

POLITECNICO DI MILANO

Facoltà di Ingegneria dei Sistemi

Corso di laurea magistrale (CLM) in Ingegneria Biomedica



Idrogeli fotopolimerizzabili a base di gelatina metacrilata:
sintesi, caratterizzazione e applicazione
nell'ambito dell'ingegneria dei tessuti alla microscala

Relatore: Prof. Alberto REDAELLI

Correlatori: Ing. Marco RASPONI

Ing. Nasser SADR

Ing. Matteo MORETTI

Ing. Francesco PIRAINO

Tesi di laurea di:
Paola OCCHETTA
matricola 750002

Anno Accademico 2010-2011

INDICE

INDICE DELLE FIGURE	4
INDICE DELLE TABELLE	6
SOMMARIO	7
ABSTRACT	12
1. INTRODUZIONE	17
1.1 Medicina rigenerativa.....	17
1.2 Matrici biomimetiche: microscala, microarchitettura e tridimensionalità.....	21
1.3 Idrogeli	24
1.3.1 Definizione e proprietà	24
1.3.2 Classificazione degli idrogeli	26
1.3.3 Applicazioni degli idrogeli nel biomedicale.....	30
1.3.4 Idrogeli come materiali biomimetici	32
1.4 Idrogeli fotopolimerizzabili.....	34
1.4.1 Patterning di idrogeli fotopolimerizzabili.....	37
1.5 Scopo del lavoro	40
2. MATERIALI E METODI	41
2.1 Sintesi del materiale: GelMA	41
2.2 Caratterizzazione del materiale	43
2.2.1 ¹ H NMR: analisi del grado di metacrilazione.....	43
2.2.3 Test reologici degli idrogeli.....	44
2.2.3 Analisi del tempo di fotopolimerizzazione.....	46
2.3 Test di interazione con le cellule	50
2.3.1 Coltura cellulare	50
2.3.2 Inclusione di cellule in GelMA	52

2.3.3	Analisi del tempo di fotopolimerizzazione in funzione della densità cellulare.	53
2.3.4	Analisi di vitalità cellulare in seguito alla fotopolimerizzazione	54
2.3.5	Analisi della distribuzione 3D delle cellule nel gel.....	56
2.3.6	Coltura cellulare a lungo termine: analisi di spreading, proliferazione e attività metabolica cellulare.....	57
2.4	Mold patterning	62
2.4.1	Realizzazione degli stampi per la fabbricazione del dispositivo.....	62
2.4.2	Fabbricazione del dispositivo per il mold patterning	64
2.4.3	Fotopolimerizzazione attraverso PDMS: trasmittanza dei raggi UVB	66
2.4.4	Analisi quantitativa di fedeltà del pattern.....	67
2.4.5	Mold patterning con cellule.....	68
3	RISULTATI SPERIMENTALI	71
3.1	Caratterizzazione del materiale	71
3.1.1	¹ H-NMR: analisi del grado di metacrilazione	71
3.1.2	Test reologici degli idrogeli.....	73
3.1.3	Analisi del tempo di fotopolimerizzazione.....	74
3.2	Test di interazione con le cellule	76
3.2.1	Analisi del tempo di fotopolimerizzazione in funzione della densità cellulare.	76
3.2.2	Analisi di vitalità cellulare in seguito alla fotopolimerizzazione	78
3.2.3	Analisi della distribuzione 3D delle cellule nell'idrogelo	81
3.2.4	Coltura cellulare a lungo termine: analisi qualitativa dello spreading	83
3.2.5	Coltura cellulare a lungo termine: analisi quantitativa di proliferazione e attività metabolica.....	85
3.3	Mold patterning	88
3.3.1	Fotopolimerizzazione attraverso PDMS: trasmittanza dei raggi UVB	88
3.3.2	Mold patterning: analisi quantitativa di fedeltà del pattern.....	89

3.3.3 Mold patterning: analisi della distribuzione spaziale delle cellule.....	92
4 DISCUSSIONE.....	97
5 CONCLUSIONE E SVILUPPI FUTURI.....	105
BIBLIOGRAFIA	107

INDICE DELLE FIGURE

Figura 1.1 Approccio dell'ingegneria dei tessuti: processo di sviluppo di un tessuto ingegnerizzato 19

Figura 1.2 Laserskin[®], Fidia Advanced Biopolymers (Abano Terme, Italia) 20

Figura 1.3 Bioreattore utilizzato nel primo trapianto di trachea ingegnerizzata[15] 20

Figura 1.4 Numero di pubblicazioni riguardanti "Ingegneria dei tessuti" e "Idrogeli" negli ultimi 25 anni [23] 24

Figura 1.5 Formazione di idrogeli attraverso polimerizzazione per via fisica. (a) polimerizzazione guidata dall'instaurarsi di interazioni idrofobiche, (b) ioniche e (c) di legami a idrogeno, che possono essere distrutti dall'applicazione di sforzi di taglio. [46] 28

Figura 1.6 Rappresentazione schematica della formazione di un idrogel per via chimica tramite una reazione di polimerizzazione radicalica. [33] 29

Figura 1.7 Raffigurazione del comportamento di idrogeli smart in risposta a stimoli esterni 30

Figura 1.8 Rappresentazione schematica della complessa struttura dell'ECM e delle interazioni tra la cellula e i componenti dell'ambiente extracellulare. [31] 33

Figura 1.9 Reazione di foto polimerizzazione attraverso radiazione UVB in presenza di PI (Irgacure 2959) [54] 34

Figura 2.1 Reazione di metacrilazione tra macromolecole di gelatina e anidride metacrilica MA 42

Figura 2.2 Processo di sintesi del GelMA 42

Figura 2.3 Setup sperimentale delle prove reologiche sui campioni di GelMA. (a) Posizionamento del campione, (b) imposizione del gap di 1000 μm e (c) applicazione della frequenza di oscillazione. 45

Figura 2.4 Diverse condizioni di metacrilazione e concentrazione di PI testate nelle prove reologiche 45

Figura 2.5 Lampada PL-S 9W/12/2P 1CT. (A) Disegno tecnico e dimensioni nominali (B) Fotometria e spettro di emissione 46

Figura 2.6 Schema delle diverse condizioni testate nel confronto dei diversi lotti in relazione ai tempi di fotopolimerizzazione 47

Figura 2.7 Supporto per la fotopolimerizzazione del GelMA alla macroscale 49

Figura 2.8 Esempio di gel (A) completamente reticolato e (B) non reticolato (B). Lotto ad alta MA e PI=0.5%. Il tempo di esposizione è 40 sec (A) e 20 sec (B). Campioni a secco, immagini a stereoscopio 1.3x 49

Figura 2.9 Processo standard di coltura e semina cellulare 51

Figura 2.10 Schema delle condizioni testate nell'analisi di vitalità cellulare post crosslinking 54

Figura 2.11 Schema delle condizioni testate nell'esperimento di coltura cellulare a 7 giorni di HUVEC GFP incluse in GelMA 58

Figura 2.12 Curva standard per la conversione dei valori di fluorescenza dei campioni in valori di numero di cellule presenti nel campione stesso. La curva è stata preparata, come indicato nel protocollo, per i seguenti valori: 0, 50, 200, 600 e 100ng/ml 60

Figura 2.13 Riduzione della resazurina (non fluorescente) in resorufina (altamente fluorescente) 61

Figura 2.14 Tecnica di soft litografia per l'ottenimento di uno stampo elastomerico e suo utilizzo in applicazioni di micromolding in capillari 63

Figura 2.15 Rappresentazione schematica dello stampo utilizzato per il mold patterning di GelMA 64

Figura 2.16 (a) Geometria e quotatura del chip2. (b) Dettaglio costruttivo 65

Figura 2.17 Percentuale di trasmissività teorica di uno strato di PDMS spesso 1mm [78] 66

Figura 2.18 Schema delle condizioni testate analisi della distribuzione di HUVEC GFP in pattern di GelMA.. 68

Figura 2.19 Iniezione del prepolimero di GelMA contenente la sospensione cellulare nei micro canali del chip di PDMS 69

Figura 2.20 Suddivisione dei canali (chip1) per l'analisi della distribuzione cellulare sulla lunghezza. Dettaglio della suddivisione in tre fasce per l'analisi sulla larghezza 70

Figura 2.21 Schema della suddivisione dei canali del chip2 per l'analisi della distribuzione cellulare sui tratti rettilinei e sugli angoli 70

Figura 3.1 Spettri ¹H NMR dei campioni di gelatina di collagene di tipo A. I segnali si riferiscono (1) al campione di controllo non metacrilato e ai tre lotti metacrilati ottenuti con l'aggiunta di (2) 0.05 ml/g MA,

(3) 0.1 ml/g MA e (4) 1 ml/g MA durante la sintesi. Tutti gli spettri sono stati acquisiti con i seguenti parametri: numero scansioni 16, tempo di acquisizione 2s, tempo di riciclo 15s..... 72

Figura 3.2 Modulo di storage e modulo di loss in funzione della frequenza. Dati relativi ai tre lotti di GelMA foto polimerizzati per 6 minuti con concentrazione di foto iniziatore (a) 0.5% w/v e (b) 0.05% w/v. Il rettangolo tratteggiato indica la zona di plateau. Gli assi sono rappresentati in scala logaritmica. Le barre di errore identificano le deviazioni standard positive..... 73

Figura 3.3 Tempi di fotopolimerizzazione dei tre lotti di GelMA (alto, medio e basso gradi di MA) alle diverse concentrazioni di PI (0.05%, 0.1%, 0.5% e 1% w/v) ottenuti a distanze dalla sorgente UVB di (a) 20mm, (b) 50 mm e (c) 125mm..... 75

Figura 3.4 Immagini a stereoscopio (ingrandimento 1.2x) dei campioni di GelMA foto polimerizzati per 40 secondi in seguito all'inclusione nel prepolimero di (a) 0.1 M/ml, (b) 1 M/ml, (c) 10 M/ml e (d) 100 M/ml di HUVEC GFP. 76

Figura 3.5 Immagini a microscopio ottico in contrasto di fase (ingrandimento 10x) dei campioni di GelMA foto polimerizzati per 40 secondi in seguito all'inclusione nel prepolimero di (a) 100 M/ml, (b) 10 M/ml, (c) 1 M/ml e (d) 0.1 M/ml di HUVEC GFP..... 77

Figura 3.6 Immagini a microscopio ottico in fluorescenza (ingrandimento 10x) dei campioni di GelMA foto polimerizzati per 40 secondi in seguito all'inclusione nel prepolimero di (a) 0.1 M/ml, (b) 1 M/ml, (c) 10 M/ml e (d) 100 M/ml di HUVEC GFP. 77

Figura 3.7 Immagini dei campioni di GelMA foto polimerizzati per 40 secondi in seguito all'inclusione nel prepolimero di diverse densità di HUVEC GFP, ottenute dopo 6 ore di incubazione con MTT 77

Figura 3.8 Immagini LIVE/DEAD di HUVEC incluse in GelMA a 24 ore dalla fotopolimerizzazione. Concentrazioni di PI di (a) 1%w/v, (b) 0.5%w/v e (c) 0.05%w/v. Le cellule vive sono visibili in verde, quelle morte in rosso. Immagini in fluorescenza acquisite a microscopio ottico con ingrandimento 10x 78

Figura 3.9 Vitalità cellulare in funzione della concentrazione di foto iniziatore. Dati relativi a 24 ore dopo la fotopolimerizzazione. Le barre di errore identificano le deviazioni standard. (*=p<0.05). 78

Figura 3.10 Immagini LIVE/DEAD di HUVEC incluse in GelMA a 24 ore dal fotopolimerizzazione. Lotti a (a) medio e (b) alto grado di metacrilazione, fotopolimerizzati con concentrazione di PI (1) 0.05%w/v e (2) 0.5%w/v. Le cellule vive sono visibili in verde, quelle morte in rosso. Immagini in fluorescenza acquisite a microscopio ottico con ingrandimento 10x 79

Figura 3.11 Vitalità cellulare in funzione del grado di metacrilazione, a due diverse concentrazioni di PI. Dati relativi a 24 ore dopo la fotopolimerizzazione. Le barre di errore identificano le deviazioni standard. 80

Figura 3.12 Sezione laterale degli idrogeli fotopolimerizzati nelle seguenti condizioni di distanza dalla sorgente UVB e tempo di esposizione: (a) 20mm e 40 sec; (b) 50mm e 50sec; (c) 125mm e 90sec. Il contorno dei campioni è delimitato dal tratteggio rosso. Immagini in contrasto di fase acquisite a microscopio ottico con ingrandimento 3.2x..... 81

Figura 3.13 Immagini in fluorescenza dei due strati (1) superiore e (2) inferiore delle sezioni laterali degli idrogeli fotopolimerizzati nelle seguenti condizioni di distanza dalla sorgente UVB e tempo di esposizione: (a) 20mm e 40 sec; (b) 50mm e 50sec; (c) 125mm e 90sec. Immagini in fluorescenza acquisite a microscopio ottico con ingrandimento 10x..... 82

Figura 3.14 Distribuzione 3D: confronto tra il numero di cellule presenti nei due strati (superiore e inferiore) della sezione laterale dei campioni di GelMA considerati. Le barre di errore identificano le deviazioni standard. 82

Figura 3.15 Immagini di HUVEC (densità 1M/ml) incluse in GelMA (alto grado di metacrilazione) dopo (a) 1, (b) 3 e (c) 7 giorni dall'inclusione per fotopolimerizzazione. Immagini in fluorescenza acquisite a microscopio ottico con ingrandimento 10. 83

Figura 3.16 Immagini di HUVEC (densità 1M/ml) incluse in GelMA (medio grado di metacrilazione) dopo (a) 1, (b) 3 e (c) 7 giorni dall'inclusione per fotopolimerizzazione. Immagini in fluorescenza acquisite a microscopio ottico con ingrandimento 10x 83

Figura 3.17 Immagini di HUVEC (densità 10M/ml) incluse in GelMA (alto grado di metacrilazione) dopo (a) 1, (b) 3 e (c) 7 giorni dall'inclusione per fotopolimerizzazione. Immagini in fluorescenza acquisite a microscopio ottico con ingrandimento 10x 84

Figura 3.18 Immagini di HUVEC (densità 10M/ml) incluse in GelMA (medio grado di metacrilazione) dopo (a) 1, (b) 3 e (c) 7 giorni dall'inclusione per fotopolimerizzazione. Immagini in fluorescenza acquisite a microscopio ottico con ingrandimento 10x 84

Figura 3.19 Stima del contenuto di DNA cellulare ottenuta con il saggio CyQ. Sono riportate le due condizioni di grado di metacrilazione alla densità cellulare (a) 1M/ml e (b) 10M/ml. Le barre di errore identificano le deviazioni standard. 86

Figura 3.20 Stima della vitalità cellulare ottenuta con il saggio AlamarBlue (normalizzata sul contenuto di DNA cellulare). Sono riportate le due condizioni di grado di metacrilazione alla densità cellulare (a) 1M/ml e (b) 10M/ml. Le barre di errore identificano le deviazioni standard. . (**= $p < 0.01$; *= $p < 0.001$)..... 87

Figura 3.21 Analisi di trasparenza del PDMS ai raggi UVB. Tempi di fotopolimerizzazione del GelMA (alto grado di metacrilazione, PI=0.5% w/v) attraverso strati di PDMS di vario spessore, rispetto alla condizione di esposizione diretta ai raggi UVB..... 88

Figura 3.22 Immagini relative allo stampo1. Pattern ottenuti fotopolimerizzando il GelMA ad alto (b) e medio (c) grado di metacrilazione. Per facilitare il confronto è riportato il pattern trasferito (a). Immagini in contrasto di fase acquisite a microscopio ottico con ingrandimento 2x 89

Figura 3.23 Immagini relative allo stampo2. Pattern ottenuti fotopolimerizzando il GelMA ad alto (b) e medio (c) grado di metacrilazione. Per facilitare il confronto è riportato il pattern trasferito (a). Immagini in contrasto di fase acquisite a microscopio ottico con ingrandimento 2x. 89

Figura 3.24 Sezione laterale del pattern ottenuto per mold patterning dallo stampo 1 del lotto (a) ad alta e (b) a media metacrilazione. Il profilo rosso identifica la forma originale dello stampo. Immagini acquisite con microscopio ottico in contrasto di fase con ingrandimento 2x. 90

Figura 3.25 Dati di risoluzione relativi allo stampo1 (a) e 2 (b). Dimensione dei pattern di GelMA espressa in % rispetto al mold di PDMS. Analisi sulla larghezza e sull'altezza dei canali. Confronto tra batch ad alto e medio grado di metacrilazione. Le barre di errore identificano le deviazioni standard. . (*= $p < 0.05$). 91

Figura 3.26 Immagini di HUVEC incluse in pattern di GelMA (stampo 1). Le immagini si riferiscono al lotto (a-b) a medio e (c-d) alto grado di metacrilazione con densità cellulari rispettivamente di (a-c) 1 e (b-d) 10M/ml. Il tratteggio definisce il profilo dello stampo. Immagini in fluorescenza acquisite a microscopio ottico con ingrandimento 10x 92

Figura 3.27 Distribuzione delle HUVEC nei pattern di GelMA al giorno 0 relativamente allo stampo 1. (a) e (b) Analisi sulla lunghezza del canale rispettivamente dei lotti a medio e alto grado di metacrilazione. (c) e (d) Analisi sulla larghezza del canale rispettivamente dei lotti a medio e alto grado di metacrilazione. Le barre di errore identificano le deviazioni standard. . (*= $p < 0.05$; **= $p < 0.01$). 93

Figura 3.28 Immagini di HUVEC incluse in pattern di GelMA (stampo 1). Le immagini si riferiscono al lotto (a-b) a medio e (c-d) ad alto grado di metacrilazione con densità cellulari rispettivamente di (a-c) 1 e (b-d) 10M/ml. Nella prima riga sono riportati i tratti rettilinei dei pattern, nella seconda i tratti ad angolo retto. Il tratteggio definisce il profilo dello stampo. Immagini in fluorescenza acquisite a microscopio ottico con ingrandimento 10x. 94

Figura 3.29 Distribuzione delle HUVEC nei pattern di GelMA al giorno 0 relativamente allo stampo 2. (a) e (b) Confronto tra rettilinei e angoli rispettivamente dei lotti a medio e alto grado di metacrilazione. (c) e (d) Analisi sulla lunghezza del canale rispettivamente dei lotti a medio e alto grado di metacrilazione. Le barre di errore identificano le deviazioni standard. 95

Figura 3.30 Immagini in fluorescenza di HUVEC GFP (10M/ml) incluse in pattern di GelMA, relative ai canali del chip1. Il tratteggio definisce il profilo dello stampo. Lotto (a) ad alta e (b) a media metacrilazione. Immagini acquisite a microscopio ottico con ingrandimento 10x 96

Figura 5.1 Sviluppi futuri: rappresentazione della potenzialità del mold patterning di idrogeli fotopolimerizzabili nell'ottenimento di micropattern multicellulari..... 106

INDICE DELLE TABELLE

Tabella 2.1 Parametri sperimentali dei test reologici 46

Tabella 3.1 Tabella riassuntiva dei gradi relativi di metacrilazione dei tre lotti, calcolati come rapporto fra l'integrale dei segnali presenti nella regione 6.06-5.62 ppm e quello dei segnali presenti nella regione 7.65-6.95 dello spettro 1H-NMR di ciascuno campione 72

SOMMARIO

Idrogeli fotopolimerizzabili a base di gelatina metacrilata: sintesi, caratterizzazione e applicazione nell'ambito dell'ingegneria dei tessuti alla microscala

Introduzione

I tessuti biologici sono composti da unità funzionali tridimensionali, aventi dimensioni dell'ordine delle centinaia- migliaia di micrometri. La struttura di queste unità, la cui architettura è ripetuta nello spazio, sta alla base della coordinazione di processi multicellulari di proliferazione, differenziamento, migrazione e apoptosi[1]. L'importanza di ottenere matrici biomimetiche tridimensionali che replichino *in vitro* quella che è l'architettura del microambiente extracellulare *in vivo*, risulta evidente in modelli di tessuti ingegnerizzati complessi e vascolarizzati[2].

Nel tentativo di sintetizzare matrici biomimetiche con queste caratteristiche, gli idrogeli rappresentano una valida alternativa in quanto mostrano somiglianze strutturali con le componenti macromolecolari proteiche dell'ECM[3]. La struttura reticolata permette agli idrogeli di fornire alle cellule incapsulate un supporto in tre dimensioni, favorendo processi di adesione, proliferazione e migrazione. Inoltre, la capacità di trattenere elevati volumi di acqua fornisce alle matrici caratteristiche di idratazione simili a quelle dell'ECM nativa[4]. La presenza nella loro struttura di una rete di pori interconnessi alla microscala garantisce il trasporto di ossigeno, nutrienti e cataboliti, e allo stesso tempo la diffusione dei segnali biochimici[5]. La struttura meccanica e la cinetica di degradazione degli idrogeli possono infine essere adeguate alle richieste cellulari, ed essere controllate attraverso la scelta di parametri di sintesi (materiale, concentrazione di polimero, tipo di polimerizzazione)[4].

Gli idrogeli fotopolimerizzabili, sottoclasse degli idrogeli, vengono reticolati *in vivo* o *in vitro* attraverso l'esposizione a fonti di luce visibile o ultravioletta (UV), in presenza di un agente fotoiniziatore (PI). Tale processo è compatibile con l'inclusione di cellule all'interno della matrice. L'utilizzo di idrogeli fotopolimerizzabili

combinato a tecniche di microstrutturazione, quali il photo patterning e il mold patterning, permette inoltre di ottenere micropattern cellulari omogenei e tridimensionali[6].

In questo studio sono stati sintetizzati e caratterizzati idrogeli fotopolimerizzabili a base di gelatina di collagene metacrilata (GelMA). In particolare, è stata indagata la loro potenzialità come matrici biomimetiche attraverso analisi di interazione con cellule fluorescenti umane da vena ombelicale di linea (HUVEC GFP). È stato poi definito un protocollo di mold patterning per l'ottenimento di micropattern cellulari, tramite l'uso combinato di fotopolimerizzazione e di replica molding di polidimetilsilossano (PDMS).

Materiali e metodi

La gelatina di collagene di tipo A (Sigma Aldrich, G6144) è stata modificata tramite una reazione di metacrilazione in modo da essere resa fotopolimerizzabile (Figura 1) [7].

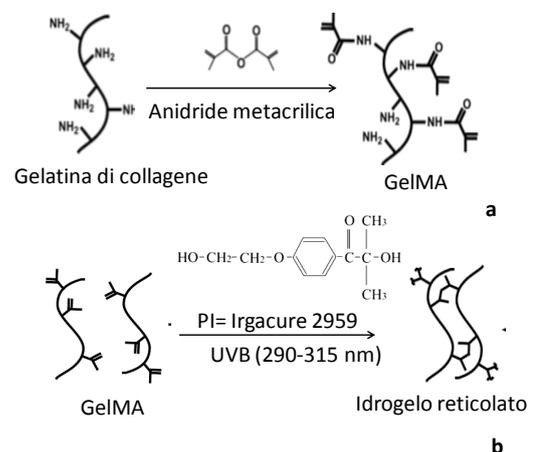


Figura 1 (a) Reazione di metacrilazione tra macromolecole di gelatina e anidride metacrilica MA. (b) Reazione di fotopolimerizzazione del GelMA attraverso radiazione UVB in presenza di PI (Irgacure 2959)

Il materiale è stato sintetizzato in tre lotti tramite l'aggiunta di diverse concentrazioni di anidride metacrilica MA (0.05 ml/g, 0.1 ml/g e 1 ml/g). Il processo di metacrilazione è stato valutato tramite indagini di spettroscopia ¹H-NMR. Le

caratteristiche reologiche dei campioni di GelMA sono state valutate tramite reometro rotazionale (TA instruments, AR 1500 Ex) con setup a piatti paralleli di diametro 20mm e distanza piatto-piatto di 1000 μ m. La definizione dei tempi di fotopolimerizzazione è stata condotta analizzando: i) dipendenza dalla distanza dalla sorgente UVB, ii) concentrazione di fotoinziatore, iii) grado di metacrilazione e iv) densità cellulare.

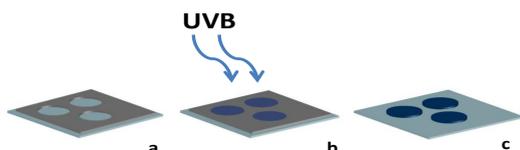


Figura 2 Supporto per la fotopolimerizzazione del GelMA alla macroscale

Le cellule utilizzate per la validazione biologica sono cellule di linea endoteliali umane da vena ombelicale, modificate per l'espressione di *green fluorescent protein* (HUVEC GFP).

La citocompatibilità del processo di inclusione è stato innanzitutto valutata attraverso il saggio LIVE/DEAD, tramite il quale è stata analizzata la dipendenza della vitalità cellulare in funzione di concentrazione di PI (Irgacure 2959), grado di metacrilazione, e tempo di esposizione. Successivamente, il processo è stato valutato in termini di distribuzione spaziale delle cellule incluse nell'idrogel. Le potenzialità degli idrogeli di GelMA come matrici biomimetiche sono state analizzate alla macroscale in seguito a inclusione di HUVEC GFP con densità cellulari di 1 e 10M/ml nei campioni. Il comportamento delle cellule è stato monitorato durante un periodo di coltura di 7 giorni in termini di spreading (immagini di microscopia), proliferazione cellulare (saggio CyQuant), e attività metabolica (saggio AlamarBlue).

La possibilità di ottenere pattern di GelMA alla microscala è stata valutata definendo uno specifico protocollo di mold patterning (Figura 3).

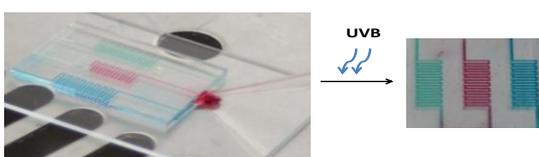


Figura 3 Schematizzazione del protocollo di mold patterning

I dispositivi utilizzati sono stati realizzati attraverso l'assemblaggio di stampi micro

strutturati in PDMS posizionati su vetrini trattati con 3-(trimetossil)propil metacrilato (TMSPMA). La risoluzione dei pattern ottenuti è stata quantificata in termini di riproduzione geometrica degli stampi (larghezza e altezza dei canali). L'inclusione di cellule nei micro pattern così ottenuti è stata validata dal punto di vista dell'omogeneità della distribuzione nelle tre dimensioni in seguito alla fotopolimerizzazione.

Risultati

L'analisi chimica di $^1\text{H-NMR}$ sui tre lotti di GelMA sintetizzati ha messo in luce la dipendenza del grado di metacrilazione finale dalla concentrazione di MA utilizzata. Il grado di metacrilazione dei tre lotti è risultato essere rispettivamente del 22%, 39% e 77%, rispetto ad un controllo non metacrilato (Tabella 1).

Tabella 1 Tabella riassuntiva dei gradi relativi di metacrilazione dei tre lotti rispetto a un controllo non metacrilato

Concentrazione di MA [ml/g]	Grado relativo di metacrilazione [%]
0.05	22
0.1	39
1	77

L'analisi del comportamento viscoelastico degli idrogeli tramite reologia, ha permesso di definire gli andamenti di modulo di *storage* (G') e di *loss* (G'') in funzione della frequenza oscillatoria. *storage* (G') and the *loss* (G'') moduli (Figura 4).

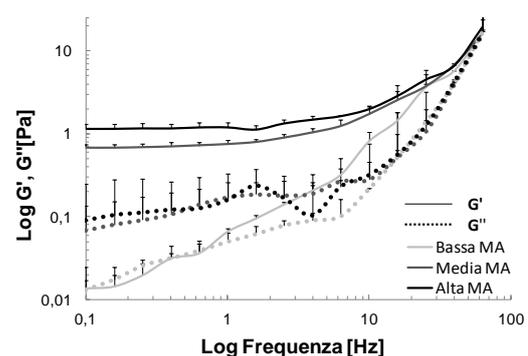


Figura 4 Modulo di *storage* e modulo di *loss* in funzione della frequenza. Dati relativi ai tre lotti di GelMA con concentrazione di foto iniziatore 0.5% w/v. Il rettangolo tratteggiato indica la zona di plateau.

Per i lotti ad alta e media metacrilazione si identifica una zona di plateau (da 0.1 a 10 Hz), nella quale G' e G'' sono indipendenti dalla sollecitazione applicata e assumono valori

rispettivamente intorno a 1 KPa e 0.1 KPa. Questo effetto risulta evidente a PI pari a 0.5% w/v. Le curve corrispondenti al basso grado di MA non presentano nessun plateau, ma valori di G' e G'' fino a un ordine di grandezza inferiori. Grado di MA e concentrazione di PI hanno un'influenza anche sul tempo necessario alla fotopolimerizzazione. Considerando una concentrazione di PI 0.5% w/v e una distanza intermedia dalla sorgente UV (50mm), i tempi di esposizione passano da 40 sec per l'alto grado di MA, fino a 100 sec per la bassa MA. Un incremento dei tempi si registra anche al diminuire della concentrazione di PI. Nel lotto a bassa MA si riscontra, per PI da 0.5% w/v a 1% w/v, una stabilizzazione nei tempo di fotopolimerizzazione. Questo è probabilmente dovuto ad una saturazione dei gruppi reattivi delle catene polimeriche: incrementi di radicali liberi di PI non portano alla formazione di nuovi ponti, per mancanza di siti disponibili. Il tempo di fotopolimerizzazione non risulta invece dipendente dalla densità delle cellule incluse nell'idrogel, e si mantiene costante intorno ai 40 secondi (lotto ad alta MA) in tutto l'intervallo testato (0.1 a 100 M/ml).

Analisi di citotossicità, eseguite a 24 ore dalla fotopolimerizzazione, mostrano una diminuzione statisticamente significativa della vitalità cellulare all'aumentare della concentrazione di PI dell'1% w/v ($80,8\% \pm 2,3\%$), rispetto alle condizioni 0.5% e 0.05% w/v ($90,7\% \pm 3,4\%$ e $94,3\% \pm 1,5\%$), comparabili tra loro (Figura 5).

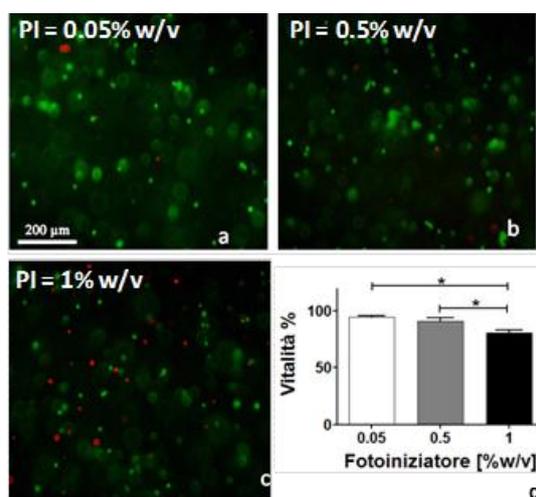


Figura 5 (a,b,c) LIVE/DEAD di HUVEC GFP 24h dopo l'inclusione in GelMA. (Cellule vive in verde, morte in rosso). (d) Quantificazione delle vitalità cellulare in funzione della concentrazione di PI (* $p < 0.05$)

Nessuna differenza statisticamente significativa di vitalità cellulare si registra invece nel confronto tra i gradi di metacrilazione medio e alto. Il lotto a basso livello di metacrilazione è stato escluso da questi test a causa delle scarse proprietà meccaniche: tali idrogeli, infatti, disgregano dopo circa 12 ore dalla fotopolimerizzazione.

L'analisi sulla distribuzione spaziale delle cellule alla macroscale mostra come in idrogeli spessi 1mm, le cellule mantengono una distribuzione tridimensionale omogenea sulla sezione laterale, in un intervallo di tempi di fotopolimerizzazione da 40 a 90 secondi.

Nelle prove di coltura a lungo termine, le cellule incluse a concentrazione 10M/ml hanno mostrato fenomeni di interazione intercellulare che culminano al giorno 7 con la formazione di network, sviluppate sia sul piano orizzontale che su quello verticale (Figura 6). Nei campioni ad alta MA si registra al giorno 7 una diminuzione nel numero di cellule, che comunque mostrano un metabolismo attivo.

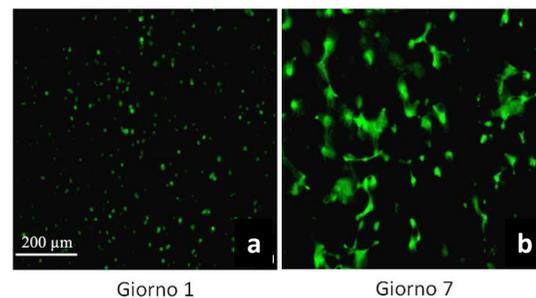


Figura 6 Immagini di HUVEC GFP (densità 10M/ml) incluse in GelMA (alto grado di metacrilazione) dopo (a) 1 e (b) 7 giorni dalla fotopolimerizzazione.

Le cellule incluse alla densità di 1M/ml non hanno mostrato fenomeni di interazione nei 7 giorni di osservazione, indipendentemente dal grado di MA. Le analisi di proliferazione non evidenziano aumenti nel numero cellulare; nonostante questo le cellule presentano un metabolismo attivo (in aumento dal giorno 1 al giorno 7).

Per la validazione alla macroscale, l'analisi di fedeltà agli stampi ha mostrato un'elevata risoluzione in larghezza per entrambi i gradi di MA. L'altezza dei pattern risulta minore rispetto ai canali, in maniera significativamente maggiore per la media MA. I pattern a media MA mostrano poi un numero elevato di difetti (Figura 7).

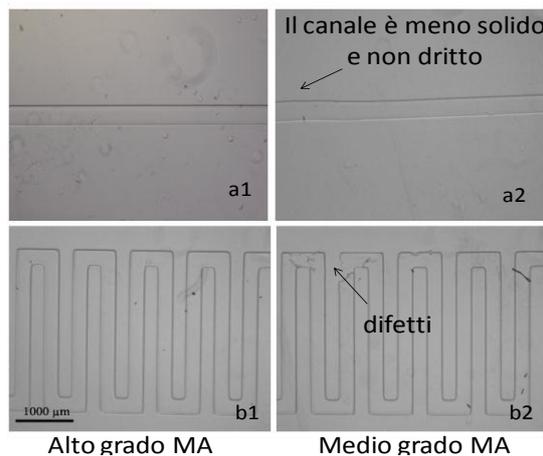


Figura 7 Immagini relative agli stampi (a) 1 e (b) 2. Pattern ottenuti fotopolimerizzando il GelMA ad alto (1) e medio (2) grado di metacrilazione.

L'analisi sulla distribuzione cellulare mostra omogeneità sulla lunghezza per entrambe le geometrie (Figura 8). Le cellule mostrano infine una distribuzione tridimensionale omogenea, per entrambi i gradi di MA (Figura 9).

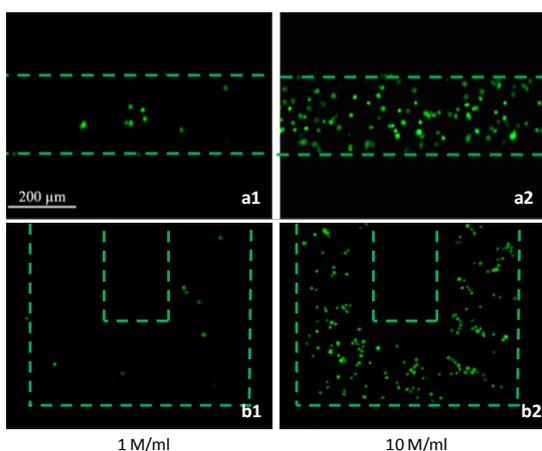


Figura 8 Immagini di HUVEC incluse in pattern di GelMA ottenuti per mold patterning dagli stampi (a) 1 e (b) 2. Le immagini si riferiscono al lotto ad alto grado di metacrilazione con densità cellulari di (1) 1 e (2) 10M/ml. Il tratteggio definisce il profilo dello stampo.

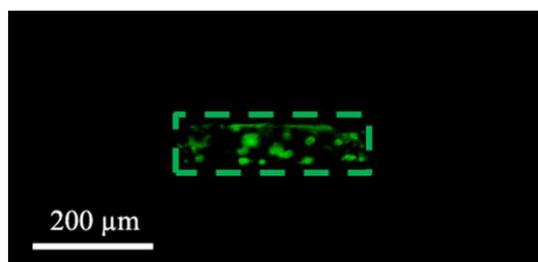


Figura 9 Immagini di HUVEC GFP (10M/ml) incluse in pattern di GelMA (alto grado di MA), relative ai canali del chip1. Il tratteggio definisce il profilo dello stampo.

Discussione

Numerosi studi hanno dimostrato le potenzialità di idrogeli fotopolimerizzabili per la formazione di matrici biomimetiche 3D e dalla microarchitettura controllata[8]. Gelatina di collagene commerciale è stata modificata tramite una reazione di metacrilazione per poter essere polimerizzata in presenza di un fotoiniziatore (Irgacure 2959) previa esposizione agli UVB.

Gli idrogeli ottenuti per fotopolimerizzazione di GelMA mostrano un comportamento viscoelastico. I risultati dei test reologici mostrano la dipendenza del comportamento meccanico dalla concentrazione di PI e dal grado di MA. Gli idrogeli analizzati mostrano proprietà meccaniche più elevate all'aumentare del livello di reticolazione raggiunta. L'aumento di PI a parità di tempo di esposizione permette la formazione di una rete più rigida dovuta alla formazione di più ponti tra le catene. Il grado di MA basso si dimostra meccanicamente meno solido rispetto alle metacrilazioni maggiori, e questo ne causa una degradazione più rapida.

La gelatina può essere reticolata anche per aggiunta di additivi chimici e/o enzimatici, che risultano però spesso citotossici. La scelta di modificare la gelatina con gruppi metacrilici (GelMA) permette di ottenere idrogeli attraverso un processo di fotopolimerizzazione compatibile con l'incapsulamento di cellule. Al fine di ottenere un protocollo di reticolazione citocompatibile occorre però un'ottimizzazione dei parametri critici di fotopolimerizzazione (concentrazione di PI e conseguente tempo di esposizione). Le analisi di vitalità cellulare hanno portato alla definizione di un intervallo di concentrazione di PI da 0.05% a 0.5% w/v che permette sia di mantenere livelli di citotossicità accettabili, sia di raggiungere una completa reticolazione in tempi tali da ottenere una distribuzione cellulare effettivamente 3D e omogenea all'interno degli idrogeli.

Il monitoraggio nel tempo del comportamento di HUVEC GFP incluse negli idrogeli alla macroscale ha dimostrato come la formazione di interazioni intercellulari sia strettamente dipendente dalla densità cellulare iniziale. A densità cellulare di 10M/ml, gli idrogeli di GelMA sono in grado di promuovere fenomeni di spreading, mantenendo le cellule

metabolicamente attive nel tempo e favorendo la formazione progressiva di network su più piani. La diminuzione nel numero di cellule riscontrata sembra essere in linea con una dinamica di comportamento cellulare compatibile con la fase iniziale dei processi angiogenetici, caratterizzata da fenomeni di apoptosi selettiva e riorganizzazione cellulare[9].

L'utilizzo di idrogeli fotopolimerizzabili di GelMA è compatibile con tecniche di microstrutturazione di mold patterning. In questo studio si mette in luce l'efficacia di un protocollo di mold patterning per l'ottenimento di micropattern cellulari dalla geometria controllata. I pattern ottenuti risultano caratterizzati da un'elevata risoluzione spaziale, compatibilmente con gli stampi utilizzati. In termini di presenza di difetti, il lotto ad alta metacrilazione si dimostra più adatto ad applicazioni alla microscala. Il protocollo presentato permette poi l'inclusione di cellule ottenendo una distribuzione spaziale omogenea nelle tre dimensioni per entrambe le geometrie testate. La concentrazione cellulare più elevata nelle zone centrali dei canali potrebbe poi essere compatibile con eventuali future applicazioni nell'ambito della microvascolarizzazione *in vitro* di tessuti ingegnerizzati.

Conclusione e sviluppi futuri

Questo lavoro ha dimostrato la compatibilità di idrogeli fotopolimerizzabili a base di gelatina metacrilata come matrici biomimetiche per applicazioni sia alla macro sia alla micro scala. In

particolare, il protocollo di mold patterning si è dimostrato adeguato all'ottenimento di micropattern cellulari ad alta risoluzione, tridimensionalmente omogenei e dalla geometria controllata. Un'analisi del comportamento cellulare a lungo termine nei pattern alla microscala sarà necessaria per confermare la fattibilità dell'approccio proposto nell'ambito dell'ingegnerizzazione di tessuti *in vitro*.

Bibliografia

1. Liu Tsang, V. and S.N. Bhatia, *Three-dimensional tissue fabrication*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2004. **56**(11): p. 1635-1647
2. Gauvin, R. and A. Khademhosseini, *Microscale Technologies and Modular Approaches for Tissue Engineering: Moving toward the Fabrication of Complex Functional Structures*. ACS Nano, 2011. **5**(6): p. 4258-4264.
3. Lee, K.Y. and D.J. Mooney, *Hydrogels for tissue engineering*. Chemical Reviews, 2001. **101**(7): p. 1869-1879
4. Geckil, H., *Engineering hydrogels as extracellular matrix mimics*. Nanomedicine, 2010. **5**: p. 469-484.
5. Tibbitt, M.W. and K.S. Anseth, *Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture*. Biotechnology and Bioengineering, 2009. **103**(4): p. 655-663.
6. Nguyen, K.T., West, J.L., *Photopolymerizable hydrogels for tissue engineering applications*. Biomaterials, 2001. **23**: p. 4307-4314.
7. Van Den Bulcke, A.I., *Structural and Rheological Properties of Methacrylamide Modified Gelatin Hydrogels*. Biomacromolecules, 2000. **1**: p. 31-38.
8. Nichol, J.W., et al., *Cell-laden microengineered gelatin methacrylate hydrogels*. Biomaterials, 2010. **31**(21): p. 5536-5544.
9. Segura, I., et al., *Inhibition of programmed cell death impairs in vitro vascular-like structure formation and reduces in vivo angiogenesis*. The FASEB Journal, 2002. **16**(8): p. 833-841.

Gelatin methacrylate photopolymerizable hydrogels: synthesis, characterization and applications in micro scaled tissue engineering

Introduction

Native tissues are composed of functional three-dimensional (3D) units on the scale of 100-1000 μ m. The 3D architecture of these repeating units underlies the coordination of multicellular processes such as proliferation, differentiation, migration and apoptosis [1]. The requirement for 3D biomimetic matrices to mimic *in vitro* the ECM microarchitecture found *in vivo* becomes relevant in complex and vascularized tissue engineered models [2].

