

POLITECNICO DI MILANO

Facoltà di Ingegneria dei Sistemi

Corso di Laurea Specialistica in Ingegneria Biomedica



**MESSA A PUNTO DI UN PROTOCOLLO
SPERIMENTALE PER LO STUDIO DELL'EFFETTO
DELLA RIGIDEZZA DELLA MATRICE SULLA
DIFFERENZIAZIONE CELLULARE
NELL'INGEGNERIA DEL TESSUTO CARDIACO**

Relatori: Prof. Manuela Teresa Raimondi

Prof. Federica Boschetti

Prof. Virginio Quaglini

Tesi di Laurea di:

Josè Antonio GUARDIANI

matr. 721051

Anno Accademico 2009-2010

a mamma, papà
e mio fratello Nicola

Indice

Sommario	pag. 1
Summary	pag. 9
1 Introduzione e obiettivi	pag. 17
1.1 La terapia tessutale dell'infarto del miocardio	pag. 17
1.2 Fattori che influenzano la differenziazione delle cellule staminali	pag. 18
1.2.1 Proprietà morfologiche della matrice	pag. 20
1.2.2 Proprietà biochimiche della matrice	pag. 22
1.2.3 Proprietà meccaniche della matrice	pag. 23
1.3 Matrici extracellulari artificiali	pag. 26
1.3.1 Polimeri naturali	pag. 27
1.3.2 Polimeri sintetici	pag. 30
1.4 Tecniche di caratterizzazione meccanica delle matrici extracellulari artificiali	pag. 32
1.4.1 La prova di trazione	pag. 33
1.4.2 La compressione confinata	pag. 33
1.4.3 La compressione non confinata	pag. 34
1.4.4 L'indentazione	pag. 34
1.4.5 La prova reologica	pag. 35
2 Materiali e Metodi	pag. 37
2.1 Individuazione e caratterizzazione di una matrice per la coltura cellulare	pag. 37
2.1.1 Cellulosa batteriana Membracel®	pag. 37
2.1.2 Il polietilene glicole (PEG)	pag. 39
2.1.3 L'alginato	pag. 41
2.1.4 L'agarosio	pag. 44
2.1.5 Formulazione di un idrogelo agarosio-alginato	pag. 45
2.1.6 Caratterizzazione meccanica	pag. 45
2.1.7 Prova di trazione	pag. 53
2.1.8 Prova di compressione non confinata	pag. 56

2.2 Calcolo dello stato di sforzo-deformazione nelle cellule e nella matrice	pag. 58
2.2.1 Identificazione dei baricentri delle microsfele incluse nella matrice	pag. 60
2.2.2 Identificazione degli stati di sforzo-deformazione	pag. 61
3 Risultati e discussione	pag. 66
3.1 Risultati della caratterizzazione meccanica	pag. 66
3.1.1 Membracel®	pag. 66
3.1.2 Il PEG	pag. 67
3.1.3 Miscela alginato-agarosio	pag. 68
3.2 Calcolo dello stato di sforzo-deformazione	pag. 75
4 Conclusione e sviluppi futuri	pag. 83
5 Appendice	pag. 86
5.1 Idrogelo agarosio-alginato a rigidità variabile - metodica di preparazione	pag. 86
5.2 Codice Matlab®	pag. 87
6 Bibliografia	pag. 99

Sommario

Introduzione e obiettivi

La terapia contro l'infarto miocardico è divenuta una delle sfide più impegnative della moderna medicina occidentale. I più recenti progressi della biologia molecolare e cellulare hanno aperto una nuova potenziale finestra terapeutica per il trattamento dell'infarto miocardico: il trapianto cellulare o cardiomioplastica cellulare (CMC), cioè l'innesto di nuove cellule nel tessuto miocardico danneggiato, capaci di rigenerare il muscolo cardiaco ripristinandone la funzione. Nonostante le cellule siano sensibili a molti fattori, quello che più ne condiziona l'esistenza è quello meccanico (1), perciò l'obiettivo di questo lavoro è quello di mettere a punto un protocollo sperimentale per lo studio dell'effetto della rigidità della matrice sulla differenziazione dei mesoangioblasti nell'ingegneria del tessuto cardiaco.

Materiali e metodi

Il primo passo è stato quello di trovare una matrice tale da consentire l'esatto differenziamento dei mesangioblasti, quindi con modulo elastico nel range 3-5kPa, per simulare la condizione fisiologica e una con modulo elastico di 35-70kPa per la condizione patologica. I materiali analizzati nel presente lavoro di tesi sono:

1. cellulosa batteriana prodotta dalla Membracel®;
2. il polietilene glicole (PEG);
3. idrogel di alginato e agarosio;

È stata formulata una miscela di alginato-agarosio poiché, il primo è dotato di una buona affinità cellulare, il secondo di ottime caratteristiche meccaniche (2). Sono state utilizzate diverse concentrazioni, per produrre la miscela, in maniera tale da ottenere un gel morbido (alginato 2% w/v, agarosio 2% w/v) e un gel rigido (alginato 2% w/v, agarosio 5% w/v). Le miscele sono state sottoposte a prove di compressione non confinata a tre livelli di deformazione: 2%, 4% e 8%. La caratterizzazione è stata svolta in un arco di tempo di 16 giorni in cui sono state effettuate otto prove al giorno, quattro per i campioni di gel rigido e quattro per i campioni di gel morbido al fine di valutare le variazioni di modulo elastico dovute alla degradazione delle matrici.

Il secondo obiettivo è stato quello di giungere alla quantificazione dello stato di sforzo e di deformazione sia della matrice, sotto l'azione dei mesangioblasti, sia delle cellule stesse. Per la quantificazione dello stato di deformazione della matrice, sono stati inseriti dei marker (microsfere fluorescenti) sotto la superficie della matrice in via di proliferazione; per la quantificazione dello stato di deformazione delle cellule, le stesse sono state modificate utilizzando la green fluorescent protein (GFP). Il microscopio a fluorescenza in time-lapse ha rilevato i movimenti dei marker e delle cellule, che stati elaborati attraverso il software MATLAB®. Si sono così ottenute informazioni di tipo globale e puntuale nel tempo per la matrice, mentre per la cellula le informazioni sono solo di tipo puntuale a riguardano il rapporto tra il primo e l'ultimo frame analizzato. Le informazioni puntuali sono state ricavate tramite funzioni di interpolazione; conoscendo poi le proprietà elastiche del mezzo è stato possibile risalire agli sforzi esercitati sulla matrice.

Risultati e conclusioni

I risultati relativi a Membracel® e al PEG hanno mostrato caratteristiche meccaniche che non rispecchiano le specifiche di progetto (Figura 1 e Figura 2, rispettivamente)

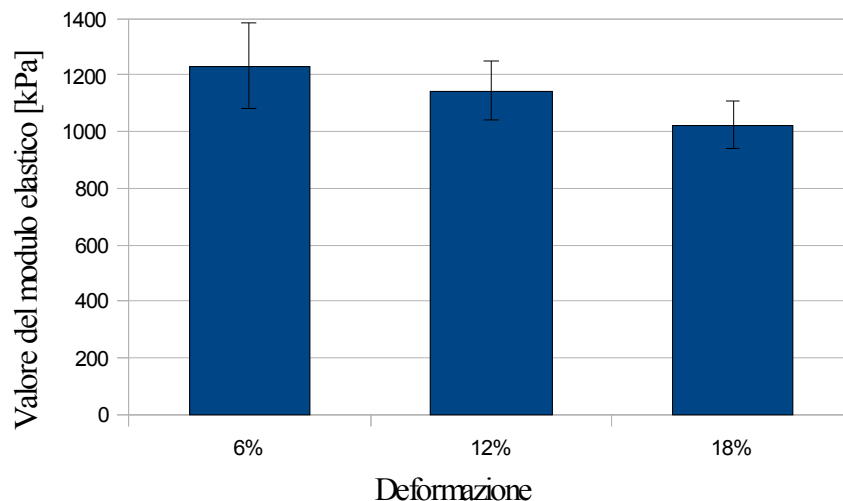


Figura 1 : Rappresentazione grafica del modulo elastico medio e deviazione standard in funzione della deformazione.

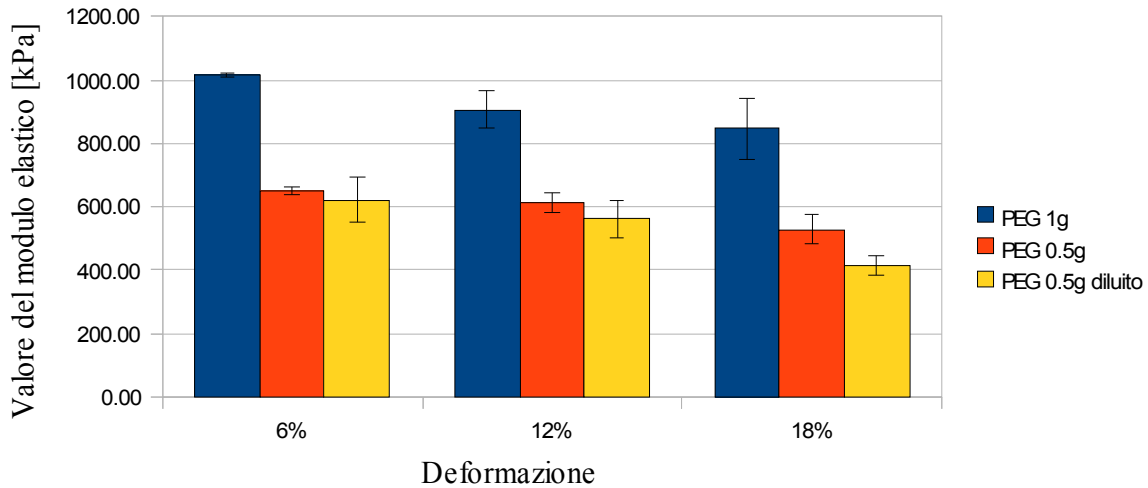


Figura 2 : Rappresentazione grafica dei valori medi del modulo elastico e delle deviazioni standard in funzione del tipo di PEG.

Mentre le proprietà della miscela alginato-agarosio sono ottime per l'obiettivo di questo lavoro di tesi (Figura 3, Figura 4, Figura 5).

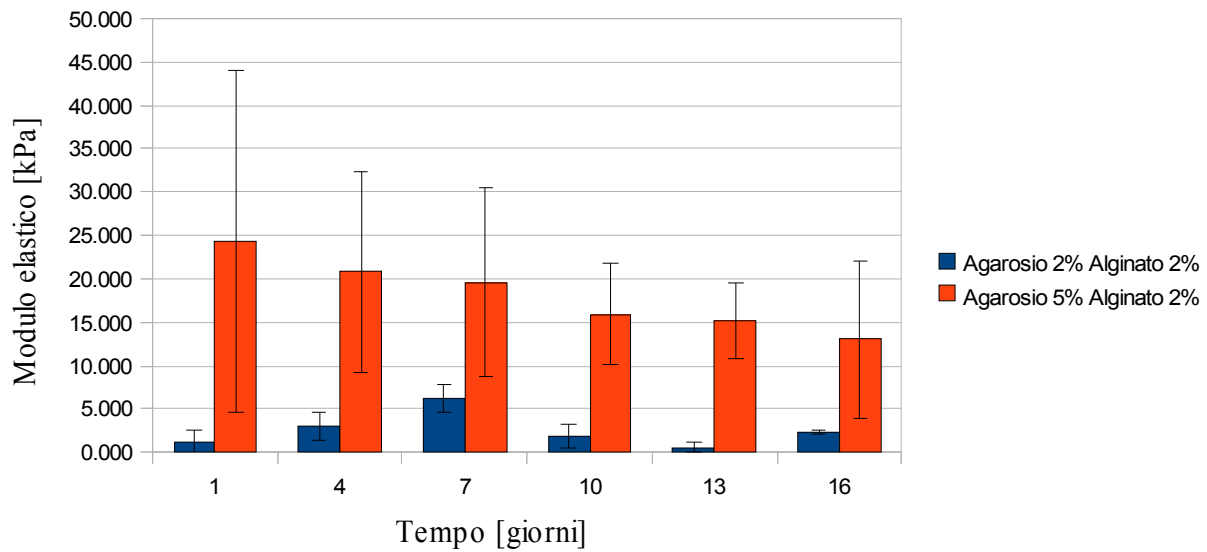


Figura 3 : Rappresentazione grafica dell'andamento nel tempo del modulo elastico della miscela di agarosio 2% alginato 2% (blu) e della miscela di agarosio 5% alginato 2% (rosso), per deformazioni del 2%.

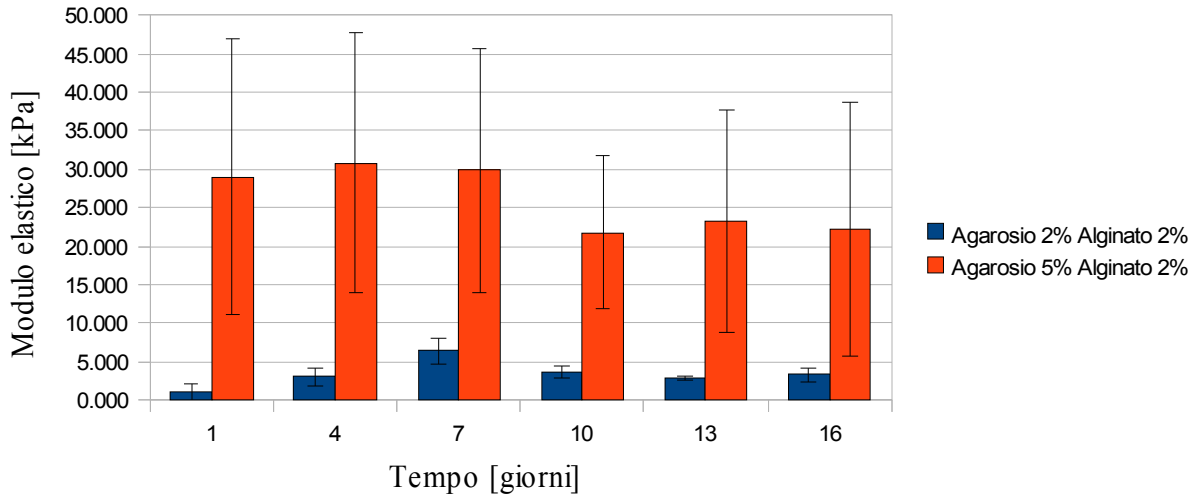


Figura 4 : Rappresentazione grafica dell'andamento nel tempo del modulo elastico della miscela di agarosio 2% alginato 2% (blu) e della miscela di agarosio 5% alginato 2% (rosso), per deformazioni del 4%.

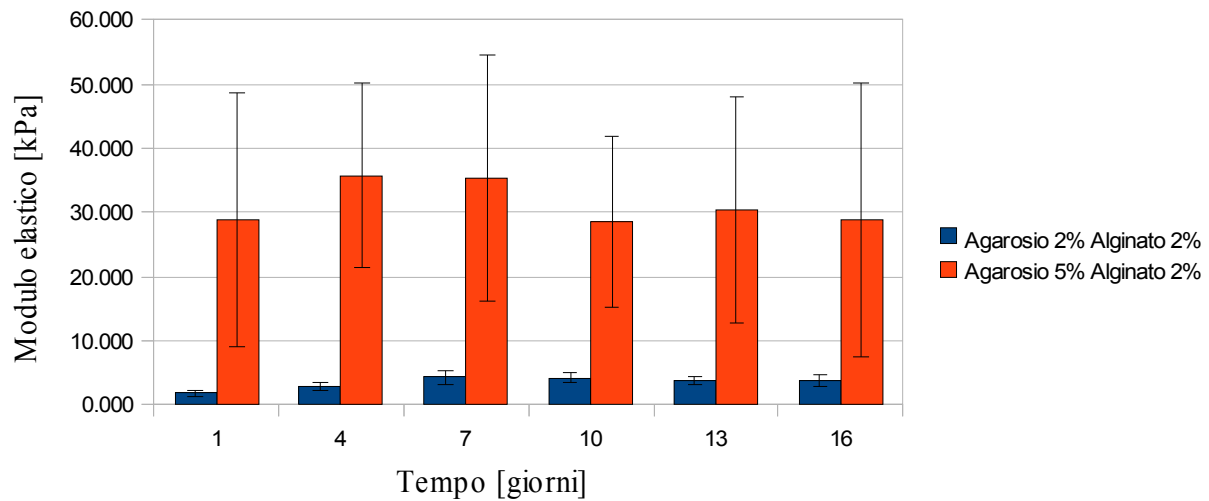


Figura 5 : Rappresentazione grafica dell'andamento nel tempo del modulo elastico della miscela di agarosio 2% alginato 2% (blu) e della miscela di agarosio 5% alginato 2% (rosso), per deformazioni del 8%.

Il calcolo dello stato di sforzo-deformazione è stato sviluppato in tre zone della matrice e in tre cellule. Per quanto riguarda le deformazioni globali relative alla matrice si può osservare che ogni zona analizzata subisce deformazioni comprese nel range -0.0753 e 0.1245 rispetto all'asse x e -0.1261 e 0.0828 rispetto all'asse y (Figura 6 e Figura 7).

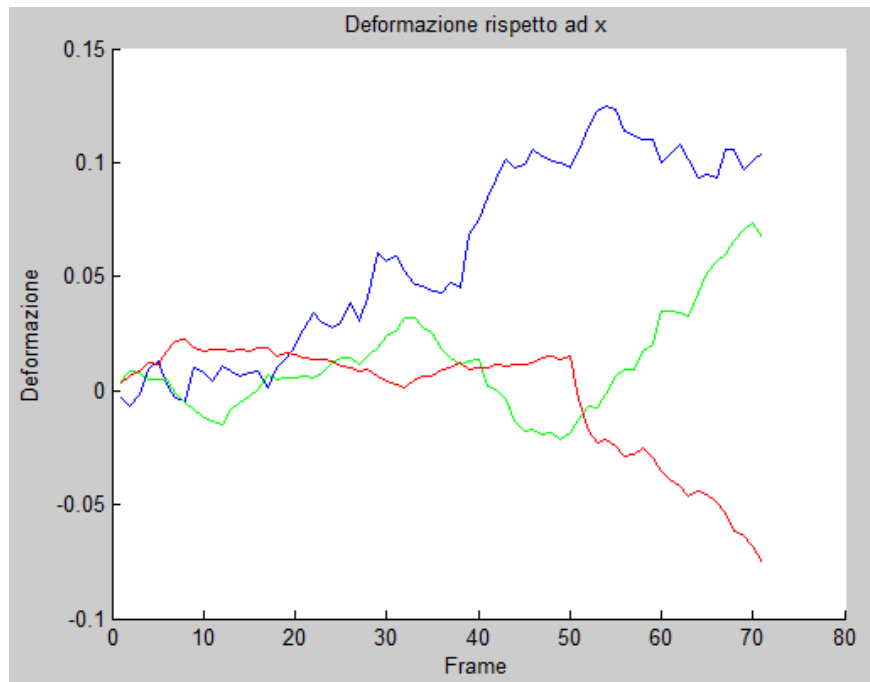


Figura 6 : Andamento nel tempo delle deformazioni rispetto all'asse x , il colore di ogni linea è lo stesso del quadrilatero che essa rappresenta.

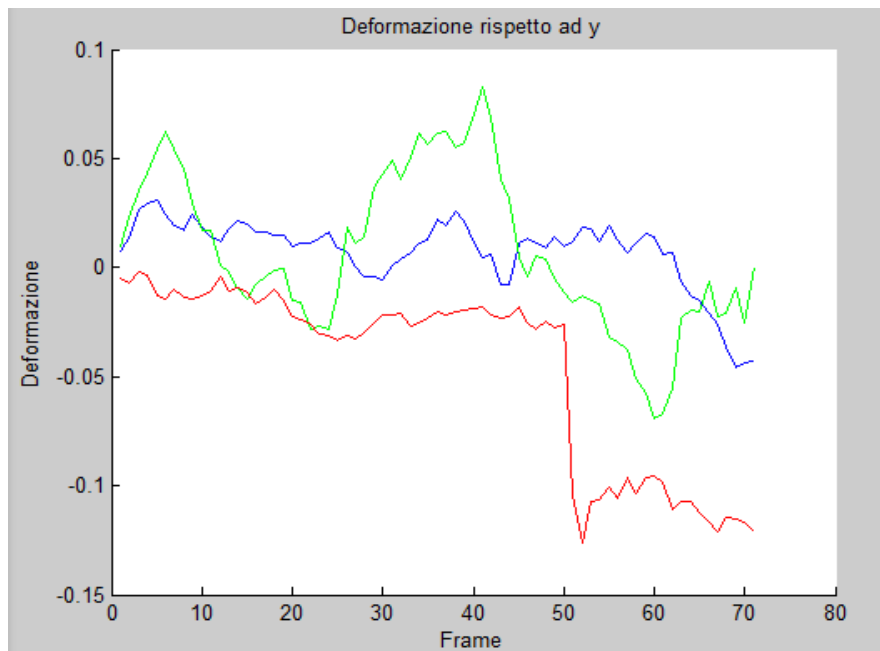


Figura 7 : Andamento nel tempo delle deformazioni rispetto all'asse y , il colore di ogni linea è lo stesso del quadrilatero che essa rappresenta.

Le informazioni di tipo puntuale hanno consentito il calcolo delle componenti di Green-Lagrange: ϵ_{xx} , ϵ_{yy} , ϵ_{xy} , sia della membrana che della cellula, tra il primo e l'ultimo frame. Tutte le mappe rappresentanti lo stato di deformazione delle cellule hanno la stessa scala, minore rispetto alla scala utilizzata per le mappe di stato di deformazione della matrice (Figura 8, Figura 9, Figura 10). Il confronto grafico ha evidenziato deformazioni a carico della matrice (comprese tra -0.265 e 0.1983) di entità molto inferiore rispetto a quelle a carico della cellula (comprese tra -4787 e 4.1772); ciò è dovuto al fatto che le adesioni focali fanno da intermediari tra la matrice e la cellula.

È da sottolineare che, mentre per la matrice si può ipotizzare un campo di deformazioni piane, per la cellula non è realistica tale ipotesi a causa della sua struttura tridimensionale, è possibile quindi calcolare solamente gli sforzi esercitati dalle adesioni focali sulla matrice conoscendone le proprietà elastiche. Da questo studio è emerso che le adesioni focali e la matrice si scambiano sforzi compresi tra -0.530 e 0.3966kPa (Figura 11).

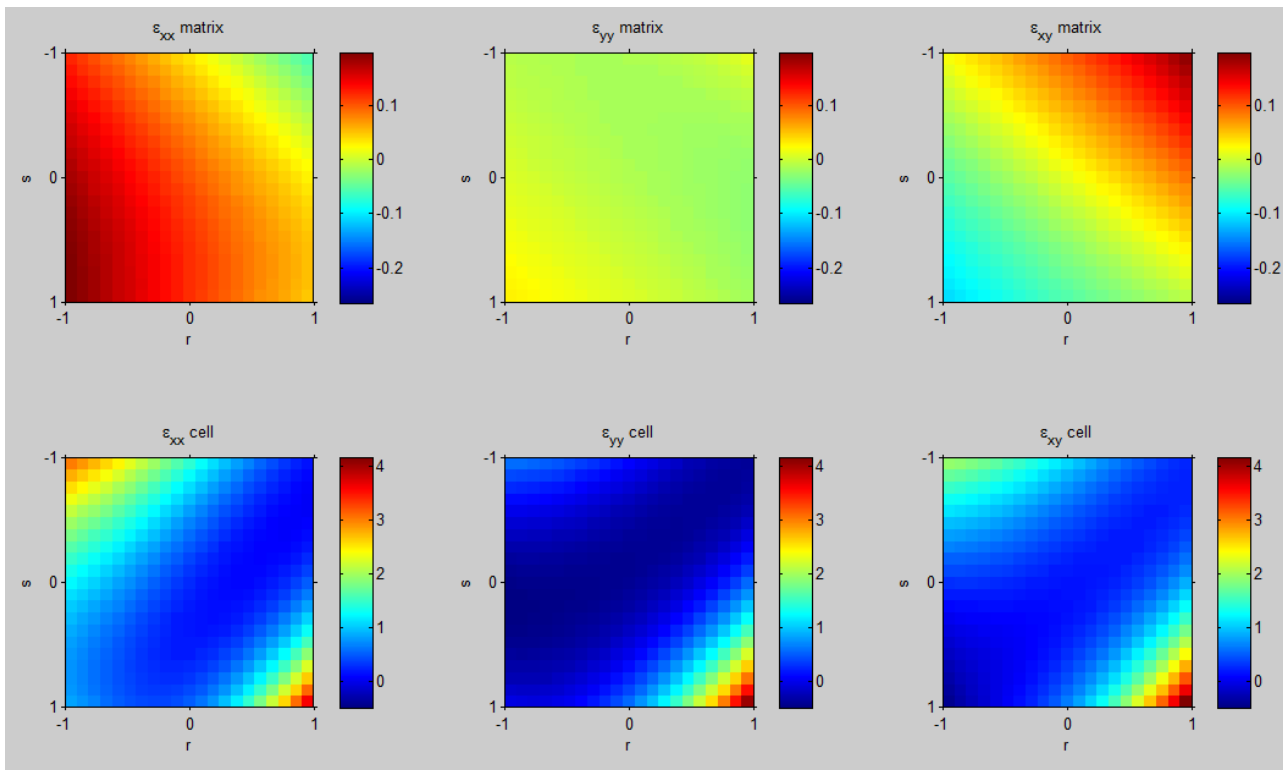


Figura 8 : Prima zona, quadrilatero e cellula con contorno blu. Mappe colorimetriche rispetto alle componenti di Green-Lagrange: ϵ_{xx} , ϵ_{yy} , ϵ_{xy} ; le immagini della prima riga sono relative alla matrice, quelle della seconda riga alla cellula.

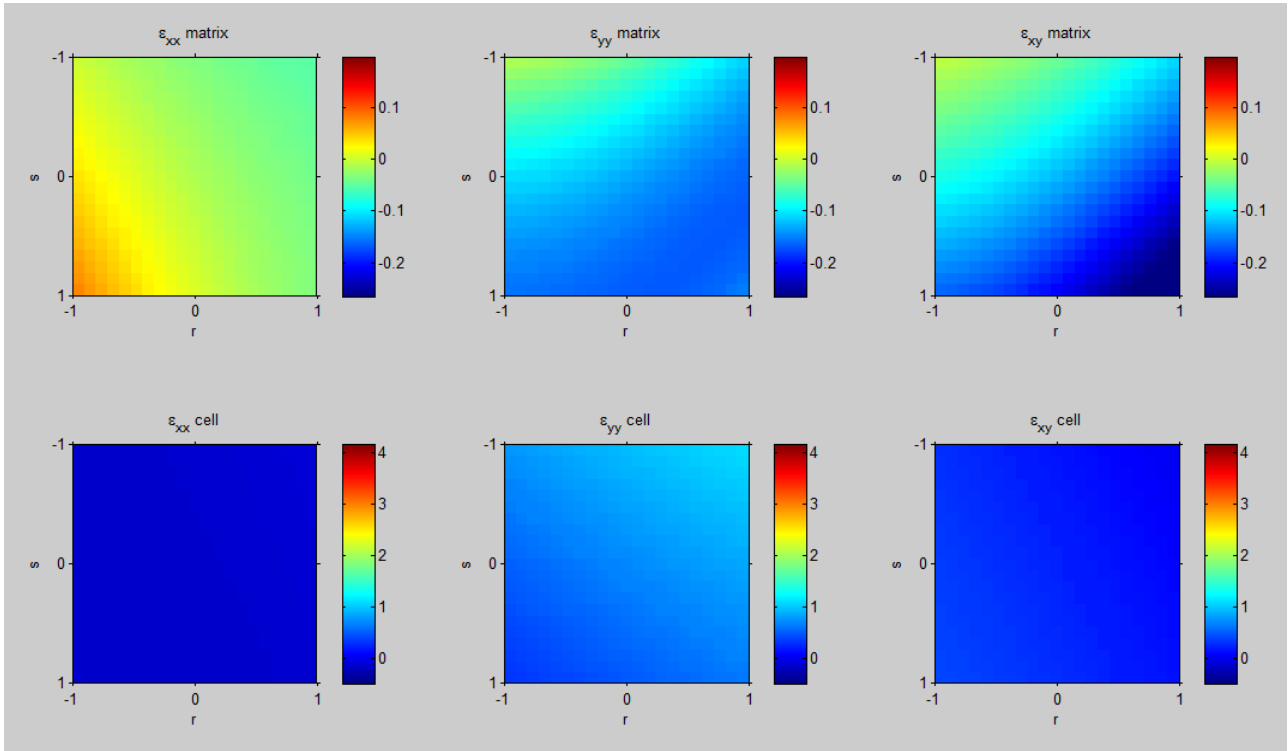


Figura 9 : Seconda zona, quadrilatero e cellula con contorno rosso. Mappe colorimetriche rispetto alle componenti di Green-Lagrange: ϵ_{xx} , ϵ_{yy} , ϵ_{xy} ; le immagini della prima riga sono relative alla matrice ,quelle delle seconda riga alla cellula.

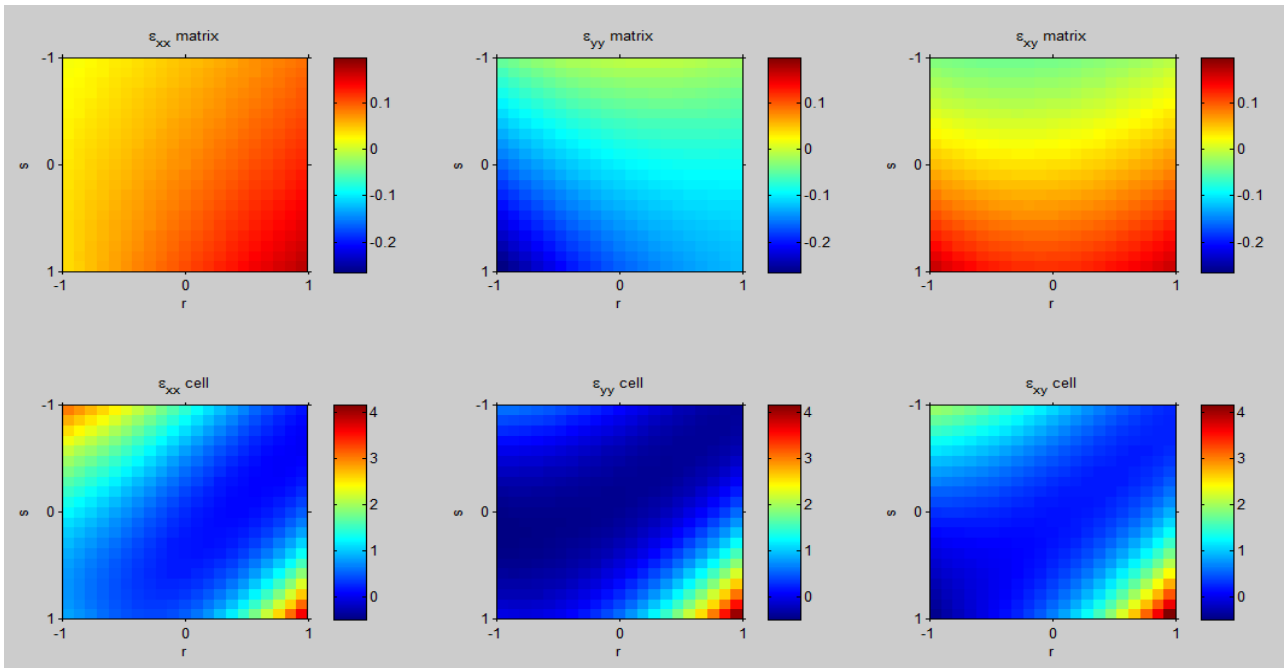


Figura 10 : Terza zona, quadrilatero e cellula con contorno verde. Mappe colorimetriche rispetto alle componenti di Green-Lagrange: ϵ_{xx} , ϵ_{yy} , ϵ_{xy} ; le immagini della prima riga sono relative alla matrice quelle delle seconda riga alla cellula.

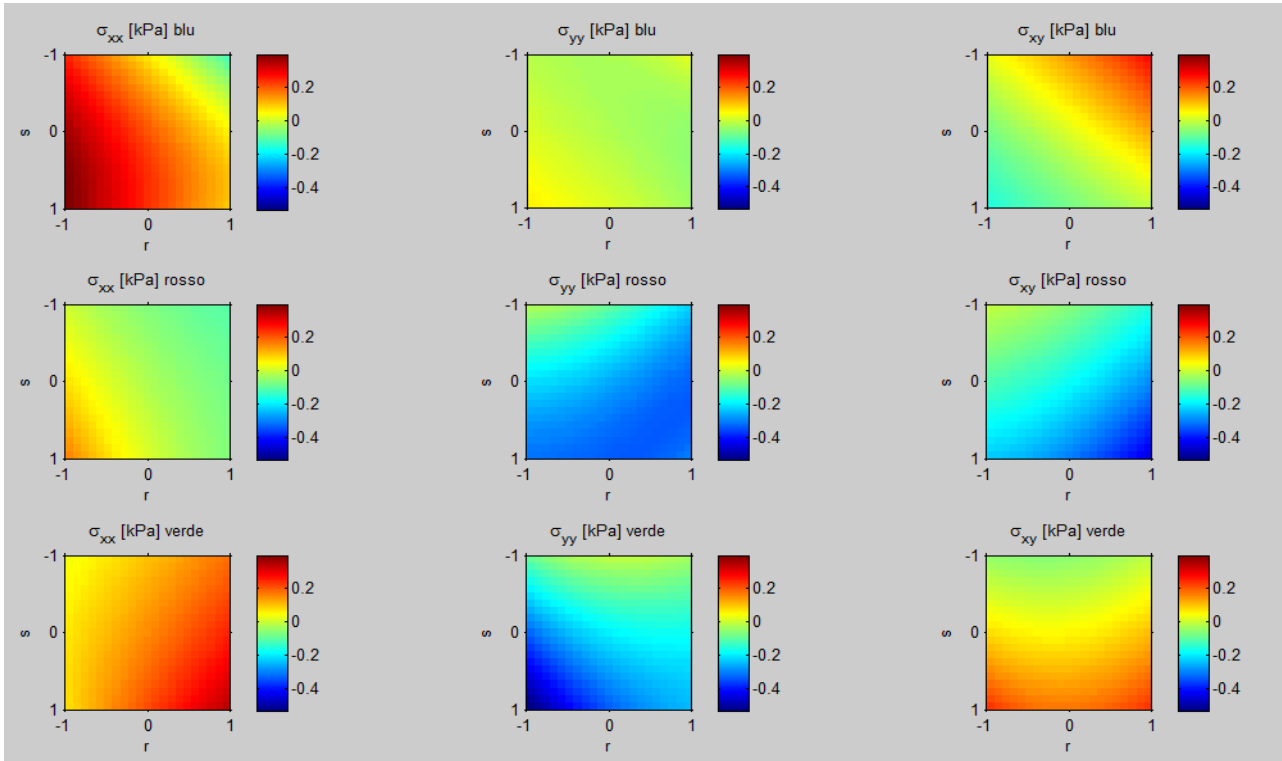


Figura 11 : Rappresentazione degli sforzi σ_{xx} σ_{yy} σ_{xy} . Nella prima riga ci sono gli sforzi agenti sulla parte di matrice delimitata dal quadrilatero con contorno blu, nella seconda riga gli sforzi sulla parte di matrice delimitata dal quadrilatero con contorno rosso e nella terza gli sforzi sulla parte di matrice delimitata dal quadrilatero con contorno verde.

Sfortunatamente l'analisi dei punti di repera sulla cellula non tiene conto della struttura tridimensionale di quest'ultima; ciò che è stato svolto in questa sezione è ,quindi, un'analisi qualitativa delle deformazioni a carico della cellula, e un'analisi di tipo quantitativo delle deformazioni a carico della matrice.

Summary

Introduction and objectives.

Therapy against myocardial infarction has become one of the biggest challenges of modern medicine. Most recent advances in molecular and cellular biology opened a new potential therapeutic window for treatment of acute myocardial infarction: cellular therapy or cellular cardiomyoplasty (CMC), i.e. the grafting of new cells in damaged myocardium, able to regenerate heart muscle and restoring his function. Although the cells are sensitive to many factors, the one that most affects their fate is the mechanical one (1). Therefore the objective of this work is to develop an experimental protocol for studying the effect of matrix stiffness on mesoangioblasts differentiation.

Materials and methods

The first step was to find a matrix that allows the exact mesoangioblasts differentiation, then with elastic modulus in the range 3-5 kPa, to simulate the physiological condition and with an elastic modulus of 35-70 kPa for the pathological condition. The materials analyzed in this thesis are:

- bacterial cellulose by Membracel®;
- polyethylene glycol (PEG);
- alginate e agarose hydrogel;

A mixture of alginate-agarose was made, as the first one has a good cell affinity, the second one has excellent mechanical properties (2). Different concentrations were used to produce the mixture, so as to achieve a soft gel (alginate 2% w / v agarose 2% w/v) and a stiff gel (alginate 2% w/v agarose 5% w/v). The mixtures were tested for unconfined compression with three strain levels: 2%, 4% and 8%. The characterization was carried out in a period of 16 days with eight trials per day, four samples for stiff gel and four for the soft one, to evaluate changes in elastic modulus due to matrix degradation.

The second step was quantify the stress-strain state both of the matrix, under the mesoangioblasts and cells action. To quantify the strain of the matrix, markers (fluorescent microspheres) were included under the top surface of the matrix during the proliferation process; to quantify the strain of cells, they have been modified with green fluorescent protein (GFP). A time-lapse fluorescence microscope measured the movements both of markers and of cells that were processed through MATLAB®

software. Global and punctual time information were obtained for the matrix, while the information about cells are between the first and last analyzed frame. The punctual informations were obtained through interpolation functions; knowing the elastic properties of the matrix, the stress on the matrix was calculated.

Results and conclusions

The results about Membracel® and PEG show, they do not have correct features for this project (Figure 1 and Figure 2 respectively).

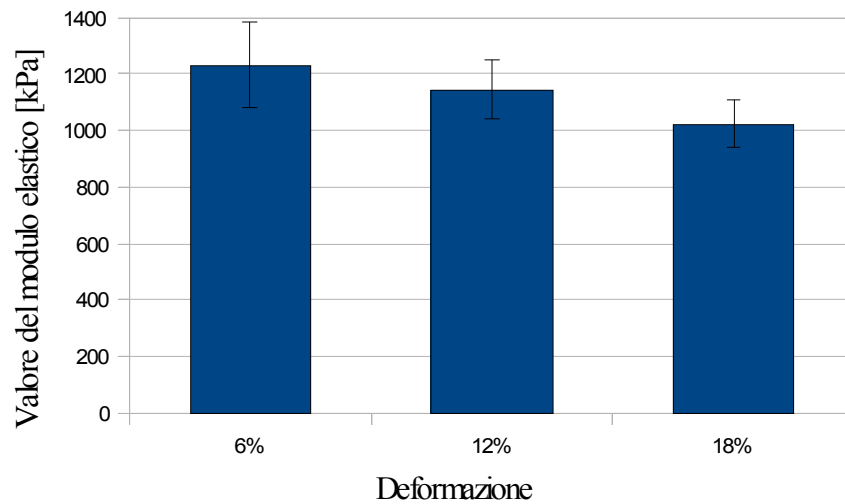


Figure 1: Graphical representation of the elastic modulus and standard deviation in function of the deformation.

