale le catene polimeriche tendono a formare oligomeri e successivamente monomeri, frammenti a basso peso molecolare.

Tutti i polimeri in realtà risultano degradabili, il fatto che siano definiti tali o meno dipende sostanzialmente dalle tempistiche relative al processo di degradazione in confronto a quelle necessarie all'applicazione [8];

- bioerodibili, polimeri nei quali si verifica una diminuzione del peso molecolare a causa del graduale allontanamento di oligomeri e monomeri;
- biorisorbibili, il materiale viene degradato all'interno dell'ambiente biologico in modo graduale, originando frammenti che vengono eliminati da meccanismi cellulari.

I meccanismi di degradazione sono di tipo **idrolitico**, **ossidativo** ed **enzimatico**.

Per i materiali biodegradabili l'**idrolisi** è la reazione più diffusa e dipende in particolare dalla struttura della catena principale, se presenta o meno legami idrolizzabili. La velocità di tale meccanismo è, inoltre, influenzata da numerosi fattori, quali, per esempio, la tipologia di legami della catena polimerica, il valore di pH, la composizione co-polimerica. Durante il processo di degradazione si ha una continua modifica fisica e chimica del polimero, lo sviluppo di tale processo può, però, essere monitorato valutando il peso molecolare.

I polimeri biodegradabili, come schematizzato nella **Figura 1.3** presentano un'erosione che può essere superficiale (*surface*, eterogenea) o di massa (*bulk*, omogenea). Nel processo di erosione superficiale il polimero subisce delle modifiche unicamente sulla superficie, mantiene la propria struttura geometrica diminuendo gradualmente la dimensione e le proprietà meccaniche.

Nell'erosione in massa la degradazione e l'erosione non sono, invece, confinati alla superficie del polimero, ma avvengono all'interno determinando il mantenimento della struttura originale fino a quando il peso molecolare del polimero è tale da indurre la dissoluzione del materiale, a questo punto anche le proprietà meccaniche cambiano in modo sensibile. L'erosione in massa è caratterizzata dall'ingresso di acqua nel bulk polimerico, che influenza la degradazione chimica del polimero stesso, determinando la formazione di oligomeri e monomeri. Questa progressiva degradazione

determina una modifica nella microstruttura del polimero ed un cambiamento di pH, consentendo il rilascio degli oligomeri e dei monomeri [8].

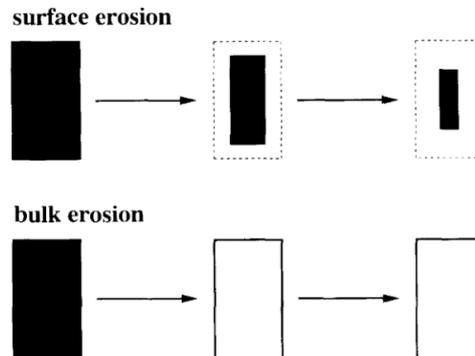


Figura 1.3: Schema dell'erosione superficiale e in massa [8].

La **degradazione ossidativa** può essere diretta, prodotta da ioni metallici oppure prodotta dall'ambiente esterno. Nel caso di ossidazione diretta l'ambiente nel quale si trova il polimero genera specie molecolari che effettuano processi ossidativi direttamente nel polimero. Nel secondo caso si ha un ambiente ossidante a causa di ioni metallici derivanti dal fenomeno di corrosione del metallo, che determina frattura fragile, i prodotti di degradazione interessano sia la superficie sia la massa del materiale. L'ultimo caso rappresenta una condizione molto particolare nella quale il corpo può trasmettere radiazioni elettromagnetiche che possono danneggiare materiali polimerici impiantati.

La **degradazione enzimatica**, infine, è mediata dall'interazione di particolari enzimi, che possono essere suddivisi in base alla tipologia del legame sul quale agiscono. Questo meccanismo risulta più veloce rispetto a quello per idrolisi. Sia polimeri naturali sia sintetici sono degradabili per via enzimatica, per esempio, proteine come il **collagene** e la gelatina, polisaccaridi come l'acido ialuronico ed il destrano e poliesteri come il PCL (policaprolattone) e il PLA (acido polilattico).

### 1.1.3.3 Approcci in vivo ed in vitro

Nell'ambito dell'ingegneria tissutale esistono diverse strategie per l'utilizzo delle cellule e degli scaffold.

- Scaffold seminato in *vitro* → prevede la coltura dello scaffold con le cellule in *vitro* ed il tessuto ottenuto viene successivamente impiantato;
- scaffold cellularizzato ed impiantato, si evita così la fase di seeding, ma si incapsulano direttamente le cellule nella fase di processing, le cellule proliferano in vivo;
- scaffold privo di cellule impiantato → le cellule presenti nell'organismo, devono diffondere nello scaffold e proliferare.

Gli approcci che prevedono l'introduzione di cellule in vitro, sfruttano lo scaffold principalmente come dispositivo di supporto, in modo tale che le cellule possano aderire e produrre matrice extracellulare [9]. Tale approccio può risultare vantaggioso dato che le cellule si trovano ad uno stadio di rigenerazione avanzato, presentano un certo grado di maturità e di capacità rigenerative. Nell'ultimo caso invece lo scaffold viene usato come mezzo di trasporto per farmaci o GFs (grow factors), in modo tale che una volta impiantato sia in grado di richiamare le cellule presenti nell'ambiente circostante e favorirne la proliferazione [9]. In questo caso lo scaffold deve essere colonizzato nella sua interezza, per cui la qualità degli stimoli deve risultare elevata, i fattori solubili, che sono in grado di stimolare le cellule, sono fondamentali per questo approccio. Una migrazione indotta unicamente da stimoli di contatto risulta molto più lenta rispetto alla presenza di fattori solubili, come GFs, che determinano altri eventi cellulari.

La scelta della strategia o di eventuali combinazioni dipende in particolare dall'applicazione e dalla struttura dello scaffold stesso (morfologia, topografia, composizione) che influenza notevolmente il comportamento cellulare. Anche la scelta della tipologia di cellule da seminare ed impiantare è determinata dall'applicazione e dalla composizione dello scaffold.

Gli scaffold devono risultare compatibili sia con le cellule specifiche del tessuto sia con l'ambiente fisiologico nel quale sono impiantati.

#### 1.1.4 Metodi di realizzazione degli scaffold

Le tecniche più usate per realizzare scaffold biomimetici, quindi tridimensionali e nanofibrosi, sono evidenziati dalla **Tabella 1.1**.

<b>CONVENZIONALI</b> Composizione chimica e struttura controllabili	Solvent casting	Miscele polimeriche versate in appositi stampi. Si ottengono membrane porose.
	Electrospinning (melt/dry/wet - spinning)	Estrusione tramite una siringa ed una differenza di potenziale di micro/nano fibre su di un collettore.
	Separazione di fase	Il materiale di partenza è sempre una soluzione polimerica. Il processo è indotto mediante la temperatura o l'uso di un non-solvente consente di ottenere membrane o nanofibre porose.
	Freeze-drying/Liofilizzazione	Congelamento dell'acqua presente nella soluzione polimerica e successiva sublimazione di tali

**NON-CONVENZIONALI**  
**Tecniche di prototipazione rapida**  
**Controllo dell'architettura dello scaffold, in termini di morfologia e porosità**

	particelle in ambiente a temperatura e pressione controllate.
Self-assembly	Componenti in grado di organizzarsi autonomamente in strutture precise, in risposta a stimoli definiti.
Gas foaming	Processamento del polimero allo stato fuso per ottenere un disco polimerico, che viene pressurizzato, solitamente con CO <sub>2</sub> , fino alla saturazione del campione. Successivamente la camera è riportata a pressione ambiente e le molecole di diossido di Carbonio si allontanano, determinando una struttura porosa
Laser Based System Sistema basato sulla fotopolimerizzazione per il cross-linking delle catene polimeriche.	Selective Laser Sintering (SLS), Stereolithography (SLA), 2-Photon-polymerization, Laser Direct Writing (LDW).
Dispenser Based System Il bioink viene depositato sottoforma di gocce o filamento mediante estrusori di tipo meccanico (trasduttore piezoelettrico, pneumatico, pistone), o fisico (tensione, calore).	Melt Electrospinning Writing (MEW), Fused Deposition Modeling (FDM), Pressure Assisted Microsyringe (PAM), Micro Extrusion Bioprinting, 3D Bioplotter, gel estruso in un substrato liquido.
Printer Based System	3D Inkjet Printing, il materiale in forma di polveri è investito da un flusso di collante (solvente per il polimero).

[10] [11]

**Tabella 1.1: Schema relativo alle diverse tecniche di realizzazione degli scaffold.**

## 1.2 IDROGELI

### 1.2.1 Definizione e caratteristiche

Gli idrogeli sono sistemi due o multicomponente che costituiscono un network tridimensionale di catene polimeriche e acqua, che si inserisce tra gli spazi delle macromolecole [12].

Gli idrogeli sono caratterizzati da un'elevata idrofilicità, contengono un elevato contenuto di acqua, di conseguenza appaiono trasparenti; appartengono alla categoria degli idrogeli convenzionali di Swoll, cioè che allo stato asciutto risultano di dimensioni ridotte, disidratati, mentre a mano a mano che entrano in contatto con l'acqua rigonfiano (fenomeno di *swelling*), aumentando nettamente il proprio volume, senza degradare, poiché presentano una struttura reticolata [13]. La capacità di immagazzinare acqua è elevata, poiché questi sistemi possono aumentare il proprio volume quasi fino al 90%, senza perdere la struttura.

Esistono anche degli idrogeli che non "Swellano", cioè contengono già la fase acquosa al proprio interno, non passano, quindi, da uno stato fisico disidratato ad uno reidratato, se inseriti in un ambiente acquoso non aumentano di volume.

Il vantaggio di usare sistemi a base di idrogeli è che l'elevato contenuto di acqua consente di ottenere strutture molto soft. La combinazione di questi due aspetti, alto contenuto di acqua e proprietà meccaniche di una struttura soft è ideale per i tessuti fisiologici. Questi si trovano, infatti, in ambiente acquoso ed hanno caratteristiche meccaniche tipiche dei tessuti soft (escluso il tessuto osseo), si ha, quindi, una buona biomimetività dell'ambiente extracellulare.

Gli idrogeli sono definiti da una particolare strutturazione mediante la quale è possibile modulare le proprietà meccaniche, la morfologia, la presenza o meno di particolari ligandi, l'inserimento di fattori solubili e la possibilità di introdurre dei siti degradabili per influenzare in qualche modo la cinetica di degradazione. La possibilità di immobilizzare ligandi consente di funzionalizzare l'idrogel con sequenze peptidiche.

### 1.2.2 Tipologie

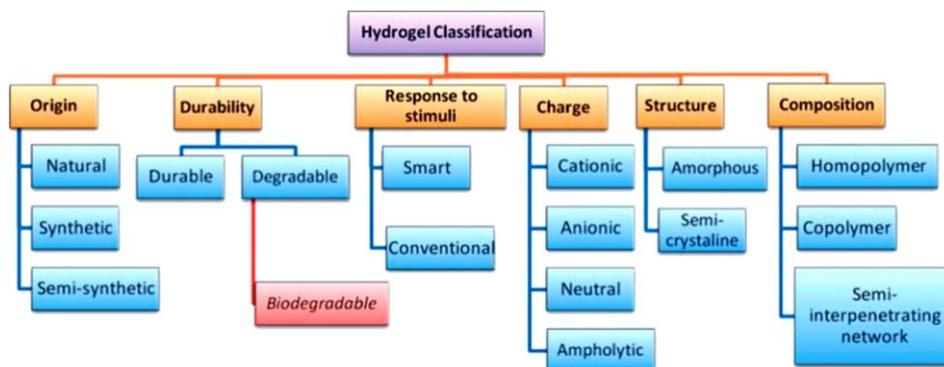


Figura 1.4: Schema relativo alla classificazione degli idrogeli.

Come rappresentato in **Figura 1.4** esistono diverse classificazioni per suddividere gli idrogeli:

La durabilità degli idrogeli dipende dalla stabilità che presentano in ambiente fisiologico e dalle caratteristiche dei polimeri che costituiscono la matrice dell'idrogel stesso.

La suddivisione principale è quella che si basa sulla natura dei legami tra le catene polimeriche:

- idrogeli fisici, presentano legami deboli, reversibili (attorcigliamento delle catene, interazioni fisiche come legami idrogeno, interazioni ioniche, interazioni idrofobiche), gel non permanenti.
- idrogeli chimici, costituiscono gel permanenti attraverso legami covalenti, irreversibili.

Gli idrogeli fisici presentano alcuni vantaggi rispetto a quelli chimici, per esempio, non necessitano né di foto-irradiazione, né di solventi organici, né di agenti di crosslinking e non disperdono calore durante la polimerizzazione. Un'importante caratteristica di questa tipologia di idrogeli, definiti "smart", è quella di formare l'idrogel in risposta ad una variazione dell'ambiente circostante, come la temperatura, il pH o la carica [14] [15].

Alcuni polimeri naturali in grado di formare idrogeli, di tipo fisico, sono proteine come **collagene** e gelatina, polisaccaridi come alginato ed agarosio [12].

L'utilizzo di componenti naturali per la realizzazione di idrogeli presenta alcune difficoltà associate alla purificazione, all'immunogenicità ed alla trasmissione di elementi patogeni. Date le loro numerose caratteristiche gli idrogeli sono impiegati in ingegneria tissutale per mimare l'ECM, in modo tale da costituire una guida sia dal punto di vista morfologico sia dal punto di vista strutturale per l'adesione, l'organizzazione e la proliferazione cellulare; incapsulare e trasportare cellule, costituire una barriera contro i tessuti circostanti e un sistema di adesione, può, infine, rappresentare un reservoir di farmaci e trasportare molecole bioattive che influenzano i processi riparativi [16].

### 1.3 BIOPRINTING

Come precedentemente anticipato la tecnica più utilizzata per la realizzazione di scaffold a base di idrogeli è il *bioprinting*. Lo sviluppo di tale tecnica è stato reso possibile attraverso l'utilizzo di stampanti 3D, le quali partendo da un disegno CAD permettono di realizzare strutture molto precise, complesse e riproducibili.

Il bioprinting si basa sulle tecniche di prototipazione rapida e consiste nel realizzare costrutti strato su strato utilizzando anche una componente biologica, cioè le cellule.

Esistono due differenti strategie per la biofabbricazione:

1. processamento di cellule senza biomateriali (approccio di Mironov) sfruttando la capacità di self-assembling delle cellule stesse;
2. utilizzo di biomateriali (idrogeli, ideali poiché citocompatibili e non immunogenici) in combinazione con le cellule. Gli idrogeli permettono di mantenere un ambiente idratato e di fornire una parziale protezione alle cellule dagli sforzi che si generano durante il processo.

Il design degli scaffold deve essere studiato sia dal punto di vista meccanico sia dal punto di vista fisico-chimico. Per queste motivazioni gli idrogeli rappresentano una valida scelta.

Per la realizzazione di scaffold 3D mediante bioprinting è necessario individuare, impostare ed ottimizzare le condizioni e i parametri di stampa e le caratteristiche dell'inchiostro (deve simulare l'ambiente dell'ECM), che viene usato per incapsulare le cellule e per salvaguardarne la vitalità, evitando che subiscano stress elevati durante il processo [17].

Le condizioni di stampa sono relative principalmente alla pressione di erogazione, alla velocità di stampa, al diametro dell'ago, alla temperatura dell'ago e della camera in cui avviene il processo. I parametri di stampa dipendono, invece, dalla tipologia di cellule e dalle proprietà dell'inchiostro. In ogni caso il metodo di stampa deve essere caratterizzato da condizioni blande, in modo tale che le cellule mantengano le proprie funzionalità biologiche.

Il bioink dovrebbe essere sviluppato in modo specifico a seconda del tipo cellulare, ma deve, comunque, risultare non tossico, biocompatibile ed in grado di rispondere a determinati stimoli. La consistenza del prodotto dipende soprattutto dal polimero, dal peso molecolare, dalla tipologia di crosslinking, dalla concentrazione e dalle proprietà reologiche.

Gli aspetti principali che deve presentare un bioink sono una buona risoluzione e il fatto di mantenere la struttura dopo la stampa. Per definire se un inchiostro è stampabile o meno vengono valutati i seguenti parametri:

- fedeltà di stampa;
- risoluzione;
- biocompatibilità;
- supporto cellulare.

Nella maggior parte dei casi è necessario trovare un compromesso tra le condizioni, i parametri di stampa e il bioink poiché spesso l'ottimizzazione di un aspetto determina il peggioramento di un altro; per esempio la viscosità ideale di stampa non coincide con quella favorevole al supporto cellulare. Per questi motivi esistono diverse possibilità relative al crosslinking del polimero, che può avvenire prima, durante o dopo la stampa.

Utilizzando gli idrogeli e il bioprinting è possibile realizzare scaffold 3D cellularizzati. Le cellule all'interno dell'idrogel sono comunque all'interno di una matrice, di conseguenza le proprietà

meccaniche e la degradazione della matrice influenzano il comportamento delle cellule. Si ha un effetto di mecano-trasduzione molto accentuata su tutta la superficie delle cellule, poiché esse non si trovano su di un substrato, ma sono totalmente incapsulate nella matrice.

Per quanto riguarda la biodegradazione le cellule devono scambiare nutrimento e informazioni con l'ambiente circostante per questo è necessario avere una struttura estremamente permeabile. Per accentuare la caratteristica di permeabilità è possibile inserire dei siti di degradazione specifici nel substrato, in modo che almeno una parte degradi abbastanza rapidamente rendendo le cellule più "libere" (mantenimento della struttura 3D, ma aumento della porosità, quindi della permeabilità). È necessario garantire la sopravvivenza cellulare per questo è vantaggioso utilizzare materiali degradabili enzimaticamente in modo tale da permettere uno scambio cellulare.

