# Politecnico di Torino

Tesi magistrale di Ingegneria Biomedica



## Tesi Magistrale

Strategie per la stampa 3D di formulazioni ibride a base di collagene per la realizzazione di scaffold ossei

**Relatrice** Candidata

Prof.ssa Chiara Vitale Brovarone

Daniela Di Giovine

Co-relatrici

Dott.ssa Priscila Melo

Dott.ssa Giorgia Montalbano

Anno Accademico 2020/2021

# Indice

Lis	ta delle F	Figure	4
Lis	ta delle T	Tabelle Tabelle	8
1.	Introdu	zione	11
2.	Stato d	ell'Arte	14
2	2.1. Il to	essuto osseo: caratteristiche e uso in medicina rigenerativa	14
	2.1.1.	Tessuto osseo	14
	2.1.2.	Osteogenesi, cellule ossee e formazione del tessuto osseo	17
	2.1.3.	La formazione del tessuto osseo	20
2	2.2. Ost	teoporosi	21
	2.2.1.	Caratteristiche ed implicazioni della malattia	21
	2.2.2.	Diagnosi e terapie	23
	2.2.3.	Nuove terapie	24
2	2.3. Bio	omateriali per la rigenerazione del tessuto osseo	25
	2.3.1.	Scaffold per tessuto osseo	27
	2.3.2.	Biomateriali e applicazioni nella TE	28
	2.3.3.	I biomateriali compositi	31
2	2.3.4	Sistemi compositi a base di collagene	32
2	2.3.5	Strategie di reticolazione del collagene	33
	2.3.6	Materiali bioattivi	36
2	4 Ad	ditive Manufacturing	40
	2.4.1	Bioprinting	43
	2.4.2	Parametri di stampa	46
	2.4.3	Bagni sacrificali di supporto ai processi di stampa 3D	49
3	Materia	ali e Metodi	52
	3.1.1	Sintesi idrotermale delle nanoparticelle di HA (nanoHA)	53
	3.1.2	Sintesi sol-gel dei vetri bioattivi mesoporosi contenenti Stronzio (MBG)	54

	3.1	.3	Preparazione	della	formulazione	ibrida	a	base	di	collage	ene:	GEN-
	Col	11/M	3G/nanoHA									55
	3.1	.4	Preparazione de 56	l bagn	o di supporto pe	r la stam	pa: s	slurry d	i algi	nato a b	ase d	i CaCl <sub>2</sub>
	3.1	.5 St	ampa 3D di scaff	fold co	mpositi in grado	di effett	uare	una re	ticola	zione in	ı-situ	59
	3.1	.6	Eliminazione de	el bagn	o di supporto e p	ost-retic	olaz	ione de	gli sc	affold		60
	3.1	.7	Preparazione de	ei can	npioni bulk pe	r analiz	zare	le pr	oprie	à del	biom	ateriale
	con	npos	ito ottenuto									61
3	3.2	Met	odi di caratterizz	azione								61
	3.2	.1.	Caratterizzazion	e delle	proprietà reolo	giche dei	mat	eriali				61
	3.2	.2.	Analisi morfolo	giche								66
	3.2	.3.	Test di degradaz	zione e	nzimatica ed idr	olitica						68
	3.2	.4.	Test di rilascio d	degli id	oni Stronzio							69
	3.2	.5.	Test biologici									69
4.	Ris	ultat	i e discussione									72
2	4.1. C	aratı	erizzazione delle	propr	ietà reologiche d	lei materi	iali					74
2	1.2.	Deg	radazione in vitr	o delle	strutture reticol	ate con g	enip	oina				81
2	1.3.	Rila	scio degli ioni St	tronzio	in vitro delle st	rutture re	tico	late cor	n geni	pina		83
۷	1.4.	Car	atterizzazione del	l bagno	o di supporto							85
۷	1.5.	Rea	lizzazione scaffo	ld 3D	tramite processo	di stamp	oa ac	l estrus	ione.			94
2	1.6.	Car	atterizzazione mo	orfolog	ica degli scaffol	d						108
2	1.7.	Car	atterizzazione bio	ologica	in vitro: biocon	npatibilit	à de	gli scaf	fold			113
5.	Coı	nclus	sioni									117
6.	Bib	oliog	rafia									120
7.	Rin	ıgraz	iamenti									130

# Lista delle Figure

Figura 1 - Struttura dell'osso compatto.	15
Figura 2 - Struttura macroscopica osso spongioso e osso compatto	16
Figura 3 - Struttura gerarchica dell'osso dalla nano alla macro-scala.	16
Figura 4 - Differenziamento delle cellule del tessuto osseo.	18
Figura 5 - Confronto tra i due processi di ossificazione.	20
Figura 6 - Differenze tra un tessuto osseo sano ed osteoporotico	22
Figura 7 - Rimodellamento osseo: fisiologico e patologico.	23
Figura 8 - Tipi di innesto osseo: (A) autologo, (B) allogenico, (C) xenogenico, (D) sostitu	
Figura 9 - Schema della triade dell'ingegneria tissutale.	
Figura 10 - Biomateriali per TE e rigenerazione del tessuto osseo [27]	28
Figura 11 – Esempi di scaffold a base di collagene attualmente in commercio.	33
Figura 12 - Schema illustrativo delle tecniche di reticolazione chimica, fisica, en	zimatica,
maggiormente utilizzate per scaffold a base di collagene	34
Figura 13 - Schema illustrativo dell'azione chimica della genipina sul collagene [45]	36
Figura 14 - Struttura chimica idrossiapatite.	37
Figura 15 - Immagini FESEM di MBG (a-b) Prodotti via Sol-Gel; (c-d) prodotti con tecn	ica spray
drying [56]	39
Figura 16 - Biomateriali e proprietà associate.	40
Figura 17 - Schema del processo di creazione e manifattura di un oggetto usando AM [64].	43
Figura 18 - Schema di funzionamento LIFT.	44
Figura 19 - Schema funzionamento Inkjet bioprinting con le due testine utilizzabili	45
Figura 20 - Testine utilizzate nella microestrusione.	46
Figura 21 - Parametri e componenti del processo di Extrusion Bioprinting [71]	46
Figura 22 - Proprietà reologiche del materiale che influenzano la stampabilità e la fedeltà	di forma.
(A) Interazione delle proprietà reologiche, durante l'estrusione. (B) Esempio di un test di A	mplitude
Sweep su una sostanza viscoelastica [71].	47
Figura 23 - Tecnica FRESH (E) V1.0 (F) V2.0 [76].	50
Figura 24 - Sintesi idrotermale di nanoparticelle di HA. A) Reattore idrotermale (B) partic	elle pre e
(C) post essiccazione in forno.	54
Figura 25 - Schema rappresentativo per la realizzazione della formulazione Coll/MBG /nan	юНА56
Figura 26 - Struttura chimica dell'alginato (A) acido $\beta$ -D-mannuronico (B) acido $\alpha$ -L-gulur	onico. 57
Figura 27 - Modello "Egg-Box" del network di alginato [85]	58

Figura 28 - Realizzazione bagno di estrusione a base di alginato (A) gel di alginato (B) Slurry di
alginato58
Figura 29 - Schema del processo di stampa
Figura 29 - Equazione della viscosità espressa dalle specifiche del reometro e dalle costanti di forma
geometrica62
Figura 30 - Equazione del modulo viscoelastico espresso dalle specifiche del reometro e dalle costant
di forma geometrica63
Figura 31 - Reometro DHR-2 (TA Instruments, Waters)
Figura 34 - Analisi delle proprietà viscoelastiche delle sospensioni (A) Coll/MBG/nanoHA (B) GEN-
Coll/MBG/nanoHA a 10 °C. identificazione dei punti di scorrimento e di flusso in funzione dei valor.
di G' e G''
Figura 35 - Andamento della viscosità in funzione del tempo (A) di Coll/MBG/nanoHA (B) GEN-
Coll/MBG/nanoHA76
Figura 36 - Peak hold test eseguiti sulle formulazioni ibride (A) GEN-Coll/MBG/nanoHA (B)
Coll/MBG/nanoHA77
Figura 37 - Andamento dei moduli G' e G'' in funzione del tempo dei campioni (A)
Coll/MBG/nanoHA (B) GEN-Coll/MBG/nanoHA C) GEN-Coll/MBG/nanoHA +GEN78
Figura 38- Zona viscoelastica lineare in funzione dei moduli G' e G'' (A) Coll/MBG/nanoHA (B)
GEN-Coll/MBG/nanoHA (C) GEN-Coll/MBG/nanoHa + GEN
Figura 39 - Andamento dei moduli G' e G'' in funzione della temperatura: (A) Coll/MBG/nanoHA
(B)GEN- Coll/MBG/nanoHA (C) GEN- Coll/MBG/nanoHA + GEN
Figura 40 - Degradazione enzimatica dei campioni GEN-Coll/MBG/nanoHA e GEN-
Coll/MBG/nanoHA + GEN fino a 48 ore82
Figura 41 – Degradazione idrolitica dei campioni GEN-Coll/MBG/nanoHA e GEN-
Coll/MBG/nanoHA + GEN fino a 14 giorni83
Figura 42 - Rilascio degli ioni Sr <sup>2+</sup> per i sistemi GEN-Coll/MBG/nanoHA e GEN-Coll/MBG/nanoHA
+GEN84
Figura 43 - Alginato con CaCO <sub>3</sub> : presenza di deposito di particolato
Figura 44 - Alginato a base di CaCl <sub>2</sub> 86
Figura 45 - Analisi delle variazioni dei moduli G' e G'' in funzione del tempo (A) Acido
alginico/CaCl <sub>2</sub> 4:1 (B) Acido alginico/CaCl <sub>2</sub> 3:287
Figura 46 - Valutazione della stabilità dei gel al variare della temperatura (A) Acido alginico/CaCl2
4:1 e Acido alginico/CaCl <sub>2</sub> 3:2

Figura 47 - Gel di Alginato al 40 wt% (A) Acido Alginico/CaCl <sub>2</sub> 4:1 (B) Acido Alginico/CaCl <sub>2</sub> 3:2
38
Figura 48 - Gel di alginato finale.
Figura 49 - Gel di Alginato con CaCl <sub>2</sub> al (A) 7 wt%, (B)14 wt% e (C)21 wt%90
Figura 50 - Analisi della rigidezza dei gel al variare del tempo con concentrazione di CaCl <sub>2</sub> al (A) 7 wt% (B) 14 wt% (C) 21 wt%
Figura 51 - Analisi delle proprietà viscoelastiche al variare della temperatura per l'alginato al (A) 7 wt% CaCl <sub>2</sub> (B) 14 wt% CaCl <sub>2</sub> (C) 21 wt% CaCl <sub>2</sub>
Figura 52 - Slurry (A) Alginato 7 wt% CaCl <sub>2</sub> (B) Alginato 14 wt% CaCl <sub>2</sub> (C) Alginato 21 wt% CaCl <sub>2</sub>
Figura 53 - Analisi della zona viscoelastica lineare per i tre slurry di Alginato al (A) 7 wt% CaCl <sub>2</sub> (B) 14 wt% CaCl <sub>2</sub> (C) 21 wt% CaCl <sub>2</sub>
Figura 54 - Andamento delle proprietà viscoelastiche degli slurry di alginato in funzione della
temperatura A) 7 wt% CaCl <sub>2</sub> (B) 14 wt% CaCl <sub>2</sub> (C) 21 wt% CaCl <sub>2</sub> . Le frecce indicano il valore di G a 20 °C
Figura 55 - Test di stampa con i tre slurry di Alginato con CaCl <sub>2</sub> a diverse concentrazioni94
Figura 56 - Scaffold 3D stampati in bagno di Alginato con CaCl <sub>2</sub> al (A) 7 wt% (B) 14 wt% (C) 21
wt%
Figura 57 - Scaffold 3D nel bagno di supporto di Alginato a base di CaCl <sub>2</sub> (A) 14 wt% (B) 7 wt%
Figura 58 - Confronto tra scaffold rispetto la (A) geometria di riferimento, realizzati con pression differenti
Figura 59 - Grandezze geometriche analizzate dalla (A) geometria CAD selezionata; e dagli scaffolo con spessore (B) 3 mm e (C) 0.3 mm
Figura 60 - Grandezze geometriche analizzate dalla (A) geometria CAD selezionata; e dagli scaffolo
con spessore (B) 3 mm e (C) 1 mm
Figura 61 - Grandezze geometriche analizzate dalla (A) geometria CAD selezionata e (B) dallo scaffold
Figura 62 - Dimensioni misurate per una geometria Honeycomb 20% infill (A) CAD, (B) scaffold
Figura 63 - Modello osseo stampato con altezza (A) di 6 mm e (B) 8 mm; post incubazione a 37 °C
per 24 ore (C) 6 mm e (D) 8 mm. (E) Geometria CAD di riferimento
Figura 64 - Scaffold (A) Honeycomb 25% infill 10x10x0.3 mm (B) Modello osseo 6 mm di altezza
post reticolazione e lavaggi108

Figura 65 - Immagini SEM di uno scaffold 3D ad un ingrandimento di 1000x (A-B), di 2500x (C) e
5000x (D). I cerchi blu indicano gli MBG nella matrice di collagene, indicata con le frecce rosse
109
Figura 66 - Immagini FESEM di uno scaffold 3D in cui è evidenziata la presenza della nanoHA
(cerchio rosso) e degli MBG (cerchio blu).
Figura 67 - Scaffold su supporto idoneo per l'analisi alla microCT
Figura 68 - Ricostruzione della struttura 3D attraverso la MIP (A) Honeycomb 10x10x0.3 mm ed
attraverso i colori di assorbimento (B) Honeycomb 10x10x3 mm (B) Honeycomb 10x10x0.3 mm
112
Figura 69 - Istogramma raffigura la vitalità cellulare delle MG63 tramite XTT, seminate sugli scaffold
GEN-Coll/MBG/nanoHA e GEN-Coll/MBG/nanoHA +GEN comparato con il TCP a 24 e 72 ore
114
Figura 70 - Immagini SEM delle cellule MG63 seminate sugli scaffold GEN-Coll/MBG/nanoHA e
GEN-Coll/MBG/nanoHA +GEN. (Scala di misura: A, E, C e D 50 μm; B, F, D e H 20 μm)115
Figura 71 - Colorazione di ematossilina ed eosina su scaffold. A) Ingrandimento 20x; B)
Ingrandimento 40x. Le frecce nere indicano le cellule sullo scaffold
Figura 72 - Distribuzione cellulare sugli scaffold GEN-Coll/MBG/nanoHA +GEN a diversi
ingrandimenti: (A-D) 10x, (B-E) 20x, (C-F) 40x. Le frecce nere sono usate per indicare la
distribuzione sulla superficie, mentre quelle rosse nei pori116

## Lista delle Tabelle

Tabella 1 - Biomateriali per rigenerazione del tessuto osseo
Tabella 2 - Tecniche di AM4
Tabella 3 - Tipi di bagni di supporto usati nel processamento di materiali morbidi e con bass
viscosità4
Tabella 4 - Materiali per la sospensione Coll/MBG/nanoHA
Tabella 5 - Riassunto dei test di flusso effettuati sui sistemi ibridi a base di collagene6
Tabella 6 - Riassunto dei test in oscillazione effettuati sui campioni ibridi a base di collagene6
Tabella 7 - Riassunto dei test in oscillazione effettuati sul bagno di estrusione60
Tabella 8 - Valori ottenuti tramite Amplitude Sweep a 10 °C delle sospensioni ibride a base d
collagene7
Tabella 9 - Valori della viscosità ottenuti tramite il test di Peak Hold per 2 ore70
Tabella 10 – Valori di viscosità ottenuti dal test di Peak Hold7
Tabella 11 – Valori ottenuti dal test di Time Sweep da 10 minuti
Tabella 12 - Riassunto risultati del Time Sweep su gel di alginato con rapporto Acido alginico/CaCl
4:1 e Acido alginico/CaCl <sub>2</sub> 3:28
Tabella 13- Risultati ottenuti con il test di Temperarture Ramp
Tabella 14 - Riassunto della media e della deviazione standard ricavate dall'analisi delle dimension
dei campioni stampati a pressioni differenti, rispetto la geometria CAD di partenza9
Tabella 15 - Riassunto della media e della deviazione standard ricavate dall'analisi delle dimension
dei campioni stampati con gli stessi parametri ma con spessori differenti, rispetto la geometria CAI
scelta10
Tabella 16 - Analisi statistica delle dimensioni ricavate dagli scaffold con altezza 3 mm e 1 mm
rispetto la geometria desiderata
Tabella 17 - Analisi statistica delle dimensioni ricavate dallo scaffold con altezza 3 mm, rispetto l
geometria desiderata
Tabella 18 - Analisi statistica delle dimensioni ricavate dallo scaffold con altezza 3 mm, rispetto l
geometria desiderata
Tabella 19 - Riassunto dei parametri utilizzati durante i processi di stampa della formulazione GEN
Coll/MBG/nanoHA nel bagno di supporto a base di alginato
Tabella 20 - Riassunto dei parametri di stampa scelti per il modello osseo10

#### **ABSTRACT**

Negli ultimi anni, l'ingegneria tissutale si è focalizzata sullo sviluppo di sistemi biomimetici e bioattivi in grado di influenzare e guidare l'attività cellulare, fornendo una valida strategia alternativa alle più convenzionali tecniche farmacologiche e chirurgiche. Specialmente nel caso di patologie come l'osteoporosi, l'uso di scaffold che mimino le caratteristiche fisico-chimiche e strutturali della matrice extracellulare ossea, può essere considerato un fattore chiave nel ripristino del fisiologico bilanciamento tra l'attività di osteoblasti e osteoclasti.

In questo scenario, sistemi compositi a base di collagene di tipo I, vetri bioattivi mesoporosi contenenti stronzio (MBG\_Sr4%) e nanoparticelle di idrossiapatite (nanoHA), hanno dimostrato di essere sistemi promettenti per mimare le caratteristiche composizionali e nano-strutturali del tessuto osseo. Inoltre, partendo da questi materiali, l'uso di tecnologie di stampa 3D ad estrusione può essere sfruttato per supportare la progettazione di strutture complesse, non essendo tali tecniche soggette ai vincoli di forma e porosità che si presentano spesso con l'uso delle tecniche convenzionali. Tuttavia, queste tecniche di fabbricazione richiedono non solo l'ottimizzazione delle proprietà reologiche del materiale ma anche l'uso di bagni di supporto che permettano l'accurata deposizione del materiale.

Partendo da queste considerazioni, le attività di ricerca presentate in questa tesi si sono concentrate sulla ricerca di strategie atte a migliorare il processo di stampa, aumentando la stabilità del materiale stampato, in modo da evitarne il collasso una volta rimosso il bagno di supporto, e migliorando l'accuratezza geometrica finale dello scaffold. Lo studio è stato condotto esplorando le caratteristiche di una formulazione a base di collagene tipo I, contenente sia MBG\_Sr4% che nanoHA, a cui si è aggiunto lo 0.1 wt% genipina, un reticolante naturale del collagene, in modo da favorire oltre alla reticolazione fisica del collagene, anche una reticolazione chimica in-situ per potenziarne le proprietà viscoelastiche. In aggiunta al processo di reticolazione in-situ è stato valutato un trattamento di postreticolazione, incubando il materiale in una soluzione di 0.5 wt% genipina/etanolo per 24 ore.

L'effetto dei diversi trattamenti di reticolazione sulle proprietà finali del materiale è stato valutato tramite analisi reologiche e test in vitro di degradazione, esplorando inoltre la capacità dei sistemi di rilasciare ioni stronzio. Oltre alle strategie di reticolazione atte a migliorare le proprietà visco-elastiche del materiale, in questo lavoro è stato sviluppato ed ottimizzato un bagno di supporto sacrificale consistente in uno slurry di alginato, allo scopo di fornire un adeguato sostegno al processo di estrusione ed ottenere una buona fedeltà di stampa.

Le strategie precedentemente sviluppate sono state applicate per la realizzazione di scaffold con diverse geometrie, ottimizzando i parametri di stampa ed esplorando la possibilità di riprodurre

architetture complesse. Le strutture stampate sono state caratterizzate morfologicamente tramite tecniche di microscopia, mentre analisi di microtomografia computerizzata (microCT) hanno permesso di ottenere una ricostruzione 3D delle strutture realizzate.

Per concludere, è stata valutata la citocompatibilità degli scaffold realizzati utilizzando linee cellulari pre-osteoblastiche MG63, valutando l'effetto dei diversi trattamenti di reticolazione sulla vitalità e proliferazione cellulare.

#### 1. Introduzione

Le attività di ricerca presentate in questa tesi descrivono il lavoro dedicato allo sviluppo di strategie per la stampa 3D di formulazioni ibride a base di collagene, allo scopo di realizzare degli scaffold per applicazione nella rigenerazione del tessuto osseo.

Le attività presentate sono state svolte nell'ambito del progetto europeo ERC BOOST, che mira alla realizzazione di uno scaffold bioattivo e biomimetico, in grado di fornire stimoli chimici e fisici alle cellule del tessuto osseo, valutando il possibile ripristino dell'equilibrio nel rimodellamento osseo, compromesso in caso di condizioni patologiche quali l'osteoporosi.

In questo scenario, i sistemi compositi e bioattivi a base di collagene di tipo I, vetri bioattivi mesoporosi contenenti stronzio (MBG\_Sr4%) e nanoparticelle di idrossiapatite (nanoHA), rappresentano strumenti promettenti per imitare le caratteristiche fisico-chimiche e nano-strutturali della matrice extracellulare ossea. Inoltre, le tecnologie di Additive Manufacturing come la stampa 3D ad estrusione possono supportare la progettazione di strutture complesse limitando i vincoli di forma e porosità che si presentano invece con l'uso delle tecniche convenzionali. Tuttavia, queste tecniche di fabbricazione richiedono una complessa ottimizzazione delle formulazioni dei biomateriali da stampare in termini di specifiche proprietà reologiche e meccaniche, preservando un'elevata biocompatibilità.

Partendo da queste considerazioni, le attività di ricerca svolte durante questa tesi magistrale si sono concentrate principalmente sulla ricerca di strategie atte a migliorare il processo di stampa di strutture di collagene, per migliorare l'accuratezza geometrica della struttura estrusa e contemporaneamente ottimizzare le proprietà viscoelastiche degli scaffold 3D stampati. Gli approcci adottati per raggiungere tali obiettivi, sono stati rispettivamente: 1) lo sviluppo e l'ottimizzazione di un bagno di stampa a base di alginato che agisse come supporto all'estrusione; 2) la valutazione e l'ottimizzazione di trattamenti di reticolazione chimica del collagene tramite genipina per migliorare le proprietà visco-elastiche e la stabilità dei costrutti finali.

In accordo con gli obiettivi principali dello studio di ricerca e con l'obiettivo di fornire una panoramica generale dello stato dell'arte, il secondo capitolo introduttivo presenterà le caratteristiche del tessuto osseo e nello specifico, i legami tra i fattori di regolazione del rimodellamento osseo e l'insorgenza dell'osteoporosi. Dopo aver discusso le cause e le terapie in atto verranno presentate le basi dell'ingegneria tissutale ed i recenti progressi nella rigenerazione del tessuto osseo. In dettaglio, la Sezione 2.3 sarà dedicata ai principali biomateriali utilizzati per realizzare scaffold ossei, descrivendone i vantaggi ed i limiti. Un' attenzione particolare verrà focalizzata sull'uso di collagene

di tipo I per progettare materiali e scaffold biomimetici, in combinazione con fasi bioattive aggiuntive come MBG e nanoHA, e le attuali strategie utilizzate per aumentare la stabilità finale dei costrutti a base di collagene. Nella quarta ed ultima sezione di questo capitolo, verrà affrontata la descrizione delle tecnologie di Additive Manufacturing, e in maniera più approfondita, della tecnica di stampa 3D ad estrusione, utilizzata per questa attività di ricerca. In questa parte, si discuterà delle proprietà che i materiali devono possedere, in combinazione alla scelta dei parametri di stampa, per poter avere la struttura geometrica desiderata. Nel dettaglio, verrà introdotto l'uso di bagni di supporto sacrificali e di tecniche di produzione innovative, per il trattamento di biomateriali con e senza l'uso di cellule.

Il terzo capitolo riporterà i materiali ed i metodi utilizzati per la realizzazione di scaffold ossei con una sospensione a base di collagene e contenente MBG, nanoHA e genipina. Verranno descritti, in particolare, i protocolli usati per ottenere la sospensione e le sintesi usate per realizzare le diverse fasi inorganiche. Per produrre delle strutture complesse 3D, garantendo allo stesso tempo stabilità e fedeltà di stampa, sono state testate diverse strategie: la reticolazione chimica del collagene con genipina e l'uso di un bagno di supporto sacrificale a base di alginato.

Lo studio è stato condotto caratterizzando la formulazione contenente genipina al 0.1 wt% in modo da favorire, oltre alla transizione sol-gel del collagene, una reticolazione *in-situ* della sospensione. In aggiunta al processo di reticolazione *in-situ*, è stato successivamente valutato un trattamento di post reticolazione, incubando i costrutti 3D ottenuti in una soluzione 0.5 wt% genipina/etanolo per 24 ore. L'effetto di questi trattamenti sulle proprietà finali dei costrutti è stato valutato, in termini di proprietà viscoelastiche, attraverso test al reometro, mentre test di degradazione *in vitro* e rilascio degli ioni stronzio sono stati condotti per valutare ulteriormente l'influenza delle diverse reticolazioni sulle proprietà del materiale finale. Oltre alla reticolazione, in questo lavoro è stato sviluppato ed ottimizzato un bagno di supporto sacrificale consistente in uno slurry di alginato, per fornire un adeguato sostegno ai processi di estrusione e ottenere una buona fedeltà di stampa.

A seguito della descrizione dei diversi materiali e degli strumenti usati per l'analisi, si tratterà del processo di stampa, dei parametri e delle geometrie utilizzate per realizzare scaffold 3D di geometria complessa, nello specifico utilizzando una stampante commerciale (BIOX, CellInk). Le strutture stampate sono state caratterizzate morfologicamente attraverso la Microscopia a Scansione Elettronica (SEM) e la Microscopia a Scansione Elettronica ed Emissione di Campo (FE-SEM) per osservare la dispersione delle diverse particelle inorganiche nella matrice di collagene e la ricostituzione di una struttura fibrillare. Infine, è stata utilizzata la microtomografia computerizzata (microCT), di cui saranno descritti i parametri ed i software, per avere una ricostruzione 3D delle

strutture realizzate, evidenziando i diversi componenti presenti e permettendo la visualizzazione della geometria finale su diversi angoli, completando così l'analisi di microscopia.

Per concludere, sono stati condotti dei test per ottenere informazioni sulla biocompatibilità degli scaffold realizzati attraverso i processi di stampa 3D e a seguito dei diversi processi di reticolazione con genipina. Quest'ultima parte del lavoro è stata realizzata in collaborazione con l'Università Politecnica delle Marche, sotto la supervisione della Prof.ssa Monica Mattioli-Belmonte. La citotossicità del materiale è stata analizzata tramite il saggio XTT ed i risultati ottenuti sono stati supportati da analisi SEM che hanno permesso di valutare sia la presenza di cellule sul campione che la loro distribuzione. Infine, è stata effettuata una analisi istologica in modo da investigare la capacità di colonizzazione delle cellule sullo scaffold.

A seguito di quanto introdotto, il quarto capitolo sarà dedicato alla presentazione dei risultati ottenuti e alla loro discussione. Verranno descritti i procedimenti utilizzati, le informazioni ricavate dalle varie analisi, la loro contestualizzazione nello stato dell'arte ed anche la loro traduzione in ambito applicativo. I dati ottenuti saranno confrontati e commentati sulla base della letteratura e dei precedenti studi effettuati.

Un capitolo finale verrà dedicato alle conclusioni, con accenno ai possibili sviluppi futuri. In sintesi, i risultati ottenuti hanno permesso di ottenere delle strategie per stabilizzare e migliorare le proprietà viscoelastiche finali dei sistemi realizzati tramite stampa 3D, garantendo una buona stabilità strutturale e la biocompatibilità dei costrutti realizzati. Gli scaffold ottenuti possono essere utilizzati come base per investigare maggiormente la loro bioattività con ulteriori test cellulari, esplorando la loro potenziale influenza sull'attività cellulare nel processo di rimodellamento osseo.

#### 2. Stato dell'Arte

#### 2.1. Il tessuto osseo: caratteristiche e uso in medicina rigenerativa

Nel capitolo che segue si descriverà il tessuto osseo nella sua struttura e composizione, evidenziandone le caratteristiche fondamentali; necessario punto di partenza per la progettazione del dispositivo medico. Si affronterà la malattia dell'osteoporosi, problema di grave impatto sia sul singolo individuo che sulla collettività, le terapie utilizzate per contrastarla e quelle in fase di sviluppo. Verranno introdotti i biomateriali, in particolare le formulazioni ibride, descrivendo le loro proprietà e applicazioni nel campo della rigenerazione ossea. Nel dettaglio, l'attenzione verrà focalizzata sul collagene, matrice organica, e su due diverse fasi inorganiche quali vetri bioattivi mesoporosi e idrossiapatite, componenti base del sistema sviluppato e studiato nell'ambito della tesi presentata. Il capitolo tratterà la reticolazione di questi sistemi compositi ed il loro processamento, concludendo con la descrizione e l'utilizzo delle tecniche di stampa 3D, per la realizzazione di scaffold in grado di supportare la rigenerazione di nuovo tessuto osseo.

#### 2.1.1. Tessuto osseo

L'osso è un tessuto connettivo, metabolicamente attivo, in grado di modificare la sua struttura in seguito a stimoli meccanici e organici. Le ossa svolgono numerose funzioni nell'organismo: forniscono supporto all'intera struttura corporea, rendono possibile il movimento, proteggono gli organi interni, sintetizzano i fattori di crescita, sono un deposito di sali minerali di cui regolano l'omeostasi e ospitano il midollo osseo, che svolge funzione emopoietica [1].

Il tessuto osseo è costituito da cellule inserite in una matrice extracellulare, composta principalmente da acqua, da una componente organica (20-30%) ed una inorganica (60-70%).

La matrice organica è composta fondamentalmente da collagene di tipo I, combinato con una quantità inferiore di proteine non collageniche, fattori di crescita e proteoglicani. La fase inorganica è invece data principalmente da fosfato di calcio, sotto forma di cristalli di idrossiapatite e carbonato di calcio, che rappresentano nell'insieme il 65% circa del peso secco dell'osso [2].

In questo contesto avviene un controllo a livello sia osseo, che endocrino per la deposizione e la mobilizzazione di calcio e di fosfato, permettendo la regolazione della concentrazione di questi ioni nei liquidi circolanti [3].

L'architettura del tessuto osseo è il risultato di un adattamento biomeccanico complesso su base genetica, in cui l'organizzazione strutturale dipende essenzialmente dalle sollecitazioni meccaniche a cui è sottoposto durante il suo sviluppo e dal tipo di vascolarizzazione che si genera. Infatti, in

termini di struttura, l'osso presenta due principali forme: compatto e spugnoso. A livello complessivo di matrice entrambi i tessuti presentano la stessa composizione, mentre ciò che li differenzia, dal punto di vista funzionale e fisiologico, è la struttura tridimensionale, caratterizzata da una diversa densità e porosità; che porta, di conseguenza, ad una diversa attività metabolica [2], [3].

Il tessuto compatto (Figura 1) costituisce circa l'80% della massa ossea di un individuo adulto ed è formato da lamelle ossee, unite tra di loro. Queste ultime sono composte da fibrille di collagene parallele, sovrapposte concentricamente su più strati e da una parte amorfa, e sono alla base anche delle unità strutturali, denominate osteoni, costituite da lamelle ossee concentriche sviluppate intorno ad un vaso sanguigno longitudinale, detto canale Haversiano. I vari sistemi osteonici comunicano tra di loro, con la cavità midollare e con la superficie libera dell'osso tramite canali disposti trasversalmente e obliquamente, detti canali di Volkmann, mentre fra osteoni adiacenti si trova l'osso interstiziale [2], [4]. A completare la struttura dell'osso corticale, sono presenti sulla superficie vari strati di lamelle, unite al periostio tramite le fibre di collagene chiamate "fibre di Sharpey". Quest'ultimo rappresenta una lamina connettivale fibro-elastica e favorisce un'elevata vascolarizzazione del tessuto osseo, rendendo possibile la nutrizione e l'innervazione del tessuto fino agli strati più profondi [5].

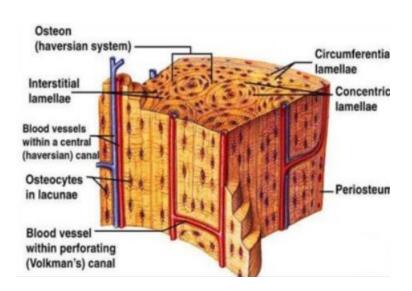


Figura 1 - Struttura dell'osso compatto.

Al contrario, il tessuto spugnoso (Figura 2) è formato da lamine ossee unite fra loro, in modo da costruire un sistema di cavità interconnesse, dove si trova il midollo osseo: si tratta dunque di

un'architettura molto porosa, che presenta un maggior rapporto superficie/volume, ottenendo un'elevata resistenza alla compressione [2].

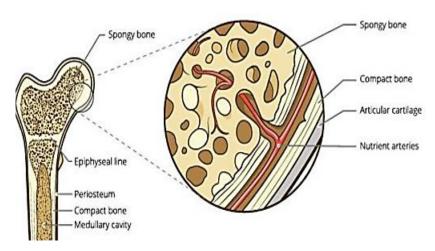


Figura 2 - Struttura macroscopica osso spongioso e osso compatto.

A seconda della disposizione delle lamelle, il tessuto osseo si divide in lamellare e non lamellare (Figura 3). Quest' ultimo è una tipologia di osso non del tutto sviluppato, maggiormente presente nei feti, embrioni e per un breve tempo a seguito di un evento di frattura. L'osso lamellare, anche detto maturo, è quello maggiormente presente in un adulto, ed è composto da una matrice organica e da una parte mineralizzata [2].

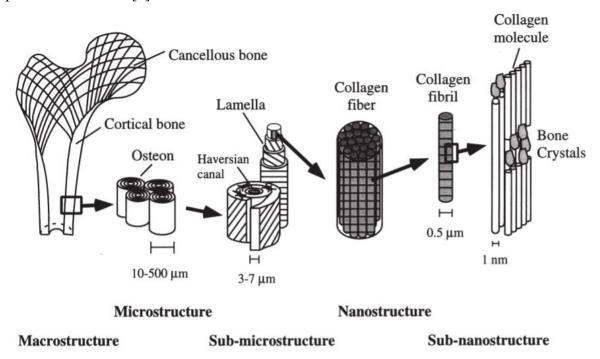


Figura 3 - Struttura gerarchica dell'osso dalla nano alla macro-scala.

La parte organica è costituita per circa il 90% da collagene di tipo I e fornisce alle ossa resistenza alla trazione. Il collagene di tipo I ha una struttura a tripla elica, formata da due catene polipeptidiche di tipo α1 e α2, le molecole sono unite in modo sfalsato in fibrille di lunghezza variabile, da alcune decine di nanometri fino al millimetro e sono stabilizzate da legami inter-fibrillari [5], [6]. Nell'osso maturo i fasci di fibrille sono disposti parallelamente fra loro in ciascuna lamella, secondo una disposizione elicoidale rispetto all'asse dell'osteone, mentre nel tessuto non lamellare le fibre di collagene si dispongono in fasci intrecciati con delle lacune nella matrice [6]. Nell'osteone, quindi, si alternano lamelle con andamento destrorso e sinistrorso, ognuna con una propria inclinazione.

Le restanti proteine, che costituiscono il rimanente 10% della matrice organica, sono: osteopontina, osteocalcina ed osteonectina. Sono classificate come proteine di adesione, contribuiscono alla tenacizzazione del tessuto osseo a livello nanometrico, creando un collante fra il collagene e la fase minerale, fra le varie fibre di collagene, e fra l'osso e le cellule ossee [5].

La fase minerale ossea è composta da cristalli di apatite non stechiometrica con la formula chimica Ca<sub>10</sub> (PO<sub>4</sub>)<sup>6++</sup>, la cui cella elementare ha la forma di un prisma esagonale appiattito; le due cariche positive sono di norma neutralizzate dal legame con due ioni idrossido (OH<sup>-</sup>) formando l'idrossiapatite [3],[5]. Tali cristalli tendono a disporsi parallelamente tra di loro e le microfibrille di collagene, di cui ricoprono la superficie, permeando le porosità. La loro formazione avviene durante il processo di mineralizzazione dell'osso, in cui il fosfato di calcio precipita inizialmente sotto forma di minutissimi aggregati amorfi. Una volta formati i cristalli di apatite, la deposizione di nuovo minerale può avvenire sia per formazione di nuovi cristalli che per apposizione sui preesistenti. Questo fenomeno è finemente regolato dalle cellule ossee, attraverso la produzione di specifiche molecole della matrice [3].

### 2.1.2. Osteogenesi, cellule ossee e formazione del tessuto osseo

Le cellule del tessuto osseo sono morfologicamente distinguibili in quattro varietà: le cellule progenitrici, gli osteoblasti, gli osteociti e gli osteoclasti (Figura 4). Le cellule osteoprogenitrici derivano da cellule staminali mesenchimali, differenziando poi in osteoblasti ed osteociti mentre gli osteoclasti hanno origine ematopoietica, [2].