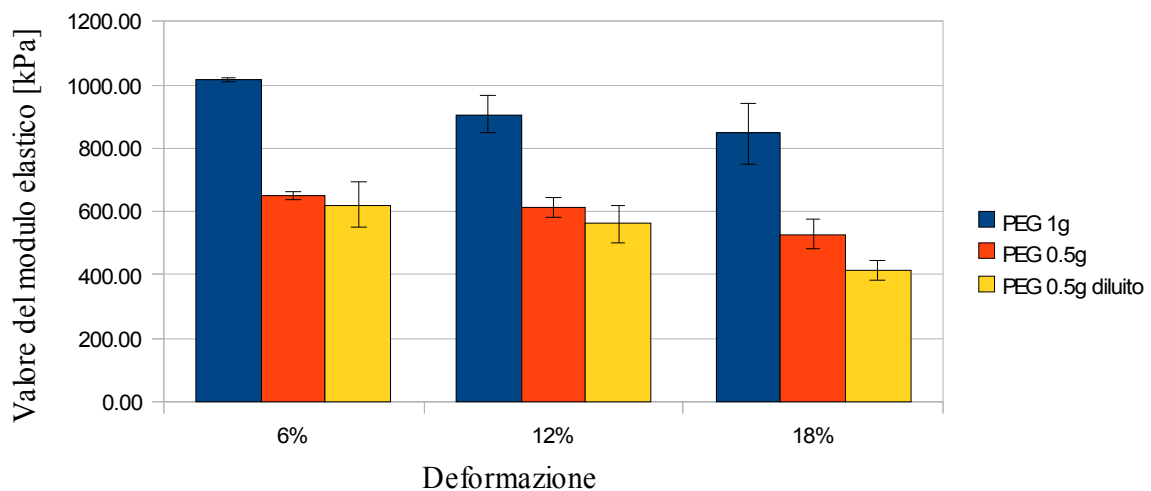


Figure 2: Graphical representation of the elastic modulus and standard deviation in function of the deformation and the kind of PEG.

Properties of alginate-agarose hydrogel are excellent for the purpose of this work (Figure 3, Figure 4, Figure 5).

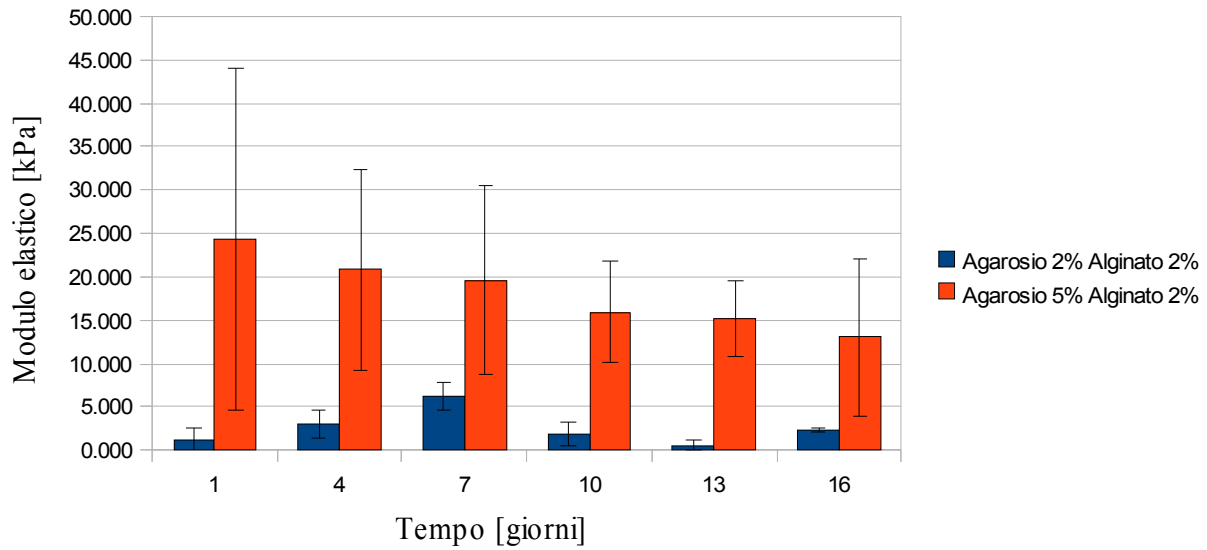


Figure 3 : Graphical representation of the elastic modulus in function of time for the mixture of agarose 2% alginate 2% (blue) and for the mixture agarose 5% alginate 2% (red); strain of 2%.

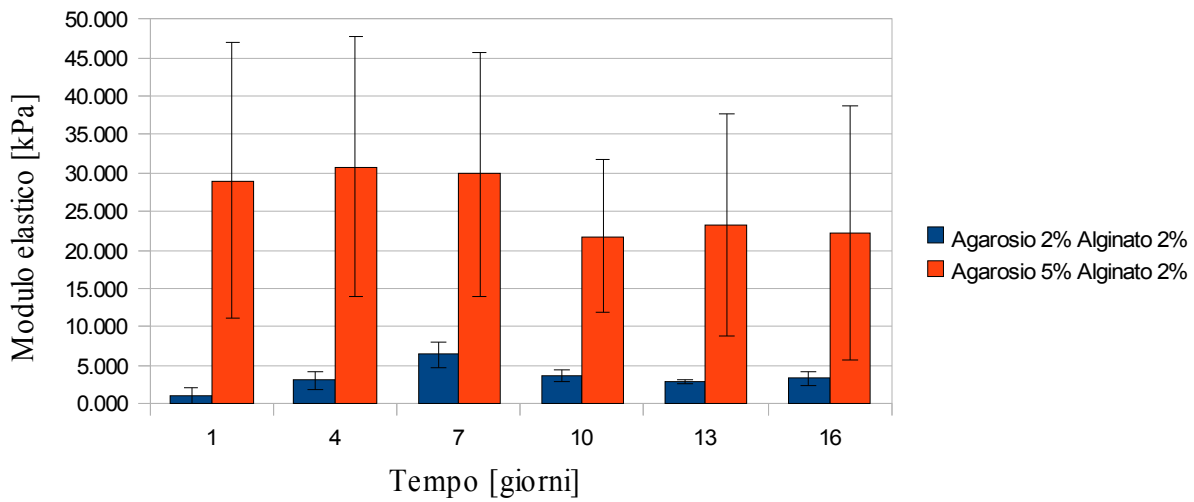


Figure 4 : Graphical representation of the elastic modulus in function of time for the mixture of agarose 2% alginate 2% (blue) and for the mixture agarose 5% alginate 2% (red); strain of 4%.

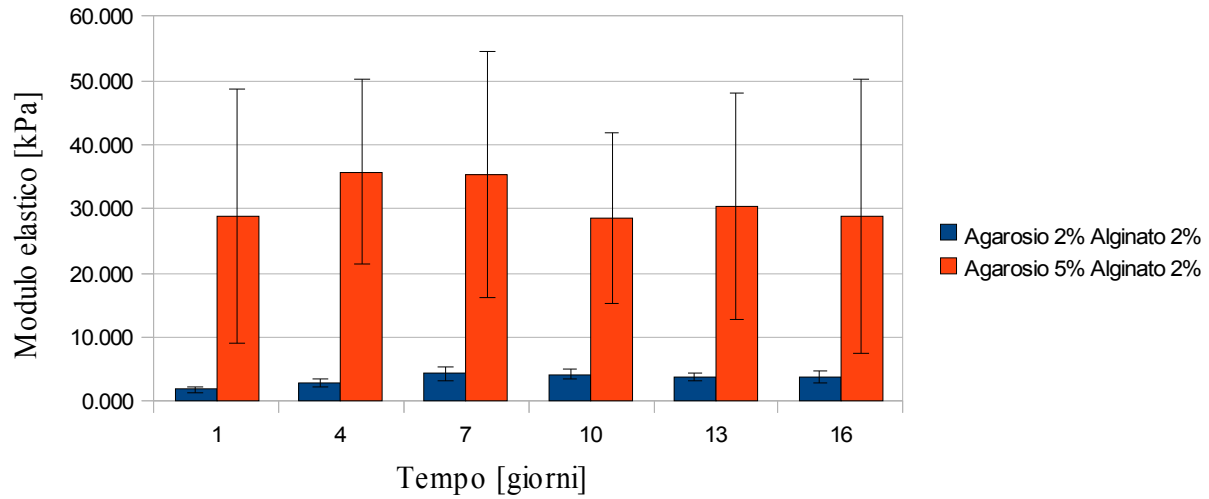


Figure 5 : Graphical representation of the elastic modulus in function of time for the mixture of agarose 2% alginate 2% (blue) and for the mixture agarose 5% alginate 2% (red); strain of 8%.

In three zones of the matrix and in three cells the stress-strain state was calculate. The global strains of the matrix, for each analyzed zone are in the range -0.0753 and 0.1245 on the x axis and in the range -0.1261 and 0.0828 on the y axis (Figure 6 and Figure 7).

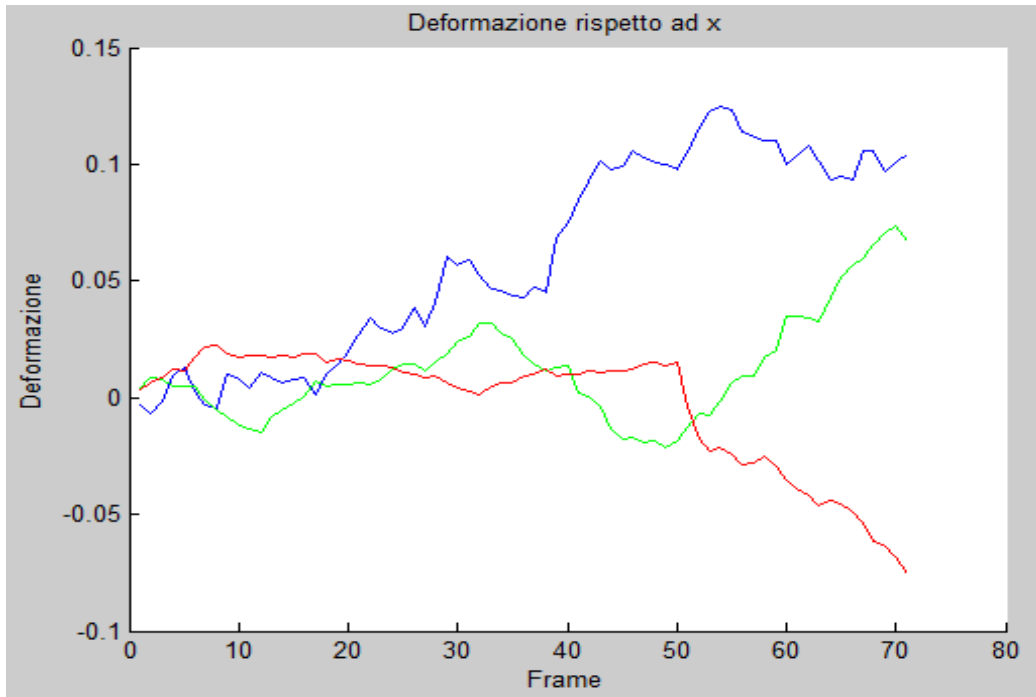


Figure 6 : Strain on x axis in function of the time, the color of each line is the same of the zone it represent.

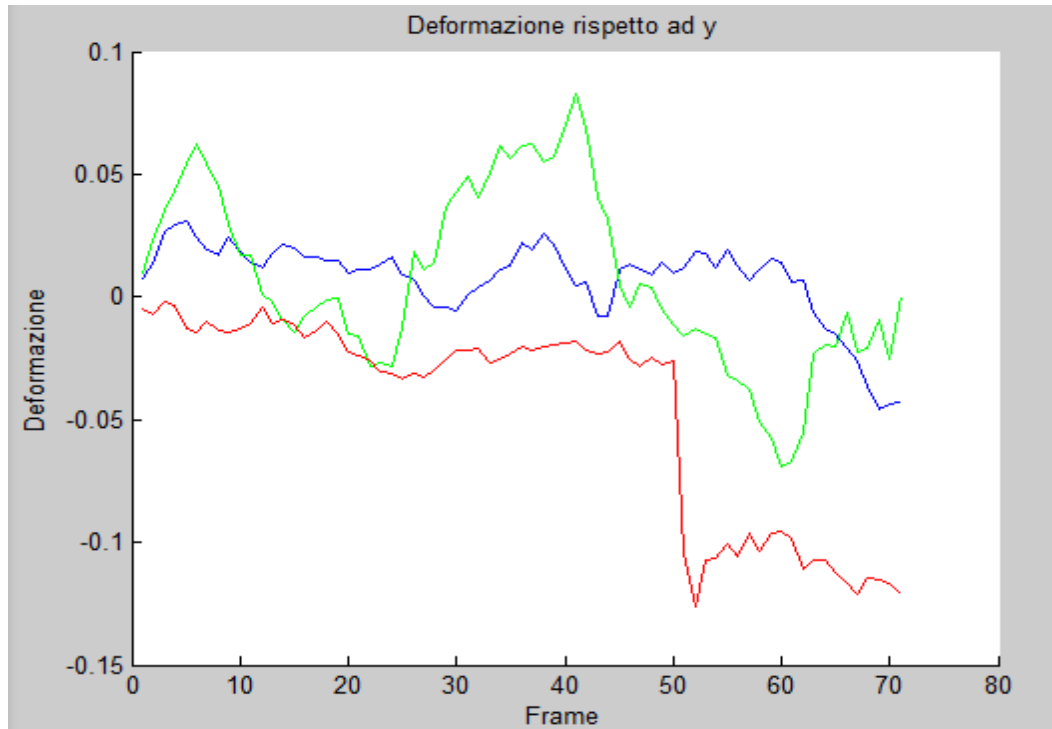


Figure 7 : Strain on y axis in function of the time, the color of each line is the same of the zone it represent..

The punctual information allows to calculate Green-Lagrange components: ϵ_{xx} , ϵ_{yy} , ϵ_{xy} , both of the matrix and the cell, between the first and last frame. All color maps for cellular strains have the same scale, that is smaller than the scale for matrix strains (Figure 8, Figure 9, Figure 10). The maps immediately highlights lower matrix strains (between -0.265 and 0.1983) in comparison to the higher cell strains (between -0.4787 and 4.1772), this is due to the action of focal adhesions as intermediaries between matrix and cell.

It should be noted that while a plane strain field is hypothesized for the matrix, this assumption is not valid for the cell, because of its three dimensional structure, it is only possible calculate the stress exerted by focal adhesions on the matrix, knowing the elastic properties. This study showed that focal adhesions and matrix exchange stress in the range -0.530 and 0.3966kPa (Figure 11).

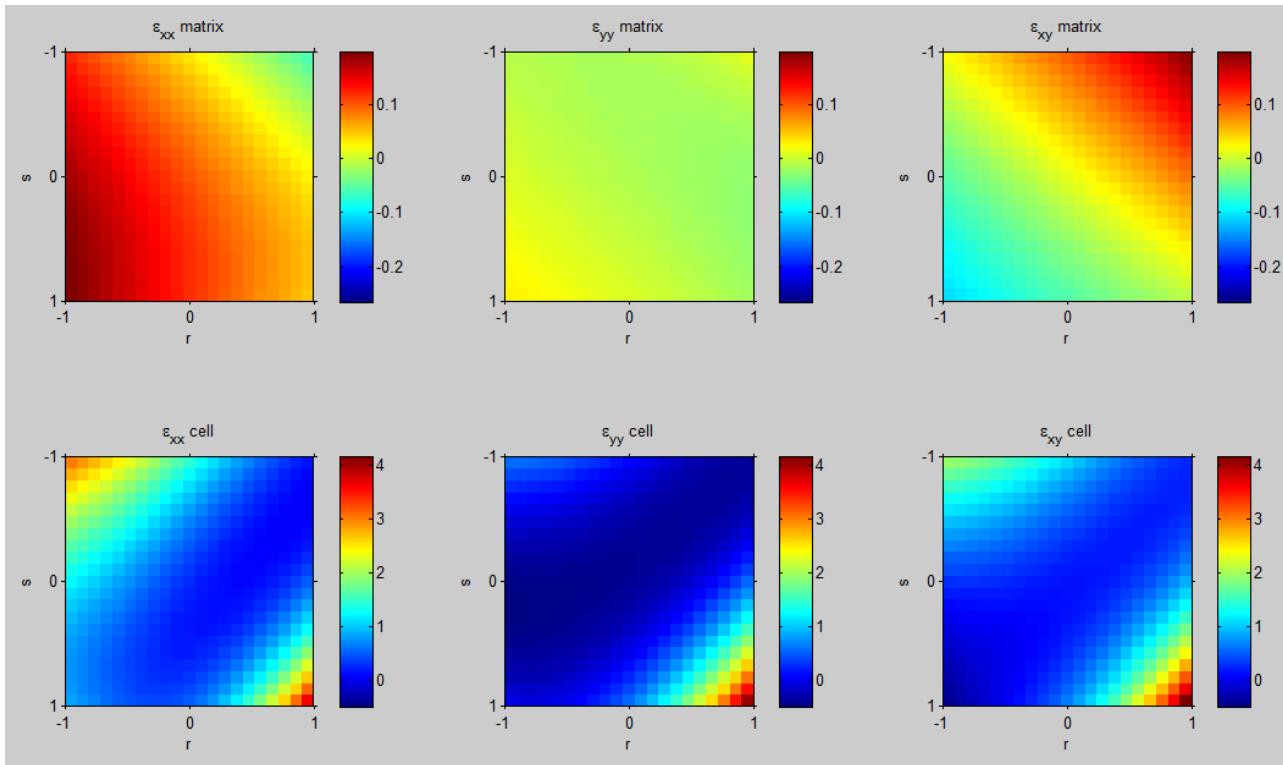


Figure 8 : First zone, quadrilateral and cell with blue outline. Color maps of the Green-Lagrange components: ϵ_{xx} , ϵ_{yy} , ϵ_{xy} ; images of the first row are about to the matrix, those in the second row about cell.

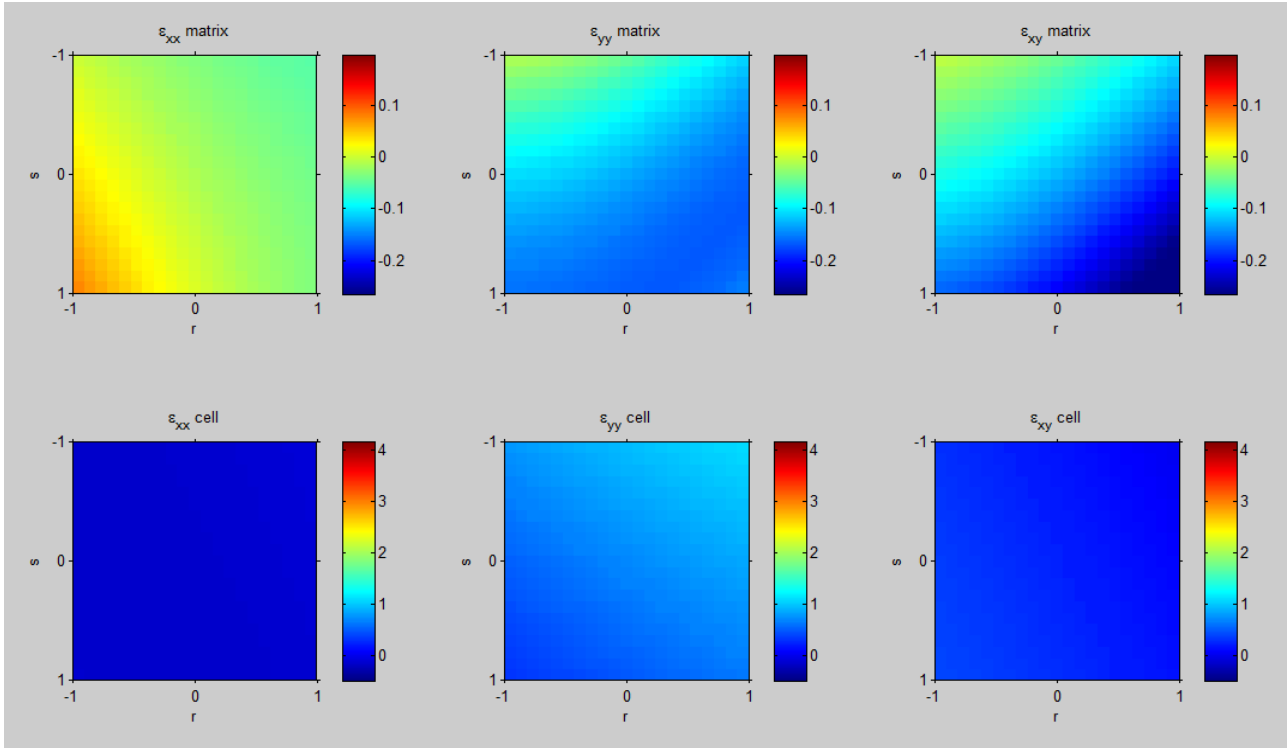


Figure 9 : Second zone, quadrilateral and cell with blue outline. Color maps of the Green-Lagrange components: ε_{xx} , ε_{yy} , ε_{xy} ; images of the first row are about to the matrix, those in the second row about cell.

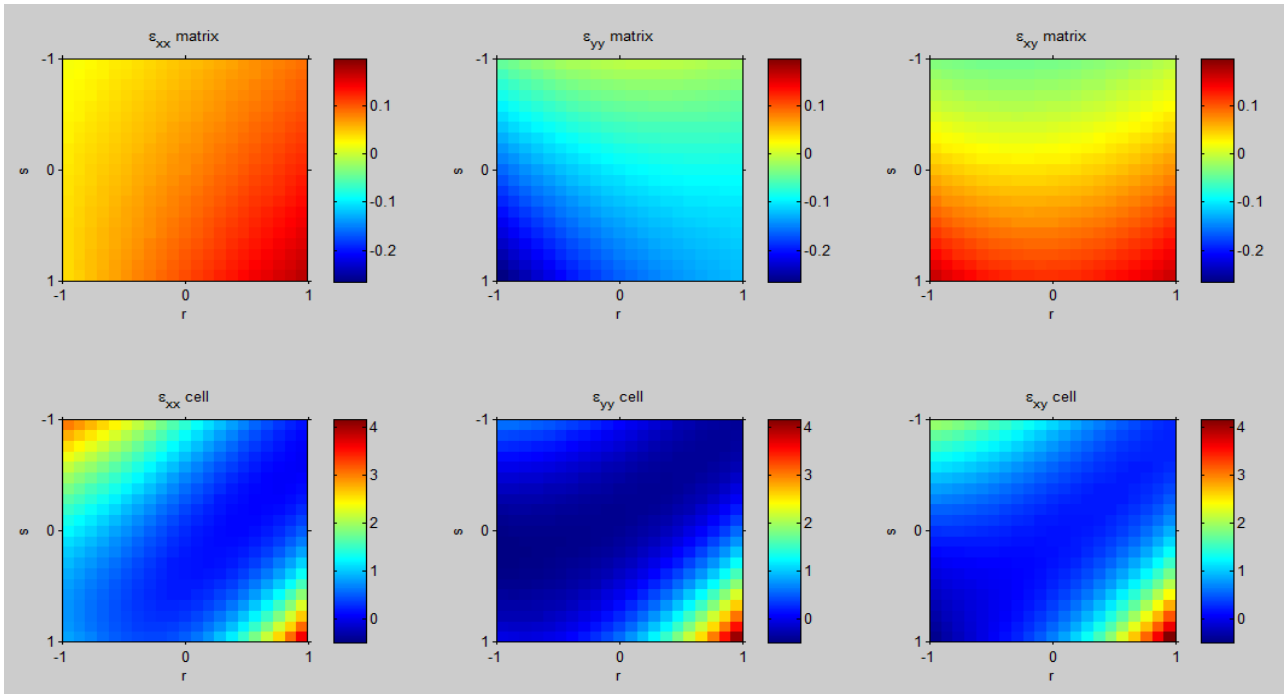


Figure 10 : Third zone, quadrilateral and cell with blue outline. Color maps of the Green-Lagrange components: ε_{xx} , ε_{yy} , ε_{xy} ; images of the first row are about to the matrix, those in the second row about cell.

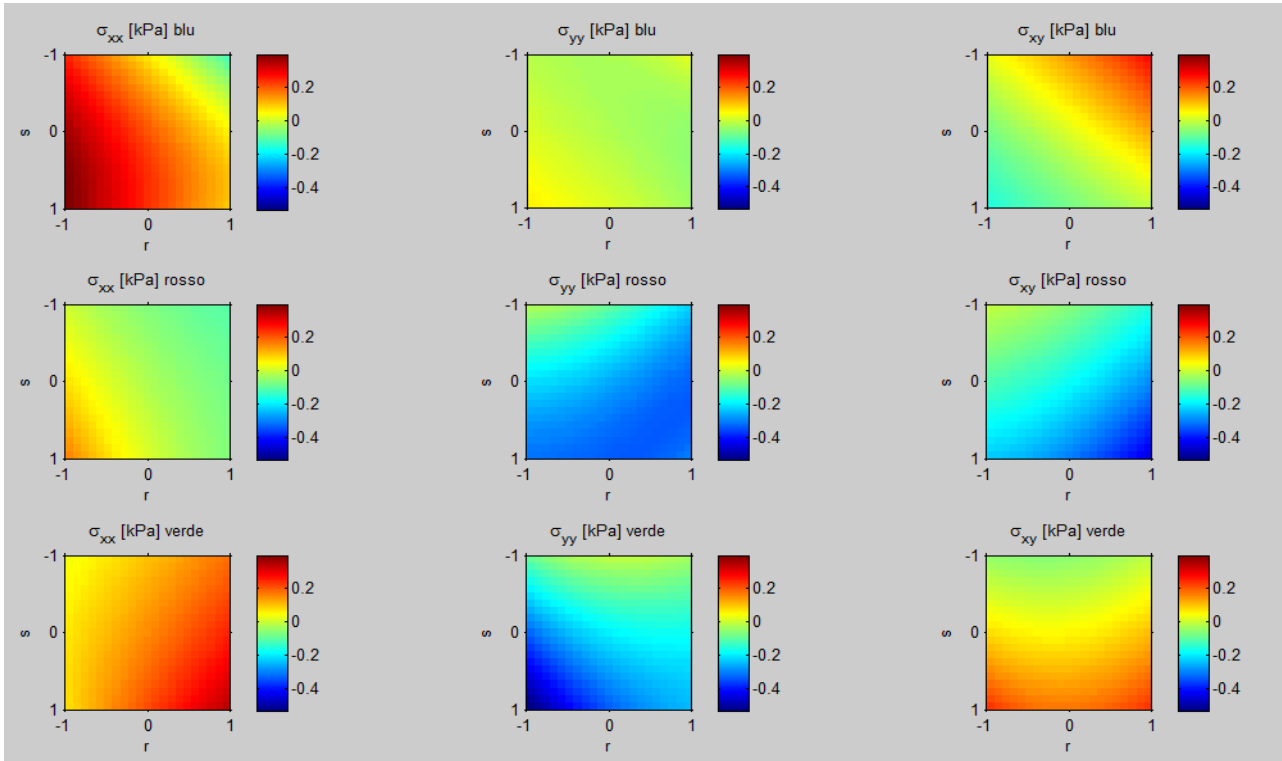


Figure 11 : Representation of the stress σ_{xx} σ_{yy} σ_{xy} . In the first row there are stress on matrix part bounded by the quadrilateral with blue outline, in the second row the stress on matrix part bounded by the quadrilateral with red outline and in third the stress on matrix part bounded by the quadrilateral with green outline.

Unfortunately the analysis of the repere marks on the cell do not consider its three-dimensional structure; in this section, a qualitative cell strain analysis and a quantitative matrix strain analysis was developed.

1 Introduzione e obiettivi

1.1 La terapia tessutale dell'infarto del miocardio.

L'infarto miocardico è la sindrome che colpisce la parete muscolare del cuore e che determina la morte di una parte del muscolo cardiaco, dovuta all'improvvisa occlusione di uno o più rami delle arterie coronarie. L'occlusione del vaso, solitamente causata da trombosi, ha come base l'aterosclerosi coronarica di cui l'infarto è la complicanza maggiore e più grave.

La terapia contro l'infarto miocardico è divenuta una delle sfide più impegnative della moderna medicina occidentale. L'impatto che questa patologia ha acquisito in termini di mortalità e di richiesta di ospedalizzazione è infatti in crescita costante, anche a causa dell'aumentata aspettativa di vita. Si stima che tale patologia colpisca 150 mila persone l'anno e che la metà abbiano meno di sessanta anni. Le differenti terapie disponibili rivolte alla cura del tessuto colpito dall'infarto mirano al ripristino della circolazione mediante l'ausilio di stent coronarici. Tuttavia, malgrado costanti progressi scientifici e tecnologici, tali terapie sono ancora caratterizzate da alcuni limiti fondamentali:

- l'impossibilità di rispondere al danno cardiomiocitario irreversibile, sostituito da tessuto fibrotico non contrattile;
- l'insorgenza di complicanze non trascurabili, quali le infezioni o i fenomeni trombo embolici.

I più recenti progressi della biologia molecolare e cellulare hanno aperto una nuova potenziale finestra terapeutica per il trattamento dell'infarto miocardico: il trapianto cellulare o cardiomioplastica cellulare (CMC). Per CMC si intende l'innesto di nuove cellule nel tessuto miocardico danneggiato, che abbiano la capacità di rigenerare il muscolo cardiaco ripristinandone la funzione. Affinché la CMC possa essere utilizzata clinicamente, devono essere stabilite:

- quali sono le linee cellulari più efficaci per l'innesto, anche in relazione al substrato anatomico-patologico bersaglio (area cicatriziale, zona perinfartuale, aree ischemiche);
- quali sono le tecniche più efficaci per l'innesto cellulare (ad esempio epicardica, endocardica, intracoronarica), quali i loro limiti e i vantaggi, nella possibilità di favorire l'introduzione e la migrazione delle cellule nell'area danneggiata.

Inoltre, da un punto di vista funzionale, le cellule utilizzate devono essere in grado di:

- colonizzare il miocardio (integrazione anatomica), sopravvivendo nel tessuto cardiaco e

contribuendo alla propria vascolarizzazione, con la creazione di nuovi vasi;

- differenziare in senso cardiomiocitario;
- contrarsi efficacemente (integrazione funzionale);
- creare un accoppiamento elettromeccanico con il tessuto miocardico circostante (integrazione elettromeccanica).

Tale requisito, difficile da dimostrare, implica che un cardiomiocita di nuova formazione non solo debba contrarsi efficacemente, ma debba anche farlo in sinergia con il tessuto miocardico circostante. Le nuove cellule, quindi, devono poter formare giunzioni intercellulari comunicanti con i cardiomiociti nativi al fine di ricevere lo stimolo elettrico.

Le evidenze prodotte in modelli sperimentali suggeriscono che vi sono differenti possibili sorgenti di cellule, sia di natura autologa che allogenica, potenzialmente in grado di soddisfare tali requisiti.

Per allogenica, si intende una fonte di reperimento geneticamente non identica al ricevente e, allo stato attuale, i tipi cellulari allogenici più sperimentati per prospettive di trapianto nell'uomo sono le cellule staminali embrionali (ES) umane, i cardiomiociti fetali (CF) o neonatali, e le cellule staminali ematopoietiche (CSE) da cordone ombelicale. Per autologa, invece, si intende una fonte di reperimento geneticamente identica al ricevente e i tipi cellulari più studiati sono le cellule staminali mesenchimali (CSM) e le cellule staminali ematopoietiche (CSE), entrambe provenienti dal midollo osseo (3).

Obiettivi

L'obiettivo generale di questo lavoro di tesi è la messa a punto di un protocollo sperimentale per lo studio dell'effetto della rigidità della matrice sulla differenziazione cellulare nell'ingegneria del tessuto cardiaco. In particolare si vuole trovare un materiale dotato di buona biocompatibilità, in modo da permettere la coltura di mesangioblasti sulla sua superficie, e adeguate proprietà meccaniche, in maniera da favorire il corretto differenziamento dei mesangioblasti in cardiomiociti. A questo scopo, data l'importanza delle proprietà meccaniche della matrice sul differenziamento cellulare, tale costrutto dovrà essere in grado di simulare la rigidità del tessuto miocardico sia in condizioni fisiologiche (1-6kPa), sia nel tessuto cicatriziale (35-70kPa) (4).

Il secondo obiettivo specifico è quello di trovare un metodo di calcolo dello stato di sforzo-deformazione nelle cellule e nella matrice, per analizzare gli sforzi che esse si scambiano.

1.2 Fattori che influenzano la differenziazione delle cellule staminali

La differenziazione delle cellule staminali, di recente, è stata sempre più legata al concetto di meccano biologia, ovvero alla risposta biologica alle forze fisiche da parte della cellula. Queste forze, originate dallo scorrimento dei filamenti di miosina lungo i filamenti di actina, sono trasmesse alla matrice extracellulare (ECM), uno scaffold proteico tridimensionale che circonda le cellule e le ancora. La trasduzione di questi segnali ha evidenziato l'esistenza di una vasta gamma di proteine di adesione, che legano meccanicamente il mondo extracellulare e quello intracellulare. Le cellule risentono molto della resistenza della matrice extracellulare, esattamente come la corrente elettrica risente della resistenza interna del filo per consentire il movimento delle cariche: le cellule tirano a sé la matrice e "sentono" la resistenza dell'ambiente adiacente alla deformazione; ciò fornisce un feedback attraverso proteine meccano-sensibili presenti lungo questa connessione. Anche se i dettagli molecolari di questo fenomeno richiedono ulteriori studi, è chiaro, quindi, che la ECM ha un ruolo fondamentale sul differenziamento cellulare. Una buona comprensione dell'interazione tra lo sviluppo dell'ECM e la sua espressione fornisce un buon punto di partenza per affrontare il problema della differenziazione delle cellule staminali.

L'ECM è composta prevalentemente da tre importanti proteine strutturali, ovvero il collagene, fibronectina e laminina, oltre a una serie di altre proteine come elastina, fibrillina, tenascina, glicosaminoglicani e proteoglicani. Ognuna di queste ha una distribuzione molto specifica e ricopre un ruolo (5) che potrebbe contribuire a processi di sviluppo, soprattutto in considerazione che l'inizio dell'espressione della matrice coincide con la fase morula (6), poco prima della nascita di cellule staminali embrionali pluripotenti (ESCs) e dei primi movimenti della cellula. La fibronectina, ad esempio, regola la migrazione delle cellule durante il processo di riorganizzazione chiamato gastrulazione, che si verifica proprio quando il destino delle cellule staminali è in corso di definizione e il piano e l'asse della cellula stanno per essere determinati. Inoltre le interazioni tra specifici strati di microrganismi e le proteine di matrice, come la morfogenesi del mesoendoderma e la sinergia tra i siti di fibronectina (7), suggerisce un collegamento tra le proprietà intrinseche della matrice e la differenziazione. Le cellule staminali adulte, inoltre, come le cellule staminali mesenchimali derivate dal midollo osseo (MSCs), sono multipotenti, ovvero possono maturare in uno specifico sottoinsieme di cellule. Anche se non possono avere una matrice tempo-variante come le ESCs, sono note per avere la capacità di migrare dal

midollo a tessuti con diverse composizioni di matrice (8).

Durante la loro differenziazione, sia le cellule staminali embrionali che le cellule staminali adulte, risentono delle proprietà della matrice extracellulare; tali proprietà possono essere divise in:

- morfologiche (9);
- biochimiche (10),
- meccaniche (11).

Le cellule staminali sono sorprendentemente sensibili in vitro a questi stimoli, in particolare a come gli stimoli cambiano le forze generate dalle cellule.

1.2.1 Proprietà morfologiche della matrice

In vivo, la matrice è dapprima secreta dalle cellule e successivamente assemblata in una rete fibrillare dalle loro integrine, che si attaccano a siti specifici della matrice stessa, ad esempio la arginina-glicina-acido aspartico (o RGD) su fibronectina. Sul sito, i cluster contenenti integrine di legame multiplo sono tirati in modo tale che le proteine della matrice siano srotolate per rivelare i domini di associazione, permettendo legami omotipici, ad esempio, fibronectina-fibronectina (12). In assenza di integrine, aggiunta di specifici domini proteici nella matrice, come la laminina, può essere sufficiente per ripristinare la struttura della membrana basale nelle ESCs e per permetterne la differenziazione (13). È importante sottolineare, tuttavia, che tali domini sono parte di una più grande matrice che è organizzata in fasci fibrillari. Data la specificità molto alta del sito di adesione RGD sulla fibronectina, la struttura fibrillare consente alla matrice di presentare alla cellula una discreta porzione adesiva solo quando il dominio di legame è accessibile alla cellula stessa, come ad esempio l'esterno della fibrille di fibronectina (Figura 1.1 A). Dal momento che le integrine sono disposte diversamente sui substrati fibrillari rispetto a substrati planari, l'introduzione di fibrille può alterare la distribuzione di contatti focali e influenzare non solo la percezione della morbidezza della matrice di fibronectina da parte della cellula, ma anche la loro differenziazione, come avviene, ad esempio, per la differenziazione di ESCs in endoderma (Figura 1.1 B). Inoltre lo studio delle superfici ha mostrato che la sola manipolazione delle stesse sembra essere sufficiente a stimolare le MSCs. I substrati di poli-metil metacrilato (PMMA) con pori 120nm di diametro disposti in maniera disorganizzata a 200nm di distanza (Figura

1.1 C) hanno dimostrato di indurre le MSCs all'osteogenesi. Anche i substrati composti di nanotubi di titanio hanno la capacità di promuovere cambiamenti di forma nelle MSCs e guidare la differenziazione delle cellule progenitrici degli osteoblasti in base al del diametro dei nanotubi e non utilizzando uno specifico cocktail di fattori di crescita (14). È importante sottolineare che in questi due materiali non è stata alterata la rugosità, ma piuttosto è stata alterata la topografia in modo da indurre la differenziazione, come dimostrato con la microscopia a forza atomica esaminando i nanotubi di titanio di diverse diametro (Figura 1.1 D). I substrati, quindi, regolano le capacità di una cellula di aderire e di generare forza.