The structural similarity of hydrogels to the macromolecular-based components of soft ECM makes them promising candidates in the design of biomimetic matrices that satisfy these requirements [3]. These reticulated structures of crosslinked polymer chains support the embedded cells in three dimensions, improving cell binding, spreading and migration. The ability to absorb a large amount of water gives hydrogels hydration properties similar to those of the natural ECM [4]. In addition, the presence of interconnected microscopic pores in their structure enhances oxygen, nutrients and waste transport [5]. Finally, their mechanical properties and degradation rate can be tuned by adjusting various parameters to match different cellular requirements (materials, polymer concentration, crosslinking method) [4].

Among others, photopolymerizable hydrogels can be crosslinked *in vivo* or *in vitro* in the presence of a photoinitiator agent (PI) using visible or ultraviolet (UV) irradiation. This crosslinking method is compatible with cell encapsulation into the gel's matrix. The possibility to combine photopolymerizable hydrogels together with microengineering technologies, such as photo patterning and mold patterning, can lead to the fabrication of cell-laden homogeneous and 3D microgels [6].

In the present study, photopolymerizable gelatin methacrylate (GelMA) hydrogels were synthesized and characterized. Their ability as

biomimetic matrices was investigated by assessing the interaction with *Human Umbilical Vein Endothelial Cell* (HUVEC GFP) from a cell line. Finally, a new protocol to obtain cell-laden micropatterns was presented, through the combination of photopolymerization and replica molding of polydimethylsiloxane (PDMS).

Materials and Methods

Methacrylate Gelatin (GelMA) was synthesized by the reaction of type A collagen gelatin (Sigma Aldrich, G6144) with methacrylic anhydride (MA), aiming at adding methacrylate groups suitable for photopolymerization (Figure 1) [7].

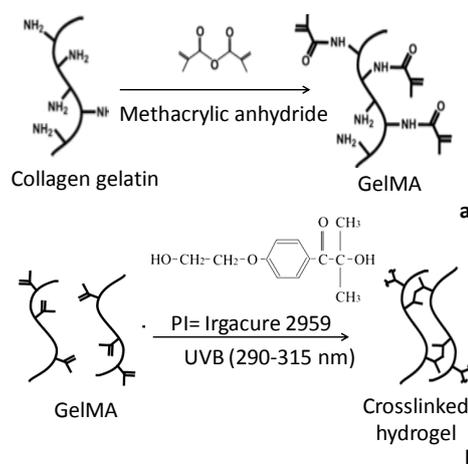


Figure 1 Synthesis of methacrylated gelatin. Gelatin macromers containing primary amine groups were reacted with methacrylic anhydride (MA) to add methacrylate pendant groups (A). To create a hydrogel network, the methacrylated gelatin can thus be crosslinked using UV irradiation in the presence of a photoinitiator (B). (Irgacure 2959).

Three batches were obtained adding different MA concentrations during the synthesis process (0.05 ml/g, 0.1 ml/g e 1 ml/g). For each batch, the degree of methacrylation was quantified through ¹H-NMR spectroscopy.

The rheological characterization of hydrogels was carried out with a rotational rheometer (TA instruments, AR 1500 Ex) using parallel plates of

20 mm diameter, at a plate-to-plate distance of 1000 μm .

The exposure time required to obtain a complete crosslinking was defined as function of: i) distance from the UVB source, ii) PI concentration, iii) methacrylation degree, and iv) embedded cell density.

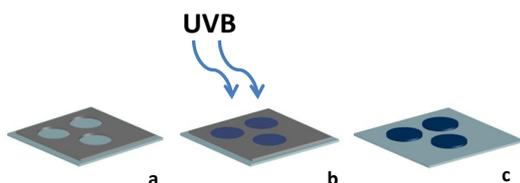


Figure 2 Macro scale setup for GelMA photopolymerization

The biological validation was carried out using *Human Umbilical Vein Endothelial Cell* from a cell line, expressing *Green Fluorescent Protein* (HUVEC GFP).

The cytocompatibility of the inclusion in the hydrogels was evaluated performing LIVE/DEAD assays, 24h after the cell encapsulation. The effects of PI concentration (Irgacure 2959), methacrylation degree and exposure time on cell viability were quantified. The 3D distribution of cells within the hydrogels was then evaluated by comparing the number of cells in two different layers of the cross section.

HUVEC GFP at cell densities of 1M/ml and 10M/mL were embedded into the hydrogels, so to exploit their potentiality as biomimetic matrices. Cell spreading (visual inspection), proliferation (CyQuant assay) and metabolic activity (AlamarBlue assay) were monitored in a 7-days culture.

The ability of patterning micro scale cell-laden gels was assessed by drawing up a specific mold patterning protocol (Figure 3).

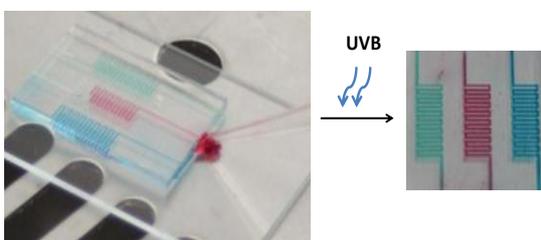


Figure 3 Micro scale mold patterning protocol

The device showed in figure 3 was fabricated assembling a micro structured PDMS mold on a 3-trimethoxysilyl) propyl methacrylate (TMSPMA) treated glass.

At first, the geometry fidelity of the patterns was quantified and compared to the original (master) mold. Secondly, cells were also encapsulated, and their homogeneity and spatial distribution was evaluated within micropatterned hydrogels.

Results

The chemical characterization showed a correlation between the final methacrylation degree of the GelMA hydrogels and the amount of MA added during the synthesis process. The methacrylation degrees, normalized for the value of a non methacrylated control, were respectively 22%, 39% and 77%. (Table 1).

Table 1 Relative methacrylation degree of GelMA samples compared to a non methacrylated control.

MA Concentration [ml/g]	Relative methacrylation degree [%]
0.05	22
0.1	39
1	77

The mechanical tests provided quantitative information on the viscoelastic and rheological properties of the hydrogels, by measuring both the storage (G') and the loss (G'') moduli.

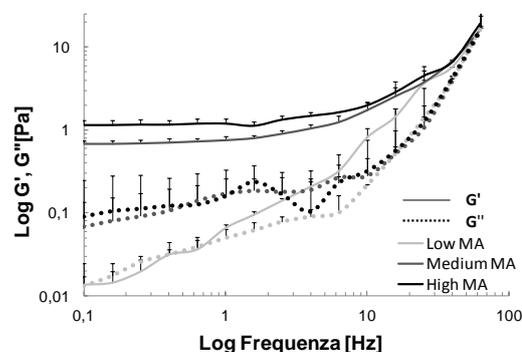


Figure 4 Storage and loss moduli as function of oscillating frequency. Samples crosslinked with a PI concentration of 0.5% w/v. The dashed square defines the plateau.

By only considering high and medium methacrylation degree, G' and G'' presented a plateau (0.1-100 Hz) around respectively 1 KPa and 0.1 KPa. The independence of the viscoelastic behavior from the applied oscillating frequency was more evident for the samples with a PI concentration of 0.5% w/v. Although the trend of G' and G'' representing the low MA degree did

not show any plateau, the values were an order of magnitude lower than the other batches.

The photopolymerization time is strictly related to both the concentration of PI and the methacrylation degree. Considering a PI concentration of 0.5% w/v, the exposure time increased from 40 sec for the high MA degree, to 100 sec for the low one. A doubling in the crosslinking time was also registered by decreasing the PI concentration from 1% w/v to 0.05% w/v. Considering the low MA degree photopolymerized with PI 0.5% w/v and 1% w/v, the exposure time presented similar values. Such effect can be explained by a possible saturation of the polymeric chain reactive groups: increments on free radicals did not lead to new linkages between the chains, due to the lack of available sites. Finally, the photopolymerization time did not change by varying the density of the embedded cells: the constant value of 40 sec (high MA degree) was registered in the entire range tested (0.1 to 100 M/ml).

Accordingly to the statistical analysis on the LIVE/DEAD assay results, the 1% w/v PI concentration caused a significant decrease on cell viability ($80.8\% \pm 2.3\%$) as compared to the 0.5% w/v and 0.05% w/v (respectively $90.7\% \pm 3.4\%$ e $94.3\% \pm 1.5\%$) (Figure 5).

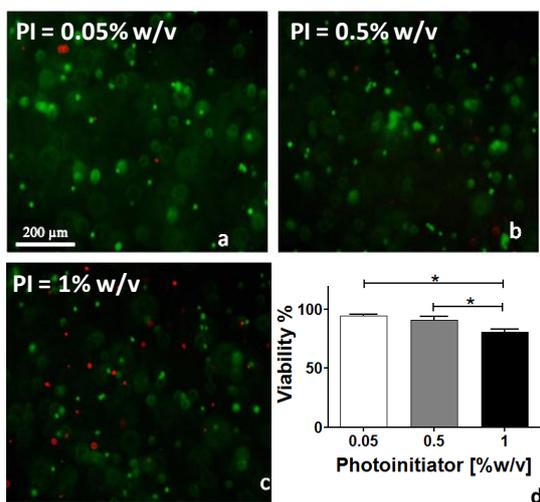


Figure 5 (a,b,c) LIVE/DEAD images of HUVEC GFP embedded in GelMA hydrogels after 24h from the photopolymerization. Viable cells are stained in green, dead cells in red. (d) Quantification of cell viability as a function of PI concentration (* $p < 0.05$)

No significant differences resulted by comparing high and medium MA degree in terms of cell viability. The batch at low MA degree was excluded from the experiments due to its low mechanical properties: these hydrogels indeed disaggregated within 12h from the photopolymerization.

Cell distribution analysis at the macroscale evidenced that the cells were homogeneously distributed in 3D within 1mm thick hydrogels, in the entire photopolymerization time tested (ranging from 40 to 90 seconds).

Concerning the culture protocol, cells seeded at a concentration of 10 M/ml elongated incrementally, forming interconnected networks in 7 days, both on vertical and horizontal planes (Figure 6). A decrease in cells number was found after 7 days in the high MA degree samples, while cells resulted metabolically active in the entire culture period.

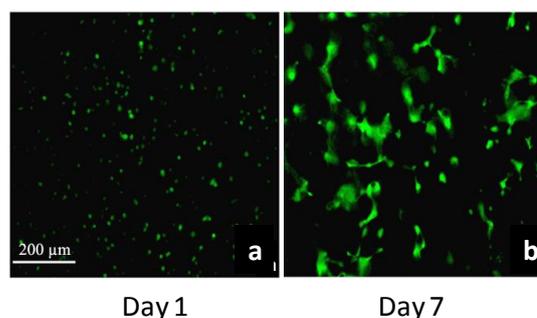


Figure 6 Images of HUVEC GFP (cell density 10M/ml) embedded in GelMA (high MA degree) after 1 (a) and 7 (b) days from the photopolymerization.

The cells embedded in hydrogels with a concentration of 1 M/ml did not show any interaction phenomena during the 7 days, regardless of the MA degree. The results of proliferation assay did not show any increase on cells number, despite the cells were metabolically active with an increase from day 1 to day 7.

Concerning the microscale, the analyses showed a high fidelity on pattern width for both the methacrylation degrees tested. Pattern heights were also assessed, resulting in lower values as compared to the mold channels, with a statistically significant difference between the two MA degrees. In addition the medium methacrylation degree formed patterns with a higher amount of defects (Figure 7).

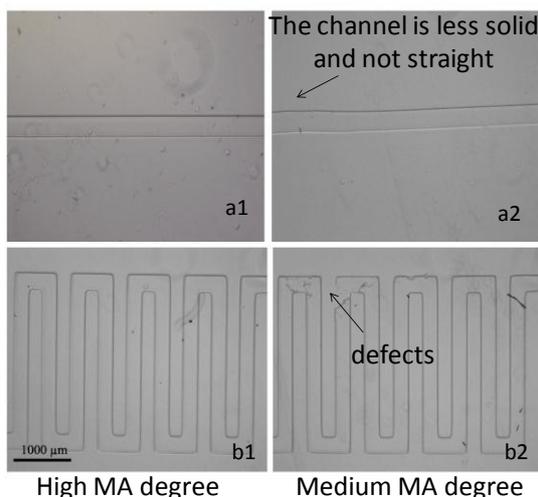


Figure 7 Images of the mold 1 (a) and 2 (b). High (1) and medium (2) MA degree.

Cell distribution quantification showed homogeneity along the channels length for both the geometries tested (Figure 8). Finally, the cells appeared homogeneously distributed within the micropatterns from both MA degrees (Figure 9).

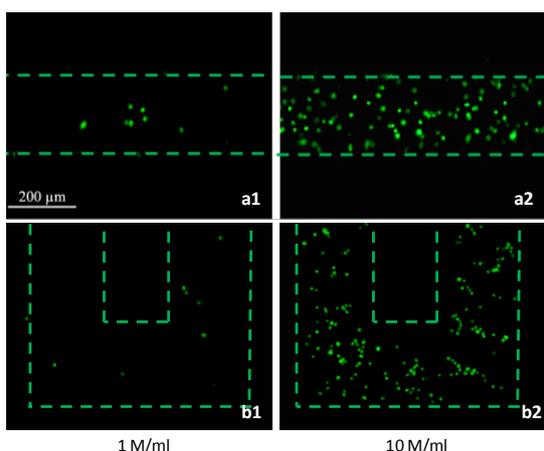


Figure 8 Images of HUVEC GFP embedded in micropatterned GelMA (High MA degree) with cells at densities of 1 M/ml (1) and 10 M/ml (2). The mold patterning was performed through the mold 1 (a) and 2 (b). The dashed line defines the mold contour.



Figure 9 Images of HUVEC GFP (10 M/ml) embedded in micropatterned GelMA (High MA degree) from mold 1. The dashed line defines the mold contour.

Discussion

The potential of photopolymerizable hydrogels to form 3D biomimetic matrices with a defined microarchitecture has been investigated [8]. Commercial collagen gelatin was modified adding methacrylate reactive, thus to be compatible with photopolymerization. The viscoelastic behavior of photo-crosslinked hydrogels was assessed suggesting a relationship of the mechanical properties of hydrogel from the PI concentration and the MA degree. The hydrogels appeared stiffer when higher degree of crosslinking was achieved. Increases in the PI concentration led to stiffer networks due to the higher numbers of bridges formed among the polymeric chains. The batch with the lowest MA degree resulted to be the less solid as compared with the others, leading to faster degradation.

Crosslinking of gelatin can be obtained with different methods including the addition of chemical and/or enzymatic crosslinking agents, which however results often cytotoxic. Gelatin methacrylation (GelMA) allows to crosslink hydrogels through a photopolymerization process compatible with cell embed.

The definition of a cytocompatible crosslinking protocol required an optimization of the critical photopolymerization parameters (such as PI concentration and exposure time). Analysis on cell viability led to the definition of a range of cytocompatibility for the PI concentration, from 0.05% w/v to 0.5% w/v. These values are compatible with the achievement of a complete crosslinking while maintaining a 3D homogenous cell distribution within the hydrogels.

The behavior of HUVEC GFP embedded in macroscaled hydrogels showed that the formation of intercellular interactions is closely related to the initial cell density. A cell density of 10 M/ml in the GelMA yielded spreading and 3D networking phenomena, while maintaining the cells viable and metabolically active over a 7 days culture period. The observed decrease on cell number can be explained as a dynamic behavior compatible with the initial phase of angiogenic processes, characterized by endothelial cell re-arrangement and selective apoptosis [9].

The photopolymerization of GelMA hydrogels is compatible with microengineering the presented mold patterning technology. The present study

demonstrates the efficacy of a mold patterning protocol to obtain cell-laden micropattern with a defined geometry. This protocol showed high resolution for both the geometries tested, especially in the case of high methacrylated hydrogels, while lower MA degrees gels were affected by early-stage degradation effects. The presented protocol allows for cell inclusion in a 3D homogeneously distribution fashion within the patterns. Moreover, the higher cell density found in the middle of the channels could be compatible with future development for the *in vitro* micro vascularization of engineered tissues.

Conclusion and future developments

The present study demonstrates the potentiality of gelatin methacrylate photopolymerizable hydrogel as biomimetic matrix for applications in both macro and micro scaled tissue engineering.

The presented mold patterning protocol shows the ability to form 3D homogeneous cellular micropatterns, with a high fidelity and user-defined size and shape.

The analysis of cell behavior within the micropattern in a long time culture will be the next step to investigate the suitability of the

proposed approach to engineered *in vitro* microscaled tissues.

References

1. Liu Tsang, V. and S.N. Bhatia, *Three-dimensional tissue fabrication*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2004. **56**(11): p. 1635-1647
2. Gauvin, R. and A. Khademhosseini, *Microscale Technologies and Modular Approaches for Tissue Engineering: Moving toward the Fabrication of Complex Functional Structures*. *ACS Nano*, 2011. **5**(6): p. 4258-4264.
3. Lee, K.Y. and D.J. Mooney, *Hydrogels for tissue engineering*. *Chemical Reviews*, 2001. **101**(7): p. 1869-1879
4. Geckil, H., *Engineering hydrogels as extracellular matrix mimics*. *Nanomedicine*, 2010. **5**: p. 469-484.
5. Tibbitt, M.W. and K.S. Anseth, *Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture*. *Biotechnology and Bioengineering*, 2009. **103**(4): p. 655-663.
6. Nguyen, K.T., West, J.L., *Photopolymerizable hydrogels for tissue engineering applications*. *Biomaterials*, 2001. **23**: p. 4307-4314.
7. Van Den Bulcke, A.L., *Structural and Rheological Properties of Methacrylamide Modified Gelatin Hydrogels*. *Biomacromolecules*, 2000. **1**: p. 31-38.
8. Nichol, J.W., et al., *Cell-laden microengineered gelatin methacrylate hydrogels*. *Biomaterials*, 2010. **31**(21): p. 5536-5544.
9. Segura, I., et al., *Inhibition of programmed cell death impairs in vitro vascular-like structure formation and reduces in vivo angiogenesis*. *The FASEB Journal*, 2002. **16**(8): p. 833-841.

1. INTRODUZIONE

1.1 Medicina rigenerativa

La perdita parziale o totale della funzionalità di uno o più organi è ad oggi una delle maggiori cause di morte e ospedalizzazione nel mondo. Il trapianto è la terapia tradizionale per la cura del fallimento funzionale di un organo e offre a pazienti critici la possibilità di un miglioramento della qualità della vita [1]. L'affermazione di tale approccio terapeutico all'inizio del XX secolo avviene grazie all'introduzione di tecniche di anastomosi microvascolare che portano nel 1954 al primo trapianto di rene nell'uomo[2]. Negli anni tale pratica chirurgica è stata applicata sia a tessuti (osso, muscolo, cute) che ad interi organi (rene, fegato, polmone) per la cura di diverse patologie con risultati sempre migliori. Nonostante la maggiore comprensione dei principi chirurgici e biologici e il miglioramento delle procedure, il trapianto di organi e tessuti soffre ancora oggi di importanti limitazioni che ne riducono l'applicabilità e il successo. Per prima cosa, nonostante negli ultimi cinquant'anni sia stato registrato un incremento costante nel numero dei donatori, questo non basta a far fronte alla richiesta di organi che è drammaticamente in crescita con un ritmo sempre più elevato[3]. Secondo una stima dell'UNOS (*United network for organ sharing*), il tasso di mortalità tra i pazienti americani in lista di attesa per un trapianto è di 15 al giorno (dato relativo al 2009)[4]. A questo si somma la necessità di sottoporre il paziente ad una terapia di immunosoppressione cronica, per evitare il rigetto derivante dall'origine allogenica dell'organo trapiantato. Conseguenze dirette sono l'insorgere di deficit immunitari, il rischio di tromboembolia e di emorragie conseguenti ai trattamenti anticoagulanti e la possibile necessità di sottoporre il paziente ad un secondo trapianto, in seguito a complicazioni ad altri organi legati alle terapie post- intervento o all'insorgere di un rigetto tardivo.

Queste problematiche hanno aperto le porte alla ricerca e allo sviluppo di soluzioni innovative. La sostituzione della funzione lesa attraverso l'utilizzo di dispositivi bioartificiali e biomeccanici rappresenta una valida alternativa al trapianto. Grazie alle nuove tecnologie sviluppate nell'ambito della meccanica e dell'elettronica associate alla medicina, sono stati messi a punto dispositivi artificiali sempre più sofisticati finalizzati a sostenere o sostituire funzioni mancanti. Questi approcci hanno portato in determinati

ambiti al ripristino di funzioni anche complesse: un esempio sono i neuro stimolatori per il sostegno o il ripristino di funzioni nervose lese o mancanti[5]. L'applicabilità in altri ambiti risente invece della natura statica di queste soluzioni ingegneristiche. I dispositivi bioartificiali non si adattano attivamente alle variazioni del corpo nel quale sono impiantati e questo porta a problematiche di fallimento a lungo termine. Inoltre, il grado di complessità di alcune funzioni biochimiche (esprese ad esempio a livello di fegato e reni) è difficilmente riproducibile con sistemi artificiali.

In questo contesto si inserisce l'interesse crescente per la medicina rigenerativa. La medicina rigenerativa, termine coniato nel 1999 da William Haseltine[6], ha come scopo la sostituzione o la rigenerazione di cellule, tessuti o organi umani per ripristinare o stabilire una normale funzione[7]. Essa comprende una serie di approcci che includono la terapia genica, la terapia cellulare e l'ingegneria dei tessuti[8].

Per terapia genica si intende l'inserzione, l'alterazione o la rimozione di geni all'interno di singole cellule per prevenire o correggere una situazione patologica. Questo approccio è particolarmente utilizzato per la cura di patologie genetiche ereditarie come le immunodeficienze combinate gravi (*Severe combined immunodeficiency*, SCID), come alternativa al trapianto di midollo in assenza di donatori idonei[9].

Le terapie cellulari, invece, consistono nell'introduzione di cellule all'interno di un tessuto allo scopo di risolvere patologie[10]. La combinazione di terapia genica e cellulare rappresenta un'ulteriore esempio di medicina rigenerativa. L'impianto *in vivo* di cellule geneticamente modificate e indotte a produrre molecole specifiche fornisce una strategia di cura per determinate patologie. Un esempio è l'utilizzo di cellule geneticamente indotte alla produzione di insulina come terapia per patologie diabetiche gravi[11]. Un'altra applicazione è l'uso di cellule modificate geneticamente per il rilascio locale di proteine con attività soppressiva delle cellule tumorali o dei processi angiogenetici, nei trattamenti di immunosoppressione di tumori[12].

L'ingegneria dei tessuti prevede infine l'utilizzo congiunto di cellule, biomateriali e fattori di crescita per la rigenerazione *in vitro* o *in vivo* di tessuti e organi funzionali[1]. Alla base di tutte queste tecniche di medicina rigenerativa sta l'utilizzo di cellule autologhe, che essendo immunocompatibili con il paziente eliminano le problematiche del rigetto immunitario. In particolare la scelta si concentra sulle cellule staminali grazie alle loro potenzialità differenziative, plastiche e proliferative. A differenza delle cellule

terminalmente differenziate, le staminali sono in grado se condizionate correttamente di differenziarsi in uno (staminali uni potenti) o più (staminali multi potenti) tipi cellulari. Inoltre, le cellule staminali sono caratterizzate dalla capacità di proliferare e moltiplicarsi indefinitamente[13].

Nell'ingegneria dei tessuti in particolare, le cellule vengono prelevate dal soggetto, espanse e fatte differenziare *ex vivo* grazie all'utilizzo di biomateriali e fattori di crescita, con lo scopo di realizzare un tessuto ingegnerizzato da reimpiantare nel paziente per il ripristino della funzione lesa (Figura 1.1). In questo contesto, i biomateriali utilizzati come matrice tridimensionale per le cellule vengono definiti scaffold. Lo scaffold rappresenta l'ambiente extracellulare che durante la rigenerazione del tessuto (*in vitro* o *in vivo*) deve fornire alle cellule il sostegno per la crescita, la proliferazione e il differenziamento, sostituendo temporaneamente le funzionalità meccaniche della matrice extracellulare (ECM) naturale e degradandosi gradualmente per lasciare spazio alla matrice neo sintetizzata dalla componente cellulare. Questa dinamicità differenzia l'approccio dell'ingegneria dei tessuti da quello dei trapianti o dei biodispositivi artificiali: i tessuti ingegnerizzati non sono progettati con il solo scopo di essere tollerati dall'organismo, ma con l'obiettivo primario di interagire attivamente e in maniera specifica con il corpo stesso.

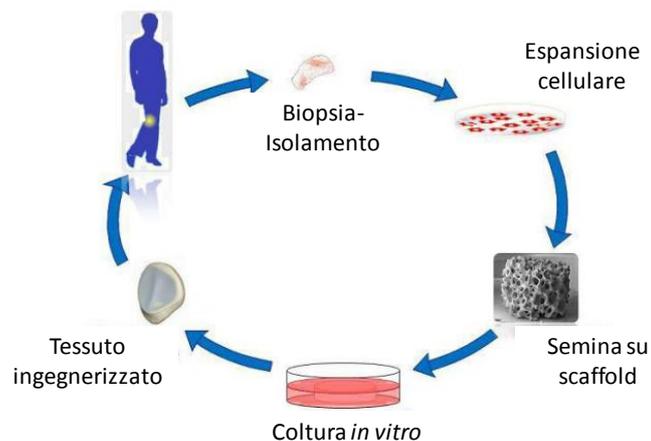


Figura 1.1 Approccio dell'ingegneria dei tessuti: processo di sviluppo di un tessuto ingegnerizzato

L'approccio classico dell'ingegneria dei tessuti, che consiste come descritto nella semina di cellule su di uno scaffold tridimensionale per indurne crescita, proliferazione, migrazione e differenziamento, ha portato negli ultimi anni ad alcuni esempi di applicabilità clinica. Alcune di queste tecniche sono entrate con successo nella pratica

clinica per il trattamento di patologie: un esempio è l'ingegnerizzazione di pelle artificiale per la cura di ustioni gravi o ulcere diabetiche[14]. In Figura 1.2 è rappresentato il prodotto commerciale Laserskin, un sottilissimo strato di acido ialuronico esterificato microforato su cui vengono fatti aderire i cheratinociti per l'ottenimento di sostituti cutanei ingegnerizzati. Altre tecniche hanno mostrato le loro potenzialità come terapie alternative per patologie irreversibili, pur essendo ancora oggetto di studi e ricerche. Un esempio è il primo trapianto di trachea ingegnerizzata: in Figura 1.3 è riportato il bioreattore utilizzato per questa applicazione[15].

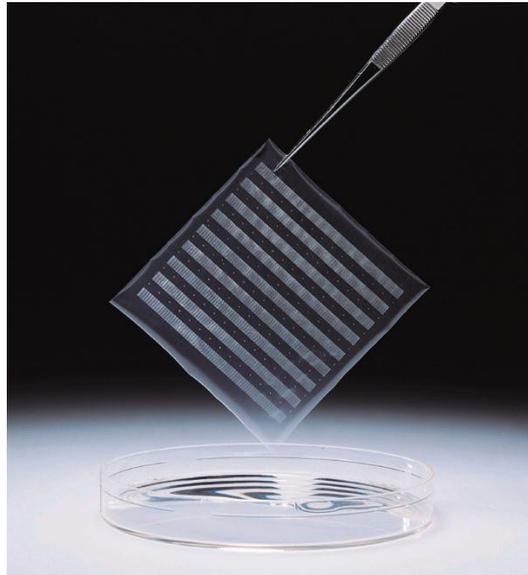


Figura 1.2 Laserskin ® , Fidia Advanced Biopolymers (Abano Terme, Italia)

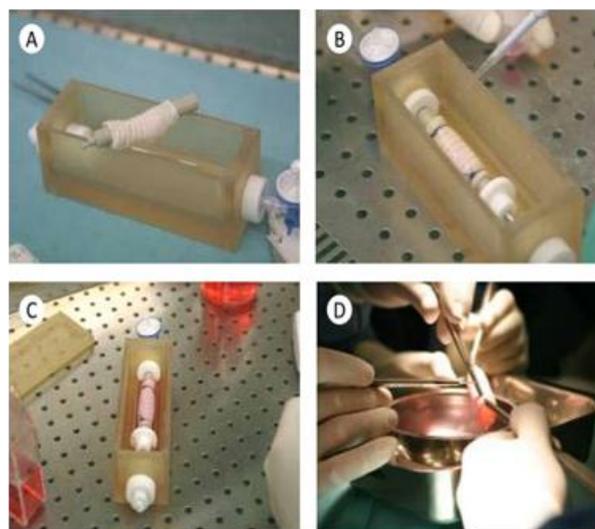


Figura 1.3 Bioreattore utilizzato nel primo trapianto di trachea ingegnerizzata[15]

1.2 Matrici biomimetiche: microscala, microarchitettura e tridimensionalità

La progettazione di una matrice biomimetica adeguata alla riproduzione *in vitro* dell'ECM naturale si basa sull'analisi dell'anatomia dei tessuti biologici. *In vivo* i tessuti sono composti da unità ripetitive tridimensionali aventi dimensioni dell'ordine delle centinaia-migliaia di micrometri (ad esempio i nefroni nel rene e i lobuli del fegato). All'interno di queste unità complesse e funzionali, le cellule sono inserite in una rete specifica di interazioni cellula- cellula e cellula- ECM, la cui architettura è ripetuta nello spazio. La struttura di queste unità sta alla base della coordinazione di processi multicellulari, delle proprietà meccaniche e dell'interazione tra organi diversi[16].

Un'organizzazione alla microscala è caratteristica anche dell'ambiente locale extracellulare, che coordina gli stimoli biochimici, cellulari e fisici che determinano il destino cellulare in termini di proliferazione, differenziamento, migrazione e apoptosi.

La chiave per l'ottenimento di un tessuto macroscopico e funzionale, con adeguate proprietà meccaniche e biologiche, è quindi la riproduzione di un'adeguata architettura alla microscala, che offra alle cellule un ambiente microstrutturato adeguato ad una corretta espressione fenotipica.

Strettamente correlato alla necessità di mimare l'organizzazione microscopica dell'ambiente ECM, si inserisce il concetto di riproduzione della topografia cellulare: in moltissimi tessuti biologici, da quello vascolare a quello muscolare a quello nervoso, la funzione è fortemente dipendente dall'organizzazione delle cellule nello spazio[17]. Per queste applicazioni è cruciale lo sviluppo di tecniche che permettano una precisa imitazione dei pattern di distribuzione spaziale dei vari tipi cellulari *in vitro*. La co-coltura di diversi tipi cellulari in pattern spazialmente conformi ai modelli *in vivo*, permette una riproduzione più fedele dell'organizzazione e della complessità del microambiente cellulare, nel quale il destino e la funzione di un tipo cellulare risulta influenzata anche dall'interazione spaziale con gli altri[18].

Il cambio di prospettiva dalla macro alla micro scala nella progettazione di matrici biomimetiche è poi affiancato dalla consapevolezza, derivante da una conoscenza sempre più sofisticata degli ambienti cellulari, dell'importanza del concetto di tridimensionalità[19]. È stato infatti dimostrato come la coltura di cellule in due dimensioni *in vitro* non replichi la dinamica delle cellule *in vivo*, modificando l'espressione di geni e proteine tessuto-specifiche. Questo è dovuto al fatto che le cellule *in*

in vivo sono circondate da una complessa rete tridimensionale rappresentata da un ambiente extracellulare micro e nano strutturato, non riproducibile attraverso sistemi di coltura bidimensionali[20]. Infatti, le colture bidimensionali polarizzano le cellule in maniera tale che solo un segmento della membrana cellulare sia in contatto con l'ECM e con le cellule vicine, mentre la restante superficie è semplicemente esposta al terreno di coltura. Questo induce meccanismi di mecano trasduzione non naturali, che influiscono sui processi intracellulari e sul destino fenotipico della cellula stessa. Oltre a ciò, si creano interazioni non naturali con i fattori solubili: nelle colture 2D, le cellule si interfacciano attraverso la membrana con una concentrazione omogenea di nutrienti, fattori di crescita e citochine presenti nel mezzo di coltura. Al contrario, la concentrazione dei fattori solubili che influenzano la migrazione, la comunicazione cellula-cellula, e il differenziamento sono caratterizzati *in vivo* dalla presenza di un gradiente spaziale dinamico[20]. Quindi, per una corretta riproduzione *in vitro* della fisiologia cellulare, dei processi di mecano trasduzione e della morfogenesi di tessuti, le cellule dovrebbero essere coltivate in microambienti 3D che mimino i fattori critici meccanici e biochimici presenti nell'ECM naturale, facilitando così i processi gerarchici di migrazione e organizzazione dei tessuti.

L'importanza di ottenere tessuti ingegnerizzati che replichino la complessità e l'architettura del microambiente extracellulare in strutture tridimensionali risulta evidente nei tentativi di ingegnerizzazione di tessuti complessi e vascolarizzati [21]. Nei tessuti biologici, i vasi sanguigni svolgono funzioni fondamentali quali il trasporto di ossigeno e nutrienti, la rimozione di rifiuti metabolici, il mantenimento della corretta temperatura corporea e la difesa immunitaria. Nei tessuti metabolicamente attivi, per una corretta diffusione di gas, metaboliti e cataboliti all'interno delle cellule, la minima distanza della cellula dal lume del capillare più vicino non può essere maggiore di 40-200 μm . Mantenendo questa vicinanza al flusso sanguigno e alla sua pressione parziale di ossigeno di circa 100 mmHg, il gradiente di concentrazione di ossigeno alle cellule risulta quello necessario alla sopravvivenza. Distanze di diffusione maggiori di 200 μm sono generalmente poco tollerate, con l'insorgere di fenomeni di necrosi già a distanze diffusive superiori a 100 μm [22]. Questo limite diffusivo deve essere considerato nel tentativo di ingegnerizzare tessuti *in vitro*. Tessuti ingegnerizzati con dimensioni maggiori di 100-200 μm e metabolicamente attivi, non possono essere supportati dalla semplice diffusione di gas e nutrienti dal terreno di coltura, ma necessitano di un sistema di vascolarizzazione. Il

controllo sulla formazione di reti vascolarizzate *in vitro* faciliterebbe quindi una rapida e funzionale integrazione dei tessuti ingegnerizzati in seguito all'impianto *in vivo*[23]. Recenti passi avanti nella conoscenza teorica del processo di neovascolarizzazione hanno permesso lo sviluppo di vari approcci per l'ottenimento di un tessuto ingegnerizzato e vascolarizzato[24]. Ad oggi esistono tre metodi in corso di studio: (1) l'inserimento di fattori angiogenetici solubili all'interno dei costrutti cellulari, (2) la modificazione genica di cellule indotte a sovra esprimere geni per la produzione di fattori angiogenetici[25] e (3) l'inclusione di cellule endoteliali all'interno di scaffold e matrici[26]. Per quanto riguarda l'ultimo approccio, la scelta della corretta matrice extracellulare deve rispettare la microgeometria caratteristica delle reti di capillari *in vivo*. Durante il processo di tubulogenesi, infatti, la composizione specifica dell'ECM e le sue interazioni con le cellule endoteliali regolano spazio-temporalmente i processi angiogenetici[27]. Numerosi studi si sono concentrati su questo problema, proponendo tecniche di neovascolarizzazione *in vitro* basate sull'inclusione di cellule e fattori di crescita in matrici biomimetiche. Raghavan et al. [28] hanno indagato la possibilità di ottenere una rete di capillari *in vitro* attraverso la combinazione di stimoli chimici adeguati (VEGF e bFGF), un'appropriata matrice 3D di collagene e un'adeguata densità di cellule endoteliali incluse nel gel, ottenendo esempi di *sprouting* e *tubulogenesis*. La necessità di sviluppare tessuti ingegnerizzati contenenti strutture microvascolarizzate è stata indagata da Du et al. [29] con lo sviluppo di un approccio per l'aggregazione di idrogeli alla microscala contenenti cellule endoteliali e muscolari in strutture 3D che includono microcanali vascolari. Questa tecnica permette un controllo sull'organizzazione spaziale delle singole unità vascolarizzate fino alla creazione di una architettura 3D complessa. La formazione di organi ingegnerizzati, ottenuti attraverso l'inclusione (i) di cellule endoteliali per l'ottenimento di attività vascolare e (ii) di cellule specializzate richieste per lo svolgimento della funzione specifica, può quindi essere raggiunta con processi bottom up di aggregazione sequenziale di singole unità funzionali alla microscala. Questo permette la fabbricazione di costrutti 3D contenenti multipli tipi cellulari e caratterizzati da un'architettura definita e finalizzata all'ottenimento della specifica funzione[21].

1.3 Idrogeli

All'interno della ricerca di materiali adeguati allo sviluppo di matrici biomimetiche che rispettino e riproducano *in vitro* la complessa micro geometria e tridimensionalità dell'ambiente extracellulare *in vivo*, gli idrogeli stanno assumendo un ruolo sempre crescente[23].

La prima applicazione degli idrogeli in ambito medico si colloca nel 1960 con l'introduzione di matrici idrofiliche di poli (idrossietilmetacrilato) (pHEMA) fotopolimerizzato come materiale per lenti a contatto (ad esempio morbide)[30]. Da allora, l'interesse per questi materiali è cresciuto in maniera esponenziale, come dimostra il numero crescente di pubblicazioni correlate agli idrogeli in campo biomedico dal 1985 a oggi (Figura 1.4).

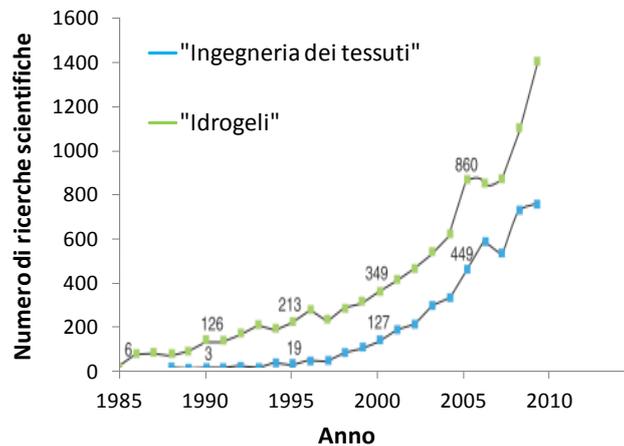


Figura 1.4 Numero di pubblicazioni riguardanti “Ingegneria dei tessuti” e “Idrogeli” negli ultimi 25 anni [23]

1.3.1 Definizione e proprietà

Gli idrogeli sono reti tridimensionali idrofiliche costituite da polimeri solubili in acqua, fotopolimerizzati in maniera da generare un composto insolubile[31]. I polimeri in forma di idrogeli hanno la capacità di assorbire grandi quantità di acqua o fluidi biologici grazie alla presenza al loro interno di micropori interconnessi. Negli idrogeli, il contenuto di acqua della matrice polimerica è almeno del 20% del peso fino a raggiungere il 99%. Gli idrogeli contenenti più del 95% in peso di acqua sono definiti superassorbenti e hanno elevata biocompatibilità grazie alla loro capacità di trattenere fluidi e allo somiglianza fisico- chimica con l’ECM nativa dei tessuti definiti molli da un punto di vista di composizione e di comportamento meccanico [32].

Dal punto di vista del comportamento meccanico, gli idrogeli dimostrano un comportamento intermedio tra solidi e liquidi viscosi. La soluzione acquosa del prepolimero di partenza, nella quale i legami tra le catene non si sono ancora formati, mostra solitamente il comportamento di fluidi newtoniani. In seguito alla gelazione, le reti tridimensionali ottenute assumono comportamenti viscoelastici fino a sviluppare in alcuni materiali caratteristiche di materiali puramente elastici[33].

Le proprietà meccaniche degli idrogeli dipendono direttamente dalla rigidità originale delle catene polimeriche, dalla densità di polimerizzazione, dalla tecnica di gelazione e dal grado di rigonfiamento, risultato del bilancio tra idrofilicità e idrofobicità[34]. Un vantaggio nell'utilizzo di idrogeli consiste nella possibilità di regolarne le caratteristiche meccaniche. Le proprietà meccaniche (rigidità e modulo elastico), così come le proprietà fisico-chimiche (carica elettrica e porosità) possono essere infatti regolate variando il tipo di polimero utilizzato, la concentrazione e la tecnica di gelazione o componendo materiali diversi per ottenere idrogeli compositi[23]. Hutson et al. [35] dimostrano per esempio come le proprietà meccaniche di un idrogelo composito di polietilenglicole (PEG) e gelatina metacrilica (GelMA) possono essere aggiustate variando la concentrazione dei due materiali di partenza. Un aumento nella concentrazione iniziale di GelMA porta ad un incremento nel modulo a compressione dell'idrogelo finale, aumenta la capacità del materiale di assorbire fluidi e velocizza il processo di degradazione enzimatica.

La biodegradabilità di un idrogelo è un'altra caratteristica cruciale per l'impiego di idrogeli come scaffold per la l'ingegneria dei tessuti o come veicoli per il trasporto di cellule o farmaci. Il tempo di degradazione, che dipende tra le altre cose dall'origine naturale o sintetica del materiale, è un parametro che deve poter essere controllato e programmato[33]. Nella rigenerazione di un tessuto il ritmo di degradazione dell'idrogelo deve essere coordinato temporalmente con la sintesi di nuova matrice[36] o con il rilascio graduale del farmaco o della componente cellulare nel sito desiderato. I processi di degradazione degli idrogeli possono essere idrolitici o enzimatici e sono strettamente correlati alla struttura chimica e alle proprietà meccaniche del materiale[34].

Altra caratteristica degli idrogeli, fondamentale per l'applicabilità nell'ambito biomedico, è la biocompatibilità. La biocompatibilità associata ad un materiale per la medicina rigenerativa, che si tratti di scaffold per l'ingegnerizzazione di tessuti o di un veicolo per il trasferimento di cellule, si definisce come l'abilità del materiale di comportarsi come

substrato in grado di supportare l'appropriata attività cellulare, senza provocare alcun effetto locale o sistemico indesiderato nell'ospite[37]. La definizione di biocompatibilità associata ad un idrogelo dipende sia dalle caratteristiche del polimero (in particolare dall'origine naturale o sintetica) che dalla tecnica utilizzata per la gelazione, che spesso introduce fattori di citotossicità[38].

