

POLITECNICO DI TORINO

Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica

Tesi di Laurea Magistrale

Membrane nanofibrose a base di policaprolattone/gelatina ottenute tramite l'elettrospinning per ricreare *in vitro* la membrana basale della barriera alveolo capillare



Relatore

Prof. Gianluca Ciardelli

Correlatore

Prof.ssa Chiara Tonda-Turo

Candidato

Viviana Nacci

Lab Tutor

Dr. Michela Licciardello

Anno Accademico 2019/2020

*A mio padre,
mancanza costante in ogni
momento della mia vita.
A te che in questo mondo
mi hai vista nascere
e da lì in alto oggi
mi guardi crescere.*

INDICE

ABSTRACT	1
I. INTRODUZIONE	2
1.1. BARRIERA ALVEOLO-CAPILLARE	2
1.2. TISSUE ENGINEERING	6
1.2.1. Strategie per la realizzazione di modelli <i>in vitro</i>	8
1.2.2. Matrice Extracellulare.....	11
1.2.3. Scaffold	13
1.2.3.1. Proprietà dello scaffold	13
1.2.3.2. Materiali per lo scaffold.....	14
1.2.3.3. Materiali polimerici.....	15
1.2.3.4. Polimeri naturali	16
1.2.3.5. Polimeri sintetici.....	17
1.2.4. Elettrospinning.....	18
1.2.4.1. Struttura nanofibrosa	18
1.2.4.2. Strumentazione e processo di elettrofilatura.....	19
1.2.4.3. Parametri che influenzano il processo dell'elettrospinning	21
1.2.4.4. Difetti di filatura.....	24
1.2.5. Membrane elettrofilate in PCL/gelatina	25
1.2.6. Modelli <i>in vitro</i> della barriera alveolo-capillare.....	26
1.3. OBIETTIVO DEL LAVORO	38
II. MATERIALI E METODI	39
2.1. MATERIALI	39
2.1.1. Gelatina.....	39
2.1.2. Policaprolattone (PCL)	41
2.1.3. γ -glicidossipropiltrimetossisilano (GPTMS)	42
2.2. METODI	43
2.2.1. Preparazione delle soluzioni polimeriche.....	44

2.2.1.1.	<i>PCL/GEL</i>	44
2.2.1.2.	<i>Gelatina</i>	44
2.2.1.3.	<i>PCL</i>	45
2.2.2.	Realizzazione delle membrane	46
2.2.2.1.	<i>Strumentazione del processo di elettrospinning</i>	46
2.2.2.2.	<i>Parametri di processo</i>	47
2.2.3.	Caratterizzazione morfologica delle membrane	47
2.2.3.1.	<i>Microscopio a scansione elettronica (SEM)</i>	47
2.2.3.2.	<i>Analisi delle immagini</i>	50
2.2.4.	Prove meccaniche.....	50
2.2.4.1.	<i>Prove di trazione statiche</i>	50
2.2.4.2.	<i>Prove di trazione dinamiche (cicliche)</i>	51
2.2.5.	Angolo di contatto	52
2.2.6.	Prove di degradazione	54
2.2.7.	Bioreattore IVTech.....	55
III.	<i>RISULTATI E DISCUSSIONE</i>	58
3.1.	Membrane elettrofilate	58
3.2.	Caratterizzazione morfologica	58
3.3.	Prove meccaniche	60
3.3.1.	Test statico con MTS.....	60
3.3.2.	Test dinamico (ciclico) con BOSE	62
3.4.	Angolo di contatto	63
3.5.	Prove di degradazione	65
3.6.	Bioreattore IVTech	67
IV.	<i>CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI</i>	68
	<i>BIBLIOGRAFIA</i>	75

ABSTRACT

The alveolar-capillary barrier is the place where gas exchanges take place in the lungs and consists of a layer of alveolar epithelium and capillary endothelium, separated by an interstitial space and a basement membrane. The basement membrane provides mechanical support to the barrier during respiratory movements, through the combined action of collagen fibres, proteoglycans and other extracellular matrix proteins (ECM). Tissue Engineering (TE) is a multidisciplinary field including disciplines with the aim to repair, regenerate or replace damaged organs or tissues by the development of biological substitutes (scaffold). However, the goal also concerns the creation of *in vitro* organ models in order to recreate a specific cellular microenvironment and to avoid experimentation on humans and/or animals. The scaffold, a three-dimensional porous template, acts as a temporary extracellular matrix allowing cell adhesion, proliferation and growth. In recent years, the interest in using biodegradable and bioresorbable composite biomaterials has grown, thanks to mechanical properties of synthetic polymers and biological properties of natural polymers. Based on principles of tissue engineering to develop *in vitro* organ models, the aim of this work is to manufacture polycaprolactone/gelatin nanofibrous matrices (scaffolds) to recreate *in vitro* the basement membrane of the alveolar-capillary barrier. Three polymeric solutions of PCL /GEL, gelatin (GEL) and polycaprolactone (PCL) were processed using the electrospinning technique. Electrospun membranes were morphologically characterized by SEM (electron scanning microscope), highlighting the random structure of the nanofibers. The membranes obtained from the polymeric solution of PCL/GEL show more uniform and defect-free fibres. In addition, static and dynamic (cyclic) tensile tests were conducted, finding good mechanical properties for both PCL-based and PCL/GEL fibres (good deformability and flexibility) and poor mechanical properties for GEL samples. The wettability of the surfaces of the membranes was assessed through an analysis of the contact angle, obtaining values about of 25 ° for PCL/GEL, 45 ° for GEL and 138 ° for PCL. The stability of the membranes was assessed under static and dynamic conditions (inside a commercial bioreactor to simulate the physiological conditions of the alveolus-capillary barrier), showing a good resistance of PCL/GEL and PCL membranes.

I. INTRODUZIONE

1.1. BARRIERA ALVEOLO-CAPILLARE

Il sistema respiratorio (insieme di organi e tessuti che permette la respirazione) è protetto da una serie di barriere funzionali e strutturali contro il materiale particolato sia dannoso che innocuo. Tuttavia, nonostante la presenza di queste barriere, sono molto frequenti le malattie respiratorie [1]. Ciò è dovuto al fatto che i polmoni costituiscono la più grande superficie del corpo (circa 100-150 m² in un adulto) direttamente esposta all'ambiente esterno, quindi rappresentano una zona molto suscettibile a lesioni dovute ad esposizioni croniche o acute (ad esempio particelle ambientali, virus, batteri, nanoparticelle, ecc.). La grande superficie interna del tratto respiratorio è essenziale per uno scambio ottimale di gas tra aria e sangue; l'ossigeno viene ceduto ai globuli rossi che circolano attraverso i capillari dei polmoni (aria -> sangue), mentre l'anidride carbonica accumulata nel sangue viene espulsa dal corpo (sangue -> aria).

I polmoni assumono le sembianze di una struttura ad albero biforcante costituita da circa 20 generazioni di vie aeree, in cui le scale di lunghezza presentano ordini di grandezza via via decrescenti dalla trachea (~1 cm) fino agli alveoli (~100 µm). La regione conduttiva ("spazio morto"; naso/bocca, faringe, laringe, trachea, bronchi e bronchioli terminali) non partecipa agli scambi di gas, i quali avvengono invece a livello degli acini polmonari. Quest'ultimi rappresentano più del 90% del volume polmonare totale con una stima di oltre 30.000 acini in un polmone umano adulto. Ogni acino presenta 200 mm³ con 10.000 alveoli disposti a partire dalla 15^a generazione. All'interno del corpo vi è quasi mezzo miliardo di alveoli con volume medio di 4 x 10⁻⁶ µm e scala di lunghezza caratteristica di circa 100-200 µm. Grazie al diametro relativamente piccolo degli alveoli, la superficie della regione polmonare risulta massimizzata con conseguente ottimizzazione dello scambio dei gas tra le sacche d'aria alveolari ed il sangue che circola attraverso la rete di capillari presenti nei setti inter-alveolari.

I condotti acinari sono circondati da cavità alveolari, le quali formano un manicotto ben stretto in cui gli alveoli adiacenti sono separati da membrane divisorie (setti inter-alveolari) con una struttura a nido d'ape [2]. All'interno del setto inter-alveolare, sono presenti due strati cellulari continui che costituiscono la barriera tissutale all'interfaccia aria-sangue (**barriera alveolo-capillare**, spessore ~ 0.2-2 µm): uno strato epiteliale verso il lume alveolare ed uno strato endoteliale verso il lume capillare; essi sono separati da una membrana basale e da uno spazio interstiziale di diverso spessore e composizione. Pertanto, la barriera alveolo-capillare rappresenta la base strutturale in cui

avvengono gli scambi di gas nei polmoni, poiché separa lo spazio aereo alveolare (compartimento in cui è presente l'aria) dal lume capillare (compartimento in cui scorre il sangue).

L'**epitelio alveolare** equivale ad un mosaico di cellule epiteliali alveolari di tipo I (ATI) e di tipo II (ATII) in rapporto 1:2. Le ATI (o pneumociti di tipo I) sono cellule squamose (appiattite) che costituiscono meno dell'8% [3] della popolazione cellulare polmonare e ricoprono circa il 95% della superficie alveolare totale, formando uno spessore di $\sim 0.1 \mu\text{m}$ [1]. Svolgono quindi una funzione di rivestimento strutturale con distanze di diffusione molto brevi per lo scambio di gas tra l'aria alveolare ed il sangue capillare. Le ATII (o pneumociti di tipo II) sono, invece, cellule cuboidali che formano circa il 5% dell'epitelio alveolare e rappresentano il 16% delle cellule parenchimali del polmone [3]. Oltre alla funzione secretoria (sintetizzano il tensioattivo alveolare), agiscono da progenitori delle ATI durante la crescita e la riparazione polmonare. L'epitelio alveolare non è direttamente posto a contatto con l'aria, ma è rivestito da un film superficiale di tensioattivo. Quest'ultimo è costituito dal 90% di lipidi (principalmente fosfolipidi saturi) e dal 10% di proteine; queste componenti vengono sintetizzate, immagazzinate, secrete e riciclate dalle cellule ATII [4]. Il tensioattivo ha il ruolo di stabilizzare la struttura alveolare per prevenire il collasso degli alveoli durante l'espiazione, in quanto riduce la tensione superficiale dello strato liquido presente attorno alle cellule epiteliali (quindi all'interfaccia spazio aereo-liquido alveolare), oppure per evitare un'eccessiva espansione dovuta all'inspirazione [1].

Inoltre, il tensioattivo è coinvolto nella risposta immunitaria innata grazie alla capacità di alcune sue proteine di legare agenti patogeni (es. virus, funghi, batteri, ecc.) [5]. Lo strato liquido di tensioattivo raggiunge spessori di $0.1\text{-}0.2 \mu\text{m}$ e valori di tensione superficiale inferiori ai 10 dyn/cm (quasi nulli dopo la compressione del film durante l'espiazione) [2].

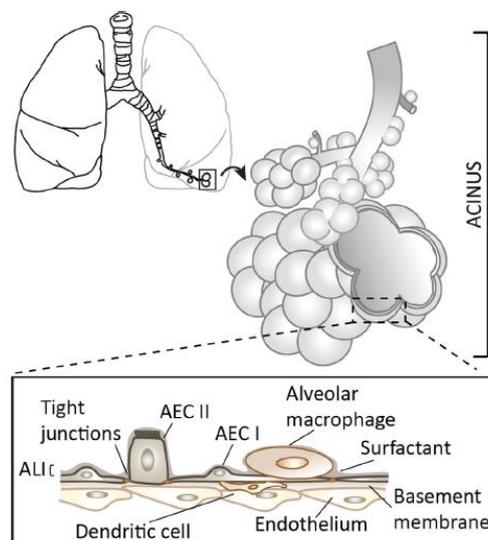


Fig. 1: Schema della struttura degli acini polmonari e della barriera alveolo-capillare [2].

La **membrana basale** è costituita dalle membrane basali dell'epitelio alveolare e dell'endotelio capillare, spesso fuse tra loro per permettere lo scambio dei gas. La membrana basale ha lo scopo di fornire supporto meccanico alla barriera alveolo-capillare [6] ed è costituita da proteoglicani, collagene ed altre proteine della matrice extracellulare. I proteoglicani contribuiscono alla stabilità meccanica del tessuto polmonare, poiché fungono da connessione tra le fibre di collagene e quelle di elastina (del tessuto connettivo). Il collagene ha il compito di mantenere l'integrità biologica e strutturale della matrice extracellulare; viene considerato la proteina principale della membrana, in quanto resiste ai carichi meccanici indotti dalla respirazione e collega la membrana basale dell'epitelio alveolare con quella dell'endotelio capillare nei punti in cui esse non appaiono fuse [7].

Lo **spazio interstiziale** separa la lamina basale dell'epitelio alveolare da quella dell'endotelio capillare, comprendendo uno strato di tessuto connettivo in cui sono presenti i fibroblasti. Quest'ultimi sono delle cellule che svolgono un ruolo essenziale in tutte le fasi dello sviluppo polmonare e che permettono di mantenere l'integrità strutturale del tessuto. In condizioni fisiologiche, i fibroblasti producono una piccola quantità di ECM. Tuttavia durante la crescita o in seguito ad una lesione del tessuto, i fibroblasti si differenziano in miofibroblasti (con proprietà contrattili e secretorie), migrando verso il sito del danno e sintetizzando le componenti della ECM al fine di contribuire al rimodellamento e alla rigenerazione del tessuto [3]. I miofibroblasti hanno anche il compito di sintetizzare l'elastina, una proteina fibrosa presente all'interno della matrice extracellulare. L'elastina conferisce al parenchima polmonare (regione di scambio gassoso) le proprietà elastiche, permettendo così il ritorno alla forma originale in seguito alla deformazione (anche del 200% [4]) dovuta ai movimenti respiratori [8].

L'**endotelio capillare** è formato da cellule endoteliali microvascolari (squamose e molto sottili), le quali formano un monostrato continuo e privo di pori o fenestrature [9]. L'endotelio non è solo una barriera passiva, ma rappresenta anche una barriera semipermeabile con il compito di regolare attivamente la permeabilità dei vasi sanguigni, l'angiogenesi, il passaggio di alcune componenti del sangue nei tessuti adiacenti ed il tono vascolare [3].

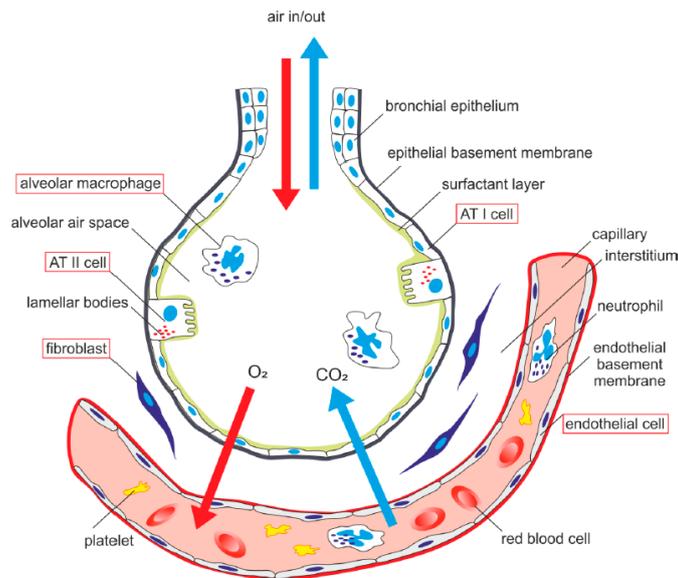


Fig. 2: Rappresentazione schematica della barriera alveolo-capillare con relative cellule [3].

Oltre ai tipi cellulari precedentemente menzionati, la barriera alveolo-capillare ne contiene tanti altri tipi diversi tra cui:

- **Macrofagi:** cellule del sistema immunitario specialmente presenti nello spazio aereo alveolare e quiescenti in condizioni normali (debole fagocitosi) [9]; svolgono il compito di mantenere l'omeostasi dei tessuti secretando mediatori anti-infiammatori e di fagocitare agenti patogeni per prevenire dei danni alla barriera [6];
- **cellule dendritiche:** cellule del sistema immunitario che fungono da sentinelle entrando a contatto con le particelle inalate e presentando gli antigeni ad altre cellule immunitarie [2].

È importante sottolineare che la barriera alveolo-capillare regola il trasporto di soluti e proteine tra l'area alveolare e sangue capillare, costituendo una barriera molto stretta grazie alle *giunzioni intercellulari strette* (TJ: occludine, claudine) e alle *giunzioni aderenti* (AJ: proteine trans-membrana E-caderina, Ve-caderina) presenti al contatto tra le cellule [2][10]. Il trasporto paracellulare risulta quindi limitato, mentre il trasporto di soluti avviene per lo più tramite vie trans cellulari, mediante diffusione passiva o trasporto attivo grazie a varie proteine trasportatrici [11]. Ciò rappresenta un aspetto essenziale per l'equilibrio dei fluidi nella regione alveolare, in quanto l'epitelio alveolare e l'endotelio capillare separano e regolano attivamente i compartimenti dei fluidi extracellulari (es. fluido interstiziale, plasma sanguigno, liquido di rivestimento alveolare) [4].

1.2. TISSUE ENGINEERING

L'ingegneria tissutale (Tissue Engineering, TE) è una branca ancora emergente dell'ingegneria biomedica e rappresenta un settore multidisciplinare in cui vengono fuse le conoscenze di scienza dei materiali, biologia molecolare/cellulare, ingegneria e chirurgia. È quindi una disciplina in rapida evoluzione che permette di riparare, rigenerare o sostituire specifici organi o tessuti [12].

Nel 1993, è stata definita da Langer e Vacanti come “un campo interdisciplinare che applica i principi dell'ingegneria e delle scienze della vita per lo sviluppo di sostituti biologici che ripristinano, mantengono o migliorano la funzione dei tessuti” [13].

Nonostante il corpo abbia delle proprietà intrinseche autorigeneranti, la gravità di lesioni o patologie possono compromettere l'innata capacità rigenerativa dei tessuti [14]. In seguito a disfunzioni oppure perdite di tessuti o organi, gli approcci medici tradizionali prevedono il trattamento tramite autotrapianto, allotrapianto, xenotrapianto, protesi e trapianto di organi. Tuttavia, queste tecniche presentano delle limitazioni riguardo la scarsa disponibilità di tessuti/organi, il rigetto dell'impianto dovuto alla risposta immunitaria e la possibile trasmissione di malattie. Dunque, l'ingegneria tissutale è nata dalla necessità di fornire al paziente un'alternativa terapeutica alle precedenti tecniche citate [15].

In generale, nel tissue engineering vi sono tre strategie fondamentali: l'utilizzo (1) di cellule isolate o sostituti cellulari come parti di ricambio cellulare, (2) di scaffold acellularizzati capaci di indurre la rigenerazione dei tessuti e (3) di cellule e scaffold in combinazione tra loro [16]. Quest'ultima strategia prevede la coltura di cellule viventi (autologhe, allogene o xenogene) su substrati naturali, sintetici o bioartificiali al fine di realizzare un sostituto biologico o un costrutto 3D vivente, che sia uguale ad un determinato tessuto/organo dal punto di vista strutturale, meccanico e funzionale. L'ingegneria tissutale è, dunque, la scienza che permette di riparare, sostituire e migliorare le proprietà funzionali di un tessuto biologico tramite la combinazione di tre elementi principali:

- **Scaffold (matrice)**, template poroso tridimensionale che funge da matrice extracellulare (ECM) temporanea permettendo l'adesione, la proliferazione e la crescita cellulare [17];
- **Cellule**, di tipologia diversa in base al tessuto da realizzare;
- **Fattori di regolazione**, coltura statica o dinamica (bioreattori), stimoli meccanici e/o biochimici (ad es. fattori di crescita) che influenzano il comportamento cellulare.

Le strategie del tissue engineering normalmente contemplano due approcci differenti, *in vitro* e *in vivo*. In entrambi i casi il protocollo iniziale prevede l'isolamento delle cellule, prelevate da un paziente tramite biopsia, e la loro successiva espansione (Fig. 3).

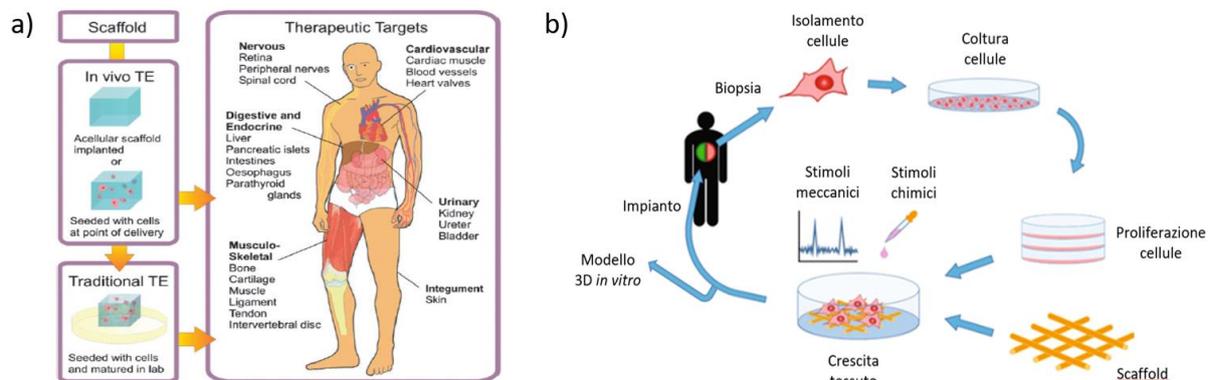


Fig. 3: a) Schema approcci del Tissue Engineering; b) schema protocollo per isolare le cellule da biopsia [18][19].

Nell'approccio *in vitro*, le cellule espanse vengono seminate sugli scaffold e coltivate in modo statico (in assenza di stimolazioni esterne) o dinamico (all'interno di un bioreattore). Con il tempo lo scaffold si degrada per essere sostituito dalle proteine della ECM, secrete dalle cellule che si infiltrano all'interno della matrice stessa [20]. Successivamente, gli scaffold possono essere impiantati sul paziente oppure utilizzati per i test farmacologici/tossicologici ed anche per lo studio dei complessi fenomeni che regolano l'insorgenza e la progressione delle patologie (al fine di evitare i test su soggetti umani e/o su animali) [13]. D'altra parte nell'approccio *in vivo*, lo scaffold può essere direttamente impiantato insieme alle cellule oppure privo di esse per reclutarle successivamente in situ (ad esempio rilasciando fattori di crescita che vanno a stimolare le cellule e favoriscono la loro migrazione) [21].

In merito alla scelta della fonte cellulare più appropriata, essa gioca un ruolo essenziale nella progettazione e nello sviluppo di un modello ingegnerizzato, in quanto le cellule devono essere in grado di replicare la fisiologia 3D del tessuto. Per colmare il divario tra i modelli animali e gli studi clinici, nei modelli ingegnerizzati dovrebbero essere principalmente utilizzate le cellule autologhe, come:

- **Cellule primarie**, cellule differenziate adulte ottenute tramite biopsia tissutale da paziente patologico o sano; tuttavia, esse presentano limitata capacità proliferativa e disponibilità, diminuendo con l'avanzare dell'età del tessuto;
- **Cellule di linea**, cellule differenziate immortali derivate da tumori o da cellule primarie modificate con oncogeni virali o trattamenti chimici, in modo da renderle capaci di proliferare indefinitamente;

- **Cellule staminali**, cellule indifferenziate presenti in tutti gli organi e i tessuti in grado di auto-rinnovarsi e di differenziarsi in uno o più tipi cellulari specializzati [13].

Per mimare al meglio l'ambiente *in vivo*, gli scaffold possono essere realizzati in modo da incorporare dei segnali molecolari che vanno ad influenzare la proliferazione, il differenziamento e la morfogenesi cellulare. Per rendere gli scaffold bioattivi, possono essere inglobate delle molecole di segnalazione (ad esempio glicosamminoglicani, proteoglicani e glicoproteine della ECM) o molecole solubili bioattive (come chemochine, citochine, fattori di crescita o ormoni) che vengono rilasciate in modo paracrino. Ad esempio, inducendo la neovascolarizzazione tramite un'opportuna aggiunta di fattori di crescita, è possibile fornire alle cellule sufficienti quantità di nutrienti per ottenere una maggiore rigenerazione dei tessuti [22]. *In vivo* oltre ai segnali chimici, le cellule sono sottoposte anche a stimoli meccanici/elettrici intracellulari o extracellulari (es. campi elettrici, flusso di fluido, pressione osmotica), che vengono forniti *in vitro* tramite l'uso di bioreattori. Quest'ultimi permettono di modulare le condizioni di coltura per raggiungere un'adeguata maturazione dei tessuti [13].

Pertanto, l'introduzione di questi modelli 3D nella ricerca biomedica presenta molteplici vantaggi riguardo il superamento dei limiti delle tecniche tradizionali (modelli di colture cellulari 2D e animali), la riduzione dell'uso degli animali ed il raggiungimento di dati più riproducibili (possibilità di controllare i parametri sperimentali) con tempistiche e costi inferiori [13].

1.2.1. Strategie per la realizzazione di modelli *in vitro*

Costruire dei modelli *in vitro* appropriati è essenziale per lo studio dei meccanismi fisiologici che avvengono all'interno di un tessuto o un organo. Per questioni etiche, l'uso di **modelli umani** viene limitato a studi minimi, come ad esempio analisi della risposta immunitaria (es. test allergici), analisi dei risultati fisici (es. frequenza respiratoria o cardiaca durante un esercizio) e studio delle biopsie di tessuti. I **modelli animali** sono quelli che hanno fornito la maggior parte delle conoscenze attuali sulla fisiopatologia di molti organi. Numerose specie animali sono state utilizzate come modelli per lo studio di determinate malattie, come ad esempio topi, ratti, criceti, conigli, cani, pecore. Data la facilità di manipolazione scientifica ed il basso costo rispetto ad altri animali, i topi rappresentano il modello animale più comunemente usato. Per ricreare delle particolari caratteristiche di una specifica malattia umana, i topi vengono "umanizzati" tramite l'innesto di cellule o di tessuti umani oppure grazie a modificazioni transgeniche. Tuttavia, gli esseri umani e gli animali sono sostanzialmente diversi; essi infatti hanno in comune diversi tipi di cellule ma che differiscono tra loro per quantità, distribuzione, posizione, morfologia e funzione. Queste differenze non consentono

di prevedere in modo corretto gli esiti tossicologici/farmacologici umani tramite dei modelli animali. Quest'ultimi presentano quindi limitate caratteristiche delle malattie umane, costituendo un problema nella validità della ricerca *in vivo*. Ad esempio più dell'80% dei farmaci, che superano la fase di sperimentazione preclinica nei topi, fallisce poi negli studi clinici. Dunque, per evitare la perdita di risorse investite e di tempo vi è la necessità di realizzare dei modelli più rappresentativi, meno costosi e con un maggiore rendimento [23]. Inoltre, a causa dei problemi etici i ricercatori devono riferirsi al principio delle 3R quando progettano ed effettuano uno studio animale: *replacement* (ove possibile sostituire i modelli animali con metodi alternativi), *reduction* (ridurre al minimo il numero di animali coinvolti, mantenendo lo stesso livello di informazioni ottenibili), *refinement* (refinire le condizioni sperimentali per infliggere la minore sofferenza possibile all'animale).

Un approccio innovativo consiste nello sviluppo di colture cellulari o tissutali per studiare gli aspetti cellulari, molecolari e biochimici relativi a determinate malattie oppure per effettuare test tossicologici e/o farmacologici. Le colture cellulari possono essere svolte in due dimensioni (2D), coltivando un solo tipo di cellule su superfici di vetro o di plastica. Queste colture permettono di ottenere una distribuzione cellulare uniforme per lo studio della genetica, della morfologia e della risposta fisiologica di quel particolare tipo di cellula. La **coltura cellulare 2D** rappresenta quindi un approccio (semplice, ad alto rendimento e relativamente economico) fondamentale nel settore dello sviluppo di farmaci. Tuttavia, vi sono degli inconvenienti intrinseci qualora debba essere ricostruita la complessa funzionalità di un intero organo o tessuto del corpo umano[24]. Di fatti, i sistemi 2D riflettono solo parzialmente il microambiente cellulare *in vivo*, in cui le cellule interagiscono con la matrice extracellulare (ECM), le altre cellule vicine, i fattori solubili e sono soggette a forze meccaniche[25]. Per ricreare un tessuto, l'interazione e la comunicazione tra i diversi tipi cellulari (che costituiscono quel particolare tessuto/organo) rappresentano un aspetto fondamentale. La coltura cellulare 2D, invece, fornisce un ambiente fisiologico statico in cui è presente un solo tipo di cellule e, dunque, non è in grado di riprodurre il microambiente 3D dei tessuti *in vivo* [24]. Queste caratteristiche possono alterare significativamente le proprietà molecolari, morfologiche e fenotipiche di numerosi tipi di cellule [26]. Da qui nasce la necessità di sviluppare modelli *in vitro* più complessi tramite **colture cellulari tridimensionali (3D)**. Quest'ultime consentono l'integrazione di diversi tipi di cellule insieme ad una matrice extracellulare (ECM) o uno scaffold per guidare l'adesione, la crescita e la proliferazione cellulare. È possibile così colmare il divario tra il tessuto vivente e la coltura cellulare, ricostruendo *in vitro* la complessa micro-architettura 3D di un tessuto/organo. I modelli di coltura 3D si suddividono in tre categorie: sferoidi, organoidi e modelli ingegnerizzati.