Altri metodi per controllare forma e adesione delle cellule hanno mostrato che le MSCs hanno la straordinaria capacità di passare da cellule adipose a ossoblasti basandosi solo sulla capacità di diffondersi su una superficie e di contrarsi su di essa. Cellule ben distribuite esprimono delle proteine comuni agli osteoblasti, in un modo che dipende dalla capacità della cellula di applicare tensione al materiale. D'altra parte, cellule scarsamente diffuse sviluppano grandi depositi lipidici, tipici degli adipociti (15) e hanno limitate capacità di diffusione e di generazione di tensione. La futura medicina rigenerativa dovrà, quindi, considerare l'importanza di tali scoperte per progettazione di nuovi materiali.

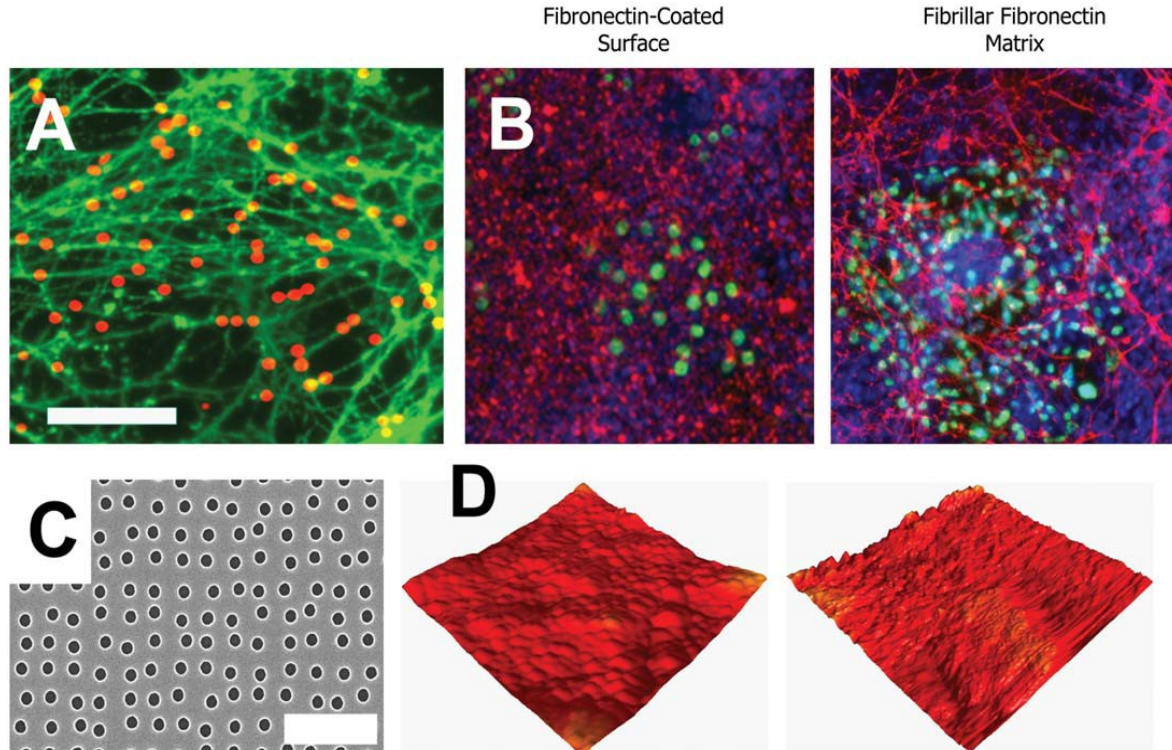


Figura 1.1: Struttura della ECM naturale e la sua influenza sulla differenziazione. (A) sezione apicale di un immagine

confocale di una matrice derivata da cellule fibrillari FN (verde). I pallini rossi, di diametro 1µm indicano siti attivi di adesione cellulare (i pallini non coperti da antibiotici). (B) Le superfici coperte da fibronectina hanno meno endoderma verde che può esprimere nuclei ESC rispetto alla matrice fibrillare dopo sette giorni in cultura. I nuclei (blu) e fibronectina (rossa) sono anche trattati con colorante. La scala della barra è di 10µm. (C) Elettromicrografia di una superficie di PMMA con buchi semi-disordinati che forniscono una topografia alle MSCs e inducono l'osteogenesi. (D) Il microscopio di forza atomica analizza un substrato di nanotubi in titanio di diametri dai 30 ai 100 nm. Color maps identiche indicano profilo simile in altezza, per esempio simili in rugosità; nonostante il colore sia lo stesso, la topografia dei tubi di piccolo diametro è più come “un pavimento con ciottoli”, che non promuove la differenziazione MSC (14).

1.2.2 Proprietà biochimiche della matrice

La regolazione biochimica delle cellule staminali non è limitata ai ligandi solubili; la composizione della matrice può regolare, infatti, il numero delle cellule attraverso differenti integrine legate ai siti di adesione (come mostrato in figura 1.1 A). Si evince così un secondo meccanismo di alterazione della differenziazione cellulare: la composizione dell' ECM. Il trapianto di tessuto acellulare, avente una distinta composizione di matrice, può interagire con una specifica sotto serie di integrine su la superficie delle MSCs e portare una porzione della popolazione di cellule a diventare, ad esempio, cardiomiociti battenti, senza l'aggiunta di uno specifico cocktail di fattori di crescita. Anche la presenza, o l'assenza, di specifici domini di ECM può drammaticamente influenzare non solo la forza di adesione (16), ma anche la differenziazione (17) attraverso cambiamenti conformazionali che intensificano la forza di trasmissione in funzione di come le integrine si legano a questi siti (18). Le differenti distribuzioni locali di recettore-ligando sono note in quanto stimolano la differenziazione sia degli aggregati multicellulari delle ESCs, chiamati corpi embrioidi (19), sia di culture monostrato di ESCs nell'endoderma (20). In più le differenze ligando-recettore controllano la differenziazione delle MSCs verso lo stato di osteoblasti (21). La chimica della matrice può anche essere cambiata alterando la sua adesività, sia attraverso varianti di accoppiamento in vivo sia usando proteine ricombinanti in vitro che non hanno moduli di adesione, come per esempio RGD. Nello *Xenopus*, l'aggiunta di FN ricombinante senza RGD, durante la crescita, provoca l'arresto della gastrulazione (22). Per le ESCs, l'unione alle FN prive di siti RGD indebolisce il legame iniziale, lo sviluppo di un'appropriata forza di adesione e la conseguente espressione dell'endoderma. Infatti anche la presenza di gruppi reattivi sulla superficie, come ad esempio i metili e i carbossili, può modificare l'adesione e indurre, rispettivamente, il rinnovamento cellulare o la differenziazione (23). Aumentare il crosslinking, invece, può migliorare

la forza di adesione della cellula alla matrice (24) e alterare l'espressione di integrina (25) e la differenziazione. L'effetto della composizione del ligando adesivo non è limitata alle cellule staminali poiché si è osservato che anche la trasformazione di altre cellule è dovuta alla concentrazione del ligando; un fenotipo maligno nelle cellule mammarie epiteliali, ad esempio, è indotto da valori stranamente alti di fibronectina (26). Dimostrata l'importanza della struttura chimica e la funzione intrinseca della composizione della matrice nella differenziazione cellulare, è bene ricordare che anche i fattori di crescita ricoprono un ruolo fondamentale nell'espressione cellulare. Questi ultimi possono legarsi direttamente alla ECM, inglobandosi ad essa, e essere liberati dalla degradazione proteolitica della matrice o dalle forze generate (27, 28). L'esempio appena descritto, infatti, è noto per essere un importante meccanismo di differenziazione dei mioblasti e può avvenire quando le cellule aderiscono al complesso di fattori di crescita situati sulla superficie della matrice.

1.2.3 Proprietà meccaniche della matrice

Molte osservazioni cellulari, in biologia moderna, sono state effettuate su vetrini spesso coperti con uno strato sottile di ECM come mostrato in Figura 1.1 B. Sfortunatamente tale strato non riproduce lo stesso ambiente meccanico in cui si trovano la maggior parte delle cellule (29) e può condurre ad una dedifferenziazione o ad una perdita di funzionalità nella cellule. La rigidità della superficie su cui la cellula può aderire varia molto a seconda del tessuto: si passa, infatti, da tessuti deformabili come il cervello ($E=0.1\text{kPa}$) a tessuti più rigidi, come quello osseo calcificato ($>30\text{kPa}$). Semplici variazioni naturali del modulo elastico (Tabella 1.1), dovute a cambiamenti temporali e spaziali nella matrice durante lo sviluppo (30,31,32), possono stimolare le cellule durante la loro differenziazione e la loro maturazione nel tessuto.

Tissue	Elasticity, E (kPa)	Definition of nomenclature
Embryonic stem cells	$\sim 0.2\text{--}0.3$ Davidson et al. (1999)	E_{ESC} (E of the ECM of stem cells), 'compliant' or 'soft'
Endoderm	$\sim 0.1\text{--}0.3$ Krieg et al. (2008), Rozario et al. (2009)	E_{ENDO} (E of the gastrulating endoderm)
Mesoderm	$\sim 0.5\text{--}1$ Krieg et al. (2008)	E_{MESO} (E of the gastrulating mesoderm)
Nerve	$\sim 0.5\text{--}1$ Flanagan et al. (2002)	E_{N} (E of nerve ECM), being compliant
Liver (hepatocytes)	~ 1.5 versus 4.5 Georges et al. (2007)	E_{H} (E of hepatocyte ECM); normal versus fibrotic
Smooth muscle	$\sim 5\text{--}9$ Engler et al. (2004b)	E_{SM} (E of smooth muscle ECM), being 'semi-compliant'
Skeletal muscle	$\sim 8\text{--}17$ Berry et al. (2006), Collinworth et al. (2002), Engler et al. (2006)	E_{M} (E of skeletal muscle ECM), being 'semi-compliant'
Demineeralize bone	> 30 Engler et al. (2006)	E_{B} (E of bone ECM), being 'rigid' or 'stiff'

Tabella 1.1: ECM specifica per ogni tessuto con le proprietà meccaniche misurate da microscopio a forza atomica.

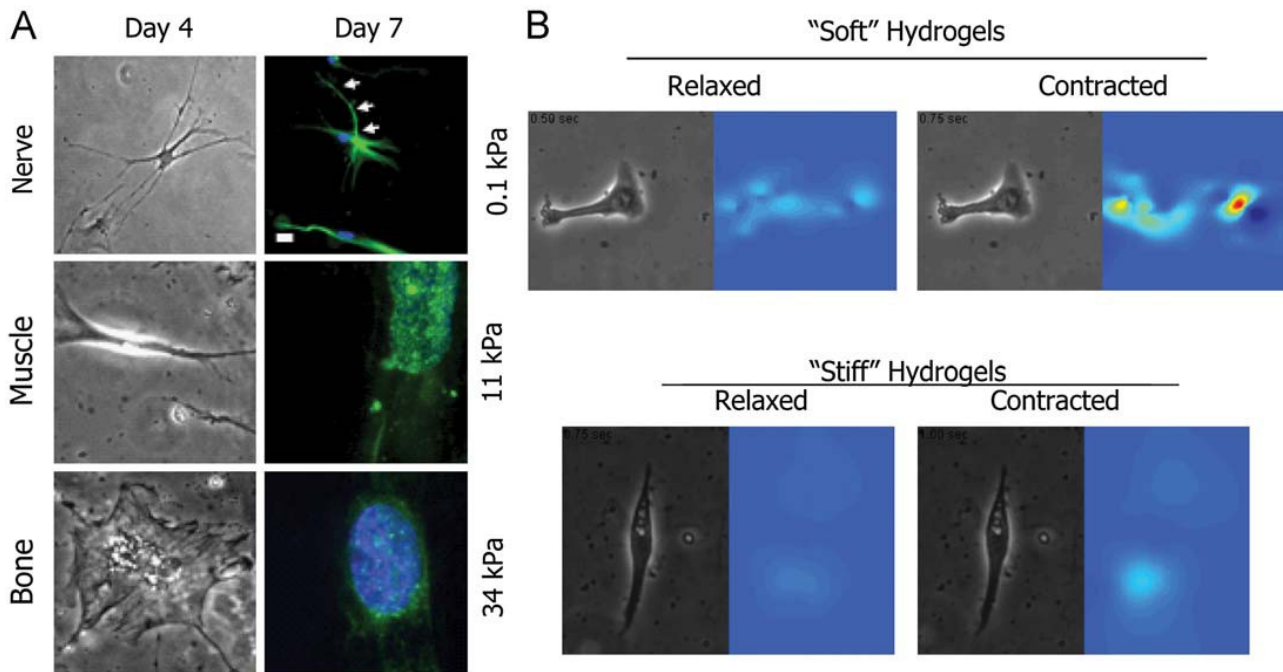


Figura 1.2: la sensibilità della matrice cellulare. (A) MSCs diventano neuroni, miociti e osteoblasti quando sono coltivati in microambienti aventi elasticità di 0.1, 11 e 34 kPa o E_N , E_M , e E_B rispettivamente, come misurato dal microscopio di forza atomica. (B) Le immagini di cardiomiociti subiscono contrazioni ritmiche nel loro stato contratto e rilassato su idrogeli morbidi di 1 kPa e rigidi di 34 kPa. È da notare che i cardiomiociti contratti su gel morbido possono introdurre grandi deformazioni nel gel (le regioni rosse indicano grandi deformazioni principali medie, quelle blu piccole deformazioni principali medie) mentre inducono deformazioni più limitate nel gel rigido.

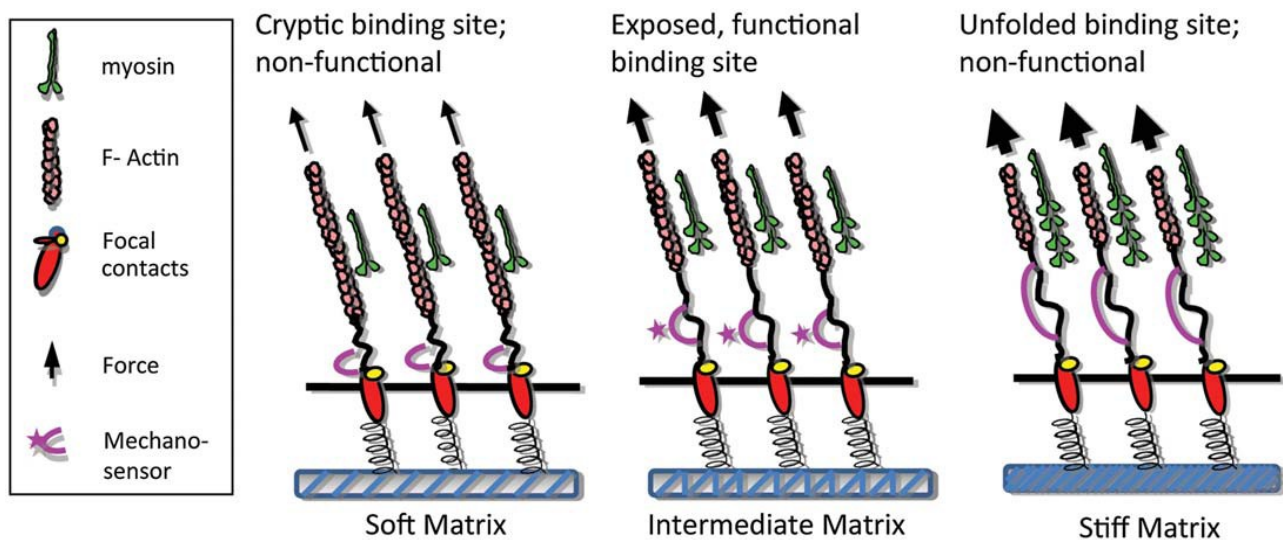


Figura 1.3 : Proposta di meccanismo sensibile alla forza all'interno di cellule staminali. I cambiamenti nel folding della proteina come forze esercitate per esporre i siti di legame. Le cellule su matrice morbida con deboli forze intracellulari non possono cambiare sufficientemente la conformazione delle proteine mecano-sensibili di interesse per esporre un sito di legame, rendendolo non funzionale. Al contrario, le cellule su matrice rigida generano tensioni elevate che causano la distensione della proteina rendendo il sito di legame non funzionale. Le cellule sulla matrice con proprietà elastiche ottimali possono applicare un'appropriata quantità di forze tali da permettere il cambiamento di conformazione della proteina, rendendo il sito di legame accessibile.

Si è scoperto che il fenomeno della differenziazione dovuto all'elasticità del substrato è un regolatore cellulare sorprendentemente sensibile (33). Si è osservato che le MSCs cresciute su gel che riproducono l'elasticità della ECM di un dato tessuto esprimono precursori di proteine per il tipo di cellule che tipicamente è presente in quel tessuto in assenza di fattori di crescita (Figura 1.2 A). Le cellule cresciute sul gel di E_N (Tabella 1.1) di elasticità simile a quella del cervello, esprimono marcatori e fenotipi neurali, e non sono molto contrattili. Coltivate su gel di 11kPa, invece, le MSCs iniziano a esprimere velocemente proteine di muscoli scheletrici. Substrati più rigidi di 34kPa, che simulano il tessuto osseo precalcificato, E_B , generano MSCs che assomigliano a cellule ossee ed esercitano una trazione significativa sul loro ambiente.

La capacità di generare un livello crescente di tensione basato sulla rigidità e/o sulla specifica forma cellulare attraverso modifiche della superficie è probabilmente regolata da proteine motrici come la miosina, che generano forze di trazione contro la matrice (34). Tali forze possono essere inibite da trattamenti farmacologici che bloccano la differenziazione definitivamente. Sono stati proposti una serie di meccanismi per questo processo:

1. cambiamenti conformazionali delle proteine sensibili alla forza (35,36) che avvengono nelle adesioni focali (37) (Figura 1.3) o all'interno della matrice (38);
2. cambiamenti nell'attività di alcuni recettori di adesione (39);
3. allungamento attivato da canali del calcio (40).

La regolazione meccanica può anche essere fonte di disfunzioni se il microambiente diventa eccessivamente rigido. Tessuti malati spesso sovraesprimono componenti dell'ECM, rendendo il tessuto più rigido e ciò potrebbe inibire la contrattibilità della cellula. Infatti, gli attacchi di cuore possono creare una cicatrice rigida nel muscolo, che può inibire la differenziazione di MSCs nel muscolo (41) e indurre nel muscolo una transdifferenziazione simile a quella che avviene nell'osso,

(42). Nel caso dei cardiomiociti, una cicatrice non è abbastanza compliant da permettere una contrazione sostenuta e il campo di deformazione che essi possono generare nella matrice diminuisce drasticamente (Figura 1.2 B). Con la matrice rigida, le forze generate dalla cellula sono dissipate all'interno della cellula, probabilmente alterando la conformazione delle proteine che connettono il citoscheletro e la matrice. È importante sottolineare che questa forma di regolazione non è esclusiva delle cellule staminali e si è osservato che varia gradualmente nelle cellule mature. Per esempio, il muscolo in crescita cambia la sua elasticità con la differenziazione (43), le cellule ciliate hanno un citoscheletro specializzato ottimizzato per la trasmissione meccanica (44), e i neuroni rispondono a una bassa elasticità della matrice dovuta alla crescente ramificazione (45). Sicuramente anche il tessuto scheletrico esibisce comportamenti sensibili alla forza, come avviene per i condrociti (46) e per l'osso (47). È interessante notare che anche la trasformazione delle cellule epiteliali mammarie in un fenotipo tumorale (48) è guidata meccanicamente.

Come punto finale nella regolazione basata sull'elasticità, si dovrebbe notare che questa forma di regolazione meccanica è strettamente correlata alla presenza di ligandi sulla matrice. L'espressione di markers degli osteoblasti nella cellula progenitrice, infatti, è altamente sensibile non solo alla deformazione della matrice ma anche alla presenza dei ligandi sulla matrice (49).

1.3 Matrici extracellulari artificiali

La possibilità di passare da sospensioni di cellule alla generazione di tessuti dipende dall'utilizzo di specifici materiali che consentano fenomeni quali la migrazione, la crescita e la differenziazione cellulare in condizioni simili all'ambiente fisiologico. I materiali utilizzati come scaffold possono essere di origine naturale o sintetica e devono soddisfare alcuni prerequisiti fondamentali. In particolare non deve essere un materiale inerte, in quanto deve essere in grado di fornire alle cellule segnali simili a quelli che fisiologicamente giungono dalla matrice extracellulare (50). Lo scaffold, inoltre, deve essere non tossico, non immunogenico e bio-degradabile in tempi compatibili con l'integrazione dell'impianto (51); infine deve avere una struttura porosa che permette l'integrazione del tessuto e la neovascolarizzazione (52).

I polimeri biodegradabili sono tra i materiali più utilizzati nel campo dell'ingegneria dei tessuti e, essendo soggetti a modificazioni strutturali nel tempo per definizione, non sono adatti ad applicazioni in cui è richiesta una struttura meccanicamente e chimicamente stabile del materiale.

Per ogni materiale, quindi, è importante conoscere:

- Composizione chimica;
- Meccanismi di degradazione;
- Prodotti di degradazione;
- Variazioni delle proprietà meccaniche nel tempo;
- Eventuali limitazioni all'uso clinico

In relazione alle diverse applicazioni, i polimeri biodegradabili possono essere realizzati in dispositivi di diversi formati. In particolare, nel caso di supporti per la crescita e l'adesione cellulare, possono essere realizzati in membrane, film e nano tubi. Ad esempio vengono utilizzati tubi di matrice di collagene per promuovere la rigenerazione del tessuto nervoso, e materiali in forma di gel sono utilizzati prevalentemente per l'isolamento o come substrato per la rigenerazione del tessuto connettivo.

1.3.1 Polimeri naturali

I polimeri naturali che si usano per costruire scaffolds si distinguono in base alle loro caratteristiche chimiche:

- proteine, come collagene, fibronectina e laminina, tra i maggiori costituenti della matrice extracellulare (53);
- polisaccaridi, come l'acido ialuronico (54) e l'alginato (55);
- poli-idrossialcanoati, poliesteri di origine vegetale e microbica con importanti caratteristiche termoplastiche (56).

Il collagene di tipo I viene estratto dal tessuto connettivo dell'animale, come parete dei vasi arteriosi, mucosa intestinale o tendini. Per conferire al materiale le opportune caratteristiche meccaniche si esegue un trattamento con sostanze fissanti come la glutaraldeide (cross-link), migliorando le proprietà

meccaniche del collagene che, divenendo più stabile, acquista una migliore resistenza alla biodegradazione. Con questi trattamenti diminuisce parallelamente la capacità di assorbire acqua, essendo ridotti gli interstizi, e conseguentemente la solubilità. Vengono realizzate in collagene matrici 3D che favoriscono la crescita del tessuto in formazione. L'adesione cellulare è promossa dalle sequenze RGDs della proteina. Va tenuto conto che alcuni tipi di collagene, come quello di tipo II, possono innescare una risposta immunitaria, e sono quindi scarsamente utilizzati in clinica in Europa. Negli Stati Uniti invece il loro uso è più frequente e per molti di essi è stata data autorizzazione all'impiego clinico dall'FDA (l'ente federale che regola la commercializzazione dei farmaci).

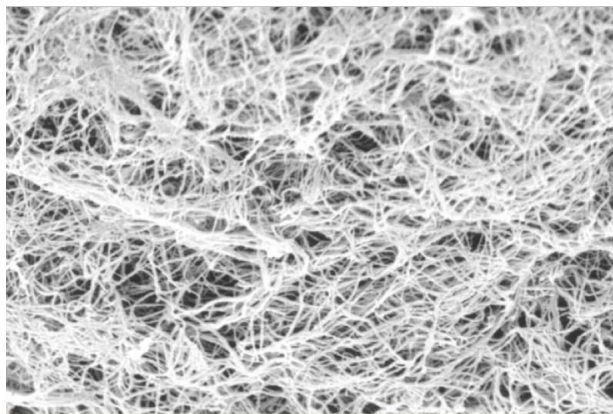


Figura 1.4: Esempio di matrice di collagene e glicosamminoglicano.

Il polimero naturale attualmente più usato è l'acido ialuronico che viene impiegato nei trapianti di lembi di pelle e riparazione di cartilagini come supporto per cellule epiteliali e condrociti. E' una molecola facilmente isolabile e modificabile per diminuirne la solubilità ed aumentarne le proprietà meccaniche. Questo materiale se non trattato, non è in grado di offrire un'adeguata resistenza meccanica in soluzione. Mediante un processo di esterificazione si può indurre un certo numero di legami intermolecolari così che il composto acquista maggior consistenza. Il grado di esterificazione oltre a consentire di modulare le proprietà meccaniche determina anche la velocità di degradazione.

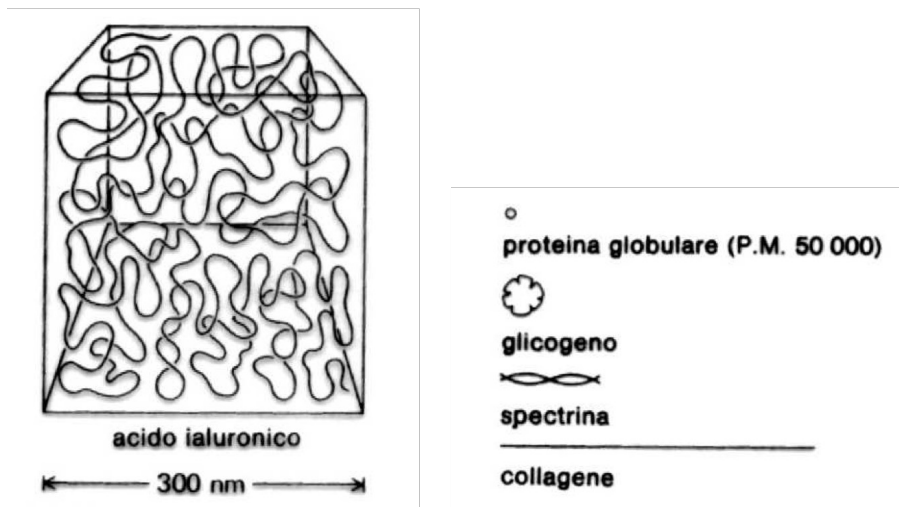


Figura 1.5 : Rappresentazione schematica della conformazione e dimensione della molecola di acido ialuronico in confronto con altre proteine.

Una delle caratteristiche dell'acido ialuronico è che ha la particolarità di essere degradato in maniera fisiologica, senza residui nocivi, grazie all'azione di enzimi, ialuronidasi, capaci di rompere le catene saccaridiche. Con una completa esterificazione può essere prodotto in strutture solide, ovvero membrane, o fibre. L'acido ialuronico è stato utilizzato anche come supporto di crescita di cellule muscolari lisce di aorta di maiale (57). Nel caso di organi con funzione di supporto, come le ossa, l'impianto di strutture di supporto prive di cellule e composte da materiali naturali biocompatibili come l'idrossiapatite ha dato buoni risultati. Infatti, tali strutture vengono prontamente colonizzate da osteoblasti che, secernendo matrice extracellulare, riproducono una struttura simile a quella pre-esistente (58).

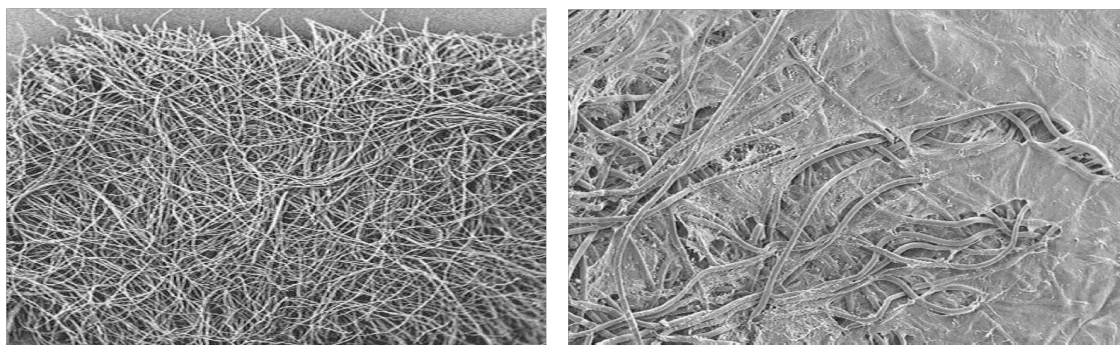


Figura 1.6 : Esempio di materiale biodegradabile a base di acido ialuronico esterificato.

Altri particolare polisaccaridi biodegradabili usati per colture cellulari sono gli idrogeli a base l'alginato di sodio e l'agarosio, a cui, data l'importanza dei due materiali ai fini di questa tesi, rimandiamo al capitolo 2 per una trattazione più completa.

1.3.2 Polimeri sintetici

Numerosi sono i polimeri sintetici il cui impiego è già stato promosso per interventi di ingegneria dei tessuti o ancora in valutazione. Tra quelli già in uso particolare importanza sembrano avere:

- il poli(N-isopropilacrilamide) (PNIPAAm)(59);
- l'acido poli(L-glicolico) (PLGA)(60);
- l'acido poli(lattico) (PLLA)(61);
- il poli-caprolattone (PCL)(62).

Si tratta di materiali ideali per colture cellulari, anche tridimensionali. Subiscono degradazione per idrolisi (ad opera di gruppi OH-) e una volta raggiunto un peso molecolare di circa 500Da durante il processo di degradazione danno luogo a reazione cellulare (con i macrofagi).

Il PNIPAAm è utilizzato come supporto per la crescita di condrociti e cellule epiteliali; il PLGA, usato come supporto per la ricostruzione di frammenti ossei (63), è idrofilico e perde le sue caratteristiche meccaniche abbastanza rapidamente nel tempo (2-4 settimane). Il PLA, usato in stent coronarici con memoria elastica (64), è invece tendenzialmente idrofobico e conseguentemente più stabile. Si usano spesso copolimeri delle due molecole nella realizzazione di materiali che abbiano una opportuna velocità di degradazione. Infatti il controllo della composizione dei copolimeri permette di controllarne la velocità di degradazione.

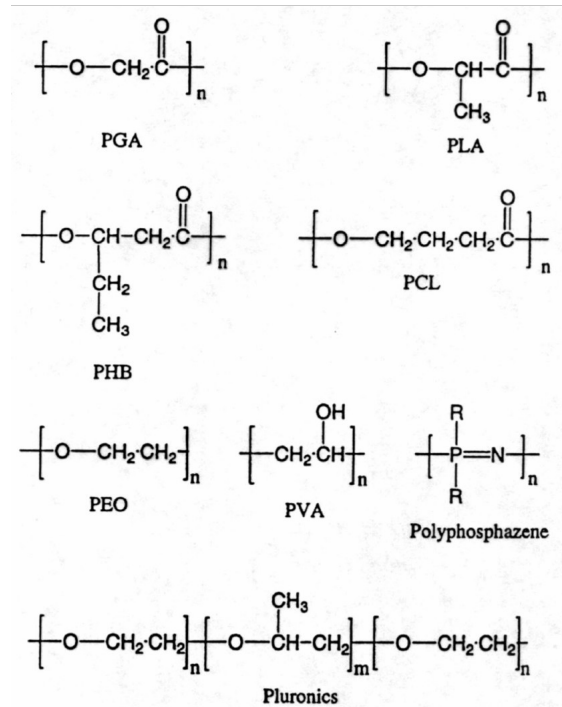


Figura 1.7: Formule chimiche di alcuni polimeri biodegradabili.

Un certo numero di materiali biodegradabili sintetici sono in corso di sviluppo per offrire caratteristiche meccaniche diverse da quelle offerte dai questi polimeri. In particolare si stanno studiando alcuni copolimeri a base di poliuretani, materiali complessi costituiti dall'assemblamento di polimeri di diversa natura. Questi materiali possono essere processati con diverse tecniche e permettono la realizzazione di matrici con particolare strutture e porosità. Al momento attuale, oltre alle difficoltà di ottenere materiali dalle caratteristiche adeguate si aggiunge la difficoltà nell'impiego clinico di questi materiali. Per poter effettuare una sperimentazione clinica è necessario ottenere autorizzazioni dagli enti governativi. Solo superando questo limite si potrà aprire la strada ad applicazioni cliniche innovative basate su tessuti biologici ingegnerizzati di nuova generazione.

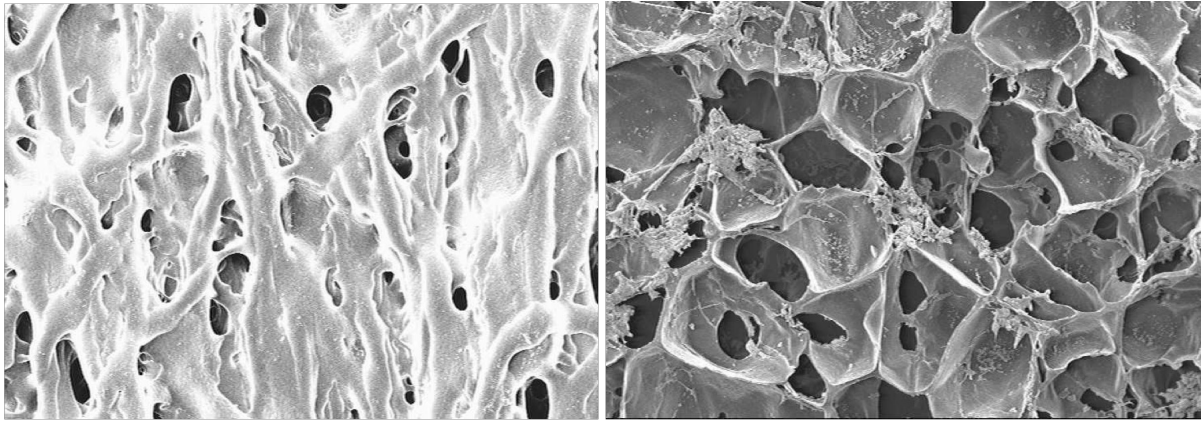


Figura 1.8 Esempi di materiale biodegradabile a base di poliuretano.

I polimeri sintetici offrono alcuni vantaggi rispetto ai polimeri naturali:

- possono essere modificati in modo da cambiarne le proprietà meccaniche;
- mostrano caratteristiche di uniformità tra i vari lotti;
- sono suscettibili a modificazioni;
- non sono soggetti o inducono reazioni immunitarie.

1.4 Tecniche di caratterizzazione meccanica delle matrici extracellulari artificiali

La scelta di un materiale è vincolata alle sue proprietà e alle funzioni che deve assolvere. Per questo motivo si sottopone il materiale a delle specifiche sollecitazioni esterne e si misura la conseguente variazione di opportune grandezze. Il risultato di ogni singola misura è verificato mediante la ripetizione della misura stessa su diversi provini, ritenuti identici, al fine di mediare i risultati e di minimizzare gli errori legati alla soggettività della singola prova. In genere le proprietà principali dei materiali che vanno ad essere indagate sono le seguenti: chimiche, meccaniche, termiche, elettriche, ottiche. Il presente lavoro di tesi è focalizzato sulla misura delle proprietà meccaniche. Affinché la differenziazione cellulare sia possibile, è necessario che ci sia similitudine tra le proprietà meccaniche dei tessuti da rigenerare e quelle dello scaffold su cui tali cellule sono seminate. Le proprietà meccaniche dei materiali polimerici possono essere investigate usando diverse tecniche. La scelta delle prove da effettuare è determinata dalle condizioni sperimentali, cioè dal tipo di materiale studiato e

apparato sperimentale impiegato nell'indagine, oltre naturalmente ai meccanismi di rilassamento che si intende investigare.

Le principali prove di caratterizzazione meccanica sono:

- Prova di trazione
- Prova di compressione confinata
- Prova di compressione non confinata
- Prova di indentazione

1.4.1 La prova di trazione

Le prove di trazione uniassiale rappresentano il metodo sperimentale più comune per studiare le proprietà meccaniche di un materiale (65). Essa consiste nel sottoporre un provino di dimensioni note a una forza di trazione lungo il suo asse, con una velocità di deformazione controllata, sino alla rottura. Per realizzare tale prova vengono tagliati dei provini rettangolari di materiale e vengono messi in trazione da una macchina di prova uniassiale. Il provino è afferrato superiormente e inferiormente mediante due morsetti serrati e, nel caso vengano testati materiali idratati, è previsto l'utilizzo di una camera d'idratazione. Si rileva il diagramma tensione-deformazione, intendendo con tensione il rapporto tra il carico applicato e la sezione iniziale, e con deformazione il rapporto tra l'allungamento di un tratto di riferimento e la sua lunghezza iniziale.

1.4.2 La compressione confinata

Anche la prova di compressione confinata può essere utilizzata per determinare le caratteristiche meccaniche di un idrogel (66,67). In questa prova il campione viene inserito in una camera di confinamento che ne impedisce le dilatazioni trasversali. Dopodiché viene applicata una compressione assiale attraverso un pistone rigido e impermeabile. In questo tipo di prova il flusso del fluido interstiziale conseguente alla compressione è consentito solo attraverso un filtro microporoso in acciaio posto alla base della camera di confinamento. Va comunque tenuto presente che la porosità deve essere sufficientemente piccola da garantire un contatto omogeneo con il campione ma allo stesso tempo sufficientemente elevata da non ostacolare sensibilmente il flusso della fase liquida. La prova è concepita in modo che tutti i fenomeni siano monodimensionali.

1.4.3 La compressione non confinata

Un'altra prova di caratterizzazione meccanica è la compressione non confinata (68,69,70) che consiste nel comprimere il materiale tra due placche rigide, lisce e impermeabili e la fuoriuscita laterale del fluido interstiziale è permessa dall'assenza delle parti laterali di confinamento.

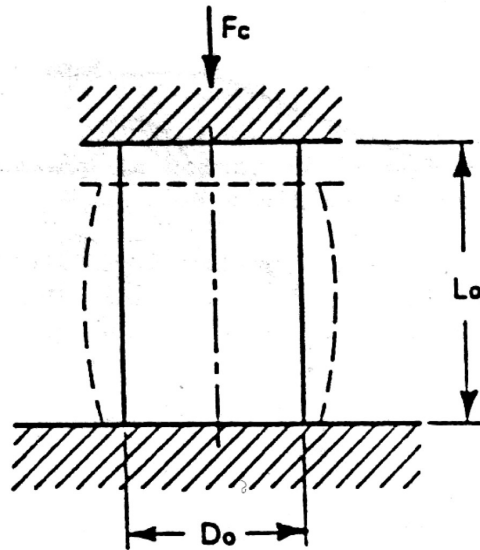


Figura 1.9 : Rappresentazione schematica della compressione non confinata. Il campione è compresso fra due piatti rigidi, lisci e impermeabili. La fuoriuscita di fluido avviene attraverso la superficie laterale.