1.3.2 Classificazione degli idrogeli

Gli idrogeli possono essere classificati in diversi gruppi in base a:

1. Origine: naturale o sintetica
2. Metodo di gelazione: polimerizzazione fisica o chimica
3. Capacità di risposta a stimoli esterni: idrogeli responsivi

La prima classificazione degli idrogeli distingue l'origine naturale o sintetica del materiale di partenza.

Gli idrogeli naturali possono essere derivati da polimeri proteici o di natura polisaccaridica. Tra gli idrogeli formati da proteine e componenti della ECM il collagene è particolarmente interessante in quanto rappresenta la proteina strutturale più abbondante dell'organismo. Il collagene viene degradato per via enzimatica attraverso la collagenase, che ne provoca una degradazione locale controllata dalle cellule presenti nel tessuto ingegnerizzato[31]. Altri esempi di polimeri proteici utilizzati per la sintesi di idrogeli sono la gelatina (derivato del collagene), il Matrigel, la fibrina, la laminina e la fibroina della seta. Tra gli idrogeli di origine polisaccaridica si distinguono invece chitosano, alginato e acido ialuronico[31].

Questi idrogeli sono generalmente caratterizzati da elevata biocompatibilità, biodegradabilità e bioattività in termini di interazione cellulare[31]. Inoltre, presentano un'elevata affinità per le proteine presenti nel siero quali ad esempio la fibronectina e l'integrina. Questa proprietà aumenta la capacità del materiale di favorire l'adesione cellulare, in quanto l'attaccamento cellulare avviene preferenzialmente su superfici caratterizzate da uno strato proteico adsorbito[39]. Tuttavia, presentano proprietà meccaniche spesso insufficienti e difficili da controllare, oltre a subire processi di degradazione spesso rapidi[20]. Inoltre, i processi di ottenimento dei polimeri naturali, solitamente più complessi e costosi, portano a una variabilità tra i diversi lotti che rende

difficile una caratterizzazione definitiva. Infine, l'origine biologica può portare in determinate condizioni a problematiche di trasmissione di patologie e contaminazioni[20]. Per quanto riguarda i polimeri biodegradabili sintetici, tra i più utilizzati ci sono i poli- α -idrossiacidi (acido polilattico, PLA e acido poliglicolico, PGA), il policaprolattone (PCL) e il PEG. Questi idrogeli presentano proprietà meccaniche relativamente elevate e facilmente controllabili, processi di produzione più flessibili e riproducibili, oltre a risolvere le problematiche legate all'immunocompatibilità per impianti *in vivo* [20]. È stato dimostrato come gli idrogeli sintetici permettano l'incapsulamento di cellule che rimangono vitali e metabolicamente attive [40, 41]. Tuttavia gli idrogeli sintetici, mancando di strutture bioattive, non permettono attività di promozione e integrazione con i processi biologici[20]. Per questo, necessitano spesso di una funzionalizzazione per interagire attivamente con la componente cellulare. La funzionalizzazione, che consiste nell'introduzione di sequenze peptidiche o proteiche nella struttura di un materiale, può avvenire tramite metodi fisici o chimici[20]. La tecnica più semplice consiste nell'introduzione di siti di legame bioattivi negli idrogeli sintetici attraverso l'incapsulamento nella matrice di proteine dell'ECM quali collagene, laminina o fibronectina o fattori di crescita. L'immobilizzazione di VEGF in idrogeli di destrano, porta per esempio ad un aumento del potere angiogenico di questa matrice biomimetica[42]. Tuttavia, l'introduzione di proteine può portare a denaturazione dell'idrogelo e la loro distribuzione risulta spesso eterogenea all'interno della matrice. In alternativa, esistono metodi chimici derivanti dagli sviluppi della proteomica, che ha permesso di identificare sequenze peptidiche attive da proteine di interesse e di inserirle nelle molecole altrimenti inerti di idrogelo[20]. La modifica delle catene polimeriche del materiale avviene quindi attraverso la formazione di legami covalenti con proteine e peptidi bioattivi (come la sequenza RGD[43] o il peptide MMP- sensibile[44]). In un recente studio, la funzionalizzazione delle molecole di PEG con una sequenza sintetica (QK) che imita una regione del fattore di crescita vascolare dell'endotelio (VEGF), ha portato all'ottenimento di un idrogelo con proprietà di angiogenesi comparabili a quelle mostrate dallo stesso idrogelo funzionalizzato con il VEGF [45].

Gli idrogeli possono poi essere classificati in base al meccanismo di polimerizzazione, che può avvenire per formazione di interazioni non covalenti (idrogeli fisici) o di legami covalenti (idrogeli chimici) tra le catene polimeriche[46]. La polimerizzazione per via

fisica include formazione di interazioni idrofobiche, ioniche e di legami a idrogeno (Figura 1.5). Nel primo caso i blocchi idrofobici delle catene interagiscono con quelli idrofilici creando un polimero anfifilico. Quando la temperatura aumenta, i blocchi idrofobici si aggregano portando alla gelazione. La concentrazione e la struttura chimica del polimero e la lunghezza dei blocchi idrofobici determinano la temperatura alla quale avviene questa transizione di fase. La formazione di idrogeli può avvenire anche attraverso l'instaurarsi di interazioni ioniche tra un biopolimero e una molecola carica, o tra due biopolimeri aventi carica opposta. La presenza di legami a idrogeno definisce infine un ponte fisico tra due catene polimeriche: questo legame è il più debole e può essere distrutto con l'applicazione di sforzi di taglio[46].

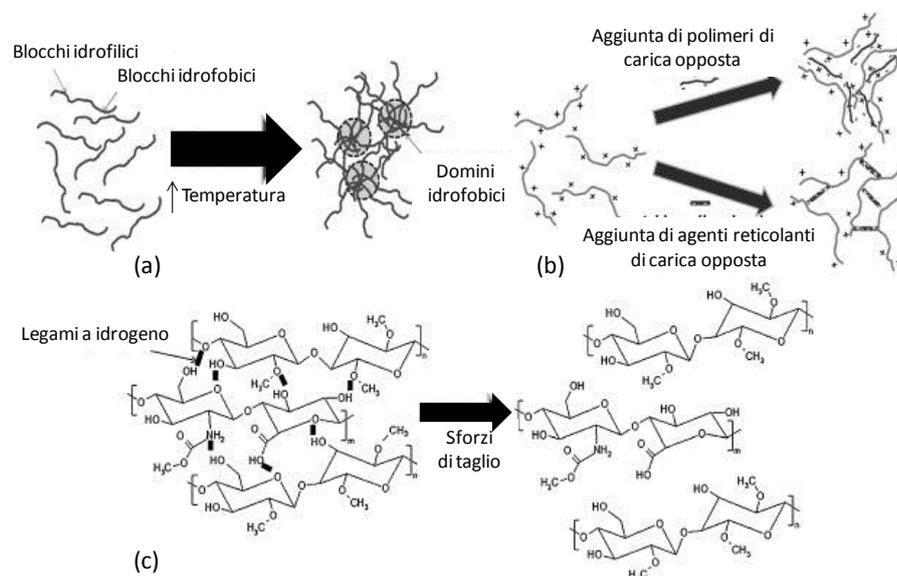


Figura 1.5 Formazione di idrogeli attraverso polimerizzazione per via fisica. (a) polimerizzazione guidata dall'instaurarsi di interazioni idrofobiche, (b) ioniche e (c) di legami a idrogeno, che possono essere distrutti dall'applicazione di sforzi di taglio. [46]

Anche se questi metodi di polimerizzazione non determinano l'instaurarsi di legami permanenti, sono sufficienti a prevenire la dissoluzione dell'idrogelo in acqua.

Metodi di polimerizzazione per via chimica includono polimerizzazione radicalica, reazioni chimiche tra gruppi complementari, irradiazione ad alto livello energetico e polimerizzazione enzimatica[33]. Le interazioni covalenti sono molto più forti di quelle non covalenti e garantiscono una stabilità meccanica maggiore agli idrogeli così ottenuti. D'altra parte, per un crosslinking chimico sono necessari agenti reticolanti che possono indurre problemi di biocompatibilità reagendo con la componente cellulare[46].

Una prima tecnica consiste nella polimerizzazione radicalica: i gruppi laterali inattivi di monomeri a basso peso molecolare (blocchi costituenti) vengono attivati in radicali liberi e assemblati attraverso un processo di iniziazione della reazione (ad esempio mediante radiazione UV) in presenza di un agente reticolante (ad esempio un fotoiniziatore) (Figura 1.6)[33]. All'interno di questo gruppo si collocano gli idrogeli fotopolimerizzabili, che verranno trattati in dettagli nel paragrafo 1.4 .

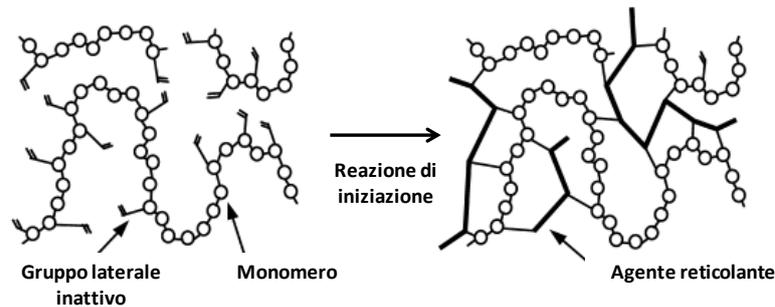


Figura 1.6 Rappresentazione schematica della formazione di un idrogel per via chimica tramite una reazione di polimerizzazione radicalica. [33]

Gli idrogeli possono essere ottenuti per via chimica anche sfruttando la presenza nelle catene polimeriche di gruppi funzionali complementari. In questo caso la polimerizzazione avviene in seguito alla reazione tra gruppi con reattività complementare. Questo secondo metodo di polimerizzazione chimica riassume l'utilizzo di reazioni di addizione e di condensazione (ad esempio la condensazione di amine e acidi carbossilici dà origine a poliammidi)[33].

Altra tecnica consiste nell'impiego di radiazioni ad alta energia, in particolare fasci elettronici e γ . Durante l'irradiazione di un polimero in soluzione acquosa, si formano radicali sulla catena principale grazie a scissioni omolitiche di legami chimici presenti (ad esempio del legame C-H). Oltre a ciò, il processo di radiolisi delle molecole di acqua induce la formazione di radicali idrossilici che a loro volta attaccano le catene polimeriche partecipando alla generazione di macroradicali. La combinazione dei macroradicali attraverso legami covalenti si conclude con la formazione della struttura polimerizzata. Un vantaggio di questo metodo è la possibilità di eseguire il processo di polimerizzazione in acqua, a temperatura e in condizioni di pH fisiologiche, senza l'utilizzo di agenti reticolanti potenzialmente tossici. D'altra parte, la tossicità del processo di irradiazione stesso deve essere verificata prima dell'inclusione nell'idrogel di cellule o altre sostanze biologiche[33].

Infine, esistono esempi di polimerizzazione di idrogeli per via enzimatica. Un esempio di questo approccio si trova nello studio di Sperinde et al. [47]: la formazione di un idrogelo a base di PEG è ottenuto attraverso una reazione enzimatica guidata dalla transglutaminasi tra macromolecole di PEG funzionalizzate con gruppi terminali di lisina o gruppi glutamminici.

Ultima classificazione si occupa degli idrogeli ottenuti a partire da polimeri definiti “*smart*” o responsivi, che rappresentano una sottoclasse degli idrogeli formati per via fisica[48]. Questi polimeri sono costituiti da una struttura che presenta ampi cambiamenti reversibili nel comportamento fisico- chimico in risposta a piccole e rapide variazioni dell’ambiente circostante. Un esempio è il passaggio degli idrogeli dallo stato collassato (dove predominano le interazioni tra le catene polimeriche) a quello rigonfiato (dove predominano le interazioni tra le catene e il solvente) in risposta a cambiamenti di temperatura, pH, campi elettrici, concentrazioni di analiti e luce (Figura 1.7).

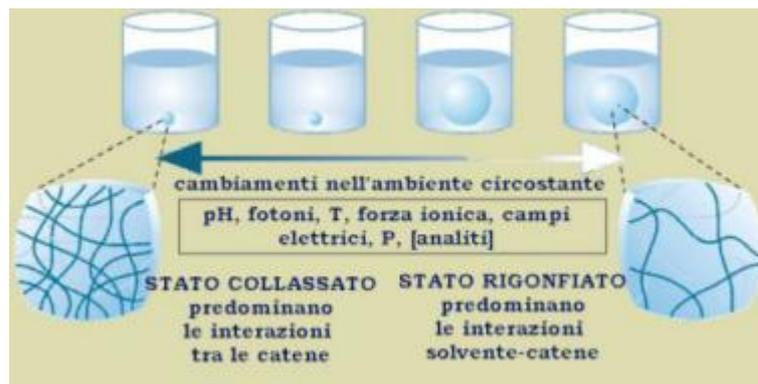


Figura 1.7 Raffigurazione del comportamento di idrogeli *smart* in risposta a stimoli esterni

1.3.3 Applicazioni degli idrogeli nel biomedicale

Applicazioni all’avanguardia degli idrogeli spaziano dai sistemi per il rilascio di farmaci, ai biosensori, agli strumenti per la diagnostica[46]. A queste si affianca l’utilizzo sempre crescente degli idrogeli come materiali biomimetici, grazie alla loro capacità di fornire una matrice 3D per l’incapsulamento di cellule all’interno di un ambiente simile a quello extracellulare nativo.

Negli ultimi anni si è osservato un grande sviluppo nell’utilizzo di idrogeli per la creazione di sistemi a rilascio controllato di biomolecole. Gli idrogeli si dimostrano adeguati candidati come veicoli per il trasporto di biomolecole, grazie alle loro proprietà di

biocompatibilità, compatibilità immunologica, biodegradabilità e microporosità. La struttura altamente porosa degli idrogeli permette l'introduzione di dosi di farmaco abbondanti il cui rilascio viene modulato nel tempo grazie alla possibilità di controllare la degradazione dell'idrogelo. Un sistema ideale per il rilascio di farmaci dovrebbe poi rispondere alle richieste fisiologiche, essere sensibile alle variazioni locali e in base a queste modificare la dinamica di rilascio. Per sincronizzare il profilo di rilascio con le condizioni fisiologiche, è necessario progettare veicoli che rispondano alle variazioni dell'ambiente circostante. Nell'ambito di questa necessità si inserisce l'utilizzo di idrogeli sensibili agli stimoli esterni come veicoli *smart* per il rilascio controllato di molecole biologiche. Un esempio si trova nello studio di Yu et al. [49]: un sistema composito costituito da micro particelle di chitosano, alginato e pectina pH sensibili è stato sviluppato per il rilascio controllato di farmaci proteici, dimostrando la capacità delle microsfele di idrogelo di rilasciare il carico in risposta a minime variazioni di pH ambientale.

In parallelo al rilascio di farmaci, sta crescendo l'interesse per gli idrogeli nell'ambito delle terapie cellulari. L'efficacia di questi trattamenti è legata alla capacità dell'idrogelo di veicolare il trasferimento delle cellule nel sito desiderato evitandone la dispersione. Un ampio numero di trial hanno dimostrato le potenzialità degli idrogeli come veicoli per il trasporto di cellule utilizzate per la rigenerazione *in situ* di tessuti. Questo grazie alla struttura microporosa degli idrogeli, che permette la diffusione di acqua e metaboliti e lo scambio di nutrienti e rifiuti, ma allo stesso tempo confina le cellule impedendone la dispersione[12].

Un'altra applicazione fondamentale è l'utilizzo di terapie cellulari per l'immunosoppressione di tumori. Cellule modificate geneticamente sono impiantate in seguito all'inclusione in idrogeli nel sito patologico, dove producono e rilasciano localmente proteine con attività soppressiva delle cellule tumorali o dei processi angiogenici ad esse associati[12]. Lohr et al. [50] hanno sviluppato microsfele a base di cellulosa per confinare cellule umane geneticamente modificate per produrre l'enzima CYP2B1 che offre un supporto alla chemioterapia *in situ* trasformando un farmaco inattivo in un agente anti tumorale.

Gli idrogeli hanno poi permesso lo sviluppo di tecnologie innovative nel campo della diagnostica e dello sviluppo di modelli *in vitro*. A causa del vasto numero di parametri dai quali è influenzato simultaneamente, il comportamento di una cellula all'interno del suo

ambiente naturale è difficile da comprendere. Gli idrogeli possono essere utilizzati come piattaforme per l'analisi *in vitro* del comportamento cellulare in diverse condizioni, quali ad esempio patologie o fallimenti funzionali di organi e tessuti, causati da agenti biotici o antibiotici come tossine chimiche, agenti patogeni e virali. Questo grazie alla loro capacità di intrappolare cellule all'interno di un ambiente simile a quello fisiologico, che permette una più corretta simulazione delle interazione e comunicazione cellule- cellula e cellula- ambiente extracellulare[23]. Jongpaiboonkit et al. [51], hanno recentemente presentato un approccio per la coltura 3D e l'analisi di cellule incluse in array di idrogeli, dimostrando come sia possibile sviluppare un modello sistematico per la caratterizzazione del comportamento cellulare, variando e analizzando indipendentemente diversi parametri di coltura (ad esempio tipo cellulare, densità cellulare, densità dei ligandi di adesione cellulare) all'interno dell'array.

Altre applicazioni degli idrogeli si inseriscono nell'ambito dei biosensori. I biosensori sono strumenti composti da un elemento sensibile e un trasduttore. Il primo interagisce con l'analita di interesse producendo tipicamente un segnale biochimico inviato al trasduttore, che lo trasforma in un segnale elettrico in uscita. Gli idrogeli stimolo- sensibili (descritti nel paragrafo precedente) sono utilizzati come elemento di interazione con gli analiti, mentre i trasduttori convertono il cambiamento non elettrico delle proprietà dell'idrogelo in risposta al legame con la biomolecola di interesse in segnale elettrico. Un esempio è costituito dal sistema microelettromeccanico (MEMS) progettato da Huang et al. [52]. per il monitoraggio a lungo termine del livello di glucosio in pazienti diabetici attraverso l'utilizzo di un idrogelo glucosio- sensibile. Il legame del glucosio con il polimero induce un cambiamento nella viscosità dell'idrogelo (elemento sensibile del biosensore) che può essere correlato alla variazione nella concentrazione di glucosio.

1.3.4 Idrogeli come materiali biomimetici

Negli ultimi anni, nella medicina rigenerativa si è imposta sempre più chiaramente la necessità di sviluppare materiali biomimetici per l'ottenimento di substrati 3D e microstrutturati per coltura cellulare, che mimino le caratteristiche delle ECM nativa. L'ECM è una complessa struttura reticolare che circonda e sostiene le cellule (Figura 1.8).

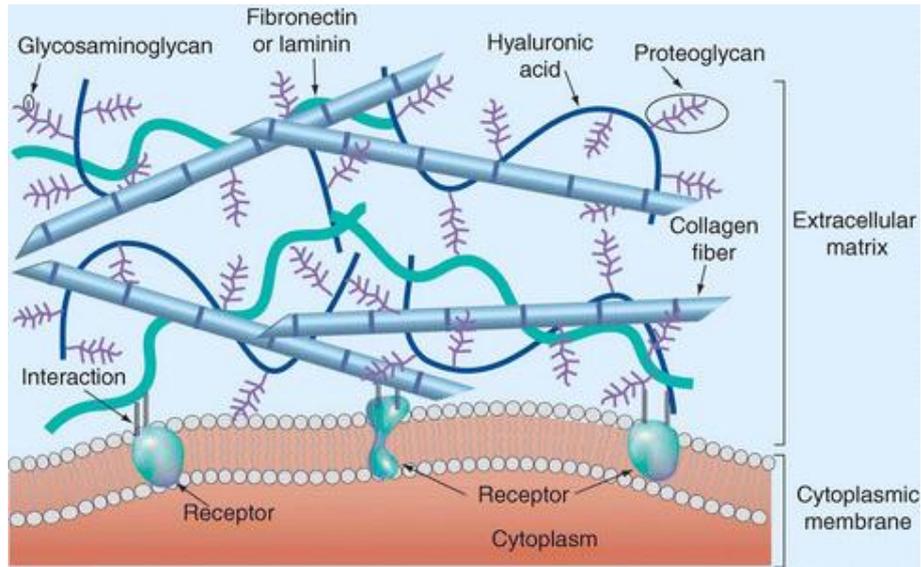


Figura 1.8 Rappresentazione schematica della complessa struttura dell'ECM e delle interazioni tra la cellula e i componenti dell'ambiente extracellulare. [31]

L'ECM è costituita da molecole secrete dalle cellule e con le quali le cellule interagiscono. La struttura portante è costituita da una complessa architettura di proteine fibrose quali la fibronectina, il collagene e la laminina, che forniscono nell'insieme la solidità meccanica alla matrice[20]. I proteoglicani completano i vuoti presenti nella struttura proteica: la loro carica fortemente negativa li rende affini con l'acqua e i fluidi biologici, rendendo l'ambiente extracellulare idratato[20].

I recettori cellulari, legandosi sia a fattori solubili che alle proteine della matrice, attivano segnali biochimici intracellulari che guidano le funzioni della cellula. Le cellule a loro volta rilasciano fattori solubili nell'ambiente ECM e rimodellano attivamente la matrice stessa. Quindi, l'ECM non agisce semplicemente come scaffold per il sostegno meccanico delle cellule, ma costituisce un ambiente bioattivo e dinamico che media tutte le funzioni cellulari[31].

Nel tentativo di sintetizzare matrici biomimetiche, gli idrogeli sono una promettente alternativa in quanto mostrano somiglianze strutturali con le componenti macromolecolari dell'ECM[34]. La struttura tridimensionale, reticolata e di natura viscoelastica degli idrogeli si avvicina strutturalmente e funzionalmente all'ossatura proteica dell'ECM. Gli idrogeli infatti, forniscono un supporto in tre dimensioni e un sostegno fisico alle cellule incapsulate, favorendo processi di adesione, proliferazione e migrazione[23]. La capacità di trattenere elevati volumi di acqua (compito svolto nell'ECM dai proteoglicani) fornisce poi alle matrici di idrogeli caratteristiche di idratazione simili a quelle trovate *in vivo*. La

presenza nella loro struttura di una rete di pori interconnessi alla microscala favorisce i trasporti di ossigeno, nutrienti e rifiuti e allo stesso tempo la diffusione dei segnali biochimici di comunicazione cellula- cellula e cellula- matrice[20]. La struttura meccanica e la cinetica di degradazione degli idrogeli possono infine essere adeguate alle richieste cellulari e controllate attraverso la scelta di parametri di sintesi (materiale, concentrazione di polimero, tipo di polimerizzazione). Lo sviluppo di un idrogelo bioattivo per una coltura cellulare 3D richiede infatti il controllo delle proprietà fisiche e chimiche del materiale su una scala spaziale che va dai micrometri ai centimetri, e temporale dai secondi alle settimane per assicurare il corretto rimodellamento del materiale ad opera della componente cellulare[20].

1.4 Idrogeli fotopolimerizzabili

Tra le classi di idrogeli introdotte nel paragrafo precedente, notevole importanza ricoprono gli idrogeli fotopolimerizzabili. Questi idrogeli possono essere polimerizzati *in vivo* o *in vitro* usando una fonte di luce visibile o UV. Queste sorgenti luminose interagiscono con composti sensibili alla luce chiamati foto iniziatori (PI), per creare radicali liberi nelle catene del prepolimero, che iniziano la reazione di polimerizzazione per formare un idrogelo[53] (Figura 1.9). La fotopolimerizzazione, sottoclasse di polimerizzazione radicalica (paragrafo 1.3.2), è usata quindi per convertire un prepolimero in fase liquida in un idrogelo in maniera semplice e controllabile, in condizioni fisiologiche o ambientali.

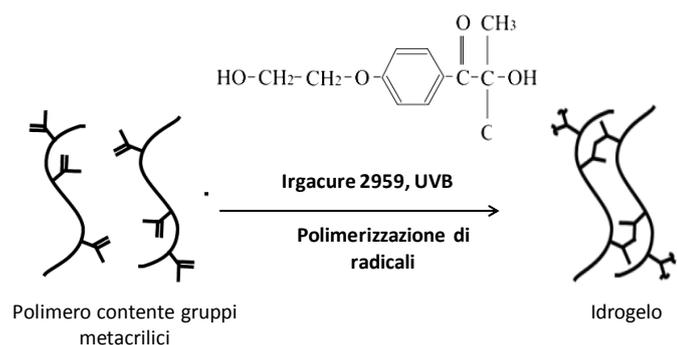


Figura 1.9 Reazione di foto polimerizzazione attraverso radiazione UVB in presenza di PI (Irgacure 2959) [54]

La fotopolimerizzazione presenta alcuni vantaggi rispetto alle tecniche di polimerizzazione convenzionali. In primo luogo, permette un controllo spaziale preciso del processo: la geometria degli idrogeli ottenuti attraverso fotopolimerizzazione può essere finemente

definita a priori grazie all'affinità di questo metodo con tecniche di microstrutturazione quali il foto patterning e il mold patterning (questo aspetto verrà approfondito nella sezione successiva 1.4.1).

Inoltre, la fotopolimerizzazione di idrogeli è un processo molto rapido (da pochi secondi a qualche minuto) e conducibile a temperatura ambiente o fisiologica. La rapidità del processo gioca un ruolo chiave per il raggiungimento di una distribuzione omogenea e 3D delle cellule nel gel, diminuendo la possibilità di sedimentazione delle cellule incapsulate nel prepolimero. Gli idrogeli fotopolimerizzabili permettono quindi di ottenere distribuzioni omogenee di cellule all'interno di una matrice biomimetica[53].

Altro vantaggio, fondamentale nel campo degli idrogeli iniettabili, è la possibilità di formare il gel *in situ* tramite un'iniezione sottocutanea del prepolimero acquoso e una successiva illuminazione trans dermica minimamente invasiva[55]. Le proprietà degli idrogeli fotopolimerizzabili sono inoltre regolabili attraverso il controllo di parametri di processo quali l'esposizione alla sorgente luminosa, la concentrazione di foto iniziatore e la concentrazione di polimero.

La tecnica di fotopolimerizzazione può essere applicata all'incapsulamento di cellule e fattori chimici all'interno degli idrogeli. Tuttavia, il processo di fotopolimerizzazione pone radicali e fonti luminose potenzialmente citotossiche a diretto contatto con le cellule, rendendo necessaria una verifica della vitalità cellulare seguente all'incapsulamento. La formazione di radicali liberi ad alta energia crea infatti i presupposti per possibili danni ossidativi alla popolazione di cellule foto incapsulate: i danni maggiori possono verificarsi alla membrana cellulare, agli acidi nucleici o alle strutture proteiche, fino a portare alla morte cellulare[56]. Oltre ai danni causati dal foto iniziatore, anche la sorgente luminosa stessa può rappresentare un fattore citotossico. In particolare, l'esposizione delle cellule a raggi UVC causa danni ossidativi al DNA con potenziale mutagenico[56].

Per questo, l'utilizzo di idrogeli fotopolimerizzabili nel campo della medicina rigenerativa impone una scelta consapevole non solo di un materiale biocompatibile, ma anche di un foto iniziatore e di una sorgente luminosa che risultino caratterizzati da minimi livelli di citotossicità.

La scelta del fotoiniziatore ideale per applicazioni cellulari si basa essenzialmente sulle caratteristiche di solubilità in acqua, stabilità e citotossicità. Diversi studi hanno riportato un confronto tra foto iniziatori ognuno caratterizzato da un diverso spettro di eccitabilità,

dimostrando come il 2-idrossi-1-[4-(idrossietossi)fenil]-2-metil-1-propanone (Irgacure 2959) sia, tra tutti i foto iniziatori in commercio, quello che presenta una minor citotossicità cellulare[[57](#), [58](#)]. La scelta della sorgente luminosa risulta vincolata dall'intervallo di sensibilità del foto iniziatore utilizzato: la fotopolimerizzazione richiede infatti l'uso di un fotoiniziatore che mostri alto potere di assorbimento ad una determinata lunghezza d'onda di luce. L'Irgacure 2959 mostra per esempio un picco di attivazione nello spettro degli UVB (290- 315nm), oltre ad un elevato assorbimento a frequenze corrispondenti agli UVC e maggiori[[57](#)].

La scelta di fotoiniziatore e sorgente luminosa implica anche una quantificazione di parametri quali concentrazione di fotoiniziatore, intensità luminosa e tempo di esposizione alla sorgente, per limitarne il più possibile gli effetti citotossici. Maggiore è la quantità di foto iniziatore utilizzato, per esempio, più rapida ed efficace sarà la reticolazione perché maggiori saranno i legami formati tra le catene, fino ad un'eventuale saturazione. Alte concentrazioni di PI risultano però più citotossiche, così come intensità luminose elevate. In questo senso è fondamentale una verifica della biocompatibilità della combinazione scelta in termini di vitalità cellulare ogni volta che uno di questi tre parametri viene variato. Per quanto riguarda il materiale, un polimero per poter essere utilizzato come precursore di un idrogelo fotopolimerizzabile deve essere solubile in acqua e contenere due o più gruppi reattivi[[53](#)]. La scelta ricade ancora nella distinzione tra polimeri sintetici e naturali.

Tra i polimeri sintetici maggiormente utilizzati in questo campo si trova il PEG, polimero non tossico, non immunogenico, favorevole ai trasporti di massa, gelificabile in condizioni di citocompatibilità e con proprietà meccaniche elevate, tipiche dei materiali sintetici. Oltre a questo, la modifica dei gruppi terminali tramite reazioni di metacrilazione rende possibile l'ottenimento di PEG dimetacrilato (PEGDA), compatibile con la formazione di un idrogelo per fotopolimerizzazione. Tuttavia, la mancanza di gruppi bioattivi nella struttura chimica del PEG impedisce alle cellule di legarsi direttamente all'idrogelo e di modificarne la struttura tramite degradazione enzimatica. Questo riduce notevolmente l'abilità delle cellule di proliferare, migrare e organizzarsi in strutture costituite da solo PEG[[35](#)]. Questo limite può essere superato tramite approcci di funzionalizzazione biologica[[45](#)] o attraverso l'uso combinato di PEG con polimeri naturali [[35](#), [59](#)].

La scelta di un materiale di origine naturale rappresenta una buona alternativa, pur richiedendo l'aggiunta alla molecola naturale di gruppi reattivi che permettano la

fotopolimerizzazione. Tra i polimeri naturali utilizzati per la formazione di idrogeli fotopolimerizzabili, la gelatina metacrilata (GelMA) è uno dei più promettenti e indagati[17, 35, 54].

La gelatina è un derivato economico del collagene, ottenibile da diverse fonti (per esempio porcina o bovina, da pelle da frammenti ossei). La gelatina si ottiene dalla denaturazione del collagene, attraverso la rottura delle strutture a tripla elica in molecole a singolo filamento tramite processi di idrolisi acida (gelatina di tipo A) o basica (gelatina di tipo B)[60]. Rispetto al suo precursore, la gelatina risulta essere meno immunogenica, ma allo stesso tempo conserva i gruppi bioattivi tipici del collagene (come la sequenza RGD e i siti di degradazione MMP-sensibili) che promuovono l'adesione, la migrazione, il differenziamento e la proliferazione cellulare[31]. Oltre a questo, la gelatina possiede molti gruppi funzionali laterali (acidi carbossilici, tioli, gruppi idrossili) che permettono la formazione di legami covalenti con fattori di crescita e citochine, per incrementare ulteriormente la promozione dei processi cellulari.

La gelatina può essere polimerizzata anche per via chimica attraverso l'uso di reagenti quali la glutaraldeide o enzimatica attraverso transglutaminase, ma la citotossicità e l'immunogenicità di questi iniziatori ne rende deleterio l'utilizzo in presenza di cellule[54]. La fotopolimerizzazione rappresenta una interessante alternativa più biocompatibile per ottenere idrogeli a base di gelatina.

1.4.1 Patterning di idrogeli fotopolimerizzabili

Una delle principali sfide dell'ingegnerizzazione di tessuti *in vitro* è la definizione di una matrice biomimetica tridimensionale che contenga le appropriate interazioni cellula-microambiente (cellula- cellula, cellula- matrice, cellula- fattori solubili) e allo stesso tempo presenti le caratteristiche di micro architettura multicellulare presentate dal tessuto di riferimento[61].

Uno dei primi metodi indagati per l'ottenimento di pattern cellulari in scaffold 3D consiste nel condizionamento cellulare attraverso stimoli esterni quali applicazione di sforzi meccanici[62], impulsi elettrici[63] o sforzi di taglio indotti da un flusso[64]. Questi metodi richiedono però sistemi di stimolazione elaborati alla macroscale, che mostrano spesso dei limiti in un controllo fine ad una scala micrometrica.

Lo sviluppo di tecnologie alla microscala combinato all'utilizzo di idrogeli permette la fabbricazione di pattern cellulari tridimensionali dalla geometria definita e controllabile, con dimensioni che spaziano dal livello subcellulare ($<1\mu\text{m}$) al livello macroscopico tissutale ($>1\text{cm}$)[61]. La creazione di questi idrogeli microstrutturati può essere ottenuta attraverso tecniche di foto patterning e mold patterning compatibili con l'utilizzo di idrogeli fotopolimerizzabili e rappresenta un'alternativa semplice per la definizione di pattern 3D di cellule senza la necessità di stimoli esterni.

Le tecniche di foto patterning permettono di eseguire una fotopolimerizzazione spazialmente selettiva del prepolimero esponendolo alla sorgente UV attraverso una foto maschera. Nelle zone esposte alla luce l'idrogelo polimerizzerà generando strutture tridimensionali che replicano quelle bidimensionali della fotomaschera. L'idrogelo così ottenuto avrà una geometria controllabile attraverso la progettazione delle microstrutture disegnate sulla fotomaschera e il controllo dello spessore di prepolimero fotopolimerizzato[16]. Esistono molteplici studi a dimostrazione dell'efficacia di questa tecnica in termini di ottenimento di pattern ad elevata risoluzione e allo stesso tempo mantenimento di condizioni favorevoli alla crescita e allo spreading cellulare. Aubin et al.[17] presentano un metodo semplice e diretto per la fabbricazione di pattern cellulari di GelMA, attraverso foto patterning di canali alla microscala. Questo lavoro dimostra le potenzialità del foto patterning nell'ottenimento di strutture biomimetiche ad elevata definizione e dimostra come l'attività cellulare sia fortemente influenzata dalla microstrutturazione esterna: diminuendo la distanza tra i canali sotto i $50\mu\text{m}$ (possibile grazie all'alta risoluzione della tecnica di patterning) si evidenzia infatti un'interazione tra cellule intrappolate in canali adiacenti. Il foto patterning di idrogeli è stato utilizzato anche per l'ottenimento di strutture multistrato e 3D attraverso l'utilizzo di tecniche di foto patterning bottom up. Liu et al. [65] utilizzano una camera ad altezza variabile per la fotopolimerizzazione di PEGDA con lo scopo ottenere pattern di idrogelo multistrato in step multipli. Questo permette (i) l'incapsulamento nell'idrogelo di diversi tipi cellulari geometricamente separati tra di loro e (ii) la formazione di una struttura multistrato dalla geometria definita e controllabile dall'utente. La possibilità di ripetere il passaggio di fotopolimerizzazione un numero elevato di volte definisce un possibile metodo bottom up per la costruzione di una macrostruttura complessa a partire da pattern microstrutturati. Due et al. [61] presentano un approccio bottom up per guidare l'assemblaggio di

microstrutture cellulari di idrogeli ottenuti attraverso foto patterning, per generare costrutti dalla microarchitettura controllabile e complessa. La formazione di legami tra questi idrogeli, flottanti nel mezzo di coltura non essendo vincolati a nessun supporto, è guidata dalla tendenza di sistemi multifase liquida-liquida di minimizzare l'area superficiale e la risultante energia libera di superficie tra le fasi. Gli idrogeli idrofilici, immersi in un solvente idrofobico, aggregano formando tessuti di varie dimensioni.

Nel mold patterning la foto polimerizzazione degli idrogeli e la strutturazione di pattern tridimensionali avviene attraverso uno stampo elastomerico micro strutturato, fabbricato con tecniche di soft litografia. Attraverso questa tecnica è possibile creare microambienti multicellulari *in vitro* in maniera semplice e poco costosa. Questa tecnica permette di ottenere pattern di idrogeli aventi geometrie caratterizzate da un'ampia varietà di forme e dimensioni, limitate solo dalla possibilità di microstrutturarne i negativi su PDMS[23]. La combinazione di mold patterning e fotopolimerizzazione permette di sfruttare i vantaggi degli idrogeli fotopolimerizzabili per la creazione di pattern definiti senza la necessità di sorgenti luminose altamente collimate o intense, riducendo così i costi del processo. Questo si collega alla possibilità di micro strutturare pattern ad alta risoluzione anche di spessori elevati, non ottenibili per foto patterning a meno di lampade finemente collimate. Nel foto patterning, infatti, all'aumentare dello spessore dell'idrogelo che si vuole ottenere, aumenta anche la dispersione della luce: questo può portare a magnificazioni nella larghezza del pattern, diminuendone la risoluzione. Questo fenomeno, in assenza di fonti luminose finemente collimate, è evidente già a spessori intorno ai 100µm[65].

A oggi, il mold patterning di idrogeli è oggetto di numerose ricerche che si limitano all'utilizzo di idrogeli polimerizzati per via chimica. Raghavan et al. [28] presentano una tecnica di mold patterning di idrogeli a base di collagene in stampo elastomerico, utilizzato come guida per la tubologenesi di cellule endoteliali. Un tentativo di fotopolimerizzazione di pattern di idrogeli di PEGDA tramite stampo elastomerico è presentato da Yeh et al. [41]: il processo descritto in questo lavoro porta all'ottenimento di unità flottanti di idrogeli aventi forme e dimensioni definite dal mold utilizzato per la fotopolimerizzazione. Questa tecnica rappresenta un potenziale primo passo per un approccio bottom up di ingegnerizzazione di tessuti complessi: le singole unità ottenute possono essere assemblate in macrostrutture aventi configurazione 3D controllabile.

1.5 Scopo del lavoro

Il presente lavoro di tesi è finalizzato all'indagine delle potenzialità di idrogeli fotopolimerizzabili a base di GelMA come matrici biomimetiche nell'ambito dell'ingegneria dei tessuti alla microscala. In particolare, è stato definito un protocollo di mold patterning che combina fotopolimerizzazione e replica molding di PDMS per l'ottenimento di pattern cellulari dalla microarchitettura controllata.

Il materiale in esame è stato sintetizzato in tre lotti con tre diversi gradi di metacrilazione e caratterizzato inizialmente dal punto di vista chimico e meccanico. Il tempo necessario alla fotopolimerizzazione del materiale è stato poi caratterizzato in assenza e in presenza di cellule. In seguito, il materiale e i processi di fotopolimerizzazione sono stati validati dal punto di vista biologico attraverso una serie di esperimenti di interazione con cellule endoteliali umane da vena ombelicale di linea continua fluorescenti (Human Umbilical Vein Endothelial Cells, HUVEC GFP). In questa fase è stata analizzata la citocompatibilità del materiale e del processo di fotopolimerizzazione: un'analisi della tossicità dei vari parametri di processo ha portato alla definizione di un protocollo di fotopolimerizzazione compatibile con il mantenimento di cellule vitali. In seguito le potenzialità del GelMA fotopolimerizzato come materiale biomimetico sono state valutate analizzando il comportamento di cellule incapsulate negli idrogeli in colture di 7 giorni, in termini di spreading, attività metabolica e proliferazione.

Infine, è stata indagata la possibilità di utilizzare il materiale e la tecnica di fotopolimerizzazione precedentemente validate per l'incapsulamento di cellule in matrici alla microscala, 3D e dalla geometria controllata attraverso mold patterning. Questo approccio è stato validato in termini di fattibilità, risoluzione dei pattern ottenibili e omogeneità nella distribuzione delle cellule nelle tre dimensioni.

La fase di caratterizzazione meccanica e chimica è stata svolta presso il Politecnico di Milano (Dipartimento di Bioingegneria), Laboratorio di Micro e Biofluidodinamica Sperimentale (μ BS Lab,) in collaborazione con il Laboratorio di Biomateriali e con il Dipartimento di Biotecnologie e Bioscienza (Università Milano-Bicocca). La sintesi, i test di fotopolimerizzazione, la validazione cellulare e gli esperimenti di mold patterning sono stati effettuati presso il Laboratorio di Ingegneria Cellulare e Tissutale dell'IRCCS Istituto Ortopedico Galeazzi Milano in collaborazione con l'azienda BEL (Bioengineering Laboratories, Cantù) per la liofilizzazione degli idrogeli.

2. MATERIALI E METODI

Nel presente capitolo verranno descritte la sintesi e la caratterizzazione di un idrogelo a base di gelatina metacrilata.

Una prima caratterizzazione è stata finalizzata all'analisi di alcune proprietà chimiche e meccaniche del materiale. In seguito, il materiale e i processi di fotopolimerizzazione sono stati validati dal punto di vista biologico attraverso una serie di esperimenti cellulari mirati a testarne biocompatibilità e potenzialità come materiale biomimetico. Infine, è stata indagata la possibilità di utilizzare il materiale e la tecnica di fotopolimerizzazione precedentemente validate per incapsulamento di cellule in matrici alla microscala, 3D e dalla geometria controllata attraverso mold patterning.

2.1 Sintesi del materiale: GelMA

La gelatina è un biopolimero naturale ottenuto per denaturazione del collagene. Grazie alle sue proprietà di gelazione, questo materiale è un ottimo candidato per l'ottenimento di idrogeli. A metodi di polimerizzazione tradizionalmente in uso[39], si stanno sempre più affiancando tecniche di fotopolimerizzazione della gelatina, che portano all'ottenimento di idrogeli chimicamente stabili con la possibilità di formare micropattern in maniera semplice ed economica [66].

In questo panorama si inserisce la scelta di sintetizzare e caratterizzare un idrogelo a base di gelatina modificata con gruppi metacrilici, che permettono alle catene polimeriche del materiale di reticolare in seguito all'esposizione a radiazione ultravioletta (range degli UVB, 290-315nm) e in presenza di un agente fotoiniziatore.

La gelatina utilizzata è commercializzata da Sigma Aldrich (Sigma Aldrich, G6144) e derivante da pelle porcina di tipo A. La gelatina reticolabile (gelatina metacrilata, GelMA) è stata ottenuta attraverso una reazione di metacrilazione tra i gruppi amminici primari delle catene del biopolimero e l'anidride metacrilica (MA) (Figura 2.1).