Gli **sferoidi** (dimensioni di poche centinaia di micron) sono costituiti da gruppi di cellule aggregate tra loro in maniera spontanea (senza l'uso di alcun sostegno esterno, in condizioni che impediscono l'adesione ai substrati di coltura) tramite il metodo *spinner flask* (agitazione della sospensione cellulare) o *hanging drop* (goccia sospesa). Vengono utilizzati per lo studio di metabolismo, angiogenesi, necrosi e adesione cellulare e molto spesso anche per lo screening dei farmaci. Gli sferoidi rappresentano dei modelli eccellenti nella ricerca sul cancro, permettendo di esaminare metastasi, invasione, radioresponsività, farmaci antineoplastici ed effetti ipossici. Tuttavia gli sferoidi mostrano delle limitazioni riguardo le dimensioni (diametri maggiori possono causare necrosi all'interno del loro nucleo e ipossia) e la scarsa diffusione di nutrienti e ossigeno [24].

Gli **organoidi** sono degli aggregati di diversi tipi cellulari (es. cellule staminali embrionali, cellule staminali pluripotenti o cellule staminali pluripotenti indotte iPS) che si auto-assemblano in una struttura 3D e crescono all'interno di un gel (complessa miscela delle proteine della matrice extracellulare, come fibronectina, laminina, proteoglicani e collagene). Il Matrigel è il gel commercialmente più impiegato per realizzare gli organoidi: è una miscela proteica gelatinosa secreta dalle cellule di sarcoma di topo (EHS, tumore ricco di proteine della ECM) che polimerizza a temperatura ambiente (quindi è allo stato liquido a basse temperature) per simulare *in vitro* l'ambiente extracellulare. Per contro, gli organoidi sono difficili da realizzare e richiedono un tempo maggiore di realizzazione [24].

I **modelli ingegnerizzati** si basano sullo sviluppo di costrutti funzionali (scaffold porosi realizzati con biomateriali) di vari tessuti sia come modelli *in vitro* per scopi di ricerca che come sostituti di tessuti danneggiati [24]. Gli scaffold vengono progettati in modo da replicare in vitro l'architettura di un determinato tessuto e quindi permettere alle cellule di aderire, crescere, proliferare e produrre matrice extracellulare. La scelta del biomateriale dipende fortemente dalle proprietà meccaniche in condizioni sane o patologiche del tessuto che si vuole realizzare. I modelli ingegnerizzati possono essere utilizzati in combinazione con i bioreattori, strumenti innovativi all'interno dei quali si sviluppano processi biologici e/o biochimici in condizioni ambientali e operative strettamente controllate (ad es. pH, temperatura, stimoli fisici). Un bioreattore fornisce delle condizioni di coltura 3D dinamica, in termini di perfusione/ricircolo/miscelazione di flusso o di stimoli simil-fisiologici. In questo modo si ottiene un miglioramento dell'efficienza dei processi, che risultano essere riproducibili, automatizzati, scalabili e standardizzati. I bioreattori possono essere utilizzati come dei sistemi di espansione cellulare, di semina cellulare su scaffold) di decellularizzazione dei tessuti, di modelli *in vitro* (per studiare sviluppo e funzione di determinati tessuti *in vitro*, ad es. per screening farmacologico o per simulare una patologia) o di produzione (per produrre tessuti funzionali ingegnerizzati) [27]. Un altro approccio consiste nel combinare i modelli ingegnerizzati con la

microfabbricazione e la tecnologia microfluidica per costruire gli *organ on a chip*, dispositivi che supportano la coltura cellulare tridimensionale andando a riprodurre l'architettura 3D dei tessuti e le condizioni fisiologiche del flusso sanguigno. Gli *organ on a chip* consentono dunque di mimare le funzioni e la struttura di un organo umano, seminando le cellule su uno scaffold che viene posto all'interno di un sistema microfluidico e perfuso dinamicamente (mimando il flusso sanguigno per l'apporto di nutrienti e la rimozione dei prodotti di scarto) [26].

1.2.2. Matrice Extracellulare

In tutti gli organismi viventi i tessuti non sono solo costituiti da cellule, ma una parte rilevante del loro volume è occupata dalla matrice extracellulare (ECM). Quest'ultima rappresenta una complessa rete di macromolecole organizzate in modo tridimensionale attorno alle cellule. La ECM presenta composizioni e strutture differenti in base al tipo di tessuto, svolgendo quindi funzioni diverse. Essa può : (1) fornire alle cellule il supporto strutturale ed un adeguato ambiente fisico per favorirne la migrazione, l'adesione, la proliferazione e la sopravvivenza; (2) conferire al tessuto le proprietà meccaniche (es. rigidità ed elasticità) associate alle sue funzioni; (3) fornire alle cellule dei segnali bioattivi per regolare il loro comportamento; (4) fungere da serbatoio di fattori di crescita per potenziarne la bioattività; (5) provvedere ad un ambiente fisico degradabile per consentire la neovascolarizzazione ed il rimodellamento dei tessuti in risposta ai loro processi dinamici (ad esempio morfogenesi, omeostasi o guarigione di lesioni) [28].

La comunicazione cellula-ECM, di tipo ancoraggio-dipendente, è mediata principalmente dalle integrine e dai segnali intracellulari che vengono generati. Le integrine sono dei recettori di membrana, ovvero molecole proteiche esposte sulla superficie delle cellule che entrano in contatto con particolari domini della ECM. In questo modo, viene facilitata l'interazione tra il citoscheletro di actina e l'ECM durante la motilità e l'adesione cellulare [29], riproducendo una comunicazione bidirezionale (segnali trasmessi dalle cellule alla matrice extracellulare e viceversa).

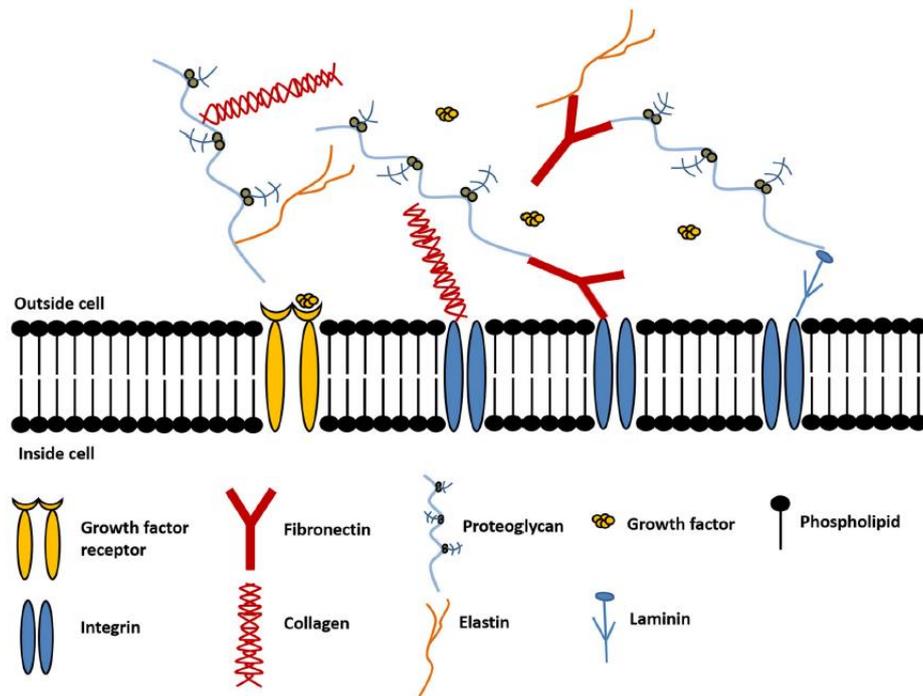


Fig. 4: Struttura della matrice extracellulare (ECM) con relative componenti.

Come mostrato in Fig.4, le componenti principali della matrice extracellulare sono:

- **Proteine fibrose:** con funzione strutturale (collageni ed elastina) e adesiva (fibronectina, laminine, vitronectina). Le fibre di collagene conferiscono la resistenza alla trazione, mantenendo l'integrità biologica e strutturale della ECM, mentre le fibre di elastina sono responsabili delle proprietà elastiche di deformazione. Le proteine di adesione mediano, invece, la connessione tra le cellule tessutali e la matrice.
- **Eteropolisaccaridi:** macromolecole idrolifiche che comprendono proteoglicani e glicosamminoglicani (GAGs). I GAGs sono dei mucopolisaccaridi, ovvero dei polimeri lineari con un'unità ripetitiva glucidica. I proteoglicani a loro volta sono catene polisaccaridiche composte da una catena proteica alla quale sono legati covalentemente i GAGs; essi riempiono lo spazio extracellulare formando un gel poroso e ben idratato in cui sono immerse le proteine fibrose. Questo gel permette la migrazione delle cellule e la diffusione di metaboliti, nutrienti e fattori di crescita tra il sangue e le cellule dei tessuti, resistendo alle forze di compressione a cui è soggetta la ECM [30].
- **Liquido interstiziale:** soluzione acquosa presente tra le cellule in prossimità di vasi sanguigni e linfatici per mediare gli scambi di elettroliti, ormoni, sostanze nutritive/di scarto tra il sangue e le cellule [31].

1.2.3. Scaffold

1.2.3.1. *Proprietà dello scaffold*

Come precedentemente accennato, all'interno dei tessuti le cellule ricevono segnali sia da altre cellule circostanti che dall'ambiente extracellulare, in particolar modo dalla ECM. Dunque, alla base dell'ingegneria tissutale vi è la necessità di realizzare scaffold porosi tridimensionali in grado di mimare la struttura e le funzioni della matrice nativa di un determinato tessuto. L'obiettivo è quello di supportare temporaneamente l'adesione, la proliferazione e la crescita cellulare fornendo un ambiente appropriato per la rigenerazione di tessuti e/o organi.

Analogamente alle funzioni della matrice extracellulare descritte in precedenza, gli scaffold sono in grado di: (1) fornire alle cellule un supporto strutturale temporaneo per favorirne l'adesione, la proliferazione e la migrazione; (2) conferire rigidità e resistenza meccanica al tessuto ingegnerizzato; (3) interagire attivamente con le cellule per facilitare la loro proliferazione e/o differenziamento; (4) fungere da veicolo di trasporto ed immagazzinamento dei fattori di crescita; (5) fornire un volume vuoto per la vascolarizzazione e la formazione di nuovi tessuti durante il rimodellamento [28].

Indipendentemente dal tipo di tessuto preso in considerazione, nel progettare uno scaffold vi sono una serie di variabili critiche da tenere in considerazione:

- **Composizione chimica:** deve ispirarsi a quella della ECM del tessuto di interesse. Lo scaffold deve essere bioattivo per facilitare le interazioni biochimiche con i tessuti biologici. Ad esempio, uno scaffold realizzato con polimeri sintetici può essere funzionalizzato in superficie con proteine adesive o sequenze peptidiche per favorire l'adesione, la proliferazione cellulare o la biodegradazione dello scaffold stesso.
- **Architettura/porosità:** l'architettura definisce la struttura meccanica dello scaffold, ma allo stesso tempo anche lo spazio a disposizione delle cellule per la formazione di nuovi tessuti (inclusi i vasi sanguigni) e per il trasporto di massa. Uno scaffold ottimale deve presentare una struttura con un'elevata porosità ed i pori interconnessi al fine di garantire l'infiltrazione delle cellule, un giusto apporto di nutrienti, la diffusione dei prodotti di scarto e di degradazione. Anche la dimensione dei pori rappresenta un parametro molto importante, in quanto pori più grandi supportano la crescita dei tessuti vascolari, mentre quelli più piccoli la colonizzazione e la migrazione cellulare. Un'ideale dimensione dei pori si attesta attorno i 100-500 μm [22].

- **Biodegradabilità:** lo scaffold, essendo un supporto temporaneo, deve degradarsi per lasciare spazio alla nuova matrice extracellulare prodotta dalle cellule. Tuttavia, i prodotti di degradazione non devono essere tossici, in modo tale da non causare delle risposte infiammatorie e non interferire con gli altri organi durante la loro espulsione dal copro. La velocità di degradazione deve essere comparabile con quella di rigenerazione dei tessuti. Infatti, se lo scaffold degrada troppo rapidamente il tessuto non riesce a svilupparsi, mentre se la cinetica di degradazione è molto lenta lo scaffold preclude la formazione del nuovo tessuto.
- **Biocompatibilità:** il materiale dello scaffold deve essere compatibile con le componenti cellulari del tessuto ingegnerizzato e ben tollerato dall'organismo, senza indurre delle reazioni infiammatorie.
- **Proprietà meccaniche:** lo scaffold deve presentare delle caratteristiche coerenti con il sito anatomico in cui si deve impiantare o che si vuole realizzare *in vitro*. Di conseguenza, deve essere in grado di fornire un'adeguata stabilità meccanica e di forma al tessuto da rigenerare/creare. Uno scaffold deve essere progettato in modo da avere delle proprietà meccaniche intermedie (né troppo soft né troppo rigido) per non influenzare negativamente l'adesione e la migrazione cellulare. È necessario, inoltre, avere un giusto compromesso tra le proprietà meccaniche e la porosità della matrice per consentire l'infiltrazione cellulare e la corretta vascolarizzazione [32][12][28][33].

1.2.3.2. *Materiali per lo scaffold*

La combinazione di varie discipline (come scienza dei materiali, ingegneria biomedica e biologia molecolare) ha permesso di comprendere nel migliore dei modi la complessa interazione tra i materiali e le cellule. La scelta del biomateriale più opportuno rappresenta un elemento chiave nella realizzazione degli scaffold, in quanto influenza significativamente il comportamento cellulare.

I biomateriali hanno lo scopo di replicare le funzioni biologiche e meccaniche di un determinato tessuto, riuscendo a: fungere da matrice extracellulare artificiale; fornire un adeguato substrato di adesione cellulare per la formazione di nuovi tessuti; fornire un supporto meccanico contro le forze che agiscono in vivo per garantire il mantenimento della struttura tridimensionale durante la rigenerazione tissutale. Inoltre, i biomateriali devono essere biocompatibili e biodegradabili affinché avvenga la sostituzione con il tessuto in neoformazione senza indurre risposte infiammatorie [20].

I materiali devono essere selezionati in base al tipo di tessuto/organo da modellare, tenendo in considerazione soprattutto le proprietà meccaniche in condizioni sane o patologiche [13]. Pertanto, uno degli aspetti essenziali per la fabbricazione degli scaffold è la complessità di ricreare microambienti simili a quelli che si trovano nel tessuto di interesse. Nel corso degli anni, sono stati selezionati e testati molteplici materiali al fine trovare quelli biocompatibili in grado di soddisfare la maggior parte dei requisiti degli scaffold. Tuttavia, la ricerca è ancora in corso [34].

I materiali ampiamente utilizzati nell'ingegneria tissutale comprendono i metalli, i materiali ceramici ed i polimeri. I primi due hanno contribuito ad importanti progressi nel campo medico, soprattutto in quello ortopedico; ciò nonostante, presentano degli svantaggi riguardo l'impossibilità di biodegradarsi e la loro limitata processabilità. Per questo motivo, i materiali che tuttora ricevono maggiore attenzione per lo sviluppo degli scaffold sono i polimeri [35]. Ognuna di queste classi di biomateriali presenta vantaggi e svantaggi, quindi negli ultimi anni stanno diventando di particolare interesse i materiali compositi, ovvero costituiti da due o più fasi differenti per ottenere materiali con proprietà superiori rispetto a quelli ottenuti a partire da una singola fase [32].

1.2.3.3. *Materiali polimerici*

I polimeri sono macromolecole ad elevato peso molecolare costituite da un gran numero di unità ripetitive uguali (monomeri) o diverse (nei copolimeri), legate covalentemente tra loro in modo da formare strutture lineari, reticolate o ramificate. In base al comportamento degradativo, i polimeri vengono classificati in:

- **Polimeri biostabili**, una volta impiantati non cambiano a contatto con l'ambiente biologico, cioè non vi sono sostanziali trasformazioni chimiche e/o fisiche nel tempo;
- **Polimeri bioinerti**, stabili a livello chimico-fisico e con minime interazioni con i tessuti circostanti;
- **Polimeri biodegradabili**, degradano per azione dell'ambiente biologico, quindi avvengono delle trasformazioni chimiche che si estendono dalla superficie fino all'interno dei materiali stessi;
- **Polimeri bioerodibili**, in cui la biodegradazione avviene inizialmente sulla superficie del polimero, che gradualmente viene eroso;
- **Polimeri bioriassorbibili**, polimeri biodegradabili i cui i prodotti di degradazione vengono facilmente metabolizzati dall'organismo senza indurre alcuna risposta infiammatoria; subiscono una progressiva degradazione e gradualmente vengono sostituiti dal tessuto biologico in neoformazione.

Per la realizzazione degli scaffold vengono soprattutto impiegati i polimeri biodegradabili e biorisorbibili. In questo modo, si riesce ad avere un supporto temporaneo che non deve essere rimosso in seguito all'impianto e che favorisce una migliore guarigione dei tessuti [21]. Inoltre, la velocità di degradazione del materiale deve essere pari a quella di rigenerazione del tessuto. Ciò è dovuto al fatto che un'elevata cinetica di degradazione causa un maggiore rilascio di prodotti di scarto, che potrebbero essere tossici e quindi indurre una risposta infiammatoria. I substrati polimerici offrono quindi numerosi vantaggi grazie alla loro elevata porosità con ridotte dimensioni dei pori, biocompatibilità, versatilità della chimica e biodegradabilità regolabile. Inoltre, presentano buone proprietà meccaniche e un alto rapporto superficie-volume [36].

1.2.3.4. Polimeri naturali

I polimeri di derivazione naturale, cioè sintetizzati in maniera spontanea da tutti gli organismi viventi, possono essere considerati i primi materiali biocompatibili usati clinicamente [36]. La loro elevata bioattività consente di ottenere una migliore adesione e crescita cellulare; inoltre essendo biodegradabili, le cellule sono in condizione di produrre la nuova ECM che successivamente andrà a sostituire lo scaffold degradato. All'interno dei sistemi biologici, i polimeri naturali non rilasciano dei prodotti di degradazione citotossici ed è possibile regolare la loro velocità di degradazione andando a modificare la formulazione iniziale e/o i parametri di processo. Spesso i polimeri naturali vengono trattati con solventi acquosi.

I polimeri naturali comprendono le componenti della matrice extracellulare e vengono suddivisi in:

- **Proteine:** polimeri basati su un'unità ripetitiva amminoacidica (es. collagene, gelatina, elastina, fibrina, fibronectina), sono di origine umana o animale ed includono delle molecole bioattive che mimano l'ambiente extracellulare.
- **Polisaccaridi:** polimeri basati su un'unità ripetitiva monosaccaridica (es. cellulosa, amido, chitosano, alginato, acido ialuronico), si ottengono da alghe (es. agar e alginato), da piante (es. cellulosa) o da fonti microbiologiche (es. destrano e gellano).

Nel tissue engineering, questi polimeri vengono utilizzati per lo sviluppo di idrogeli, scaffold porosi, membrane sottili o particelle, subendo *in vivo* una degradazione enzimatica. Tuttavia, l'uso di questi materiali presenta degli svantaggi riguardo le limitate proprietà meccaniche, la possibilità di indurre una risposta immunitaria indesiderata a causa di contaminazioni da agenti patogeni/virali (essendo soprattutto di origine animale, devono essere sterilizzati e purificati) ed una carente omogeneità dal punto di vista della composizione e delle proprietà fisico-chimiche [37]. La maggior parte dei polimeri

naturali sono idrofili e, quindi, prima di essere impiantati necessitano di essere reticolati per aumentarne la stabilità in ambiente acquoso. Per migliorare la processabilità e le proprietà meccaniche, i polimeri naturali possono essere combinati con altri materiali sintetici [34].

1.2.3.5. *Polimeri sintetici*

I polimeri sintetici ampiamente utilizzati per la fabbricazione degli scaffold comprendono i poli(α -idrossiacidi), ovvero l'acido polilattico (PLA), l'acido poliglicolico (PGA), il copolimero PLGA ed il policaprolattone (PCL). Essendo termoplastici, i polimeri sintetici possono essere facilmente processati sotto forma di scaffold tridimensionali con microstrutture, forme e dimensioni desiderate [20]. Rispetto ai polimeri naturali, questi biomateriali risultano essere più stabili e facilmente sterilizzabili, poiché sono meno sensibili alla temperatura. Inoltre, è possibile controllare le loro condizioni di processo riuscendo ad ottenere una maggiore prevedibilità e riproducibilità delle proprietà meccaniche e fisiche (es. resistenza alla trazione, modulo di Young, rate di degradazione) [29]. I polimeri sintetici subiscono una degradazione idrolitica (idrolisi dei legami esteri) attraverso l'erosione in massa, con prodotti di scarto che vengono facilmente rimossi tramite dei pathway metabolici (ad es. vie respiratorie). Per di più, la cinetica di degradazione può essere controllata regolando il peso molecolare, il rapporto di copolimerizzazione e la polidispersità dei polimeri.

Grazie alla versatilità di creare microambienti con caratteristiche regolabili (proprietà meccaniche, tempo di degradazione e porosità), i polimeri sintetici risultano essere molto interessanti per l'ingegneria dei tessuti. Molti di questi biomateriali (es. PCL, PEG, PLGA, PEO) vengono ampiamente utilizzati in campo biomedico grazie alla loro biocompatibilità ed elevata processabilità; queste caratteristiche permettono di ottenere fibre biomimetiche alla micro/nano-scala. Tuttavia essendo idrofobici, mostrano delle limitazioni nella rigenerazione dei tessuti a causa della loro scarsa bagnabilità e della mancanza di interazioni tra il substrato e le cellule (carente bioattività intrinseca)[18]. Un altro aspetto negativo riguarda il rilascio da parte dei polimeri sintetici di prodotti di degradazione acida, che vanno ad alterare il pH dei tessuti circostanti. Questo cambiamento di pH, a sua volta, può influenzare il comportamento e la sopravvivenza cellulare, causando delle infiammazioni nei tessuti. Pertanto, è necessario che gli scaffold vengano funzionalizzati in superficie con agenti biologicamente attivi in modo da ottenere una risposta cellulare adeguata [37].

1.2.4. Elettrospinning

Il tissue engineering ha compiuto eccellenti progressi nella rigenerazione di tessuti e organi umani grazie allo sviluppo di sostituti biologici costituiti da cellule, scaffold e biofattori. Alla base vi è la realizzazione di substrati che forniscano alle cellule un ambiente favorevole alla micro/nano-scala. Negli anni sono stati studiati vari metodi di progettazione delle matrici per simulare al meglio l'ambiente nativo del tessuto [38]. Con l'emergere della nanotecnologia, l'elettrospinning ha suscitato un notevole interesse grazie al suo grande potenziale e alla sua versatilità per applicazioni in diversi settori. È una semplice tecnica di fabbricazione che permette di ottenere scaffold nanofibrosi sintetici e/o naturali altamente porosi (porosità interconnessa) con proprietà, struttura e funzioni desiderate, in grado di mimare la matrice extracellulare di un determinato tessuto [39]. Ciò costituisce uno dei paradigmi essenziali nell'area dell'ingegneria tissutale. Rispetto ad altre tecniche convenzionali, l'elettrospinning risulta essere più efficiente, rapido e meno costoso. È un processo che sfrutta un campo elettrico per controllare la formazione e la deposizione su un collettore di fibre polimeriche con diametro da qualche micron fino a 2 nm.

1.2.4.1. *Struttura nanofibrosa*

Le fibre nanometriche imitano da vicino la scala dimensionale delle proteine fibrose (es. collagene) presenti all'interno della matrice extracellulare. Sia la dimensione delle fibre che la topografia della matrice ottenuta svolgono un ruolo molto importante nell'adesione e nella proliferazione delle cellule [40].

Con la riduzione del diametro dei filamenti elettrospinnati, si è verificato un aumento dei contatti fibra-fibra per unità di lunghezza ed una diminuzione del raggio medio dei pori all'interno della matrice [41]. Grazie al loro elevato rapporto superficie-volume, le nanofibre presentano un maggior numero di proteine adsorbite e di siti di legame per i recettori delle membrane cellulari, permettendo così di migliorare le attività cellulari come adesione, proliferazione e differenziamento [38]. Come mostrano in Fig. 5 le cellule assumono una morfologia diversa in base al tipo di substrato con cui entrano in contatto. Su scaffold microporosi o microfibrati (con dimensione dei pori dell'ordine di centinaia di micron) le cellule tendono ad aderire e ad appiattirsi, formando una struttura bidimensionale. Mentre su scaffold nanofibrati, grazie alla dimensione delle fibre molto più piccola rispetto a quella delle cellule (10-15 μm), quest'ultime aderiscono acquisendo una morfologia tridimensionale simile a quella che assumerebbero all'interno della matrice extracellulare naturale.

La coltura 3D altera quindi in maniera significativa la stimolazione meccanica rispetto a quella fornita mediante una coltura 2D, andando ad influenzare il comportamento delle cellule che assumono una morfologia molto simile a quella *in vivo* [42].

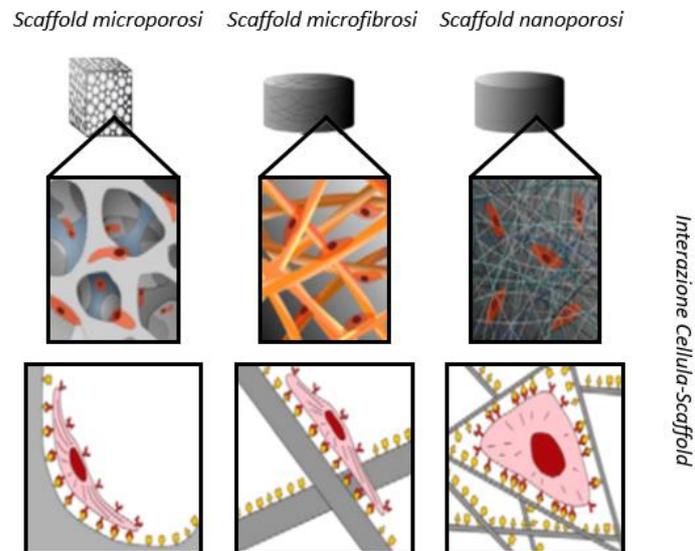


Fig. 5: Influenza dell'architettura dello scaffold sulla morfologia cellulare.

1.2.4.2. *Strumentazione e processo di elettrofilatura*

Come mostrato in Fig. 6, la strumentazione necessaria per mettere in atto il processo dell'elettrospinning è costituita da quattro elementi:

- **Siringa**, in cui viene inserita la soluzione polimerica ed è dotata di un ugello di dimensioni millimetriche;
- **Pompa**, collegata alla siringa per imporre una certa velocità di flusso affinché la soluzione venga spinta attraverso il capillare;
- **Generatore di tensione**, genera una differenza di potenziale (d.d.p.) ad elevato voltaggio tra l'ugello ed il collettore;
- **Collettore**, superficie metallica (es. alluminio) su cui vengono depositate le fibre.

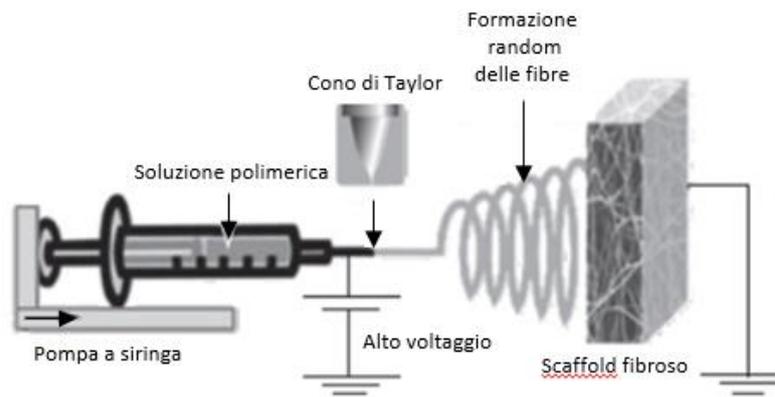


Fig. 6: Rappresentazione schematica del processo di elettrospinning.

L'elettrospinning prevede l'applicazione di un forte campo elettrico su una soluzione polimerica posta all'interno di una siringa e spinta fuori dal capillare grazie all'azione costante di una pompa volumetrica. La soluzione viene trattenuta all'interno dell'ugello in virtù della sua tensione superficiale, formando in uscita una calotta emisferica. Applicando un'elevata differenza di potenziale (0-30 kV) tra l'ugello ed il collettore, la soluzione acquista in superficie una carica elettrica positiva creando al suo interno delle interazioni repulsive. Un aumento dell'intensità del campo elettrico comporta un iniziale allungamento della calotta emisferica dalla punta del capillare per assumere la forma conica nota come **cono di Taylor**. Al di sopra di un certo valore critico di d.d.p., la forza elettrostatica prevale sulla tensione superficiale; si forma così un getto che viene espulso dalla punta del cono di Taylor ed accelerato verso il collettore. Nel percorso verso il collettore, man mano che il solvente evapora, il volume del getto si riduce; aumenta quindi la carica per unità di volume e le forze elettriche diventano sempre più intense. Si arriva ad un punto in cui queste forze elettriche sono talmente intense che il getto diventa instabile ed inizia a separarsi in tanti piccoli filamenti, percorrendo delle traiettorie circolari via via crescenti. In questo modo, aumenta la lunghezza del percorso ed il tempo di transito verso il collettore, favorendo così i processi di evaporazione del solvente e di assottigliamento delle fibre [40]. Successivamente, le fibre nanometriche si vanno a depositare sul collettore metallico in modo caotico. Il continuo accumulo di fibre genera uno scaffold tridimensionale.