La prova di compressione non confinata è una prova di stress-relaxation, ovvero si impone uno spostamento e si misura l'evoluzione nel tempo del carico con il quale reagisce il campione. Consiste quindi in una fase iniziale di carico a velocità costante fino a raggiungere la deformazione imposta, mantenuta poi costante per il tempo necessario a stabilizzare il valore di sforzo. Quello che si osserva è la progressiva diminuzione del valore di sforzo fino al raggiungimento di un asintoto. Da queste prove viene calcolato il modulo di Young E . Tale prova è stata seguita ai fini di questo lavoro di tesi, pertanto rimandiamo al capitolo 2 per una trattazione più dettagliata.

1.4.4 L'indentazione

L'indentazione è una tecnica utilizzata basata sull'applicazione di una compressione da parte di una punta rigida, chiamata indentatore, sulla superficie del campione da testare. Le prove di indentazione sono non distruttive e senza particolari esigenze per il campione studiato: questo è un grande vantaggio se bisogna testare materiali biologici poiché campioni di particolare forma o dimensione sono

solitamente molto difficili da ottenere.

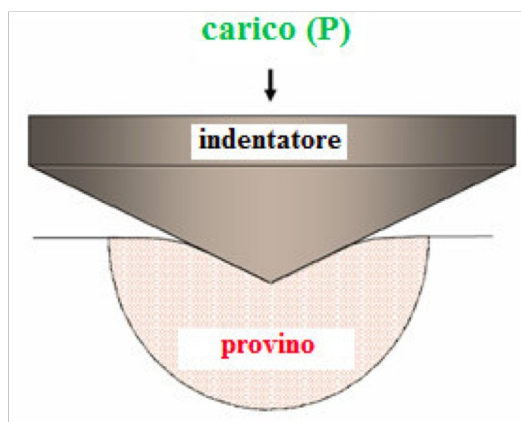


Figura 1.10: La prova di indentazione. Durante tale prova una punta rigida, chiamata indentatore, è pressata sulla superficie del campione da testare.

1.4.5 La prova reologica

Le prove reologiche vengono effettuate con reometri di vario tipo e, per quanto riguarda gli idrogeli, generalmente si effettuano prove con reometri rotazionali (Figura 1.11) (71).



Figura 1.11 : esempio di reometri rotazionali.

Nel reometro si può o applicata una coppia M , riconducibile allo sforzo di taglio e a quel punto misurare una velocità angolare Ω , riconducibile al gradiente di velocità oppure si può applicare una velocità angolare Ω e misurare una coppia M , dopo di che si perviene ad una espressione per la viscosità. Le due procedure sopra indicate sono tipiche, rispettivamente dei reometri a stress controllato e dei reometri a deformazione controllata. I reometri rotazionali sono caratterizzati dal tipo di geometria che impone il moto ai campioni, essi sono (Figura 1.12):

- reometri a piani paralleli;
- reometri a cilindri coassiali;
- reometri a cono piatto;
- reometri a piatti paralleli.

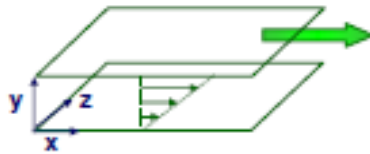


Figura 1.12a : reometri a piani paralleli.

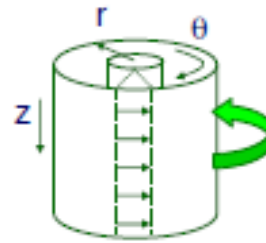


Figura 1.12b : reometri a cilindri coassiali.

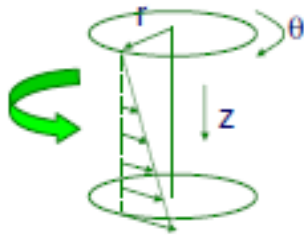


Figura 1.12c: reometri a cono piatto.

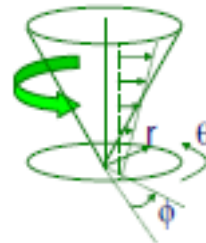


Figura 1.12d: reometri a piatti paralleli.

2. Materiali e metodi

2.1 Individuazione e caratterizzazione di una matrice per la coltura cellulare

Data l'importanza delle proprietà meccaniche della matrice sulla differenziazione cellulare, la matrice da individuare dovrà rispettare le specifiche di rigidità relative all'applicazione studiata. In particolare, poiché l'obiettivo è di permettere la differenziazione dei mesangioblasti in cardiomiociti, la matrice, oltre ad essere biocompatibile e permettere una buona adesione cellulare, dovrà essere in grado di simulare la rigidità del tessuto miocardico sia in condizioni fisiologiche (1-6 kPa), sia nel tessuto cicatriziale (35-70 kPa). I materiali analizzati nel presente lavoro di tesi sono:

- cellulosa batteriana prodotta dalla Membracel®;
- il polietilene glicole (PEG);
- idrogel di alginato e agarosio

2.1.1 Cellulosa batteriana Membracel®

La Membracel Produtos Biotecnológicos Ltda. è un'azienda nata nel 2000 nella città di Curitiba, Paraná, Brasile. Moreschi sviluppò queste membrane batteriane di cellulosa non porosa purificata, riducendo grandemente il contenuto di proteine e di altri pirogeni in relazione alle altre membrane in commercio. Con tale precauzione la membrana divenne di colore bianco e non biocompatibile. L'azienda ha sviluppato una membrana, chiamata appunto Membracel, costituita di microfibrille di cellulosa cristallina, sintetizzata in condizioni speciali in fermentazione batteriana e processata in maniera tale da ottenere un materiale disidratato, sterilizzato in ossido di etilene e con porosità creata artificialmente. Tale prodotto è utilizzato nel suo Paese di origine come sostituto temporaneo della pelle, al fine di promuovere una rapida rigenerazione delle lesioni causate da ustioni e ulcere (72). Attualmente in Sud America tale membrana sta acquisendo sempre più interesse in quanto la cellulosa batteriana, prodotta *Acetobacter xylinum*, è costituita da microfibrille di dimensioni indefinite, intrecciate e distribuite senza direzioni preferenziali formano un tessuto gelatinoso a spessore sottile. Essendo costituita di cellulosa, materiale altamente igroscopico e inerte, e grazie alle caratteristiche ottenute dal processo di lavorazione, la membrana Membracel permette la protezione del derma e promuove la rigenerazione del tessuto. Il contatto diretto di questa con il letto della lesione, infatti, ha

come obiettivo lo sviluppo e la crescita accelerata di tessuto di granulazione.

Svensson (73) ha dimostrato che le membrane di cellulosa batteriana hanno valori di modulo elastico che variano tra i 10kPa e i 70kPa, in funzione dello spessore, da prove di compressione confinata (Figura 2.1) e di circa 10.5MPa da prove di trazione (Figura 2.2); inoltre la cellulosa batteriana è in grado di supportare la proliferazione dei condrociti e ne permette il differenziamento durante la crescita.

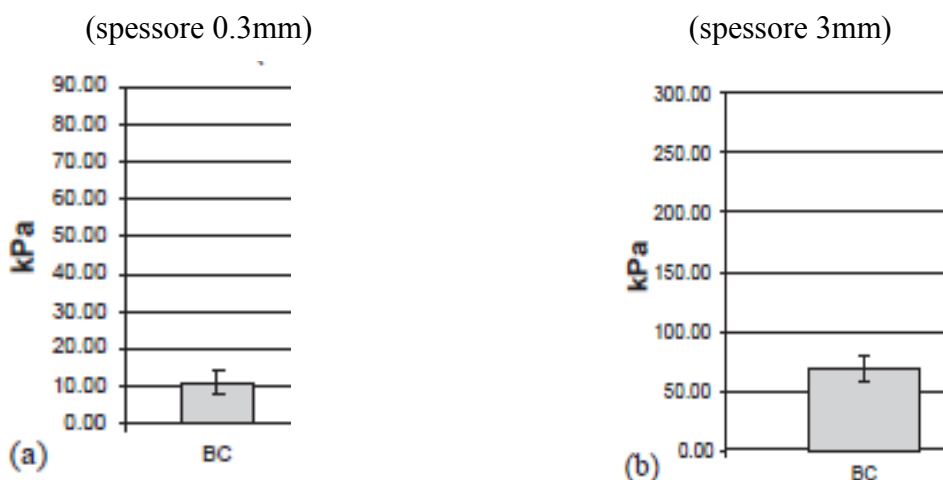


Figura 2.1: Modulo elastico ottenuto da prove di compressione confinata in campioni di a) 0.3 mm e di b) 3 mm.

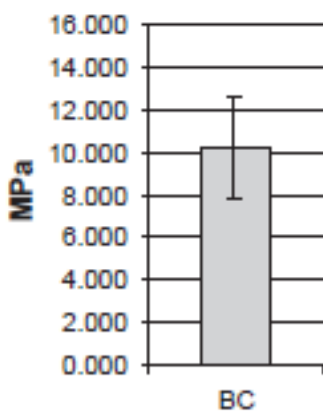


Figura 2.2: Modulo elastico della membrana batteriana ottenuto da prove di trazione.

2.1.2 Il polietilene glicole (PEG)

Il poli etilene glicole (PEG) è un materiale biocompatibile, non tossico, preparato per polimerizzazione dell'ossido di etilene. Tale idrogel è idoneo alla somministrazione in vivo di farmaci: proteine “PEGilate”, ad esempio, sono state usate per la maggiore resistenza alla degradazione enzimatica (74,75), per l'aumentata stabilità termica e per la ridotta risposta immunitaria. L'utilizzo del PEG riduce l'assorbimento proteico su una varietà di substrati idrofobici (76), quali polimeri solidi o liposomi (77,78) e minimizza le deposizioni di piastrine su superfici esposte a flusso sanguigno (79).

Il PEG è un materiale interessante anche per alcune sue caratteristiche chimiche: possiede, infatti, un “backbone” con una bassa polidispersione di peso molecolare; per questo motivo risulta solubile in acqua, come in molti altri solventi; è commercialmente ottenibile con vari tipi e gradi di modificazioni chimiche e può facilmente essere fotopolimerizzato. Inoltre è possibile intrappolare nella sua struttura biomolecole di varie dimensioni. In particolare, gli idrogeli di PEG fotopolimerizzato hanno trovato utilizzo in un ampio range di applicazioni biomediche. Le più importanti sono:

- Utilizzo come barriera;
- Utilizzo come sistema di rilascio controllato di farmaci (drug delivery systems);
- Utilizzo come scaffold.

Grazie alla natura antiadesiva degli Idrogel di PEG diacrilato e alla possibilità di essere formato direttamente sulle superfici dei tessuti, tale materiale risulta un promettente candidato per rivestimenti biospecifici di tessuti (barriers). Molto studiata, infatti, è la possibilità di applicare il materiale su tessuti come soluzione liquida prepolimerica e, in seguito, essere fotopolimerizzato in situ per formare un film di Hydrogel sulla superficie del tessuto in questione. Forme biodegradabili di PEG di acrilato sono state utilizzate, ad esempio, per evitare adesioni post-operatorie (80). Per realizzare rivestimenti molto sottili (10µm) di tessuti, è stata inoltre utilizzata la fotopolimerizzazione interfacciale, in cui il fotoiniziatore è assorbito dalla superficie del tessuto, mentre non è presente all'interno della soluzione prepolimerica precorritrice di PEG diacrilato. Questi idrogeli di PEG diacrilato aderiscono alla superficie del tessuto su cui sono fatte polimerizzate grazie allo scorrimento del liquido precursore, non ancora fotopolimerizzato, all'interno del tessuto o alla sua diffusione all'interno della matrice ECM con l'effetto di avere rispettivamente o un'interazione meccanica o un network polimerico interpenetrante col tessuto. Diverse applicazioni hanno riguardato, inoltre, rivestimenti di sensori da impianto, per

aumentarne la biocompatibilità (81). Il PEG è oggetto di studio anche del campo delle matrici per rilascio controllato di farmaci, grazie ad una buona biocompatibilità, alla compatibilità con farmaci idrofilici e macromolecolari, quali proteine o oligonucleotidi, e alla facilità di controllare il rilascio di farmaco regolando l'assorbimento d'acqua, la densità di crosslink e la degradazione.

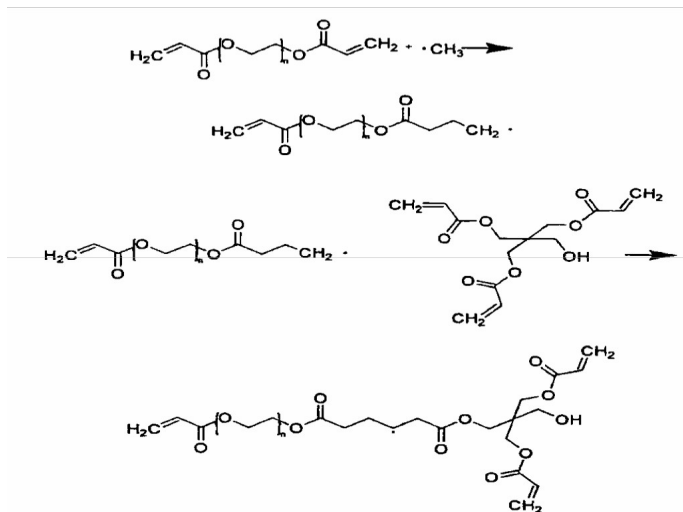


Figura 2.3: Struttura molecolare della molecola di PEG.

Poiché le proprietà fisico-meccaniche d'idrogeli di PEG possono essere modificate, variando, ad esempio, la concentrazione di monomero iniziale o di agenti cross-ligante, questi materiali risultano interessanti quali scaffold per lo sviluppo e la rigenerazione dei tessuti stessi.

Il PEG, poiché non ha buona affinità cellulare, è solitamente utilizzato con oligopeptidi di adesione RGD, cross legato con oligopeptidi corti che contengono plasmina o collagenasi (82)(83). Il cross-legante da alle cellule la libertà di migrare nella rete di PEG allo scopo di generare la secrezione naturale di proteasi. Un altro tipo di PEG utilizzato è il PEG-peptide modificato con ligandi di adesione e fattori di crescita per simulare:

- la migrazione delle cellule nel tessuto muscolare liscio (84);
- la proliferazione (85);
- la produzione di nuove proteine di matrice(86).

Il PEG utilizzato con tecniche come quelle descritte sopra, sembra in grado di permettere l'adesione cellulare (87). In letteratura i valori di modulo elastico da prove a compressione sono dell'ordine dei alcuni MPa come riportato nella Tabella 2.1

PEG 400	E MPa	M_c	PEG 1500	E MPa	M_c	PEG 6000	EMPa	M_c
(1/0.13)	0.49	13 200	(1/0.25)	1.9	2900	(1/1)	0.39	17 200
(1/0.25)	2.1	3300	(1/0.5)	2.5	2500	(1/2)	1.2	5900
(1/0.5)	2.9	2300	(1/1)	3.8	1700	(1/3)	1.6	4500
(1/1)	4.8	1300	(1/2)	4.6	1500	(1/4)	2.4	3100

M_c (g/mole): molecular weight between crosslinks.

Tabella 2.1: Valori del modulo elastico da prove a compressione per PEG in funzione della composizione molare. I PEG differiscono per la presenza o meno di domini cristallini e di catene intrecciate.

Per quanto riguarda le prove di trazione, i valori del modulo elastico sono compresi nel range 15-90kPa come mostrato nel seguente grafico (Figura 2.4)

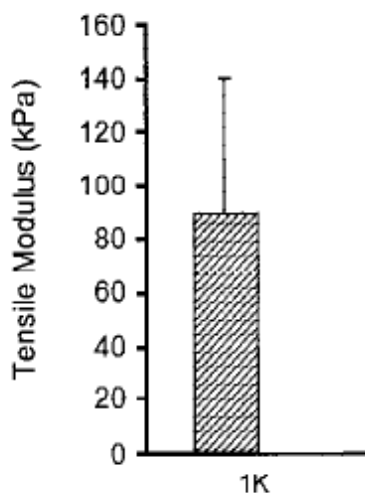


Figura 2.4: valori del modulo elastico da prove di trazione per il PEG un determinato valore di peso molecolare.

2.1.3 L'alginato

L'alginato è una sostanza derivante da alghe brune, come la *Laminaria hyperborea*, la *Macrocystis pyrifera*, e l'*Ascophyllum nodosum*. In tutte queste varietà, l'alginato è il principale polisaccaride presente all'interno della matrice intracellulare e può arrivare a costituire anche il 40% in peso del vegetale essiccato. Le catene polisaccaridiche dell'alginato sono sequenze lineari di acido β -D-mannuronico (M) ed acido α -L-guluronico (G), uniti in posizione 1-4 mediante legami glicosidici. Le

unità strutturali sono organizzate a blocchi: regioni omopolimeriche generate da sequenze mannuroniche (MM) o guluroniche (GG) vengono affiancate a strutture alternate (MG), come si può vedere nella Figura 2.5.

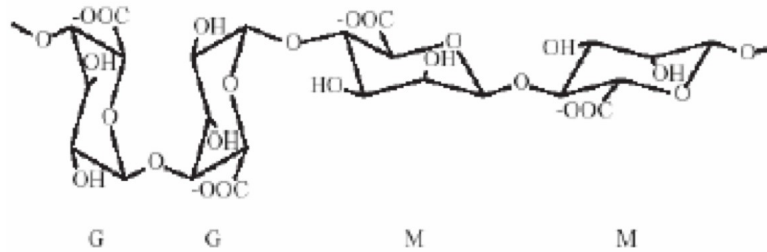


Figura 2.5: La struttura chimica degli alginati

Gli alginati che contengono un'elevata percentuale di blocchi di tipo GG hanno la capacità di formare gel. Il gel si forma in presenza di cationi bivalenti o trivalenti, che fungono da mediatori nel legare monomeri di guluronato di una molecola di alginato a regioni equivalenti di un'altra molecola di alginato. I cationi contribuiscono anche alla formazione di giunzioni di tipo fisico, di carattere cooperativo e di conseguenza sufficientemente forti da consentire la formazione di un gel rigido. Le interazioni fisiche in questione interessano regioni spaziali molto estese e vengono comunemente indicate con il termine "egg-box" (Figura 2.6).

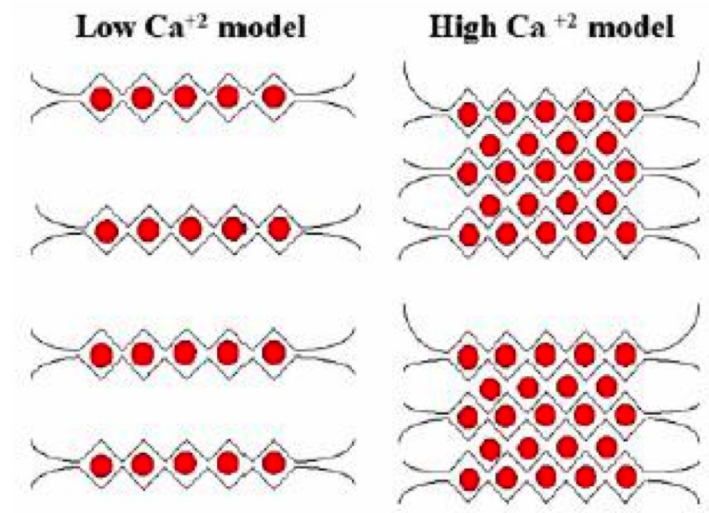


Figura 2.6: Le strutture "egg-box" (a "scatola di uova") caratteristiche dei geli rigidi di alginato. Le sfere rosse sono i cationi bivalenti.

Nel campo dell'ingegneria tissutale l'alginato sta acquisendo sempre più interesse grazie alla sua buona

affinità con le cellule. Tuttavia tale materiale è caratterizzato da un bassissimo modulo elastico e, durante la fase di polimerizzazione, da luogo a superfici molto irregolari che rendono difficile sia la sua caratterizzazione meccanica, sia lo studio di colture cellulari seminate.

L'alginato è uno degli idrogeli più studiati tra quelli che vengono fatti gelificare con cationi divalenti come il Ca^{2++} che cooperano per legare i blocchi G di catene di alginato adiacenti, creando ponti ionici che causano la gelificazione della soluzione acquosa di alginato. È importante notare che gli alginati cross-legati ionicamente perdono le loro proprietà meccaniche nel tempo, e ciò è presumibilmente dovuto al flusso di ioni cross leganti che esce nel mezzo circostante. L'alginato ha ottime capacità di far aderire le cellule ed è facilmente lavorabile per migliorarne le capacità di adesione (88).

Ahearne (89) ha eseguito prove di indentazione su campioni con concentrazioni comprese tra l'1.25% e l'1.75 % w/v, evidenziando valori di modulo elastico compresi tra 1kPa e 26kPa (Figura 2.7).

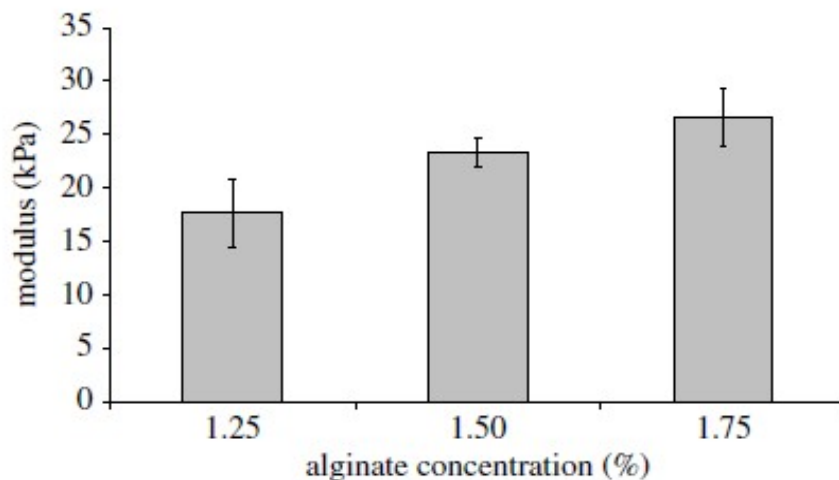


Figura 2.7: modulo elastico in relazione a diverse concentrazioni di alginato.

Kuo (90) ha sottoposto campioni dello stesso gel a prove di compressione, rilevando moduli elastici nel range tra i 10kPa e i 30kPa, a seconda del tipo di cross legante utilizzato per la polimerizzazione. A titolo di esempio è riportato il grafico del modulo elastico di un gel di alginato in funzione del tipo di cross legante e del suo contenuto di calcio, misurato in rapporto molare (Figura 2.8).

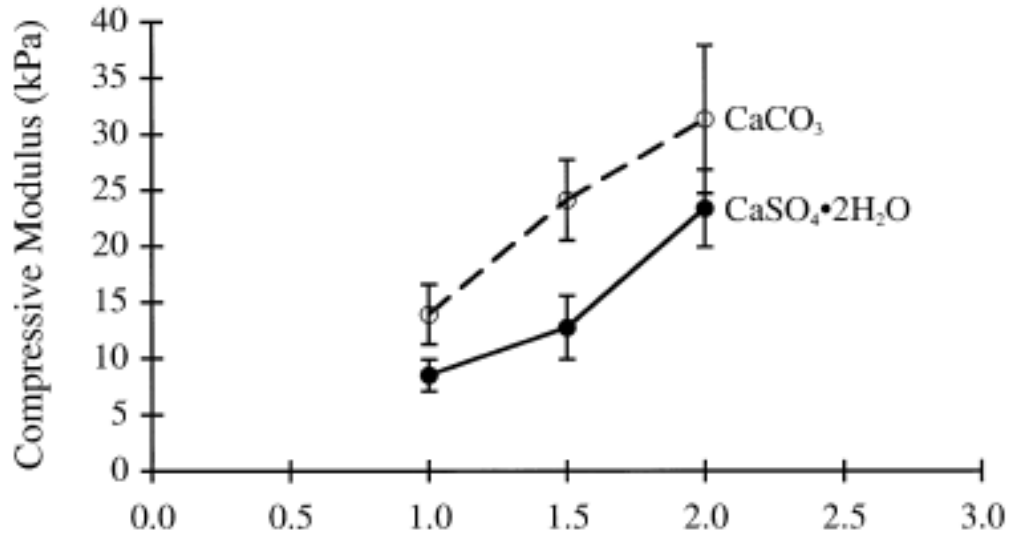


Figura 2.8 : Modulo elastico di gel di alginato in funzione della concentrazione di calcio espressa come rapporto molare

2.1.4 L'agarosio

L'agarosio è un polisaccaride purificato dall'agar agar, una sostanza gelatinosa estratta dalle alghe marine rosse. È un polimero lineare e neutro formato da unità di D-galattosio e di 3,6-anidro-L-galattosio legate alternativamente con legami glicosidici (Figura 2.9).

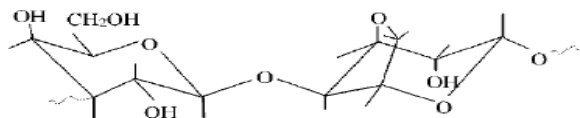


Figura 2.9: Unità fondamentale di agarosio, M = 306 g/mol.

L'agarosio è uno zucchero solubile in acqua alla temperatura di ebollizione, mentre diventa solido man mano che si raffredda formando un gel grazie alla formazione di una matrice tridimensionale costituitasi attraverso dei legami a idrogeno tra le catene lineari. E' composto da due catene di galattosio che si uniscono e assumono la conformazione a doppia elica (91,92); in forma di gel queste ultime si avvolgono così saldamente che le molecole di acqua rimangono trattenute negli interstizi (93).

Le due catene sono in grado di legarsi con i tratti terminali di altre eliche in maniera casuale, così da formare un'intricata rete di legami che rende il gel una complessa struttura tridimensionale di eliche contenente molecole d'acqua (94,95,96). La microstruttura del gel è illustrata in Figura 2.10 in un'immagine ottenuta con Microscopio Elettronico a Scansione (SEM).

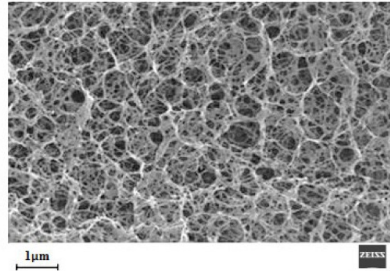


Figura 2.10: Immagine del gel di agarosio ottenuta con un Microscopio Elettronico a Scansione.

2.1.5 Formulazione di un idrogelo agarosio-alginato

Al fine di ottenere un idrogelo con buona affinità cellulare e adeguata rigidità, si è optato per la realizzazione di una miscela di alginato e agarosio. Il protocollo dettagliato per la formulazione dell'idrogelo è riportato in Appendice 5.1.

L'agarosio è stato scelto per la semplicità con cui è possibile produrre gel con differenti gradi di rigidità. Il modulo elastico del gel, infatti, è proporzionale alla quantità di agarosio contenuto. Per ottenere un gel a una determinata concentrazione si scioglie una certa quantità di agarosio in acqua deionizzata. Per la miscelazione viene utilizzato un agitatore magnetico che permette di aumentare la temperatura per favorire l'associazione dell'agarosio con l'acqua. Il composto, raffreddandosi, genera il gel pronto da usare negli esperimenti. A temperature superiori a 40° le catene di agarosio si presentano in una configurazione polimerica rigida e disordinata. A temperature inferiori le catene si riordinano per formare le eliche che successivamente si aggregano in spessi fasci (97).

La tecnica di formulazione proposta di questo lavoro di tesi consiste nello sciogliere le polveri di agarosio e alginato in soluzione fisiologica. Per il gel morbido la polvere di agarosio costituisce l'1.8%

peso/volume, mentre per il gel rigido il 4.5% peso/volume. In entrambi i casi la quantità di alginato è rimasta invariata, ovvero 0.2% peso/volume. Le soluzioni, in seguito, sono miscelate utilizzando un agitatore magnetico per 30 minuti alla temperatura di 80° e chiuse ermeticamente per evitare l'evaporazione della soluzione fisiologica. Il gel viene dispensato in pozzetti, parafilmato e tenuto alla temperatura di 4° per 60 minuti in maniera da favorire la polimerizzazione dell'agarosio e bloccare la struttura finale del gel. Contemporaneamente si prepara una soluzione 100mM di CaCl₂ (1.1% peso/volume) in fisiologica e, trascorsi i 60 minuti, si dispensa tale soluzione nei pozzetti, per determinare la polimerizzazione dell'alginato, la cui struttura è ormai bloccata tra le catene di agarosio. L'agarosio è un gel con ottime caratteristiche meccaniche, facilmente lavorabile e per questo è usato ampiamente come scaffold. Nella seguente tabella (Tabella 2.2) sono presenti le proprietà meccaniche date in letteratura. È da notare che il range di valori del modulo elastico varia notevolmente in funzione della concentrazione dell'agarosio, della temperatura (98) e del tipo di prova effettuata (99).

Investigators	Methods	Test Temp. (°C)	Agarose Gel (%)	Compressive Stiffness (kPa) ^a
Noncyclic loading				
Normand et al. (2000) [9]	Unconfined compression (6.4% strain/s)	10	1.0	80
			2.0	240
			3.0	520
Gu et al. (2003) [5]	Confined compressive creep ^b	21	2.0	1.5
			2.5	4.2
			3.0	10
			4.0	11
			6.0	33
			10.0	82
			14.8	330
Costa et al. (2003) [10]	Unconfined compression, stress relaxation, equilibrium modulus	Room temp.	1.5	3.4
			3.0	24
Stolz et al. (2004) [1]	Unconfined compression (0.01% strain/s)	23	1.5	3.0
			2.0	14
			2.5	22
			3.0	31
			4.0	64
Cyclic Loading				
Adler et al. (1998) [11]	Unconfined compression (~0.15 Hz)	37	1.0	14
			2.0	34
			4.0	140
Chen et al. (2003) [12]	Shear (<i>G</i>) DMA ^c (1–20 Hz, 1-Hz data shown)	n.r.	2.0	15 (45) ^d
			3.0	34 (100)
			4.0	75 (220)
Gu et al. (2003) [5]	Confined compression DMA ^c (0.01–1 Hz; 1-Hz data shown)	21	2.0	44
			2.5	100
			3.0	140
			4.0	170
			6.0	300
			10.0	600
			14.8	1000
Costa et al. (2003) [10]	Indentation, IT AFM ^e nano-pyramid (1 Hz)	Room temp.	1.5	9.8
			3.0	26
Costa et al. (2003) [10]	Indentation, IT AFM ^e microsphere (1 Hz)	Room temp.	1.5	3.7
			3.0	28
Stolz et al. (2004) [1]	Indentation, IT AFM ^e nano-pyramid (3 Hz)	Room temp.	2.5	22
Stolz et al. (2004) [1]	Indentation, IT AFM ^e microsphere (3 Hz)	Room temp.	2.5	36

^a kPa values rounded to 2 significant figures for ease of comparison.

^b This study employed load control, and all others employed displacement control.

^c DMA, dynamic mechanical analyzer (type of instrument used).

^d Values in parentheses are calculated of $E_c = 2G(1+\nu)$, for $\nu = 0.5$.

^e IT AFM, indentation-type atomic force microscopy.

Tabella 2.2 : Valori del modulo elastico dell'agarosio riportati in letteratura.

2.1.6 Caratterizzazione meccanica

Macchina di prova per la compressione

La macchina utilizzata per eseguire le prove di caratterizzazione meccanica è la ELF3200 (ElectroForce® 3200) della casa costruttrice Bose®. Le caratteristiche principali di questa macchina sono:

- possibilità di lavorare in un ampio range di frequenze (da un ciclo/giorno fino a 400 Hz);
- precisioni dell'ordine dei micrometri e dei micronewtons che garantiscono rispettivamente accurate variazioni di spostamenti e esatti controlli di forza;
- capacità di eseguire test composti da diverse forme d'onda e da diverse frequenze.

Essa comprende un blocco operativo, una centralina di acquisizione dati, un software di interfaccia installato su PC e un ulteriore software utile per le prove cicliche. Il software di interfaccia è il Wintest® Digital Control System che, grazie alla sua grafica piuttosto intuitiva, permette un certa flessibilità nel cambiare i vari parametri e quindi di impostare in maniera relativamente veloce e semplice diversi tipi di prove. Il blocco operativo è dotato di un attuatore meccanico, posto all'estremità dell'ambiente destinato ad ospitare campioni il cui movimento è misurato da un trasduttore di spostamento, un LVDT (linear variable differential transformer) preciso al micrometro; infine l'estremità dell'attuatore è montato l'afferraggio superiore. Il trasduttore di carico è invece una cella di carico, un trasduttore estensimetrico. Si hanno due tipi di cella di carico, una con un fondo scala pari a 220N ed una precisione dell'ordine del decimo di N ed un'altra con un fondo scala pari a 22N ed una precisione dell'ordine del centesimo di N. Per le prove di compressione dei gel si è scelto di utilizzare quella con fondo scala minore poiché, essendo le variazioni di carico, ai diversi livelli di deformazione, dell'ordine talvolta di qualche centesimo di N, garantisce una maggior precisione.

La cellula di carico è posizionata dalla parte opposta dell'attuatore e su di essa è montato l'afferraggio inferiore. I segnali misurati dai due trasduttori sono acquisiti dalla centralina della macchina e vengono inviati al PC per la visualizzazione su schermo e il salvataggio su file. La macchina può lavorare sia in controllo di carico sia in controllo di spostamento.

Le prove eseguite sono state condotte in controllo di spostamento; il controllo di carico è stato utilizzato per determinare lo spessore e per impostare il valore di precarico dal quale poi si fa partire la prova.

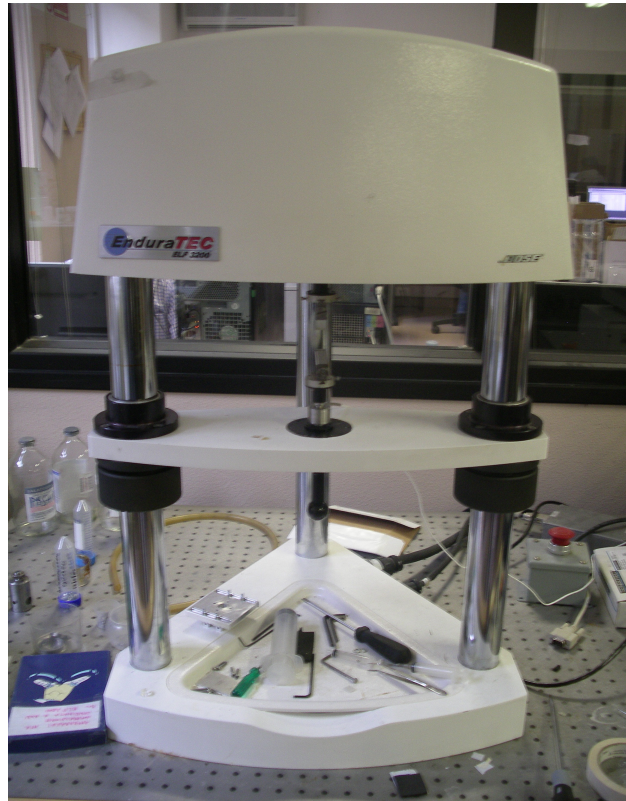


Figura 2.11 : Macchina di prova.

Gli afferraggi

Tutti i componenti costituenti gli afferraggi sono realizzati in acciaio inossidabile per evitare che il contatto con l'acqua e la soluzione fisiologica li possa danneggiare. Trattandosi di afferraggi per trazione o compressione, quello superiore è atto a tirare, o comprimere, il campione, mentre quello inferiore è costituito da una tenaglia atta a bloccare o da una camera che accoglie il campione.

Afferraggio superiore

Nella prova di trazione l'afferraggio superiore è costituito da un morsetto serrante che ha il compito di evitare eventuali movimenti del campione sottoposto ad allungamento. Nella prova di compressione non confinata, invece, si utilizza un pistone con base di 8 mm di diametro per permettere un completo schiacciamento del pistone, avendo cura di posizionare il campione esattamente in corrispondenza della base del pistone, in quanto un posizionamento errato del campione potrebbe determinare uno stato di sforzo non omogeneo al suo interno perchè solo una parte del pistone insisterebbe sul campione.

L'afferraggio è solidale all'attuatore in quanto ad esso vincolato tramite quattro viti mordenti in acciaio inossidabile

Afferraggio inferiore

L'afferraggio inferiore, nel caso di prova di trazione, è anch'esso un morsetto serrante e, nel caso il campione debba rimanere idratato, viene utilizzata anche una camera di idratazione.

Per la prova di compressione non confinata, invece, è costituito da un supporto sul quale viene posizionata una base, la quale, a sua volta, sorregge una camera di compressione confinata o una camera di compressione non confinata. Gli elementi principali di questo sistema sono:

- **il supporto:**
è la parte collegata tramite un apposito elemento alla cella di carico.
Su di esso viene vincolata la base mediante quattro viti mordenti in acciaio inossidabile.
- **la base:**
è la parte destinata a ospitare la camera di confinamento
- **la camera di compressione non confinata:**
è una vaschetta in plexiglass che viene incastrata nell'incavo profondo due millimetri ricavato nella base.

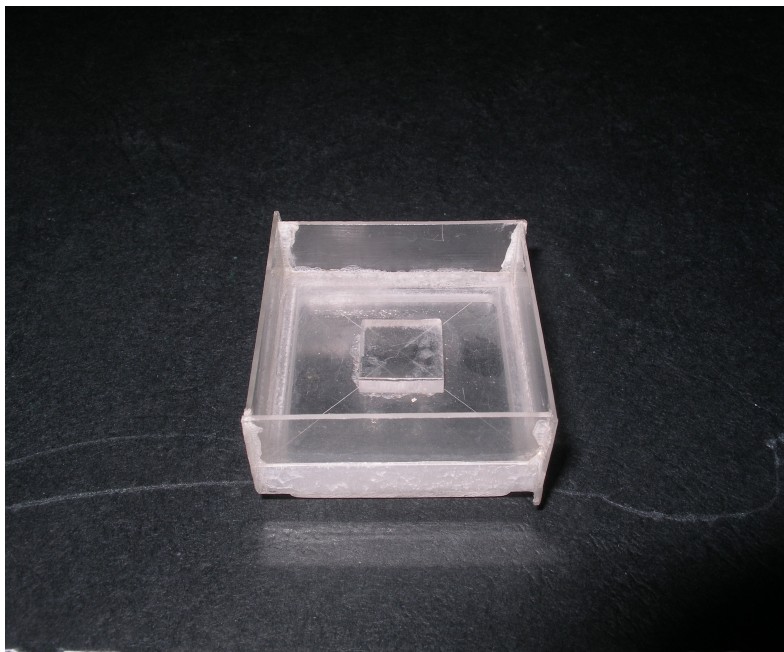


Figura 2.13 : Camera per la compressione non confinata: il campione viene posizionato sul rialzamento di forma quadrangolare al centro della camera.

Vengono di seguito riportati, secondo l'ordine di accoppiamento dei vari componenti, gli afferraggi per la prova di compressione non confinata.