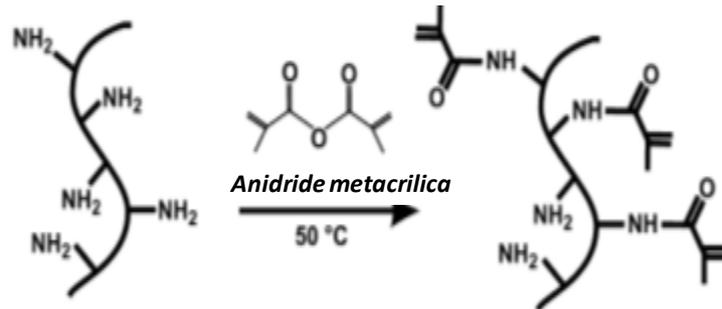


Figura 2.1 Reazione di metacrilazione tra macromolecole di gelatina e anidride metacrilica MA

Allo scopo di ottenere GelMA a tre diversi gradi di metacrilazione, sono state eseguite tre distinte reazioni di sintesi, ognuna caratterizzata dall'aggiunta di una specifica quantità di anidride metacrilica MA: 0.05 ml di MA al grammo di gelatina, 0.1ml di MA al grammo di gelatina e 1 ml di MA al grammo di gelatina. Maggiore è il numero di molecole di MA in fase di reazione, maggiore sarà la frazione di gruppi lisina modificati.

Il processo di sintesi è stato adattato da Van Den Bulcke et al.[67], e in Figura 2.2 è riportata una sua rappresentazione schematica.

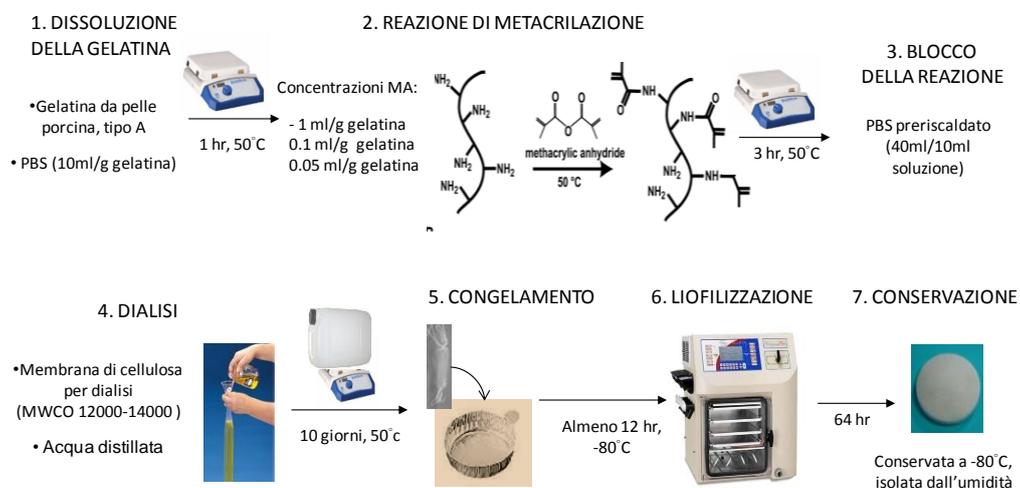


Figura 2.2 Processo di sintesi del GelMA

La gelatina è stata miscelata al tampone fosfato PBS (pH=7.5) per ottenere una soluzione al 10% w/v, riscaldata a 50°C e mescolata per un'ora fino al completo scioglimento. In seguito, l'anidride metacrilica è stata aggiunta goccia a goccia nelle quantità prestabilite e lasciata reagire per tre ore, mantenendo la soluzione a 50°C. Al termine, la reazione di metacrilazione è stata bloccata diluendo con PBS (40ml di PBS/ 10ml di soluzione), preriscaldato a 37°C nel bagnetto termostatico. La soluzione così ottenuta è stata sottoposta

a dieci giorni di dialisi contro acqua distillata, utilizzando tubi di cellulosa per dialisi con soglia di filtrazione 12-14KDa. La dialisi, finalizzata alla purificazione del materiale, permette la rimozione di sali e acido metacrilico residuo. L'acqua è stata cambiata tre volte al giorno per rendere il processo il più efficace possibile, mentre il mantenimento di una temperatura costante di 50°C ha evitato la precipitazione e la gelazione del materiale. Al termine del processo di dialisi, la soluzione è stata filtrata attraverso unità filtranti con diametro delle maglie pari a 0.22 µm. Particolare attenzione è stata posta nel mantenere la temperatura della soluzione sopra i 37°C durante il filtraggio per evitare la gelazione del materiale e l'intasamento del filtro. La soluzione così ottenuta è stata congelata a -80°C in contenitori di alluminio e liofilizzata per 64 ore per ottenere una "spugna" porosa di GelMA e la rimozione dell'acqua. Per la liofilizzazione, svolta presso BEL (Bioengineering Laboratories, Cantù), è stato utilizzato un liofilizzatore industriale. Dodici campioni alla volta sono stati sottoposti a un ciclo di 66 ore a vuoto spinto, composto da una prima fase di raffreddamento controllato fino a -60°C della durata di 1 ora, una fase di liofilizzazione vera e propria a 0°C di 64 ore ed una fase finale di 1 ora di essiccamento secondario a 25°C. Alla fine del ciclo i campioni sono stati analizzati qualitativamente per verificarne la completa liofilizzazione. I campioni così ottenuti sono stati conservati a -80°C fino all'utilizzo (avendo cura di minimizzare le esposizioni all'aria per evitare l'assorbimento di umidità ambientale).

2.2 Caratterizzazione del materiale

Ciascuna reazione di sintesi volta alla produzione di GelMA è stata innanzitutto valutata in termini di grado di metacrilazione risultante. Successivamente, per ogni tipologia sono state prese in considerazione diverse concentrazioni di agente fotoiniziatore e sono stati valutati: i) le proprietà reologiche dei materiali reticolati; ii) il tempo richiesto per l'ottenimento di idrogelo (polimerizzazione attraverso irraggiamento UV).

2.2.1 ¹H NMR: analisi del grado di metacrilazione

Per verificare l'efficacia della reazione di metacrilazione nel processo di sintesi, è stato misurato il grado di metacrilazione dei tre lotti prodotti attraverso una prova di ¹H-NMR (Bruker Advance 3, 600 MHz equipaggiato con cryo-probe).

Prima dell'acquisizione, dal momento che gli spettri possono essere acquisiti solo in soluzione, 10mg di ogni lotto sono stati disciolti in 1 ml di ossido di deuterio per procedere all'analisi. Gli spettri dei tre campioni di gelatina metacrilata e del controllo sono stati acquisiti a 60°C, per prevenire la gelazione del materiale, attraverso 16 scansioni con tempo di acquisizione di 2s e tempo di riciclo di 15s. gli spettri sono stati elaborati utilizzando il software MestreNova (MestreLab research).

2.2.3 Test reologici degli idrogeli

L'utilizzo di idrogeli come matrici tridimensionali per la coltura cellulare richiede la soddisfazione di requisiti tra i quali la comparabilità tra le proprietà meccaniche del materiale e quelle dell'ambiente extracellulare che si vuole replicare. Inoltre, indipendentemente dal fatto che le proprietà meccaniche richieste variano in funzione del tessuto considerato, una matrice utilizzata per la coltura di cellule deve garantire un sostegno meccanico nel tempo e avere proprietà tali da evitarne una degradazione precoce. Per definire quali siano le proprietà meccaniche espresse dal GelMA sintetizzato e verificare se queste possano soddisfare le richieste biologiche, è stata eseguita una caratterizzazione reologica.

Le prove reologiche consentono di determinare parametri visco-elastici, attraverso la misura del modulo complesso G^* , e la loro dipendenza da tempo, frequenza, deformazione e temperatura. I parametri che definiscono un test oscillatorio sono la frequenza di oscillazione o l'ampiezza della deformazione di taglio; la risposta del campione viene descritta attraverso il modulo complesso $G^* = [G'(\omega) + i G''(\omega)]$, che definisce il comportamento generale del materiale ed è espresso dalla combinazione lineare del modulo elastico G' e del modulo viscoso G'' . I test dinamici in regime oscillatorio permettono di studiare il comportamento del materiale sottoponendo il campione a uno sforzo o ad una deformazione di taglio che varia periodicamente nel tempo.

La caratterizzazione reologica dei campioni di GelMA è stata valutata tramite reometro rotazionale (TA instruments, AR 1500 Ex) impiegando un setup con piatti paralleli di diametro 20 mm). L'altezza dei provini, di diametro 20 mm, è stata impostata a 1000 μ m tramite la riduzione del gap tra i piatti paralleli (Figura 2.3).

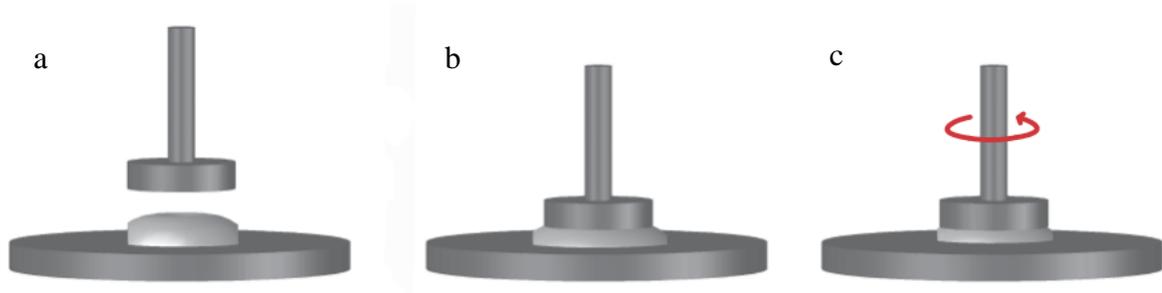


Figura 2.3 Setup sperimentale delle prove reologiche sui campioni di GelMA. (a) Posizionamento del campione, (b) imposizione del gap di 1000 μm e (c) applicazione della frequenza di oscillazione.

Le diverse condizioni testate sono riassunte in Figura 2.4.

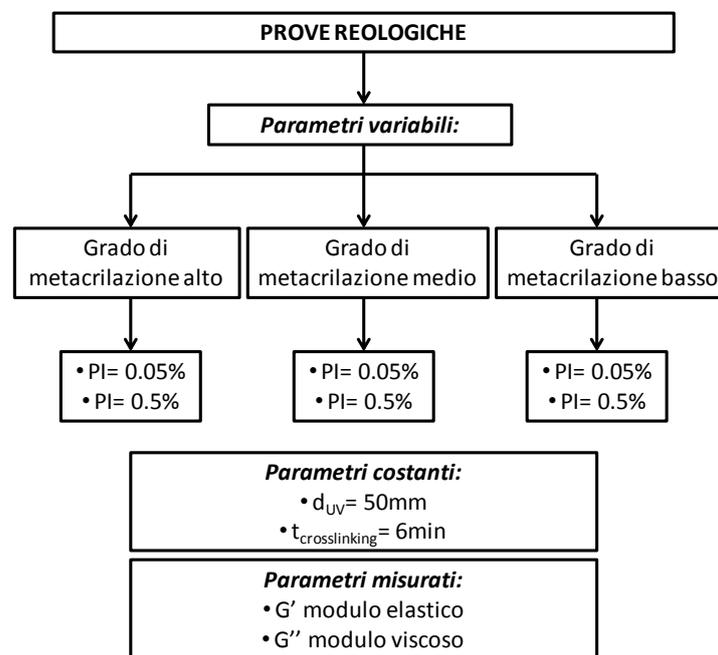


Figura 2.4 Diverse condizioni di metacrilazione e concentrazione di PI testate nelle prove reologiche

Tutti e tre i lotti di GelMA a bassa, media e alta metacrilazione sono stati analizzati. Sono state utilizzate due concentrazioni di foto iniziatore (0.05% w/v e 0.5% w/v) per indagarne l'effetto sulle proprietà meccaniche dell'idrogel. È stato poi scelto di mantenere un tempo di fotopolimerizzazione pari a 6 minuti costante per tutte le condizioni, sufficiente a permettere le analisi anche nelle condizioni più sfavorevoli (bassa metacrilazione, PI= 0.05%) e allo stesso tempo non inserire una variabile ulteriore che potesse influenzare le proprietà meccaniche finali. I provini di GelMA sono stati polimerizzati immediatamente prima del test meccanico e ogni prova è stata effettuata in triplicato.

Nella Tabella 2.1 sono riportati i parametri sperimentali (deformazione, temperatura, frequenza oscillatoria). La scelta del valore di deformazione da utilizzare per mantenersi nel campo di viscoelasticità lineare, all'interno del quale per piccole deformazioni G' e G'' dipendono solo dalla frequenza, si è basato sull'analisi della letteratura [67-69].

Tabella 2.1 Parametri sperimentali dei test reologici

Deformazione [%]	0.3
Temperatura [°C]	37
Frequenza [Hz]	Rampa 0.1- 100

2.2.3 Analisi del tempo di fotopolimerizzazione

Il GelMA ottenuto mediante la sintesi precedentemente descritta è stato caratterizzato in termini di tempo necessario a una completa reticolazione in seguito dell'irraggiamento tramite luce ultravioletta (fotopolimerizzazione).

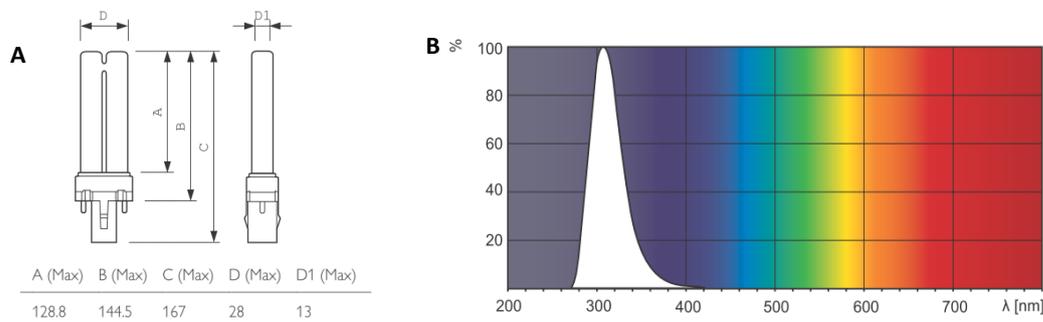


Figura 2.5 Lampada PL-S 9W/12/2P 1CT. (A) Disegno tecnico e dimensioni nominali (B) Fotometria e spettro di emissione

La gelatina modificata con gruppi metacrilati mostra infatti la capacità di formare reticolazioni chimicamente stabili se esposta per un certo lasso di tempo a luce di adeguata lunghezza d'onda ed intensità, in presenza di un fotoiniziatore (PI) solubile in acqua. La fonte luminosa scelta (PL-S 9W/12/2P 1CT) presenta un unico picco di emissione negli UVB (290-315nm) con una potenza di 9W (schema della lampada in Figura 2.5A). L'assenza di picchi di emissione nel range degli UVC (Figura 2.5B), che inducono modificazioni ossidative del DNA, riduce la potenziale citotossicità del processo qualora

siano presenti cellule. La forma della lampada (2xT12) permette, benché il fascio non sia focalizzato, un'emissione di luce uniforme: questo gioca un ruolo fondamentale per l'ottenimento di campioni omogeneamente fotopolimerizzati.

La fotopolimerizzazione è una tipo di polimerizzazione radicalica che permette la formazione di legami chimici tra i gruppi metacrilici delle catene polimeriche della gelatina: la reazione di iniziazione è innescata da un fotoiniziatore che genera radicali liberi in risposta alla luce UV. Diversi studi [57] [58] hanno riportato un confronto tra diversi fotoiniziatori, dimostrando come il 2-idrossi-1-[4-(idrossietossi)fenil]-2-metil-1-propanone (Irgacure 2959) sia, tra tutti i fotoiniziatore in commercio, quello che presenta una minor citotossicità (per le analisi di citotossicità si rimanda al paragrafo 2.3.4).

Per definire la capacità del materiale di polimerizzare se esposto a luce UVB, il parametro di interesse considerato è stato il tempo di reticolazione. A tale scopo è stato eseguito un confronto tra i tre lotti prodotti (livello di metacrilazione basso, medio e alto), misurando per ognuno il tempo necessario per la fotopolimerizzazione. I parametri esaminati sono stati la concentrazione di PI (0.05%, 0.1%, 0.5%, 1% w/v) e la distanza del campione dalla sorgente UV (20, 50, 125mm) (Figura 2.6). Tutte le condizioni sono state testate in triplicato.

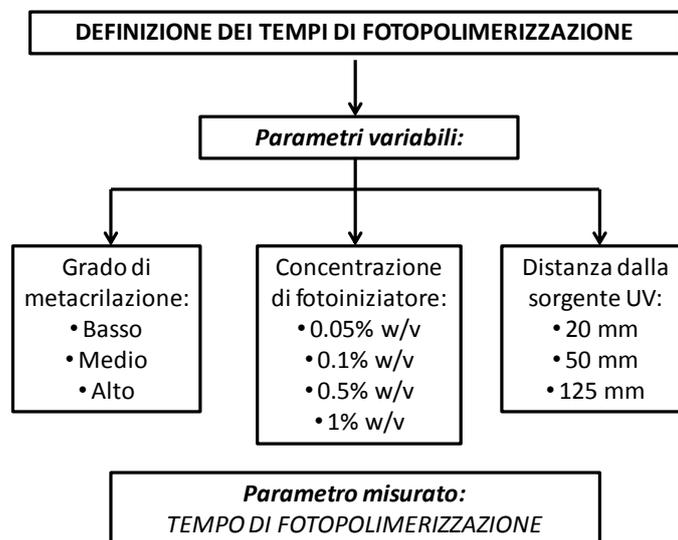


Figura 2.6 Schema delle diverse condizioni testate nel confronto dei diversi lotti in relazione ai tempi di fotopolimerizzazione

Il protocollo seguito per le prove di reticolazione è illustrato in seguito.

Per prima cosa, si crea un supporto per la fotopolimerizzazione del campione costituito nella parte sottostante da un vetrino trattato con 3-(trimetossil)propil metacrilato (TMSPMA), sopra al quale applicare uno stampo di polidimetilsilossano (PDMS) come stampo ($\Phi=6\text{mm}$; $h=450\mu\text{m}$).

Il trattamento del vetrino (Menzel-Glaser ISO 8037/1) con TMSPMA è eseguito per favorire l'adesione del GelMA al supporto nel processo di fotopolimerizzazione lasciando gruppi metacrilici liberi sulla superficie del vetro[65]. Questo risolve il problema del distacco del campione dal supporto, evidente soprattutto in esperimenti di coltura a lungo termine. I vetrini sono lasciati per 12 ore immersi in una soluzione al 10% w/v di idrossido di sodio (NaOH). Dopo tre lavaggi in tre bagni di etanolo al 100%, i vetrini sono posti in stufa a 80°C avvolti in alluminio per un'ora. A questo punto il rivestimento vero e proprio è ottenuto facendo colare 3ml di TMSPMA sopra ai vetrini posti a stretto contatto l'uno di fianco all'altro in un becher. Il TMSPMA, che inizialmente si deposita sul fondo del becher, risale per capillarità sfruttando gli spazi tra due vetrini adiacenti e finisce per bagnare uniformemente entrambe le superfici di tutti i vetrini. Un rivestimento efficace si ottiene lasciando agire il TMSPMA per un'ora. Per fissare il rivestimento, i vetrini sono lasciati in stufa a 80°C per 12 ore e passati nuovamente in tre soluzioni di etanolo al 100%. Lo stampo di PDMS è realizzato miscelando il prepolimero con un catalizzatore del processo di polimerizzazione (agente polimerizzante) in un rapporto di peso 10:1 (Sylgard 184, Dow Corning Corporation). I gruppi di idruro di silicio presenti nell'agente polimerizzante reagiscono con i gruppi vinilici presenti nella soluzione di base, formando un polimerico elastomerico reticolato. Dopo il mescolamento manuale, la soluzione è posta sotto vuoto per favorirne il debollamento. La soluzione così ottenuta viene colata in piatti di Petri di vetro, utilizzati come stampo in quantità tale, da ottenere lo spessore desiderato (450 μm). La completa reticolazione è raggiunta dopo un'ora in stufa a 150°C, così da ottenere un foglio di PDMS allo stato vetroso. Da questo vengono ricavati gli stampi da applicare ai supporti in vetro attraverso una fustella di diametro 6mm.

Assemblati i supporti, la soluzione di Irgacure 2959 è stata preparata diluendo la corretta quantità di PI in 10ml di PBS, per ottenere la concentrazione desiderata. Per favorire uno scioglimento omogeneo, la soluzione è stata vorticata più volte e scaldata a 60°C per 30 minuti, proteggendola dalla luce ambientale a causa della elevata fotosensibilità del PI. La

soluzione di prepolimero è stata poi preparata sciogliendo il GelMA liofilizzato (5% w/v) nella soluzione di PI calda e vorticando per garantire omogeneità. Il prepolimero ottenuto, protetto anch'esso dalla luce, è stato lasciato a temperatura ambiente per 15 minuti. A questo punto, una quantità pari a 15 μ l di prepolimero è stata prelevata tramite un pipettatore e depositata all'interno del supporto descritto in precedenza. Posto il campione alla distanza desiderata dalla sorgente di luce UV, è stato definito il tempo necessario a una completa e omogenea polimerizzazione attraverso incrementi temporali successivi di 5 secondi, fino all'ottenimento del risultato desiderato.

La Figura 2.7 riassume i passaggi del processo di fotopolimerizzazione: (a) assemblaggio del supporto, (b) iniezione del prepolimero ed esposizione alla sorgente UVB e (c) ottenimento degli idrogeli reticolati.

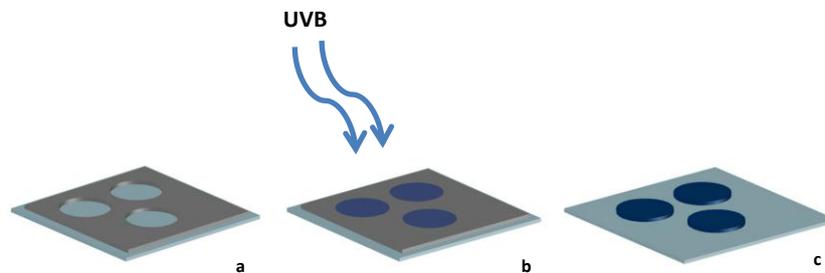


Figura 2.7 Supporto per la fotopolimerizzazione del GelMA alla macroscale

La definizione qualitativa di completa polimerizzazione (Figura 2.8) si basa su proprietà macroscopiche quali la capacità del campione di mantenere una forma a secco e in PBS e la presenza di striature caratteristiche dell'idrogelo se osservato sotto microscopio. All'analisi immediatamente successiva all'avvenuta fotopolimerizzazione, si è aggiunta una verifica a 24 ore. Superata la prima verifica, i campioni sono stati immersi in PBS e lasciati a 37°C per 12hr, alla fine delle quali un campione è stato definito correttamente cross linkato se il mantenimento della forma risultava mantenuto.

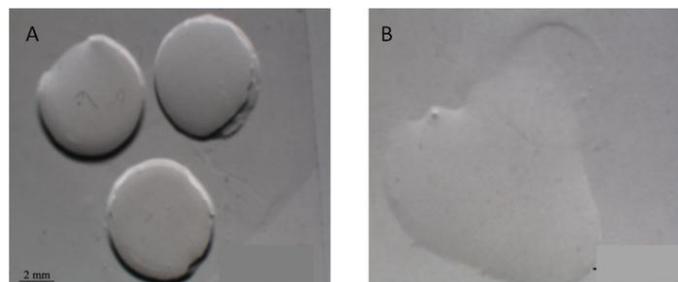


Figura 2.8 Esempio di gel (A) completamente reticolato e (B) non reticolato (B). Lotto ad alta MA e PI=0.5%. Il tempo di esposizione è 40 sec (A) e 20 sec (B). Campioni a secco, immagini a stereoscopio 1.3x

2.3 Test di interazione con le cellule

La seconda fase si concentra sulla definizione della citocompatibilità del GelMA sintetizzato e sull'analisi delle sue potenzialità come matrice 3D per la crescita e la proliferazione cellulare.

2.3.1 Coltura cellulare

Per la caratterizzazione biologica del GelMA sintetizzato si è deciso di analizzarne l'interazione con cellule endoteliali da vena ombelicale umana di linea fluorescenti (HUVEC GFP). La particolare proprietà delle cellule di emettere fluorescenza nel verde è dovuta a una trasfezione ottenuta attraverso lentivirus esprime la *green fluorescent protein* (GFP). La GFP è una proteina espressa nella medusa *Aequorea victoria*, che esibisce un'intensa fluorescenza verde quando eccitata da luce blu ($\lambda_{\text{eccitazione}}=475\text{nm}$; $\lambda_{\text{emissione}}=505\text{nm}$) [70, 71]. Esprimendo questa proteina le cellule utilizzate possono essere osservate in fluorescenza senza dover eseguire saggi o colorazioni aggiuntive.

Il mezzo di coltura utilizzato per le HUVEC GFP è il medium base EBM-2 (*Endothelial Cell Basal Medium-2*, Lonza) al quale viene aggiunto un kit di supplementi (CC- 4176 EGM-2 BulletKit, Lonza) contenente idrocortisone, fattore di crescita umano dell'endotelio vascolare (*human Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF), acido ascorbico, eparina, fattore di crescita umano dell'epidermide (*human Epidermal Growth Factor*, hEGF), fattori di crescita dei fibroblasti (*Fibroblast Growth Factor*, hFGF- β), fattore di crescita insulinico (*Insulin-like Growth Factor*, IGF- 1), gentamicina e amfotericina- B (GA- 100) e siero fetale bovino al 2%.

All'inizio di ogni esperimento le cellule, crioconservate in un Dewar contenente azoto liquido (-196°C), sono scongelate secondo procedura standard (Figura 2.10). Per prevenire il danneggiamento causato dal congelamento (i danni possono essere dovuti a formazione di cristalli di ghiaccio, alterazioni nella concentrazione degli elettroliti e del pH o disidratazione), prima del congelamento vengono sospese in una soluzione crioprotettiva di dimetilsolfossido (DMSO) al 10% v/v e siero fetale bovino (FBS). L'azione del DMSO, tossico a temperatura ambiente, è inibita aggiungendo del terreno di coltura completo. A questo punto la sospensione cellulare viene posta in centrifuga a 1400 rpm per 5 minuti in modo da addensare le cellule sul fondo della provetta e poter così rimuovere il surnatante.

Le cellule depositatesi sul fondo della provetta, vengono risospese nel terreno di coltura e successivamente contate (utilizzando la tecnica “*trypan blue dye exclusion*” e la camera di Burker) in modo tale da procedere poi all’espansione, piastrandole alla densità desiderata (densità minima: 8000 cellule/cm²) in T-flask (Celbio-Corning) con rivestimento superficiale di gelatina, per favorire l’adesione cellulare[72]. Per il rivestimento, viene preparata una soluzione all’1% w/v di gelatina bovina in acqua bi distillata (ddH₂O) utilizzata per ricoprire il fondo della flask (2ml sono sufficienti in un T-flask da 75 cm²). Un rivestimento ottimale si raggiunge lasciando agire la gelatina a 37°C per mezz’ora, al termine della quale la soluzione viene recuperata. Dopo averla lasciata ad asciugare sotto cappa, la T-flask è pronta all’utilizzo. Le T-flask contenenti la sospensione cellulare vengono quindi poste in incubatore ambientale (temperatura di 37°C, saturazione di vapore e concentrazione di CO₂ pari al 5%). Le cellule vengono mantenute in queste condizioni fino al raggiungimento della confluenza (raggiunta di solito in 3 giorni con una media stimata di 0.7 doubling/giorno). A questo punto si procede a staccare le cellule adese alla superficie della T flask attraverso l’uso dell’enzima proteolitico tripsina, che ha un tempo di azione di 5 minuti a 37°C. A questo punto si può procedere in tre modi: (i) si può decidere di far proseguire la crescita della popolazione cellulare; (ii) congelare le cellule in azoto liquido, per conservarle in modo stabile nel tempo fino al momento dell’utilizzo; oppure (iii) utilizzare direttamente le cellule per gli esperimenti (inclusione nel GelMA). Il processo descritto è sintetizzato in Figura 2.9.



Figura 2.9 Processo standard di coltura e semina cellulare

2.3.2 Inclusione di cellule in GelMA

Una delle caratteristiche fondamentali che sta portando gli idrogeli ad avere un ruolo sempre più centrale nell'ambito della medicina rigenerativa, è la loro capacità di svolgere il ruolo di matrice 3D per l'inclusione di cellule. È stato infatti dimostrato[23] come i substrati bidimensionali per la coltivazione *in vitro* di cellule e tessuti, non siano in grado di replicare correttamente l'ambiente extra cellulare presente *in vivo*. Questo è dovuto al fatto che *in vivo* le cellule sono inserite all'interno di *network* tridimensionali che costituiscono un ambiente extracellulare complesso con topografia microporosa[19]. Per questo motivo è stato messo a punto un protocollo per l'inclusione di cellule nel GelMA in modo tale da sfruttare la possibilità di questo idrogelo di mimare le caratteristiche della matrice ECM, formando un sostegno 3D per le cellule.

Per prima cosa vengono assemblati i supporti per la fotopolimerizzazione costituiti da un vetrino trattato con TMSPMA e da uno stampo in PDMS, ottenuti secondo il protocollo descritto nel paragrafo 2.2.3. Prima dell'utilizzo a contatto con le cellule, vetrini e stampi di PDMS sono sottoposti sotto cappa a flusso laminare a lavaggi con acqua MilliQ filtrata ed etanolo 100% per garantirne la sterilità. Successivamente, viene preparata la soluzione di prepolimero come descritto nel paragrafo 2.2.3 con le desiderate concentrazioni di Irgacure 2959 e di GelMA. Per una miglior polimerizzazione il prepolimero è preparato qualche minuto prima dell'utilizzo per permetterne il raggiungimento della temperatura ambiente.

Nel frattempo si passa alla tripsinizzazione delle cellule HUVEC GFP mantenute in coltura fino al raggiungimento dell'80% di confluenza (vedi paragrafo 2.3.1). Dalla sospensione cellulare così ottenuta, viene prelevato il quantitativo di cellule desiderato, posto in una fiala eppendorf da 0.6ml. L'aliquota è centrifugata a 1400rpm per 5 minuti per far depositare le cellule sul fondo della provetta ed eliminare il surnatante di scarto. Le cellule sono così risospese in un corretto volume di prepolimero, calcolato in maniera da ottenere la densità cellulare desiderata. 15 µl della miscela di cellule e prepolimero sono depositati uniformemente nello stampo assemblato in precedenza e spostati sotto la sorgente UVB alla distanza desiderata. Questo passaggio va effettuato il più velocemente possibile per evitare la sedimentazione delle cellule su uno strato 2D. Il campione è lasciato sotto la lampada fino all'ottenimento della completa fotopolimerizzazione: il tempo di esposizione

viene scelto in base ai parametri quali grado di metacrilazione, concentrazione di PI, distanza dalla sorgente secondo la caratterizzazione descritta nel paragrafo 2.2.3 .

Il campione così ottenuto viene posto in una piastra multi pozzetto, sciacquato in PBS per eliminare cellule non incluse e gel non reticolato e coperto con mezzo di coltura. La piastra è posta in incubatore a 37°C e il campione è tenuto in coltura, per tempi diversi a seconda dell'applicazione, cambiando il mezzo ogni tre giorni. L'operazione viene ripetuta volta per volta per tutti i campioni necessari.

2.3.3 Analisi del tempo di fotopolimerizzazione in funzione della densità cellulare

La scelta del numero di cellule da includere all'interno di idrogeli allo scopo di ottenere un tessuto funzionale è uno dei parametri fondamentali da considerare e dipende dall'applicazione specifica. In generale, è dimostrato come la formazione *in vivo* di strutture biologiche complesse, quali ad esempio vasi sanguigni, sia strettamente dipendente dall'esistenza di interazioni cellula-cellula[73]. Perché questo fenomeno sia replicabile *in vitro* occorre che la densità cellulare iniziale all'interno della matrice artificiale permetta alle cellule di interagire e di instaurare una comunicazione intercellulare tale da portare alla formazione di interconnessioni.

Prima di stabilire la densità cellulare ottimale che porti le HUVEC considerate a interagire e innescare uno scambio intercellulare di segnali biochimici all'interno del GelMA, si è analizzato come e se la densità cellulare influenzasse il processo di fotopolimerizzazione dell'idrogelo. Scopo di questa indagine è stata la definizione di un intervallo di densità cellulari nel quale poter spaziare per la scelta di un valore ottimale per questo parametro.

Le densità cellulari considerate sono state 0.1, 1, 10 e 100 milioni di cellule/ml di prepolimero. Il parametro analizzato è stato il tempo di reticolazione per verificare se, a parità di grado di metacrilazione (alto), concentrazione di PI (0.5% w/v) e distanza dalla sorgente UV (50mm), la presenza di densità diverse di cellule influenzasse il processo di fotopolimerizzazione del GelMA.

Per ottenere un risultato visivamente e qualitativamente chiaro dell'ottenimento di idrogeli polimerizzati contenenti diverse densità cellulari, i campioni sono stati sottoposti al saggio MTT. L'utilizzo di questo saggio permette un'analisi qualitativa della differenza nel numero di cellule incluse in ogni campione basata sull'intensità del colore violaceo dovuto ai cristalli di formazano. L'acronimo MTT indica il composto bromuro di 3-(4,5-

dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio che viene ridotto dalle deidrogenasi, presenti solamente nei mitocondri delle cellule vive, e si converte in cristalli di formazano dal colore violaceo. Per effettuare il saggio gli idrogel contenenti le HUVEC sono stati incubati a 37 °C con 1 ml di soluzione 500 µg/ml di MTT (Sigma) in mezzo HUVEC per 6 ore, dopo le quali si è osservata la differenza nella colorazione dei campioni.

2.3.4 Analisi di vitalità cellulare in seguito alla fotopolimerizzazione

Un aspetto critico nell'utilizzo di un idrogelo fotopolimerizzabile per l'inclusione di cellule è la potenziale citotossicità del processo[56]. In seguito all'irraggiamento UV, le molecole del fotoiniziatore sono scisse in radicali, i quali iniziano la formazione di un network con le catene polimeriche. Questi radicali possono reagire direttamente con membrana, proteine o acidi nucleici cellulari, inducendo danni. Per questo motivo, la citocompatibilità del processo di fotopolimerizzazione del GelMA sintetizzato è stato valutata dopo 24 ore dall'ottenimento dell'idrogelo. Diversi parametri del processo sono stati variati (concentrazione di fotoiniziatore, grado di metacrilazione e tempo di esposizione), per definirne l'influenza sulla vitalità cellulare (Figura 2.10).

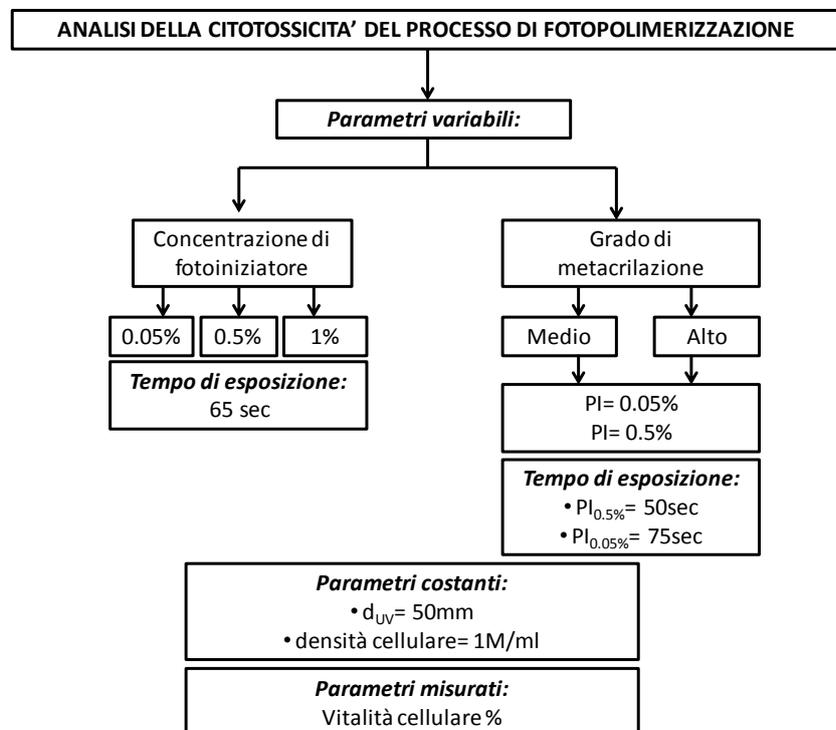


Figura 2.10 Schema delle condizioni testate nell'analisi di vitalità cellulare *post crosslinking*

Il primo parametro considerato è stata la concentrazione di fotoiniziatore Irgacure 2959. Le concentrazioni confrontate sono state 0.05% w/v, 0.5% w/v e 1% w/v, testate mantenendo costanti il grado di metacrilazione (alto) e il tempo di esposizione UV, scelto in modo da permettere la polimerizzazione in tutte le condizioni di PI (è stato utilizzato il tempo necessario alla polimerizzazione nella condizione più sfavorevole, coincidente con la concentrazione di PI 0.05% e pari a 65sec).

Il secondo parametro considerato è stato il grado di metacrilazione attraverso il confronto dei tre diversi lotti sintetizzati. In questo caso, il confronto è avvenuto su due concentrazioni di foto iniziatore (0.05% w/v e 0.5% w/v) per indagare se l'influenza del livello di metacrilazione variasse al variare del tempo di esposizione (maggiore nel caso di PI= 0.05% w/v). Ancora una volta il tempo di esposizione alla fonte UV utilizzato è stato quello minimo che garantisce la polimerizzazione in tutte le condizioni.

I parametri mantenuti costanti per tutte le condizioni sono stati la distanza dalla sorgente UV (50mm) e la densità cellulare (1M/ml).

Tutte le condizioni citate sono state ripetute in triplicato e i campioni, preparati come descritto nel paragrafo 2.2.3 , sono stati mantenuti in incubatore a 37°C per 24 ore, al termine delle quali è stato eseguito il saggio LIVE/DEAD (Invitrogen).

Il saggio LIVE/DEAD fornisce un metodo visivo per la simultanea determinazione di cellule vive e morte grazie all'utilizzo di due sonde molecolari che misurano parametri caratteristici della vitalità cellulare, quali l'attività intracellulare delle esterasi e l'integrità della membrana cellulare. Le cellule vive sono marcate dalla conversione enzimatica (operata dall'esterasi) della calceina AM non fluorescente in calceina ad intensa fluorescenza verde ($\lambda_{eccitazione} \sim 495$ nm, $\lambda_{emissione} \sim 515$ nm). Le cellule morte sono invece marcate dall'omodimero 1 di etidio (EthD-1), che entrando attraverso la membrana danneggiata, subisce un aumento di fluorescenza di 40 volte legandosi agli acidi nucleici emettendo nel rosso ($\lambda_{eccitazione} \sim 528$ nm, $\lambda_{emissione} \sim 617$ nm).

Grazie alla fluorescenza delle HUVEC GFP utilizzate, è stato in realtà possibile eseguire la sola colorazione con EthD-1, ottenendo un risultato analogo a quello descritto. La soluzione finale è stata preparata diluendo l'EthD-1 (componente B del kit) in PBS secondo una diluizione 500x (in questo modo si ottiene una concentrazione di 4 μ M, partendo dallo stock 2mM). La quantità di soluzione, protetta dalla luce a causa della fotosensibilità dell'EthD-1, è stata calcolata in maniera tale da essere sufficiente a coprire

interamente tutti i campioni esaminati (per campioni in piastre a 6 pozzetti sono stati considerati 3ml a campione, per piastre da 12 pozzetti 1ml a campione). Una volta sciacquati in PBS, i campioni sono stati trattati con la quantità prestabilita di soluzione EthD-1. Dopo 40 minuti di incubazione al buio a 37°C, i campioni sono stati lavati almeno due volte in PBS per eliminare l’EthD-1 non reagito. I campioni sono quindi stati analizzati con il microscopio a fluorescenza utilizzando il filtro ottico FITC ($\lambda_{\text{eccitazione}}=470-490\text{nm}$, $\lambda_{\text{emissione}}>520\text{nm}$) per visualizzare le cellule vive in verde, e il TRITC ($\lambda_{\text{eccitazione}}=530-550\text{ nm}$, $\lambda_{\text{emissione}}=600-640\text{nm}$) per eccitare il marker EthD-1 in quelle morte, che fluoresce nel rosso. Per ogni campione sono stati scelti tre punti significativi per i quali sono state acquisite su diversi piani orizzontali (in modo da tenere in considerazione la disposizione tridimensionale) tre immagini LIVE, tre immagine DEAD e tre in contrasto di fase. Le immagini LIVE e DEAD corrispondenti sono state sovrapposte con la funzione MERGE del software utilizzato (CellF, Olympus).

Per ogni campione, sono state contate le cellule vive e morte per ognuno dei tre punti considerati (come media tra i tre piani) attraverso la funzione *Cell Counter* del software *ImageJ*. La vitalità cellulare del singolo campione è stata quindi quantificata con la seguente formula:

$$\text{Vitalità \%} = \frac{\text{Numero cellule vive}}{\text{Numero cellule vive} + \text{Numero cellule morte}} * 100$$

Per ogni condizione considerata sono state poi calcolate media e deviazione standard. La presenza di differenze statisticamente significative tra le condizioni confrontate è stata analizzata attraverso il test statistico *One way ANOVA* seguito dal test *post-hoc* di Bonferroni, utilizzando il software GraphPad Prism v5.00 (GraphPad Software, USA).

2.3.5 Analisi della distribuzione 3D delle cellule nel gel

In seguito all’ottenimento di microstrutture di GelMA fotopolimerizzato con inclusione di HUVEC a diverse densità cellulari, l’effettiva distribuzione delle cellule all’interno del gel è stata oggetto di verifica. Per essere utilizzato come matrice biomimetica per la coltura 3D di cellule, il materiale sintetizzato non deve solo permettere l’inclusione di cellule durante il processo di fotopolimerizzazione, ma deve anche garantire il mantenimento di una distribuzione 3D al suo interno. Il parametro critico per l’ottenimento di una distribuzione

omogenea delle cellule attraverso tutto lo spessore del gel è il tempo: maggiore è il tempo necessario ad ottenere una matrice di gelatina reticolata, più le cellule tendono a sedimentare sul fondo del campione per azione della forza di gravità. Per questo motivo, è stato analizzato come incrementi della distanza del campione dalla sorgente UV durante la fotopolimerizzazione (20mm, 50mm e 125mm) e conseguenti incrementi nella durata del crosslinking (30, 40 e 90 sec) influenzassero la distribuzione 3D delle cellule nel gel. Le dimensioni dei campioni fotopolimerizzati sono di 60mm di diametro e 1mm di altezza. Ogni condizione è stata ripetuta in triplicato e immagini delle sezioni laterali sono state prese sia in contrasto di fase che in fluorescenza, sfruttando la fluorescenza delle HUVEC GFP. Per la quantificazione, ogni campione è stato quindi diviso in due strati (superiore e inferiore) ed è stato eseguito un confronto tra i due basandosi sulla conta del numero di cellule presenti nelle immagini in fluorescenza.