## 1.4 COLLAGENE

### 1.4.1 Definizione e struttura

Il collagene è una proteina fibrosa e strutturale, rappresenta fino al 30% delle proteine all'interno del corpo umano ed è sintetizzato e secreto principalmente, all'interno dell'ECM, dai fibroblasti [2].

Il collagene è caratterizzato da una struttura quaternaria e in *vivo* la sua sintesi prevede diversi step.

La **struttura primaria** è data dalla ripetizione della tripletta Gly-Xaa-Yaa, dove Gly rappresenta la glicina, mentre Xaa e Yaa rappresentano qualsiasi amminoacido, ma tendenzialmente sono la prolina e l'idrossiprolina. La ripetizione regolare della struttura primaria costituisce un filamento dato da più di 1000 amminoacidi. Ogni filamento assume una **struttura secondaria** elicoidale sinistrorsa, tale conformazione è possibile poiché tutte le catene presentano come terzo residuo l'amminoacido più piccolo, la glicina. Queste catene polipeptidiche sono dette *catene pro- $\alpha$*  [18][19].

Le singole catene polipeptidiche presentano alle estremità un propeptide aminoterminale ed uno carbossiterminale.

L'unione di tre catene  $\alpha$  in una conformazione di superelica destrorsa costituisce il *procollagene*. La sintesi del procollagene avviene all'interno della cellula e successivamente è secreto nella matrice extracellulare attraverso una vescicola del Golgi.

I propeptidi terminali svolgono principalmente due funzioni la prima consiste nel guidare la formazione intracellulare di molecole di procollagene, mentre la seconda è quella di impedire la formazione intracellulare di fibrille di collagene di dimensione elevata, che potrebbero determinare effetti negativi per la cellula stessa [20].

All'esterno della membrana plasmatica i propeptidi delle estremità N e C sono asportati dagli enzimi procollagene peptidasi. In questo modo si ottiene il *tropocollagene*, unità base del collagene. I

filamenti del tropocollagene sono stabilizzati da legami ad idrogeno, che si formano, in particolare, tra i gruppi N-H della glicina e i gruppi O-H dell'idrossiprolina di un'altra catena; da legami ionici, da reticolazioni intercatena. Il tropocollagene costituisce la **struttura terziaria**, rappresenta cioè la conformazione tridimensionale della proteina, tiene conto delle relazioni a lungo raggio nella sequenza amminoacidica.

Le molecole di tropocollagene, supereliche, si dispongono tra loro in file parallele sfalsate, formando *fibrille* (spesse 20-100 nm). Le fibrille submicroscopiche si autoassemblano in *fibre di collagene*, queste fibre rappresentano la **struttura quaternaria**. Le fibre di collagene sono saldate da legami crociati covalenti fra residui di lisina.

Il collagene di tipo fibrillare è presente soprattutto nella pelle, nel tessuto osseo, nei denti, nei tendini, nei legamenti, nelle pareti vascolari e nella cornea [18].

Le fibrille di collagene formano strutture che resistono a forze di trazione, tali fibrille hanno diametri vari e sono organizzate in modo diverso in tessuti diversi.

La struttura della proteina del collagene è rappresentata nella **Figura 1.5**.

In natura esistono più di venti tipi di collagene, i tipi I, II, III, V, XI, XXIV e XXVII sono collagene fibrillari e costituiscono la struttura appena descritta, gli altri tipi sono associati alle fibrille oppure formano reticoli [21].

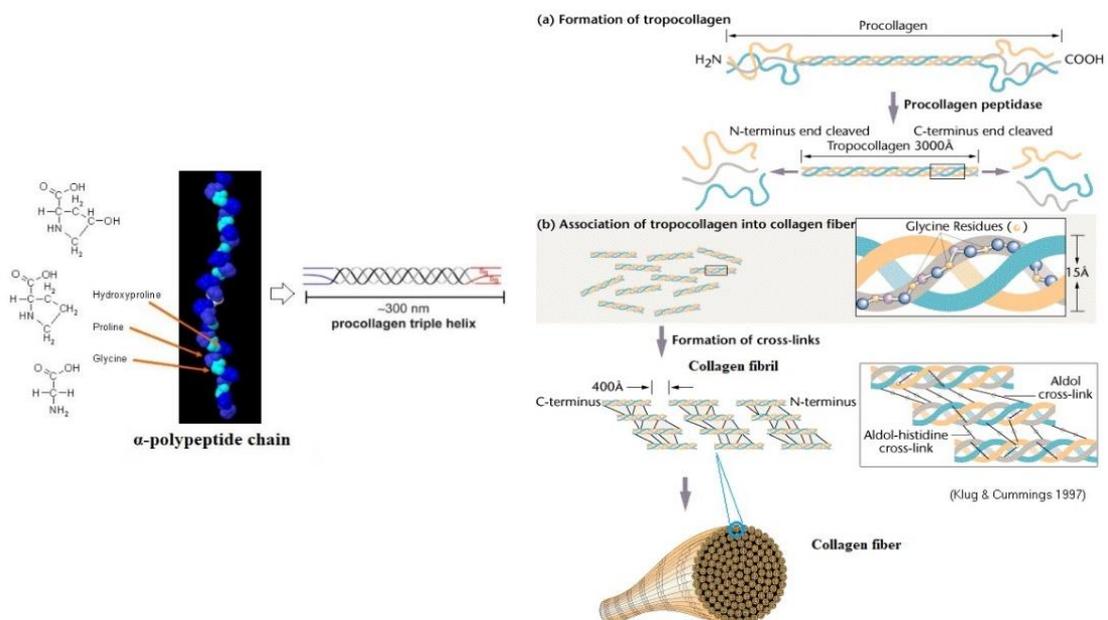


Figura 1.5: Schema relativo alla struttura del collagene a partire dalle catene alfa.

## 1.5 BIOPRINTING DI IDROGELI IN COLLAGENE

Per poter realizzare idrogeli a base di collagene che risultino stabili sia dal punto di vista strutturale sia morfologico oltre ad ottimizzare le caratteristiche dell'idrogel, i parametri e le condizioni di stampa è necessario ottenere la fibrillogenesi del collagene *in vitro*.

### 1.5.1 Fibrillogenesi del collagene *in vitro*

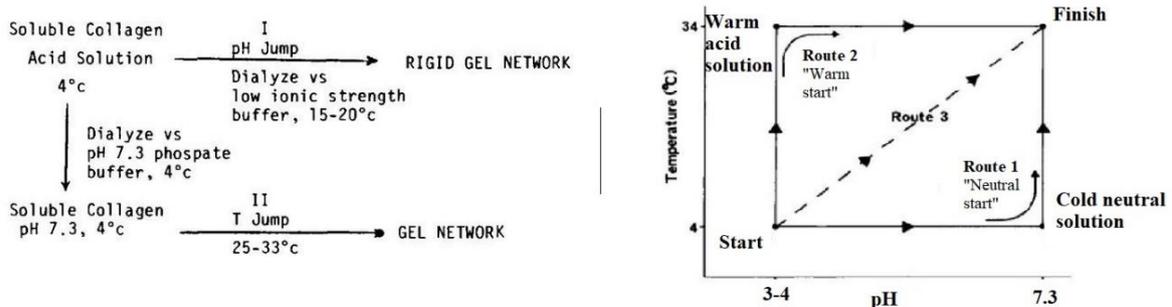
Le proprietà di reticolazione del collagene dipendono dalla temperatura, dal pH e dai legami ionici, tali parametri influenzano, infatti, la capacità delle molecole di collagene (tropocollagene) di autoassemblarsi in fibrille [22].

I primi studi volti ad investigare il meccanismo e la cinetica del processo di self-assembly del collagene hanno valutato inizialmente la torbidità della soluzione. Durante la gelificazione del collagene di tipo I, la torbidità aumenta, da una soluzione, relativamente trasparente di monomeri, si ha lo sviluppo di una soluzione di fibrille che producono uno scattering della luce molto diverso. Dai dati ottenuti da questi studi si è ipotizzato che il processo di fibrillogenesi sia caratterizzato da un fenomeno di nucleazione e di crescita [19] [22] [23].

In *vitro*, come schematizzato in **Figura 1.6**, è possibile indurre la fibrillogenesi di una soluzione di molecole di collagene in due modi diversi:

- I. partendo da una soluzione fredda (4 °C) di molecole di collagene, mantenendo in agitazione, si aumenta gradualmente il pH, fino ad un valore fisiologico (3,5 → 7,4); in seguito, senza stirring, si aumenta la temperatura (25-33 °C). In questa fase si verifica un incremento della torbidità, si ha un'iniziale aggregazione delle molecole di collagene ed una successiva fase di crescita di fibrille [24];
- II. in ambiente acido (pH = 3/4), a 4 °C e con legami ionici deboli si aumenta la temperatura fino a 33 °C. Successivamente portando la miscela a pH fisiologico si ottiene un gel reticolato rigido [23] [25].

Un ulteriore metodo è quello di procedere in modo simultaneo con l'aumento della temperatura e del pH [26][27].



**Figura 1.6:** Vie per ottenere la fibrillogenesi del collagene *in vitro* [26] [28].

I due metodi di realizzazione presentano come risultato finale dei prodotti di reazione diversi per distribuzione e diametri delle fibre.

### 1.5.2 Idrogeli a base di collagene

La realizzazione di idrogeli a base di collagene (in particolare di tipo I), date le ottime proprietà fisico-chimiche e biologiche di tale proteina, permette di stampare scaffold con proprietà fisiche, chimiche e meccaniche ideali per gli scopi dell'ingegneria tissutale. Proprio per raggiungere tali obiettivi è fondamentale regolare la concentrazione di collagene, che deve risultare sufficiente per garantire, in determinate condizioni, la costituzione di un gel. È, inoltre, importante mantenere il valore di pH, in un range fisiologico (7,4 - 8,4 [29]), in modo tale da permettere la sopravvivenza cellulare.

Negli ultimi anni sono stati condotti diversi studi relativi alla stampa di idrogeli a base di collagene per la rigenerazione di tessuto osseo, tessuto cartilagineo, tessuto vascolare e per la coltura di differenti tipi cellulari, come cellule neuronali. Spesso per la realizzazione di questi supporti viene utilizzato il collagene da solo o in combinazione con altri polimeri naturali e/o sintetici in modo da ottenere le caratteristiche ideali per lo specifico scopo di applicazione.

Alcuni esempi presenti in letteratura permettono di comprendere meglio le molteplici possibilità derivanti dall'utilizzo di idrogeli per la realizzazione di scaffold attraverso tecniche di prototipazione rapida.

- Realizzazione di un idrogel a base di collagene di tipo I (sciolto in acido cloridrico e DMEM, neutralizzato con idrossido di sodio) e agarosio (per aumentare l'elasticità della matrice 3D di collagene, senza però alterarne la struttura fibrotica). In questo studio si è valutato come l'unione dell'agarosio al collagene permette la differenziazione osteogenica di cellule stromali mesenchimali umane (MSCs, cellule multipotenti, in grado di differenziare nella linea osteogenica, adipogenica, condrogenica, miogenica e neurogenica). Le cellule sono inserite nell'idrogel e stampate (drop-on demand printing). In questo studio è stato riscontrato come aumentando la percentuale di agarosio la vitalità cellulare diminuisce, mentre la processabilità e la risoluzione di stampa migliorano. Per questo sono state svolte prove con miscele a diverse concentrazioni di collagene e agarosio in modo da identificare i parametri che permettono di ottenere un buon processo di stampa, ma anche una migliore sopravvivenza cellulare. La miscela studiata risulta degradabile per via idrolitica e stabile sia meccanicamente sia morfologicamente. In conclusione, le cellule, incapsulate nel gel, sono in grado di crescere e proliferare; inoltre su di un substrato soft, anisotropo e ricco di collagene sono in grado di differenziare in osteociti [30] [31].

- Realizzazione di un costrutto 3D poroso e biocompatibile a base di un idrogel di collagene e genipina (collagene sciolto in acido acetico ad elevata concentrazione 10% v/w, neutralizzato con DMEM, in rapporto 1:1). L'idrogel di collagene è stampato su di un supporto a determinate condizioni di temperatura e successivamente immerso in un bagno di genipina ed incubato a 37 °C, in modo tale da ottenere un elevato cross-linking della struttura. In questo lavoro sono stati usati osteoblasti derivanti da cellule staminali. Il costrutto così ottenuto consente alle cellule di sopravvivere, crescere e differenziare in senso osteogenico [32].
- Sviluppo di strutture 3D a base di collagene per la rigenerazione del tessuto epidermico. L'idrogel è stato realizzato sciogliendo, a bassa temperatura (4 °C), il collagene in acido acetico, ottenendo una soluzione molto concentrata 10% v/w e, neutralizzato mediante DMEM, in rapporto 1:1. Il sistema è stampato su di una base riscaldata a 36-39 °C e a pH neutro. Le cellule coltivate in questo costrutto sono cheratinociti e fibroblasti, in modo alternato, un *layer* cheratinociti e tre di fibroblasti, in modo da mimare il più possibile il derma. Tale costrutto una volta impiantato *in vivo* permette alle cellule inglobate di migrare e proliferare, favorisce, cioè la rigenerazione del tessuto [33].
- Idrogel a base di collagene solubilizzato in acido acetico e neutralizzato in idrossido di sodio. La temperatura del piatto di stampa a 37 °C e la concentrazione di collagene nell'idrogel permettono di avere una buona fedeltà di stampa. Le cellule coltivate in questo lavoro sono fibrocondrociti. Le quali presentano un'elevata (circa il 90%) vitalità sia dopo il processo di stampa sia durante i dieci giorni successivi. Inizialmente le cellule risultano distribuite tra le molecole di collagene, ma dopo la coltura si trovano adese sulle nuove fibre di collagene, che si stanno sviluppando. La vitalità cellulare non dipende dalla concentrazione di collagene, mentre con l'aumentare di tale concentrazione si ha un incremento del modulo di compressione [34].
- Realizzazione di un costrutto tissutale 3D del fegato, coltivato con epatociti e cellule stellate per poter analizzare gli effetti dell'intossicazione da acetaminofene (paracetamolo). Scaffold a base di collagene metacrilato ed acido ialuronico tiolato (i gruppi tiolati dell'HA reticolano mediante esposizione ad UV). Nello studio sono state analizzate soluzioni a diverse concentrazioni di collagene ed acido ialuronico ed è stato riscontrato come un aumento della concentrazione di collagene permetta un migliore attaccamento della matrice extracellulare e lo spreading cellulare. Durante un periodo di cultura di sette giorni, in tutte le concentrazioni, le cellule presentano una buona vitalità (>80%). A tali colture aggiungendo il farmaco, l'acetaminofene, si riscontra una risposta comparabile a quella fisiologica. Grazie

a questi risultati è possibile realizzare un modello semplice, ma funzionale di un fegato umano [35].

### 1.5.3 Vantaggio di una struttura stampata piuttosto che un idrogel

Gli idrogeli risultano, dunque, essere il materiale ideale per le cellule poiché sono altamente permeabili ai mezzi di coltura, ai nutrienti ed ai prodotti di scarto sviluppati durante il processo metabolico delle cellule stesse [36].

La tecnica di *bioprinting* permette di ottimizzare le proprietà degli idrogeli realizzando strutture con geometrie complesse, diverse proprietà chimiche, fisiche, meccaniche e dimensioni ridotte (nell'ordine dei micrometri). Questo processo consente, in tempi ridotti, di ottenere modelli precisi, affidabili e ripetibili. È possibile controllare il microambiente al punto da definire e condurre l'orientamento di ogni singola cellula [36].

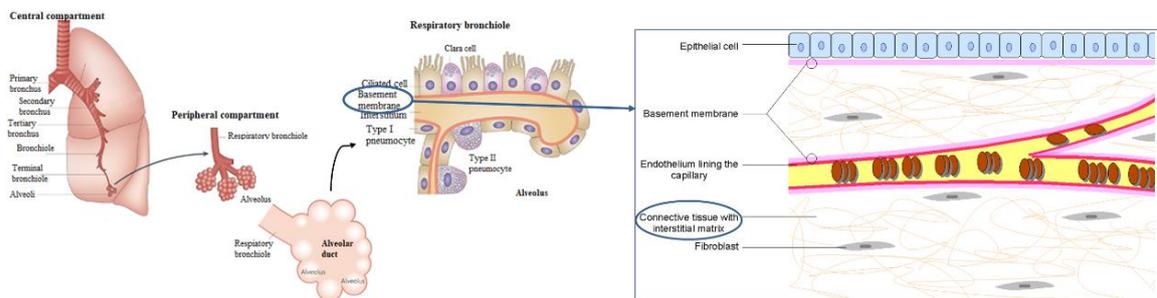
## II. SCOPO TESI

Come anticipato l'ingegneria tissutale è un campo del tutto innovativo, che tenta sostanzialmente di comprendere e riprodurre i meccanismi naturali, come per esempio la rigenerazione di tessuto, in seguito a traumi o malattie e la differenziazione cellulare in seguito a stimoli fisici e chemotattici.

Tra gli elementi fondamentali dell'ingegneria tissutale lo scaffold è quello su cui ci si è maggiormente concentrati in questo lavoro di tesi. Lo scopo principale è stato, infatti, quello di realizzare, con idrogel di collagene, modelli 3D *in vitro* del tessuto polmonare.

In particolare, è stato usato il collagene di tipo I, proteina fibrosa e strutturale, presente nella matrice extracellulare del tessuto connettivo degli alveoli polmonari; lo scaffold che si vuole realizzare risulta, dunque, biomimetico e biocompatibile.

Il lavoro è stato sviluppato in più fasi, si è partiti dalla realizzazione dell'idrogel di collagene, valutandone l'effettiva fibrillogenesi, la stabilità, la compatibilità alla vita cellulare, le proprietà reologiche e le proprietà meccaniche. Successivamente sono stati testati due differenti metodi di stampa per la realizzazione degli scaffold, uno caratterizzato dalla stampa su di un supporto mantenuto ad una temperatura pari a 37 °C ed uno stampando all'interno di un materiale di supporto.