In base al tipo applicazione di interesse, è possibile utilizzare collettori diversi per ottenere scaffold con nanofibre distribuite in maniera random (collettore piano) oppure allineate lungo una certa direzione (collettore cilindrico rotante, due collettori piani o ad anelli paralleli posti ad una determinata distanza l'uno dall'altro) [17][43].

1.2.4.3. Parametri che influenzano il processo dell'elettrospinning

L'elettrospinning è una tecnica di per sé semplice dal punto di vista dei principi su cui si basa e sulla strumentazione necessaria per realizzarla. Tuttavia, complesso è il sistema di variabili che entra in gioco durante l'intero processo e che viene suddiviso in parametri di sistema, parametri di processo e parametri ambientali. Regolando in maniera opportuna questi parametri, si ottengono delle fibre con morfologia e diametri desiderati [44].

I **parametri di sistema** sono legati alle proprietà della soluzione polimerica. È difficile isolare gli effetti dei singoli parametri che influenzano l'elettrospinning, in quanto la variazione di uno di essi può andarne a modificare un altro (ad es. una variazione della conducibilità influisce sulla viscosità della soluzione) [45]. Questi parametri includono:

- **Concentrazione:** determina la spinnabilità di una soluzione, cioè la formazione o meno di una fibra. La concentrazione di soluto all'interno della soluzione polimerica influenza sia la viscosità che la tensione superficiale. La soluzione non può essere né troppo diluita né troppo concentrata. Esiste una concentrazione minima al di sotto della quale avviene il processo dell'*elettrospray*, ovvero la fibra polimerica si rompe in goccioline prima di raggiungere il collettore a causa della bassa viscosità e degli effetti della tensione superficiale. Mentre, al di sopra di una concentrazione massima non è possibile mantenere un flusso costante e quindi estrarre il materiale per l'elevata viscosità. Pertanto, esiste un intervallo di concentrazioni ottimali in cui si ottengono fibre continue mantenendo costanti gli altri parametri. Inoltre, è stato ampiamente dimostrato che, all'aumentare della concentrazione, si riduce la formazione dei *beads* (difetti di filatura) ed incrementa la dimensione delle fibre [40].
- **Peso molecolare e viscosità:** il peso molecolare (PM) ha un effetto significativo sulle proprietà reologiche ed elettriche della soluzione, come viscosità, tensione superficiale e conduttività. Il PM riflette il numero di legami che si instaurano tra le catene polimeriche all'interno della soluzione e che determina la viscosità. Il numero di legami è altamente correlato alla lunghezza delle catene, che è tanto più elevata quanto maggiore è il PM del polimero in soluzione. Dunque, al crescere del peso molecolare incrementa la viscosità. Una soluzione sufficientemente viscosa dipende dall'elevato PM del polimero impiegato ma soprattutto dalla sua concentrazione in soluzione. Analogamente, un aumento della concentrazione determina un maggior numero di catene polimeriche e, di conseguenza, la formazione di più legami. Una soluzione con peso molecolare troppo basso può portare,

invece, sia alla rottura del getto in tante piccole gocce che alla formazione di fibre cosparse di *beads*. Maggiore è il PM maggiore è il diametro delle fibre ottenute [41][44].

- **Tensione superficiale:** dipende dal tipo di solvente ed ha come effetto la riduzione dell'area superficiale per unità di massa. L'elevata tensione superficiale di una soluzione polimerica causa l'instabilità dei getti con generazione di fibre discontinue cosparse di *beads*. Tuttavia, riducendo la tensione superficiale è possibile ottenere fibre continue e prive di difetti [41][44].
- **Conducibilità:** è determinata dal tipo di polimero, dal solvente usato e dall'eventuale presenza di sali ionizzabili. I polimeri sono per lo più conduttivi, dunque gli ioni che vengono caricati nella soluzione hanno una notevole influenza sulla formazione del getto, sottoposto ad una tensione maggiore con il campo elettrico applicato. L'aggiunta dei sali (es. cloruro di sodio, bifosfato di sodio e fosfato monopotassico) aumenta la conducibilità della soluzione, ottenendo una maggiore uniformità delle fibre ed una minore generazione dei *beads*. All'aumentare della conducibilità si verifica una significativa riduzione del diametro delle fibre, mentre una conducibilità insufficiente comporta la creazione di fibre discontinue con difetti di filatura. La conducibilità favorisce quindi la formazione di fibre lisce e sottili solo in un certo range, oltre il quale sfocia nell'instabilità e nella rottura del getto in presenza di forti campi elettrici [41][46][47].
- **Volatilità del solvente:** la scelta del solvente è un passaggio cruciale nel processo dell'elettrospinning poiché influenza sia la formazione delle fibre che la porosità della matrice. La formazione delle nanofibre è dovuta ad una rapida separazione di fase all'interno della goccia polimerica tra il polimero ed il solvente (prima che avvenga la deposizione delle fibre solide), il quale evapora durante il tragitto ugello-collettore. Pertanto, per consentire un'adeguata evaporazione è necessario utilizzare un solvente volatile. Una maggiore volatilità permette di ottenere un'alta densità dei pori, dovuta alla rapida evaporazione del solvente. D'altra parte, con solventi meno volatili diminuisce la densità dei pori e si generano fibre piatte a forma di nastri [40][47].

I **parametri di processo** riguardano la strumentazione utilizzata durante il processo dell'elettrospinning, andando ad influenzare notevolmente la formazione e la morfologia delle fibre:

- **Potenziale elettrico:** un elemento essenziale dell'elettrospinning è il potenziale elettrico applicato alla soluzione polimerica. La generazione delle fibre avviene solamente dopo aver raggiunto una certa tensione di soglia, oltre la quale la forza elettrostatica supera la tensione superficiale della soluzione. Si arriva così allo sviluppo del cono di Taylor e la successiva formazione del getto. Tramite l'effetto delle forze repulsive presenti all'interno del getto e

del campo elettrico generato dalla d.d.p. tra l'ago ed il collettore, la soluzione viene stirata. Aumentando la tensione cresce quindi lo stiramento del getto, con conseguente riduzione iniziale dei diametri delle fibre ed incremento della velocità di evaporazione del solvente. Tuttavia, tensioni troppo elevate causano un'accelerazione del getto ed una drastica riduzione del tempo di transito verso il collettore. Dunque, le fibre non dispongono del tempo necessario per lo stiramento e ciò può portare ad avere un incremento dei diametri e la presenza di difetti di filatura [44].

- **Distanza ugello-collettore:** è necessaria una distanza minima affinché il solvente evapori sufficientemente in tempo prima che le fibre si depositino sul collettore. A distanze molto brevi si generano fibre piatte ricche di solvente e con diametro relativamente più grande, mentre al crescere della distanza si formano fibre più sottili, arrotondate e prive di difetti di filatura. Tuttavia, per distanze eccessive non si ha alcuna deposizione delle fibre [41].
- **Flow rate:** il flusso della soluzione polimerica è un parametro che influenza sia la velocità del getto che il processo di evaporazione del solvente. È preferibile lavorare a bassi flow rate per consentire al solvente di evaporare completamente prima che le fibre raggiungano il collettore. Invece se il flusso è troppo elevato, il solvente non ha abbastanza tempo per evaporare e si verifica un aumento dei diametri delle fibre (dovuto al maggiore volume di soluzione da filare nell'unità di tempo) con una presenza significativa di *beads*. [44].

Anche le interazioni tra la soluzione polimerica e l'ambiente circostante possono indurre effetti sulla morfologia delle fibre. Tuttavia, le conseguenze che l'ambiente esterno produce sul processo dell'elettrospinning rappresentano un campo tuttora poco studiato. I principali **parametri ambientali** riguardano:

- **Umidità:** il grado di umidità influisce sulla porosità e sulla dimensione finale dei pori, andando a condizionare la volatilità e quindi la velocità di evaporazione del solvente. Ciò accade poiché, a causa dell'evaporazione del solvente, il getto si raffredda e a contatto con la superficie si può verificare la condensazione del vapore acqueo presente nell'aria. La formazione dei pori avviene in seguito all'evaporazione sia del solvente che dell'acqua. Ad umidità molto basse, la velocità di evaporazione del solvente supera quella di estrusione della soluzione, causando un'ostruzione nella punta dell'ago che impedisce il processo di elettrofilatura. Mentre con l'incremento dell'umidità, all'interno della struttura fibrosa si verifica la comparsa di piccoli pori circolari che successivamente coalescono [46].
- **Temperatura:** un aumento della temperatura comporta una maggiore velocità di evaporazione del solvente ed una minore viscosità della soluzione polimerica. In questo

modo, le fibre subiscono uno stiramento più grande e di conseguenza presentano diametri ridotti [44].

1.2.4.4. Difetti di filatura

All'interno delle membrane nanofibrose, realizzate tramite la tecnica dell'elettrospinning può verificarsi la presenza di difetti di filatura:

- **Beads (perline):** rigonfiamenti delle fibre con conformazione a “pallone collassato”, dovuti alla lenta evaporazione del solvente. Quest'ultimo non riesce ad evaporare completamente lungo il percorso tra l'ugello ed il collettore, quindi l'evaporazione del solvente residuo avviene solo dopo la deposizione delle fibre sul collettore.
- **Nastri:** fibre con strutture a nastro poiché, essendo ancora ricche di solvente, collassano su sé stesse perdendo la loro iniziale geometria cilindrica. Il solvente non evapora in maniera adeguata in tutto il sistema, quindi le fibre tendono a schiacciarsi contro il collettore, si deformano e dopo l'evaporazione del solvente rimangono queste strutture schiacciate e rettangolari.
- **Difetti superficiali:** fibre molto più piccole del diametro medio delle nanofibre. Al fine di ridurle, devono essere ottimizzati i parametri di sistema e di processo [48].

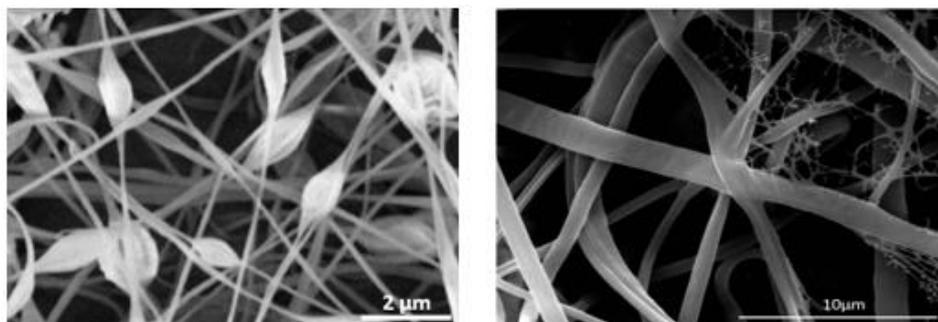


Fig. 7: Immagini SEM di membrane elettrofilate con difetti di filatura.

1.2.5. Membrane elettrofilate in PCL/gelatina

Come precedentemente descritto, la matrice extracellulare è una complessa rete fibrosa che funge da supporto tridimensionale per le cellule, andando ad influenzare il loro comportamento tramite la trasmissione di segnali biochimici. Gli scaffold nanofibrosi realizzati tramite il processo dell'elettrospinning rappresentano una classe emergente di costrutti in grado di mimare l'ECM dei tessuti nativi, per sostenere e riparare aree patologiche o danneggiate. È possibile realizzare costrutti ibridi con determinate proprietà biochimiche, meccaniche e strutturali attraverso la combinazione di polimeri sintetici e naturali. I polimeri sintetici sono molto resistenti a livello meccanico, affidabili ed economici; tuttavia, presentano carenti proprietà bioattive. Questo aspetto è essenziale per avere un'interazione specifica con il tessuto bersaglio. Da qui nasce la necessità di miscelare i polimeri sintetici con quelli naturali, per favorire le interazioni cellula-scaffold. Rispetto ai polimeri sintetici, quelli naturali inducono una minore risposta immunitaria ed interagiscono in modo migliore con le componenti cellulari in termini di vitalità e tossicità [49]. In questo modo si ottengono substrati che presentano le caratteristiche dei diversi polimeri o mostrano persino nuove caratteristiche uniche, beneficiando delle proprietà meccaniche dei polimeri sintetici e quelle biologiche dei polimeri naturali.

Grazie alla sua biocompatibilità, biodegradabilità e disponibilità commerciale a basso costo, la gelatina rappresenta uno dei biomateriali naturali più impiegati nell'ambito del tissue engineering. La gelatina è una miscela proteica che si ottiene dalla parziale idrolisi del collagene (maggior costituente della ECM) ed è ricca di domini in grado di legarsi ai recettori della superficie cellulare e ad altre proteine della ECM, fornendo così un eccellente substrato per l'adesione e la proliferazione cellulare [50]. Tuttavia, le fibre in gelatina presentano scarse proprietà meccaniche, che possono essere migliorate attraverso la reticolazione e realizzando dei *blend* con polimeri sintetici più resistenti. Il PCL è un polimero termoplastico semicristallino con una bassa affinità cellulare e che rappresenta uno dei materiali sintetici più associati alla gelatina nelle applicazioni dell'ingegneria tissutale (es. rigenerazione dei tessuti nervosi, ossei, vascolari, dermali).

Secondo uno studio di Ghasemi-Mobarakeh et al. in cui sono state prodotte delle soluzioni di gelatina e PCL variando la concentrazione dei due polimeri, l'aggiunta della gelatina ha migliorato l'idrofilicità dello scaffold biocomposito in modo da favorire una maggiore interazione delle cellule con il substrato; mentre, l'aggiunta del PCL ha consentito di avere una soluzione più viscosa così da facilitare il processo dell'elettrospinning. Inoltre, è stato dimostrato che il blend di PCL e gelatina con un rapporto 70:30 in peso ha permesso di realizzare uno scaffold con migliori proprietà meccaniche e di biodegradabilità rispetto a soluzioni con alte concentrazioni di gelatina [51]. Ciò viene

confermato anche dal lavoro svolto da Gautam et al. in cui diminuendo la concentrazione di gelatina, e quindi aumentando quella di PCL, è stato realizzato uno scaffold con fibre più uniformi, piccole, lisce e prive di difetti di filatura in modo da avere una migliore adesione e proliferazione cellulare (grazie soprattutto alla presenza della gelatina) [52]. Pertanto, questi studi hanno dimostrato che i *blend* ottenuti miscelando la gelatina e il PCL rappresentano una soluzione ottimale ai limiti dei polimeri presi singolarmente; si ottiene così un biomateriale finale con buone proprietà chimiche, fisiche, meccaniche ed una migliore bioattività.

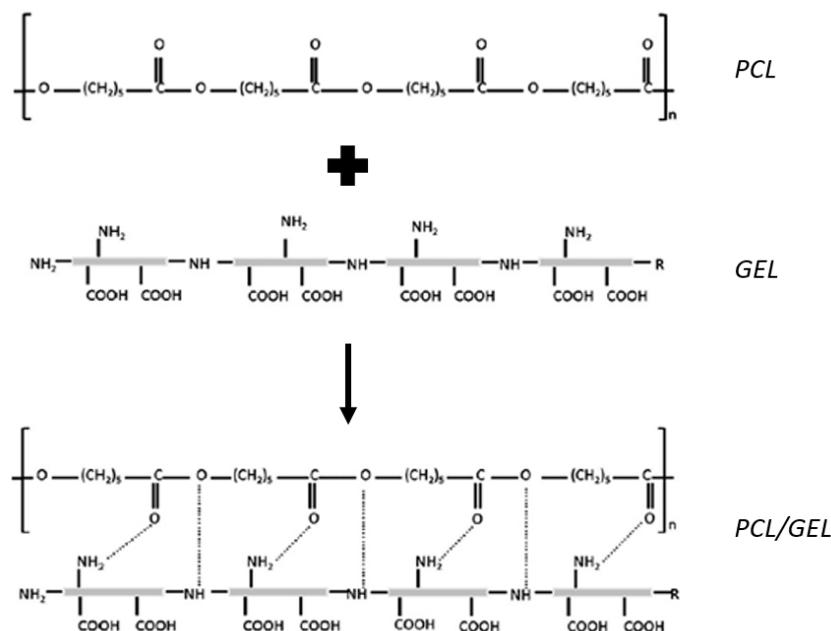


Fig. 8: Rappresentazione schematica di una possibile interazione tra PCL e gelatina all'interno dello scaffold biocomposito.

1.2.6. Modelli *in vitro* della barriera alveolo-capillare

Di seguito verranno riportati i dati, acquisiti grazie ai lavori sperimentali presenti in letteratura, relativi alla realizzazione *in vitro* della barriera alveolo-capillare, tramite un'opportuna combinazione di cellule epiteliali ed endoteliali:

1. ***Snyder-Talkington et al.***: co-coltura delle cellule epiteliali SAEC (vie aeree terminali umane) ed endoteliali HMVEC (microvascolari mammarie umane), che permette di modellare *in vitro* la barriera alveolo-capillare (barriera che protegge il sistema respiratorio da particelle inalate). Le SAEC e le HMVEC vengono rispettivamente seminate sul compartimento apicale e basale di un inserto Transwell. L'obiettivo è quello di studiare gli effetti tossici che i nanotubi di carbonio a

parete multipla (MWCNT, nanoparticelle costituite da strati concentrici di tubi di carbonio cilindrici con diametro < 100 nm) inducono sull'endotelio vascolare. *In vivo*, i MWCNT causano un'acuta risposta infiammatoria nel polmone dopo la loro aspirazione, seguita da una risposta fibrotica persistente. Trascorse le 72 ore di coltura, lo strato epiteliale della barriera neoformata viene quindi sottoposto all'esposizione dei nanotubi di carbonio (inseriti nel compartimento apicale dell'inserito *Transwell*) per 6 e 24 ore. Tramite un'analisi TEM (microscopio elettronico a trasmissione), viene rilevata la presenza dei nanotubi nello strato epiteliale ma non in quello endoteliale (per entrambi i *time step*). Ciò dimostra l'interazione diretta tra le cellule epiteliali ed i nanotubi, i quali non attraversano la membrana *Transwell* ma generano degli effetti indiretti sulle cellule endoteliali. Di fatti, in seguito all'esposizione, le cellule epiteliali producono dei mediatori cellulari infiammatori che, attraversando la membrana, vanno ad influenzare negativamente lo strato endoteliale. All'aumentare del tempo di esposizione incrementa la produzione dei ROS (specie reattive all'ossigeno che causano il danneggiamento delle cellule) e si ha una riorganizzazione alterata dell'actina con formazione di gap (perdita di VE-caderina) tra le cellule endoteliali (quindi aumenta la permeabilità vascolare e diminuisce l'integrità della barriera). In conclusione, la co-coltura di SAEC e HMVEC rappresenta un modello rilevante della barriera alveolo-capillare per studiare le conseguenze dovute all'esposizione per inalazione ai MWCNT. Inoltre, questo modello mette in chiaro i *pathways* di segnalazione che vi sono tra le cellule [53].

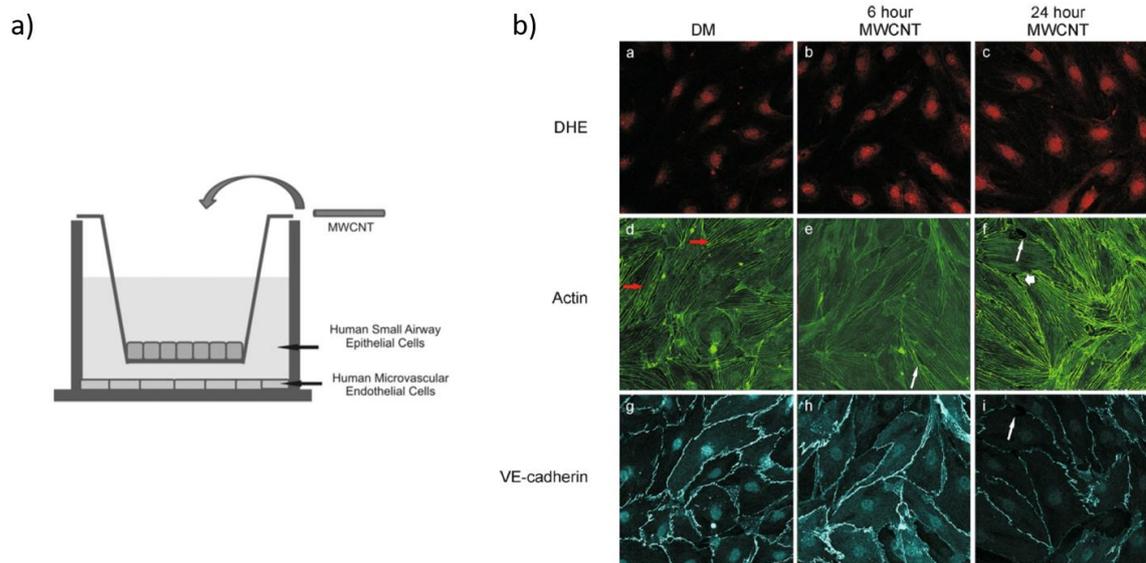


Fig. 9: a) Co-coltura SAEC e HMVEC; b) l'esposizione delle SAEC ai MWCNT induce la produzione di ROS (DHE) ed i cambiamenti morfologici nelle HMVEC (Actin e VE-cadherin) [53].

2. **Hiquita-Castro et al.:** modello *in vitro* della barriera alveolo-capillare mediante la co-coltura di cellule epiteliali A549 (alveolari umane) e di endoteliali HUVEC (vena ombelicale umana). Le cellule vengono coltivate per 48 ore su membrane elettrofilate (spessore circa 20 μm) di PCL/GEL a diverse concentrazioni. Le membrane vengono poste all'interno di un dispositivo microfluidico. Quest'ultimo consiste in una struttura 3D *multilayers* costituita da due camere microfluidiche in PDMS (per modellare lo spazio delle vie aeree ed il lume capillare), interfacciate con una membrana porosa di fibre polimeriche (per mimare la membrana basale della barriera). Lo scopo finale consiste nel simulare l'architettura del microambiente alveolare e nell'utilizzare questo modello per studiare come le proprietà microstrutturali della matrice extracellulare (ECM) influenzano la permeabilità della barriera e le lesioni delle cellule epiteliali durante la riapertura delle vie aeree (inspirazione). Il dispositivo microfluidico simula le forze di tensione superficiale che causano le lesioni alle cellule durante l'inspirazione. Modificando le concentrazioni dei due polimeri (PCL e gelatina), si studia la permeabilità al variare della rigidità delle membrane ottenute tramite l'elettrospinning. La permeabilità viene esaminata analizzando il trasporto del destrano dalla camera apicale (con le epiteliali) a quella basale (con le endoteliali). In sostanza, si ha una minore permeabilità quando le cellule vengono coltivate su matrici rigide e dense di fibre (all'aumentare del contenuto di PCL si formano monostrati cellulari più stretti grazie alla presenza delle giunzioni strette TJ), mentre all'aumentare del contenuto di GEL (quindi con matrici più soft e meno dense, ridotta formazione delle TJ) la permeabilità della barriera aumenta. Un incremento del contenuto di gelatina comporta una riduzione del modulo elastico ed un aumento del diametro delle nanofibre, che assumono una morfologia a nastro (piuttosto che una struttura più densa simile ad un filamento aumentando la quantità di PCL). Tuttavia, dal punto di vista della morte cellulare si preferiscono le matrici con un contenuto di gelatina più alto (quindi matrici più soft e meno dense), poiché le cellule su questi substrati risultano essere più piatte. Questa morfologia appiattita permette di dissipare le forze idrodinamiche applicate all'interfaccia aria-liquido, andando a causare una minore quantità di lesioni cellulari durante l'inspirazione. Il flusso di aria viene simulato iniettando il PBS sul monostrato epiteliale della camera apicale e ritraendolo ad una velocità di 0.3 mm/s; in questo modo si forma la bolla d'aria all'interno del canale microfluidico. La vitalità delle cellule viene analizzata tramite il test live/dead dopo aver simulato l'inspirazione per cinque volte. Questo sistema consente quindi di riprodurre la micro-architettura del tessuto polmonare in condizioni patologiche, come ad esempio la fibrosi polmonare (maggiore deposizione di collagene con conseguente ECM densa e rigida) e l'enfisema polmonare (distruzione della ECM e network di fibre meno denso) rispettivamente tramite membrane 100% PCL e 50:50 PCL/GEL [54].

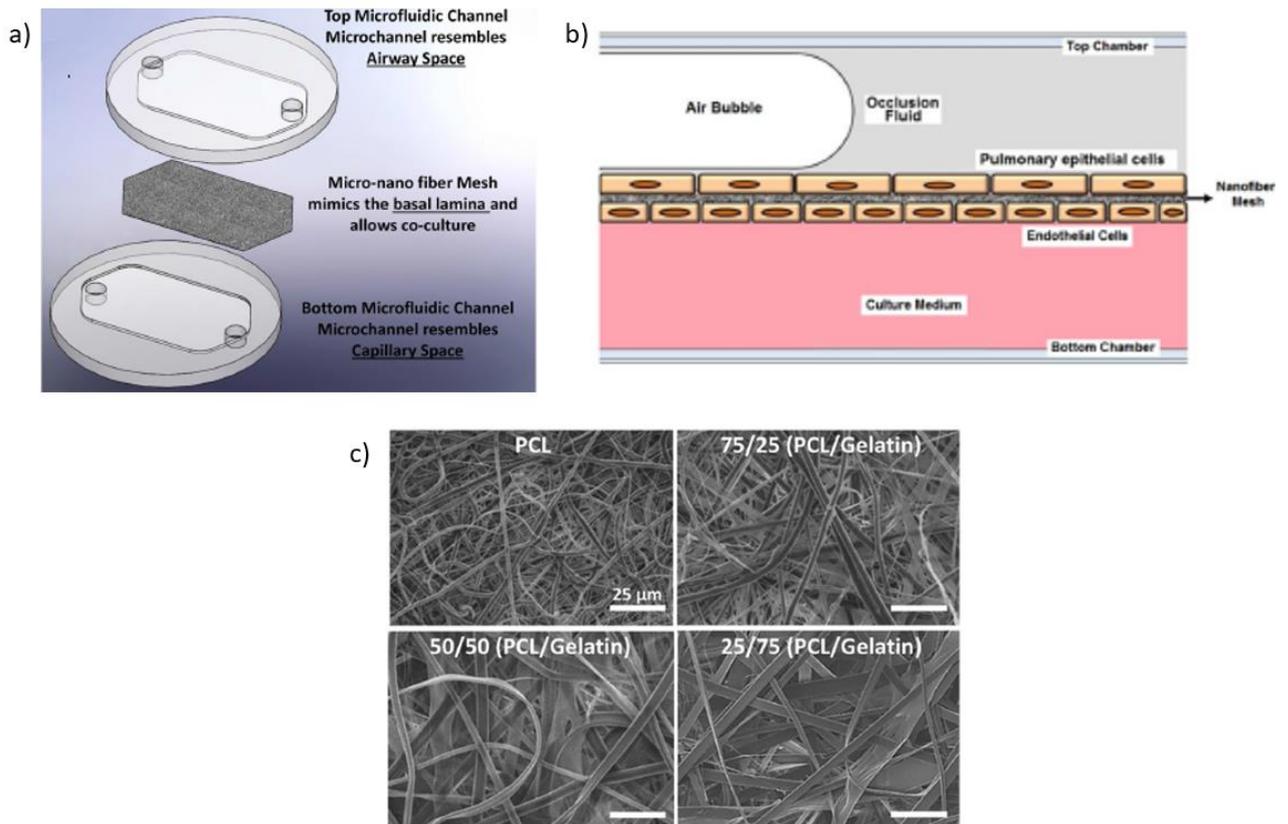


Fig. 10: a) Rappresentazione schematica del sistema microfluidico ; b) rappresentazione schematica della simulazione della riapertura delle vie aeree ; c) immagini SEM delle strutture nanofibrose [54].

3. ***Hermanns et al.***: co-coltura per esaminare l'interazione tra le cellule epiteliali e quelle endoteliali in seguito a lesioni del polmone, poiché la distruzione della barriera alveolo-capillare è alla base di molte patologie. Le cellule epiteliali NCI H441 (alveolari umane) vengono coltivate insieme alle endoteliali HPMEC (microvascolari polmonari umane) su inserti Transwell, le cui superfici vengono sottoposte ad un *coating* di collagene. Nel compartimento apicale (in cui sono presenti le cellule epiteliali) al terzo giorno di co-coltura viene aggiunto il desametasone (DEX, 190 μM), che permette di ottenere un valore di resistenza trans-epiteliale (TER, circa $500 \Omega\text{cm}^2$ dopo 10-12 giorni di coltura) sei volte maggiore rispetto a quello delle cellule non trattate. Il DEX favorisce la formazione delle giunzioni intercellulari e di conseguenza di un layer strettamente organizzato sia per le NCI H441 (immunocolorazione continua e circonferenziale per le proteine ZO-1 e E-caderina) che per le HPMEC (immunocolorazione per VE-caderina lungo i bordi delle cellule). La presenza delle giunzioni strette e aderenti tra le cellule indica una minore permeabilità della barriera, correlata ad un minor flusso paracellulare del marker idrofilico sodio-fluoresceina dal compartimento apicale a quello basale. Per dimostrare l'applicabilità di questa co-coltura in un modello di barriera alveolo-capillare lesionata e ristabilita, viene testata l'influenza della citochina pro-infiammatoria $\text{TNF-}\alpha$ sulla permeabilità della barriera. Dunque,

entrambi i compartimenti (apicale e basale) vengono esposti alla citochina TNF- α per determinare gli effetti sul valore di TER a diversi *time step*. Dopo 48 ore, si nota una significativa riduzione del valore di TER, il quale può essere ristabilito in 24 ore rimuovendo semplicemente la citochina. Pertanto, questo modello è in grado di riprodurre le proprietà essenziali di entrambi i tipi cellulari che prendono parte alla formazione della barriera aria-sangue ed al suo ripristino in seguito ad una lesione [5].

