



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN
BIOLOGIA E MEDICINA DELLA RIGENERAZIONE
XXVII° CICLO

TESI DI DOTTORATO

**PROPRIETÀ OSTEOINDUTTIVE DI SUPERFICI MICRO E
NANO STRUTTURATE PER L'IMPLANTOLOGIA OSSEA**

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof.ssa Maria Teresa Conconi

Supervisore: Ch.mo Prof.ssa Maria Teresa Conconi

Dottoranda: Enrica Guidi

*“Insegnare”
significa “mostrare che è possibile”,
“apprendere”
vuol dire “rendere realizzabile per se stessi”*

— Paulo Coelho

INDICE

RIASSUNTO	I
ABSTRACT	III
1. INTRODUZIONE	1
1.1 Il tessuto osseo	1
1.2 Cellule staminali mesenchimali	2
1.3 Differenziamento in osteoblasti	4
1.4 Ingegneria tissutale e rigenerazione ossea	10
1.5 Biomateriali	14
1.6 Nanotecnologie per la rigenerazione di tessuti ossei	19
1.7 Progetto <i>Nanobones</i>	22
2. MATERIALI E METODI	25
2.1 Superfici modificate con micropillars	25
2.2 Superfici modificate con nanopillars	28
2.3 Colture cellulari	31
2.4 Colture cellulari su supporti modificati con micro e nanopillars	31
2.5 Microscopia elettronica a scansione	32
2.6 Immunofluorescenza (IF)	33
2.7 MTS-test	34
2.8 Valutazione della deposizione di sali di calcio	35
2.9 Estrazione e quantificazione di RNA	37
2.10 One step RT-PCR	38
2.11 Real time PCR	40

3. RISULTATI E DISCUSSIONE	45
3.1 Produzione di supporti in polistirene con superfici microstrutturate	45
3.2 Valutazione dell'adesione e proliferazione di cellule MC3T3- E1 su superfici microstrutturate	48
3.3 Valutazione delle proprietà osteoinduttive di superfici microstrutturate	50
3.4 Produzione di scaffold con superfici nanostrutturate	54
3.5 Valutazione delle proprietà osteoinduttive di superfici nanostrutturate	58
4. CONCLUSIONI	63
5. BIBLIOGRAFIA	65
6. RINGRAZIAMENTI	73

RIASSUNTO

Le procedure di sostituzione ossea vengono usate per impianti dentali e per correggere difetti strutturali di vario tipo. Per ottenere un riparo funzionale a lungo termine, i sostituti ossei, composti da materiali metallici o polimerici, devono unirsi in modo stabile al tessuto del paziente. Questo processo, chiamato osteointegrazione, è una conseguenza della migrazione di cellule indifferenziate dal tessuto circostante all'impianto e della loro differenziazione in cellule mature (osteoblasti) che, producendo tessuto osseo, ancorano l'impianto in modo duraturo. Se questo non accade, si ottiene un riparo di bassa qualità funzionale con possibilità di spostamento della protesi.

Nel nostro organismo, la maggior parte delle cellule deve aderire ad un substrato per vivere e proliferare ed è noto che le cellule sono, inoltre, in grado di rispondere alle caratteristiche delle superfici di adesione (per es. rugosità, geometria), attivando al loro interno programmi differenti che determinano il tipo cellulare.

A partire da queste considerazioni, questo lavoro si è proposto di realizzare bioprotesi tridimensionali, utilizzabili nell'implantologia ossea. A tal fine, è stato ottimizzato il processo di stampaggio ad iniezione con formazione di pillar cilindrici di dimensioni micro o nano. Tale processo ha permesso di ottenere un elevato grado di replicazione delle caratteristiche di superficie rendendo il microstampaggio, una tecnica efficace, efficiente ed estremamente interessante da un punto di vista commerciale. Le proprietà osteoinduttive delle superfici micro e nanostrutturate sono state, successivamente, verificate *in vitro* utilizzando cellule staminali mesenchimali da midollo osseo umano. A diversi intervalli di tempo, sono stati valutati l'adesione e la crescita cellulare e il differenziamento osteogenico attraverso la determinazione della deposizione di sali di calcio e l'espressione dell'osteocalcina.

Collettivamente, i dati raccolti dalla sperimentazione *in vitro*, hanno evidenziato che le superfici sia micro che nanostrutturate posseggono proprietà osteoinduttive, permettendo la differenziazione delle MSC in

assenza di fattori di crescita induttivi. In particolare, è stata evidenziata una relazione tra caratteristiche dimensionali della geometria superficiale e potenziale differenziativo. Infatti, l'aumento del diametro dei pillar e dell'interasse si traduce in un incremento della deposizione di sali calcio e dell'espressione di OC, marker tardivo della differenziazione osteogenica. Al contrario, le superfici nano e microstrutturate e le loro caratteristiche dimensionali non sembrano avere effetti sull'adesione e proliferazione cellulare. Ulteriori studi *in vivo* saranno necessari per confermare le proprietà osteoinduttive delle geometrie selezionate con il presente lavoro e verificarne l'osteointegrazione.

ABSTRACT

Bone replacement procedures can be used to replace missing teeth, for repairing bone defects and restoring bone structures. To obtain a functional and long-term repair, bone substitutes, composed of metal or synthetic materials, must firmly join to natural bone. This process, named osseointegration, is a consequence of the migration of undifferentiated cells from the host surrounding tissues to the prosthesis and their differentiation towards mature bone cells producing bone tissue that firmly anchor the implant in place. When cells fail to do this, a soft capsule surrounds the implant resulting in the dislodgment of the prosthesis or low quality repair. In the biological environment, the most of cells must adhere to a substrate to live and proliferate. Moreover, they are able sense the features of the bonding surface (e.g., roughness, geometry) and this can affect the differentiation pathway of cells thus leading to a different phenotype. To achieve a stable anchorage, mesenchymal stem cells (MSCs) must differentiate toward mature osteoblasts rather than connective tissue cell types.

In light of these considerations, the aim of this project is to develop the technology to produce potentially transplantable osteoinductive devices for the replacement and the repair of bone defects. To achieve this purpose, the injection molding process was optimized to realize cylindrical micro- or nano-pillars on the scaffold surface. This technique has allowed to obtain a high degree of feature replication thus making the micro imprinting an effective and efficient technique that is extremely interesting from a commercial point of view. Subsequently, the osteoinductive properties of micro- and nanostructured surfaces were tested *in vitro* using bone marrow derived MSCs.

At different time points various assays were performed in order to assess cell adhesion, morphology and cell viability. The analysis of cell differentiation was carried out through the evaluation of calcium deposition and the quantification of osteocalcin expression.

Collectively, our data show that both micro- and nano-structured

surfaces possess osteoinductive properties, allowing MSC differentiation without any inductive growth factors. In particular, a relationship between dimensional features of surface topography and differentiative potential has been noted. Indeed, the increase in pillar diameters and interpillar distances leads to an enhancement of calcium deposition and OC expression. On the contrary, both micro- and nano-structured surfaces and their features seem to be ineffective on cell adhesion and proliferation. Further *in vivo* studies will be necessary to confirm the osteoinductive properties of the selected surface geometries and verify their osteointegration.

1. INTRODUZIONE

1.1 Il tessuto osseo

Il tessuto osseo appartiene, insieme al tessuto cartilagineo, alla classe dei tessuti connettivi specializzati deputati alla funzione di protezione e sostegno, oltre ad essere implicato nel mantenimento dell'omeostasi dello ione calcio e nel processo emopoietico. Esso origina dal mesenchima, come tutti i tessuti connettivi, ed è costituito da cellule, fibre e da una complessa matrice extracellulare in cui si distinguono una parte organica e una parte inorganica. La peculiarità del tessuto osseo è proprio la presenza di questa matrice mineralizzata, la cui fase organica è costituita prevalentemente da collagene di tipo I (il 97%, il restante 3% è collagene di tipo V) e da proteine non-collageniche (osteocalcina, osteonectina, osteopontina, fibronectina, sialoproteina ossea o BSP, fosfatasi alcalina). La fase inorganica è invece formata da sali di calcio e fosfato depositati in forma di cristalli di idrossiapatite $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, da carbonato di calcio e altri sali in quantità minore. L'elevato grado di mineralizzazione conferisce al tessuto spiccate proprietà meccaniche come durezza e resistenza al carico; le componenti proteiche invece sono determinanti nel garantire elasticità e resistenza alle fratture. Il collagene di tipo I, in particolar modo, possiede una struttura terziaria in cui tre catene polipeptidiche uguali sono avvolte in conformazione elicoidale, conferendo alla molecola, e di conseguenza all'osso, rilevanti proprietà elastiche. Il tessuto osseo, inoltre, rappresenta la fonte primaria di ione calcio per le necessità metaboliche dell'intero organismo; la deposizione e la mobilizzazione del calcio nell'osso sono, infatti, processi dinamici finemente controllati, atti a regolare i livelli plasmatici dello ione.

La componente cellulare del tessuto osseo è costituita da diversi tipi di cellule: cellule osteoprogenitrici, osteoblasti, osteociti e osteoclasti. Sono proprio le cellule a guidare sinergicamente il processo continuo di rimodellamento dell'osso, la sua rigenerazione e la sua riparazione.

I *preosteoblasti* sono le cellule osteoprogenitrici, dotate di una capacità proliferativa che si manifesta prevalentemente durante l'accrescimento corporeo, ma che si mantiene anche durante la vita adulta. Il differenziamento dei preosteoblasti in osteoblasti maturi è regolato da numerosi fattori, i principali dei quali sono il paratormone (PTH), l'ormone della crescita (GH) e il transforming growth factor-beta (TGF- β).

Gli *osteoblasti* sono le cellule responsabili della deposizione dei componenti organici della matrice extracellulare e della sua mineralizzazione. Hanno origine mesenchimale, sono cellule voluminose di forma globosa, con un nucleo rotondeggiante e abbondante citoplasma. Queste cellule sono unite tra loro e con gli osteociti limitrofi attraverso giunzioni comunicanti (gap junctions), ossia particolari tipi di connessioni intercellulari fondamentali per lo scambio di molecole segnale nella coordinazione dell'attività metabolica e nella deposizione di matrice ossea.

Gli *osteociti* sono le cellule tipiche dell'osso maturo, responsabili del suo mantenimento, ma anche determinanti nel processo di rinnovamento della matrice ossea. Hanno una limitata attività biosintetica, non subiscono mitosi, ma si ritiene che mantengano la matrice mineralizzata in uno stato dinamico, mediando il rilascio a breve termine del calcio in essa contenuto o la sua deposizione. L'attività degli osteociti nel mantenimento dell'omeostasi di questo ione resta comunque direttamente controllata dalla concentrazione plasmatica dello ione stesso e indirettamente da PHT e dalla calcitonina (Nishida, Endo, & Yamagiwa, 1999).

Gli *osteoclasti* sono grosse cellule multinucleate derivanti da cellule pluripotenti della famiglia dei monociti/macrofagi. Sono caratterizzate da una zona apicale in cui si trovano i nuclei (da due a molte centinaia) e da una zona basale frastagliata adesa alla matrice ossea. Queste cellule sono le dirette responsabili del riassorbimento del tessuto osseo. In seguito a stimoli locali modificano la loro forma e assumono una marcata polarità; tale variazione ne consente l'attivazione e l'adesione alla matrice ossea da riassorbire. Sono dotate di strutture specializzate dette

podosomi che permettono di delimitare l'area di tessuto in cui verrà formata la lacuna. In questa zona inizieranno ad agire pompe protoniche, enzimi proteolitici e lisosomiali per catalizzare il processo di riassorbimento.

1.2 Cellule staminali mesenchimali

Le cellule staminali sono cellule non specializzate in grado di proliferare, autorigenerarsi indefinitamente (self-renewal), differenziarsi in tipi cellulari differenti in base agli stimoli ambientali che ricevono per ripopolare e rigenerare un dato tessuto *in vivo*. Si possono suddividere in staminali embrionali e staminali adulte. Un particolare tipo di staminali adulte è rappresentato dalle cellule staminali mesenchimali (MSC) che rivestono grande importanza soprattutto per il loro impiego in svariati protocolli clinici. Le MSC sono cellule multipotenti con la capacità di differenziarsi non solo in osteoblasti, ma anche in adipociti, condrociti e mioblasti (Dong et al., 2009). Inizialmente, l'esistenza di tali unità biologiche è stata evidenziata nel midollo osseo. Oggi è appurato che le MSC sono virtualmente ubiquitarie, rappresentando, infatti, una componente dello stroma di moltissimi tessuti. Esse possono essere rintracciate nei tessuti muscolare e adiposo, nel sangue, nella matrice del cordone ombelicale e nel liquido amniotico, nel timo e nella milza. Nel tessuto in cui risiedono, le MSC svolgono diverse funzioni specifiche: forniscono protezione a sostegno dell'emopoiesi, giocano un ruolo chiave per la riparazione dei tessuti di origine e, selettivamente, anche in quelli danneggiati, e risultano poi fondamentali nel controllo dei processi infiammatori grazie alle loro marcate proprietà immunoregolatorie. Viste le loro capacità differenziative, immunomodulatorie e di supporto nella crescita cellulare, l'interesse verso di esse è cresciuto sempre più, tanto da essere considerate attualmente le candidate ideali per la cura delle malattie degenerative.

La presenza delle MSC in molti distretti e tessuti corporei è riconosciuta da tempo, ma le cellule maggiormente utilizzate nell'ambito della

rigenerazione ossea sono quelle estratte e isolate dalla componente stromale del midollo osseo in quanto dimostrano un maggior potenziale osteogenico nonostante alcuni svantaggi a carico del paziente (Liao & Chen, 2014). La facilità con cui le cellule aderiscono al materiale plastico, la relativa facilità di isolamento, il loro elevato potenziale di espansione *ex vivo* e di self-renewal a lungo termine e l'attitudine al differenziamento multilineare sono caratteristiche che le rendono un'interessante risorsa per la terapia cellulare, per la terapia genica e per la medicina rigenerativa. Le MSC infatti hanno peculiari caratteristiche che le rendono interessanti in diversi campi: sono cellule facilmente manipolabili, hanno bassa immunogenicità, se ne può guidare la differenziazione con opportuni stimoli e, in condizioni ambientali ottimali, presentano una buona capacità di autoreplicazione.

Gli stimoli esterni vengono recepiti attraverso la matrice extracellulare (ECM), cioè l'insieme di tutte quelle componenti che forniscono il supporto su cui le cellule possono crescere e proliferare, e che sono in grado di influire sull'organizzazione del citoscheletro delle cellule stesse. Nel caso di ECM sintetica l'interazione tra cellule e substrato risulta regolata da molti parametri, tra cui la composizione del materiale costituente il supporto, le proprietà meccaniche del materiale, la rugosità superficiale e la topografia del supporto.

Numerose ricerche hanno evidenziato il ruolo predominante giocato dalla topografia, in quanto principale responsabile della trasmissione di segnali fisici capaci di indurre l'adesione, la proliferazione e la differenziazione controllata delle MSC (Ravichandran, Liao, & Ng, 2009). Relativamente alle protesi, l'efficacia e la durata di un impianto dipendono fortemente dal contatto che si instaura tra la superficie del substrato (coinvolgendo quindi la geometria superficiale del supporto) e le MSC richiamate per avviare l'osteointegrazione. Le cellule mesenchimali sono state impiegate in diversi studi di rigenerazione ossea al fine di riparare difetti a ossa lunghe, alveoli dentali, e ossa del cranio (Tsuchida et al., 2003).

1.3 Differenziamento in osteoblasti

Come già riferito in precedenza, dalle cellule mesenchimali multipotenti prendono origine più linee cellulari: osteoblasti, adipociti e condrociti, in particolar modo, presentano caratteristiche simili che fanno ipotizzare la presenza di precursori comuni.

È stata messa in luce in popolazioni cellulari derivanti da stroma di midollo osseo di roditori la possibilità che esista un precursore bipotente adipociti-osteoblasti, supportata dall'evidenza di una relazione inversa tra l'espressione del fenotipo osteoblastico piuttosto che adipocitario (J. E. Aubin, 2001).

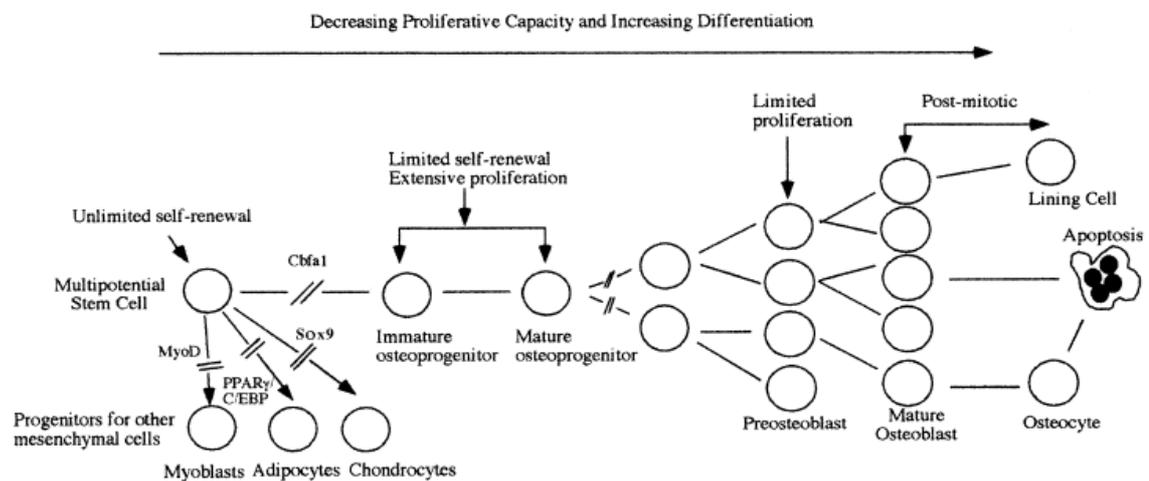


Fig. 1.1: Stadi ipotizzati di proliferazione e differenziamento lungo la linea osteoblastica, comprovati da studi *in vitro* e *in vivo* (J.E. Aubin, 2001)

L'ambiente in cui le cellule sono mantenute in coltura, infatti, condiziona il pathway genetico coinvolto nel differenziamento di questo tipo di precursore. L'utilizzo di supplementi, quali glucocorticoidi e vitamina D in colonie che presentano marker tipici di entrambe le linee cellulari, riesce ad indirizzare il differenziamento in osteoblasti, nonché la regressione di adipociti maturi prima in precursori più proliferativi che presentano fenotipo fibroblastico, e in seguito in cellule con fenotipo osteoblastico.

Numerose evidenze sperimentali hanno poi suggerito la presenza di un

osteo-condroprogenitore bipotente,(J. E. Aubin, 2001), confermata anche dalla ben nota plasticità delle MSC. In alcuni studi su pulcini è stato messo in evidenza un fenomeno di trans-differenziazione da condrocita ipertrofico ad osteoblasto tramite un meccanismo che coinvolge divisioni asimmetriche. È importante però sottolineare che in condizioni standard i condrociti maturi esprimono una varietà di marker comuni anche agli osteoblasti, quali BSP, osteopontina, osteonectina, recettore per il paratormone (PTH-R) e fosfatasi alcalina, sebbene si possano distinguere gli uni dagli altri valutando il tipo di collagene presente (collagene di tipo I e X negli osteoblasti, collagene di tipo IIA e IIB nei condrociti). È quindi necessario un approfondimento ulteriore sul meccanismo che regola questo processo di trans-differenziazione e l'individuazione di nuovi marker sia molecolari che genetici che abbiano maggior specificità.

Gli osteoblasti sono morfologicamente riconoscibili grazie alla presenza dei cosiddetti nodi di mineralizzazione, prodotto finale della proliferazione e del differenziamento degli osteoprogenitori. La presenza di questi nodi compare in colture di cellule ossee a lungo termine a tempi prevedibili e riproducibili, evidenza che rende possibile lo studio e l'analisi più approfondita dei processi che portano allo sviluppo dell'osteoblasto maturo.

Il processo di progressione da MSC ad osteoblasto maturo e sintetizzante matrice si può riassumere in tre fasi distinte.

- *Proliferazione*: le cellule osteoprogenitrici presentano un comportamento altamente mitotico e la tendenza a multistratificare, esprimendo a livelli elevati i geni associati alla formazione della matrice extracellulare (procollagene di tipo I, fibronectina, TGF- β).
- *Maturazione della matrice extracellulare*: dal momento in cui si formano agglomerati di cellule in multistrato la proliferazione diminuisce e viene espresso ai suoi massimi livelli il marker simbolo del differenziamento lungo la linea osteoblastica, l'enzima fosfatasi alcalina.
- *Mineralizzazione*: è caratterizzata dall'espressione di

osteocalcina (OC), sialoproteina ossea (BSP), osteopontina (OPN) e dalla deposizione di calcio in nodi di mineralizzazione visibili anche al microscopio ottico.

Un ruolo cruciale nella formazione degli osteoblasti è il fattore di trascrizione *Cbfa1*, sia durante l'embriogenesi, sia nella relazione tra osteoblasti e condrociti. Questo fattore viene stimolato dalle Bone Morphogenetic proteins (BMPs) e da altri fattori di crescita, ed assume un ruolo importante durante il differenziamento. La sua espressione infatti regola diversi meccanismi quali:

- induzione dello sviluppo osteoblastico. In caso di delezione di *Cbfa1*, infatti, si assiste alla formazione di tessuto cartilagineo e non osseo;
- espressione del marker tardivo osteocalcina; e
- regolazione della quantità di matrice ossea prodotta da osteoblasti già differenziati.

