

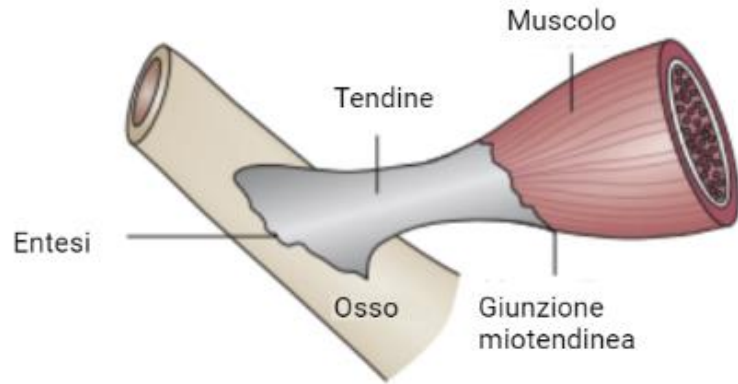
Formulazione e caratterizzazione di un bioink a base di alginato e fibroina per il bioprinting del tendine

Candidato: Benedetta Frongia

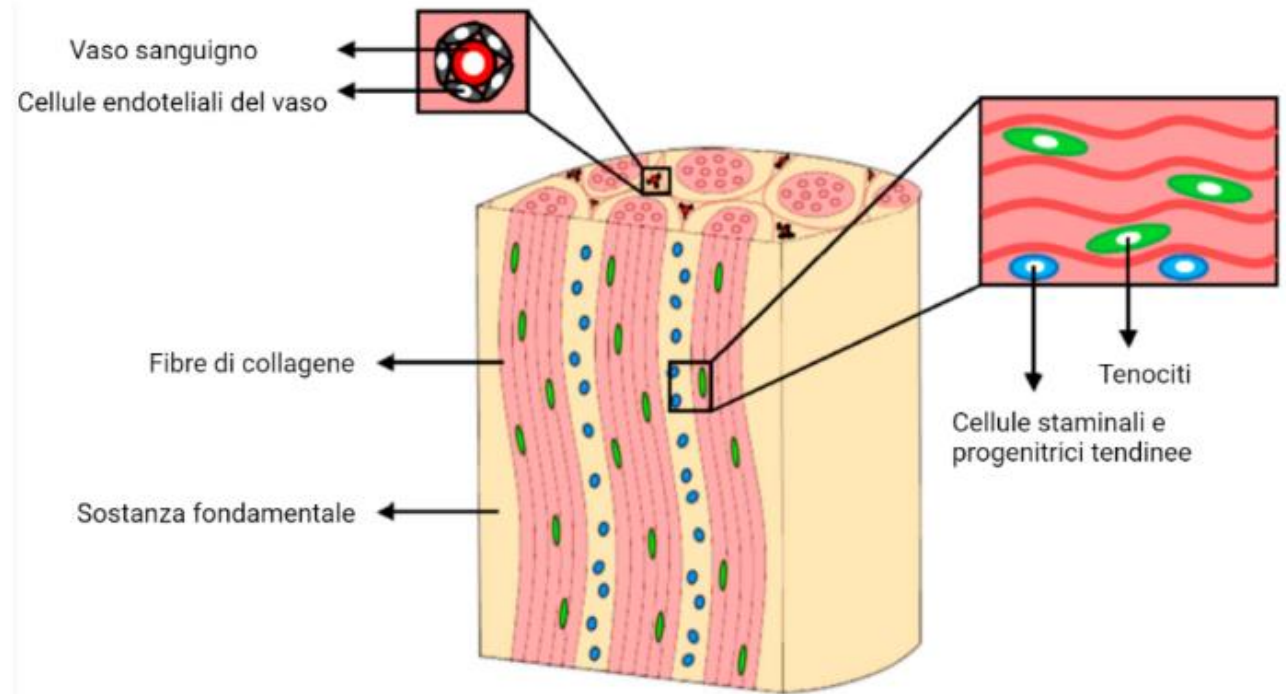
Relatore: Prof. Michele Conti
Correlatori: Giulia Maria Di Gravina,
Franca Scocozza

A.A. 2021/2022

A)



B)

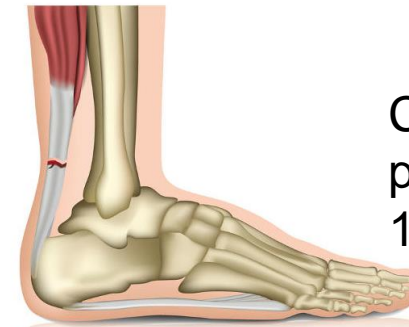


- Funzione: trasmettere all'osso la forza creata nel muscolo
- Anisotropia e viscoelasticità
- Modulo di Young da 20 a 1200 MPa

Stato dell'arte: trattamento lesione tendinea



Normale



Rotto

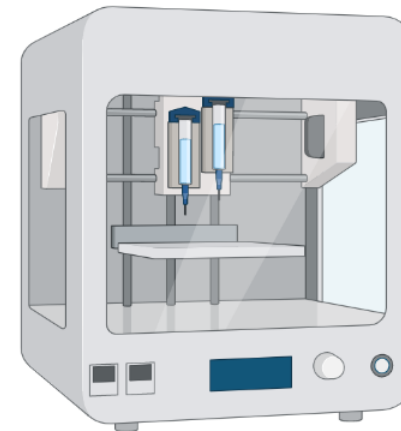
Colpisce circa 31
persone ogni
100000 all'anno

Approcci tradizionali:

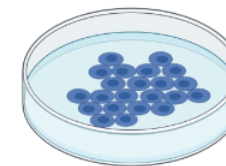
- Conservativo
- Chirurgico



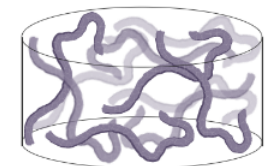
Ingegneria dei tessuti



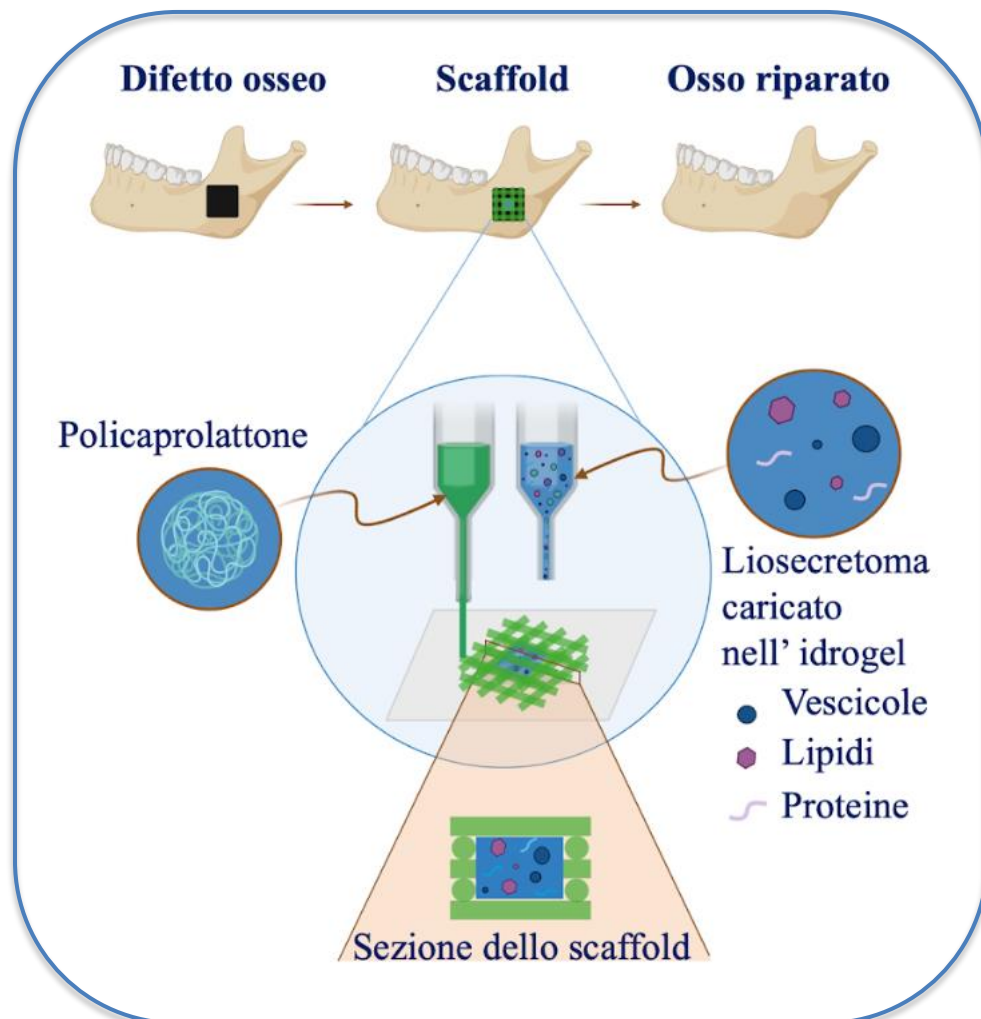
cellule



biomateriale



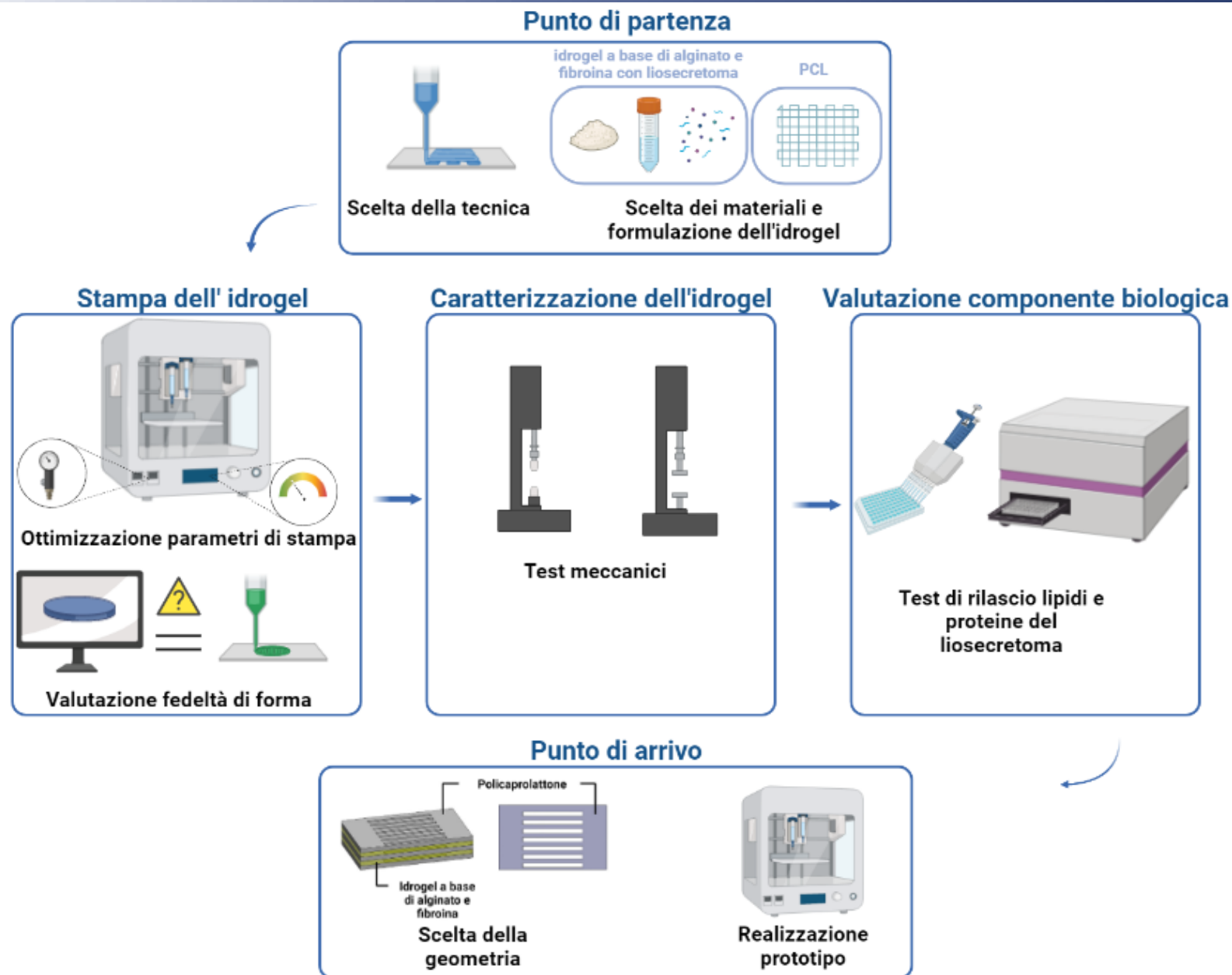
Studio di partenza

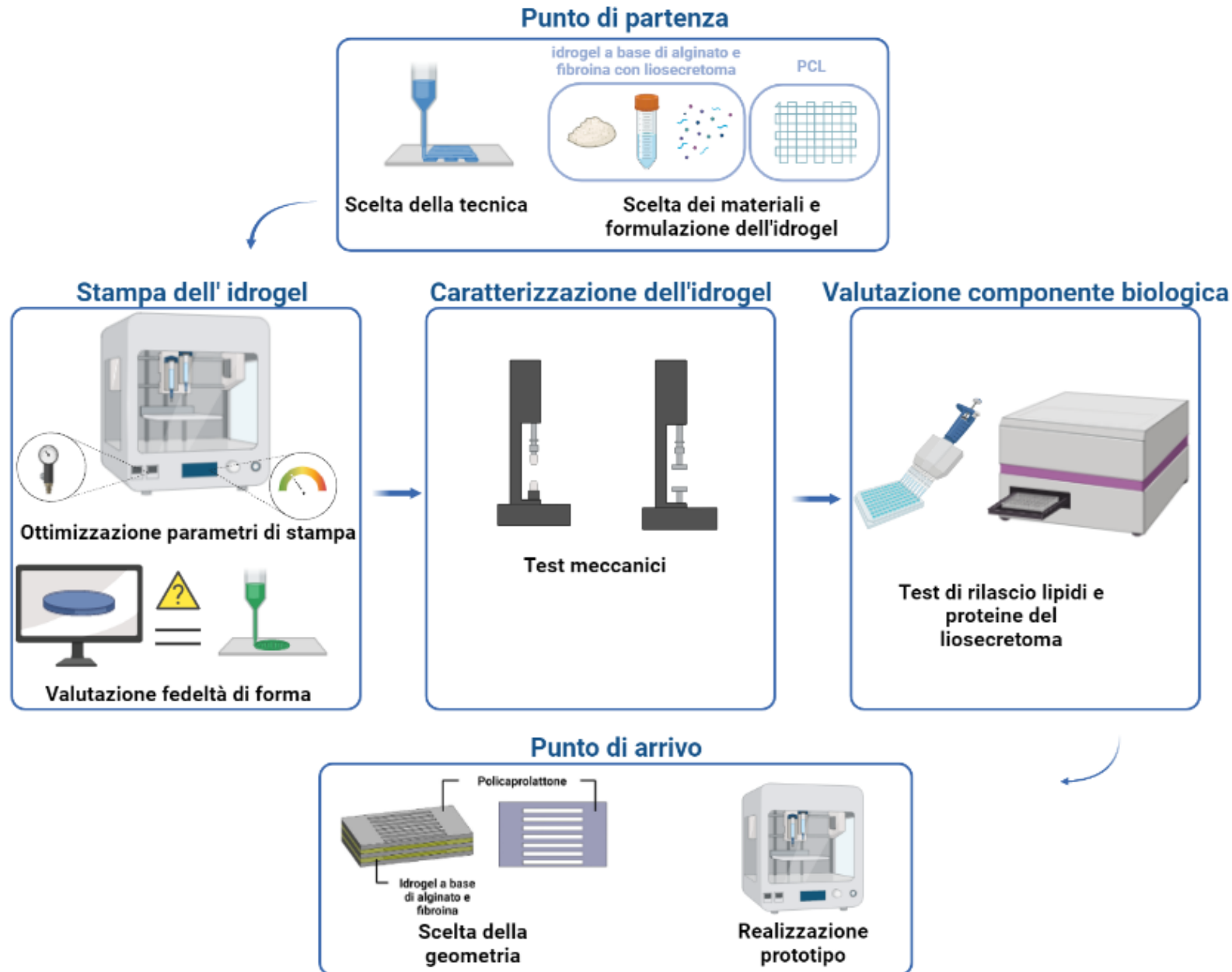


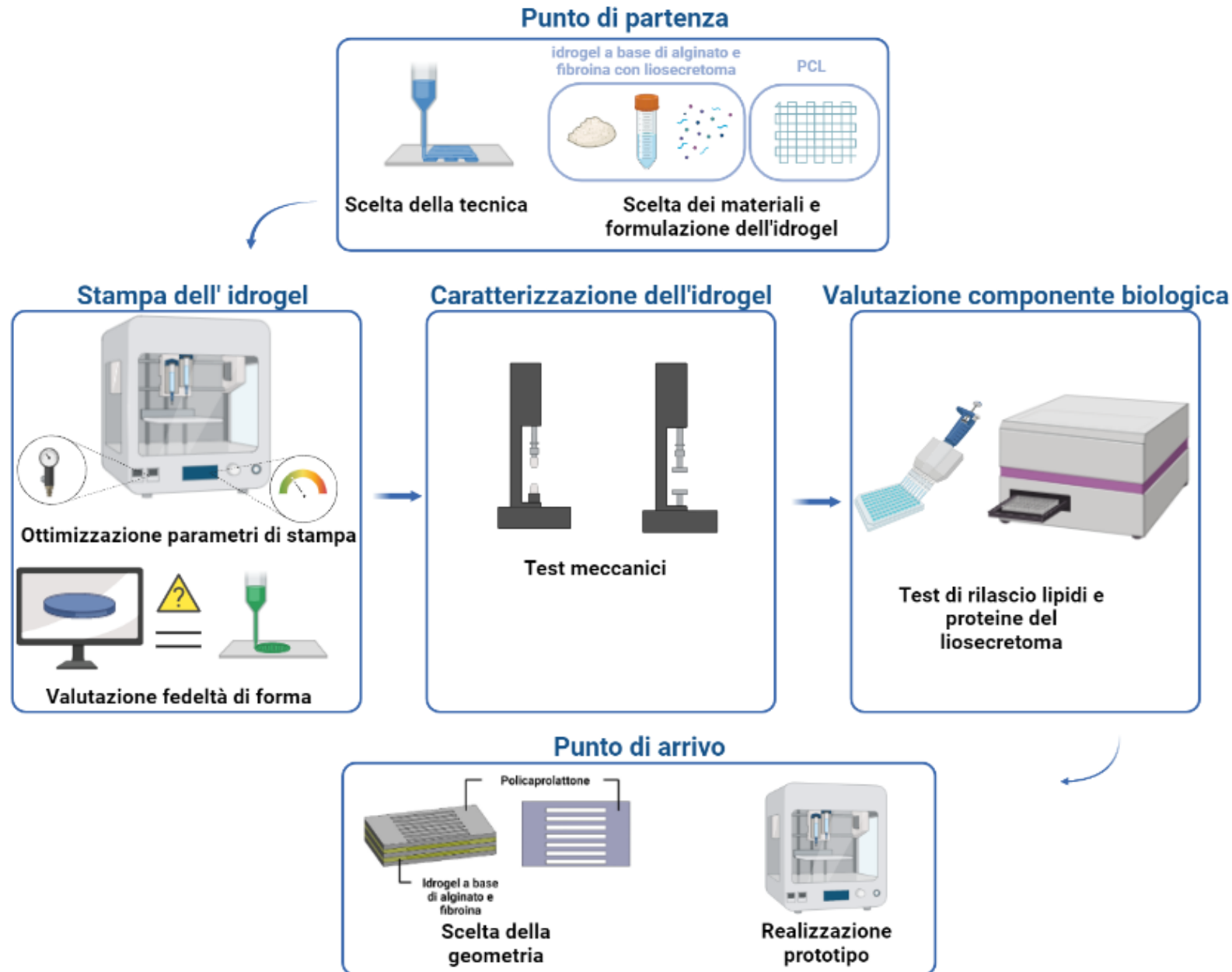
Lavoro di tesi

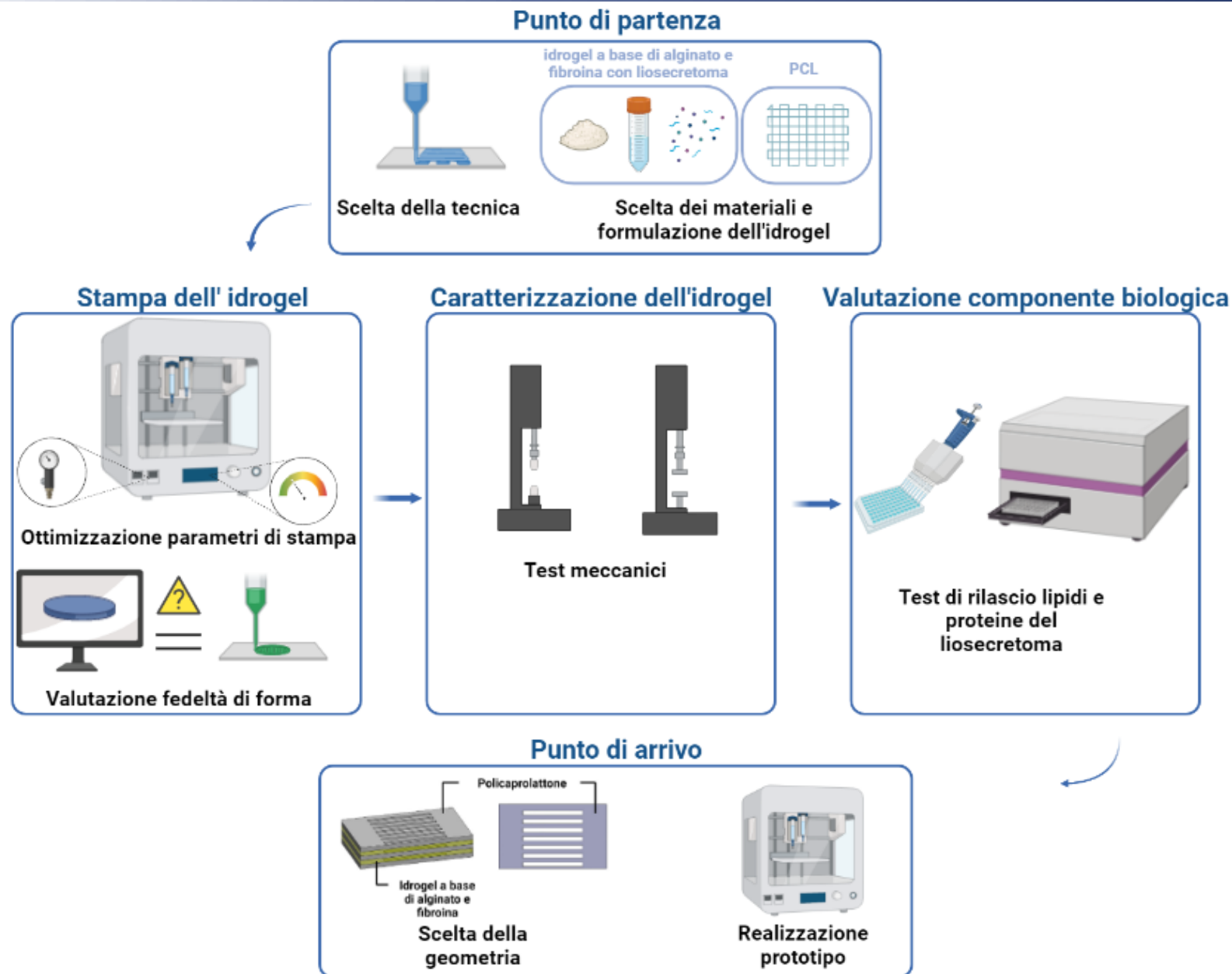


Bari, E.; Scocozza, F.; Perteghella, S.; Sorlini, M.; Auricchio, F.; Torre, M.L.; Conti, M. 3D Bioprinted Scaffolds Containing Mesenchymal Stem/Stromal Lyosecretome: Next Generation Controlled Release Device for Bone Regenerative Medicine. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 515.