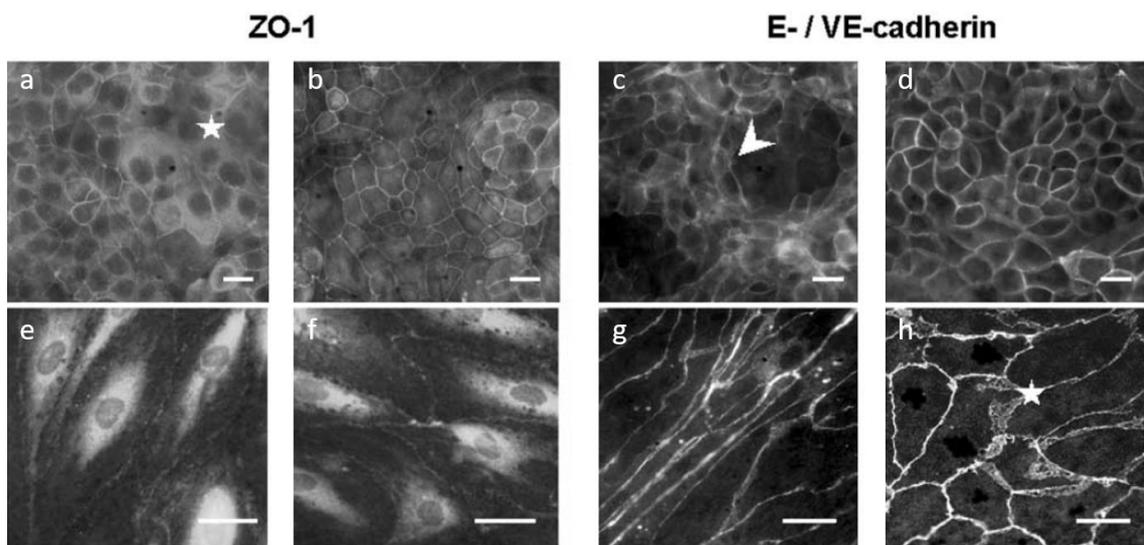


Fig. 11: Marcatura immunofluorescente delle giunzioni intracellulari nelle cellule NCI H441 (a-d) e HPMEC (e-h). Marcatura TJ: ZO-1 per cellule non trattate (a, e) e trattate (b, f) con DEX. Marcatura AJ: E-caderina per le cellule epiteliali non trattate (c) e trattate (d) con DEX; VE-caderina per cellule endoteliali non trattate (g) e trattate (h) con DEX [5].

4. ***Dohle et al.***: co- e tripla-coltura per studiare la fisiologia e la risposta immunitaria del polmone in seguito a possibili infezioni o esposizione a nanoparticelle. Le cellule epiteliali NCI H441 (alveolari umane) e quelle endoteliali ISO-HAS-1 (microvascolari umane del cuoio capelluto) vengono seminate su membrane elettrofilate di PCL (simulano la membrana basale della barriera alveolo-capillare) per 14 giorni. Viene quindi fatto un confronto tra la coltura bipolare e la tripla-coltura, che prevede l'aggiunta dei macrofagi al di sopra dello strato epiteliale al settimo giorno di coltura. Nella coltura bipolare le cellule epiteliali (marcate positivamente per E-caderina e β -catenina) presentano una morfologia appiattita formando mono- o bi-layer, mentre nella tripla-coltura si ha una struttura multi-layer in cui vengono incorporati i macrofagi. Sia nella co- che tripla-coltura, le cellule endoteliali (colorate positivamente per il marker CD31) costituiscono un sottile monolayer. In entrambe le colture al giorno 4 viene aggiunto anche il DEX (1 μ M), ottenendo dei valori di resistenza trans-epiteliali al di sopra dei 300 Ω cm²

(membrana con ridotta permeabilità grazie alla presenza delle giunzioni intercellulari) dopo 10 giorni di coltura. Dopo l'aggiunta dei macrofagi avviene un leggero decremento del TER, ma che rimane in ogni modo ad un livello alto. La permeabilità della barriera viene valutata tramite il trasporto para-cellulare del marker sodio-fluoresceina dal compartimento apicale a quello basale. Questo sistema, dunque, può essere impiegato nello studio degli effetti di possibili agenti tossici o patogeni, grazie soprattutto all'epitelio alveolare ed ai macrofagi che costituiscono la prima linea di difesa della barriera alveolo-capillare [6].

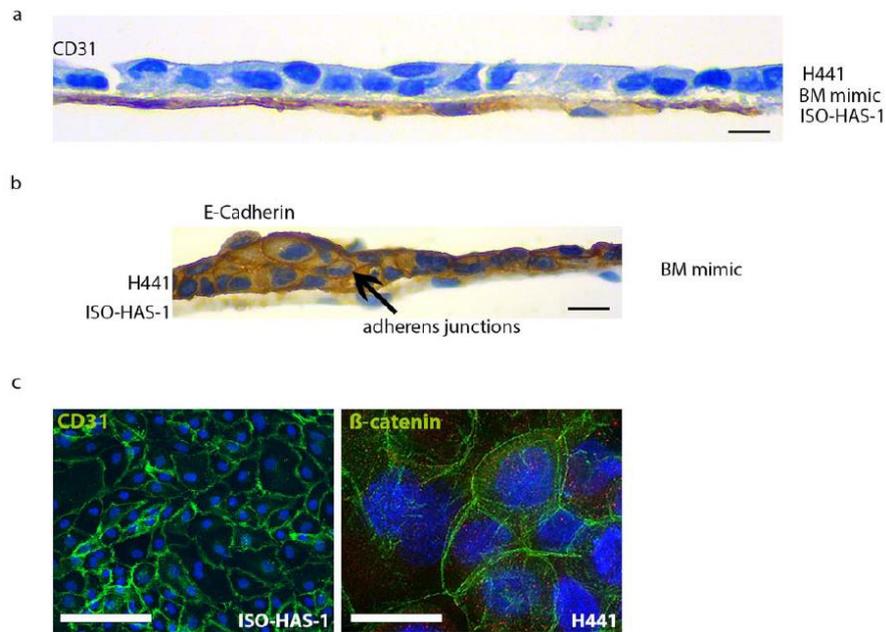


Fig. 12: Immunocolorazioni delle sezioni istologiche della coltura bi-polare sulla membrana elettrofilata (mima la membrana basale, BM mimic) per il marcatore CD31 (a) specifico delle cellule endoteliali e E-caderina (b) delle cellule epiteliali. Immunocolorazione dell'intera membrana per il marcatore CD31 delle cellule endoteliali e la β -catenina delle cellule epiteliali (c) [6].

5. ***Dekali et al.***: modello *in vitro* della barriera alveolo-capillare per lo studio della traslocazione di nanoparticelle. La co-coltura consiste nel seminare le cellule epiteliali Calu-3 (bronchi umani) ed i macrofagi THP-1 (leucemia umana) sul lato apicale di un inserto Transwell (con membrana porosa in poliestere, dimensione pori 0.4 μm) e le endoteliali HPMEC-ST1.6R (microvascolari polmonari umane) sul lato basale. Come cellule epiteliali vengono scelte le Calu-3 dato il loro elevato valore di resistenza trans-epiteliale ($>1000 \Omega\text{cm}^2$) in co-coltura sia con che in assenza di macrofagi. Le membrane vengono esaminate prima e dopo l'aggiunta dei macrofagi tramite immunofluorescenza per valutare la presenza di giunzioni strette (TJ: occludina) e giunzioni aderenti (AJ: E-caderina per le Calu-3 e VE-caderina per le HPMEC-ST1.6R) tra le cellule. Esaminando la bi-coltura, le giunzioni E-caderina e occludina appaiono in modo intenso ed

uniforme tra le cellule Calu-3; mentre, la VE-caderina appare in maniera intensa ma non uniforme tra le cellule endoteliali, poiché si sviluppano strutture *multi-layers*. L'aggiunta dei macrofagi (al settimo giorno di coltura) sul lato apicale delle cellule epiteliali non causa una significativa riduzione del valore di TER. Inoltre, viene effettuata un'analisi SEM per mettere in luce eventuali cambiamenti morfologici sulle Calu-3 indotti dall'aggiunta dei THP-1. Di fatti, nella bi-coltura le cellule epiteliali presentano numerosi microvilli, i quali scompaiono nella tripla-coltura (a causa della presenza dei macrofagi con molti pseudopodi sul lato apicale delle Calu-3) lasciando spazio ad una superficie collinare. Si ipotizza che i macrofagi innescano un rilascio di citochine pro-infiammatorie che va a modificare la morfologia alveolare. I macrofagi potrebbero non comportarsi come nel polmone *in vivo* e dunque dovrebbero essere svolte ulteriori indagini riguardo le reali cause e le conseguenze di questi cambiamenti morfologici. La traslocazione di alcune nanoparticelle viene valutata in relazione alla perdita di fluorescenza del sale di dipotassio CH Lucifer Yellow (LY, la permeabilità del LY è proporzionale al numero dei pori delle giunzioni strette). Alla fine si ottiene una barriera che limita il passaggio di nanoparticelle dal compartimento apicale a quello basale delle Transwell (attraversano la barriera solo le particelle più piccole e non funzionalizzate in superficie), grazie all'azione combinata delle cellule epiteliali e dei macrofagi[9].

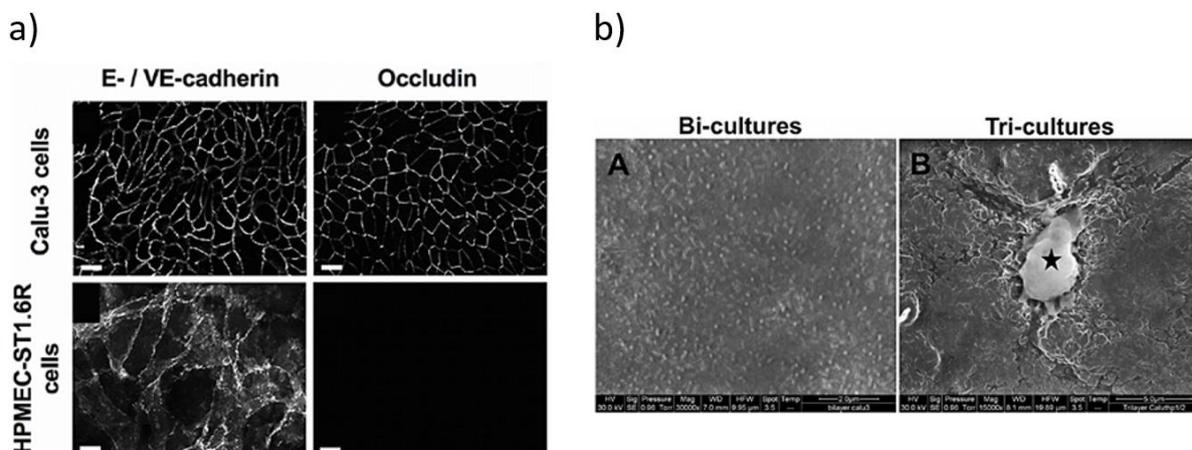


Fig. 13: a) Immunocolazione per le proteine delle giunzioni aderenti (E-/VE-caderina) e strette (occludina) nella bi-coltura delle cellule Calu-3 e HPMEC-ST1.6R; b) immagini SEM del sito apicale della bi-coltura (A: scale bar 2 μm) e tri-coltura (B: scale bar 5 μm), la stella in figura B indica la presenza di un macrofago THP-1 attivato [9].

6. **Stucki et al.:** *lung on a chip* per simulare il parenchima polmonare, incluso la sottile barriera alveolo-capillare e gli stress meccanici indotti dai movimenti respiratori. La barriera bio-artificiale consiste in una membrana sottile, porosa e flessibile di PDMS (spessore 10 μm, pori 8 μm) su cui vengono coltivate le cellule epiteliali bronchiali (16HBE14o- sul lato apicale) e le endoteliali della vena ombelicale (pHUVEC sul lato basale). Il *lung on a chip* è costituito da una

parte fluidica (ovvero due piastre di PDMS con al centro la membrana bio-artificiale) e da una parte pneumatica (in cui vi è un sottile layer di PDMS, che funge da micro-diaframma, legato ad una piastra di attuazione in cui sono strutturati i canali). La membrana in PDMS viene realizzata tramite un processo di micro-strutturazione e laminazione. In sostanza, il polimero PDMS viene inserito all'interno di uno stampo in silicone contenente dei *micropillars*, i quali (presentando altezze e diametri diversi) definiscono la dimensione dei pori e lo spessore finale della membrana in seguito ad un processo di polimerizzazione. La barriera viene sollecitata meccanicamente in maniera indiretta attraverso i movimenti del micro-diaframma, al di sotto del quale viene applicata una pressione negativa con una funzione sinusoidale (grazie ad una piccola cavità e ad un elettropneumatico esterno) che ne causa la deflessione. Il micro-diaframma è quindi in grado di applicare una deformazione ciclica sulle cellule (allungamento lineare del 10% ad una frequenza di campionamento di 0.2 Hz). Dopo quattro giorni di co-coltura, le cellule epiteliali ed endoteliali formano una barriera molto stretta: nel layer epiteliale si formano giunzioni strette (TJ: ZO-1) e aderenti (AJ: E-caderina), mentre in quello endoteliale sono presenti le giunzioni aderenti (AJ: VE-caderina). In questo modo si ottiene una barriera stretta ed omogenea, in cui la permeabilità viene influenzata dai movimenti indotti dalla respirazione simulata. Ovvero la permeabilità aumenta in condizioni dinamiche, poiché i pori delle giunzioni cellulari vengono stirati (in concomitanza dello stiramento delle cellule) durante la deformazione ciclica. Ciò permette il passaggio di piccole molecole idrofiliche. La permeabilità viene analizzata grazie al trasporto attraverso la membrana del sodio-FITC, mentre l'integrità della barriera con l'uso del destrano-RITC [55].

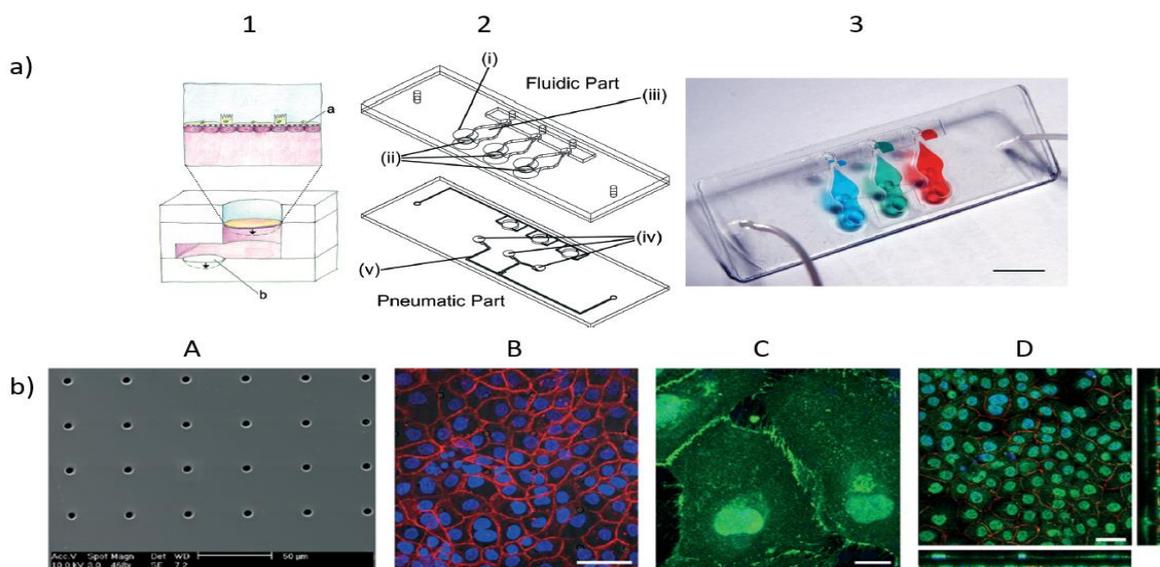


Fig. 14: a) Stress meccanico ciclico della membrana bioartificiale indotto dal micro-diaframma ((1), membrana alveolare bioartificiale (a) e micro-diaframma (b)), design del *lung on a chip* ((2), parte fluidica

costituita da tre pozzetti di coltura cellulari (i), membrane porose in PDMS (ii), camere basali (iii); parte pneumatica formata da tre micro-diaframmi (iv) e micro-canali (v)) e fotografia *lung on a chip* con soluzioni coloranti nelle camere basali (3). b) Immagine SEM della membrana in PDMS con 8 μm di pori (A), immunocolorazione delle cellule epiteliali per E-caderina (rosso) ed i nuclei (blu) (B), immunofluorescenza delle cellule endoteliali per VE-caderina (verde) e nuclei (blu) (C), immagine confocale della co-coltura con immunocolorazione per E-caderina (rosso), VE-caderina (verde) e nuclei (blu) [55].

7. **Zhang et al.**: *lung on a chip* per ricreare la struttura e le funzioni del polmone umano e valutare la tossicità delle nanoparticelle TiO_2 e ZnO . Il dispositivo microfluidico in PDMS è costituito da tre canali paralleli per l'introduzione delle cellule epiteliali (pneumociti) di tipo II (HPAEpiCs, alveolari umane), delle cellule endoteliali (HUVECs, vena ombelicale umana) e della matrice extracellulare (Matrigel per mimare la membrana basale e l'interazione cellulare con la nativa ECM negli alveoli; sciolto a 4°C ed iniettato nel canale). Prima dell'inserimento delle cellule, i canali vengono modificati effettuando un *coating* di chitosano e successivamente di collagene di tipo I. Dopo tre giorni di co-coltura, si formano un monolayer di cellule epiteliali (marcate positivamente per E-caderina) ed uno di cellule endoteliali (colorate positivamente per VE-caderina). Per studiare la permeabilità della barriera alle macromolecole, viene utilizzato il destrano marcato in modo fluorescente (aggiunto nel canale alveolare) sia in condizioni statiche che dinamiche (applicando un flusso di $10 \mu\text{l/h}$ all'interno del canale del vaso per mimare quello sanguigno). Le nanoparticelle vengono inserite nel canale alveolare e l'esposizione delle cellule epiteliali avviene per 24 ore, dopo le quali si valuta la presenza o meno di queste particelle all'interno del canale del vaso a diversi *time point*. L'esposizione alle nanoparticelle incrementa la generazione di ROS (specie reattive all'ossigeno) da parte delle cellule, in quanto le dimensioni ridotte e l'elevata area superficiale per unità di massa delle NPs portano ad una maggiore reattività e possibilità di formazione di radicali liberi (che potrebbero causare uno stress ossidativo sulle cellule). L'accumulo dello stress ossidativo può causare l'apoptosi delle cellule e di conseguenza la disfunzione della barriera. I risultati migliori, ovvero una ridotta permeabilità, si hanno con la coltura sottoposta alle condizioni dinamiche. L'integrità della membrana viene valutata tramite immunofluorescenza per l'espressione delle proteine delle giunzioni intercellulari [56].

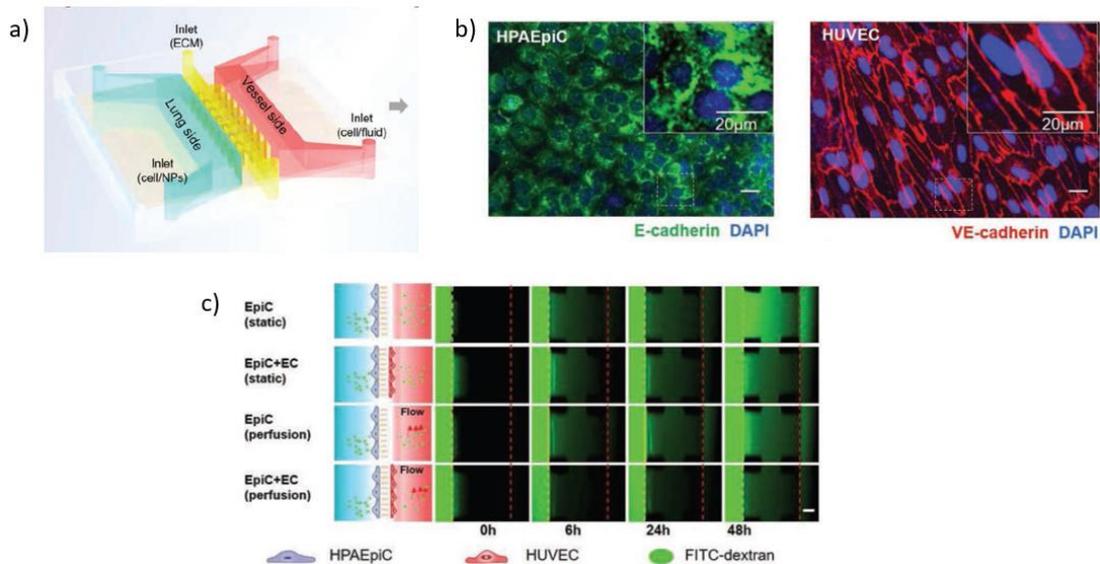


Fig. 15: a) Design *lung on a chip*; b) espressione delle proteine di giunzione (E-/VE-caderina) in condizioni di flusso continuo; c) immagini *time-lapse* del destrano attraverso l'interfaccia alveolo-capillare nel canale del vaso in varie condizioni (EpiC: HPAEpiC; EC: HUVEC) [56].

8. **Horvath et al.:** modello 3D della barriera alveolo-capillare realizzato tramite la tecnica del *bioprinting*. Quest'ultima consente di ottenere dei modelli cellulari standardizzati e riproducibili per lo screening ad alto rendimento, con la possibilità di controllare spazialmente e temporalmente la deposizione di biomateriali *layer-by-layer*. La co-coltura consiste in una deposizione controllata delle cellule epiteliali A549 (alveolari umane), delle cellule endoteliali EA.hy926 (linea cellulare umana dalla fusione di HUVEC e A549) e del sottile strato di Matrigel tramite la tecnica del *bioprinting*. Il *bioprinter* (BioFactory) utilizzato presenta una risoluzione nel range dei micrometri ($< 5 \mu\text{m}$), un piccolo volume stampabile (5-10 nl) ed è dotato di un'unità di temperatura controllata. Quest'ultima garantisce una temperatura costante (5°C) per i biomateriali termosensibili durante la procedura di stampa. Grazie alla microscopia a scansione laser viene eseguita un'analisi della morfologia cellulare, attraverso l'immunocolorazione delle cellule (per l'actina-F) e dei loro nuclei: le cellule epiteliali mostrano una morfologia cuboidale, mentre le endoteliali presentano una morfologia più piatta che permette di ricoprire una superficie di crescita maggiore. In questo modo si ottiene una distribuzione omogenea delle cellule (che formano mono-layer molto sottili) con un'elevata vitalità cellulare (analizzata misurando l'attività del lattato idrogenasi rilasciato dal citosol delle cellule danneggiate; la tecnica di stampa non intacca le cellule) ed una ridotta permeabilità della barriera bio-artificiale (testata tramite il trasporto del destrano blu dal sito apicale a quello basale della membrana) [57].

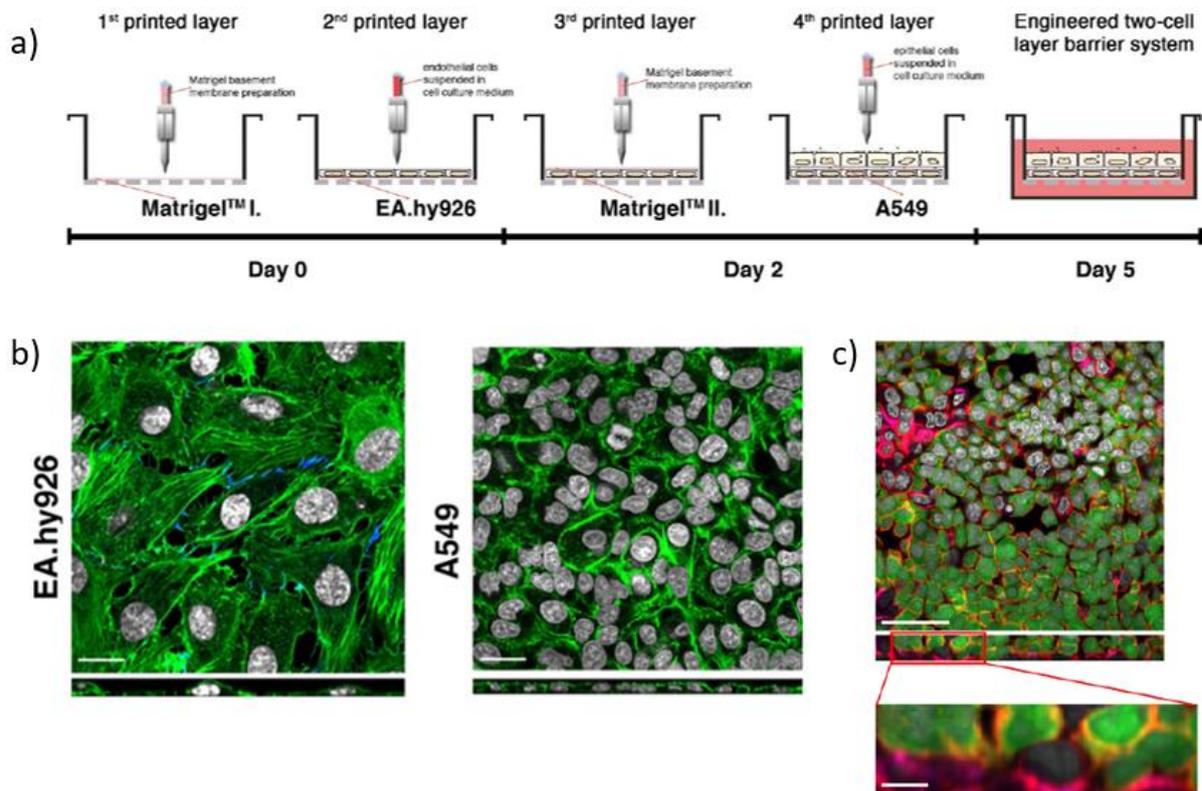


Fig. 16: a) Schema della sequenza temporale per il *bioprinting* dei due strati cellulari; b) immunocolorazione delle cellule per l'F-actina (citoscheletro, verde) e dei nuclei (grigio), scale bar 20 μm ; c) immunocolorazione delle cellule in co-cultura per l'F-actina (rosso) e nuclei (bianco), cellule epiteliali A549 in verde e cellule endoteliali EA.hy926 marcate per VE-caderina (rosa), scale bar 50 μm e 10 μm [57].

	CELLULE EPITELIALI	FONTE CELLULARE EPITELIALI	MEDIUM EPITELIALI	CELLULE ENDOTELIALI	FONTE CELLULARE ENDOTELIALI	MEDIUM ENDOTELIALI
1	SAEC (1.5×10^5 cells/well)	via aeree umane	1.5 ML SAGM + GF	HMVEC (2×10^5 cells/well)	microvascolari umane	2.5 ml EBM-2 + 10% FCS + 100U/ml PEN + 10 $\mu\text{g/ml}$ STREP + 0.01 $\mu\text{g/ml}$ EGF + 1 $\mu\text{g/ml}$ idrocortisone
2	A549 (1.6×10^5 cells/cm ²)	adenocarcin oma	DMEM + 10% FBS + mix	HUVEC (1.8×10^5 cells/cm ²)	vena ombelicale umana	Medium 200 PRF + LSGS +

		alveolare umano (ATII)	antibiotici/antimicotici			gentamicina/ amfotericina
3	NCI H441 (2×10^4 cells/cm ²)	adenocarcinoma polmonare umano	RPMI 1640 + L-glutammina + 10% FCS + 100 U/100 µg/ml PEN/STREP	HPMEC (5×10^4 cells/cm ²)	microvascolari da carcinoma polmonare umano	HPMEC (MCDB 131 + 15% FCS + 2mM glutamax + 100 U/100 µg/ml PEN/STREP + 10 µg/ml eparina + 2.5 µg/ml bFGF
4	NCI H441 (2×10^4 cells/cm ²)	adenocarcinoma polmonare umano	RPMI 1640 + 10% FCS + 1% PEN/STREP	ISO-HAS-1 (5×10^4 cells/cm ²)	emangiosarcoma microvascolare umane	RPMI 1640 + 10% FCS + 1% PEN/STREP
5	Calu-3 (5×10^4 cells/cm ²)	adenocarcinoma polmonare umano	RPMI 1640 + 10% v/v FCS inattivato al calore + 1% PEN/STREP	HPMEC-ST1.6R (2×10^4 cells/cm ²)	microvascolari umane	M199 + 20% v/v FCS inattivato al calore + 50 µg/ml VEGF + 25 µg/ml eparina di sodio + 1% v/v PEN/STREP
6	16HBE14o- (4×10^5 cells/cm ²)	bronchiali umane	MEM + 10% FCS + 1% L-glutammina + 1% PEN/STREP	pHUVEC (5×10^4 cells/cm ²)	vena ombelicale umana	EBM-2 + 2% FCS + GF
7	HPAEpiC (1×10^5 cells)	pneumociti II di tessuto polmonare umano	RPMI 1640 + 10% FCS	HUVEC (1×10^5 cells)	cordone ombelicale umano	ECM (Endothelial Cell Medium)
8	A549 (4.5×10^6 cells/ml)	Adenocarcinoma alveolare umano (ATII)	RPMI 1640 + 10% v/v FCS + 1% v/v L-glutammina	EA.hy926 (4.5×10^6 cells/ml)	linea cellulare umana ibrida da fusione di HUVEC e A549	DMEM + 10% v/v FCS + 1% v/v L-glutammina + 1% v/v PEN/STREP

a + 1% v/v
PEN/STREP

Tabella 1: Dati acquisiti dalla letteratura riguardo la combinazione di cellule epiteliali ed endoteliali per la realizzazione *in vitro* della barriera alveolo-capillare.