Il prodotto di questo lungo processo di differenziamento è un osteoblasto maturo, contraddistinto da morfologia definita e specifici marcatori. *In vivo*, tuttavia, i marker espressi da tutti gli osteoblasti sono solamente due: la fosfatasi alcalina (ALP) e il PTH-R. Gli altri marcatori dipendono dallo stato di maturazione dell'osso, dal tipo di osso, dall'età degli osteoblasti e dal microambiente in cui risiedono. La regolazione è quindi molto complessa.

L'individuazione di marker specifici di formazione ossea è la chiave necessaria per stabilire l'avvenuto o meno differenziamento delle MSC in osteoblasti. Si può ricondurre la classe dei marcatori, molto variegata ed eterogenea, a due grandi gruppi: fattori solubili e molecole appartenenti alla matrice extracellulare.

a) *Fattori solubili*

BMP: sono state annoverate tra le molecole attive nella regolazione dello sviluppo osteoblastico per la loro abilità nell'indurre la formazione di osso *ex-novo*. Il gruppo delle BMP è molto numeroso, ma tutte le proteine ad esso appartenenti condividono la loro attività nell'indurre l'attivazione della cascata di citochine e fattori di crescita fondamentali

per lo sviluppo osseo, tra cui il gene *Cbfa1*. Tra i membri della famiglia delle BMP la più significativa a livello osseo è BMP-2, per la quale molteplici studi hanno dimostrato la capacità di indurre differenziamento *in vitro* sia in modelli umani che animali, favorendo lo sviluppo di osteoblasti maturi e funzionanti in modo molto simile alla fisiologia cellulare. E' stato dimostrato infatti che BMP-2 stimola la crescita sia di cellule staminali stromali sia di osteoblasti maturi, inducendo mineralizzazione a livello di matrice, sebbene non induca in modo globale tutti i geni coinvolti nel differenziamento osteoblastico (Jørgensen et. al, 2004).

PTH: è un regolatore fisiologico della mineralizzazione ossea. Nonostante sia accertato il suo contributo nel riassorbimento osseo, i risultati degli studi condotti sul suo ruolo nel differenziamento delle MSC sono contrastanti. Sembrerebbe, infatti, che, se somministrato ad intermittenza, induca un aumento di massa ossea, se somministrato per infusione continua e in modo cronico inibisca il differenziamento lungo la linea osteoblastica. Nonostante questo, ulteriori studi sembrano mostrare come PTH aumenti la vita degli osteoblasti diminuendone l'apoptosi (J. E. Aubin, 2001).

b) Proteine della matrice

Collagene di tipo I: è uno dei primi marker che viene sovraregolato negli osteoprogenitori. La sua deposizione nella ECM sembra essere un evento precoce durante il processo di differenziamento, che induce anche l'attivazione del fattore di trascrizione *Cbfa1*. Anche i peptidi terminali del procollagene di tipo I (PINP e PICP) sono considerati marcatori di formazione ossea, in quanto rilasciati in circolo durante la sintesi di collagene.

Osteocalcina (OC): è una piccola proteina di 5,8 kDa che rientra nel gruppo delle proteine non-collageniche della ECM. Viene sintetizzata e secreta esclusivamente da cellule osteoblastiche in fase finale di maturazione ed è considerata un valido indicatore del loro differenziamento. Viene rilasciata dalle cellule in minima parte nel circolo sanguigno, mentre in maggior quantità viene incorporata nella

matrice ossea rappresentando circa il 15% delle proteine non-collageniche. In seguito al riassorbimento osseo viene liberata nel torrente ematico. Interagendo con proteine e recettori di superficie, l'OC gioca un ruolo attivo nell'organizzazione della matrice extracellulare; si ritiene infatti che si leghi con alta affinità ai cristalli di idrossiapatite, regolandone la crescita e la formazione. L'espressione di OC è modulata da PTH e da molteplici fattori.

Sialoproteina ossea (BSP): è una proteina altamente solfatata, fosforilata e glicosilata che media l'ancoraggio delle cellule alla ECM. Grazie alla sua carica negativa, BSP riesce a sequestrare ioni calcio conservando regioni poligluttammiche che esplicano un potenziale di formazione di cristalli di idrossiapatite. In assenza di OC, si ritiene che BSP possa contribuire attivamente alla formazione di osso.

Osteonectina (SPARC) e Osteopontina (OPN): sono entrambe glicoproteine abbondantemente espresse nell'osso sottoposto a rimodellamento. Sono sintetizzate da cellule della linea osteoblastica e svolgono un ruolo importante nell'inibire la mineralizzazione *in vitro* legandosi all'idrossiapatite, calcio e collagene di tipo I. L'espressione di questi marker suggerisce quindi che è in atto il rimodellamento osseo, seguito dalla stabilizzazione dei cristalli di idrossiapatite e dall'organizzazione delle molecole di collagene (Sila-Asna et. al, 2007).

Fosfatasi alcalina (ALP): è un metalloenzima appartenente ad una classe di proteine della superficie cellulare legate covalentemente al fosfatidil inositolo, fosfolipide delle membrane cellulari. ALP è espressa in molte specie (piante, batteri, animali), in cui svolge il suo ruolo di catalisi di fosfomonoesteri $R-O-PO_3$. La posizione della fosfatasi alcalina a livello di membrana cellulare, inoltre, fa ipotizzare un suo attivo coinvolgimento nel signaling transmembrana (Golub et. al, 2007). L'enzima è presente in diverse isoforme prodotte da differenti tessuti (fegato, osso, rene, intestino, milza, placenta), codificate da quattro loci genetici posti sul cromosoma 1. Di questi quattro, tre geni sono tessuto-specifici: codificano infatti per le forme intestinale, placentare e simil-placentare. Il restante invece è considerato non-tessuto specifico (TNAP): codifica per le forme ossea/epatica/renale, che differiscono

l'una dall'altra per modificazioni postsintetiche di glicosilazione e sialilazione. L'isoforma coinvolta nella formazione di tessuto osseo è la forma ossea, riconoscibile perché disattivata dall'esposizione prolungata al calore (Moss, 1982).

Il ruolo della ALP nella formazione di osso e nel processo di mineralizzazione è stato dimostrato da numerosi studi, che la identificano quale marker espresso dai preosteoblasti in fase precoce di differenziamento, molto prima rispetto alla mineralizzazione e alla espressione delle proteine non-collageniche della matrice. È stato osservato che in colture di MSC da midollo osseo si formano CFU-F che esprimono fosfatasi alcalina e che assumono comportamento tipico degli osteoblasti, nonché nodi di mineralizzazione. Il numero di colonie ALP-positive diminuisce in modo inversamente proporzionale all'età anagrafica del donatore, confermando l'importanza dell'enzima nel processo di sviluppo scheletrico (Nishida et al., 1999). L'espressione dell'enzima può essere indotta da molteplici fattori, in particolar modo dall'arricchimento del terreno di coltura con desametasone (R. M. Porter, Huckle, & Goldstein, 2003) (Jørgensen et al., 2004) e dalla semina delle MSC su biomateriali modificati superficialmente o con caratteristiche osteogeniche (Reilly et. al, 2007).

1.4 Ingegneria tissutale e rigenerazione ossea

L'enorme progresso delle conoscenze nel campo della biologia cellulare e delle biotecnologie ha consentito, negli ultimi anni, lo sviluppo di approcci mirati alla ricostruzione *in vitro* di tessuti o di organi, definendo una nuova branca delle scienze biomediche conosciuta come "ingegneria dei tessuti". La strategia messa in atto consiste nell'avvalersi di cellule viventi e di supporti innovativi per sviluppare sostituti tissutali bioattivi in alternativa a impianti inerti. La necessità di tali innovazioni emerge da una richiesta sempre maggiore dovuta al raggiungimento di una migliore qualità della vita e a un conseguente aumento della vita media, fattori che hanno portato nell'ultimo decennio ad un incremento degli interventi di riparazione di danni legati al

deterioramento di organi e tessuti.

In particolar modo, la rigenerazione del tessuto osseo ha assunto un ruolo rilevante nel campo della chirurgia ortopedica e cranio-facciale. Ogni anno milioni di persone sono soggette a lesioni a carico delle ossa conseguenti a gravi malformazioni congenite, eventi traumatici, ipoplasie, necrosi ischemiche, lesioni neoplastiche primarie (osteosarcomi, tumori ossei benigni) o secondarie (metastasi) ed osteoporosi (Ciapetti et al., 2003; Lin et al., 2003).

Questi danni al tessuto osseo possono essere trattati mediante ricostruzione chirurgica o attraverso il trapianto d'organo. Tuttavia queste strategie sono soggette a limitazioni terapeutiche e metodologiche.

La necessità di introdurre nuove tecniche d'intervento, la domanda crescente di tessuto osseo (essendo questo il secondo tessuto più trapiantato, preceduto unicamente dal sangue; Stylios et al., 2007) e l'espansione dell'ingegneria tissutale, hanno portato allo sviluppo di approcci clinico-sperimentali orientati al trattamento di pazienti con interventi poco invasivi e meno dolorosi. La possibilità di associare le potenzialità del trapianto di cellule viventi con la tecnologia degli organi artificiali consente di realizzare strutture altamente funzionali (Grigolo et al., 2002) e alternative al classico trapianto d'organo (Langer & Vacanti, 1993) (Chua, 2001) (Weinand et al., 2006).

Il punto di partenza è rappresentato dall'utilizzo di cellule provenienti dal paziente stesso: esse vengono isolate e successivamente fatte proliferare *in vitro* su un sistema tridimensionale (3D) o scaffold in presenza di fattori di differenziazione e di crescita fino alla sintesi di un nuovo tessuto; successivamente il costrutto o protesi realizzata in laboratorio viene impiantato all'interno del difetto osseo (Mistry et al., 2005).

Esistono tre approcci alternativi:

- *Tissue engineering*: prevede la semina e il differenziamento *ex-vivo* di cellule osteoprogenitrici autologhe su biomateriali tridimensionali modificati e riassorbibili, che, una volta

reimpiantati nel paziente, dovrebbero essere riassorbiti e sostituiti da tessuti vitali.

- *In situ tissue engineering*: ai biomateriali vengono associati fattori induttivi in forma di polveri, soluzioni o microparticelle capaci di promuovere la riparazione locale. Molecole o fattori che attivano la proliferazione cellulare (ad esempio le BMP) possono essere coniugate chimicamente al materiale per indurre a livello locale le cellule dell'ospite a rilasciare fattori di crescita, che a loro volta stimolano le cellule coinvolte nella rigenerazione del tessuto *in situ*.

- *Matrix based approaches*: vengono utilizzati sistemi acellulari in cui la struttura tridimensionale del biomateriale (pori o pillars di dimensioni micro o nanometriche) gioca un ruolo determinante nella corretta riparazione del tessuto (Ngiam, Nguyen, Liao, Chan, & Ramakrishna, 2011).

Quest'ultimo approccio è alla base del progetto svolto nel lavoro qui presentato. I biomateriali selezionati per l'ingegneria tissutale devono avere precise caratteristiche e devono possedere proprietà biologiche e fisiche adatte a soddisfare le condizioni fisiologiche *in vitro* ed *in vivo*. Se da un lato il compito di un supporto è quello di mimare la ECM in modo tale da permettere l'iniziale adesione delle cellule e favorirne il differenziamento (Shin et al., 2003), dall'altro lato deve soddisfare criteri di base, come avere proprietà meccaniche simili al tessuto da rigenerare, essere biocompatibile e facilmente sterilizzabile (Burg et al., 2000) (Hutmacher, 2000) (Salgado et al., 2004). In aggiunta, l'ECM sintetica deve possedere una degradabilità controllabile in modo da facilitare lo sviluppo dell'osso, produrre prodotti di degradazione non tossici e non provocare una risposta infiammatoria di tipo cronico (J. R. Porter et al., 2009). Altre proprietà strutturali e fisiche come l'interconnettività, la porosità e la morfologia della superficie, svolgono anch'esse un ruolo chiave, in quanto influenzano l'adesione cellulare, il comportamento e lo sviluppo dei tessuti (Spector, 2006).

Tutte le caratteristiche richieste devono promuovere processi chiave che nel caso specifico sono: osteoinduzione, osteoconduzione e

osteointegrazione.

L'*osteoiduzione* è la capacità di reclutare cellule indifferenziate multipotenti e stimolare il loro differenziamento in preosteoblasti. Per favorire il processo di osteoiduzione, al materiale inerte si possono ancorare agenti inducenti quali le BMP, anche se possono essere sufficienti stimoli di tipo fisico come pillars, pori, modifiche superficiali di vario tipo più o meno organizzate (Habibovic & de Groot, 2007).

L'*osteococonduzione* è la capacità del biomateriale di essere rivestito da cellule del tessuto osseo. Le caratteristiche superficiali sono fondamentali per indurre il reclutamento delle cellule osteogeniche (preosteoblasti e osteoblasti) già presenti nel tessuto; la loro migrazione, la distribuzione, l'ancoraggio e la sopravvivenza dipendono dal biomateriale e dalla sua micro e nanostruttura. Per innescare il processo di formazione dell'osso assumono una grande importanza i fattori di crescita e lo sviluppo di nuovi vasi sanguigni, ma la biocompatibilità dell'impianto e le sue caratteristiche fisiche restano il punto chiave per avere osteococonduzione (Albrektsson & Johansson, 2001).

L'*osteointegrazione* è la capacità del biomateriale di ancorarsi *in vivo* in modo diretto ad un segmento osseo tramite formazione, all'interfaccia osso-scaffold, di tessuto mineralizzato e non fibroso. È indubbio che lo stadio iniziale di osteointegrazione dipenda strettamente da osteoiduzione e osteococonduzione, ma il vero scopo dell'osteointegrazione è il mantenimento nel tempo di un fissaggio rigido a livello dell'osso preesistente, con formazione di uno strato interfacciale dalla densità ossea analoga a quella dell'osso in cui il biomateriale viene impiantato. L'ancoraggio rigido e duraturo dell'impianto è necessario in ortopedia e in chirurgia cranio-facciale. L'osteointegrazione può essere sollecitata e velocizzata dall'apposizione sulla superficie del biomateriale di fattori biologici (Albrektsson & Johansson, 2001)

Osteoiduzione, osteococonduzione e osteointegrazione sono fenomeni strettamente correlati, ma non identici: l'osteoiduzione è responsabile della maggior parte della crescita di nuovo osso tramite il reclutamento delle MSC, ad esempio a seguito di una frattura o dell'inserzione di un

impianto. Il biomateriale stesso può essere osteoinduttivo, ma non è un prerequisito necessario per indurre la formazione di nuovo osso. Osteoconduzione e osteointegrazione dipendono non solo dalla presenza di fattori biologici sulla superficie dell'impianto, ma anche dalla risposta fisiologica al biomateriale stesso. Sebbene il processo di osteoconduzione si svolga in un tempo relativamente breve, l'osteoiduzione garantisce l'ancoraggio a lungo termine.

I concetti fondamentali che guidano lo sviluppo di supporti per l'ingegneria tissutale dell'osso si basano sul metodo di produzione e sulla selezione del biomateriale. Quest'ultima è stata oggetto di numerosi studi, che hanno selezionato diversi materiali sia metallici, che ceramici, ma anche polimeri naturali e sintetici o materiali compositi (Hoexter, 2002), (Stylios et al., 2007).

1.5 Biomateriali

Gli impianti attualmente studiati e utilizzati in terapia rigenerativa ossea si possono dividere in due grandi gruppi, in base alla loro composizione.

1. *Naturali*: implicano l'utilizzo di osso autologo (autotrapianto). Questi rappresentano il gold standard in quanto non inducono reazioni di rigetto e hanno buone performances biologiche in termini di osteoiduzione, osteoconduzione e osteointegrazione. Nonostante ciò, sono stati messi in evidenza alcuni aspetti negativi, primo fra tutti la necessità di ricorrere ad un'ulteriore operazione chirurgica invasiva per il prelievo dell'osso, seguita da dolore, possibile infezione post-operatoria, prolungata ospedalizzazione e da un significativo calo della compliance del paziente (Chouzouri & Xanthos, 2007). In secondo luogo, l'uso di autoinnesti è fortemente limitato dalla bassa disponibilità di materiale autologo.

Per ovviare al problema, sono stati studiati impianti alloigenici. Le difficoltà riscontrate nella rimozione dei siti di immunogenicità, la limitata vascolarizzazione, la bassa cellularità e gli scarsi risultati in termini di potenziale di osteoiduzione e osteoconduzione ne vanificano

gli aspetti positivi, quali maggiore disponibilità e il non dover ricorrere ad una ulteriore pratica chirurgica (Ngiam et al., 2011).

2. Sintetici: questi rappresentano un'alternativa più che valida ai biomateriali naturali, per questo motivo negli ultimi anni sono stati ampiamente studiati. In base alla composizione chimica si possono dividere in quattro gruppi: *metallici* (titanio o acciaio inox per lo più), *ceramiche* (costituite da calcio fosfato, allumina, carbone o vetro), *polimeri* (polistirene, polimetilmetacrilato, poliuretano, polietilene, acido polilattico, siliconi) o *composti* dei primi tre gruppi. Tra i lati positivi di questi biomateriali si possono annoverare l'ampia disponibilità, l'assenza di risposta antigenica e la facilità di adattamento. Senza dubbio però la performance biologica in termini di reclutamento delle MSC, induzione del differenziamento e supporto della crescita dell'osso è nettamente inferiore rispetto ai biomateriali naturali (Habibovic & de Groot, 2007).

Metalli e materiale ceramico. Per sostituire o riparare parti di tessuto osseo danneggiate, sono stati utilizzati metalli e ceramiche al fine di creare delle protesi artificiali di materiale inorganico. I principali metalli usati sono stati l'acciaio inossidabile, leghe a base di cobalto o di titanio, mentre tipiche ceramiche sono rappresentate da allumina, zirconia, fosfato di calcio e bioglass. Diversi studi hanno proposto l'utilizzo di protesi metalliche per curare difetti ossei su animali (Dolder et al., 2003), in quanto esse presentano ottime proprietà meccaniche (Karageorgiou et al., 2005). Tuttavia, i metalli presentano diversi svantaggi come la mancanza di adesione da parte delle cellule del tessuto da riparare (Hulbert et al., 1970), la bassa degradabilità *in situ*, la necessità di un secondo intervento per sostituire la protesi e, nel caso di una protesi permanente, la possibilità di accumulo di ioni metallici a causa della corrosione a cui è esposto l'impianto stesso (Rubin & Yaremchuk, 1997). I biomateriali in ceramica impiegati per l'osteogenesi sono principalmente basati su idrossiapatite o su materiali composti per formare un materiale simile all'apatite dell'osso, migliorando in questo modo l'osteointegrazione. Questi composti sono in grado di legare e

concentrare citochine come nel caso dell'osso naturale. Gli svantaggi principali associati al loro uso sono la fragilità e la loro lenta degradazione (Karageorgiou et al., 2005). A causa degli aspetti negativi associati all'uso di metalli e di materiali in ceramica, negli ultimi anni l'attenzione della comunità scientifica e medica si è indirizzata verso materiali polimerici.

Polimeri naturali. Molti polimeri di derivazione naturale possiedono il grande vantaggio di essere biocompatibili e biodegradabili, perché simili ai componenti strutturali di diversi tessuti (es. collagene e glicosamminoglicani). I polimeri naturali usati sono l'amido, il collagene, la chitina, il chitosano, i quali sono stati utilizzati per la riparazione di diversi tessuti compreso l'osso (Chua, 2001). Tuttavia, la bassa resistenza meccanica e/o l'alta velocità di degradazione, porta a non usare questi biomateriali singolarmente ma in associazione o dopo modifica delle loro proprietà chimiche attraverso *cross-linking* per migliorare la resistenza meccanica e aumentare il tempo di degradazione. Le modificazioni chimiche possono comportare effetti tossici e diminuire la biocompatibilità (Luyn, 1992); per queste ragioni l'uso dei biopolimeri naturali come *scaffold* è decisamente molto limitato.

Polimeri sintetici. I polimeri di origine sintetica possono avere struttura chimica molto varia grazie all'elevato numero di monomeri di partenza attualmente disponibili. Inoltre le caratteristiche strutturali e geometriche ottenibili sono molto varie, così come le proprietà meccaniche e le cinetiche di degradazione. Diverse classi di polimeri possono essere usate al fine di realizzare uno scaffold come sostituto osseo; i più diffusi sono i poliesteri, le polianidridi, i poliortoesteri, i polifosfazeni. Molti di questi polimeri sono degradati attraverso idrolisi chimica a pH fisiologico. La classe più importante di polimeri è rappresentata da poliesteri e copoliesteri dell'acido lattico e dell'acido glicolico, i quali sono stati approvati dalla Food and Drug Administration (FDA). Ad oggi, molti poliesteri sono stati proposti come scaffold per la rigenerazione ossea, compreso l'acido poliglicolico (PGA), l'acido polilattico (PLA), i quali sono anche largamente usati

come fili per suture chirurgiche in campo ospedaliero. Altri polimeri attualmente in uso sono l'acido polilattico-co-glicolico (PLGA) e il ϵ -policaprolattone (PCL) (Kikuci et al., 1997) (Stylios et al., 2007). Tutti i polimeri dell'acido poliglicolico (PGA) possono essere ottenuti con un alto grado di cristallinità (40-75%), (Perrin et al., 1997, Middleton et al., 2000), ragion per cui il PGA non è solubile in molti solventi organici ad eccezione di quelli altamente fluorurati come l'esafluoroisopropanolo (HFIP). Inoltre, a causa della sua natura idrofilica, il PGA tende a perdere le proprietà meccaniche (~50%) in un periodo di circa 2 settimane e viene completamente assorbito in 4-6 mesi dopo l'impianto (Yang et al., 2001).