Per ogni condizione considerata sono state poi calcolate media e deviazione standard. La presenza di differenze statisticamente significative tra i due strati confrontati è stata analizzata attraverso il test statistico *t di student* seguito dal test *post-hoc* di Bonferroni, utilizzando GraphPad Prism v5.00 (GraphPad Software, USA).

2.3.6 Coltura cellulare a lungo termine: analisi di spreading, proliferazione e attività metabolica cellulare

Le potenzialità del GelMA sintetizzato come matrice 3D biomimetica sono state valutate attraverso una coltura a lungo termine (7giorni) finalizzata ad analizzare il comportamento delle cellule incluse nel gel in termini di spreading, proliferazione e attività metabolica.

Uno schema delle condizioni testate è fornito in Figura 2.11.

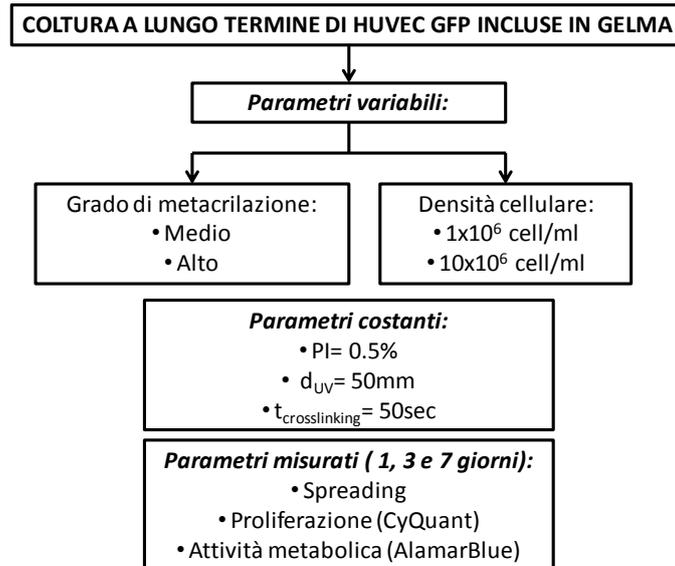


Figura 2.11 Schema delle condizioni testate nell'esperimento di coltura cellulare a 7 giorni di HUVEC GFP incluse in GelMA

Il confronto è avvenuto sui due lotti ad alta e media metacrilazione e a due diverse concentrazioni cellulari (1 M/ml e 10 M/ml), mantenendo costanti la concentrazione di PI a 0.5% w/v e il tempo di esposizione a 50sec (tempo necessario per la polimerizzazione del gel a media MA).

Per la preparazione dei campioni è stato seguito il protocollo descritto nel paragrafo 2.3.1 . Ogni condizione testata è stata ripetuta in triplicato per i diversi *time points* (1, 3, 7 giorni). Una volta preparati, i campioni sono stati lasciati in coltura in 1ml di mezzo per HUVEC; il mezzo è stato cambiato ogni tre giorni. Per ogni condizione di densità cellulare sono poi state create sei aliquote di riferimento da 15 μ l, tre congelate ed utilizzate in seguito come controllo per definire il valore di pgDNA/cellula nel saggio CyQuant, tre piastrate e mantenute nelle stesse condizioni di coltura dei campioni di GelMA come controllo 2D per lo spreading.

Ad ogni time point i campioni sono stati analizzati in termini di spreading (immagini a microscopio), attività metabolica (saggio AlamarBlue, Invitrogen) e proliferazione cellulare (Saggio CyQuant, Invitrogen). Per ogni condizione e per ogni time point sono state eseguite tutte e tre le analisi citate, in modo da avere una correlazione significativa tra i dati ottenuti.

Analisi qualitativa dello spreading cellulare

Per l'analisi dello spreading cellulare (appiattimento della cellula finalizzato alla locomozione) i campioni sono stati osservati a microscopio ottico, provvisto di fotocamera per l'acquisizione delle immagini. Per ogni campione, sono state acquisite immagini in contrasto di fase e in fluorescenza (ingrandimento 10x). Ad ogni time point ci si è concentrati sull'analisi qualitativa della vitalità cellulare, della formazione di network e della distribuzione e del comportamento delle cellule nei diversi piani del gel. Un parametro al quale è stata posta attenzione è stato la presenza di cellule al di fuori del gel (nel medium di coltura o adese al vetrino di supporto), come parametro per valutare l'eventuale disgregazione dell'idrogelo. Per fare questo è stata analizzata un'aliquota del mezzo di coltura di ogni campione prima dell'esecuzione dei saggi successivi. Ad ogni time point, i campioni usati come riferimento 2D sono stati a loro volta analizzati come controllo.

Analisi di proliferazione cellulare: saggio Cyquant

Per la quantificazione del contenuto di DNA cellulare è stato effettuato un saggio spettrofotometrico mediante il kit CyQuant, che impiega una sonda fluorescente in grado di legare in maniera specifica gli acidi nucleici presenti all'interno della cellula.

Per realizzare il saggio vengono utilizzati i seguenti reagenti:

- CyQuant GR dye (component A);
- cell-lysis buffer (componente B);
- λ DNA standard necessario a costruire la curva di calibrazione.

Per l'esecuzione di questo saggio è necessario effettuare la lisi delle membrane cellulari per riuscire a estrarre il contenuto di DNA cellulare. Nel caso specifico ogni campione è stato trasferito dal vetrino in una fiala eppendorf con l'aiuto di un puntale da 30 μ l, avendo cura di trasportare tutto il gel per evitare sottostime cellulari. I campioni sono stati quindi congelati e conservati a -20°C sino alla conclusione dell'intero esperimento. Per la digestione, a ogni campione portato a temperatura ambiente sono stati aggiunti 250 μ L di soluzione costituita da proteinaseK. I campioni immersi in soluzione sono stati poi posti in un termoagitatore a 60 °C per 16 ore, per favorirne la digestione.

Per la quantificazione del contenuto di DNA è necessario ottenere una curva di riferimento standard (a 5 punti) a concentrazione nota necessaria a convertire i valori di intensità di fluorescenza letti allo spettrofotometro in concentrazioni di DNA. In Figura 2.12 è rappresentata la curva realizzata.

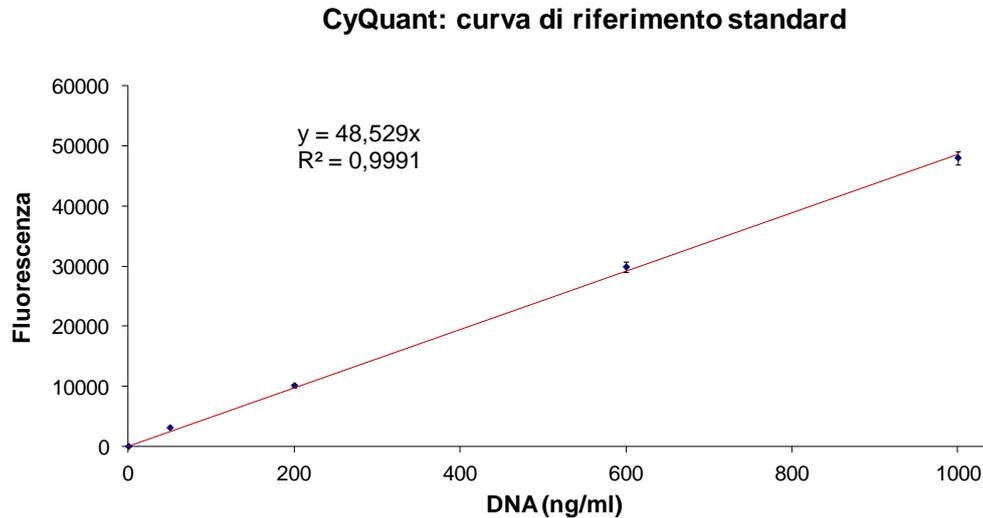


Figura 2.12 Curva standard per la conversione dei valori di fluorescenza dei campioni in valori di numero di cellule presenti nel campione stesso. La curva è stata preparata, come indicato nel protocollo, per i seguenti valori: 0, 50, 200, 600 e 1000 ng/ml

Considerando letture in triplicato, per ogni campione sono stati preparati 600 μL di soluzione di lavoro costituita dal componente A (400 X) e dal componente B (20 X) diluiti in un opportuno volume di acqua bi-distillata (H_2O RNA-ase e DNA-ase free, GIBCO). Per la lettura in fluorescenza, in questo caso alla lunghezza d'onda di 520 nm, è necessario utilizzare 200 μL della soluzione che si vuole analizzare, ponendoli in una piastra multipozzetto a 96 pozzetti a fondo nero. La soluzione da analizzare è ottenuta prelevando 5 μL da ciascuna sospensione in seguito alla disgregazione delle membrane cellulari dei campioni, ai quali vengono addizionati 195 μL della soluzione di lavoro, composta dalla sonda intercalante il DNA e dal lisante cellulare. A partire dalla lettura di assorbanza e utilizzando la curva di calibrazione, è stata ricavata la concentrazione di DNA presente nel campione. Considerando i valori ottenuti dai campioni di riferimento, dei quali è noto il numero di cellule, è di conseguenza possibile risalire al numero di cellule per ogni campione.

Analisi quantitativa dell'attività metabolica cellulare: saggio Alamar Blue

Tutti i campioni rappresentanti le diverse condizioni testate e i campioni di controllo 2D sono stati caratterizzati per determinare la vitalità cellulare tramite il test AlamarBlue, che risulta essere un test non tossico per le cellule. Il saggio AlamarBlue funziona come un indicatore di vitalità cellulare in quanto sfrutta il potere riducente delle cellule vitali misurando quantitativamente l'attività metabolica. Le cellule vitali hanno infatti un'attività mitocondriale attiva in grado di mantenere un ambiente riducente all'interno della cellula. Il componente attivo dell'AlamarBlue è la resazurina, un composto non tossico, in grado di attraversare le membrane cellulari, che presenta una colorazione tendente al blu e che produce un segnale fluorescente in risposta ad una attività metabolica. Infatti, la resazurina, che è un indicatore non fluorescente, viene ridotta in resorufina (Figura 2.13) che invece risulta altamente fluorescente ($\lambda_{ecc} = 530 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 590 \text{ nm}$), dalle cellule metabolicamente attive.



Figura 2.13 Riduzione della resazurina (non fluorescente) in resorufina (altamente fluorescente)

Questa variazione di fluorescenza, che può essere quantificata tramite fluorimetria, viene accompagnata anche da una variazione colorimetrica passando dal blu (forma ossidata) al rosso (forma ridotta). Per quanto concerne la metodica utilizzata, sono stati preparati per ogni campione 900 μL di una soluzione filtrata contenente il terreno di coltura utilizzato negli esperimenti, addizionato con AlamarBlue alla concentrazione del 10%. I campioni immersi nella soluzione vengono posti in incubatore a 37 °C per 4 ore; al termine di questo periodo, un'aliquota di 200 μL di medium contenente il colorante viene prelevata e trasferita in una piastra multipozzetto a fondo nero per effettuare l'analisi della fluorescenza allo spettrofotometro (lunghezza d'onda di lettura 540 nm). Ogni lettura è eseguita in triplicato. I campioni, dopo alcuni lavaggi con tampone fosfato PBS per eliminare i residui del colorante, sono stati preparati per i successivi saggi.

2.4 Mold patterning

Recenti studi hanno dimostrato[16, 39, 74] come gli idrogeli abbiano notevoli potenzialità nel ricreare *in vitro* ambienti biomimetici per la crescita cellulare che mimino la complessa tridimensionalità e le caratteristiche chimico-fisiche della ECM *in vivo*. L'utilizzo di tecniche quali la *photolithography* e la *soft lithography* per ottenere mold microstrutturati per l'incapsulamento di cellule in *patterns* di idrogeli a geometria definita e controllata, permette di raggiungere una maggiore affinità con il microambiente biologico.

In questo lavoro di tesi è stata approfondita la potenzialità del mold patterning di idrogeli fotopolimerizzabili come strumento per ottenere incapsulamento di cellule in matrici alla microscala, 3D e dalla geometria controllata. Nel mold patterning, la fotopolimerizzazione dell'idrogelo avviene attraverso uno stampo elastomerico micro strutturato.

2.4.1 Realizzazione degli stampi per la fabbricazione del dispositivo

Per la fabbricazione degli stampi elastomerici è stata utilizzata la tecnica di soft-litografia. La soft-litografia è una tecnologia derivata dalla fotolitografia, sviluppata dal gruppo di Whitesides all'Università di Harvard[75]. Questa tecnica di microfabbricazione *top-down* consente la produzione di elastomeri stampati utilizzando patterns in rilievo su di una superficie (Figura 2.14). Da questi si possono fabbricare o replicare micro- o nano-strutture in modo semplice ed economico tramite diversi metodi, tra cui Replica Molding (REM), Microcontact-printing (mcP), microtransfer-Molding (mTM), Solved Assisted microMolding (SAMIM) e micromolding in capillaris (MIMIC) che è in particolare l'applicazione analizzata in questa parte del lavoro di tesi.

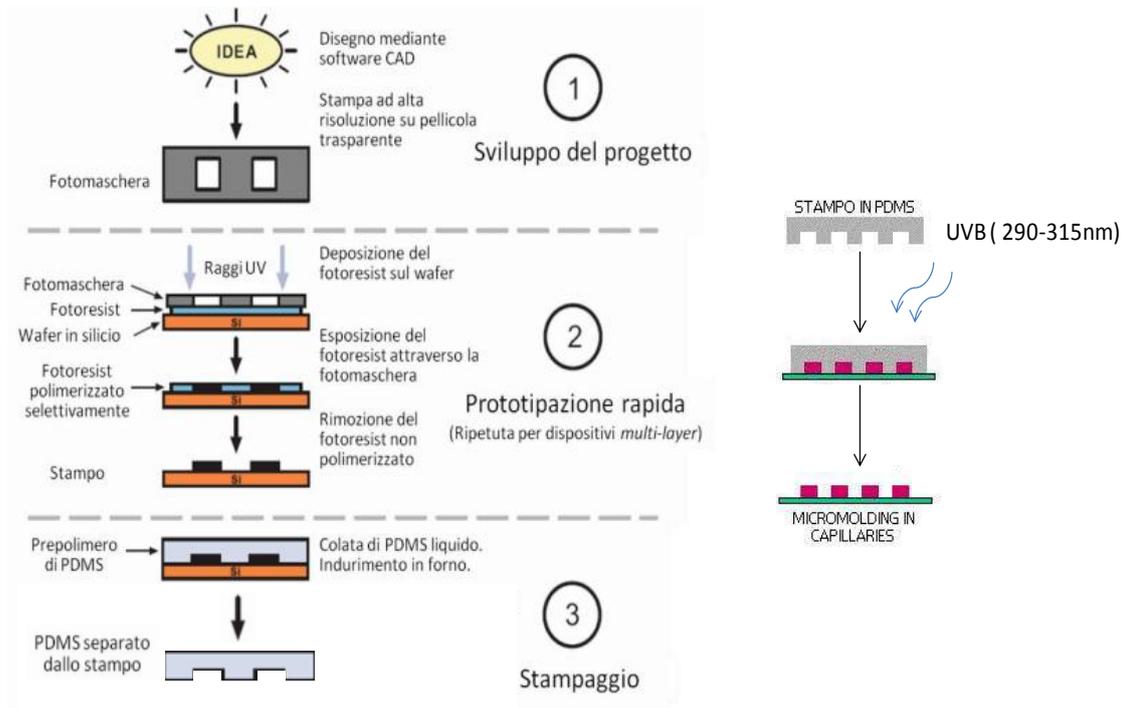


Figura 2.14 Tecnica di soft litografia per l'ottenimento di uno stampo elastomerico e suo utilizzo in applicazioni di micromolding in capillari

L'elemento caratterizzante la soft-litografia è una replica elastomerica, usata per stampare o replicare su differenti substrati il disegno (pattern) presente su una maschera (master) di partenza. L'elastomero maggiormente usato è il PDMS. I procedimenti seguiti in una tipica tecnica soft-litografica prevedono inizialmente la realizzazione del master su un wafer di silicio (o altri materiali come quarzo o metallo) e la produzione di una sua copia elastomerica in negativo, attraverso l'uso di materiali polimerici le cui proprietà sono scelte in base alle caratteristiche del pattern. Sulla superficie del master, che presenta strutture in rilievo, si versa, in modo da ricoprirle completamente, il liquido prepolimerico di un elastomero. Quest'ultimo, dopo la polimerizzazione, usualmente termica, in seguito alla quale aumenta di viscosità e diventa solido, viene rimosso meccanicamente dal master e costituisce una copia in negativo del pattern iniziale, chiamata replica elastomerica. I processi di fabbricazione del master, la realizzazione della replica e l'adesione di questa al substrato sono comuni a tutti i metodi di soft-litografia, il metodo con cui avviene il trasferimento del pattern al substrato finale varia a seconda della particolare tecnica.

Per questo lavoro di tesi, lo stampo su wafer di silicio è stato realizzato presso la camera bianca del L-NESS Polo regionale di Como (Politecnico di Milano). La maschera, stampata ad alta risoluzione (32000dpi) è stata utilizzata per esporre parzialmente un

polimero fotosensibile (SU8-50, Microchem) preventivamente depositato uniformemente su un wafer di silicio da 4”.

2.4.2 Fabbricazione del dispositivo per il mold patterning

Il dispositivo utilizzato per il mold patterning di GelMA è stato realizzato attraverso l’assemblaggio di uno stampo micro strutturato in PDMS, trattato al plasma (in aria) per 1 minuto per aumentarne l’idrofilicità, con un vetrino trattato con TMSPMA (Figura 2.15).

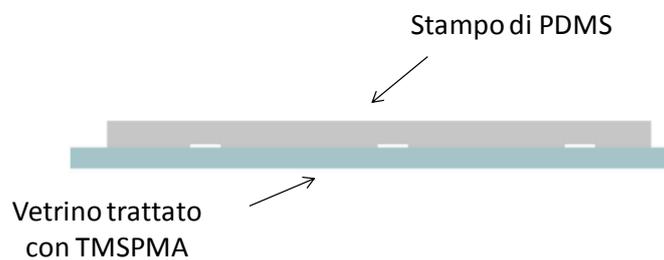


Figura 2.15 Rappresentazione schematica dello stampo utilizzato per il mold patterning di GelMA

Il PDMS è un polimero elastomerico a base siliconica che presenta proprietà che lo rendono un ottimo materiale per la realizzazione di dispositivi microfluidici, tramite tecnica soft-litografica. Questo materiale polimerico è infatti chimicamente inerte, termicamente stabile, permeabile ai gas, semplice da maneggiare e manipolare, mostra proprietà isotropiche e omogenee, è economico ed è in grado di conformarsi anche a strutture sub-micrometriche per la replica e il trasferimento di microstrutture[76]. Il PDMS possiede una struttura chimica che consiste nella ripetizione di unità $-\text{OSi}(\text{CH}_3)_2-$, in cui in particolare il gruppo $-\text{CH}_3$ contribuisce a renderlo idrofobico. Tale proprietà è evidenziata da una bassa bagnabilità in presenza di solventi acquosi, dal fatto che la superficie di dispositivi realizzati con questo materiale risulta incline all’adsorbimento non specifico di proteine e cellule, e che i microcanali costruiti in PDMS sono in grado di intrappolare le bolle d’aria formatesi al loro interno. Per quanto riguarda l’interazione con gli idrogeli, la sua natura idrofobica permette una separazione dello stampo dal pattern senza l’induzione di danni alla struttura dell’idrogelo.

Lo stampo in PDMS è stato ottenuto mediante replica molding, ovvero per colata di una soluzione di PDMS e sua successiva polimerizzazione. La soluzione di PDMS si ottiene come descritto in precedenza (paragrafo 2.2.3). Dopo il mescolamento manuale, la

soluzione viene posta sotto vuoto per favorirne il debollamento. Tale step viene ripetuto anche dopo la sua colata sugli stampi microfabbricati. Ultimo passo del processo riguarda la reticolazione, che avviene in stufa a 80°C per 2 ore. L'esecuzione di un trattamento al plasma dello stampo di PDMS prima dell'adesione al vetrino di supporto dipende dalla necessità di rendere lo stampo elastomerico idrofilico, per favorire il riempimento capillare de prepolimero di gel. uesto trattamento genera temporaneamente sulla superficie del PDMS gruppi silanolici (Si-OH) grazie all'ossidazione dei gruppi metilici. La superficie esposta al plasma rimane infatti idrofilica indefinitamente se posta in contatto con una soluzione acquosa o con solventi polari, mentre in aria il riarrangiamento chimico riporta velocemente in superficie i gruppi idrofobici, abbassando così l'energia libera superficiale. Per tale motivo, l'assemblaggio dello stampo così attivato con il vetrino e il riempimento dei canali ottenuti deve avvenire rapidamente.

Gli stampi (o chip) utilizzati presentano due geometrie costituite da canali di larghezza 250µm e altezza 100µm. Lo stampo 1 è definito da tre canali paralleli di lunghezza 20mm posti a 4750µm l'uno dall'altro. Lo stampo 2 è definito da tre canali che presentano la geometria mostrata in Figura 2.16.

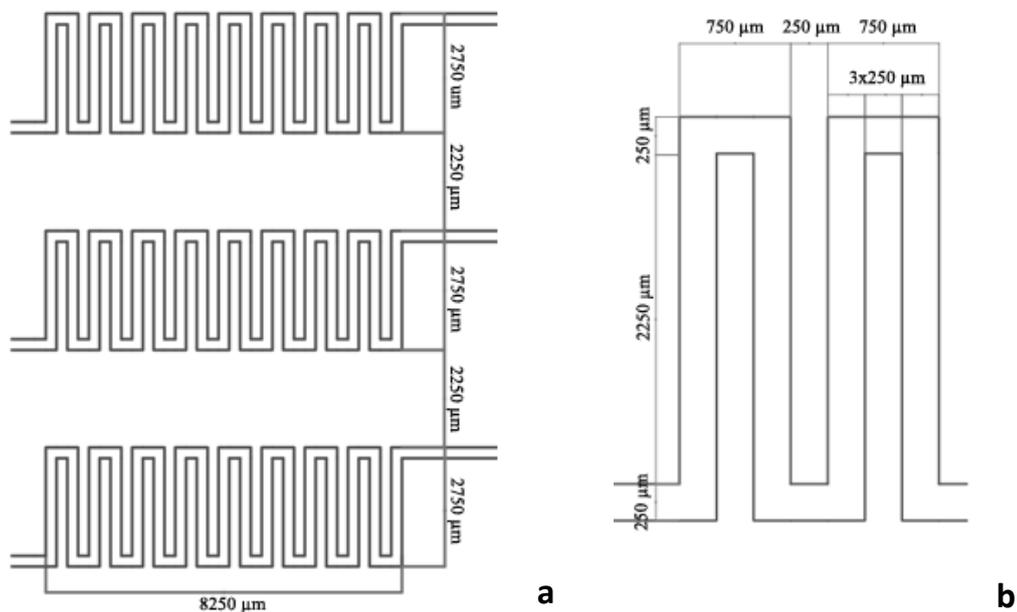


Figura 2.16 (a) Geometria e quotatura del chip2. (b) Dettaglio costruttivo

La scelta di queste geometrie ha una duplice funzione. In primo luogo si è voluto paragonare la possibilità di intrappolare cellule in canali dritti piuttosto che contenenti angoli a 90° , i quali rappresentano un punto critico nell'ottenimento di una distribuzione cellulare omogenea[28]. In secondo luogo, in vista di una futura applicazione nell'ambito della micro vascolarizzazione *in vitro*, la scelta di canali paralleli rappresenta un primo passo per l'ottenimento di singoli vasi, mentre il secondo tipo di canale potrebbe essere un punto di partenza per l'ottenimento di network di capillari.

2.4.3 Fotopolimerizzazione attraverso PDMS: trasmittanza dei raggi UVB

Una delle caratteristiche che rendono il PDMS un ottimo candidato per la realizzazione di stampi attraverso i quali ottenere foto pattern in GelMA è la sua trasparenza ottica a lunghezze d'onda $>280\text{nm}$ [77, 78] (Figura 2.17).

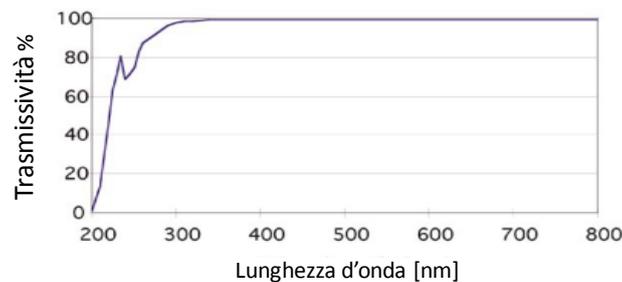


Figura 2.17 Percentuale di trasmittività teorica di uno strato di PDMS spesso 1mm [78]

Questo è di fondamentale importanza in quanto l'interposizione di un materiale tra la sorgente UV e il prepolimero di GelMA, potrebbe incrementare il tempo necessario all'ottenimento della reticolazione nel caso in cui i raggi ultravioletti fossero in parte assorbiti dall'intermediario. Ciò accade per esempio in presenza di vetro o polistirene e ha effetti negativi sulle cellule in quanto il tempo di esposizione ai raggi UV è uno dei parametri che influenzano la vitalità e la sedimentazione di cellule incapsulate in idrogeli fotopolimerizzabili[58].

Per questo motivo si è voluto indagare l'effettiva trasparenza del PDMS ai raggi UVB e la relazione tra tempo di fotopolimerizzazione e spessore di PDMS. Per far questo sono stati preparati foglietti di PDMS di spessore 300, 750 e 1500 μm (il procedimento di fabbricazione del PDMS è lo stesso descritto nel paragrafo 2.2.3) ed è stato registrato il tempo di crosslinking del GelMA attraverso questi strati di elastomero. Le prove sono state eseguite a concentrazione di foto iniziatore 0.5% e sul lotto di GelMA ad alta

metacrilazione. Il tempo richiesto è stato poi confrontato con i dati ottenuti in assenza di PDMS (paragrafo 3.1.3) per verificare che l'interposizione di uno strato di polidimetilsilossano non influenzasse la polimerizzazione del gel.

2.4.4 Analisi quantitativa di fedeltà del pattern

Uno dei problemi principali nell'ottenimento di pattern attraverso l'uso di fotomaschere è la risoluzione della geometria finale. Infatti, per ottenere pattern ad alta risoluzione è necessario disporre di una fonte luminosa ad elevata densità e con raggi collimati, in modo da attraversare la maschera perpendicolarmente. La difficoltà nell'ottenere un'adeguata fedeltà nel pattern è maggiormente evidente in geometrie di dimensioni inferiori ai 100µm, per le quali si ottengono spesso bordi non definiti o canali più spessi di quelli desiderati[65].

Per verificare che questo limite potesse essere superato attraverso un approccio diverso, quale il mold patterning, la risoluzione dei pattern ottenuti per fotopolimerizzazione attraverso i due stampi in PDMS è stata quantificata. I pattern sono stati ottenuti iniettando la soluzione di prepolimero all'ingresso dei canali dei chip e avviando il processo di fotopolimerizzazione al termine del completo riempimento che avviene per capillarità. È stato eseguito un confronto tra i due lotti a media e alta metacrilazione per verificare se questo parametro influenzasse la risoluzione dei pattern ottenibili. Le grandezze su cui ci si è focalizzati sono state la larghezza dei canali e lo spessore, analizzate da un punto di vista quantitativo attraverso misurazioni in ImageJ e successiva normalizzazione in percentuale rispetto alle dimensioni dello stampo di partenza. La larghezza dei canali dello stampo di PDMS è stata utilizzata come metro per la misura dell'altezza dei canali. Infatti, tale dimensione, pari a 250µm, è imposta durante la produzione in camera bianca e mantenuta anche dopo la colata di PDMS (a meno di un restringimento naturale pari a 1.7% di cui si è tenuto in considerazione). Per quanto riguarda la risoluzione degli angoli del chip numero due, è stato eseguito un confronto qualitativo tra il pattern di GelMA e lo stampo di PDMS. Ogni condizione testata è stata ripetuta in triplicato e la presenza di differenze statisticamente significative tra le condizioni confrontate è stata analizzata attraverso il test statistico *One way ANOVA* seguito dal test *post-hoc* di Bonferroni, utilizzando il software GraphPad Prism v5.00 (GraphPad Software, USA).

2.4.5 Mold patterning con cellule

Dopo le fasi sopra descritte di caratterizzazione non biologica della tecnica di mold patterning associata al GelMA sintetizzato, si è passati ad un'analisi del comportamento delle cellule incapsulate in micro geometrie controllate di GelMA. Uno schema delle condizioni testate è fornito in Figura 2.18.

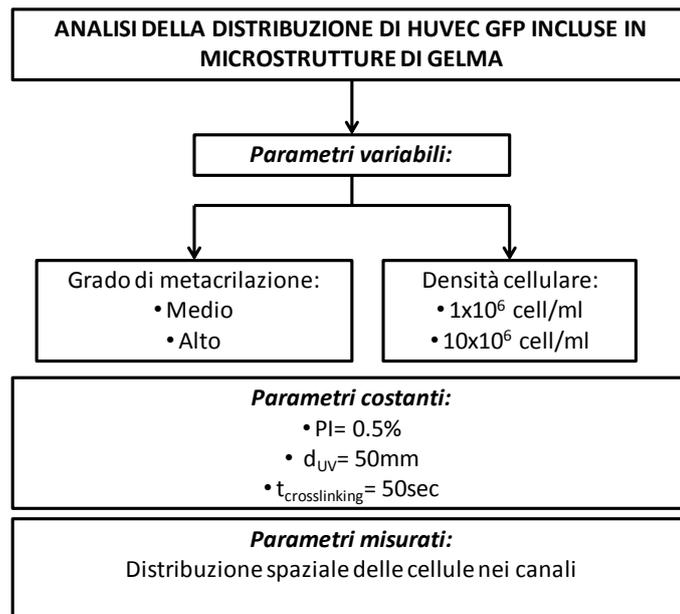


Figura 2.18 Schema delle condizioni testate analisi della distribuzione di HUVEC GFP in pattern di GelMA

Il confronto è avvenuto sui due lotti ad alta e media metacrilazione e a due diverse concentrazioni cellulari (1×10^6 cellule/ml e 10×10^6 cellule/ml), mantenendo costanti la concentrazione di PI a 0.5% w/v e il tempo di esposizione a 50sec (tempo necessario per la polimerizzazione del gel a media MA). La combinazione di queste condizioni di PI e di tempi di esposizione dovrebbe essere ottimale in termini di citocompatibilità e di ottenimento di una distribuzione 3D delle cellule nel gel.

Il protocollo per l'ottenimento dei campioni segue in linea generale quello descritto nel paragrafo 2.3.2 . Le differenze fondamentali stanno nell'utilizzo del chip di PDMS micro strutturato come stampo per la polimerizzazione del gel, fabbricato in precedenza come descritto nel paragrafo 2.4.2 . Il prepolimero contenente la sospensione cellulare alla densità desiderata è inserito all'ingresso dei canali tramite un puntale (

Figura 2.19).

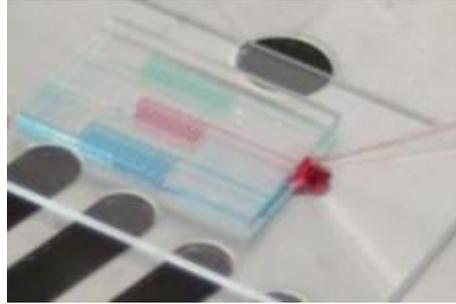


Figura 2.19 Iniezione del prepolimero di GelMA contenente la sospensione cellulare nei micro canali del chip di PDMS

L'iniezione avviene direttamente sotto la lampada UV, per minimizzare i tempi e, di conseguenza, l'effetto di sedimentazione delle cellule. La fotopolimerizzazione inizia al termine del completo riempimento del canale che avviene per capillarità.

Il campione così ottenuto viene posto in una piastra multi pozzetto, sciacquato in PBS per eliminare cellule e gel non reticolato e coperto con mezzo di coltura. La piastra è quindi posta in incubatore ad atmosfera controllata (temperatura di 37°C, concentrazione di CO₂ pari al 5 % e saturazione di vapore) e il campione è tenuto in coltura, cambiando il mezzo ogni tre giorni.

I campioni sono stati osservati sotto microscopio ottico e immagini in contrasto di fase e in fluorescenza (sfruttando la proprietà GFP delle HUVEC utilizzate) sono state acquisite per le analisi successive. Al giorno 0 si è andati ad indagare la distribuzione spaziale delle cellule nei canali. I due parametri analizzati sono stati la distribuzione lungo la lunghezza e sulla sezione trasversale (tridimensionalità) dei canali.

Per quanto riguarda il chip 1, avente canali di lunghezza totale 20mm, è stata considerata la distribuzione cellulare sulla lunghezza, confrontando il numero di cellule presenti in 4 punti (82x900µm) equidistanti tra di loro (circa 5mm) da un'estremità all'altra. La distribuzione sulla larghezza è stata quantificata dividendo il canale in tre fasce di larghezza 82µm e lunghezza 900 µm e contando il numero di cellule su un campionamento di 4 punti equidistanti (circa 5 mm)(Figura 2.20).

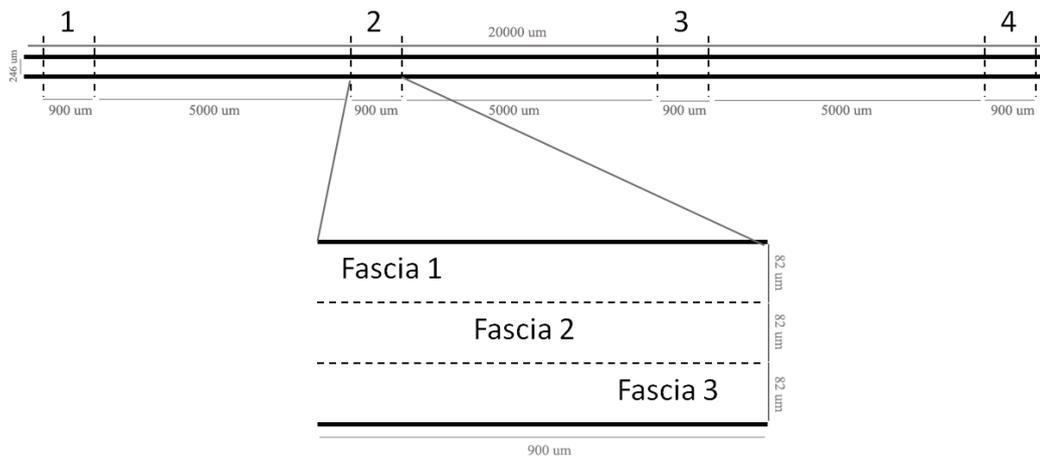


Figura 2.20 Suddivisione dei canali (chip1) per l'analisi della distribuzione cellulare sulla lunghezza. Dettaglio della suddivisione in tre fasce per l'analisi sulla larghezza.

Per quanto riguarda l'uniformità lungo i canali del chip 2 è stato eseguito un confronto tra la quantità di cellule intrappolate nei tratti paralleli e negli angoli, su un campionamento di 3 punti per tipo ($900 \times 670 \mu\text{m}$) posti ad una distanza di $2750 \mu\text{m}$ tra di loro (Figura 2.21).

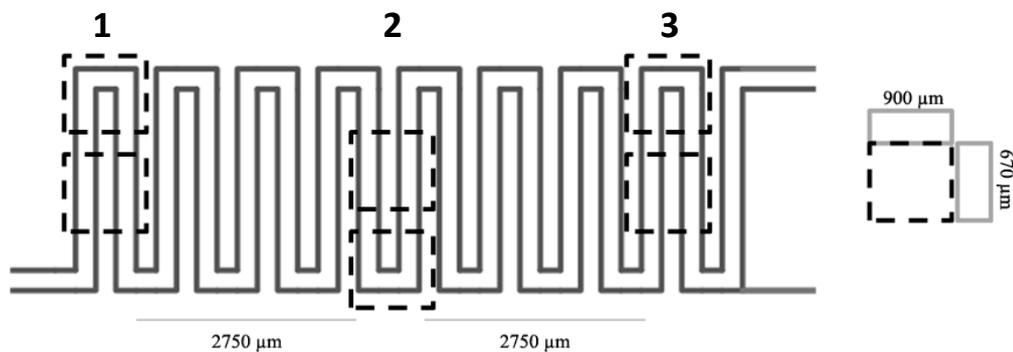


Figura 2.21 Schema della suddivisione dei canali del chip2 per l'analisi della distribuzione cellulare sui tratti rettilinei e sugli angoli

Per quanto riguarda la distribuzione spaziale delle cellule in sezione trasversale, l'analisi qualitativa si è basata sull'acquisizione di immagini della sezione laterale dei pattern, per evidenziare l'eventuale presenza di cellule su più piani.

3 RISULTATI SPERIMENTALI

Nel seguente capitolo verranno presentati i risultati delle prove sperimentali descritte nella sezione precedente.

3.1 Caratterizzazione del materiale

Ciascuna reazione di sintesi volta alla produzione di GelMA è stata innanzitutto valutata in termini di grado di metacrilazione risultante. Successivamente, per ogni tipologia sono state prese in considerazione diverse concentrazioni di agente fotoiniziatore e sono stati valutati: i) le proprietà reologiche dei materiali reticolati; (ii) il tempo richiesto per l'ottenimento di un idrogel (polimerizzazione attraverso irraggiamento UV).

3.1.1 $^1\text{H-NMR}$: analisi del grado di metacrilazione

La spettroscopia di Risonanza Magnetica Nucleare (NMR) è una tecnica analitica strumentale che permette di ottenere dettagliate informazioni sulla struttura molecolare dei composti in esame. Per grado di metacrilazione si intende la percentuale di gruppi amminici, originariamente presenti nella gelatina di collagene, ai quali, durante la reazione di sintesi precedentemente descritta, si sono legati gruppi metacrilati[67]. Il grado di metacrilazione di ognuno dei tre campioni è stato calcolato a partire dagli spettri ottenuti dalle analisi $^1\text{H-NMR}$ sui campioni. I picchi rappresentanti i doppi legami di carbonio, indici della formazione di un legame tra i gruppi carbossilici $-\text{COOH}$ della MA e i gruppi ammina $-\text{NH}_2$ della gelatina, sono stati identificati nella regione 6.06-5.62 ppm degli spettri NMR 1H. Si è proceduto quindi al calcolo dell'integrale sottostante questi picchi, normalizzato per l'integrale del picco caratteristico delle catene aromatiche (7.65-6.95 ppm degli spettri NMR 1H). Il grado di metacrilazione di ogni lotto è stato ottenuto normalizzando gli integrali delle gelatina metacrilate tramite la reazione con diverse concentrazione di MA , per lo stesso picco ottenuto per la gelatina di controllo non metacrilata.

La Figura 3.1 riporta gli spettri NMR 1H dei tre campioni ad (1) alto, (2) medio e (3) basso grado di metacrilazione. I picchi corrispondenti ai doppi legami di carbonio, indici di metacrilazione e riquadrati nei 4 spettri, danno un'informazione visiva sull'aumento del

grado di metacrilazione dal campione a bassa concentrazione di MA a quello a concentrazione maggiore, rispetto al controllo non metacrilato (4).

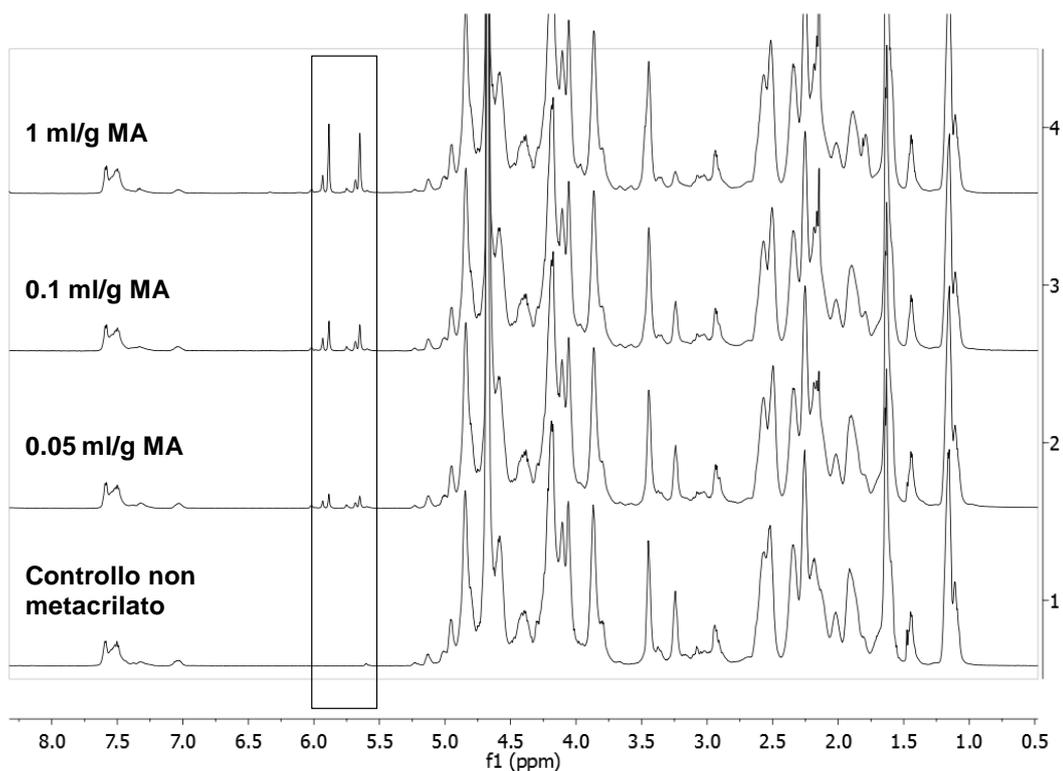


Figura 3.1 Spettri ^1H NMR dei campioni di gelatina di collagene di tipo A. I segnali si riferiscono (1) al campione di controllo non metacrilato e ai tre lotti metacrilati ottenuti con l'aggiunta di (2) 0.05 ml/g MA, (3) 0.1 ml/g MA e (4) 1 ml/g MA durante la sintesi. Tutti gli spettri sono stati acquisiti con i seguenti parametri: numero scansioni 16, tempo di acquisizione 2s, tempo di riciclo 15s.