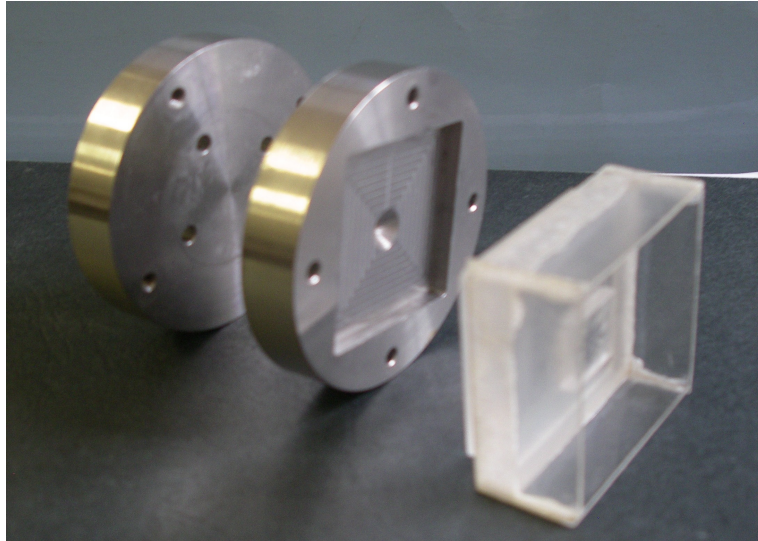


Figura 2.14 : Sequenza d'accoppiamento dei componenti per l'afferraggio inferiore per la prova di compressione non confinata.



Figura 2.15 : Sequenza d'accoppiamento dei componenti per l'afferraggio superiore per la prova di compressione non confinata.

Determinazione dello spessore

Prima di iniziare le prove vere e proprie, è necessario misurare lo spessore del campione.

Per la prova di trazione lo spessore è misurato utilizzando un calibro elettronico. Prima di inserire il campione nella macchina di prova, lo spessore è misurato in più punti del campione e viene calcolato lo spessore medio. Per la prova di compressione, invece, questa misura è fatta mediante una prova simile a quella di creep non confinata: si applica un piccolo carico costante al provino e, trascorso il tempo necessario a raggiungere il regime si ricava lo spessore iniziale dalla distanza tra i piatti rigidi e solidali al campione. Per questo tipo di misura si è scelto di utilizzare sempre la configurazione sperimentale della prova non confinata, ovvero la vaschetta in plexiglass ed il pistone da 8 mm per i seguenti accorgimenti:

- la vaschetta in plexiglass, essendo trasparente, permette un riscontro visivo sulla bontà della misura e permette di correggere eventuali posizionamenti errati;
- all'interno della vaschetta utilizzata per la prova non confinata il pistone scende con maggiore facilità, evitando eventuali attriti con la camera di confinamento che invece si potrebbero verificare in una configurazione confinata e questo, poiché le misure in gioco sono dell'ordine del mN e quindi molto basse, permette una maggiore precisione;

La prima operazione da fare è la misura dello zero seguendo la seguente procedura:

- si inserisce la vaschetta in plexiglass, vuota, sulla base;
- si esegue la tara delle cellule di carico in modo che essa misuri esattamente zero newton;
- si procede all'azionamento dell'attuatore controllandone il movimento in controllo di spostamento, avvicinandolo manualmente alla base, fino a quando il pistone ad esso solidale non arriva a contatto con la superficie in plexiglass. Il contatto è registrato dal trasduttore estensimetrico che misurerà un valore di carico diverso da zero;
- il valore di spostamento corrispondente, misurato dall' LVDT, è lo zero.

Dopo l'operazione di zero si può procedere alla misura dello spessore del campione:

- si alza l'attuatore fino al valore massimo consentito dalla macchina;
- si appoggia il campione centrandolo correttamente;
- si esegue la tara della cella di carico in modo che essa misuri esattamente 0 N ;

- si fa scendere il pistone in controllo di spostamento fino ad arrivare a contatto con il campione: con questo accorgimento si fa in modo che quando poi, al punto successivo, si aggiungerà l'acqua distillata il campione manterrà la sua posizione;
- si riempie la vaschetta fino all'orlo con acqua distillata in modo da evitare che il campione si disidrati falsando i risultati;
- in controllo di spostamento si cerca il valore di precarico corrispondente ad uno sforzo di 0.5 KPa (-0.02N per i campioni di diametro di 8 mm);
- si mantiene il provino in questa condizione per 10 minuti, tempo necessario affinché si esaurisca il creep del provino e quindi una stabilizzazione del valore di spostamento del pistone. Un tempo così breve è sufficiente a raggiungere l'equilibrio imposto per i materiali testati.

Il valore finale di spostamento (displacement) è il valore di contatto. Lo spessore del campione viene ricavato come differenza tra il valore della posizione in questa condizione e quello letto nella condizione zero.

2.1.7 Prova di trazione

In tale prova il campione, viene inserito tra due morsetti serranti e, data la necessità di tenere il campione immerso in acqua distillata, è stata utilizzata anche una camera di idratazione. La prova di trazione è una prova di stress-relaxation nella quale si impone uno spostamento e si analizza il valore della forza nel tempo. È divisa, quindi, in una prima fase di preconditionamento, in cui il campione viene messo in trazione all'1% di deformazione per una serie di cicli alla frequenza di 1Hz. Successivamente il campione è sottoposto a tre stati di deformazione crescente, rispettivamente 2%, 6% e 12%. Infine il campione viene scaricato e messo in trazione fino a rottura. Da queste prove è possibile estrarre vari parametri di interesse come il modulo elastico, l'area di isteresi nei cicli di pretensionamento e il modulo a rottura.

Modalità della prova di trazione

Dopo aver misurato lo spessore del campione, quest'ultimo viene bloccato tra i morsetti della macchina di trazione. La prova è costituita da una prima fase di precarico (Figura 2.16), seguita da quattro blocchi, ciascuno comprendente una rampa (ramp) e un rilassamento (dwell), entrambi in controllo di spostamento. La lunghezza iniziale del campione è definita come la distanza fra i due afferraggi dopo

l'applicazione del precarico. Il primo blocco sarà così costituito:

- innalzamento del pistone di controllo di spostamento fino a raggiungere una deformazione del 2% a una velocità costante del 1% della lunghezza iniziale del campione al secondo;
- rilassamento (dwell) di 300 secondi.
-

Seguono poi due blocchi che impongono una deformazione del 6% e del 12% (Figura 2.17) e, infine, dopo una fase di scarico, il campione viene messo in trazione fino a raggiungere il punto di rottura o l'allungamento massimo consentito dalla macchina di prova; la durata delle prove è di circa trenta minuti.

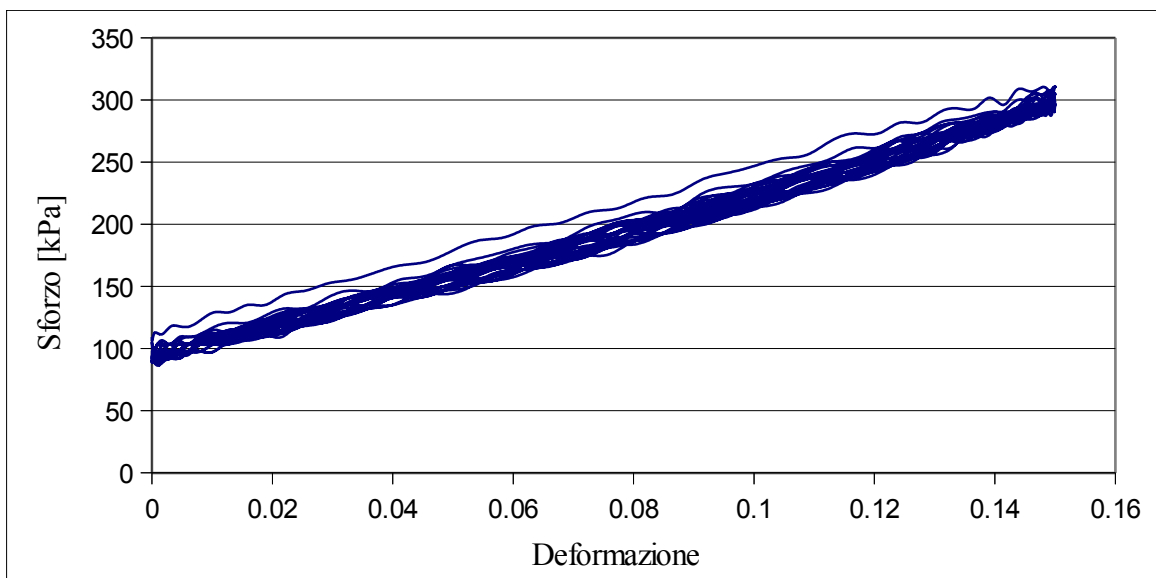


Figura 2.16 : cicli di precarico

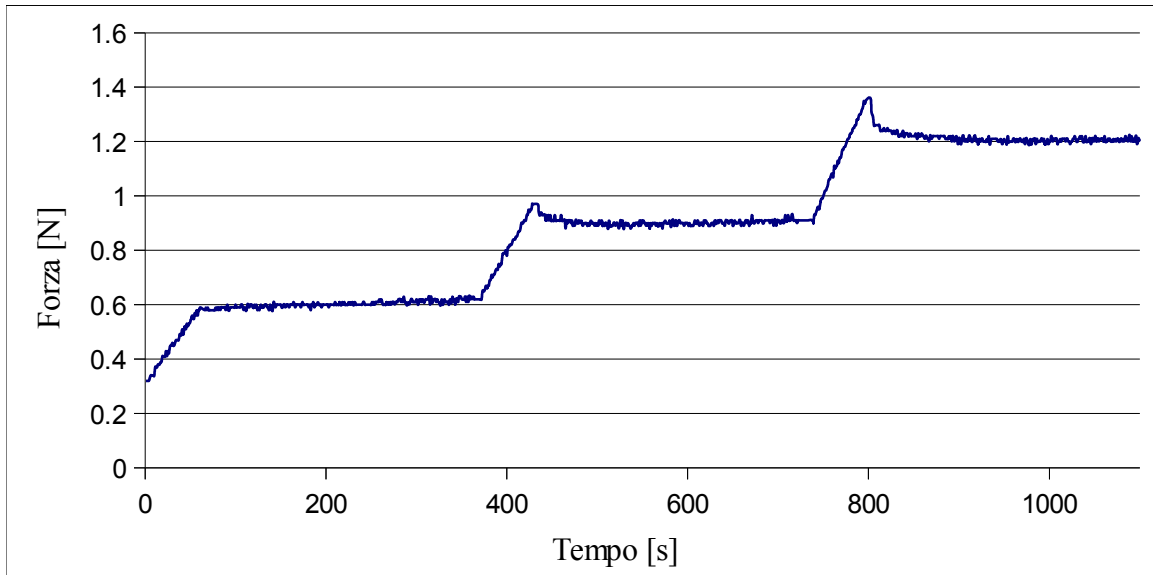


Figura 2.17 : Andamento della forza di trazione nel tempo. Nel grafico è possibile notare le tre rampe di deformazione al 2%, 6% e 12% della lunghezza iniziale e le conseguenti fasi di rilassamento.

Dall'ultima fase delle prove a trazione (allungamento fino a rottura) è stato possibile ricavare le curve sforzo-deformazione in cui il coefficiente angolare rappresenta il modulo elastico.

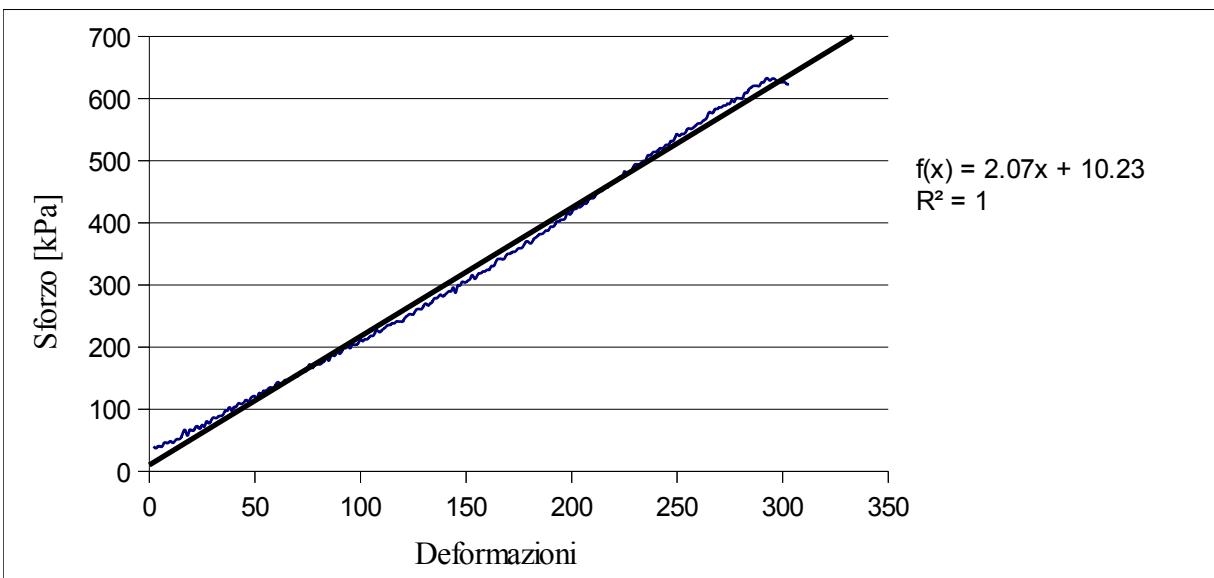


Figura 2.18 : esempio di curva sforzo-deformazione per la prova di trazione.

2.1.8 Prova di compressione non confinata

In questa prova il campione, viene inserito tra due piatti rigidi, lisci e impermeabili e la fuoriuscita laterale del fluido interstiziale è permessa dall'assenza delle parti laterali di confinamento. La prova può essere eseguita lasciando il campione immerso in acqua distillata.

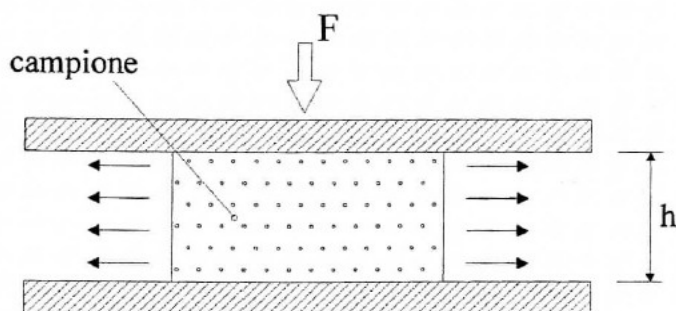


Figura 2.19 : Rappresentazione schematica della compressione non confinata. Il campione è compresso fra due piatti rigidi, lisci e impermeabili. La fuoriuscita di fluido avviene attraverso la superficie laterale.

La prova di compressione non confinata è una prova di stress-relaxation, si impone cioè uno spostamento e si misura l'evoluzione nel tempo del carico con il quale reagisce il campione. Consiste quindi in una fase iniziale di carico a velocità costante fino a raggiungere la deformazione imposta, mantenuta poi costante per il tempo necessario a stabilizzare il valore di sforzo. La velocità di carico è stata impostata in modo da avere una deformazione del 1% dello spessore del campione al secondo. Quello che si osserva è la progressiva diminuzione del valore di sforzo fino al raggiungimento di un asintoto. In particolare si tratta di una prova multirampa costituita da tre rampe di deformazione in cui il campione è compresso fino a raggiungere una deformazione del 2%, 4%, 8% ciascuna seguita da un rilassamento. Da queste prove viene calcolato il modulo di Young E .

Modalità della prova di compressione

Una volta determinato lo spessore del campione si imposta la prova che è sostanzialmente costituita da tre blocchi, ciascuno comprendente una rampa (ramp) e un rilassamento (dwell), entrambi in controllo di spostamento. Il primo blocco sarà così costituito:

- abbassamento del pistone in controllo di spostamento fino a raggiungere una deformazione del 2% a una velocità costante del 1% dello spessore del campione al secondo;

- rilassamento (dwell) di 800 secondi.

A questo seguono altri due blocchi analoghi che differiscono da questo per il valore di deformazione raggiunta alla fine della rampa che è del 4% e del 8%; la durata delle prove è di circa quaranta minuti.

Acquisizione ed elaborazione dei dati

I dati registrati dalla macchina vengono direttamente salvati su PC grazie al software di interfaccia Wintest® di cui è equipaggiata la macchina. A questo punto si apre con Excel® il file creato dalla macchina, in tale file sono presenti vari dati organizzati per colonne:

- il numero di campioni di ogni fase;
- il tempo totale trascorso dall'inizio della prova [s];
- il tempo trascorso dall'inizio di ogni fase (ramp e dwell) [s];
- lo spostamento del pistone all'istante t [s];
- la forza registrata all'istante t [N].

È possibile visualizzare il grafico della forza applicata sul campione nel tempo e quello dello spostamento del pistone nel tempo. A questo punto si calcola prima lo sforzo di regime σ dividendo la forza registrata dalla macchina per l'area del campione e poi si calcola il modulo elastico dalla formula:

$$E = \frac{\Delta \sigma_i}{\Delta \varepsilon_i}$$

$$\Delta \sigma_i = \sigma_i - \sigma_{i-1} \quad (1)$$

$$\Delta \varepsilon_i = \frac{disp_i - disp_{i-1}}{h_{i-1}}$$

dove per E si intende il modulo elastico, ε è la deformazione, h è lo spessore del campione, disp è lo spostamento σ è lo sforzo mediato sugli ultimi 30 valori di carico misurati alla fine del periodo di rilassamento; con $i=0$ ci si riferisce allo stato indeformato e con un $i=1,2,3$ ci si riferisce alle rampe del 2%, 4% e 8% rispettivamente.

2.2 Calcolo dello stato di sforzo-deformazione nelle cellule e nella matrice

Il secondo obiettivo di questo lavoro di tesi è giungere alla quantificazione dello stato di sforzo e di deformazione sia della matrice, sotto l'azione dei mesangioblasti, sia delle cellule stesse. Per la quantificazione dello stato di deformazione della matrice, sono stati inseriti dei marker (microsfere fluorescenti) sotto la superficie del gel in via di proliferazione. Rilevando i movimenti di queste ultime, è stato possibile identificare le deformazioni della matrice nel tempo. Per la quantificazione dello stato di deformazione delle cellule, le stesse sono state modificate utilizzando la green fluorescent protein (GFP). Per il tracking dei markers è stato utilizzato un microscopio a fluorescenza in time-lapse in grado di fotografare il piano all'interfaccia tra il monostrato cellulare e la matrice ogni trenta secondi per un periodo di sei ore, acquisendo così settecentoventi immagini salvate come TIFF (Tagged Image File Format) a 16 bit con varie tecniche di rilevamento:

1. contrasto di fase;
2. fluorescenza nel rosso;
3. fluorescenza nel verde.

Le immagini sono state registrate a 24 ore dalla semina. Nelle immagini a contrasto di fase sono ben visibili le cellule seminate sulla superficie della matrice ed è possibile osservare i loro movimenti; non risultano ben visibili, invece, i markers. (Figura 2.20).

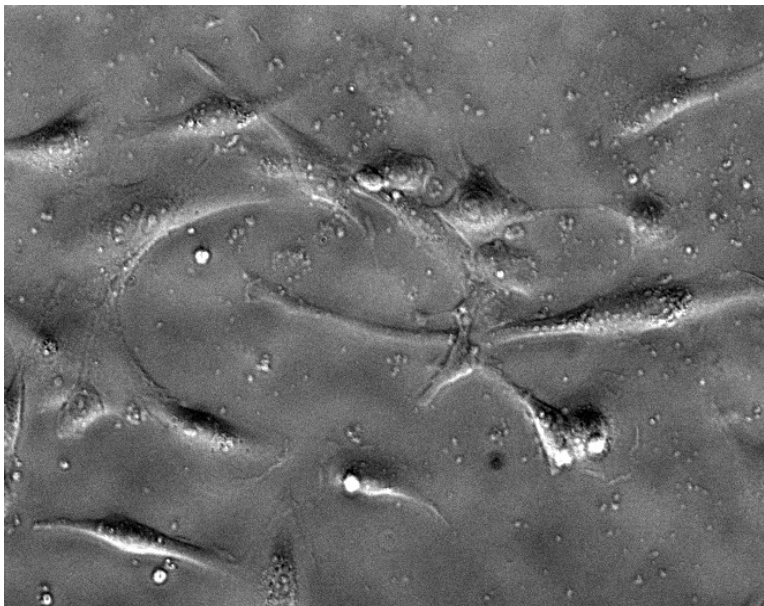


Figura 2.20 : esempio di immagine in contrasto di fase.

Al contrario, nelle immagini in fluorescenza, sia nel verde che nel rosso, i marker sono molto evidenti, ma l'identificazione delle cellule presenti sull'idrogel è molto limitata (Figura 2.21 e Figura 2.22). Nelle immagini in fluorescenza verde si possono notare anche i profili appena accennati di alcune cellule, come si nota in Figura 2.22.

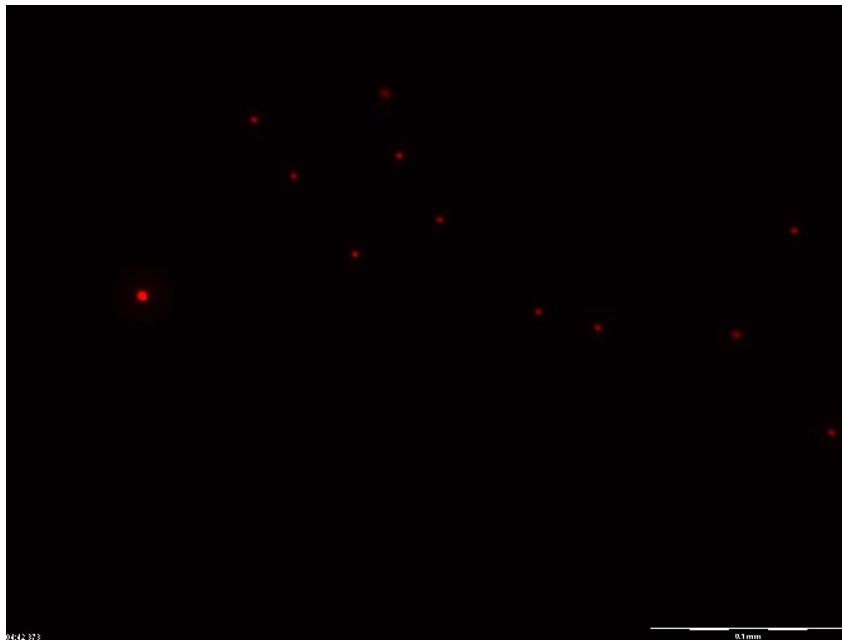


Figura 2.21 : esempio di immagine in fluorescenza rossa, è possibile soltanto la visualizzazione dei marker.

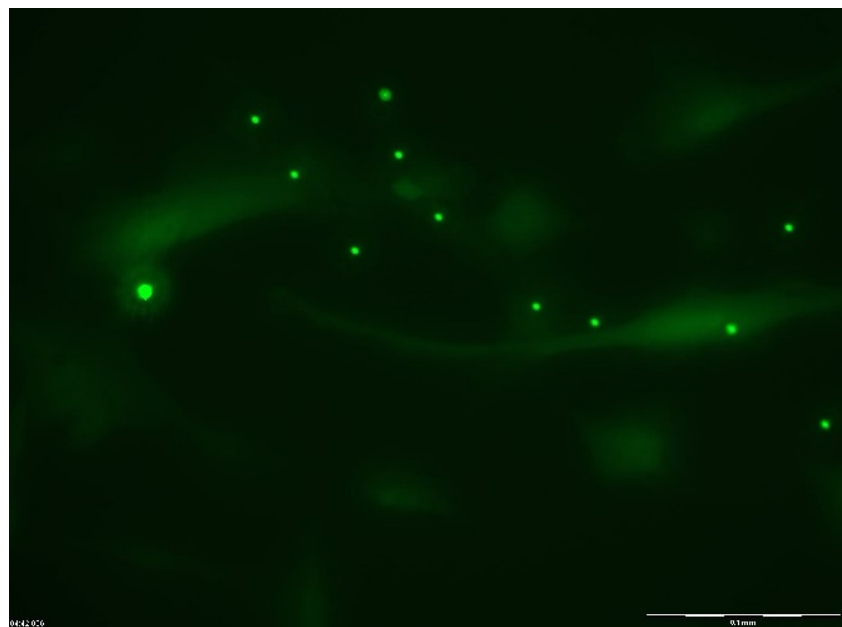


Figura 2.22 : esempio di immagine in fluorescenza verde, i marker sono ben visibili e in più si notano degli aloni che rappresentano le cellule marcate con GFP.

2.2.1 Identificazione dei baricentri delle microsferi incluse nella matrice

Per il rilevamento della posizione dei markers e dei relativi spostamenti è necessario identificare il baricentro di ogni microsfera. A tal scopo è stato utilizzato il software MATLAB®. Il listato completo del software sviluppato è riportato in Appendice 5.2.

Date le dimensioni delle cellule, e di conseguenza il range dei loro movimenti, sono stati esclusi dall'analisi tutti quei markers con movimenti molto accentuati e del tutto imprevedibili, probabilmente dovuti alla non corretta inclusione nella struttura della matrice. La selezione ha portato all'identificazione di otto markers di interesse (Figura 2.23).

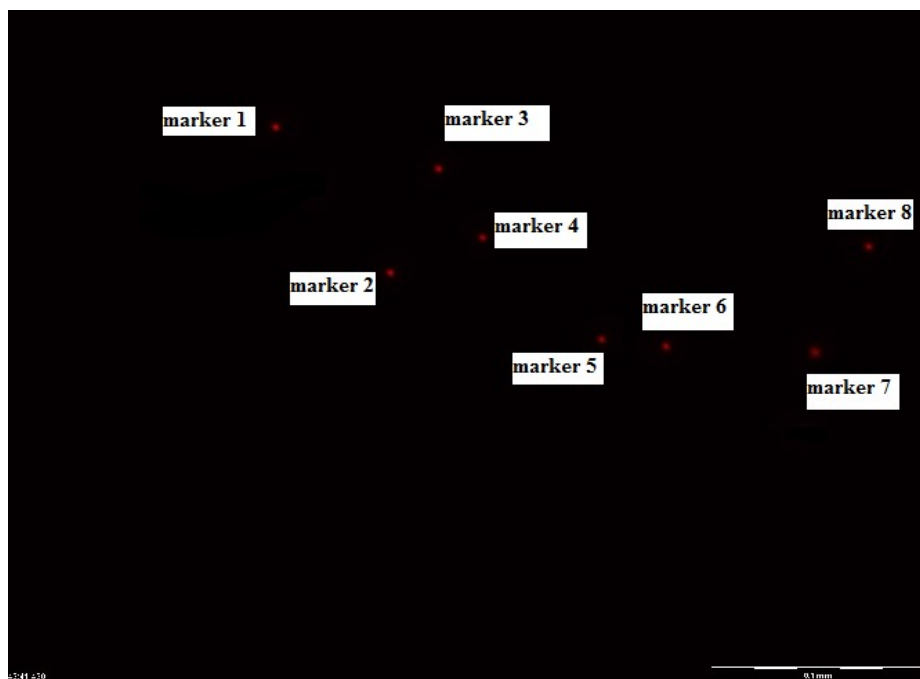


Figura 2.23 : gli 8 marker per utilizzati per l'analisi.

Le tappe fondamentali per il rilevamento delle coordinate dei markers sono:

- caricamento dell'immagine nel programma;
- conversione dell'immagine in binaria;
- selezione manuale dei marcatori di interesse;
- calcolo dell'area occupata da ogni marker;
- identificazione dei baricentri;
- salvataggio delle coordinate dei baricentri.

2.2.2 Identificazione degli stati di sforzo-deformazione

Per analizzare gli stati di sforzo e di deformazione della matrice sono stati identificati sulle immagini tre quadrilateri aventi come vertici le coordinate dei markers (Figura 2.24).

Un'ipotesi di lavoro adottata è stata quella di assumere le deformazioni di tipo planare, e quindi contenute nel piano delle immagini (stato di deformazione piana).

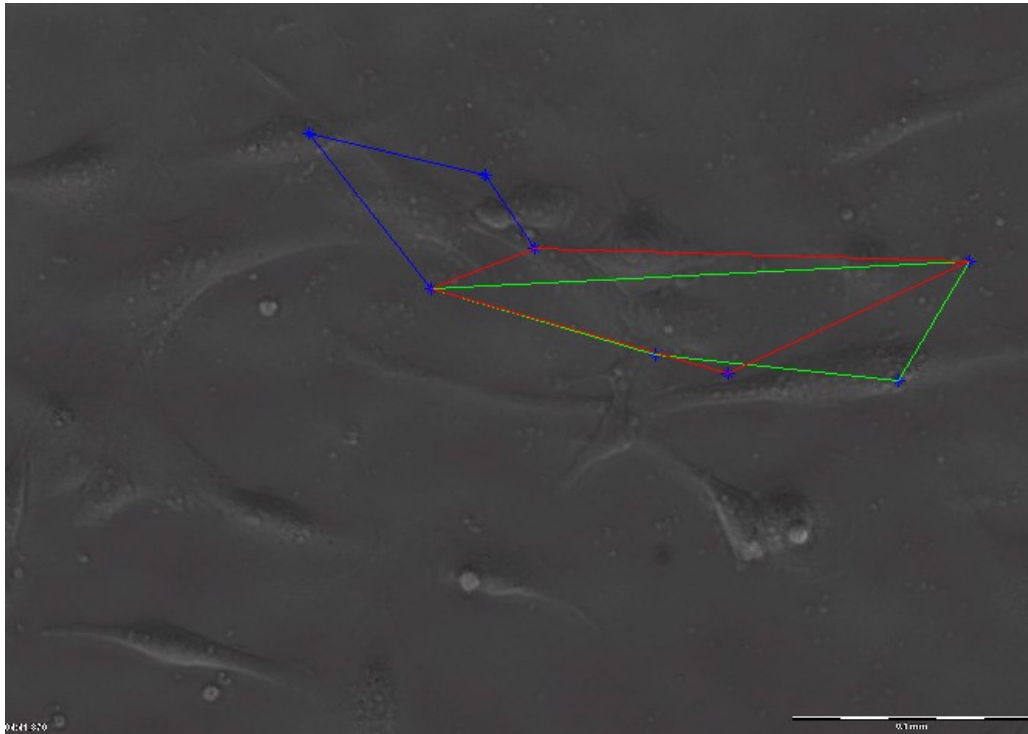


Figura 2.25: configurazione dei tre quadrilateri utilizzata per l'analisi.

Per passare dalle coordinate dei marker a una misura delle deformazioni subite dalla matrice si possono seguire due approcci:

- un approccio “globale”, che consiste nel calcolare direttamente le deformazioni medie nella regione di misura a partire dalle coordinate iniziali e finali dei markers;
- un approccio “locale”, che consente di valutare l'intero campo di deformazione nella regione di misura, passando attraverso l'introduzione di opportune funzioni di interpolazione.

Nel primo approccio si sono calcolate le deformazioni principali medie nel piano di osservazione, per ciò come prima cosa si sono calcolati i rapporti di allungamento nelle due direzioni x e y secondo la formula:

$$\lambda_x = \frac{1}{2} \left(\frac{x_2 - x_1}{X_2 - X_1} + \frac{x_3 - x_4}{X_3 - X_4} \right) \quad (2)$$

$$\lambda_y = \frac{1}{2} \left(\frac{y_4 - y_1}{Y_4 - Y_1} + \frac{y_3 - y_2}{Y_3 - Y_2} \right)$$

dove λ_x e λ_y sono i rapporti di allungamento, x_i e y_i per $i=1,2,3,4$, sono le coordinate dei punti dell' i -esimo marker, infine X_i e Y_i sono le coordinate dei punti nella configurazione di riferimento (quella non deformata) (vedi Figura 2.26a).

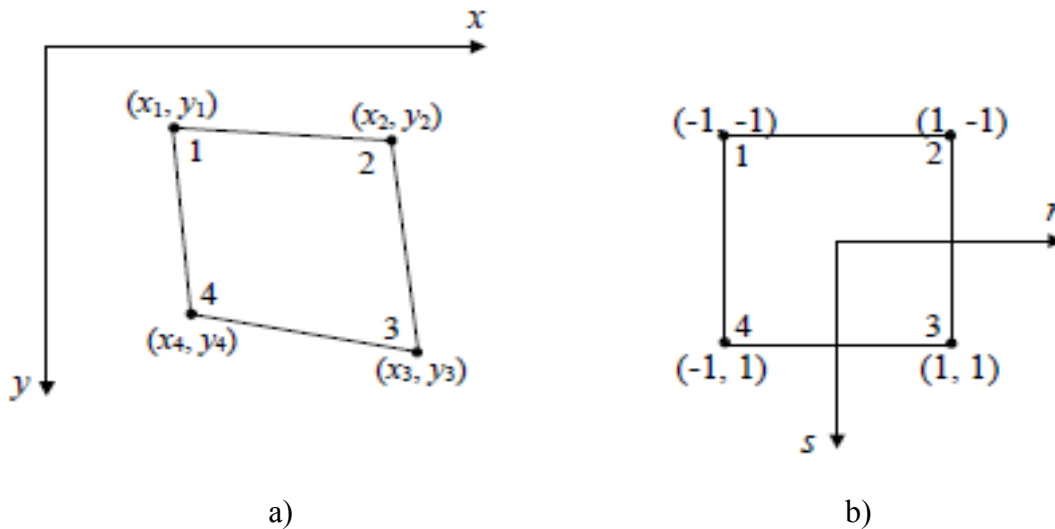


Figura 2.26 : a) posizione dei marker e del sistema di riferimento xy ; b) piano rs in cui è stato mappato il quadrilatero in xy nel quadrato ideale

Le deformazioni principali medie sono state calcolate attraverso le seguenti equazioni:

$$\bar{\varepsilon}_x = \frac{1}{2} (\lambda_x^2 - 1) \quad (3)$$

$$\bar{\varepsilon}_y = \frac{1}{2} (\lambda_y^2 - 1)$$

È da notare che le deformazioni definite nelle equazioni sopra sono misure di tipo globale e principale, cioè la distribuzione della deformazione all'interno della regione delimitata dai marker è assunta omogenea e sono trascurati i termini di dispersione. Tale approccio non può descrivere distribuzioni di deformazione non uniformi.

Nel secondo approccio sono state introdotte funzioni di interpolazione (100,101,102,103,104,105,106), con le quali è invece possibile rappresentare il campo intero di spostamento all'interno della regione di interesse della matrice a partire dallo spostamento di n punti (gli n markers) nel piano fisico (x, y) . Si consideri come regione di misura quella zona il cui contorno è delineato dalle congiungenti 4 markers di Figura 2.26a. Poiché la geometria reale della regione di misura risulta distorta, l'espressione analitica delle funzioni di interpolazione che correlano lo spostamento di ciascun punto interno agli spostamenti dei markers non è ricavabile. È quindi comodo ricondurre la geometria distorta della regione di misura nel piano fisico ad una geometria regolare e convessa in un piano virtuale (r,s) in cui è semplice scrivere le funzioni di interpolazione. Si introducono pertanto delle funzioni di mappatura che stabiliscono una correlazione biunivoca tra i punti della regione di misura e i punti della regione virtuale. Nel caso di un quadrilatero, nel sistema di riferimento (r,s) con origine nel baricentro dell'elemento, questa regione virtuale assume la forma di un quadrato di lato 2×2 (Figura 2.26 b). Gli spostamenti u, v ad ogni posizione all'interno della regione virtuale sono determinati usando:

$$u(r, s) = \sum_{i=1}^n f_i(r, s)u_i \quad v(r, s) = \sum_{i=1}^n f_i(r, s)v_i \quad (4)$$

dove $n=4$ è il numero di marker che vengono considerati, f_i è la funzione di interpolazione del marker i , u_i, v_i gli spostamenti dei markers in direzione x ed y ed r, s le coordinate isoparametriche:

$$x(r, s) = \sum_{i=1}^n f_i(r, s)x_i \quad y(r, s) = \sum_{i=1}^n f_i(r, s)y_i \quad (5)$$

Il sistema di coordinate (r, s) è un sistema di coordinate isoparametrico, poiché le stesse funzioni f_i vengono utilizzati sia per esprimere la corrispondenza tra i punti del piano fisico e quelli nel piano virtuale, sia per interpolare gli spostamenti del punto generico in funzione degli spostamenti nodali. Le f_i vengono così definite:

$$f_i(r, s) = \frac{(1 + r \cdot r_i) \cdot (1 + s \cdot s_i)}{4} \quad i = 1, 2, 3, 4 \quad (6)$$

Si osservi che la funzione di interpolazione f_i relativa al generico nodo i si calcola imponendo che si annulli in tutti i nodi fuorché nel nodo considerato dove deve assumere valore unitario. Nel caso in esame, deformazioni planari, le uniche componenti non nulle di deformazione di Green-Lagrange sono ε_{xx} , ε_{yy} , ε_{xy} e ε_{zz} (la componente ε_{zz} non viene però valutata). Le tre componenti planari possono essere calcolate in ciascun punto all'interno della regione di misura in termini di gradiente di spostamento dalla storia dei markers interpolati in accordo con le seguenti formule:

$$\begin{aligned} \varepsilon_{xx} &= u_{,x} + \frac{1}{2} \left[(u_{,x})^2 + (v_{,x})^2 \right] \\ \varepsilon_{yy} &= u_{,y} + \frac{1}{2} \left[(u_{,y})^2 + (v_{,y})^2 \right] \\ \varepsilon_{xy} &= \frac{1}{2} \left[u_{,y} + v_{,x} + u_{,x} \cdot u_{,y} + v_{,x} \cdot v_{,y} \right] \end{aligned} \quad (7)$$

dove le virgole indicano le derivate parziali rispetto alle coordinate x, y .