1.3. OBIETTIVO DEL LAVORO

L'obiettivo di questo lavoro è quello di realizzare matrici nanofibrose a base di policaprolattone/gelatina tramite la tecnica dell'elettrospinning, con l'idea di ricreare *in vitro* la membrana basale della barriera alveolo-capillare. All'inizio del percorso sperimentale, sono state effettuate delle prove utilizzando il collagene come polimero naturale. Tuttavia non avendo ottenuto dei risultati soddisfacenti, si è deciso di cambiare materiale e di utilizzare la gelatina insieme al PCL per aumentarne le proprietà meccaniche e la stabilità in ambiente acquoso. Quest'ultime saranno valutate *in vitro* sia in condizioni statiche che dinamiche, per simulare al meglio il comportamento *in vivo* della membrana basale.

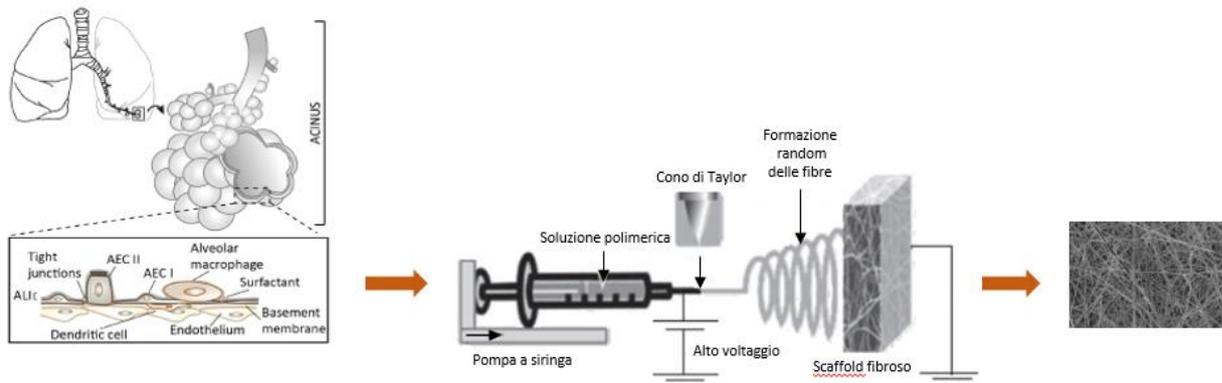


Fig. 17: Schema riassuntivo dell'obiettivo del lavoro.

II. MATERIALI E METODI

2.1. MATERIALI

2.1.1. Gelatina

In questo lavoro di tesi è stata utilizzata la gelatina acquistata dalla *Sigma-Aldrich*, le cui proprietà sono riportate in Tabella 2.

Gelatina – Sigma-Aldrich

<i>Forma</i>	polvere
<i>Origine</i>	Pelle suina
<i>Tipo</i>	A
<i>Solubilità in acqua</i>	50 mg/ml

Tabella 2: Proprietà gelatina (GEL).

La gelatina è una proteina che si ottiene dalla degradazione termica o enzimatica oppure da processi di parziale idrolisi del collagene (principale costituente della ECM dei tessuti connettivi) mediante trattamenti acidi o alcalini. Viene comunemente usata nell'industria farmaceutica, alimentare e cosmetica grazie alla sua biocompatibilità e biodegradabilità in ambienti fisiologici. La gelatina commerciale è ottenuta dai tessuti dei mammiferi (es. pelle/ossa di bovini o suini), ma negli ultimi anni anche da organismi marini (es. pelle di pesci, calamari, meduse). In commercio si trova sotto forma di polvere, fogli o grani. La gelatina è composta da circa il 90% di proteine, l'1-2% di sali minerali, mentre il resto è acqua. La sua struttura chimica è costituita dalla ripetizione della sequenza amminoacidica lineare Glicina-X-Y, in cui generalmente X corrisponde alla prolina e Y all'idrossiprolina.

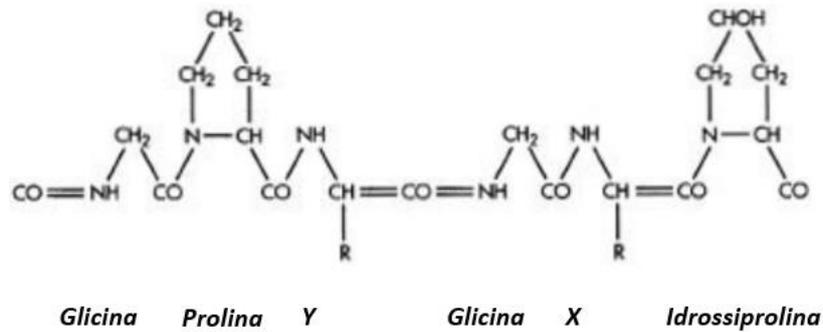


Fig. 18: Struttura chimica della gelatina.

La denaturazione del collagene avviene attraverso due processi differenti, il trattamento termico e l'idrolisi. Il trattamento termico (a circa 40°C) porta alla rottura dei legami idrogeno presenti all'interno della struttura fibrillare del collagene posto a contatto con l'acqua. In questo modo, la struttura a tripla elica (catene α) del collagene viene scomposta in una o più catene polipeptidiche distribuite casualmente (conformazione *random coil*). La temperatura di denaturazione dipende dal contenuto di aminoacidi della fonte (ad es. suino, bovino) e dal tipo di collagene (es. I, IV). Il processo idrolitico causa invece la rottura dei legami covalenti presenti all'interno delle catene polipeptidiche del collagene in condizioni acide o alcaline. Il processo acido porta alla formazione della gelatina di tipo A (gelatina basica, punto isoelettrico a pH 9, carica positiva a pH fisiologico), immergendo il collagene in una soluzione acida diluita di un acido forte (es. acido cloridrico o acido solforico) a pH 4. D'altra parte, il processo alcalino consente la formazione della gelatina di tipo B (gelatina acida, punto isoelettrico a pH 5, carica negativa a pH fisiologico), la quale presenta meno impurità ed un maggior numero di gruppi carbossilici. La gelatina di tipo A si ricava dalla pelle suina, mentre quella di tipo B da pelle bovina. In base al tipo di collagene da cui deriva e al processo di denaturazione, la gelatina presenta una differente struttura macromolecolare eterogenea e casuale, con un peso molecolare che varia da migliaia ad oltre un milione di Dalton. In seguito al processo di denaturazione, la gelatina viene filtrata, disidratata, sterilizzata ed infine essiccata. Inoltre, la gelatina è un idrocolloide molto versatile e, essendo termo-reversibile, può formare dei gel al variare della temperatura. Normalmente gelifica a temperature al di sotto dei 37°C, mentre all'aumentare della temperatura presenta una bassa viscosità intrinseca (si scioglie ritornando allo stato liquido) [58].

La gelatina è largamente impiegata come biomateriale naturale nel *tissue engineering*, grazie alla sua elevata biodegradabilità, biocompatibilità, bioattività (favorisce adesione e crescita cellulare) e scarsa antigenicità. Tuttavia, essendo solubile in acqua ed avendo scarse proprietà meccaniche, la gelatina necessita di un processo di reticolazione.

2.1.2. Policaprolattone (PCL)

In questo lavoro di tesi è stato utilizzato il policaprolattone (PCL), acquistato dalla *Sigma-Aldrich*. Le proprietà del PCL sono riportate in Tabella 3.

PCL- Sigma-Aldrich

<i>Forma</i>	pellet
<i>PM medio</i>	80 kDa

Tabella 3: Proprietà PCL

Il (PCL) è un polimero idrofobo, biodegradabile e biocompatibile che ha suscitato molto interesse nelle applicazioni biomedicali, data l'elevata solubilità in molti solventi organici e la bassa temperatura di fusione. Fa parte della famiglia dei poliesteri alifatici e si ottiene dalla polimerizzazione ad apertura di anello del monomero ciclico ϵ -caprolattone ($C_6H_{10}O_2$), utilizzando l'ottoato stannoso come catalizzatore [59]. È costituito da cinque gruppi di metilene non polari ed un singolo gruppo estere relativamente polare, il quale essendo idroliticamente instabile rende il polimero biodegradabile in condizioni fisiologiche. Grazie alla sua lenta degradazione, il PCL risulta essere un materiale molto utile sia per applicazioni a lungo termine che per sistemi a rilascio di farmaco controllato. È un polimero termoplastico semicristallino con una temperatura di fusione tra i 59 e i 64°C ed una temperatura di transizione vetrosa di -60°C [60]. A basse temperature mostra quindi ottime proprietà meccaniche, tra cui flessibilità e tenacità. Inoltre, il PCL è altamente miscibile e compatibile con una vasta gamma di altri polimeri [61].

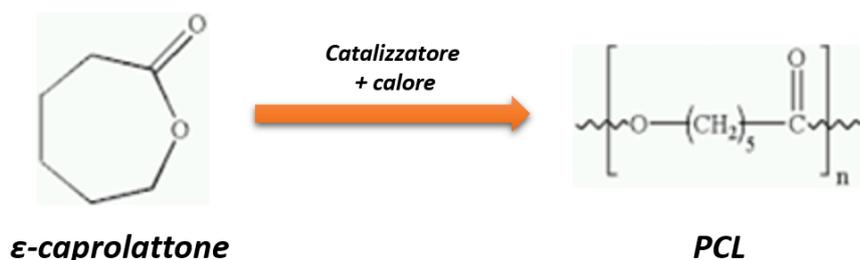


Fig. 19: Schema della polimerizzazione ad apertura di anello tramite cui si ottiene il PCL.

2.1.3. γ -glicidossipropiltrimetossisilano (GPTMS)

Per la reticolazione della gelatina, è stato utilizzato il γ -glicidossipropiltrimetossisilano prodotto dalla *Sigma-Aldrich* (proprietà evidenziate nella Tabella 4).

GPTMS - Sigma-Aldrich

<i>Purezza</i>	98%
<i>Forma</i>	Liquido
<i>Densità</i>	1.07 g/ml a 25°C

Tabella 4: Proprietà GPTMS.

Il GPTMS è un agente reticolante di natura siliconica, usato per la reticolazione di polimeri naturali (es. gelatina) per realizzare membrane biocompatibili e stabili in ambiente acquoso.

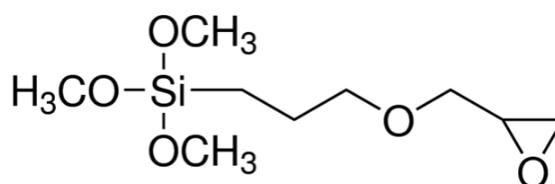


Fig. 20: Struttura chimica del GPTMS.

Il processo di interazione tra la gelatina ed il GPTMS è stato riportato nel lavoro svolto da Tonda-Turo e collaboratori [62]. Il GPTMS è utilizzato come *cross-linker* per la gelatina, aggiungendolo alla soluzione polimerica (gelatina-acqua) prima di processarla tramite l'elettrospinning. Rispetto ad altri reticolanti che possono essere impiegati (es. genipina), l'aggiunta del GPTMS non comporta delle variazioni nella viscosità della soluzione durante la lavorazione. Di fatti, la fase finale della reticolazione (reazione di condensazione) si verifica durante l'evaporazione del solvente, prima che le fibre vengano raccolte sul collettore. Il processo di reticolazione della gelatina avviene in due *step* consecutivi. Inizialmente, gli anelli di ossirano (ossido di etilene, C_2H_4O) presenti all'interno delle molecole di GPTMS reagiscono con i gruppi amminici ($-NH_2$) delle catene di gelatina. La reazione di idrolisi dei gruppi trimetossi ($Si-H_3CO$) dell'agente reticolante dà origine a gruppi pendenti di silanolo ($Si-OH$), tramite una reazione catalizzata da acido.

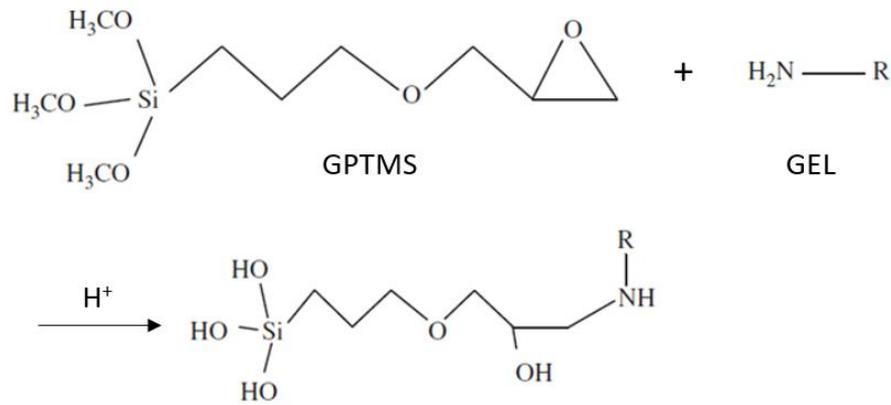


Fig. 21: Primo *step* del processo di reticolazione della gelatina tramite il GPTMS: reazione di idrolisi in ambiente acido dei gruppi trimetossi del GPTMS.

In seguito, durante l'evaporazione del solvente due gruppi silanolo condensano formando dei legami Si-O-Si. Quest'ultimi sono dei legami covalenti che si generano tra le catene e che permettono di ottenere una struttura reticolata e stabile [62].

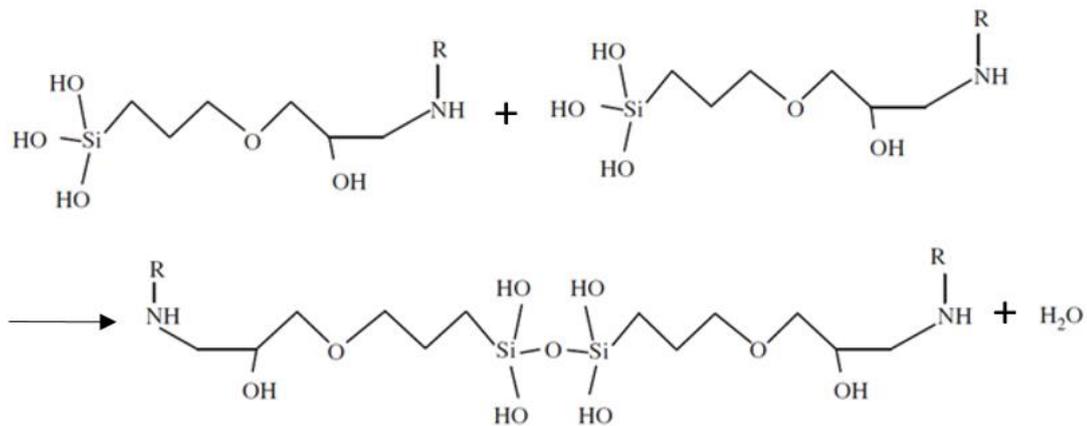


Fig. 22: Secondo *step* del processo di reticolazione della gelatina tramite il GPTMS: condensazione di due gruppi silanolo per formare i legami Si-O-Si.

2.2. METODI

Al fine di realizzare e caratterizzare le membrane nanofibrose, tutta la strumentazione necessaria è stata messa a disposizione dal Politecnico di Torino, presso i laboratori del DIMEAS (Dipartimento di Ingegneria Meccanica e Aerospaziale).

2.2.1. Preparazione delle soluzioni polimeriche

Partendo da protocolli ottenuti dalla letteratura e già ottimizzati, sono state realizzate le tre soluzioni polimeriche di PCL/GEL, gelatina (GEL) e PCL.

2.2.1.1. PCL/GEL

La soluzione di PCL/GEL è stata ottenuta disperdendo i due polimeri (PCL e GEL) al 15% w/v (rispettivamente in rapporto 80:20 w/w) in una miscela di acido acetico e acido formico (in rapporto 1:1 v/v), rispettivamente $C_2H_4O_2$ e CH_2O_2 . I pellet di PCL e la polvere di gelatina sono stati inseriti all'interno di un becher, aggiungendo successivamente l'acido acetico e l'acido formico. La soluzione è stata posta in agitazione a 250 rpm per circa 24h, in seguito alle quali è stato aggiunto il GPTMS ad una concentrazione di 3.68% v/v sul volume totale della soluzione. Infine, la miscela è stata mantenuta in agitazione per altri 30 minuti. In questo modo, le catene polimeriche della gelatina si sono intrecciate con quelle presenti nella fase del PCL, formando una soluzione miscibile e trasparente.

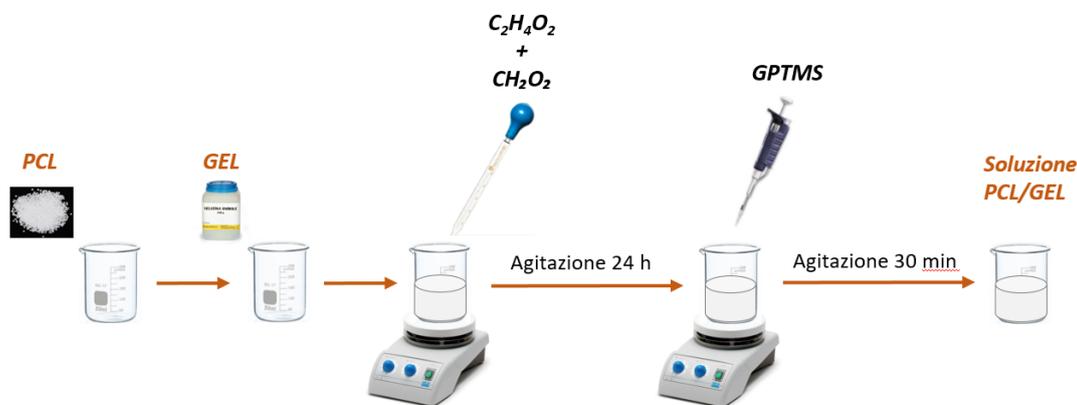


Fig. 23: Rappresentazione schematica della preparazione della soluzione di PCL/GEL.

2.2.1.2. Gelatina

In Fig. 24 vengono mostrati i passaggi principali del protocollo utilizzato per la realizzazione della soluzione polimerica a base di gelatina (GEL). È stata preparata una soluzione di gelatina al 15% w/v disciolta in acqua bidistillata (H_2O) e sottoposta ad un'agitazione di 250 rpm per un'ora. Una volta sciolta la gelatina, è stato aggiunto il GPTMS (92 μ l per grammo di GEL) alla soluzione [62], ponendola

nuovamente in agitazione a 250 rpm per 30 minuti. L'intero procedimento è stato svolto ad una temperatura di 50°C al fine di evitare la gelificazione della gelatina.

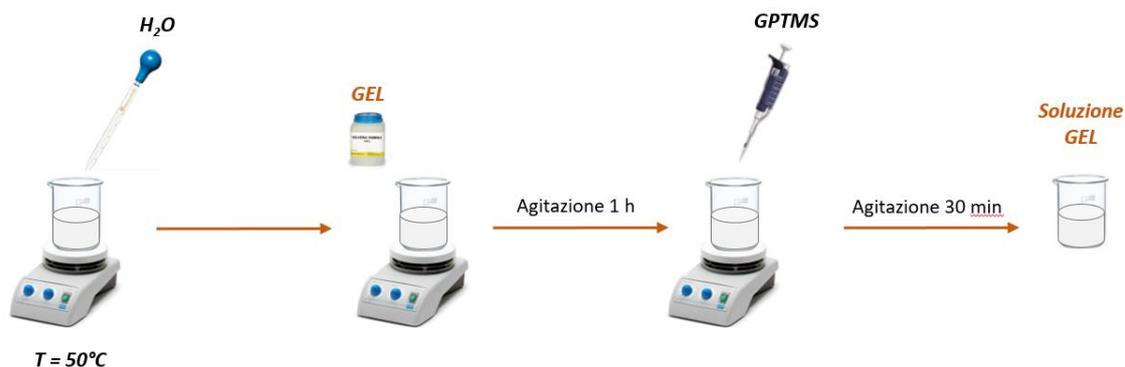


Fig. 24: Rappresentazione schematica della preparazione della soluzione di gelatina.

2.2.1.3. PCL

La soluzione a base di PCL è stata realizzata miscelando il PCL al 12% w/v in una soluzione di cloroformio e acido formico (con rapporto 70:30 v/v). Inizialmente il PCL è stato inserito all'interno del becher contenente il cloroformio (CHCl_3) e successivamente la miscela è stata posta in agitazione a 250 rpm per circa un'ora, dopo la quale è stato aggiunto l'acido formico (CH_2O_2). In seguito, la soluzione è stata mantenuta in agitazione a 250 rpm per ulteriori 30 minuti.



Fig. 25: Rappresentazione schematica della preparazione della soluzione di PCL.

2.2.2. Realizzazione delle membrane

2.2.2.1. *Strumentazione del processo di elettrospinning*

Le soluzioni ottenute tramite i protocolli precedentemente descritti sono state elettrofilate grazie alla tecnica dell'elettrospinning.

L'apparecchiatura che permette di effettuare il processo dell'elettrospinning prevede l'utilizzo di diverse componenti:

- **Siringa:** in plastica o vetro (in relazione al tipo di solvente usato) con un volume di 5 ml e dotata di un ago da 0,8 mm (21G); al suo interno viene introdotta la soluzione polimerica da elettrofilare.
- **Pompa volumetrica:** impone una pressione continua sullo stantuffo della siringa, consentendo così di estrarre la soluzione ad una determinata velocità costante (Linari Engineering s.r.l.).
- **Generatore di tensione:** genera una differenza di potenziale tra 0 kV e 60 kV, in base al voltaggio desiderato (Linari Engineering s.r.l.).
- **Collettore piano:** piastra in plastica (200 x 300 mm²) rivestita da un foglio di alluminio per consentire la deposizione random delle nanofibre.
- **Cappa di ventilazione:** al cui interno sono presenti tutte le componenti tranne il generatore di tensione; consente di regolare sia la ventilazione (per l'aspirazione dei solventi che evaporano durante il processo) che la temperatura.

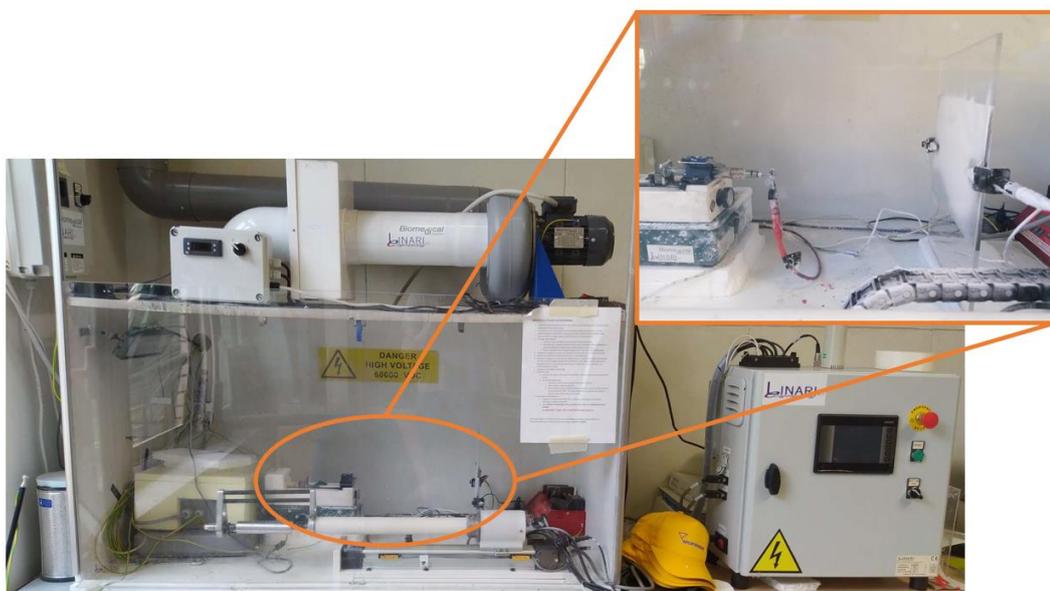


Fig. 26: Apparecchiatura dell'elettrospinning tramite cui sono state realizzate le membrane nanofibrose.

Una volta collocata la siringa sulla pompa, un elettrodo dell'alimentatore è stato collegato all'ago e gli altri due al collettore. Successivamente, sono stati impostati i parametri di processo per realizzare le membrane elettrofilate.

2.2.2.2. Parametri di processo

Le membrane nanofibrose, realizzate a partire dalle tre diverse soluzioni polimeriche, sono state ottenute impostando i parametri di processo riassunti in Tabella 5. In seguito, le membrane sono state caratterizzate dal punto di vista morfologico e meccanico.

	<i>Voltaggio</i>	<i>Flow rate</i>	<i>Distanza ugello-collettore</i>	<i>Ventilazione</i>
<i>PCL/GEL</i>	21 kV	0.508 ml/h	12 cm	10
<i>Gelatina</i>	30 kV	1.53 ml/h	20 cm	-
<i>PCL</i>	20 kV	1.02 ml/h	20 cm	10

Tabella 5: Parametri di processo impostati per l'elettrospinning.

2.2.3. Caratterizzazione morfologica delle membrane

2.2.3.1. Microscopia a scansione elettronica (SEM)

La microscopia a scansione elettronica è una tecnica non distruttiva che permette di eseguire analisi morfologiche delle superfici, sfruttando l'interazione tra il campione in esame ed un fascio di elettroni. Il potere di risoluzione di un microscopio elettronico è inversamente proporzionale alla lunghezza d'onda della radiazione utilizzata. Pertanto, nel SEM vengono impiegati gli elettroni che, grazie alla loro lunghezza d'onda molto inferiore rispetto ad esempio a quella dei fotoni di un microscopio ottico, consentono di ottenere un'ottima risoluzione anche a profondità di campo maggiori, garantendo una buona tridimensionalità delle immagini acquisite ed elevati ingrandimenti.

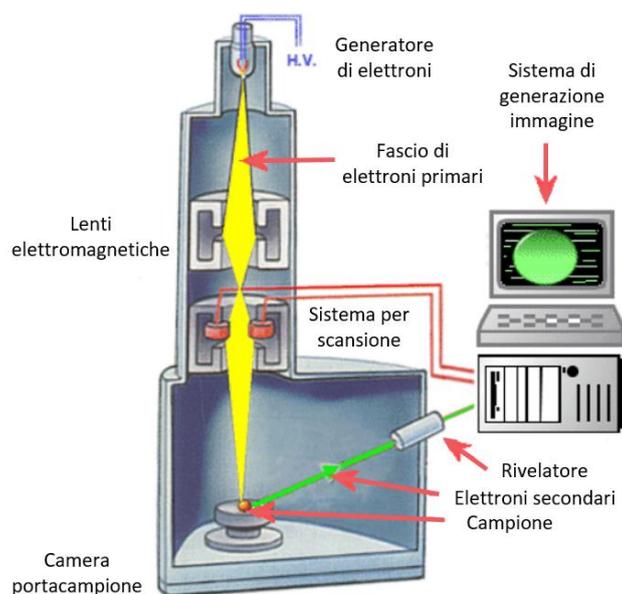


Fig. 27: Schema del processo di acquisizione delle immagini al SEM.

Il fascio di elettroni viene prodotto al catodo da una sorgente presente in cima ad una colonna elettronica, lunga circa un metro. La sorgente è costituita da un filamento in tungsteno che, una volta riscaldato, emette degli elettroni primari per effetto termoionico. Applicando una certa differenza di potenziale tra l'anodo ed il catodo, gli elettroni vengono accelerati fino ad acquisire un'energia dell'ordine dei keV e vengono attratti da un anodo collocato al di sotto del filamento. Il fascio divergente di elettroni primari viene successivamente focalizzato su un'area molto piccola del campione tramite un sistema di lenti elettromagnetiche, che consente di ridurre il diametro fino a qualche nanometro. All'estremità inferiore della colonna, una lente obiettivo (sistema di bobine) permette una deflessione controllata del fascio e di conseguenza una scansione riga per riga (percorso a linee parallele ed equidistanti) della superficie del campione. Il fascio viene quindi focalizzato dalla lente finale e, uscendo dalla colonna, va a colpire il provino presente all'interno di una camera porta-campione. Nell'istante in cui il fascio colpisce la superficie, gli elettroni interagiscono con gli atomi del campione perdendo la loro energia. In risposta all'interazione tra gli elettroni del fascio e la materia costituente il campione, avviene l'emissione di elettroni retrodiffusi (backscattered), raggi X ed elettroni secondari.

Gli **elettroni retrodiffusi** sono degli elettroni ad elevata energia (dell'ordine dei keV) che appartengono al fascio primario ed emergono dalle regioni più profonde del provino. L'intensità di questi elettroni è correlata al numero atomico degli elementi del materiale di cui è costituito il campione, fornendo così un'analisi qualitativa della composizione chimica.

I **raggi X** vengono emessi dal campione in seguito alla ionizzazione degli atomi presenti nelle orbite più interne. In questo modo si ottiene un'analisi chimica puntuale dell'oggetto in esame, risalendo quindi alla sua composizione elementare (ogni spettro di energie dei raggi X è riconducibile ad una determinata specie atomica).

Gli **elettroni secondari** hanno una bassa energia (qualche decina di eV) e provengono dalle aree più superficiali del campione. Essi vengono catturati da un rivelatore (*detector*) e convertiti in segnali elettrici. L'intensità di questi segnali, essendo governata dalla morfologia del campione, consente di ricostruire la topografia superficiale in un'immagine 3D in bianco e nero mostrata su un monitor (ogni pixel è associato ad un punto del campione). L'ingrandimento è dato dal rapporto tra la dimensione dell'immagine mostrata sullo schermo e quella dell'area del campione scansionata (più è piccola l'area più alto sarà l'ingrandimento).