In Tabella 3.1 sono riportati i risultati delle analisi semiquantitative eseguite sugli spettri, rappresentati da un valore percentuale indicante di grado di metacrilazione rispetto al controllo. I dati mostrano circa un raddoppio del grado di metacrilazione passando da una concentrazione di MA alla successiva.

Tabella 3.1 Tabella riassuntiva dei gradi relativi di metacrilazione dei tre lotti, calcolati come rapporto fra l'integrale dei segnali presenti nella regione 6.06-5.62 ppm e quello dei segnali presenti nella regione 7.65-6.95 dello spettro ^1H -NMR di ciascuno campione

Concentrazione di MA [ml/g]	Grado relativo di metacrilazione [%]
0.05	22
0.1	39
1	77

3.1.2 Test reologici degli idrogeli

Nella Figura 3.2 sono riportati gli andamenti di modulo di *storage* e di *loss* riferiti ai tre lotti di GelMA nelle due condizioni di foto iniziatore testate, ottenuti in seguito ai test reologici.

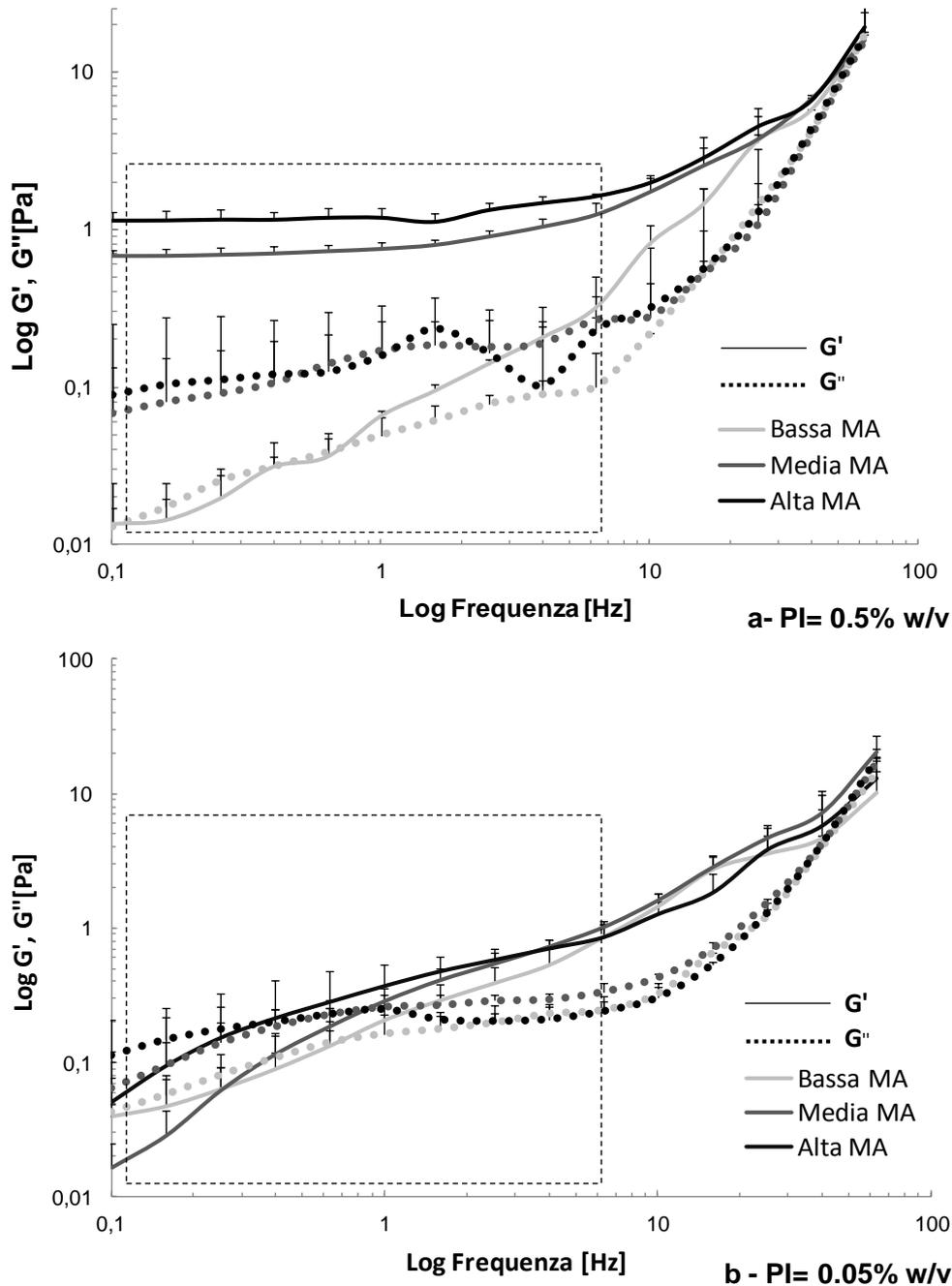


Figura 3.2 Modulo di *storage* e modulo di *loss* in funzione della frequenza. Dati relativi ai tre lotti di GelMA foto polimerizzati per 6 minuti con concentrazione di foto iniziatore (a) 0.5% w/v e (b) 0.05% w/v. Il rettangolo tratteggiato indica la zona di plateau. Gli assi sono rappresentati in scala logaritmica. Le barre di errore identificano le deviazioni standard positive

Dal momento che la maggior parte degli idrogeli, inclusa la gelatina metacrilata presentano modulo elastico relativamente basso, misure dinamiche di forza sono spesso utilizzate per determinarne il comportamento viscoelastico[79]. Dall'analisi del grafico 3.2-a, si identificano valori di modulo di *storage* (G') per i lotti a media e alta metacrilazione superiori di circa dieci volte rispetto a quelli di modulo di *loss* (G'') corrispondenti. Questo risulta valido per la concentrazione maggiore di fotoiniziatore testata (0.5% w/v) nell'intervallo di frequenze considerato da 0.1 a 100 Hz. Questo è indice di un comportamento di solidi viscosi degli idrogeli ottenuti da questi lotti, con PI di 0.5% w/v. Il lotto a bassa metacrilazione, foto polimerizzato nelle stesse condizioni, presenta invece G' comparabile a G'' , comportandosi da liquido viscoso. Alla concentrazione di fotoiniziatore inferiore (0.05% w/v, figura 3.3) i valori di G' si abbassano per tutti e tre i lotti, avvicinandosi di più a quelli di G'' .

All'aumentare della frequenza, si può identificare un range entro il quale il comportamento di G' e G'' si mantiene lineare (identificato nei grafici dal tratteggio): per i lotti ad alta e media metacrilazione, questo intervallo va da 0.1 Hz fino a circa 10 Hz e risulta più marcato a PI pari a 0.5% w/v. Per frequenze più elevate, che rappresentano il comportamento dell'idrogelo in risposta ad alti valori di stress, G' e G'' aumentano rapidamente fino a 100 volte. Le curve rappresentati il lotto a basso grado di MA non presentano al contrario nessun plateau.

3.1.3 Analisi del tempo di fotopolimerizzazione

In Figura 3.3 sono riportati i tempi di irraggiamento necessari per la completa fotopolimerizzazione di campioni posti a tre distanze dalla sorgente UVB (20, 50 e 125mm). Per ogni distanza è riportato il confronto tra i tre lotti di gelatina metacrilata (alto, medio e basso grado di metacrilazione), a quattro concentrazioni di fotoiniziatore (0.05%, 0.1%, 0.5% e 1% w/v).

A parità di concentrazione di fotoiniziatore e distanza dalla sorgente, il lotto ad alta metacrilazione risulta caratterizzato dai tempi di fotopolimerizzazione più bassi, con valori intorno ai 40 secondi considerando condizioni di distanza dalla sorgente e PI intermedie. I tempi aumentano passando al lotto a media metacrilazione, fino a raggiungere i valori più elevati in corrispondenza del lotto a bassa metacrilazione (fino a 200 secondi con massima distanza dalla sorgente e minimo PI).

3. RISULTATI SPERIMENTALI

I tempi necessari alla fotopolimerizzazione aumentano poi in funzione della distanza dalla sorgente UV, per tutte le combinazioni di fotoiniziatore e grado di metacrilazione.

L'influenza della concentrazione di fotoiniziatore sulla durata della fotopolimerizzazione si identifica in un incremento dei tempi, registrato per tutti e tre i lotti, passando da 0.05% w/v, a 0.1% w/v fino a 0,5% w/v di PI. Nel confronto tra concentrazioni di PI 0.5% w/v a 1% w/v non si registra invece nessun incremento nei tempi di fotopolimerizzazione nei lotti a media e bassa metacrilazione, mentre l'aumento risulta minimo nel lotto ad alta metacrilazione. Questo è indice di una probabile saturazione dei gruppi reattivi delle catene polimeriche a opera delle molecole di fotoiniziatore: eccessi di PI non producono quindi incrementi nella reticolazione.

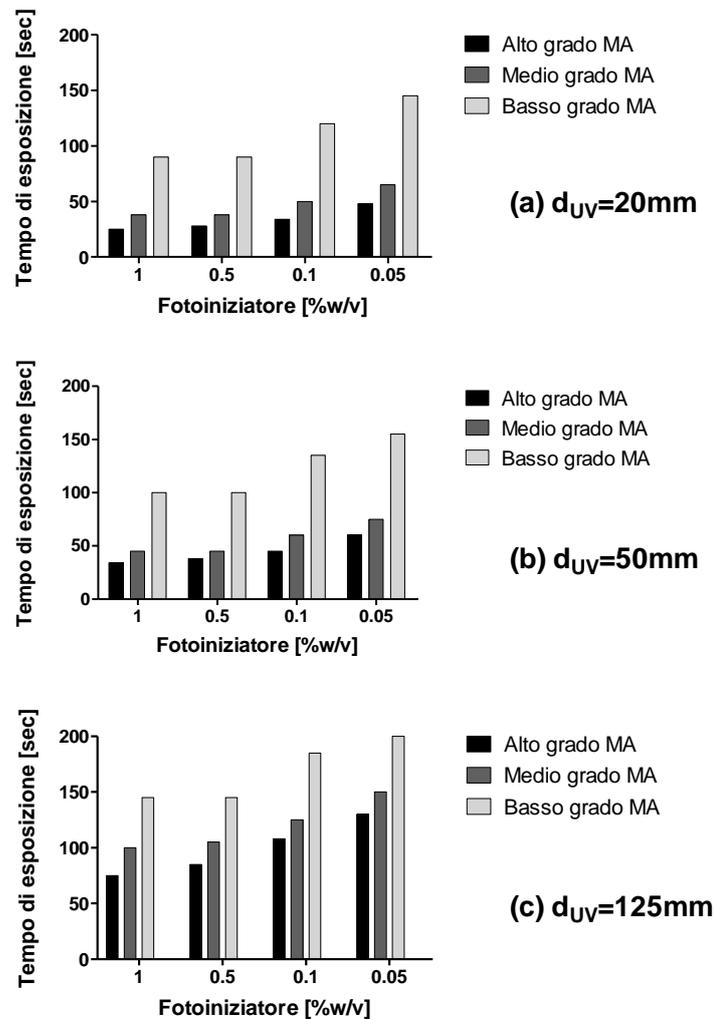


Figura 3.3 Tempi di fotopolimerizzazione dei tre lotti di GelMA (alto, medio e basso gradi di MA) alle diverse concentrazioni di PI (0.05%, 0.1%, 0.5% e 1% w/v) ottenuti a distanze dalla sorgente UVB di (a) 20mm, (b) 50 mm e (c) 125mm

3.2 Test di interazione con le cellule

In questa sezione vengono riportati i risultati ottenuti nei test cellulari per la caratterizzazione biologica del GelMA sintetizzato. In particolare sono mostrate le immagini rappresentative per ogni prova, associate quando presenti a grafici quantitativi elaborati a partire dalle immagini a microscopio o ottenuti dai risultati dei saggi eseguiti.

3.2.1 Analisi del tempo di fotopolimerizzazione in funzione della densità cellulare

Scopo di questa prova sperimentale è stato quello di definire come la densità di cellule incluse nel gel influenzi la durata della fotopolimerizzazione. Le densità cellulari considerate sono state 0.1, 1, 10 e 100 milioni di cellule/ml di prepolimero.

A parità di grado di metacrilazione (alto), concentrazione di PI (0.5% w/v) e distanza dalla sorgente UV (50mm), si è ottenuta la fotopolimerizzazione del prepolimero contenente cellule con un tempo di esposizione di 40 secondi per tutte le condizioni di densità cellulare testate. Questo ha portato a concludere che il tempo di fotopolimerizzazione non è significativamente influenzato dal parametro densità cellulare in un intervallo da 0.1 a 100 milioni HUVEC/ml di prepolimero.

In Figura 3.4 sono riportate immagini dei campioni acquisite tramite stereoscopio immediatamente dopo la fotopolimerizzazione di 40 secondi. Queste immagini evidenziano come a tutte le densità cellulari testate ((a) 0.1M/ml, (b) 1M/ml, (c) 10M/ml e (d) 100M/ml) i campioni risultino completamente foto polimerizzati, dimostrando la capacità di mantenere una forma propria.

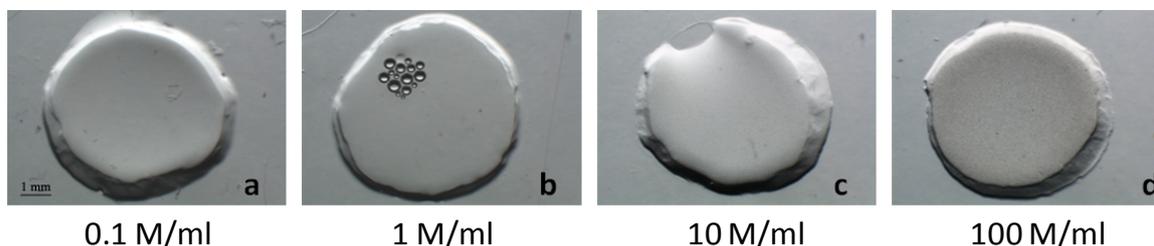


Figura 3.4 Immagini a stereoscopio (ingrandimento 1.2x) dei campioni di GelMA foto polimerizzati per 40 secondi in seguito all'inclusione nel prepolimero di (a) 0.1 M/ml, (b) 1 M/ml, (c) 10 M/ml e (d) 100 M/ml di HUVEC GFP.

In Figura 3.5 e Figura 3.6 sono mostrati ingrandimenti in contrasto di fase e in fluorescenza dei campioni riportati in figura 3.4 aventi densità cellulari (a) 0.1M/ml, (b) 1M/ml, (c) 10M/ml e (d) 100M/ml. Queste immagini dimostrano la presenza di un gradiente nella densità di cellule incluse negli idrogeli, che cresce dal primo (a) all'ultimo (d) campione.

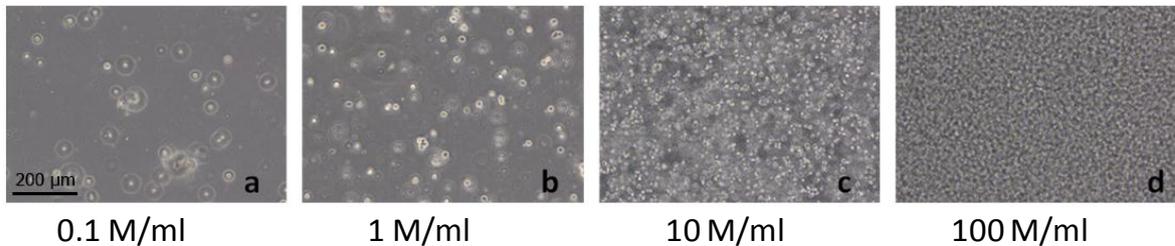


Figura 3.5 Immagini a microscopio ottico in contrasto di fase (ingrandimento 10x) dei campioni di GelMA foto polimerizzati per 40 secondi in seguito all'inclusione nel prepolimero di (a) 100 M/ml, (b) 10 M/ml, (c) 1 M/ml e (d) 0.1 M/ml di HUVEC GFP.

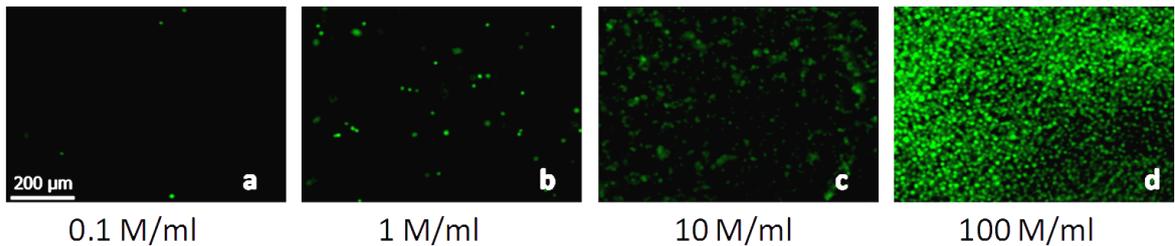


Figura 3.6 Immagini a microscopio ottico in fluorescenza (ingrandimento 10x) dei campioni di GelMA foto polimerizzati per 40 secondi in seguito all'inclusione nel prepolimero di (a) 0.1 M/ml, (b) 1 M/ml, (c) 10 M/ml e (d) 100 M/ml di HUVEC GFP.

In Figura 3.7 viene infine riportata un'immagine dei campioni alle diverse densità cellulari e dopo l'esecuzione del saggio MTT: si può notare la presenza di un gradiente colorimetrico del viola che mostra qualitativamente la presenza del gradiente di densità cellulare sottolineato dalle immagini precedenti.



Figura 3.7 Immagini dei campioni di GelMA foto polimerizzati per 40 secondi in seguito all'inclusione nel prepolimero di diverse densità di HUVEC GFP, ottenute dopo 6 ore di incubazione con MTT

3.2.2 Analisi di vitalità cellulare in seguito alla fotopolimerizzazione

Il seguente paragrafo riporta i risultati ottenuti nelle analisi di citotossicità del processo di fotopolimerizzazione. Il primo parametro del quale è stata valutata la citotossicità è stato la concentrazione dell'agente fotoiniziatore Irgacure 2959. Le concentrazioni confrontate sono state 0.05% w/v, 0.5% w/v e 1% w/v, testate mantenendo costanti il grado di metacrilazione (alto) e il tempo di fotopolimerizzazione (65sec). In Figura 3.8 sono riportate le immagini ottenute dall'esecuzione del saggio LIVE/DEAD su HUVEC GFP incluse negli idrogeli, fotopolimerizzati alle tre condizioni di fotoiniziatore descritte, a 24 ore dalla fotopolimerizzazione. Le cellule vive mostrano colorazione verde, quelle morte invece rossa: la sovrapposizione delle immagine, acquisite alle due lunghezze di fluorescenza, permette la visualizzazione simultanea di cellule vive e morte.

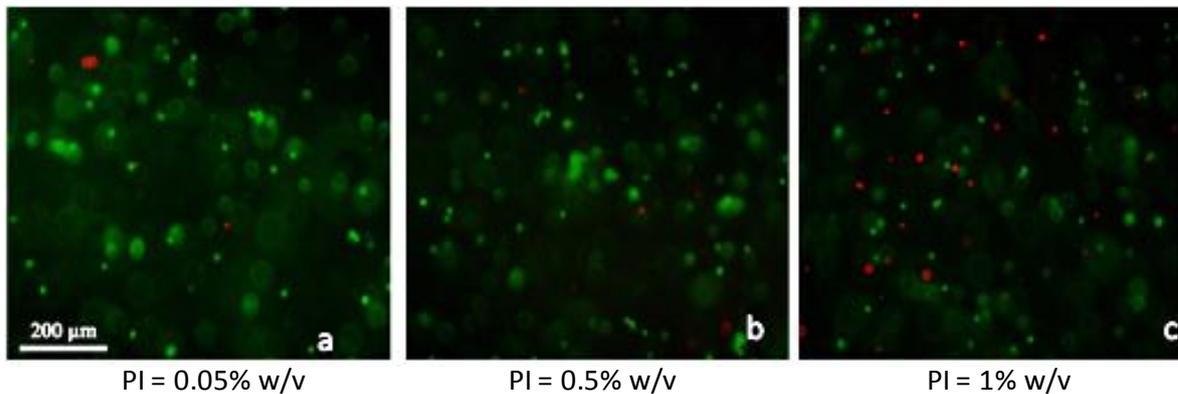


Figura 3.8 Immagini LIVE/DEAD di HUVEC incluse in GelMA a 24 ore dalla fotopolimerizzazione. Concentrazioni di PI di (a) 1% w/v, (b) 0.5% w/v e (c) 0.05% w/v. Le cellule vive sono visibili in verde, quelle morte in rosso. Immagini in fluorescenza acquisite a microscopio ottico con ingrandimento 10x

Il grafico in Figura 3.9 mostra la quantificazione della vitalità cellulare a 24 ore dalla fotopolimerizzazione.

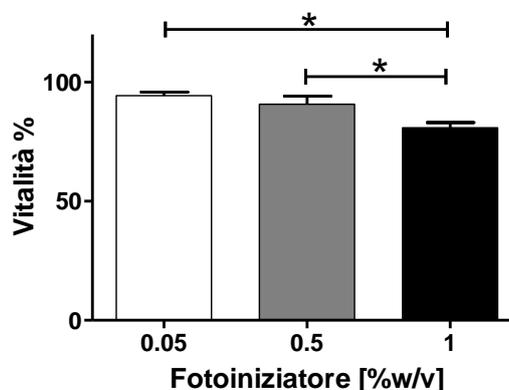


Figura 3.9 Vitalità cellulare in funzione della concentrazione di foto iniziatore. Dati relativi a 24 ore dopo la fotopolimerizzazione. Le barre di errore identificano le deviazioni standard. (*= $p < 0.05$).

E' stata riscontrata una diminuzione statisticamente significativa ($p < 0.05$) nella vitalità delle cellule tra la condizione 1% w/v ($80,8\% \pm 2,3\%$) e le condizioni 0.05% w/v e 0.5% w/v di PI. Le concentrazioni 0.05% w/v e 0.5% w/v di PI non hanno mostrato differenze statisticamente significative in termini di citotossicità: le cellule condizionate con entrambe le concentrazioni di PI hanno mostrato vitalità % superiore al 90% (rispettivamente $94,3\% \pm 1,5\%$ e $90,7\% \pm 3,4\%$).

Il secondo parametro considerato è stato il grado di metacrilazione attraverso il confronto dei diversi lotti (1, 0.1 e 0.05 ml/g MA) a due concentrazioni di PI (0.5% w/v e 0.05% w/v). A causa delle scarse proprietà meccaniche del corrispondente idrogelo, che disgrega dopo circa 12 ore dalla fotopolimerizzazione indipendentemente dalla concentrazione di fotoinziatore, il lotto a basso livello di metacrilazione è stato escluso da questo e dai successivi test. In Figura 3.10 sono riportate le immagini del saggio LIVE/DEAD su HUVEC GFP incluse negli idrogeli, a 24 ore dalla fotopolimerizzazione. I due lotti confrontati (a) medio e (b) alto grado di metacrilazione, sono stati fotopolimerizzati con concentrazione di PI (1) 0.05% w/v e (2) 0.5% w/v.

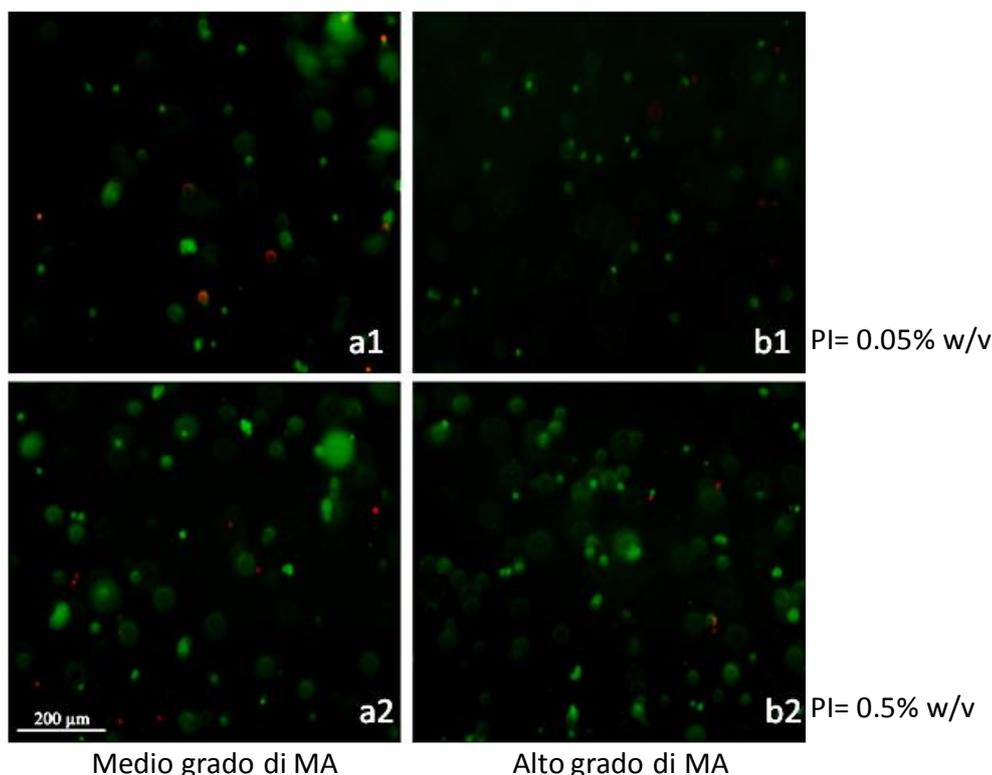


Figura 3.10 Immagini LIVE/DEAD di HUVEC incluse in GelMA a 24 ore dal fotopolimerizzazione. Lotti a (a) medio e (b) alto grado di metacrilazione, fotopolimerizzati con concentrazione di PI (1) 0.05% w/v e (2) 0.5% w/v. Le cellule vive sono visibili in verde, quelle morte in rosso. Immagini in fluorescenza acquisite a microscopio ottico con ingrandimento 10x

Il grafico in Figura 3.11 mostra la quantificazione della vitalità cellulare a 24 ore. Non è stata riscontrata alcuna differenza statisticamente significativa tra i due gradi di metacrilazione testati, per entrambe le condizioni di foto iniziatore. Il grado di metacrilazione non influenza quindi la vitalità cellulare, nelle condizioni testate.

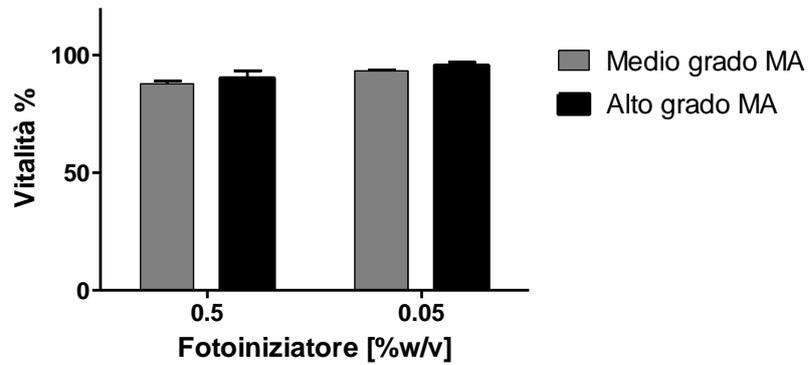


Figura 3.11 Vitalità cellulare in funzione del grado di metacrilazione, a due diverse concentrazioni di PI. Dati relativi a 24 ore dopo la fotopolimerizzazione. Le barre di errore identificano le deviazioni standard.

3.2.3 Analisi della distribuzione 3D delle cellule nell'idrogelo

In questo paragrafo vengono riportati i risultati dell'analisi sulla distribuzione tridimensionale delle cellule incluse all'interno dell'idrogelo.

In Figura 3.12 sono mostrate le sezioni laterali dei campioni ottenuti nelle diverse configurazioni di fotopolimerizzazione in termini di distanza dalla sorgente ((a) 20mm, (b) 50mm e (c) 125mm) e durata dell'irraggiamento UV ((a) 30sec, (b) 40sec e (c) 90sec, rispettivamente). Le immagini in contrasto di fase mostrano qualitativamente la presenza di una distribuzione omogenea delle cellule sulla sezione laterale dei tre idrogeli.

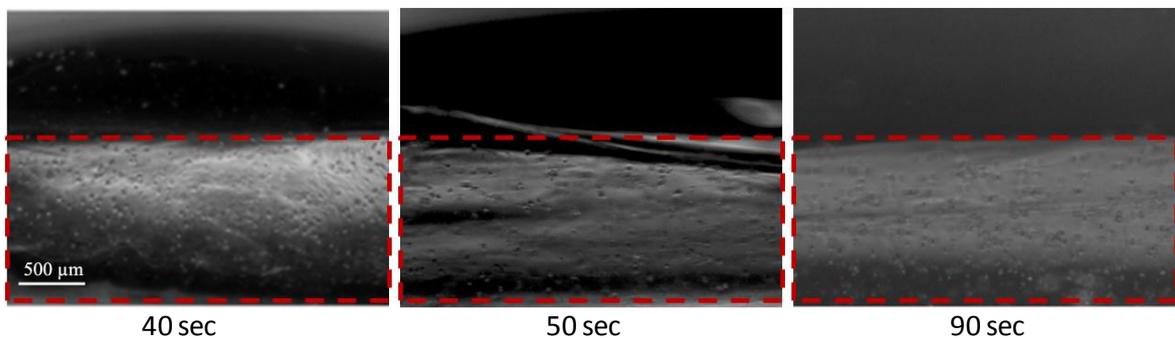


Figura 3.12 Sezione laterale degli idrogeli fotopolimerizzati nelle seguenti condizioni di distanza dalla sorgente UVB e tempo di esposizione: (a) 20mm e 40 sec; (b) 50mm e 50sec; (c) 125mm e 90sec. Il contorno dei campioni è delimitato dal tratteggio rosso. Immagini in contrasto di fase acquisite a microscopio ottico con ingrandimento 3.2x

La Figura 3.13 mostra le immagini in fluorescenza, acquisite ad un ingrandimento di 10x, degli stessi idrogeli. Per ogni campione, l'intera sezione laterale è rappresentata da due immagini, rappresentanti (1) lo strato superiore e (2) lo strato inferiore. Queste immagini sono state utilizzate per eseguire una quantificazione e un confronto sul numero di cellule effettivamente presenti sui due strati della sezione laterale di ciascun campione. Gli istogrammi in Figura 3.14 mostrano i risultati dell'analisi quantitativa eseguita.

Non sono state riscontrate differenze statisticamente significative tra il numero di cellule negli strati superiori e inferiori dei campioni analizzati in nessuna delle condizioni di distanza dalla sorgente e tempo di esposizione testate. Questa porta a concludere che, in idrogeli spessi 1mm, le cellule mantengono una distribuzione tridimensionale omogenea sulla sezione laterale in un intervallo di tempi di fotopolimerizzazione da 40 a 90 secondi.

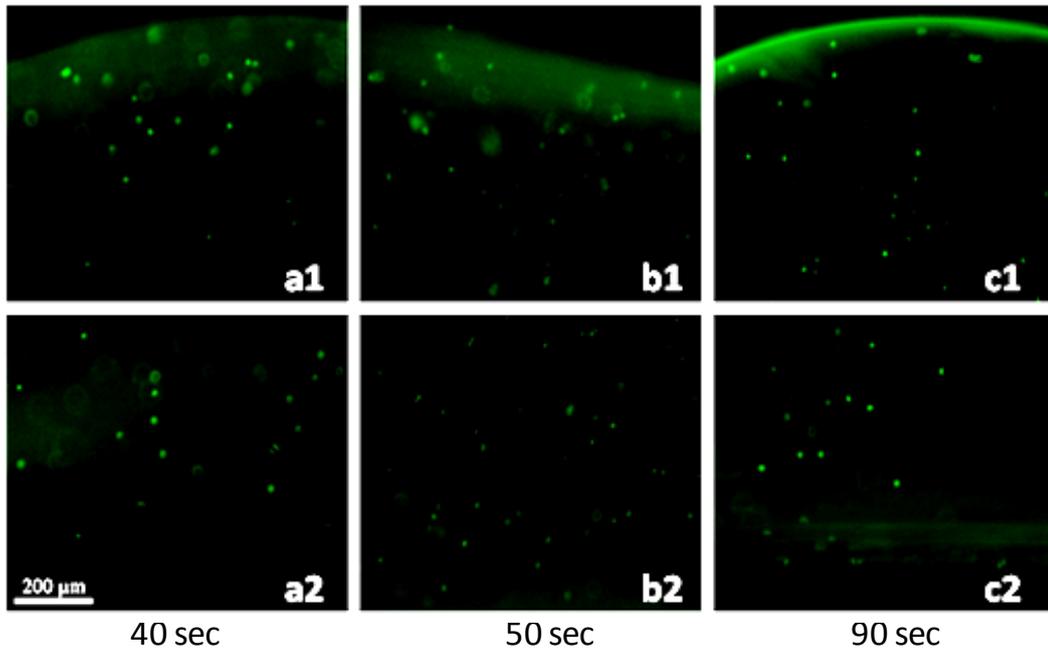


Figura 3.13 Immagini in fluorescenza dei due strati (1) superiore e (2) inferiore delle sezioni laterali degli idrogeli fotopolimerizzati nelle seguenti condizioni di distanza dalla sorgente UVB e tempo di esposizione: (a) 20mm e 40 sec; (b) 50mm e 50sec; (c) 125mm e 90sec. Immagini in fluorescenza acquisite a microscopio ottico con ingrandimento 10x

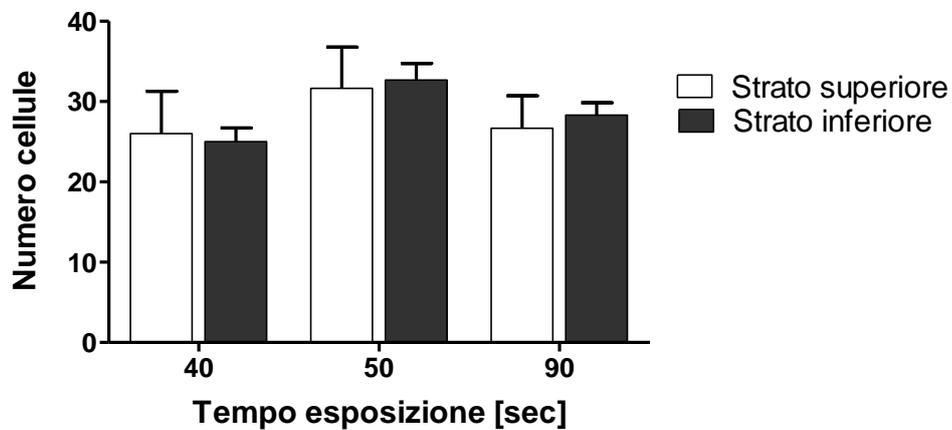


Figura 3.14 Distribuzione 3D: confronto tra il numero di cellule presenti nei due strati (superiore e inferiore) della sezione laterale dei campioni di GelMA considerati. Le barre di errore identificano le deviazioni standard.

3.2.4 Coltura cellulare a lungo termine: analisi qualitativa dello spreading

Nel seguente paragrafo vengono descritti i risultati in termini di analisi qualitativa di spreading degli esperimenti di coltura di HUVEC GFP incluse nei campioni di GelMA per 7 giorni. Il confronto è avvenuto sui due lotti ad alto e medio grado di metacrilazione e a due diverse concentrazioni cellulari (1 M/ml e 10 M/ml).

La Figura 3.15 mostra HUVEC alla concentrazione cellulare di 1M/ml incluse in idrogeli ottenuti dal lotto ad alta metacrilazione: il comportamento cellulare è monitorato su sette giorni e le immagini riportano la condizione delle cellule ai giorni (a) 1, (b) 3 e (c) 7.

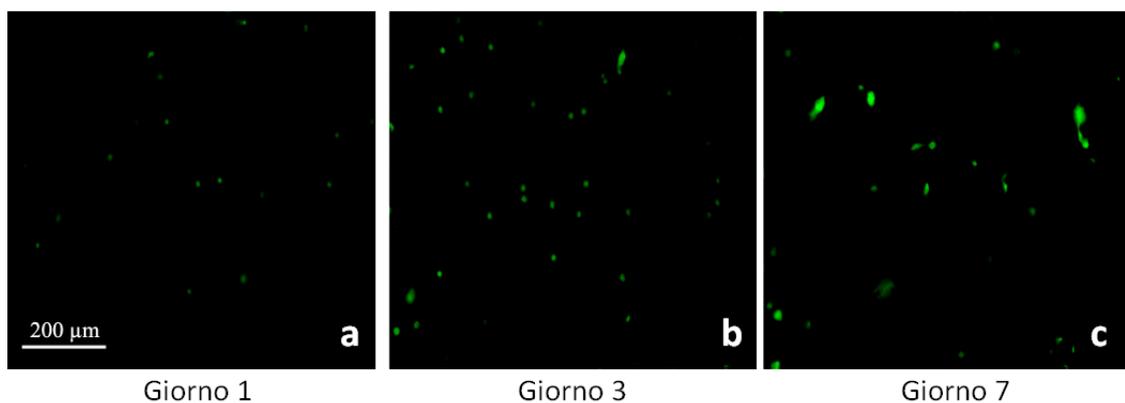


Figura 3.15 Immagini di HUVEC (densità 1M/ml) incluse in GelMA (alto grado di metacrilazione) dopo (a) 1, (b) 3 e (c) 7 giorni dall'inclusione per fotopolimerizzazione. Immagini in fluorescenza acquisite a microscopio ottico con ingrandimento 10.

La Figura 3.16 riporta il comportamento nel tempo di HUVEC incluse, nelle stesse condizioni di densità cellulare, in idrogeli ottenuti dal lotto a media metacrilazione.

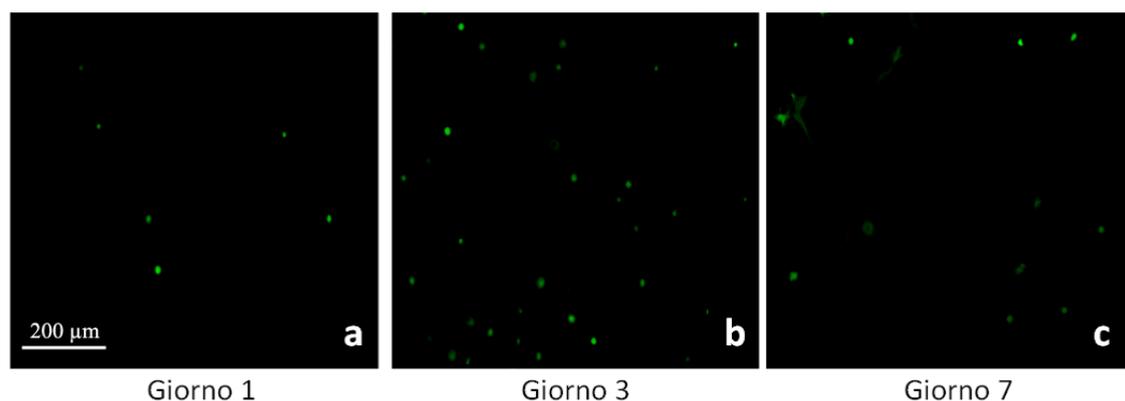


Figura 3.16 Immagini di HUVEC (densità 1M/ml) incluse in GelMA (medio grado di metacrilazione) dopo (a) 1, (b) 3 e (c) 7 giorni dall'inclusione per fotopolimerizzazione. Immagini in fluorescenza acquisite a microscopio ottico con ingrandimento 10x

Le cellule incluse alla densità di 1M/ml non mostrano fenomeni di interazione le une con le altre nei 7 giorni di osservazione, indipendentemente dal grado di metacrilazione dell'idrogelo. Al giorno 3 (Figura 3.15b) si osservano alcune cellule in fase di distensione all'interno dell'idrogelo ad alta metacrilazione, fenomeno che diventa più evidente al giorno 7 (Figura 3.15c). L'idrogelo a media metacrilazione mostra una tendenza meno evidente delle cellule alla distensione.

La Figura 3.17 mostra HUVEC alla concentrazione cellulare di 10M/ml incluse in idrogeli ottenuti dal lotto ad alta metacrilazione: il comportamento cellulare è monitorato su sette giorni e le immagini riportano la condizione delle cellule ai giorni a (a) 1, (b) 3 e (c) 7.

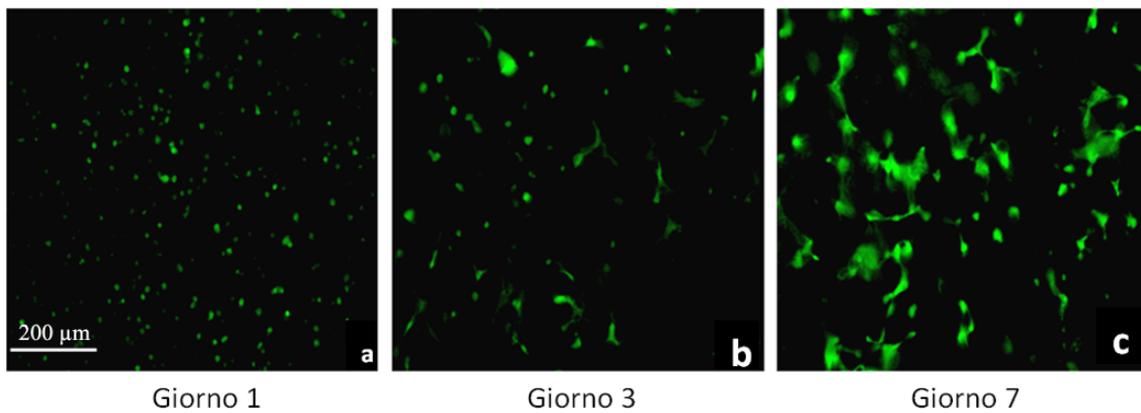


Figura 3.17 Immagini di HUVEC (densità 10M/ml) incluse in GelMA (alto grado di metacrilazione) dopo (a) 1, (b) 3 e (c) 7 giorni dall'inclusione per fotopolimerizzazione. Immagini in fluorescenza acquisite a microscopio ottico con ingrandimento 10x

La Figura 3.18 riporta il comportamento nel tempo di HUVEC incluse, nelle stesse condizioni di densità cellulare, in idrogeli ottenuti dal lotto a media metacrilazione.