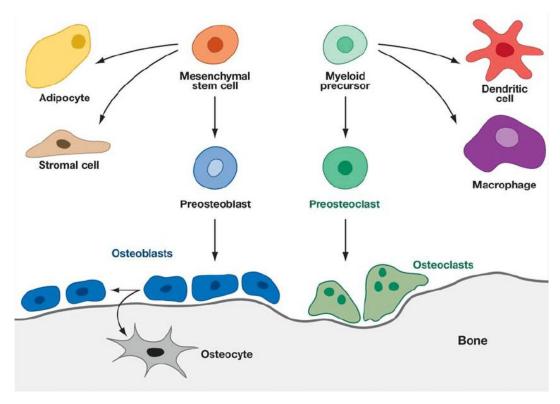


Figura 4 - Differenziamento delle cellule del tessuto osseo.

In presenza di un appropriato stimolo le cellule staminali mesenchimali si trasformano in preosteoblasti, istologicamente simili agli osteoblasti ma non ancora in grado di produrre tessuto
mineralizzato, hanno le caratteristiche delle cellule staminali, sono indifferenziate e proliferanti [1],
[7]. I pre-osteoblasti durante l'accrescimento osseo si trasformano in osteoblasti, cellule di dimensioni
di circa 20 µm, in grado di sintetizzare la matrice extracellulare dell'osso e di partecipare alla sua
mineralizzazione. Esse hanno forma globosa o poliedrica e tendono a giustapporsi le une alle altre,
formando delle lamine epitelioidi a ridosso delle superfici ossee in via di sviluppo [7].

Oltre al loro ruolo nella formazione dell'osso, gli osteoblasti depositano all'interno della matrice fattori che vengono successivamente rilasciati dagli osteoclasti durante il riassorbimento osseo, o tramite interazioni cellula-cellula, producendo inoltre i fattori di crescita in grado di stimolare le colonie di macrofagi (M-CSF), la citochina RANKL e l'osteoprotegerina (OPG), essenziali alla formazione e al buon funzionamento degli osteoclasti [4].

Questo processo viene bilanciato a livello ormonale attraverso l'azione del paratormone (PTH), che agendo sugli osteoblasti, permette di secernere la proteina M-CSF e la citochina RANKL, per la quale i monociti presentano uno specifico recettore RANK. Dall'interazione tra queste molecole prodotte dagli osteoblasti e i recettori specifici dei monociti si induce la loro differenziazione in osteoclasti. Per inibire l'attività dl RANKL viene attivata la produzione dell'OPG, evitando così un eccesso di attività di riassorbimento osseo da parte degli osteoclasti [3].

Infine, oltre a regolare il differenziamento degli osteoclasti, gli osteoblasti sono in grado di controllarne il movimento tramite il rilascio di fattori chemiotattici: l'osteocalcina e il collagene-I, entrambi liberati dagli osteoclasti durante la fase di riassorbimento ed utilizzati come segnale per le cellule precursore degli osteoclasti nelle vicinanze del sito di riassorbimento. Concluso il ciclo di riformazione ossea, gli osteoblasti non destinati ad apoptosi possono diventare osteociti o cellule di rivestimento osseo [4].

Circa il 20% degli osteoblasti maturi si circonda di una matrice extracellulare, composta soprattutto da collagene di tipo I, formando così l'osteoide e differenziandosi in osteociti, la cui funzione principale è il mantenimento della struttura ossea. In seguito a questo processo gli osteociti risultano completamente circondati dal tessuto osseo, sono altamente interconnessi all'interno della matrice ossea e alle cellule sulla superficie tramite lunghi pseudopodi. Questi ultimi assicurano l'apporto di nutrienti dai vasi sanguigni verso gli osteociti e permettono la comunicazione fra le cellule, grazie al passaggio delle molecole di segnalazione [5], [6]. Gli osteociti sono cellule di dimensioni minori rispetto agli osteoblasti e con un minor numero di organuli citoplasmatici, risiedono all'interno delle lacune ossee nella matrice di nuova formazione per lunghi periodi, e alla fine del loro ciclo vanno incontro ad apoptosi [8].

Gli osteoclasti sono cellule plurinucleate in grado di riassorbire il tessuto osseo. I loro precursori, detti pre-osteoclasti, originano nel midollo osseo ematopoietico e appartengono alla linea differenziativa di una categoria di globuli bianchi, i monociti. I pre-osteoclasti una volta migrati nel tessuto osseo, si fondono insieme originando gli osteoclasti attivi, cellule giganti di dimensioni comprese tra 100 e 200 µm [2], [4]. Gli osteoclasti attivati presentano una polarizzazione funzionale con un orletto a spazzola in contatto con l'osso. La membrana citoplasmatica dell'orletto aderisce all'osso attraverso i recettori delle integrine, formando una zona di chiusura (sealing zone). Il microambiente che si forma ha un pH acido per l'azione degli enzimi proteolitici rilasciati, in cui quando la concentrazione di Ca<sup>2+</sup> è elevata, la membrana degli osteoclasti si stacca e termina la funzione osteolitica. Nel momento in cui gli osteoclasti abbandonano la superficie dell'osso lasciano delle concavità denominate fossette di Howship [5]. Nonostante la funzione primaria degli osteoclasti sia il riassorbimento dei tessuti, essi svolgono anche un ruolo nella regolazione della formazione di nuovo osso. Ciò è dovuto alla secrezione di fattori che regolano la formazione di nuovo osso, o alla diretta interazione con le cellule coinvolte nel rimodellamento [6].

#### 2.1.3. La formazione del tessuto osseo

La formazione del tessuto osseo può seguire due percorsi distinti chiamati ossificazione intramembranosa ed endocondrale (Figura 5) [9].

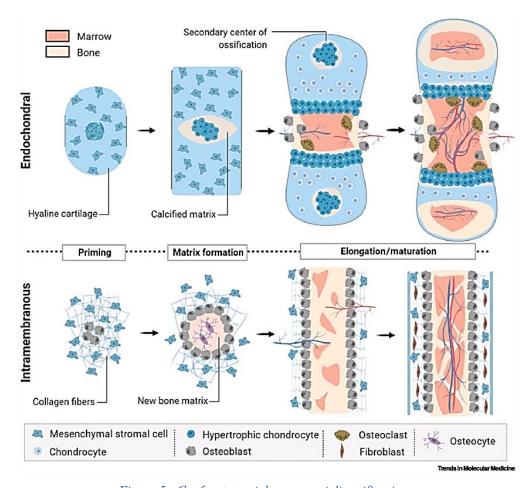


Figura 5 - Confronto tra i due processi di ossificazione.

La prima prevede la conversione diretta del tessuto mesenchimale in osso ed è il percorso caratteristico delle ossa piatte. Nell'ossificazione endocondrale, invece, le cellule mesenchimali si differenziano in cartilagine e successivamente avviene la formazione dell'osso. Il processo è piuttosto complesso: in primo luogo le cellule mesenchimali sono attivate dai fattori paracrini per differenziare in cellule cartilaginee, per poi condensare in noduli compatti. A questo livello, i noduli possono diventare condrociti e rapidamente proliferare per formare il modello dell'osso [6]. Quando i condrociti smettono di proliferare, iniziano ad aumentare il proprio volume, diventando condrociti ipertrofici, cellule in grado di mineralizzare la matrice aggiungendo carbonato di calcio. L'ultima fase prevede la formazione dei vasi sanguigni nel tessuto cartilagineo, mentre i condrociti ipertrofici vanno incontro ad apoptosi [6], [7].

Quando le cellule della cartilagine muoiono, le cellule rimanenti sono in grado di differenziarsi in osteoblasti, in modo da sostituire tutta la cartilagine con l'osso. Questo osso neoformato ha un reticolo tridimensionale trabecolare a fibre intrecciate, che delimitano le cavità irregolari occupate dai vasi sanguigni e da tessuto connettivo. Successivamente, con la fase di rimodellamento osseo si ha che l'osso spugnoso primario viene sostituito da quello compatto, questo processo prevede che l'osso sia riassorbito per essere sostituito con osso di neoformazione. Il processo di rimodellamento non si arresta una volta completato lo sviluppo dell'apparato scheletrico, prosegue invece per tutta la vita dell'individuo, al fine di mantenere la densità ossea nel tempo, permettendo la regolazione dell'omeostasi minerale [3], [9]. Con l'avanzare dell'età, la continua alternanza tra distruzione delle componenti cellulari più vecchie (riassorbimento osseo) e deposizione di nuove cellule (deposizione ossea) viene meno, con un amento del processo di riassorbimento che, lentamente, diventa preponderante sulla deposizione ossea. Questo cambiamento induce una conseguente riduzione della densità e della forza delle ossa, ponendo le basi per l'insorgenza dell'osteoporosi, malattia che porta ad un aumento del rischio di frattura

#### 2.2. Osteoporosi

L'osteoporosi è una malattia cronica del tessuto osseo, caratterizzata da un'alterazione della struttura ossea con conseguente riduzione della resistenza al carico meccanico, che porta inevitabilmente ad aumento del rischio di fratture. Molti studi dimostrano come il numero di persone affette da questa malattia sia in costante crescita, per via dell'aumento della longevità della popolazione nel mondo, con un conseguente impatto negativo sul benessere sociale e sull'economia [10], [11].

Si considera che nel 2050 il numero di fratture dell'anca nel mondo potrebbe arrivare a 21 milioni, sottolineando inoltre che il 50% delle donne e il 25% degli uomini, con età compresa tra i 50 e gli 85 anni, soffriranno di fratture osteoporotiche [12], [13]. La tendenza all'aumento dell'osteoporosi è spesso associata ad una mancanza di informazione e di applicazione delle strategie di prevenzione. Inoltre, a livello diagnostico della malattia, solo un piccolo numero di pazienti, ad alto rischio di frattura, viene riconosciuto e successivamente indirizzato alla terapia. Quindi, una diagnosi precoce ed una buona prevenzione diventano la chiave per ridimensionare l'impatto dell'osteoporosi sul sistema sanitario [10], [13].

### 2.2.1. Caratteristiche ed implicazioni della malattia

L'Organizzazione Mondiale della Sanità definisce l'osteoporosi come "bassa massa ossea e deterioramento micro architettonico del tessuto osseo, con conseguente aumento della fragilità ossea e aumento del rischio di frattura" (Figura 6) [14]. La resistenza meccanica dell'osso è determinata

dalla sua densità e dal suo stato fisiologico, quindi, se la densità è bassa l'osso avrà ridotta resistenza meccanica, aumentando la sua fragilità. La maggior parte delle fratture osteoporotiche si verificano a livello vertebrale e femorale, in quanto sono ossa in cui si concentra un alto livello di stress meccanico [15].

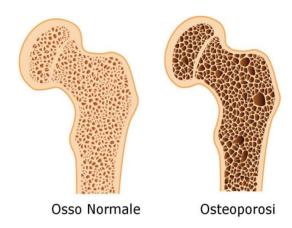


Figura 6 - Differenze tra un tessuto osseo sano ed osteoporotico.

Il metodo più comunemente utilizzato per valutare la resistenza meccanica consiste nella determinazione della densità minerale dell'osso o bone mineral density (BMD), espressa come grammi di costituente minerale per unità di area o volume, che contribuisce per circa il 70% alla resistenza dell'osso [15]. Sulla base di questi dati, l'osteoporosi viene definita come la variazione standard di 2.5 unità sotto alla media della BMD, della media normale dei giovani adulti. Questo approccio è adatto per definire il livello di soglia per osteoporosi, ma non definisce la gravità dell'osteoporosi o il livello assoluto di densità ossea [11], [15].

Esistono diversi tipi di osteoporosi, la forma più comune è nota come "osteoporosi primaria", cioè causata da un impoverimento fisiologico della massa ossea; che è a sua volta suddivisa in postmenopausale, quando direttamente innescata e sostenuta da carenza di estrogeni, o senile se associata all'invecchiamento. La perdita ossea causata da malattie o farmaci specifici è invece indicata come "osteoporosi secondaria". Ci sono anche importanti fattori di rischio come il fumo, l'alcol, il consumo eccessivo di caffè, la magrezza e la carenza di calcio. Altri fattori importanti sono quelli associati alla sedentarietà, che comportano una ridotta sollecitazione meccanica del tessuto osseo, fermando gli stimoli meccanici essenziali alla rigenerazione ossea [14].

La menopausa è una delle cause più importanti, potendo portare ad una perdita tra il 20-30% della massa di osso trabecolare, nel corso dei 6-10 anni del periodo peri-menopausale. Questo dimostra come la diminuzione della BMD sia accelerata nelle donne all'inizio della menopausa. Per quanto

riguarda l'osso corticale, un massimo del 10% risulta compromesso nella fase iniziale della menopausa ed anche se la perdita di massa continua, è più lenta di quella dell'osso trabecolare [15]. A livello cellulare possono verificarsi due scenari diversi:

- 1) difetto nella funzione degli osteoblasti, per la quale la deposizione di uno strato di nuovo tessuto è insufficiente a riempire completamente la lacuna ossea;
- 2) eccessivo riassorbimento (Figura 7), con perforazione di placche trabecolari e rimozione dell'osso corticale endostale.

Il difetto a livello degli osteoblasti potrebbe essere la conseguenza di un processo di senescenza cellulare, ma essere anche il risultato di una diminuzione della sintesi, o dell'attività sistemica e locale dei fattori di crescita [2].

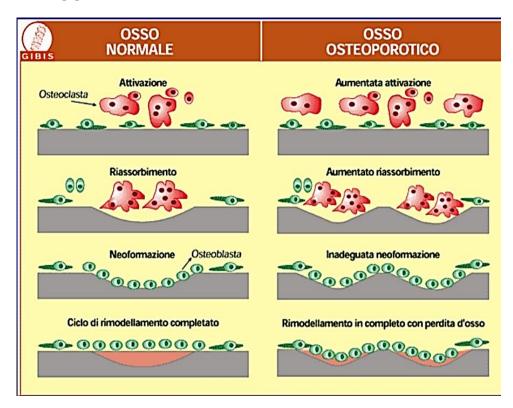


Figura 7 - Rimodellamento osseo: fisiologico e patologico.

### 2.2.2. Diagnosi e terapie

È difficile formulare una diagnosi di osteoporosi, in quanto la malattia non genera sintomi se non quando si sviluppa la frattura. Le fratture da ossa lunghe causano un forte dolore improvviso ed intenso, mentre quelle dei corpi vertebrali possono anche decorrere in maniera asintomatica. A questo

segue un dolore cronico, con conseguente accentuazione della cifosi dorsale e riduzione della statura [10], [16].

La diagnosi di osteoporosi si ottiene attraverso valutazioni strumentali e di laboratorio; queste ultime sono indispensabili per tracciare il profilo metabolico del paziente e per l'eventuale identificazione di forme secondarie. L'esame strumentale più affidabile è la densitometria ossea o mineralometria ossea computerizzata (MOC), che viene effettuato sia per identificare i pazienti con osteoporosi, sia per controllare nel tempo l'evoluzione della malattia, valutando i rischi di subire una frattura [15]. Si utilizzano raggi X per determinare la massa ossea, in particolare la quantità e la densità minerale nei distretti a maggior rischio di frattura: le vertebre lombari e la parte prossimale del femore.

A prescindere dalla diagnosi, risulta fondamentale attuare una prevenzione dell'osteoporosi sin dalla giovane età, massimizzando il picco di massa ossea alla fine della maturazione fisica, ossia la quantità minerale ossea presente all'inizio della fase adulta. Nei maschi avviene tra i 20 e 22 anni nelle donne tra i 16 e 18 anni, da questo momento in poi la densità e la dimensione delle ossa non aumentano più, rimanendo costanti [13], [14].

A livello di terapia, ad oggi, si utilizzano diversi trattamenti farmacologici in base al tipo di storia clinica del paziente. Un'opzione è l'assunzione di integratori, come Vitamina D e Calcio, raccomandato a tutti i pazienti, indipendentemente dall'età, per aiutare a mantenere e preservare le ossa. A livello farmacologico, ci sono i Bifosfonati e alcuni anticorpi monoclonali che diminuiscono l'attività osteoclastica, inibendo l'attività del RANKL, oppure gli anabolizzanti ed altri tipi di farmaci che incrementano l'attività osteoblastica. Tutti questi approcci risultano in effetti collaterali di variabile intensità e sono sconsigliati in presenza di altre patologie [16], [17].

## 2.2.3. Nuove terapie

Considerate le limitazioni date dagli approcci standard e farmacologici, l'impianto di un dispositivo in grado di migliorare la guarigione ossea può essere vista come una valida alternativa volta a migliorare la condizione del paziente ed accelerarne i tempi di guarigione. L'uso di tali dispositivi potrebbe garantire un sostegno, oltre ad indurre una nuova formazione del tessuto, prevenendo il suo riassorbimento. A livello economico inoltre, si potrebbero limitare i costi sociali associati, garantendo una ripresa più rapida e una maggiore qualità della vita dei pazienti [16], [18].

Tra le soluzioni attualmente in uso (Figura 8) vengono considerati gli innesti ossei. Possono essere autogeni (dal paziente stesso) con un'elevata capacità di integrazione e rigenerazione, ma che presentano svantaggi tra cui: disponibilità a livello del tessuto utilizzabile, necessità di due interventi chirurgici, con conseguente sofferenza del paziente durante il recupero.

Gli innesti allogeni (da un altro paziente), invece, hanno un'elevata disponibilità di utilizzo, ma presentano una difficile integrazione col tessuto circostante e un rimodellamento osseo con cinetica differente, senza escludere la possibile incompatibilità genetica.

Infine, è possibile utilizzare una fonte di innesto xenogena (derivazione animale), ma con rischio di trasmissione virale [16].

Negli ultimi anni si sta quindi procedendo verso nuove strategie, utilizzando fattori di crescita, scaffold osteoconduttivi e cellule osteoprogenitrici. L'obiettivo di queste tecniche basate sulla rigenerazione dei tessuti e sulla terapia genica, è quello di superare i limiti dei metodi terapeutici attuali, ottenendo un tessuto con proprietà biomeccaniche il più possibile identiche all'osso fisiologico. La ricerca è in corso per migliorare le proprietà meccaniche e di biocompatibilità degli scaffold, in modo da promuovere adesione, crescita e differenziazione cellulare, favorendo la crescita vascolare e la formazione del tessuto osseo [17], [18].

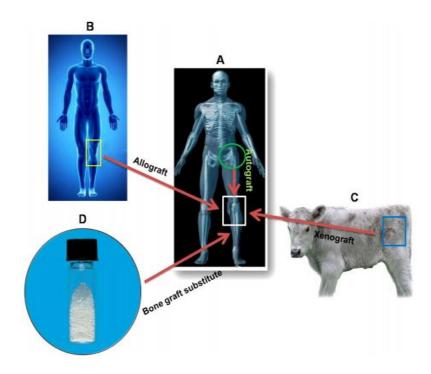


Figura 8 - Tipi di innesto osseo: (A) autologo, (B) allogenico, (C) xenogenico, (D) sostituto osseo.

#### 2.3. Biomateriali per la rigenerazione del tessuto osseo

In molti casi non è possibile ottenere una guarigione spontanea del tessuto osseo e le strategie terapeutiche basate sul trapianto, autologo o eterologo, presentano diversi svantaggi e limitazioni. A causa di questi limiti è necessario quindi cercare terapie alternative mirate alla guarigione ossea [18], [19].

L'ingegneria dei tessuti (Tissue Engeneering, TE) è definita come "un processo che influenza la struttura e l'architettura di qualsiasi tessuto vitale e non, con l'obiettivo di aumentare l'efficacia del costrutto in ambienti biologici" [20].

Inizialmente le applicazioni dell'ingegneria tissutale miravano principalmente a diminuire l'antigenicità degli innesti ossei [21]. Negli ultimi anni, invece, la ricerca e le applicazioni biomedicali si sono basate sull'ingegneria dei tessuti per utilizzare biomateriali in combinazione con cellule staminali e fattori di crescita, al fine di migliorare la riparazione ossea [19]. Nell'ambito della medicina rigenerativa, la rigenerazione di nuovo tessuto si basa su tre componenti fondamentali (Figura 9): cellule, biomateriali e biomolecole o fattori di crescita.

I biomateriali sono usati come substrati in cui le cellule dovranno aderire e proliferare, mentre specifiche biomolecole possono essere aggiunti per promuovere l'attività cellulare e regolarne la sintesi di proteine e altri fattori di crescita [22].

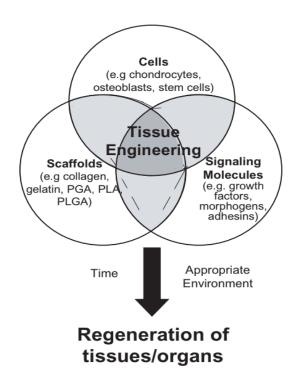


Figura 9 - Schema della triade dell'ingegneria tissutale.

Nell'ambito della rigenerazione del tessuto osseo, la matrice ossea demineralizzata ed il collagene sono stati tra i primi biomateriali maggiormente utilizzati per innesti ossei. Attualmente vengono studiate le applicazioni di altri elementi sintetici come HA, β-tricalciofosfato (β-TCP), calcio-cementi fosfatici e vetroceramici, in quanto è stato dimostrato che hanno proprietà che favoriscono la migrazione, la proliferazione e differenziazione delle cellule ossee [18]. Questi materiali vengono spesso combinati per realizzare scaffold, ossia strutture artificiali in grado di supportare e rigenerare

il tessuto di interesse. Sulla base di questo obiettivo, la ricerca si è focalizzata soprattutto per migliorare le proprietà meccaniche e di biocompatibilità degli scaffold. Di conseguenza, concetti come reazione da corpo estraneo (in particolare a causa di detriti di usura), protezione contro le sollecitazioni (stress-shielding), biocompatibilità e più recentemente, bioattività e osteoinduzione, sono i requisiti fondamentali dei biomateriali, che sono stati gradualmente introdotti nella progettazione di dispositivi impiantabili [23].

#### 2.3.1. Scaffold per tessuto osseo

Gli scaffold svolgono un ruolo fondamentale nell'ingegneria dei tessuti, con l'obiettivo di "fornire una struttura e un supporto iniziale alle cellule per attaccarsi, proliferare e differenziarsi, formando una matrice extracellulare" [24].

Nelle applicazioni di rigenerazione ossea, gli scaffold servono generalmente come supporto meccanico per il tessuto in crescita, possono inoltre rilasciare i farmaci caricati ed eventuali ioni terapeutici/osteoinduttivi incorporati. Poiché un singolo materiale non è in grado di soddisfare tutti i requisiti, come le proprietà meccaniche e la bioattività, spesso viene sfruttato l'uso di sistemi compositi, in modo da combinare le proprietà migliori dei singoli materiali o delle diverse fasi introdotte.

Nella progettazione di uno scaffold, ci sono diversi requisiti che devono essere rispettati, in modo da creare una struttura che permetta la crescita e lo sviluppo del tessuto nativo, senza creare reazioni avverse. Tra i requisiti desiderati per uno scaffold ci sono [21], [23]:

- Biocompatibilità: condizione indispensabile per permettere l'adesione e la crescita cellulare, pertanto la superficie del materiale dovrebbe essere simile all'ambiente fisiologico delle cellule.
- Morfologia e porosità: la struttura porosa interconnessa, con pori che dovrebbero avere una dimensione tra 100-1000 μm, per favorire la crescita cellulare, la diffusione di nutrienti e prodotti di scarto metabolico, nonché la formazione di una corretta rete angiogenica [25], [26]. La percentuale di porosità influisce sulla resistenza strutturale dello scaffold, mentre la dimensione del poro influisce sul numero di cellule che possono aderire alle pareti del scaffold senza bloccare la migrazione di altre cellule, ed anche di nutrienti. Oltre a poter modificare la grandezza dei pori, è possibile definirne l'orientamento, con varie tecniche, per indurre la crescita cellulare in una direzione specifica.

 Proprietà meccaniche: modulate per consentire un supporto meccanico e resistere alle sollecitazioni fisiologiche, fino a completa rigenerazione del nuovo tessuto. Non dovrebbero superare quelle del tessuto nativo per evitare fenomeni di stress-shielding, ossia un'alterazione della distribuzione dei carichi sull'osso.

In aggiunta a questi requisiti e in base alla specifica applicazione, la biodegradabilità risulta essere un aspetto fondamentale da valutare nella realizzazione dello scaffold. Durante questa fase è importante che i prodotti di degradazione del costrutto non siano tossici o in grado di produrre una reazione infiammatoria. In questo contesto la velocità di degradazione dello scaffold è estremamente importante, infatti, deve essere proporzionale alla crescita del tessuto nativo, per assicurarne l'adeguata formazione del tessuto fisiologico. Se la degradazione fosse troppo lenta interferirebbe con il rimodellamento dei tessuti, al contrario, se troppo rapida, lo scaffold non sarebbe in grado di assicurare il processo di guarigione [24].

#### 2.3.2. Biomateriali e applicazioni nella TE

In generale, gli scaffold possono essere realizzati con polimeri, naturali e sintetici, ceramiche, metalli, biomateriali compositi e caricati con fattori in grado di stimolare specifiche attività cellulari insieme ad una possibile rigenerazione tissutale (Figura 10) [22].

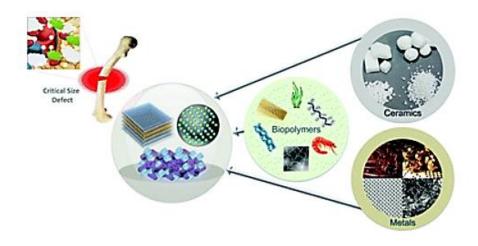


Figura 10 - Biomateriali per TE e rigenerazione del tessuto osseo [27].

Le proprietà dei diversi materiali scelti sono funzionali all'applicazione finale, ad esempio, la biodegradabilità è ideale negli scaffold per la rigenerazione ossea, ma non nei dispositivi portanti come le protesi.

Tra i materiali più usati per lo sviluppo di protesi ed elementi di supporto durante la riparazione di fratture ossee troviamo i metalli. In particolare, i metalli e le leghe di metallo si possono classificare in tre gruppi: leghe di titanio ed a base di titanio, acciaio inossidabile, acciai e leghe a base di cobalto. Sono tutti biocompatibili, a costo relativamente basso e possiedono un'alta resistenza alla deformazione, ma allo stesso tempo non favoriscono una buona adesione cellulare e possono essere soggetti a corrosione a seguito del contatto con i fluidi biologici [27].

La seconda classe di biomateriali, i ceramici, raggruppa i composti inorganici non metallici, che comprendono carbonio pirolitico, biovetri e vetroceramica. Sono biomateriali prodotti mediante sinterizzazione o fusione di materie prime inorganiche per creare un solido amorfo o cristallino, sono molto utili nel rivestimento di impianti metallici, aiutando la fissazione nei tessuti [22]. I due tipi di bioceramici più comunemente utilizzati sono l'idrossiapatite e il tricalcio fosfato poiché elementi presenti alla base della fase inorganica dell'osso ed in grado di stimolare direttamente le cellule del tessuto [28].

In particolare, si distinguono quattro tipi di materiali ceramici a seconda delle interazioni che si instaurano con il tessuto circostante [29]:

- Bioinerti: ha una interazione minima con il corpo (p.es. allumina e zirconia).
- Bioattivo: sviluppa una risposta biologica specifica all'interfaccia tra lo scaffold e osso (p.es. idrossiapatite).
- Poroso: consente la migrazione e l'infiltrazione cellulare.
- Riassorbibile o biodegradabile: può essere rimosso dal corpo (p.es. fosfati di calcio che essendo molto porosi si riassorbono in concomitanza alla crescita ossea).

Possono essere utilizzati sia in ambito ortopedico che odontoiatrico, hanno ottime proprietà a livello di resistenza meccanica e durezza, ma allo stesso modo presentano un'elevata fragilità, con costi di lavorazione alti.

Infine, ci sono i polimeri, ampiamente utilizzati nell'ingegneria dei tessuti, che sono generalmente classificati come naturali o sintetici [27], [29]. I polimeri naturali possono essere sia di derivazione animale (collagene, acido ialuronico) che di origine vegetale (cellulosa, alginato di sodio), sono ottimi a livello di biocompatibilità e bioattività in quanto, molti, sono già presenti all'interno del nostro corpo, ma possiedono scarse proprietà meccaniche. Al contrario i polimeri sintetici sono disponibili

in grandi quantità, sono facilmente processabili e possiedono diverse proprietà fisico chimiche che possono essere modulate, dimostrando buone proprietà meccaniche, di biocompatibilità e biodegradabilità che sono generalmente richieste per applicazioni di ingegneria tissutale [26]. Tra questi ce ne sono di diversi tipi: i polimeri idrofobici, come il polietilene e polimetilmetacrilato; i polari come cloruro di polivinile e nylon e i polimeri idrofili (polivinil alcool, polietilenglicole) [30]. Di contro tali polimeri possono rilasciare prodotti polimerici durante la loro degradazione col rischio di intaccare il tessuto circostante portando al fallimento dell'impianto.

Riassumendo, nonostante tutti questi biomateriali abbiano proprietà e caratteristiche adatte a sostituire o rigenerare il tessuto osseo, da soli possono soddisfare solo in parte i requisiti di progetto di un dispositivo biomedico. Questa limitazione ha portato allo sviluppo dei biocompositi, incorporando le caratteristiche desiderate di materiali diversi per soddisfare le rigorose esigenze del tessuto vivente.

I biomateriali si possono riassumere nella tabella sottostante (Tabella 1), insieme ai loro vantaggi, svantaggi e applicazioni nella rigenerazione del tessuto osseo.

Tabella 1 - Biomateriali per rigenerazione del tessuto osseo.

BIOMATERIALE	VANTAGGI	SVANTAGGI	USO CLINICO
METALLI	Buone proprietà meccaniche  Alto modulo elastico, resistenza allo snervamento e duttilità	Riduce l'adesione cellulare sulla superficie.  Possibilità di corrosione a contatto con i fluidi biologici	Protesi ortopediche e odontoiatriche
CERAMICI	Alta rigidezza meccanica Refrattarietà chimico- fisica	Fragilità  Alte temperature di processamento	Protesi d'anca  Protesi dentale  Sostituti ossei e cartilaginei
POLIMERI SINTETICI	Possibilità di modulare la porosità e le proprietà meccaniche durante il processamento	Possibilità di rilascio di ioni e prodotti di polimerizzazione	Rivestimenti protesici  Cementi ossei  Sostituti ossei

POLIMERI NATURALI	Biocompatibili Bioattivi	Scarse proprietà meccaniche Rapida biodegradazione	Sostituti cartilaginei ed ossei
----------------------	-----------------------------	---	------------------------------------

#### 2.3.3. I biomateriali compositi

Come definito da Ramakrishna [29], i biomateriali compositi sono composti eterogenei dati dalla combinazione di due o più materiali, che differiscono per morfologia o dalla composizione su scala micro o nanometrica. Dato un materiale di base che forma la matrice, viene incorporato almeno un secondo materiale, che funge da fase di rinforzo. I biomateriali compositi possono essere classificati in base alla forma dei loro componenti di rinforzo [27]:

- Fibrosi, quando la fase incorporata è sotto forma di fibre.
- Particolati, in cui vengono introdotte delle particelle come seconda fase.

I biomateriali con cui vengono prodotti gli scaffold influenzano fortemente l'interazione con l'ambiente biologico, determinando le proprietà fisico-chimiche, meccaniche e di degradazione finali. Gli impianti in metallo e di ceramica inerti hanno dimostrato di non essere ottimali dal punto di vista di citocompatibilità e biodegradabilità. A livello polimerico, un buon compromesso è quello di combinare polimeri naturali con quelli sintetici, ottenendo strutture 3D stabili, sfruttando le caratteristiche dei biopolimeri e l'effetto rinforzante di fasi aggiuntive [19], [26].

Negli ultimi anni l'attenzione si è spostata sullo sviluppo di materiali compositi, combinando i vantaggi di due o più materiali. Questo approccio permette di ottenere un migliore controllo sulle caratteristiche meccaniche e sulle proprietà di degradazione. Molto utilizzati sono i compositi a base di polimeri rinforzati con ceramici, in quanto imitano effettivamente la natura del tessuto osseo. In questo contesto, scaffold polimerici contenenti fosfati di calcio o particelle di vetro bioattivo, caratterizzati da diverse forme e dimensioni, hanno dimostrato di migliorare l'integrità meccanica, la bioattività e l'espressione di fattori osteogenici [19], [31]. In generale, tutti questi compositi hanno una buona biocompatibilità, sfruttando i vantaggi delle diverse fasi come dimostrato da Kikuchi e collaboratori [32], che hanno combinato il β-TCP con acido polilattico (PLA) per formare un composito polimero-ceramica, sfruttando l'osteoconduttività del β-TCP e la degradabilità del PLA. Similmente, il gruppo di ricerca guidato da Cato.T Laurencin [33] ha realizzato scaffold porosi

contenenti PLGA e HA, in cui la degradabilità del PLGA, insieme alla bioattività dell'idrossiapatite hanno dimostrato favorire la proliferazione, la differenziazione cellulare e la formazione di minerali. Tra i polimeri naturali maggiormente usati in questo ambito ci sono i polisaccaridi di origine animale come il chitosano, polimero che deriva dalla chitina, spesso utilizzato insieme ai bioceramici per compensare la mancanza di resistenza dei polimeri e la fragilità dei ceramici. Tra gli esempi più recenti si può riportare la fabbricazione di una struttura 3D nanocomposita costituita da chitosano, gelatina e nanoparticelle di silice. La gelatina, infatti, è un altro polimero naturale, di origine animale molto utilizzato nella medicina rigenerativa, grazie alla sua proprietà chimico-fisico di formare gel e al basso costo [5], [27].

Invece, considerando le ottime proprietà bioattive e di biocompatibilità del collagene, il nostro gruppo di ricerca ha realizzato degli scaffold compositi a base di collagene con nanoidrossiapatite e ossidi di vetro contenenti stronzio per migliorare le proprietà meccaniche del polimero, ottenendo contemporaneamente delle buone proprietà osteogeniche e di osteoinduzione [34].

#### 2.3.4 Sistemi compositi a base di collagene

Molto studiato ed utilizzato in questo ambito biomedico è il collagene, la proteina più abbondante nei tessuti di origine animale. È una fibra altamente insolubile, che costituisce la matrice extracellulare e i tessuti connettivi [27]. Grazie alle sue proprietà fisico-chimiche, il collagene è in grado di creare degli idrogeli, reticoli polimerici in grado di contenere grandi quantità di acqua. In particolare, a pH acido e temperature inferiori ai 10 °C il collagene viene mantenuto in soluzione a diverse concentrazioni, mentre pH e temperatura fisiologici promuovono la transizione sol-gel del sistema, grazie all'autoassemblamento spontaneo delle sue molecole, ottenendo la ricostituzione di matrici fibrillari solide, caratterizzate da un alto contenuto di acqua [35]. Gli idrogeli permettono infatti di fornire un ambiente favorevole alle cellule, simile a quello trovato nella matrice extracellulare nativa, in grado di promuovere l'attaccamento e la proliferazione cellulare. I sistemi a base di collagene vengono quindi utilizzati per ottenere idrogeli, scaffold porosi, membrane, nano/microparticelle per il rilascio di agenti bioattivi disponibili in varie forme e dimensioni (ad esempio fogli, spugne o tubi) e disponibili spesso anche come prodotti commerciali (Figura 11) [31], [36].



Figura 11 – Esempi di scaffold a base di collagene attualmente in commercio.

Tuttavia, come per tutti i costrutti a base di polimeri naturali, gli scaffold in collagene sono caratterizzati da scarsa stabilità e scarse proprietà meccaniche, che ne limitano l'utilizzo in campo ortopedico [21]. Di conseguenza, anche in questo caso, si realizzano spesso biomateriali compositi, per combinare le caratteristiche biologiche e di superficie, adatte a promuovere l'adesione cellulare del collagene, ad una maggior resistenza meccanica e strutturale.

Molto utilizzati sono i sistemi ibridi a base di collagene con nanoHA [37], in cui si ha un aumento della rigidità dello scaffold ed una migliore risposta biologica, rispetto all'uso del solo polimero. Inoltre, è possibile funzionalizzare la superficie di tali costrutti, aggiungendo agenti terapeutici e molecole bioattive, utilizzandoli come sistemi di rilascio [25], [31], [36].

Di contro, i costrutti in collagene disponibili in commercio hanno dimostrato un rilascio rapido o inefficiente di fattori di crescita, con conseguenti danni ai tessuti circostanti e la formazione di osso ectopico, evidenziando l'effettiva necessità di modulare meglio e prolungare possibilmente il rilascio [38]. Questo ha portato all'uso di strategie di reticolazione del collagene e all'aggiunta di fasi inorganiche rinforzanti, fondamentali nello sviluppo degli scaffold ossei, per fornire cinetiche di degradazione controllate e per supportare la rigenerazione di nuovo tessuto funzionale [33], [37].