Acido polilattico

L'acido polilattico (PLA) è attualmente considerato uno dei più promettenti biopolimeri grazie al largo spettro delle sue potenziali applicazioni, come si può vedere anche dall'ampia letteratura che si è resa disponibile negli ultimi anni sull'argomento (Stylios et al., 2007) (Shue et al., 2012) (Garlotta, 2001). Tra i suoi punti di forza vi sono la versatilità nell'essere processato con diverse tecnologie industriali e la sua ampia disponibilità commerciale in differenti tipologie.

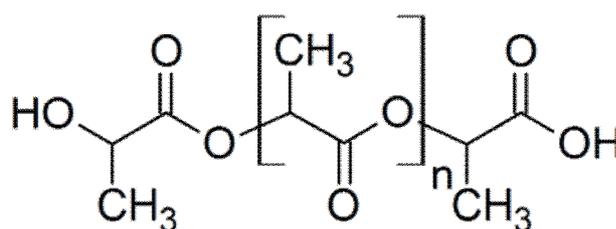


Fig. 1.2: Struttura chimica dell'acido polilattico

Il PLA possiede una struttura molto simile al PGA, ma con caratteristiche chimiche, fisiche e meccaniche molto diverse, a causa della presenza di un gruppo metilico sul carbonio α . A causa di questa struttura, il carbonio α risulta essere chirale, così il PLA presenta tre isomeri D, L e DL. L'isomero poli-L-lattico (PLLA) è semicristallino e relativamente rigido e la sua struttura chimica lo rende più idrofobo e,

dunque, più resistente agli attacchi idrolitici, mentre il poli-D;L lattico (PDLLA) è un materiale amorfo e trasparente (Garlotta, 2001). Il grado di degradazione di PDLLA risulta essere più rapido rispetto a PLLA: a seconda delle dimensioni e dello spessore dell'impianto la degradazione del campioni può avvenire in un periodo di circa 2-12 mesi.

Il PLA è privo di componenti allogeniche e xenogeniche e non induce una risposta antigenica significativa (Shue et al., 2012). In base allo spessore, alla struttura e alla composizione chimica permette di offrire diversi gradi di stabilità; l'associazione con altri copolimeri ne migliora la maneggevolezza rendendolo più flessibile e soffice e ne rallenta la velocità di riassorbimento. Tra gli aspetti negativi del PLA si ricordano: un costo abbastanza elevato e una relativa fragilità (Shue et al., 2012). Tuttavia le sue interessanti proprietà, le sue caratteristiche di biodegradabilità e la sua capacità di essere processato come un normale polimero termoplastico nei già esistenti impianti industriali, lo rendono un biomateriale ottimale per la rigenerazione ossea.

Come già accennato, uno dei punti chiave negli studi di ingegneria tissutale è lo sviluppo di scaffold che possano stimolare il differenziamento delle MSC in osteoblasti senza l'ausilio di trattamenti chimici o di fattori solubili. Queste cosiddette "strutture biomimetiche", infatti, ricalcano la stessa complessa struttura fisiologica dell'osso e della matrice, in modo che la superficie fornisca segnali fisici, geometrici, meccanici e strutturali atti a guidare la risposta cellulare, a stimolare il differenziamento e l'apposizione di nuovo osso.

La creazione di una struttura topografica adeguata può influenzare diversi eventi a livello cellulare, modulando adesione, orientamento, morfologia, organizzazione del citoscheletro, proliferazione, espressione genica e differenziamento. Inoltre la geometria della superficie può modulare la risposta cellulare: numerosi studi hanno dimostrato che biomateriali sia micro che nanostrutturati inducono, seppur in modo differente, l'espressione di marker specifici di deposizione ossea. In particolar modo, l'utilizzo di superfici modificate con pori o pillars di dimensioni nanometriche ha un effetto favorevole sul differenziamento

di MSC sia di origine murina che umana (Brammer et al., 2011; Olivares-Navarrete et al., 2010). Oltre alle dimensioni, anche la disposizione spaziale dei pillars o dei pori sulla superficie del biomateriale influenza il differenziamento osteogenico. La distanza tra due pillars attigui, la densità dei pori, la forma quadrata o esagonale, la disposizione ordinata o random influenzano il comportamento cellulare in maniera notevole, rilevabile tramite la misurazione dei filopodi, marker fisici di migrazione e adesione cellulare (Dalby et al., 2007). L'organizzazione citoscheletrica è infatti un nodo critico nella trasmissione del segnale che conduce alla proliferazione e al differenziamento delle cellule staminali. Un indice dell'adesione cellulare è data dalla presenza di filopodi, strutture filiformi di actina che sondano il terreno per valutare se la superficie è idonea all'adesione e alla proliferazione. Il fallimento dell'adesione cellulare, infatti, provoca, da ultimo, la morte della cellula (John et al., 2006).

1.6 Nanotecnologie per la rigenerazione di tessuti ossei

L'obbiettivo dell'ingegneria dei tessuti e della medicina rigenerativa è lo sviluppo di sostituti biologici capaci di ripristinare, mantenere o migliorare il tessuto danneggiato e la funzionalità di un organo. Se da un lato sono molto promettenti i risultati ottenuti in tali campi nell'ultimo decennio, rimangono ancora numerose problematiche legate soprattutto ai materiali tradizionalmente impiegati. Le nanotecnologie, ossia l'impiego di nanomateriali, e l'utilizzo di topografie nanometriche, rappresentano la via più promettente per cercare di replicare le architetture biologiche fornendo gli opportuni stimoli per incentivare il processo rigenerativo (Zhang & Webster, 2009). Queste nanocaratteristiche giocano un ruolo chiave nello stimolare la crescita cellulare e nel guidare la rigenerazione del tessuto coinvolto, ossia risultano essere fondamentali in quell'intima unione tra osso e protesi che determina l'osteointegrazione.

Inizialmente la progettazione di impianti ortopedici mirava all'utilizzo di materiali biologicamente inerti, per evitare una risposta immunitaria

dell'ospite; negli ultimi vent'anni ci si è concentrati sull'impiego di materiali bioattivi, capaci di richiamare gli elementi osteogenici e di sostenere la rigenerazione del tessuto e con proprietà meccaniche e chimiche simili a quelle dell'osso nativo.

Per microtopografia e nanotopografia si intende la presenza su una superficie di profili di dimensioni micrometriche e nanometriche (da qualche unità fino a qualche centinaia di unità).

Nonostante fosse già chiaro che la geometria di un substrato influenza il comportamento delle cellule, si è dovuto attendere lo sviluppo dei processi di manipolazione e fabbricazione delle materie prime per appurare gli effetti delle diverse geometrie a livello biologico.

Dalla maggior parte degli studi condotti emerge una chiara relazione tra le topografie micrometrica e nanometrica e l'orientazione, la migrazione, la morfologia, la proliferazione e la differenziazione delle cellule. Per cercare di capire a fondo tale relazione sono state variate le caratteristiche superficiali dei materiali. Sono stati esaminati microcanali che hanno stimolato la proliferazione con la possibilità di indirizzare la crescita lungo una direzione preferenziale (Martinez et al., 2009). Superfici modificate con pattern di micropillars circolari hanno, invece, dimostrato una scarsa influenza sull'adesione cellulare (Dolatshahi-pirouz et al., 2011). Variazioni sulle dimensioni, la distribuzione e la forma dei pillars non hanno influenzato la proliferazione cellulare che è di contro condizionata dal diametro e dal passo di queste microstrutture (Kolind et al., 2014). La realizzazione di pillars nanometrici in materiale polimerico per colture di MSC influisce su adesione, crescita e migrazione rispetto ad una corrispondente superficie piana.

Nonostante alcuni risultati contraddittori dovuti alla molteplicità di tipi cellulari, materiali e geometrie utilizzati per condurre gli esperimenti, appare sempre più rilevante l'effetto biologico che esercita la nanotopografia in termini di adesione, crescita e differenziazione delle cellule coltivate su un substrato (Martinez et al., 2009) (Ravichandran et al., 2009).

Negli ultimi anni è cresciuto l'interesse nei confronti dell'effetto meccanico dei pillar, ossia forze di trazione e rilassamento. Oltre all'effetto geometrico delle micro o nanocaratteristiche in quanto tali, si sono rilevati significativi effetti riconducibili alla tipologia del substrato; in particolare idrofobicità e rigidità. In confronto ad una superficie piatta l'angolo di contatto raggiungibile con superfici dotate di pillars micro o nanometrici è molto maggiore, ciò comporta un aumento dell'idrofobicità che favorisce il contatto tra le cellule e quindi l'organizzazione in colonie (Brammer et al., 2011).

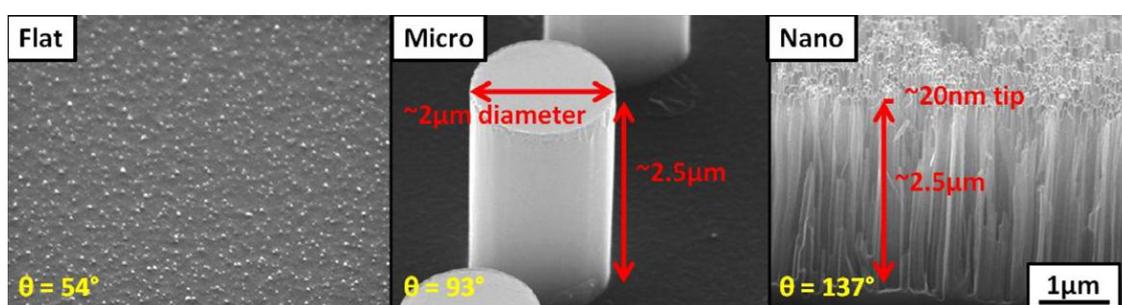


Fig. 1.3: Variazione dell'angolo di contatto, ossia dell'idrofobicità, al variare della topografia del substrato

Anche la rigidità dello scaffold è influenzata dalla presenza dei pillar. Da studi recenti (Engler et al., 2006), la rigidità del substrato appare sempre più come un aspetto chiave nel regolare la risposta di una cellula all'ambiente esterno con cui interagisce: il grado di elasticità della superficie è infatti strettamente correlato al percorso differenziativo delle MSC.



Fig. 1.4: Influenza dell'elasticità del substrato sul processo di differenziazione delle MSC.

Alla luce di quanto visto è dunque chiaro come i progressi nella micro e nanoingegneria possano essere sfruttati per controllare il comportamento e la differenziazione delle MSC, sviluppando delle superfici contraddistinte da opportune caratteristiche in grado di fornire stimoli appropriati. Sono perciò numerosi i progetti di ricerca volti ad applicare le tecnologie produttive per dimensioni micrometriche e nanometriche nell'ambito dell'ingegneria tissutale e della medicina rigenerativa. Tra questi vi è anche il progetto NanoBones.

1.7 Progetto *Nanobones*

Il lavoro svolto in questa tesi rientra nel progetto *NanoBones* che ha come scopo la realizzazione di supporti in materiale polimerico, biorisorbibili, osteoinduttivi caratterizzati da modifiche superficiali mediante l'introduzione di caratteristiche micro o nanometriche, così da riuscire a stimolare la differenziazione delle MSC in osteoblasti. Il progetto è stato finanziato dal Dipartimento della Sanità pubblica e dell'Innovazione del Ministero della Salute e sviluppato mediante la collaborazione del Laboratorio di Tecnologie e Sistemi di Lavorazione (Te.Si.), del Dipartimento di Ingegneria Industriale (DII) dell'Università di Padova. Il fine di tale progetto è quello di sviluppare, a partire da polimeri sintetici, potenziali nuovi dispositivi trapiantabili con marcate proprietà osteoinduttive, utilizzabili in campo ortopedico ed odontoiatrico.

I principali vantaggi ottenibili da questi nuovi dispositivi sono:

- la possibilità di impiegare materiali biorisorbibili, ripristinando una condizione del tutto naturale, senza la permanenza dell'impianto o la necessità di rimuoverlo successivamente;
- la possibilità di lavorare mediante microstampaggio ad iniezione, tecnica che permette di contenere i costi e che offre elevata velocità e ripetibilità.

Tra tutte le possibili tecniche di microformatura, questa infatti è quella che garantisce il miglior compromesso tra precisione e capacità di produzione di massa a basso costo unitario, avendo poi come ulteriori

aspetti positivi il ridotto tempo ciclo, la possibile completa automazione del processo e la disponibilità di un notevole know-how trasferibile dal processo di stampaggio ad iniezione tradizionale. Per contro, la criticità di tale scelta è associata all'accuratezza ottenibile nella replicazione delle micro e nanocaratteristiche, ragion per cui i parametri che influenzano lo stampaggio devono essere calibrati al meglio.

Il progetto NanoBones prevede le seguenti tre fasi:

1. fabbricazione e caratterizzazione di superfici polimeriche micro e nanostrutturate;
2. valutazione *in vitro* dell'effetto della topografia superficiale sul comportamento delle MSC; e
3. valutazione *in vivo* dell'integrazione delle superfici polimeriche con il tessuto osseo.

Fino ad ora la sperimentazione è stata condotta entro le prime due fasi, sfruttando vari supporti con un pattern a schema quadrato di micro e nanopillars a sezione circolare, variando le dimensioni sia dei pillars sia della distribuzione degli stessi nel piano.

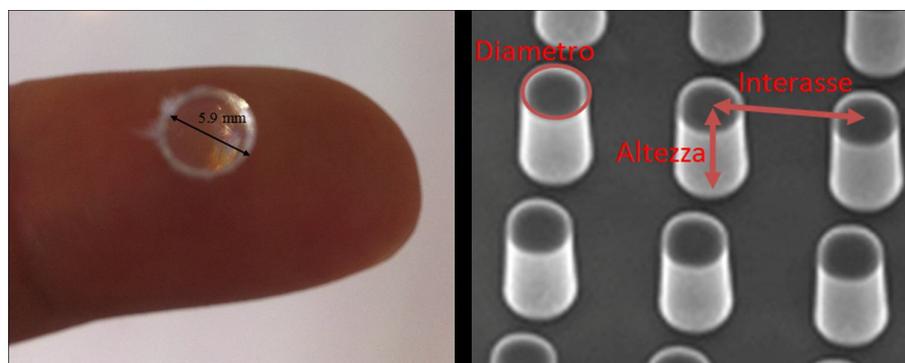


Fig. 1.5: Supporto in materiale polimerico stampato per il progetto NanoBones e relativo schema della topografia dotata di micro pillars.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Superfici modificate con micropillars

I supporti utilizzati per la crescita e la differenziazione cellulare sono stati progettati dal gruppo dei prof. Paolo Bariani e Giovanni Lucchetta del Dipartimento di Ingegneria Industriale, Università di Padova, e realizzati nel laboratorio Te.Si. di Rovigo. Tali supporti sono stati ottenuti per microstampaggio a iniezione su polistirene non trattato per colture cellulari, materiale biocompatibile, semplice da processare ed economico, di dimensioni tali (5.9 mm di diametro e 2 mm di altezza) da poter essere contenuti nei pozzetti di una piastra a 96. Le superfici presentavano dei micropillars le cui dimensioni sono state variate in termini sia di diametro che di interasse tra pillars adiacenti.

Ottenimento dello stampo micrometrico

Il foto resist TMSPM-Zr:sintesi

Lo stampo microstrutturato è stato ottenuto utilizzando un materiale sol-gel direttamente patternabile per fotolitografia, depositato su un supporto di acciaio.

Il fotoresist, denominato TMSPM-Zr, è stato sintetizzato a partire da Butossido di Zirconia ($Zr(OBut)_4$) 3-(trimetossisilil)propil metacrilato (TMSPM). Quest'ultimo è un alcossido organicamente modificato che presenta il legame Si-C indispensabile per ottenere un materiale ibrido, in cui reticolo organico e inorganico sono legati covalentemente. Al TMSPM è stato aggiunto butossido di zirconia ($Zr(OBut)_4$) che prende parte al reticolo inorganico, e acido metacrilico (MAA) con funzione di agente chelante, rallentando la reazione di idrolisi del Zr-But. La polimerizzazione organica dei doppi legami C=C di TMSPM e MAA presenti è stata preservata in fase di sintesi e sfruttata in fase di fotolitografia, in quanto avveniva mediante esposizione alla radiazione UV. TMSPM e $Zr(OBut)_4$ opportunamente miscelati permettevano quindi di ottenere reticoli inorganici del tipo Si-O-Si, Si-O-Zr e Zr-O-Zr, a cui

era legato il reticolo organico grazie alla stabilità del legame Si-C nelle condizioni di sintesi.

La sintesi ha previsto l'idrolisi del TMSPM in catalisi acida per 1 h a temperatura ambiente (TA). I rapporti molari dei reagenti erano TMSPM: H₂O, HCl 1N=1:3:0,01. Alla soluzione sono stati aggiunti poi goccia a goccia Zr(OBut)₄ e acido metacrilico (MAA), agitati separatamente per 5 min, e il tutto è stato messo in agitazione per un'ora, sempre a TA. Il rapporto molare tra i precursori era il seguente TMSPM:Zr(OBut)₄:MAA=1:0,5:1. Tetraidrofurano (C₄H₈O) è stato aggiunto come solvente per ottenere la diluizione desiderata (110 or 80 g/l SiO₂+ZrO₂). La soluzione è stata infine filtrata mediante un filtro in teflon con fori di 0.2 µm al fine di ottenere film di miglior qualità per spin-coating.

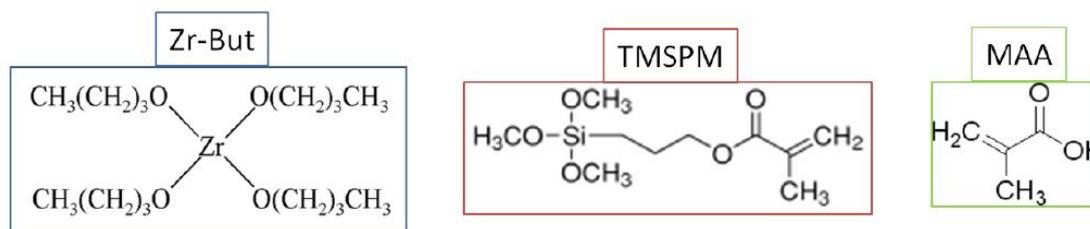


Fig. 2.1: Formule chimiche del butossido di zirconia (Zr-But), 3-Trimetoxisilyl)propylmethacrylate (TMSPM) e dell'acido metacrilico (MAA)

Il processo di fotolitografia con TMSPM-Zr

Allo scopo di ottimizzare la polimerizzazione del reticolo organico del fotoresist, mediante esposizione UV, è stato scelto di aggiungere alla soluzione il fotoiniziatore 2-Benzyl-2-dimethylamino-1-(4-morpholinophenyl)-butanone-1 (Ciba® IRGACURE® 369), in concentrazione 1% molare rispetto alle moli di TMSPM. Tale iniziatore aumentava, infatti, l'assorbimento UV del TMSPM-Zr intorno ai 360 nm, che corrispondeva alla riga di emissione più intensa della lampada UV utilizzata nel processo di fotolitografia (Hamamatsu Lightningcure LC5). Il procedimento sperimentale di fotolitografia consisteva nel depositare un film di fotoresist sul substrato desiderato, in questo caso un inserto in acciaio da alloggiare nella macchina per micro stampaggio a iniezione, attraverso la tecnica dello spin-coating. Successivamente, una maschera

in quarzo che riportava le strutture da replicare è stata appoggiata sul film (litografia per contatto). La funzione esplicata dalla maschera era quella di non far filtrare, nelle zone rese opache dal cromo, i raggi UV, in modo da ottenere sul film un'immagine latente del pattern desiderato. Infine, si è proceduto con la fase di sviluppo del film per 15 sec in soluzione etanolo-acetone in rapporto 100:1. Durante questa fase le zone non esposte alla radiazione UV, il cui reticolo organico non era quindi stato polimerizzato, sono state disciolte nella soluzione di sviluppo. Il comportamento del fotoresist TMSPM-Zr sintetizzato era quindi negativo.

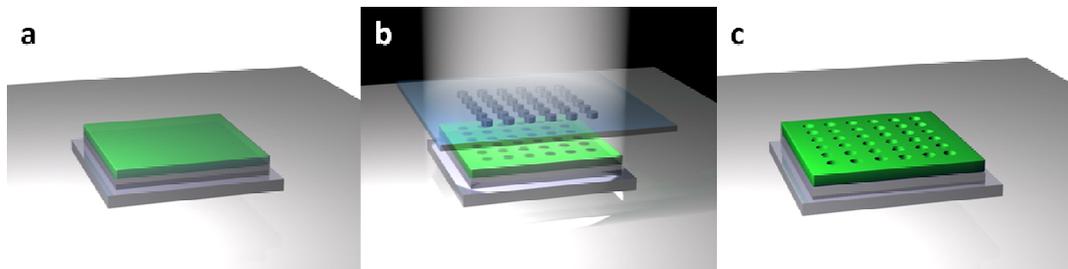


Fig.2.2: Rappresentazione del processo di fotolitografia per irradiazione con raggi UV

Lo stampo rappresenta la parte più importante del processo: contiene l'inserto che determina la forma del prodotto finito, i canali di alimentazione, gli estrattori e il sistema di condizionamento. Deve avere una forma negativa rispetto a quella che si vuole impartire al prodotto finito, di conseguenza, la qualità del prodotto finito va di pari passo con quella dello stampo. Gli inserti ottenuti sono stati caratterizzati con due numeri, il primo riferito al diametro (\emptyset) in μm dei micropits, il secondo alla distanza in μm tra il centro di due micropits attigui (interasse **I**). Le geometrie realizzate sono state $\emptyset 2 - I8$, $\emptyset 3 - I9$, $\emptyset 4 - I10$. Per praticità ciascun supporto è stato identificato con le due cifre indicanti diametro e interasse (2-8, 3-9, 4-10). È stata, inoltre, fornita una superficie non modificata che è stata utilizzata come controllo (indicata come superficie non trattata-NT).