**Figura 2.1:** Immagine relativa al tessuto polmonare, in particolare degli alveoli polmonari.

#### 3.1 COMPONENTI DELLA SOLUZIONE

##### 3.1.1 Collagene

Il collagene utilizzato durante questo lavoro di tesi, **Figura 3.1**, è collagene liofilizzato di origine bovina, in particolare estratto dal tendine di achille. Il prodotto si presenta in forma di polvere di colore bianco; come riportato da specifiche del produttore in questa forma, il collagene, risulta solubile in ambiente acido e a basse temperature, circa 4-5 °C, in modo tale che non si verifichi l'autoassemblamento delle molecole di collagene [37].



Azienda Produttrice	BLÁFAR
Nome Prodotto	Bovine Collagen Type I Powder
Purezza	> 85 %
pH	2.0 - 3.0

**Figura 3.1: Collagene.**

##### 3.1.2 DMEM

Il DMEM, nello specifico Dulbecco's Modified Eagle Medium, è un terreno di coltura che si trova allo stato liquido e presenta una colorazione tra l'arancione e il fucsia.

Il terreno di coltura è necessario per mantenere vitali le cellule, poiché contengono gli elementi nutritivi fondamentali per la sopravvivenza cellulare che le cellule stesse non sono in grado di sintetizzare autonomamente, come, per esempio, amminoacidi, vitamine, gas disciolti e ioni.

##### 3.1.3 Gelatina

La gelatina è un polimero che deriva dalla parziale idrolisi acida (gelatina di tipo A) o alcalina (gelatina di tipo B) del collagene animale. A seconda dell'origine del collagene e dalle tecniche di preparazione la gelatina presenta una struttura con proprietà fisiche e chimiche variabili. Questo polimero risulta facilmente reperibile e presenta costi ridotti. È biodegradabile, biocompatibile, presenta un'antigenicità limitata, degrada per via enzimatica senza produrre residui nocivi, presenta sequenza come Arginina-Glicina-Acido Aspartico che modulano l'adesione cellulare e presenta numerosi gruppi funzionali accessibili. La presenza dei gruppi Glicina-X-Prolina determina la conformazione a tripla elica della gelatina. La carica della gelatina varia in base al valore di pH, in ambiente acido risulta carica negativamente, mentre in ambiente basico carica positivamente [38].

In soluzioni acquose le macromolecole della gelatina assumono, ad elevata temperatura, una conformazione casuale. Al contrario in specifiche condizioni di pH, temperatura e solvente, le macromolecole presentano una flessibilità sufficiente a realizzare diverse conformazioni [39].

La gelatina, **Figura 3.2**, usata in questo lavoro è commercializzata dalla *Sigma-Aldrich* (cod. 1002679884) deriva dalla pelle porcina si presenta sottoforma di polvere di colore bianco.



Azienda Produttrice	Sigma-Aldrich
Tipo	A
Forma	Polvere
Solubilità	50 mg/mL di H <sub>2</sub> O

**Figura 3.2: Gelatina e sue proprietà.**

### 3.2 PREPARAZIONE DELLA SOLUZIONE A BASE DI COLLAGENE

La soluzione a base di collagene, come rappresentato in **Figura 3.3A**, viene realizzata preparando in un beaker i due solventi DMEM e Acido Acetico (alla concentrazione pari a 0.5M), il pH di tale composto risulta acido, pH < 4.0. Il tutto deve essere conservato a bassa temperatura, all'incirca < 10 °C, in modo tale da favorire la solubilità del collagene.

Mantenendo il sistema in agitazione, attraverso uno stirrer, ed in ambiente freddo si aggiunge gradualmente la polvere di collagene (2% w/v).

Conclusa questa operazione si lascia il beaker in agitazione (rotazione minima 50-60 rpm) almeno per 12h, così da favorire la completa dispersione del collagene in soluzione.

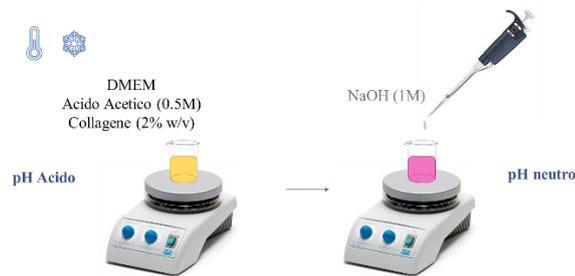


**Figura 3.3A: Primo step relativo alla preparazione della soluzione a base di collagene.**

Verificato di aver ottenuto una soluzione omogenea si procede alla neutralizzazione. Tale soluzione risulta, infatti, acida, per questo è necessario utilizzare una base, idrossido di sodio (NaOH, 1M) per

poter raggiungere un pH neutro. Servendosi di una pipetta si aggiunge, quindi, progressivamente la base fino ad ottenere un pH fisiologico  $\approx 7.4$ .

Il cambiamento del pH (**Figura 3.3B**) da acido a neutro è facilmente verificabile anche ad occhio nudo, poiché la soluzione ottenuta prima della neutralizzazione risulta color giallo paglierino (pH acido  $\approx 4.0$ ), mentre al termine di tale processo risulta color arancio-fucsia (pH neutro  $\approx 7.4$ ). Questo cambiamento cromatico è determinato dalla presenza nel terreno di coltura del colorante rosso fenolo, un indicatore di pH che risulta giallo a pH acido, arancio a pH neutro, rosso a pH maggiore di 7.4 e violaceo man mano che si sale.



**Figura 3.3B: Secondo step, neutralizzazione della soluzione di collagene.**

Per avere una soluzione omogenea il campione, dopo l'aggiunta del sale, è stato lasciato in frigo sullo stirrer con velocità minima (50-60 rpm) per almeno 12h.

### 3.3 PREPARAZIONE MATERIALE DI SUPPORTO

Il materiale di supporto è costituito da due parti, la prima, **Figura 3.4**, data da una soluzione di gelatina (4.5 % w/v) e buffer (pH 7.4, costituito da  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 M e NaOH 0.1 M), mentre la seconda data semplicemente dal buffer.



**Figura 3.4: Realizzazione prima soluzione a base di gelatina.**

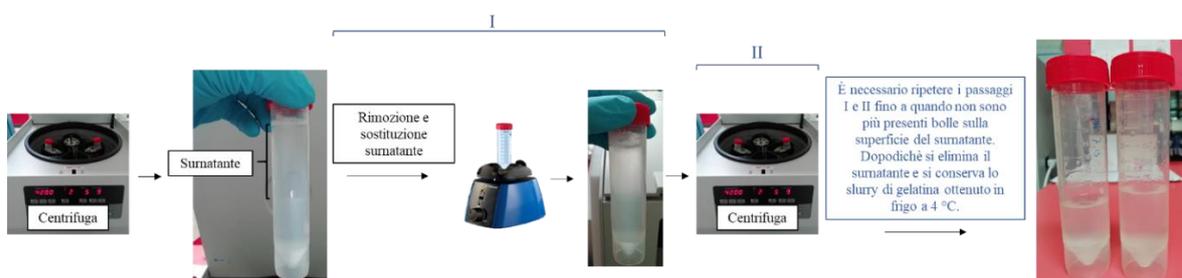
Come riportato dalla figura soprastante la prima soluzione viene preparata miscelando le soluzioni saline ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 M e NaOH 0.1, in rapporto 1.3:1), successivamente la soluzione neutra ottenuta viene lasciata su di uno stirrer con temperatura pari a 45 °C, viene aggiunta la polvere di gelatina e si lascia in rotazione per 1-2h in modo tale da favorire la completa dispersione della gelatina in soluzione. A questo punto si lascia il tutto in frigo (T circa 4 °C) per 12h.

Come mostrato in **Figura 3.5** trascorse le 12h alla soluzione gelificata viene aggiunta la seconda parte, cioè solo il buffer. Servendosi di un frullino ad immersione (120 secondi di rotazione) avviene la miscela del composto gelificato e del buffer.



**Figura 3.5: Unione soluzione gelificata e buffer.**

Il composto così ottenuto, **Figura 3.6**, viene inserito in falcon e centrifugato a 4200 rpm per 2 minuti. Al termine della prima centrifuga si rimuove il surnatante si usa il vortex e si procede nuovamente alla centrifuga. La sequenza vortex e centrifuga viene ripetuta fino a quando non sono più visibili bolle sulla superficie del surnatante, dopo la centrifuga. A questo punto rimosso il surnatante il materiale ottenuto costituisce il materiale di supporto e può essere conservato in frigo.



**Figura 3.6: Sequenza di passaggi per ottenere il materiale di supporto.**

### 3.4 SWELLING E STABILITÀ

In seguito alla preparazione della soluzione a base di collagene a pH neutro, prima di procedere con le caratterizzazioni fisiche e meccaniche si è analizzata la variabilità o meno del volume di sale aggiunto per ottenere un valore di pH neutro.

È stata, inoltre, valutata la capacità di *swelling* e la stabilità su lungo periodo del campione in fase gel. In particolare, per quanto riguarda la stabilità del campione è stata effettuata un'analisi sia relativa al valore di pH nel tempo sia di degradazione dell'idrogel ottenuto.

Questi studi sono stati condotti su bijoux contenenti 2mL di soluzione di collagene (2.5 - 4 mL per la valutazione di volume di NaOH) alle quali è stato aggiunto il sale per avere un pH neutro.

### 3.5 CARATTERIZZAZIONE SOLUZIONE

#### 3.5.1 Tube Inverting Test

La prova del *tube inverting* test è molto semplice e fornisce, qualitativamente, tempi e temperature di transizione dalla fase sol alla fase gel.

I campioni analizzati sono stati realizzati preparando tre bijoux contenenti ciascuna 2 mL di soluzione di collagene. A questo punto è stato possibile iniziare il test, che è stato svolto in incubatore (Control AG-System, presso i laboratori del DIMEAS, Dipartimento di Ingegneria Meccanica e Areospaziale) a 37°C con intervalli tra le diverse misurazioni pari a cinque minuti.

La transizione sol-gel della soluzione è riscontrabile dal fatto che capovolgendo la bijoux il campione non subisce alcuna modifica, mantenendo la stessa posizione.

La misurazione dei dati relativi al *tube inverting* test è stata svolta tramite osservazione diretta del campione e registrazione del relativo time step.

#### 3.5.2 Reometro

Il reometro misura le proprietà reologiche in condizioni stazionarie, dinamiche ed oscillatorie di determinati campioni. Esistono reometri rotazionali a stress controllato e reometri capillari.

Nei reometri capillari il campione è contenuto in una camera di materiale idoneo, è spinto da un pistone e forzato a scorrere attraverso un tubo capillare, come in un estrusore. La velocità del pistone, impostata dallo strumento e, la viscosità del campione causano nella camera un aumento della pressione che viene misurato e registrato.

Nei reometri rotazionali il campione è, invece, posto su di un piattino statico e le prove sono effettuate mediante il movimento controllato del pistone superiore (può avere geometrie differenti, piatto,

cono), che può ruotare od oscillare. Nel primo caso si effettuano misure di viscosità, per valutare le proprietà di scorrimento, contrariamente nel secondo è possibile mantenere misure in oscillatorio, per valutare la deformabilità del materiale. Le misure possono anche essere effettuate a temperatura fissa o variabile, in modo graduale e controllato.

In questo lavoro è stato utilizzato il reometro automatico MCR SERIES ANTON PAAR, in modalità piatto-piatto (**Figura 3.7**), disponibile presso il laboratorio Interdipartimentale, per valutare le proprietà reologiche dell'idrogel a base di collagene.



**Figura 3.7: Reometro.**

In particolare, sono state svolte le seguenti prove:

- strain test, studia le proprietà meccaniche del campione. Questo test deve sempre essere svolto per primo, in modo tale da identificare la regione viscoelastica lineare (LVE), che permette di conoscere i range entro i quali condurre le successive caratterizzazioni senza incorrere nella rottura del campione. Inizialmente il campione, in fase sol, è posto sul piattino inferiore alla temperatura di 0°C; successivamente si ha un graduale aumento della temperatura fino al valore richiesto, in questo caso 37 °C, in modo tale da consentire la transizione. Raggiunta una stabilità termica si procede allo svolgimento della prova a temperatura e frequenza costanti (1 Hz), lo sforzo aumenta gradualmente fino alla rottura del campione stesso;
- time test, permette di monitorare la transizione del campione dallo stato sol allo stato gel nel tempo. In questo modo si può avere un'indicazione più precisa e quindi quantitativa rispetto, per esempio, al tube inverting test. Durante la prova l'ampiezza dello sforzo è mantenuta pari a 0.1% (valutata dal risultato dello strain test), la frequenza costante (1 Hz) e la temperatura è portata in modo graduale da 0°C fino alla temperatura di transizione, 37°C;
- frequency test, valuta la cinetica della transizione sol-gel. Permette di identificare la condizione del campione, se è monofasico (modulo di elasticità,  $G'$ , maggiore del modulo

di perdita,  $G'' \rightarrow$  stato gel; viceversa,  $G' < G'' \rightarrow$  stato sol) o bifasico (sia sol sia gel, la transizione si ha nel punto di crossover). Durante la prova vengono mantenute costanti sia la temperatura sia la deformazione (ampiezza pari a 0.1%) e viene gradualmente variata la frequenza in un range definito dal limite di linearità (0.1 – 100 *rad/s*). Questo test risulta utile per confrontare campioni diversi oppure nel caso di idrogeli termosensibili per verificare il comportamento del campione a temperature diverse.

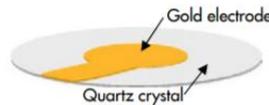
Per ciascuna prova il campione utilizzato è stato preparato come indicato nel capitolo precedente, si è, quindi, utilizzato in ogni test un certo volume di soluzione di collagene a pH neutro.

I dati delle diverse prove sono stati esportati su Excel, analizzati e rappresentati.

### 3.5.3 QCM-D

La QCM-D (Quartz Cristal Microbalance with Dissipation monitoring) è una microbilancia a cristalli di quarzo, utilizzata per valutare piccole variazioni di massa e di dissipazione energetica tra il cristallo di quarzo (elemento di sensig) e l'ambiente circostante. La QCM-D è un biosensore di tipo gravimetrico e label-free.

L'elemento sensibile **Figura 3.8** è un cristallo piezoelettrico inserito tra due elettrodi metallici, solitamente in oro. La frequenza di risonanza del cristallo ha un'elevata sensibilità alla massa depositata sul cristallo stesso.



**Figura 3.8: Sensore**

Il segnale misurato attraverso la microbilancia corrisponde, infatti, al potenziale elettrico generato in risposta allo stress meccanico dovuto alla variazione di massa. Sulla base della legge di Sauerbrey (valida per materiali rigidi depositati in aria o nel vuoto) l'aumento della massa è proporzionale alla diminuzione della frequenza; massa e frequenza risultano, quindi, inversamente proporzionali.

$$\Delta m_f = -C \frac{\Delta f}{n}$$

$C =$  costante di sensitività della massa;

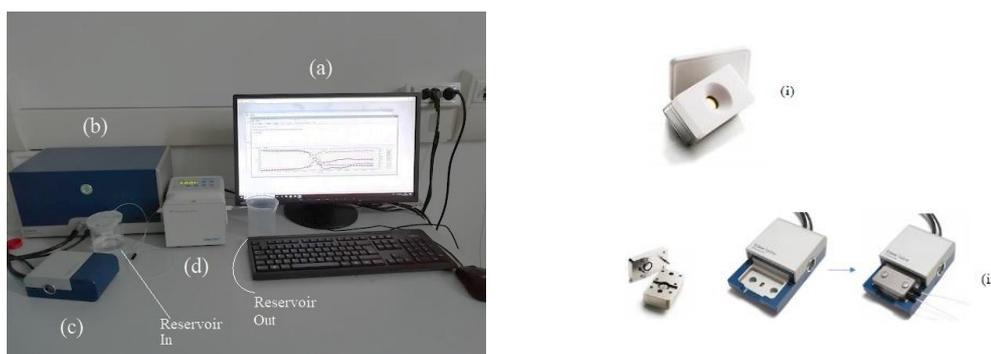
$n =$  numero dell'armonica.

La sensibilità del sensore è maggiore nella zona centrale e decresce allontanandosi da essa, inoltre più è alto il numero dell'armonica minore è l'area del cristallo indagata.

La dissipazione energetica aumenta quando si è in presenza di un substrato soft, mentre diminuisce con l'aumentare della rigidità dello stesso.

Per queste caratteristiche la microbilancia può essere utilizzata per monitorare l'assemblamento di più *layers*, l'adsorbimento di proteine e l'interazione cellule-superficie.

Il sistema della QCM-D *QSense* a disposizione presso il laboratorio interdipartimentale (Politecnico di Torino), **Figura 3.9**, è costituito da un computer per l'acquisizione dei dati, dalla microbilancia vera e propria, dall'alloggiamento contenente il cristallo (elemento sensibile) e dalla pompa peristaltica per utilizzare un flusso continuo. Tale strumento ha permesso di verificare sia la transizione sol-gel sia la stabilità dell'idrogel a contatto con il flusso di soluzione tampone (PBS, Phosphate Buffered Saline).



**Figura 3.9:** (a) computer per l'acquisizione e l'analisi dei dati; (b) QCM-D; (c) camera contenente il modulo; (d) pompa peristaltica. Immagine a dx relativa al modulo aperto (i) e al modulo chiuso (ii).

La microbilancia può essere utilizzata in due configurazioni, modulo aperto, con un coperchio per evitare l'evaporazione del campione e per migliorare la stabilità della misurazione, oppure modulo chiuso con un flusso continuo grazie all'utilizzo di una pompa peristaltica e di due reservoir. In questo lavoro il modulo aperto è stato impiegato per l'analisi della transizione sol-gel, mentre il modulo chiuso per lo studio della stabilità.

- Modulo aperto: il campione allo stato sol viene posto sul cristallo e la temperatura viene impostata a 37 °C. Trascorsi circa venti minuti il campione passa allo stato gel: quindi, viene aggiunta una soluzione tampone (PBS) per registrare eventuali variazioni di peso e per evitare che il campione si asciughi.