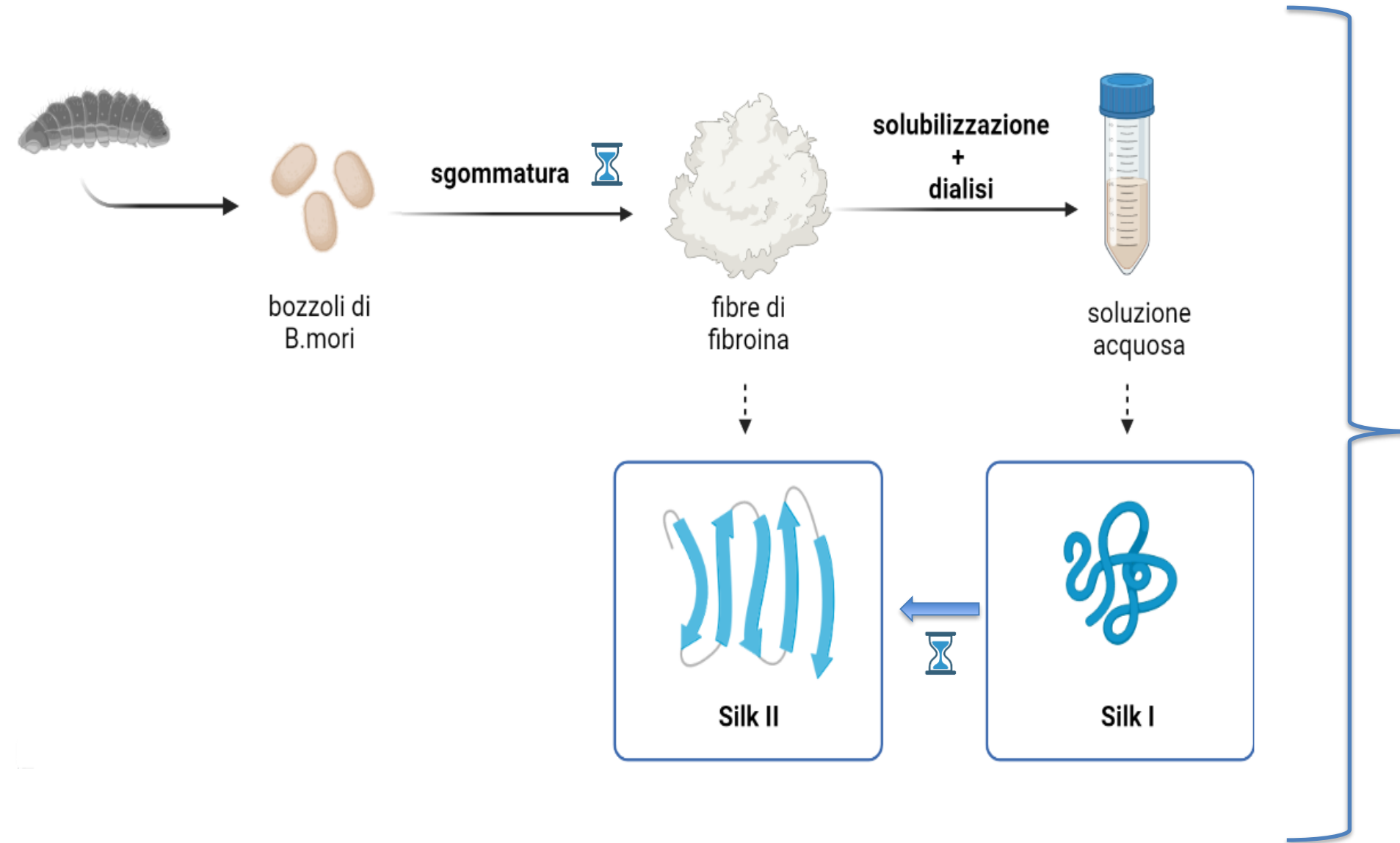








Fibroina della seta: protocollo di preparazione

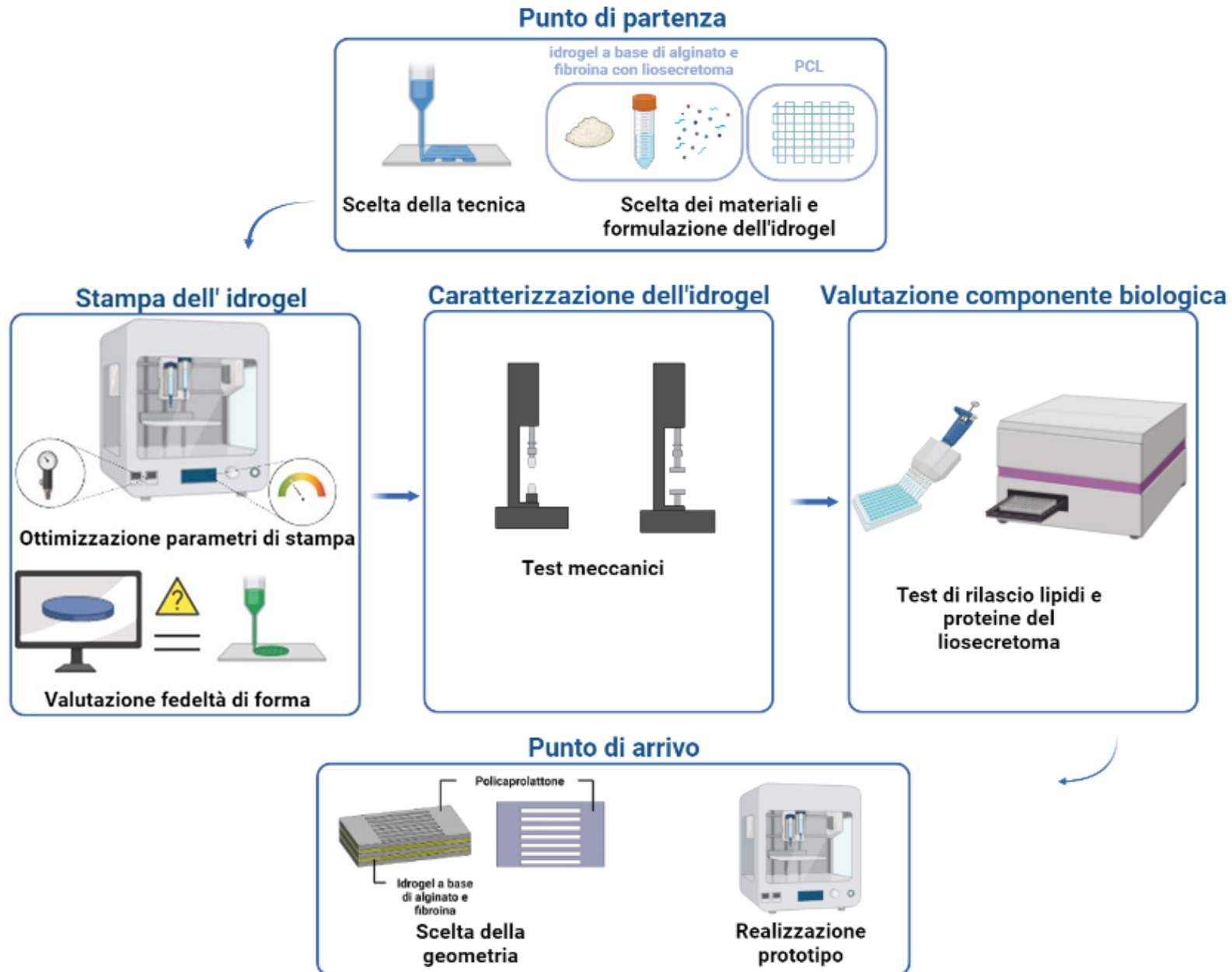


Comportamento
dipendente da:

- Durata del processo di sgommatura
- Tempo dalla preparazione della soluzione acquosa

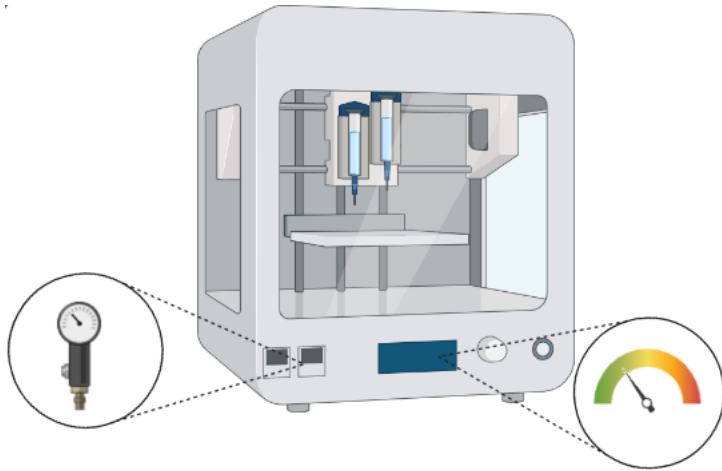


- **3 lotti con differente sgommatura: 1, 2 e 4 ore**
- **2 time point: 7 e 14 giorni**



Ottimizzazione dei parametri di stampa:

- Pressione
- Velocità

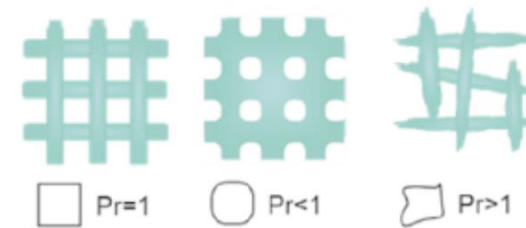
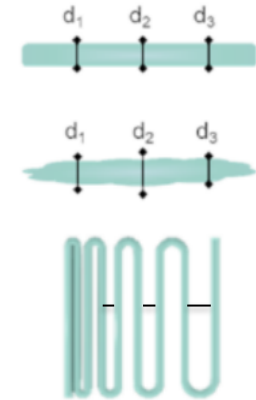


Protocollo proposto da **Paxton et al.***: stampa di una serpentina variando la velocità. Fissata la velocità ottimale, variando la pressione