2.2 Superfici modificate con nanopillars

I supporti utilizzati per la crescita e la differenziazione cellulare sono

stati progettati dal gruppo dei prof. Paolo Bariani e Giovanni Lucchetta del Dipartimento di Ingegneria Industriale, Università di Padova, e realizzati nel laboratorio Te.Si. di Rovigo. Tali supporti, sono stati realizzati per microstampaggio a iniezione di Acido Polilattico (Purasorb Pl-10), materiale biocompatibile e biodegradabile, di dimensioni tali (5.9 mm di diametro e 2 mm di altezza) da poter essere contenuti nei pozzetti di una piastra a 96. Le superfici presentavano nanopillars le cui dimensioni sono state variate in termini sia di diametro che di interasse tra pillars adiacenti.

Ottenimento dello stampo nanometrico

Sintesi del resist GZ

Al fine di ottenere stampi nanostrutturati è stata utilizzata la tecnica del nano imprinting con resist ibrido ottenuto a partire da 3-glycidoxypropyltrimethoxysilane (GPTMS) e ZrBut. Il GPTMS è un alcossido di silicio organicamente modificato, caratterizzato da un anello epossidico a fine catena, in grado di dar luogo al reticolo organico, e da gruppi alcossido legati al silicio che a seguito di idrolisi e condensazione formano un reticolo inorganico. Al GPTMS è stato aggiunto butossido di zirconia (Fig. 2.3) che concorre anch'esso alla formazione della parte inorganica. Il Zr-But, agendo come acido di Lewis, è in grado di aprire gli anelli epossidici del GPTMS già durante la sintesi, permettendone così la polimerizzazione. Si è ottenuto, quindi, un materiale che presentava i due reticoli organico e inorganico legati covalentemente tra loro.

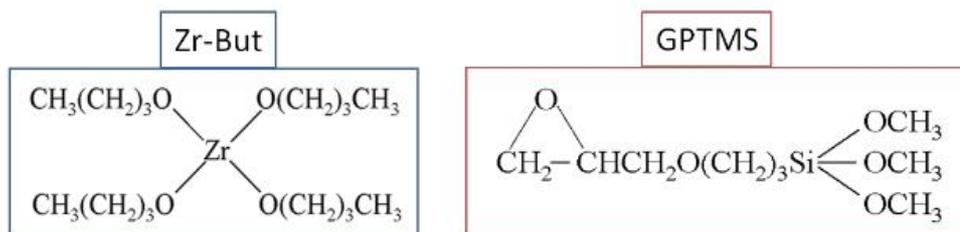


Fig 2.3: Formule chimiche del butossido di Zirconia (Zr-But) e del 3-glycidoxypropyltrimethoxysilane (GPTMS)

La sintesi era la seguente: sono stati messi in agitazione per 1 h GPTMS, H₂O e HCl 1N (si è utilizzata quindi la catalisi acida) secondo i rapporti molari 1:1,5:0,005. Separatamente 2-metossietanolo e butossido di zirconia (Zr(But)₄), sono stati lasciati in agitazione per 15 min e aggiunti poi alla soluzione di GPTMS, al fine di ottenere un rapporto molare GPTMS:ZrBut di 80:20. Infine, la soluzione così ottenuta è stata messa in agitazione per 90 min in un sistema di reflusso a 80 °C, e successivamente filtrata con un filtro in teflon con pori di 0.2 µm. 2-metossietanolo è stato aggiunto come solvente alla soluzione finale in quantità opportuna per ottenere la diluizione desiderata. La soluzione così ottenuta è stata chiamata GZ.

Il processo di nano imprinting con il sistema GZ

Per l'ottenimento degli stampi nanostrutturati è stata utilizzata la tecnica del nano imprinting. L'imprinting è un particolare processo di litografia che prevede l'utilizzo di un resist a bassa viscosità, in genere liquido, e di uno stampo, mold, sulla superficie del quale compare il pattern nanometrico da trasferire. Lo stampo, generalmente in silicio, viene pressato sul resist stesso con lo scopo di facilitare l'ingresso, per capillarità, del precursore liquido nelle cavità del pattern. Una volta riempito lo stampo, avvengono le reazioni di polimerizzazione e/o di idrolisi e condensazione, nel caso di resist sol-gel, mediante riscaldamento o esposizione UV, che determinano il passaggio da un ricoprimento liquido ad uno solido, sul quale è presente la replica del pattern.

Il primo step è stata la definizione dei layout dei master in silicio da realizzare per litografia a fascio elettronico (EBL). Si è optato per una configurazione di pillar cilindrici, imponendo però il vincolo di elementi con aspect ratio pari a 2. Diversi layout sono stati definiti variando sia il diametro dei pillar sia il loro passo. Le specifiche dimensionali dei vari schemi sono riportate in tabella 1.

Pattern	Diametro (nm)	Altezza (nm)	Passo (nm)	Aspect ratio
200 – 300	200	400	300	2
200 – 400	200	400	400	2
200 – 600	200	400	600	2
400 – 800	400	800	800	2

Tabella 1: Specifiche dimensionali dei layout scelti per gli inserti nanostrutturati

Microstampaggio a iniezione

I supporti in polistirene sono stati stampati a partire dagli inserti in acciaio con micropits con pressa Wittman Battenfeld Micropower 15. Lo stampaggio ad iniezione rappresenta una tecnologia di tipo discontinuo, adatta a formare manufatti di forme tridimensionali su media e larga scala, con un costo limitato. Inoltre, in aggiunta ad entrambe le classi di polimeri, termoplastici e termoindurenti, è possibile stampare anche altri tipi di materiale, come ceramiche, fibre e polveri eventualmente rinforzate con polimeri. Una pressa ad iniezione è essenzialmente costituita da un cilindro di forza contenente una vite elicoidale che, ruotando, trasporta e fonde il polimero granulato sino alla testa della vite, ove è situata la camera calda di iniezione. Un ugello di iniezione mette in comunicazione tale camera con lo stampo (mantenuto sempre a temperatura relativamente bassa). Una volta riempita la camera di iniezione, la massa fusa accumulata scaldata tramite resistenze elettriche è sufficiente a riempire lo stampo. Il fuso polimerico viene spostato nella camera calda dello stampo, il polimero nello stampo si raffredda, solidifica e si procede con la fase di estrazione. Una rappresentazione schematica dell'intero processo è riportata nella figura seguente.

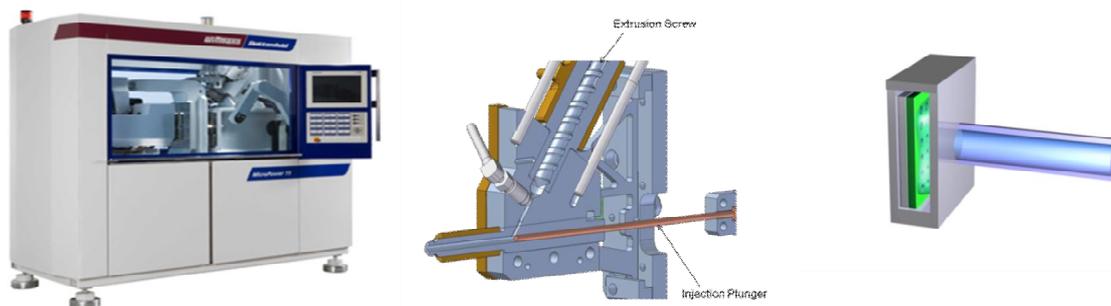


Fig.2.4: Pressa Wittman Battenfeld Micropower 15 utilizzata per la produzione tramite microstampaggio a iniezione di superfici con micropillars

2.3 Colture cellulari

Cellule MC3T3-E1

La linea cellulare MC3T3-E1, formata da preosteoblasti murini, è stata acquistata al Leibniz-Institut DSMZ Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), e coltivata con alpha Minimum Essential Medium (α -MEM, Life technologies, Baltimore, MD), supplementato con 10% Fetal Bovine Serum (FBS, Sigma Aldrich, ST. Louis, MO) e 1% penicillina/streptomicina (Sigma Aldrich). Le colture sono state mantenute in condizioni standard (97% umidità relativa, 5% CO₂, 37°C) e il terreno è stato sostituito ogni 48 h con terreno fresco.

Cellule mesenchimali stromali umane da midollo osseo (MSC)

Tali cellule sono state gentilmente fornite dal prof. Mauro Krampera del Dipartimento di Medicina dell'Università di Verona. Provenivano da prelievi di midollo osseo da donatori sani, ottenuti dopo l'ottenimento del consenso informato come previsto dal comitato etico dell'Azienda ospedaliera Universitaria Integrata di Verona (N. Prog. 1828, May 12, 2010 - 'Institution of cell and tissue collection for biomedical research in Onco-Hematology'). Le MSC sono state coltivate in α -MEM (Life technologies) supplementato con 1% penicillina/streptomicina (Sigma Aldrich) 1% Glutamina (Sigma Aldrich) e 18% Fetal bovine serum 16000 (FBS 16000, Life Technologies). Le colture sono state mantenute in condizioni standard e il terreno è stato sostituito a giorni alterni con terreno fresco. Tali cellule sono state utilizzate per verificare *in vitro* le proprietà osteoinduttive delle superfici modificate con micro e nanopillars.

2.4 Colture cellulari su supporti modificati con micro e nanopillars

I supporti modificati superficialmente con micro e nanopillars sono stati sterilizzati con lavaggi successivi in Amuchina, in soluzione salina tamponata (PBS) e in alcole assoluto. I residui di alcole sono stati allontanati per evaporazione sotto cappa a flusso laminare, i supporti sono stati inseriti nei pozzetti di piastre a 96 ed incubati overnight in

PBS addizionato di penicillina/streptomicina al 2%. Successivamente, le MSC sono state seminate ad una densità pari a 5000 cell/pozzetto. Per i primi sette giorni, le cellule sono state coltivate come precedentemente descritto. A partire dall'8° giorno dalla semina e fino alla fine della sperimentazione, la concentrazione di FBS 16000 è stata ridotta al 10%.

Non sono stati utilizzati terreni induttivi contenenti supplementi osteogenici, quali desametasone, β -glicerofosfato e acido ascorbico (Porter et al., 2003), per evidenziare unicamente l'effetto delle modifiche di superficie sul comportamento differenziativo delle MSC. La valutazione delle proprietà osteoinduttive è stata effettuata a 24 h, 72 h, 7, 14 e 21 giorni dalla semina tramite analisi morfologica delle colture, determinazione dell'adesione e della proliferazione cellulare, verifica del differenziamento in senso osteogenico tramite misurazione della deposizione di sali di calcio e valutazione dell'espressione di osteocalcina.

2.5 Microscopia elettronica a scansione

Il microscopio elettronico a scansione, indicato con la sigla SEM (Scanning Electron Microscope), è stato utilizzato per ricavare informazioni con alta risoluzione (2-5 nanometri) sull'aspetto, la natura e le proprietà delle superfici dei supporti modificati con micro e nanopillars e sulla morfologia delle cellule. Colpendo la superficie con un fascio di elettroni, lo strumento (JEOL JSM-6490) permette di esplorare la superficie nei dettagli. Gli elettroni secondari generati punto per punto dalla superficie vengono raccolti da un elettrodo collettore, che produce un segnale elettrico: sullo schermo quindi si forma un'immagine con grande profondità di fuoco. Per consentire l'osservazione e la determinazione di morfologia e struttura dei campioni al SEM, i supporti sono stati opportunamente trattati per renderli anidri evitando che l'acqua presente in essi venisse rilasciata nel momento in cui si forma il vuoto all'interno dello strumento. Al time point predefinito, le colture sono state private del terreno di coltura, lavate con PBS, e fissate per 20 min con 3,7% formaldeide (Sigma Aldrich). Successivamente, sono state lavate 3 volte con PBS e disidratate utilizzando etanolo in

acqua deionizzata in concentrazione crescente: 10%, 20%, 40%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%. Ogni alcol è stato lasciato in piastra 2 min. I campioni sono stati quindi fissati su uno speciale nastro bi-adesivo conduttivo a base di grafite (carbon tape), ed ancorati ad un supporto metallico, per poi subire il processo di metallizzazione o coating. La copertura dei supporti con un sottile strato superficiale di oro ha reso il campione, di per sé non conduttivo, idoneo a trasmettere il segnale elettrico.

2.6 Immunofluorescenza (IF)

Le actine citoplasmatiche, che fanno parte del sistema di microfilamenti delle proteine del citoscheletro, sono tra le proteine eucariotiche più conservate tra quelle espresse nei mammiferi e negli uccelli. L'actina è una proteina con sei isoforme che differiscono per la sequenza di aminoacidi e sono accomunate dalla stessa massa molecolare (42 kD). Le isoforme presentano una omologia complessiva del 90% per quanto riguarda la sequenza e una omologia pari appena al 50–60% per quanto riguarda i residui dell'N-terminale. La regione N-terminale sembra essere una grande area antigenica. Esistono diverse isoforme α che sono specifiche dei tessuti muscolari, ad esempio il muscolo scheletrico, il muscolo cardiaco e il muscolo liscio. Le β e γ -actine possono essere presenti nelle cellule muscolari oltre che in molti altri tipi di cellule dell'organismo, comprese cellule non muscolari.

Le colture, dopo 24 h dalla semina, sono state lavate due volte con PBS per eliminare i residui del terreno di coltura. Le cellule sono state fissate con acetone freddo per 10 min a +4°C e a seguire sono stati effettuati tre lavaggi con PBS. La permeabilizzazione delle membrane cellulari è stata eseguita con 0,5% TritonX100 (Sigma Aldrich) in dH₂O per 10 min a TA. Lavate le cellule con PBS, per impedire i legami aspecifici dell'anticorpo, è stato effettuato il blocco dei siti di legame mediante incubazione con bovine serum albumin (BSA) al 2% in PBS e quindi l'incubazione overnight a +4°C con l'anticorpo primario mouse anti-Actina pan α (diluizione 1:100 in PBS addizionato di BSA al 2%). In seguito ad accurati lavaggi, è stata eseguita l'incubazione con

l'anticorpo secondario goat anti-mouse coniugato Alexa fluor488 (Invitrogen, Life Technologies) diluito 1:200 in PBS + 2% BSA per 1 h a TA e al riparo dalla luce. Terminata l'incubazione si è proceduto con due lavaggi con PBS + 2% BSA e successivamente i vetrini sono stati montati con montante Fluoro-gel contenente DAPI (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA).

Per ogni vetrino è stato eseguito un controllo negativo costituito da campioni incubati con il solo anticorpo secondario, omettendo l'anticorpo primario (controllo di specificità). I campioni sono stati analizzati mediante microscopio a fluorescenza Leica DM4000B (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany).

2.7 MTS test

La vitalità cellulare delle MSC è stata determinata attraverso il metodo colorimetrico MTS-test. La metodica prevede l'utilizzo di un composto tetrazolico [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-5-(3-carbossimetossifenil)-2-(4-solfofenil)-2H tetrazolio, MTS] noto anche come reagente di Owen (Promega). In seguito ad un processo di riduzione, il composto si trasforma in un sale di formazano solubile e colorato in viola, indice della presenza di cellule metabolicamente attive in cui le deidrogenasi mitocondriali producono NADPH e NADH.

Ad ogni time-point, il terreno di coltura è stato rimosso e i supporti (4 supporti per tipo per ogni tempo) sono stati spostati in un pozzetto adiacente vuoto per evitare una sovra-stima dovuta all'eventuale presenza di cellule adese sul fondo del pozzetto. Ad ogni supporto sono stati aggiunti 200 μ L di α -MEM contenente 1% Gln e 10% MTS. La piastra è stata mantenuta in incubazione 4 h a 37°C, al termine delle quali 150 μ L di terreno sono stati prelevati e utilizzati per la determinazione dell'assorbanza mediante Microplate Autoreader EL 311 (Bio-Tek Instruments) a $\lambda = 490$ nm. I valori di assorbanza erano proporzionali al numero di cellule vitali presenti in coltura, che è stato determinato tramite una retta di taratura (Fig.2.5), preventivamente allestita determinando i valori di assorbanza relativi a numeri noti di MSC. I risultati, media di 3 esperimenti separati, sono stati espressi come

numero di cellule \pm deviazione standard. L'analisi statistica è stata effettuata con il t test di Student.

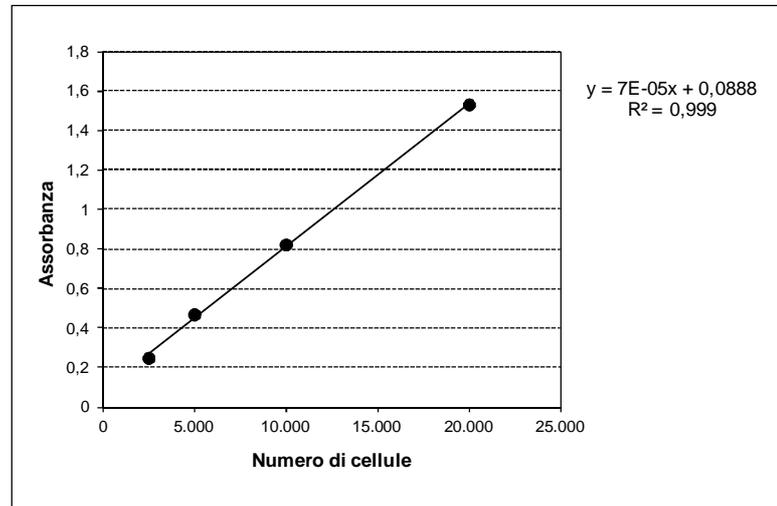


Fig.2.5: Retta di taratura per MTS test

2.8 Valutazione della deposizione di sali di calcio

Per valutare la deposizione di sali di calcio e la presenza di nodi di mineralizzazione, indice del differenziamento delle MSC lungo la linea osteogenica, è stata utilizzata l'alizarina Red S, colorante antrachinonico, che è in grado di chelare il calcio e permette sia la visualizzazione al microscopio ottico dei depositi del minerale, sia una loro stima (Gregory et al., 2004). La formazione del complesso non è strettamente specifica per il calcio, in quanto può avvenire anche con magnesio, manganese, bario, stronzio e ferro. Tuttavia, tali elementi sono presenti in concentrazioni talmente basse da non interferire con la colorazione. Il protocollo prevede il trattamento delle colture con il colorante, la rimozione del suo eccesso, la successiva estrazione dell'alizarina complessata e la sua quantificazione tramite determinazione dell'assorbanza a 405 nm.

A 7, 14 e 21 giorni, è stato rimosso il terreno di coltura, è stato effettuato un lavaggio con PBS e i supporti (6 supporti per tipo per ogni tempo) sono stati trasferiti su un pozzetto vuoto adiacente. Le cellule sono state fissate con 3,7% formaldeide per 30 min a TA e nuovamente lavate con dH₂O per due volte. In ogni pozzetto poi sono stati aggiunti

200 μL di 40 mM Alizarin Red Solution (Alizarin Red S, Sigma Aldrich) in dH_2O , pH 4,1 e lasciati ad incubare per 30 min a TA. Dopo aver rimosso il colorante, i pozzetti sono stati lavati abbondantemente con dH_2O .

Per la determinazione quantitativa dei sali di calcio, 200 μL di 10% acido acetico sono stati aggiunti ad ogni pozzetto e lasciati ad incubare per 30 min in agitazione. Il monostrato di cellule, scarsamente ancorato al supporto, è stato poi sottoposto a scrape e l'acido acetico e la sospensione cellulare in esso presente sono stati recuperati in eppendorf e agitati in Vortex. I tubi sono stati quindi scaldati a 85°C per 10 min, raffreddati in ghiaccio e centrifugati per 15 min a $16000 \times g$. I campioni sono stati poi trasferiti in Savant (Savant Speed Vac Concentrator, Thermo Scientific) e lasciati a liofilizzare overnight. Successivamente, sono stati risospesi con 150 μL di 10% acido acetico tamponato a pH 4,1. In una nuova piastra da 96 pozzetti sono quindi stati trasferiti 100 μL di ogni campione e l'assorbanza è stata determinata a $\lambda = 405 \text{ nm}$ utilizzando il Microplate Autoreader EL 311. I valori registrati sono stati convertiti in concentrazione di colorante, utilizzando una retta di taratura (Fig.2.6), precedentemente ottenuta determinando l'assorbanza di campioni di alizarina a concentrazioni note da 30 a $0,47 \mu\text{M}$, come riportato nella figura sottostante. I risultati sono stati espressi in percentuale rispetto alla superficie di controllo.

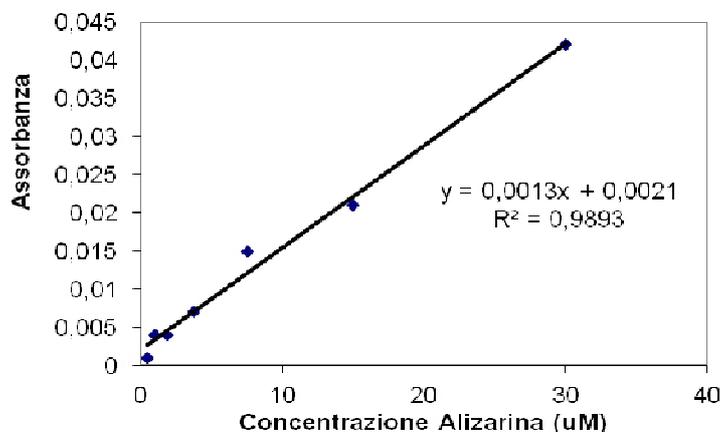


Fig.2.6: Retta di taratura per determinare la concentrazione di Alizarina

2.9 Estrazione e quantificazione di RNA

A diversi time point, le colture, sono state lavate con PBS 1X e trattate per 5 min a TA con 0.5 mL di TRI Reagent (Sigma Aldrich), una soluzione monofasica di fenolo e guanidina isotiocianato in grado di inibire irreversibilmente le ribonucleasi e di lisare le cellule permettendo la completa dissociazione nucleo-proteica (Chomczynski & Sacchi, 2006). Si è proceduto con l'aggiunta di 0.1 mL di cloroformio (Sigma Aldrich), i campioni sono stati agitati vigorosamente per 15 sec, lasciati incubare a TA per 10 min ed infine centrifugati a 12000 rcf per 15 min a 4°C. Dopo la centrifugazione ciascun campione era separato in 3 fasi: una fase inferiore di colore rosso pallido (fenol-cloroformio), un interfase, ed una fase superiore acquosa incolore. La fase acquosa superiore contenente l'RNA (circa il 60% del volume iniziale di trizolo) è stata trasferita in un nuovo tubo RNase free (Sarstedt), senza toccare l'interfase sottostante. Tale fase è stata trattata con 0.25 mL di isopropanolo (Carlo Erba) per 10 min a TA per favorire la precipitazione del RNA. Dopo una centrifugazione a 12000 rcf per 10 min a 4°C, il pellet è stato lavato con etanolo 75% e centrifugato a 7500 rcf per 5 min a 4°C. Al termine il pellet è stato risospeso in 20 µL di acqua RNase free (Invitrogen).