- **Modulo chiuso:** questa configurazione, è caratterizzata da un flusso costante per evitare il deterioramento del campione. Data la difficoltà di accesso alla camera contenente il sensore e la presenza dei fori per il movimento del flusso all'interno della camera stessa la transizione del campione da sol a gel è stata effettuata all'interno del modulo aperto, successivamente il gel così ottenuto è stato inserito nel modulo chiuso. La pompa peristaltica, collegata ad un reservoir contenente soluzione tampone ed uno vuoto per recuperare il flusso in uscita, è stata settata alla velocità minima (0.002 mL/min).

I dati acquisiti sono stati, quindi, analizzati tramite Excel; in particolare, è stata considerata unicamente un'armonica, della quale è stato calcolato il delta relativo sia alla frequenza sia alla dissipazione energetica ed i risultati così ottenuti sono stati rappresentati su di un unico grafico, in modo da avere in combinazione informazioni relative ad eventuali variazioni di massa e di rigidezza.

### 3.6 RELIZZAZIONE DELLO SCAFFOLD

#### 3.6.1 Stampante

La stampante a disposizione presso il DIMEAS al Politecnico di Torino è la Rokit INVIVO **Figura 3.10**, in particolare per questo lavoro è stato utilizzato il modulo1, relativo al Bio dispenser, il modulo a sinistra consente, invece, di sfruttare la tecnica FDM (Focus Deposition Modeling). Questa stampante permette di controllare ed impostare la temperatura dell'alloggiamento contenente la siringa e del piatto sul quale viene estruso il materiale.

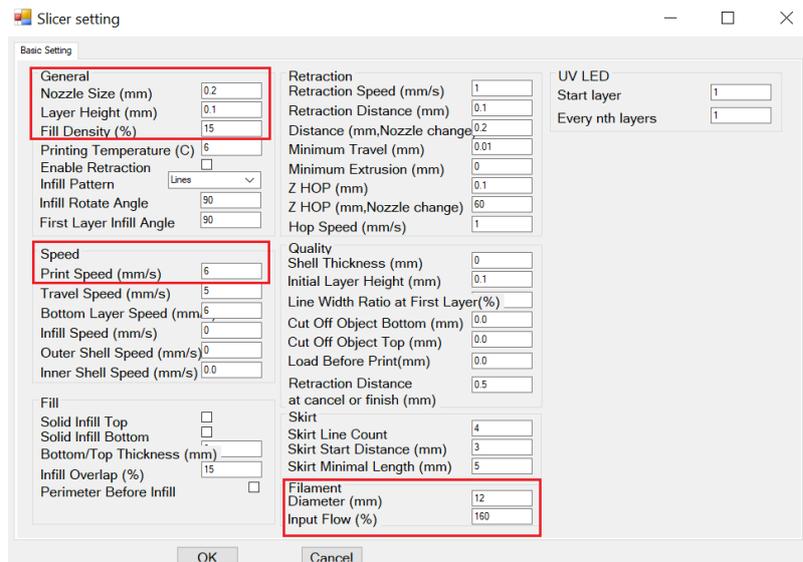


**Figura 3.10: Rokit Invivo.**

##### 3.6.1.1 Realizzazione del modello

Per realizzare la stampa di un qualsiasi oggetto è necessario utilizzare un software CAD (per esempio Solidworks) per originare un modello con le caratteristiche desiderate ed esportarlo come file `stl`; tale estensione viene caricata sul programma collegato alla stampante, NewCreatorK. Il software della stampante permette, dopo aver impostato alcuni parametri, di realizzare lo *slicing* dell'oggetto, crea, cioè, un file `gcode` nel quale vi sono i comandi per realizzare il modello un *layer* alla volta.

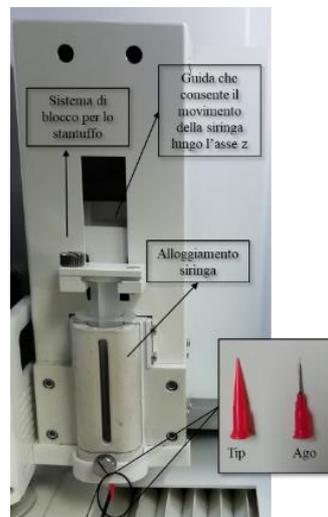
Come anticipato prima di poter effettuare lo *slicing* del modello è necessario impostare alcuni parametri; si riporta di seguito la schermata relativa a tale operazione (**Figura 3.11**). Tramite i box rossi sono state evidenziate le variabili che influenzano maggiormente le caratteristiche e la processabilità del filamento estruso. Per ottenere una struttura relativamente definita sono state effettuate numerose prove in merito alla scelta delle impostazioni, cercando di trovare un compromesso valido tra velocità e variabili del filamento.



**Figura 3.11: Parametri da impostare prima dello *slicing*.**

### 3.6.1.2 Inizializzazione Stampante

Il Bio dispenser, **Figura 3.12**, è costituito, in particolare, da:



**Figura 3.12: Modulo relativo al BioDispenser**

- siringa, contenente il materiale da stampare;
- ago/tip entrambi di diametro pari a 200  $\mu\text{m}$ ;
- alloggiamento per la siringa, del quale può essere modificata la temperatura;
- piattino, sul quale viene posizionata la petri per la stampa del campione, di cui è possibile impostare la temperatura.

La stampante è dotata di un touch screen che consente di accedere alle impostazioni di stampa.

Per poter stampare si accende il controller della temperatura e si impostano i valori desiderati sia per il dispenser sia per il piattino, rispettivamente 8 °C e 37 °C. La soluzione contenuta nella siringa può, quindi, essere estrusa senza che occluda l'ago, il filamento generato viene depositato sulla petri a 37 °C, temperatura che permette la transizione del collagene.

Non appena il dispositivo ha raggiunto la temperatura impostata si inserisce, nell'apposito alloggiamento, la siringa in combinazione con l'ago o la tip. Successivamente dallo schermo accedendo al programma della stampante NewCreatorK si seleziona il comando *Printer View* si sceglie il pannello *Dispenser 1* e mediante i tasti *Load* e *Uload* si posiziona correttamente l'elemento superiore dell'alloggiamento, in modo tale da poter bloccare lo stantuffo della siringa.

Posizionato il campione segue l'impostazione dello zero dell'asse z e del piano x-y, che permette di eseguire l'inizializzazione della stampante, necessaria prima di eseguire la stampa. L'asse z è l'asse lungo il quale si muove l'estrusore (siringa), mentre il piano x-y è rappresentato dal piatto. Si parte dall'asse z, attraverso i comandi di salita e discesa si posiziona la punta della siringa quasi a contatto con la petri; si termina l'operazione salvando le modifiche. Tornando alla schermata precedente si svolge l'inizializzazione del piano x-y, sempre utilizzando i comandi direzionali si sposta il piattino fino a quando la punta della siringa si trova al centro della petri.

Conclusa l'inizializzazione dalla stampante si può eseguire il file `gcode` contenente le istruzioni per la realizzazione del costruito. Tale file può essere inviato alla stampante tramite chiavetta usb, ingresso presente sulla stampante stessa, oppure tramite cavo collegato attraverso il software NewCreatorK presente sul computer a disposizione in laboratorio.

### 3.6.1.3 Primo metodo di Stampa

Durante i tentativi di realizzazione dello scaffold si è riscontrata la necessità di non stampare in modo continuo i vari *layers*, ma di introdurre una pausa tra un *layer* ed il successivo, in modo tale da consentire la fibrillogenesi della soluzione di collagene, attraverso il pH neutro della soluzione stessa e la temperatura del piattino di estrusione (37 °C). Tale accorgimento permette di ottenere una struttura più stabile rispetto alla stampa continua, in grado di sostenere la deposizione dei *layers* successivi. Questo comando deve, però, essere inserito manualmente nel file `gcode` ottenuto in seguito allo *slicing*.

Per automatizzare l'operazione si è usato il linguaggio di programmazione Python. In **Figura 3.13** è riportato il codice scritto per modificare il file gcode.

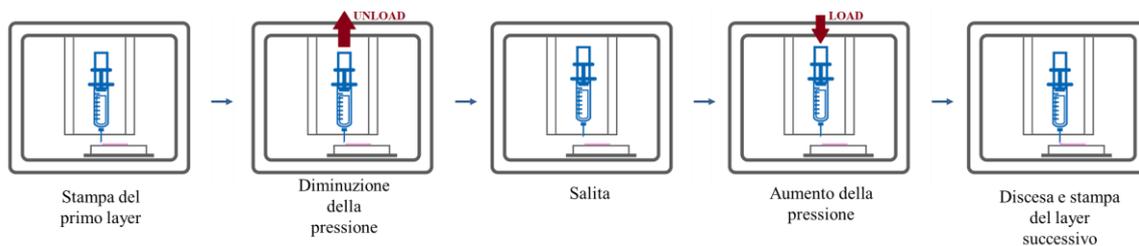
```

Python 3.7 (64-bit)
Python 3.7.0 (v3.7.0:1bf9cc5093, Jun 27 2018, 04:59:51) [MSC v.1914 64 bit (AMD64)] on win32
Type "help", "copyright", "credits" or "license" for more information.
>>> p = ('\n')
>>> i = 1
>>> j = 1
>>> l = 0.07322
>>> v = 90.0
>>> f1 = open('C:/Users/[redacted]/Dropbox/TESI/STAMPANTE/Mod.txt', 'w')
>>> with open('C:/Users/[redacted]/Dropbox/TESI/STAMPANTE/New10.0/Cubo5_FD15_F120_d11_v43.gcode') as f:
...     for line in f:
...         x = line.startswith("M73")
...         y = line.startswith("G0")
...         if x == True and line[5] != "0":
...             E = 0.05000
...             Es = E + (i*0.00007)
...             e = round(Es,6)
...             z = 0.1
...             z1 = z + (i*0.1)
...             z2 = round(z1,2)
...             load = l + 0.03237
...             l = load
...             pausa='\n;ENABLE RETRACTION\nG1 F{0} E-{1} (retractionAmount)\nG1 Z{2} F{0} H1(retractionZHop)\n;PAUSA\nG1 Z
40.000 F{0} (Nozzle Hop)\nG1 F{0} E{3:.5f} (Back-retraction)\n'.format(v,e,z2,l)
...             f1.write(pausa+p+line)
...             i += 1
...         elif y == True and line[7] == "Z":
...             k = 0.1 + j*0.1
...             k1 = k - 0.1
...             alt = 'G0 F{0} Z{1:.3f}\n'.format(v,k1)
...             f1.write(alt)
...             j += 1
...         else:
...             f1.write(line)

```

**Figura 3.13: Codice Python**

Nel file gcode, contenente le istruzioni per stampare il modello voluto, non è presente un comando di pausa, ma è necessario introdurre un movimento di salita e successiva discesa del dispenser senza estrusione di materiale; inoltre prima e dopo la salita serve rispettivamente una diminuzione ed un aumento della pressione sullo stantuffo della siringa, in modo tale da non avere la formazione di gocce. In **Figura 3.14** vi è una rappresentazione schematica della pausa.



**Figura 3.14: Schematizzazione dei movimenti necessari per realizzare la pausa**

Nel codice di Python sono presenti anche alcune righe che identificano l'inizio di un nuovo layer, tali istruzioni sono state inserite per modificare il parametro  $Z$ , in modo tale che il filamento estruso dall'ago risulti a contatto con il layer precedente. Questa variazione è stata resa necessaria poiché i primi strati stampati, a contatto con la petri a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , tendono a perdere il proprio contenuto di acqua molto velocemente, determinando così una diminuzione dell'altezza del layer depositato.

#### 3.6.1.4 Secondo metodo di stampa

Date le difficoltà riscontrate nella stampa dell'idrogel a base di collagene sono state svolte alcune prove modificando il metodo di stampa attraverso l'utilizzo di un materiale di supporto. Per realizzare queste prove si è fatto riferimento alla tecnica FRESH (Freeform Reversible Embedding of Suspended Hydrogels, [40]).

Questa tecnica si basa sull'utilizzo di uno slurry di particelle di gelatina, come materiale di supporto. L'idrogel a base di collagene viene stampato all'interno del materiale di supporto, conclusa la fase di stampa, il tutto viene inserito in incubatore a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  per consentire al collagene di passare dallo stato sol a quello gel ed alla gelatina di fondere. La stampa avviene, infatti, mantenendo il dispenser sempre a bassa temperatura ( $T < 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) mentre il piattino a temperatura ambiente circa  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

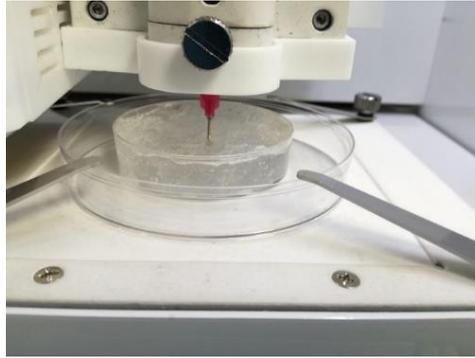
Nell'articolo in cui è presentata la tecnica FRESH per realizzare il materiale di supporto viene utilizzata una soluzione di  $\text{CaCl}_2$  e HEPES buffer grazie al quale si ha un valore di pH neutro. La presenza del sale probabilmente permette di ottenere una migliore distribuzione di particelle di gelatina, sia per quanto riguarda il numero sia per la dimensione ridotta.

Data la mancanza del buffer HEPES, inizialmente sono state condotte delle prove realizzando in laboratorio un buffer a pH pari a 7.4 a base di Diidrogenofosfato di potassio (o Fosfato Monopotassico,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) e Idrossido di Sodio ( $\text{NaOH}$ ). Il sale  $\text{CaCl}_2$  non è stato utilizzato nelle prove svolte, poiché se inserito nel buffer precipitava.

I file stampati con questa tecnica sono gli stessi usati precedentemente, con l'unica differenza di non presentare la pausa.

Per stampare l'idrogel nel materiale di supporto durante tutte le prove svolte è stato usato unicamente l'ago e non la tip, ma comunque di diametro pari a  $200\text{ }\mu\text{m}$ .

La petri sulla quale viene stampato il modello (**Figura 3.15**) viene totalmente riempita con il materiale di supporto e posizionata sul piattino della stampante a  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Successivamente l'idrogel contenuto nella siringa viene inserito nell'alloggiamento alla temperatura di  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . A questo punto è possibile avviare il processo di stampa, al termine del quale la petri contenente il modello appena stampato viene inserito in incubatore a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ .



**Figura 3.15: Stampa all'interno del materiale di supporto.**

### **3.7 CARATTERIZZAZIONE SCAFFOLD**

#### 3.7.1 FE-SEM

Il Microscopio elettronico a scansione con sorgente ad emissione di campo (Field Emission - Scanning Electron Microscope, FE-SEM) acquisisce immagini ad elevato ingrandimento, con risoluzione intorno al nanometro e permette la caratterizzazione topografica di superfici piane o micro/nanostrutturate, l'analisi composizionale a scala micrometrica e la mappatura strutturale di superfici.

Il FE-SEM a disposizione presso il DIMEAS è lo ZEISS MERLIN, **Figura 3.16**, ed è stato utilizzato per indagare la presenza della struttura fibrillare del collagene.



**Figura 3.16: FE-SEM a disposizione presso il DIMEAS.**

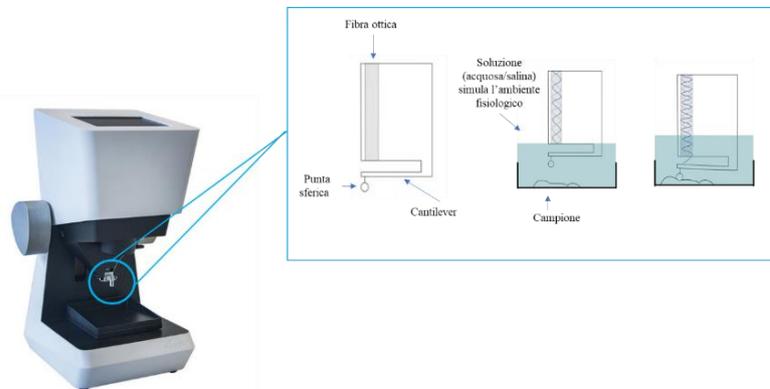
Attraverso questo dispositivo è stato possibile analizzare i campioni in sezione, in modo da avere un'indicazione della struttura interna. I campioni per poter essere studiati attraverso il FE-SEM sono stati liofilizzati, tagliati con un semplice bisturi, posizionati su di uno *stub* e ricoperti di Platino ottenendo così una risoluzione fino a 5 nm.

### 3.7.2 Nanoindentazione

La nanoindentazione permette di valutare le proprietà meccaniche di diversi materiali, sia leghe metalliche sia gel polimerici. Questo metodo si basa sulla relazione tra un carico applicato da un indentatore e la profondità di penetrazione di quest'ultimo.

In particolare, in questo lavoro è stato usato il dispositivo *OpticsII Piima Nanoindenter* presso il dipartimento Interdipartimentale. Questo strumento è stato realizzato per la caratterizzazione di materiali soft usati in ambito biologico.

La sonda ottica del nanoindenter, rappresentato in **Figura 3.17** è costituita da una fibra ottica, che consente la registrazione dei dati ottenuti tramite l'elemento sensibile, un cantilever e, da una punta sferica, elemento a contatto con il campione. La misura può anche essere svolta immergendo il campione in un mezzo acquoso, in modo tale da simulare l'ambiente fisiologico.