#### 2.3.5 Strategie di reticolazione del collagene

Nonostante sia noto che la combinazione con fasi inorganiche fornisce una maggiore rigidità meccanica e stabilità alle matrici a base di collagene, di per sé potrebbe risultare insufficiente. Infatti, la matrice extracellulare naturale è composta da una densa struttura fibrillare, altamente resistente alla degradazione, che viene ottenuta grazie all'azione di specifici enzimi in grado di legare

covalentemente le molecole di collagene adiacenti, garantendo così la formazione di una matrice stabile e rigida [39], [40]. Questi meccanismi non si verificano *in vitro*, di conseguenza per fornire ai costrutti finali migliori caratteristiche meccaniche e cinetiche di degradazione più lente, si sono studiati diversi approcci per favorire la formazione di legami covalenti e non covalenti tra molecole proteiche. Sono stati sfruttati i fattori esogeni biologici, metodi di reticolazione chimici o fisici, di cui i più comuni sono riassunti nella Figura 12 [39]–[41].

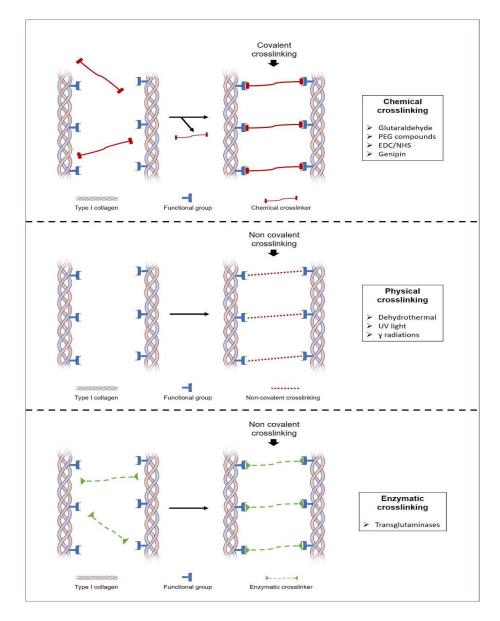


Figura 12 - Schema illustrativo delle tecniche di reticolazione chimica, fisica, enzimatica, maggiormente utilizzate per scaffold a base di collagene.

Attraverso questi trattamenti si ottiene una reticolazione tra le molecole di collagene o tra le singole tre eliche, in cui la loro efficienza è regolata da diversi fattori come la stabilità dei legami, l'energia associata e il numero di residui coinvolti nel trattamento [41]. Allo stesso tempo, è possibile modulare il grado di reticolazione, per regolare con precisione le proprietà finali degli scaffold, ad esempio

controllando l'infusione del reticolante degli idrogel di collagene, ottenendo dei gradienti nelle proprietà meccaniche [39].

Sono stati condotti molti studi, utilizzando approcci biomimetici, per riprodurre i meccanismi di reticolazione *in vivo* della matrice di collagene, in cui sono stati valutati i legami intermolecolari indotti da enzimi come la transglutaminasi microbica o la glicosilazione non enzimatica (glicazione). Nonostante un'elevata citocompatibilità, l'azione reticolante ha portato solo ad un leggero miglioramento della stabilità della matrice del costrutto finale, insufficiente per supportare la rigenerazione del tessuto osseo [40], [41].

Tra gli agenti chimici, la glutaraldeide (GTA) è stato quello più utilizzato ed efficace per il collagene e per i tessuti biologici, grazie alla sua elevata reattività con diversi gruppi funzionali presenti sulle proteine. Inoltre, ad alte concentrazioni, la GTA ha dimostrato di formare lunghe catene polimeriche, che promuovono il legame di residui amminici situati molto distanti, aumentando quindi lo spazio di azione reticolante. Nonostante la notevole stabilità e resistenza ottenuta grazie all'azione della GTA sulle matrici a base di collagene, si sono osservati spesso effetti citotossici, sia *in vitro* che *in vivo*, indotti dalla presenza di aldeidi residue non legate alla matrice che vengono rilasciate durante la sua degradazione [40], [41].

Come reticolanti chimici alternativi adatti a reticolare le molecole di collagene e promuovere la loro funzionalizzazione con altre biomolecole, sono stati spesso utilizzate le carbodiimmidi. Ad esempio, l'1-etil-3-(3-dimetilamminopropil) carbodiimmide cloridrato (EDC) è in grado di formare legami covalenti tra gruppi carbossilici e amminici di molecole di collagene, dove l'urea idrosolubile rappresenta l'unico prodotto di reazione, che può essere facilmente rimosso limitando la citotossicità. Tuttavia, l'efficienza di reticolazione delle carbodiimmidi è significativamente limitata a causa della loro incapacità di polimerizzare oltre alla formazione di legami covalenti di lunghezza zero, che ostacolano il collegamento tra residui amminoacidici distanti, o tra le fibrille di collagene adiacenti [41][62]. In aggiunta, diversi studi in letteratura hanno riportato risultati contrastanti riguardo l'effettivo aumento delle proprietà meccaniche degli scaffold a base di collagene dopo trattamenti EDC. Ad esempio Kwangwoo et al. hanno sviluppato altre strategie per aumentare il grado di reticolazione, ossia la modulazione del tempo e della temperatura del processo, oltre all'utilizzo dell'etanolo al posto dei solventi a base acquosa [41], [42].

Per garantire la biocompatibilità, la ricerca si è spostata verso i reticolanti di origine naturale; tra questi la genipina, reticolante chimico di derivazione naturale, estratto dal frutto della gardenia (Gardenia jasminoides Ellis), ha dimostrato risultati promettenti in termini di potenziamento meccanico ed enzimatico, stabilità delle matrici collageniche, con ridotto effetto citotossico [43], [44]. La genipina provoca la reticolazione dei gruppi amminici liberi del collagene attraverso la

formazione di strutture cicliche, che agiscono come ponti intra e intermolecolari lungo le catene polimeriche, ottenendo una miglior stabilità nella ricostituzione delle fibre di collagene [44] [45] (Figura 13).

Figura 13 - Schema illustrativo dell'azione chimica della genipina sul collagene [45].

#### 2.3.6 Materiali bioattivi

Come fasi inorganiche aggiuntive alle matrici di collagene si tende ad utilizzare elementi bioattivi, in grado di stimolare maggiormente una risposta cellulare. Un materiale bioattivo è un materiale "in grado di sviluppare una serie di reazioni superficiali, quando impiantato nel corpo, portando alla formazione di un legame con i tessuti sia duri che molli" [46]. Fanno parte di questa classe: i ceramici a base di fosfati di calcio (soprattutto le apatiti), i vetri bioattivi, i vetroceramici bioattivi ed i compositi bioattivi.

I materiali bioattivi possono ulteriormente essere classificati in due sottocategorie:

- 1. Classe A, materiali osteoinduttivi che favoriscono l'adesione delle cellule osteogeniche presenti nell'ambiente biologico, in modo da generare la matrice ossea. Questi materiali, come ad esempio i biovetri, che possono essere posti a contatto sia a tessuti molli che duri.
- 2. Classe B, materiali osteoconduttivi, si legano al tessuto duro (osso) e stimolano la crescita ossea lungo la superficie del materiale bioattivo, ad esempio, ceramiche di HA sintetica e TCP.

Si ritiene che il meccanismo di legame osseo ai materiali bioattivi sia dovuto alla formazione di uno strato di HA sulla superficie dei materiali dopo l'immersione nel fluido corporeo. Questo strato è simile a quello dell'apatite presente nell'osso, suggerendo la formazione di un forte legame [47], [48].

#### 2.3.6.1 L'idrossiapatite

Durante gli anni '80 si è scoperto che la componente principale dalla fase minerale dell'osso è l'HA con una composizione di base Ca<sub>10</sub> (PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub> (OH)<sub>2</sub>, [49]. È un sale doppio costituito da trifosfato di calcio e idrossido di calcio, ha simmetria esagonale, in cui si trovano tetraedri di fosfati calcio disposti intorno a colonne di ossidrili (Figura 14) [50].

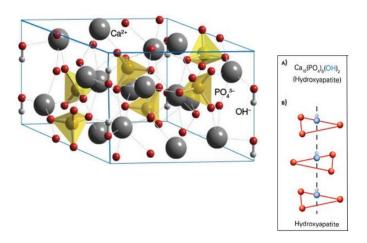


Figura 14 - Struttura chimica idrossiapatite.

La struttura colonnare conferisce al cristallo delle proprietà piezoelettriche, dove gli ioni OH formano dei dipoli, limitando anche le dimensioni dei cristalli di idrossiapatite. La sua chimica superficiale dipende dal pH della soluzione con la quale si trova a contatto. In caso di ambiente biologico, in cui il pH è prevalentemente acido, si possono avere fenomeni di dissoluzione superficiale, con la conseguente formazione di uno strato idrato e successivamente la formazione di idrossicarbonatoapatite [50].

Nel tessuto osseo, l'HA viene prodotta dagli osteoblasti, i suoi cristalli crescono negli spazi presenti tra le molecole di collagene sotto forma di placche con lunghezza media di 50 nm, larghezza di 25 nm e spessore di 2-3 nm e orientando il loro C-asse parallelamente a quello delle fibrille [51]. Il collagene svolge un ruolo importante nella regolazione spaziale dei cristalli di HA *in vivo*, innescando la loro nucleazione e modulando il processo di mineralizzazione [52]. In laboratorio, invece, si possono produrre polveri di idrossiapatite sfruttando diversi processi: per via umida (reazioni di neutralizzazione, sintesi sol-gel), reazioni allo stato solido, oppure attraverso trattamenti idrotermali.

Nel campo biomedico, viene usata in particelle nanometriche (nanoHA) grazie al suo potenziale osteogenico ed osteoconduttivo, migliorando significativamente l'osteointegrazione di diversi materiali inerti, come impianti metallici e cementi [53]. Altre applicazioni sono relative al trasporto

dei farmaci, grazie alla sua solubilità nei fluidi biologici e alla sua capacità di penetrare nella membrana cellulare. Osservando la composizione nativa dell'osso, l'HA può quindi essere introdotta in formulazioni ibride a base di collagene per aumentare il carattere biomimetico dello scaffold finale, favorendo complessivamente una maggiore proliferazione e differenziazione cellulare [54].

#### 2.3.6.2 I vetri bioattivi

Analogamente all'HA, i vetri bioattivi sono classificati come materiali in grado di fornire una superficie simile alla matrice extracellulare, grazie alla formazione di uno strato di idrossiapatite, biologicamente attivo, sulla loro superficie a contatto con i fluidi biologici [55], [56].I vetri sono materiali amorfi, le cui caratteristiche di base possono essere modificate con l'aggiunta di ossidi [57]. I primi biovetri che sono stati realizzati consistevano in sistemi con quattro ossidi: SiO<sub>2</sub>, CaO, Na<sub>2</sub>O, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, in base alla percentuale di ogni ossido si ottengono proprietà bioattive diverse del sistema finale, ad esempio il primo biovetro è stato ideato da Hench nel 1970, riportando una formulazione composta da: 45% SiO<sub>2</sub> - 24,5% Na<sub>2</sub>O - 24,4% CaO - 6% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (% in peso) e successivamente definito come Bioglass® 45S5.

La loro composizione chimica permette un'eccellente biocompatibilità con un'elevata capacità di osteointegrazione, degradazione e bioriassorbimento nel momento in cui avviene la sostituzione con la matrice del tessuto osseo [48]. È stato dimostrato che sfruttando il rilascio di ioni calcio e silicio, come prodotti di dissoluzione, è possibile stimolare l'osteogenesi innescando la proliferazione e la differenziazione cellulare, promuovendo l'espressione di geni come RCL e CD44; tale effetto permette di classificare questi tipi di biovetri come materiali osteoinduttivi [58].

Attraverso delle tecniche di lavorazione è possibile ottenere una struttura mesoporosa altamente ordinata, sfruttando la presenza dei pori, di tali dimensioni, sistema di rilascio nelle applicazioni biomedicali.

Questi biovetri vengono definiti vetri bioattivi mesoporosi (mesoporous bioactive glasses, MBG), con cui è possibile ottenere un grado più elevato di bioattività, grazie ai mesopori che presentano una maggiore area superficiale e reattività [55], [56]. Inoltre, è possibile arricchire la formulazione del vetro bioattivo con elementi specifici come lo stronzio o il rame, che presentano proprietà pro-osteogeniche, pro-angiogeniche e antibatteriche, con l'obiettivo di combinare in un unico biomateriale diverse capacità terapeutiche.

Grazie a queste caratteristiche gli MBG sono stati utilizzati per sviluppare una grande varietà di dispositivi per l'ingegneria dei tessuti, tra cui scaffold porosi maggiormente biocompatibili e

osteoconduttivi, nonché strutture più biomimetiche, per promuovere una diafonia positiva tra materiale e cellule nelle applicazioni di rigenerazione ossea [58].

Diversi studi condotti dal nostro gruppo di ricerca [43], [56] hanno infatti dimostrano come attraverso due diverse procedure di sintesi, sol-gel e spray drying (Figura 15), sia possibile ottenere MBG rispettivamente sotto forma di nanoparticelle e microparticelle, caratterizzate da una diversa superficie specifica, volumi e dimensione media dei pori. In entrambi i casi è stato dimostrato il rilascio degli ioni stronzio ed è stato evidenziato un eccellente comportamento bioattivo, confermando la formazione di depositi di HA a seguito dell'incubazione in fluidi simil fisiologici (SBF). Ulteriore analisi hanno inoltre dimostrano una ridotta risposta pro-infiammatoria ed una espressione di geni pro-osteogenici. Sulla base anche di diversi studi presenti in letteratura, i vetri bioattivi mesoporosi si confermano ottimi materiali candidati per applicazioni di rigenerazione ossea in combinazioni con matrici polimeriche [56], [59], [60].

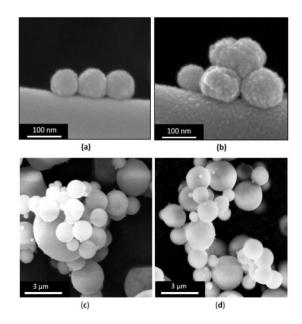


Figura 15 - Immagini FESEM di MBG (a-b) Prodotti via Sol-Gel; (c-d) prodotti con tecnica spray drying [56].

Riassumendo ad oggi esistono molti biomateriali, che grazie alle loro proprietà sono in grado di supportare ed eventualmente interagire col tessuto osseo circostante, favorendo una possibile rigenerazione tissutale (Figura 16). Nonostante ciò, non esiste un'unica tipologia capace di soddisfare tutti i requisiti sopracitati, portando la ricerca a soffermarsi sullo studio di biocompositi per combinare le proprietà ed i vantaggi dei singoli elementi in relazione all'obiettivo finale della loro applicazione.

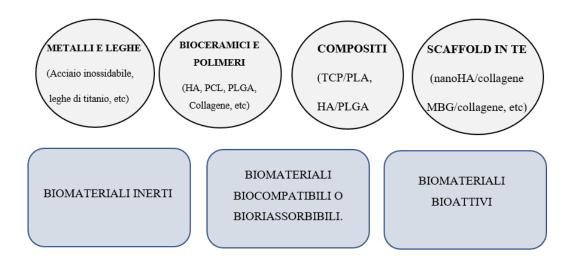


Figura 16 - Biomateriali e proprietà associate.

# 2.4 Additive Manufacturing

L'aggiunta di fasi inorganiche bioattive nelle matrici polimeriche, soprattutto di origine naturale, rappresenta un punto chiave nella progettazione di scaffold 3D per tessuto osseo, in quanto è possibile imitare maggiormente la natura del tessuto nativo, garantendo contemporaneamente migliori proprietà meccaniche e distribuzione del carico. In aggiunta alle proprietà fisico-chimiche, le proprietà strutturali giocano un ruolo fondamentale sulla finale risposta biologica del costrutto: il controllo della porosità, la distribuzione delle fasi e l'interconnessione della struttura sono aspetti importanti da valutare in fase di progettazione [61]. Le tecniche convenzionali utilizzate per la fabbricazione di costrutti ossei si basano su approcci sottrattivi, in cui non si riesce ad avere un controllo ottimale sulla loro forma finale, inoltre è difficile garantire una porosità interconnessa ed una precisa dimensione dei pori. Con questi approcci è possibile ottenere delle strutture composite a base di collagene attraverso l'estrusione di singoli filamenti, oppure ottenendo spugne con tecniche di liofilizzazione, utilizzando uno stampo di base, ma si hanno dei limiti a livello di controllo morfologico [43]. Per questo, negli ultimi anni sono molto utilizzati i processi basati sulle tecnologie di Additive manufacturing (AM), per cui secondo la definizione ASTM, la produzione additiva è "un processo di unione dei materiali per creare oggetti dai dati del modello 3D, di solito strato su strato, in contrapposizione alla produzione con metodi sottrattivi " [62]. La natura additiva di queste tecnologie garantisce il minimo spreco di materiali costosi, offrendo un grande controllo sull'architettura, riproducibilità, scalabilità e standardizzazione.

Nel campo biomedico, per ricostruire la zona danneggiata, si parte dalle immagini acquisite dai pazienti con la tomografia computerizzata (CT) o attraverso la risonanza magnetica (MRI). Queste vengono convertite in un modello 3D, processate per rimuovere errori di conversione e di qualità della riproduzione dell'oggetto. Per la creazione di un design specifico che possa fittare il difetto

scansionato, oppure per uno scaffold idealizzato per una determinata applicazione, si utilizza la progettazione con Computer Aided Design (CAD) [63]. Il CAD è molto importante per questi processi, perché determina le proprietà strutturali del modello e garantisce la conformità anatomica, ruolo indispensabile per una corretta integrazione nel tessuto nativo. I dati CAD sono suddivisi in strati sottili, in cui più sottile è lo strato, maggiore sarà la risoluzione del processo, ottenendo una maggior accuratezza geometrica. Uno dei principali vantaggi nell'utilizzo della progettazione CAD è la facilità nell'implementare delle modifiche [64]. È possibile affiancare altri software, come l'analisi degli elementi finiti (FEA), che forniscono simulazioni a sollecitazione ed informazioni su come ottimizzare la topologia [63], [65]. Ci sono tre passaggi generali per creare un oggetto da stampare:

- 1) Modellazione 3D
- 2) Divisione per strati (slicing)
- 3) Stampa

Come mostrato nella Figura 17, i processi di AM prevedono oltre alla fase vera e propria di processamento, una di pre-processing ed una di post-processing. La prima inizia con la creazione del modello CAD 3D al calcolatore, per poi ottenere un file STL, che rappresenta il volume del modello come un insieme di piani 2D. Successivamente, si ha la generazione dei supporti di stampa e la trasmissione del file STL al software di gestione della macchina, che definisce una serie di parametri. Dopo si procede con la fabbricazione del pezzo e con la conseguente fase di post-processing in cui avviene la pulizia del campione. In base al tipo di tecnica e materiali utilizzati, è possibile che ci sia anche un trattamento del campione, ad esempio con raggi UV, concludendo con la finitura, per ottenere le superfici funzionali desiderate [64].

Le tecniche di AM (Tabella 2) sono divise in sette categorie, secondo la ASTM F42 e ISO TC 261.

Tabella 2 - Tecniche di AM.

TIPO DI PROCESSO	DESCRIZIONE	MATERIALE	ESEMPIO DI TECNOLOGIE
Directed Energy Deposition (DED)	Unico dispositivo per depositare simultaneamente materiale ed energia necessaria per processamento.	Metalli in polvere o in stato liquido	Laser Metal Deposition (LMD)

Material Extrusion (MEX)	Il materiale viene depositato tramite estrusione, attraverso un ugello.	Polimeri	Fused deposition modeling (FDM)
Powder Bed Fusion (PBF)	Raggio laser o di elettroni per sinterizzare selettivamente il materiale all'interno di un contenitore.	Polimeri o metalli in polvere	Selective Laser Sintering (SLS) Electron beam melting (EBM) Selective Heat Sintering (SHS) Direct Metal Laser Sintering (DMLS)
Vat Photopolimerization (VPP)	Materiale in una vasca, polimerizzati selettivamente, attraverso una fonte di energia luminosa.	Fotopolimeri liquidi	Digital Light Processing (DLP) Stereolitografia (SLA)
Binder Jetting (BJT)	Agente legante liquido stampato in un letto di polvere per formare sezioni trasversali parziali.	Polimeri, metalli e sabbia di fonderia in polvere	Powder Bed and Inkjet Head (PBIH) Plaster Based 3D Printing (PP)
Material Jetting (MJT)	Materiale depositato selettivamente sottoforma di goccioline.	Polimeri e cere	Multi Jet Modeling (MJM)
Sheet Lamination (SHL)	Fogli di materiale uniti per formare una parte.	Carta e metalli	Laminated Object Manufacturing (LOM), Ultrasonic Consolidation (UC)

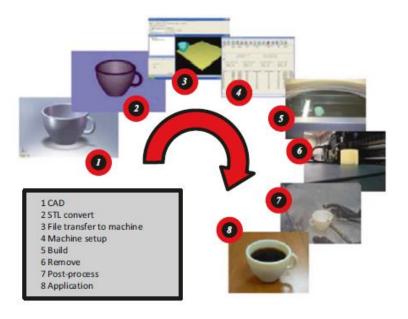


Figura 17 - Schema del processo di creazione e manifattura di un oggetto usando AM [64].

# 2.4.1 Bioprinting

La necessità di trovare approcci più sofisticati, che consentano la riproduzione di caratteristiche architettoniche complesse, utilizzando allo stesso tempo biomateriali, cellule e segnali biochimici derivati dall' ECM, ha portato all'identificazione di un gruppo più ristretto di tecnologie AM, classificate come tecniche di Bioprinting. La medicina rigenerativa si basa molto su questo tipo di tecnologie, che permettono il processamento di biomateriali tramite AM, da soli o contenenti cellule (bioink). Infatti, questa categoria di tecniche sfrutta condizioni di lavorazione e ambientali miti, riducendo l'esposizione a fonti esterne e stress, che possono ostacolare la vitalità dei componenti cellulari. Di conseguenza, risulta efficace processare materiali come i polimeri naturali, altamente sensibili alle condizioni di lavorazione [38], [66]. Le tecnologie appartenenti a questa famiglia sono: la laser-induced foward transfer (LIFT), l'inkjet e la microextrusion.

#### 2.4.1.1. Laser-induced foward transefer (LIFT)

Questo processo di Bioprinting (Figura 18) utilizza un raggio laser pulsato, un sistema di messa a fuoco ed un substrato. Quest'ultimo è costituito da diversi strati: uno di vetro, trasparente ai raggi laser, uno di assorbimento di energia (oro, titanio) ed infine uno di materiale biologico (cellule e/o

idrogel), preparato in una soluzione liquida. Il laser funge da forza motrice per indurre la deposizione di piccole goccioline di bioink, sul substrato ricevente. Non c'è bisogno di utilizzare ugelli e si ha un'alta risoluzione alla microscala, ma i costi rimangono elevati, insieme alle tempistiche di processo [67].

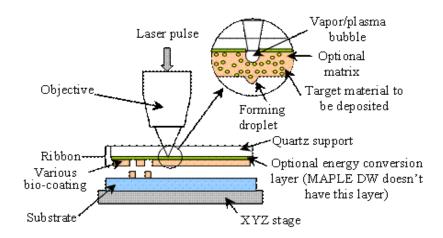


Figura 18 - Schema di funzionamento LIFT.

#### 2.4.1.2. Inkjet Bioprinting

L'inkjet prevede la dispersione di goccioline di biomateriale attraverso un piccolo orifizio, permettendo la deposizione precisa di piccoli volumi di materiale ed ottenendo un'elevata risoluzione. La formazione di goccioline può essere indotta sia da meccanismi piezoelettrici che termici (Figura 19), ma spesso creano sollecitazioni locali elevate, danneggiando l'integrità delle membrane cellulari. Inoltre, c'è il frequente intasamento degli ugelli, che richiede l'utilizzo di materiali con viscosità estremamente basse (< 0,1 Pa.s). Con questa tecnica è possibile ottenere un'elevata velocità di stampa e garantire, rispetto alla tecnica LIFT, una maggior vitalità cellulare (nel caso di bioink) e costi inferiori [68].

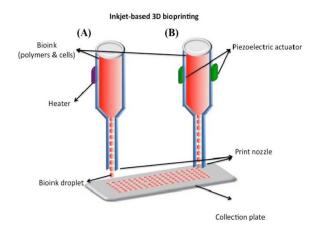


Figura 19 - Schema funzionamento Inkjet bioprinting con le due testine utilizzabili.

#### 2.4.1.3. Microextrusion bioprinting

Questa tecnica si basa sull'estrusione di materiale sotto forma di filamento, ottenendo una struttura 3D, strato su strato, senza utilizzare temperature elevate per fondere il materiale. Nel caso di materiali altamente deformabili, dopo aver estruso il materiale è opportuno stabilizzare la struttura finale con dei metodi di reticolazione. È un processo molto versatile, perché utilizza materiali con un ampio range di viscosità; è anche possibile incapsulare le cellule nei biomateriali sotto forma di idrogel ed estruderli in maniera combinata [69]. Tra i polimeri più utilizzati ci sono i termosensibili e quelli in grado di reticolare in condizioni chimiche favorevoli. Sono compresi polimeri sia naturali (alginato, agarosio, gelatina, collagene, fibrina ecc.) che sintetici, blend polimerici e sospensioni contenenti fasi inorganiche, disperse in fase polimerica [68].

Si ottengono risoluzioni tra 100 e 200 µm, che sono inferiori rispetto alle tecniche che usano una sorgente laser e inkjet. Un grande vantaggio di questa tecnica è l'alta velocità di produzione, ottenendo molti pezzi in meno tempo e con dimensioni più grandi.

Ci sono diversi metodi di estrusione (Figura 20) [69]:

- Estrusione pneumatica: un compressore applica una pressione a monte del materiale.
- Estrusione meccanica: un pistone con moto lineare, azionato a motore. Si ha un maggior controllo sul flusso di materiale.
- Estrusione a vite: sono estrusi materiali termoplastici o viscosi tramite vite senza fine. È una tecnologia più adatta per le alte viscosità, ma allo stesso tempo comporta un maggior danno sulla componente cellulare, se presente [70].

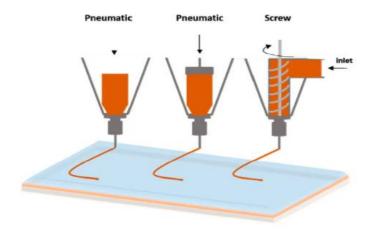


Figura 20 - Testine utilizzate nella microestrusione.

# 2.4.2 Parametri di stampa

Nella tecnica di microestrusione è fondamentale garantire la stampabilità (printability) e la fedeltà di riproduzione 3D (printing fidelity), che dipendono direttamente dalle caratteristiche del materiale e dalla sua stabilità post-estrusione (Figura 21).

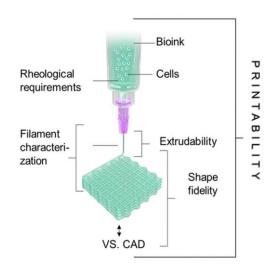


Figura 21 - Parametri e componenti del processo di Extrusion Bioprinting [71].

I biomateriali usati nella microestrusione devono preferibilmente avere le seguenti proprietà [71], [72]:

• Pseudo-plasticità (shear thinning behaviour): capacità di diminuire la viscosità per valori crescenti di stress e velocità di taglio applicati.

- Alto limite di scorrimento (yield stress): valore di stress che deve essere superato per ottenere il flusso del materiale, quindi la sua deformazione.
- Veloci cinetiche di recupero delle proprietà visco-elastiche (fast shear recovery): il materiale dovrebbe poter preservare la forma evitando collassi e spanciamenti, in modo da limitare la risoluzione finale del pezzo.

Materiali che tendono a formare un filamento e possiedono un rapido recupero post estrusione garantiscono una migliore fedeltà di stampa e adesione tra gli strati [71]–[73]. L'analisi visiva della forma delle gocce o dei filamenti, durante la prima fase di estrusione, è un passo identificativo per una corretta impostazione dei parametri di stampa. Per avere una valutazione dei parametri fisicochimici che descrivono il flusso e la deformazione di un materiale, sottoposto a specifiche sollecitazioni, (Figura 22A) si effettuano dei test al reometro rotazionale, ottenendo risultati che permettono di valutare le sue caratteristiche e di effettuare un primo screening sulla effettiva capacità della sua stampabilità. Ad esempio, il test di "Amplitude Sweep" (Figura 22B) di una sostanza viscoelastica in funzione della sollecitazione di taglio, indica limite di scorrimento (Yield point) come limite dell'intervallo viscoelastico lineare e del punto di flusso (Flow point). Questo viene valutato con l'andamento del modulo elastico (G') e del modulo viscoso (G''), in funzione dello stress applicato. In particolare, il punto di scorrimento indica che il materiale sta subendo una deformazione che coincide col diminuire di G'. Quando il valore della componente viscosa è maggiore di quella elastica il materiale inizia a fluire [71].

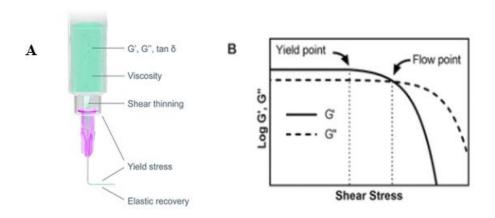


Figura 22 - Proprietà reologiche del materiale che influenzano la stampabilità e la fedeltà di forma. (A) Interazione delle proprietà reologiche, durante l'estrusione. (B) Esempio di un test di Amplitude Sweep su una sostanza viscoelastica [71].

Una volta studiato il materiale, si passa alla definizione dei parametri di stampa. Questi possono essere impostati tramite interfaccia del software della stampante quando si parte da un modello 3D

con file STL, oppure vengono inseriti in fase di definizione del Gcode [74]. I parametri incidenti sul materiale che devono essere impostati sono [71], [72] :

- Pressione (kPa): fortemente legata alle proprietà visco-elastiche del materiale. Deve essere regolata in modo tale da ottenere un flusso concorde alla velocità di movimento della testina.
- Velocità della testina o del letto di stampa (mm/s): deve essere regolata in base al flusso del materiale, in modo tale da ottenere una deposizione di materiale accurata.
- Diametro dell'ago (μm, G): per ottenere strutture fini, ad alta risoluzione, sono utilizzati diametri inferiori dell'ago. I diametri più piccoli sono associati a sforzi e velocità di taglio superiori applicati al materiale, che possono essere dannosi in presenza di una componente cellulare.
- Riempimento dello strato /Infill (%): percentuale di riempimento di ogni strato.
- Spessore dello strato /z step (μm): parametro fondamentale per la buona coesione tra strati successivi, contribuendo alla risoluzione finale del pezzo stampato. La definizione dell'altezza di ogni strato viene definita come il 70% in base alla dimensione del diametro interno dell'ago, in quanto è risultato essere una misura adatta per garantire una buona adesione tra strati.
- Temperature di esercizio (testina e piatto di deposizione): si possono sfruttare le temperature di transizione dei materiali, per stabilizzare il processo di stampa o per modificare le proprietà visco-elastiche del materiale. Nel caso ci siano solventi, deve essere fatta attenzione alla loro velocità di evaporazione.

Le risoluzioni finali e la fedeltà di stampa ottenute dipendono, quindi, anche dalla tecnologia utilizzata e dai suoi limiti meccanici. È possibile controllare e ottimizzare la velocità della testina e del flusso di materiale, ma si dovranno sempre considerare i limiti legati alla meccanica dei motori. Oltre all'adesione tra gli strati, la stabilità della struttura finale è influenzata dalla buona adesione tra il primo strato e il piatto di stampa; bisogna regolare correttamente la distanza tra la punta dell'ago e la base di estrusione (offset), usare superfici che promuovano l'adesione del materiale e regolare opportunamente le temperature del piatto di stampa, in base alle proprietà del materiale [69], [73].

La stampa di materiali con scarse proprietà meccaniche e l'uso di gel rappresenta una delle maggiori difficoltà del bioprinting. I principali polimeri naturali considerati per la stampa di scaffold, biocompatibili ma anche biomimetici, presentano una bassa viscosità e cinetiche di reticolazione lente. In questo contesto, infatti, l'uso di bagni sacrificali di supporto alla stampa diventa fondamentale per garantire la deposizione del biomateriale, evitandone il collasso o l'eccessivo spanciamento durante il processo [75].

# 2.4.3 Bagni sacrificali di supporto ai processi di stampa 3D

Nella fase di estrusione, dei processi di stampa 3D, i bagni sacrificali di supporto hanno la capacità di sospendere ed incapsulare completamente il materiale stampato. In particolare, hanno un comportamento di tipo solido in assenza di una sollecitazione applicata, o a sollecitazioni molto basse, come quelle indotte dalla gravità [76],[77]. Allo stesso tempo, sono in grado di far passare l'ugello attraverso la propria microstruttura, per depositare il materiale e poi ricostituirsi. Questa capacità di autoriparazione consente di incapsulare il materiale depositato [78], permettendo la stampa di materiali morbidi o fluidi a bassa viscosità, spesso contenenti un alto contenuto di acqua. Ciò presenta un notevole aumento della gamma dei materiali che possono essere stampati tramite tecniche di estrusione. I bagni di supporto permettono l'estrusione anche dei bioink con bassa viscosità, contribuendo a garantire la sopravvivenza delle cellule durante il processo. Inoltre, consentono la fabbricazione di forme ben definite, senza richiedere uno scaffold preesistente [76]. Nella tabella 3 sono presentati degli esempi di bagni più utilizzati e le loro caratteristiche.

Tabella 3 - Tipi di bagni di supporto usati nel processamento di materiali morbidi e con bassa viscosità.

MATERIALE	CARATTERISTICHE	IMMAGINE DA ESEMPIO
Acido ialuronico (HA) modificato [79]	Idrogel Supramolecolare: sospende il materiale stampato grazie a legami intermolecolari reversibili	
Alginato e gomma xanthana [80]	Due bioink distinti, contenenti cardiomiociti e cellule endoteliali, stampati in un bagno di microparticelle alginato in una soluzione di gomma xanthan in mezzo cellulare.	Prima

# Albero arterioso di alginato (nero) stampato in un bagno Sospensione di di supporto in gelatina. particelle irregolari di Bagno composto da **GELATINA**[75] particelle micrometriche irregolari di gelatina. Valvola cardiaca in collagene (diametro di 28 Sospensione di mm), stampata in un bagno di supporto in gelatina. particelle sferiche di GELATINA [81] Bagno con particelle micrometriche sferiche di gelatina

Molti autori hanno studiato lo sviluppo dei bagni di supporto [75],[81],[82] fino a proporli in commercio. Per esempio Hinton et al. [75] hanno prodotto un bagno in gelatina, secondo un metodo definito come "freeform reversible embedding of suspended hydrogel" (FRESH). Questi bagni a base di particelle di gelatina sono stati usati per la stampa di componenti funzionali del cuore, come le valvole cardiache tricuspide stampate in collagene (Tabella 3) [80]. In seguito ad un'incubazione a 37 °C, il collagene gelifica e la gelatina liquefa, permettendo la rimozione. Il lavoro, svolto da Feinberg e colleghi, adatta la loro tecnica originale FRESH [76] per stabilire una seconda versione, FRESH v2.0, centrata sul controllo dell'omogeneità delle microparticelle di gelatina (Figura 23 E-F). Rispetto alla prima versione, in cui un blocco di gelatina è stato frullato per produrre particelle con un diametro medio di 65 μm, il FRESH v2.0 utilizza un approccio di coacervazione, ottenendo particelle di diametro inferiore (~ 25 μm), con minore polidispersione [81].

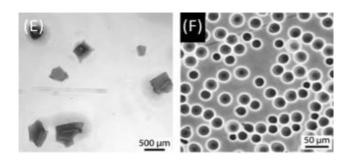


Figura 23 - Tecnica FRESH (E) V1.0 (F) V2.0 [76].

La stampa 3D e la tecnica FRESH possono quindi essere combinati al fine di realizzare scaffold complessi per tessuto osseo, infatti, ad esempio, il nostro gruppo di lavoro ha cercato di realizzare delle strutture composite a base di collagene, nanoHA ed MBG in un bagno di gelatina con tecnica FRESH V1.0. Nonostante siano state ottenute delle buone proprietà viscoelastiche e una buona stampabilità del sistema, una volta rimosso il bagno di gelatina è stata osservata una scarsa stabilità del costrutto, che presentava anche delle imperfezioni strutturali. I risultati ottenuti hanno dimostrato il potenziale di questa tecnica, suggerendo ulteriori miglioramenti nel processo di stampa [43].

### 3 Materiali e Metodi

Questo lavoro ha l'obiettivo di realizzare strategie di stampa 3D di formulazioni ibride a base di collagene, per la realizzazione di scaffold ossei. Partendo dalla formulazione composita a base di collagene, nanoparticelle di HA (nanoHA) e vetri bioattivi mesoporosi contenenti Stronzio al 4% molare (MBG\_Sr4%), già ottimizzata precedentemente dal gruppo di ricerca di questo lavoro [43], si è cercato di incrementare le proprietà reologiche di tale sospensione, sfruttando un agente chimico naturale con basso effetto citotossico, la genipina, in grado di reticolare il collagene. Il reticolante è stato aggiunto direttamente alla sospensione composita, e successivamente questa formulazione ibrida è stata utilizzata come inchiostro per ottenere scaffold, tramite la tecnica di stampa 3D ad estrusione. L'obiettivo è di ottenere, in seguito alla transizione sol-gel, che permette di ottenere l'autoassemblamento delle molecole di collagene, un ulteriore reticolazione chimica con la formazione di legami covalenti tra le catene polimeriche, per azione della genipina.

