

Relazione finale

SHORT TERM MOBILITY 2016 (I call)

Titolo del programma

Design/analysis of a collagen density gradient on 3D printed scaffolds

Descrizione dettagliata dell'Istituzione ospitante: AO RESEARCH INSTITUTE DAVOS; CLAVADELERSTRASSE 8, 7270 DAVOS, SWITZERLAND

Fruitore: Ugo D'Amora

Istituto di afferenza: ISTITUTO PER I POLIMERI, COMPOSITI E BIOMATERIALI (IPCB) DEL CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE (CNR)

con **qualifica** RICERCATORE T.D. livello III

Dipartimento di afferenza SCIENZE CHIMICHE E TECNOLOGIE DEI MATERIALI

Introduzione

L'ingegneria dei tessuti è un settore interdisciplinare che coinvolge il know how di biologi, chimici, medici, bioingegneri. Essa ha come obiettivo quello di offrire nel campo del recupero d'organi e tessuti danneggiati una valida alternativa all'uso di protesi artificiali ed al trapianto. La strategia di questa disciplina dunque consiste nell'avvalersi di cellule viventi e di supporti innovativi, gli "scaffold" che non solo fungono da semplice sostegno meccanico ma, stimolando l'adesione, la proliferazione e il differenziamento cellulare sono in grado temporaneamente di favorire la rigenerazione, sviluppando sostituti tissutali bioattivi.

Uno scaffold ideale dovrebbe possedere una serie di caratteristiche chimiche, biochimiche e biofisiche. Innanzitutto dovrebbe essere altamente poroso, con pori aperti ed interconnessi e con diametro opportuno, al fine di favorire la migrazione delle cellule e la diffusione di nutrienti; dovrebbe essere caratterizzato da una matrice polimerica biodegradabile e biocompatibile, con delle proprietà fisiche e meccaniche simili a quelle del tessuto da sostituire e contraddistinto da una cinetica di degradazione confrontabile con quella di ricrescita del tessuto naturale; dovrebbe avere inoltre proprietà chimiche superficiali tali da promuovere l'adesione, la proliferazione e il differenziamento delle cellule.

E'così che è nata la necessità di ricercare dei materiali "bio-inspired", ad elevata capacità di interfacciarsi con i tessuti viventi, minimizzandone le reazioni avverse e la necessità di sviluppare nuovi approcci progettuali e soluzioni di processo.

L'introduzione delle tecnologie di Rapid Prototyping nel campo dell'ingegneria dei tessuti ha permesso di suddividere le tecniche di realizzazione degli scaffold in due grandi categorie. La prima è rappresentata dalle tecniche convenzionali (Solvent casting/Particulate leaching, Gas foaming, Fiber bonding, Emulsione, Phase Separation, Sinterizzazione delle microsfele polimeriche) le quali permettono la realizzazione di substrati 3D biodegradabili con struttura porosa ma non consentono la realizzazione di un network interconnesso. La seconda categoria invece comprende le tecniche non convenzionali di prototipazione rapida o solid free form fabrication (three-dimensional printing, three-dimensional biplotting, three-dimensional fiber deposition, stereolithography, fused deposition modelling, selective laser sintering) che si interfacciano con un computer e consentono di ottenere strutture con pori interconnessi e facilmente riproducibili. Queste ultime e in particolare il metodo *3D Fiber Deposition* (ovvero deposizione tridimensionale delle fibre) sono da preferire rispetto alle tecnologie convenzionali proprio perché consentono di realizzare strutture a morfologia controllata (è, infatti, possibile modulare il diametro della fibra, la distanza centro-centro tra due fibre adiacenti poste sullo stesso piano e lo spessore dello strato) con elevata riproducibilità, con pori totalmente interconnessi e senza l'impiego di solventi tossici per la rimozione di sali e degli agenti porogeni.