L'intero processo, che permette di ottenere le immagini al SEM, deve svolgersi in vuoto spinto. Quest'ultimo rappresenta una condizione fondamentale affinché non vi siano elementi contaminanti (es. altri atomi o molecole) che, interagendo con gli elettroni del fascio primario, potrebbero causare una ridotta risoluzione dell'immagine. Un altro aspetto essenziale riguarda il trattamento a cui i campioni sono sottoposti prima di essere analizzati al SEM. Di fatti, i campioni non conduttivi devono essere rivestiti con un sottile strato di materiale metallico (solitamente oro), depositato sul campione mediante *sputtering* [63][64][65][66].

In questo percorso sperimentale, il microscopio a scansione elettronica è stato utilizzato per valutare la morfologia delle membrane elettrofilate di PCL/GEL, GEL e PCL. Ogni campione è stato ottenuto ritagliando una piccola porzione della membrana, per poi posizionarlo su uno *stub* precedentemente rivestito con un nastro biadesivo conduttivo. Prima di procedere all'acquisizione delle immagini, è stato eseguito il processo di *sputtering* (strumento Agar Auto Sputter Coater) per la deposizione di un sottile strato di oro sui campioni per produrre una superficie conduttiva; dunque, sono stati impostati una corrente di 30 mA ed un tempo di lavoro di 50 secondi. Successivamente, si è proceduto all'analisi dei campioni posizionandoli all'interno della camera porta-campione del microscopio LEO 435VP SEM. Sono state acquisite così delle immagini a diversi ingrandimenti (1000x, 2000x e 5000x), impostando dall'operatore una distanza di 15 mm tra la lente e il campione ed una tensione del fascio di 20 kV.

2.2.3.2. *Analisi delle immagini*

Le immagini ricavate al SEM sono state successivamente analizzate attraverso il software *ImageJ* per valutare le dimensioni dei diametri delle fibre. Sulle immagini delle membrane ad ingrandimento 5000x, sono stati misurati 30 diametri per ogni materiale grazie al comando *analyze-measure*. I dati acquisiti sono stati riportati su *Excel* al fine di calcolare diametro medio e deviazione standard, grazie ai quali è stato possibile realizzare gli istogrammi relativi alla distribuzione dei diametri dei tre diversi campioni.

2.2.4. Prove meccaniche

Al fine di valutare le proprietà meccaniche delle membrane elettrofilate, sono state effettuate delle prove di trazione sia statiche che dinamiche (cicliche) su campioni tagliati ad osso di cane. Le dimensioni dei provini sono state misurate mediante un calibro digitale, ottenendo una larghezza di 4 mm, un tratto utile di 15 mm ed uno spessore variabile. Per le due tipologie di test meccanici, sono state svolte tre prove per i campioni di PCL/GEL e GEL, mentre per il PCL solo una a causa della mancanza di materiale in quel preciso momento. Queste, di fatti, sarebbero dovute essere delle prove preliminari, che quindi andrebbero ripetute. Dopo aver acquisito i dati durante i test ed averli processati tramite *Excel* (normalizzandoli in funzione del tratto utile e dell'area trasversale dei provini), sono state ricavate per ogni materiale le curve sforzo-deformazione ed il relativo modulo elastico (o modulo di Young, in MPa). Quest'ultimo è stato calcolato come coefficiente angolare del tratto lineare di ogni curva e moltiplicato per 10^2 . Infine, per i campioni di PCL/GEL e GEL sono stati calcolati media e deviazione standard dei moduli di Young.

2.2.4.1. *Prove di trazione statiche*

Il dispositivo MTS QTest/10 permette di svolgere delle prove di trazione uniassiale in maniera statica. Il sistema prevede il fissaggio di ogni campione in posizione verticale tra i morsetti dei due afferraggi, collegati rispettivamente alla traversa fissa (inferiore) e a quella mobile (superiore). Quest'ultima durante il test si muove verso l'alto, allontanandosi dalla traversa inferiore ad una certa velocità di spostamento (precedentemente impostata) e causando una deformazione nel provino. Il provino viene quindi sottoposto ad un carico monoassiale (opposto alla forza di trazione) inizialmente nullo e che incrementa fino ad un valore massimo, portando alla rottura del campione.



Fig. 28: Dispositivo MTS MTS QTest/10 utilizzato per i test di trazione statica.

La velocità di spostamento della traversa mobile è stata impostata a 2 mm/min. Inoltre, la traversa mobile è collegata ad una cella di carico da 10 N, che permette di misurare e controllare la forza applicata al provino, mentre un estensimetro ne rileva l'allungamento. In questo modo, per ogni campione sono stati ottenuti istante per istante i valori della forza in funzione dell'allungamento percentuale mediante l'utilizzo del software *TestWorks 4*.

2.2.4.2. *Prove di trazione dinamiche (cicliche)*

Il dispositivo Bose ElectroForce 3200 consente di predire il comportamento meccanico di costrutti polimerici per confrontarlo con quello dei tessuti biologici, con un principio di funzionamento simile al dispositivo precedentemente descritto. Il sistema è costituito da un banco di prova su cui poggiano un motore lineare a magnete permanente, due traverse mobili ed una cella di carico. Il campione viene fissato ai morsetti degli afferraggi collegati alle due traverse mobili, le quali agiscono imponendo ciclicamente sul provino una forza contrapposta. In questo caso, non è di interesse il raggiungimento del punto di rottura del provino. La cella di carico funge da sensore, parallelamente al motore, per la rilevazione delle forze che agiscono durante la prova. Grazie all'azione combinata del motore e della cella di carico e all'ausilio del software *WinTest*, è possibile impostare una certa

deformazione con una determinata velocità ed ampiezza. Questo sistema permette quindi di acquisire istante per istante le grandezze fisiche di interesse, in questo caso la forza in funzione della deformazione.



Fig. 29: Dispositivo Bose ElectroForce 3200 utilizzato per i test a trazione ciclici [67].

Le prove di trazione monoassiali dinamiche sono state effettuate per mimare le condizioni fisiologiche della membrana basale durante i movimenti respiratori. È stata impostata una deformazione del 10% con una frequenza di campionamento di 0.2 Hz, utilizzando una cella di carico da 220 N. Per ogni campione sono stati eseguiti 40 cicli di deformazione.

2.2.5. Angolo di contatto

La micro/nano-struttura superficiale di un qualsiasi oggetto influenza le sue proprietà fisiche, come ad esempio la bagnabilità. Quest'ultima rappresenta la capacità di un liquido di bagnare parzialmente o completamente la superficie su cui viene depositato. Una volta depositata, la goccia tende ad assumere una forma simmetrica su superfici piane orizzontali o asimmetrica su superfici inclinate. La grandezza termodinamica che quantifica la bagnabilità è l'angolo di contatto, descritto come l'angolo tra il substrato solido e la tangente al punto in cui la goccia interseca la superficie. Il valore dell'angolo di contatto è dato quindi dall'interazione dei tre elementi presenti (aria, liquido, solido) ed in particolar modo dalle forze superficiali che ognuno di essi genera.

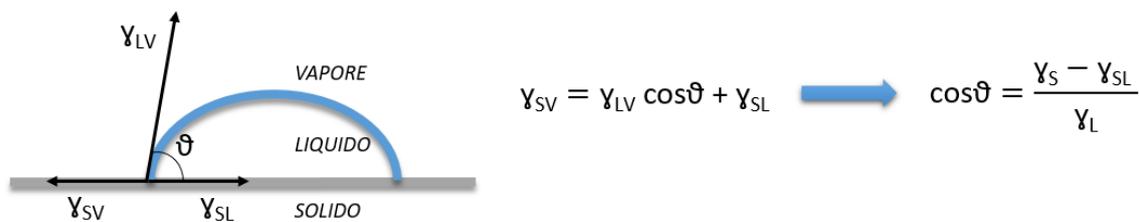


Fig. 30: Rappresentazione delle tensioni relative alle tre interfacce e la corrispettiva formula di Young.

La bagnabilità di una superficie orizzontale ideale (liscia ed omogenea) è descritta dall'equazione di Young: il coseno dell'angolo di contatto nello stato di equilibrio (ϑ) è direttamente proporzionale alla differenza delle tensioni superficiali delle interfacce solido-vapore (γ_{SV}) e solido-liquido (γ_{SL}), ed inversamente proporzionale alla tensione dell'interfaccia liquido-vapore (γ_{LV}). Ognuna di queste tensioni superficiali indica la forza interfacciale per unità di lunghezza. In genere però l'aria non viene considerata (è uguale per tutti i sistemi), per cui si valuta solo l'interazione liquido-solido. In base al valore dell'angolo di contatto (tra 0° e 180°), una superficie può essere definita super-idrofilica (se $\vartheta < 5^\circ$), idrofilica (se $\vartheta < 90^\circ$), idrofobica (se $\vartheta > 90^\circ$) oppure super-idrofobica (se $\vartheta > 150^\circ$). Dunque, la bagnabilità è massima quando $\vartheta=0^\circ$ ed è nulla quando $\vartheta=180^\circ$. Sulle superfici idrofile la goccia viene parzialmente assorbita, mentre su quelle idrofobe la goccia non viene assorbita ed assume una forma tondeggiante [48].

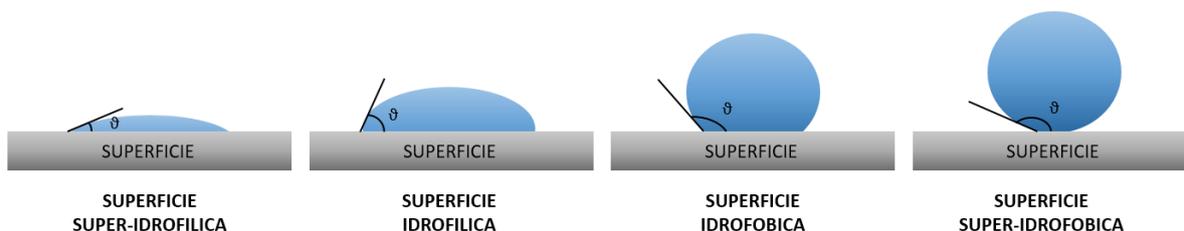


Fig. 31: Rappresentazione schematica della bagnabilità al variare dell'angolo di contatto.

In questo lavoro sperimentale, è stata valutata la bagnabilità delle membrane elettrofilate dei tre diversi materiali (gelatina, PCL, PCL/GEL) calcolando l'angolo di contatto a temperatura ambiente grazie al dispositivo KSV CAM 200. I campioni sono stati ottenuti ritagliando delle porzioni rettangolari dalle membrane, per poi fissarli su dei vetri tramite uno scotch biadesivo. I campioni successivamente sono stati posizionati sul supporto orizzontale e mobile del dispositivo. Tramite la procedura *sessile drop* del software *Advance*, tre gocce di liquido sono state depositate sulla superficie di ogni campione per azione di una pompa a siringa (diametro ago 0.5 mm). Il dispositivo, essendo dotato di una fotocamera ad alto frame-rate (fino a 100 fotogrammi al secondo) ed una sorgente di luce LED (per illuminare la goccia), ha permesso di ottenere un'analisi grafica degli angoli

di contatto attraverso una misura del profilo delle gocce di liquido sulla superficie dei campioni. Come liquido di test è stata utilizzata l'acqua deionizzata, con un volume di 2 μl . Oltre all'angolo medio, sono stati valutati e confrontati tra loro anche gli angoli al tempo 0 (stato di equilibrio) e l'angolo dopo 3.20 secondi, con lo scopo di osservare il comportamento della goccia sulle superfici con il trascorrere del tempo.



Fig. 32: Dispositivo KSV CAM 200 utilizzato per l'angolo di contatto.

2.2.6. Prove di degradazione

Per valutare la stabilità nel tempo in ambiente acquoso (in condizioni simili a quelle fisiologiche), le membrane elettrofilate sono state sottoposte ad una degradazione idrolitica *in vitro*. Le membrane nanofibrose dei tre differenti materiali sono state staccate dal collettore e tagliate in campioni di dimensione 2 x 2 cm^2 . Successivamente, ogni campione è stato immerso in 2 ml di PBS (tampone fosfato salino) all'interno di una *bijoux* in plastica e posto in incubatore a 37°C a diversi *time step* (24 ore, 72 ore, 1 settimana). Trascorso il tempo di incubazione, il PBS è stato rimosso dai campioni per eseguire in seguito l'essiccazione. Quest'ultima è stata effettuata utilizzando l'etanolo a concentrazioni crescenti (30, 50, 70, 80, 90, 95 e 100%) a *time step* da 15 minuti ciascuno; tra uno *step* e l'altro, è stato rimosso l'etanolo ed inserito quello a concentrazione maggiore. Infine, la morfologia dei campioni degradati è stata valutata al SEM e confrontata con quella delle membrane non degradate.

2.2.7. Bioreattore IVTech

Un modello *in vitro*, per essere fisiologicamente rilevante e predittivo, dovrebbe essere in grado di replicare i principali stimoli che agiscono sulle cellule all'interno del corpo umano. Ciò è possibile grazie all'uso dei bioreattori, i quali forniscono alle cellule un ambiente dinamico facilmente controllabile e riproducibile. Pertanto, un bioreattore deve garantire l'applicazione di adeguati stimoli chimico-fisici, il controllo delle variabili ambientali (pressione, temperatura, pH) e una valida distribuzione spaziale delle cellule su costrutti tridimensionali [68].

La tecnologia **IVTech** si basa sull'impiego di camere di coltura compatte e facilmente utilizzabili, con dimensioni e forma paragonabili a quelle dei pozzetti di una piastra Transwell. In particolare, il bioreattore IVTech è costituito da una pompa peristaltica, due reservoir per il ricambio del medium ed una camera di coltura; queste componenti sono collegate tra loro attraverso quattro circuiti fluidici (tubi in PDMS). Questo è un bioreattore a doppio flusso normalmente usato per simulare *in vitro* le barriere fisiologiche, come ad esempio l'epitelio intestinale, quello polmonare o l'epidermide.



Fig. 33: Camera di coltura LB2.

La camera di coltura **LiveBox2** (LB2) è una camera trasparente progettata per colture cellulari dinamiche. È dotata di due ingressi e due uscite per il medium di coltura ed un supporto rimovibile, detto *holder*, per alloggiare la membrana porosa. Quest'ultima viene posta al centro della camera di coltura, tra il compartimento apicale e quello basale. Inoltre, è possibile lavorare sia in condizioni di interfaccia aria-liquido (ALI) che liquido-liquido (LLI). Pertanto, il compartimento apicale e quello basale vengono perfusi con due flussi (paralleli, diversi ed indipendenti) in direzione tangenziale. Il fondo della camera di coltura è rimovibile e, essendo in vetro trasparente, permette l'*imaging* dal vivo durante la coltura dinamica [69].

LiveBox2

Volume [ml]	2.5
Condizioni di interfaccia	ALI, LLI
Diametro membrana [mm]	25
Spessore membrana [mm]	> 0.1

Tabella 6: Specifiche camera di coltura LiveBox2.

La pompa peristaltica **LiveFlow** è un dispositivo compatto con dimensioni e peso ridotti. Presenta due teste di pompaggio rimovibili, ciascuna delle quali consente di guidare due circuiti fluidici indipendenti. Il LiveFlow è dotato anche di un cassetto in cui si possono inserire fino a quattro camere di coltura, con la possibilità quindi di eseguire più esperimenti in parallelo. Un'interfaccia molto intuitiva, tramite un display ed un paio di pulsanti, consente di selezionare i due *flow rate* in un intervallo tra i 100 e i 450 $\mu\text{l}/\text{min}$ [70].



Fig. 34: Pompa peristaltica LiveFlow.

LiveFlow

Dimensioni [w × l × h, cm]	21.5 × 16 × 14.5
Alimentazione	12 V; 7.2 W
Flow rate [μl/min]	100-450
Peso [Kg]	1.2

Tabella 7: Specifiche pompa peristaltica LiveFlow.

Per mimare al meglio le condizioni fisiologiche presenti all'interno della barriera alveolo capillare, è stata valutata *in vitro* la stabilità delle membrane elettrofilate di PCL/GEL e PCL in condizioni dinamiche grazie all'uso del Bioreattore IVTech. Di seguito verrà spiegato il funzionamento alla base del bioreattore. I campioni vengono fissati all'*holder* e posti successivamente al centro della camera di coltura, tra il compartimento apicale e quello basale. Impostato un *flow rate* di 100 μl/min, la pompa peristaltica preleva il medium (DMEM) dal *reservoir*, facendolo fluire mediante i tubi verso l'*inlet* del compartimento apicale; in seguito, il medium lascia la camera di coltura attraverso l'*outlet* per ritornare all'interno del *reservoir*. Parallelamente si verifica lo stesso processo per il compartimento basale. In questo modo, il medium di coltura ha la capacità di perfondere la singola membrana su entrambi i suoi lati (apicale e basale).

Trascorse le 72 ore, ogni membrana è stata analizzata al SEM per valutare i cambiamenti morfologici indotti dalla degradazione rispetto ad una corrispettiva membrana non degradata.

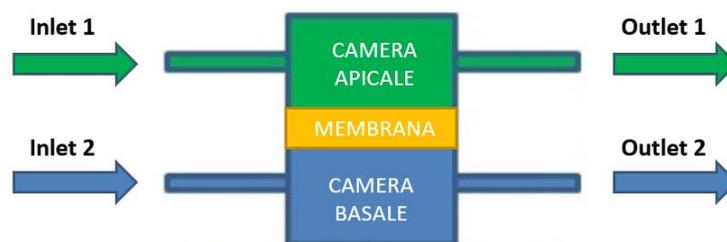


Fig. 35: Schema del flusso tangenziale che attraversa i due compartimenti della camera di coltura.

III. RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1. Membrane elettrofilate

Le soluzioni polimeriche a base di PCL/GEL, gelatina e PCL sono state preparate secondo i protocolli precedentemente descritti e successivamente processate tramite l'elettrospinning. Questa tecnica ha permesso di ottenere delle membrane nanofibrose che, in seguito, sono state sottoposte a caratterizzazione morfologica, prove meccaniche, test di bagnabilità delle superfici e prove di degradazione statiche/dinamiche.

3.2. Caratterizzazione morfologica

La morfologia delle membrane elettrofilate è stata valutata grazie alle immagini ottenute attraverso il microscopio a scansione elettronica (SEM).

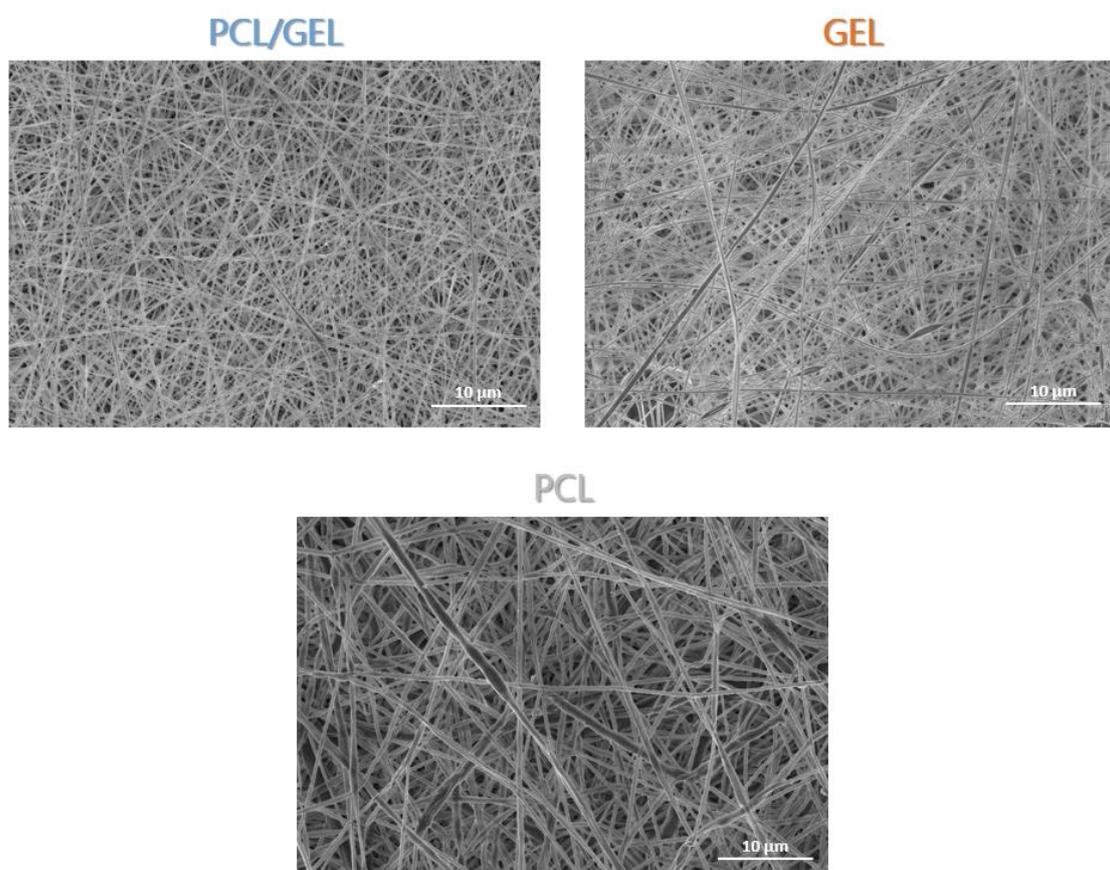


Fig. 36: Immagini delle tre membrane ottenute al SEM.

Riportati su *Excel* i valori dei diametri acquisiti tramite il software *ImageJ*, è stata ottenuta la distribuzione dei diametri relativi alle fibre dei tre diversi materiali polimerici. Come mostrato in Fig. 37, i valori dei diametri delle fibre di tutti i campioni sono compresi nel range dei nanometri. Per quanto riguarda le membrane a base di PCL/GEL, sono state ottenute delle fibre più uniformi e lisce con un diametro minore rispetto alle fibre in PCL. In accordo con il lavoro sperimentale svolto da Mobarakeh et al. [51], ciò è dovuto all'introduzione della gelatina che ha causato la diminuzione della viscosità della soluzione (e di conseguenza del diametro delle fibre). Pertanto, le fibre realizzate con la soluzione di gelatina sono quelle che presentano diametri inferiori rispetto a quelle realizzate con le altre due soluzioni polimeriche. D'altra parte, per le membrane a base di PCL, le fibre presentano un diametro maggiore a causa della viscosità della soluzione più elevata.

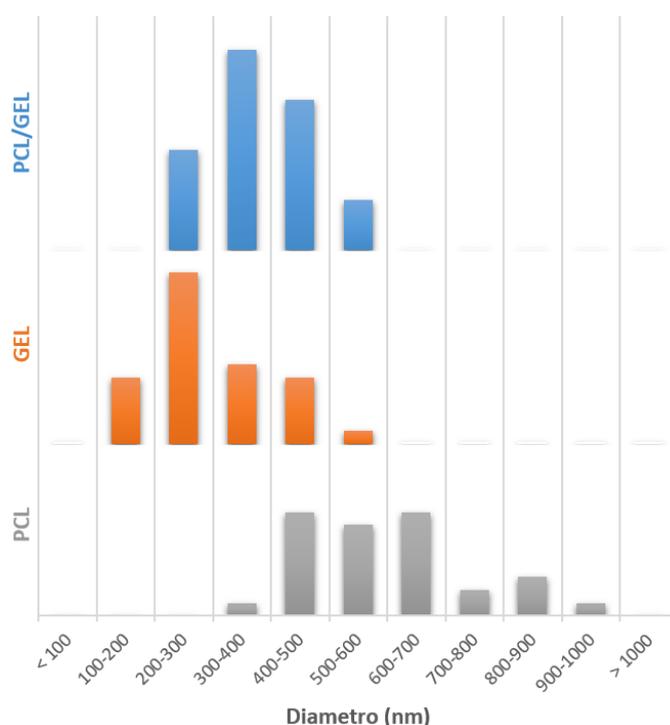


Fig. 37: Distribuzione dei diametri delle tre membrane nanofibrose.

L'influenza del tipo di polimero sulla morfologia della membrana verrà spiegato di seguito. Il PCL è un polimero sintetico non ionico, dunque quando viene disciolto in un solvente organico (ad es. cloroformio) non produce ioni all'interno della soluzione. La gelatina invece, essendo un polimero polielettrolita con molti gruppi ionizzabili (es. amminici e carbossilici), produce degli ioni che si dissolvono nel solvente. I gruppi amminici e carbossilici vengono ionizzati a pH neutro o in condizioni acide. Pertanto, l'aggiunta della gelatina comporta l'aumento della densità di carica e della repulsione tra le cariche all'interno della soluzione da elettrospinnare; ciò incrementa la conduttività della soluzione favorendo così la formazione di nanofibre di diametro ridotto [52].

Diametro medio fibre [nm]

<i>PCL/GEL</i>	390 ± 86
<i>GEL</i>	310 ± 107
<i>PCL</i>	610 ± 144

Tabella 8: Diametro medio e deviazione standard delle fibre delle tre diverse membrane.

I risultati ottenuti in questo lavoro di tesi sono in accordo con quelli del lavoro svolto da Gautam et al., in cui è stata valutata la morfologia delle membrane al variare del rapporto in peso di PCL/GEL. La morfologia delle fibre cambia gradualmente da una struttura con beads ad una struttura di fibre uniformi al diminuire della concentrazione di gelatina e di conseguenza all'aumentare della concentrazione del PCL. Di fatti, diminuendo il contenuto di gelatina i difetti sono scomparsi completamente e si sono formate fibre lisce. Le nanofibre prive di beads sono state ottenute anche eliminando totalmente il contenuto di gelatina dalla soluzione polimerica PCL/GEL [52]. Quest'ultimo risultato sottolinea la necessità di migliorare in questo lavoro sperimentale il protocollo per la realizzazione della membrana a base di PCL.

3.3. Prove meccaniche

3.3.1. Test statico con MTS

Al fine di valutare le proprietà meccaniche delle membrane polimeriche, su ogni tipologia di nanofibre sono state effettuate delle prove di trazione in condizioni statiche. Riportati su *Excel* i valori acquisiti durante i test, sono state ottenute le informazioni relative alla resistenza alla trazione e alla deformazione percentuale a rottura. In seguito, sono state ricavate le curve sforzo-deformazione (stress/strain %) con il corrispettivo modulo elastico (modulo di Young, E).

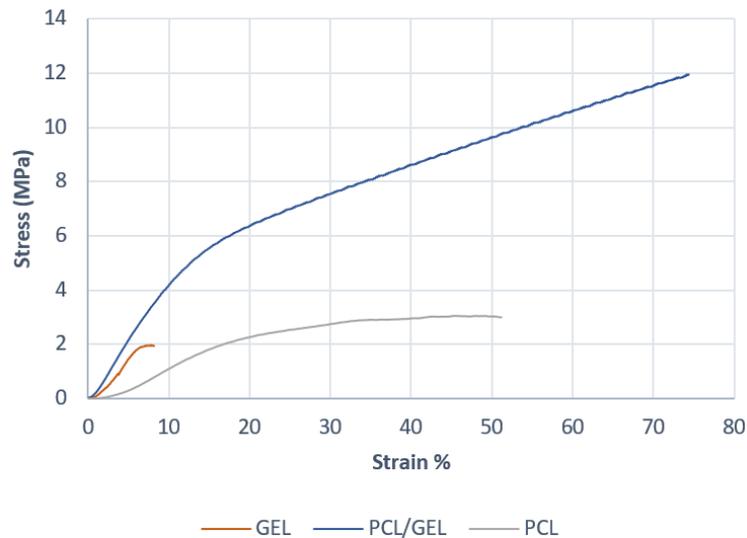


Fig. 38: Grafico relativo alle curve sforzo-deformazione delle membrane dei tre materiali polimerici.

Come si evince dalle curve sforzo-deformazione, i campioni realizzati a partire dalla soluzione polimerica di PCL/GEL sono quelli che mostrano una maggiore resistenza a sollecitazione più elevate; presentano quindi buone proprietà di deformabilità e flessibilità. I campioni invece realizzati solo con la gelatina (materiale con scarse proprietà meccaniche e quindi poco resistente) hanno una minore capacità di deformazione, giungendo a rottura ad una deformazione percentuale di circa 8%. D'altra parte, i provini in PCL (polimero elastico) presentano un modulo elastico inferiore rispetto alle membrane ottenute con le altre due soluzioni polimeriche.

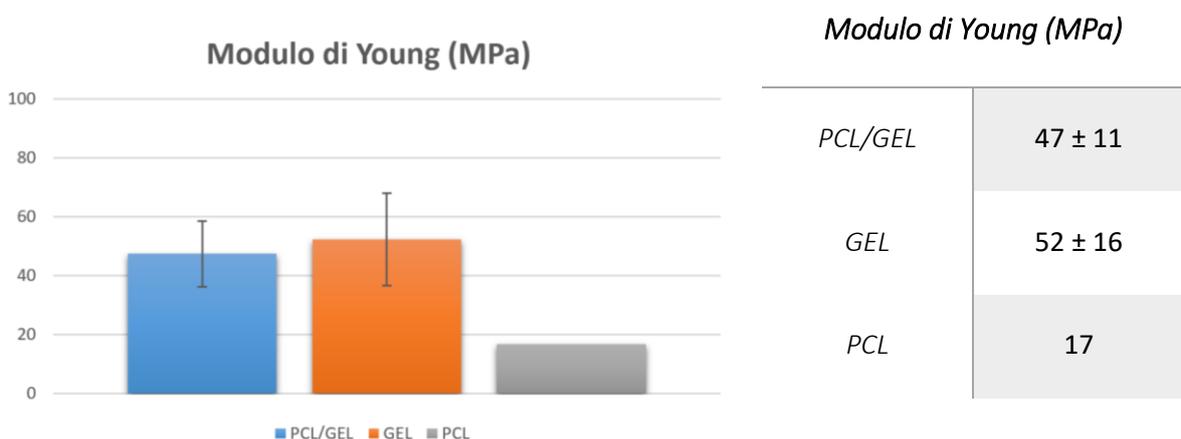


Fig. 39: Istogramma e tabella relative ai moduli elastici dei diversi materiali.