**Figura 3.17: Nanoindenter, ingrandimento della sonda ottica.**

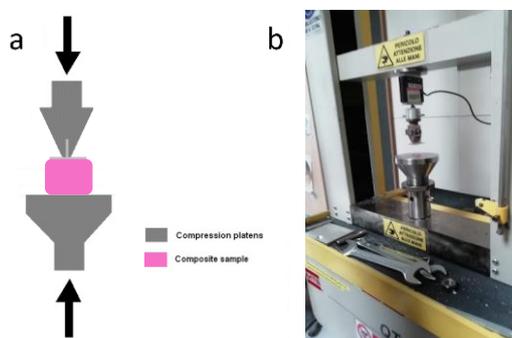
Le prove svolte in questo lavoro sono state condotte attraverso una punta sferica di  $49.5 \mu\text{m}$  a temperatura ambiente.

Per svolgere questa caratterizzazione meccanica la soluzione a base di collagene a pH neutro è stata versata in una petri di vetro e si è indotta la transizione dalla fase sol alla fase gel mantenendo il campione in incubatore a  $37^\circ\text{C}$  per circa mezz'ora. Il gel, così ottenuto, è stato posizionato sul piano inferiore del dispositivo. Prima di iniziare la prova è stato aggiunto sulla superficie del campione un certo volume di acqua in modo da evitare eventuali accumuli di materiale sulla sonda.

Il campione è stato analizzato attraverso l'indentazione di più punti di un'unica area, rappresentata da una matrice  $5 \times 5$  con distanza tra ogni punto di indentazione di  $100 \mu\text{m}$ . Il funzionamento del dispositivo è controllato dal software *PiimaV2*, che consente di raccogliere e visualizzare i dati delle diverse prove, sia su curve di carico-spostamento sia su mappe colore (rappresentano, con un codice colore, il modulo elastico di ogni punto di indentazione rilevato). Le curve ottenute dal dispositivo sono state modificate attraverso il software *DataViewerV2.2*.

### 3.7.3 MTS - Prove di compressione

Le prove di compressione sono state realizzate attraverso la macchina di prova universale elettromeccanica MTS QTest/10, **Figura 3.18**, presso il laboratorio del DIMEAS.



**Figura 3.18:** (a) schema relativo al posizionamento del campione nel dispositivo; (b) foto relativa all'intero macchinario a disposizione.

Il sistema utilizzato è costituito principalmente da due traverse delle quali solo quella superiore è mobile, mentre quella inferiore permette l'alloggiamento del campione.

Nei test di compressione svolti è stato utilizzato per la parte superiore un afferraggio combinato con un elemento a forma di T per consentire l'applicazione del carico, mentre sulla traversa inferiore è stato montato un alloggiamento piatto per consentire il posizionamento del campione. La cella di carico collegata alla traversa mobile presenta un carico massimo di 10 N.

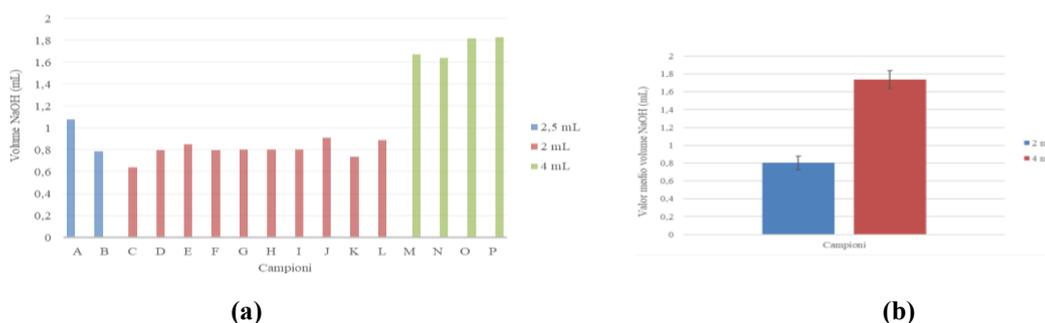
Posizionati i rispettivi moduli alle traverse il campione da analizzare è stato depositato sul piatto inferiore mentre la traversa superiore è stata spostata in modo tale da risultare a contatto con il campione stesso. La discesa della traversa mobile è stata impostata ad una velocità pari a 1 mm/min.

Il funzionamento del macchinario è gestito dal software TestWorks 4 attraverso il quale è possibile avviare la prova e monitorare, in tempo reale, il procedere del test, che si conclude non appena l'elemento superiore viene a contatto con quello inferiore. I dati così registrati sono stati salvati su Excel analizzati e rappresentati su curve sforzo-deformazione.

Per lo svolgimento delle prove sono stati realizzati campioni cilindrici. È stata preparata una soluzione di collagene (6 mL) a pH neutro che è stata successivamente versata in quattro pozzetti (1.5 mL ciascuno) di una multiwell da 24 in modo tale da ottenere provini cilindrici (*diametro* = 16 mm; *altezza*  $\cong$  10 mm). La multiwell è stata mantenuta in incubatore (37 °C) per circa venti minuti per ottenere i provini di gel.

#### 4.1 STABILITÀ

Come anticipato prima di svolgere le caratterizzazioni della soluzione a base di collagene è stato necessario valutare le caratteristiche della stessa. Realizzata la soluzione a base di collagene si è aggiunto un volume costante (**Figura 4.1**) di sale, idrossido di sodio (NaOH, 1M) raggiungendo un pH neutro. I dati relativi alle diverse prove sono stati registrati, analizzati e rappresentati attraverso Excel.



**Figura 4.1: (a) Grafico relativo al volume di sale aggiunto per ottenere un pH neutro, valutato su campioni di differente volume; (b) Valore medio e deviazione standard del volume di sale aggiunto.**

Nella prima fase del progetto è stato utilizzato idrossido di sodio 1M ed in media su un volume di 2 mL di soluzione a base di collagene sono stati aggiunti 0.8 mL di soluzione NaOH 1M. Il volume aggiunto ha causato una diminuzione sia della viscosità della soluzione sia della concentrazione di collagene iniziale. Per questo è stata usata una soluzione di NaOH 2M. Questa scelta è stata velocemente scartata, in quanto il sale a tale concentrazione modifica la soluzione al punto da renderla inutilizzabile (è stata evidenziata la formazione di schiuma e bolle). Si è per questo ritornati alla scelta iniziale utilizzando NaOH 1M. Partendo da una concentrazione pari a 2% w/v in seguito al processo di neutralizzazione la concentrazione finale di collagene risulta all'incirca pari a 1,43% w/v.

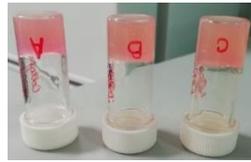


**Figura 4.2: Foto relativa al campione in parte neutralizzato con NaOH (2M) a sx e NON neutralizzato a dx.**

#### 4.1.1 *Swelling* e degradazione

Disponendo il campione neutralizzato in incubatore avviene la transizione sol  $\rightarrow$  gel. A questo punto si è aggiunto un dato volume di soluzione tampone (1 mL di fosfato salino, PBS) e a differenti intervalli di tempo si è verificata la stabilità del pH, lo swelling e la degradazione.

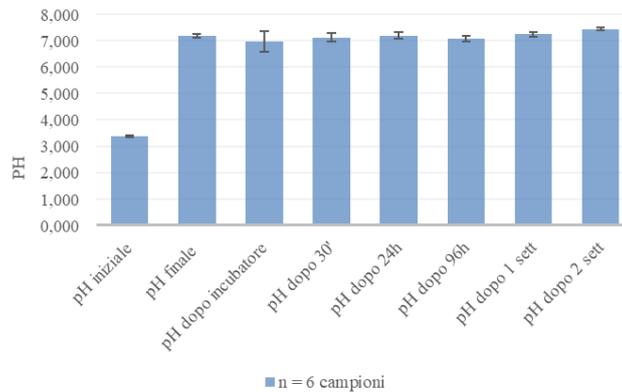
Tutti i campioni utilizzati, **Figura 4.3**, per queste analisi sono gel a base di collagene (2% w/v), contenuti in bijoux.



**Figura 4.3:** Immagine relativa ai campioni di gel a base di collagene utilizzati.

- **pH**

Durante questo lavoro si è misurato il pH di sei campioni, per le prove successive (swelling e degradazione) si sono analizzati tre campioni. I valori ottenuti come nel caso precedente sono stati analizzati e rappresentati su Excel.



**Figura 4.4:** Grafico relativo al valore medio di pH a diversi time step.

Come si evince dal grafico, **Figura 4.4**, sopra riportato il valore di pH dei campioni rimane costante fino a due settimane, tempo fino al quale è stata portata avanti la misura.

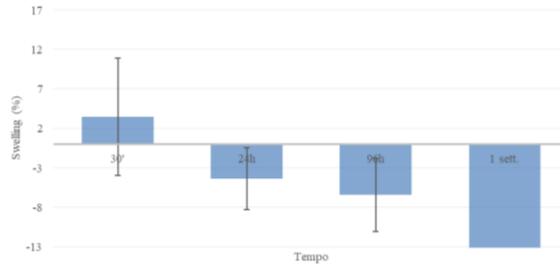
- ***Swelling***

Per valutare lo swelling percentuale dell'idrogel, quindi la capacità di adsorbimento di soluzione dall'ambiente circostante si è misurato il peso dei campioni subito dopo la transizione in gel e a differenti intervalli, in particolare in seguito a 30 minuti, 24 minuti, 96 ore ed una settimana.

$$\frac{w_{gelF} - w_{gelI}}{w_{gelF}} * 100$$

$w_{gelF}$  = peso del campione ad un dato time step (g);

$w_{gelI}$  = peso del campione in fase gel, al tempo zero (g).



**Figura 4.5: Grafico relativo allo swelling percentuale.**

Dal grafico riportato, **Figura 4.5**, si può notare come trascorso il primo time step, trenta minuti, lo swelling risulta negativo, in quanto è maggiore il fenomeno di degradazione. Questo aspetto probabilmente è dovuto alla ridotta concentrazione di collagene nell'idrogel, per cui avviene una reticolazione poco fitta che facilita l'ingresso di soluzione e la conseguente degradazione degli strati più superficiali del campione.

▪ **Variazione di peso e degradazione**

L'analisi della stabilità è stata svolta come quella relativa allo swelling, pesando i campioni a differenti intervalli. Per calcolare il valore di degradazione percentuale è necessario avere il peso dei campioni liofilizzati, di conseguenza è stato riportato, **Figura 4.6**, tale valore solo per l'ultimo time step, una settimana.

$$\frac{w_{fd_{gelI}} - w_{fd_{gelF}}}{w_{fd_{gelI}}} * 100$$

$w_{fd_{gelI}}$  = peso campione liofilizzato inicial, tempo zero (g);

$w_{fd_{gelF}}$  = peso campione liofilizzato ad un dato time step (g).

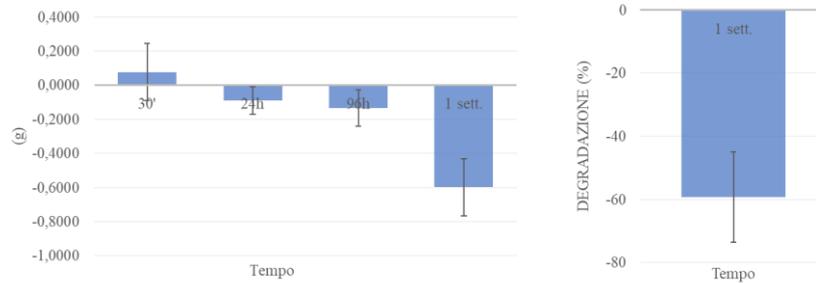


Figura 4.6: Grafico relativo alla variazione di peso (sx) e alla degradazione percentuale (dx).

## 4.2 TUBE INVERTING TEST

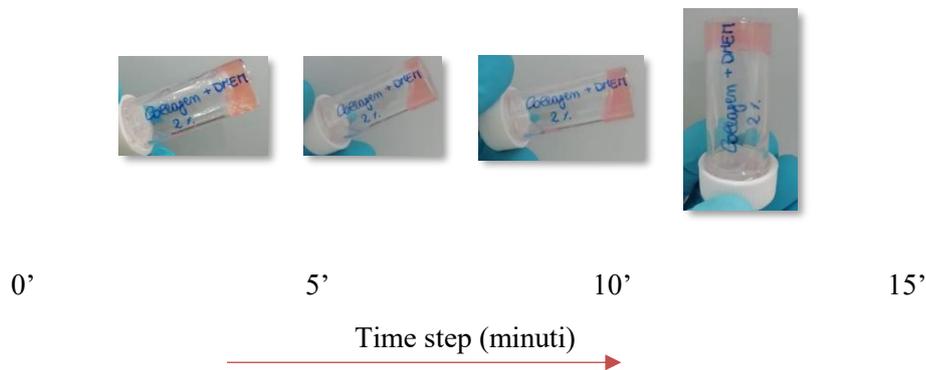


Figura 4.7: Successione dei time step eseguiti durante la prova.

I campioni analizzati durante il *tube inverting* test sono realizzati alla stessa concentrazione di quelli studiati per la valutazione di swelling e stabilità.

La soluzione a pH neutro viene inserita in incubatore (37 °C), la combinazione di pH e di temperatura permette, come precedentemente descritto, la fibrillogenesi del collagene.

Per avere una prima indicazione relativa alla tempistica della transizione (sol → gel) lo stato del campione viene verificato a diversi time step (**Figura 4.7**) semplicemente ruotando la bijoux. Siccome nei primi controlli il campione risulta ancora in fase liquida è sufficiente inclinare la bijoux.

Attraverso questo test è stato possibile verificare che trascorsi quindici minuti il campione risulta un gel.

## 4.3 REOMETRO

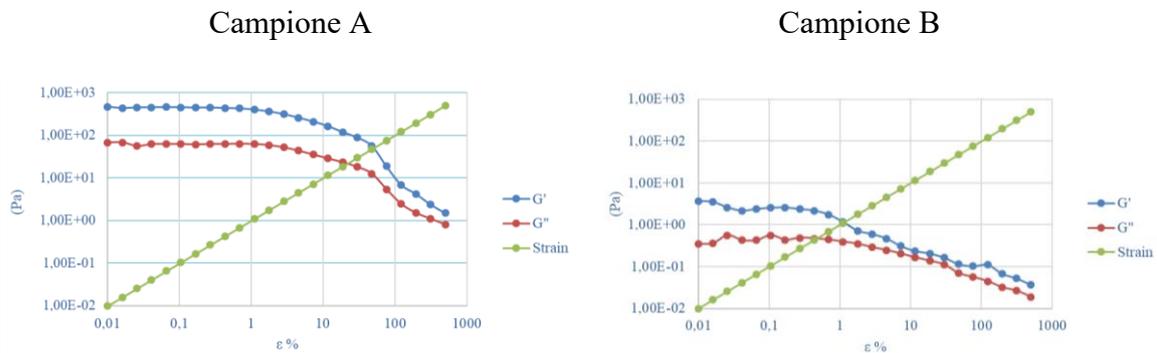
Le prove di reologia sono state svolte sia per il campione di soluzione a base di collagene neutralizzato (pH neutro) sia per il campione di soluzione a base di collagene non neutralizzato (pH

acido) in modo tale da verificare sperimentalmente come solo l'azione combinata di pH e temperatura consente la fibrillogenesi *in vitro* del collagene.

Di seguito saranno, dunque, presentati i risultati dei due casi in modo parallelo per tutte e tre le prove svolte (strain, frequency, time).

Per le analisi svolte a 37 °C si è utilizzata la *solvent trap*, riempita con acqua distillata, in modo da evitare sia la parziale evaporazione sia l'eventuale asciugatura del campione stesso.

### 4.3.1 Strain



**Figura 4.8:** Grafici relativi alla prova di strain, campione neutralizzato (A); campione non neutralizzato (B).

Lo strain sweep test è stato svolto in modo tale da identificare la regione viscoelastica lineare (LVE), la quale si trova al di sotto dell'1% di strain. La temperatura (37 °C) e la frequenza (1 Hz) sono mantenute costanti durante la prova.

Il campione rimane nello stato di gel per tutta la durata della prova, dato che il modulo di elasticità ( $G'$ ) è sempre maggiore del modulo di perdita ( $G''$ ).

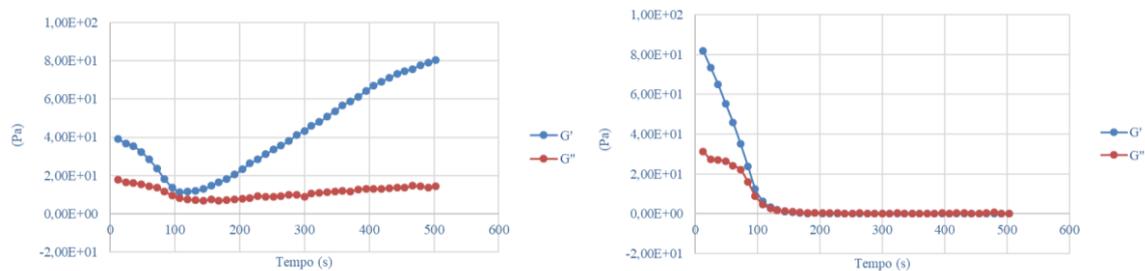
Le analisi successive, frequency e time test, sono state svolte mantenendo un valore percentuale di sforzo pari a 0,1%, in modo tale da essere sicuri di rientrare nella regione LVE.

La differenza riscontrabile tra i grafici, **Figura 4.8**, rispettivamente del campione neutralizzato e di quello non neutralizzato è relativa al valore del modulo elastico e del modulo di perdita, i quali si discostano nei due casi di circa due ordini di grandezza; inoltre nel caso del campione non neutralizzato la LVE risulta inferiore.

Nel caso A data la combinazione di pH neutro e di temperatura vi sono relazioni tra le catene polimeriche, le quali risultano parzialmente attorcigliate; questo legame fisico blocca le catene, che non sono libere di muoversi e risultano meno flessibili; inoltre le molecole di collagene (tropocollagene) iniziano a formare le prime fibrille, costituendo un network dinamico.