Per determinare la concentrazione dell'RNA estratto e verificare l'assenza di contaminanti, quali proteine, polisaccaridi o fenolo, l'RNA è stato analizzato mediante il Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). Questo strumento è uno spettrofotometro UV-Visibile a spettro totale (220-750 nm) in grado di effettuare analisi di volumi estremamente ridotti di campione (1µL). La sorgente luminosa è costituita da una lampada allo xenon e la luce che attraversa il campione viene analizzata da uno spettrofotometro. Lo strumento viene controllato da un software la cui interfaccia grafica restituisce per ciascun campione la curva di assorbimento e la concentrazione espressa in ng/µL.

Lo strumento permette di misurare l'assorbanza (A) a 260 nm, lunghezza d'onda di assorbimento caratteristica degli anelli eterociclici aromatici degli acidi nucleici. Inoltre l'assorbanza viene misurata anche alle seguenti lunghezze d'onda:

- $\lambda = 230$ nm: lunghezza d'onda di assorbimento di carboidrati e fenoli;
- $\lambda = 280$ nm: lunghezza d'onda di assorbimento di proteine;
- $\lambda = 320$ nm: rumore di fondo dovuto ad un assorbimento aspecifico.

Noti questi valori è possibile:

- determinare la concentrazione (ng/ μ L) di RNA calcolata dallo strumento; e
- stimare il grado di purezza dell'RNA (o DNA).

Buone preparazioni di RNA devono avere i seguenti rapporti:

$$A_{260}/A_{280} = 1,8-2$$

$$A_{260}/A_{230} = 1,8-2,2$$

2.10 One step RT-PCR

Per evidenziare l'espressione di OC, marker di differenziamento osteogenico, è stata eseguita l'estrazione di RNA da 16 supporti microstrutturati per ogni tipo e per ogni tempo, e successivamente analizzato tramite one step-RT PCR. Come gene housekeeping, è stato usato Gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi (GAPDH).

Lo studio è stato condotto utilizzando il *Qiagen® One Step RT-PCR Kit*. La strategia *Qiagen* consente di eseguire in un unico tubo prima la retrotrascrizione dell'RNA in cDNA e poi la sua amplificazione, utilizzando una miscela di enzimi appositamente formulata e formata da Omniscript e Sensiscript Reverse Transcriptases (*retrotrascrizione*) e HotStarTaq DNA Polymerase (*amplificazione*). L'azione specifica ed efficiente del sistema è dipendente dalla temperatura: durante la retrotrascrizione la HotStarTaq DNA Polymerase è completamente inattiva mentre si attiva alla temperatura di 95°C durante l'amplificazione, simultaneamente alla disattivazione della trascrittasi inversa. La miscela di reazione (25 μ L) è stata preparata in ghiaccio utilizzando 1 μ L di RNA alla concentrazione di 30 ng/ μ L, 3 μ L *forward primer* (5 μ M), 3 μ L *reverse primer* (5 μ M), 1 μ L dNTP mix (10 mM), 1 μ L *Qiagen® One Step RT-PCR Enzyme Mix*, 1 μ L *RNAse inhibitor* (125 U), 5 μ L 5X buffer e acqua *RNAse free*. La *One Step RT-PCR* è stata effettuata con il termociclatore iCycler iQ™ (Bio Rad) alle condizioni

riportate nella tabella sottostante. Le sequenze dei primers utilizzati sono riportate in Tab.2.

FASI	TEMPO	TEMPERATURA
Retrotrascrizione	30 min	50°C
Step iniziale di attivazione	15 min	95°C
Denaturazione	1 min	94°C
Annealing	1 min	64°C
Estensione	min	72°C
Estensione finale	10 min	72°C

Gene	Sigla	Sequenza del primer	Sequenza di riferimento
Osteocalcina	hOC	F: TCACACTCCTCGCCCTATT R: CCTCCTGCTTGGACACAAA	NM_199173.4
Gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi	GAPDH	F: ACCACAGTCCATGCCATCAC R: TCCACCACCCTGTTGCTGTA	NM_002046.5

Tabella 2: Oligonucleotidi impiegati nell'analisi di espressione genica mediante One Step RT-PCR analysis (F = Forward; R = Reverse) .

Elettroforesi su gel di agarosio.

L'analisi elettroforetica dei prodotti di reazione della one step RT-PCR è stata eseguita su gel di agarosio (Sigma-Aldrich) preparato al 2% con la soluzione tampone TBE 1X (0.04 mM tris-Borato, 0.001M EDTA, pH 8) (Sigma-Aldrich) ed il Gel Red (0.1 µL/mL) (Biotium) come marcatore di acidi nucleici. Per il caricamento, sono stati utilizzati 6 µL di amplificato addizionati di 2 µL di colorante *Gel Loading Buffer* (Sigma-Aldrich). Come marcatore di riferimento per i pesi molecolari compresi tra 100 e 1000 pb, è stato utilizzato il prodotto *PCR 100 bp Low ladder* (Sigma-Aldrich). Le bande dei campioni amplificati sono state visualizzate mediante esposizione ai raggi UV e le immagini sono state acquisite con lo strumento Gel Doc 2000 (Bio Rad). Le intensità delle bande ottenute sono state poi normalizzate per il valore relativo al gene GAPDH, utilizzato come housekeeping.

2.11 Real time PCR

Per valutare l'espressione dell'mRNA per OC, è stata effettuata la Real-Time PCR sugli estratti provenienti dalle colture a 7 e 21 giorni dalla semina.

I campioni di cDNA, ottenuti dopo la retrotrascrizione effettuata sull'RNA estratto, sono stati analizzati mediante Real Time PCR utilizzando il SYBR Green (Quiagen) come indicatore di fluorescenza e per verificare la specificità dei prodotti amplificati mediante curva di melting. Questa tecnica misura l'amplificazione in tempo reale durante la fase esponenziale della PCR, quando cioè l'efficienza di amplificazione è influenzata minimamente dalle variabili di reazione, permettendo di ottenere risultati molto più accurati rispetto alla PCR tradizionale. Questo è reso possibile mediante il rilevamento di una fluorescenza che è proporzionale al prodotto di PCR. Sfruttando tale strategia è possibile quantificare l'espressione genica, identificare il prodotto di amplificazione specifico rispetto a prodotti aspecifici, si può effettuare l'analisi simultanea di due campioni nella stessa reazione e individuare mutazioni puntiformi. I metodi comuni di quantificazione includono l'uso delle molecole fluorescenti, che si intercalano con il DNA a doppio filamento, come, per esempio, il SYBR Green.

Il SYBR Green è una molecola fluorescente non specifica che si lega al solco minore del DNA. All'inizio del processo di amplificazione, la miscela di reazione contiene DNA denaturato, i primer e la molecola fluorescente. Dopo l'annealing dei primer, si legano poche molecole fluorescenti alla doppia elica e durante l'elongazione si verifica un aumento di fluorescenza che corrisponde all'aumento del numero di copie dell'amplicone, cioè dei prodotti della PCR. La molecola fluorescente, non essendo specifica, si lega in modo casuale a tutte le doppie eliche, inclusi i dimeri di primer ed eventuali prodotti aspecifici. Tuttavia, considerando che il SYBR Green non fluoresce in assenza di DNA a doppia elica, se dopo l'amplificazione i campioni vengono riscaldati e viene registrata variazione di fluorescenza al variare della temperatura, si può generare una curva di disassociazione (detta Curva di Melting), caratteristica di ogni prodotto di amplificazione. Più

precisamente, la temperatura di melting (T_m) viene definita come la temperatura alla quale metà del DNA si trova nello stato a doppia elica e l'altra metà in quello denaturato. La T_m dipende sia dalla lunghezza totale della molecola di DNA, sia dalla specifica sequenza dei nucleotidi; pertanto ad ogni prodotto di PCR corrisponde una T_m caratteristica.

I vantaggi della Real Time rispetto alla PCR classica sono molteplici:

- la maggiore sensibilità (può testare con affidabilità fino a 0,5 picogrammi di DNA) e specificità (dovuta all'appaiamento specifico dei primer e della sonda all'interno dell'amplicone);
- la possibilità di monitorare la reazione di PCR mentre questa si verifica e registrare l'emissione della fluorescenza durante la reazione;
- permette di acquisire un dato quantitativo con un ampio range (10^1 - 10^7 copie);
- riduzione dei tempi di analisi e dei rischi di contaminazione, in quanto al termine della reazione di amplificazione non è richiesta elettroforesi o altra manipolazione.

Lo studio della variazione dell'espressione genica prevede 4 fasi:

- Estrazione mRNA dalle cellule seminate (vedi par. 2.9);
- Trattamento di mRNA con RQ1 RNase-Free DNase;
- Reazione di retrotrascrizione del RNA estratto;
- Amplificazione tramite Real time PCR;
- Analisi dei risultati mediante quantizzazione relativa (ΔCt).

Trattamento di RNA con RQ1 RNase-Free DNase

RQ1 (RNA Qualified) *Rnase-Free Dnase* (Promega) è una Dnasi di tipo I (endonucleasi) in grado di degradare le doppie e le singole eliche di DNA producendo nucleotidi 3'-OH. Per questo tipo di trattamento è stata preparata una miscela contenente 1 μ L di RNA (1 μ g/ μ L), 1 μ L di RQ1 *Rnase-Free Dnase* 10X *Reaction Buffer*, 1 μ L di RQ1 *Rnase-Free Dnase* e 7 μ L di acqua DEPC. Dopo incubazione a 37°C per 30 min, alla miscela è stato aggiunto 1 μ L di RQ1 *Dnase stop solution*. Il trattamento è stato completato con un'incubazione a 65°C per 10 min.

Reazione di retrotrascrizione

I campioni di RNA sono stati retrotrascritti a cDNA mediante allestimento di una reazione che ha previsto l'utilizzo di 1 µg di RNA estratto, 1 µL di Oligo(dT)₂₃ Primers Anchored (Sigma-Aldrich), 1 µL di dNTPs (Sigma-Aldrich) e acqua RNase free. La miscela è stata incubata a 70°C per 10 min, poi i tubi sono stati posti in ghiaccio. A seguire sono stati aggiunti: 2 µL di Buffer M-MLV (Sigma-Aldrich), 1 µL di trascrittasi inversa del virus Moloney della leucemia murina (M-MLV) (Sigma-Aldrich), 0.5 µL di inibitore RNase (Sigma-Aldrich) e 3.5 µL di acqua DEPC (Sigma-Aldrich) ottenendo un volume finale di 20 µL. La soluzione è stata incubata per 10 min a TA, poi a 37°C per 50 min e infine 10 min a 94°C. Dopo aver ottenuto e quantificato tramite Nanodrop il cDNA, si è passati alla sua amplificazione utilizzando la Platinum SYBR Green qPCR Super-mix-UDG (Invitrogen).

Real time PCR

L'analisi dell'espressione genica per OC e per il gene housekeeping HPRT è stata condotta sui campioni conservati a -80°C.

Le sequenze nucleotidiche dei geni di interesse sono state individuate tramite consultazione del database online <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide?cmd=search>. I primer sono stati disegnati a cavallo tra 2 esoni adiacenti, in modo tale da escludere l'amplificazione di eventuale DNA contaminante.

La reazione di qPCR è stata allestita utilizzando, per ciascun campione, 12.5 µL di Platinum[®] SYBR Green qPCR SuperMix UDG, 1.5 µL di *forward primer* (10 µM), 1.5 µL di *reverse primer* (10 µM), 1 µg/µL di cDNA e acqua distillata fino a volume finale di 25 µL. Nel controllo negativo è stato utilizzato 1 µL di acqua RNase free al posto del cDNA.

L'amplificazione è stata condotta utilizzando lo strumento *DNA Engine Opticon Real Time Thermal cycler* (BioRad) con il programma che ha previsto un'incubazione iniziale a 50°C per 2 min per attivare l'enzima UDG e, successivamente a 95°C per 2 min. Sono stati eseguiti 40 cicli di amplificazione con lo step di denaturazione a 95°C per 30 sec, quello di

annealing a 64°C per 30 sec ed infine quello di estensione a 72°C per 1 min.

Analisi dei dati

I dati relativi all'espressione del gene sono stati raccolti in termini di Ct (ciclo soglia) ed analizzati utilizzando il metodo del Δ Ct, ovvero mediante quantificazione relativa con cui è possibile valutare se un determinato gene è più o meno espresso in diverse condizioni sperimentali.

Questa quantificazione viene effettuata paragonando i Ct dei diversi campioni e normalizzando l'espressione del gene studiato con l'espressione di un gene housekeeping, ossia un gene che viene costitutivamente espresso dalla cellula a livelli medio-alti come la hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) la cui espressione è costante e non influenzata dal trattamento in studio. Tali geni costitutivi sono caratterizzati dal fatto che la loro espressione segue l'attività trascrizionale della cellula: ne consegue che la quantità di RNA e quindi di cDNA utilizzato quale template è ad essa proporzionale. Tale valore, che risulta attendibile a parità di efficienza di amplificazione del gene target e dell' housekeeping, esprime dunque l'entità dell'espressione differenziale del gene d'interesse tra il campione ed il suo controllo.

Per ogni campione (analizzato in triplicato) è stato individuato il valore di Ct del gene di interesse e di quello housekeeping. In particolare i Ct dei geni studiati sono stati riportati al gene housekeeping calcolando il Δ Ct per eliminare la variabilità dovuta al fatto di avere più o meno cDNA nel campione. Per ogni gruppo di trattamento è stato calcolato il Δ Ct medio e la deviazione standard. La differenza tra il Δ Ct di un qualsiasi gruppo di trattamento ed il Δ Ct del gruppo controllo rappresenta il $\Delta\Delta$ Ct, derivandone che il $\Delta\Delta$ Ct del gruppo controllo è pari a zero. L'espressione matematica $2^{-\Delta\Delta C_t}$, che per il gruppo dei campioni controllo è quindi uguale ad 1, rappresenta il numero di volte (in più o in meno) in cui il gene di interesse è espresso rispetto all'espressione basale (quella riscontrata nei campioni di controllo). Con tale metodo,

per ogni campione, la quantità del gene di interesse analizzato è quindi espressa come “n” volte rispetto alla quantità presente nelle cellule coltivate sulla superficie liscia (controllo).

L’analisi di espressione del gene OC e del gene HPRT è stata eseguita sugli estratti provenienti dalle colture seminate sulle superfici lisce e nanostrutturate, utilizzando i *primers* indicati in Tabella 3. I risultati, media di 3 esperimenti separati, sono stati espressi come numero di cellule \pm deviazione standard. L’analisi statistica è stata effettuata con il t test di Student.

Gene	Sigla	Sequenza del primer	Sequenza di riferimento
Osteocalcina	hOC	F: TCACACTCCTCGCCCTATT R: CTCCTGCTTGGACACAAA	NM_199173.4
<i>Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase</i>	HPRT	F: ATGGACAGGACTGAACGTCTTGCT R: TGAGCACACAGAGGGCTACAATG	NM_000194.2

Tabella 3: Sequenza di *primers* utilizzati nell’analisi di espressione di Osteocalcina mediante qPCR

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 Produzione di supporti in polistirene con superfici microstrutturate

Per l'ottenimento di superfici microstrutturate è stata utilizzata la tecnica del micro-stampaggio a iniezione (μ IM), nell'ottica di una successiva produzione industriale. Come materiale base, è stato scelto il polistirene non trattato per colture cellulari, in quanto biocompatibile. Lo stampo, o master, da cui poi è stato possibile produrre tutti i supporti per i saggi biologici, è stato ottenuto tramite litografia UV. Il materiale utilizzato per tale scopo era una miscela di zirconia e 3-(trimetossisilil)propil metacrilato (TMSPM-Zr) che, tramite spin coating, ricopriva un substrato metallico. Dopo tale passaggio il film polimerico veniva patternato per fotolitografia in modo da ottenere la microstruttura superficiale desiderata che, successivamente, è stata replicata negativamente in polistirene tramite microstampaggio a iniezione. I vantaggi derivanti dall'utilizzo di un resist direttamente patternabile rispetto al processo fotolitografico tradizionale, che prevede la deposizione di maschere metalliche, etching e lift-off, o all'utilizzo di stampi metallici, sono i seguenti: un risparmio economico e una riduzione dei tempi di realizzazione, una minor dispersione termica del materiale ibrido utilizzato rispetto agli stampi metallici, che aumenta l'accuratezza della replicazione, la possibilità di realizzare numerose strutture senza limitazioni dimensionali e con una maggior precisione nella finitura della superficie. Il processo di fotopolimerizzazione del TMSPM-Zr addizionato di Irgacure 369 (un fotoiniziatore) è riportato nella fig. 3.1. L' α -ammino-alchilfenone a seguito dell'esposizione genera un radicale libero altamente reattivo e che determina l'inizio del processo di polimerizzazione.

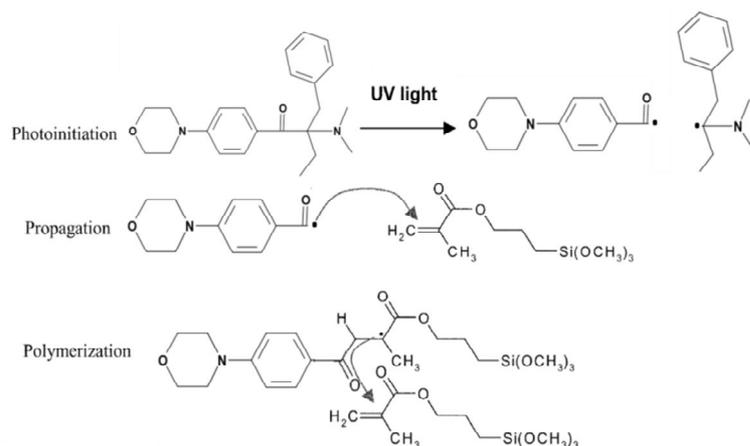


Fig.3.1: Processo di fotopolimerizzazione del TMSPM addizionato di Irgacure 369

Durante l'esposizione ai raggi UV, i cambiamenti chimici all'interno del polimero sono stati monitorati tramite FTIR (Fig. 3.2) Durante l'irradiazione UV sono stati notati i seguenti cambiamenti nello spettro:

- la banda corrispondente ai legami C=C diminuiva parallelamente all'avanzamento della reazione di polimerizzazione;
- il picco a 1547 cm^{-1} , che individua gli stati di coordinazione dei gruppi COO^- , si spostava a lunghezze d'onda maggiori e si riduceva di intensità mano a mano che si incrementava la dose di raggi UV; e
- il picco relativo agli esteri, a 1725 cm^{-1} , subiva uno spostamento a lunghezze d'onda maggiori a causa del cambiamento di configurazione dopo la reazione di polimerizzazione.

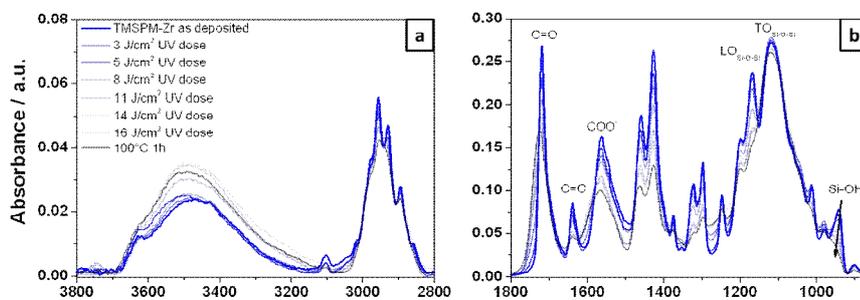


Fig.3.2: spettro FTIR del film di TMSPM-Zr esposto a dosi crescenti di raggi UV

La soluzione di TMSPM-Zr è stata deposta, tramite spin coating, su supporti di metallo a formare un film di copertura omogeneo di circa 2

μm di spessore. La miscela polimerica è stata sottoposta poi a litografia UV e, tramite l'utilizzo di una maschera di quarzo, è stato possibile ottenere le geometrie desiderate, come riportato nel paragrafo 2.1. Sono quindi stati fabbricati stampi con fori di diametro di 2, 3, 4 μm e con valori di interasse rispettivamente di 8, 9, 10 μm e con aspect ratio pari a 0.5. In figura 3.3a, sono riportati l'inserto metallico in cui è stato alloggiato lo stampo microstrutturato che è stato montato nella pressa per microstampaggio a iniezione. Esempi di immagini SEM degli stampi microstrutturati ottenuti sono riportati in figura 3.3 b-d.