Le derivate spaziali u e v rispetto alle coordinate globali x, y sono determinate inserendo le equazioni 4 e 5 nei seguenti sistemi (107):

$$\begin{aligned} \begin{Bmatrix} \frac{\partial u}{\partial x} \\ \frac{\partial u}{\partial y} \end{Bmatrix} &= \begin{bmatrix} \frac{\partial x}{\partial s} & \frac{\partial y}{\partial s} \\ \frac{\partial x}{\partial r} & \frac{\partial y}{\partial r} \end{bmatrix}^{-1} \cdot \begin{Bmatrix} \frac{\partial u}{\partial s} \\ \frac{\partial u}{\partial r} \end{Bmatrix} & \quad \begin{Bmatrix} \frac{\partial u}{\partial x} \\ \frac{\partial u}{\partial y} \end{Bmatrix} &= \begin{bmatrix} \frac{\partial x}{\partial s} & \frac{\partial y}{\partial s} \\ \frac{\partial x}{\partial r} & \frac{\partial y}{\partial r} \end{bmatrix}^{-1} \cdot \begin{Bmatrix} \frac{\partial u}{\partial s} \\ \frac{\partial u}{\partial r} \end{Bmatrix} \end{aligned} \quad (8)$$

A questo punto sono state calcolate le componenti del tensore degli sforzi σ_{xx} , σ_{yy} , σ_{xy} attraverso le seguenti equazioni che esprimono la legge di Hooke, valida nell'ambito del comportamento del materiale elastico, omogeneo ed isotropo:

$$\begin{aligned}\sigma_{xx} &= E\varepsilon_{xx} \\ \sigma_{yy} &= E\varepsilon_{yy} \\ \sigma_{xy} &= 2G\varepsilon_{xy} \quad (9) \\ G &= \frac{E}{2(1+\nu)}\end{aligned}$$

dove ε_{xx} , ε_{yy} , ε_{xy} , componenti non nulle di deformazione di Green-Lagrange, G è il modulo di elasticità tangenziale e ν è il coefficiente di Poisson.

3 Risultati e discussione

Nel seguente capitolo sono dapprima presentati i risultati di questo lavoro di tesi. Segue la raccolta dei risultati relativi delle prove di trazione svolte sulla membrana batteriana Membracel e sul PEG e delle prove di compressione non confinata svolte sui gel di agarosio-alginato. I dati riportati nei risultati sono stati ottenuti seguendo la procedura descritta nel paragrafo *Caratterizzazione meccanica e validazione cellulare* del capitolo *Materiali e Metodi*.

3.1 Risultati della caratterizzazione meccanica

3.1.1 Membracel®

Per quanto riguarda la membrana di cellulosa batteriana Membracel® sono state effettuate prove di trazione uniassiale, su campioni di dimensioni di 6 cm per 0.5 cm e uno spessore di 10 μ m .

I risultati ottenuti mostrano valori di modulo elastico a trazione superiori a 1MPa, decisamente troppo elevati rispetto ai valori di progetto, dell'ordine del kPa.

	Membracel	
	Media	Dev. STD
Deformazione	[kPa]	[kPa]
6%	1233.45	150.33
12%	1145.62	103.25
18%	1024.54	85.87

Tabella 3.1: modulo elastico medio e deviazione standard in funzione della deformazione.

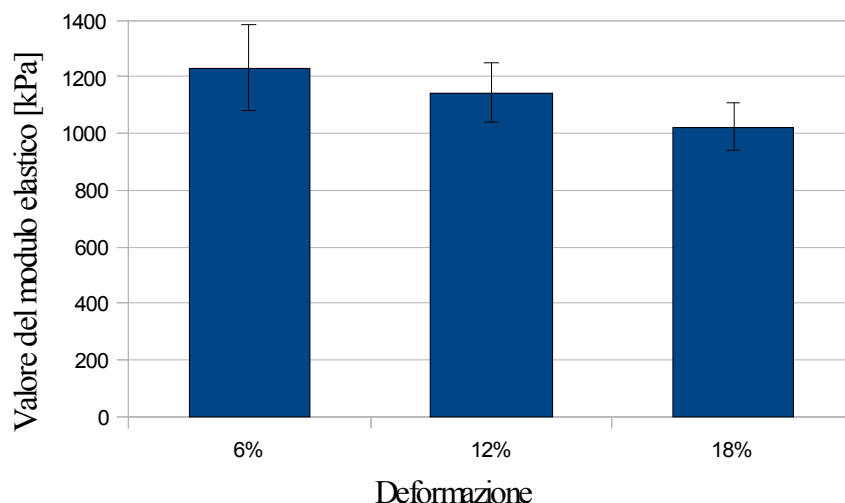


Figura 3.2 : rappresentazione grafica del modulo elastico medio e deviazione standard in funzione della deformazione.

Inoltre, dagli esperimenti effettuati Presso l’Istituto Pequeno Principe, è risultato che tale membrana, senza l’uso di colle, non ha buona affinità cellulare con cellule staminali mesenchimali animali e umane, probabilmente anche a causa della sterilizzazione con ossido di etilene. Tale matrice, perciò, non è stata presa in considerazione per la semina dei mesangioblasti.

3.1.2 II PEG

Sono stati testati tre tipi di PEG con prove di trazione:

- il PEG 0.5g;
- il PEG 0.5g diluito;
- il PEG 1g.

Per ognuno di essi sono stati testati 3 campioni ricavando i valori di modulo elastico riassunti nella (tabella 3.2) e rappresentati nel Figura 3.3.

Deformazione	PEG 1g		PEG 0.5g		PEG 0.5g diluito	
	Media [kPa]	Dev. STD [kPa]	Media [kPa]	Dev. STD [kPa]	Media [kPa]	Dev. STD [kPa]
6%	1016.56	4.85	650.56	9.98	622.50	70.21
12%	906.46	58.46	612.80	32.56	562.46	58.26
18%	848.23	96.26	528.84	47.14	417.73	31.27

Tabella 3.3: moduli elastici medi e deviazioni standard in funzione della deformazione, per i tre tipo di PEG testati.

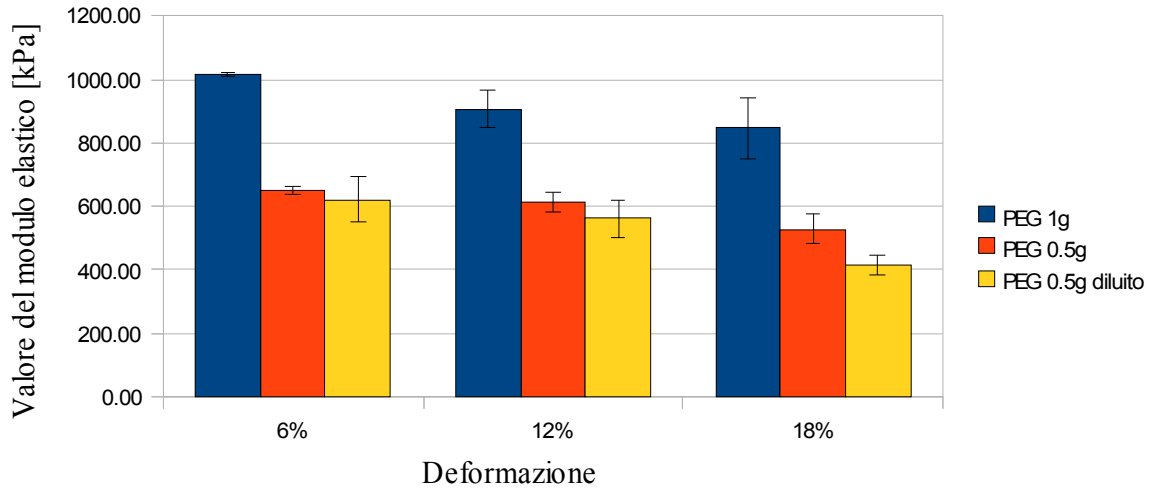


Figura 3.4 : rappresentazione grafica dei valori medi del modulo elastico e delle deviazioni standard in funzione del tipo di PEG.

Per i campioni testati i valori del modulo elastico sono compresi tra i 400 e i 1000kPa, eccessivamente alti per le specifiche di progetto.

3.1.3 Miscela Alginato-Agarosio

I campioni testati sono stati prodotti con il metodo descritto in *Formulazione di un idrogel agarosio-alginato* in *Metodi e Materiali*. I due gel, una volta prodotti, sono stati divisi in ventiquattro pozzetti e n'è stato misurato il modulo elastico per quattordici giorni, analizzando quattro campioni al giorno per ogni gel, a giorni alterni (Figura 3.5).

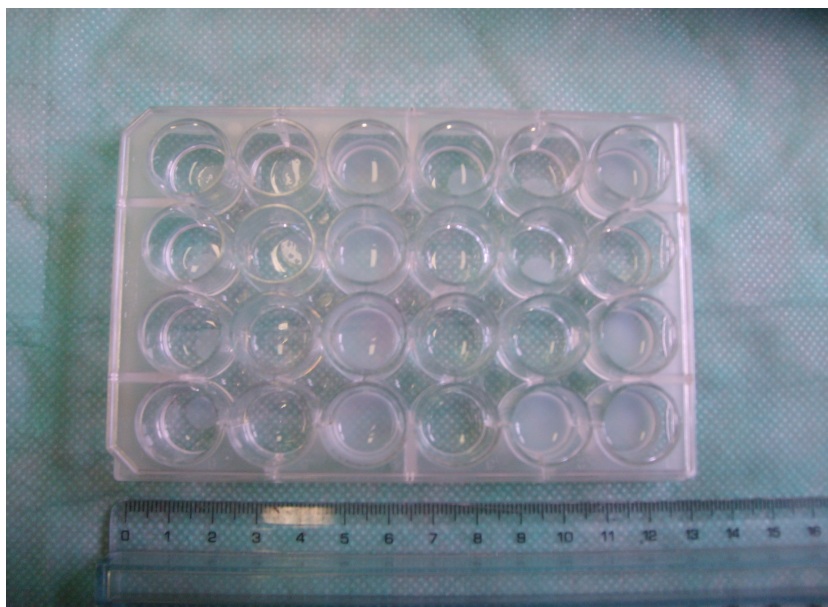


Figura 3.5 : Piastra da 24 pozzetti per la conservazione dei campioni di alginato-agarosio.

Da ogni pozzetto è stato possibile ricavare un campione di diametro di 8 mm e spessore variabile, successivamente misurato con il protocollo descritto in *Determinazione dello spessore*, in *Materiali e Metodi*. Il campione veniva tagliato utilizzando una fustella e subito utilizzato per la prova di compressione.

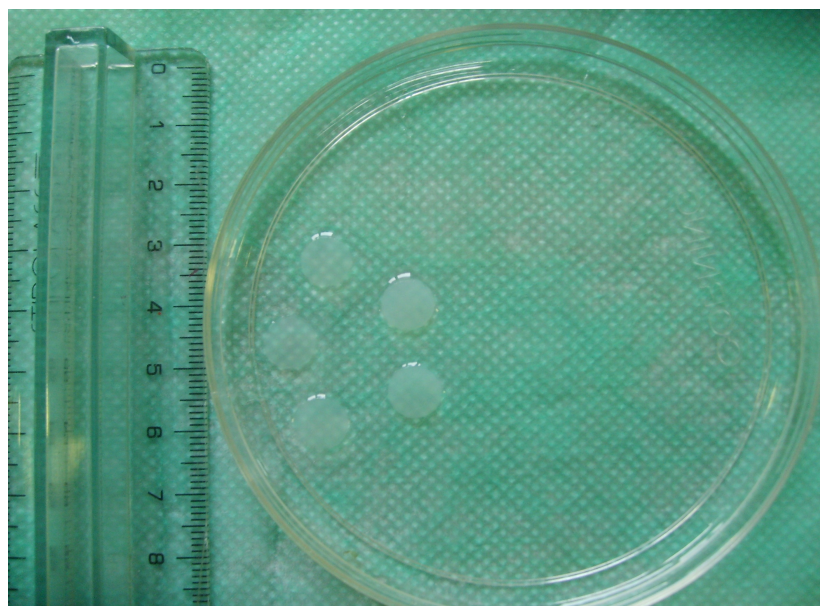


Figura 3.6 : esempio di campioni analizzati.

La caratterizzazione è stata svolta in un arco di tempo di due settimane in cui sono state effettuate otto prove al giorno, quattro per i campioni di gel rigido e quattro per i campioni di gel morbido. Nella Figura 3.7 è mostrato un tipico andamento dello spostamento del pistone della macchina di prova di compressione in funzione del tempo. Nell'immagine è possibile distinguere tre rampe, con valori in modulo sempre maggiori, dovute al protocollo di prova che imponeva deformazioni del 2%, 4% e 8% rispetto allo spessore iniziale.

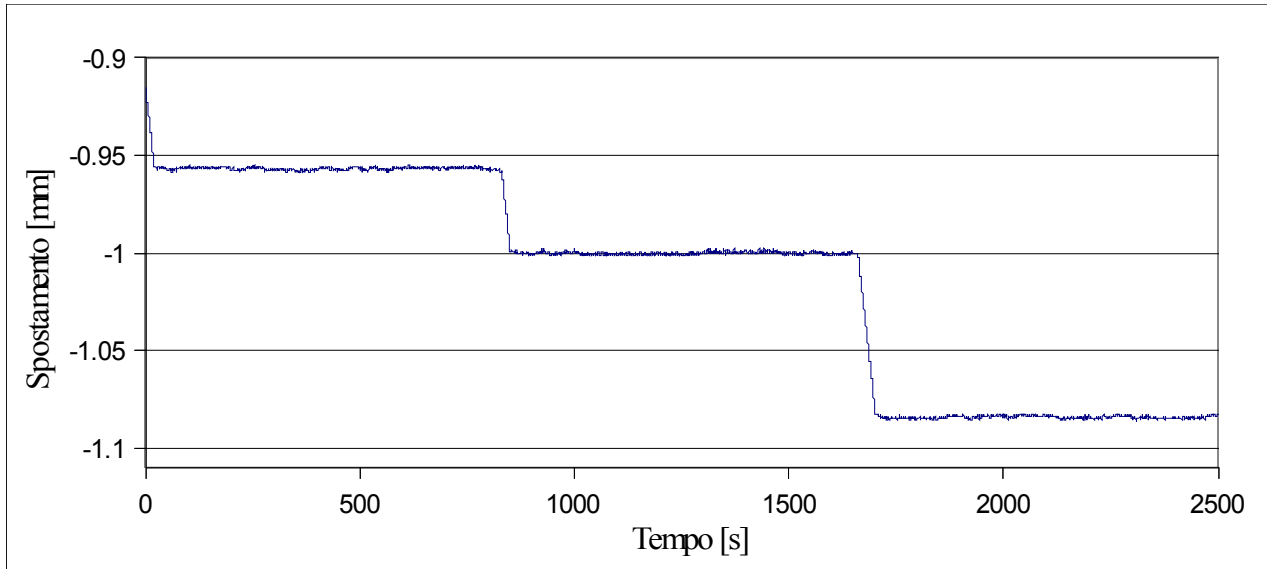


Figura 3.7 : Andamento dello spostamento del pistone nel tempo.

I gel di agarosio-alginato rispondono alla prova di compressione non confinata con un andamento del modulo di Young nel tempo che cresce in funzione della deformazione applicata. A seguito dell'imposizione della deformazione, infatti, è possibile notare un brusco aumento del modulo di Young, seguito da una lunga fase di rilassamento. Dall'andamento dei due grafici, inoltre, è possibile notare come l'andamento del modulo di Young aumenti con la concentrazione di agarosio, essendo questo l'unico parametro variato nella formulazione dei due gel.

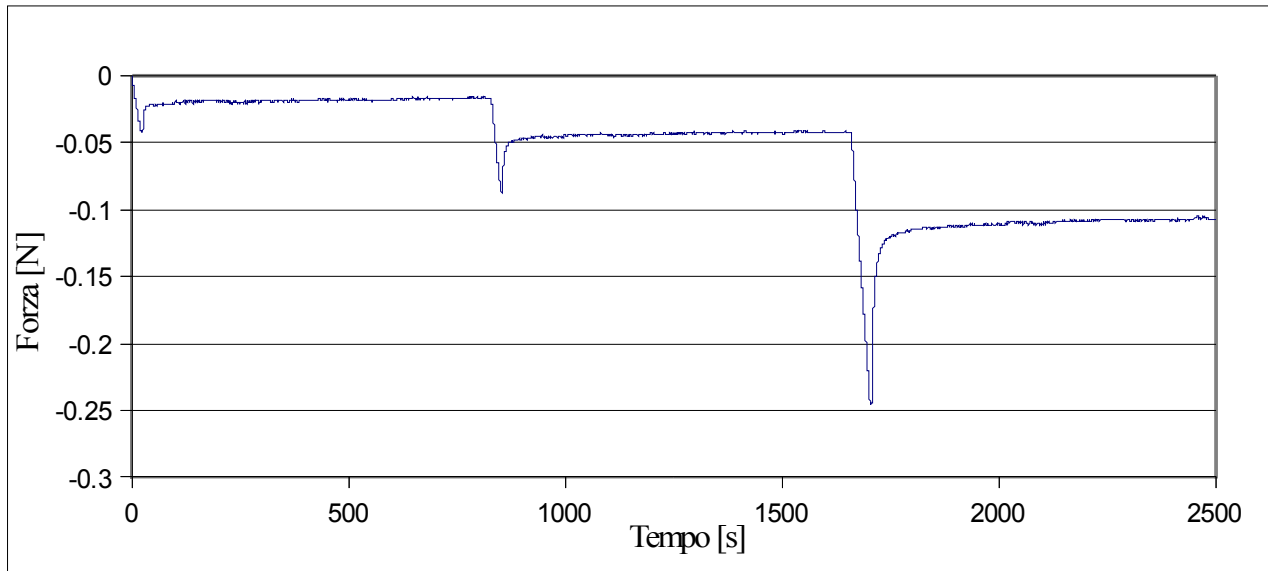


Figura 3.8 : Tipico andamento della forza a compressione di un gel di alginato-agarosio morbido.

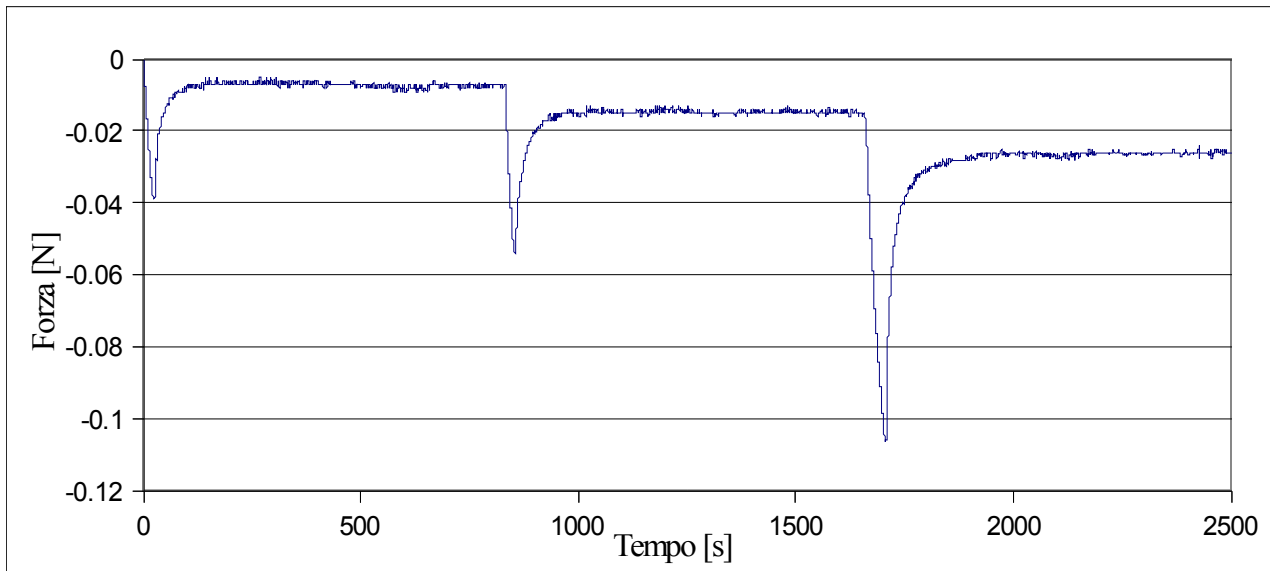


Figura 3.9 : Tipico andamento della forza a compressione di un gel di alginato-agarosio rigido.

Nella Tabella 3.4 è riportato il valore medio e le rispettive deviazioni standard del modulo di Young dei campioni testati per il gel morbido a seguire, nella Tabella 3.5 sono riportati i dati relativi al gel rigido. Tali dati sono stati calcolati includendo tutti i campioni utilizzati ed estraendo un modulo di Young medio per ogni giorno di sperimentazione.

tempo [giorni]	Agarosio 2% Alginato 2%					
	Deformazione 2%		Deformazione 4%		Deformazione 8%	
	Media [kPa]	Dev. STD [kPa]	Media [kPa]	Dev. STD [kPa]	Media [kPa]	Dev. STD [kPa]
1	1.220	1.263	0.980	1.181	1.820	0.405
4	3.110	1.595	3.050	1.153	2.870	0.674
7	6.160	1.590	6.400	1.733	4.240	1.020
10	1.870	1.307	3.650	0.844	4.090	0.783
13	0.620	0.473	2.800	0.240	3.670	0.611
16	2.370	0.250	3.290	1.006	3.790	0.914

Tabella 3.4: miscela di agarosio 2% alginato 2% medie e deviazioni standard dei valori di modulo elastico per deformazioni del 2%, 4%, 8% in funzione del tempo.

tempo [giorni]	Agarosio 5% Alginato 2%					
	Deformazione 2%		Deformazione 4%		Deformazione 8%	
	Media [kPa]	Dev. STD [kPa]	Media [kPa]	Dev. STD [kPa]	Media [kPa]	Dev. STD [kPa]
1	24.370	19.639	29.040	17.848	28.860	19.883
4	20.770	11.653	30.830	16.973	35.780	14.371
7	19.520	10.877	29.860	15.875	35.270	19.195
10	15.920	5.872	21.810	9.859	28.530	13.307
13	15.170	4.248	23.150	14.416	30.320	17.730
16	13.050	9.066	22.300	16.480	28.890	21.273

Tabella 3.5 : miscela di agarosio 5% alginato 2% medie e deviazioni standard dei valori di modulo elastico per deformazioni del 2%, 4%, 8% in funzione del tempo.

Dai grafici è possibile notare che nel gel rigido la degradazione porta ad una significativa perdita di modulo elastico, soprattutto nel caso di deformazioni del 2% dove è presente una diminuzione del modulo del 50% rispetto al valore iniziale. Variazioni meno evidenti, invece, sono presenti nel caso di deformazioni del 4% e dell'8%. Nel caso del gel morbido è presente una prima fase di irrigidimento, che porta ad un aumento del modulo elastico, soprattutto per piccole deformazioni e intorno al settimo giorno.

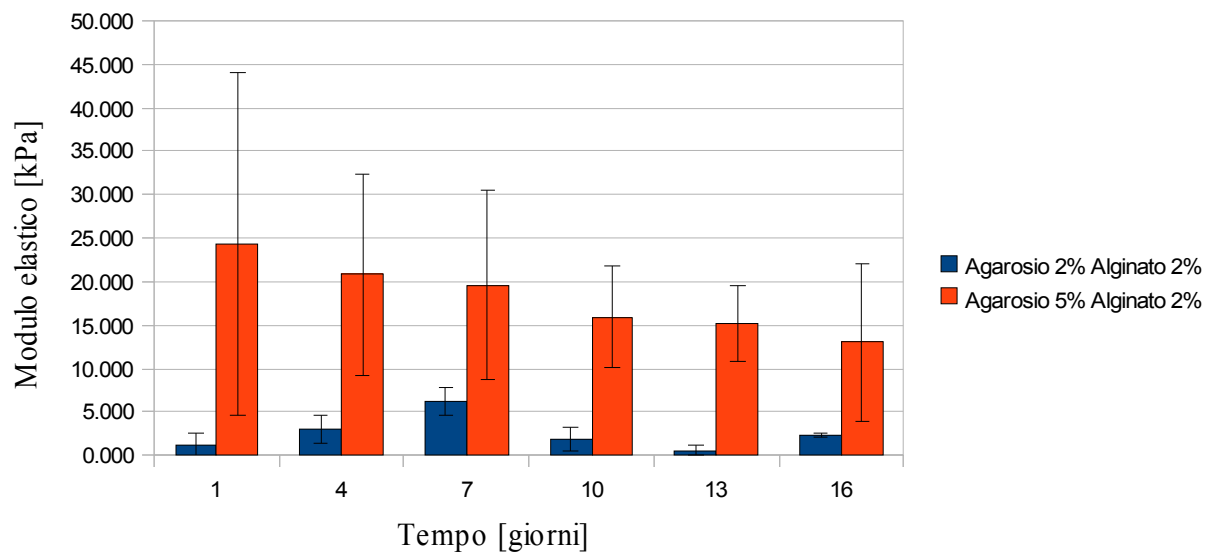


Figura 3.10 :rappresentazione grafica dell'andamento nel tempo del modulo elastico della miscela di agarosio 2% alginato 2% (blu) e della miscela di agarosio 5% alginato 2% (rosso), per deformazioni del 2%.

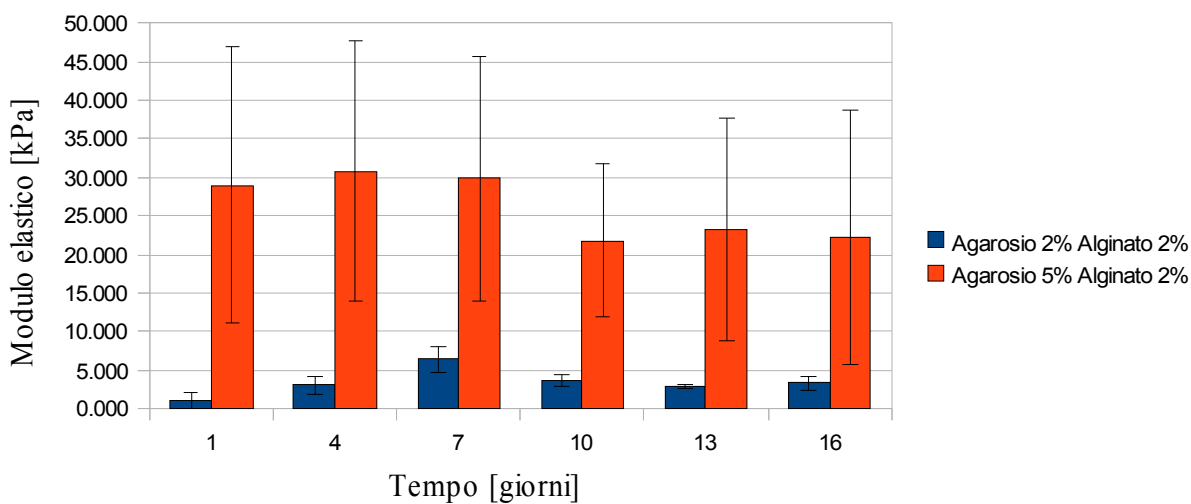


Figura 3.11 : rappresentazione grafica dell'andamento nel tempo del modulo elastico della miscela di agarosio 2% alginato 2% (blu) e della miscela di agarosio 5% alginato 2% (rosso), per deformazioni del 4%.

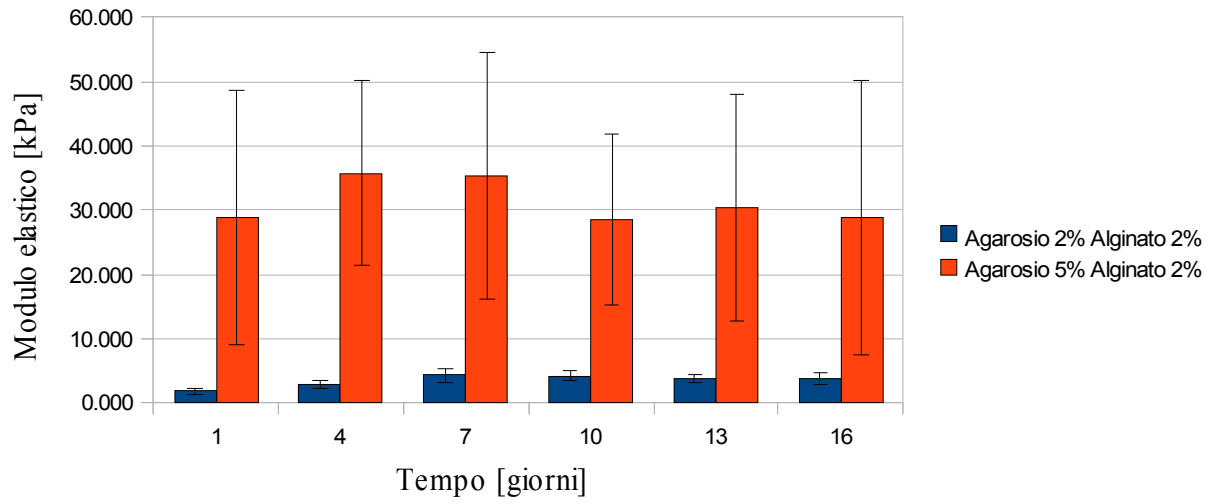


Figura 3.12 : rappresentazione grafica dell'andamento nel tempo del modulo elastico della miscela di agarosio 2% alginato 2% (blu) e della miscela di agarosio 5% alginato 2% (rosso), per deformazioni del 8%.

3.2 Calcolo dello stato di sforzo-deformazione

Il primo passo è stato quello di quantificare le deformazioni della matrice cellulare nel tempo.

È necessario fare una premessa: l'analisi si sviluppa rispetto al primo frame disponibile, che però, non fornisce i dati della configurazione indeformata, ma semplicemente, i dati all'istante in cui è iniziata l'osservazione del complesso cellule-matrice. Inoltre, non essendoci un evento specifico da associare ai vari frame, si è riportata anche la storia di deformazione globale nel tempo per ogni singolo quadrilatero analizzato.

Nelle seguenti figure sono riportati i quadrilateri individuati sulla matrice e sulle cellule, i cui vertici corrispondono a 4 punti di repere (Figura 3.13, Figura 3.14).

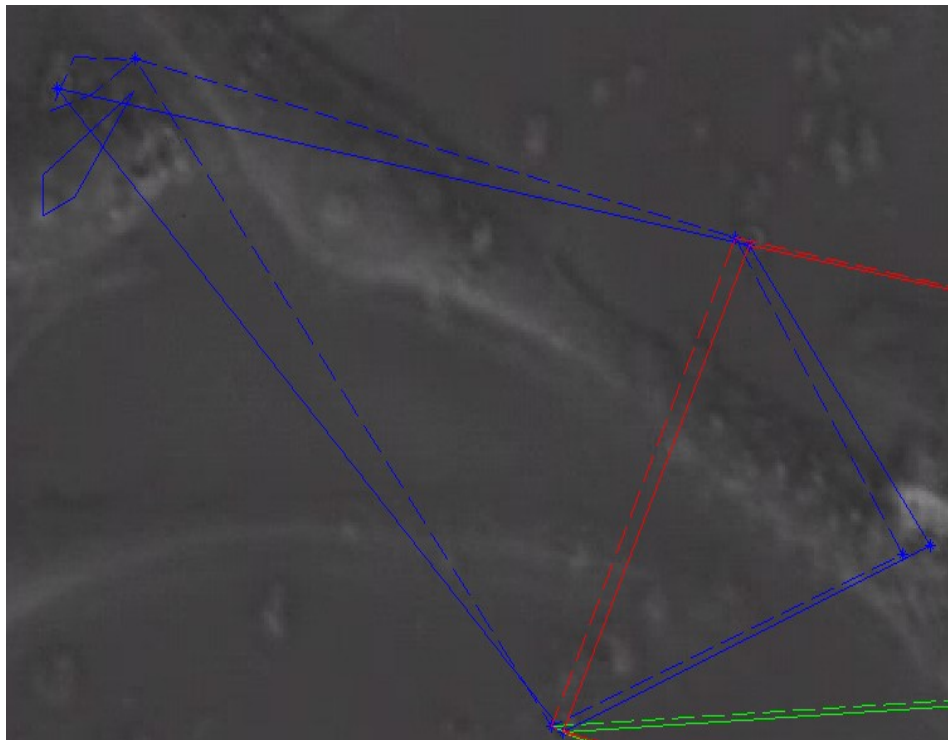


Figura 3.13 : Prima zona (elementi blu). Le linee tratteggiate rappresentano la configurazione iniziale dei quadrilateri individuati sulla matrice e sulla cellula, mentre le linee continue rappresentano la configurazione finale. In alto a sinistra si può osservare la cellula individuata da 4 punti di repere e al centro la regione di studio della matrice.

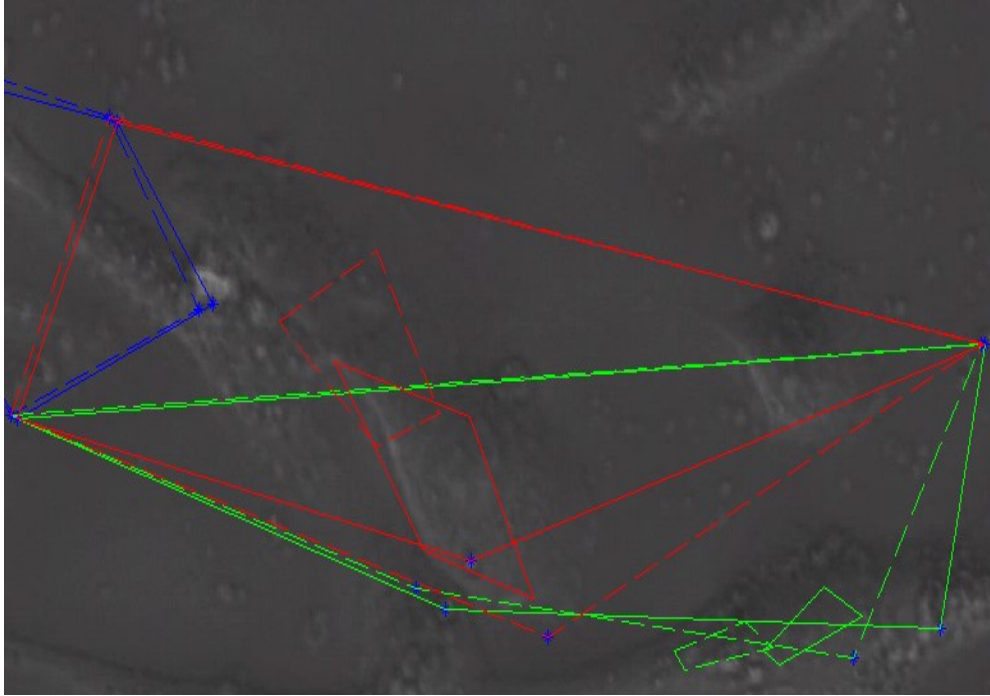


Figura 3.14 : Seconda e terza zona (rispettivamente, elementi rossi e verdi); le linee tratteggiate rappresentano la configurazione iniziale dei quadrilateri individuati sulla matrice e sulla cellula, mentre linee continue rappresentano la configurazione finale. Al centro e in basso a destra si possono osservare le cellule individuate, ciascuna da 4 punti di repere e al centro le due zone individuate nella matrice.

I quadrilateri sono stati scelti in modo da ricoprire la maggior area possibile della matrice, evitando lo scambio di posizione tra i vertici. La storia di deformazioni globali nel tempo rispetto all'asse x e all'asse y per ogni quadrilatero in funzione dei frame viene riportata nelle seguenti figure (Figura 3.15, Figura 3.16).

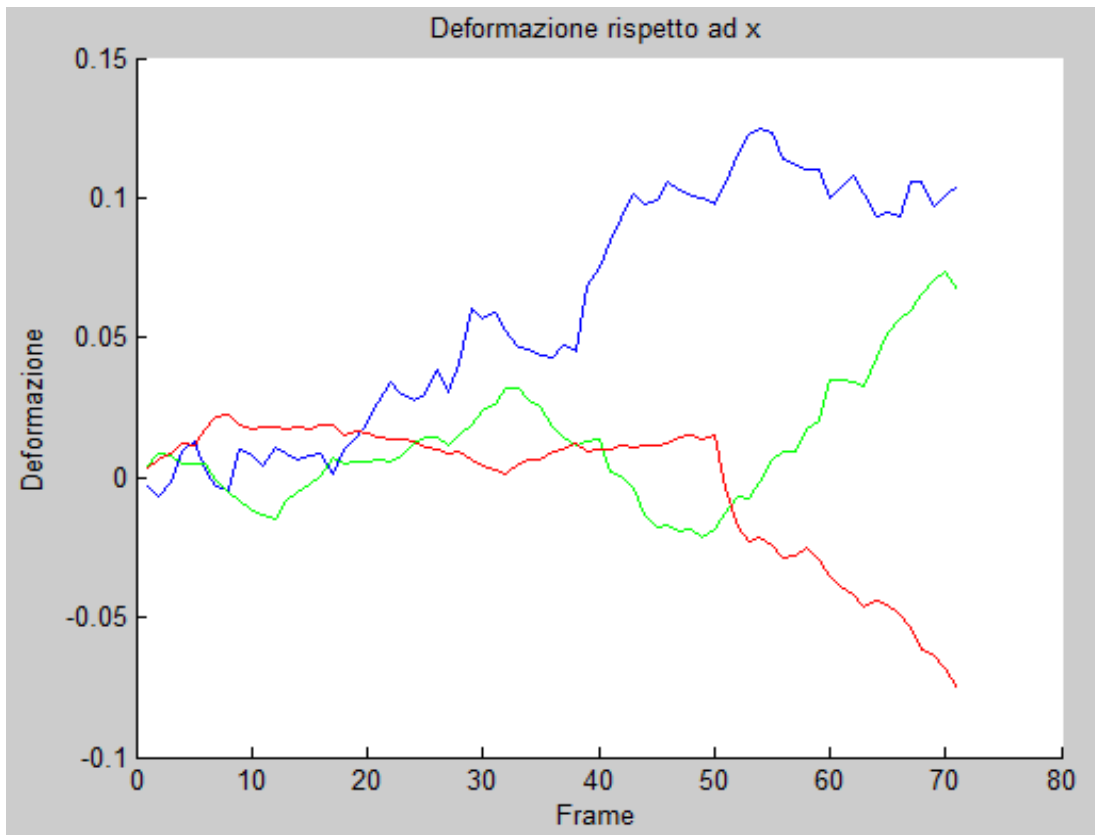


Figura 3.15 : Andamento nel tempo delle deformazioni rispetto all'asse x , il colore di ogni linea è lo stesso del quadrilatero che essa rappresenta.

Le deformazioni sono comprese nel range -0.0753 e 0.1245 ; come da riscontro grafico la zona rappresentata dalla quadrilatero in rosso si sta contraendo mentre le altre due si stanno dilatando; è da notare che il quadrilatero in blu ha un accentuata deformazione in corrispondenza del frame quaranta mentre gli altri due in corrispondenza del frame cinquanta, sfortunatamente dall'immagine video in contrasto di fase non si è potuto identificare un avvenimento particolare, che possa spiegare tale fenomeno.