Le due sospensioni ibride, senza reticolante (Coll/MBG/nanoHA) e con genipina (GEN-Coll/MBG/nanoHA), sono state analizzate, confrontando le proprietà viscoelastiche per ottenere informazioni sul loro comportamento a seguito di determinati stress applicati, utili ai fini della stampa 3D.

Per il processo di Bioprinting è stato testato l'ausilio del bagno di supporto sacrificale per i processi di stampa, cercando di ottenere una miglior deposizione del filamento durante la fase di estrusione ed una miglior fedeltà di stampa finale. Studi precedenti hanno utilizzato bagni sacrificali a base di slurry di gelatina, ottenuti tramite la tecnica definita come "freeform reversible embedding of suspended hydrogel" (FRESH) [76][43], che hanno dimostrato ottime proprietà contemporaneamente il movimento dell'ago della stampante al loro interno e l'incapsulamento dei filamenti estrusi. Allo stesso tempo, essendo la gelatina un derivato del collagene, non è stato possibile utilizzare questo materiale, in quanto l'azione della genipina si verificherebbe anche su quest' ultimo. Di conseguenza sulla base dei protocolli della tecnica FRESH, con cui si ottiene un blocco di gel di gelatina che successivamente viene frullato per ottenere delle particelle, si è sviluppato ed ottimizzato un bagno sacrificale a base di slurry di alginato e cloruro di calcio. Per ottenere il materiale finale sono stati testati diversi reticolanti e successivamente diverse concentrazioni di acido alginico sodato e reticolante, discriminando i risultati migliori a seguito degli studi condotti attraverso il reometro.

L'obiettivo finale è quello di riuscire a realizzare strutture complesse in grado di mimare la struttura ossea, tramite la tecnica di stampa 3D ad estrusione, ottenendo delle buone proprietà strutturali, morfologiche e biomimetiche per le cellule del tessuto osseo.

Di conseguenza, sono stati realizzate dei campioni con la sospensione GEN-Coll/MBG/nanoHA e dopo aver favorito la transizione sol-gel del collagene, le strutture ottenute sono state sottoposte ad una seconda reticolazione, in cui sono state incubate per 24 ore con una soluzione a base di genipina ed etanolo, come precedentemente trattato da Montalbano et al. [43]. I costrutti finali così realizzati (GEN-Coll/MBG/nanoHA +GEN), sono stati analizzati per studiare gli effetti dell'ulteriore trattamento di reticolazione, in termini di proprietà viscoelastiche, attraverso test al reometro, e stabilità strutturale con test di degradazione e rilascio degli ioni stronzio.

La formulazione GEN-Coll/MBG/nanoHA ed il bagno sacrificale a base di slurry di alginato sono stati utilizzati nei processi di stampa. Sono state testate diverse geometrie impostando un parametro di stampa, la pressione e variando la velocità di estrusione al fine di valutare il suo effetto sulla struttura finale realizzata. Dopo aver asportato il bagno di alginato con un lavaggio a base di soluzione di alginato liasi, enzima in grado di indebolire i legami chimici favorendo la degradazione del polimero, gli scaffold ottenuti sono stati analizzati morfologicamente tramite tecniche di caratterizzazione non distruttiva, per osservare la fase organica ed inorganica, ed infine con test cellulari per ottenere informazioni sulla biocompatibilità con cellule di origine ossea.

# 3.1.1 Sintesi idrotermale delle nanoparticelle di HA (nanoHA)

Per la sintesi delle nanoparticelle di HA (Figura 24) è stato utilizzato un metodo idrotermale, il cui protocollo e stato precedentemente sviluppato ed ottimizzato dal gruppo di ricerca di questo lavoro. Il procedimento ha previsto la realizzazione di una prima soluzione in cui sono stati disciolti 5.48 g di potassio fosfato bibasico triidrato in 100 mL di acqua bidistillata (ddH2O). Successivamente, è stato aggiunto 0.2 vol% di Darvan 821-A alla soluzione ed il pH è stato impostato a 10.5, aggiungendo una soluzione di idrossido di sodio 1 molare (1 M NaOH). Per avere un rapporto molare Ca/P di 1.67, è stata preparata una seconda soluzione, disciogliendo 4.44 g di cloruro di calcio in 60 mL di ddH<sub>2</sub>O. Dopo un'ora di agitazione, quest'ultima soluzione è stata aggiunta, goccia a goccia, nella soluzione contenente il precursore del fosfato, mantenendo costantemente il pH a 10.5, aggiungendo 1 M NaOH. La soluzione risultante è stata tenuta sotto agitazione per 3 ore, mantenendo costantemente il pH a 10.5. La soluzione è stata lasciata riposare per circa 24 ore, a pressione atmosferica e temperatura ambiente. Successivamente è stato rimosso il surnatante e la sospensione rimanente è stata versata in un contenitore di teflon da 250 mL, collocato dentro il reattore idrotermale e messa in forno a 100 °C, per 4 ore. Dopo il raffreddamento, è stato rimosso il surnatante e la sospensione risultante è stata centrifugata per separare le particelle di nanoHA, successivamente sono stati eseguiti tre lavaggi con ddH<sub>2</sub>O ed una volta con etanolo puro (EtOH). Alla fine, le particelle di nanoHA sono state raccolte in un piatto Petri ed essiccate in forno a 100 °C per 24 ore, in modo da far evaporare l'EtOH in eccesso. Una volta asciutto, il materiale è stato macinato dentro un mortaio, al fine di ottenere una polvere omogenea.

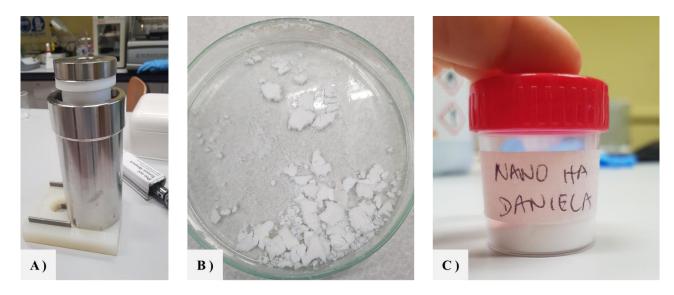


Figura 24 - Sintesi idrotermale di nanoparticelle di HA. A) Reattore idrotermale (B) particelle pre e (C) post essiccazione in forno.

# 3.1.2 Sintesi sol-gel dei vetri bioattivi mesoporosi contenenti Stronzio (MBG 4%)

Il protocollo utilizzato per la sintesi sol-gel dei vetri bioattivi mesoporosi, contenenti stronzio, è stato precedentemente sviluppato ed ottimizzato dal gruppo di ricerca di questo lavoro, per ottenere delle nanoparticelle mesoporose in grado di rilasciare ioni [34], [56]. Queste nanoparticelle contenenti il 4% molare di stronzio (Sr/Ca/ Si = 4/11/85) sono state prodotte dissolvendo 6.6 g di bromuro di cetiltrimetilammonio (CTAB, 98%, Sigma Aldrich, Milano, Italia) e 12 mL NH4OH (soluzione di idrossido di ammonio, Sigma Aldrich, Milano, Italia) in 600 mL di ddH2O. Successivamente, 30 mL di ortosilicato di tetraetile (TEOS, ortosilicato di tetraetile, Sigma Aldrich, Milano, Italia), 4.13 g di calcio nitrato tetraidrato (Ca (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 4H<sub>2</sub>O, 99%, Sigma Aldrich, Milano, Italia) e 1.68 g di cloruro di stronzio sono stati aggiunti nella soluzione di esaidrato (SrCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O, per analisi EMSURE® ACS); la sospensione risultante è stata mantenuta sotto vigorosa agitazione per 3 ore. Dopo la centrifugazione (Hermle Labortechnik Z326, Hermle LaborTechnik GmbH, Wehingen, Germania) a 10.000 rpm per 5 minuti, il precipitato finale è stato lavato una volta con ddH<sub>2</sub>O e due volte con EtOH, infine essiccato a 70 °C per 12 ore. Le polveri sono state ulteriormente calcinate a 600 °C in un forno (Carbolite 1300 CWF 15/5 Carbolite Ltd., Parson Lane, Hope, Hope Valley, UK), per rimuovere possibili residui di CTAB.

# 3.1.3 Preparazione della formulazione ibrida a base di collagene: GEN-Coll/MBG/nanoHA

La sospensione è stata realizzata ed ottimizzata precedentemente da Montalbano et al. [43], utilizzando il 45 wt% di collagene, il 40 wt% di nanoHA e il 15 wt% di MBG, calcolati considerando il rapporto in volume tra fase organica ed inorganica dell'osso e una percentuale in volume di 50:50 tra nanoHA e MBG (Tabella 4).

Tabella 4 - Materiali per la sospensione Coll/MBG/nanoHA.

COLLAGENE DI TIPO 1 (mg)	MBG (mg)	nanoHA (mg)	0.5 M ACIDO ACETICO (mL)	1M NaOH (mL)	DARVAN 821-A (μL)	VOLUME TOTALE (mL)
450	150	400	20	9,85	150	30
225	75	200	10	4,925	75	15

Per ottenere 30 mL (Figura 25) di sospensione, sono stati disciolti 450 mg di polvere di Collagene di tipo 1, in 15 mL di 0.5 M di acido acetico (0.5 M AA), a 4 °C. La soluzione è stata posta in agitazione magnetica per circa 24 ore. La sospensione di idrossiapatite è stata ottenuta versando 150 μL di Darvan 821-A in 9.85 mL di 1 M NaOH, per ottenere una concentrazione dello 0.5 v% di Darvan 821-A. La soluzione è stata completata con l'aggiunta di 400 mg di nanoHA e lasciata in agitazione magnetica per 1 ora. Successivamente, la sospensione è stata sonicata per 1 ora e posta in agitazione per circa 24 ore. La sospensione di MBG è stata ottenuta disperdendo 150 mg di polveri di MBG in 5 mL di 0.5M AA e poi sonicata per 1 ora; dopodiché, è stata agitata per 3 ore, a 4 °C. In seguito, la sospensione di MBG è stata aggiunta alla soluzione di collagene e la sospensione risultante è stata neutralizzata aggiungendo goccia a goccia quella di nanoHA in NaOH/Darvan, fino ad ottenere un pH neutro. La formulazione finale è lasciata in agitazione per 3 ore.

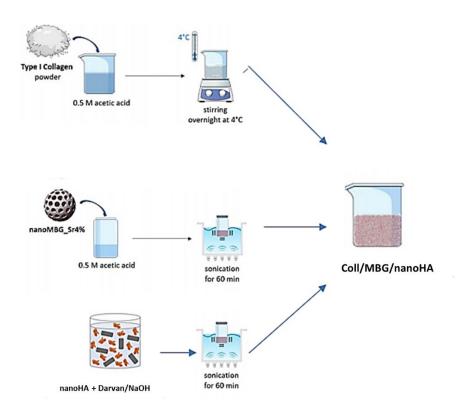


Figura 25 - Schema rappresentativo per la realizzazione della formulazione Coll/MBG /nanoHA.

Trascorse le 3 ore, dopo aver controllato che non ci fossero aggregati di particelle all'interno della formulazione ibrida di Coll/MBG/nanoHA, è stato misurato il pH, che deve rimanere neutro. Successivamente sono state pesate le polveri di genipina, al fine di ottenere una concentrazione di 0.1 wt%, e sono state aggiunte direttamente nella sospensione posta in agitazione magnetica. La formulazione ibrida ottenuta, GEN-Coll/MBG/nanoHA, è stata mantenuta in agitazione per circa 10 minuti, per favorire la dispersione omogenea delle polveri di reticolante nella sospensione ed infine è stato ricontrollato che il pH fosse rimasto neutro (7.4).

# 3.1.4 Preparazione del bagno di supporto per la stampa: slurry di alginato a base di CaCl<sub>2</sub>

Gli alginati sono copolimeri lineari di origine naturale estratti dalla parete cellulare delle alghe brune Laminaria e Ascophillum, prima di essere utilizzati subiscono una serie di trattamenti, che portano alla loro trasformazione in alginato di sodio, in modo tale da diventare solubili [84].

Dal punto di visto chimico sono copolimeri a blocchi random, composti da monomeri di acido  $\beta$ -D-mannuronico (M) e acido  $\alpha$ -L-guluronico (G) (Figura 26). All'interno del polimero di alginato, i monomeri M e G sono assemblati in blocchi, sia a sequenza ripetuta (MM o GG), che a sequenza

alternata (MG). La quantità e la distribuzione dei due monomeri dipendono, ovviamente, dalla specie, dall'età e dalla parte dell'alga da cui il polimero è stato isolato [85].

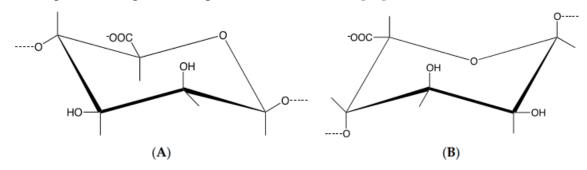


Figura 26 - Struttura chimica dell'alginato (A) acido  $\beta$ -D-mannuronico (B) acido  $\alpha$ -L-guluronico.

L'alginato è un polisaccaride di forte interesse in campo biomedicale per via della sua capacità di gelificare. Un gel è un sistema colloidale costituito da un network 3D di molecole tenute insieme da zone di giunzione di tipo chimico o fisico, in modo da costituire una fase solida nella quale rimane inglobato il mezzo liquido disperso. Il network conferisce al gel le proprietà caratteristiche dello stato solido, mentre la fase liquida influisce sulla densità [86].

Questo polimero gelifica in seguito alla presenza in soluzione di cationi bivalenti, come ad esempio Ca<sup>2+</sup>, che portano alla formazione di legami ionici tra le diverse catene polimeriche e promuovono una transizione sol-gel. Nel dettaglio, cationi bivalenti interagiscono con il polimero riuscendo a coordinare i blocchi G su diverse catene polimeriche, consentendo la formazione di un network tridimensionale. In letteratura si parla del modello "egg-box" (Figura 27) che descrive il network polimerico ottenuto grazie all'interazione degli ioni Ca<sup>2+</sup> con i gruppi ossidrilici e carbonilici dei monomeri, e dall'instaurazione di siti di legame tra due blocchi G adiacenti in seguito alla chelazione dei cationi bivalenti [85], [86].

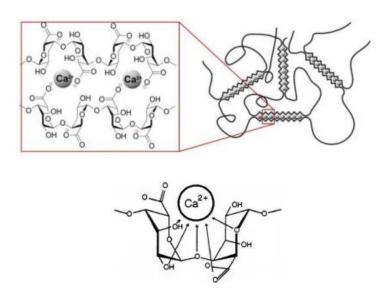


Figura 27 - Modello "Egg-Box" del network di alginato [85].

Per ottenere un gel di alginato sono state utilizzate due soluzioni, la prima è stata ottenuta disciogliendo sotto agitazione magnetica l'acido alginico sodato in ddH<sub>2</sub>O ad una concentrazione di 40 wt%, la seconda soluzione è stata realizzata disciogliendo le polveri di CaCl<sub>2</sub> in ddH<sub>2</sub>O, sotto agitazione magnetica, ottenendo una concentrazione finale di 14 wt%. La prima soluzione è stata versata in un piatto Petri e posta a 70 °C per 20 minuti, successivamente raffreddata a temperatura ambiente. A questo punto la seconda soluzione è stata aggiunta in modo a coprire tutta la superficie. Dopo aver trascorso una fase di riposo per tutta la notte, è stata eliminata la soluzione di reticolante in eccesso (Figura 28A) ed il gel ottenuto è stato frullato con ddH<sub>2</sub>O, in rapporto 2:1, per 2 minuti alla massima potenza. Infine, sono stati effettuati 2 lavaggi in ddH<sub>2</sub>O e centrifugando il materiale a 5500 rpm per 4 minuti, ottenendo lo slurry finale (Figura 28B).

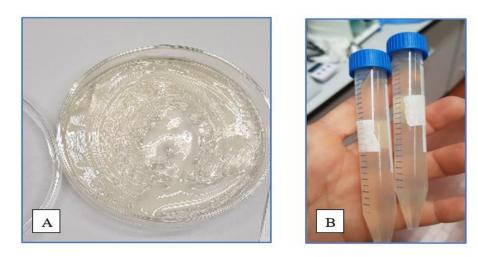


Figura 28 - Realizzazione bagno di estrusione a base di alginato (A) gel di alginato (B) slurry di alginato.

# 3.1.5 Stampa 3D di scaffold compositi in grado di effettuare una reticolazione *insitu*

Prima di procedere ai processi di stampa, fase fondamentale è la centrifugazione del bagno e della sospensione posta all' interno della cartuccia di stampa, per eliminare il più possibile la presenza di bolle d'aria, fattore di errore e problemi durante la fase di estrusione. Quindi, la sospensione è stata centrifugata per 5 minuti a 3000 rpm, successivamente questa operazione è stata ripetuta, girando la cartuccia a testa in giù. Anche il bagno è stato centrifugato, a 1500 rpm per 5 minuti, in modo da eliminare l'acqua in eccesso. Dopo avere effettuato questi procedimenti è stato possibile procedere con i test di stampa (Figura 29), in cui è stata utilizzata una testina meccanica con capacità di raffreddare e mantenere costante la temperatura, in questo caso a 10 °C, mentre il piatto di estrusione è stato mantenuto ad una temperatura costante di 20 °C. Queste temperature sono state scelte per evitare eventuali variazioni di stato rispettivamente della formulazione ibrida a base di collagene e dello slurry di alginato.

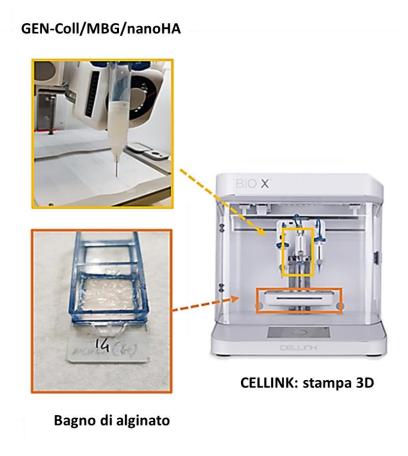


Figura 29 - Schema del processo di stampa.

Per realizzare gli scaffold sono stati utilizzati aghi da 27 G (0.2 mm di diametro interno), impostando una un'altezza dello strato di 0.17 mm, circa il 66% del diametro dell'ago utilizzato, in quanto

garantisce una buona adesione tra gli strati [71]. Si sono selezionate diverse geometrie semplici per realizzare gli scaffold con diversi riempimenti dello strato, infine è stata testata una geometria più complessa ottenuta tramite realizzazione di un File STL di un modello di struttura del tessuto osseo, ricavato dalle analisi alla microtompografia computerizzata. Tutte le geometrie semplici hanno un perimetro con lati di base di 10 mm, mentre lo spessore è stato variato scegliendo un intervallo tra 0.3 mm e 3 mm, mentre il modello di osso ha dimensioni 8x8x8 mm e 6x6x6 mm. La percentuale di riempimento dello strato (infill) è stata impostata tra il 15% e 30% per le geometrie semplici e tra 70% ed 80% per il modello di osso. Le prove di stampa sono state effettuate mantenendo costante un parametro, la pressione, e variando il valore della velocità della testina, in modo da comprendere l'influenza di quest' ultimo sui processi di stampa. I valori di velocità utilizzati sono stati tra 8 -12 mm/s, mentre quelli della pressione sono stati mantenuti tra 8 e 12 kPa, in quanto durante il processo di estrusione, per ottenere pori molto piccoli è ravvicinati è stato necessario variare anche il parametro della pressione, mantenendo costante il valore della velocità precedentemente scelto.

### 3.1.6 Eliminazione del bagno di supporto e post-reticolazione degli scaffold

Una volta stampate le strutture desiderate, i campioni sono stati posti in incubazione a 37 °C, per circa 24 ore, al fine di favorire i processi di reticolazione del collagene e contemporaneamente indebolire i legami chimici dello slurry di alginato, in quanto il legame tra i cationi bivalenti e le molecole sono favoriti a basse temperature. Per rimuovere il bagno di supporto all'estrusione è stata creata una soluzione contenente l'enzima in grado di digerire specificatamente l'alginato, attraverso la scissione dei legami carbonio-alogenuro: l'alginato liasi. Nel dettaglio, il meccanismo di azione delle liasi è basato su una reazione a tre fasi, comprendente [87]:

- 1. la rimozione della carica negativa sull' anione carbossilato (COO-);
- 2. l'estrazione base-catalizzata del protone sul carbonio C(5);
- 3. una β-eliminazione del legame 4-O-glicosidico.

La soluzione di alginato liasi è stata ottenuta disciogliendo le polveri dell'enzima in ddH<sub>2</sub>O, per una concentrazione finale di 0.8 wt%. Dopo aver rimosso manualmente il gel in eccesso, la soluzione creata di alginato liasi è stata versata in ogni piastra contenente il campione. I campioni sono stati lasciati una notte in un agitatore dinamico a 37 °C, a 50 rpm e successivamente lavati in soluzione salina (Dulbecco Phosphate Buffer Solution, DPBS), 3 volte per 20 min.

Per ottenere una maggior stabilità della struttura degli scaffold ottenuti, una seconda reticolazione chimica è stata effettuata incubando gli scaffold in 3 mL di soluzione di 0.5 wt% genipina in 70% EtOH. Dopo un'incubazione a 37 °C, per circa 24 ore, la soluzione in eccesso è stata rimossa ed i

campioni lavati con DPBS. Sono stati effettuati un totale di 3 lavaggi, aggiungendo DPBS ed incubando i campioni a 37 °C, per 30 min.

# 3.1.7 Preparazione dei campioni bulk per analizzare le proprietà del biomateriale composito ottenuto

Sono stati realizzati dei campioni bulk utilizzando la formulazione ibrida a base di collagene con aggiunta delle polveri di genipina, Coll/MBG/nanoHA +GEN, per analizzare le proprietà reologiche, morfologiche e fisico-chimiche delle matrici ricostituite a seguito dei processi di autoassemblaggio del collagene e dell'interazione chimica del reticolante nella ricostituzione delle fibre del polimero, che portano alla formazione del gel finale. In particolare, sono stati preparati dei campioni circolari di 10 mm di diametro e 5 mm di spessore, versando 400 µL di sospensione in stampi di silicone. Questi sono stati utilizzati per le seguenti analisi:

- Caratterizzazione morfologica.
- Caratterizzazione fisico-chimica.
- Test di rilascio di ioni stronzio.
- Prove di degradazione idrolitica.
- Prove di degradazione enzimatica.

Con una quantità di 600 µL di sospensione, invece, sono stati ottenuti campioni di 20 mm di diametro e circa 1 mm di spessore, per eseguire prove reologiche per studiare le proprietà viscoelastiche ottenute a seguito dei processi di reticolazione.

In particolare, gli stampi contenenti la sospensione, sono stati incubati a 37 °C per 24 ore, per favorire i processi di reticolazione fisica e chimica del collagene, inoltre sono stati ottenuti anche dei campioni con post crosslinking, attraverso il metodo descritto nella sezione 3.1.6. I campioni ottenuti sono stati conservati a 4 °C fino all'analisi.

#### 3.2 Metodi di caratterizzazione

# 3.2.1. Caratterizzazione delle proprietà reologiche dei materiali

La reologia studia la deformazione e il flusso della materia sottoposta a diverse condizioni ambientali e di stress. Le prove reologiche possono essere eseguite sia su materiali liquidi, che su quelli solidi, mediante un reometro rotazionale, studiando la variazione delle loro proprietà viscoelastiche in

seguito all'applicazione di diverse sollecitazioni. I regimi in cui possono essere condotti i test sono di due tipi:

• Flusso (rotazione continua), si effettuano sui fluidi per indagare la variazione della viscosità del materiale, modulando il moto rotatorio della geometria alla temperatura desiderata. La viscosità viene ricavata attraverso l'equazione costitutiva riportata nella Figura 29, in cui le variabili da cui dipende: sono la coppia applicata M (Nm), la costante geometrica  $K_{\sigma}$  (2/πr<sup>3</sup>), dove r è il raggio della geometria, la velocità angolare  $\Omega$  del motore (rad/s) e la costante geometrica  $K_{\gamma}$  (r/h), dove r è il raggio della geometria e h è lo spazio tra la geometria e la piastra di caricamento del campione.

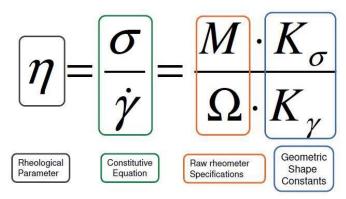


Figura 30 - Equazione della viscosità espressa dalle specifiche del reometro e dalle costanti di forma geometrica.

• Oscillatorio, applicabile sia su campioni fluidi che solidi, per monitorare la variazione delle proprietà viscoelastiche del materiale a diverse condizioni di stress e temperature predefinite. In questo caso, la geometria applica una sollecitazione oscillatoria dipendente dall'ampiezza e dalla frequenza selezionate, per misurare il modulo complesso del materiale (G\*, Pa) descritto dal modulo elastico (G', Pa) e da quello viscoso (G", Pa). Il modulo viscoelastico G\* risultante del materiale viene misurato considerando l'equazione costitutiva riportata in Figura 30 ed in funzione: della coppia applicata M (Nm), della costante geometrica K<sub>σ</sub> (2/πr³), dove r è il raggio della geometria, della deformazione angolare del motore θ (rad) e della costante geometrica K<sub>γ</sub> (r/h), dove r è il raggio della geometria e h è lo spazio tra la geometria e la piastra di caricamento del campione.

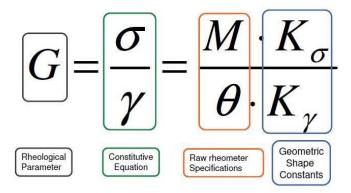


Figura 31 - Equazione del modulo viscoelastico espresso dalle specifiche del reometro e dalle costanti di forma geometrica.

Tutti i test reologici sono stati eseguiti utilizzando un reometro rotazionale a sollecitazione controllata DHR-2 (TA Instruments, Waters), dotato di una geometria a piastra parallela con diametro di 20 mm e un sistema di piastre Peltier, per controllare costantemente la temperatura del sistema (Figura 31)



Figura 32 - Reometro DHR-2 (TA Instruments, Waters).

#### 3.2.1.1 Analisi della viscosità

Sono state effettuate delle prove in regime di flusso sulla sospensione, variando le sollecitazioni di taglio applicate ai campioni di materiale a 10 °C. Ogni test è stato eseguito tre volte, impostando lo spazio tra la geometria e la piastra di caricamento del campione di un valore compreso tra 400 µm e 1500 µm, a seconda del volume del campione.

Sono stati eseguiti dei test applicando uno sforzo di taglio costante definiti come "Peak Hold tests" con l'obiettivo di:

Simulare il processo di stampa e studiare il recupero a seguito di sforzi di taglio (shear recovery) del materiale. Sono stati impostati un valore di sollecitazione di taglio di 1000 s<sup>-1</sup> (100 s) e 0.1 s<sup>-1</sup> (300 s) per riprodurre rispettivamente la fase di estrusione e la fase di deposizione.

2. Mimare la condizione statica in cui si trova la sospensione all'interno della cartuccia di stampa, analizzando la variazione della viscosità del materiale in funzione di una velocità di taglio bassa (0.01 s<sup>-1</sup>) per 2 ore a temperatura costante. Il fine è stato ottenere una stima del tempo impiegabile nel processo di stampa, senza avere variazioni dello stato della sospensione.

Di seguito è riportata la tabella con i test e i materiali caratterizzati.

Tabella 5 - Riassunto dei test di flusso effettuati sui sistemi ibridi a base di collagene.

TEST	MATERIALE (sospensione)	PARAMETRO ANALIZZATO
PEAK HOLD	Coll/MBG/nanoHA	Viscosità
	GEN-Coll/MBG/nanoHA	Shear recovery

# 3.2.1.2. Analisi delle proprietà viscoelastiche delle formulazioni ibride prima e dopo la reticolazione chimica

Le proprietà viscoelastiche del sistema sviluppato sono state investigate mediante prove in regime oscillatorio, monitorando il valore e la variazione dei moduli G ' e G'' in condizioni diverse di stress e temperatura. Le prove sono state eseguite tre volte, impostando lo spazio tra la geometria e la piastra di caricamento del campione di un valore compreso tra 400 µm e 1500 µm, a seconda del volume o spessore specifico del campione caricato. L'analisi sulle sospensioni viene effettuata per ottenere informazioni sul limite di scorrimento a seguito di uno stress applicato e per avere un confronto sui valori di stress da imprimere per far fluire il materiale, mentre dai test effettuati sui campioni bulk delle strutture biocomposite, ottenute a seguito dei fenomeni di reticolazione, è possibile ricavare dei dati sperimentali utili a comprende gli effetti della reticolazione chimica del collagene.

Per ricavare informazioni aggiuntive a quelle ricavate dai test in regime di flusso, le sospensioni ibride sono state analizzate attraverso un test di "*Amplitude Sweep*", che permette di ricavare attraverso il monitoraggio di G' e G'' il limite di scorrimento. Le sospensioni ibride sono state mantenute ad una temperatura costante di 10 °C in cui è stato variato lo stress applicato tra 0.1 e 100 Pa ad una frequenza costante di 1 Hz.

Sono state valutate le proprietà viscoelastiche a seguito dei fenomeni di reticolazione del collagene, dei costrutti finali osservando:

• La zona viscoelastica lineare, attraverso un test di "Amplitude Sweep", in cui i campioni sono stati mantenuti ad una temperatura di 37 °C ed è stato variato lo stress di oscillazione in un intervallo tra 0.01-10 %, ad una frequenza costante di 1Hz.

- La rigidezza finale in funzione del tempo a temperatura costante mediante il test di "Time Sweep", in cui è stata applicata una deformazione costante dello 0.5% e una frequenza di 1 Hz per 10 minuti
- La temperatura di denaturazione, applicando delle Rampe di temperatura (Temperature Ramp tests) in un intervallo compreso tra 25 °C e 80 °C, con velocità di rampa di 10 °C /min, in cui è stata impostata una deformazione costante dell'1%, una frequenza costante di 1 Hz.

Di seguito è riportata la tabella che riassume i test effettuati

Tabella 6 - Riassunto dei test in oscillazione effettuati sui campioni ibridi a base di collagene.

TIPO DI TEST	MATERIALE	PROPRIETÀ ANALIZZATE
AMPLITUDE SWEEP (10 °C)	Coll/MBG/nanoHA GEN- Coll/MBG/nanoHA	Limite di scorrimento (G', G'')
AMPLITUDE SWEEP (37 °C)	Coll/MBG/nanoHA GEN-Coll/MBG/nanoHA GEN-Coll/MBG/nanoHA +GEN	Rigidezza del materiale (G', G''); Zona viscoelastica lineare
TIME SWEEP (10 Minuti)	Coll/MBG/nanoHA GEN-Coll/MBG/nanoHA GEN-Coll/MBG/nanoHA +GEN	Rigidezza del materiale (G', G'')
TEMPERATURE RAMP (25-80 °C)	Coll/MBG/nanoHA GEN-Coll/MBG/nanoHA GEN-Coll/MBG/nanoHA +GEN	Temperature di denaturazione, in cui avviene la transizione da stato solido a liquido (G', G'')

#### 3.2.1.3. Analisi delle proprietà reologiche del bagno di supporto alla stampa.

Per supportare la deposizione del materiale sviluppato durante il processo di stampa, sono stati realizzati dei materiali di supporto, di cui sono state valutate le proprietà viscoelastiche. Sono stati eseguiti diversi test discriminando il tipo di reticolante più adatto e le concentrazioni di acido alginico sodato e reticolante ideali per ottenere un materiale atto a supportare la fase di stampa. Le analisi al reometro hanno permesso di discriminare, attraverso lo studio delle proprietà viscoelastiche, i gel con rigidezza tale da poter essere processati. Successivamente, scelti i gel adatti ad essere processati, sono stati frullati, e gli slurry ottenuti sono stati confrontati in termini di proprietà reologiche, permettendo di ricavare informazioni sul loro comportamento in seguito all'applicazione di stress, come ad esempio il passaggio dell'ago della stampante al loro interno.

I test sono stati condotti in regime oscillatorio, monitorando le proprietà viscoelastiche in funzione di G' e G'' ad una temperatura costante di 20 °C per valutare:

- La rigidezza dei gel ottenuti in funzione del tempo, con il test di "*Time sweep*" per una durata di 300 secondi, in cui è stato applicato uno stress dello 0.5% ed una frequenza di 1 Hz.
- La zona viscoelastica lineare degli slurry, con un test di "*Amplitude Sweep*" in un intervallo di stress dallo 0.01 al 10 % ed applicando una frequenza di 1Hz.

Infine, per entrambi i materiali sono stati effettuati dei test di" *Temperature Ramp*" tra 15 °C e 30 °C, in cui sono stati valutati i cambiamenti dei moduli G' e G' in funzione dalla temperatura, mantenendo costante lo stress allo 0.5% e la frequenza di 1 Hz. Di seguito è riportata la tabella con i test effettuati.

Tabella 7 - Riassunto dei test in oscillazione effettuati sul bagno di estrusione.

TEST	MATERIALE (ALGINATO)	PROPRIETÀ ANALIZZATE
TIME SWEEP (300 secondi)	GEL	Rigidezza del materiale (G', G'')
AMPLITUDE SWEEP (20 °C)	SLURRY	Zona viscoelastica lineare (G', G'')
TEMPERATURE RAMP (15-30 °C)	GEL SLURRY	Temperature di denaturazione in cui avviene la transizione da stato solido a liquido (G', G'')

# 3.2.2. Analisi morfologiche

# 3.2.2.1. Analisi al microscopio a scansione elettronica (SEM) e al microscopio a scansione elettronica ed emissione di campo (FESEM)

In questo studio sono stati analizzati gli scaffold stampati, per investigare attraverso delle analisi non distruttive le caratteristiche morfologiche dei campioni. L'obiettivo è osservare la dispersione della fase inorganica all'interno della matrice di collagene. Essendo campioni non conduttivi, prima di essere analizzati, sono stati congelati a -20 °C e liofilizzati per 24 ore, utilizzando un liofilizzatore Lyovapor L-200 (Büchi, Svizzera) sottovuoto (< 0,1 mbar). Successivamente, sono stati metallizzati con uno strato di 7 nm di platino, utilizzando una macchina Cressington Sputter Coated 180 al fine di ridurre il potenziale di superficie e migliorando la risoluzione delle immagini.

È stato utilizzato il Microscopio a Scansione Elettronica SEM Phenom XL (Phenom-World B.V., Paesi Bassi), in cui è stato applicato un alto vuoto 1 Pa, ottenuto grazie all'azione combinata di una pompa relativa più una turbo pompa, in quanto l'aria impedirebbe la produzione del fascio a causa della bassa energia degli elettroni. Gli elettroni, generati da una sorgente e focalizzati sulla superficie da osservare, interagiscono con il campione originando una serie di segnali per ogni punto colpito. Questi segnali vengono raccolti e rielaborati, e la loro intensità viene utilizzata per produrre un'immagine ingrandita del campione, visibile sul monitor. Attraverso opportuni campi magnetici, il

fascio elettronico può essere indirizzato su un punto qualunque della superficie del campione, analizzando la porzione di area desiderata. La risoluzione ottenibile dipende dai parametri impostati a livello di tensione di accelerazione, dimensione del fascio e distanza di lavoro [88], in generale non supera 5 nm, non permettendo di apprezzare le particelle più piccole all'interno della matrice organica.

Per questo motivo è stato affiancato l'utilizzo del Microscopio a Scansione Elettronica ed Emissione di Campo (FESEM) poter osservare maggiormente la ricostituzione delle fibre di collagene, insieme alla dispersione degli MBG e della nanoHA nella matrice. Grazie a questo strumento è possibile ottenere ingrandimenti da 10x fino a 300,00x, con profondità di campo illimitata, inoltre rispetto al SEM, produce immagini più pulite e meno distorte con una risoluzione spaziale fino a 1 nm, da tre a sei volte migliore [89].

### 3.2.2.3 Analisi con la microtomografia computerizzata (microCT)

Per apprezzare maggiormente le proprietà topografiche e morfologiche degli scaffold 3D realizzati, è stata effettuata una ricostruzione tridimensionale tramite microtomografia computerizzata (microCT). Come descritto precedentemente, i campioni sono stati congelati e liofilizzati, prima di essere analizzati.

La tomografia computerizzata (CT) è uno strumento non invasivo di diagnostica che fornisce una ricostruzione tridimensionale degli organi interni. La CT offre un buon contrasto tra ossa e tessuto molle, e per questo motivo è molto utilizzato come strumento di ricerca per il tessuto osseo. I campioni possono essere sottoposti ad imaging con dimensioni di pixel fino a 100 nm e gli oggetti possono essere scansionati fino a 200 mm di diametro [80].

Gli scanner microCT acquisiscono una serie di immagini radiografiche planari 2D e ricostruiscono i dati in sezioni trasversali 2D, che possono essere ulteriormente elaborate in modelli 3D e persino stampate come oggetti fisici per effettuare delle analisi. Con i sistemi di microCT è possibile ottenere una vista interna dell'oggetto e rivelarne le caratteristiche, fornendo informazioni volumetriche sulla microstruttura, in modo non distruttivo. Lo strumento è composto da una sorgente emettente radiazioni X, che vengono trasmessi dal campione e registrati dal rilevatore di raggi X come immagine di proiezione 2D. Il campione viene quindi ruotato di una frazione di grado sulla fase di rotazione e viene acquisita un'altra immagine di proiezione ai raggi X. Questo passaggio viene ripetuto attraverso una rotazione di 180° (o di 360°), ottenendo una serie di immagini che possono essere calcolate in sezioni trasversali attraverso il processo di calcolo chiamato "ricostruzione". Queste sezioni possono essere analizzate ed ulteriormente elaborate in modelli 3D, trasformate in filmati, stampate in oggetti fisici 3D e altro ancora [80] (Figura 31).