Inoltre, queste tecniche, permettendo un attento controllo delle proprietà morfologiche e meccaniche, possono essere impiegate per realizzare strutture con gradienti capaci di imitare perfettamente le caratteristiche dei tessuti naturali, nei quali le performance cambiano gradualmente. [1]

Grande interesse è stato rivolto anche alla bioattivazione di materiali potenzialmente privi di siti di riconoscimento biologico. In particolar modo, l'idea di creare un gradiente biochimico di una proteina su di uno scaffold in policaprolattone (PCL), un poliestere alifatico lineare ampiamente utilizzato nell'ingegneria dei tessuti, non è stata ancora sviluppata in maniera sistematica. [2,3]

Obiettivo

La ricerca all'interno del gruppo di "Polymer and Surfaces", dell' "AO Research Institute Davos", è stata focalizzata sulla preparazione e funzionalizzazione di scaffold 3D, ottenuti mediante tecnica di rapid prototyping. In particolare, lo studio si proponeva di estendere i risultati su substrati bidimensionali, ottenuti durante un precedente soggiorno presso l'istituzione ospitante, a strutture tridimensionali porose per la rigenerazione di tessuti interfacciali.

Obiettivo del lavoro è stato, quindi, produrre scaffold e realizzare un gradiente di concentrazione di gruppi amminici e di conseguenza di una biomolecola (collagene tipo I) covalentemente immobilizzata sulla superficie di PCL.

Materiali e Metodi

Preparazione degli scaffold

Strutture tridimensionali a morfologia controllata sono state realizzate. A tal fine, pellet di PCL sono stati processati mediante 3D Bioplotter per produrre scaffold (5 mm x 4 mm x 4 mm) con un pattern di sovrapposizione degli strati di 0/0/90/90°. Per la realizzazione degli scaffold, i pellet sono stati inseriti all'interno di una siringa in acciaio inossidabile, per poi essere portati alla temperatura di 80°C tramite una cartuccia metallica riscaldata, posizionata sul braccio mobile di un Bioplotter (3D discovery®, RegenHU Ltd). Per forzare il materiale attraverso l'ago della siringa, è stato utilizzato azoto in pressione (2.5 bar). Gli scaffold sono stati quindi realizzati per deposizione *layer-by-layer* delle fibre, seguendo i modelli precedentemente caricati nel sistema CAD/CAM del *bioplotter*. L'ugello utilizzato aveva un needle di 330 µm. La dimensione dei pori era di 200 µm.

Preparazione del gradiente di gruppi amminici e di collagene

Per controllare il tempo di reazione e la superficie esposta alla soluzione reattiva è stato messo a punto un sistema (Fig. 1). In particolare, il set-up era costituito da una *syringe pump* con una vite di comando per movimenti lineari di precisione. Lo scaffold in PCL è stato vincolato alla vite per una estremità, ed una regione di 10 mm è stata immersa per 15 minuti nella soluzione reattiva, oggetto del prossimo paragrafo, dopo di che, una seconda regione della struttura è stata lasciata a contatto nel bagno termostatico per altri 15 minuti. Il processo è stato ripetuto tre volte per un totale di 45 minuti in modo da ottenere uno scaffold caratterizzato da quattro zone differenti dalla regione superiore, in puro PCL, a quella inferiore che era in contatto con la soluzione DEA / IPA per 45 minuti (Fig. 1).

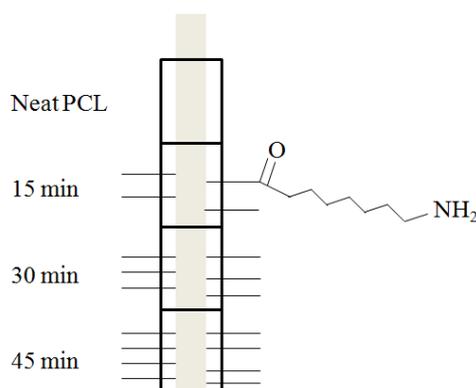


Figura 1. Rappresentazione schematica del gradiente di gruppi amminici lungo la superficie dello scaffold realizzato in PCL.

Successivamente la struttura è stata immersa in una soluzione di collagene di tipo I.

Di seguito sono analizzati i due *step* del processo di funzionalizzazione.