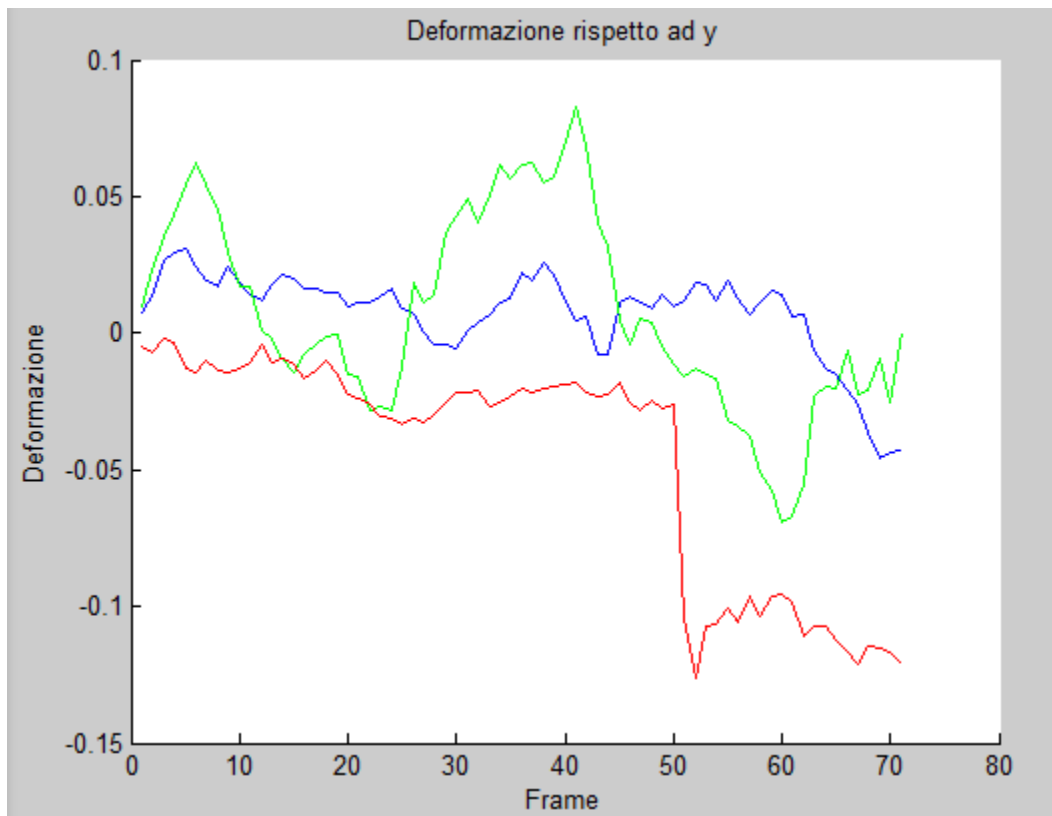


Figura 3.16 : Andamento nel tempo delle deformazioni rispetto all'asse y , il colore di ogni linea è lo stesso del quadrilatero che essa rappresenta.

Le deformazioni sono comprese nel range -0.1261 e 0.0828 ; in questo caso le deformazioni maggiori sono a carico della zona delimitata dal quadrilatero in rosso che si contrae. Anche qui va notata la brusca deformazione che avviene in prossimità dei frame 40 e 50 per i quadrilateri verdi e rossi, il blu al contrario sembra mantenere un andamento più costante. In questo approccio come già spiegato sono state tenute in considerazione solo le informazioni globali relative a determinate zone individuate nella matrice. Si è trascurato completamente ciò che avviene alle cellule, in quanto trovare dei punti di repere su di esse risulta complicato ed estremamente impreciso, sia manualmente che computazionalmente. Le cellule infatti, hanno una struttura tridimensionale che viene completamente trascurata dalle immagini bidimensionali.

Il secondo approccio (spiegato nel capitolo 2) ha permesso il calcolo di informazioni di tipo puntuale in ogni zona analizzata. Le seguenti figure riportano mappe colorimetriche che rappresentano le componenti di Green-Lagrange: ϵ_{xx} , ϵ_{yy} , ϵ_{xy} , sia della membrana che della cellula, calcolate tra il primo e l'ultimo frame; tutte le mappe rappresentanti lo stato di deformazione delle cellule sono rappresentate

con la stessa scala, minore rispetto alla scala utilizzata per le mappe di stato di deformazione della matrice (Figura 3.17, Figura 3.18, Figura 3.19).

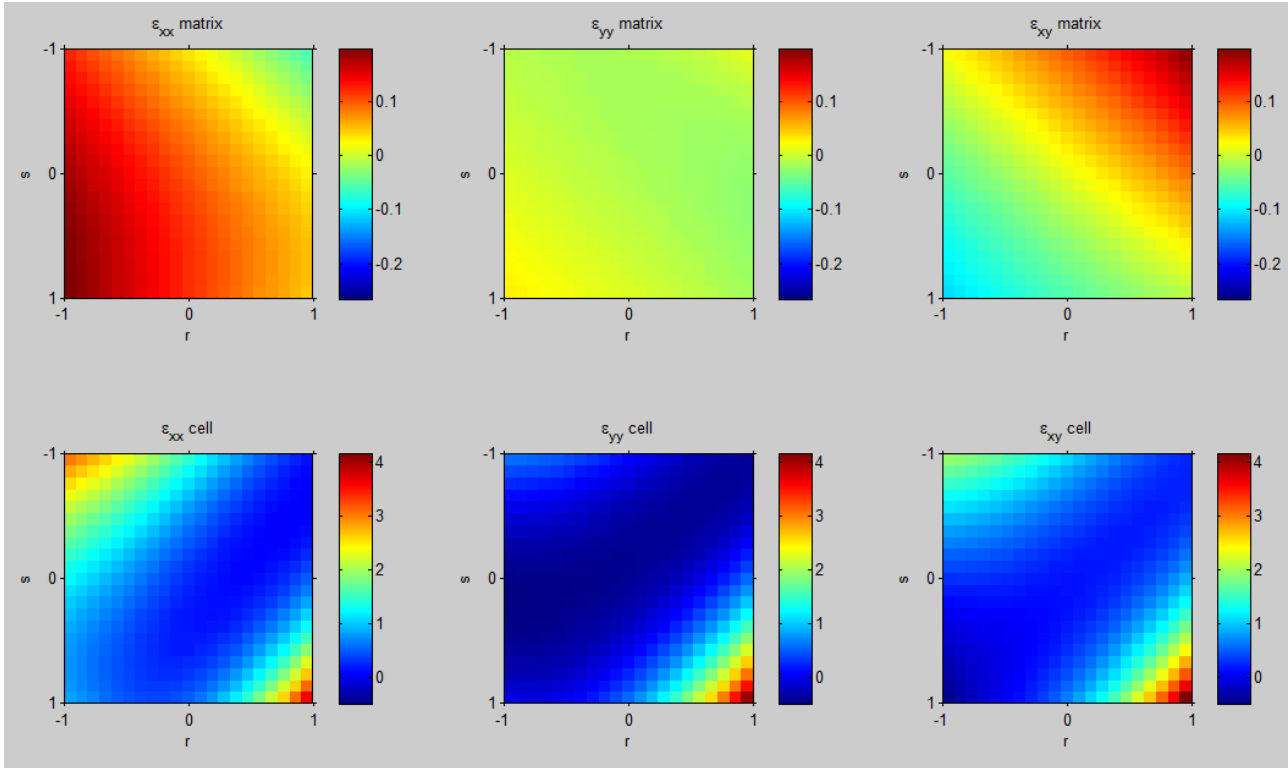


Figura 3.17 : Prima zona, quadrilatero e cella con contorno blu. Mappe colorimetriche rispetto alle componenti di Green-Lagrange: ϵ_{xx} , ϵ_{yy} , ϵ_{xy} ; le immagini della prima riga sono relative alla matrice, quelle della seconda riga alla cella.

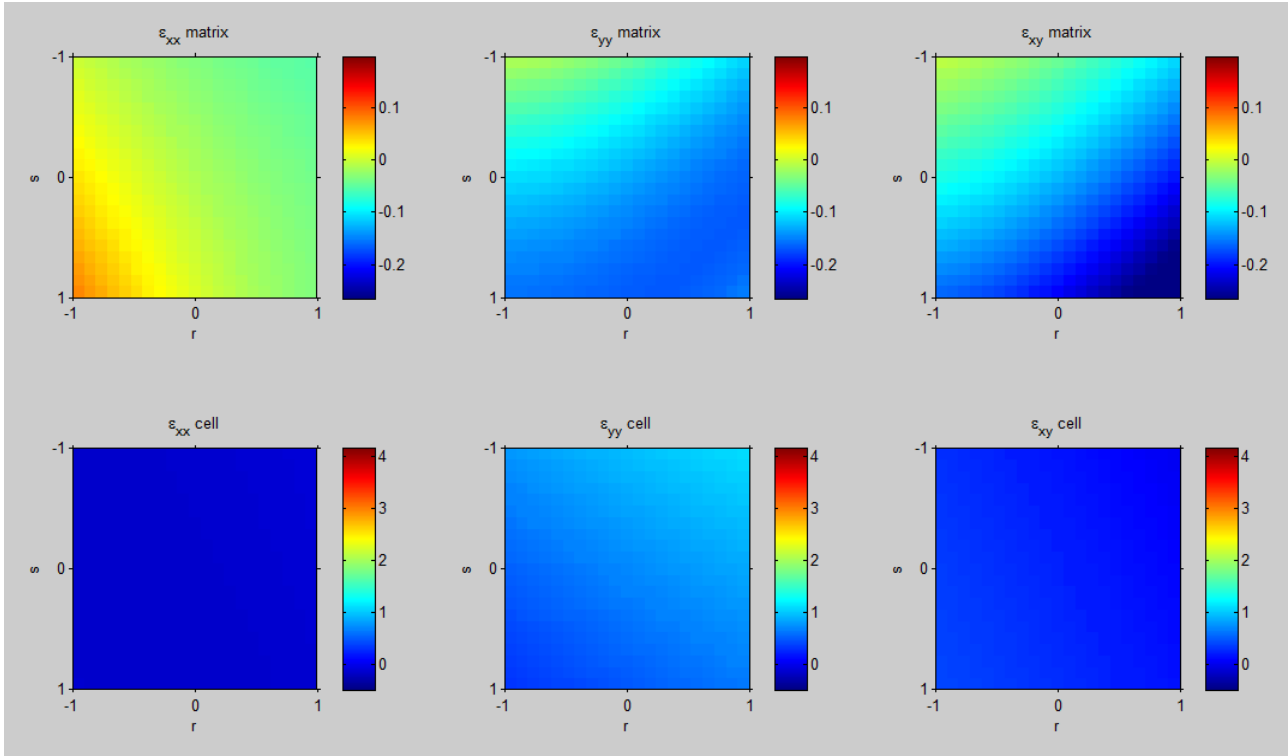


Figura 3.18 : Seconda zona, quadrilatero e cellula con contorno rosso. Mappe colorimetriche rispetto alle componenti di Green-Lagrange: ϵ_{xx} , ϵ_{yy} , ϵ_{xy} ; le immagini della prima riga sono relative alla matrice, quelle della seconda riga alla cellula.

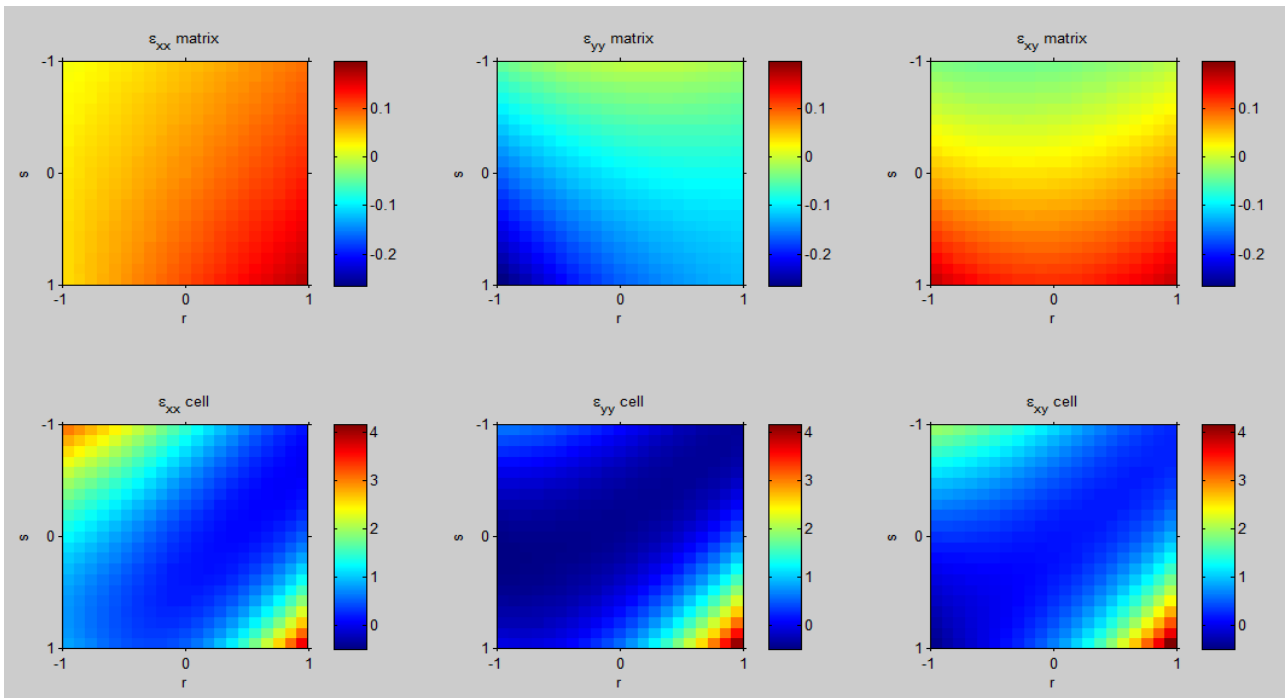


Figura 3.19 : Terza zona, quadrilatero e cellula con contorno verde. Mappe colorimetriche rispetto alle componenti di Green-Lagrange: ϵ_{xx} , ϵ_{yy} , ϵ_{xy} ; le immagini della prima riga sono relative alla matrice, quelle della seconda riga alla cellula.

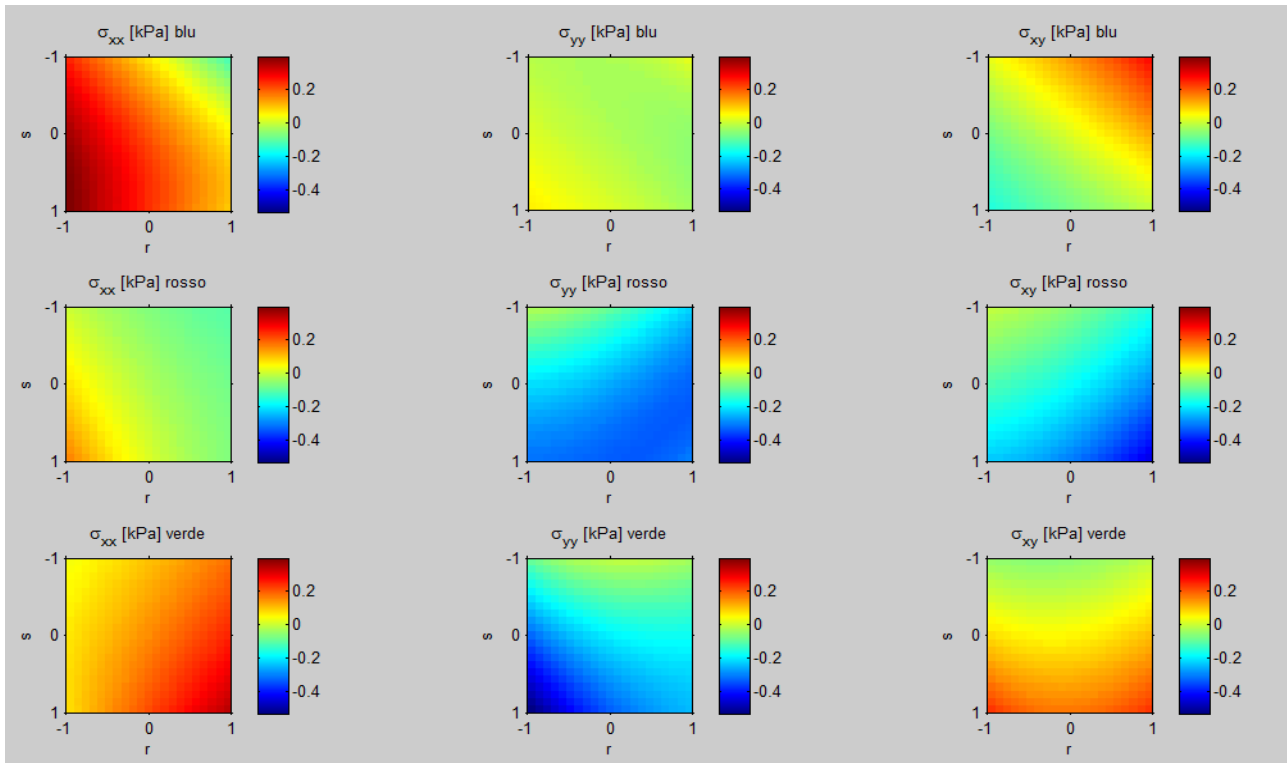


Figura 3.20 : Rappresentazione degli sforzi σ_{xx} σ_{yy} σ_{xy} . Nella prima riga ci sono gli sforzi agenti sulla parte di matrice delimitata dal quadrilatero con contorno blu, nella seconda riga gli sforzi sulla parte di matrice delimitata dal quadrilatero con contorno rosso e nella terza gli sforzi sulla parte di matrice delimitata dal quadrilatero con contorno verde.

Il confronto grafico mette subito in evidenza il fatto che le deformazioni a carico della matrice (comprese tra -0.265 e 0.1983) sono di entità molto inferiore rispetto a quelle a carico della cellula (comprese tra -0.4787 e 4.1772); esse possono differire anche per due ordini di grandezza. Le deformazioni non sono dello stesso ordine di grandezza perché le adesioni focali fanno da intermediari tra la matrice e la cellula.

Una cosa molto importante da sottolineare è che, mentre per la matrice si può ipotizzare un campo di deformazioni piane, per la cellula non è realistica tale ipotesi, per cui non è corretto calcolare le deformazioni della cellula utilizzando solo gli spostamenti dei suoi punti di reperi nel piano, in quanto, questi punti avranno spostamenti anche in direzione normale a quella del piano. Inoltre non è possibile risalire dalle deformazioni della matrice alle deformazioni della cellula, perché, come detto sopra, le adesioni focali fanno da intermediari tra cellula e matrice; è però possibile calcolare gli sforzi esercitati da esse sulla matrice conoscendone le proprietà elastiche. Sono stati quindi calcolati gli sforzi

e rappresentati graficamente attraverso mappe colorimetriche (Figura 3.20), sapendo che il modulo elastico della matrice analizzata è uguale a 2kPa e utilizzando un coefficiente di Poisson pari a 0.4. Ciò che è stato svolto in questa sezione è un'analisi qualitativa delle deformazioni a carico della cellula, e un'analisi di tipo quantitativo delle deformazioni a carico della matrice.

4 Conclusione e sviluppi futuri

Il primo obiettivo è stato quello di trovare un materiale dotato di buona compatibilità, in modo da permettere la coltura di mesoangioblasti sulla sua superficie, e adeguate proprietà meccaniche, in maniera da favorire il corretto differenziamento dei mesoangioblasti in cardiomiociti. Le prove sperimentali hanno dimostrato che il materiale più idoneo, tra quelli testati, per il raggiungimento del primo obiettivo è la miscela di alginato e agarosio. Entrambi i tipi di miscela, quella morbida e quella rigida hanno dimostrato di avere proprietà meccaniche nel range desiderato:

- 1-6 kPa per simulare la rigidità in condizioni fisiologiche;
- 35-70 kPa condizione patologica.

Lo studio della miscela alginato-agarosio, evidenzia che tale materiale ha delle proprietà meccaniche (modulo elastico) che vengono mantenute sufficientemente costanti nella matrice morbida e tendono ad una leggera diminuzione nella matrice rigida. Un fenomeno particolare è quello per cui il modulo elastico tende ad aumentare nella prima settimana e inizia a decrescere dal decimo giorno in poi; contrariamente a ciò che ci si aspettava, la sola diminuzione del valore del modulo elastico. Un'altra cosa che purtroppo deve essere sottolineata è il fatto che i valori riportati del modulo elastico sono accompagnati da una deviazione standard che a volte è troppo elevata. Una soluzione a questo problema non è stata trovata in questo lavoro di tesi, nonostante siano stati utilizzati più protocolli per la prova di compressione. Probabilmente il problema principale è stato riscontrato nella fase di preparazione del gel, in cui non è stato semplice controllare con esattezza la temperatura di polimerizzazione dell'agarosio, parametro che risulta di fondamentale importanza (108).

Il secondo obiettivo specifico è stato quello di trovare un metodo di calcolo dello stato di sforzo-deformazione nelle cellule e nella matrice ed eventualmente l'esistenza di una relazione tra le forze generate dalla matrice e quelle generate dalla cellula. Avere dei marker incastrati all'interno della matrice ha reso possibile l'analisi delle deformazioni e attraverso l'impiego del software di calcolo Matlab® è stato possibile implementare un programma che possa calcolare dalle coordinate dei marker, lo stato di sforzo-deformazione della matrice. Come già anticipato nei precedenti paragrafi non è possibile risalire dalle deformazioni della matrice alle deformazioni della cellula, perché le adesioni focali fanno da intermediari tra cellula e matrice; inoltre la cellula ha una struttura tridimensionale che

non può essere rilevata da un'immagine bidimensionale. Non è stato quindi possibile quantificare gli sforzi a livello della cellula, ma solo gli sforzi che vengono scambiati tra matrice e adesioni focali. Da questo studio è emerso che le adesioni focali e la matrice si scambiano sforzi compresi tra -0.530 e 0.3966kPa .

Questo lavoro ha aperto numerose possibilità per lavori futuri, in particolare la seconda parte in cui si calcola lo stato di sforzo-deformazione nella cellula e nella matrice. Per prima cosa deve essere tenuta in considerazione la struttura tridimensionale della cellula, l'identificazione grafica di punti di reperi sulla cellula che è stata eseguita in questo lavoro di tesi ha il problema di essere di tipo qualitativo e quindi incapace di dare informazioni esatte. Punto su cui bisogna lavorare è quindi quello di cercare un modo per segnare le cellule con punti di reperi che possano essere rilevati computazionalmente e non manualmente, in modo da rendere più precisa la misura. Per tenere conto della tridimensionalità della cellula sarebbe necessario acquisire le immagini in tre dimensioni.

Un'altra problematica da affrontare riguarda le microsfele, il numero di microsfele utili per l'analisi non è stato sufficiente per effettuare un'analisi completa della matrice analizzata, perciò sicuramente dovrebbero essere impiegati molti più marker e possibilmente dovrebbero essere posizionati in modo da rendere più facile la ricerca di una relazione tra le deformazioni della cellula e quelle della matrice. Ad esempio, sarebbe interessante posizionare almeno otto marker (109) sotto ad ogni cellula per avere un'analisi più precisa; aumentare il numero di marker implica un ridimensionamento degli stessi, servirebbero quindi, marker di diametro minore di quello attuale. Dovrà essere tenuto presente che aumentare il numero di marker e ridurre il diametro implicherà un costo computazionale più elevato.

Altro aspetto che potrebbe essere interessante migliorare riguarda il fatto che la maggior parte degli stimoli che agiscono sulla ECM (citati nel capitolo 1) illustrati in letteratura, sono studiati individualmente, ma ognuno di essi non sembra sufficiente a promuovere da solo la completa differenziazione relativa a cellule adulte e mature, ma risultano solo promuovere i precursori di questi tipi di cellule (1). Le ECM nel corpo hanno una unica composizione locale che presenta differenti proprietà che possono direttamente influenzare la funzione di ogni parametro; la somma di tutti gli stimoli che agiscono sulla cellula non è sempre uguale alla somma delle sue parti prese singolarmente (100). Poiché il corpo umano presenta molti segnali intrinseci nello stesso momento, si evince che l'effettiva strategia di differenziazione non deriva dalla semplice combinazione di questi segnali, ma deriva da una combinazione che deve essere caratterizzata. Deve essere tenuta in considerazione anche la struttura tridimensionale della cellula, i mediatori critici della differenziazione su substrato planare,

quando presenti in un contesto tridimensionale, possono condurre a risultati differenti . La discussione tra planare e 3D è stata estensivamente affrontata in letteratura (111,112,113), ciò che è stato tralasciato è l'importanza di migliorare la funzionalità e la capacità di riprodurre ambienti naturali della matrice in modo da generare forze di trasmissione fisiologicamente rilevanti; ad esempio, una mancanza di ligandi inibisce l'adesione delle cellule alla matrice che la circonda e così è inibita la forza di trasmissione tra le altre cellule in adesione interponendosi così agli eventi cellulari, è necessario quindi migliorare la mimica degli appropriati siti di adesione per ottenere la migliore produzione di forza (114,115). Una volta attaccate alla matrice le cellule iniziano a tirare e a sondare l'ambiente e per questo esistono così ampie differenze nel comportamento meccanico delle cellule tra materiali planari e 3D.

É da notare che le cellule sintetizzano la loro matrice nel tempo. Così le interazioni tra cellule, ECM, e cellule vicine può cambiare rapidamente. Con il tempo la sintesi da parte della stessa matrice può diventare una guida variabile e le interazioni cellulari con la matrice originale potrebbero diminuire; la scelta del futuro della cellula può essere programmato nei primi giorni di interazione con il materiale. Riconoscendo il rimodellamento del rapporto cellula-ECM non si intende trascurare tutta l'importanza del contatto iniziale delle cellule con il materiale che controlla che nei primi eventi di differenziazione siano prodotte proteine di ECM.

Come riportato in letteratura nonostante le cellule siano sensibili a molti fattori, quello che più ne condiziona l'esistenza è quello meccanico, per ciò in questo lavoro di tesi è stata affrontata solamente la problematica meccanica. Le relazioni meccanobiologiche tra cellula e matrice devono essere meglio comprese tramite esperimenti *in vitro* e applicazioni cliniche, per separare i contributi di ogni parametro che influenza la cellula e controllarne meglio la differenziazione.

5 Appendice

5.1 Idrogelo agarosio-alginato a rigidità variabile - metodica di preparazione

soluzioni da preparare separatamente in bottiglie autoclavabili e tappabili.

1) per il gel morbido: sciogliere agarosio in polvere (1.8% peso/vol) e alginato in polvere (0.2% peso/vol) in fisiologica

2) per il gel rigido: sciogliere agarosio in polvere (4.5% peso/vol) e alginato in polvere (0.2% peso/vol) in fisiologica

- mantenere le soluzioni 1 e 2 agitate per 30 minuti a 80°C con il tappo chiuso ermeticamente
- autoclavare le soluzioni 1 e 2 e mantenerle agitate sotto cappa a 80°C con il tappo chiuso
- preparare una soluzione 100 mM di CaCl₂ (1.1% peso/vol) in fisiologica
- filtrare la soluzione di CaCl₂ con filtro da 0.2 micron
- dispensare 0.3 ml/pozzetto delle soluzioni 1 e 2 in piastra da 24 pozzetti
- parafilmare la piastra e tenerla a 4°C per 60 minuti per far polimerizzare l'agarosio
- dispensare 0.5 ml/pozzetto della soluzione di CaCl₂
- parafilmare la piastra e tenerla a 4°C per 30 minuti per far polimerizzare l'alginato
- parafilmare la piastra e conservare a 4°C fino al momento della semina

5.2 Codice Matlab®

Identificazione dei marker

```
function traccatoremanuale
index=[10:10:720];
mov = aviread('verde.avi',index);
for a=10:length(index)
I = mov(a).cdata;
% metto immagine in bianco e nero
BW = im2bw(I,0.5);
% marco gli elementi
[labeled, numeroOggetti]=bwlabel(BW);
% cerco gli elementi manualmente
[x,y,BW2,idx,xi,yi] = bwselect(labeled,8);

s = regionprops(labeled, 'all');
for b=1:size(xi)
    for c=1:numeroOggetti
% calcolo il centro dei pallini
        centro = s(c).Centroid;
% se il punto cliccato è in un raggio di 6 pixel dal centro
        if ((xi(b)<centro(1)+6)&& (xi(b)>centro(1)-6)&& (yi(b)<centro(2)+6)&& (yi(b)>centro(2)-6))
            matricecoordinate(b,1,a)=centro(1);
            matricecoordinate(b,2,a)=centro(2);
        end
    end
end
if (size(matricecoordinate,2)~= 9 && a==1)
    fprintf( 'marcher messi n      : %g \n',size(matricecoordinate,1));
end

if find(matricecoordinate(:,a)==0)
    fprintf( 'non hai marcato il pallino n      : %g \n', find(matricecoordinate(:,a)==0) );
end
end
save matriceManuale matricecoordinate
```

Calcolo delle deformazioni globali

```
function [E1,E2,E3]=primoapproccio
clc
load Mdeformazioni
index=[10:10:720];

mov = aviread('grigio.avi',index);
nome='Immagine con marcatori';
figure('name',nome);
for i=1:71:size(Mdeformazioni,3)
I = mov(i).cdata;
imshow(I,[])
hold on
plot(Mdeformazioni([1 2 3 4 5 6 7 8],1,i),Mdeformazioni([1 2 3 4 5 6 7 8],2,i),'*')
plot(Mdeformazioni([1 3 4 2 1],1,i),Mdeformazioni([1 3 4 2 1],2,i))
plot(Mdeformazioni([2 8 7 5 2],1,i),Mdeformazioni([2 8 7 5 2],2,i),'g')
plot(Mdeformazioni([3 8 6 2 3],1,i),Mdeformazioni([3 8 6 2 3],2,i),'r'),title(['Frame n: ' num2str(i)]);
end

[E1]= deformazioniMedie(1,3,4,2);
[E2]= deformazioniMedie(2,8,7,5);
[E3]= deformazioniMedie(3,8,6,2);

figure(2)
hold on
plot(E1(:,1))
plot(E2(:,1),'g')
plot(E3(:,1),'r'),xlabel('Frame'),ylabel('Deformazione'),title('Deformazione rispetto ad x');
hold off
figure(3)
hold on
plot(E1(:,2))
plot(E2(:,2),'g')
plot(E3(:,2),'r'),xlabel('Frame'),ylabel('Deformazione'),title('Deformazione rispetto ad y');
hold off
```

Calcolo delle deformazioni e degli sforzi puntuali nella matrice e nella cellula

```
function secondoapproccio
clc
load Mdeformazioni
load Cellule
ultimoframe=71;
estremi=zeros(21,21,18);
r=-1:0.1:1;
s=-1:0.1:1;
E=2;%modulo di young in kPa
coeff=0.4;
G=E/(2*(1+coeff));
% Analisi matrice
Hsx=1;Hdx=3;Ldx=4;Lsx=2;
disegnoExx=zeros(size(s,2),size(r,2),size(Mdeformazioni,3)-1);
disegnoEyy=zeros(size(s,2),size(r,2),size(Mdeformazioni,3)-1);
disegnoExy=zeros(size(s,2),size(r,2),size(Mdeformazioni,3)-1);
for i=1:size(s,2)
    for j=1:size(r,2)
        [Exx,Eyy,Exy,Theta]=deformazionidaRS(r(j),s(i),Hsx,Hdx,Ldx,Lsx);
        disegnoExx(i,j,:)=Exx;
        disegnoEyy(i,j,:)=Eyy;
        disegnoExy(i,j,:)=Exy;
    end
end

Hsx=3;Hdx=8;Ldx=6;Lsx=2;
disegnoExx1=zeros(size(s),size(r),size(Mdeformazioni,3)-1);
disegnoEyy1=zeros(size(s),size(r),size(Mdeformazioni,3)-1);
disegnoExy1=zeros(size(s),size(r),size(Mdeformazioni,3)-1);
for i=1:size(s,2)
```

```

for j=1:size(r,2)
[Exx,Eyy,Exy,Theta]=deformazionidaRS(r(j),s(i),Hsx,Hdx,Ldx,Lsx);
disegnoExx1(i,j,:)=Exx;
disegnoEyy1(i,j,:)=Eyy;
disegnoExy1(i,j,:)=Exy;
end
end

Hsx=2;Hdx=8;Ldx=7;Lsx=5;
disegnoExx2=zeros(size(s),size(r),size(Mdeformazioni,3)-1);
disegnoEyy2=zeros(size(s),size(r),size(Mdeformazioni,3)-1);
disegnoExy2=zeros(size(s),size(r),size(Mdeformazioni,3)-1);
for i=1:size(s,2)
for j=1:size(r,2)
[Exx,Eyy,Exy,Theta]=deformazionidaRS(r(j),s(i),Hsx,Hdx,Ldx,Lsx);
disegnoExx2(i,j,:)=Exx;
disegnoEyy2(i,j,:)=Eyy;
disegnoExy2(i,j,:)=Exy;
end
end

numerocellula=1;
disegnoExxC1=zeros(size(s,2),size(r,2),size(cellula1,3)-1);
disegnoEyyC1=zeros(size(s,2),size(r,2),size(cellula1,3)-1);
disegnoExyC1=zeros(size(s,2),size(r,2),size(cellula1,3)-1);
for i=1:size(s,2)
for j=1:size(r,2)
[Exx,Eyy,Exy,Theta]=deformazionidaRScellule(r(j),s(i),numerocellula);
disegnoExxC1(i,j,:)=Exx;
disegnoEyyC1(i,j,:)=Eyy;
disegnoExyC1(i,j,:)=Exy;

```

```

    end
end

numerocellula=2;
disegnoExxC2=zeros(size(s,2),size(r,2),size(cellula1,3)-1);
disegnoEyyC2=zeros(size(s,2),size(r,2),size(cellula1,3)-1);
disegnoExyC2=zeros(size(s,2),size(r,2),size(cellula1,3)-1);
for i=1:size(s,2)
    for j=1:size(r,2)
        [Exx,Eyy,Exy,Theta]=deformazionidaRScellule(r(j),s(i),numerocellula);
        disegnoExxC2(i,j,:)=Exx;
        disegnoEyyC2(i,j,:)=Eyy;
        disegnoExyC2(i,j,:)=Exy;
    end
end
% analisi cellule
numerocellula=1;
disegnoExxC3=zeros(size(s,2),size(r,2),size(cellula1,3)-1);
disegnoEyyC3=zeros(size(s,2),size(r,2),size(cellula1,3)-1);
disegnoExyC3=zeros(size(s,2),size(r,2),size(cellula1,3)-1);
for i=1:size(s,2)
    for j=1:size(r,2)
        [Exx,Eyy,Exy,Theta]=deformazionidaRScellule(r(j),s(i),numerocellula);
        disegnoExxC3(i,j,:)=Exx;
        disegnoEyyC3(i,j,:)=Eyy;
        disegnoExyC3(i,j,:)=Exy;
    end
end

%% Disegno
estremi(:,1)=disegnoExx(:,,ultimoframe);estremi(:,2)=disegnoEyy(:,,ultimoframe);estremi(:,3)=di

```

```

segnoExy(:, :, ultimoframe);
estremi(:, :, 4)=disegnoExx1(:, :, ultimoframe);estremi(:, :, 5)=disegnoEyy1(:, :, ultimoframe);estremi(:, :, 6)=
disegnoExy2(:, :, ultimoframe);
estremi(:, :, 7)=disegnoExx2(:, :, ultimoframe);estremi(:, :, 8)=disegnoEyy2(:, :, ultimoframe);estremi(:, :, 9)=
disegnoExy2(:, :, ultimoframe);

estremiC(:, :, 4)=disegnoExxC1(:, :);estremiC(:, :, 5)=disegnoEyyC1(:, :);estremiC(:, :, 6)=disegnoExyC1(:, :
);
estremiC(:, :, 10)=disegnoExxC2(:, :);estremiC(:, :, 11)=disegnoEyyC2(:, :);estremiC(:, :, 12)=disegnoExyC
2(:, :);
estremiC(:, :, 16)=disegnoExxC3(:, :);estremiC(:, :, 17)=disegnoEyyC3(:, :);estremiC(:, :, 18)=disegnoExyC
3(:, :);

inf=min(estremi(:))
sup=max(estremi(:))
infC=min(estremiC(:))
supC=max(estremiC(:))
disegnoExx(15,15,71)=1;,[inf sup],
imshow(disegnoExx(:, :, 71),[], 'InitialMagnification',500),colormap(jet),xlabel('r'),ylabel('s')
figure(1)
subplot(2,3,1),imshow(disegnoExx(:, :, 71),[inf
sup], 'InitialMagnification',500),colormap(jet),xlabel('r'),ylabel('s'),title('\epsilon_x_x matrix')
set(gca, 'Visible', 'on'),set(gca, 'XTick', 0.5:10.5:21.5),set(gca, 'XTickLabel', {'-1', '0', '1'})
set(gca, 'YTick', 0.5:10.5:21.5),set(gca, 'YTickLabel', {'-1', '0', '1'})

subplot(2,3,2),imshow(disegnoEyy(:, :, 71),[inf
sup], 'InitialMagnification',500),colormap(jet),xlabel('r'),ylabel('s'),title('\epsilon_y_y matrix')
set(gca, 'Visible', 'on'),set(gca, 'XTick', 0.5:10.5:21.5),set(gca, 'XTickLabel', {'-1', '0', '1'})
set(gca, 'YTick', 0.5:10.5:21.5),set(gca, 'YTickLabel', {'-1', '0', '1'})

subplot(2,3,3),imshow(disegnoExy(:, :, 71),[inf