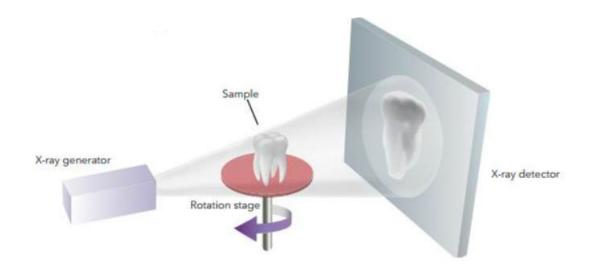


Figura 31 - Schema di funzionamento della microCT.

I test sono stati eseguiti su due campioni di scaffold con geometria Honeycomb, rispettivamente di spessore 0.3 mm e 3 mm, senza l'utilizzo di filtri (50 kV e  $200 \text{ }\mu\text{A}$ ), con una risoluzione di  $6 \text{ }\mu\text{m}$  ed uno step di rotazione di  $0.2^{\circ}$ . I limiti di intensità utilizzati sono stati 0-0.2 per lo scaffold con spessore da 0.3 mm e 0-0.67 per quello con spessore da 3 mm.

Le immagini sono state ricostruite tramite NRecon che permette di ottenere tutte le diverse sezioni registrate in scale di grigi. Successivamente attraverso i programmi di DataViwer, CTVox e CTtan le immagini sono state corrette da eventuali errori di scansione e ricostruite per avere un modello 3D.

# 3.2.3. Test di degradazione enzimatica ed idrolitica

I test di biodegradazione sono stati effettuati sui campioni bulk da 400 μL, realizzati come descritto nel paragrafo 3.1.7, per osservare l'influenza della reticolazione chimica del collagene da parte della genipina, sui processi di degradazione. Per lo studio di degradazione enzimatica è stata utilizzata collagenasi del Clostridium histolyticum (tipo I, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Ogni campione è stato immerso in 1 mL di DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Media, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) contenente 1 mg di collagenasi (2.1 unità) e successivamente incubato a 37 °C, sotto lieve agitazione (50 rpm). A diversi intervalli di tempo predefiniti (12 ore, 24 ore, 48 ore) i campioni sono stati raccolti, lavati in acqua distillata ed infine congelati.

Per l'analisi di degradazione idrolitica i campioni sono stati immersi in 3 mL di D-PBS, a 37 °C, sotto lieve agitazione (50 rpm), raccolti a diversi intervalli di tempo predefiniti (24 ore, 72 ore, 7 giorni e 14 giorni) e dopo congelati.

I campioni ottenuti dall'analisi, sono stati poi liofilizzati e accuratamente misurati per registrare le variazioni di peso. La perdita di peso è stata valutata utilizzando la seguente formula:

$$W = [(W_0 - W_d)/W_0] \times 100$$

dove  $W_0$  rappresenta la massa iniziale del campione,  $W_d$  rappresenta la massa dopo la degradazione e W è la percentuale di perdita risultante. Sono stati presi in considerazione tre campioni per ogni intervallo di tempo e i risultati sono stati come media  $\pm$  deviazione standard.

### 3.2.4. Test di rilascio degli ioni Stronzio

È stata analizzata la cinetica di rilascio ionico dei campioni compositi realizzati con la formulazione GEN-Coll/MBG/nanoHA e confrontando i risultati con quelli realizzati dopo il trattamento di post reticolazione GEN-Coll/MBG/nanoHA + GEN. I campioni bulk da 400 μL realizzati, come descritto nel paragrafo 3.1.7, sono stati immersi in 3 mL di (Tris (idrossimetil)amminometano (Trizma) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 0.1 M, pH 7.4), (Tris HCl). Quest'ultimo è stato completamente rinfrescato ad ogni time point, in cui è stato raccolto il surnatante (dopo 3 ore 10 ore, 24 ore, 3 giorni e 7 giorni,) ed è stato analizzato dal plasma accoppiato induttivamente con la tecnica di spettrometria ad emissione atomica (ICP-AES) (Thermo Scientific, Massachusetts, USA, ICP-MS, ICAP Q), dopo una corretta diluizione in ddH<sub>2</sub>O (1:5). La percentuale di ioni liberati è stata calcolata considerando la quantità di stronzio inizialmente incorporata nelle particelle MBG ed equivalente al 4% molare, così come il contenuto della fase inorganica incorporata nel sistema ibrido. Per calcolare la percentuale finale degli ioni rilasciati i campioni sono stati precedentemente sciolti in una soluzione di acido cloridrico e successivamente analizzati, tramite PIC. Le analisi sono state condotte in triplice copia e le percentuali di ioni rilasciati sono riportate come valore ± deviazione standard.

# 3.2.5. Test biologici

#### 3.2.5.1. Preparazione campioni

Per la realizzazione dei test biologici *in vitro*, sono stati stampati 48 scaffold 5x5x1 mm con geometria alveolare (Honeycomb), utilizzando la sospensione GEN-Coll/MBG/nanoHA, in cui in metà dei campioni prodotti (24 in totale) è stato eseguito un trattamento di reticolazione con 0.5% Gen/EtOH. Le strutture sono state stampate ed inviate in piatti well da 12 immerse in PBS (Figura 32).

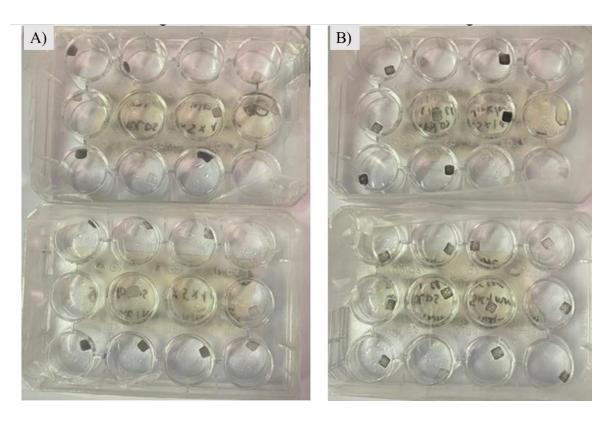


Figura 32 - Campioni per test biologici a base di (A) GEN-Coll/MBG/nanoHA (B) GEN-Coll/MBG/nanoHA +GEN.

#### 3.2.5.2. Cultura cellulare

Sono state utilizzate cellule di osteosarcoma umano MG-63 (ATCC, CRL-1427), mantenute in Dulbecco Modified Eagle's Medium (H-DMEM, Corning Inc., D6429), 1% di penicillina-streptomicina (Thermo Fisher Scientific, 15140122) e 10% di FBS (Corning Inc., 35-079-CV), rinfrescato ogni 3 giorni, dopo incubate a 37 °C in ambiente umidificato (95% di aria e 5% di CO<sub>2</sub>). Per il passaggio delle cellule è stata utilizzata tripsina / EDTA (tripsina 0.05% - EDTA 0.02% in PBS, Sigma-Aldrich, USAT4174).

#### 3.2.5.3. Sterilizzazione e condizionamento

I campioni sono stati sterilizzati con EtOH al 70% per 30 min, lavati tre volte con PBS e irradiati con UV per 30 min su ciascun lato. Dopo la sterilizzazione, i campioni sono stati pre-condizionati per 3 ore con DMEM ad alto glucosio, con 10% di FBS e 1% di penicillina/streptomicina.

#### 3.2.5.4. Semina delle cellule MG63 per valutare la citotossicità

Per la valutazione della citotossicità, le MG63 sono state seminate ad una densità di  $0.02 \times 10^6$ /pozzetto in una piastra di 96 pozzetti. Dopo 24 ore dalla semina, il terreno è stato sostituito con un mezzo condizionato, con biomateriale o le sue diluizioni 1: 2 e 1: 5. Il mezzo fresco è stato utilizzato come controllo. Il dosaggio XTT è stato eseguito a 24 e 72 ore dopo il cambio del mezzo. Le MG63

metabolicamente attive sono state analizzate tramite XTT (Roche, 11465015001) secondo le istruzioni del produttore. In breve, la miscela di etichettatura XTT è stata aggiunta al terreno in ciascun pozzetto, con rapporto 1:2 e incubata a 37 °C, 95% di umidità per 4 ore. Quindi, l'assorbanza è stata quantificata mediante spettrofotometria (MultiskanGo, Thermo Scientific), monitorando l'assorbanza a 555 nm, con lunghezza d'onda di riferimento a 655 nm.

#### 3.2.5.5. Semina delle cellule MG63 sui biomateriali

Sono stati eseguiti test biologici su biomateriali pre-condizionati. Le cellule MG63 all' 80% della confluenza sono state staccate, come descritto in precedenza per il passaggio e sono state seminate ad una densità di  $0.02 \times 10^6$ /campione. Le cellule piastrate sul fondo dei pozzetti di polistirene di coltura tissutale (TCP), sono state utilizzate come controlli. Le piastre sono state incubate a 37 °C e 5% di CO<sub>2</sub>. La vitalità delle MG63 è stata valutata mediante dosaggio XTT a 24 ore e 72 ore, come descritto precedentemente.

#### 3.2.5.6. Analisi al SEM

La morfologia cellulare è stata analizzata al SEM dopo 72 ore e 7 giorni. I materiali seminati con le cellule sono stati fissati in glutaraldeide al 2% (MERCK, 4239) in tampone cacodilato di sodio 0.1 M (Sigma, C-0250), seguiti da lavaggi in saccarosio al 7% in tampone cacodilato 0.1 M e post-fissazione in tetrossido di osmio all'1% (Scienze di microscopia elettronica, 12310) in tampone cacodilato di sodio 0.1 M. La disidratazione completa è stata ottenuta in serie di alcol graduati (25, 50, 70, 80, 95 e 100%), seguite da Critical Point Dry eseguito con esametildisilano (HMDS, Sigma Aldrich, 440191). I campioni sono stati montati su tronchetti di alluminio, metallizzati con oro tramite Edwards Sputter Coater B150S ed osservati con un microscopio Philips XL 20 SEM (FEI Italia SRL).

#### 3.2.5.7. Analisi istologiche

Dopo 7 giorni, i campioni sono stati fissati in paraformaldeide al 4% in PBS per 30 minuti a 4 °C e lavati tre volte con PBS 1X. È stata utilizzata una scala graduata di alcoli dal 50% al 100% di xilene, per disidratare i campioni prima dell'incubazione notturna in paraffina a 56 °C. Prima dell'inclusione, sono state eseguite due incubazioni in paraffina, attraverso l'incorporazione dei campioni nella paraffina formando un angolo di 45 °C con la superficie dello stampo, per ottenere una superficie più ampia nel taglio. Sono stati tagliati strati da 5 μm e colorati con ematossilina ed eosina.

# 4. Risultati e discussione

In questo studio sono state realizzate delle strategie per la stampa 3D di formulazioni ibride a base di collagene, al fine di ottenere scaffold ossei. Il collagene di tipo I e l'idrossiapatite rappresentano rispettivamente la principale fase organica e inorganica del tessuto osseo, mentre i vetri bioattivi mesoporosi contenenti stronzio sono ben noti per le loro elevate capacità bioattive e pro-osteogeniche. Con l'obiettivo di incrementare la rigidezza finale delle strutture 3D stampate, rendendole maggiormente stabili, è stata aggiunta la genipina allo 0.1 wt% direttamente alla formulazione ibrida a base di collagene di tipo I, vetri bioattivi mesoporosi contenenti stronzio (MBG\_Sr4%) e nanoparticelle di idrossiapatite (nanoHA). A seguito della transizione sol-gel in cui avviene l'autoassemblamento delle molecole di collagene, l'aggiunta della genipina permette la formazione di legami covalenti tra le catene polimeriche, attraverso una reticolazione chimica del collagene *in situ*. Successivamente, i costrutti ottenuti sono stati sottoposti ad un ulteriore trattamento di reticolazione, incubandoli a 37 °C per 24 ore in una soluzione 0.5 wt% di genipina/etanolo. Questi trattamenti di reticolazione chimica sono state due strategie sviluppate, atte a migliorare la stabilità degli scaffold finali realizzati con la stampante 3D ad estrusione.

Invece, per i processi di Bioprinting è stato sviluppato ed ottimizzato un bagno di supporto alla fase di estrusione a base di slurry di alginato, sospensione di origine naturale ottenuta dal processamento di un iniziale blocco di gel, dato dall'interazione chimica tra acido alginico sodato e ioni calcio. I protocolli che sono stati utilizzati derivano da quelli della tecnica "freeform reversible embedding suspended hydrogel" (FRESH) con cui è stato realizzato un bagno sacrificale a base di slurry di gelatina, in grado di supportare una buona deposizione dei filamenti durante i processi di estrusione e ottenere una buona fedeltà di stampa finale. Studi precedenti realizzati da questo gruppo di ricerca, hanno dimostrato che a causa della sua natura chimica, la gelatina è soggetta alla reticolazione chimica da parte della genipina; di conseguenza è nata la necessità di sviluppare un altro bagno sacrificale con caratteristiche viscoelastiche simili.

In questo capitolo si presenteranno i risultati scaturiti dall'analisi al reometro delle proprietà viscoelastiche della formulazione composita contenente genipina, prima e dopo la transizione sol-gel del collagene, per ottenere informazioni sull'azione del reticolante chimico al suo interno. Inoltre, i costrutti così ottenuti verranno confrontati con le strutture finali a cui è stato effettuato il trattamento di post reticolazione con la soluzione di genipina/etanolo, permettendo di attuare dei miglioramenti delle proprietà viscoelastiche finali. L' azione della genipina nei due costrutti, sarà discussa e presentata anche a seguito dei test di degradazione, idrolitica ed enzimatica, e di rilascio degli ioni stronzio.

In seguito, verranno descritti i protocolli ed i passaggi utilizzati al fine di ottenere il bagno a base di alginato, in grado di supportare il processo di estrusione di stampa 3D e di garantire una miglior risoluzione finale del campione ottenuto. Sulla base dei protocolli della tecnica FRESH, precedentemente utilizzati per ottenere lo slurry di gelatina, si è cercato di realizzarne uno a base di alginato con proprietà viscoelastiche simili. Nel dettaglio verranno discussi i vari procedimenti che sono stati eseguiti e che hanno portato alla scelta del tipo di reticolante, alla concentrazione in peso dei materiali e alle tecniche di gelificazione utilizzate, presentando i risultati scaturiti dalle analisi al reometro delle proprietà viscoelastiche dei campioni realizzati.

Successivamente si tratterà del processo di stampa per realizzare gli scaffold 3D, utilizzando come inchiostro, la formulazione ibrida a base di collagene, MBG\_Sr4%, nanoHA e genipina, e lo slurry di alginato come bagno di supporto sacrificale al processo di estrusione. Sono state testate diverse geometrie con diversi riempimenti di strato e porosità, al fine di ottenere dei parametri di pressione e velocità di stampa atti a realizzare degli scaffold con una buona accuratezza geometrica, di cui saranno presentati i migliori ottenuti.

Successivamente verranno descritti i passaggi per rimuovere il bagno di alginato dagli scaffold, utilizzando una soluzione a base di enzima, e saranno riportati i risultati così ottenuti. In seguito, ci sarà la trattazione delle analisi morfologiche non distruttive realizzate sulla superficie dei campioni stampati, attraverso il Microscopio a Scansione Elettronica (SEM) e il Microscopio a Scansione Elettronica ed Emissione di Campo (FE-SEM), in cui verranno presentate ed analizzate le immagini ricavate. Inoltre, è stata condotta un'analisi con la microtomografia computerizzata (microCT) su due scaffold possedenti la stessa geometria di base ma differenti altezze, per ricostruire le loro strutture tramite una serie di software, evidenziando i diversi componenti presenti e permettendo la visualizzazione della geometria finale su diversi angoli, a completare così l'analisi di microscopia.

Infine, essendoci ancora dei risultati poco concordi sulla quantità limite di genipina utilizzabile per non risultare citotossica, sono stati condotti dei test in vitro sugli scaffold, con reticolazione del collagene *in-situ* e su quelli a cui è stata aggiunta la fase di post reticolazione, per studiarne la biocompatibilità. I dati ricavati saranno discussi e confrontati in relazione alla risposta della linea cellulare MG63 scaturita dopo un'incubazione di 7 giorni sui campioni realizzati.

### 4.1. Caratterizzazione delle proprietà reologiche dei materiali

Le proprietà reologiche di un materiale sono considerate importanti fattori fisico-chimici che influenzano la stampabilità del materiale, le analisi al reometro permettono di ottenere informazioni sul comportamento del materiali in risposta all'applicazione di diverse sollecitazioni e deformazioni, utili nella fase di impostazione dei parametri di stampa [71].

In questo lavoro, per ottenere informazioni sulla stampabilità del materiale, sono state condotte delle analisi al reometro, in regime di flusso ed oscillazione. Inizialmente, sono state analizzate e confrontate le proprietà viscoelastiche tra la sospensione iniziale, a base di collagene, MBG\_Sr4% e nanoHA e la medesima a cui è stata aggiunta la genipina allo 0.1 wt% per ottenere la reticolazione chimica *in-situ* del collagene (GEN- Coll/MBG/nanoHA). Entrambe le formulazioni hanno un comportamento pseudoplastico in cui, a seguito dell'applicazione di uno stress crescente, le catene polimeriche si orientano, permettendo un migliore scorrimento ed una conseguente diminuzione della viscosità [71].

Per ricavare il limite di scorrimento (Yield stress), ossia il valore di stress che bisogna applicare affinché la sospensione fluisca, è stato effettuato un "*Amplitude test*", condotto in regime oscillatorio. Con questo test viene valutato il valore di Yield stress in funzione del modulo complesso G\*, espresso attraverso la sua componente elastica G', che definisce l'energia immagazzinata elasticamente durante la deformazione, e la sua componente viscosa G'', che misura l'energia dissipata in funzione del flusso viscoso. Le analisi sono state condotte su entrambe le sospensioni: Coll/MBG/nanoHA e GEN-Coll/MBG/nanoHA (Figura 34 A-B), osservando i loro comportamento viscoelastico in funzione dello stress applicato.

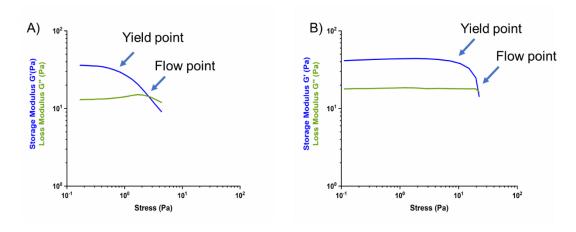


Figura 33 - Analisi delle proprietà viscoelastiche delle sospensioni (A) Coll/MBG/nanoHA (B) GEN- Coll/MBG/nanoHA a 10 °C. identificazione dei punti di scorrimento e di flusso in funzione dei valori di G' e G''.

Il comportamento viscoelastico dei materiali, viene descritto tramite i moduli G' e G'', che sono strettamente correlati al numero, al tipo di legami e reticoli presenti nel materiale [71], [72]. Nella Figura 34 sono indicati il limite di scorrimento (Yield point), come limite dell'intervallo viscoelastico lineare, ed il punto di flusso (Flow point). In particolare, il punto di scorrimento indica che il materiale sta subendo una deformazione coincidente con il diminuire di G', mentre il punto di flusso si verifica quando il materiale mostra un comportamento simil liquido, ossia quando il valore della componente viscosa G" è maggiore di quella elastica G'. Dalla Figura 34B si può osservare che entrambe le sospensioni possedevano un comportamento maggiormente elastico per tutti i valori di stress applicato, con prevalenza del modulo G' rispetto G". La differenza riscontrata è che mentre la sospensione Coll/MBG/nanoHA presentava un valore di Yield point intorno ai 4.35 Pa, quella contenente genipina presentava un limite di scorrimento a circa 10 Pa. Invece i valori di stress in cui le formulazioni fluiscono erano simili, rispettivamente 14.20 Pa per Coll/MBG/nanoHA e 16.26 Pa per GEN- Coll/MBG/nanoHA. Questi dati sono evidenziati nella Tabella 8, in cui sono stati riportati i valori del modulo elastico e viscoso, oltre i valori di Yield stress e Flow point. Nella pratica, consegue nella necessità di imprimere un valore di stress leggermente superiore per far fluire il materiale con all'interno il reticolante, attraverso il parametro della pressione di estrusione. Questi dati sono risultati in accordo con gli studi di letteratura, in cui è possibile che la presenza della genipina e delle particelle della fase inorganica influenzino la viscosità del collagene, che è proporzionale al del limite di scorrimento della sospensione [34], [43], [54].

Tabella 8 - Valori ottenuti tramite Amplitude Sweep a 10 °C delle sospensioni ibride a base di collagene.

SOSPENSIONE	Max G' (Pa)	Max G'' (Pa)	Yield Stress (Pa)	Flow Point (Pa)
Coll/MBG/nanoHA	36.24	13.00	4.35	14.20
GEN- Coll/MBG/nanoHA	41.34	17.34	10.62	16.26

In seguito, è stata valutata la stabilità delle sospensioni tramite un test in regime di flusso a stress costante, definito come di "*Peak Hold* test". In particolare, è stata misurata la variazione della viscosità del materiale in funzione di una velocità di taglio bassa (0.01 s<sup>-1</sup>) per una durata di 2 ore a temperatura costante, confrontando il comportamento della sospensione di partenza con quella contenente genipina, come riportato in Figura 35. Questi parametri sono stati scelti per cercare di mimare la condizione statica in cui si trova la sospensione all'interno della cartuccia in fase di stampa, ed ottenere una stima del tempo impiegabile nel processo di stampa, prima che il materiale subisca variazioni viscoelastiche, provocate dalla reticolazione.

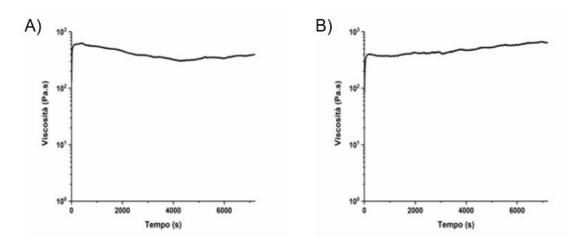


Figura 34 - Andamento della viscosità in funzione del tempo (A) di Coll/MBG/nanoHA (B) GEN- Coll/MBG/nanoHA.

Come riportato nella Figura 35 e nella Tabella 9, la sospensione Coll/MBG/nanoHA presentava un andamento della viscosità pressoché costante per circa 2 ore, mentre la formulazione GEN-Coll/MBG/nanoHA mostrava un lieve aumento della viscosità verso la fine del tempo di osservazione. Questo risultato ha indicato la presenza di un iniziale reticolazione da parte della genipina sulle molecole di collagene, senza però impattare sul processo di stampa, in quanto per le 2 ore del tempo di osservazione, non si è ottenuto una variazione eccessiva della viscosità [34], [83]. Come riportato nella Tabella 9, i dati ottenuti hanno suggerito che se si utilizza la sospensione con la genipina al suo interno, i processi di stampa non dovrebbero superare le due ore, per evitare la variazione delle proprietà viscoelastiche del collagene e conseguenti complicanze durante l'estrusione.

Tabella 9 - Valori della viscosità ottenuti tramite il test di Peak Hold per 2 ore.

SOSPENSIONE	Viscosità a t=0 (Pa.s)	Viscosità a t=2 ore (Pa.s)
Coll/MBG/nanoHA	210	397
GEN- Coll/MBG/nanoHA	214	645

Come discusso precedentemente, bassi valori di viscosità e quindi bassi limiti di scorrimento non garantiscono un'elevata fedeltà di stampa. Un altro fattore che influenza la fedeltà di stampa finale è la capacità del materiale di riacquistare le proprietà viscoelastiche iniziali, dopo essere stato sottoposto ad elevati stress (shear recovery) [71], [72]. A tale scopo è stato effettuato un test di "Peak hold" (Figura 36) per monitorare il comportamento delle sospensioni durante il processo di stampa, dove il materiale è sottoposto ad elevate velocità di taglio durante la fase di estrusione, mentre una volta deposto il filamento, le velocità di taglio sono nulli.

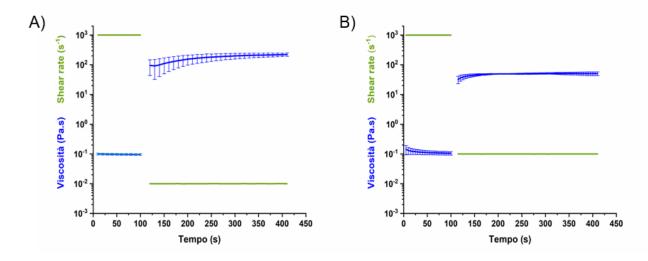


Figura 35 - Peak hold test eseguiti sulle formulazioni ibride (A) GEN-Coll/MBG/nanoHA (B) Coll/MBG/nanoHA.

Come mostrato nella Figura 36 e riassunto nella Tabella 10, la viscosità dei sistemi testati assumeva valori molto bassi di circa 0.1 Pa.s, a seguito dell'applicazione di una velocità di taglio costante di  $1000 \, \mathrm{s}^{-1}$ . Quando è stato applicato uno stress di taglio molto basso (0.1  $\mathrm{s}^{-1}$ ), la viscosità è aumenta raggiungendo valori di plateau di circa 50 Pa.s, per la sospensione Coll/MBG/nanoHA, e 200 Pa.s per quella con GEN-Coll/MBG/nanoHA, mostrando il recupero della struttura molecolare del materiale [83]. Tuttavia, dopo 300 secondi in condizioni di bassa velocità di taglio, nessuna delle due sospensioni ha recuperato i valori di viscosità ottenuti in condizioni statiche rispettivamente di 210 Pa.s e 335 Pa.s, evidenziando che nonostante la presenza di una fase inorganica e di un reticolante chimico, questi non abbiano influenzato lo shear recovery della sospensione. Inoltre, il valore della viscosità ottenuto è basso per garantire una buona fedeltà di stampa, senza che il sistema stampato collassi. Di conseguenza, è risultato necessario attuare ulteriori strategie per migliorare la stabilità dei filamenti depositati per garantire una miglior fedeltà di stampa [71].

Riassumendo, la sospensione a base di genipina ha mostrato un comportamento viscoelastico tale da permettere la sua estrusione attraverso gli aghi della stampante 3D, ma a causa della sua scarsa viscosità non ha garantito una sufficiente rigidezza alla struttura appena stampata; quindi, è diventato necessario l'utilizzo di un bagno di supporto sacrificale durante il processo di stampa, per ottenere una miglior stabilità delle strutture estruse.

Tabella 10 – Valori di viscosità ottenuti dal test di Peak Hold.

SOSPENSIONE	Viscosità a 100 secondi (Pa.s)	Viscosità a 300 secondi (Pa.s)
Coll/MBG/nanoHA	0.14	50
GEN-Coll/MBG/nanoHA	0.10	222

A seguito della valutazione della viscosità delle sospensioni con e senza genipina, si è passati ad investigare le proprietà reologiche dei sistemi dopo 24 ore, una volta avvenuta la transizione sol-gel del collagene. Infatti, questo polimero in condizioni fisiologiche (T=37 °C e pH=7.4) è in grado di riassemblare le sue molecole, reticolando fisicamente, inoltre la presenza della genipina permette un ulteriore reticolazione chimica con l'instaurarsi di legami covalenti tra le catene polimeriche. In aggiunta, sono stati analizzati anche le strutture a base della formulazione ibrida contenete genipina, che sono state incubate per 24 ore ad con la soluzione di genipina/etanolo: GEN-Coll/MBG/nanoHA+GEN, ottenendo un'ulteriore reticolazione.

I risultati ricavati dai tre costrutti sono stati confrontati, per studiare l'azione della genipina sul collagene nel processo di *in-situ* crosslinking e nel caso dell'ulteriore trattamento di postreticolazione sul materiale già ricostituito.

È stato inizialmente eseguito un test in regime oscillatorio, definito "*Time Sweep*" (Figura 37), in cui sono state valutate le proprietà viscoelastiche nel tempo, in condizioni statiche.

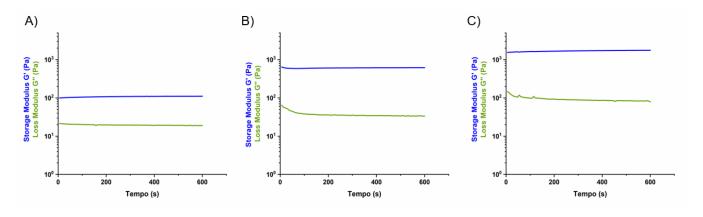


Figura 36 - Andamento dei moduli G' e G'' in funzione del tempo dei campioni (A) Coll/MBG/nanoHA (B) GEN-Coll/MBG/nanoHA + GEN.

Dai grafici riportati in Figura 37 è stato possibile osservare un comportamento solid-like per tutti e tre i campioni, in cui il modulo G' è risultato molto maggiore di G'', denotando un contributo elastico superiore rispetto a quello viscoso [43]. È stato confermato inoltre, che i valori dei moduli (Tabella 11) siano aumentati al crescere della concentrazione di genipina, infatti la sospensione senza genipina possedeva un modulo elastico G' di circa 100 Pa, mente quella GEN-Coll/MBG/nanoHA +GEN aveva un valore di G' superiore a 1500 Pa. Questo risultato ha confermato i dati in letteratura [83], dimostrando che l'instaurarsi di legami covalenti tra le catene polimeriche, a seguito della reticolazione chimica del collagene, ha permesso di ottenere una maggior stabilità della struttura fibrillare, conferendo una maggior rigidezza ai costrutti. Questo risultato è stato ricavato dai valori

di G' e G'' che sono risultati molto diversi, evidenziando la prevalenza della componente elastica su quella viscosa.

SOSPENSIONE	G' (Pa) a t=0	G''(Pa) a t=0	G' (Pa) a t=10 min	G''(Pa) a t=10 min
Coll/MBG/nanoHA	99.93	21.47	110.85	18.90
GEN-Coll/MBG/nanoHA	644,77	64,68	617.35	33.51
GEN-Coll/MBG/nanoHA +GEN	1551,49	146,2	1765,05	78,83

Per osservare la zona viscoelastica lineare, ossia in cui i moduli G' e G'' rimangono costanti al variare della deformazione applicata, è stato effettuato un "Amplitude Sweep test" a 37 °C.

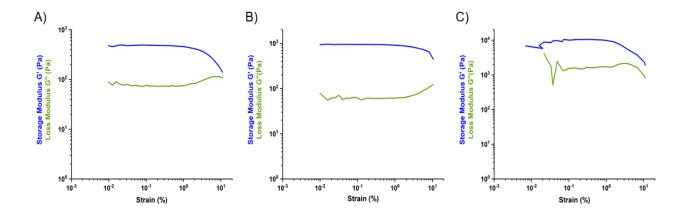


Figura 37- Zona viscoelastica lineare in funzione dei moduli G' e G'' (A) Coll/MBG/nanoHA (B) GEN-Coll/MBG/nanoHA (C) GEN-Coll/MBG/nanoHa +GEN.

Tutti i campioni hanno presentato una zona viscoelastica lineare compresa in intervallo di deformazione applicato tra 0.07 e 1.01 %, pur confermando diversi valori per i moduli G' e G'', maggiori nel caso dei costrutti realizzati con genipina e di quelli sottoposti al trattamento di postreticolazione (Figura 38 B-C). L'aumento della rigidezza delle matrici collageniche, indotto dall'aggiunta di nanoparticelle inorganiche è stato già osservato e riportato in altri studi [54], [55], ma considerando che tutti i costrutti sono stati realizzati con lo stesso contenuto in volume degli elementi inorganici nelle formulazioni ibride, l'aumento dei moduli G' e G'' è stato attribuito alla reticolazione chimica del collagene. Questo effetto si è verificato attraverso la formazione di legami covalenti tra

le molecole di collagene che, insieme alla reticolazione fisica del collagene indotta dalla temperatura, conferisce maggior stabilità alla struttura dei costrutti [43], [55], [83].

Infine, è stata testata la stabilità delle strutture realizzate al variare della temperatura, per studiare l'influenza del reticolante sulla temperatura di denaturazione del collagene. A questo scopo è stata eseguita una rampa di temperatura (Temperature Ramp test), in un intervallo tra i 25 °C e 80 °C (Figura 39).

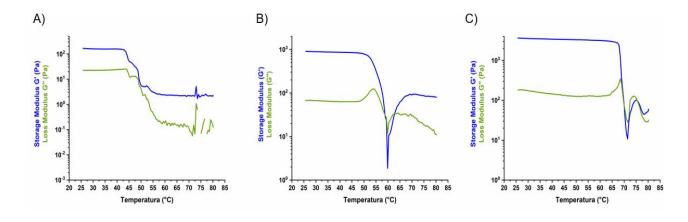


Figura 38 - Andamento dei moduli G' e G'' in funzione della temperatura: (A) Coll/MBG/nanoHA (B)GEN-Coll/MBG/nanoHA (C) GEN-Coll/MBG/nanoHA +GEN.

Come si osserva dai grafici, la presenza di genipina ha influenzato la stabilità del collagene in funzione della temperatura, osservando una variazione dei moduli G' e G'' a temperature superiori. La drastica diminuzione dei moduli G' e G'' in seguito alla denaturazione della matrice organica è avvenuta a 43 °C nella costrutto realizzato a base di Coll/MBG/nanoHA [34], mentre per i sistemi realizzati con GEN-Coll/MBG/nanoHA e per quelli GEN-Coll/MBG/nanoHA +GEN è stato osservato questo comportamento a temperature più alte, rispettivamente a 53 °C e 67 °C, registrando un incremento di circa di 24 °C superiore alla temperatura ottenuta nel sistema senza genipina.

Questo risultato ha dimostrato che la creazione di legami covalenti tra le molecole di collagene indotti della genipina ha portato ad una evidente miglioramento della stabilità finale del materiale anche in funzione della temperatura di denaturazione[83].

Per riassumere, questi test hanno dimostrato che la formulazione contenente la genipina possiede un basso limite di scorrimento, inoltre non è in grado di recuperare velocemente le sue proprietà viscoelastiche in seguito ad elevate velocità di taglio, come possono essere quelle che si verificano durante i processi di estrusione, suggerendo l'utilizzo di un bagno di supporto di stampa per ottenere una maggior stabilità durante la deposizione dei filamenti e garantire una miglior fedeltà di stampa [71], [72], [81]. Invece, per ottenere delle migliori proprietà meccaniche degli scaffold stampati, a seguito dei processi di transizione sol-gel e dell'eliminazione del bagno di supporto, è consigliato il

trattamento di post reticolazione con genipina/etanolo, avendo dimostrato un effettivo miglioramento in termini di rigidezza e stabilità della struttura, grazie all'azione chimica della genipina sulle molecole di collagene.

### 4.2. Degradazione in vitro delle strutture reticolate con genipina

I test di degradazione in vitro dei sistemi sviluppati sono stati condotti in modo da supportare i dati ottenuti attraverso lo studio reologico e per investigare ulteriormente l'azione reticolante indotta dalla genipina.

La degradazione idrolitica del collagene, consiste nella scissione dei legami peptidici della molecola, mentre la degradazione enzimatica, indotta da collagenasi, provoca la scissione di due delle tre catene elicoidali del collagene in punti specifici, determinando la disgregazione della fibrilla [90], [91].

L'azione di un agente reticolante chimico come la genipina, è in grado di generare dei legami covalenti tra le molecole di collagene, ottenendo una maggior conservazione della struttura della matrice durante i processi di degradazione e rallentando la perdita graduale in peso del costrutto [43].

È stata studiata la degradazione enzimatica ed idrolitica delle strutture realizzate a seguito della reticolazione della formulazione ibrida contenente genipina e di quelle processate successivamente con la soluzione di genipina ed etanolo, per dimostrare ulteriormente la stabilità dei sistemi sia in soluzione acquosa, che in soluzioni enzimatiche.

La digestione dei diversi campioni, data dall'azione della collagenasi a 37 °C, è stata analizzata misurando la percentuale di perdita di peso fino a 48 ore di incubazione nella soluzione enzimatica. Dagli studi condotti da Montalbano et al. [43] è stata analizzata la degradazione *in vitro* dei costrutti realizzati con la sospensione contenente collagene, MBG\_Sr4% e nanoHA, ottenuti a seguito della transizione sol- gel del collagene, in cui è stata registrata una perdita in peso del 80% già dopo le prime 12 ore, nel caso del processo enzimatico. Come illustrato nella Figura 40, il processo di degradazione per il campione GEN-Coll/MBG/nanoHA ha mostrato una perdita di peso superiore al 20% già nelle prime 12 ore, raggiungendo un valore di circa l'80% alla fine della durata dell'analisi. Al contrario i campioni GEN-Coll/MBG/nanoHA +GEN hanno raggiunto il 20% della perdita di peso solo dopo 24 ore e il 40 % alla fine del tempo di osservazione, confermando l'efficacia del trattamento chimico aggiuntivo. I risultati ottenuti hanno dimostrato l'efficacia dei trattamenti chimici di reticolazione a base di genipina, in concordo con gli studi precedentemente effettuati [43].