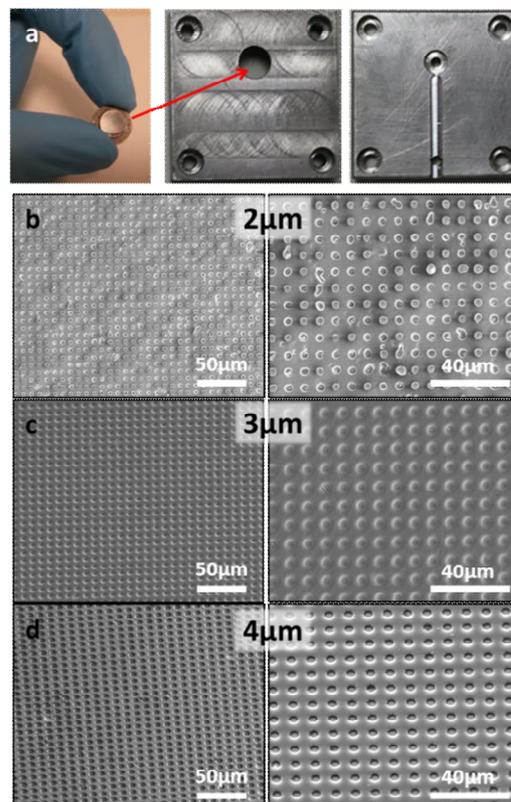


Fig. 3.3: (a) Inserto in cui viene alloggiato lo stampo microstrutturato per lo stampaggio ad iniezione. Immagini al SEM di inserti ottenuti tramite litografia UV su TMSPM-Zr con strutture di diametro di (b) 2 μm , (c) 3 μm , (d) 4 μm .

Microstrutture cilindriche (di seguito indicate come pillars) su polistirene (Fig.3.4) sono quindi state ottenute per microstampaggio a iniezione, utilizzando gli stampi ottenuti per fotolitografia. Analizzando il processo sono stati individuati i seguenti parametri per massimizzare la replicazione dei supporti:

- temperatura di fusione del polistirene = 90°C;
- velocità di iniezione del polistirene = 500 mm/s; e

- packing pressure = 200 bar.

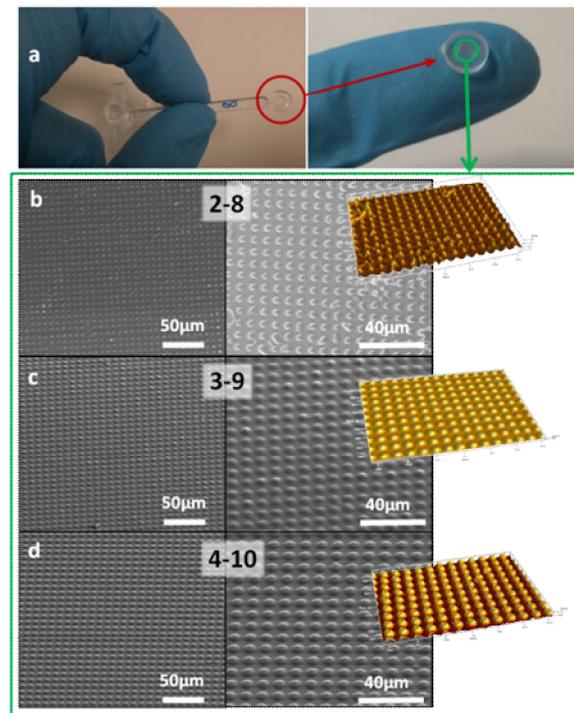


Fig.3.4: (a) Esempio di polistirene microstrutturato dopo stampaggio a iniezione; (b-d) immagini al SEM delle diverse dimensioni dei micropillar; rispettivamente con 2 (nominato 2-8), 3 (nominato 3-9) e 4 μm (nominato 4-10) di diametro dei pillars

3.2 Valutazione dell'adesione e proliferazione di cellule MC3T3-E1 su superfici microstrutturate

Per un'analisi preliminare, è stata utilizzata la linea cellulare preosteoblastica di origine murina MC3T3-E1. A 24 h dalla semina, le cellule aderivano su tutte le superfici in esame, esibendo alcune differenze morfologiche (Fig.3.5).

Rispetto alle cellule seminate sulla superficie liscia, la maggior parte delle MC3T3-E1 coltivate sui supporti microstrutturati erano più appiattite, presentavano una forma meno allungata con un numero maggiore di protrusioni. Come già emerso da precedenti studi (Hamilton, et al., 2006), (Justesen et al., 2009), la topografia superficiale dei supporti influenza la morfologia cellulare e questo può modularne il differenziamento. In ogni caso, le geometrie qui esaminate non hanno avuto effetti sull'orientamento e l'allineamento delle MC3T3-E1; infatti, su tutti le superfici microstrutturate le cellule erano disposte in modo casuale.

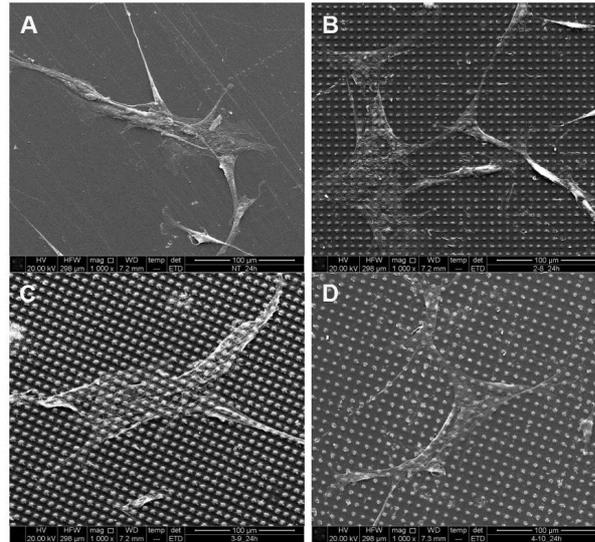


Fig.3.5: SEM di colture di MC3T3-E1 a 24 ore dalla semina: superficie liscia (A), 2-8 (B), 3-9 (C), e 4-10 (D).

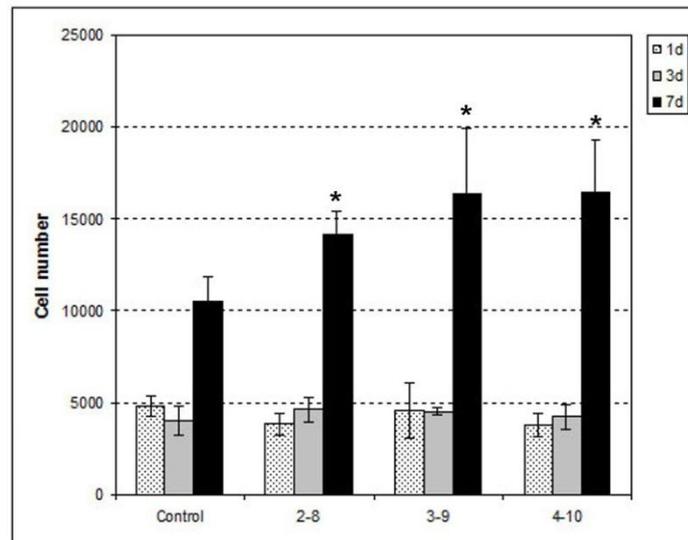


Fig.3.6: MTS-test a 1, 3, e 7 giorni dalla semina. I risultati, media di tre esperimenti ed espressi come numero di cellule, sono riportati come media \pm deviazione standard. *= $p < 0.05$ vs controllo, t test di Student

Per valutare l'effetto della topografia dei substrati sulla proliferazione cellulare, è stato determinato il numero di cellule vitali a 1, 3 e 7 giorni dalla semina (Fig.3.6). In tutte le condizioni di coltura tra 1 e 3 giorni non è stato registrato un significativo aumento del numero di cellule, risultato atteso in quanto il polistirene non era trattato per colture cellulari, al fine di evidenziare l'effetto delle modifiche della superficie sul comportamento cellulare. Inoltre, sempre a 1 e 3 giorni dalla semina, non ci sono state variazioni di rilievo nel numero di cellule tra le colture cresciute su supporti con micropillars e quelle di controllo. Al contrario, a 7 giorni il numero di cellule sulle superfici modificate

era significativamente maggiore ($p < 0.05$) rispetto alle superfici di controllo. Tuttavia, non è stata rilevata nessuna relazione tra dimensioni dei pillars e proliferazione cellulare.

3.3 Valutazione delle proprietà osteoinduttive di superfici microstrutturate

È noto che l'adesione delle MSC, mediata dai recettori delle integrine, regola i processi di crescita e differenziamento cellulare (Dalby, et al., 2014). Un ruolo chiave è rivestito dalla topografia superficiale che modula i contatti focali e l'organizzazione del citoscheletro, attivando vie di segnale e/o modificando l'organizzazione nucleare, che si traduce in una variazione dell'espressione dei geni (Bacakova, et al., 2011). L'adesione delle MSC sui supporti in esame è stata valutata tramite SEM e MTS-test dopo 24 h dalla semina. Come mostrato in fig. 3.7, le MSC aderivano su tutti i tipi di supporto mostrando una forma allungata sulle superfici microstrutturate, e un fenotipo più appiattito sul controllo (Fig 3.7 A-D). E' già stato osservato che esiste una relazione tra morfologia cellulare e differenziamento delle MSC (Lavenus et al., 2010); un'elevata adesione sembra favorire la differenziazione in senso osteogenico. Il numero di cellule sui supporti 2-8 e 3-9 era significativamente inferiore rispetto alla superficie liscia che presentava un numero di MSC paragonabile al supporto 4-10 (Fig. 3.7 E). In tutte le colture cellulari, il numero di MSC era circa 5 volte inferiore rispetto alla densità di semina (4.8×10^3 cell/supporto). Tale comportamento era atteso in quanto il polistirene utilizzato non era trattato per colture cellulari.

L'analisi al microscopio elettronico ha evidenziato che, a 7 giorni dalla semina, su tutti i supporti le cellule formavano un monostrato quasi confluento, che, a 14 e 21 giorni, tendeva a stratificare (Fig. 3.8).

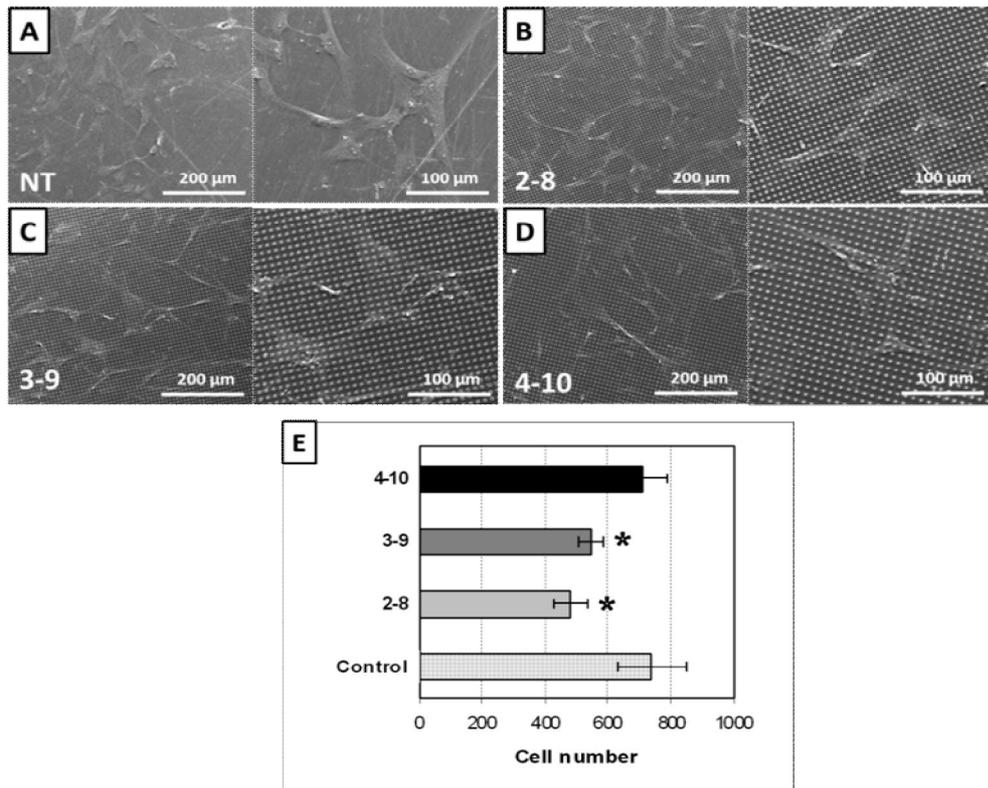


Figure 3.7: Adesione cellulare dopo 24 ore dalla semina. SEM a due diversi ingrandimenti (A-D): controllo (A); 2-8 (B); 3-9 (C); e 4-10 (D). MTS-test (E). I risultati, media di tre esperimenti ed espressi come numero di cellule, sono riportati come media \pm deviazione standard. *= $p < 0.05$ vs controllo, t test di Student

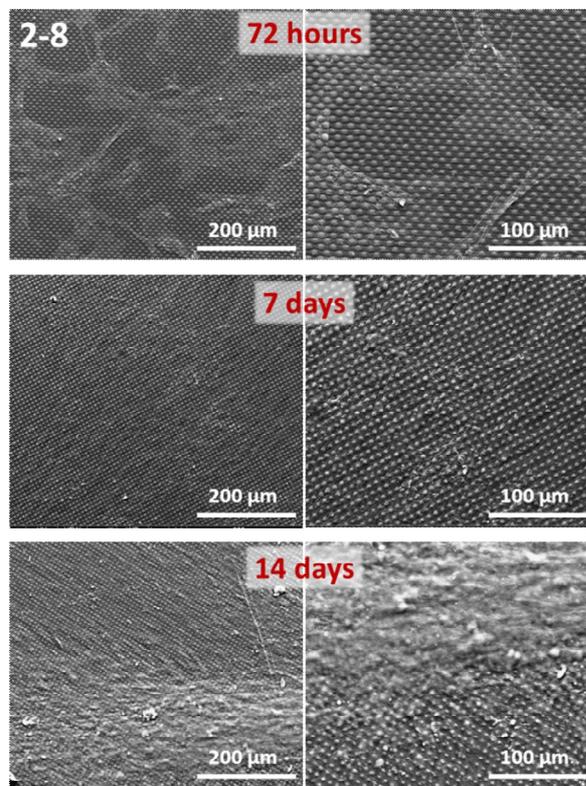


Fig.3.8: Proliferazione cellulare sul supporto microstrutturato 2-8, a 72 h, 7 e 14 giorni dalla semina.

In accordo con i dati morfologici, in tutte le colture il numero di cellule vitali aumentava fino a 14 giorni dalla semina, mentre, tra il 14° e il 21° giorno, si osservava un rallentamento nella proliferazione (Fig. 3.9). Inoltre, a 21 giorni, il numero di cellule sulle superfici con micropillars era significativamente minore rispetto al controllo. Questi dati suggerivano, nelle superfici microstrutturate, un possibile shift del ciclo cellulare da una fase proliferativa ad una differenziativa.

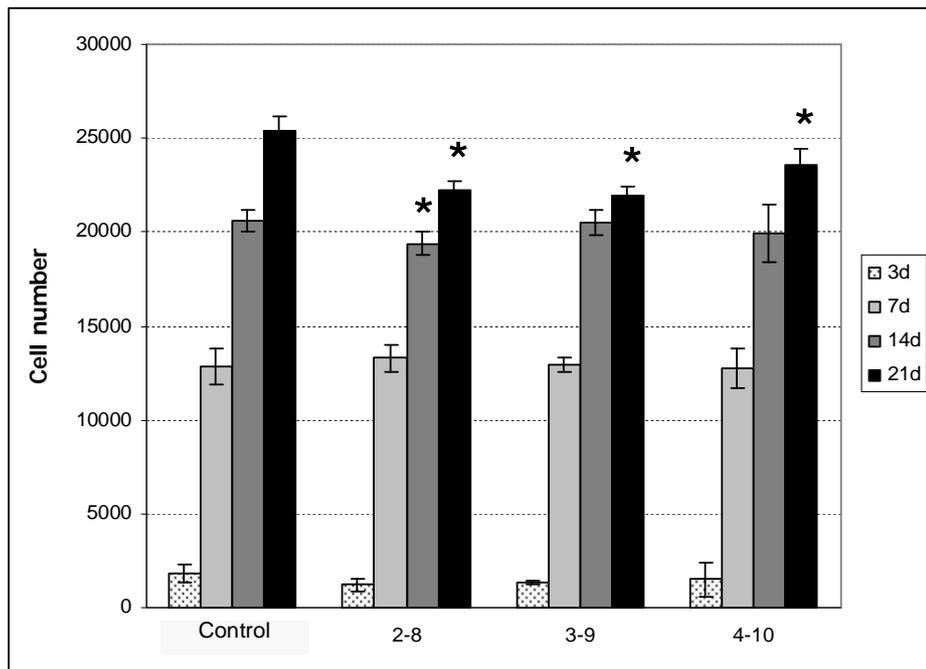


Figure 3.9: Proliferazione cellulare a 3, 7, 14 e 21 giorni dalla semina su superfici microstrutturate e su superfici di controllo. I risultati, media di tre esperimenti ed espressi come numero di cellule, sono riportati come media \pm deviazione standard. *= $p < 0.05$ vs controllo, t test di Student

Il differenziamento osteogenico delle MSC è stato verificato tramite la valutazione della deposizione dei sali di calcio e dell'espressione di mRNA per OC. È interessante notare che le MSC possedevano di *per se* capacità differenziativa in senso osteogenico, come evidenziato dai risultati del saggio con alizarina (Fig. 3.10). A 7 e 14 giorni dalla semina, su tutte le superfici sono stati determinati bassi livelli di mineralizzazione; tuttavia, a 21 giorni la concentrazione del colorante aumentava per tutti i supporti, e in modo più evidente per le superfici 3-9 e 4-10. A 21 giorni dalla semina, le MSC seminate sulle superfici 2-8 e su quelle di controllo presentavano bassi livelli di mRNA per OC matura, corrispondente al prodotto di PCR a 113 bp (Fig. 3.11).

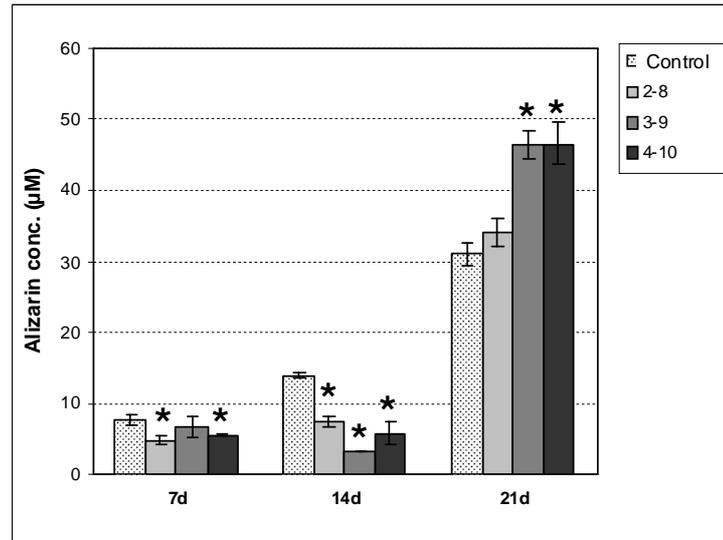


Figure 3. 10: Effetto delle superfici modificate con micro pillars sulla capacità di mineralizzazione delle MSC a 7, 14 e 21 giorni dalla semina. I risultati, media di tre esperimenti ed espressi come concentrazione di alizarina μM , sono riportati come media \pm deviazione standard. *= $p < 0.05$ vs controllo, t test di Student

Al contrario, le cellule cresciute sui supporti 3-9 e 4-10 esprimevano mRNA sia per OC matura sia per il suo precursore, corrispondente al prodotto di PCR a 540 bp. L'analisi densitometrica delle bande, ha rivelato che l'espressione di entrambi i prodotti era significativamente maggiore per le MSC coltivate sulle superfici 3-9 e 4-10. Inoltre, i livelli più alti sono stati registrati per le colture su 4-10.

I risultati ottenuti dalla one step-PCR e dalla valutazione dei nodi di mineralizzazione hanno, quindi, indicato che esiste una relazione diretta tra le proprietà osteogeniche delle superfici e la geometria dei pillars. Infatti, all'aumentare del diametro e dell'interasse, aumentavano le proprietà osteoinduttive del supporto.