```



```
sup], 'InitialMagnification', 500), colormap(jet), xlabel('r'), ylabel('s'), title('\epsilon_x_y matrix')
set(gca, 'Visible', 'on'), set(gca, 'XTick', 0.5:10.5:21.5), set(gca, 'XTickLabel', {'-1', '0', '1'})
set(gca, 'YTick', 0.5:10.5:21.5), set(gca, 'YTickLabel', {'-1', '0', '1'})
```

```
subplot(2,3,4), imshow(disegnoExxC1(:, :), [infC
supC], 'InitialMagnification', 500), colormap(jet), xlabel('r'), ylabel('s'), title('\epsilon_x_x cell')
set(gca, 'Visible', 'on'), set(gca, 'XTick', 0.5:10.5:21.5), set(gca, 'XTickLabel', {'-1', '0', '1'})
set(gca, 'YTick', 0.5:10.5:21.5), set(gca, 'YTickLabel', {'-1', '0', '1'})
```

```
subplot(2,3,5), imshow(disegnoEyyC1(:, :), [infC
supC], 'InitialMagnification', 500), colormap(jet), xlabel('r'), ylabel('s'), title('\epsilon_y_y cell')
set(gca, 'Visible', 'on'), set(gca, 'XTick', 0.5:10.5:21.5), set(gca, 'XTickLabel', {'-1', '0', '1'})
set(gca, 'YTick', 0.5:10.5:21.5), set(gca, 'YTickLabel', {'-1', '0', '1'})
```

```
subplot(2,3,6), imshow(disegnoExyC1(:, :), [infC
supC], 'InitialMagnification', 500), colormap(jet), xlabel('r'), ylabel('s'), title('\epsilon_x_y cell')
set(gca, 'Visible', 'on'), set(gca, 'XTick', 0.5:10.5:21.5), set(gca, 'XTickLabel', {'-1', '0', '1'})
set(gca, 'YTick', 0.5:10.5:21.5), set(gca, 'YTickLabel', {'-1', '0', '1'})
```

figure(2)

```
subplot(2,3,1), imshow(disegnoExx1(:, :, 71), [inf
sup], 'InitialMagnification', 500), colormap(jet), xlabel('r'), ylabel('s'), title('\epsilon_x_x matrix')
set(gca, 'Visible', 'on'), set(gca, 'XTick', 0.5:10.5:21.5), set(gca, 'XTickLabel', {'-1', '0', '1'})
set(gca, 'YTick', 0.5:10.5:21.5), set(gca, 'YTickLabel', {'-1', '0', '1'})
```

```
subplot(2,3,2), imshow(disegnoEyy1(:, :, 71), [inf
sup], 'InitialMagnification', 500), colormap(jet), xlabel('r'), ylabel('s'), title('\epsilon_y_y matrix')
set(gca, 'Visible', 'on'), set(gca, 'XTick', 0.5:10.5:21.5), set(gca, 'XTickLabel', {'-1', '0', '1'})
set(gca, 'YTick', 0.5:10.5:21.5), set(gca, 'YTickLabel', {'-1', '0', '1'})
```

```
subplot(2,3,3), imshow(disegnoExy1(:, :, 71), [inf
```

```
sup], 'InitialMagnification', 500), colormap(jet), xlabel('r'), ylabel('s'), title('\epsilon_x_y matrix')
set(gca, 'Visible', 'on'), set(gca, 'XTick', 0.5:10.5:21.5), set(gca, 'XTickLabel', {'-1', '0', '1'})
set(gca, 'YTick', 0.5:10.5:21.5), set(gca, 'YTickLabel', {'-1', '0', '1'})
```

```
subplot(2,3,4), imshow(disegnoExxC2(:, :), [infC
supC], 'InitialMagnification', 500), colormap(jet), xlabel('r'), ylabel('s'), title('\epsilon_x_x cell')
set(gca, 'Visible', 'on'), set(gca, 'XTick', 0.5:10.5:21.5), set(gca, 'XTickLabel', {'-1', '0', '1'})
set(gca, 'YTick', 0.5:10.5:21.5), set(gca, 'YTickLabel', {'-1', '0', '1'})
```

```
subplot(2,3,5), imshow(disegnoEyyC2(:, :), [infC
supC], 'InitialMagnification', 500), colormap(jet), xlabel('r'), ylabel('s'), title('\epsilon_y_y cell')
set(gca, 'Visible', 'on'), set(gca, 'XTick', 0.5:10.5:21.5), set(gca, 'XTickLabel', {'-1', '0', '1'})
set(gca, 'YTick', 0.5:10.5:21.5), set(gca, 'YTickLabel', {'-1', '0', '1'})
```

```
subplot(2,3,6), imshow(disegnoExyC2(:, :), [infC
supC], 'InitialMagnification', 500), colormap(jet), xlabel('r'), ylabel('s'), title('\epsilon_x_y cell')
set(gca, 'Visible', 'on'), set(gca, 'XTick', 0.5:10.5:21.5), set(gca, 'XTickLabel', {'-1', '0', '1'})
set(gca, 'YTick', 0.5:10.5:21.5), set(gca, 'YTickLabel', {'-1', '0', '1'})
```

figure(3)

```
subplot(2,3,1), imshow(disegnoExx2(:, :, 71), [inf
sup], 'InitialMagnification', 500), colormap(jet), xlabel('r'), ylabel('s'), title('\epsilon_x_x matrix')
set(gca, 'Visible', 'on'), set(gca, 'XTick', 0.5:10.5:21.5), set(gca, 'XTickLabel', {'-1', '0', '1'})
set(gca, 'YTick', 0.5:10.5:21.5), set(gca, 'YTickLabel', {'-1', '0', '1'})
```

```
subplot(2,3,2), imshow(disegnoEyy2(:, :, 71), [inf
sup], 'InitialMagnification', 500), colormap(jet), xlabel('r'), ylabel('s'), title('\epsilon_y_y matrix')
set(gca, 'Visible', 'on'), set(gca, 'XTick', 0.5:10.5:21.5), set(gca, 'XTickLabel', {'-1', '0', '1'})
set(gca, 'YTick', 0.5:10.5:21.5), set(gca, 'YTickLabel', {'-1', '0', '1'})
```

```
subplot(2,3,3), imshow(disegnoExy2(:, :, 71), [inf
```

```

sup], 'InitialMagnification',500),colormap(jet),xlabel('r'),ylabel('s'),title('\epsilon_x_y matrix')
set(gca,'Visible','on'),set(gca,'XTick',0.5:10.5:21.5),set(gca,'XTickLabel',{'-1','0','1'})
set(gca,'YTick',0.5:10.5:21.5),set(gca,'YTickLabel',{'-1','0','1'})

```

```

subplot(2,3,4),imshow(disegnoExxC3(:,:),[infC
supC], 'InitialMagnification',500),colormap(jet),xlabel('r'),ylabel('s'),title('\epsilon_x_x cell')
set(gca,'Visible','on'),set(gca,'XTick',0.5:10.5:21.5),set(gca,'XTickLabel',{'-1','0','1'})
set(gca,'YTick',0.5:10.5:21.5),set(gca,'YTickLabel',{'-1','0','1'})

```

```

subplot(2,3,5),imshow(disegnoEyyC3(:,:),[infC
supC], 'InitialMagnification',500),colormap(jet),xlabel('r'),ylabel('s'),title('\epsilon_y_y cell')
set(gca,'Visible','on'),set(gca,'XTick',0.5:10.5:21.5),set(gca,'XTickLabel',{'-1','0','1'})
set(gca,'YTick',0.5:10.5:21.5),set(gca,'YTickLabel',{'-1','0','1'})

```

```

subplot(2,3,6),imshow(disegnoExyC3(:,:),[infC
supC], 'InitialMagnification',500),colormap(jet),xlabel('r'),ylabel('s'),title('\epsilon_x_y cell')
set(gca,'Visible','on'),set(gca,'XTick',0.5:10.5:21.5),set(gca,'XTickLabel',{'-1','0','1'})
set(gca,'YTick',0.5:10.5:21.5),set(gca,'YTickLabel',{'-1','0','1'})

```

```

%% Tutti i grafici per tempo

```

```

figure(2)

```

```

% mesh(disegnoExx(:, :, 71)), [], colormap(jet), xlabel(['r']), ylabel(['s']), title(['Frame n: ' num2str(i)]);

```

```

for i=1:size(disegnoExx,3)

```

```

    subplot(9,8,i),imshow(disegnoExx(:, :, i), [], colormap(jet), xlabel('r'), ylabel('s'), title(['Frame n: '
num2str(i)]);

```

```

end

```

```

figure(3)

```

```

for i=1:size(disegnoEyy,3)

```

```

    subplot(9,8,i),imshow(disegnoEyy(:, :, i), [], colormap(jet), xlabel('r'), ylabel('s'), title(['Frame n: '
num2str(i)]);

```

```

end
figure(4)
for i=1:size(disegnoExy,3)
    subplot(9,8,i),imshow(disegnoExy(:,i,:),colormap(jet),xlabel('r'),ylabel('s'),title(['Frame n: '
num2str(i)]));
end

%% Sforzi della matrice
disegnoSxx=disegnoExx(:,71)*E;disegnoSxx1=disegnoExx1(:,71)*E;disegnoSxx2=disegnoExx2(:,71)*E;
disegnoSyy=disegnoEyy(:,71)*E;disegnoSyy1=disegnoEyy1(:,71)*E;disegnoSyy2=disegnoEyy2(:,71)*E;
disegnoSxy=disegnoExy(:,71)*2*G;disegnoSxy1=disegnoExy1(:,71)*2*G;disegnoSxy2=disegnoExy2(:,71)*2*G;
inf=inf*E;sup=sup*E;
figure(4)
subplot(3,3,1),imshow(disegnoSxx(:,:),[inf
sup], 'InitialMagnification',500),colormap(jet),xlabel('r'),ylabel('s'),title('\sigma_x_x [kPa] blu')
set(gca,'Visible','on'),set(gca,'XTick',0.5:10.5:21.5),set(gca,'XTickLabel',{'-1','0','1'})
set(gca,'YTick',0.5:10.5:21.5),set(gca,'YTickLabel',{'-1','0','1'})

subplot(3,3,2),imshow(disegnoSyy(:,:),[inf
sup], 'InitialMagnification',500),colormap(jet),xlabel('r'),ylabel('s'),title('\sigma_y_y [kPa] blu')
set(gca,'Visible','on'),set(gca,'XTick',0.5:10.5:21.5),set(gca,'XTickLabel',{'-1','0','1'})
set(gca,'YTick',0.5:10.5:21.5),set(gca,'YTickLabel',{'-1','0','1'})

subplot(3,3,3),imshow(disegnoSxy(:,:),[inf
sup], 'InitialMagnification',500),colormap(jet),xlabel('r'),ylabel('s'),title('\sigma_x_y [kPa] blu')
set(gca,'Visible','on'),set(gca,'XTick',0.5:10.5:21.5),set(gca,'XTickLabel',{'-1','0','1'})
set(gca,'YTick',0.5:10.5:21.5),set(gca,'YTickLabel',{'-1','0','1'})

```

```
subplot(3,3,4),imshow(disegnoSxx1(:,:),[inf
sup], 'InitialMagnification',500),colormap(jet),xlabel('r'),ylabel('s'),title('\sigma_x_x [kPa] rosso')
set(gca,'Visible','on'),set(gca,'XTick',0.5:10.5:21.5),set(gca,'XTickLabel',{'-1','0','1'})
set(gca,'YTick',0.5:10.5:21.5),set(gca,'YTickLabel',{'-1','0','1'})
```

```
subplot(3,3,5),imshow(disegnoSyy1(:,:),[inf
sup], 'InitialMagnification',500),colormap(jet),xlabel('r'),ylabel('s'),title('\sigma_y_y [kPa] rosso')
set(gca,'Visible','on'),set(gca,'XTick',0.5:10.5:21.5),set(gca,'XTickLabel',{'-1','0','1'})
set(gca,'YTick',0.5:10.5:21.5),set(gca,'YTickLabel',{'-1','0','1'})
```

```
subplot(3,3,6),imshow(disegnoSxy1(:,:),[inf
sup], 'InitialMagnification',500),colormap(jet),xlabel('r'),ylabel('s'),title('\sigma_x_y [kPa] rosso')
set(gca,'Visible','on'),set(gca,'XTick',0.5:10.5:21.5),set(gca,'XTickLabel',{'-1','0','1'})
set(gca,'YTick',0.5:10.5:21.5),set(gca,'YTickLabel',{'-1','0','1'})
```

```
subplot(3,3,7),imshow(disegnoSxx2(:,:),[inf
sup], 'InitialMagnification',500),colormap(jet),xlabel('r'),ylabel('s'),title('\sigma_x_x [kPa] verde')
set(gca,'Visible','on'),set(gca,'XTick',0.5:10.5:21.5),set(gca,'XTickLabel',{'-1','0','1'})
set(gca,'YTick',0.5:10.5:21.5),set(gca,'YTickLabel',{'-1','0','1'})
```

```
subplot(3,3,8),imshow(disegnoSyy2(:,:),[inf
sup], 'InitialMagnification',500),colormap(jet),xlabel('r'),ylabel('s'),title('\sigma_y_y [kPa] verde')
set(gca,'Visible','on'),set(gca,'XTick',0.5:10.5:21.5),set(gca,'XTickLabel',{'-1','0','1'})
set(gca,'YTick',0.5:10.5:21.5),set(gca,'YTickLabel',{'-1','0','1'})
```

```
subplot(3,3,9),imshow(disegnoSxy2(:,:),[inf
sup], 'InitialMagnification',500),colormap(jet),xlabel('r'),ylabel('s'),title('\sigma_x_y [kPa] verde')
set(gca,'Visible','on'),set(gca,'XTick',0.5:10.5:21.5),set(gca,'XTickLabel',{'-1','0','1'})
set(gca,'YTick',0.5:10.5:21.5),set(gca,'YTickLabel',{'-1','0','1'})
```

```
%% Plotto le cellule in posizione finale e iniziale
```

```

index=[10:10:720];
mov = aviread('grigio.avi',index);
nome='Immagine con marcatori';
figure('name',nome);
for i=1:71:size(Mdeformazioni,3)
I = mov(i).cdata;
imshow(I,[])
hold on
plot(Mdeformazioni([1 2 3 4 5 6 7 8],1,1),Mdeformazioni([1 2 3 4 5 6 7 8],2,1),'*')
plot(Mdeformazioni([1 2 3 4 5 6 7 8],1,72),Mdeformazioni([1 2 3 4 5 6 7 8],2,72),'*')

plot(Mdeformazioni([1 3 4 2 1],1,1),Mdeformazioni([1 3 4 2 1],2,1),'--')
plot(Mdeformazioni([1 3 4 2 1],1,72),Mdeformazioni([1 3 4 2 1],2,72))

plot(Mdeformazioni([2 8 7 5 2],1,1),Mdeformazioni([2 8 7 5 2],2,1),'--g')
plot(Mdeformazioni([2 8 7 5 2],1,72),Mdeformazioni([2 8 7 5 2],2,72),'g')

plot(Mdeformazioni([3 8 6 2 3],1,1),Mdeformazioni([3 8 6 2 3],2,1),'--r');
plot(Mdeformazioni([3 8 6 2 3],1,72),Mdeformazioni([3 8 6 2 3],2,72),'r');

plot(cellula1([1 2 3 4 1],1,1),cellula1([1 2 3 4 1],2,1),'--');
plot(cellula1([1 2 3 4 1],1,2),cellula1([1 2 3 4 1],2,2));

plot(cellula2([1 2 3 4 1],1,1),cellula2([1 2 3 4 1],2,1),'--r');
plot(cellula2([1 2 3 4 1],1,2),cellula2([1 2 3 4 1],2,2),'r');

plot(cellula3([1 2 3 4 1],1,1),cellula3([1 2 3 4 1],2,1),'--g');
plot(cellula3([1 2 3 4 1],1,2),cellula3([1 2 3 4 1],2,2),'g');
pause()
end

```

6 Bibliografia

1. Reilly G.C. and Engler A.J., 2010. Intrinsic extracellular matrix properties regulate stem cell differentiation, *J Biomech* 43, pp. 55–62.
2. Selmi T.A. et al., 2008. Autologous chondrocyte implantation in a novel alginate-agarose hydrogel: outcome at two years, *J. Bone Joint Surg. Br.* 90 pp. 597–604
3. Pompilio G, Cannata A, Capogrossi MC, Alamanni F, Pesce M, Germani A, Biglioli P. *Cardiomioplastica cellulare autologa: un traguardo raggiungibile?*, *Italian Heart Journal* 2002; 3 : 1188-1197- Copyright © 2002 - CEPI Sr
4. Engler, A.J., Carag-Krieger, C., Johnson, C.P., Raab, M., Tang, H.Y., Speicher, D.W., Sanger, J.W., Sanger, J.M., Discher, D.E., 2008. Embryonic cardiomyocytes beat best on a matrix with heart-like elasticity: scar-like rigidity inhibits beating. *J. Cell Sci.* 121, 3794–3802.
5. Hay, ED, 1991. *Cell Biology of Extracellular Matrix*. Plenum Press, New York (p. 468).
6. Eyal-Giladi, H., 1995. Early avian morphogenesis leading to gastrulation in the wider context of vertebrate embryogenesis. In: Zagris, N., Duprat, A.M., Durston, A. (Eds.), *Organization of the Early Vertebrate Embryo*, vol. 279. Plenum Press, New York, pp. 111–121.
7. Davidson, L.A., Hoffstrom, B.G., Keller, R., DeSimone, D.W., 2002. Mesendoderm extension and mantle closure in *Xenopus laevis* gastrulation: combined roles for integrin alpha(5)beta(1), fibronectin, and tissue geometry. *Dev. Biol.* 242, 109–129.
8. Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., Marshak, D.R., 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143–147.
9. Dalby, M.J., Gadegaard, N., Tare, R., Andar, A., Riehle, M.O., Herzyk, P., Wilkinson, C.D., Oreffo, R.O., 2007. The control of human mesenchymal cell differentiation using nanoscale symmetry and disorder. *Nat. Mater.* 6, 997–1003.
10. Ott, H.C., Matthiesen, T.S., Goh, S.K., Black, L.D., Kren, S.M., Netoff, T.I., Taylor, D.A., 2008. Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nat. Med.* 14, 213–221.
11. Ruiz, S.A., Chen, C.S., 2008. Emergence of patterned stem cell differentiation within multicellular structures. *Stem Cells* 26, 2921–2927.

12. Mao, Y., Schwarzbauer, J.E., 2005. Fibronectin fibrillogenesis, a cell-mediated matrix assembly process. *Matrix Biol.* 24, 389–399.
13. Li, S., Harrison, D., Carbonetto, S., Fassler, R., Smyth, N., Edgar, D., Yurchenco, P.D., 2002. Matrix assembly, regulation, and survival functions of laminin and its receptors in embryonic stem cell differentiation. *J. Cell Biol.* 157, 1279–1290.
14. Oh, S., Brammer, K.S., Li, Y.S., Teng, D., Engler, A.J., Chien, S., Jin, S., 2009. Stem cell fate dictated solely by altered nanotube dimension. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 2130–2135.
15. McBeath, R., Pirone, D.M., Nelson, C.M., Bhadriraju, K., Chen, C.S., 2004. Cell Shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Dev. Cell* 6, 483–495.
16. Friedland, J.C., Lee, M.H., Boettiger, D., 2009. Mechanically activated integrin switch controls alpha5beta1 function. *Science* 323, 642–644.
17. Rowlands, A.S., George, P.A., Cooper-White, J.J., 2008. Directing osteogenic and myogenic differentiation of MSCs: interplay of stiffness and adhesive ligand presentation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 295, C1037–C1044.
18. Katsumi, A., Naoe, T., Matsushita, T., Kaibuchi, K., Schwartz, M.A., 2005. Integrin activation and matrix binding mediate cellular responses to mechanical stretch. *J. Biol. Chem.* 280, 16546–16549.
19. Bratt-Leal, A.M., Carpenedo, R.L., McDevitt, T.C., 2009. Engineering the embryoid body microenvironment to direct embryonic stem cell differentiation. *Biotechnol. Prog.* 25, 43–51.
20. Yasunaga, M., Tada, S., Torikai-Nishikawa, S., Nakano, Y., Okada, M., Jakt, L.M., Nishikawa, S., Chiba, T., Era, T., 2005. Induction and monitoring of definitive and visceral endoderm differentiation of mouse ES cells. *Nat. Biotechnol.* 23, 1542–1550.
21. Martino, M.M., Mochizuki, M., Rothenfluh, D.A., Rempel, S.A., Hubbell, J.A., Barker, T.H., 2009. Controlling integrin specificity and stem cell differentiation in 2D and 3D environments through regulation of fibronectin domain stability. *Biomaterials* 30, 1089–1097.
22. Darribere, T, Schwarzbauer, J.E, 2000. Fibronectin matrix composition and organization can regulate cell migration during amphibian development. *Mech. Dev.* 92, 239–250.
23. Curran, J.M., Chen, R., Hunt, J.A., 2006. The guidance of human mesenchymal stem cell differentiation in vitro by controlled modifications to the cell substrate. *Biomaterials* 27, 4783–4793.

24. Engler, A.J., Chan, M., Boettiger, D., Schwarzbauer, J.E., 2009. A novel mode of cell detachment from fibrillar fibronectin matrix under shear. *J. Cell Sci.* 122 1647–1653
25. Orr, A.W., Ginsberg, M.H., Shattil, S.J., Deckmyn, H., Schwartz, M.A., 2006. Matrix-specific suppression of integrin activation in shear stress signaling. *Mol. Biol. Cell.* 17, 4686–4697.
26. Williams, C.M., Engler, A.J., Slone, R.D., Galante, L.L., Schwarzbauer, J.E., 2008. Fibronectin expression modulates mammary epithelial cell proliferation during acinar differentiation. *Cancer Res.* 68, 3185–3192.
27. Wells, R.G., Discher, D.E., 2008. Matrix elasticity, cytoskeletal tension, and TGF- β : the insoluble and soluble meet. *Sci. Signal* 1, 13.
28. Wipff, P.J., Rifkin, D.B., Meister, J.J., Hinz, B., 2007. Myofibroblast contraction activates latent TGF- β 1 from the extracellular matrix. *J. Cell Biol.* 179, 1311–1323.
29. Engler, A.J., Richert, L., Wong, J.Y., Picart, C., Discher, D.E., 2004c. Surface probe measurements of the elasticity of sectioned tissue, thin gels and polyelectrolyte multilayer films: correlations between substrate stiffness and cell adhesion. *Surf. Sci.* 570, 142–154.
30. Krieg, M., Arboleda-Estudillo, Y., Puech, P.H., Kafer, J., Graner, F., Muller, D.J., Heisenberg, C.P., 2008. Tensile forces govern germ-layer organization in zebrafish. *Nat. Cell Biol.* 10, 429–436.
31. Rozario, T., Dzamba, B., Weber, G.F., Davidson, L.A., DeSimone, D.W., 2009. The physical state of fibronectin matrix differentially regulates morphogenetic movements in vivo. *Dev. Biol.* 327, 386–398.
32. Zamir, E.A., Srinivasan, V., Perucchio, R., Taber, L.A., 2003. Mechanical asymmetry in the embryonic chick heart during looping. *Ann. Biomed. Eng.* 31, 1327–1336.
33. Engler, A.J., Sen, S., Sweeney, H.L., Discher, D.E., 2006. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* 126, 677–689.
34. Dembo, M., Wang, Y.-L., 1999. Stresses at the cell-to-substrate interface during locomotion of fibroblasts. *Biophys. J.* 76, 2307–2316.
35. del Rio, A., Perez-Jimenez, R., Liu, R., Roca-Cusachs, P., Fernandez, J.M., Sheetz, M.P., 2009. Stretching single talin rod molecules activates vinculin binding. *Science* 323, 638–641
36. Johnson, C.P., Tang, H.Y., Carag, C., Speicher, D.W., Discher, D.E., 2007. Forced unfolding of proteins within cells. *Science* 317, 663–666.

37. Rivelino, D., Zamir, E., Balaban, N.Q., Schwarz, U.S., Ishizaki, T., Narumiya, S., Kam, Z., Geiger, B., Bershadsky, A.D., 2001. Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism. *J. Cell Biol.* 153, 1175–1186.
38. Smith, M.L., Gourdon, D., Little, W.C., Kubow, K.E., Eguiluz, R.A., Luna-Morris, S., Vogel, V., 2007. Force-induced unfolding of fibronectin in the extracellular matrix of living cells. *PLoS Biol.* 5, 2243–2254.
39. Peyton, S.R., Putnam, A.J., 2005. Extracellular matrix rigidity governs smooth muscle cell motility in a biphasic fashion. *J. Cell Physiol.* 204, 198–209.
40. Lo, C.M., Wang, H.B., Dembo, M., Wang, Y.L., 2000. Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophys. J.* 79, 144–152.
41. Berry, M.F., Engler, A.J., Woo, Y.J., Pirolli, T.J., Bish, L.T., Jayasankar, V., Morine, K.J., Gardner, T.J., Discher, D.E., Sweeney, H.L., 2006. Mesenchymal stem cell injection after myocardial infarction improves myocardial compliance. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 290, H2196–H2203.
42. Breitbach, M., Bostani, T., Roell, W., Xia, Y., Dewald, O., Nygren, J.M., Fries, J.W., Tiemann, K., Bohlen, H., Hescheler, J., Welz, A., Bloch, W., Jacobsen, S.E., Fleischmann, B.K., 2007. Potential risks of bone marrow cell transplantation into infarcted hearts. *Blood* 110, 1362–1369.
43. Collinsworth, A.M., Zhang, S., Kraus, W.E., Truskey, G.A., 2002. Apparent elastic modulus and hysteresis of skeletal muscle cells throughout differentiation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 283, C1219–C1227.
44. Muller, U., Littlewood-Evans, A., 2001. Mechanisms that regulate mechanosensory hair cell differentiation. *Trends Cell Biol.* 11, 334–342.
45. Flanagan, L.A., Ju, Y.E., Marg, B., Osterfield, M., Janmey, P.A., 2002. Neurite branching on deformable substrates. *Neuroreport* 13, 2411–2415.
46. Huang, A.H., Farrell, M.J., Mauck, R.L., Mechanics and mechanobiology of mesenchymal stem cell-based engineered cartilage. *J Biomech.*
47. Chen, J.-H., Liu, C., You, L., Simmons, C.A., Boning up on Wolff's Law: Mechanical regulation of the cells that make and maintain bone. *J Biomech.*
48. Paszek, M.J., Zahir, N., Johnson, K.R., Lakins, J.N., Rozenberg, G.I., Gefen, A., Reinhart-

- King, C.A., Margulies, S.S., Dembo, M., Boettiger, D., Hammer, D.A., Weaver, V.M., 2005. Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell* 8, 241–254.
49. Kong, H.J., Polte, T.R., Alsberg, E., Mooney, D.J., 2005. FRET measurements of cell- traction forces and nano-scale clustering of adhesion ligands varied by substrate stiffness. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 4300–4305.
50. Langer R, Tirrell DA. Designing materials for biology and medicine. *Nature* 2004; 428: 487-492.
51. Leor J, Aboulafia-Etzion S, Dar A, et al. Bioengineered cardiac grafts to repair the infarcted myocardium and attenuate heart failure. *Circulation* 2000; 102: 56-61.
52. Hutmacher DW. Scaffold in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* 2000;20:2529–2543.
53. Battista S, Guarnieri D, Borselli C, et al. The effect of matrix composition of 3D constructs on embryonic stem cell differentiation. *Biomaterials* 2005; 26: 6194-6207.
54. Nguyen H, Qian JJ, Bhatnagar RS, et al. Enhanced cell attachment and osteoblastic activity by P-15 peptide-coated matrix in hydrogels. *Biochem Biophys Res Comm* 2003; 311: 179-186.
55. Rowley JA, Madlambayan G, Mooney DJ. Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials. *Biomaterials* 1999; 20: 45-53.
56. Williams SF, Martin DP, Horowitz DM, et al. PHA applications: addressing the price performance issue: I. Tissue engineering. *Int J Biol Macromol* 1999; 25: 111-121.
57. Remuzzi A, Mantero S, Colombo M, et al. Vascular smooth muscle cells on hyaluronic acid: culture and mechanical characterization of an engineered vascular construct. *Tissue Eng* 2004; 10: 699-710.
58. Petite H, Viateau V, Bensaid W, et al. Tissue-engineered bone regeneration. *Nat Biotech* 2000; 18: 959-963.
59. Kim MR, Jeong JH, Park TG. Swelling induced detachment of chondrocytes using RGD-modified poly(N-isopropyl-acrilamide) hydrogel beads. *Biotechnol Prog* 2002; 18: 495-500.
60. Mann BK, West JL. Cell adhesion peptides alter smooth muscle cell adhesion, proliferation, migration and matrix protein synthesis on modified surfaces and in polymer scaffolds. *J Biomed Mater Res* 2002; 60: 86-93.
61. Hutmacher DW, Goh JC, Teoh SH. An introduction to biodegradable materials for tissue

- engineering applications. *Ann Acad Med Singapore* 2001; 30: 183-191.
62. Ng KW, Hutmacher DW, Schantz JT, et al. Evaluation of ultra-thin poly(epsilon-caprolactone) films for tissue-engineered skin. *Tissue Eng* 2001; 4: 441-455.
63. Kim HS, Oh SK, Park YB, et al. Methods of derivation of Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells* 2005; doi:10.1634.
64. Venkatraman SS, Tan LP, Joso JF, et al. Biodegradable stents with elastic memory. *Biomaterials* 2006; 27:1573 – 1578.
65. Drury JL, Dennis RG, Mooney DJ The tensile properties of alginate hydrogels. *Biomaterials*, 2004 25: 3187–3199.
66. Behravesh E, Timmer MD, Lemoine JJ, Liebschner MA, Mikos AG: Evaluation of the in vitro degradation of macroporous hydrogels using gravimetry, confined compression testing, and microcomputed tomography. *Biomacromolecules* 2002, 3:1263-1270
67. Gu WY, Yao H, Huang CY et al. New insight into deformation-dependent hydraulic permeability of gels and cartilage, and dynamic behavior of agarose gels in confined compression. *J Biomech* 2003;36:593598.
68. T.M. Quinn, A.J. Grodzinsky, *Macromolecules* 26 (1993) 4332–4338.
69. J.A. Stammen, S. Williams, D.N. Ku, R.E. Guldborg, *Biomaterials* 22 (2001) 799– 806.
70. Koob T.J, Hernandez D.J, 2003 Mechanical and thermal properties of novel polymerized NDGA-gelatin hydrogels. *Biomaterials*. 24, 1285–1292.
71. Gao D, Heimann RB, Williams MC, Wardhaugh LT, Muhammad M. Rheological properties of poly(acrylamide)–bentonite composite hydrogels. *J Mater Sci* 1999; 34:1543.
72. SIQUEIRA, J. J. P. & MORESCHI, J. C. Membranas de Celulose Porosas Desidratadas para Curativos em Ulceras, Escoriações e Queimaduras. *Revista da Sociedade Brasileira de Angiologia e Cirurgia Vascular*. Vol 16. No. 5, outubro.2000. Pag. 179-180.
73. Svensson A, Nicklasson E, Harrah T, Panilaitis B, Kaplan D.L, Brittberg M, Gatenholm P 2005 Bacterial cellulose as a potential scaffold for tissue engineering of cartilage. *Biomaterials*. 26, 419–431.
74. Katre NV. Immunogenicity of recombinant IL-2 modified by covalent attachment of polyethylene glycol. *J Immunol* 1990;144:209-213.
75. Guerra PI, Acklin c, Kosky AA, Davis JM Treuheit MJ, Brems DN. PEGylation prevents the N-

- terminal degradation of megakaryocyte growth and development factor. *Pharm Res.* 1988 Dec; 15(12):1822-7.
76. Abuchowsky A, Kazo GM, Verhoest CR Jr, Van Es T, Kafkewitz D, Nucci ML, Viau AT, Davis FF., 1984; Cancer therapy with chemically modified enzymes. I. Antitumor properties of polyethylene glycol-asparaginase conjugates. *Cancer Biochem Biophys.* 1984 Jun;7(2):175-86.
77. Andrade SP, Cardoso CC, machado RD, Beraldo WT. Angiotensin-II-induced angiogenesis in sponge implants in mice. *Int J Microcirc Clin Exp.* 1996 Nov-Dec;16(6):302-7.
78. Klibanov AL, Maruyama K, Torchilin VP, Huang L, Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes. *FEBS Lett.* 1990 Jul 30; 268(1):235-7.
79. Maechling-Strasser C, Déjardin P, Galin JC, Schmitt A, Housse-Ferrari V, Sébille B, Mulvihill JN, Cazenave JP. (Synthesis and adsorption of a poly(N-acetyleneimine)-polyethyleneoxide-poly-acetyleneimine) triblock-copolymer at silica/solution interface. Influence of its preadsorption on platelet adhesion and fibrinogen adsorption. *J Biomed Mater Res.* 1989 Dec;23(12):1395-410.
80. Hill-West JL, Chowhury SM, Sawhney AS, Pathak CP, Dunn RC, Hubbell JA. Prevention of postoperative adhesions in the rat by in situ photopolymerization of bioresorbable hydrogel barriers. *Obstet Gynecol.* 1994 Jan; 83(1):59-64.
81. Quinn Cp, Pathak CP, Heller A, Hubbell JA. Photo-crosslinked copolymers of 2-hydroxyethyl methacrylate, poly(ethylene glycol) tetra-acrylate and ethylene dimethacrylate for improving biocompatibility of biosensors. *Biomaterials* 1995 Mar; 16(5):389-96.
82. Lutolf MP, Lauer-Fields JL, Schmoekel HG, Metters AT, Weber FE, Fields GB, et al. Synthetic matrix metalloproteinase-sensitive hydrogels for the conduction of tissue regeneration: engineering cell invasion characteristics. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(9):5413–8.
83. Pratt AB, Weber FE, Schmoekel HG, Muller R, Hubbell JA. Synthetic extracellular matrices for in situ tissue engineering. *Biotechnol Bioeng* 2004;86(1):27–36
84. Mann BK, Gobin AS, Tsai AT, Schmedlen RH, West JL. Smooth muscle cell growth in photopolymerized hydrogels with cell adhesive and proteolytically degradable domains: synthetic ECM analogs for tissue engineering. *Biomaterials* 2001;22(22):3045–51.
85. Gobin AS, West JL. Cell migration through defined, synthetic ECM analogs. *Faseb J*

2002;16(7):751-3.

86. Mann BK, Schmedlen RH, West JL. Tethered-TGF-beta increases extracellular matrix production of vascular smooth muscle cells. *Biomaterials* 2001;22(5):439-44.
87. Dikovsky, D., Bianco-Peled, H., and Seliktar, D. The effect of structural alterations of PEG-fibrinogen hydrogel scaffolds on 3-D cellular morphology and cellular migration. *Biomaterials* 27, 1496, 2006.
88. Shoichet MS, Li RH, White ML, Winn SR. Stability of hydrogels used in cell encapsulation: an in vitro comparison of alginate and agarose. *Biotechnol Bioengng* 1996;50:374,81.
89. Ahearne M, Yang Y, El Haj AJ, Then KY, Liu KK. Characterizing the viscoelastic properties of thin hydrogel-based constructs for tissue engineering applications. *J R Soc Interface* 2005; 2:455-463.
90. Kuo, C.K. and Ma, P.X. Ionically crosslinked alginate hydrogels as scaffolds for tissue engineering: Part 1. Structure, gelation rate and mechanical properties. *Biomaterials* 22, 511, 2001.
91. Morris, V. J. 1986, Gelation of polysaccharide, Mitchell J.A. & Ledwards D.A. Editors, 121-170.
92. Schafer S.F., Steven F.S. 1995, A reexamination of the double-helix model for agarose gel using optical rotation, *Biopolymers*, 36(1), 103-108.
93. Arnott S., Fulner A., Scott W.E., Dea I.C.M., Morehouse R., Rees D.A. 1974, The agarose double helix and its function in agarose gel structure. *Journal of Molecular Biology*, 90(2), 269-284.
94. Norziah M.H., Foo S.L., Abd A.K. 2006, Rheological studies on mixtures of agar (*Gracilaria changii*) and -carrageenan, *Food Hydrocolloids*, 20, 204-217.
95. Djabourov M., Clark A.H., Rowlands D.W., Ross-Murphy S.B. 1989, Small angle X-ray scattering characterization of agarose sols and gels. *Macromolecules*, 22, 180-188.
96. Labropoulos K.C., Niesz D.E., Danforth S.C., Kevrekidis P.G. 2002, Dynamic rheology of agar gels: theory and experiments part I development of a rheological model, *Carbohydrate Polymers*, 50, 393-406.
97. Ross K.A., Pyrak-Nolte L.J., Campanella O.H. 2006, The effect of mixing conditions on the material properties of an agar gel, *Food Hydrocolloids*, 20, 79-87.

98. P. Aymard, V. Normand, D.L. Lootens, E. Amici, K.P. Plucknett, *Biomacromolecules* 1 (2000) 730.
99. Scandiucci de Freitas P., Wirz D., Stolz M., Gopfert B., Friederich N.F 2006, Pulsatile dynamic stiffness of cartilage-like materials and use of agarose gels to validate mechanical methods and models, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 78, 347-357.
100. Robinson J. *Integrated theory of finite element methods*. Wiley, Interscience Publication; 1973.
101. Humphrey J.D., Vawter D.L., Vito R.P.: Quantification of strains in biaxially tested soft tissues, *J. Biomech.*, Vol. 20, pp.59-65 (1987).
102. Lee NS, Bathe KJ. Effect of element distortions on the performance of isoparametric elements. *Int J Numer Meth Eng* 1993;36:3553–76.
103. Russell WS. Polynomial interpolation schemes for internal derivative distributions on structured grids. *Appl Numer Math* 1995;17:129–71.
104. Li LX, Kunimatsu S, Han XP, Xu SQ. The analysis of interpolation precision of quadrilateral elements. *Finite Elem Anal Des* 2004;41: 91–108.
105. Sacks, M. S., and Chuong, C. J., 1998, “Orthotropic Mechanical Properties of Chemically Treated Bovine Pericardium,” *Ann. Biomed. Eng.*, 26, pp. 892– 902.
106. Billiar KL, Sacks MS. Biaxial mechanical properties of the natural and glutaraldehyde treated aortic valve cusp—Part I: Experimental results. *J Biomech Eng*. 2000; 122: 23–30.
107. Quaglini V, C. Corazza and C. Poggi; An integrated optical-analytical approach for high deformable textiles; 12th International Conference on Experimental Mechanics, (2004)
108. Aymard P., Martin D.R., Plucknett K., Foster T.J., Clark A.H., Norton I.T. 2001, Influence of thermal history on the structural and mechanical properties of agarose gels, *Biopolymers*, 59(3), 131-144.
109. Quaglini V, Corazza C, Poggi C, 2007. Experimental characterization of orthotropic technical textiles under uniaxial and biaxial loading; *Composites Part A: Applied Science and manufacturing*; 39a (8) : 1331-1342
110. Flaim C. J., Chien S., Bhatia S. N. (2005) *Nat. Methods* 2:119–125, pmid:15782209.
111. Burdick, J.A., Vunjak-Novakovic, G., 2008. Review: engineered microenvironments for controlled stem cell differentiation. *Tissue Eng. Part A*.

112. Chan, G., Mooney, D.J., 2008. New materials for tissue engineering: towards greater control over the biological response. *Trends Biotechnol.* 26, 382–392.
113. Lee, J., Cuddihy, M.J., Kotov, N.A., 2008. Three-dimensional cell culture matrices: state of the art. *Tissue Eng. Part B Rev.* 14, 61–86.
114. Adhikari, R., Michler, G.H., Huy, T.A., Ivan'kova, E., Godehardt, R., Lebek, W., Knoll, K., 2003. Correlation between molecular architecture, morphology, and deformation behaviour of styrene/butadiene block copolymers. *Macromol. Chem. Phys.* 204, 488–499.
115. Maniadis, P., Tsimpanogiannis, I.N., Kober, E.M., Lookman, T., 2008. Phase segregation of diblock copolymers in nanopore geometries. *Europhys. Lett.* 81.