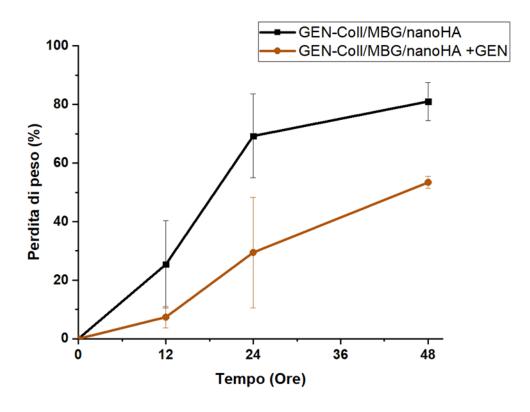


Figura 39 - Degradazione enzimatica dei campioni GEN-Coll/MBG/nanoHA e GEN-Coll/MBG/nanoHA +GEN fino a 48 ore.

Per il test di degradazione idrolitica, i campioni sono stati analizzati fino a 14 giorni di incubazione in D-PBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline, St. Louis, MO, USA) a 37 °C. Riguardo i test effettuati sui campioni bulk a base di collagene, MBG e nanoHA, negli studi di Montalbano et al. [43], è stata ottenuta una perdita in peso al di sotto del 20% per i primi 3 giorni, aumentando, fino ad arrivare a circa l'80% alla fine dei 14 giorni. Nel caso dei sistemi a base di GEN-Coll/MBG/nanoHA è stata registrata una perdita di peso del circa il 50% dopo 14 giorni (Figura 41), osservando quindi una migliore resistenza alla degradazione rispetto al materiale non contenente il reticolante. Questo risultato è stato ancora più evidente nei campioni GEN-Coll/MBG/nanoHA +GEN, che hanno registrato solamente il 20% della perdita di peso alla fine del tempo di osservazione. Questo ha dimostrato come la reticolazione chimica sia in grado di garantire una maggior stabilità della struttura nei sistemi realizzati [43], permettendo di ottenere una perdita in peso graduale e costante nell'arco di tempo di osservazione dei processi di degradazione.

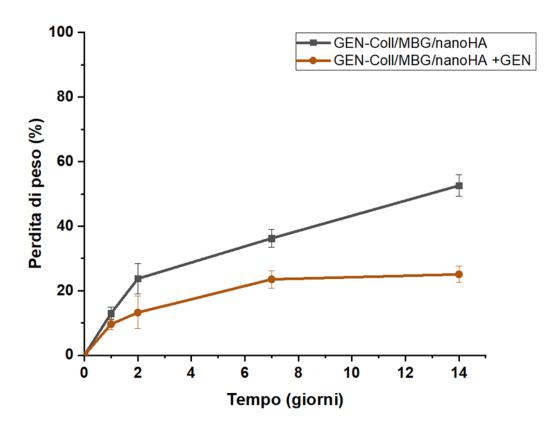


Figura 40 – Degradazione idrolitica dei campioni GEN-Coll/MBG/nanoHA e GEN-Coll/MBG/nanoHA +GEN fino a 14 giorni.

In conclusione, possiamo affermare che la reticolazione chimica ha permesso di ottenere una maggior stabilità della matrice collagenica durante i processi di degradazione, confermando i vantaggi già indicati precedentemente nell'effettuare un trattamento di post crosslinking sui costrutti stampati.

# 4.3. Rilascio degli ioni Stronzio in vitro delle strutture reticolate con genipina

Diversi studi hanno dimostrato come il rilascio di ioni stronzio sia fondamentale per potenziare le proprietà osteogeniche dei sistemi, promuovendo la formazione di nuovo tessuto osseo [54], [56], [59]. L'utilizzo di vetri bioattivi mesoporosi contenenti stronzio ha dimostrato delle ottime proprietà bioattive per il tessuto osseo, in cui la cinetica di rilascio degli ioni è attribuita alla superficie notevolmente elevata dei mesopori e alle dimensioni delle particelle, che ne consentono una rapida diffusione all'interno della struttura porosa [56].

I campioni sono stati immersi in 3 mL di soluzione salina (Tris HCl), di cui è stato raccolto il surnatante dopo 3 ore, 10 ore, 24 ore, 3 giorni e 7 giorni, ed è stato analizzato dal plasma accoppiato induttivamente con la tecnica di spettrometria ad emissione atomica (ICP-AES), dopo una corretta diluizione in ddH2O (1:5).

Il rilascio di ioni stronzio da matrici Coll/MBG/nanoHA era stato osservato in precedenti studi effettuati dal gruppo di ricerca, registrando un rilascio massivo di circa 280 ppb già dopo 24 ore di incubazione in Tris-HCl. Lo stesso test è stato svolto sui sistemi GEN-Coll/MBG/nanoHA e su quelli trattati ulteriormente con un precesso di post reticolazione GEN-Coll/MBG/nanoHA +GEN. Nella Figura 42 è stato riportato l'andamento del rilascio degli ioni Sr<sup>2+</sup> per i di entrambi i campioni testati, in una finestra di osservazione da 3 ore fino a 7 giorni. Come visibile in Figura 42, un rilascio massivo è avvenuto entro le prime 3 ore, soprattutto per i campioni contenenti genipina *in-situ*, in cui è stato ottenuto un valore di circa 225 ppb, mentre nei campioni in cui è stata effettuata la post reticolazione è stato osservato un rilascio di soli 120 ppb. Infatti, per quest'ultimo, il picco massimo di circa 130 ppb, è stato evidenziato dopo 10 ore. Successivamente, entrambi campioni hanno iniziato a rilasciare la stessa quantità di ioni stronzio assumendo lo stesso andamento decrescente, ottenendo informazioni simili dopo 3 e 7 giorni (168 ore). Questo risultato ha dimostrato che la reticolazione con genipina sia in grado di favorire una cinetica di rilascio più lenta, con un picco entro le 24 ore [54]. Di conseguenza la fase aggiuntiva di post reticolazione dovrebbe garantire il rilascio totale di ioni Sr<sup>2+</sup> solo una volta che il costrutto venga incubato con le cellule.

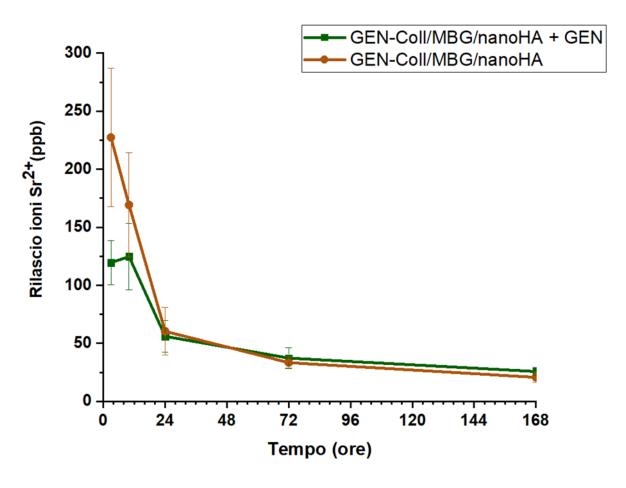


Figura 41 - Rilascio degli ioni Sr<sup>2+</sup> per i sistemi GEN-Coll/MBG/nanoHA e GEN-Coll/MBG/nanoHA +GEN.

Riassumendo, tutte e tre i costrutti hanno mostrato lo stesso andamento decrescente, costante per l'intera durata del test, con il picco di rilascio entro le 24 ore per i costrutti che sono stati trattati con la soluzione di genipina/etanolo, dimostrando ulteriormente l'efficacia di questo trattamento [56].

### 4.4. Caratterizzazione del bagno di supporto

Lo sviluppo del bagno di supporto a base di alginato si è basato su un lavoro precedentemente realizzato, in cui è stato utilizzato acido alginico sodato al 15 wt% in ddH<sub>2</sub>O. Questo è stato usato per stampare una formulazione ibrida a base di collagene, sviluppato dal gruppo di ricerca in cui è stato svolta l'attività di ricerca. Dagli studi effettuati, questo primo bagno sviluppato è risultato essere troppo liquido per stampare strutture complesse ed evitarne il collasso.

Partendo da queste osservazioni, è stato sviluppato un nuovo bagno di supporto prendendo come riferimento il metodo definito come "freeform reversible embedding of suspended hydrogel" (FRESH) riportato da Hinton et al [81], con cui è stato realizzato un gel in gelatina, successivamente processato per ottenere particelle con un diametro medio di 65 µm. Questo materiale ha consentito di ottenere una buona deposizione dei filamenti durante il processo di estrusione, con un miglioramento della risoluzione finale del costrutto, ma a causa della sua natura chimica è soggetto a reticolazione chimica da parte della genipina, non permettendone l'uso in questo studio. Di conseguenza è nata la necessità di ottenere un bagno con le stesse caratteristiche viscoelastiche, ma a base di un altro polimero naturale.

Per ottenere un gel di alginato con sufficienti proprietà viscoelastiche da poter essere frullato, ottenendo uno slurry, si è partiti dall'ottimizzare tipo e concentrazione di reticolante. È stato testato l'acido alginico sodato al 15 wt% con cloruro di calcio (CaCl<sub>2</sub>), o carbonato di calcio (CaCO<sub>3</sub>), come reticolanti e sulla base del lavoro condotto da Pacheco et al. [92] i gel sono stati ottenuti con un rapporto 4:1 tra acido alginico e reticolante. Per favorire una corretta dispersione, le soluzioni acquose contenenti le polveri dei rispettivi reticolanti sono state versate direttamente nella soluzione acquosa di acido alginico, posto in agitazione magnetica.

In parallelo sono stati testati gli stessi elementi ma aggiungendo una quantità di cloruro di sodio (NaCl), come agente disperdente, alla soluzione acquosa contenente CaCl<sub>2</sub> o CaCO<sub>3</sub>, come suggerito in letteratura [92].

Sono state condotte delle analisi visive, osservando i campioni dopo 1 ora, 3 ore ed infine a 5 ore. Come osservabile nella Figura 43 l'alginato a base di CaCO<sub>3</sub> è risultato essere troppo liquido e non omogeno, evidenziando una scarsa azione reticolante, in cui sul fondo del becher è stata osservata la presenza del deposito di particolato bianco, particelle di CaCO<sub>3</sub> che non hanno interagito con la soluzione di acido alginico sodato.



Figura 42 - Alginato con CaCO<sub>3</sub>: presenza di deposito di particolato.

Al contrario l'alginato a base di CaCl<sub>2</sub>, alla fine delle 5 ore ha mostrato (Figura 44) un'azione reticolante maggiore, permettendo la formazione di un gel di scarsa rigidezza che, come si evince dalla foto, presentava una consistenza eterogena a causa dal tipo di processo di gelificazione utilizzato, in accordo agli studi condotti in letteratura [93]. La presenza eccessiva di bolle è scaturita dal processo di emulsione, in cui la soluzione di reticolante è stata versata in quella di acido alginico posta in agitazione magnetica, non garantendo una giusta omogenizzazione.



Figura 43 - Alginato a base di CaCl<sub>2</sub>.

I test condotti con l'aggiunta di sale nelle soluzioni di reticolante non hanno mostrato differenze sostanziali nella formazione finale dei gel, di conseguenza non è stato utilizzato il sale come elemento disperdente nelle analisi successive. Inoltre, in base ai gel ottenuti, il CaCO<sub>3</sub> è stato scartato come reticolante ed i test successivi sono stati condotti per migliorare la consistenza del gel di alginato ottenuto con CaCl<sub>2</sub>.

A seguito della selezione del reticolante, si è passati a testare rapporti differenti tra acido alginico sodato e CaCl<sub>2</sub> rispettivamente di 4:1 e 3:2 [92]. Sui gel risultanti sono stati condotti dei test di "T*ime Sweep*" per una durata di 300 secondi, applicando una deformazione dello 0.5% (Figura 45) e di "*Temperature Ramp*" (Figura 46) in un intervallo di temperatura tra i 15 °C ed i 30 °C, in cui sono

stati monitorati i valori del modulo elastico G' e del modulo viscoso G'' al variare dei parametri impostati, per ottenere informazioni sulle risultanti proprietà viscoelastiche.

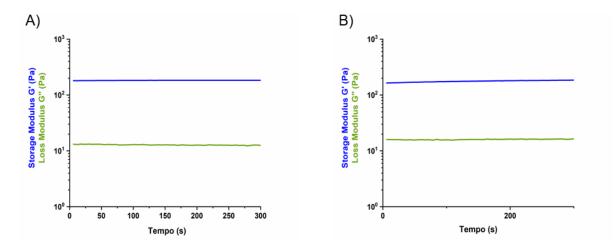


Figura 44 - Analisi delle variazioni dei moduli G' e G'' in funzione del tempo (A) Acido alginico/CaCl<sub>2</sub> 4:1 (B) Acido alginico/CaCl<sub>2</sub> 3:2.

Come mostrato nei grafici riportati in Figura 45, entrambi i gel sono risultati stabili nel tempo, mostrando un comportamento solid-like con un valore maggiormente predominante del modulo G'. Per quanto il divario dei moduli G' e G'' abbia dimostrato una buona reticolazione, i moduli sono risultati essere troppo bassi rispetto alla rigidezza della gel in gelatina utilizzato per ottenere uno slurry con la tecnica FRESH [81] (Tabella 12).

Tabella 12 - Riassunto risultati del Time Sweep su gel di alginato con rapporto Acido alginico/ $CaCl_2$  4:1 e Acido alginico/ $CaCl_2$  3:2

GEL	G' (Pa) a t=0	G'' (Pa) a t=0	G' (Pa) a t= 2 ore	G'' (Pa) a t= 2 ore
Alginato (Acido alginico/CaCl2 4:1)	180.57	13.18	183.57	12.44
Alginato (Acido alginico/CaCl <sub>2</sub> 3:2)	164.54	15.90	184.58	16.34
Gelatina	2962.20	80.54	3086.47	67.64

I test di "*Temperature Ramp*" (Figura 46) sono stati condotti in un intervallo tra 15 °C e 30 °C, valutando l'andamento dei moduli G' e G'' in funzione della temperatura.

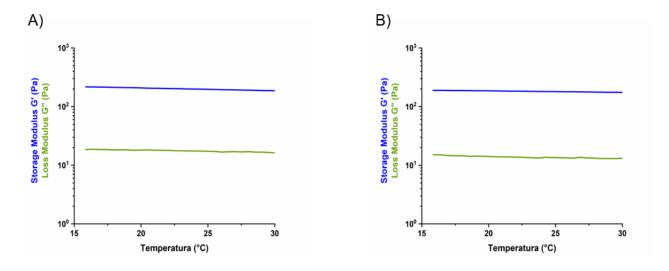


Figura 45 - Valutazione della stabilità dei gel al variare della temperatura (A) Acido alginico/CaCl<sub>2</sub> 4:1 e Acido alginico/CaCl<sub>2</sub> 3:2.

Come si evince dai grafici, i gel in entrambi i casi sono risultati stabili nell'intervallo di temperature tra 15 °C e 30 °C, garantendo di poter effettuare i test e le analisi a temperatura ambiente, senza incorrere in cambiamenti delle proprietà reologiche.

Per migliorare le proprietà viscoelastiche del gel, cercando di ottenere una maggior rigidezza, è stata aumentata la concentrazione di acido alginico sodato, aumentando così il numero di catene disponibili alla reticolazione [92] e mantenendo i due rapporti precedenti. Il gel che ha dimostrato di possedere migliori proprietà viscoelastiche è stato ottenuto con una concentrazione del 40 wt% di acido alginico in soluzione acquosa (Figura 47).

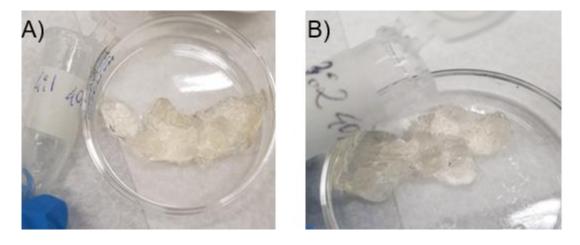


Figura 46 - Gel di Alginato al 40 wt% (A) Acido Alginico/CaCl<sub>2</sub> 4:1 (B) Acido Alginico/CaCl<sub>2</sub> 3:2.

Dalla Figura 47 si osserva che entrambi i due gel ottenuti hanno mostrato una consistenza eterogenea, maggiormente evidente nel rapporto 3:2 che ha presentato anche delle zone liquide (Figura 47B).

Questo risultato ha portato alla ricerca di un nuovo metodo di gelificazione, per ottenere dei campioni maggiormente omogenei. Ci sono diversi meccanismi di gelificazione [93], [94], quello più comune, per semplicità, è la diffusione, in cui i cationi bivalenti diffondono da una soluzione esterna posta a contatto con la soluzione acquosa di acido alginico. La gelificazione risulta eterogenea, perché la reticolazione è maggiore nella zona che per prima viene a contatto con la soluzione di reticolante [94]. Un altro metodo che permette di ottenere un gel omogeneo e compatto è "l'inner gelation", ossia una reticolazione in-situ. Questa tecnica prevede la dispersione di una forma inattiva del catione bivalente in una soluzione di alginato, in presenza di una sostanza lentamente idrolizzante. Quest'ultimo porta ad un graduale rilascio dei cationi, che man mano legano le catene di alginato, gelificandolo [93]. L'ultimo metodo è il "setting by cooling", tecnica basata sulla temperatura, in cui si ottiene una gelificazione eterogenea ma termoreversibile. Questo si verifica in quanto l'associazione cationi/molecole può avvenire solo a temperature basse, quindi solo quando la soluzione viene fatta raffreddare, conferendo una maggiore stabilità al gel finale [94].

Di conseguenza è stato ottimizzato il processo per ottenere il gel, utilizzando contemporaneamente due tecniche di gelificazione eterogenea: per diffusione e per via termica, utilizzando un rapporto tra acido alginico sodato e reticolante di cloruro di calcio di 2:1 [92]. Il procedimento ha previsto l'utilizzo di due soluzioni; la prima (soluzione 1) è stata ottenuta disciogliendo, sotto agitazione magnetica, l'acido alginico sodato in ddH<sub>2</sub>O ad una concentrazione di 40 wt%. Per la seconda soluzione è stato disciolto CaCl<sub>2</sub> in ddH<sub>2</sub>O, sotto agitazione magnetica, ottenendo una concentrazione finale di 7 wt% (soluzione 2). La soluzione 1 è stata versata in un piatto Petri e posta a 70 °C per 20 minuti, successivamente raffreddata a temperatura ambiente. Di seguito, la soluzione 2 è stata aggiunta in modo a coprire tutta la superficie e dopo aver trascorso una fase di riposo di circa 24 ore, è stata eliminata la soluzione di reticolante in eccesso, ottenendo il gel finale (Figura 48).



Figura 47 - Gel di alginato finale.

Il gel ottenuto ha mostrato una miglior consistenza e rigidezza, portando successivamente a tesare diverse concentrazioni di reticolante. In particolare, è stata utilizzata una concentrazione di CaCl<sub>2</sub> al 7 wt%, al 14 wt% e al 21 wt%; i gel così ottenuti (Figura 49) sono stati testati al reometro per ottenere informazioni sulle proprietà viscoelastiche risultanti.

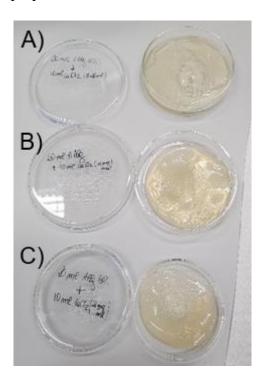


Figura 48 - Gel di Alginato con CaCl<sub>2</sub> al (A) 7 wt%, (B) 14 wt% e (C) 21 wt%.

I test sono stati effettuati in regime oscillatorio attraverso un test di "*Time Sweep*" di 300 secondi, applicando una deformazione dello 0.5%, ed un test di "*Temperature Ramp*" tra 15 °C e 30 °C, in cui sono stati valutati i cambiamenti dei moduli G' e G'' in funzione dei parametri impostati. I grafici riportati in Figura 50 mostrano che tutti i gel ottenuti hanno mostrato un comportamento solid-like ed una struttura stabile per tutta la durata di osservazione. È stato inoltre osservato l'aumento della rigidezza dei diversi gel in funzione della concentrazione di reticolante, ottenendo un incremento sostanziale dei moduli G' e G'' tra il 7 wt% e il 21 wt% di CaCl<sub>2</sub>.

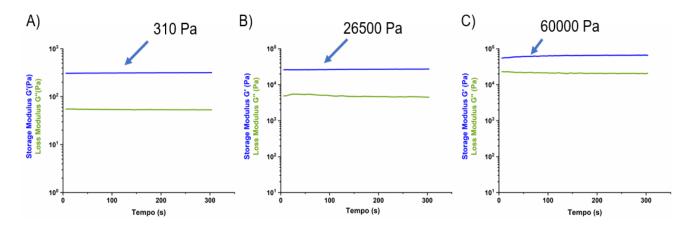


Figura 49 - Analisi della rigidezza dei gel al variare del tempo con concentrazione di CaCl<sub>2</sub> al (A) 7 wt% (B) 14 wt% (C) 21 wt%.

Dai grafici relativi al test di "*Temperature Ramp*", mostrati in Figura 51 è stato osservato, invece, come l'aumento della temperatura abbia influenzato le proprietà viscoelastiche, in proporzione all'aumentare della concentrazione di reticolante. Questo risultato, in accordo con la letteratura [93], [94], ha dimostrato che i gel ottenuti con questi procedimenti sono sensibili alle alte temperature. I processi di gelificazione sono favoriti a basse temperature, aumentando la concentrazione di reticolante sono presenti più legami intra e intermolecolari, che in seguito all'aumento della temperatura si indebolisco, portando il gel ad essere meno stabile [86].

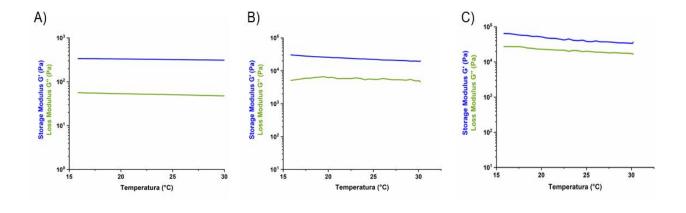


Figura 50 - Analisi delle proprietà viscoelastiche al variare della temperatura per l'alginato al (A) 7 wt% CaCl<sub>2</sub> (B) 14 wt% CaCl<sub>2</sub> (C) 21 wt% CaCl<sub>2</sub>.

I valori dei moduli G' e G'' ottenuti dai grafici precedenti (Figura 51) sono stati riportati in Tabella 13, in cui è stata osservata una diminuzione proporzionale di entrambi i moduli G' e G'' al crescere della temperatura e all'aumentare della concentrazione di CaCl<sub>2</sub>. In particolare, alla concentrazione di 21 wt% a 30 °C i valori sono stati circa la metà di quelli iniziali, a 15 °C di temperatura. Questi

risultati hanno indicato che aumentando la temperatura c'è un aumento della velocità di diffusione del calcio e di conseguenza, a concentrazioni maggiori di reticolante aumenta la sua diffusione nel gel, producendo una struttura interna meno regolare con diminuzione della sua rigidezza [85].

Tabella 13- Risultati ottenuti con il test di Temperarture Ramp.

Gel di Alginato con concentrazione di CaCl <sub>2</sub>	G' (Pa) a 15 °C	G'' (Pa) a 15 °C	G' (Pa) a 30 °C	G'' (Pa) a 30 °C
7 wt%	338.23	56	310.46	47
14 wt%	30575	5120	19756	4550
21 wt%	64407	27293	36573	16493

Attraverso i protocolli della tecnica FRESH è stato ottenuto il blocco di gel in gelatina [81], che prima di essere processato, possedeva un modulo elastico G' di circa 3000 Pa ed un modulo viscoso G'' di circa 80 Pa. Questi valori sono stati confrontati con quelli ottenuti dai test effettuati sui tre gel, suggerendo che le proprietà viscoelastiche erano adatte a garantirne il processamento per realizzare gli slurry. Di conseguenza, i tre gel sono stati frullati, ottenendo rispettivamente tre slurry di alginato (Figura 52), successivamente analizzati al reometro.





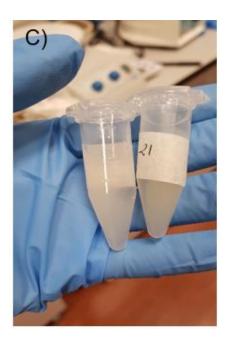


Figura 51 - Slurry (A) Alginato 7 wt% CaCl<sub>2</sub> (B) Alginato 14 wt% CaCl<sub>2</sub> (C) Alginato 21 wt% CaCl<sub>2</sub>.

I test condotti sono stati: un "Amplitude Sweep", per studiare il comportamento visco-elastico in risposta ad un ampio intervallo crescente di deformazioni, e la "Temperature Ramp" per valutare la stabilità dei materiali nell'intervallo di temperatura tra i 15 °C ed i 30 °C.

Dai risultati si nota come tutti gli slurry abbiano mostrato una zona viscoelastica lineare tra 0.1 e 2 % di deformazione applicata, in cui i moduli di G' e G'' sono rimasti costanti (Figura 53), permettendo di garantire il processo di estrusione, senza incorrere a modifiche delle loro proprietà viscoelastiche.

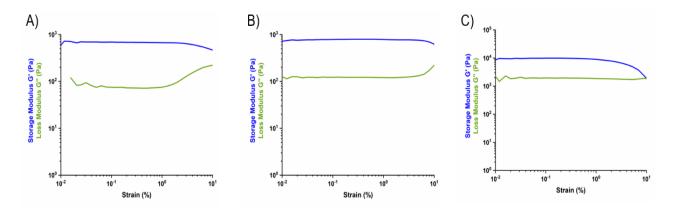


Figura 52 - Analisi della zona viscoelastica lineare per i tre slurry di Alginato al (A) 7 wt% CaCl<sub>2</sub> (B) 14 wt% CaCl<sub>2</sub> (C) 21 wt% CaCl<sub>2</sub>.

Osservando i grafici della "*Temperature Ramp*" riportati in Figura 54, i dati ottenuti sono stati concordi a quelli ottenuti per i gel contenenti diverse concentrazioni di reticolante, seppur con valori più bassi dei moduli G' e G''. Lo slurry di gelatina utilizzato nella tecnica FRESH [81], possedeva un modulo G' di circa 300 Pa, più vicino ai valori degli slurry di alginato con concentrazione 7 wt% e 14 wt%. Questo risultato ha suggerito che i due campioni di slurry potessero essere dei buoni candidati per supportare la fase di estrusione durante i processi di stampa. Inoltre, questo test ha confermato che i materiali potevano supportare l'estrusione della formulazione ibrida, posta a 10 °C, senza variare le loro proprietà viscoelastiche.

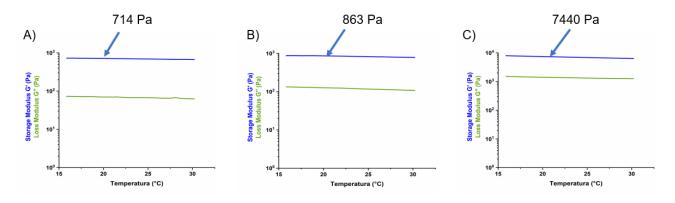


Figura 53 - Andamento delle proprietà viscoelastiche degli slurry di alginato in funzione della temperatura A) 7 wt% CaCl<sub>2</sub> (B) 14 wt% CaCl<sub>2</sub> (C) 21 wt% CaCl<sub>2</sub>. Le frecce indicano il valore di G'a 20 °C.

Infine, dato l'andamento decrescente dei moduli G' e G'' all'aumentare della temperatura, si è scelto di impostare una temperatura costante a 20 °C durante i processi di stampa, per garantire le proprietà reologiche studiate.

### 4.5. Realizzazione scaffold 3D tramite processo di stampa ad estrusione.

I tre slurry di Alginato al 40 wt% con CaCl<sub>2</sub> aggiunto a diverse concentrazioni (7 wt%, 14 wt% e 21 wt%) sono stati testati nei processi di estrusione, per discriminare quello più adatto a supportare la struttura e garantire una maggior fedeltà di stampa.

I tre campioni sono stati versati in un apposito piatto di stampa (Figura 55), dopodiché è stata caricata la formulazione ibrida a base di collagene e genipina (GEN-Coll/MBG/nanoHA) in una cartuccia, per testare la capacità dei bagni di supportare il processo di estrusine del filamento. I primi test sono stati effettuati selezionando una geometria semplice a griglia (Grid) con pori di grandi dimensioni di circa 5 mm, tramite la scelta di un riempimento di strato del 5%. L'ago utilizzato è stato di 27 G, di diametro 0.2 mm e l'altezza dello strato è stata impostata a 0.17 mm. Gli scaffold sono stati processati testando una pressione di 40 kPa e una velocità della testina di stampa di 10 mm/s.

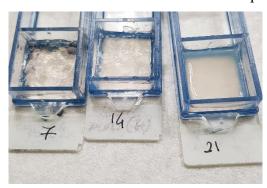


Figura 54 - Test di stampa con i tre slurry di Alginato con CaCl<sub>2</sub> a diverse concentrazioni.

Come mostrato in Figura 56C, i tre bagni avevano consistenze differenti; in particolare, quello al 21 wt% di reticolante è risultato essere molto liquido, non garantendo il supporto del filamento durante l'estrusione, la struttura di fatti è collassata. Al contrario entrambi gli slurry al 7 wt% e 14 wt% di reticolante avevano una consistenza più gelatinosa, che ha permesso di supportare il processo di stampa, ottenendo una miglior fedeltà di stampa al modello originario (Figura 56 A-B).

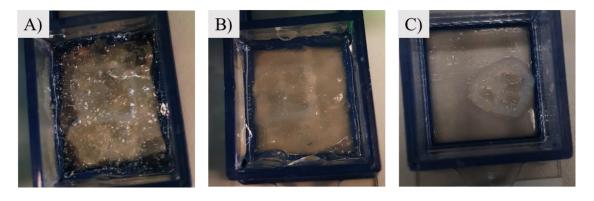


Figura 55 - Scaffold 3D stampati in bagno di Alginato con CaCl<sub>2</sub> al (A) 7 wt% (B) 14 wt% (C) 21 wt%.

Considerati simili i risultati ottenuti dalla stampa della struttura Grid nei bagni con CaCl<sub>2</sub> al 7 wt% e al 14 wt%, sono stati condotti ulteriori test, stampando una struttura geometrica più complessa alveolare (honeycomb). In questo caso è stata aumentata la porosità scegliendo un riempimento dello strato del 15%, i parametri di stampa sono stati impostati, partendo da un valore di pressione di 40 kPa ed una velocità di 12 mm/s. Il bagno a 7 wt% di CaCl<sub>2</sub> non ha garantito sufficiente supporto, infatti la sospensione si è dispersa al suo interno, perdendo la definizione geometrica (Figura 57B). Invece, lo slurry di alginato al 14 wt% di reticolante, ha dimostrato di sostenere maggiormente l'estrusione dei filamenti, ottenendo una buona fedeltà di stampa (Figura 57A).

Questo risultato può esser stato dovuto alla presenza di una maggior fase liquida all'interno del bagno al 7 wt% di CaCl<sub>2</sub> rispetto quello al 14 wt%, che non ha garantito un sufficiente incapsulamento dei filamenti.

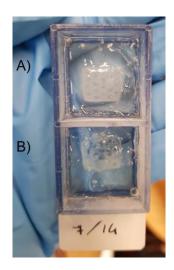


Figura 56 - Scaffold 3D nel bagno di supporto di Alginato a base di CaCl<sub>2</sub> (A) 14 wt% (B) 7 wt%.

In seguito a queste considerazioni, per i successivi test è stato scelto come bagno di supporto lo slurry al 14 wt% di CaCl<sub>2</sub>. Di seguito, lo studio è proceduto con la fase di stampa di diverse geometrie, con diversi riempimenti, in modo da ottimizzare i parametri di stampa per garantire una fedeltà di stampa

ottimale al modello desiderato. I test sono è stati condotti utilizzando come inchiostro la formulazione ibrida GEN-Coll/MBG/nanoHA, mantenuta ad una temperatura costante di 10 °C, mentre il piatto di estrusione è stato impostato a 20 °C. L'ago utilizzato e l'altezza del singolo strato sono rimasti rispettivamente 27 G e 0.17 mm. Le geometrie testate sono state differenti, in modo da valutare sia la stampabilità del materiale, che la capacità del bagno di supportare la fase di estrusione, osservando l'accuratezza geometrica ottenuta negli scaffold. I parametri di stampa sono stati cambiati uno per volta, per studiare la loro influenza sul processo. Iniziando da una velocità di stampa di 8 mm/s ed una pressione di 40 kPa è stato prodotto uno scaffold con geometria semplice, a reticolo (Linear) impostando un riempimento dello strato del 15 % ed una altezza di 3 mm (Figura 58A). La definizione geometrica ottenuta è stata considerata molto bassa (Figura 58B), paragonata al modello CAD iniziale (Figura 58A), in cui i pori sono risultati ostruiti dall'abbondante materiale estruso. Questo risultato ha dimostrato che la pressione applicata era troppo elevata per queste condizioni di stampa, infatti secondo Paxton et al. [72], per ottenere una dimensione del filamento pari a quella del diametro interno dell'ago, la pressione deve essere regolata con precisione, in combinazione alla velocità della testina di stampa.

Riducendo la pressione a 30 kPa, la definizione geometrica è stata migliorata significativamente, risultando più fedele al modello scelto come visibile in Figura 58C.

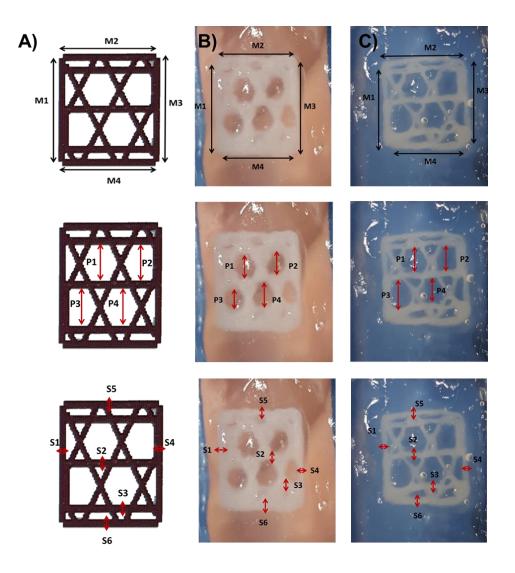


Figura 57 - Confronto tra scaffold rispetto la (A) geometria di riferimento, realizzati con pressioni differenti (B) 40kPa (C) 30kPa.

Per confermare l'analisi visiva, sono stati misurati i lati del perimetro, i pori e il diametro dei filamenti (Figura 58 A-C), in cui per ogni grandezza è stata calcolata la media e la deviazione standard, di seguito riportate nella Tabella 14 per confrontare i risultati ottenuti.

Lo scaffold estruso a 40 kPa possedeva dimensioni maggiori, sia per i lati di base, che per gli spessori, rispetto alla geometria CAD e alla struttura ottenuta a 30 kPa. Inoltre, venivano persi tutti i pori di piccole dimensioni, mentre quelli più grandi erano 1 mm più piccoli rispetto lo standard desiderato.

Tabella 14 - Riassunto della media e della deviazione standard ricavate dall'analisi delle dimensioni dei campioni stampati a pressioni differenti, rispetto la geometria CAD di partenza.

	M1-M4 (mm)		P1-P	'4 (mm)	S1-S6 (mm)	
CAMPIONE	Media	Deviazione Standard	Media	Deviazione Standard	Media	Deviazione Standard
GEOMETRIA CAD	8.5	1	3	0.1	0.6	0.01
SCAFFOLD 40 kPa	8.64	0.6	2	0.3	0.7	0.2
SCAFFOLD 30 kPa	8	0.7	2.7	0.2	0.5	0.1

In seguito ai dati ottenuti, usando le condizioni ottimizzate in questo esperimento (30 kPa e 8 mm/s), è stata stampata la stessa geometria ma con uno spessore di 0.3 mm, per verificare con precisione l'accuratezza dimensionale dello scaffold. Per ottenere scaffold con altezze di qualche mm è necessario estrudere tanti strati, questo può portare ad un aumento del peso della struttura, che può non essere supportato a causa delle scarse proprietà viscoelastiche del materiale utilizzato per realizzare la struttura. Quindi, riducendo l'altezza è stato possibile discriminare gli effetti dei parametri su ogni singolo livello [71], [72]. Data la geometria CAD desiderata (Figura 59A), i risultati ottenuti e riportati in Tabella 15, hanno dimostrato un grande miglioramento della risoluzione per lo scaffold con 0.3 mm di altezza (Figura 59C), rispetto a quello di 3 mm (Figura 59B).