*Paxton N, Smolan W, Böck T, Melchels F, Groll J, Jungst T. Proposal to assess printability of bioinks for extrusion-based bioprinting and evaluation of rheological properties governing bioprintability. Biofabrication. 2017

Valutazione della fedeltà di forma attraverso:

- Diametro del filamento
- Distanza tra i filamenti
- Indice di stampabilità



$$P_r = \frac{\pi}{4C} = \frac{L^2}{16A}$$

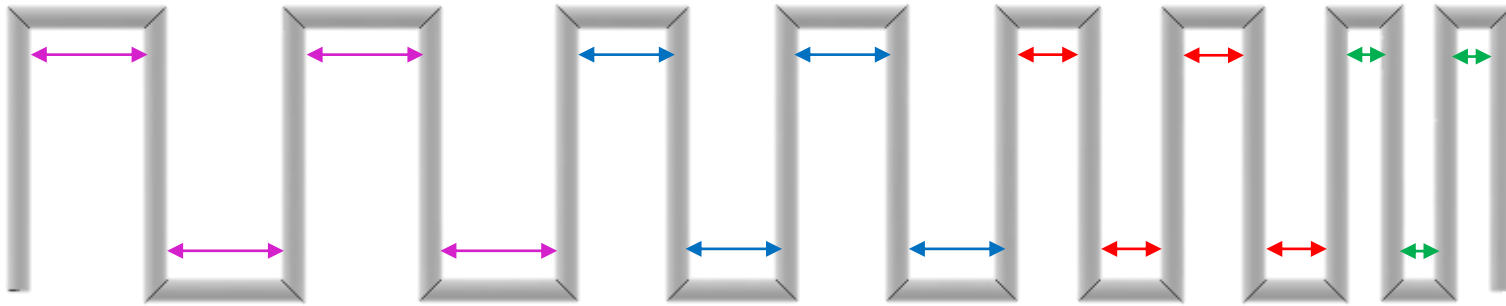
$$C = \frac{4A}{L^2} \pi$$

Protocollo proposto da **Schwab et al.***

*Schwab A, Levato R, D'Este M, Piluso S, Eglin D, Malda J. Printability and Shape Fidelity of Bioinks in 3D Bioprinting. Chem Rev. 2020 Oct 14;120(19)

Valutazione delle prestazioni di stampa: geometrie utilizzate

Stampa 1



- **Ottimizzazione parametri di stampa**
- **Valutazione fedeltà di forma:**
 - Diametro del filamento
 - Distanza tra i filamenti

Stampa 2



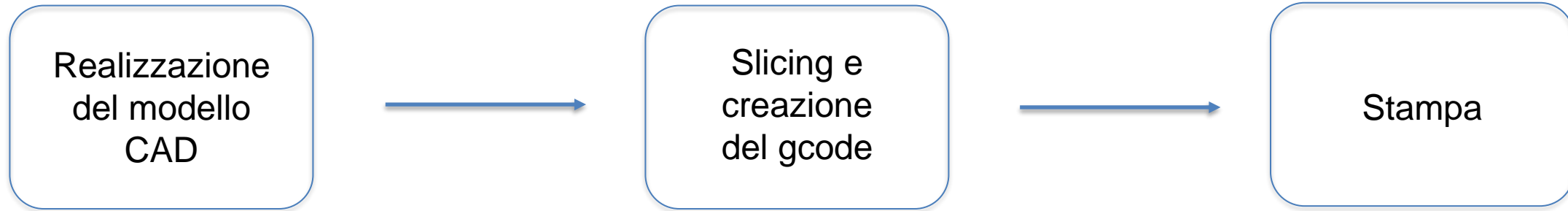
Infill 10%

Infill 15%

Infill 20%



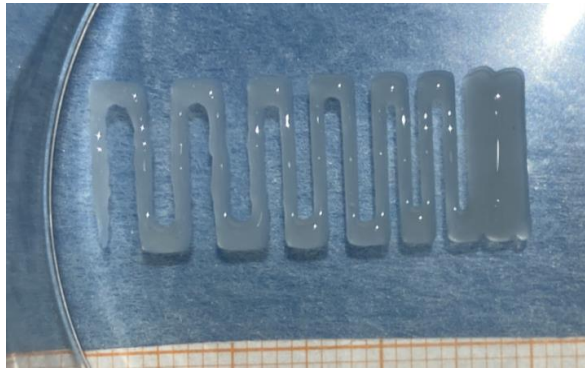
- **Valutazione fedeltà di forma:**
 - Indice di stampabilità



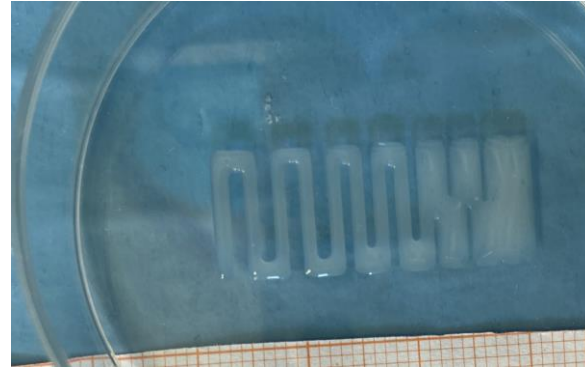
Ottimizzazione parametri di stampa

Metodo proposto da Paxton et al.*: stampa di una serpentina variando la velocità. Fissata la velocità ottimale, si fa variare la pressione

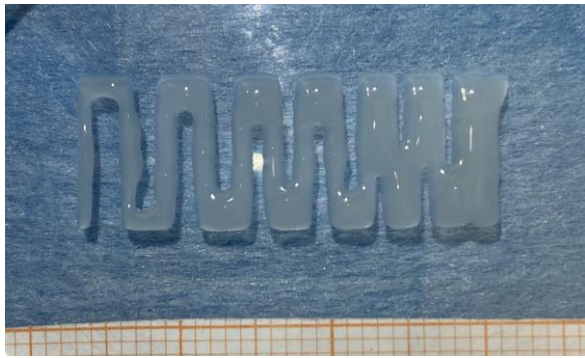
Esempio:



1000 mm/min ✓



600 mm/min



800 mm/min



400 mm/min



12 kPa



8 kPa ✓

*Paxton N, Smolan W, Böck T, Melchels F, Groll J, Jungst T. Proposal to assess printability of bioinks for extrusion-based bioprinting and evaluation of rheological properties governing bioprintability. Biofabrication. 2017

Ottimizzazione parametri di stampa: risultati

T1 (7 giorni)

T2 (14 giorni)

ALG10-SF 1h

1000 mm/min
8 kPa
12 kPa



ALG10-SF 2h

600 mm/min
20 kPa
30 kPa

600 mm/min
20 kPa
30 kPa

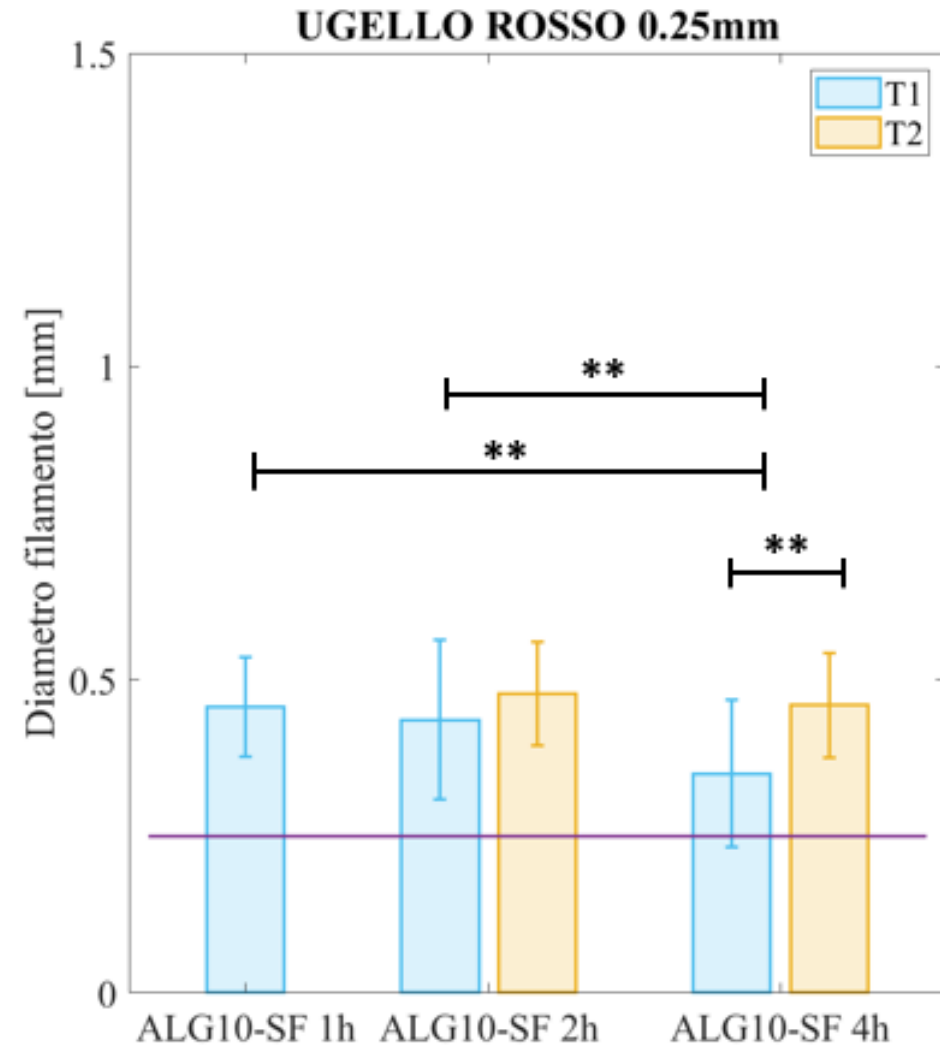
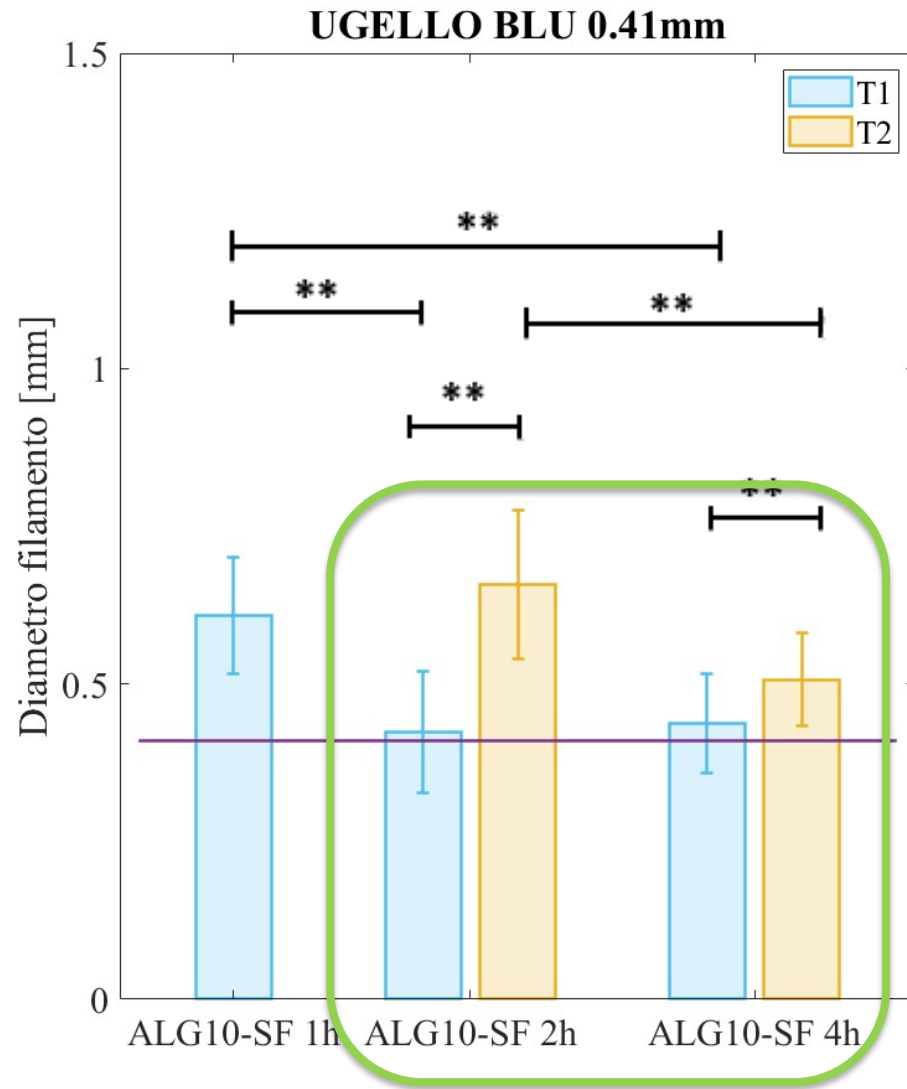
ALG10-SF 4h