Funzionalizzazione dello scaffold

Amminolisi

Gli scaffold porosi di PCL sono stati funzionalizzati mediante reazione di amminolisi. I campioni sono stati lavati in alcol isopropilico per alcuni minuti a temperatura ambiente e asciugati con un flusso d'azoto. In seguito sono stati trattati con una soluzione 0.43 M di 1,6 diamminoesano in alcol isopropilico per 15, 30 45 minuti, sfruttando l'apparato precedentemente descritto. La reazione è stata condotta termostatando a 37°C e mantenendo costantemente in agitazione la soluzione. Al termine della reazione, la diammina in eccesso è stata allontanata con ripetuti lavaggi in isopropanolo e in

acqua deionizzata. La reazione può essere così riassunta (Fig. 2): un gruppo amminico della diammina alchilica reagisce con il carbonile (CO=) del poliestere formando un legame ammidico, mentre l'altro ammino-gruppo, non coinvolto in alcuna reazione, è disponibile per la coniugazione con una molecola bioattiva. Osserviamo che l'amminolisi di per sé già favorisce l'adesione cellulare, poiché riduce l'idrofobicità e la rigidità degli scaffold. Tuttavia, la bioattivazione ha lo scopo di promuovere specifiche risposte biologiche in modo più significativo. [2-5]

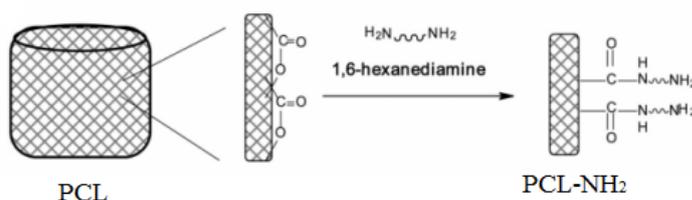


Figura 2. Amminolisi del PCL (Kuo-Yung Chang, et al. 2008).

Grafting del Collagene

Una volta funzionalizzato mediante amminolisi, lo scaffold (PCL-NH₂) è stato trattato con una soluzione di collagene di tipo I (4 mg/ml in 0.5 M di acido acetico) per 24 ore a -20°C. I campioni sono stati liofilizzati per 24 ore e successivamente trattati con una soluzione di carbodiimide (48 mM 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) e 6 mM N-hydroxy-succinimide (NHS) in 2-Morpholinoethanesulfonic acid (MES)), (Fig. 3). [2-5]

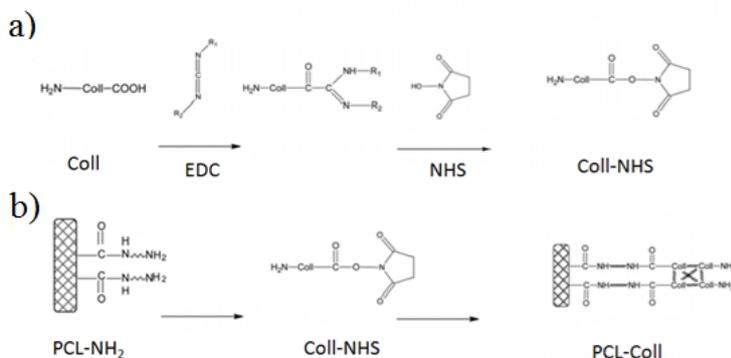


Figura 3. Reazione di *grafting* del collagene alla superficie di PCL trattata precedentemente mediante amminolisi (Kuo-Yung Chang, et al. 2008).

Analisi Morfologica: Microtomografia

Nel presente lavoro è stato impiegato un apparato μ CT40 (Scanco Medical, Switzerland) tramite il quale sono state svolte delle analisi microtomografiche su scaffold 3D polimerici realizzati mediante la tecnica 3D Fiber Deposition. Sono così state valutate l'interconnessione della struttura, la porosità, la dimensione effettiva della fibra, dei pori e lo spessore di ogni stato.