Il comportamento di flessibilità e deformabilità delle membrane di PCL/GEL è coerente con quanto riportato nel lavoro svolto da Ghasemi-Mobarakeh et al.: diminuendo il contenuto di gelatina fino ad un rapporto PCL/GEL di 70:30, è stata ottenuta una maggiore percentuale di allungamento delle

nanofibre rispetto a quelle realizzate solo con il PCL; tuttavia, la percentuale di deformazione si è ridotta drasticamente aumentando il contenuto di gelatina all'interno della soluzione polimerica [51].

3.3.2. Test dinamico (ciclico) con BOSE

Le prove di trazione in condizioni dinamiche sono state effettuate per mimare le condizioni fisiologiche a cui è sottoposta la membrana basale della barriera alveolo-capillare. È stata imposta quindi una deformazione del 10% con una frequenza di campionamento di 0.2 Hz.

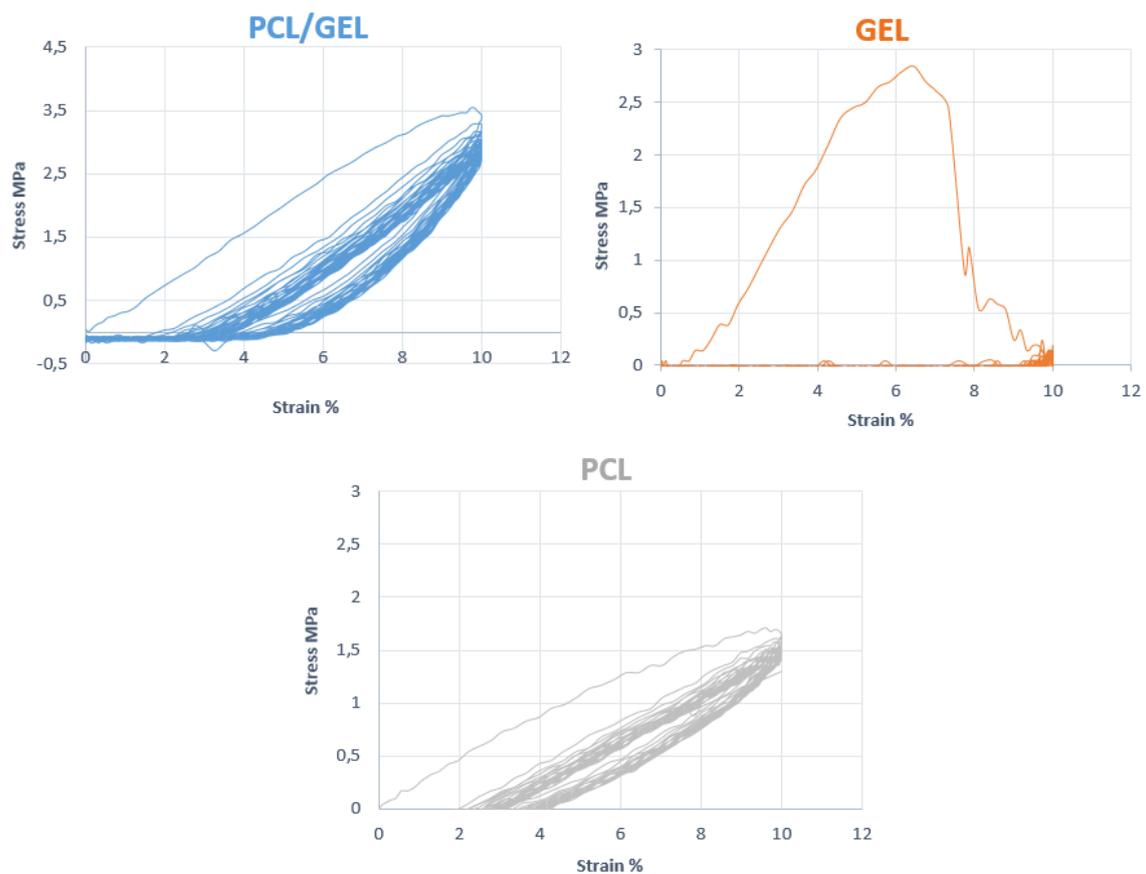


Fig. 40: Grafici delle curve sforzo-deformazione per le membrane realizzate con le tre soluzioni polimeriche.

Per i campioni a base di PCL/GEL e PCL sono stati effettuati 40 cicli di deformazione; i materiali presentano quindi una buona resistenza a fatica. Tuttavia, per la gelatina è stato possibile svolgere un solo ciclo di deformazione a causa della rottura dei campioni.

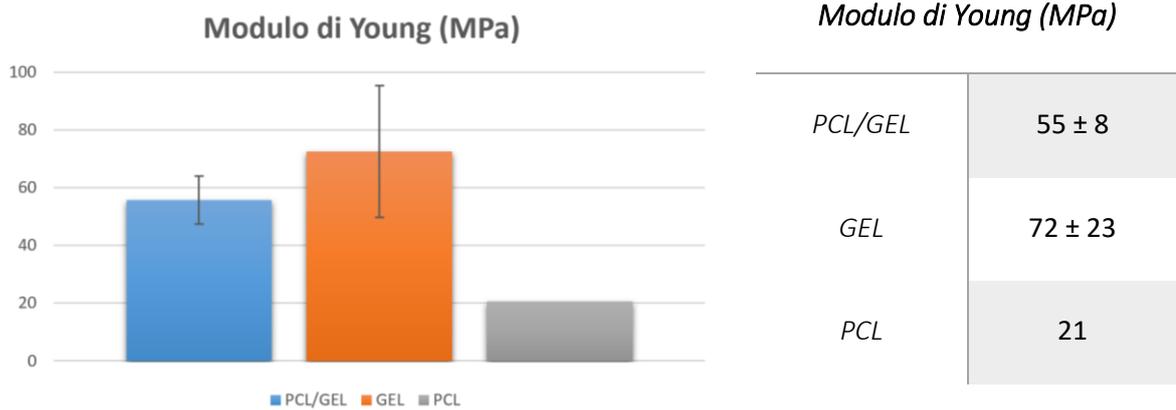


Fig. 41: Istogramma e tabella relative ai moduli elastici dei diversi materiali.

3.4. Angolo di contatto

La natura idrofila della superficie di un biomateriale rappresenta un aspetto molto importante, in quanto un'adeguata bagnabilità ha un impatto positivo sul comportamento cellulare. Di fatti, le superfici idrofobe portano ad una minore adesione cellulare nella fase iniziale della coltura cellulare. Tramite l'angolo di contatto è stata valutata la bagnabilità delle superfici delle membrane a base di PCL/GEL, gelatina e PCL.

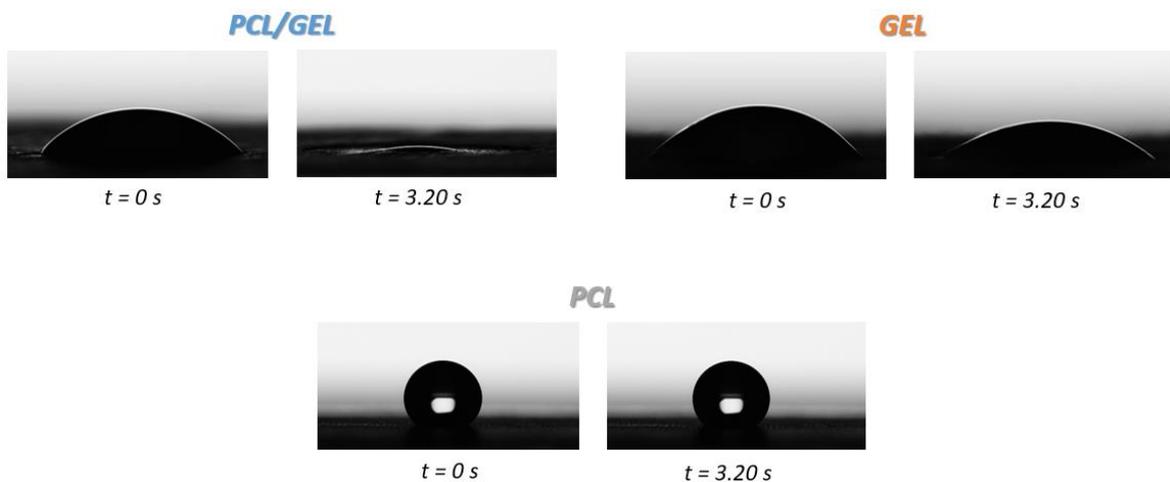


Fig. 42: Immagini acquisite tramite in dispositivo dell'angolo di contatto relative al profilo delle gocce depositate sulle superfici delle tre membrane.

Oltre al calcolo dell'angolo di contatto medio, per ogni membrana è stato fatto un confronto tra l'angolo al tempo 0 (momento in cui la goccia risulta essere stabile in seguito alla deposizione sulla

superficie) e l'angolo dopo 3.20 secondi. I valori medi e la deviazione standard degli angoli di contatto vengono riportati in Tabella 9.

	<i>CA medio</i>	<i>CA_{t=0s}</i>	<i>CA_{t=3.20s}</i>
<i>PCL/GEL</i>	$25^\circ \pm 10^\circ$	$54^\circ \pm 2^\circ$	$15^\circ \pm 7^\circ$
<i>GEL</i>	$45^\circ \pm 8^\circ$	$55^\circ \pm 6^\circ$	$41^\circ \pm 10^\circ$
<i>PCL</i>	$138^\circ \pm 1^\circ$	$138^\circ \pm 2^\circ$	$138^\circ \pm 2^\circ$

Tabella 9: Valori medi dell'angolo di contatto, al tempo 0 e dopo 3.20 s relativi alle tre membrane.

La membrana realizzata a partire dalla soluzione di PCL/GEL, con un angolo di contatto medio di 25° , risultata essere molto idrofilica; di fatti, la goccia di liquido (emessa verticalmente dalla siringa del dispositivo) è stata rapidamente assorbita dalla superficie dopo 3.20 secondi. La membrana di GEL risulta anch'essa idrofilica, ma con un angolo di contatto medio più elevato rispetto a quello del PCL/GEL; dopo 3.20 secondi la goccia è stata parzialmente assorbita dalla superficie. D'altra parte, la membrana a base di PCL mostra un angolo di contatto medio di 138° , pressoché costante durante tutto il tempo registrato; dunque, la goccia di liquido è rimasta perfettamente tondeggiate sulla superficie della membrana. Ciò conferma il forte carattere idrofobo e la scarsa bagnabilità della superficie di questa membrana.

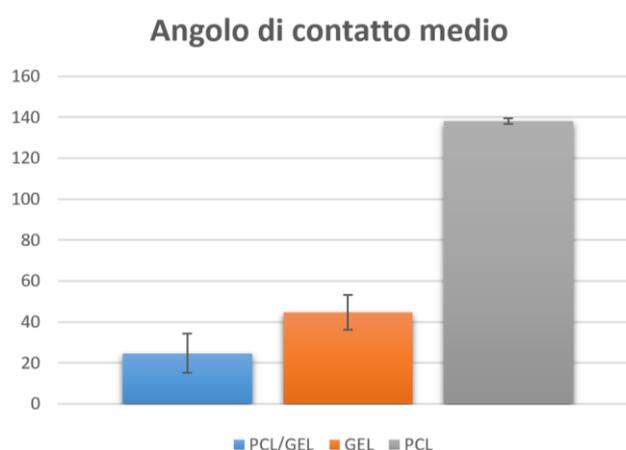


Fig. 43: Istogramma dell'angolo di contatto medio delle membrane di PCL/GEL, GEL e PCL.

Lo studio effettuato da Ghasemi-Mobarakeh et al. ha permesso di comprendere la correlazione tra la bagnabilità di una superficie e la presenza di gelatina. L'aggiunta della gelatina all'interno della soluzione polimerica ha portato ad una migliore idrofilità degli scaffold a base di PCL/GEL e quindi al decremento dell'angolo di contatto. Hanno attribuito questo comportamento alla presenza dei gruppi amminici e carbossilici nella struttura della gelatina; questi gruppi funzionali idrofili sono disposti sulla superficie delle membrane nanofibrose e formano legami idrogeno con molecole d'acqua. La maggiore idrofilità ha consentito una migliore adesione e proliferazione cellulare [51].

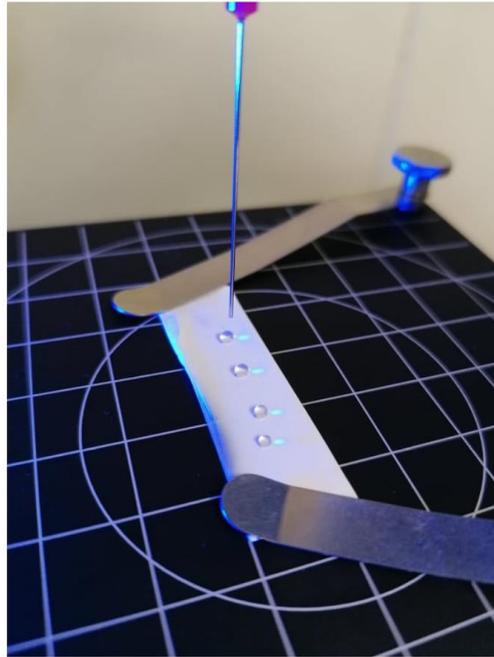


Fig. 44: Goccia perfettamente tondeggiante sulla superficie della membrana a base di PCL.

3.5. Prove di degradazione

La stabilità in ambiente acquoso delle membrane di PCL/GEL, GEL e PCL è stata valutata *in vitro* tramite delle prove di degradazione in PBS a 37°C a differenti *time step* di incubazione (24h, 72h e 1 settimana). In seguito all'essiccamento dei campioni, è stato possibile analizzare la morfologia delle membrane grazie al microscopio a scansione elettronica (SEM).

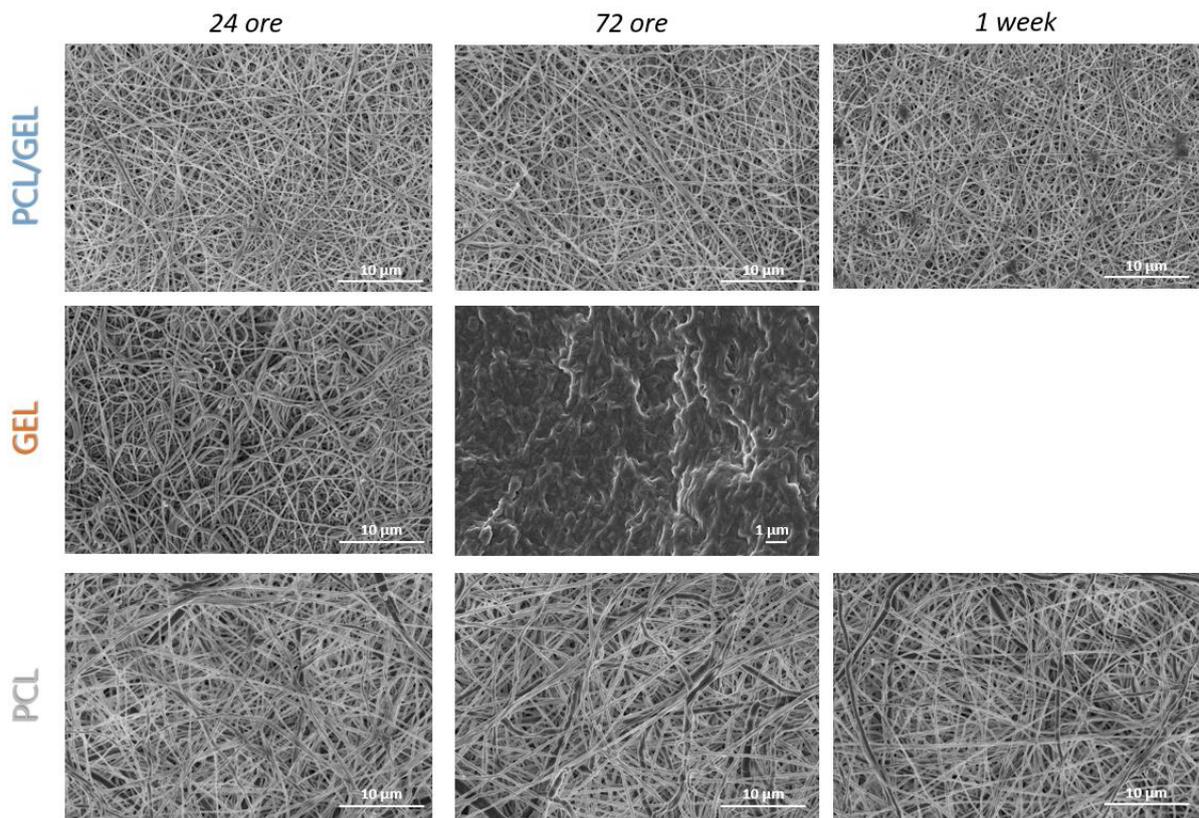


Fig. 45: Immagini SEM relative alla degradazione delle membrane ai diversi *time step*.

Dalla Fig. 45 è evidente la mancanza dell'immagine SEM della membrana realizzata con la soluzione a base di gelatina dopo una settimana di incubazione. Ciò è dovuto al fatto che le membrane di gelatina hanno subito una rapida degradazione, evidente soprattutto nell'immagine SEM centrale in cui si nota lo *swelling* delle fibre. Di fatti, dopo una settimana di incubazione non è stato possibile analizzare il campione a causa della quasi totale dissoluzione in PBS. Per quanto riguarda invece il PCL/GEL ed il PCL, non vengono messi in luce evidenti cambiamenti morfologici, anche a distanza di una settimana. Ciò denota una buona stabilità e resistenza delle membrane nanofibrose di PCL/GEL e PCL in condizioni di degradazione statica.



Fig. 46: Quasi totale dissoluzione in PBS dei tre campioni di GEL dopo una settimana di incubazione.

3.6. Bioreattore IVTech

La stabilità in condizioni dinamiche delle membrane, realizzate a partire dalle soluzioni polimeriche di PCL/GEL e PCL, è stata valutata *in vitro* grazie all'uso del bioreattore IVTech. L'obiettivo è stato quello di mimare nel migliore dei modi le condizioni fisiologiche a cui è sottoposta la membrana basale della barriera alveolo-capillare.

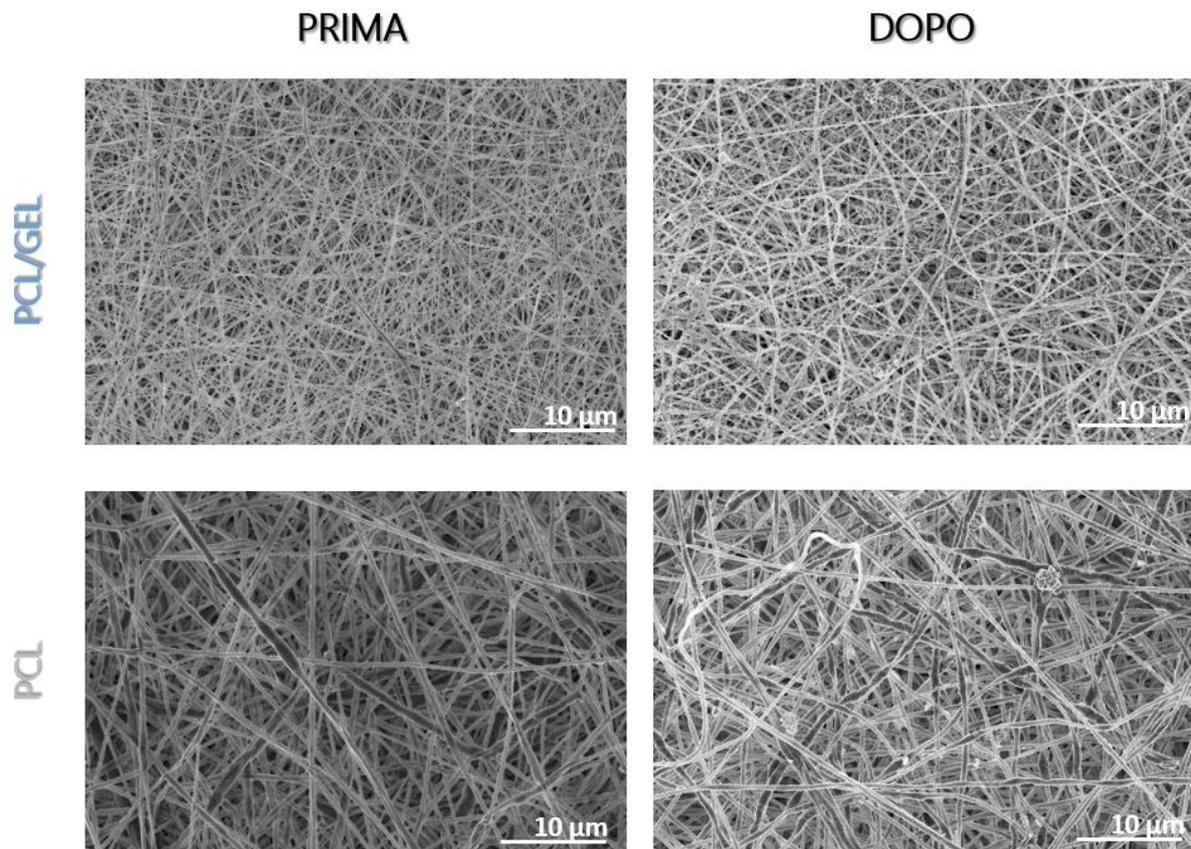


Fig. 47: Immagini SEM prima e dopo la degradazione delle membrane poste all'interno del bioreattore.

Confrontando le immagini SEM di entrambe le membrane prima e dopo la degradazione in condizioni dinamiche, non si notano evidenti cambiamenti morfologici delle membrane. Si denota quindi che, impostando un flow rate simile a quello fisiologico, gli sforzi tangenziali (dovuti alla perfusione con il DMEM) non hanno influenzato la struttura delle nanofibre. Di conseguenza, le membrane risultano avere una buona stabilità e resistenza anche in condizioni dinamiche.

IV. CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI

Il sistema respiratorio è un apparato sottoposto a continue investigazioni nell'ambito della medicina, a causa delle frequenti malattie respiratorie che gravano sugli esseri umani. I polmoni, nonostante siano protetti dalla barriera alveolo-capillare, rappresentano una zona molto suscettibile a lesioni dovute all'esposizione delle particelle presenti nell'atmosfera. La barriera alveolo-capillare è il luogo in cui avvengono gli scambi di gas nei polmoni ed è costituita da due strati cellulari (l'epitelio alveolare in cui sono presenti le ATI e le ATII e l'endotelio capillare) separati dallo spazio interstiziale e dalla membrana basale. Quest'ultima svolge un ruolo essenziale nel fornire il supporto elastico alla barriera durante i movimenti respiratori, grazie all'azione combinata delle fibre di collagene, dei proteoglicani e delle altre proteine della ECM presenti al suo interno.

Il *tissue engineering* è un settore in continua evoluzione, in cui convergono le conoscenze relative a diverse discipline (come medicina, chirurgia, biologia, scienza dei materiali ed ingegneria). Il TE nasce dalla necessità di sopperire ai limiti della medicina tradizionale nella rigenerazione e nella riparazione dei tessuti danneggiati. L'obiettivo non riguarda solamente il ripristino delle funzioni originali di un determinato tessuto o organo, ma anche la realizzazione di modelli di ricerca *in vitro* al fine di ricreare il microambiente cellulare (presente all'interno del tessuto di interesse) e di evitare così la sperimentazione su umani e/o animali. L'ingegneria dei tessuti si basa dunque sull'utilizzo di tre elementi fondamentali, quali *scaffold*, cellule e fattori di regolazione. Lo *scaffold* deve essere in grado di mimare la struttura e le funzioni della matrice extracellulare del tessuto che si vuole realizzare *in vitro*, con lo scopo di supportare temporaneamente l'adesione, la proliferazione e la crescita cellulare. La scelta del biomateriale più opportuno rappresenta un elemento chiave nella realizzazione degli *scaffold*: i biomateriali hanno l'obiettivo di replicare le funzioni biologiche e meccaniche del tessuto sano o patologico preso in esame, dunque influenzano in maniera significativa il comportamento delle cellule. I biomateriali più utilizzati per la fabbricazione degli *scaffold* sono i polimeri di origine naturale o sintetica con proprietà di biodegradabilità e biorisorbibilità, in modo da fornire un supporto temporaneo alle cellule durante la coltura *in vitro*. I polimeri naturali, che derivano dalle principali componenti della ECM, presentano ottime proprietà di biocompatibilità, bioattività, biodegradabilità e biomimetici, ma scarse proprietà meccaniche e bassa stabilità in ambiente acquoso (necessitano di reticolazione). D'altra parte, i polimeri sintetici sono caratterizzati da elevate proprietà meccaniche, che possono essere modulate controllando le condizioni di processo e che li rendono versatili e facilmente processabili attraverso una vasta gamma di tecniche; tuttavia, i polimeri sintetici presentano una carente bioattività intrinseca. Per migliorare la processabilità e le proprietà meccaniche, i polimeri naturali possono essere utilizzati in combinazione con i polimeri sintetici. In questo modo, si ottengono substrati che beneficiano delle

proprietà meccaniche dei polimeri sintetici e quelle biologiche dei polimeri naturali. Grazie alla sua biocompatibilità, biodegradabilità, bioattività e disponibilità commerciale a basso costo, la gelatina (derivato del collagene, il maggiore costituente della ECM dei tessuti) rappresenta uno dei biomateriali naturali più impiegati nell'ambito del tissue engineering. Tuttavia, le fibre in gelatina presentano scarse proprietà meccaniche, che possono essere migliorate attraverso la reticolazione e realizzando dei *blend* con polimeri sintetici più resistenti. Il PCL è uno dei materiali sintetici più associati alla gelatina nelle applicazioni dell'ingegneria tissutale.

L'obiettivo di questo lavoro di tesi sperimentale è quello di realizzare delle matrici nanofibrose a base di PCL/GEL per ricreare *in vitro* la membrana basale della barriera alveolo-capillare. Le tre soluzioni polimeriche di PCL/GEL, GEL e PCL sono state realizzate partendo da protocolli già ottimizzati e successivamente processate tramite la tecnica dell'elettrospinning, per ottenere delle membrane con un'architettura nanofibrosa.

La microscopia a scansione elettronica ha consentito di studiare le membrane elettrofilate dal punto di vista morfologico, riscontrando i valori dei diametri delle fibre nell'intervallo dei nanometri. Le membrane realizzate a partire dalla soluzione polimerica di PCL/GEL mostrano delle fibre più uniformi e lisce (prive di difetti), con un valor medio del diametro compreso tra quello delle fibre di GEL e di PCL. La soluzione polimerica a base di gelatina ha portato ad una minore viscosità e ad una maggiore conducibilità, con un conseguente minor diametro rispetto alle fibre delle altre due tipologie di membrana. La soluzione a base di PCL presenta invece ha causato una maggiore viscosità e, essendo un polimero sintetico non ionico, non ha provocato cambiamenti nella conducibilità. Dunque, le fibre di PCL presentano diametri maggiori rispetto a quelli di PCL/GEL e GEL. Tuttavia, sarebbero necessarie ulteriori investigazioni al fine di migliorare la morfologia delle fibre di PCL (per ottenere fibre prive di difetti), andando a modificare i parametri di processo dell'elettrospinning (ad es. diminuendo il flusso della soluzione o aumentando la distanza ugello-collettore).

Grazie alle prove di trazione statiche e dinamiche effettuate sulle tre tipologie di membrane elettrofilate, sono state riscontrate buone proprietà meccaniche sia per le fibre a base di PCL che di PCL/GEL; in particolare, quest'ultime presentano buone caratteristiche di deformabilità e flessibilità, mostrando una maggiore resistenza a trazione anche a sollecitazioni più elevate. Per contro invece, i provini di gelatina sono giunti a rottura ad una bassa deformazione percentuale per i test statici e dopo un ciclo di deformazione per i test dinamici ciclici. Quest'ultimi andrebbero ripetuti per valutare il comportamento meccanico delle membrane all'aumentare del numero dei cicli di deformazione.

Tramite un'analisi dell'angolo di contatto è stata valutata la bagnabilità delle superfici delle tre tipologie di membrane ottenute. La bagnabilità di una superficie rappresenta un aspetto importante da tenere in considerazione soprattutto quando si lavora a contatto con le cellule, poiché il loro comportamento è altamente influenzato dal carattere idrofilo o idrofobo della superficie su cui

vengono coltivate; una maggiore idrofilicità consente una migliore adesione e proliferazione cellulare. In accordo con i dati presenti in letteratura, il PCL presenta un elevato angolo di contatto medio (138°), mettendo in evidenza il forte carattere idrofobo e la scarsa bagnabilità della superficie di questo materiale. L'effetto opposto si è ottenuto con le membrane realizzate a partire dalle soluzioni polimeriche di PCL/GEL e della gelatina, le cui superfici risultano essere idrofile rispettivamente con un angolo di contatto medio di 25° e 45° (maggior grado di idrofilia per il PCL/GEL). Ciò è dovuto alla presenza dei gruppi funzionali amminici e carbossilici presenti nella struttura della gelatina e al loro coinvolgimento nella formazione di legami idrogeno con le molecole di acqua.