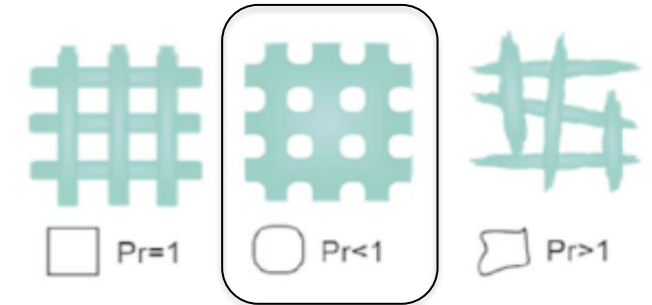
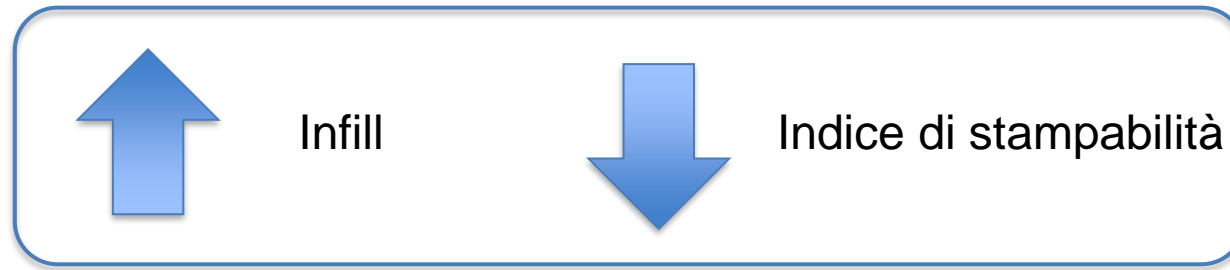
600 mm/min
20 kPa
35 kPa

600 mm/min
20 kPa
35 kPa

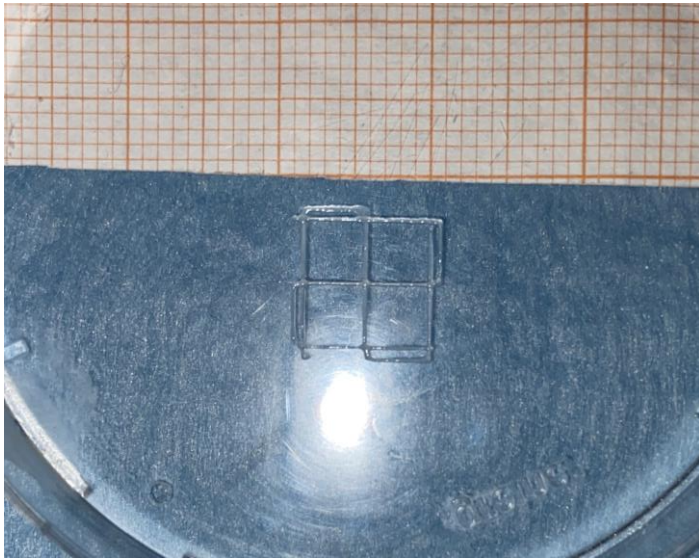
Valutazione fedeltà di forma: risultati

** = p -value < 0.01

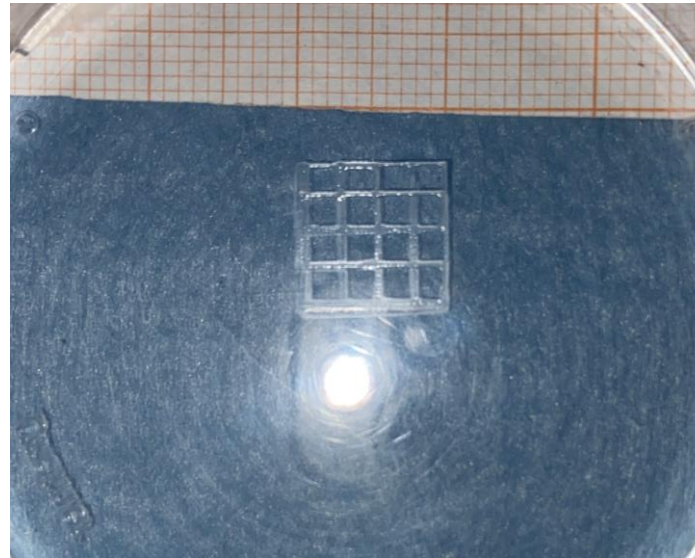




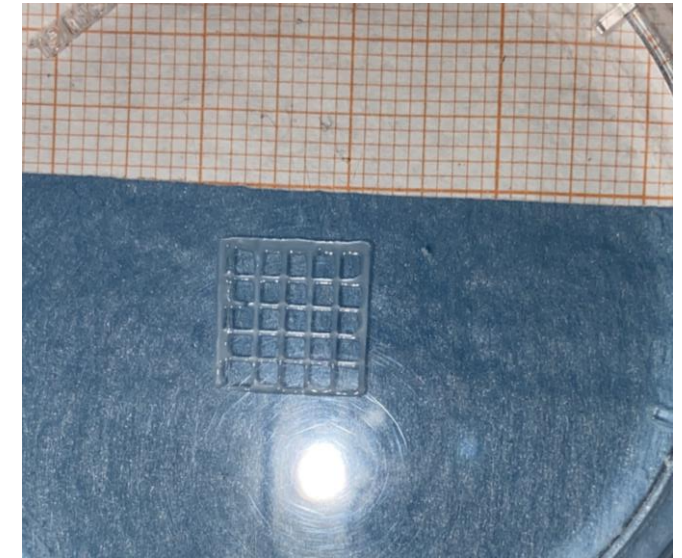
Esempio:



Infill 10%

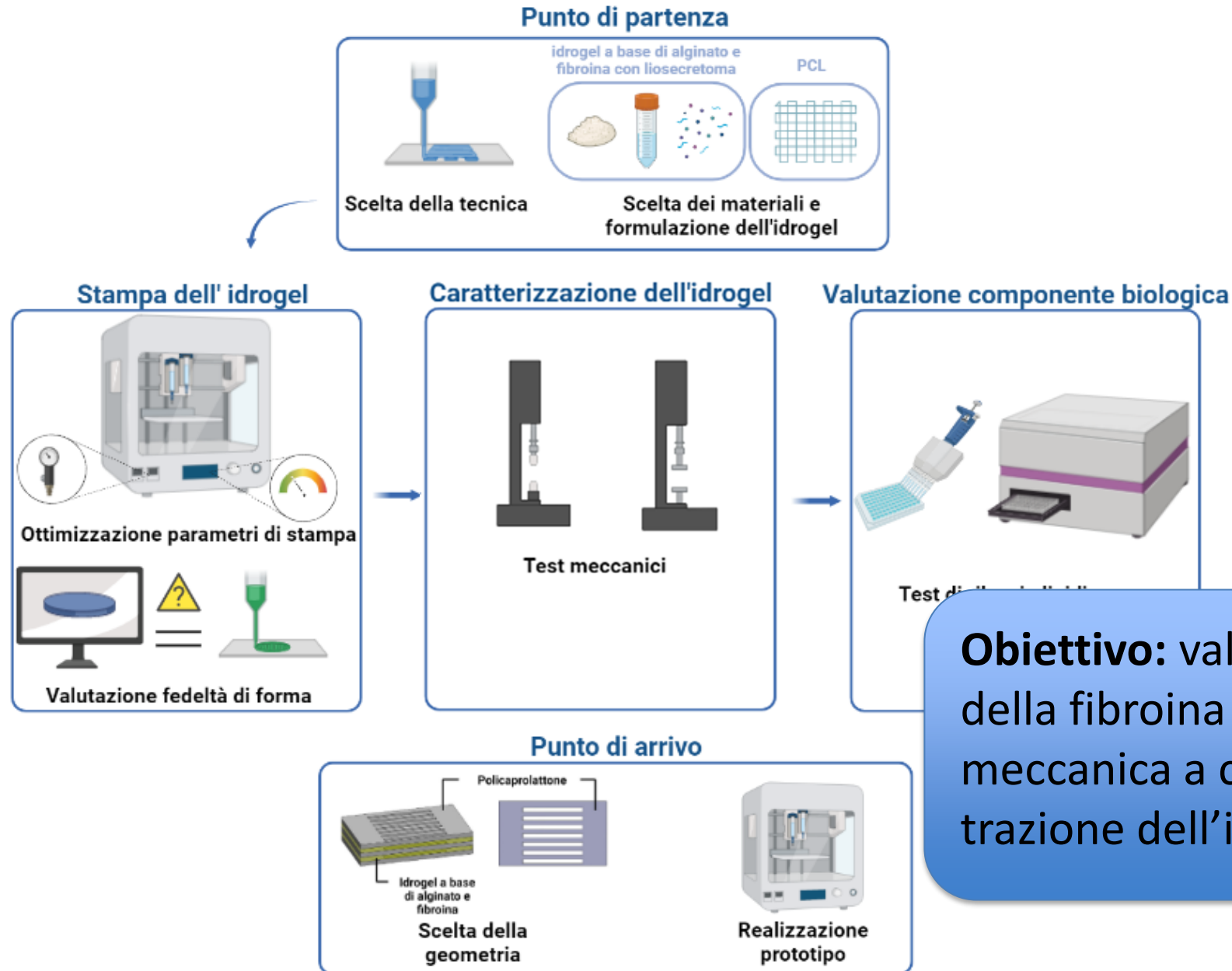


Infill 15%



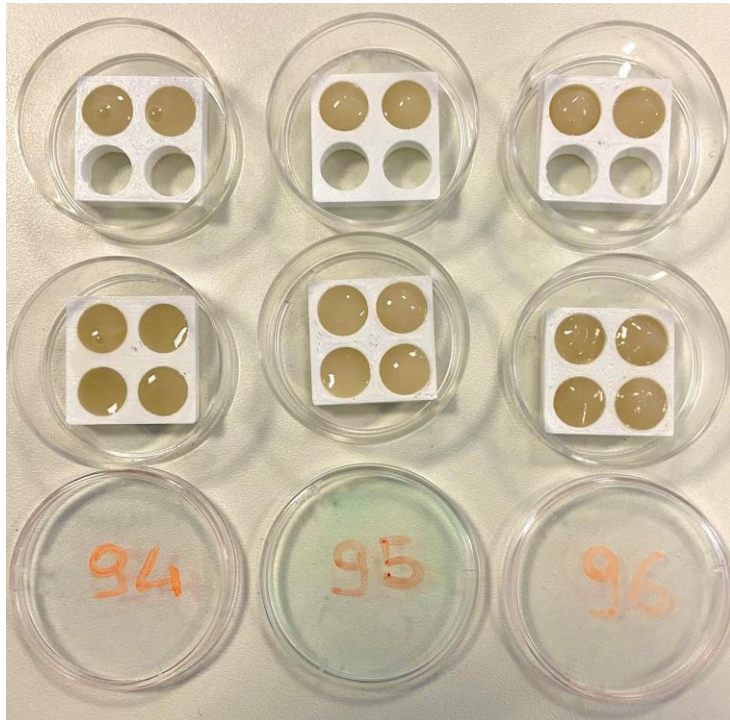
Infill 20%

$$1 > Pr_{\text{infill}10\%} > Pr_{\text{infill}15\%} > Pr_{\text{infill}20\%}$$



Obiettivo: valutare l'influenza della fibroina nella risposta meccanica a compressione e a trazione dell'idrogel