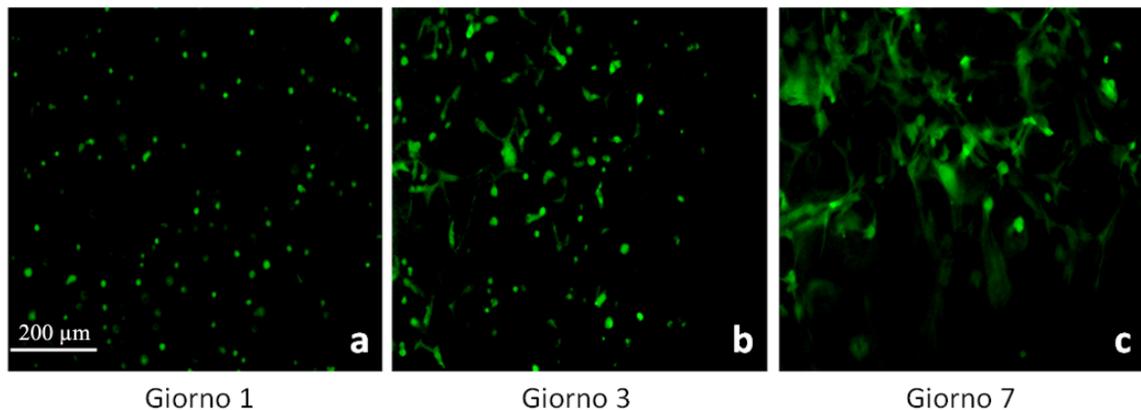


Figura 3.18 Immagini di HUVEC (densità 10M/ml) incluse in GelMA (medio grado di metacrilazione) dopo (a) 1, (b) 3 e (c) 7 giorni dall'inclusione per fotopolimerizzazione. Immagini in fluorescenza acquisite a microscopio ottico con ingrandimento 10x

In entrambe le condizioni di metacrilazione, le cellule mostrano un comportamento di distensione e allungamento nel tempo. Mentre al giorno 1 (a) le cellule si presentano incluse negli idrogeli con una morfologia sferica, al giorno 3 (b) si osserva una tendenza delle cellule a allungarsi negli idrogeli, con la formazione di alcune connessioni intercellulari, che aumentano in numero al giorno 7 (c). Le interconnessioni appaiono sviluppate sia sul piano orizzontale che su quello verticale. In entrambe le condizioni, la formazione di interconnessioni cellulari si osserva su più piani dell'idrogelo, ma risulta più marcata in prossimità del supporto in vetro.

3.2.5 Coltura cellulare a lungo termine: analisi quantitativa di proliferazione e attività metabolica

Nel seguente paragrafo vengono descritti i risultati degli esperimenti di coltura di HUVEC GFP incluse nei campioni di GelMA per 7 giorni in termini di analisi dell'attività metabolica e proliferativa. Il confronto è avvenuto sui due lotti ad alto e medio grado di metacrilazione e a due diverse concentrazioni cellulari (1M/ml e 10M/ml).

In seguito vengono riportati i risultati dei saggi per la valutazione per la quantificazione del DNA (Cy-Quant) e della vitalità cellulare (AlamarBlue) nei campioni di GelMA. In particolare attraverso il saggio del DNA è possibile calcolare per ogni campione il contenuto di DNA; conoscendo i valori ottenuti dai campioni di riferimento, dei quali è noto il numero di cellule, è quindi possibile risalire al numero di cellule per ogni campione. In tal modo, i valori generali ottenuti dal saggio AlamarBlue possono essere normalizzati sul valore del DNA (o sul numero di cellule), così da garantire un raffronto quantitativo tra i diversi gruppi sperimentali.

In Figura 3.19 sono rappresentati le quantificazioni di di proliferazione cellulare (CyQuant) ottenuti dai campioni a densità cellulare (a) 1 M/ml e (b) 10M/ml.

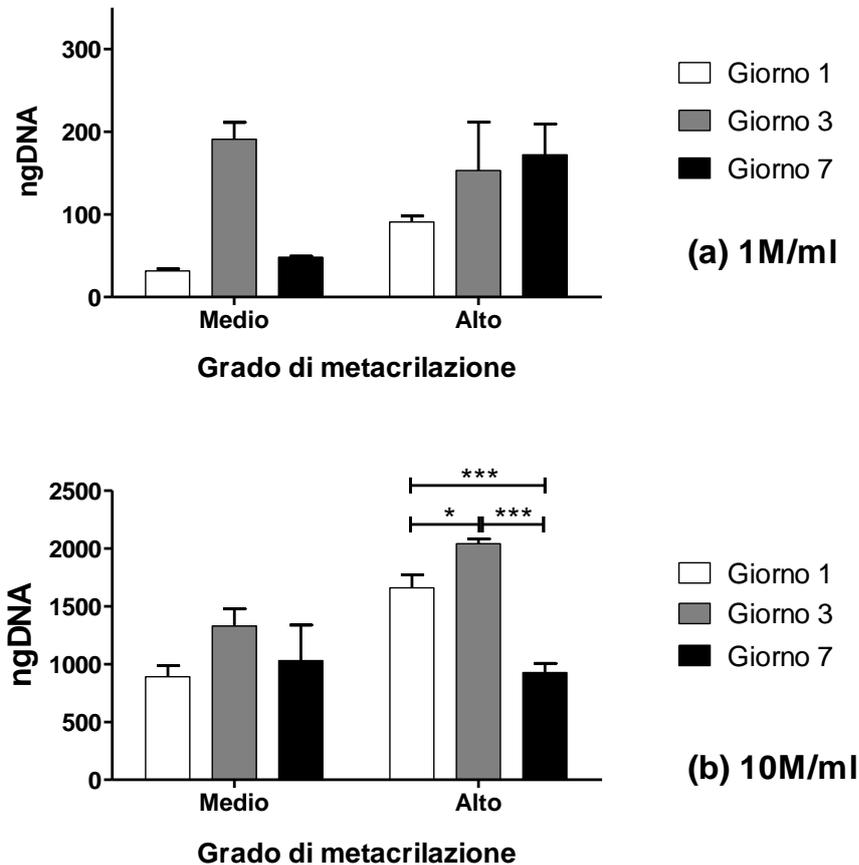


Figura 3.19 Stima del contenuto di DNA cellulare ottenuta con il saggio CyQ. Sono riportate le due condizioni di grado di metacrilazione alla densità cellulare (a)1M/ml e (b) 10M/ml. Le barre di errore identificano le deviazioni standard.

Considerando la densità cellulare 1M/ml, per i campioni a media MA l'andamento del contenuto di DNA cellulare non è costante nei sette giorni di osservazione. Per i campioni ad alta MA il numero di cellule rimane statisticamente invariato dal giorno 1 al giorno 7. Per la densità cellulare 10 M/ml, nel lotto a media metacrilazione non si registrano variazioni statisticamente significative nel contenuto di DNA cellulare dei campioni dal giorno 1 al giorno 7. Nei campioni a densità cellulare 10M/ml si registra un incremento nel numero di cellule al giorno 3, seguito da una diminuzione al giorno 7.

In Figura 3.20 sono rappresentati le quantificazioni dell'attività metabolica (normalizzata sul contenuto di DNA cellulare) ottenute dai campioni a densità cellulare (a) 1M/ml e (b) 10 M/ml.

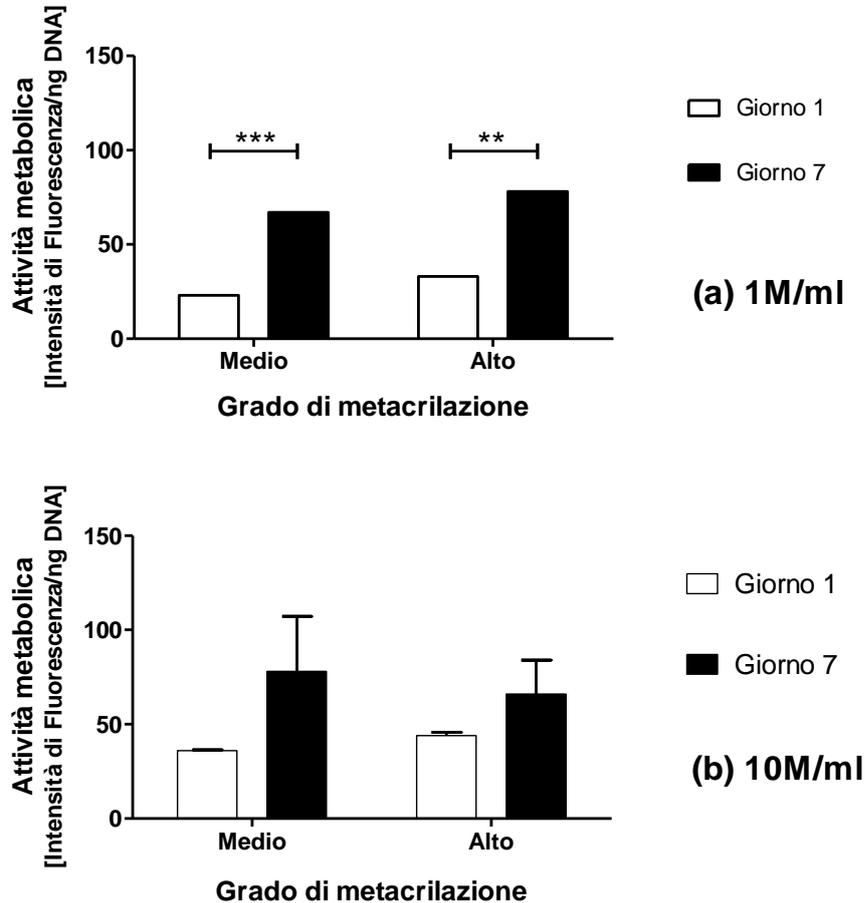


Figura 3.20 Stima della vitalità cellulare ottenuta con il saggio AlamarBlue (normalizzata sul contenuto di DNA cellulare). Sono riportate le due condizioni di grado di metacrilazione alla densità cellulare (a) 1M/ml e (b) 10M/ml. Le barre di errore identificano le deviazioni standard. . (**=p<0.01; ***=p<0.001).

Per i campioni a densità cellulare 1M/ml, in entrambe le condizioni di grado di metacrilazione, si registra un aumento statisticamente significativo ($p < 0.001$ per la media MA e $p < 0.01$ per l'alta MA) dell'attività metabolica cellulare assoluta (normalizzata sul contenuto di DNA cellulare) dal giorno 1 al giorno 7. Per i campioni a densità cellulare 10M/ml non si registrano variazioni statisticamente significative nell'attività metabolica assoluta (normalizzata sul contenuto di DNA cellulare) dal giorno 1 al giorno 7.

3.3 Mold patterning

In questa sezione sono riportati i risultati sperimentali legati all'applicazione della tecnica di mold patterning al GelMA sintetizzato. Dapprima è stata validata la tecnica ed è stato caratterizzato il suo utilizzo con l'idrogel in esame; successivamente si è proceduto ad un'analisi preliminare di fattibilità biologica.

3.3.1 Fotopolimerizzazione attraverso PDMS: trasmittanza dei raggi UVB

Le proprietà di trasmittanza ottica del PDMS nel campo degli UVB sono state analizzate misurando il tempo di fotopolimerizzazione del GelMA in funzione sia della distanza dalla fonte luminosa (20mm, 50mm, 125mm) sia dell'eventuale fraposizione di spessori crescenti di PDMS (spessori considerati: 300, 750 e 1500 μm). I dati rappresentati in Figura 3.21 riportano, per ogni distanza dalla sorgente luminosa, un confronto tra i tempi di fotopolimerizzazione in assenza di PDMS e con la fraposizione dei tre spessori testati. I risultati sono relativi al lotto di GelMA ad alto grado di metacrilazione con concentrazione di fotoiniziatore allo 0.5% w/v. L'ottenimento di tempi di fotopolimerizzazione uguali in tutte e quattro le condizioni mostra come l'interposizione di PDMS tra il prepolimero di GelMA e la sorgente di luce UVB non influisca sui tempi di polimerizzazione in un intervallo di spessore del PDMS da 300 a 1500 μm .

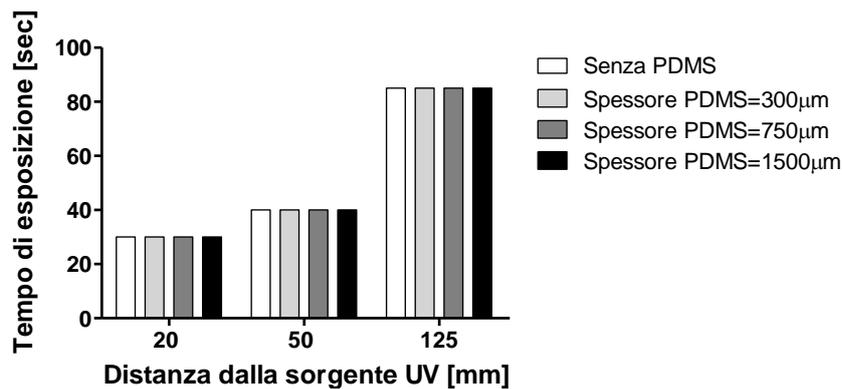


Figura 3.21 Analisi di trasparenza del PDMS ai raggi UVB. Tempi di fotopolimerizzazione del GelMA (alto grado di metacrilazione, PI=0.5% w/v) attraverso strati di PDMS di vario spessore, rispetto alla condizione di esposizione diretta ai raggi UVB

3.3.2 Mold patterning: analisi quantitativa di fedeltà del pattern

In questo paragrafo sono riportati i risultati di quantificazione della risoluzione dei pattern ottenuti per fotopolimerizzazione attraverso i due stampi in PDMS.

La Figura 3.22 e la Figura 3.23 mostrano immagini acquisite con microscopia a contrasto di fase dei pattern, relativi agli stampi 1 e 2 rispettivamente, ottenuti fotopolimerizzando il GelMA ad alto (b) e medio (c) grado di metacrilazione. Per facilitare il confronto, nelle figure stesse sono anche riportati i pattern trasferiti (a).

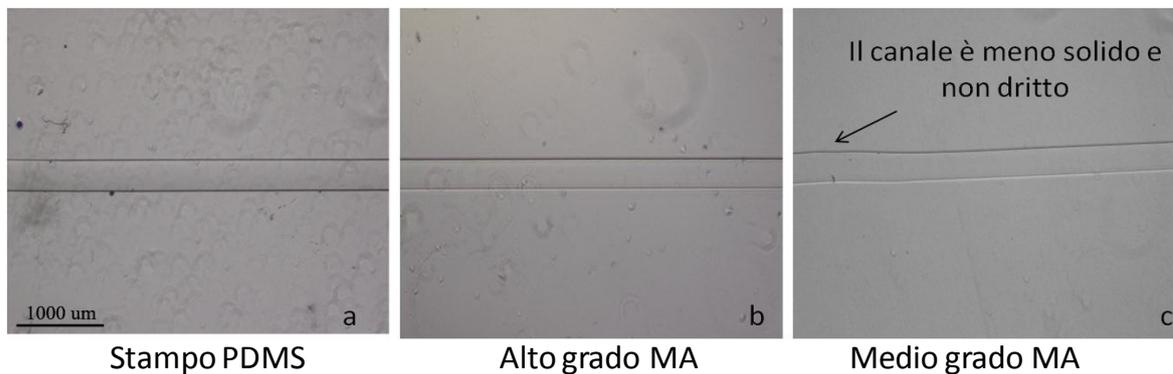


Figura 3.22 Immagini relative allo stampo1. Pattern ottenuti fotopolimerizzando il GelMA ad alto (b) e medio (c) grado di metacrilazione. Per facilitare il confronto è riportato il pattern trasferito (a). Immagini in contrasto di fase acquisite a microscopio ottico con ingrandimento 2x

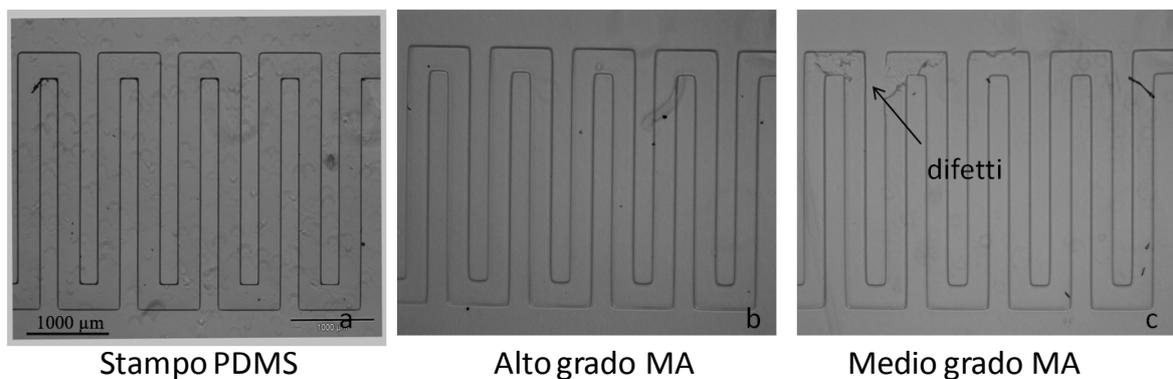


Figura 3.23 Immagini relative allo stampo2. Pattern ottenuti fotopolimerizzando il GelMA ad alto (b) e medio (c) grado di metacrilazione. Per facilitare il confronto è riportato il pattern trasferito (a). Immagini in contrasto di fase acquisite a microscopio ottico con ingrandimento 2x.

Nella Figura 3.22 si osserva una maggiore irregolarità del canale ottenuto dal lotto a media metacrilazione (c) rispetto a quello ad alta metacrilazione (b), se confrontati con i pattern trasferiti (a). In Figura 3.23 (c) è messo in evidenza un difetto nel pattern ottenuto dal lotto a media metacrilazione, mentre la geometria dell'idrogel ad alta metacrilazione (b) è qualitativamente più conforme al pattern trasferito (a).

In Figura 3.24 è riportata la sezione laterale del pattern ottenuto dal lotto (a) ad alta e (b) a media metacrilazione. La linea rossa identifica il profilo laterale dello stampo in PDMS relativo al chip1. In entrambi i casi si evidenzia una buona fedeltà nella riproduzione della geometria del pattern, più evidente nel lotto ad alta metacrilazione.

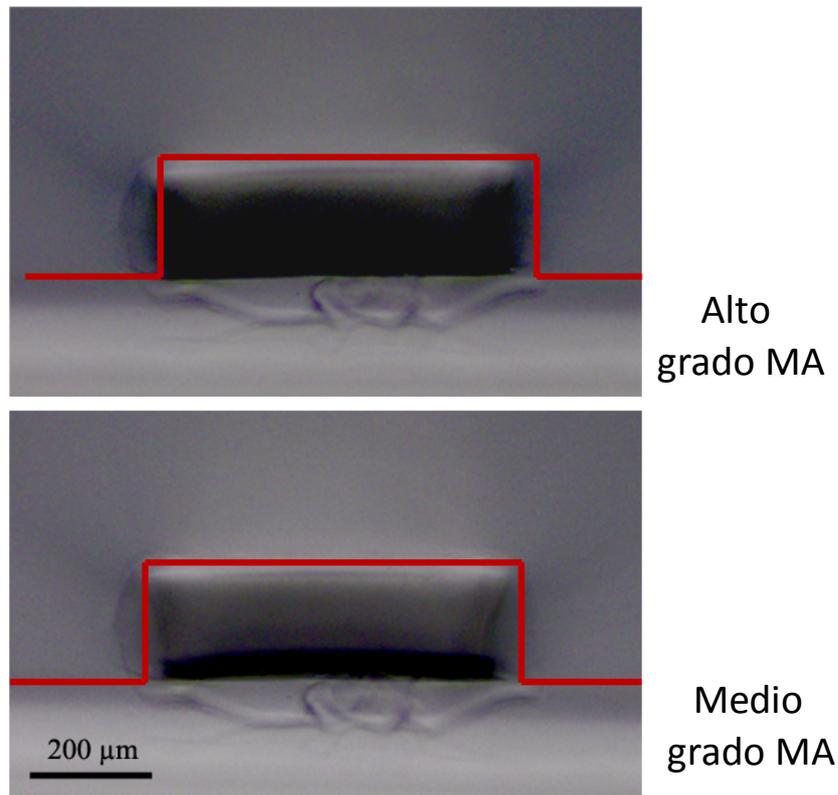


Figura 3.24 Sezione laterale del pattern ottenuto per mold patterning dallo stampo 1 del lotto (a) ad alta e (b) a media metacrilazione. Il profilo rosso identifica la forma originale dello stampo. Immagini acquisite con microscopio ottico in contrasto di fase con ingrandimento 2x.

Nel grafico in Figura 3.25 sono riportati i risultati delle analisi quantitative volte a determinare la risoluzione dei pattern ottenuti, con un confronto tra i lotti ad alta e media metacrilazione. I dati di larghezza e altezza dei pattern sono mostrati in percentuale rispetto alle dimensioni effettive dei canali degli stampi di PDMS.

Per entrambi i chip, i dati mostrano una differenza statisticamente significativa ($p < 0.05$) tra i due lotti di GelMA nell'altezza di pattern ottenuti: utilizzando il lotto a media metacrilazione si nota una maggiore contrazione rispetto al chip in altezza. Nessuna differenza statisticamente significativa si riscontra nella risoluzione in larghezza, con dati confrontabili tra i due lotti. In tutti i casi, le dimensioni dei pattern ottenuti sono leggermente inferiori alle dimensioni effettive dei canali microstrutturati utilizzati come stampo.

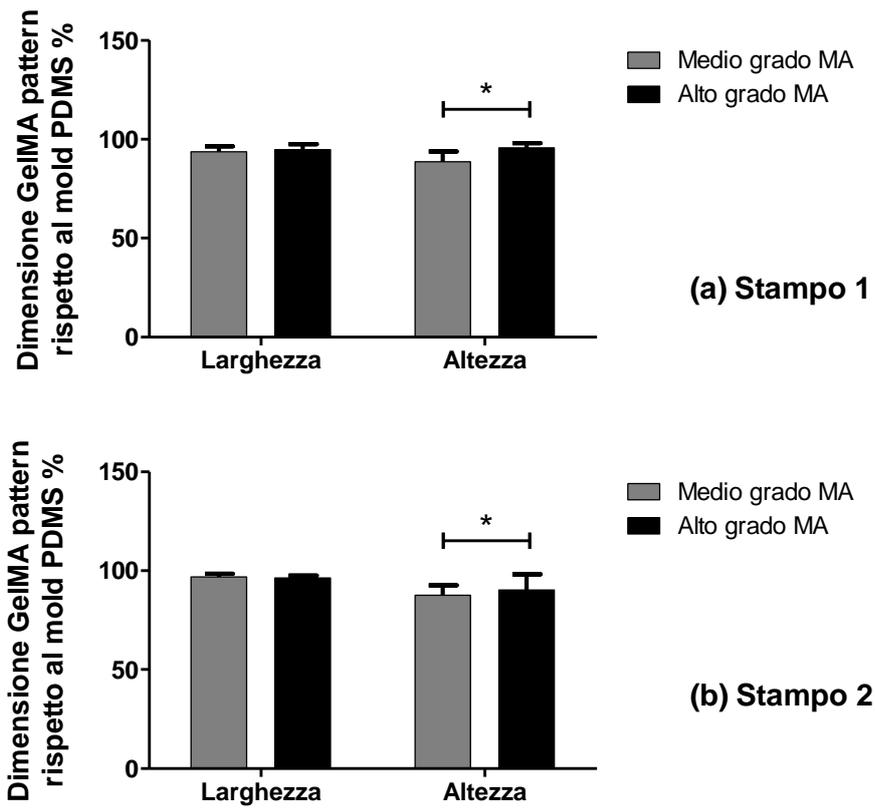


Figura 3.25 Dati di risoluzione relativi allo stampo1 (a) e 2 (b). Dimensione dei pattern di GelMA espressa in % rispetto al mold di PDMS. Analisi sulla larghezza e sull'altezza dei canali. Confronto tra batch ad alto e medio grado di metacrilazione. Le barre di errore identificano le deviazioni standard. . (*= $p < 0.05$).

3.3.3 Mold patterning: analisi della distribuzione spaziale delle cellule

La Figura 3.26 riporta le immagini relative alla distribuzione di HUVEC incluse in pattern di GelMA ottenuti attraverso fotopolimerizzazione all'interno dei canali dello stampo 1. Le immagini sono relative al giorno 0, quindi rappresentano la distribuzione spaziale delle cellule immediatamente dopo l'irraggiamento UV. Le immagini (a) e (b) si riferiscono al lotto ad medio grado di metacrilazione con densità cellulari rispettivamente di 1 e 10M/ml. Le immagini (c) e (d) si riferiscono al lotto ad alto grado di metacrilazione con densità cellulari rispettivamente di 1 e 10M/ml.

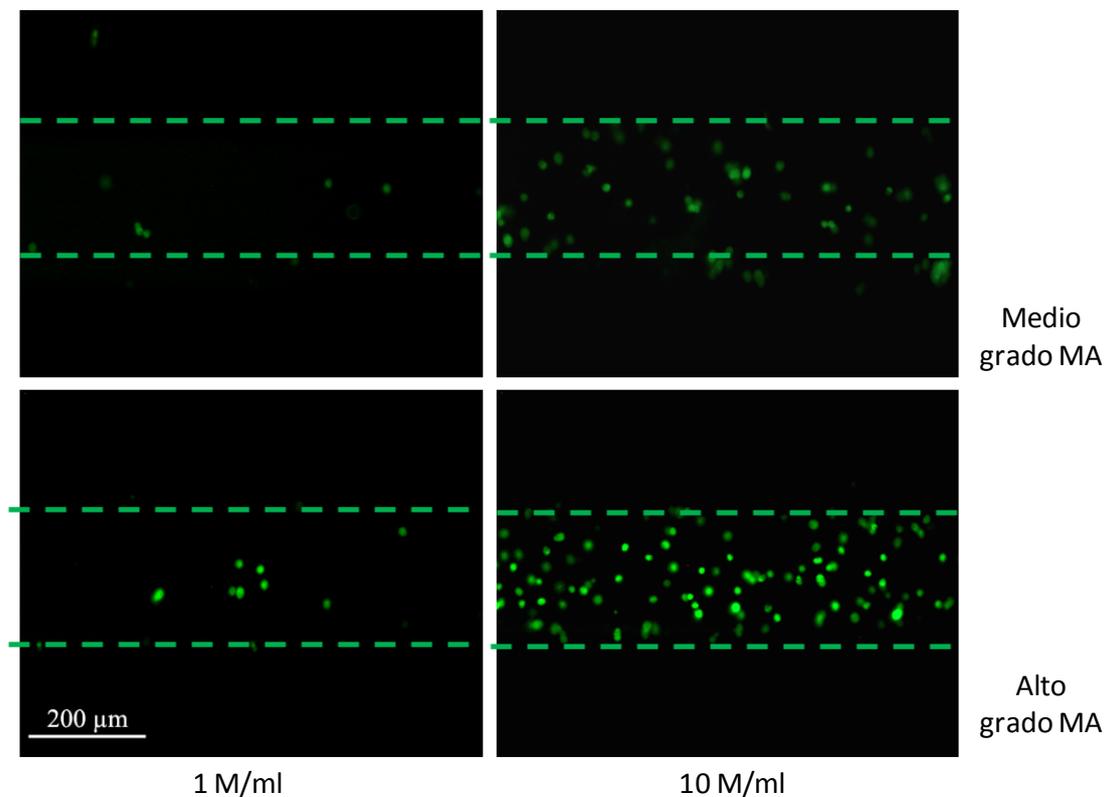


Figura 3.26 Immagini di HUVEC incluse in pattern di GelMA (stampo 1). Le immagini si riferiscono al lotto (a-b) a medio e (c-d) alto grado di metacrilazione con densità cellulari rispettivamente di (a-c) 1 e (b-d) 10M/ml. Il tratteggio definisce il profilo dello stampo. Immagini in fluorescenza acquisite a microscopio ottico con ingrandimento 10x

I grafici in Figura 3.27 riportano i risultati delle analisi quantitative sulla distribuzione delle cellule nei pattern relativi allo stampo 1. Non sono state riscontrate differenze statisticamente significative nella distribuzione delle cellule sulla lunghezza del canale per nessun grado di metacrilazione e densità cellulare. L'analisi sulla distribuzione cellulare nella larghezza del canale ha mostrato una maggior concentrazione di cellule nella fascia

centrale del pattern: differenze statisticamente significative ($p < 0.01$) sono state riscontrate per entrambi i lotti di GelMA a concentrazioni cellulare 1 e 10M/ml.

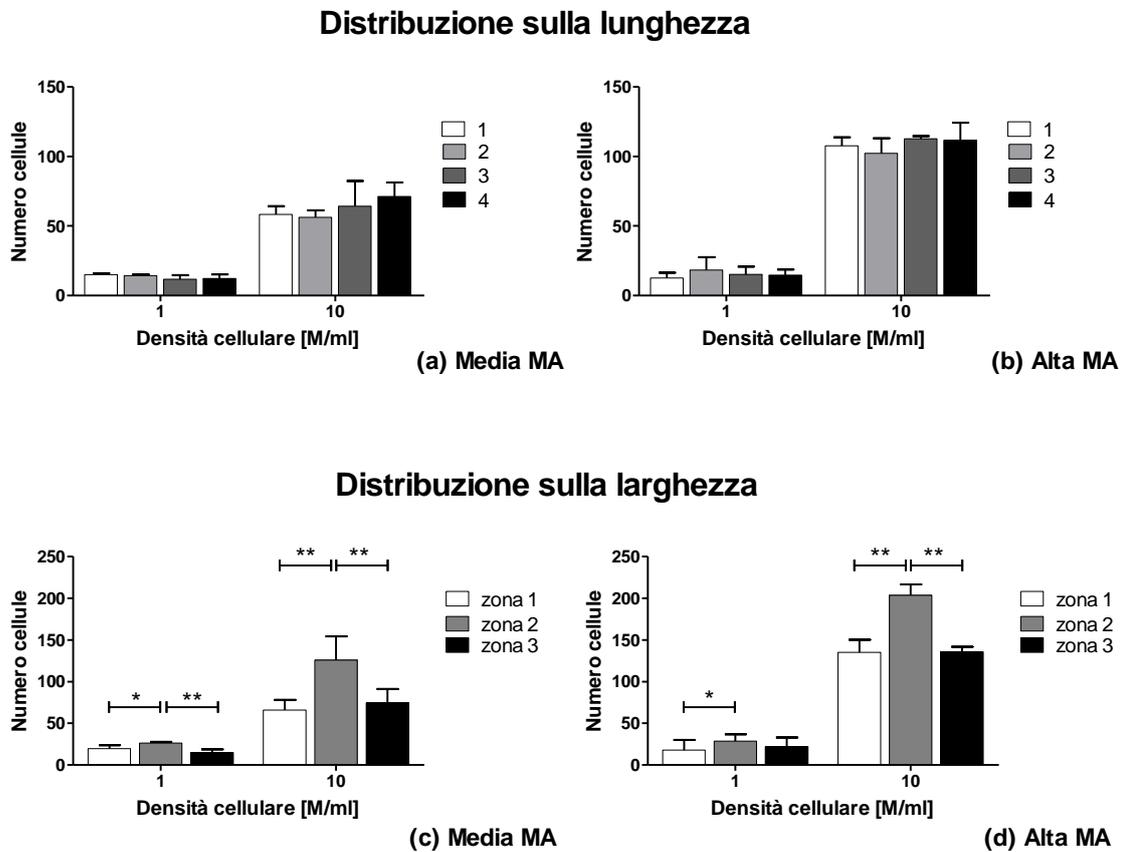


Figura 3.27 Distribuzione delle HUVEC nei pattern di GelMA al giorno 0 relativamente allo stampo 1. (a) e (b) Analisi sulla lunghezza del canale rispettivamente dei lotti a medio e alto grado di metacrilazione. (c) e (d) Analisi sulla larghezza del canale rispettivamente dei lotti a medio e alto grado di metacrilazione. Le barre di errore identificano le deviazioni standard. (*= $p < 0.05$; **= $p < 0.01$).

La Figura 3.28 riporta le immagini relative alla distribuzione di HUVEC incluse in pattern di GelMA ottenuti attraverso fotopolimerizzazione all'interno dei canali dello stampo 2. Le immagini sono relative al giorno 0, quindi rappresentano la distribuzione spaziale delle cellule immediatamente dopo l'irraggiamento UV. Le condizioni di grado di metacrilazione e densità cellulare sono le stesse descritte per il chip1. Per ogni condizione, sono in questo caso riportate le immagini sia di un tratto rettilineo, sia di un tratto ad angolo retto dei pattern ottenuti dallo stampo 2, per rendere visivamente chiaro il confronto tra la distribuzione di cellule quantificato nel grafico in Figura 3.29.

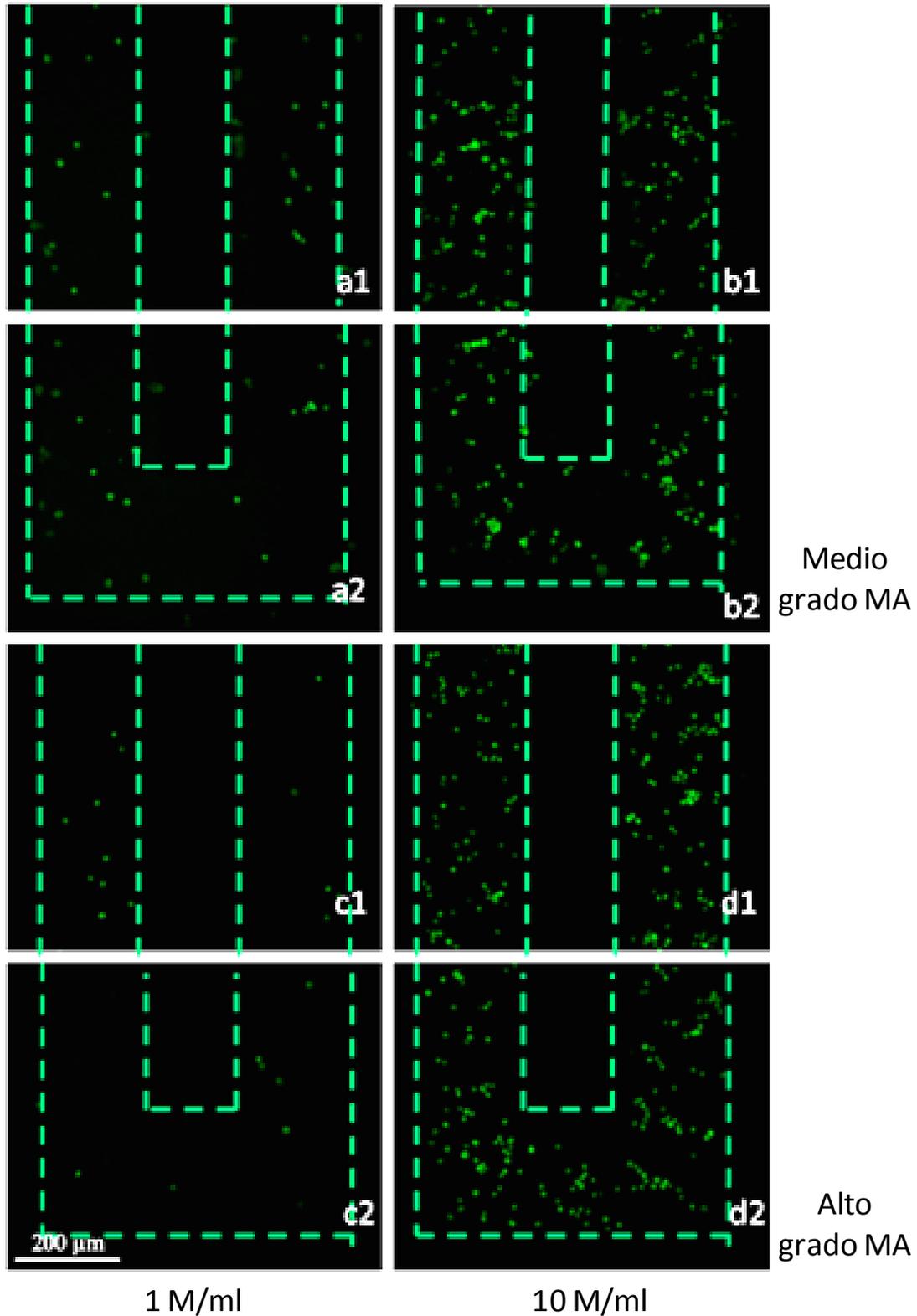


Figura 3.28 Immagini di HUVEC incluse in pattern di GelMA (stampo 1). Le immagini si riferiscono al lotto (a-b) a medio e (c-d) ad alto grado di metacrilazione con densità cellulari rispettivamente di (a-c) 1 e (b-d) 10M/ml. Nella prima riga sono riportati i tratti rettilinei dei pattern, nella seconda i tratti ad angolo retto. Il tratteggio definisce il profilo dello stampo. Immagini in fluorescenza acquisite a microscopio ottico con ingrandimento 10x.

I grafici in Figura 3.29 riportano i risultati delle analisi quantitative sulla distribuzione delle cellule nei pattern relativi allo stampo 2. In questo caso, non sono state riscontrate differenze statisticamente significative nella distribuzione delle cellule lungo i tratti rettilinei rispetto agli angoli del canale. Inoltre, non sono state riscontrate differenze statisticamente significative nella distribuzione delle cellule sulla lunghezza del canale per nessun grado di metacrilazione e densità cellulare.

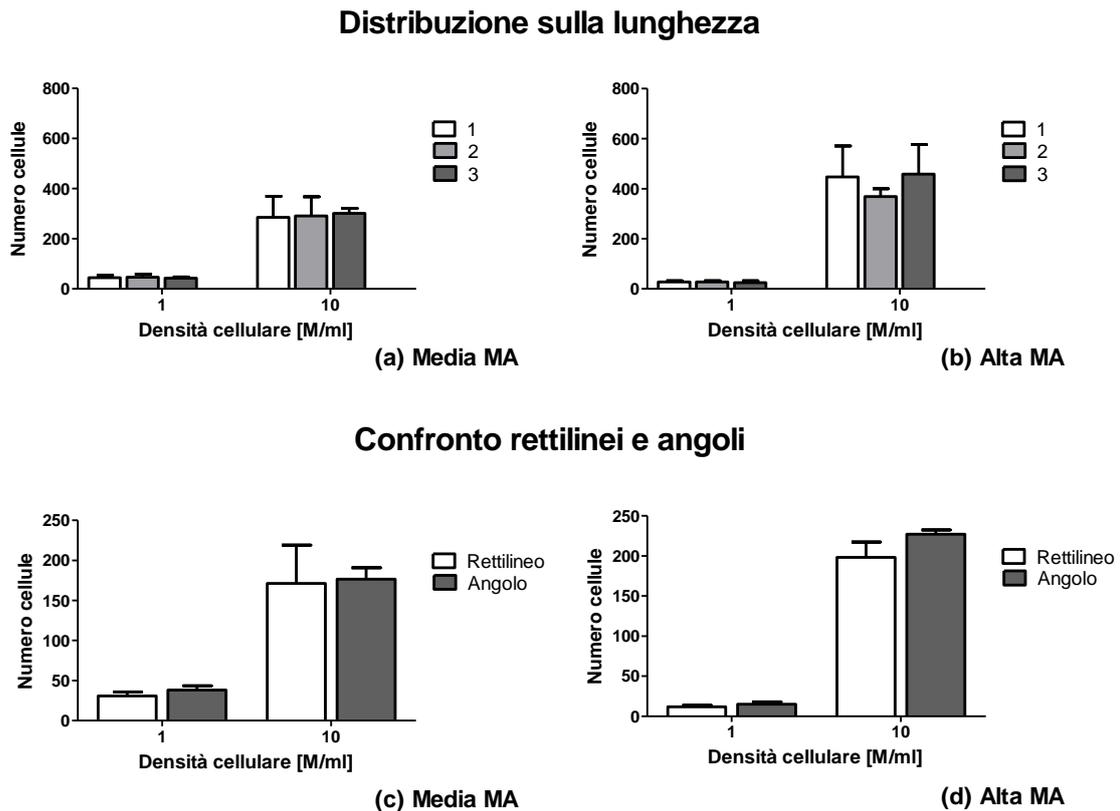


Figura 3.29 Distribuzione delle HUVEC nei pattern di GelMA al giorno 0 relativamente allo stampo 2. (a) e (b) Confronto tra rettilinei e angoli rispettivamente dei lotti a medio e alto grado di metacrilazione. (c) e (d) Analisi sulla lunghezza del canale rispettivamente dei lotti a medio e alto grado di metacrilazione. Le barre di errore identificano le deviazioni standard.

È stato poi documentato un profilo di distribuzione tridimensionale delle cellule nei pattern. Questo è mostrato in Figura 3.30, dove sono riportate le immagini della sezione laterale dei pattern con concentrazione cellulare 10M/ml, relative ai lotti (1) ad alto e (b) a medio grado di metacrilazione.