I risultati, ottenuti tramite le prove di degradazione statica in PBS a diversi *time step*, hanno messo in evidenza la stabilità e la resistenza delle membrane di PCL/GEL e PCL fino ad una settimana; mentre, le membrane a base di gelatina sono andate incontro ad un rapido deterioramento del materiale già dopo sole 24 ore. La stabilità delle membrane di PCL/GEL e PCL è stata valutata anche in condizioni dinamiche, inserendo i campioni all'interno del bioreattore IVTech per simulare le condizioni fisiologiche a cui è sottoposta la membrana basale della barriera alveolo-capillare. Le membrane sono state perfuse dal DMEM sia nel compartimento apicale che in quello basale della camera di coltura, impostando un flow rate (100 µl/min) simile a quello fisiologico (caratteristico dei capillari sanguigni che si trovano negli alveoli polmonari, circa 1 cm/s). Confrontando le immagini SEM dei campioni prima e dopo la degradazione all'interno del bioreattore, le membrane risultano essere stabili anche in condizioni dinamiche. Ciò significa che gli sforzi tangenziali, dovuti alla perfusione con il DMEM, non hanno influenzato la struttura delle nanofibre.

Dunque, il suddetto lavoro sperimentale ha permesso di ottenere delle membrane nanofibrose a base di PCL/GEL con buone proprietà meccaniche e stabili in ambiente acquoso.

Partendo dai risultati precedentemente ottenuti, in futuro si potrebbe valutare la biocompatibilità e la biomimetività delle membrane a base di PCL/GEL a contatto con le cellule (ricreando una barriera alveolo-capillare bioartificiale *in vitro*). Per far ciò, si dovrebbero prendere in considerazione gli aspetti riguardanti la scelta di:

1. cellule da seminare sullo scaffold;
2. condizioni di coltura (statica e/o dinamica);
3. tipi di test da effettuare per analizzare il comportamento delle cellule.

Scelta delle cellule: in letteratura vi è un gran numero di modelli polmonari *in vitro* che variano tra loro per la complessità (da monocultura a co-cultura cellulare su chip) e che si basano soprattutto sull'utilizzo delle cellule epiteliali polmonari sia primarie che di linea. Le cellule primarie mantengono le caratteristiche delle cellule *in vivo* e presentano un fenotipo differenziato rispetto a quelle di linea.

Tuttavia, vi sono degli svantaggi dal punto di vista della complessità del loro isolamento dal tessuto di un animale/paziente, della limitata capacità proliferativa (limitato numero di cicli cellulari), della maggiore variabilità (differiscono da paziente a paziente) e della senescenza a cui le cellule vanno incontro. Le cellule di linea invece sono facili da lavorare, più riproducibili ed omogenee (ridotta variabilità), presenti in commercio ed hanno la capacità di proliferarsi indefinitamente; quelle più utilizzate sono la linea cellulare alveolare A549 (incapace di formare giunzioni strette TJ) e le linee cellulari bronchiali NCI H441, Calu-3 e 16HBE14o- (in grado di formare TJ) [71]. Le giunzioni strette svolgono un ruolo cruciale nella formazione di una barriera alveolo-capillare con un'adeguata permeabilità. Nello studio svolto da Dekali et al., viene riportato il valore di resistenza elettrica trans-epiteliale (TEER, indicatore della formazione di TJ e quindi del decremento della permeabilità della barriera) di monoculture di pneumociti umani di tipo I pari a $2180 \pm 62 \Omega\text{cm}^2$ dopo 8 giorni di semina su membrane Transwell. Misurando lo sviluppo del TEER nel tempo di diverse linee cellulari epiteliali polmonari dopo 11 giorni di coltura su membrane Transwell, sono stati ottenuti i seguenti valori: A549 con un valore di TEER = $18.7 \pm 2.5 \Omega\text{cm}^2$; NCI H441 con TEER = $100.2 \pm 25.4 \Omega\text{cm}^2$; NCI H441 coltivato con $1 \mu\text{M}$ di DEX con TEER = $263.9 \pm 12.7 \Omega\text{cm}^2$; Calu-3 con TEER = $1233.5 \pm 58.1 \Omega\text{cm}^2$ [9]. Le A549, sebbene rappresentino il modello epiteliale alveolare più utilizzato in letteratura, non sono capaci di formare layers di cellule polarizzate con giunzioni strette funzionali e di conseguenza non costituiscono una barriera-alveolo capillare con un'adeguata permeabilità [72]. Una linea cellulare in grado di superare questi limiti è quella Calu-3, la quale deriva dalle cellule epiteliali bronchiali di adenocarcinoma umano.

In seguito a queste considerazioni, uno sviluppo futuro di questo lavoro di tesi potrebbe riguardare la co-coltura delle cellule epiteliali Calu-3 e delle cellule endoteliali HPMEC-ST1.6R (cellule con morfologia microvascolare e di origine polmonare) sulle membrane nanofibrose ottenute secondo i protocolli già descritti.

Condizioni di coltura:

- *Coltura statica:* linee cellulari Calu-3 e HPMEC-ST1.6R coltivate staticamente sulle membrane elettrofilate a base di PCL/GEL, tagliate in piccoli campioni, ognuno dei quali posto all'interno di un pozzetto di una *multiwell* grazie all'ausilio di un inserto *Transwell*. Ispirandosi al lavoro svolto da Dekali et al. [9], gli inserti (in cui sono fissate le membrane porose) potrebbero essere capovolti su piastre di Petri per seminare le cellule endoteliali (2×10^4 cells/cm² nel medium M199 + 20% FBS + 1% v/v penicillina/streptomicina) sul lato basale della membrana (rivolto verso l'alto). Le piastre di Petri verrebbero successivamente poste all'interno di un incubatore per 2 ore a 37°C, 5% CO₂ e 95% di umidità, per permettere alle cellule di aderire sulla membrana. In seguito, il medium delle cellule endoteliali verrebbe rimosso per aspirazione, gli inserti

verrebbero capovolti nella posizione originale ed inseriti all'interno dei pozzetti contenenti il medium RPMI 1640 + 10% v/v di FBS (siero fetale bovino) + 1% v/v penicillina/streptomicina. A questo punto, le cellule epiteliali Calu-3 (5×10^4 cells/cm²) verrebbero seminate sul lato apicale della membrana. Dopo 24 ore, il medium nella camera apicale andrebbe rimosso per consentire alle cellule epiteliali di crescere in condizioni di interfaccia aria-liquido (ALI). Le cellule verrebbero così coltivate all'interno dell'incubatore per 7 giorni, cambiando il medium di coltura della camera basale ogni due giorni.

- *Coltura dinamica*: linee cellulari Calu-3 e HPMEC-ST1.6R coltivate dinamicamente all'interno di un bioreattore IVTech, fissando la membrana di PCL/GEL all'*holder* della camera di coltura. Inizialmente verrebbero coltivate le HPMEC-ST1.6R in M199 + 20% FBS + 1% v/v penicillina/streptomicina, lasciandole aderire al substrato per due ore. Successivamente, verrebbero coltivate le Calu-3 in RPMI 1640 + 10% v/v di FBS + 1% v/v penicillina/streptomicina, lasciandole aderire alla membrana per 24 ore. Trascorso questo periodo, il medium delle cellule epiteliali verrebbe rimosso per interfacciare la membrana con l'aria ed a questo punto verrebbe impostato un *flow rate* di 100 µl/min per far fluire il medium delle cellule endoteliali dal reservoir al compartimento basale della camera di coltura (attraverso un sistema di tubi). I successivi test verrebbero svolti dopo 7 giorni di co-coltura.

Test per valutare il comportamento cellulare:

- ✓ *Morfologia cellulare*: tramite la microscopia a scansione laser (SEM), si potrebbe fare un confronto tra la morfologia delle cellule seminate sulla membrana in condizioni statiche e quella delle cellule coltivate in condizioni dinamiche. I campioni andrebbero precedentemente sottoposti a disidratazione in etanolo e quindi fissati sugli *stub* prima di procedere al rivestimento con il sottile strato metallico (*sputtering*). In questo modo, verrebbero valutati eventuali cambiamenti morfologici al variare delle condizioni di coltura.
- ✓ *Permeabilità*: trasporto para-cellulare del sodio-fluoresceina dal compartimento apicale a quello basale della membrana per valutare l'integrità delle barriere bioartificiali ottenute in precedenza. Per far ciò, il medium della camera apicale dovrebbe essere sostituito con un terreno di coltura contenente il sodio-fluoresceina. I campioni del fluido accettore nel pozzetto inferiore (basale) verrebbero prelevati a vari time step (ad es. 30, 60, 90 e 120 minuti) e sostituiti con un egual volume di medium nuovo. In seguito, i campioni verrebbero diluiti con NaOH e la fluorescenza potrebbe essere misurata utilizzando un lettore di piastre a fluorescenza ad una lunghezza d'onda di eccitazione di 485 nm ed emissione di 530 nm. Il coefficiente di permeabilità (P_{app}) andrebbe in seguito calcolato tramite la seguente formula:

$$P_{app} = \frac{dQ}{dt} \cdot \frac{1}{A \cdot C_0}$$

Dove A è l'area superficiale della membrana, C_0 è la concentrazione iniziale di sodio-fluoresceina nel compartimento apicale e dQ/dt è la quantità di sodio-fluoresceina trasportata nel tempo ($\mu\text{mol/s}$) attraverso la barriera cellulare [9].

- ✓ *Permeabilità*: misurazione della resistenza elettrica trans-epiteliale (TEER) per valutare l'integrità delle barriere cellulari durante le fasi di crescita e differenziamento delle cellule. La misurazione consiste nell'utilizzo di un voltmetro (es. EVOM) posizionando un elettrodo nella camera apicale ed uno nella camera basale di un inserto *Transwell*, al centro del quale viene fissata la membrana elettrofilata. La resistenza elettrica viene calcolata in Ωcm^2 , ovvero come la resistenza della barriera (Ω , tensione/corrente elettrica) moltiplicata per l'area totale della membrana (cm^2) [73]. Dunque, potrebbe essere realizzata una monocultura statica di cellule epiteliali Calu-3 (5×10^4 cells/ cm^2 nel medium RPMI 1640 + 10% v/v di FBS + 1% v/v PEN/STREP) su una membrana elettrofilata fissata ad un inserto *Transwell* per valutare la resistenza trans-epiteliale (TEER) nel corso dei 7 giorni di coltura, così da confrontarla con i valori presenti in letteratura (sebbene vi sia una vasta gamma di valori TEER, poiché dipendono dall'accuratezza della misura, dalla temperatura, il periodo di coltura cellulare). La camera di misura (collegata al voltmetro) verrebbe riempita con il medium delle Calu-3 e successivamente al suo interno verrebbe posizionata la membrana con le cellule seminate sul lato superiore. Inoltre, si dovrebbe fare una misura di controllo calcolando il valore di TEER con una membrana priva di cellule; questo valore andrebbe poi sottratto a quello ottenuto con la membrana contenente le cellule epiteliali.
- ✓ *Vitalità*: test live/dead per distinguere le cellule vive da quelle morte (grazie ad immagini a fluorescenza del campione) nella co-coltura delle Calu-3 e delle HPMEC-ST1.6R. Questo metodo prevede l'utilizzo di due diversi coloranti: la calceina che si lega alle cellule vive colorandole in verde; l'etidio che interagisce con gli acidi nucleici delle cellule che presentano la membrana danneggiata (cellule morte), colorando in rosso il loro nucleo.
- ✓ *Vitalità*: saggio di vitalità condotto con resazurina, colorante blu utilizzato come indicatore colorimetrico della reazione di ossidoriduzione (blu in ambiente ossidato, rosa in ambiente ridotto) ed in grado di misurare la capacità metabolica delle cellule. Le cellule metabolicamente attive hanno la capacità di ridurre la resazurina (non fluorescente) in resorufina (altamente fluorescente) all'interno del medium di coltura. Dunque, la resazurina cambia colore da blu a rosa se la cellula è viva. Terminato il periodo di co-coltura, il medium di coltura verrebbe sostituito con quello contenente la resazurina, lasciando il tutto in incubazione per un'ora. Dopodiché, la fluorescenza verrebbe analizzata tramite un lettore di piastre a fluorescenza ad

una lunghezza d'onda di eccitazione di 530 nm ed emissione di 590 nm. Il segnale emesso corrisponde alla quantità di resazurina ridotta e dunque al numero di cellule vive.

BIBLIOGRAFIA

- [1] B. Rothen-Rutishauser, F. Blank, C. Mühlfeld, and P. Gehr, "In vitro models of the human epithelial airway barrier to study the toxic potential of particulate matter," *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, vol. 4, no. 8, pp. 1075–1089, 2008, doi: 10.1517/17425255.4.8.1075.
- [2] J. Tenenbaum-Katan, A. Artzy-Schnirman, R. Fishler, N. Korin, and J. Sznitman, "Biomimetics of the pulmonary environment in vitro: A microfluidics perspective," *Biomicrofluidics*, vol. 12, no. 4, 2018, doi: 10.1063/1.5023034.
- [3] Z. Nova, H. Skovierova, and A. Calkovska, "Alveolar-capillary membrane-related pulmonary cells as a target in endotoxin-induced acute lung injury," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, no. 4, 2019, doi: 10.3390/ijms20040831.
- [4] L. Knudsen and M. Ochs, "The micromechanics of lung alveoli: structure and function of surfactant and tissue components," *Histochem. Cell Biol.*, vol. 150, no. 6, pp. 661–676, 2018, doi: 10.1007/s00418-018-1747-9.
- [5] M. I. Hermanns, R. E. Unger, K. Kehe, K. Peters, and C. J. Kirkpatrick, "Lung epithelial cell lines in coculture with human pulmonary microvascular endothelial cells: Development of an alveolo-capillary barrier in vitro," *Lab. Investig.*, vol. 84, no. 6, pp. 736–752, 2004, doi: 10.1038/labinvest.3700081.
- [6] E. Dohle *et al.*, "Human Co- and Triple-Culture Model of the Alveolar-Capillary Barrier on a Basement Membrane Mimic," *Tissue Eng. - Part C Methods*, vol. 24, no. 9, pp. 495–503, 2018, doi: 10.1089/ten.tec.2018.0087.
- [7] E. Roan and C. M. Waters, "What do we know about mechanical strain in lung alveoli?," *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 301, no. 5, pp. 625–635, 2011, doi: 10.1152/ajplung.00105.2011.
- [8] M. Loscertales *et al.*, "Type IV collagen drives alveolar epithelial-endothelial association and the morphogenetic movements of septation," *BMC Biol.*, vol. 14, no. 1, pp. 1–21, 2016, doi: 10.1186/s12915-016-0281-2.
- [9] S. Dekali, C. Gamez, T. Kortulewski, K. Blazy, P. Rat, and G. Lacroix, "Assessment of an in vitro model of pulmonary barrier to study the translocation of nanoparticles," *Toxicol. Reports*, vol. 1, pp. 157–171, 2014, doi: 10.1016/j.toxrep.2014.03.003.
- [10] J. Bhattacharya and M. A. Matthay, "Regulation and Repair of the Alveolar-Capillary Barrier in

- Acute Lung Injury,” *Annu. Rev. Physiol.*, vol. 75, no. 1, pp. 593–615, 2013, doi: 10.1146/annurev-physiol-030212-183756.
- [11] A. Kuehn *et al.*, “Human alveolar epithelial cells expressing tight junctions to model the air-blood barrier,” *ALTEX*, vol. 33, no. 3, pp. 251–260, 2016, doi: 10.14573/altex.1511131.
- [12] G. F. Muschler, C. Nakamoto, and L. G. Griffith, “Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering,” *J. Bone Jt. Surg. - Ser. A*, vol. 86, no. 7, pp. 1541–1558, 2004, doi: 10.2106/00004623-200407000-00029.
- [13] S. Caddeo, M. Boffito, and S. Sartori, “Tissue engineering approaches in the design of healthy and pathological in vitro tissue models,” *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 5, no. AUG, pp. 1–22, 2017, doi: 10.3389/fbioe.2017.00040.
- [14] J. S. Katz and J. A. Burdick, “Synthetic biomaterials,” *Tissue Eng. Princ. Pract.*, vol. 42, no. 2, pp. 5-1-5–20, 2012, doi: 10.1201/b13978.
- [15] H. Naderi, M. M. Matin, and A. R. Bahrami, “Review paper: Critical issues in tissue engineering: Biomaterials, cell sources, angiogenesis, and drug delivery systems,” *J. Biomater. Appl.*, vol. 26, no. 4, pp. 383–417, 2011, doi: 10.1177/0885328211408946.
- [16] A. Khademhosseini, Y. Du, B. Rajalingam, J. P. Vacanti, and R. S. Langer, “Microscale technologies for tissue engineering,” *Adv. Tissue Eng.*, vol. 103, no. 8, pp. 349–369, 2008, doi: 10.1142/9781848161832_0017.
- [17] R. Vasita and D. S. Katti, “Nanofibers and their applications in tissue engineering,” *Int. J. Nanomedicine*, vol. 1, no. 1, pp. 15–30, 2006, doi: 10.2147/nano.2006.1.1.15.
- [18] E. S. Place, J. H. George, C. K. Williams, and M. M. Stevens, “Synthetic polymer scaffolds for tissue engineering,” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 38, no. 4, pp. 1139–1151, 2009, doi: 10.1039/b811392k.
- [19] B. W. Kim, “Clinical regenerative medicine in urology,” *Clin. Regen. Med. Urol.*, pp. 1–285, 2017, doi: 10.1007/978-981-10-2723-9.
- [20] A. Atala, “Tissue engineering of reproductive tissues and organs,” *Fertil. Steril.*, vol. 98, no. 1, pp. 21–29, 2012, doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.05.038.
- [21] V. Chiono, “Appunti di Ingegneria per la medicina rigenerativa”, 2018 .
- [22] Y. Ikada, “Challenges in tissue engineering,” *J. R. Soc. Interface*, vol. 3, no. 10, pp. 589–601, 2006, doi: 10.1098/rsif.2006.0124.

- [23] A. Dellaquila, E. K. Thomée, A. H. McMillan, and S. C. Lesher-Pérez, *Lung-on-a-chip platforms for modeling disease pathogenesis*. 2020.
- [24] D. Konar, M. Devarasetty, D. V. Yildiz, A. Atala, and S. V. Murphy, "Lung-On-A-Chip Technologies for Disease Modeling and Drug Development," *Biomed. Eng. Comput. Biol.*, vol. 7s1, p. BECB.S34252, 2016, doi: 10.4137/becb.s34252.
- [25] D. Gao *et al.*, "Recent developments in microfluidic devices for in vitro cell culture for cell-biology research," *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 35, pp. 150–164, 2012, doi: 10.1016/j.trac.2012.02.008.
- [26] A. Skardal, T. Shupe, and A. Atala, "Organoid-on-a-chip and body-on-a-chip systems for drug screening and disease modeling," *Drug Discov. Today*, vol. 21, no. 9, pp. 1399–1411, 2016, doi: 10.1016/j.drudis.2016.07.003.
- [27] D. Massai, "Appunti di Bioreattori," 2018.
- [28] B. P. Chan and K. W. Leong, "Scaffolding in tissue engineering: General approaches and tissue-specific considerations," *Eur. Spine J.*, vol. 17, no. SUPPL. 4, 2008, doi: 10.1007/s00586-008-0745-3.
- [29] S. Ahmed, V. M. Chauhan, A. M. Ghaemmaghami, and J. W. Aylott, "New generation of bioreactors that advance extracellular matrix modelling and tissue engineering," *Biotechnol. Lett.*, vol. 41, no. 1, pp. 1–25, 2019, doi: 10.1007/s10529-018-2611-7.
- [30] B. S. Kim and D. J. Mooney, "Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering," *Trends Biotechnol.*, vol. 16, no. 5, pp. 224–230, 1998, doi: 10.1016/S0167-7799(98)01191-3.
- [31] V. Monesi and S. Adamo, *Istologia*. Piccin, 2002.
- [32] F. J. O'Brien, "Biomaterials & scaffolds for tissue engineering," *Mater. Today*, vol. 14, no. 3, pp. 88–95, 2011, doi: 10.1016/S1369-7021(11)70058-X.
- [33] P. X. Ma, "Biomimetic materials for tissue engineering," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 60, no. 2, pp. 184–198, 2008, doi: 10.1016/j.addr.2007.08.041.
- [34] N. H. A. Ngadiman, M. Y. Noordin, A. Idris, and D. Kurniawan, "A review of evolution of electrospun tissue engineering scaffold: From two dimensions to three dimensions," *Proc. Inst. Mech. Eng. Part H J. Eng. Med.*, vol. 231, no. 7, pp. 597–616, 2017, doi: 10.1177/0954411917699021.

- [35] G. Chen, T. Ushida, and T. Tateishi, "Scaffold design for tissue engineering," *Macromol. Biosci.*, vol. 2, no. 2, pp. 67–77, 2002, doi: 10.1002/1616-5195(20020201)2:2<67::AID-MABI67>3.0.CO;2-F.
- [36] B. Dhandayuthapani, Y. Yoshida, T. Maekawa, and D. S. Kumar, "Polymeric scaffolds in tissue engineering application: A review," *Int. J. Polym. Sci.*, vol. 2011, no. ii, 2011, doi: 10.1155/2011/290602.
- [37] C. M. Lakhani, "乳鼠心肌提取 HHS Public Access," *Physiol. Behav.*, vol. 176, no. 3, pp. 139–148, 2019, doi: 10.1016/j.physbeh.2017.03.040.
- [38] J. Hong, M. Yeo, G. H. Yang, and G. Kim, "Cell-electrospinning and its application for tissue engineering," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, no. 24, 2019, doi: 10.3390/ijms20246208.
- [39] S. Zhang, Z. Jia, T. Liu, and G. Wei, "Electrospinning Nanoparticles-Based Materials," 2019.
- [40] T. J. Sill and H. A. von Recum, "Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering," *Biomaterials*, vol. 29, no. 13, pp. 1989–2006, 2008, doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.01.011.
- [41] N. Bhardwaj and S. C. Kundu, "Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique," *Biotechnol. Adv.*, vol. 28, no. 3, pp. 325–347, 2010, doi: 10.1016/j.biotechadv.2010.01.004.
- [42] D. R. Nisbet, J. S. Forsythe, W. Shen, D. I. Finkelstein, and M. K. Horne, "Review paper: A review of the cellular response on electrospun nanofibers for tissue engineering," *J. Biomater. Appl.*, vol. 24, no. 1, pp. 7–29, 2009, doi: 10.1177/0885328208099086.
- [43] G. Ciardelli, "Appunti di Bionanotecnologie," 2017 .
- [44] M. Folli, "Progettazione e sviluppo di nuove membrane nanostrutturate per applicazioni ambientali," 2012, [Online]. Available: <https://core.ac.uk/download/pdf/11670207.pdf>.
- [45] Q. P. Pham, U. Sharma, and A. G. Mikos, "Pham2006," *Tissue Eng.*, vol. 12, no. 5, pp. 1197–1211, 2006.
- [46] G. Ciofani, "Appunti di Bionanotecnologie," 2017.
- [47] "Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID- 19 . The COVID-19 resource centre is hosted on Elsevier Connect , the company ' s public news and information ," no. January, 2020.
- [48] G. Ciofani, "Appunti di Sistemi Biomimetici," 2018.

- [49] A. Şelaru *et al.*, “Fabrication and biocompatibility evaluation of nanodiamonds-gelatin electrospun materials designed for prospective tissue regeneration applications,” *Materials (Basel)*, vol. 12, no. 18, pp. 1–18, 2019, doi: 10.3390/ma12182933.
- [50] G. Piccirillo *et al.*, “Non-invasive characterization of hybrid gelatin:poly-l-lactide electrospun scaffolds using second harmonic generation and multiphoton imaging,” *J. Mater. Chem. B*, vol. 6, no. 40, pp. 6399–6412, 2018, doi: 10.1039/C8TB02026D.
- [51] L. Ghasemi-Mobarakeh, M. P. Prabhakaran, M. Morshed, M. H. Nasr-Esfahani, and S. Ramakrishna, “Electrospun poly(ϵ -caprolactone)/gelatin nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering,” *Biomaterials*, vol. 29, no. 34, pp. 4532–4539, 2008, doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.08.007.
- [52] S. Gautam, A. K. Dinda, and N. C. Mishra, “Fabrication and characterization of PCL/gelatin composite nanofibrous scaffold for tissue engineering applications by electrospinning method,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 33, no. 3, pp. 1228–1235, 2013, doi: 10.1016/j.msec.2012.12.015.
- [53] B. N. Snyder-Talkington, D. Schwegler-Berry, V. Castranova, Y. Qian, and N. L. Guo, “Multi-walled carbon nanotubes induce human microvascular endothelial cellular effects in an alveolar-capillary co-culture with small airway epithelial cells,” *Part. Fibre Toxicol.*, vol. 10, no. 1, pp. 1–14, 2013, doi: 10.1186/1743-8977-10-35.
- [54] N. Higueta-Castro *et al.*, “Using a Novel Microfabricated Model of the Alveolar-Capillary Barrier to Investigate the Effect of Matrix Structure on Atelectrauma,” *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–13, 2017, doi: 10.1038/s41598-017-12044-9.
- [55] A. O. Stucki *et al.*, “A lung-on-a-chip array with an integrated bio-inspired respiration mechanism,” *Lab Chip*, vol. 15, no. 5, pp. 1302–1310, 2015, doi: 10.1039/c4lc01252f.
- [56] M. Zhang, C. Xu, L. Jiang, and J. Qin, “A 3D human lung-on-a-chip model for nanotoxicity testing,” *Toxicol. Res. (Camb)*, vol. 7, no. 6, pp. 1048–1060, 2018, doi: 10.1039/c8tx00156a.
- [57] L. Horvath, Y. Umehara, C. Jud, F. Blank, A. Petri-Fink, and B. Rothen-Rutishauser, “Engineering an in vitro air-blood barrier by 3D bioprinting,” *Sci. Rep.*, vol. 5, 2015, doi: 10.1038/srep07974.
- [58] M. Nikkhah, M. Akbari, A. Memic, A. Dolatshahi-pirouz, and A. Khademhosseini, “for Tissue Engineering and,” *Biomater. from Nat. Adv. Devices Ther.*, pp. 37–62, 2016.
- [59] P. A. Gunatillake, R. Adhikari, and N. Gadegaard, “Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering,” *Eur. Cells Mater.*, vol. 5, pp. 1–16, 2003, doi: 10.22203/eCM.v005a01.

- [60] S. Yang, K. F. Leong, Z. Du, and C. K. Chua, "The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors," *Tissue Eng.*, vol. 7, no. 6, pp. 679–689, 2001, doi: 10.1089/107632701753337645.
- [61] "PCL - xpolymers." <https://www.xpolymers.it/pcl.html> (accessed May 27, 2020).
- [62] C. Tonda-Turo *et al.*, "Crosslinked gelatin nanofibres: Preparation, characterisation and in vitro studies using glial-like cells," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 33, no. 5, pp. 2723–2735, 2013, doi: 10.1016/j.msec.2013.02.039.
- [63] "Microscopio elettronico a scansione - Wikipedia." https://it.wikipedia.org/wiki/Microscopio_elettronico_a_scansione (accessed Jun. 07, 2020).
- [64] "Che cos'è il SEM? Spieghiamo la tecnologia del Microscopio elettronico a scansione | Microscopia Elettronica da banco." <http://www.microscopiaelettronicadabanco.it/come-funziona-il-sem> (accessed Jun. 07, 2020).
- [65] "Il microscopio elettronico: caratteristiche e descrizione dello strumento." <https://www.microbiologiaitalia.it/microscopia/il-microscopio-elettronico/> (accessed Jun. 07, 2020).
- [66] D. I. Ingegneria, T. Di, L. Meccanica, D. D. Laureando, A. C. Matricola, and A. Accademico, "Università degli studi di padova," vol. 591914, pp. 1–83, 2011.
- [67] "ELECTROFORCE® LOAD FRAME AND TESTBENCH INSTRUMENTS."
- [68] S. Giusti, "Bioreattori per la realizzazione di modelli multi-organo in vitro I modelli in vitro," pp. 21–24, 2015.
- [69] "LiveBox2 (LB2) - Products - IVTech." <https://www.ivtech.it/Products/LiveBox2-%28LB2%29/> (accessed Jun. 05, 2020).
- [70] "LiveFlow (LF) - Products - IVTech." <https://www.ivtech.it/Products/LiveFlow-%28LF%29/> (accessed Jun. 05, 2020).
- [71] H. M. Braakhuis, C. Giannakou, W. J. G. M. Peijnenburg, J. Vermeulen, H. van Loveren, and M. V. D. Z. Park, "Simple in vitro models can predict pulmonary toxicity of silver nanoparticles," *Nanotoxicology*, vol. 10, no. 6, pp. 770–779, 2016, doi: 10.3109/17435390.2015.1127443.
- [72] M. Haghi, H. X. Ong, D. Traini, and P. Young, "Across the pulmonary epithelial barrier: Integration of physicochemical properties and human cell models to study pulmonary drug formulations," *Pharmacol. Ther.*, vol. 144, no. 3, pp. 235–252, 2014, doi:

10.1016/j.pharmthera.2014.05.003.

[73] L. Shuler and J. J. Hickman, *TEER measuments in cells*, vol. 20, no. 2. 2016.