Caratterizzazione meccanica: test a compressione

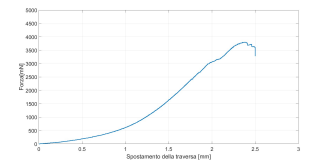
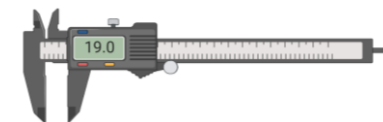


Preparazione dei campioni



Configurazione della macchina prima di iniziare la prova

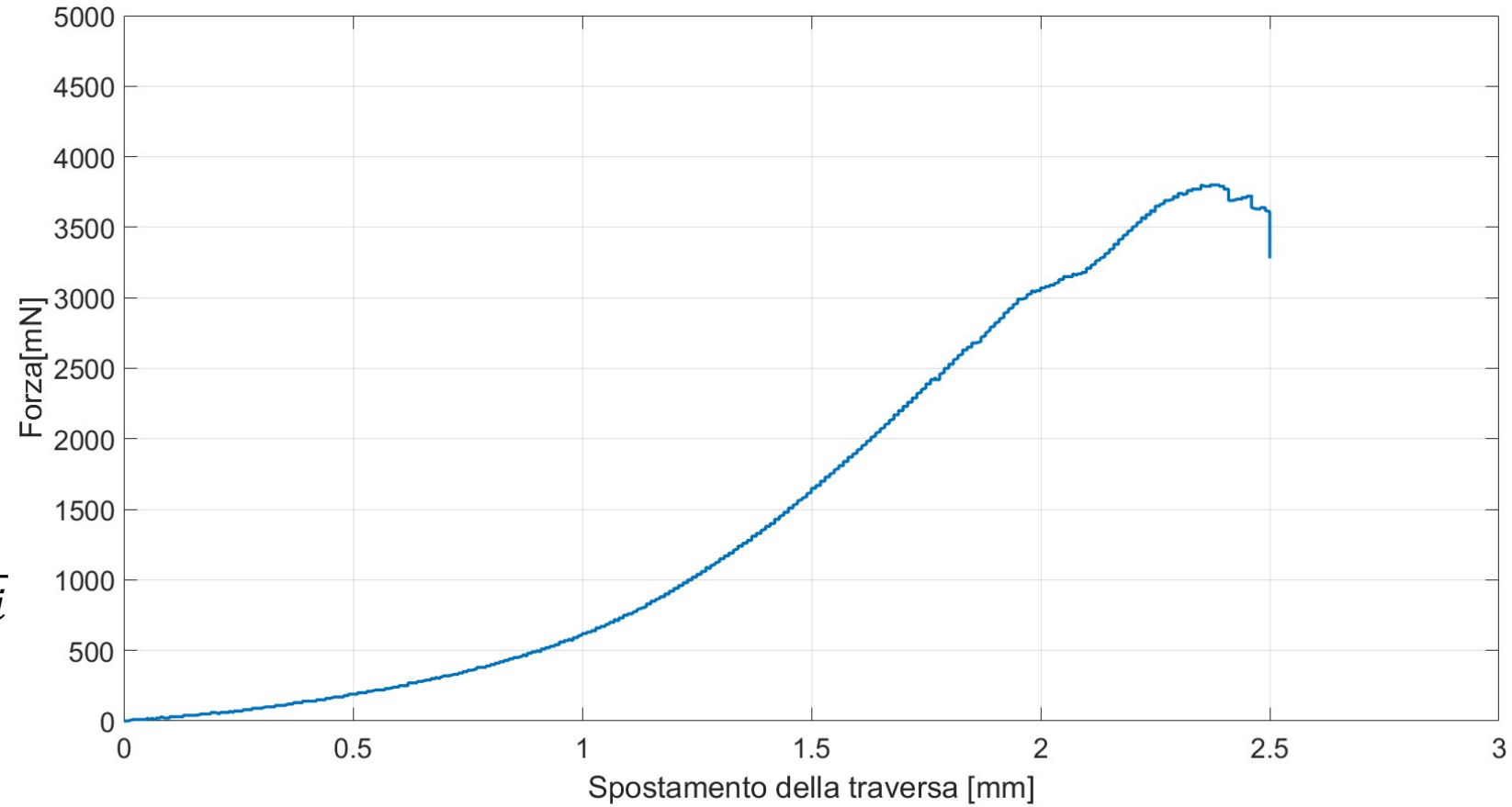
- Campioni cilindrici con diametro 8 mm
- Test ripetuti a **diversi time point**
- Gruppi di campioni:
 - idrogel con fibroina sgommato 1 h
 - idrogel con fibroina sgommato 2 h
 - idrogel con fibroina sgommato 4 h
- Gruppo di controllo:
 - idrogel di solo alginato



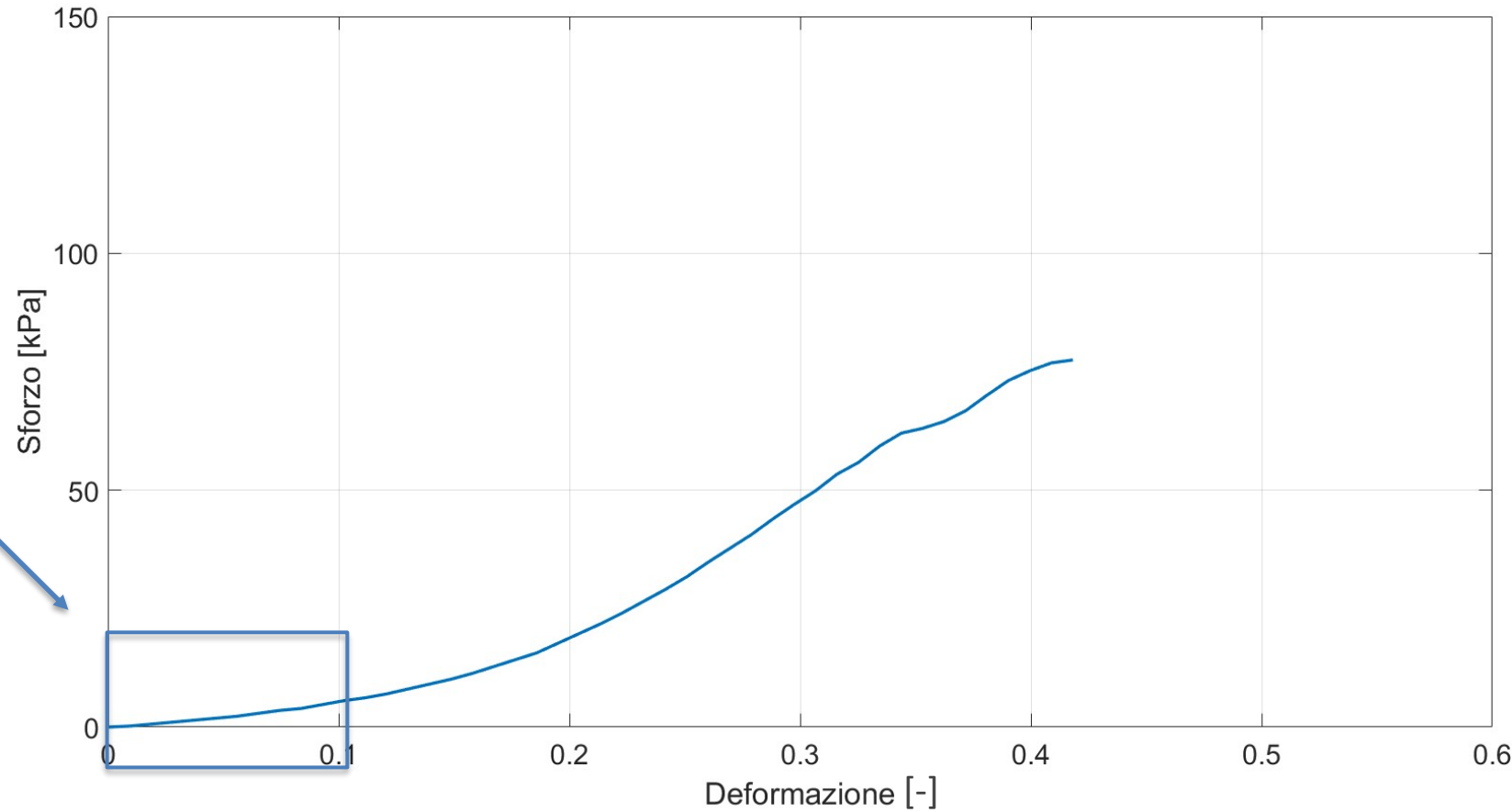
Caratterizzazione meccanica: elaborazione delle curve