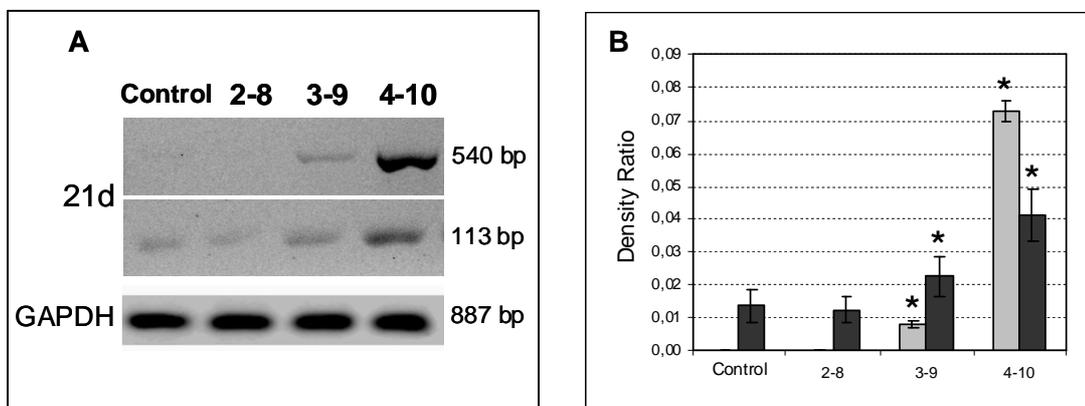


Figure 3.11: Effetti delle superfici con micro pillars sull'espressione dell' mRNA codificante per OC dopo 21 giorni dalla semina. A: gel di agarosio dei prodotti della PCR. B: Analisi densitometrica delle bande corrispondenti ai prodotti della PCR normalizzati per il corrispettivo valore di GAPDH. Barre in nero (113 bp); grigio (540 bp). I risultati, media di tre esperimenti ed espressi come densità normalizzata, sono riportati come media \pm deviazione standard. *= $p < 0.05$ vs controllo, t test di Student

3.4 Produzione di scaffold con superfici nanostrutturate

Come precedentemente descritto nel paragrafo 3.1, anche per la produzione di superfici nanostrutturate è stata sfruttata la tecnica del micro-stampaggio a iniezione (μ IM). Come materiale base è stato utilizzato acido polilattico (Purasorb Pl-10). Lo stampo, o master, da cui è stato possibile ottenere tutti i supporti per i saggi biologici, è stato ottenuto tramite litografia UV. Il materiale utilizzato per tale scopo era una miscela, denominata GZ, di 3-glycidoxypropyltrimethoxysilane (GPTMS) e ZrBut, che è stata processata tramite nanoimprinting per l'ottenimento degli stampi nanostrutturati.

Durante l'esposizione ai raggi UV, i cambiamenti chimici all'interno del polimero sono stati monitorati tramite FTIR (Fig. 3.12). Le bande e i picchi di assorbimento dei vari legami erano i seguenti:

- la banda tra 3600 e 3000 cm^{-1} era caratteristica del gruppo OH, presente nei precursori idrolizzati; era particolarmente visibile l'assorbimento del 2-metossietanolo (3420 cm^{-1}) presente in quantità elevata dato che deve ancora avvenire il trattamento termico che causa la sua evaporazione;
- i picchi caratteristici del gruppo CH_2 : 2935 cm^{-1} (stretching asimmetrico), 2870 cm^{-1} (stretching simmetrico) e 1460 cm^{-1} (bending);
- la banda tra 1100 e 1060 cm^{-1} , in particolare la spalla a 1060 cm^{-1} , corrispondeva allo stretching asimmetrico dell'atomo di O lungo la direzione parallela agli atomi di Si nel legame Si-O-Si;
- a 966 cm^{-1} era presente il picco caratteristico sia del legame Si-OH (stretching) che del legame Si-O-Zr;
- il legame Si-O-Zr assorbiva anche a 440 cm^{-1}

Si può inoltre notare che non erano identificabili i picchi dell'anello epossidico, quale ad esempio il picco a 910 cm^{-1} dovuto allo stretching asimmetrico, generalmente scelto per valutare l'apertura degli anelli. Questo dimostra che la polimerizzazione organica avveniva già durante la sintesi del sistema GZ grazie alla presenza dell'atomo di Zr, che agiva da acido di Lewis e provocava l'apertura degli anelli epossidici.

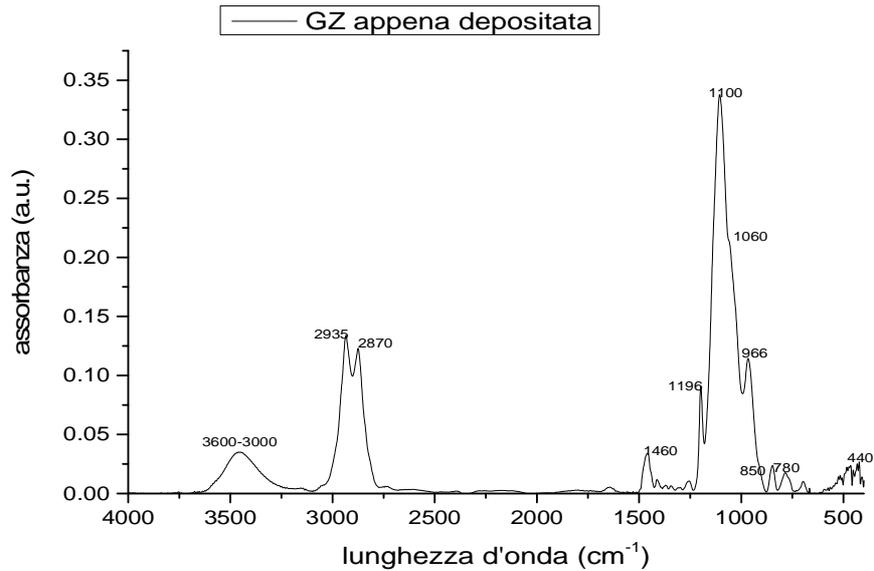


Fig.3.12: Spettro FTIR di un film di GZ depositato per spin-coating

A differenza del resist TMSPM-Zr, in fase di litografia nanoimprinting termico con sistema GZ si è sfruttata la reticolazione del network inorganico del materiale ibrido, che avveniva per idrolisi e condensazione. Le immagini SEM degli inserti ottenuti per litografia nanoimprinting come descritto nel paragrafo 2.2. sono riportate di seguito in fig. 3.13 e fig 3.14.

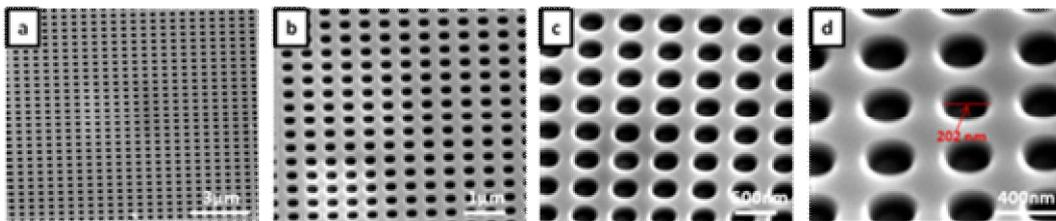


Fig.3.13: Immagini al SEM con ingrandimento crescente (a-d) delle strutture con diametro di 200nm ottenute tramite nanoimprinting

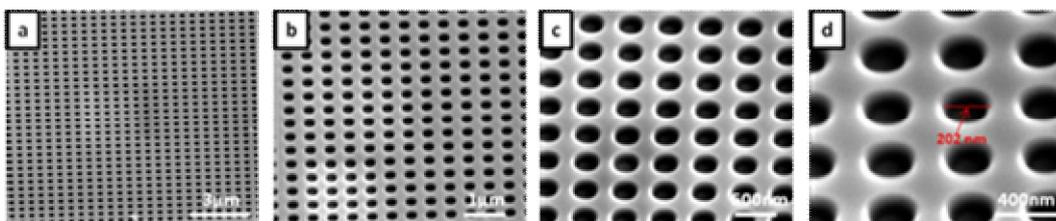


Fig.3.14: Immagini al SEM con ingrandimento crescente (a-d) delle strutture con diametro di 400nm ottenute tramite nanoimprinting

Utilizzando le informazioni raccolte durante la precedente sperimentazione, nello stampaggio delle superfici nanostrutturate sono stati utilizzati i parametri di processo ottimizzati per quelle microstrutturate, mantenendo il PS come materiale polimerico di base. I risultati ottenuti si sono però rivelati del tutto inaccettabili, con campioni caratterizzati da un grado di replicazione esiguo rispetto a quello raggiunto su scala micrometrica.

Visti i grossi limiti di replicabilità si è pensato di procedere adottando un materiale differente e la scelta è ricaduta sul PLLA, per due ragioni principali:

- rispetto al PS è caratterizzato da temperatura di fusione più bassa e da una sensibilità alle variazioni di temperatura maggiore; pertanto è possibile la processazione con temperature stampo inferiori e la modifica del comportamento reologico anche con piccole variazioni termiche;
- a differenza del PS è un polimero biodegradabile e biorisorbibile, proprietà vantaggiosa in vista dell'eventuale utilizzo finale in implantologia ossea.

Una volta definite le geometrie dei pattern nanostrutturati (tabella 1), è stato realizzato il master.

In questo caso, la miscela era composta per l'80% da glicidossipropiltrimetossisilano (GPTMS), un alcossido organicamente modificato contenente un anello epossidico, e per il 20% da una soluzione di zirconio butossido ($Zr(But)_4$) e 2-metossietanolo ($C_3H_8O_2$).

Pattern	Diametro [nm]	Altezza [nm]	Passo [nm]	Aspect Ratio
2-3	200	400	300	2
2-4	200	400	400	2
4-6	400	800	600	2
4-8	400	800	800	2

Tabella 1: Specifiche dimensionali nominali dei layout scelti per gli inserti nanostrutturati

L'ottimizzazione del processo di stampaggio di features nanometriche in PLLA ha condotto ad individuare i seguenti elementi chiave per ottenere risultati soddisfacenti:

- la temperatura dello stampo (T_m) è di gran lunga il parametro di processo più influente per tutti e due i polimeri esaminati. L'incidenza della T_m è più marcata nelle superfici nanometriche di PLLA rispetto a quelle micrometriche di PS. Questo è riconducibile alla maggiore sensibilità delle caratteristiche reologiche del PLLA ad una data variazione della temperatura, nonché alla sua generale minor viscosità.
- negli studi di ottimizzazione la pressione di mantenimento (P_{hot}) viene indicata come un fattore significativo rispetto alla variabile di risposta considerata. La sua incidenza "diretta" non è certamente comparabile a quella della temperatura stampo, tuttavia non è nemmeno così limitata da poter essere trascurata.
- la velocità di iniezione (V_{inj}) non risulta essere un parametro significativo in quanto non influenza in modo significativo il grado di replicazione, tuttavia non è da sottovalutare il suo ruolo "indiretto", cioè in termini di interazione con gli altri parametri.

Partendo da questa base, è stato definito il set ottimale dei parametri di processo, che sono di seguito riportati.

Parametri	Valore ottimale
T_m/T_g	1.2
V_{inj} [mm/s]	450
P_{hol} [bar]	400

Nello specifico, per ottenere un elevato grado di replicazione, era indispensabile stampare con una T_m maggiore della temperatura di transizione vetrosa del polimero processato. Nell'ottica dello stampaggio di features miniaturizzate, in particolare su scala nanometrica, la temperatura stampo acquisiva un'incidenza così marcata che, compatibilmente con i tempi di processo, era opportuno mantenerla a valori il più elevati possibile.

Anche la pressione di mantenimento e la sua interazione con la temperatura stampo erano fattori significativi, ma l'incidenza della T_m è stata molto più pronunciata.

Lo studio ha permesso di ottimizzare il processo fino a replicare i

supporti nanostrutturati con un grado di riempimento superiore all'85% e con nanopillars caratterizzati da aspect ratio di ~ 1.75 . Tali ottimi risultati discendevano principalmente dalla scelta del PLLA come materiale base, in quanto le sue caratteristiche termiche e reologiche hanno consentito di sfruttare al meglio l'effetto della temperatura stampo, rendendo il processo estremamente efficace ed efficiente.

3.5 Valutazione delle proprietà osteoinduttive di superfici nanostrutturate

A 24 h dalla semina, le cellule aderivano bene su ciascuna superficie. Tuttavia, nelle colture di controllo le MSC presentavano una forma allungata, mentre sul PLLA nanostrutturato assumevano una forma poligonale (Fig. 3.15). Inoltre, nei supporti 2-4, 4-6 e 4-8 le cellule si organizzavano a formare colonie a rosetta, al contrario di quanto si osservava nei controlli e nei supporti 2-3, sui quali le MSC si distribuivano in modo sparso su tutta la superficie di coltura. Le osservazioni ottenute sono in linea con quanto già riportato da altri ricercatori. È stato già dimostrato, infatti, che le modifiche della superficie di coltura con pillars o pori di dimensioni nanometriche possono modulare la distribuzione delle integrine e l'assemblaggio dei contatti focali, portando a variazioni nell'organizzazione del citoscheletro, che si traducono in una variazione della morfologia cellulare (Bettinger et al., 2009) (Yim et al., 2010) (Zheng & Zhang, 2011). McBeath et al., hanno dimostrato, inoltre, che la forma cellulare è importante nel determinare il percorso differenziativo delle MSC verso la linea adipogenica od osteogenica (Goldyn et al., 2009). Per verificare una possibile riorganizzazione del citoscheletro, le MSC sono state colorate con actina-Alexa fluor488 e DAPI. Nonostante le differenze nella morfologia cellulare rilevate al SEM, la distribuzione dei filamenti di actina era analoga in tutte le modalità di coltura (Fig. 3.15). A 24 h, il numero di cellule adese sulle superfici 2-3 e 4-8 era significativamente minore a quello determinato nel controllo, che presentava valori paragonabili alle superfici 2-4 e 4-6 (Fig. 3.16).

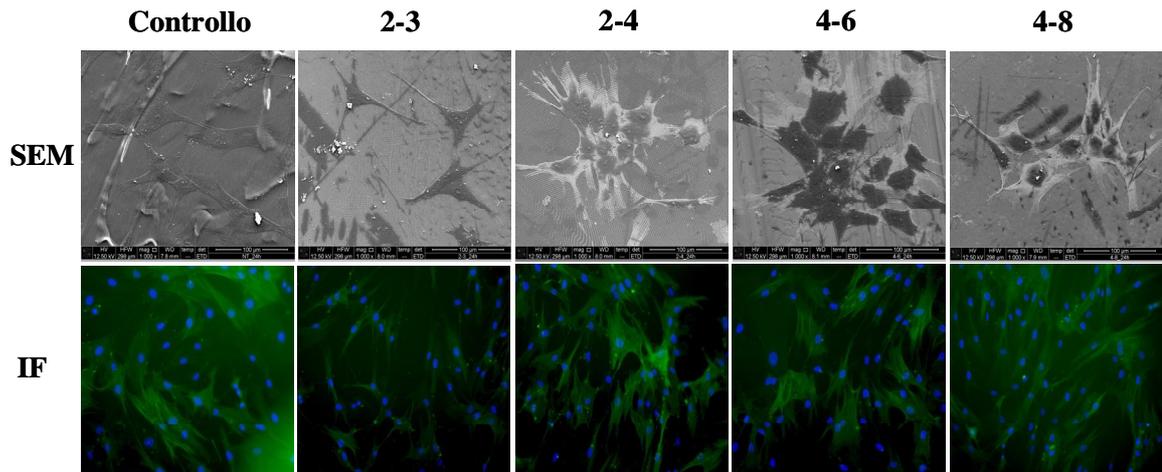


Fig.3.15: SEM e immunofluorescenza di colture di MSC su superfici in PLLA modificate e non (controllo) con nanopillars a 24 ore dalla semina. Immunofluorescenza: blu: DAPI; verde: actina; ingrandimento x100

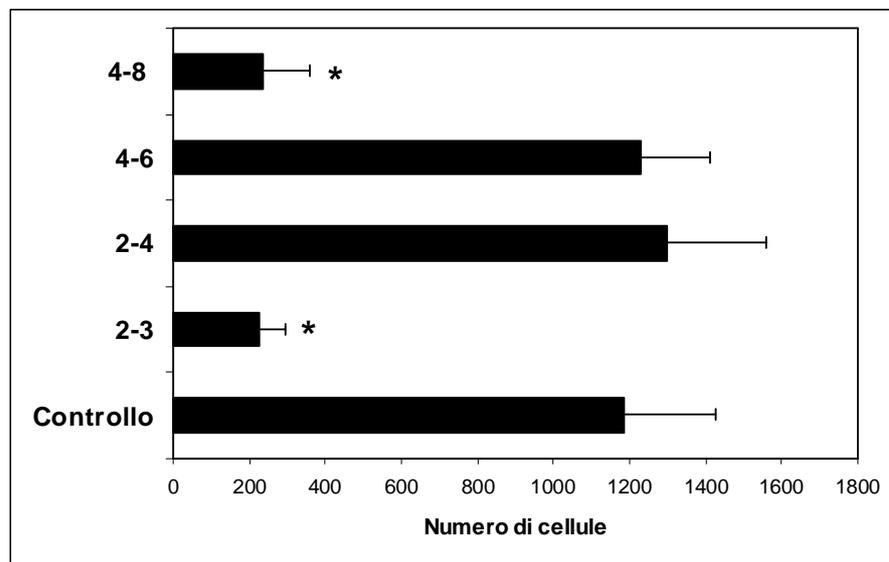


Fig.3.16: MTS-test eseguito dopo 24ore dalla semina su supporti in PLLA modificati con nanopillars e sui controlli. I risultati, media di tre esperimenti ed espressi come numero di cellule, sono riportati come media \pm deviazione standard. *= $p < 0.05$ vs controllo, t test di Student

Con l'aumentare del tempo di coltura, le cellule seminate sulle superfici di controllo non modificate formavano già a 7 giorni un monostrato quasi confluento, che iniziava a stratificare a 14 giorni (Fig. 3.17). A 7 giorni, anche sulla superficie 2-3 le MSC si organizzavano a formare colonie. Su tutte le superficie nanostrutturate comparivano, al centro delle colonie, zone di stratificazione già a 7 giorni. La dimensione di tali zone e delle colonie aumentava progressivamente nel tempo. Tuttavia, a 21 giorni non si osservava una copertura completa della superficie.

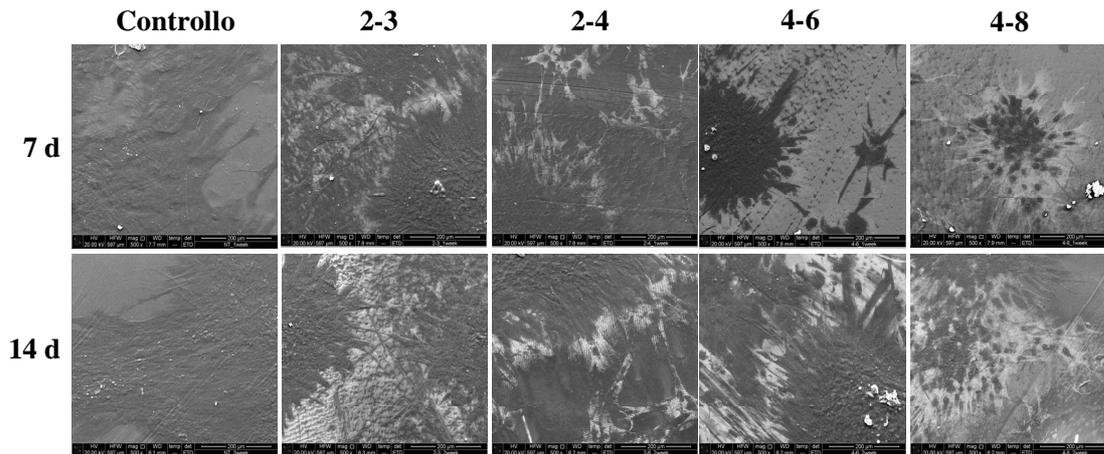


Fig.3.17: SEM delle colture di MSC sui supporti nanostrutturati e sulle superfici di controllo a 7 e 14 giorni dalla semina.

A 7 e 14 giorni, in tutte le superfici, eccezion fatta per la geometria 4-6, il numero di cellule registrato era significativamente minore a quello determinato nelle colture di controllo (Fig.3.18). Al contrario, a 21 giorni la situazione appariva capovolta con un incremento del numero di cellule sui supporti 2-3, 2-4 e 4-8. Basandoci sui risultati dei saggi di adesione e di crescita, si può concludere che le superfici nanostrutturate sono idonee per l'adesione e la proliferazione delle MSC, anche se non appare evidente alcuna relazione con le caratteristiche dimensionali della geometria superficiale.

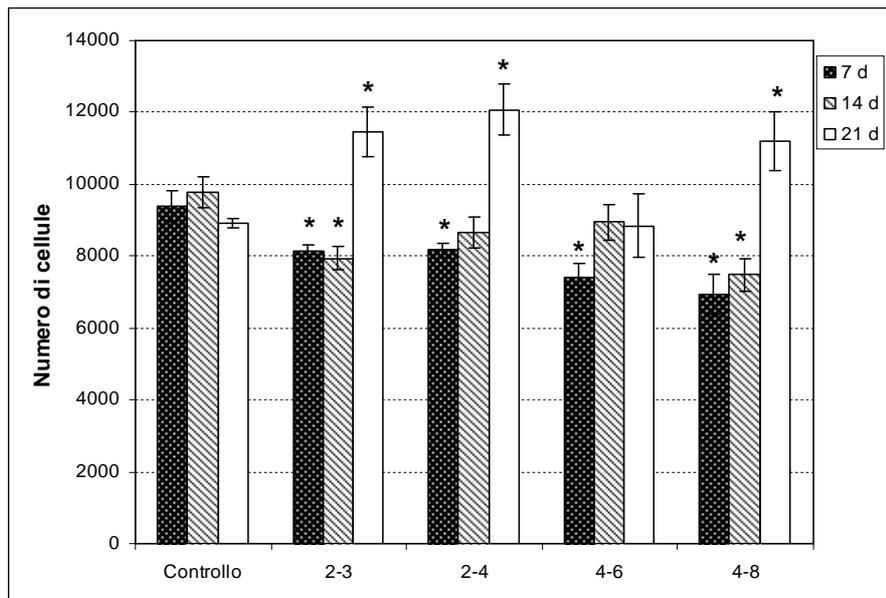


Fig.3.18: Proliferazione cellulare a 7, 14 e 21 giorni dalla semina su superfici nanostrutturate e su superfici di controllo. I risultati, media di tre esperimenti ed espressi come numero di cellule, sono riportati come media \pm deviazione standard. *= $p < 0.05$ vs controllo, t test di Student

Come si può notare nella fig. 3.19, già a 7 giorni le MSC coltivate sulle superfici 2-4 e 4-8 mostravano una maggiore capacità di mineralizzazione rispetto a quanto determinato nelle colture di controllo. A 14 giorni, tale capacità era evidente in tutte le geometrie. I valori, a 21 giorni dalla semina, tendevano poi a riallinearsi con quelli della superficie di controllo, eccezion fatta per le MSC coltivate sulle superfici 2-4 e 4-6 che mostravano ancora una maggiore capacità di deporre i sali di calcio.