Microscopia Confocale

Mediante coniugazione di un dye fluorescente alla superficie sottoposta al trattamento di amminolisi, è stata monitorata la presenza dei gruppi amminici. Il probe fluorescente utilizzato (Rodamina B Isotiocianato, RBITC, Sigma-Aldrich) risultava avere una lunghezza d'onda di eccitazione di 543 nm e di emissione di 572 nm. I campioni funzionalizzati sono stati trattati con una soluzione 0.1 mg/ml di RBITC in alcol isopropilico per 24 ore a 2°- 4°C, mantenendo sotto agitazione magnetica la soluzione reattiva. In seguito, i campioni sono stati lavati per 24 ore in alcol isopropilico e in acqua deionizzata a temperatura ambiente e successivamente sono stati essiccati sotto vuoto per 24 ore. La coniugazione con RBITC permette di visualizzare unicamente i gruppi amminici, in quanto il gruppo Isotiocianato (-N=C=S) reagisce selettivamente con i gruppi NH₂ formando un legame covalente stabile. Il colorante in eccesso è allontanato durante i lavaggi, mentre i gruppi ossidrilici (-OH) non reagiscono con il dye fluorescente.

Staining del Collagene

Per mostrare il gradiente di collagene chimicamente legato alla superficie di policaprolattone, è stata utilizzata una soluzione di Coomassie Brilliant blue R250 (Fluka) per 30 minuti. Successivamente, lo scaffold è stato ripetutamente lavato in acqua deionizzata per 1 ora e lasciato essiccare sotto vuoto a temperatura ambiente per 1 ora.

Risultati e Discussione

La Figura 4 mostra la struttura in PCL realizzata.

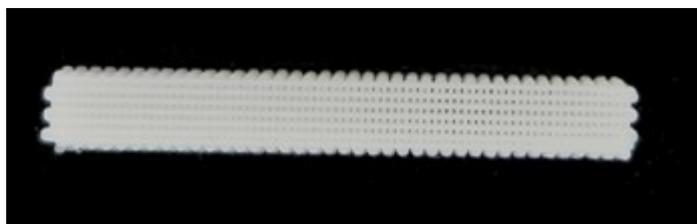


Figura 4 Scaffold 3D in PCL realizzato mediante tecnica di rapid prototyping.

Le analisi microtomografiche e morfometriche sono state eseguite con una risoluzione (voxel size) di $12\ \mu\text{m}$ (70 kVp, 114 μA , and 150 ms integration time).

Esse hanno consentito di valutare principalmente la distribuzione e la dimensione dei pori, l'interconnessione e la porosità delle strutture 3D realizzate utilizzando la tecnica *3D fiber deposition*, precedentemente descritta. Di seguito è riportata un'immagine ottenuta dall'elaborazione dei dati. In particolare i parametri sperimentali sono in accordo con quelli teorici, il diametro della fibra è $265.1 \pm 35.0\ \mu\text{m}$. Inoltre, gli scaffold sono totalmente interconnessi con una porosità del 47% ed una larghezza dei pori pari a $224.0 \pm 4.0\ \mu\text{m}$ (Fig. 5).

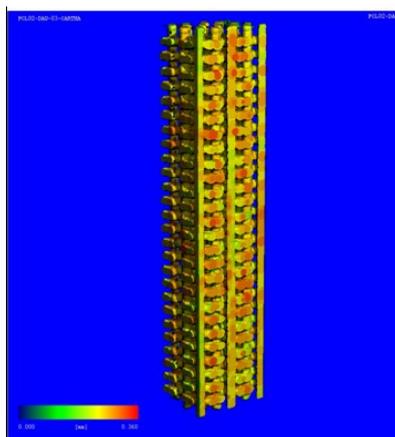


Figura 5. Ricostruzione 3D dello scaffold. La Microtomografia evidenzia la distribuzione dei pori, l'interconnessione, la dimensione delle fibre.

Una volta funzionalizzato lo scaffold, come descritto precedentemente, è stato possibile valutare il gradiente dei gruppi amminici attraverso il grafting covalente di un dye fluorescente. L'analisi al confocale (Fig. 6) ha permesso infatti di valutare qualitativamente il gradiente in termini di intensità di fluorescenza.