Nel caso B il campione è meno stabile, nonostante anch'esso sia un gel ( $G' > G''$ ) presenta caratteristiche meccaniche più soft, il campione è caratterizzato dall'aver unicamente legami dovuti all'attorcigliamento delle catene polimeriche. Il campione non neutralizzato presentando legami più deboli raggiunge la rottura per valori di sforzo inferiori rispetto al caso del campione a pH neutro.

#### 4.3.2 Time



**Figura 4.9:** Grafici relativi alla prova di time, campione neutralizzato (A); campione non neutralizzato (B).

Il time test permette di monitorare la transizione del campione dallo stato sol allo stato gel nel tempo. In questo modo si può avere un'indicazione quantitativa più precisa rispetto, per esempio, al tube inverting test.

Durante la prova la temperatura varia in modo graduale da  $0^{\circ}\text{C}$  fino alla temperatura di transizione, nel nostro caso  $37^{\circ}\text{C}$ .

La transizione sol gel termina con il completo sviluppo del gel, che nel grafico è identificato da un plateau dei due moduli. Sopra riportati, **Figura 4.9**, vi sono i grafici relativi al time test svolto per i due differenti campioni (A campione neutralizzato, B campione non neutralizzato).

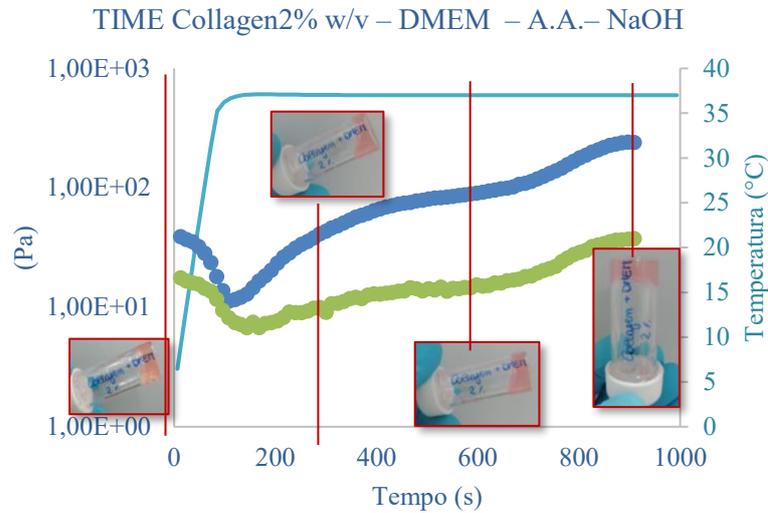
Nel caso A non si è riscontrato un vero e proprio plateau, poiché la soluzione a tale concentrazione di collagene e a pH neutro, è un gel (durante tutta la prova risulta  $G' > G''$ ) e raggiunge il completo sviluppo dopo circa 8-10 minuti.

Al contrario nel caso B, campione non neutralizzato, non si verifica mai il raggiungimento di un plateau e nonostante l'iniziale stato di gel ( $G' > G''$ ) dopo un paio di minuti si ha una riduzione delle proprietà meccaniche.

Il grafico relativo al caso B evidenzia come il solo contributo della temperatura non sia sufficiente ad innescare la fibrillogenesi del collagene, ma è necessario avere anche un valore di pH neutro.

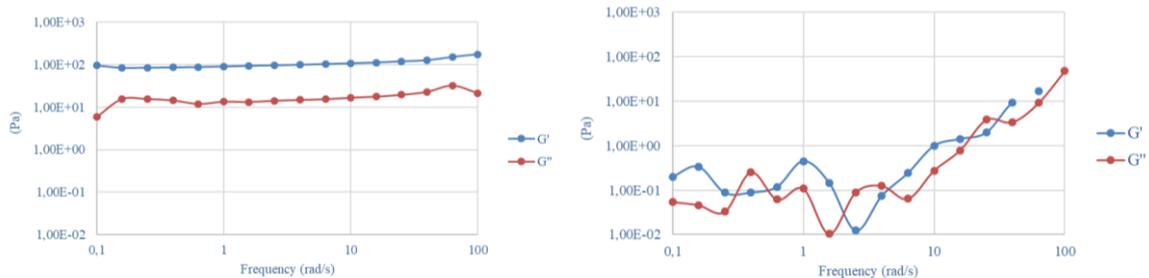
Come anticipato il time test permette di ottenere un'indicazione più precisa riguardo al completo cambiamento di fase del campione rispetto al tube inverting test, risulta, comunque, molto

interessante vedere la sovrapposizione dei dati ottenuti con entrambe le caratterizzazioni, **Figura 4.10**.



**Figura 4.10:** Grafico relativo al time test del campione neutralizzato (A) sovrapposto alle immagini dei tube inverting test.

### 4.3.3 Frequency



**Figura 4.11:** Grafici relativi alla prova di frequency, campione neutralizzato (A); campione non neutralizzato (B).

Il frequency test permette di verificare la condizione del campione, se è monofasico ( $G' > G''$  gel;  $G' < G''$  sol) o bifasico (sia sol sia gel, la transizione si ha nel punto di crossover). Come riportato in **Figura 4.11** questo test è stato svolto alla temperatura corporea, 37 °C.

Analizzando il grafico relativo al caso A, campione neutralizzato, è evidente come il campione sia monofasico, totalmente gel,  $G' > G''$ , non è presente crossover, questo risultato conferma il fatto che la fibrillogenesi sia vincolata alla combinazione di temperatura e di pH.

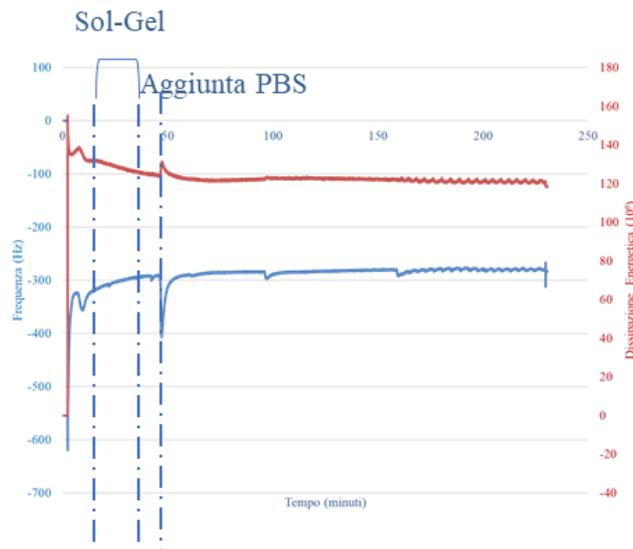
Il grafico ottenuto nel caso B, campione non neutralizzato, conferma ulteriormente questa necessità, in quanto i dati relativi sia al modulo di elasticità sia al modulo di perdita risultano molto instabili.

Questi dati possono essere associati al collasso della tripla elica del tropocollagene in una conformazione random, per cui avendo una soluzione con legami deboli aumentando la temperatura si ha un incremento della mobilità molecolare, avviene la separazione dei legami fisici, attorcigliamenti, tra le catene e la rottura dei legami idrogeno tra i gruppi -CO e -NH di catene vicine, determinando la separazione della struttura delle  $\alpha$ -elica [37].

#### 4.4 QCM-D

La QCM-D è stata utilizzata come ulteriore verifica della transizione sol  $\rightarrow$  gel del campione, mediante il modulo aperto e, della stabilità, mediante il modulo chiuso.

- Modulo aperto: in queste condizioni la misura è stata condotta per poco meno di quattro ore in modo tale da valutare la stabilità del campione. I risultati ottenuti sono presentati nel grafico sottostante, **Figura 4.12**.



**Figura 4. 12: Grafico relativo alla variazione di frequenza e dissipazione ottenuti tramite QCM-D.**

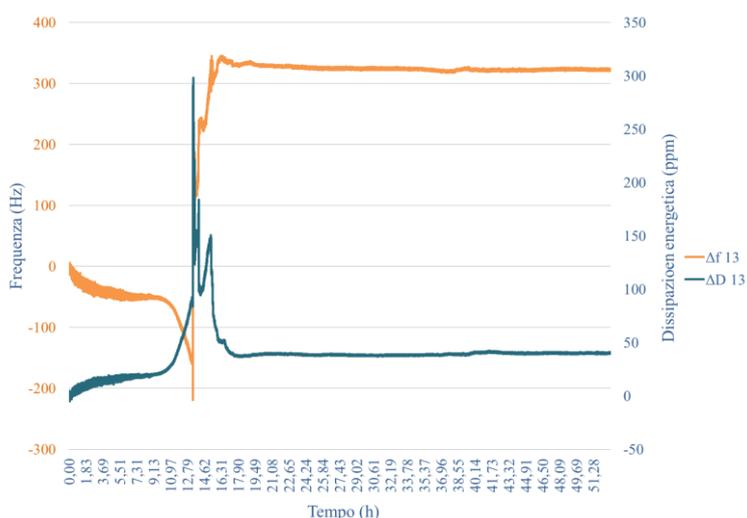
Per semplicità nel grafico è stata riportata il delta relativo alla frequenza e alla dissipazione di energia di un'unica armonica. In particolare, sono stati analizzati i dati di un'armonica con un valore elevato (f13, D13), in modo da indagare il centro del cristallo e ridurre così eventuali artefatti dovuti a rumore.

La porzione di grafico indicata come "Sol-Gel" indica appunto la transizione, nel tempo, dalla fase sol alla fase gel; questo evento è facilmente riscontrabile dalla diminuzione della dissipazione energetica poiché con il cambiamento di fase il campione risulta anche più rigido.

L'aggiunta del PBS è rappresentata da un picco, sia nel caso della dissipazione energetica sia nel caso della frequenza. Monitorando la stabilità nel tempo non si riscontrano significativi cambiamenti di peso o di rigidezza del campione.

- Modulo chiuso: i dati ottenuti, relativi ad un'osservazione durata all'incirca due giorni, sono stati analizzati e rappresentati, **Figura 4.13**, come nel caso precedente.

Anche in questo caso sono stati riportati i valori relativi ad un'armonica elevata, in modo da ridurre artefatti dovuti a rumore.



**Figura 4.13: Grafico relativo alla variazione di frequenza e dissipazione ottenuti tramite QCM-D.**

All'inizio del grafico soprariportato si ha una lieve variazione di peso dovuta al completo riempimento della camera, successivamente si riscontra, infatti, una situazione stabile.

Trascorse poco più di dodici ore si evidenzia un picco sia relativo alla variazione di frequenza sia di dissipazione. La variazione di frequenza passa da un valore negativo ad uno positivo indicando una diminuzione di massa, mentre la dissipazione energetica aumenta, in valore assoluto, determinando un cambiamento delle proprietà meccaniche del campione, il quale degradando risulta, infatti, meno rigido più soft, i legami più superficiali, a contatto con la soluzione iniziano a rompersi (in particolare i legami idrogeno tra i gruppi -CO e -NH tra le catene).

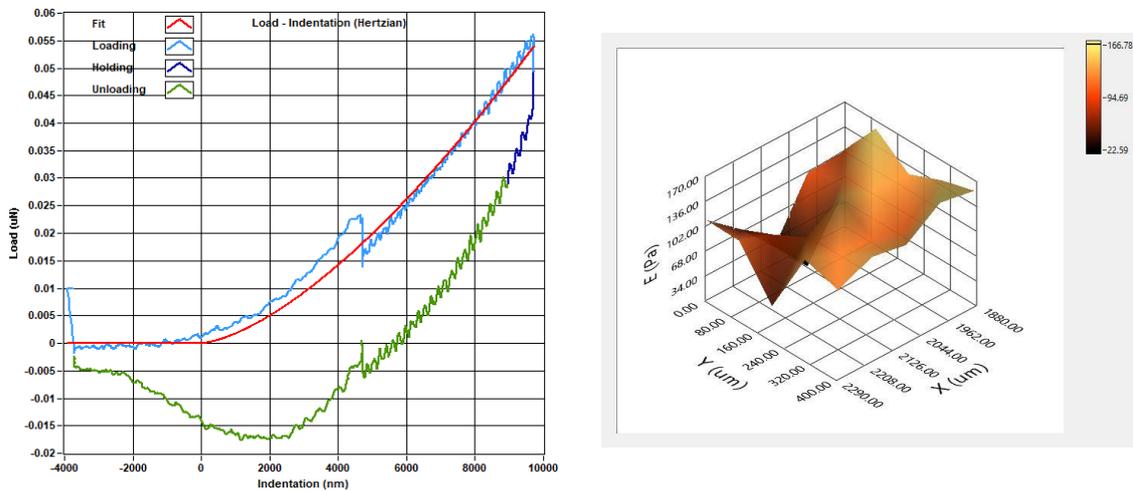
#### 4.5 NANOINDENTER

Nella figura sottostante, **Figura 4.14**, è rappresentato il campione utilizzato per questa caratterizzazione meccanica ed il suo posizionamento nel dispositivo.



**Figura 4.14: Dimensioni campione e posizionamento per il test meccanico.**

Risultati relativi all'analisi svolta su di una matrice 5x5, nella quale la distanza da un punto ad un altro è pari a 100  $\mu m$ .

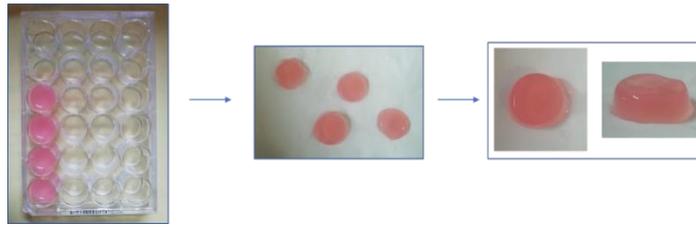


**Figura 4.15: (sx) Curve sforzo-deformaione; (dx) Mappa colorimetrica della curva.**

Il primo grafico, **Figura 4.15**, indica le curve sforzo-deformazione relative ad un punto di indentazione, dalle quali è possibile calcolare il valore del modulo di compressione; la mappa colorimetrica riportata nella stessa figura permette, invece, di avere una visione completa del modulo di compressione riferito ad ogni punto della matrice indagata.

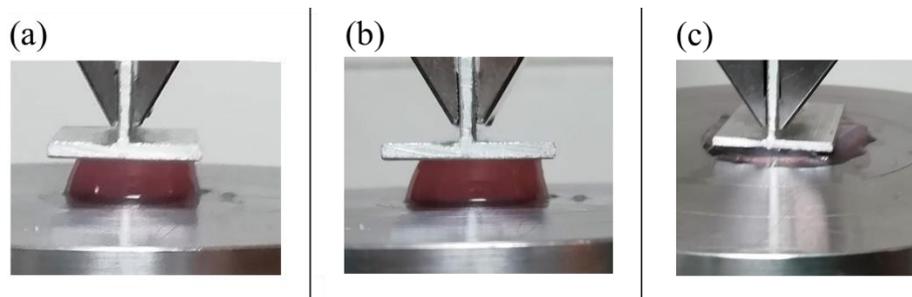
#### 4.6 MTS-EM COMPRESSIONE

Come precedentemente descritto per lo svolgimento di questa prova meccanica sono stati preparati dei provini cilindrici, **Figura 4.16**, versando la soluzione a base di collagene all'interno di quattro pozzetti di una multiwell.

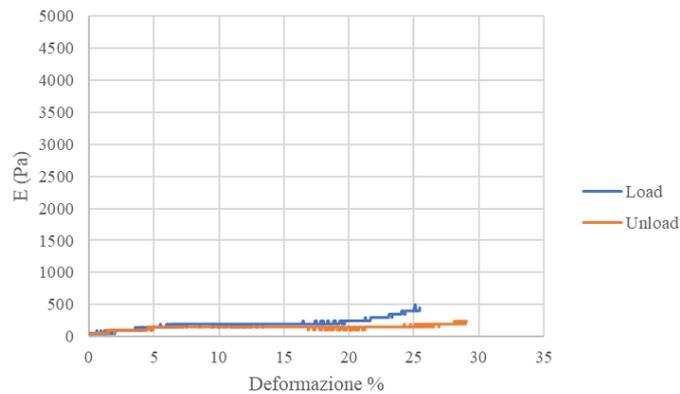


**Figura 4.16: Provini per test meccanico.**

I provini sono stati posizionati sull'alloggiamento inferiore del dispositivo, in seguito la traversa mobile è stata abbassata in modo tale che l'afferraggio risultasse a contatto con il gel (**Figura 4.17 (a)**). A questo punto è stato possibile avviare, tramite il software dedicato, il test a compressione (**Figura 4.17, (b)**), che termina con il contatto del piatto inferiore (**Figura 4.17, (c)**).



**Figura 4.17: Fasi relative al test di compressione. (a) posizionamento; (b) compressione; (c) termine prova.**



**Figura 4.18: Grafico sforzo-deformazione relativo al test di compressione.**

I dati registrati dalla cella di carico (10 N) sono stati esportati su Excel, **Figura 4.18**. Tramite i valori di *extension* e *load* si è calcolata rispettivamente la deformazione percentuale e lo sforzo (Pa).

Data la consistenza di gel del campione la risoluzione della cella di carico non permette di ottenere risultati particolarmente precisi. Il maggiore carico registrato mediamente risulta pari a 0.05 N, mentre il modulo elastico massimo durante la fase di carico è risultato 1200 Pa, durante la fase di scarico 1700 Pa.