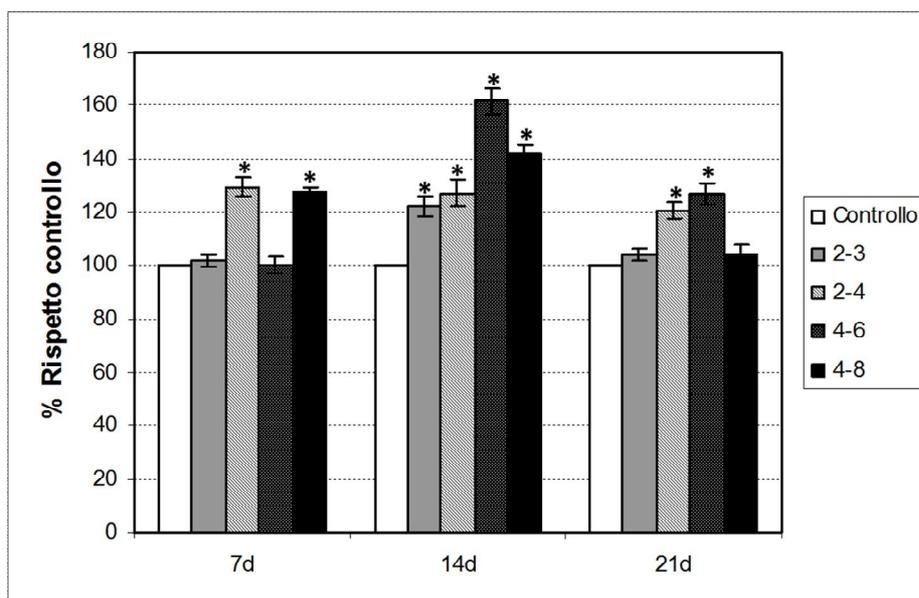


Fig.3.19: Effetto delle superfici modificate con nano pillars sulla capacità di mineralizzazione delle MSC a 7, 14 e 21 giorni dalla semina. I risultati, espressi come variazione percentuale della concentrazione di alizarina rispetto alle superfici di controllo, sono riportati come media di tre esperimenti \pm deviazione standard. *= $p < 0.05$ vs controllo, t test di Student

Un'ulteriore prova del differenziamento delle cellule in senso osteoblastico è stata eseguita valutando l'espressione del marker tardivo OC tramite real time-PCR. A 7 giorni, le MSC seminate sulle superfici 2-3, 4-6 e 4-8 presentavano livelli di espressione significativamente maggiori rispetto a quelli determinati nel controllo, con un fold increase che arrivava quasi a 6 volte per la geometria 4-6 (Fig.3.20). Tale incremento diminuiva notevolmente a 21giorni, dove un aumento di espressione rispetto alle colture di controllo era evidente solo per le superfici 4-6 e 4-8. Analogamente a quanto osservato per la deposizione di sali di calcio, l'effetto delle superfici nanostrutturate sulla differenziazione è meno marcato a 21 giorni. Questo può essere dovuto

al fatto che le MSC, quando arrivano a confluenza, tendono spontaneamente ad evolvere verso la linea osteogenica. Tuttavia, appare evidente che il processo di differenziazione avviene più precocemente sulle superfici nanostrutturate, anche in assenza di fattori di crescita induttivi. Inoltre, i dati raccolti indicano che, come già osservato per le superfici nanostrutturate, l'aumento del diametro dei pillar e dell'interasse migliora le capacità differenziative della superficie.

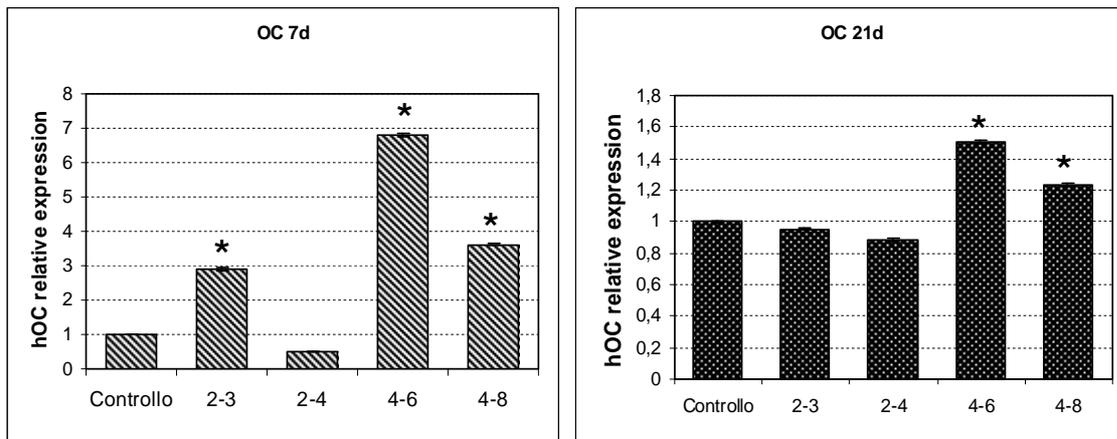


Fig.3.20: Effetti delle superfici con nano pillars sull'espressione dell'mRNA codificante per OC a 7 e 21 giorni dalla semina. I risultati, media di tre esperimenti ed espressi come fold increase rispetto le superfici di controllo, sono riportati come media \pm deviazione standard. *= $p < 0.05$ vs controllo, t test di Student

4. CONCLUSIONI

In questa tesi è stato progettato e ottimizzato il processo di stampaggio, su scala sia nano che micro, di superfici polimeriche tramite injection molding. Tra tutte le possibili tecniche di microformatura questa, infatti, è quella che garantisce il miglior compromesso tra precisione e capacità di produzione di massa a basso costo unitario, avendo poi come ulteriori aspetti positivi il ridotto tempo ciclo, l'elevata riproducibilità e la possibile completa automazione del processo.

Collettivamente, i dati raccolti dalla sperimentazione *in vitro*, hanno evidenziato che le superfici sia micro che nanostrutturate posseggono proprietà osteoinduttive, permettendo la differenziazione delle MSC anche in assenza di fattori di crescita induttivi. In particolare, è stata evidenziata una relazione tra caratteristiche dimensionali della geometria superficiale e potenziale differenziativo. Infatti, l'aumento del diametro dei pillar e dell'interasse si traduce in un incremento della deposizione di sali calcio e dell'espressione di OC, marker tardivo della differenziazione osteogenica. Inoltre, limitatamente ai supporti nanostrutturati, le modifiche superficiali inducono dei profondi cambiamenti della morfologia cellulare, con comparsa di elementi poligonali, che formano colonie. Tuttavia, la modifica della forma cellulare non è accompagnata da una evidente riorganizzazione dei filamenti citoscheletrici di actina. Al contrario di quanto emerso per la differenziazione in senso osteogenico, le superfici nano e microstrutturate e le loro caratteristiche dimensionali non sembrano avere effetti sull'adesione e proliferazione cellulare. Ulteriori studi *in vivo* saranno necessari per confermare le proprietà osteoinduttive delle geometrie selezionate con il presente lavoro e per verificarne l'osteointegrazione.

5. BIBLIOGRAFIA

- Albrektsson, T., & Johansson, C. (2001). Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *European Spine Journal*, 96–101. doi:10.1007/s005860100282
- Aubin, Jane E. (2001). Regulation of osteoblast formation and function.pdf. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*. doi:10.1023/A:1010011209064
- Aubin, J. E. (2001). Regulation of osteoblast formation and function. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*, 2(1), 81–94.
- Bacakova, L., Filova, E., Parizek, M., Ruml, T., & Svorcik, V. (2011). Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants. *Biotechnology Advances*, 29(6), 739–67. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.06.004
- Bettinger, C. J., Langer, R., & Borenstein, J. T. (2009). Engineering substrate topography at the micro- and nanoscale to control cell function. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 48(30), 5406–15. doi:10.1002/anie.200805179
- Brammer, K. S., Choi, C., Frandsen, C. J., Oh, S., & Jin, S. (2011). Hydrophobic nanopillars initiate mesenchymal stem cell aggregation and osteo-differentiation. *Acta Biomaterialia*, 7(2), 683–690. doi:10.1016/j.actbio.2010.09.022
- Burg, K. J. L., Porter, S., & Kellam, J. F. (2000). Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Work*, 21.
- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (2006). The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nature Protocols*, 1(2), 581–5. doi:10.1038/nprot.2006.83
- Chouzouri, G., & Xanthos, M. (2007). In vitro bioactivity and degradation of polycaprolactone composites containing silicate fillers. *Acta Materialia*, 3, 745–756. doi:10.1016/j.actbio.2007.01.005

- Chua, C. (2001). Review The Design of Scaffolds for Use in Tissue Engineering. Part I. Traditional Factors, *7*(6), 679–689.
- Ciapetti, G., Ambrosio, L., Savarino, L., Granchi, D., Cenni, E., Baldini, N., & Pagani, S. (2003). Osteoblast growth and function in porous poly e-caprolactone matrices for bone repair : a preliminary study. *Biomaterials*, *24*, 3815–3824. doi:10.1016/S0142-9612(03)00263-1
- Dalby, M. J., Gadegaard, N., Tare, R., Andar, A., Riehle, M. O., Herzyk, P., Oreffo, R. O. C. (2007). The control of human mesenchymal cell differentiation using nanoscale symmetry and disorder. *Group*. doi:10.1038/nmat2013
- Dalby, M. J., Gadegaard, N., & Oreffo, R. O. C. (2014). Harnessing nanotopography and integrin-matrix interactions to influence stem cell fate. *Nature Materials*, *13*(6), 558–69. doi:10.1038/nmat3980
- Dolatshahi-pirouz, A., Nikkhah, M., Kolind, K., & Dokmeci, M. R. (2011). Functional Biomaterials Micro- and Nanoengineering Approaches to Control Stem Cell-Biomaterial Interactions. *Review Literature And Arts Of The Americas*, 88–106. doi:10.3390/jfb2030088
- Dolder, J. Van Den, Farber, E., Spauwen, P. H. M., & Jansen, J. A. (2003). Bone tissue reconstruction using titanium fiber mesh combined with rat bone marrow stromal cells. *Science*, *24*, 1745–1750. doi:10.1016/S0142-9612(02)00537-9
- Dong, S.-W., Ying, D.-J., Duan, X.-J., Xie, Z., Yu, Z.-J., Zhu, C.-H., ... Sun, J.-S. (2009). Bone regeneration using an acellular extracellular matrix and bone marrow mesenchymal stem cells expressing Cbfa1. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *73*(10), 2226–33. doi:10.1271/bbb.90329
- Engler, A. J., Sen, S., Sweeney, H. L., & Discher, D. E. (2006). Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. *Cell*, 677–689. doi:10.1016/j.cell.2006.06.044
- Garlotta, D. (2001). A literature review of poly (lactic acid). *Journal of Polymers and the Environment*, *9*(2). doi:10.1023/a:1020200822435
- Goldyn, A. M., Rioja, B. A., Spatz, J. P., Ballestrem, C., & Kemkemer, R. (2009). Force-induced cell polarisation is linked to RhoA-driven microtubule-independent focal-adhesion sliding. *Journal of Cell Science*, *122*(Pt 20), 3644–51. doi:10.1242/jcs.054866

- Golub, E., & Boesze-Battaglia, K. (2007). The role of alkaline phosphatase in mineralization. *Current Opinion in Orthopaedics*, 18(5), 444–448. doi:10.1097/BCO.0b013e3282630851
- Gregory, C. a, Gunn, W. G., Peister, A., & Prockop, D. J. (2004). An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Analytical Biochemistry*, 329(1), 77–84. doi:10.1016/j.ab.2004.02.002
- Grigolo, B., Roseti, L., Fiorini, M., De Franceschi, L., & Facchini, A. (2002). [Tissue engineering applications: cartilage lesions repair by the use of autologous chondrocytes]. *Reumatismo*, 54(4), 364–71.
- Habibovic, P., & de Groot, K. (2007). Osteoinductive biomaterials-- properties and relevance in bone repair. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 1(1), 25–32. doi:10.1002/term.5
- Hamilton, D. W., Wong, K. S., & Brunette, D. M. (2006). Microfabricated discontinuous-edge surface topographies influence osteoblast adhesion, migration, cytoskeletal organization, and proliferation and enhance matrix and mineral deposition in vitro. *Calcified Tissue International*, 78(5), 314–25. doi:10.1007/s00223-005-0238-x
- Hoexter, D. L. (2002). Bone regeneration graft materials. *The Journal of Oral Implantology*, 28(6), 290–4. doi:10.1563/1548-1336(2002)028<0290:BRGM>2.3.CO;2
- Hulbert, S. F., Young, F. a, Mathews, R. S., Klawitter, J. J., Talbert, C. D., & Stelling, F. H. (1970). Potential of ceramic materials as permanently implantable skeletal prostheses. *Journal of Biomedical Materials Research*, 4(3), 433–56. doi:10.1002/jbm.820040309
- Hutmacher, D. (2000). Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*, 21, 2529–2543. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961200001216>
- John, M., Mccloy, D., Robertson, M., Agheli, H., Sutherland, D., Affrossman, S., & Oreffo, R. O. C. (2006). Osteoprogenitor response to semi-ordered and random nanotopographies. *Bone*, 27, 2980–2987. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.01.010

- Jørgensen, N. R., Henriksen, Z., Sørensen, O. H., & Civitelli, R. (2004). Dexamethasone, BMP-2, and 1, 25-dihydroxyvitamin D enhance a more differentiated osteoblast phenotype: validation of an in vitro model for human bone marrow-derived primary osteoblasts. *Steroids*, 69, 219–226. doi:10.1016/j.steroids.2003.12.005
- Justesen, J., Lorentzen, M., Andersen, L. K., Hansen, O., Chevallier, J., Modin, C., ... Pedersen, F. S. (2009). Spatial and temporal changes in the morphology of preosteoblastic cells seeded on microstructured tantalum surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 89(4), 885–94. doi:10.1002/jbm.a.32032
- Karageorgiou, V., & Langer, R. (2005). Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*, 26, 5474–5491. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.02.002
- Kolind, K., Kraft, D., Bøggild, T., Duch, M., Lovmand, J., Pedersen, F. S., ... Besenbacher, F. (2014). Acta Biomaterialia Control of proliferation and osteogenic differentiation of human dental-pulp-derived stem cells by distinct surface structures. *Acta Biomaterialia*, 10(2), 641–650. doi:10.1016/j.actbio.2013.11.006
- Langer, R., & Vacanti, J. (1993). Tissue engineering. *Science*, 260(5110), 920–926. doi:10.1126/science.8493529
- Lavenus, S., Ricquier, J., Louarn, G., & Layrolle, P. (2010). Cell interaction with nanopatterned surface of implants. *Nanomedicine*, 5(6), 937–47. doi:10.2217/nnm.10.54
- Liao, H.-T., & Chen, C.-T. (2014). Osteogenic potential: Comparison between bone marrow and adipose-derived mesenchymal stem cells. *World Journal of Stem Cells*, 6(3), 288–95. doi:10.4252/wjsc.v6.i3.288
- Lin, A. S. P., Barrows, T. H., Cartmell, S. H., & Guldberg, R. E. (2003). Microarchitectural and mechanical characterization of oriented porous polymer scaffolds. *Science*, 24, 481–489.
- Luyn, M. Van. (1992). Relations between in vitro cytotoxicity and crosslinked dermal sheep collagens. *Journal of ...*, 26(8), 1091–110. doi:10.1002/jbm.820260810
- M., K., Y., S., & J., T. (1997). Preparation and mechanical properties of calcium phosphate / copoly- L -lactide composites. *Journal of*

- Materials Science: Materials in Medicine*, 8(3), 361–364.
doi:10.1023/A:1018580816388
- Martinez, E., Engel, E., Planell, J., & Samitier, J. (2009). Effects of artificial micro-and nano-structured surfaces on cell behaviour. *Annals of Anatomy- ...*, 191(1), 126–35.
doi:10.1016/j.aanat.2008.05.006
- McBeath, R., Pirone, D. M., Nelson, C. M., Bhadriraju, K., & Chen, C. S. (2004). Cell Shape, Cytoskeletal Tension, and RhoA Regulate Stem Cell Lineage Commitment. *Developmental Cell*, 6(4), 483–495.
doi:10.1016/S1534-5807(04)00075-9
- Mistry, A. S., & Mikos, A. G. (2005). Tissue engineering strategies for bone regeneration. *Advances in Biochemical Engineering/biotechnology*, 94, 1–22. doi:10.1007/b14096
- Moss, D. W. (1982). Alkaline phosphatase isoenzymes. *Clinical Chemistry*, 28(10), 2007–16.
- Ngiam, M., Nguyen, L. T. H., Liao, S., Chan, C. K., & Ramakrishna, S. (2011). Biomimetic nanostructured materials: potential regulators for osteogenesis? *Annals of the Academy of Medicine, Singapore*, 40(5), 213–22.
- Nishida, S., Endo, N., & Yamagiwa, H. (1999). Number of osteoprogenitor cells in human bone marrow markedly decreases after skeletal maturation. *Journal of Bone and ...*, 17(3), 171–7.
Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10757676>
- Olivares-navarrete, R., Hyzy, S. L., Hutton, D. L., Erdman, C. P., Wieland, M., Boyan, B. D., & Schwartz, Z. (2010). Biomaterials Direct and indirect effects of microstructured titanium substrates on the induction of mesenchymal stem cell differentiation towards the osteoblast lineage. *Biomaterials*, 31(10), 2728–2735.
doi:10.1016/j.biomaterials.2009.12.029
- Porter, J. R., Ruckh, T. T., & Popat, K. C. (2009). Bone tissue engineering: a review in bone biomimetics and drug delivery strategies. *Biotechnology Progress*, 25(6), 1539–60.
doi:10.1002/btpr.246
- Porter, R. M., Huckle, W. R., & Goldstein, A. S. (2003). Effect of dexamethasone withdrawal on osteoblastic differentiation of bone

- marrow stromal cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 90(1), 13–22. doi:10.1002/jcb.10592
- Ravichandran, R., Liao, S., & Ng, C. (2009). Effects of nanotopography on stem cell phenotypes. *World Journal of Stem ...*, 1(1), 55–66. doi:10.4252/wjsc.v1.i1.55
- Reilly, G. C., Radin, S., Chen, A. T., & Ducheyne, P. (2007). Differential alkaline phosphatase responses of rat and human bone marrow derived mesenchymal stem cells to 45S5 bioactive glass. *Biomaterials*, 28(28), 4091–7. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.05.038
- Rubin, P., & Yaremchuk, M. (1997). Complications and toxicities of implantable biomaterials used in facial reconstructive and aesthetic surgery: a comprehensive review of the literature. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 100(5), 1336–1353. doi:10.1097/00006534-199710000-00043
- Salgado, A. J., Coutinho, O. P., & Reis, R. L. (2004). Bone tissue engineering: state of the art and future trends. *Macromolecular Bioscience*, 4(8), 743–65. doi:10.1002/mabi.200400026
- Shin, H., Jo, S., & Mikos, A. G. (2003). Biomimetic materials for tissue engineering. *Biomaterials*, 24, 4353–4364. doi:10.1016/S0142-9612(03)00339-9
- Shue, L., Yufeng, Z., & Mony, U. (2012). Biomaterials for periodontal regeneration: a review of ceramics and polymers. *Biomatter*, 2(4), 271–7. doi:10.4161/biom.22948
- Sila-Asna, M., & Bunyaratvej, A. (2007). Osteoblast differentiation and bone formation gene expression in strontium-inducing bone marrow mesenchymal stem cell. *Kobe J Med ...*, 53(1-2), 25–35. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17579299>
- Spector, M. (2006). Biomaterials-based tissue engineering and regenerative medicine solutions to musculoskeletal problems. *Swiss Med Wkly*, 136, 293–302. Retrieved from <http://www.smw.ch/docs/pdf200x/2006/19/smw-11310.PDF>
- Stylios, G., Wan, T., & Giannoudis, P. (2007). Present status and future potential of enhancing bone healing using nanotechnology. *Injury*, 38 Suppl 1, S63–74. doi:10.1016/j.injury.2007.02.011

- Tsuchida, H., Hashimoto, J., Crawford, E., Manske, P., & Lou, J. (2003). Engineered allogeneic mesenchymal stem cells repair femoral segmental defect in rats. *Journal of Orthopaedic Research : Official Publication of the Orthopaedic Research Society*, 21(1), 44–53. doi:10.1016/S0736-0266(02)00108-0
- Weinand, C., Pomerantseva, I., Neville, C. M., Gupta, R., Weinberg, E., Madisch, I., ... Vacanti, J. P. (2006). Hydrogel-beta-TCP scaffolds and stem cells for tissue engineering bone. *Bone*, 38(4), 555–63. doi:10.1016/j.bone.2005.10.016
- Yim, E. K. F., Darling, E. M., Kulangara, K., Guilak, F., & Leong, K. W. (2010). Nanotopography-induced changes in focal adhesions, cytoskeletal organization, and mechanical properties of human mesenchymal stem cells. *Biomaterials*, 31(6), 1299–306. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.10.037
- Zhang, L., & Webster, T. J. (2009). Nanotechnology and nanomaterials : Promises for improved tissue regeneration. *Nanotechnology*, 66–80. doi:10.1016/j.nantod.2008.10.014
- Zheng, X. R., & Zhang, X. (2011). Microsystems for cellular force measurement: a review. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 21(5), 054003. doi:10.1088/0960-1317/21/5/054003