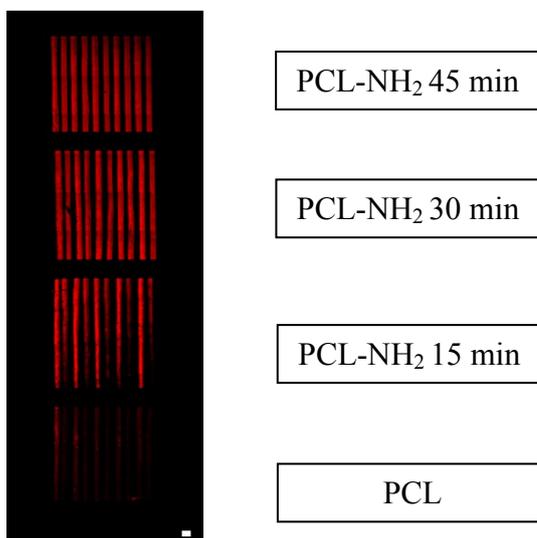


Figura 6. Risultati ottenuti dall'analisi CLSM condotta sulla struttura in PCL funzionalizzata con gruppi amminici. Scale Bar: 400 μ m.

Lo scaffold funzionalizzato è stato trattato con la soluzione di collagene. Successivamente la colorazione con il Blue di Coomassie ha permesso di visualizzare il gradiente della biomolecola (Fig. 7).

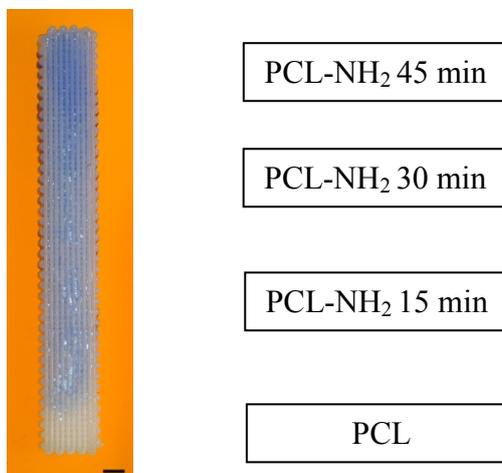


Figura 7. Risultato ottenuto dalla colorazione con Blue di Coomassie. Scale Bar: 5 mm.

Conclusione

Il trattamento di modifica superficiale è stato con successo esteso a scaffold 3D polimerici a morfologia controllata, dimostrando la possibilità di produrre costrutti con gradienti strutturali e chimici per soluzioni innovative nel campo dell' ingegneria dei tessuti. In futuro saranno presi in considerazione percorsi mirati alla produzione di scaffold caratterizzati da entrambi i gradienti chimici, di proprietà meccaniche/morfologiche.

Bibliografia

- [1] N. J. Castro, S. A. Hacking, L. G. Zhang. *Ann. Biomed. Eng.* **2012** 40,1628.
- [2] A. Gloria, F. Causa, T. Russo, E. Battista, R. Della Moglie, S. Zeppetelli, R. De Santis, P. A. Netti, L. Ambrosio, *Biomacromolecules* **2012**, 13, 3510.
- [3] F. Causa, E. Battista, R. Della Moglie, D. Guarnieri, M. Iannone, P. A. Netti, *Langmuir* **2010**, 26, 9875
- [4] Z. Yang, M. ZhengWei, S. HuaYu, G. Chang You, *Sci. China Chem.* **2012**, 55, 2419.
- [5] K. Y. Chang, L. H. Hung, I. M. Chu, C. S. Ko, Y. D. Lee, *J. Biomed. Mater. Res. A.* **2010**, 92, 712.

Note

I risultati ottenuti saranno oggetto di una pubblicazione su rivista impattata, di interesse scientifico internazionale. Si ringrazia per questo il Progetto STM 2016 per i fondi messi a disposizione per l'approfondimento ed il completamento del lavoro di ricerca.