$$Sforzo = \frac{Forza}{Area}$$

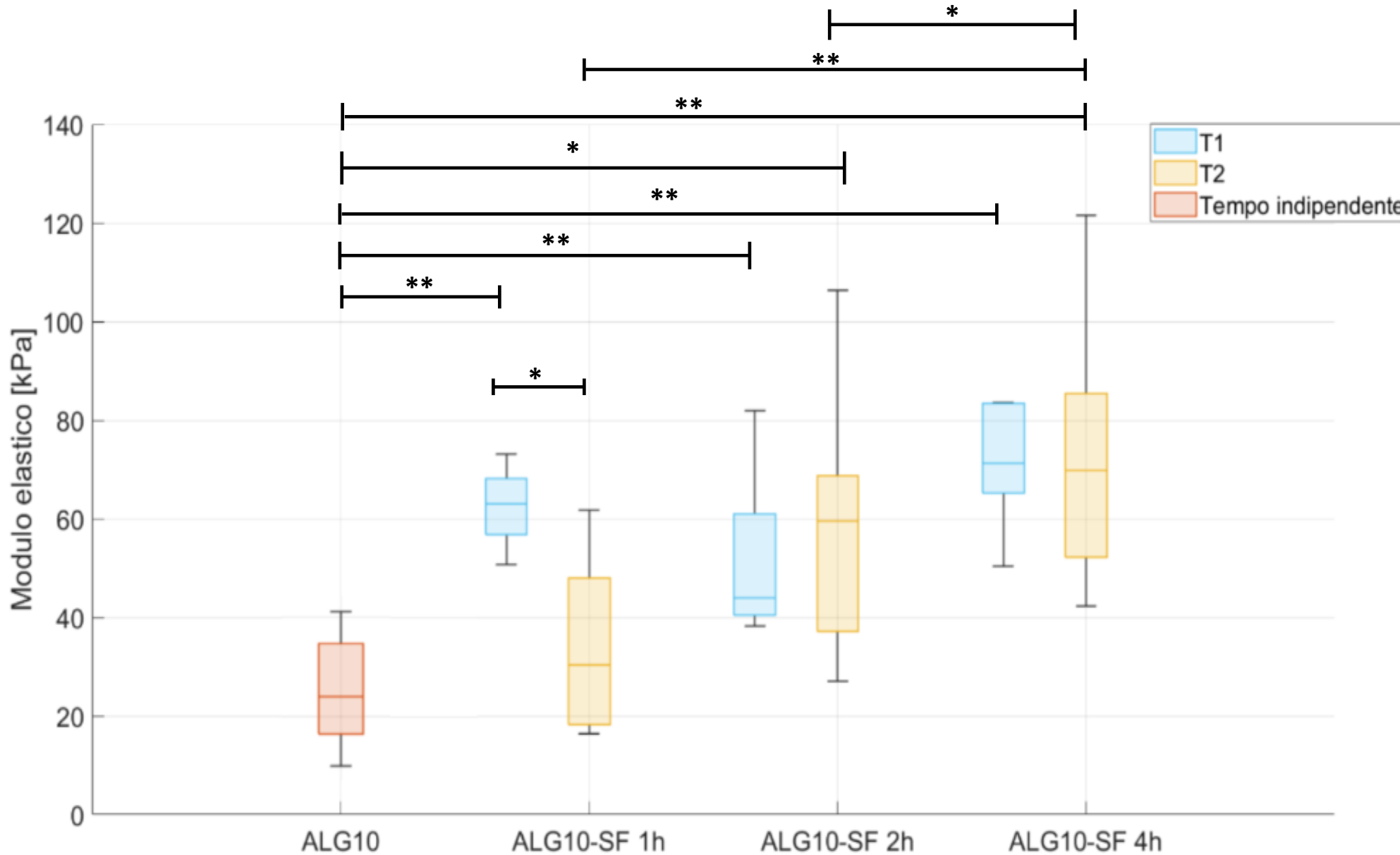
$$Deformazione = \frac{Spostamento\ traversa}{Separazione\ tra\ i\ piatti}$$



Modulo a compressione
ricavato come pendenza della
curva sforzo-deformazione



Test a compressione: risultati



* = p -value < 0.05

** = p -value < 0.01

N. campioni = 8

La fibroina agisce sulla risposta a compressione dell'idrogel aumentandone il modulo a compressione

Caratterizzazione meccanica: test a trazione

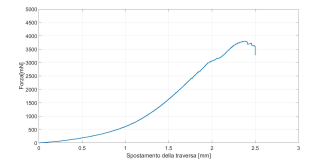
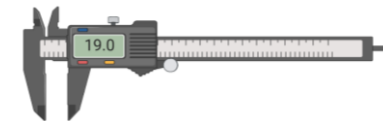


Stampo dove viene colato l'idrogel per realizzare i campioni



Configurazione della macchina prima di iniziare la prova

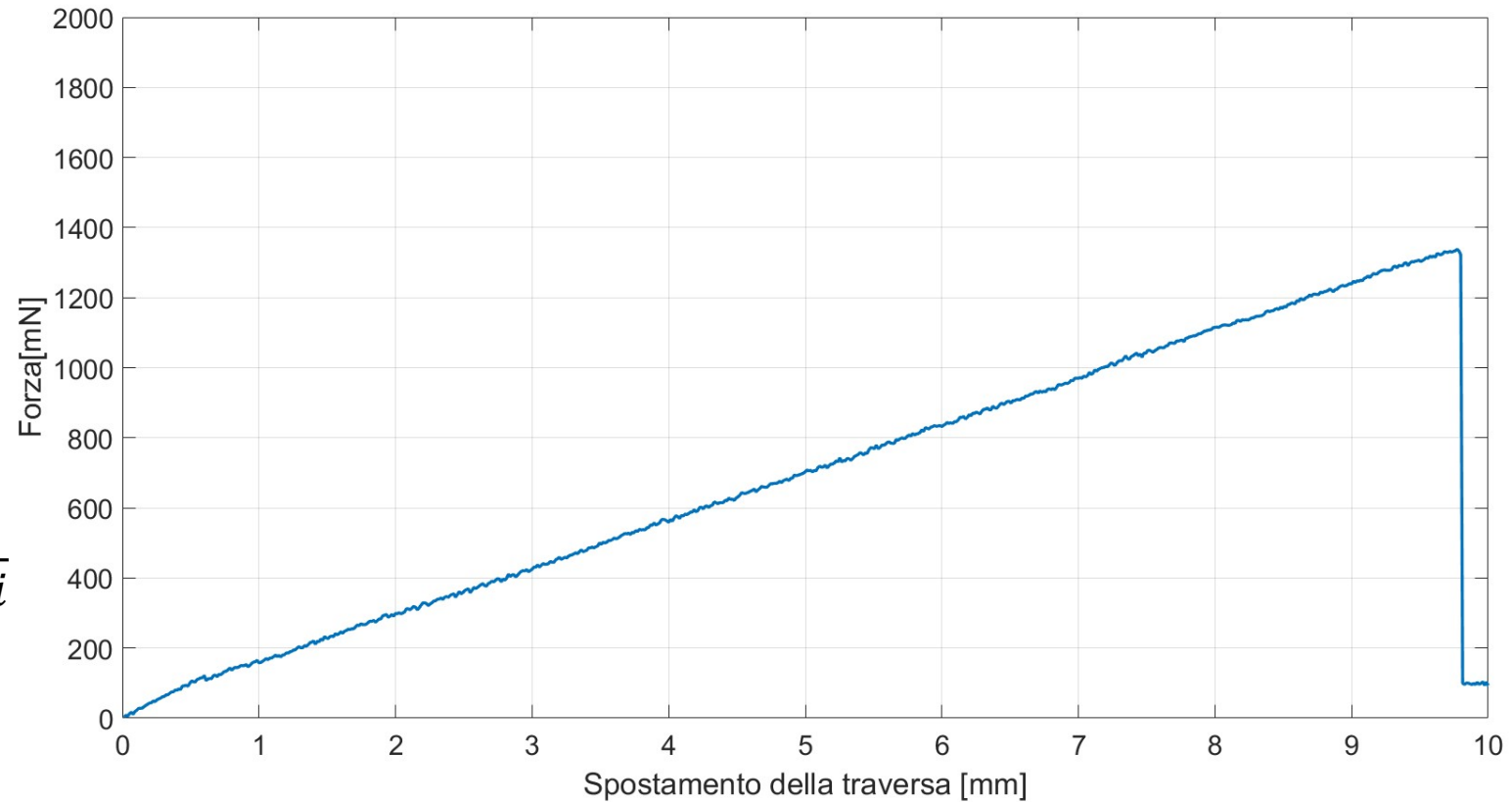
- Campioni ad osso di cane (standard ASTM F29000)
- Test ripetuti a **diversi time point**
- Gruppi di campioni:
 - idrogel con fibroina sgommato 1 h
 - idrogel con fibroina sgommato 2 h
 - idrogel con fibroina sgommato 4 h
- Gruppo di controllo:
 - idrogel di solo alginato



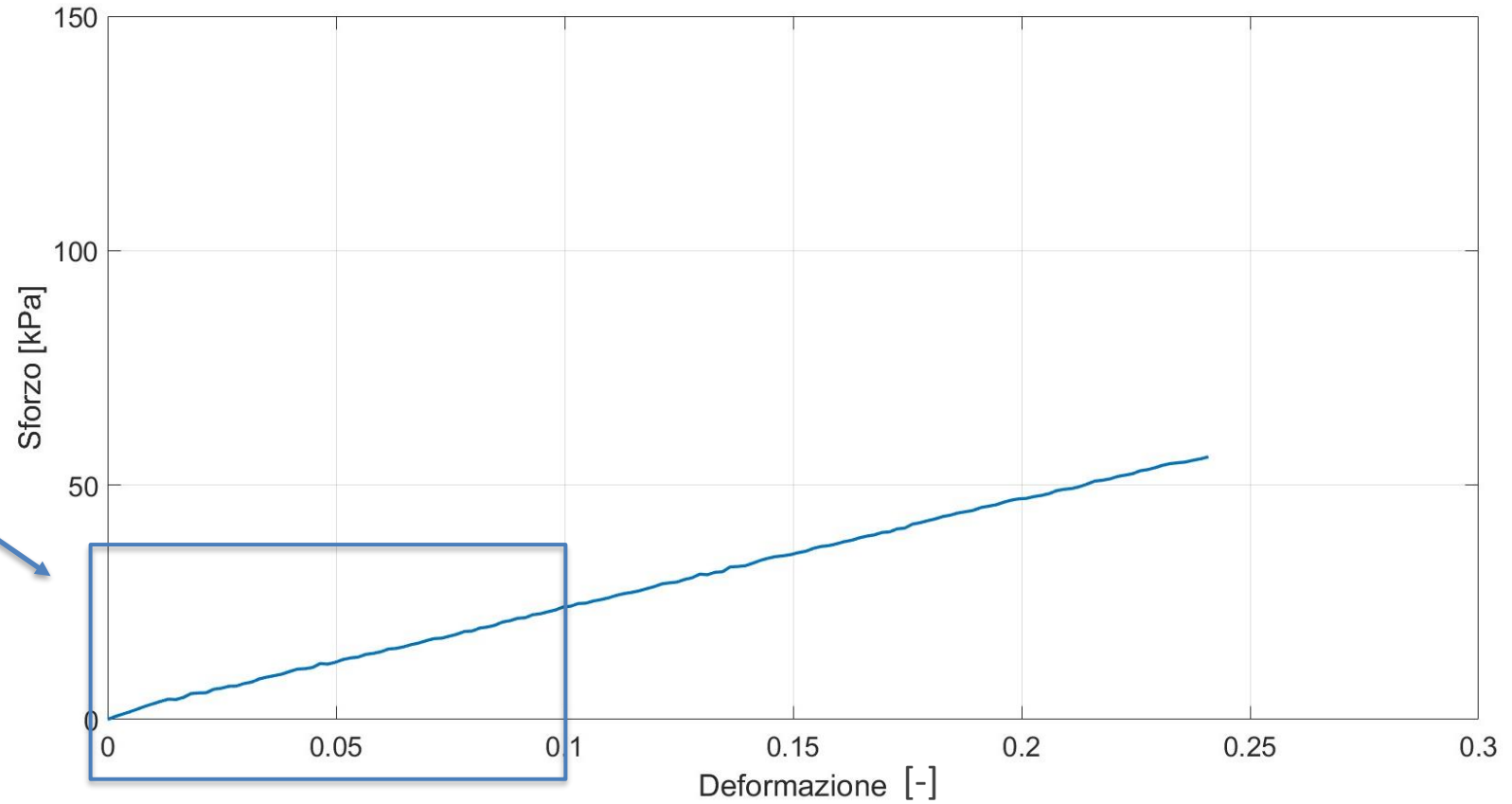
Caratterizzazione meccanica: elaborazione delle curve