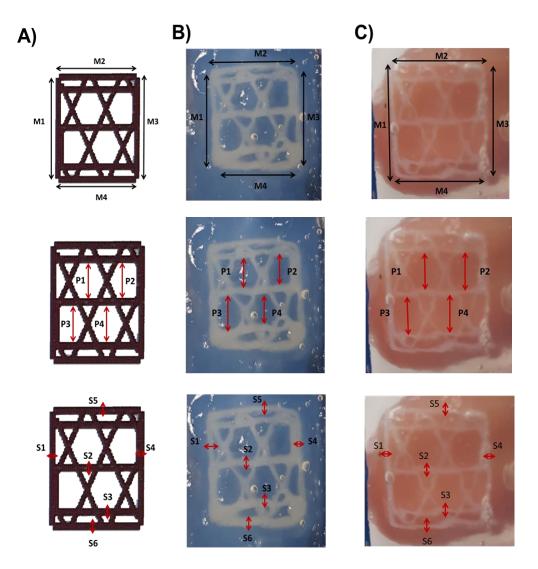


Figura 58 - Grandezze geometriche analizzate dalla (A) geometria CAD selezionata; e dagli scaffold con spessore (B) 3 mm e (C) 0.3 mm.

Dall'analisi dimensionale e considerando la deviazione standard, sono stati ottenuti valori simili per entrambi gli scaffold. La media delle dimensioni dei lati esterni dello scaffold più basso si è discostata di 0.1 mm da quella della geometria CAD, mentre lo scaffold di 3 mm ha riportato una differenza di 0.5 mm, essendo effettivamente più piccolo. Difatti come si osserva in Figura 59B, è stata persa la definizione degli spigoli laterali, portando la struttura a ridurre generalmente la sua dimensione. In aggiunta però, i valori delle deviazioni standard sono stati molto bassi, confermando che le misure erano uniformi per tutti i lati. Per i pori e gli spessori dei filamenti, i valori erano paragonabili, dimostrando che aumentando l'altezza dello scaffold fino a 3 mm non sono state ottenute differenze significative al livello geometrico, infatti entrambi gli scaffold hanno presentato discostamenti di 0.1 mm per i pori e circa 0.1-1.2 mm per i filamenti, rispetto alle misure di base.

Tabella 15 - Riassunto della media e della deviazione standard ricavate dall'analisi delle dimensioni dei campioni stampati con gli stessi parametri ma con spessori differenti, rispetto la geometria CAD scelta.

	M1-M4 (mm)		P1-P4 (mm)		S1-S6 (mm)	
CAMPIONE	Media	Deviazione Standard	Media	Deviazione Standard	Media	Deviazione Standard
GEOMETRIA CAD	8.5	1	3	0.1	0.6	0.01
SCAFFOLD 3mm	8	0.7	2.7	0.2	0.5	0.1
SCAFFOLD 0.3 mm	8.6	0.3	2.8	0.2	0.4	0.1

È stato successivamente effettuato un altro test utilizzando una geometria diversa, griglia (Grid) con un riempimento dello strato del 20 %, con molti pori di piccole dimensioni. Come per il modello a reticolo (Linear), sono stati stampati due scaffold con altezze differenti, rispettivamente di 3 mm e 1 mm, per osservare nel caso di un modello più complesso, l'influenza dei parametri di stampa ottimizzati in ogni strato. Si è partiti quindi dai parametri impostati in precedenza di 30 kPa per la pressione e 8 mm/s per la velocità, ottenendo uno scaffold (Figura 60B) che ha mostrato riprodurre tutti i pori del modello selezionato, nonostante alcuni di essi fossero poco regolari. Di conseguenza, per evitare un'estrusione insufficiente di materiale, è stata mantenuta la pressione costante, ma è stata aumentata la velocità a 10 mm/s, cercando di garantire una miglior accuratezza. L'influenza di questa modifica è stata studiata nel caso della struttura più bassa (Figura 60C), ottenendo una fedeltà di stampa maggiore con tutti i pori ben visibili e distanziati.

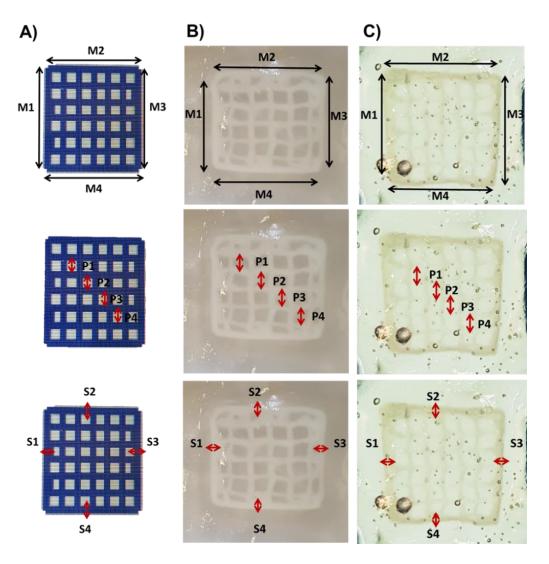


Figura 59 - Grandezze geometriche analizzate dalla (A) geometria CAD selezionata; e dagli scaffold con spessore (B) 3 mm e (C) 1 mm.

I risultati dell'analisi dimensionale delle strutture, rispetto alla geometria desiderata, sono stati riportati nella Tabella 15. I dati hanno dimostrato che lo scaffold di altezza 3 mm era più piccolo di 0.5 mm rispetto il modello CAD, come conseguenza della perdita dei pori a ridosso dei lati di base. Dalla deviazione standard si è ricavato che le dimensioni dei lati erano omogenee, quindi quello che si è osservato era un collasso del filamento, che ha introdotto degli artefatti di stampa, come precedentemente spiegato [71]. Questo esito è stato osservato anche nella dimensione dei pori interni, che sono risultati 0.2 mm più piccoli rispetto quelli della geometria CAD, mantenendo anche in questo caso una deviazione standard molto bassa. Al contrario, lo scaffold con 1 mm di altezza ha confermato un'elevata risoluzione, discostandosi dalle misure del modello scelto di soli 0.1 mm, per tutte le grandezze misurate.

Tabella 16 - Analisi statistica delle dimensioni ricavate dagli scaffold con altezza 3 mm e 1 mm rispetto la geometria desiderata.

	M1-M4 (mm)		P1-P	<sup>2</sup> 4 (mm)	S1-S6 (mm)	
CAMPIONE	Media	Deviazione Standard	Media	Deviazione Standard	Media	Deviazione Standard
GEOMETRIA CAD	9.5	0.4	1.1	0.1	0.8	0.2
SCAFFOLD 3 mm	9.0	0.4	0.9	0.1	0.7	0.2
SCAFFOLD 1 mm	9.4	0.4	1.2	0.2	0.7	0.1

Si è voluto testare una condizione in cui i pori fossero ancora più piccoli e ravvicinati, scegliendo la stessa geometria, Grid, ma aumentando il riempimento al 30% (Figura 61A). Sono stati mantenuti i parametri usati in precedenza a 30 kPa e 10 mm/s, ma il risultato è stato insoddisfacente dal punto di vista dell'accuratezza delle porosità. Di conseguenza è stata abbassata anche la pressione a 20 kPa, ottenendo una struttura con lo stesso numero di pori del modello scelto, seppur non tutti della stessa forma (Figura 61B).

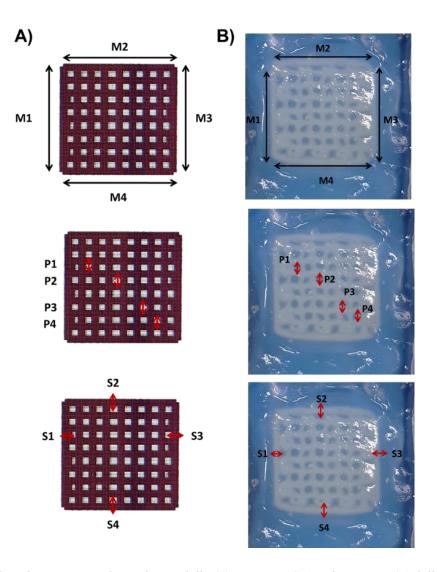


Figura 60 - Grandezze geometriche analizzate dalla (A) geometria CAD selezionata e (B) dallo scaffold.

Questa disuniformità, però, è stata riscontrata anche nella geometria CAD (Figura 61A) come riportato in Tabella 17, in cui è stata ottenuta la stessa dimensione dei pori per entrambi i campioni. Invece, la lunghezza dei lati del perimetro dello scaffold è risultato 0.3 mm più piccola, rispetto il modello geometrico, suggerendo che questo risultato potesse essere una conseguenza dei fenomeni di ristringimento dovuti alla reticolazione. Infatti la presenza di molti strati sovrapposti può portare a qualche distorsione delle dimensioni finali [72].

In conclusione, i dati ottenuti per questa geometria sono risultati positivi, perché è stato possibile ottenere uno scaffold con pori molto piccoli e ravvicinati, evitando il collasso o la fusione del filamento con quelli vicini durante l'estrusione.

Tabella 17 - Analisi statistica delle dimensioni ricavate dallo scaffold con altezza 3 mm, rispetto la geometria desiderata.

	M1-M4 (mm)		P1-P4 (mm)		S1-S6 (mm)	
CAMPIONE	Media	Deviazione Standard	Media	Deviazione Standard	Media	Deviazione Standard
GEOMETRIA CAD	9.3	0.2	0.5	0.1	0.6	0.01
SCAFFOLD	9	0.1	0.5	0.07	0.5	0.1

Infine, partendo sempre dai parametri ottenuti per la geometria a reticolo (Linear), di 30 kPa per la pressione e 8 mm/s per la velocità della testina, è stata testata una forma più complessa, alveolare (Honeycomb) con un riempimento dello strato al 20% (Figura 62A), stampando una struttura di 3 mm di altezza. Questo test è stato condotto per osservare l'influenza dei parametri di stampa, precedentemente ottimizzati, nel caso di una geometria con pori di forma esagonali, grandi pochi millimetri. I risultati ottenuti sono stati riassunti nella Figura 62 e Tabella 18.

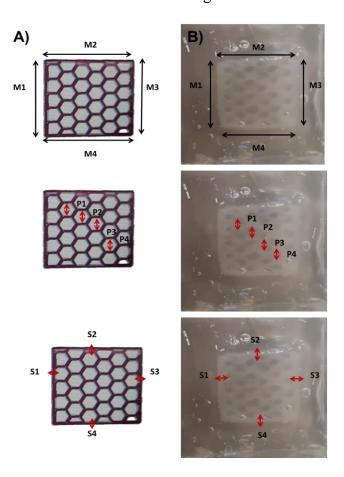


Figura 61 - Dimensioni misurate per una geometria Honeycomb 20% infill (A) CAD, (B) scaffold.

Dall'analisi visiva dello scaffold è possibile osservare, che tutti i pori del modello sono stati realizzati, anche se le dimensioni sono risultate più piccole di 0.3 mm rispetto quelle della geometria CAD (Tabella 18). Al contrario, la lunghezza dei lati del perimetro della struttura realizzata era più grande di 0.1 mm, seppur con un valore di deviazione standard molto basso, indicando l'uniformità delle misure. Invece, osservando il valore della deviazione standard del modello CAD è stato possibile concludere che le misure dei lati della geometria scelta non sono tutte uguali, di conseguenza, i risultati ottenuti sono stati accettati come positivi, confermando che i parametri precedentemente ottimizzati fossero appropriati anche per questo tipo di struttura.

Tabella 18 - Analisi statistica delle dimensioni ricavate dallo scaffold con altezza 3 mm, rispetto la geometria desiderata.

	M1-M4 (mm)		P1-P4 (mm)		S1-S6 (mm)	
CAMPIONE	Media	Deviazione Standard	Media	Deviazione Standard	Media	Deviazione Standard
GEOMETRIA CAD	9.2	0.6	1.5	0.06	0.4	0.1
SCAFFOLD	9.3	0.1	1.2	0.02	0.4	0.1

Questi parametri, riassunti e riportati nella Tabella 19, sono strettamente dipendenti dalla sospensione e dal suo stato di omogeneità [71]. Inoltre, per quanto sia indicato l'utilizzo di aghi con piccoli diametri per raggiungere risoluzioni elevate e precisione nella deposizione del materiale, questi allo stesso tempo possono ostacolare l'estrusione a causa delle alte sollecitazioni di taglio in gioco [95].

Tabella 19 - Riassunto dei parametri utilizzati durante i processi di stampa della formulazione GEN-Coll/MBG/nanoHA nel bagno di supporto a base di alginato.

GEOMETRIA	INFILL (%)	DIMENSIONI (mm)	PRESSIONE E VELOCITÀ DI STAMPA
LINEAR	15	10x10x3	30 kPa – 8mm/s
LINEAR	15	10x10x0.3	30 kPa – 8mm/s
HONEYCOMB	20	10x10x3	30 kPa – 8mm/s

GRID	20	10x10x3	30 kPa – 8mm/s
GRID	20	10x10x1	30 kPa – 10mm/s
GRID	30	10x10x3	20 kPa – 10mm/s

Per concludere, gli ultimi parametri ottimizzati per la geometria a griglia (Gird) con riempimento dello strato al 30 % sono stati testati per un modello 3D di osso, con altezza di 6 mm e 8 mm, derivante da un file STL di un campione di osso trabecolare analizzato con la microCT. La realizzazione di geometrie così irregolari comporta spostamenti dell'ago molto rapidi su più punti nel piano di stampa, di conseguenza per cercare di ottenere tutti gli strati interconnessi ed avere dei movimenti dell'ago più regolari durante l'estrusione, è stata impostata una geometria Grid con riempimento dello strato del 80% e del' 75%, rispettivamente per i due modelli. La selezione di questo parametro ha permesso di riempire ogni strato del modello di osso con un susseguirsi di linee parallele e perpendicolari, ottimizzando così l'estrusione di una struttura completamente irregolare.

Tabella 20 - Riassunto dei parametri di stampa scelti per il modello osseo.

GEOMETRIA	INFILL (%)	DIMENSIONI (mm)	PRESSIONE E VELOCITA' DI STAMPA
BONE-STL	75	6x6x6	20 kPa – 10mm/s
BONE-STL	80	8x8x8	20 kPa – 10mm/s

Gli scaffold ottenuti (Figura 63 A-D) hanno dimostrato una buona fedeltà di stampa alla geometria di partenza (Figura 63 E), ottenendo una buona risoluzione finale.

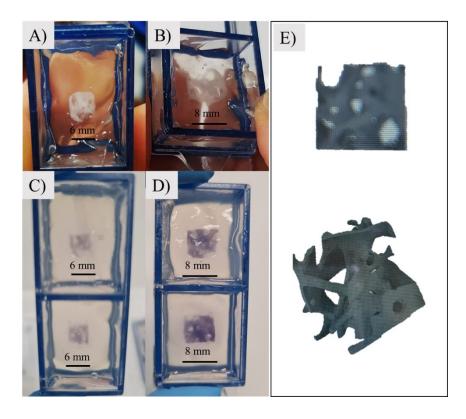


Figura 62 - Modello osseo stampato con altezza (A) di 6 mm e (B) 8 mm; post incubazione a 37 °C per 24 ore (C) 6 mm e (D) 8 mm. (E) Geometria CAD di riferimento.

Successivamente tutti i campioni realizzati sono stati incubati per 24 ore a 37 °C, per favorire i processi di reticolazione del collagene e di rimozione del bagno (Figura 63 C-D). Il bagno è stato rimosso utilizzando una soluzione acquosa di alginato liasi 0.8 wt%, come descritto nel paragrafo 3.1.6. La concentrazione ideale di enzima, per la rimozione del gel in eccesso, è stata ottenuta dopo aver testato diverse concentrazioni in soluzione acquosa. Il meccanismo dell'azione delle liasi è basato su una reazione in cui avviene la rimozione della carica negativa sull'anione carbossilato (COO-), favorendo l'estrazione base-catalizzata del protone sul carbonio C(5). Infine, come ultimo step, si ha una β-eliminazione del legame 4-O-glicosidico, degradando completamente l'alginato [87].

La soluzione è stata aggiunta solo dopo aver rimosso manualmente lo slurry intorno allo scaffold, permettendo l'interazione con quello rimanente all'interno delle porosità. I campioni ottenuti hanno mostrato l'effettiva reticolazione del materiale grazie all'azione della genipina, attraverso una colorazione blu/viola delle strutture finali (Figura 63 C- D e Figura 64 A-B) [83]. Inoltre, si può osservare che la geometria sottile contenente piccole porosità è stata mantenuta fino alla fine del processo di lavaggio del bagno di supporto (Figura 64 A), al contrario la struttura del modello osseo (Figura 64 B), rimuovendo il bagno è collassata, a causa delle sue scarse proprietà viscoelastiche che non hanno supportato il peso generato dai tanti strati estrusi.

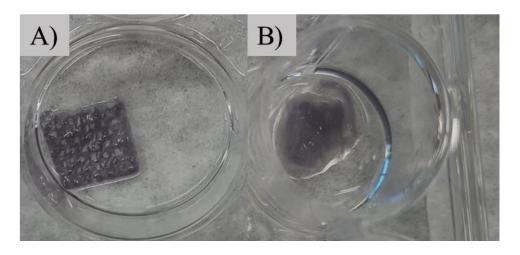


Figura 63 - Scaffold (A) Honeycomb 25% infill 10x10x0.3 mm (B) Modello osseo 6 mm di altezza, post reticolazione e lavaggi.

## 4.6. Caratterizzazione morfologica degli scaffold

Per confermare la distribuzione delle componenti inorganiche all'interno della matrice organica e la ricostruzione delle fibrille di collagene dopo i processi di reticolazione, è stata analizzata la morfologia degli scaffold realizzati tramite delle analisi di caratterizzazione non distruttive. In particolare, attraverso l'analisi al Microscopio a Scansione Elettronica (SEM) è stato possibile osservare la distribuzione degli MBG all'interno della matrice collagenica, mentre l'analisi al Microscopio a Scansione Elettronica ed Emissione di Campo (FESEM) ha permesso di ottenere una maggior risoluzione delle immagini, mostrando la dispersione di entrambi gli elementi della fase inorganica, i vetri bioattivi mesoporosi e le nanoparticelle di idrossiapatite, troppo piccole per essere osservate utilizzando il SEM.

Le immagini riportate nella Figura 65 A-B, sono state ottenute ad un ingrandimento di 1000x in cui è stata osservata la matrice di collagene, indicata con le frecce rosse, con all'interno delle piccole particelle rotonde, ad indicare la presenza degli MBG (cerchi blu).

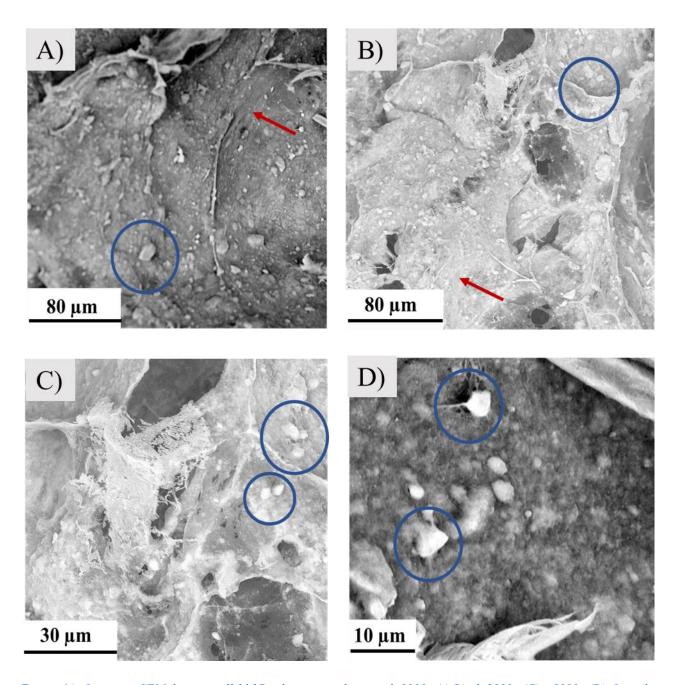


Figura 64 - Immagini SEM di uno scaffold 3D ad un ingrandimento di 1000x (A-B), di 2500x (C) e 5000x (D). I cerchi blu indicano gli MBG nella matrice di collagene, indicata con le frecce rosse.

Aumentando l'ingrandimento dell'immagini (2500x e 5000x) è stata osservata maggiormente la forma e la presenza degli MBG tra le fibre di collagene (Figura 65 C-D). In accordo agli studi precedentemente effettuati, la distribuzione delle particelle lungo le fibre ha portato alla formazione di nanostrutture, con dispersione della fase minerale all'interno, simili a quelle del collagene della matrice ossea [34], [43]. I sistemi biomimetici nanostrutturati si sono dimostrati utili non solo per la differenziazione osteogenica delle cellule staminali, ma anche per accelerare la cinetica di mineralizzazione in vivo [29], [50].

Per poter osservare anche la presenza della nanoHA, sono state condotte delle analisi tramite FE-SEM che hanno permesso di ottenere immagini più pulite e meno distorte con una risoluzione spaziale fino a 1 nm, da tre a sei volte migliore rispetto al SEM [89].

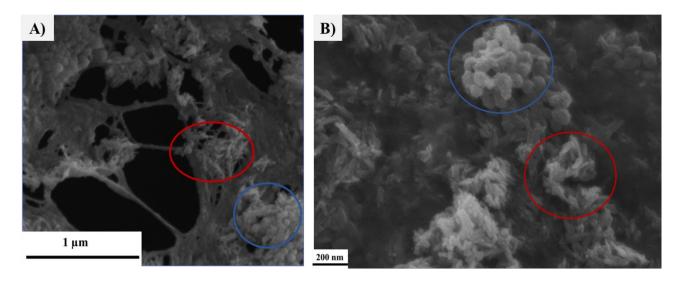


Figura 65 - Immagini FE-SEM di uno scaffold 3D in cui è evidenziata la presenza della nanoHA (cerchio rosso) e degli MBG (cerchio blu).

Nell'immagine (Figura 66 A-B) le particelle di nanoHA sono state indicate con il cerchio rosso, in è stato possibile osservarle nella loro forma allungata, ricavata a seguito di un'ottimizzazione del processo idrotermale, in accordo con gli studi di Montalbano et al. [54]. Invece, gli MBG sono stati indicati attraverso cerchio blu, in cui è stata maggiormente evidenziata la loro forma sferica.

Infine, per ottenere maggiori informazioni sulla struttura tridimensionale degli scaffold, discriminando la fase organica da quella inorganica in tutto il volume, sono state eseguite delle analisi tramite microCT. I campioni analizzati sono stati due scaffold di geometria alveolare (Honeycomb), costituita da pori esagonali di circa 1 mm di lunghezza, con riempimento dello strato 25% e di dimensioni rispettivamente di 10x10x0.3 mm e 10x10x3 mm. Questi sono stati congelati, liofilizzati e successivamente sono stati posti su un apposito supporto per essere scansionati tramite microCT (Figura 67).

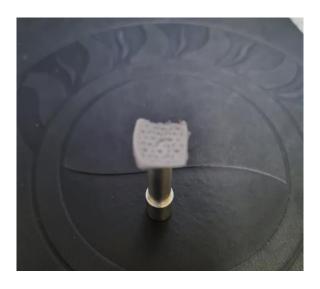


Figura 66 - Scaffold su supporto idoneo per l'analisi alla microCT.

Le strutture a base di collagene hanno un assorbimento molto vicino all'aria, quindi per ottenere una miglior discriminazione del materiale rispetto allo sfondo è stato deciso di non utilizzare filtri, selezionando  $50~\rm kV$  e  $200~\mu A$ , ed è stata impostata una risoluzione di  $6~\mu m$  con uno step di rotazione di  $0.2^{\circ}$ . Col software NRecon sono state ottenute le sezioni ricostruite, immagini bidimensionali in scala di grigio (256 toni di grigio). Per convenzione, la gradazione più chiara si ritrova in corrispondenza dei materiali con maggiore assorbimento di raggi X. Inoltre, i pixel size sono pari alla risoluzione selezionata nella fase di acquisizione. In questa fase è stato impostato il limite di intensità, che per la struttura 10x10x3~mm è stato un range da 0~a~0.67, mentre per quella con spessore 0.3~mm da 0~a~0.2.

Sono stati corretti degli errori di acquisizione attraverso il:

- RING ARTIFACT REDUCTION: corregge il ring artifact, che si verifica per il malfunzionamento di un elemento del detector, non rilevando correttamente l'intensità della radiazione che lo colpisce. Se la correzione è eccessiva crea un offuscamento dell'immagine.
- BEAM-HARDENING CORRECTION: riduce il beam hardening, derivante dalla natura policromatica della radiazione. I raggi meno intensi, infatti, vengono assorbiti dalla superficie del campione, causando una misura maggiore e non veritiera della densità della superficie.

Infine, è stata effettuata l'analisi volume, in cui le immagini derivanti dalla fase di ricostruzione sono state elaborate da un opportuno software per la visualizzazione 3D (CTVox) del volume del campione. È stata spostata la soglia del livello di opacità verso valori di attenuazione più alti, in modo da rendere trasparenti i materiali aventi un'attenuazione più bassa, come ad esempio l'aria. Con la modalità MIP (Figura 68A), in cui il modello 3D è stato presentato in bianco e nero, è stato possibile

osservare le zone più dense di materiale (bianco), discriminando la parte organica ed inorganica della matrice. A conferma delle analisi precedentemente svolte [34], [43], è stata osservata un dispersione uniforme delle particelle all'interno del collagene. È stato anche regolato il colore a seconda dell'assorbimento dei materiali (Figura 68 B-C) in cui quelli più assorbenti hanno colore blu, quelli intermedi verde e quelli meno assorbenti hanno colore rosso. Dalle immagini si osserva come aumentando la quantità di materiale, sia stato possibile ottenere una maggiore discriminazione tra il collagene (colore rosso) e la fase inorganica (verde e blu) con le particelle di MBG e nanoHA, presenti in aggregati e disperse nella matrice di collagene. Nella struttura di 0.3 mm di altezza (Figura 68C), è stato sempre possibile osservare la presenza di due fasi disperse uniformemente in tutto il campione, ma apprezzando in minor modo la forma e la disposizione delle particelle inorganiche nella matrice collagenica. Questo risultato è stato correlato alla quantità di materiale analizzato, che nel caso di spessori così sottile è risultato essere poco per permette di ottenere un'analisi maggiormente dettagliata.

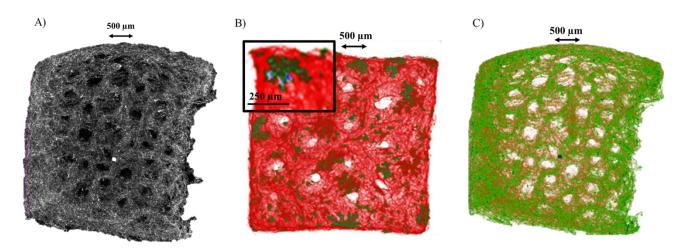


Figura 67 - Ricostruzione della struttura 3D attraverso la MIP (A) Honeycomb 10x10x0.3 mm ed attraverso i colori di assorbimento (B) Honeycomb 10x10x3 mm (B) Honeycomb 10x10x0.3 mm.

Inoltre, attraverso il programma di CTVol è stato possibile modellizzare le superfici del campione e visualizzare il modello in 3D, assegnando la scala di misura di riferimento e permettendo di ottenere le dimensioni dei lati che sono risultate concordi a quelle impostate durante la fase di stampa, conservando le porosità di 500 µm. Lo studio attraverso microCT permette la valutazione dettagliata delle strutture fino alla nano-scala , il che risulta di estrema importanza per la realizzazione di scaffold con microporosità [38], garantendo di valutare non solo la distribuzione e la grandezza dei pori ma anche di discriminare gli elementi presenti all'interno dei campioni.

## 4.7. Caratterizzazione biologica in vitro: biocompatibilità degli scaffold

Come descritto precedentemente, in questo studio è stata testata la reticolazione chimica del collagene attraverso l'utilizzo della genipina, reticolante di origine naturale, per ottenere una maggiore rigidità meccanica e stabilità dei sistemi sviluppati a base di collagene. Questo agente naturale è in grado di indurre la reticolazione del collagene, attraverso l'instaurazione di legami covalenti tra le catene polimeriche del polimero naturale, inoltre possiede una bassa citotossicità e genotossicità rispetto ad altri agenti di reticolazione chimici [44]. Nonostante sia stato dimostrato che la biocompatibilità della genipina sia superiore rispetto ad altri comuni reticolanti chimici del collagene come carbodiimmidi e glutaraldeide, sono stati presentati risultati contrastati in cui non è stato ancora raggiunto un'accettazione comune sui limiti di concentrazione e sulle condizioni di processo da utilizzare [41], [43], [83].

Come discusso nella Sezione 3.2.1, gli effetti della reticolazione della genipina sono stati testati utilizzando due processi: una reticolazione *in-situ*, attraverso la dispersione di 0.1 wt% di polveri all'interno della formulazione ibrida a base di collagene, con cui sono stati stampati gli scaffold, e successivamente, dopo aver favorito la transizione sol-gel dei campioni realizzati, è stata aggiunta una fase di post reticolazione incubando i costrutti in una soluzione di 0.5 wt% di genipina/etanolo. Nonostante siano stati osservati gli effetti benefici dovuti alle maggiori proprietà meccaniche e alla riduzione della perdita di stronzio, è stata valutata la citocompatibilità per avere ulteriori informazioni sugli effetti della genipina sui sistemi realizzati.

I test biologici sono stati eseguiti utilizzando delle cellule simili agli osteoblasti con la linea cellulare MG63, ampiamente segnalata come un potente strumento nel campo della biologia di base e applicata grazie alla maggiore disponibilità cellulare rispetto alle cellule primarie, e alla conseguente riproducibilità dei risultati [96]. La valutazione della citocompatibilità è stata effettuata osservando la vitalità cellulare dopo 24 ore e 72 ore dalla semina cellulare mediante test XTT, mentre la morfologia cellulare è stata successivamente analizzata mediante Microscopia a Scansione Elettronica (SEM).

Dopo aver seminato le MG63 sugli scaffold, preparati come descritto nella Sezione 2.2.4, è stata misurata la vitalità sottraendo il valore di fondo relativo al biomateriale senza cellule (cioè circa 120 RFU) dall'RFU di cellule- campioni seminati. Il campione di controllo delle MG63 seminate su TCP standard ed analizzato a 24 ore e 72 ore è stato preso come campione di riferimento, 100% di cellule vitali, per calcolare la vitalità percentuale degli altri campioni.

I risultati riportati nella Figura 69 hanno confermato la vitalità di MG63 su entrambi i campioni reticolati, GEN-Coll/MBG/nanoHA e GEN-Coll/MBG/nanoHA +GEN, dopo 24 e 72 ore di coltura, con una vitalità superiore osservata per i campioni che hanno subito un ulteriore trattamento di reticolazione attraverso l'incubazione in genipina/etanolo. Come chiaramente visibile dalla Figura 69, anche se non è stata osservata la proliferazione cellulare, la vitalità cellulare complessiva è stata mantenuta dopo 72 ore dalla semina, confermando la biocompatibilità di entrambi gli scaffold realizzati.

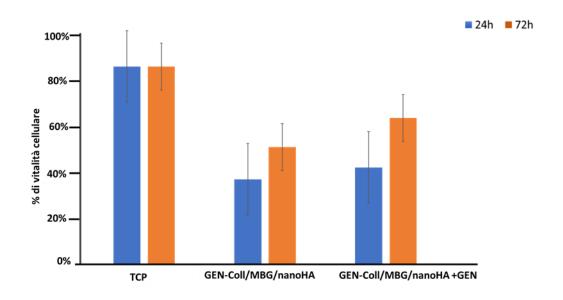


Figura 68 - Istogramma raffigura la vitalità cellulare delle MG63 tramite XTT, seminate sugli scaffold GEN-Coll/MBG/nanoHA e GEN-Coll/MBG/nanoHA +GEN comparato con il TCP a 24 e 72 ore.

Successivamente, sono state valutate l'adesione cellulare e la morfologia delle cellule MG63 su entrambi gli scaffold GEN-Coll/MBG/nanoHA e GEN-Coll/MBG/nanoHA +GEN, dopo la raccolta a 72 ore e 7 giorni mediante SEM, come mostrato nella Figura 70.

In dettaglio, a 72 ore di coltura un elevato numero di cellule MG63 ha aderito alla superficie di entrambi i campioni, osservando un maggior appiattimento e una forma cellulare più allungata sugli scaffold GEN-Coll/MBG/nanoHA +GEN (Figura 71 E-F). Questo comportamento è stato mantenuto ed evidenziato anche dopo 7 giorni di cultura cellulare, in cui si osserva una buona proliferazione con la presenza di molti contatti tra cellule vicine come rappresentato in Figura 71 C-G.

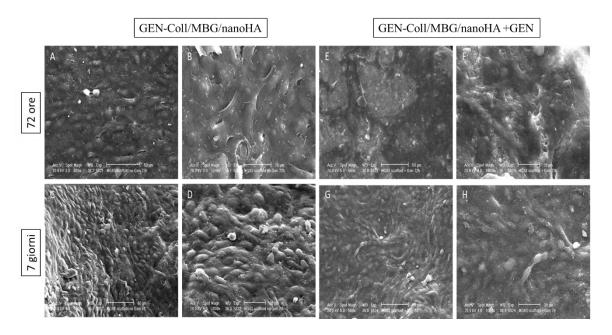


Figura 69 - Immagini SEM delle cellule MG63 seminate sugli scaffold GEN-Coll/MBG/nanoHA e GEN-Coll/MBG/nanoHA +GEN. (Scala di misura: A, E, C e D 50 μm; B, F, D e H 20 μm).

Successivamente sono state riportate le immagini SEM delle analisi istologiche effettuate su entrambi i tipi di scaffold, GEN-Coll/MBG/nanoHA e GEN-Coll/MBG/nanoHA +GEN, precedentemente trattati con ematossilina ed eosina per evidenziare la presenza delle cellule MG63 negli scaffold, dopo 7 giorni di coltura cellulare. La figura 71 mostra una sezione degli scaffold GEN-Coll/MBG/nanoHA dove attraverso le frecce nere sono state indicate le cellule MG63 adese su tutta la superficie dei campioni.

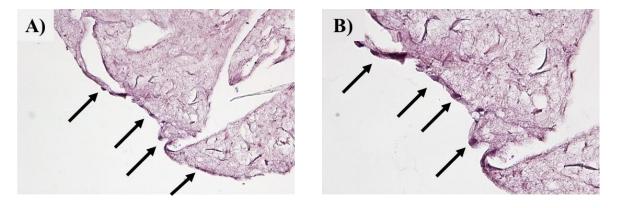


Figura 70 - Colorazione di ematossilina ed eosina su scaffold. A) Ingrandimento 20x; B) Ingrandimento 40x. Le frecce nere indicano le cellule sullo scaffold.

Nella Figura 72 A-F, viene riportata la sezione degli scaffold GEN-Coll/MBG/nanoHA +GEN in cui è stata evidenziata una maggiore adesione delle cellule MG63, indicate con le frecce nere, su tutta la superficie e anche all'interno dei pori della struttura, indicate con le frecce rosse. In questo caso sono stati effettuati diversi ingrandimenti delle immagini, in modo tale da apprezzarne meglio i dettagli.

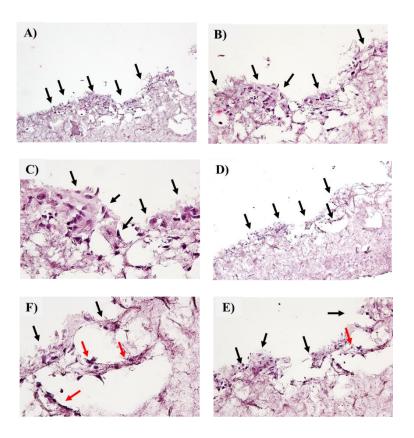


Figura 71 - Distribuzione cellulare sugli scaffold GEN-Coll/MBG/nanoHA +GEN a diversi ingrandimenti: (A-D) 10x, (B-E) 20x, (C-F) 40x. Le frecce nere sono usate per indicare la distribuzione sulla superficie, mentre quelle rosse nei pori.

Questi risultati sono concordi con gli studi precedenti svolti da Montalbano et al. [43], in cui era stata investigata la vitalità dello stesso tipo di cellule sulle strutture biocomposite a base di collagene, MBG e nanoHA, sottoposte in seguito alla transizione sol-gel del collagene ad un trattamento di post reticolazione con la soluzione 0.5% Gen/EtOH, in cui era stata confermata una vitalità cellulare crescente dopo 72 ore di coltura. In conclusione, è possibile affermare che la genipina non è risultata citotossica nelle quantità che sono state utilizzate ed entrambi gli scaffold realizzati sono biocompatibili. Inoltre, dalle analisi SEM effettuate è stata osservata una maggior adesione e proliferazione cellulare sugli scaffold realizzati con il secondo trattamento di reticolazione chimica, utilizzando la soluzione di Gen/EtOH per 24 ore, evidenziando che l'incremento delle proprietà meccaniche a seguito di questo processo ha favorito una migliore risposta cellulare di origine ossea.

## 5. Conclusioni

L'obiettivo di questa tesi magistrale è stato quello di ottimizzare strategie di stampa 3D in grado di produrre strutture complesse, utilizzabili per applicazioni nella rigenerazione del tessuto osseo, partendo da formulazioni ibride a base di collagene precedentemente sviluppate e caratterizzate come biomateriali per stampa ad estrusione.