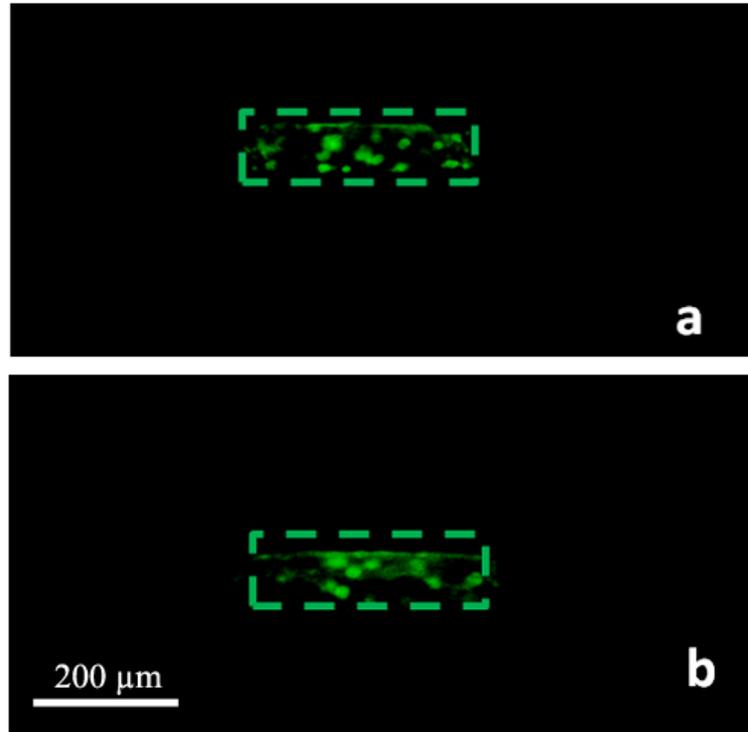


Figura 3.30 Immagini in fluorescenza di HUVEC GFP (10M/ml) incluse in pattern di GelMA, relative ai canali del chip1. Il tratteggio definisce il profilo dello stampo. Lotto (a) ad alta e (b) a media metacrilazione. Immagini acquisite a microscopio ottico con ingrandimento 10x

4 DISCUSSIONE

Il presente studio indaga le potenzialità di utilizzo di idrogeli fotopolimerizzabili a base di gelatina metacrilata come matrici biomimetiche per applicazioni nell'ambito dell'ingegneria dei tessuti alla microscala. In particolare lo studio pone l'attenzione sull'utilizzo combinato delle tecniche di fotopolimerizzazione e di mold patterning, non ancora esplorata per lo sviluppo di idrogeli a base di GelMA. Lo scopo è l'ottenimento di pattern dalla microarchitettura controllata, per l'inclusione di cellule distribuite secondo una topografia tridimensionale (3D) controllata.

Negli ultimi anni, infatti, si è imposta sempre più chiaramente la necessità di sviluppare materiali biomimetici per l'ottenimento di substrati 3D dalla microarchitettura controllata per coltura cellulare, in grado di mimare le caratteristiche della matrice extracellulare (ECM) nativa[21]. Grazie alla loro conformazione strutturale, simile a quella delle componenti macromolecolari della matrice ECM, gli idrogeli si dimostrano buoni candidati come matrici biomimetiche per il sostegno di processi di adesione, proliferazione e differenziamento cellulare, con lo scopo di ingegnerizzare tessuti funzionali *in vitro*[34]. Gli idrogeli fotopolimerizzabili, sottoclasse degli idrogeli, vengono reticolati *in vivo* o *in vitro* attraverso l'esposizione a fonti di luce visibile o ultravioletta (UV), in presenza di un agente fotoiniziatore (PI). Tale processo è compatibile con l'inclusione di cellule all'interno della matrice, e l'utilizzo di idrogeli fotopolimerizzabili combinato a tecniche di microstrutturazione, quali il foto patterning e il mold patterning, permette di ottenere micropattern cellulari omogenei e tridimensionali [53].

In letteratura, la scelta del materiale polimerico per lo sviluppo di idrogeli fotopolimerizzabili per la coltura cellulare spazia dai polimeri sintetici a quelli naturali. I polimeri sintetici sono caratterizzati da proprietà meccaniche relativamente elevate e facilmente controllabili, oltre a presentare processi di produzione flessibili e riproducibili. Diversi idrogeli sintetici, tra i quali quello maggiormente diffuso è il PEG [40, 41, 80], si sono dimostrati affini all'incapsulamento di tipi cellulari diversi per applicazioni molteplici. Nonostante le cellule incapsulate in idrogeli sintetici a base di PEG mantengano un'elevata vitalità nel tempo, le cellule non si legano tipicamente al gel e non lo rimodellano attivamente[40, 41]. Per superare questo limite, gli idrogeli sintetici possono essere modificati attraverso una funzionalizzazione specifica con gruppi in grado di favorire processi di adesione, tramite ad esempio la formazione di legami covalenti con

peptidi bioattivi come l'RGD[43] o il peptide MMP- sensibile[44]. I processi di funzionalizzazione, tuttavia, oltre a richiedere una conoscenza specifica delle sequenze peptidiche attive e della loro funzionalità all'interno delle proteine di interesse, non risolvono spesso l'impossibilità per le cellule di rimodellare l'ECM[54]. Al contrario, gli idrogeli naturali sono generalmente caratterizzati da elevata biocompatibilità, biodegradabilità e bioattività in termini di interazione cellulare[31]. La scelta di un materiale di origine naturale rappresenta quindi una buona alternativa. Tra l'ampia varietà di polimeri naturali analizzati in letteratura[68, 81-83] per l'ottenimento di idrogeli fotopolimerizzabili, in questo studio si è scelto di indagare le potenzialità di un idrogelo a base di gelatina di collagene. La gelatina è stata resa fotopolimerizzabile attraverso una reazione chimica con addizione di anidride metacrilica (MA)[67]. Idrogeli a base di gelatina sono stati ottenuti in letteratura anche per via chimica attraverso aggiunta di glutaraldeide[84] o enzimatica tramite glutaminase[85]: entrambi questi additivi si sono dimostrati citotossici e immunogenici, impedendone l'utilizzo per l'incapsulamento cellulare. La scelta di modificare la gelatina con gruppi metacrilici (GelMA) permette quindi di ottenere idrogeli attraverso un processo di fotopolimerizzazione. Numerosi studi hanno dimostrato l'affinità del processo di fotopolimerizzazione di GelMA all'incapsulamento e alla coltura di cellule in una matrice 3D [17, 54, 79, 86]. Grazie alla presenza di siti di legame distribuiti lungo le catene polimeriche della gelatina, le cellule si legano infatti facilmente a questi idrogeli, che ne favoriscono altresì allungamento e migrazione [54]. La definizione di citocompatibilità legata alla fotopolimerizzazione richiede in ogni caso un'analisi preliminare mirata all'ottimizzazione dei parametri fondamentali di processo.

La reazione di metacrilazione consiste nella formazione di legami tra i gruppi ammina – NH_2 della gelatina e i gruppi carbossilici – COOH dell'anidride metacrilica aggiunta. Questa reazione non richiede particolari equipaggiamenti, e può essere condotta in laboratori standard attraverso una procedura semplice ed economica[67]. In questo studio il GelMA è stato sintetizzato in tre diverse condizioni, ognuna caratterizzata dall'aggiunta di diverse concentrazioni di MA, per ottenere lotti a diversi gradi di metacrilazione. Indagini di spettroscopia di risonanza magnetica nucleare ($^1\text{H-NMR}$) hanno confermato che la percentuale di metacrilazione del materiale sintetizzato cresce all'aumentare della quantità di MA aggiunta nel processo di sintesi.

Il GelMA sintetizzato è stato caratterizzato anche dal punto di vista delle proprietà reologiche. Gli idrogeli mostrano in generale un comportamento intermedio tra i solidi e i liquidi viscosi, avvicinandosi per questo alla natura dell'ECM dei tessuti molli[33]. Gli idrogeli a base di gelatina sono generalmente caratterizzati da un modulo complesso (combinazione di moduli di *storage* e di *loss*, G' e G'' rispettivamente) relativamente basso e mostrano un comportamento viscoelastico anche per valori elevati di stress[68]. I dati ottenuti in questo studio hanno dimostrato la dipendenza del comportamento reologico dei gel da concentrazione di PI e grado di MA. Concentrazioni di PI più elevate, a parità di tempo di esposizione, permettono il raggiungimento di una reticolazione più solida grazie alla formazione di più ponti tra le catene polimeriche. Questo riduce lo scivolamento relativo tra le catene e porta a valori di G' e G'' più elevati e indipendenti, fino a circa 10 Hz, dalle sollecitazioni in frequenza. Questo comportamento elastomerico si registra per i lotti ad alta e media MA, condizionati con PI di 0.5% w/v. Anche il grado di MA, essendo uno dei parametri che influenzano il livello di reticolazione, determina differenze nel comportamento meccanico. Il lotto a bassa MA, caratterizzato da G' e G'' più bassi e comparabili tra loro, mostra un comportamento più vicino al liquido viscoso. L'analisi di questi risultati reologici deve tenere conto di tre fenomeni registrati in fase di misura, che potrebbero aver modificato il comportamento dei materiali, causando a frequenze elevate lo stabilizzarsi di tutti i dati nell'interno dello stesso valore. In primo luogo, la presenza di acqua nei campioni, fondamentale per aumentare l'affinità con le cellule, induce fenomeni di evaporazione causati dal contatto con il piatto del reometro scaldato a 37°C. Inoltre, il reometro si basa sul confinamento del campione di idrogelo tra due piatti paralleli, tra loro separati da una distanza ottimale pari a 1mm; il basso controllo dello spessore in fase di generazione del provino fa sì che la natura viscoelastica del gel stesso possa provocare una fuoriuscita di materiale in eccesso dai piatti paralleli, alterando probabilmente i risultati della misurazione. Correlato a questo, lo scivolamento del campione nella fase finale della misurazione altera gli ultimi valori registrati.

Il grado di metacrilazione e la concentrazione di fotoiniziatore sono due dei parametri di processo che determinano le proprietà degli idrogeli fotopolimerizzabili[56]: per il materiale in esame, questo è stato osservato nella caratterizzazione reologica e confermato dai risultati delle analisi sui tempi di fotopolimerizzazione. Questi hanno dimostrato come un grado di metacrilazione più elevato faciliti una fotopolimerizzazione più rapida ed

efficace. I tempi di esposizione crescono infatti in maniera inversamente proporzionale alla metacrilazione: prepolimeri caratterizzati da un maggior numero di gruppi laterali attivi, formano più legami con i radicali liberi ottenuti per scissione del PI, mostrando la comparsa di una rete interconnessa e stabile in tempi minori. Come già dimostrato, inoltre, il tempo necessario alla reticolazione varia in funzione della concentrazione di fotoiniziatore[79]. Un aumento nella concentrazione di fotoiniziatore riduce i tempi necessari alla reticolazione inducendo la formazione contemporanea di più radicali liberi. Questo fenomeno arriva ad una saturazione nel caso in cui la proporzione tra radicali liberi e gruppi laterali potenzialmente reattivi sulle catene del prepolimero raggiunga un plateau. Questo è risultato evidente per il grado di metacrilazione più basso, dove sono stati ottenuti tempi comparabili a PI di 0.5% w/v e 1% w/v. Il confronto con la letteratura dei tempi di fotopolimerizzazione intesi in senso assoluto risulta complicato, a causa della differenza dei parametri sperimentali di sorgente UV utilizzati in questo studio. L'analisi dei tempi di fotopolimerizzazione ha comunque dimostrato come la velocità del processo possa essere regolata tramite la combinazione di parametri diversi, quali il grado di metacrilazione, la distanza dalla sorgente UV e la concentrazione di fotoiniziatore. In presenza di cellule, la combinazione di questi parametri deve però tenere conto della necessità di mantenere il processo di fotopolimerizzazione al di sotto di livelli di citotossicità. La buona citocompatibilità del PI utilizzato (Irgacure 2959[57, 58]) e la scelta di una sorgente di luce con un picco di emissione nei soli UVB (minimamente citotossici) non garantiscono in linea assoluta la citocompatibilità del processo finale di fotopolimerizzazione. Mentre il grado di metacrilazione non ha dimostrato influenza sulla vitalità cellulare, le analisi condotte su cellule endoteliali di linea continua da cordone ombelicale umano (HUVEC GFP), incluse negli idrogeli, hanno confermato la dipendenza della vitalità cellulare dalla concentrazione di fotoiniziatore, già dimostrata in letteratura[56, 79, 81]. I risultati del saggio di LIVE/DEAD hanno dimostrato come concentrazioni elevate di fotoiniziatore (1% w/v) determino una mortalità cellulare legata allo stress del processo di fotopolimerizzazione significativamente più elevata rispetto a concentrazioni inferiori. Nelle condizioni sperimentali da noi adottate, è stato possibile definire un intervallo di citocompatibilità nella concentrazione di PI che va da 0.5% w/v a 0.05% w/v. Molti lavori sperimentali hanno dimostrato come l'utilizzo di concentrazioni di fotoiniziatore pari al limite superiore di questo range (0.5% w/v) non influisca negativamente sull'attività delle

cellule incluse negli idrogeli[17, 35, 54]. Supportata da queste basi, la scelta di utilizzare nelle analisi successive una concentrazione di PI pari allo 0.5%w/v deriva quindi, a parità di citotossicità, dalla necessità di minimizzare i tempi di reticolazione per garantire l'ottenimento di distribuzioni 3D delle cellule incluse.

Oltre alla vitalità cellulare, infatti, un parametro fondamentale legato direttamente al tempo di polimerizzazione è la distribuzione 3D delle cellule nel gel neoformato. La replica *in vitro* della tridimensionalità del microambiente cellulare nel quale le cellule sono immerse *in vivo*, è infatti uno dei principali requisiti per la realizzazione di una matrice biomimetica che permetta un condizionamento fisiologico delle cellule in essa incluse[19]. Gli idrogeli mostrano una struttura in tre dimensioni che li rende potenziali candidati alla realizzazione di matrici tridimensionali per la coltura cellulare[31]. La fotopolimerizzazione di idrogeli a base di GelMA si è dimostrata affine all'inclusione di cellule direttamente durante la fase di reticolazione[54, 86], rendendo possibile l'ottenimento immediato di una distribuzione cellulare potenzialmente 3D e omogenea. Nel presente studio, l'analisi quantitativa sulla distribuzione delle cellule nell'idrogelo ha permesso di dimostrare come i parametri di fotopolimerizzazione definiti citocompatibili nei test di vitalità cellulare (concentrazione di PI di 0.5% w/v, distanze dalla sorgente UV comprese tra i 20 e i 125 mm e conseguenti tempi di reticolazione tra i 40 e i 90 secondi), siano adeguati anche per l'ottenimento di idrogeli che presentano una distribuzione cellulare effettivamente 3D e omogenea, già dagli istanti successivi alla polimerizzazione.

È stato dimostrato come la formazione *in vivo* di strutture biologiche complesse, quali ad esempio vasi sanguigni, sia strettamente dipendente dall'esistenza di interazioni cellula-cellula[73]. Il monitoraggio nel tempo del comportamento di HUVEC GFP incluse negli idrogeli ha dimostrato come la formazione di queste interazioni cellula-cellula sia dipendente tra le altre cose dalla densità cellulare iniziale. HUVEC GFP incluse in idrogeli di GelMA a media e alta metacrilazione con una densità iniziale di 1 M/ml non mostrano fenomeni di spreading o di interazione intercellulare in colture di 7 giorni. Questo potrebbe essere conseguenza di una distanza troppo elevata tra le cellule, che impedisce l'instaurarsi di legami cellula-cellula. Le cellule, dopo un'iniziale diminuzione dell'attività metabolica (probabilmente causata dallo stress del processo di inclusione) dimostrano comunque un metabolismo attivo, indice di benessere. A densità più elevata (10M/ml), le distanze più ridotte tra le cellule permettono invece l'instaurarsi di interazioni intercellulari. Per

entrambi i gradi di metacrilazione utilizzati, le cellule presentano fenomeni di spreading già al giorno 3, che portano al giorno 7 alla formazione di alcune reti cellulari interconnesse. La formazione di interconnessioni è più evidente negli strati più profondi degli idrogeli, in particolare nell'intorno del vetro sul quale l'idrogelo è adeso: le cellule potrebbero in queste zone risentire della maggior rigidità meccanica del substrato. Le cellule più superficiali mantengono invece una conformazione sferica e isolata. Anche in questo caso, i dati relativi all'attività metabolica cellulare mostrano un metabolismo cellulare attivo. Questi dati confermano quanto osservato nelle immagini a microscopia, e già dimostrato in studi precedenti[35, 54, 82]: gli idrogeli di GelMA risultano essere una matrice affine all'adesione e allo spreading cellulare, mantenendo le cellule metabolicamente attive nel tempo e favorendo la formazione progressiva di network su più piani. Nonostante l'attività metabolica cresca nel tempo, evidenziando uno stato di generale benessere cellulare, le analisi di proliferazione mostrano una tendenza inversa. La diminuzione nel numero di cellule, evidente in maniera significativa al giorno 7 negli idrogeli ad alta metacrilazione, potrebbe essere spiegata nell'ottica dell'esistenza di fenomeni apoptotici caratteristici del processo di rivascularizzazione. Segura et al.[87] dimostrano infatti come la formazione di strutture vascolarizzate in matrici tridimensionali (Matrigel) *in vitro* sia strettamente correlata al presentarsi di processi apoptotici. Questo è conforme al bilancio esistente *in vivo* tra processo di apoptosi e crescita cellulare che determina il rimodellamento tessutale e il mantenimento dell'omeostasi[88]. Dal momento che i processi angiogenetici e di rivascularizzazione coinvolgono una riorganizzazione dei tessuti preesistenti, l'apoptosi cellulare si presenta come parte intrinseca al processo[89]. Segura et al.[87] dimostrano sempre nello stesso studio come questi processi apoptotici siano concentrati nella prima fase di riorganizzazione caratterizzata dalla formazione di interconnessioni cellulari. Nel tempo la proliferazione prende il sopravvento, portando alla formazione della struttura capillare. I dati ottenuti nel presente studio, sembrano quindi essere conformi a questa dinamica, indicando come la riorganizzazione in network riscontrata nelle HUVEC GFP ad alta densità in GelMA possa rientrare in una fase preliminare di un processo di neovascolarizzazione.

Una delle principali sfide dell'ingegnerizzazione di tessuti *in vitro* è la definizione di una matrice biomimetica tridimensionale che presenti le caratteristiche di microarchitettura e controllo della topografia cellulare presentate dal tessuto di riferimento[61]. Per questo,

dall'analisi delle proprietà del GelMA come matrice biomimetica alla macroscale, si è passati all'indagine di una possibile tecnica per l'ottenimento di micro pattern cellulari dalla geometria definita e controllabile. Numerosi studi hanno dimostrato come la combinazione di idrogeli fotopolimerizzabili a base di gelatina e di tecniche di fotopatterning alla microscala permetta di ottenere pattern cellulari ad alta risoluzione a partire dall'esposizione di questo materiale a raggi UV tramite una fotomaschera[17, 29, 65]. Esistono tuttavia tecniche alternative per l'ottenimento di pattern di idrogeli fotopolimerizzabili. Il mold patterning, studiato in associazione ad altre categorie di idrogeli[28, 41], non è mai stato applicato all'ottenimento di pattern di idrogeli a base di gelatina metacrilata. I risultati ottenuti in questo studio dimostrano come la combinazione di fotopolimerizzazione e mold patterning permetta di ottenere pattern con una risoluzione elevata. L'analisi quantitativa sulle dimensioni dei pattern ha dimostrato per entrambi i gradi di metacrilazione esaminati una fedeltà elevata della larghezza dei canali di GelMA rispetto allo stampo. L'analisi sulla cross section ha poi evidenziato come i pattern ottenuti abbiano un profilo conforme alla geometria del canale in termini di ortogonalità delle pareti laterali, soprattutto per il lotto ad alta metacrilazione. Questi risultati mostrano le potenzialità di questa tecnica nella microstrutturazione di pattern ad alta risoluzione anche su spessori relativamente elevati, difficilmente ottenibile con foto patterning in assenza di fonti luminose finemente collimate che aumenterebbero i costi di processo. Nel foto patterning, infatti, all'aumentare dello spessore dell'idrogelo che si vuole ottenere, aumenta anche la dispersione della luce: questo porta a magnificazioni nella larghezza del pattern, diminuendone la risoluzione spaziale. Questo fenomeno è presente già a spessori intorno ai 100 μ m in assenza di fonti luminose collimate [65] e diventa evidente per spessori elevati anche in condizioni più focalizzate di illuminazione. La risoluzione dei pattern ottenuti risulta minore se si considera l'altezza dei canali. Dal punto di vista del patterning alla microscala, l'utilizzo del lotto ad alta metacrilazione permette di ottenere strutture dalla geometria più conforme agli stampi, riducendo drasticamente l'innescò di difetti. Le performance dei due lotti ad alta e media metacrilazione, comparabili alla macroscale in termini di citotossicità e interazione con le cellule, dimostrano come l'idrogelo ad alta metacrilazione sia più adatto al micropatterning in termini di risoluzione. Osservazioni tutt'ora in corso di validazione sembrano evidenziare inoltre una maggior resistenza nel tempo dei pattern a metacrilazione più alta nei pattern alla microscala.

Questo fenomeno di dipendenza della velocità di degradazione dal grado di metacrilazione, evidente alla macroscale per la metacrilazione più bassa, potrebbe quindi allargarsi alla microscala anche a quella media. Nessun dato certo, tuttavia, è stato ancora ottenuto a riguardo.

L'applicazione di tecniche di mold patterning agli idrogeli di GelMA è mirata all'ottenimento di strutture tridimensionali e geometricamente definite di cellule alla microscala. L'effettiva possibilità di incapsulare le cellule in pattern in maniera omogenea su tre dimensioni è stata dimostrata dall'analisi quantitativa della distribuzione cellulare all'interno di canali fotopolimerizzati a partire da stampi con due geometrie diverse. L'analisi della distribuzione di HUVEC GFP in canali paralleli ha dimostrato un'uniformità sulla lunghezza, ma una concentrazione maggiore di cellule nella parte centrale dei canali. Questo dipende dalle dinamiche di flusso alle quali è sottoposto il prepolimero iniettato nel canale. Nell'ottica di una futura applicazione nell'ambito della micro vascolarizzazione *in vitro*, questa disomogeneità iniziale potrebbe essere accettabile dove la scelta di canali paralleli rappresenta un primo passo per l'ottenimento di singoli vasi. La distribuzione delle cellule si è dimostrata omogenea anche nella seconda geometria che presenta angoli a 90°. Si è poi ottenuto un profilo omogeneo di tridimensionalità nella distribuzione delle cellule sulla sezione laterale dei pattern, maggiormente evidente per concentrazioni cellulari più elevate (10M/ml). Questo dimostra l'efficacia del protocollo presentato nella realizzazione di pattern cellulari che soddisfano quindi richieste di tridimensionalità e micro topografia cellulare controllata.

I risultati di questo studio dimostrano come idrogeli fotopolimerizzabili a base di gelatina metacrilata abbiano caratteristiche promettenti come matrici biomimetiche alla macro e alla microscala. La combinazione di tecniche di fotopolimerizzazione e mold patterning permette poi di ottenere microstrutture cellulari ad alta risoluzione, omogenee, tridimensionali e dalla geometria controllata.

5 CONCLUSIONE E SVILUPPI FUTURI

Questo lavoro ha dimostrato le potenzialità di idrogeli fotopolimerizzabili a base di gelatina metacrilata come matrici biomimetiche tridimensionali sia alla macro e che alla micro scala. La risposta di cellule HUVEC GFP di linea continua coltivate in idrogeli alla macroscale ha evidenziato la citocompatibilità del materiale e della tecnica di fotopolimerizzazione, dimostrando la possibilità di includere cellule vitali e omogeneamente distribuite nelle tre dimensioni. È stata poi osservata la tendenza delle cellule incluse a densità elevate alla formazione di network, associata alla presenza di una dinamica di comportamento cellulare compatibile con la fase iniziale dei processi angiogenetici. Il passaggio alla microscala è avvenuto attraverso un protocollo di mold patterning messo a punto tramite l'uso combinato di fotopolimerizzazione e di replica molding di PDMS. Questo approccio si è dimostrato adeguato all'ottenimento di micropattern cellulari ad alta risoluzione, omogenei, tridimensionali e dalla geometria controllata.

Questo studio preliminare rappresenta un primo passo verso possibili applicazioni di ingegnerizzazione di tessuti vascolarizzati *in vitro*. Un'analisi del comportamento cellulare a lungo termine nei pattern alla microscala sarà il primo punto da approfondire per confermare la fattibilità dell'approccio proposto. In seguito, i risultati ottenuti con cellule di linea continua dovranno essere validati con cellule primarie, per un confronto con tipi cellulari caratterizzati da dinamiche di comportamento più fisiologiche.

Nell'ottica di possibili sviluppi futuri, la tecnica di mold patterning indagata offre anche la possibilità di includere in pattern adiacenti tipi cellulari diversi (Figura 5.1). Considerata la complessità del microambiente cellulare trovato *in vivo*, occorre infatti prevedere un'indagine circa possibili interazioni tra cellule endoteliali e muscolari lisce incluse in canali adiacenti, in modo da guidare la generazione di reti vascolari ingegnerizzate attraverso il controllo della microarchitettura multicellulare. Come passo ulteriore, inoltre, si può prevedere la possibilità di includere fattori di crescita angiogenetici all'interno degli idrogeli in modo da favorirne un rilascio controllato e graduale, e mirato a replicare le dinamiche di trasporto dei fattori solubili che caratterizzano i processi angiogenetici *in vivo*.

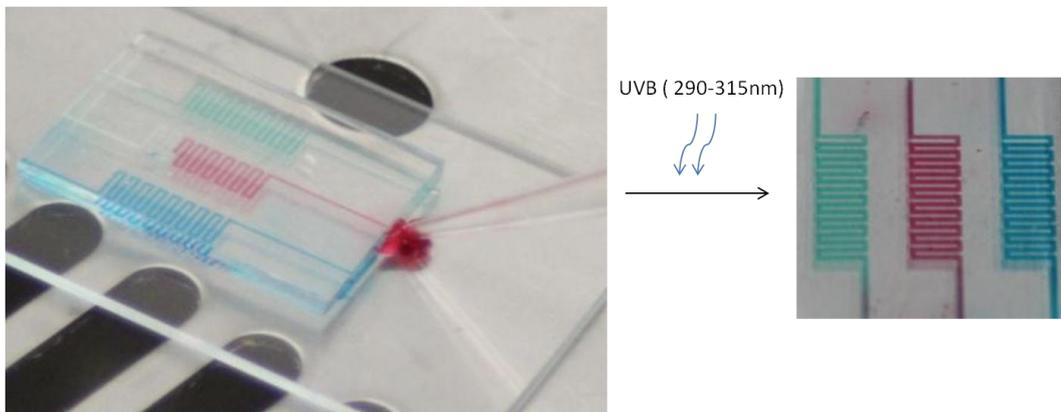


Figura 5.1 Sviluppi futuri: rappresentazione della potenzialità del mold patterning di idrogeli fotopolimerizzabili nell'ottenimento di micropattern multicellulari.

BIBLIOGRAFIA

1. Orlando, G., et al., *Regenerative Medicine and Organ Transplantation: Past, Present, and Future*. Transplantation, 2011. **91**(12): p. 1310-1317.
2. Joseph E, M., *The first successful organ transplants in man*. Journal of the American College of Surgeons, 2005. **200**(1): p. 5-9.
3. Mantero, S., *Fondamenti di ingegneria dei tessuti per la medicina rigenerativa*. Bologna: Patron, 2009.
4. <http://www.unos.org/>, 19/11/2011
5. Ambrosini, E., et al., *Cycling Induced by Electrical Stimulation Improves Motor Recovery in Postacute Hemiparetic Patients*. Stroke, 2011. **42**(4): p. 1068-1073.
6. Anthony, A., *Engineering organs*. Current Opinion in Biotechnology, 2009. **20**(5): p. 575-592.
7. Mason, C. and P. Dunnill, *A brief definition of regenerative medicine*. Regenerative Medicine, 2007. **3**(1): p. 1-5.
8. Greenwood, H.L., et al., *Regenerative medicine and the developing world*. Plos Medicine, 2006. **3**(9): p. 1496-1500.
9. Qasim, W., H.B. Gaspar, and A.J. Thrasher, *Progress and prospects: gene therapy for inherited immunodeficiencies*. Gene Ther, 2009. **16**(11): p. 1285-1291.
10. Mason, C., et al., *Cell therapy industry: billion dollar global business with unlimited potential*. Regenerative Medicine, 2011. **6**(3): p. 265-272.
11. Naujok, O., et al., *Insulin-producing Surrogate beta-cells From Embryonic Stem Cells: Are We There Yet?* Molecular Therapy, 2011. **19**(10): p. 1759-1768.
12. Wang, C., R.R. Varshney, and D.-A. Wang, *Therapeutic cell delivery and fate control in hydrogels and hydrogel hybrids*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2010. **62**(7-8): p. 699-710.
13. Kuci, S., et al., *Adult stem cells as an alternative source of multipotential (pluripotential) cells in regenerative medicine*. Current stem cell research & therapy, 2009. **4**(2): p. 107-117.
14. Lam, P.K., et al., *Development and evaluation of a new composite Laserskin graft*. The Journal of trauma, 1999. **47**(5): p. 918-22.

15. Macchiarini, P., et al., *Clinical transplantation of a tissue-engineered airway*. Lancet, 2008. **372**(9655): p. 2023-2030.
16. Liu Tsang, V. and S.N. Bhatia, *Three-dimensional tissue fabrication*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2004. **56**(11): p. 1635-1647.
17. Aubin, H., et al., *Directed 3D cell alignment and elongation in microengineered hydrogels*. Biomaterials, 2010. **31**(27): p. 6941-6951.
18. Kaji, H., et al., *Engineering systems for the generation of patterned co-cultures for controlling cell-cell interactions*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 2011. **1810**(3): p. 239-250.
19. Griffith, L.G. and M.A. Swartz, *Capturing complex 3D tissue physiology in vitro*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(3): p. 211-224.
20. Tibbitt, M.W. and K.S. Anseth, *Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture*. Biotechnology and Bioengineering, 2009. **103**(4): p. 655-663.
21. Gauvin, R. and A. Khademhosseini, *Microscale Technologies and Modular Approaches for Tissue Engineering: Moving toward the Fabrication of Complex Functional Structures*. Acs Nano, 2011. **5**(6): p. 4258-4264.
22. Avgoustiniatos, E.S. and C.K. Colton, *Effect of External Oxygen Mass Transfer Resistances on Viability of Immunoisolated Tissuea*. Annals of the New York Academy of Sciences, 1997. **831**(1): p. 145-166.
23. Geckil, H., *Engineering hydrogels as extracellular matrix mimics*. Nanomedicine, 2010. **5**: p. 469-484.
24. Montano, I., et al., *Formation of human capillaries in vitro: the engineering of prevascularized matrices*. Tissue Eng Part A, 2010. **16**(1): p. 269-82.
25. Supp, D.M., A.C. Karpinski, and S.T. Boyce, *Vascular endothelial growth factor overexpression increases vascularization by murine but not human endothelial cells in cultured skin substitutes grafted to athymic mice*. Journal of Burn Care & Rehabilitation, 2004. **25**(4): p. 337-345.
26. Wu, X., et al., *Tissue-engineered microvessels on three-dimensional biodegradable scaffolds using human endothelial progenitor cells*. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 2004. **287**(2): p. H480-H487.
27. Dickinson, L.E., M.E. Moura, and S. Gerecht, *Guiding endothelial progenitor cell tube formation using patterned fibronectin surfaces*. Soft Matter, 2010. **6**(20): p. 5109.

28. Raghavan, S., et al., *Geometrically Controlled Endothelial Tubulogenesis in Micropatterned Gels*. Tissue Engineering Part A, 2010. **16**(7): p. 2255-2263.
29. Du, Y., et al., *Sequential Assembly of Cell-Laden Hydrogel Constructs to Engineer Vascular-Like Microchannels*. Biotechnology and Bioengineering, 2011. **108**(7): p. 1693-1703.
30. Dreifus, M., O. Wichterle, and D. Lim, *Intra-cameral lenses made of hydrocolloidal acrylates*. Ceskoslovenska oftalmologie, 1960. **16**: p. 154-9.
31. Zhu, J. and R.E. Marchant, *Design properties of hydrogel tissue-engineering scaffolds*. Expert Review of Medical Devices, 2011. **8**(5): p. 607-626.
32. Kudela, V., *Encyclopedia of Polymer Science and Engineering*. New York: Wiley, 1987.
33. Hennink, W.E. and C.F. van Nostrum, *Novel crosslinking methods to design hydrogels*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2002. **54**(1): p. 13-36.
34. Lee, K.Y. and D.J. Mooney, *Hydrogels for tissue engineering*. Chemical Reviews, 2001. **101**(7): p. 1869-1879.
35. Hutson, C.B., et al., *Synthesis and Characterization of Tunable Poly(Ethylene Glycol): Gelatin Methacrylate Composite Hydrogels*. Tissue Engineering Part A, 2011. **17**(13-14): p. 1713-1723.
36. Carletti, E., A. Motta, and C. Migliaresi, *Scaffolds for tissue engineering and 3D cell culture*. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), 2011. **695**: p. 17-39.
37. Tanzi, M.C., *Fondamenti di bioingegneria chimica: non solo biomateriali*. Pitagora Editrice Bologna, 2006.
38. Ifkovits, J.L. and J.A. Burdick, *Review: Photopolymerizable and Degradable Biomaterials for Tissue Engineering Applications*. Tissue Engineering, 2007. **13**(10): p. 2369-2385.
39. Van Vlierberghe, S., P. Dubruel, and E. Schacht, *Biopolymer-Based Hydrogels As Scaffolds for Tissue Engineering Applications: A Review*. Biomacromolecules, 2011. **12**(5): p. 1387-1408.
40. Durst, C.A., et al., *Flexural characterization of cell encapsulated PEGDA hydrogels with applications for tissue engineered heart valves*. Acta Biomaterialia, 2011. **7**(6): p. 2467-2476.

41. Yeh, J., et al., *Micromolding of shape-controlled, harvestable cell-laden hydrogels*. *Biomaterials*, 2006. **27**(31): p. 5391-5398.
42. Sun, G., et al., *Functional neovascularization of biodegradable dextran hydrogels with multiple angiogenic growth factors*. *Biomaterials*, 2011. **32**(1): p. 95-106.
43. Park, K.H., K. Na, and H.M. Chung, *Enhancement of the adhesion of fibroblasts by peptide containing an Arg-Gly-Asp sequence with poly(ethylene glycol) into a thermo-reversible hydrogel as a synthetic extracellular matrix*. *Biotechnology Letters*, 2005. **27**(4): p. 227-231.
44. Moon, J.J., et al., *Biomimetic hydrogels with pro-angiogenic properties*. *Biomaterials*, 2010. **31**(14): p. 3840-7.
45. Leslie-Barbick, J.E., et al., *The promotion of microvasculature formation in poly(ethylene glycol) diacrylate hydrogels by an immobilized VEGF-mimetic peptide*. *Biomaterials*, 2011. **32**(25): p. 5782-5789.
46. Deligkaris, K., et al., *Hydrogel-based devices for biomedical applications*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2010. **147**(2): p. 765-774.
47. Sperinde, J.J. and L.G. Griffith, *Control and prediction of gelation kinetics in enzymatically cross-linked poly(ethylene glycol) hydrogels*. *Macromolecules*, 2000. **33**(15): p. 5476-5480.
48. Bajpai, A.K., et al., *Responsive Polymers in Biology and Technology*. *Polymer Reviews*, 2011. **51**(1): p. 53-97.
49. Yu, C.-Y., et al., *Composite microparticle drug delivery systems based on chitosan, alginate and pectin with improved pH-sensitive drug release property*. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 2009. **68**(2): p. 245-249.
50. Lohr, M., et al., *Microencapsulated cell-mediated treatment of inoperable pancreatic carcinoma*. *Lancet*, 2001. **357**(9268): p. 1591-1592.
51. Jongpaiboonkit, L., et al., *An adaptable hydrogel array format for 3-dimensional cell culture and analysis*. *Biomaterials*, 2008. **29**(23): p. 3346-3356.
52. Huang, X., et al., *A MEMS affinity glucose sensor using a biocompatible glucose-responsive polymer*. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2009. **140**(2): p. 603-609.
53. Nguyen, K.T., West, J.L., *Photopolymerizable hydrogels for tissue engineering applications*. *Biomaterials*, 2001. **23**: p. 4307-4314.

54. Nichol, J.W., et al., *Cell-laden microengineered gelatin methacrylate hydrogels*. *Biomaterials*, 2010. **31**(21): p. 5536-5544.
55. Elisseff, J., et al., *Transdermal photopolymerization for minimally invasive implantation*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999. **96**(6): p. 3104-3107.
56. Fedorovich, N.E., et al., *The effect of photopolymerization on stem cells embedded in hydrogels*. *Biomaterials*, 2009. **30**(3): p. 344-353.
57. Williams, C.G., et al., *Variable cytocompatibility of six cell lines with photoinitiators used for polymerizing hydrogels and cell encapsulation*. *Biomaterials*, 2005. **26**(11): p. 1211-1218.
58. Bryant, S.J., C.R. Nuttelman, and K.S. Anseth, *Cytocompatibility of UV and visible light photoinitiating systems on cultured NIH/3T3 fibroblasts in vitro*. *Journal of biomaterials science. Polymer edition*, 2000. **11**(5): p. 439-57.
59. Qi, H., et al., *Patterned Differentiation of Individual Embryoid Bodies in Spatially Organized 3D Hybrid Microgels*. *Advanced Materials*, 2010. **22**(46): p. 5276-5281.
60. Peng, H.T., L. Martineau, and P.N. Shek, *Hydrogel-elastomer composite biomaterials: 3. Effects of gelatin molecular weight and type on the preparation and physical properties of interpenetrating polymer networks*. *J Mater Sci Mater Med*, 2008. **19**(3): p. 997-1007.
61. Du, Y., et al., *Directed assembly of cell-laden microgels for fabrication of 3D tissue constructs*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008. **105**(28): p. 9522-9527.
62. Nguyen, T.D., et al., *Effects of Cell Seeding and Cyclic Stretch on the Fiber Remodeling in an Extracellular Matrix-Derived Bioscaffold*. *Tissue Engineering Part A*, 2009. **15**(4): p. 957-963.
63. Flaibani, M., et al., *Muscle Differentiation and Myotubes Alignment Is Influenced by Micropatterned Surfaces and Exogenous Electrical Stimulation*. *Tissue Engineering Part A*, 2009. **15**(9): p. 2447-2457.
64. Pedersen, J.A., S. Lichter, and M.A. Swartz, *Cells in 3D matrices under interstitial flow: Effects of extracellular matrix alignment on cell shear stress and drag forces*. *Journal of Biomechanics*, 2010. **43**(5): p. 900-905.

65. Liu, A., Bhatia, S.N., *Three- Dimensional Photopatterning of Hydrogels Containing Living Cells* Biomedical Microdevices, 2002. **4**(4): p. 257-266.
66. Bulcke, V.d., *Structural and Rheological Properties of Methacrylamide Modified Gelatin Hydrogels*. 2000.
67. Van Den Bulcke, A.I., *Structural and Rheological Properties of Methacrylamide Modified Gelatin Hydrogels*. Biomacromolecules, 2000. **1**: p. 31-38.
68. Möller, L., et al., *Preparation and evaluation of hydrogel-composites from methacrylated hyaluronic acid, alginate, and gelatin for tissue engineering*. The International Journal of Artificial Organs, 2011. **34**(2): p. 93-102.
69. Wang, D., *Synthesis and characterization of a novel degradable phosphate-containing hydrogel*. Biomaterials, 2003. **24**(22): p. 3969-3980.
70. Roger, Y.T., *The green fluorescent protein*. Annu. Rev. Biochem, 1998. **67**: p. 509-544.
71. Wiedenmann, J., F. Oswald, and G.U. Nienhaus, *Fluorescent proteins for live cell imaging: Opportunities, limitations, and challenges*. IUBMB Life, 2009. **61**(11): p. 1029-1042.
72. Smeets, E.F., et al., *A COMPARISON OF SUBSTRATES FOR HUMAN UMBILICAL VEIN ENDOTHELIAL-CELL CULTURE*. Biotechnic & Histochemistry, 1992. **67**(4): p. 241-250.
73. Saik, J.E., et al., *Biomimetic Hydrogels with Immobilized EphrinA1 for Therapeutic Angiogenesis*. Biomacromolecules, 2011. **12**(7): p. 2715-2722.
74. Tsang, V.L. and S.N. Bhatia, *Fabrication of Three-Dimensional Tissues*. 2007. **103**: p. 189-205.
75. Whitesides, G.M., et al., *Soft lithography in biology and biochemistry*. Annual Review of Biomedical Engineering, 2001. **3**: p. 335-373.
76. Mata, A., Fleischman, A.J, Roy, S., *Characterization of Polydimethylsiloxane (PDMS) Properties for Biomedical Micro/Nanosystems*. Biomedical Microdevices, 2005. **7**: p. 281- 293.
77. Hu, S.W., et al., *Tailoring the surface properties of poly(dimethylsiloxane) microfluidic devices*. Langmuir, 2004. **20**(13): p. 5569-5574.
78. Norris, A., *Silicones: ideal material solutions for*

the photovoltaic industry. Photovoltaics International's.

79. Hu, X., et al., *Gelatin Hydrogel Prepared by Photo-initiated Polymerization and Loaded with TGF- β 1 for Cartilage Tissue Engineering*. Macromolecular Bioscience, 2009. **9**(12): p. 1194-1201.
80. Weber, L.M., et al., *PEG-based hydrogels as an in vitro encapsulation platform for testing controlled β -cell microenvironments*. Acta Biomaterialia, 2006. **2**(1): p. 1-8.
81. Hu, X. and C. Gao, *Photoinitiating polymerization to prepare biocompatible chitosan hydrogels*. Journal of Applied Polymer Science, 2008. **110**(2): p. 1059-1067.
82. Xiao, W., et al., *Synthesis and characterization of photocrosslinkable gelatin and silk fibroin interpenetrating polymer network hydrogels*. Acta Biomaterialia, 2011. **7**(6): p. 2384-2393.
83. Liu, Y. and M.B. Chan-Park, *A biomimetic hydrogel based on methacrylated dextran-graft-lysine and gelatin for 3D smooth muscle cell culture*. Biomaterials, 2010. **31**(6): p. 1158-1170.
84. Choi, Y.S., et al., *Study on gelatin-containing artificial skin: I. Preparation and characteristics of novel gelatin-alginate sponge*. Biomaterials, 1999. **20**(5): p. 409-417.
85. Crescenzi, V., A. Francescangeli, and A. Taglienti, *New gelatin-based hydrogels via enzymatic networking*. Biomacromolecules, 2002. **3**(6): p. 1384-91.
86. Benton, J.A., *Photocrosslinking of Gelatin Macromers to Synthesize Porous Hydrogels That Promote Valvular Interstitial Cell Function*. TISSUE ENGINEERING: Part A 2009. **15**: p. 3221-3230.
87. Segura, I., et al., *Inhibition of programmed cell death impairs in vitro vascular-like structure formation and reduces in vivo angiogenesis*. The FASEB Journal, 2002. **16**(8): p. 833-841.
88. Meier, P., A. Finch, and G. Evan, *Apoptosis in development*. Nature, 2000. **407**(6805): p. 796-801.
89. Risau, W., *Mechanisms of angiogenesis*. Nature, 1997. **386**(6626): p. 671-674.