Caratterizzazione	Modulo Elastico Max-Min (Pa)	Modulo di Perdita Max-Min (Pa)	Modulo Elastico (Pa) Load Max-Min	Modulo Elastico (Pa) Unload Max-Min	Modulo di Compressione Valore medio (Pa)
Reometro (Strain test)	474 - 1.51	68.7-0.816	-	-	-
Nanoindenter	-	-	-	-	202,066
MTS-EM	-	-	1029.194 - 8.951	1657.864 - 4.482	-

**Tabella IVa: Riassunto delle caratteristiche meccaniche individuate con Reometro, Nanoindenter e MTS-EM.**

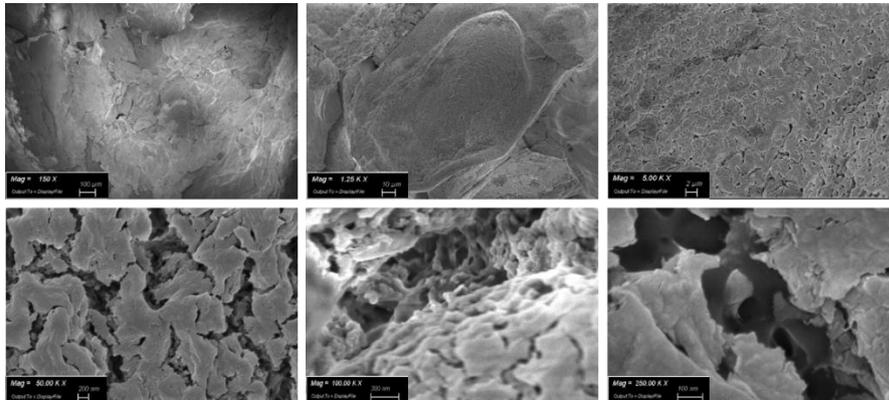
Origine campione	Zona indagata	Spessore campione	Metodo di testing	Rigidezza
Tessuto polmonare di topo [41]	Parenchima	400 µm	AFM- microindentazione	Modulo Elastico 0.5-3 kPa
Tessuto polmonare decellularizzato di ratto [42]	Setto e giunzione alveolare	7 µm	AFM- microindentazione	Modulo Elastico 16.8 ± 2.4 kPa; 15.6 ± 2.5 kPa
Tessuto polmonare porcino [43]	Parenchima	Intero polmone (in vivo)	Risonanza Magnetica Elastografia	Modulo di taglio 1.48 ± 0.09 - 2.23 ± 0.17 kPa
Tessuto polmonare porcino [44]	Parenchima	Intero polmone	Risonanza Magnetica Elastografia	Modulo di taglio 0.81 ± 0.12 - 3.2 ± 0.607 kPa
Tessuto polmonare porcino [45]	-	Intero polmone	Ultrasuoni	Modulo Elastico 3.68 ± 0.06 kPa
Tessuto polmonare porcino [46]	-	-	Cavitazione Reometria SAOS Microindentazione Tensione uniassiale	6.1 ± 1.6 kPa 3.3 ± 0.5 kPa 1.4 ± 0.4 kPa 3.4 ± 0.4 kPa
Tessuto polmonare umano [47]	Parenchima	-	AFM	1.87 ± 0.95 kPa

**Tabella IVb: Rigidezza tessuto polmonare riportata in letteratura misurata attraverso diversi metodi.**

#### 4.7 FE-SEM

Al FE-SEM sono stati analizzati due differenti campioni:

- I. gel di collagene 2% w/v;

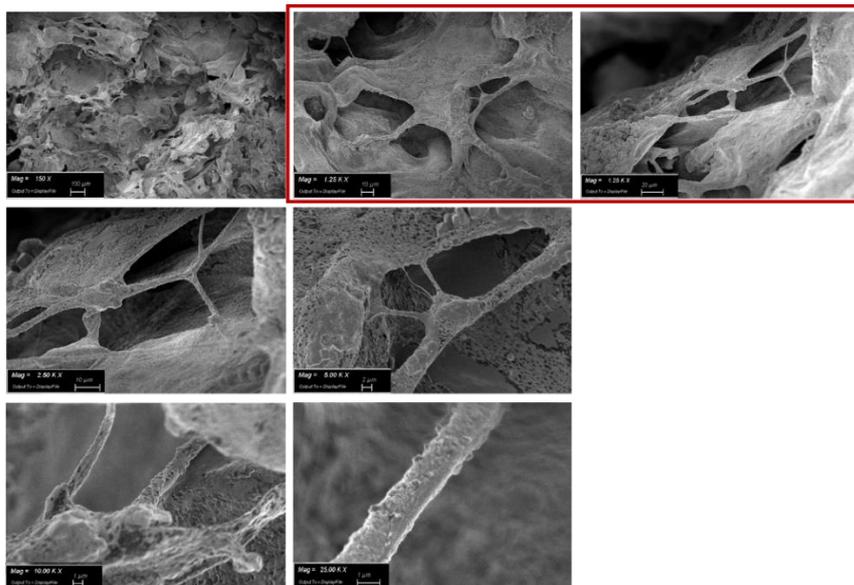


**Figura 4.20: Immagini FE-SEM a diversi ingrandimenti (150; 1,250; 5,000; 50,000; 100,000; 250,000).**

Le immagini sopra riportate, **Figura 4.20**, rappresentano il campione a diversi ingrandimenti. In tutte le immagini è comunque presente una struttura spugnosa, compatta, non è evidente la struttura fibrillare dovuta al collagene; è molto presente, invece, il sale che forma sostanzialmente un rivestimento superficiale su tutto il campione.

L'assenza della struttura fibrillare, caratteristica che ci si aspettava di individuare, probabilmente è dovuta all'eccessiva presenza di sale e all'intervallo prolungato di tempo trascorso dalla liofilizzazione del campione alla caratterizzazione.

- II. gel di collagene 2% w/v dopo test di compressione con MTS.



**Figura 4.21: Immagini FE-SEM a diversi ingrandimenti (150; 1,250; 5,000; 10,000; 25,000).**

Le immagini riportate, **Figura 4.21** in questo caso presentano una struttura diversa rispetto al precedente, è, infatti, visibile una struttura meno compatta, fibrosa.

Per analizzare un campione al FE-SEM è necessario avere una sezione relativamente sottile in modo da facilitarne l'adesione sul supporto, in questo caso si sono riscontrate alcune difficoltà nella preparazione del campione. Per questo non si è potuto migliorare la risoluzione, in quanto, data la sovrapposizione di più piani, l'immagine non risultava più stabile; risultano, quindi, evidenti fibre di dimensione dell'ordine dei  $\mu\text{m}$ ; non è stato possibile verificare la presenza delle fibrille di collagene (ordine  $\text{nm}$ ). Anche in questo campione risulta comunque presente un'elevata quantità di sale.

## 4.8 ROKIT INVIVO

Tutte le prove di stampa per il primo metodo sono state realizzate mantenendo la siringa ad una temperatura inferiore a  $8\text{ }^{\circ}\text{C}$  ed il piattino ad una temperatura pari  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , mentre per il secondo metodo, relativo al materiale di supporto, la temperatura della siringa è stata mantenuta inferiore a  $8\text{ }^{\circ}\text{C}$  e quella del piattino è stata abbassata a  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Inoltre, dato che la difficoltà principale di questo lavoro è stata quella di riuscire a stampare l'idrogel in una struttura 3D è stata scelta una geometria semplice, un cubo (sia  $15 \times 5$ , sia  $10 \times 5\text{ mm}$ ).

### 4.8.1 Primo Metodo

Le prime prove sono state svolte senza modificare il file `gcode`, quindi senza pausa, ma con la stampa di tutti i layers in successione, uno dopo l'altro. Purtroppo, non sono presenti immagini relative a queste prove poiché il filamento risultava troppo grande e subito dopo l'estrusione non manteneva la struttura, collassava.

Successivamente sono stati modificati alcuni parametri, tra i quali:

- FD = Fill Density (%), determina quanto sia fitta o meno l'area di stampa;
- h = Layer height (mm), indica l'altezza del layer (influenza la qualità della stampa);
- v = speed (mm/s) velocità di stampa, velocità di spostamento ( $t = \text{travel}$ );
- d = filament diameter (mm), diametro del filamento, anche se effettivamente non è legato al diametro dell'ago usato;
- f = input flow (%), termine di compensazione del flusso;

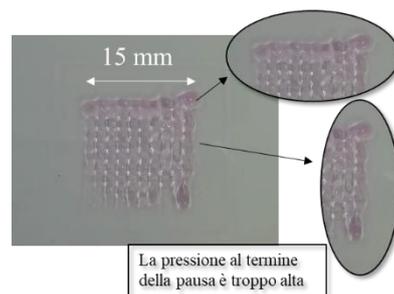
Gli ultimi due parametri sono sembrati essere quelli che maggiormente determinano il volume di materiale estruso. Dal software in dotazione tali parametri risultano essere specificati come segue:

*Filament Diameter (mm)* = maggiore è il valore relativo al parametro minore è il volume di materiale estruso;

*Input Flow (%)* = la quantità di materiale estruso è moltiplicato per questo valore.

A questo punto sono state effettuate diversi tentativi per trovare un setting di parametri soddisfacente:

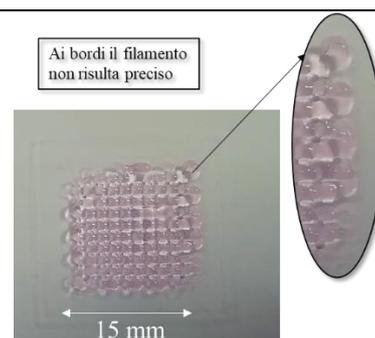
- Pausa 30'
- Cubo 15mm
- Fill Density (%) 15
- v (mm/s) 6
- d (mm) 12
- Input flow (%) 160
- h (mm) 0.1
- # layers 7



**Figura 4.22**

Prime prove con l'inserimento della pausa, come si può vedere dalle immagini a fianco, **Figura 4.22**, viene esercitata una pressione troppo alta al termine della pausa. Per questo il primo tratto stampato risulta più spesso rispetto agli altri.

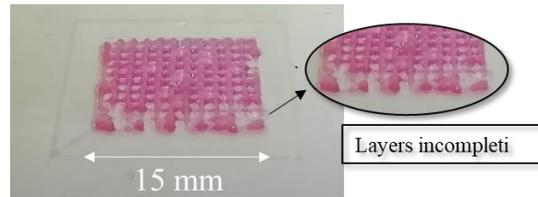
- Pausa 60'
- Cubo 15mm
- Fill Density (%) 15
- v (mm/s) 4
- d (mm) 12
- Input flow (%) 160
- h (mm) 0.1
- # layers 10



**Figura 4,23**

Questa prova, **Figura 4.23** è stata realizzata con gli stessi parametri di quella precedente, ma è stato ridotto il volume di estrusione (riscontrabile nel file gcode come parametro *E*). La differenza è evidente, anche se i bordi non mantengono la forma.

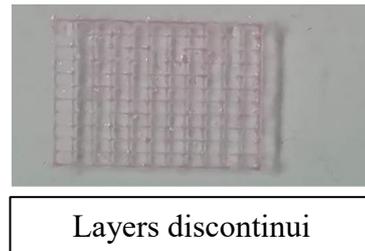
- Pausa 60'
- Cubo 15mm
- Fill Density (%) 15
- v (mm/s) 4
- d (mm) 11
- Input flow (%) 120
- h (mm) 0.1
- # layers 28



**Figura 4.24**

In questa prova, **Figura 4.24**, è stato diminuito il valore relativo all'Input Flow (%) in modo tale da avere un filamento più sottile rispetto al caso precedente ed evitare il collasso della struttura ai bordi. Questo obiettivo è stato raggiunto, ma non si sono ottenuti dei layers continui.

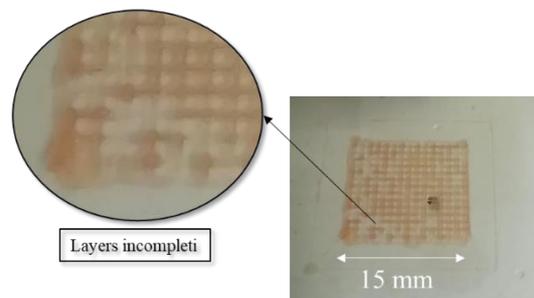
- Pausa 60'
- Cubo 15mm
- Fill Density (%) 15
- v (mm/s) 6
- d (mm) 11
- Input flow (%) 120
- h (mm) 0.1
- # layers 25



**Figura 4.25**

In questa prova, **Figura 4.25**, sono stati mantenuti gli stessi parametri della prova precedente, ma è stata aumentata la velocità del piattino sul quale viene estruso il materiale. Nonostante la modifica i layer depositati risultano comunque discontinui.

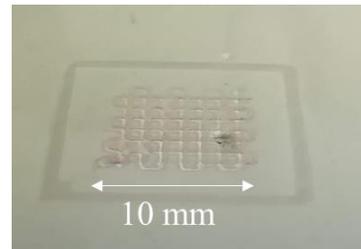
- Pausa 60'
- Cubo 15mm
- Fill Density (%) 20
- v (mm/s) 4
- d (mm) 11
- Input flow (%) 120
- h (mm) 0.06
- # layers 45



**Figura 4.26**

Successivamente si è tentato di ottenere un filamento più sottile modificando l'altezza del materiale estruso (da 0.1 mm è stato diminuito a 0.06 mm) e mantenendo indicativamente gli altri parametri come nel caso precedente. Come si può vedere dalla **Figura 4.26**, il filamento risulta più sottile, ma i layers risultano incompleti.

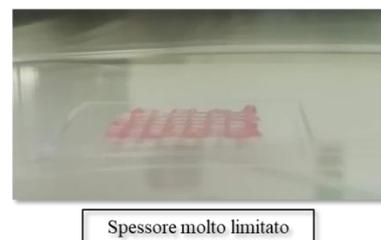
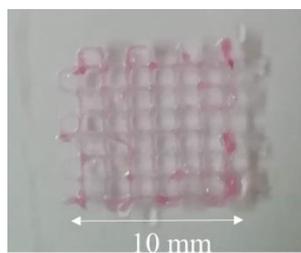
- Pausa 60'
- Cubo 10mm
- Fill Density (%) 15
- v (mm/s) 8
- d (mm) 11
- Input flow (%) 160
- h (mm) 0.08
- # layers 10



**Figura 4.27**

Per questa prova e quelle successive è stata ridotta la dimensione del modello, stampando un cubo con lato pari a 10mm. Scalando le dimensioni del modello, **Figura 4.27**, è stato aumentato il valore della velocità, dell'altezza del filamento estruso ( $h = 0.8$ ) e della percentuale di Input Flow. Volendo ottenere un filamento sottile, ma volendo anche evitare di avere layers discontinui come nel caso precedente, l'altezza è stata portata dal valore di 0.06 mm a 0.08 mm ed in combinazione è stato aumentato il valore di Input Flow, in modo tale da incrementare il volume di materiale estruso. In questa prova specifica sono stati depositati unicamente dieci layers poiché si è otturata la tip e non è stato possibile procedere con la stampa.

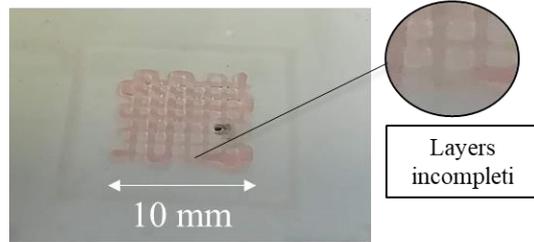
- Pausa 60'
- Cubo 10mm
- Fill Density (%) 15
- v (mm/s) 8
- d (mm) 11
- Input flow (%) 160
- h (mm) 0.08
- # layers 50



**Figura 4.28**

Dato l'inconveniente riscontrato nella precedente prova, ne è stata svolta una seconda mantenendo i parametri invariati. Il modello seppure sia costituito da numerosi layers, risulta comunque troppo sottile, altezza finale del modello inferiore a 1.5 mm, come evidente dalla **Figura 4.28**.

- Pausa 60'
- Cubo 10mm
- Fill Density (%) 15
- v (mm/s) 8
- d (mm) 12
- Input flow (%) 140
- h (mm) 0.1
- # layers 20



**Figura 4.29**

Tornando all'altezza iniziale pari a 0.1 mm, è stato modificato il valore relativo al Filament Diameter ed all'Input Flow, per cercare di compensare l'aumento di h ed avere, quindi, un filamento comunque sottile. Durante la realizzazione, **Figura 4.29**, si sono però riscontrati i precedenti problemi relativi alla mancanza di continuità in tutti i layers e all'occlusione dell'ago.

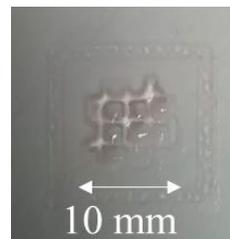
- Pausa 60'
- Cubo 10mm
- Fill Density (%) 15
- v (mm/s) 8
- d (mm) 12
- Input flow (%) 140
- h (mm) 0.1
- # layers 20



**Figura 4.30**

Ulteriore prova, **Figura 4.30** con gli stessi parametri del caso precedente ottenendo comunque le stesse problematiche, layers poco continui, spessore molto limitato.

- Pausa 30'
- Cubo 10mm
- Fill Density (%) 15
- v (mm/s) 8
- d (mm) 11
- Input flow (%) 100
- h (mm) 0.2
- # layers 15



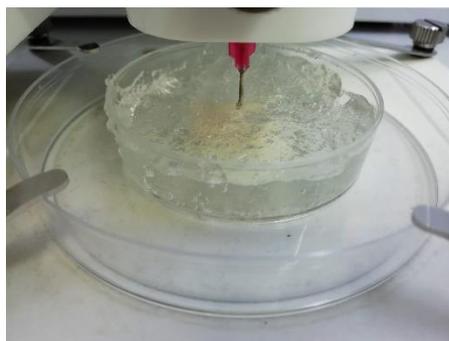
**Figura 4.31**

Per cercare di risolvere le problematiche riscontrate (altezza costruito ottenuto ridotta, filamenti poco continui, occlusione ago) sono state svolte prove utilizzando un ago con un diametro maggiore ed è stato dimezzato il tempo di pausa. Come visibile dalla **Figura 4.31** i layers sono comunque discontinui.