Basandosi su studi precedenti in cui sono stati realizzati degli scaffold tramite stampa 3D ad estrusione partendo da una formulazione ibrida a base di collagene, nanoHA e MBG contenenti stronzio, sono stati sviluppati e valutati dei trattamenti di reticolazione chimica del collagene con l'obiettivo di migliorare le proprietà viscoelastiche del materiale. Il miglioramento è stato ottenuto attraverso l'utilizzo di un reticolante naturale del collagene, la genipina, in grado di creare dei legami covalenti tra le catene polimeriche, che in sinergia alla reticolazione fisica delle molecole di collagene in condizioni fisiologiche di temperatura e pH (T=37 °C e pH 7.4), promuovono la formazione di una matrice finale più stabile.

Le polveri di genipina sono state inizialmente inserite nella formulazione ibrida a base di collagene (GEN-Coll/MBG/nanoHA), per promuovere una reticolazione *in-situ* della proteina, a seguito della stampa del costrutto. Attraverso le analisi al reometro è stato possibile studiare le proprietà viscoelastiche della sospensione ottenuta, che entro le prime due ore dall'aggiunta della genipina sono risultate ottimali per la fase di estrusione, ma insufficienti a garantire la stabilità dei filamenti estrusi, portando alla necessità di utilizzare bagni sacrificali di supporto alla stampa 3D.

Sulla base di queste osservazioni, per supportare l'estrusione della sospensione GEN-Coll/MBG/nanoHA è stato sviluppato ed ottimizzato un bagno di supporto sacrificale a base di alginato, ispirandosi alla tecnica "freeform reversible embedding of suspended hydrogel "(FRESH). Questa tecnica di T.J Hinton, era stata utilizzata precedentemente dal gruppo di ricerca con il quale è stato realizzato questo lavoro, per ottenere un bagno a base di particelle di gelatina, in grado di favorire il movimento dell'ago al suo interno e contemporaneamente sostenere i filamenti estrusi, ma essendo la gelatina un derivato del collagene è soggetta anch'essa alla reticolazione per effetto della genipina, non permettendone quindi l'utilizzo in questo lavoro di ricerca.

Per lo sviluppo del bagno sacrificale a base di alginato sono stati utilizzati i protocolli della tecnica FRESH, realizzando un iniziale blocco in gel di alginato al 40 wt% con 14 wt% di CaCl<sub>2</sub>, successivamente frullato per ottenere uno slurry in grado di supportare l'estrusione del materiale durante la stampa. Le concentrazioni finali di acido alginico sodato e reticolante sono state definite in base ai risultati ottenuti dall'analisi reologica degli slurry, studiati in condizioni di sollecitazione analoghe a quelle del processo di stampa. Infine, i test di stampa 3D hanno confermato la capacità dei materiali sviluppati di supportare il filamento estruso.

Per la rimozione del bagno, a seguito della reticolazione delle strutture stampate, è stata ottimizzata una strategia che combina la rimozione manuale con una digestione enzimatica del materiale. In particolare, una volta rimossa la maggior parte del materiale di supporto, le strutture sono state immerse in una soluzione acquosa allo 0.8 wt% di alginato liasi, permettendo l'azione di digestione del materiale anche all'interno dei pori. La presenza di eventuali residui di alginato all'interno degli scaffold non comprometterebbe la biocompatibilità del sistema data la sua alta biocompatibilità dell'alginato.

Per migliorare ulteriormente la stabilità degli scaffold realizzati tramite stampa 3D, una volta eliminato il bagno di supporto, è stato aggiunto un ulteriore step di reticolazione chimica con genipina, incubando le strutture ottenute a seguito della reticolazione *in-situ* del collagene (GEN-Coll/MBG/nanoHA), in una soluzione 0.5 wt% di genipina ed etanolo (GEN-Coll/MBG/nanoHA+GEN) per 24 ore, favorendo l'ulteriore formazione di legami covalenti tra le molecole di collagene. Per apprezzare un effettivo miglioramento delle proprietà viscoelastiche ottenute, i costrutti GEN-Coll/MBG/nanoHA e GEN-Coll/MBG/nanoHA +GEN sono stati analizzati al reometro, che ha permesso di evidenziare sia un aumento della rigidezza delle strutture che un aumento del valore della temperatura di denaturazione del polimero, in funzione dei trattamenti utilizzati.

Questi risultati sono stati confermati anche tramite i test di biodegradazione *in vitro* sia in soluzione acquosa che in presenza dell'enzima collagenasi, dimostrando come la reticolazione chimica data dall'azione della genipina permetta di ottenere delle matrici di collagene più stabili. Infine, i test di rilascio degli ioni stronzio hanno confermato un ulteriore vantaggio dato dalla reticolazione, evidenziando una cinetica di rilascio degli ioni stronzio più lenta per i campioni sottoposti a reticolazione chimica, rispetto a quelli ottenuti senza l'utilizzo di genipina.

Questi dati hanno dimostrato che le strategie di reticolazione del collagene tramite genipina, permettono di ottenere una miglior stabilità e rigidezza del materiale finale e sono quindi un valido strumento per la realizzazione degli scaffold 3D stampati a base di collagene.

Dopo aver realizzato la formulazione ibrida GEN-Coll/MBG/nanoHA ed aver sviluppato il bagno sacrificale a base di alginato è stato testato il processo di stampa 3D usando una biostampante commerciale (BIOX, CellInk), al fine di trovare i parametri ottimali per ottenere strutture geometriche complesse, fedeli al modello CAD desiderato. Sono state testate diverse geometrie con diversi spessori e riempimenti dello strato stampato, evidenziando come sia necessario combinare adeguatamente i parametri di stampa, dalla velocità della testina alla pressione di estrusione, per ottenere una buona fedeltà di stampa. L'obiettivo finale era quello di realizzare uno scaffold di un modello osseo 3D, derivante da una ricostruzione ottenuta dall'analisi di microtomografia computerizzata (microCT) effettuata su campioni di osso trabecolare. Questo scopo è stato raggiunto

ottenendo strutture con altezza di 6 mm e 8 mm, attraverso l'estrusione del filamento a 10 mm/s di velocità e 20 kPa di pressione. A causa delle scarse proprietà viscoelastiche della sospensione e ai limiti tecnici della stampante 3D utilizzata, una volta rimosso il bagno, si osserva un parziale collasso della struttura stampata, portando alla perdita dell'altezza iniziale dello scaffold. Sulla base di questi risultati, gli stessi parametri e materiali utilizzati potrebbero essere testati con un'altra stampante 3D a più alta risoluzione. Inoltre, sarebbe necessario ottimizzare il modello dell'osso ottenuto con microCT, in modo da guarantire l'assenza di difetti derivati dal processo di ricostituzione.

Le strutture 3D realizzate sono state successivamente caratterizzate morfologicamente tramite Microscopia a Scansione Elettronica (SEM) e Microscopia a Scansione Elettronica ed Emissione di Campo (FESEM) e microCT, confermando la presenza degli MBG e delle nanoparticelle di idrossiapatite nel collagene, sia sulla superficie che sul volume degli scaffold realizzati.

Infine, sono stati condotti dei test *in vitro* utilizzando la linea cellulare MG63 su scaffold a struttura "honeycomb" prima e dopo l'incubazione nella soluzione reticolante, per analizzare la biocompatibilità dei materiali e del processo di stampa. I risultati hanno confermato che le quantità di genipina utilizzata nei diversi step di reticolazione non sono citotossiche, osservando una buona attività cellulare per una durata temporale di 7 giorni su entrambi i tipi di campioni. Inoltre, le analisi istologiche hanno dimostrato una colonizzazione cellulare sulla superficie e all'interno delle porosità degli scaffold, in particolare per le strutture trattate con l'ulteriore fase di post reticolazione.

Questi risultati suggeriscono che i materiali realizzati ed i processi utilizzati permettono di ottenere scaffold tridimensionali biocompatibili, sfruttabili per la rigenerazione del tessuto osseo. È inoltre risultato evidente come un ulteriore trattamento di post reticolazione permetta di garantire maggior rigidezza e stabilità delle strutture e una migliore risposta cellulare. Di conseguenza, in studi futuri, si potrebbero testare diversi tipi di cellule ossee: sane, patologiche, oppure staminali, confrontando così la risposta biologica sugli scaffold realizzati con entrambi i trattamenti di reticolazione. Inoltre, si potrebbe studiare un bio-inchiostro, incorporando delle cellule derivanti dal tessuto osseo nella formulazione ibrida utilizzata, al fine di stampare uno scaffold che emuli maggiormente il tessuto fisiologico e ne riproduca morfologia e funzionalità.

## 6. Bibliografia

- [1] B. Clarke, "Normal bone anatomy and physiology.," *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 3 Suppl 3, no. Suppl 3, pp. S131-9, Nov. 2008, doi: 10.2215/CJN.04151206.
- [2] D. W. 2nd Buck and G. A. Dumanian, "Bone biology and physiology: Part I. The fundamentals.," *Plast. Reconstr. Surg.*, vol. 129, no. 6, pp. 1314–1320, Jun. 2012, doi: 10.1097/PRS.0b013e31824eca94.
- [3] L. Bayliss, D. J. Mahoney, and P. Monk, "Normal bone physiology, remodelling and its hormonal regulation," *Surg.*, vol. 30, no. 2, pp. 47–53, 2012, doi: https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2011.12.009.
- [4] R. Florencio-Silva, G. R. da S. Sasso, E. Sasso-Cerri, M. J. Simões, and P. S. Cerri, "Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells," *Biomed Res. Int.*, vol. 2015, p. 421746, 2015, doi: 10.1155/2015/421746.
- [5] Y. Bala and E. Seeman, "Bone's Material Constituents and their Contribution to Bone Strength in Health, Disease, and Treatment.," *Calcif. Tissue Int.*, vol. 97, no. 3, pp. 308–326, Sep. 2015, doi: 10.1007/s00223-015-9971-y.
- [6] J. S. Walsh, "Normal bone physiology, remodelling and its hormonal regulation," *Surg.*, vol. 33, no. 1, pp. 1–6, 2015, doi: https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2014.10.010.
- [7] L. J. Raggatt and N. C. Partridge, "Cellular and Molecular Mechanisms of Bone Remodeling\*," *J. Biol. Chem.*, vol. 285, no. 33, pp. 25103–25108, 2010, doi: https://doi.org/10.1074/jbc.R109.041087.
- [8] M. Prideaux, D. M. Findlay, and G. J. Atkins, "Osteocytes: The master cells in bone remodelling," *Curr. Opin. Pharmacol.*, vol. 28, pp. 24–30, 2016, doi: https://doi.org/10.1016/j.coph.2016.02.003.
- [9] U. Kini and B. N. Nandeesh, "Physiology of Bone Formation, Remodeling, and Metabolism," in *Radionuclide and Hybrid Bone Imaging*, I. Fogelman, G. Gnanasegaran, and H. van der Wall, Eds. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2012, pp. 29–57.
- [10] Office of the Surgeon General (US). Bone Health and Osteoporosis: A Report of the Surgeon General. Rockville (MD): Office of the Surgeon General (US); 2004. PMID: 20945569. Rockville (MD), 2004.

- [11] B. L. Riggs and L. J. 3rd Melton, "The worldwide problem of osteoporosis: insights afforded by epidemiology.," *Bone*, vol. 17, no. 5 Suppl, pp. 505S-511S, Nov. 1995, doi: 10.1016/8756-3282(95)00258-4.
- [12] P. Pisani *et al.*, "Major osteoporotic fragility fractures: Risk factor updates and societal impact.," *World J. Orthop.*, vol. 7, no. 3, pp. 171–181, Mar. 2016, doi: 10.5312/wjo.v7.i3.171.
- [13] E. Hernlund *et al.*, "Osteoporosis in the European Union: medical management, epidemiology and economic burden. A report prepared in collaboration with the International Osteoporosis Foundation (IOF) and the European Federation of Pharmaceutical Industry Associations (EFPIA).," *Arch. Osteoporos.*, vol. 8, no. 1–2, p. 136, 2013, doi: 10.1007/s11657-013-0136-1.
- [14] J. A. Kanis, "Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis: synopsis of a WHO report. WHO Study Group.," *Osteoporos. Int. a J. Establ. as result Coop. between Eur. Found. Osteoporos. Natl. Osteoporos. Found. USA*, vol. 4, no. 6, pp. 368–381, Nov. 1994, doi: 10.1007/BF01622200.
- [15] M. T. Drake, B. L. Clarke, and E. M. Lewiecki, "The Pathophysiology and Treatment of Osteoporosis," *Clin. Ther.*, vol. 37, no. 8, pp. 1837–1850, 2015, doi: https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2015.06.006.
- [16] S. C. Goode, T. F. Wright, and C. Lynch, "Osteoporosis Screening and Treatment: A Collaborative Approach," *J. Nurse Pract.*, vol. 16, no. 1, pp. 60–63, 2020, doi: https://doi.org/10.1016/j.nurpra.2019.10.017.
- [17] J. A. Kanis, L. J. Melton III, C. Christiansen, C. C. Johnston, and N. Khaltaev, "The diagnosis of osteoporosis," *J. Bone Miner. Res.*, vol. 9, no. 8, pp. 1137–1141, 1994, doi: https://doi.org/10.1002/jbmr.5650090802.
- [18] R. Dimitriou, E. Jones, D. McGonagle, and P. V Giannoudis, "Bone regeneration: current concepts and future directions," *BMC Med.*, vol. 9, no. 1, p. 66, 2011, doi: 10.1186/1741-7015-9-66.
- [19] M. R. Iaquinta *et al.*, "Innovative Biomaterials for Bone Regrowth.," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, no. 3, Jan. 2019, doi: 10.3390/ijms20030618.
- [20] F. R. A. J. Rose and R. O. C. Oreffo, "Bone tissue engineering: hope vs hype.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 292, no. 1, pp. 1–7, Mar. 2002, doi: 10.1006/bbrc.2002.6519.

- [21] A. Oryan, S. Alidadi, A. Moshiri, and N. Maffulli, "Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions.," *J. Orthop. Surg. Res.*, vol. 9, no. 1, p. 18, Mar. 2014, doi: 10.1186/1749-799X-9-18.
- [22] "A Manual for Biomaterials/Scaffold Fabrication Technology," *Manuals in Biomedical Research*, vol. Volume 4. WORLD SCIENTIFIC, p. 288, Jul. 01, 2007, doi: doi:10.1142/6408.
- [23] M. Navarro, A. Michiardi, O. Castaño, and J. A. Planell, "Biomaterials in orthopaedics," *J. R. Soc. Interface*, vol. 5, no. 27, pp. 1137–1158, Oct. 2008, doi: 10.1098/rsif.2008.0151.
- [24] C. M. Agrawal and R. B. Ray, "Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 55, no. 2, pp. 141–150, May 2001, doi: https://doi.org/10.1002/1097-4636(200105)55:2<141::AID-JBM1000>3.0.CO;2-J.
- [25] J. Henkel *et al.*, "Bone Regeneration Based on Tissue Engineering Conceptions A 21st Century Perspective.," *Bone Res.*, vol. 1, no. 3, pp. 216–248, Sep. 2013, doi: 10.4248/BR201303002.
- [26] T. Ghassemi, A. Shahroodi, M. H. Ebrahimzadeh, A. Mousavian, J. Movaffagh, and A. Moradi PhD, "Current Concepts in Scaffolding for Bone Tissue Engineering," *Arch. Bone Jt. Surg.*, vol. 6, no. 2, pp. 90–99, 2018, doi: 10.22038/abjs.2018.26340.1713.
- [27] K. Jahan and M. Tabrizian, "Composite biopolymers for bone regeneration enhancement in bony defects," *Biomater. Sci.*, vol. 4, no. 1, pp. 25–39, 2016, doi: 10.1039/C5BM00163C.
- [28] L. H. He *et al.*, "Role of Bone Marrow Stromal Cells in Impaired Bone Repair from BRONJ Osseous Lesions," *J. Dent. Res.*, vol. 96, no. 5, pp. 539–546, Feb. 2017, doi: 10.1177/0022034517691507.
- [29] T. S. Srivatsan, "Biomaterials: A Nano Approach, by Sreeram Ramakrishna, Murugan Ramalingam, T. S. Sampath Kumar, and Winston O. Soboyejo," *Mater. Manuf. Process.*, vol. 29, no. 11–12, pp. 1510–1511, Dec. 2014, doi: 10.1080/10426914.2014.950068.
- [30] B. D. Ratner and S. J. Bryant, "Biomaterials: where we have been and where we are going.," *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, vol. 6, pp. 41–75, 2004, doi: 10.1146/annurev.bioeng.6.040803.140027.
- [31] P. K. Chu and X. Liu, Biomaterials fabrication and processing: Handbook. 2008.
- [32] M. Kikuchi, J. Tanaka, Y. Koyama, and K. Takakuda, "Cell culture test of TCP/CPLA composite.," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 48, no. 2, pp. 108–110, 1999, doi: 10.1002/(sici)1097-4636(1999)48:2<108::aid-jbm2>3.0.co;2-f.

- [33] J. E. Devin, M. A. Attawia, and C. T. Laurencin, "Three-dimensional degradable porous polymer-ceramic matrices for use in bone repair.," *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, vol. 7, no. 8, pp. 661–669, 1996, doi: 10.1163/156856296x00435.
- [34] G. Montalbano *et al.*, "Development and Biocompatibility of Collagen-Based Composites Enriched with Nanoparticles of Strontium Containing Mesoporous Glass.," *Mater. (Basel, Switzerland)*, vol. 12, no. 22, Nov. 2019, doi: 10.3390/ma12223719.
- [35] J. Leijten, Y. C. Chai, I. Papantoniou, L. Geris, J. Schrooten, and F. P. Luyten, "Cell based advanced therapeutic medicinal products for bone repair: Keep it simple?," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 84, pp. 30–44, Apr. 2015, doi: 10.1016/j.addr.2014.10.025.
- [36] S. Chattopadhyay and R. T. Raines, "Collagen-based biomaterials for wound healing," *Biopolymers*, vol. 101, no. 8, pp. 821–833, Aug. 2014, doi: https://doi.org/10.1002/bip.22486.
- [37] R. A. Pérez, J.-E. Won, J. C. Knowles, and H.-W. Kim, "Naturally and synthetic smart composite biomaterials for tissue regeneration.," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 65, no. 4, pp. 471–496, Apr. 2013, doi: 10.1016/j.addr.2012.03.009.
- [38] L. Roseti *et al.*, "Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the art and new perspectives.," *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.*, vol. 78, pp. 1246–1262, Sep. 2017, doi: 10.1016/j.msec.2017.05.017.
- [39] G. Griffanti and S. N. Nazhat, "Dense fibrillar collagen-based hydrogels as functional osteoid-mimicking scaffolds," *Int. Mater. Rev.*, vol. 65, no. 8, pp. 502–521, Nov. 2020, doi: 10.1080/09506608.2020.1735828.
- [40] B. D. Walters and J. P. Stegemann, "Strategies for directing the structure and function of three-dimensional collagen biomaterials across length scales," *Acta Biomater.*, vol. 10, no. 4, pp. 1488–1501, Apr. 2014, doi: 10.1016/j.actbio.2013.08.038.
- [41] G. M. Cunniffe and F. J. O'Brien, "Collagen scaffolds for orthopedic regenerative medicine," *JOM*, vol. 63, no. 4, p. 66, 2011, doi: 10.1007/s11837-011-0061-y.
- [42] K. Nam, T. Kimura, and A. Kishida, "Controlling coupling reaction of EDC and NHS for preparation of collagen gels using ethanol/water co-solvents.," *Macromol. Biosci.*, vol. 8, no. 1, pp. 32–37, Jan. 2008, doi: 10.1002/mabi.200700206.

- [43] G. Montalbano *et al.*, "Collagen Hybrid Formulations for the 3D Printing of Nanostructured Bone Scaffolds: An Optimized Genipin-Crosslinking Strategy," *Nanomaterials*, vol. 10, no. 9, 2020, doi: 10.3390/nano10091681.
- [44] Y. B. Kim, H. Lee, and G. H. Kim, "Strategy to Achieve Highly Porous/Biocompatible Macroscale Cell Blocks, Using a Collagen/Genipin-bioink and an Optimal 3D Printing Process," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 8, no. 47, pp. 32230–32240, Nov. 2016, doi: 10.1021/acsami.6b11669.
- [45] Y.-J. Hwang, J. Larsen, T. B. Krasieva, and J. G. Lyubovitsky, "Effect of Genipin Crosslinking on the Optical Spectral Properties and Structures of Collagen Hydrogels," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 3, no. 7, pp. 2579–2584, Jul. 2011, doi: 10.1021/am200416h.
- [46] M. N. Rahaman *et al.*, "Bioactive glass in tissue engineering.," *Acta Biomater.*, vol. 7, no. 6, pp. 2355–2373, Jun. 2011, doi: 10.1016/j.actbio.2011.03.016.
- [47] J. R. JONES, "19 Scaffolds for tissue engineering," in *Woodhead Publishing Series in Biomaterials*, L. L. Hench and J. R. B. T.-B. Jones Artificial Organs and Tissue Engineering, Eds. Woodhead Publishing, 2005, pp. 201–214.
- [48] L. L. Hench, "Bioactive materials: The potential for tissue regeneration," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 41, no. 4, pp. 511–518, Sep. 1998, doi: https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(19980915)41:4<511::AID-JBM1>3.0.CO;2-F.
- [49] D. C. Lobb, B. R. J. DeGeorge, and A. B. Chhabra, "Bone Graft Substitutes: Current Concepts and Future Expectations.," *J. Hand Surg. Am.*, vol. 44, no. 6, pp. 497-505.e2, Jun. 2019, doi: 10.1016/j.jhsa.2018.10.032.
- [50] E. S. Ahn, N. J. Gleason, A. Nakahira, and J. Y. Ying, "Nanostructure Processing of Hydroxyapatite-based Bioceramics," *Nano Lett.*, vol. 1, no. 3, pp. 149–153, Mar. 2001, doi: 10.1021/nl0055299.
- [51] J. Y. Rho, L. Kuhn-Spearing, and P. Zioupos, "Mechanical properties and the hierarchical structure of bone.," *Med. Eng. Phys.*, vol. 20, no. 2, pp. 92–102, Mar. 1998, doi: 10.1016/s1350-4533(98)00007-1.
- [52] P. Fratzl, H. S. Gupta, E. P. Paschalis, and P. Roschger, "Structure and mechanical quality of the collagen–mineral nano-composite in bone," *J. Mater. Chem.*, vol. 14, no. 14, pp. 2115–2123, 2004, doi: 10.1039/B402005G.

- [53] D. S. Gomes, A. M. C. Santos, G. A. Neves, and R. R. Menezes, "A brief review on hydroxyapatite production and use in biomedicine," *CerÃ\textcentmica*, vol. 65, pp. 282–302, 2019, [Online]. Available: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\_arttext&pid=S0366-69132019000200282&nrm=iso.
- [54] G. Montalbano, G. Molino, S. Fiorilli, and C. Vitale-Brovarone, "Synthesis and incorporation of rod-like nano-hydroxyapatite into type I collagen matrix: A hybrid formulation for 3D printing of bone scaffolds," *J. Eur. Ceram. Soc.*, vol. 40, no. 11, pp. 3689–3697, 2020, doi: https://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2020.02.018.
- [55] B. Sarker, J. Hum, S. N. Nazhat, and A. R. Boccaccini, "Combining Collagen and Bioactive Glasses for Bone Tissue Engineering: A Review," *Adv. Healthc. Mater.*, vol. 4, no. 2, pp. 176–194, Jan. 2015, doi: https://doi.org/10.1002/adhm.201400302.
- [56] S. Fiorilli *et al.*, "The Incorporation of Strontium to Improve Bone-Regeneration Ability of Mesoporous Bioactive Glasses," *Materials (Basel).*, vol. 11, no. 5, 2018, doi: 10.3390/ma11050678.
- [57] T. Albrektsson and C. Johansson, "Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration.," *Eur. spine J. Off. Publ. Eur. Spine Soc. Eur. Spinal Deform. Soc. Eur. Sect. Cerv. Spine Res. Soc.*, vol. 10 Suppl 2, no. Suppl 2, pp. S96-101, Oct. 2001, doi: 10.1007/s005860100282.
- [58] T. Gong, J. Xie, J. Liao, T. Zhang, S. Lin, and Y. Lin, "Nanomaterials and bone regeneration," *Bone Res.*, vol. 3, no. 1, p. 15029, 2015, doi: 10.1038/boneres.2015.29.
- [59] P. Naruphontjirakul, A. E. Porter, and J. R. Jones, "In vitro osteogenesis by intracellular uptake of strontium containing bioactive glass nanoparticles.," *Acta Biomater.*, vol. 66, pp. 67–80, Jan. 2018, doi: 10.1016/j.actbio.2017.11.008.
- [60] C. Wu, Y. Ramaswamy, D. Kwik, and H. Zreiqat, "The effect of strontium incorporation into CaSiO3 ceramics on their physical and biological properties," *Biomaterials*, vol. 28, no. 21, pp. 3171–3181, 2007, doi: https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.04.002.
- [61] M. Alizadeh-Osgouei, Y. Li, and C. Wen, "A comprehensive review of biodegradable synthetic polymer-ceramic composites and their manufacture for biomedical applications," *Bioact. Mater.*, vol. 4, no. 1, pp. 22–36, Nov. 2018, doi: 10.1016/j.bioactmat.2018.11.003.
- [62] A. International., *Standard terminology for additive manufacturing technologies : designation F2792-12a*. West Conshohocken, PA: ASTM International, 2012.

- [63] B. Zhang, A. Goel, O. Ghalsasi, and S. Anand, "CAD-based design and pre-processing tools for additive manufacturing," *J. Manuf. Syst.*, vol. 52, pp. 227–241, 2019, doi: https://doi.org/10.1016/j.jmsy.2019.03.005.
- [64] I. Gibson, D. W. Rosen, and B. Stucker, *Additive Manufacturing Technologies: Rapid Prototyping to Direct Digital Manufacturing*, 1st ed. Springer Publishing Company, Incorporated, 2009.
- [65] J. A. Semba, A. A. Mieloch, and J. D. Rybka, "Introduction to the state-of-the-art 3D bioprinting methods, design, and applications in orthopedics," *Bioprinting*, vol. 18, p. e00070, 2020, doi: https://doi.org/10.1016/j.bprint.2019.e00070.
- [66] G. Turnbull *et al.*, "3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering," *Bioact. Mater.*, vol. 3, no. 3, pp. 278–314, 2018, doi: https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2017.10.001.
- [67] P. Serra and A. Piqué, "Laser-Induced Forward Transfer: Fundamentals and Applications," *Adv. Mater. Technol.*, vol. 4, no. 1, p. 1800099, Jan. 2019, doi: https://doi.org/10.1002/admt.201800099.
- [68] S. V Murphy and A. Atala, "3D bioprinting of tissues and organs," *Nat. Biotechnol.*, vol. 32, no. 8, pp. 773–785, 2014, doi: 10.1038/nbt.2958.
- [69] X. Zhang and Y. Zhang, "Tissue Engineering Applications of Three-Dimensional Bioprinting.," *Cell Biochem. Biophys.*, vol. 72, no. 3, pp. 777–782, Jul. 2015, doi: 10.1007/s12013-015-0531-x.
- [70] C. Kryou, V. Leva, M. Chatzipetrou, and I. Zergioti, "Bioprinting for Liver Transplantation.," *Bioeng. (Basel, Switzerland)*, vol. 6, no. 4, Oct. 2019, doi: 10.3390/bioengineering6040095.
- [71] A. Schwab, R. Levato, M. D'Este, S. Piluso, D. Eglin, and J. Malda, "Printability and Shape Fidelity of Bioinks in 3D Bioprinting," *Chem. Rev.*, vol. 120, no. 19, pp. 11028–11055, Oct. 2020, doi: 10.1021/acs.chemrev.0c00084.
- [72] N. Paxton, W. Smolan, T. Böck, F. Melchels, J. Groll, and T. Jungst, "Proposal to assess printability of bioinks for extrusion-based bioprinting and evaluation of rheological properties governing bioprintability.," *Biofabrication*, vol. 9, no. 4, p. 44107, Nov. 2017, doi: 10.1088/1758-5090/aa8dd8.
- [73] L. Ouyang, "3D Bioprinting and Bioink: Background," 2019, pp. 7–23.

- [74] T. H. Duong *et al.*, "G-code Visualization and Editing Program for Inexpensive Metal 3D Printing," *Procedia Manuf.*, vol. 17, pp. 22–28, 2018, doi: https://doi.org/10.1016/j.promfg.2018.10.007.
- [75] T. J. Hinton *et al.*, "Three-dimensional printing of complex biological structures by freeform reversible embedding of suspended hydrogels.," *Sci. Adv.*, vol. 1, no. 9, p. e1500758, Oct. 2015, doi: 10.1126/sciadv.1500758.
- [76] A. McCormack, C. B. Highley, N. R. Leslie, and F. P. W. Melchels, "3D Printing in Suspension Baths: Keeping the Promises of Bioprinting Afloat," *Trends Biotechnol.*, vol. 38, no. 6, pp. 584–593, 2020, doi: https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.12.020.
- [77] T. Bhattacharjee *et al.*, "Writing in the granular gel medium," *Sci. Adv.*, vol. 1, no. 8, p. e1500655, Sep. 2015, doi: 10.1126/sciadv.1500655.
- [78] S. R. Moxon *et al.*, "Suspended Manufacture of Biological Structures.," *Adv. Mater.*, vol. 29, no. 13, Apr. 2017, doi: 10.1002/adma.201605594.
- [79] C. B. Highley, C. B. Rodell, and J. A. Burdick, "Direct 3D Printing of Shear-Thinning Hydrogels into Self-Healing Hydrogels," *Adv. Mater.*, vol. 27, no. 34, pp. 5075–5079, Sep. 2015, doi: https://doi.org/10.1002/adma.201501234.
- [80] N. Noor, A. Shapira, R. Edri, I. Gal, L. Wertheim, and T. Dvir, "3D Printing of Personalized Thick and Perfusable Cardiac Patches and Hearts," *Adv. Sci.*, vol. 6, no. 11, p. 1900344, Jun. 2019, doi: https://doi.org/10.1002/advs.201900344.
- [81] A. Lee *et al.*, "3D bioprinting of collagen to rebuild components of the human heart," *Science* (80-.)., vol. 365, no. 6452, pp. 482 LP 487, Aug. 2019, doi: 10.1126/science.aav9051.
- [82] T. J. Hinton, A. Lee, and A. Feinberg, "3D bioprinting from the micrometer to millimeter length scales: Size does matter," *Curr. Opin. Biomed. Eng.*, vol. 1, pp. 31–37, 2017.
- [83] L. M. Delgado, K. Fuller, and D. I. Zeugolis, "(\*) Collagen Cross-Linking: Biophysical, Biochemical, and Biological Response Analysis.," *Tissue Eng. Part A*, vol. 23, no. 19–20, pp. 1064–1077, Oct. 2017, doi: 10.1089/ten.TEA.2016.0415.
- [84] R. Pandey, Z. Ahmad, S. Sharma, and G. K. Khuller, "Nano-encapsulation of azole antifungals: Potential applications to improve oral drug delivery," *Int. J. Pharm.*, vol. 301, no. 1, pp. 268–276, 2005, doi: https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.05.027.

- [85] G. Skjåk-Bræk and K. I. Draget, "10.10 Alginates: Properties and Applications," K. Matyjaszewski and M. B. T.-P. S. A. C. R. Möller, Eds. Amsterdam: Elsevier, 2012, pp. 213–220.
- [86] K. I. Draget, G. Skjåk-Bræk, and B. T. Stokke, "Similarities and differences between alginic acid gels and ionically crosslinked alginate gels," *Food Hydrocoll.*, vol. 20, no. 2, pp. 170–175, 2006, doi: https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2004.03.009.
- [87] T. Y. Wong, L. A. Preston, and N. L. Schiller, "ALGINATE LYASE: review of major sources and enzyme characteristics, structure-function analysis, biological roles, and applications.," *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 54, pp. 289–340, 2000, doi: 10.1146/annurev.micro.54.1.289.
- [88] W. Zhou, R. Apkarian, Z. Wang, and D. Joy, "Fundamentals of Scanning Electron Microscopy (SEM)," 2006, pp. 1–40.
- [89] A. Restivo, I. Degano, E. Ribechini, J. Pérez-Arantegui, and M. P. Colombini, "Field-emission scanning electron microscopy and energy-dispersive x-ray analysis to understand the role of tannin-based dyes in the degradation of historical wool textiles.," *Microsc. Microanal. Off. J. Microsc. Soc. Am. Microbeam Anal. Soc. Microsc. Soc. Canada*, vol. 20, no. 5, pp. 1534–1543, Oct. 2014, doi: 10.1017/S1431927614012793.
- [90] P. Angele *et al.*, "Influence of different collagen species on physico-chemical properties of crosslinked collagen matrices," *Biomaterials*, vol. 25, no. 14, pp. 2831–2841, 2004, doi: https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.09.066.
- [91] A. El-Fiqi, J. H. Lee, E.-J. Lee, and H.-W. Kim, "Collagen hydrogels incorporated with surface-aminated mesoporous nanobioactive glass: Improvement of physicochemical stability and mechanical properties is effective for hard tissue engineering," *Acta Biomater.*, vol. 9, no. 12, pp. 9508–9521, 2013, doi: https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.07.036.
- [92] D. P. Pacheco *et al.*, "Disassembling the complexity of mucus barriers to develop a fast screening tool for early drug discovery," *J. Mater. Chem. B*, vol. 7, no. 32, pp. 4940–4952, 2019, doi: 10.1039/C9TB00957D.
- [93] K. I. Draget, K. Steinsvåg, E. Onsøyen, and O. Smidsrød, "Na- and K-alginate; effect on Ca2+-gelation," *Carbohydr. Polym.*, vol. 35, no. 1, pp. 1–6, 1998, doi: https://doi.org/10.1016/S0144-8617(97)00237-3.
- [94] F. Loth, "Industrial gums: Polysaccharides and their derivatives. 3rd edition. Edited by Roy L. Whistler and James N. BeMiller. ISBN 0-12-746253-8.Academic Press,Inc., San Diego/New

York/Boston/London/Sidney/Tokyo/Toronto 1993.642P.," *Acta Polym.*, vol. 44, no. 3, p. 172, Jun. 1993, doi: https://doi.org/10.1002/actp.1993.010440315.

- [95] N. Diamantides *et al.*, "Correlating rheological properties and printability of collagen bioinks: the effects of riboflavin photocrosslinking and pH.," *Biofabrication*, vol. 9, no. 3, p. 34102, Jul. 2017, doi: 10.1088/1758-5090/aa780f.
- [96] E. M. Czekanska, M. J. Stoddart, J. R. Ralphs, R. G. Richards, and J. S. Hayes, "A phenotypic comparison of osteoblast cell lines versus human primary osteoblasts for biomaterials testing.," *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 102, no. 8, pp. 2636–2643, Aug. 2014, doi: 10.1002/jbm.a.34937.

## 7. Ringraziamenti

A conclusione di questo elaborato, desidero menzionare tutte le persone, senza le quali questo lavoro non sarebbe potuto esistere.

Prima di tutto vorrei ringraziare la professoressa Chiara Vitale Brovarone, relatrice di questa tesi, per avermi dato la possibilità di collaborare a questo suo progetto, permettendomi di imparare e far parte di una "super squadra", composta da sole donne ingegneri. Grazie a lei ho acquisito ulteriori conoscenze e competenze, che mi aiuteranno non solo nel lavoro ma anche nella vita.

A tal proposito ringrazio le mie co-relatrici Priscila Melo e Giorgia Montalbano per avermi accompagnata e sostenuta in questi mesi, insegnandomi i trucchi della vita in laboratorio e soprattutto per avermi trasmesso la loro passione in questo ambito. Vorrei anche ringraziare la professoressa Monica Mattioli Belmonte dell'Università Politecnica delle Marche per la collaborazione, riguardo i test cellulari *in vitro* sui campioni realizzati, permettendo di concludere al meglio il lavoro della mia tesi magistrale. Infine, ringrazio anche l'intero gruppo Iris, con il quale ho condiviso la maggior parte del tempo durante il periodo di attività sperimentale, per l'ospitalità e per le abilità che grazie a loro ho acquisito sul campo.

Ringrazio tutti i miei amici, il mio gruppo di Biomedici con il quale ho condiviso la gioia e il dolore di questi anni universitari, le notti insonni per lo studio e quelle di festa, fino a quest'ultimo traguardo. Ringrazio il mio ragazzo Federico per avermi supportato e sopportato fino alla fine. Senza di loro non sarei mai arrivata fino a qui.

È stato un anno particolarmente difficile, è scoppiata una pandemia che ha messo tutti a dura prova, ci sono stati piani rimandati, imprevisti da gestire e cambiamenti a cui adattarsi, ma per me è stato l'anno che più in assoluto mi ha regalato delle soddisfazioni professionali e personali.

Di questo non posso che ringraziare, dedicando a loro questo mio percorso, i miei genitori che hanno sempre avuto fiducia in me, sostenendomi in momenti in cui di positivo non vedevo neanche i segni matematici delle equazioni. Mi hanno permesso a soli diciotto anni di andare a studiare lontano, mille chilometri, da casa, dandomi tutto ciò di cui avevo bisogno e non facendomi mai sentire sola. La loro tenacia nel lavoro e nella vita è sempre stata una fonte di ispirazione per me, il loro affetto il mio punto fermo.

È stata una bella esperienza, difficile ma piena di soddisfazioni e non potevo concludere in maniera migliore il mio percorso che con questa tesi sperimentale. Grazie di cuore a tutti.