La variazione di velocità tra 4 mm/s e 8 mm/s non ha determinato particolari differenze nel filamento. Mediante tutte le diverse prove è stato possibile modificare i parametri di stampa in modo tale da ottenere un filamento sottile e preciso. Il maggior problema riscontrato è stato il fatto che il filamento una volta depositato sul piattino riscaldato tende a perdere il suo contenuto di acqua molto velocemente e di conseguenza non mantiene la struttura e non consente la deposizione di più strati. Un'altra difficoltà incontrata è stata la mancanza di continuità durante la stampa di un layer, talvolta dovuta all'occlusione dell'ago stesso. La parte terminale della siringa si trova, infatti, al di fuori dell'alloggiamento che viene mantenuto alla temperatura impostata mediante una cella di peltier di conseguenza la soluzione prima di essere estrusa si trova sostanzialmente alla temperatura ambiente e può iniziare la transizione sol-gel, determinando così l'occlusione dell'ago.

#### 4.8.2 Secondo Metodo

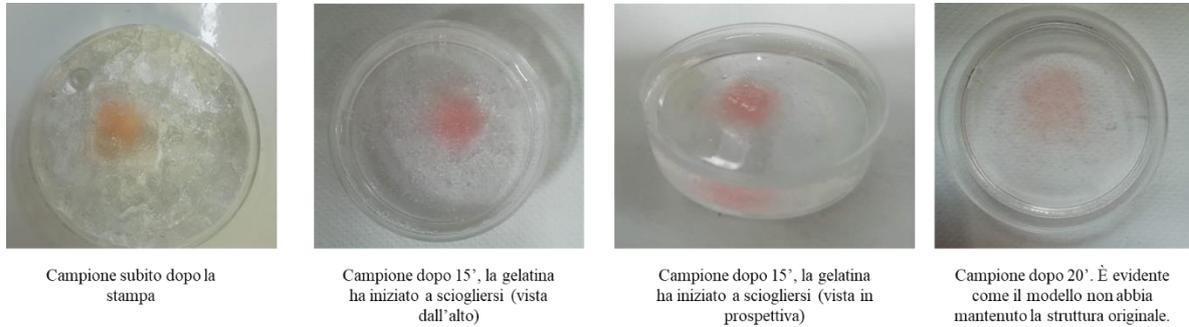
Durante la stampa, a causa della presenza del materiale di supporto, è difficile valutare indicativamente la qualità della stampa; come rappresentato nell'immagine sottostante, **Figura 4.30** si intravede un alone tendente al rosa, caratteristico della soluzione di collagene.



**Figura 4.32: Stampa all'interno del materiale di supporto.**

Conclusa la stampa la petri è stata posizionata in incubatore a 37 °C per circa 20 minuti, tempo che mediamente il collagene impiega per passare dalla fase sol alla fase gel.

Il file stampato, **Figura 4.31**, in queste prove presenta una Fill Density maggiore (FD = 30% invece di 15%) rispetto a quella utilizzata nel primo metodo. (Input Flow 120%; d 11 mm; v 4 mm/s; cubo con lato 10 mm).



**Figura 4.3: Controllo del modello stampato ed inserito in incubatore.**

Utilizzando questo metodo di stampa è necessario evitare il completo passaggio in soluzione del materiale di supporto; la struttura di collagene trascorsi venti minuti non risulta, infatti, stabile, non mantiene la propria struttura.

Rispetto al primo metodo questo sembra comunque permettere di ottenere una struttura maggiormente sviluppata in altezza, si realizza il volume definito dal modello CAD.

### 5.1 CONCLUSIONI

La nascita ed il continuo sviluppo dell'ingegneria tissutale consentono di immaginare e realizzare nuovi metodi ed approcci multidisciplinari per lo studio di patologie, la rigenerazione di tessuti e la comprensione di meccanismi cellulari.

Una strategia introdotta da questo campo dell'ingegneria è la realizzazione di modelli di tessuti fisiologici, in modo da studiarne l'interazione con cellule sia sane sia patologiche, con farmaci e con qualsiasi elemento che permetta di approfondirne la conoscenza per tentare di individuare nuovi target terapeutici.

Nel lavoro di tesi presentato è stato approfondito questo aspetto cercando di realizzare uno scaffold 3D a base di idrogel di collagene per ricreare la matrice extracellulare del tessuto degli alveoli polmonari.

Per mimare un contesto fisiologico complicato come la matrice extracellulare è necessario realizzare un ambiente biomimetico sia dal punto di vista biochimico sia dal punto di vista biomeccanico. Per ciò per realizzare il primo step è stato utilizzato il collagene, proteina strutturale e fibrosa già presente all'interno dell'ECM stessa ed è stato mantenuto un ambiente a pH neutro.

Dalla letteratura è stato verificato come la fibrillogenasi del collagene in vitro, la transizione cioè da sol a gel sia possibile mediante la combinazione di pH neutro ( $\text{pH} = 7.4$ ) e temperatura fisiologica ( $T = 37\text{ }^\circ\text{C}$ ). L'effettivo passaggio da sol a gel è stato analizzato in modo qualitativo attraverso il tube inverting test e le immagini al FE-SEM ed in modo quantitativo attraverso l'analisi reologica. Per confermare che fosse la combinazione di temperatura e di pH a determinare la transizione è stato caratterizzato quantitativamente (analisi reologiche) un campione di idrogel non neutralizzato (con pH acido,  $\text{pH} < 4$ ).

A questo punto è stato analizzato il comportamento del gel su lungo periodo, in particolare valore di pH, swelling, stabilità e degradazione. Dalle analisi svolte è emerso che il pH rimane stabile fino ad una settimana (periodo per il quale sono state condotte le indagini), inoltre il gel se posto a contatto con una soluzione inizialmente rigonfia, ma in meno di 24h inizia a degradare.

Il secondo step relativo alla biomimetività a livello biomeccanico è, invece, rappresentato dalla conformazione 3D del modello e dalle caratteristiche meccaniche comparabili con il tessuto polmonare, ottenute modulando la concentrazione di collagene.

Realizzato e caratterizzato l'idrogel a base di collagene si è proceduto alla stampa. Date le diverse applicazioni del software a disposizione (FDM per materiali sintetici e Bio Dispenser per idrogel) un aspetto importante di questo lavoro è stato quello di capire quale influenza avessero i numerosi parametri, relativi alla compilazione del file gcode sul filamento estruso.

Alla fine, attraverso il metodo di stampa senza il materiale di supporto è stato ottenuto un filamento sottile e preciso, ma non è stata mantenuta la continuità dei layers né è stata raggiunta l'altezza che ci si aspettava dalla sovrapposizione dei diversi layers. Sarebbe interessante valutare la stampa utilizzando un filamento non troppo sottile (h 0.1 mm; Filament Diameter 11-12 mm; Input Flow 120-140 %, questi parametri sono quasi equivalenti) riducendo la pausa, come svolto durante le ultime prove e, mantenendo la temperatura dell'ambiente inferiore ai 25 °C, in modo tale da evitare l'occlusione dell'ago.

Il metodo di stampa con il materiale di supporto sembra, invece, permettere di ottenere una struttura 3D più complessa, anche se è necessario migliorare la preparazione e la rimozione del materiale di supporto, in modo da mantenere la struttura stampata.

## **5.2 SVILUPPI FUTURI**

In seguito ai risultati ottenuti nel corso di questo lavoro si possono prevedere alcuni sviluppi, quali, per esempio, l'ottimizzazione del metodo e del processo di stampa e la realizzazione di una struttura più complessa, che possa modellizzare la geometria di un alveolo polmonare.

A questo punto risulterebbe necessario valutare l'interazione del modello con le cellule sia depositate dopo il processo di stampa all'interno del materiale sia durante la stampa, inserendole, quindi, nell'idrogel di partenza.

## BIBLIOGRAFIA

---

- [1] R. Langer and J. P. Vacanti, "Tissue Engineering," *Science (80-. )*, vol. 260, no. 5110, pp. 920–926, 1993.
- [2] A. D. Theocharis, S. S. Skandalis, C. Gialeli, and N. K. Karamanos, "Extracellular matrix structure," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 97, pp. 4–27, 2016.
- [3] P. . Malafaya *et al.*, "Natural origin biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine: present status and some moving trends," *J. R. Soc. Interface*, vol. 4, no. 17, pp. 999–1030, 2007.
- [4] V. B. et Al., *Tissue Engineering*. 2008.
- [5] K. A. Ramalingam M., Jabbari E., Ramakrishna S., *Micro and Nanotechnologies in Engineering Stem Cells and Tissues*. IEEE Press, 2013.
- [6] M. K. Włodarczyk-Biegun and A. del Campo, "Biomaterials 3D bioprinting of structural proteins," *Biomaterials*, vol. 134, pp. 180–201, 2017.
- [7] C. Cha, F. Piraino, and A. Khademhosseini, *Microfabrication Technology in Tissue Engineering*, Second Edi. Elsevier Inc., 2014.
- [8] J. P. P. Santerre *et al.*, "Chemical degradation of composite restoratives.," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 28, no. 2, pp. 254–261, 2001.
- [9] D. Howard, L. D. Buttery, K. M. Shakesheff, and S. J. Roberts, "Tissue engineering: Strategies, stem cells and scaffolds," *J. Anat.*, vol. 213, no. 1, pp. 66–72, 2008.
- [10] Y. Li, "IJN-38635-a-review--techniques-of-fabrication-and-construction-three-d," pp. 1–14, 2013.
- [11] J. Malda *et al.*, "25th anniversary article: Engineering hydrogels for biofabrication," *Adv. Mater.*, vol. 25, no. 36, pp. 5011–5028, 2013.
- [12] E. M. Ahmed, "Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review.," *J. Adv. Res.*, vol. 6, no. 2, pp. 105–21, 2015.
- [13] S. H. Takahashi, L. M. Lira, and S. I. Córdoba de Torresi, "Zero-Order Release Profiles from A Multistimuli Responsive Electro-Conductive Hydrogel," *J. Biomater. Nanobiotechnol.*, vol. 03, no. 02, pp. 262–268, 2012.
- [14] A. Gutowska, Y. H. Bae, J. Feijen, and S. W. Kim, "Heparin release from thermosensitive

- hydrogels,” *J. Control. Release*, vol. 22, no. 2, pp. 95–104, 1992.
- [15] L. Ferreira, M. M. Vidal, and M. H. Gil, “Evaluation of poly(2-hydroxyethyl methacrylate) gels as drug delivery systems at different pH values,” *Int. J. Pharm.*, vol. 194, no. 2, pp. 169–180, 2000.
- [16] E. M. Agency, “El-Sherbiny IM, Yacoub MH. Hydrogel scaffolds for tissue engineering: Progress and challenges, *Global Cardiology Science and Practice* 2013:38 <http://dx.doi.org/10.5339/gcsp.2013.38>,” vol. 44, no. April, 2015.
- [17] S. V. Murphy and A. Atala, “3D bioprinting of tissues and organs,” *Nat. Biotechnol.*, vol. 32, no. 8, pp. 773–785, 2014.
- [18] R. P. Boot-Handford and D. S. Tuckwell, “Fibrillar collagen: The key to vertebrate evolution? A tale of molecular incest,” *BioEssays*, vol. 25, no. 2, pp. 142–151, 2003.
- [19] K. E. Kadler, “Fell Muir Lecture: Collagen fibril formation in vitro and in vivo,” *Int. J. Exp. Pathol.*, vol. 98, no. 1, pp. 4–16, 2017.
- [20] J. L. ruce Alberts, Alexander Johnson, *Biologia molecolare della cellula*, V. 2009.
- [21] K. E. Kadler, D. F. Holmes, J. A. Trotter, and J. A. Chapman, “Review Article: Collagen fibril formation Karl,” *Biochem. J.*, vol. 11, pp. 1–11, 1996.
- [22] J. Zhu and L. J. Kaufman, “Collagen i self-assembly: Revealing the developing structures that generate turbidity,” *Biophys. J.*, vol. 106, no. 8, pp. 1822–1831, 2014.
- [23] J. Gross and D. Kirk, “The Heat Precipitation Some of Collagen from Neutral Factors ” Solutions :,” *J. Biol. Chem.*, vol. 233, pp. 355–360, 1958.
- [24] G. C. Wood and M. K. Keech, “The formation of fibrils from collagen solutions 1. The effect of experimental conditions: kinetic and electron-microscope studies,” *Biochem. J.*, vol. 75, no. 3, pp. 588–598, 1960.
- [25] H. B. Bensusan and A. Scanu, “Fiber Formation from Solutions of Collagen. II. The Role of Tyrosyl Residues,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 82, no. 18, pp. 4990–4995, 1960.
- [26] A. Veis, “Collagen fibrillogenesis,” *Connect. Tissue Res.*, vol. 10, no. 1, pp. 11–24, 1982.
- [27] D. M. E. Nimni, *Collagen: Volume I: Biochemistry*. CRC Press.
- [28] D. M. E. Nimni, *Collagen Volume I: Biochemistry*. .
- [29] E. E. Antoine, P. P. Vlachos, and M. N. Rylander, “Review of Collagen I Hydrogels for Bioengineered Tissue Microenvironments: Characterization of Mechanics, Structure, and Transport,” *Tissue Eng. Part B Rev.*, vol. 20, no. 6, pp. 683–696, 2014.

- [30] M. Köpf, D. F. D. Campos, A. Blaeser, K. S. Sen, and H. Fischer, “A tailored three-dimensionally printable agarose-collagen blend allows encapsulation, spreading, and attachment of human umbilical artery smooth muscle cells,” *Biofabrication*, vol. 8, no. 2, pp. 1–15, 2016.
- [31] D. F. Duarte Campos *et al.*, “The Stiffness and Structure of Three-Dimensional Printed Hydrogels Direct the Differentiation of Mesenchymal Stromal Cells Toward Adipogenic and Osteogenic Lineages,” *Tissue Eng. Part A*, vol. 21, no. 3–4, pp. 740–756, 2015.
- [32] Y. B. Kim, H. Lee, and G. H. Kim, “Strategy to Achieve Highly Porous/Biocompatible Macroscale Cell Blocks, Using a Collagen/Genipin-bioink and an Optimal 3D Printing Process,” *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 8, no. 47, pp. 32230–32240, 2016.
- [33] H. Yoon, J. S. Lee, H. Yim, G. Kim, and W. Chun, “Development of cell-laden 3D scaffolds for efficient engineered skin substitutes by collagen gelation,” *RSC Adv.*, vol. 6, no. 26, pp. 21439–21447, 2016.
- [34] S. Rhee, J. L. Puetzer, B. N. Mason, C. A. Reinhart-King, and L. J. Bonassar, “3D Bioprinting of Spatially Heterogeneous Collagen Constructs for Cartilage Tissue Engineering,” *ACS Biomater. Sci. Eng.*, vol. 2, no. 10, pp. 1800–1805, 2016.
- [35] A. Mazzocchi, M. Devarasetty, R. Huntwork, S. Soker, and A. Skardal, “Optimization of collagen type I-hyaluronan hybrid bioink for 3D bioprinted liver microenvironments,” *Biofabrication*, vol. 11, no. 1, p. 15003, 2019.
- [36] M. M. Stanton, J. Samitier, and S. Sánchez, “Bioprinting of 3D hydrogels,” *Lab Chip*, vol. 15, no. 15, pp. 3111–3115, 2015.
- [37] G. Lai, Y. Li, and G. Li, “Effect of concentration and temperature on the rheological behavior of collagen solution,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 42, no. 3, pp. 285–291, 2008.
- [38] M. Hoque, T. Nuge, T. Yeow, N. Nordin, and R. Prasad, “Gelatin Based Scaffolds for Tissue Engineering-a Review,” *Polym. Res. J.*, vol. 9, no. 1, p. 15, 2015.
- [39] P. V. Kozlov and G. I. Burdygina, “The structure and properties of solid gelatin and the principles of their modification,” *Polymer (Guildf.)*, vol. 24, no. 6, pp. 651–666, 1983.
- [40] T. J. Hinton *et al.*, “Three-dimensional printing of complex biological structures by freeform reversible embedding of suspended hydr(1) Hinton, T. J.; Jallerat, Q.; Palchesko, R. N.; Park, J. H.; Grodzicki, M. S.; Shue, H.-J.; Ramadan, M. H.; Hudson, A. R.; Feinberg, A. W. Thr,” *Sci. Adv.*, vol. 1, no. 9, pp. e1500758–e1500758, 2015.
- [41] M. Ecol, “HHS Public Access,” vol. 25, no. 5, pp. 1032–1057, 2017.

- [42] J. A. Zimmerlin, N. Sanabria-Delong, G. N. Tew, and A. J. Crosby, “Cavitation rheology for soft materials,” *Soft Matter*, vol. 3, no. 6, pp. 763–767, 2007.
- [43] Y. K. Mariappan *et al.*, “Magnetic resonance elastography of the lung parenchyma in an in situ porcine model with a noninvasive mechanical driver: Correlation of shear stiffness with trans-respiratory system pressures,” *Magnetic Resonance in Medicine*, vol. 67, no. 1, pp. 210–217, 2012.
- [44] C. A. Hutchens SB, “Soft-solid deformation mechanics at the tip of an embedded needle. *Soft Matter*,” p. 10(20):3679, 2014.
- [45] J. Cui, C. H. Lee, A. Delbos, J. J. McManus, and A. J. Crosby, “Cavitation rheology of the eye lens,” *Soft Matter*, vol. 7, no. 17, pp. 7827–7831, 2011.
- [46] S. R. Polio, D. E. Aurian-blajeni, N. P. Birch, J. D. Schiffman, J. Alfred, and S. R. Peyton, “Cross-Platform Mechanical Characterization of Lung Tissue (In press),” pp. 1–17, 2013.
- [47] D. Sicard, A. J. Haak, K. M. Choi, A. R. Craig, L. E. Fredenburgh, and D. J. Tschumperlin, “Aging and anatomical variations in lung tissue stiffness,” *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 314, no. 6, pp. L946–L955, 2018.
- [48] T. R. Cox and J. T. Epler, “Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix: Implications for fibrotic diseases and cancer,” *DMM Dis. Model. Mech.*, vol. 4, no. 2, pp. 165–178, 2011.
- [49] D. T. Butcher, T. Alliston, and V. M. Weaver, “A tense situation: Forcing tumour progression,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 9, no. 2, pp. 108–122, 2009.