$$Sforzo = \frac{Forza}{Area}$$

$$Deformazione = \frac{Spostamento\ traversa}{Separazione\ tra\ afferraggi}$$

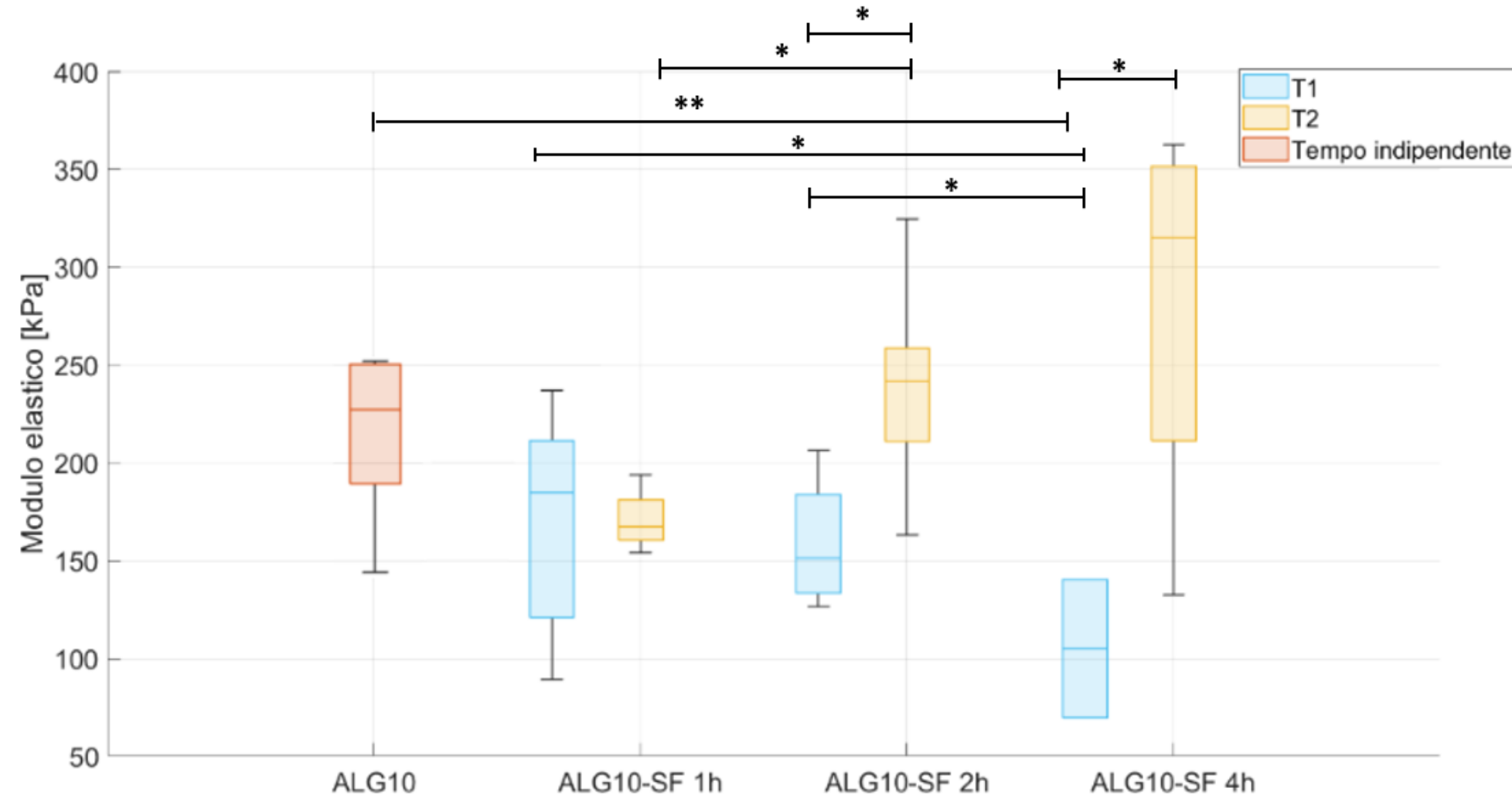


Modulo a trazione ricavato
come pendenza della curva
sforzo-deformazione



Test a trazione: risultati

* = p -value < 0.05
** = p -value < 0.01

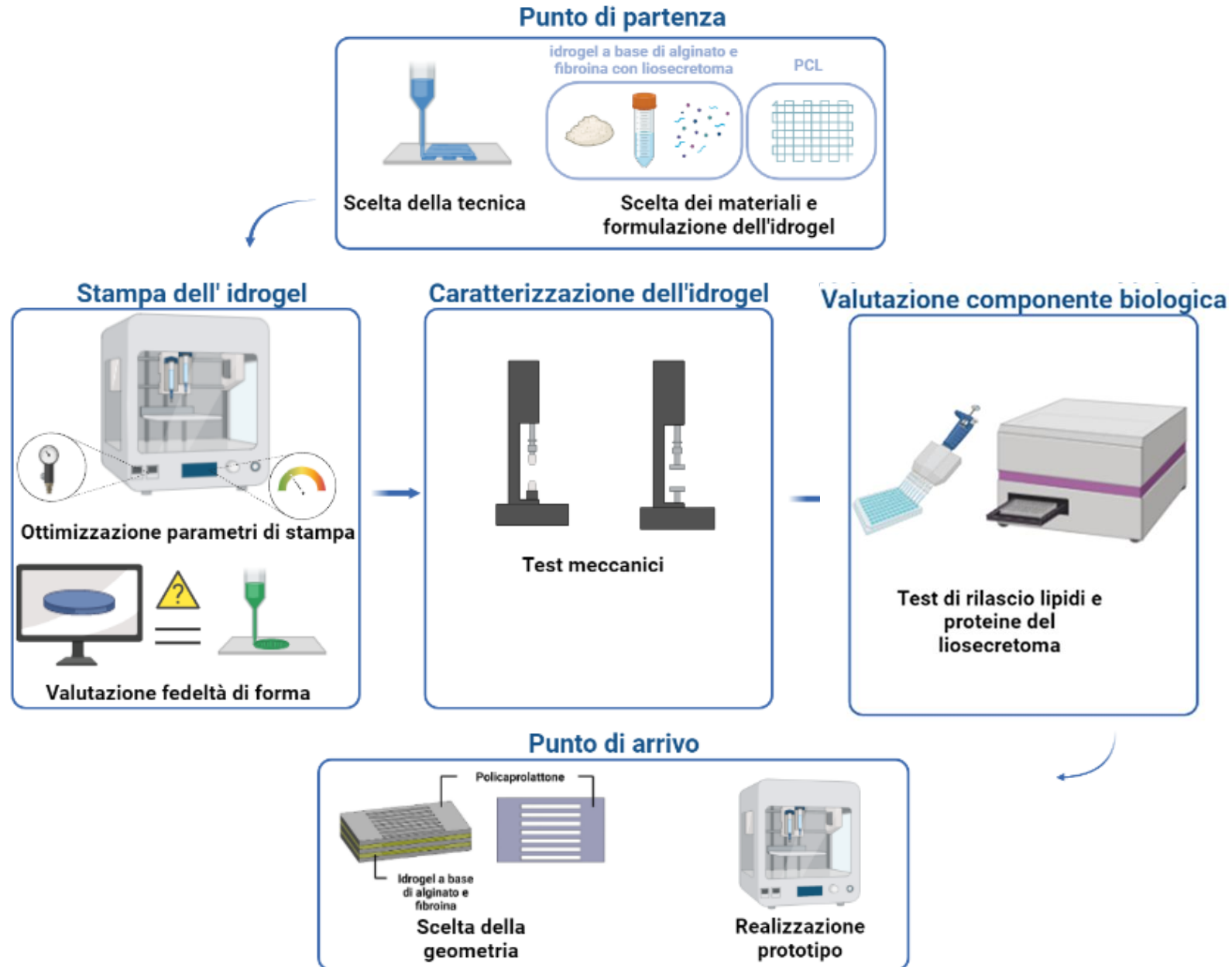


2 < N. campioni < 6

La fibroina **NON**
aumenta la risposta
a trazione dell'idrogel

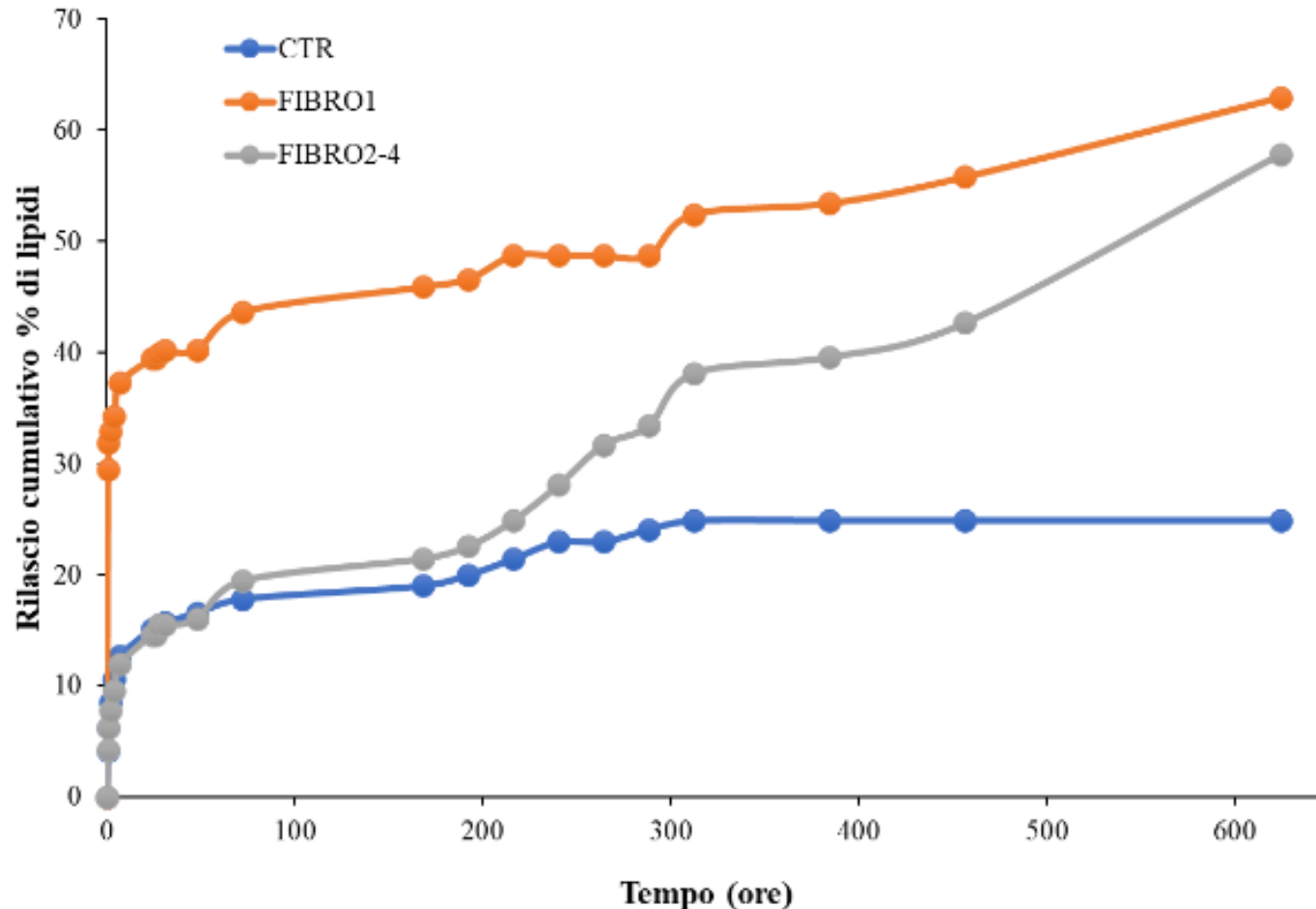


Causa: influenza del
reticolante

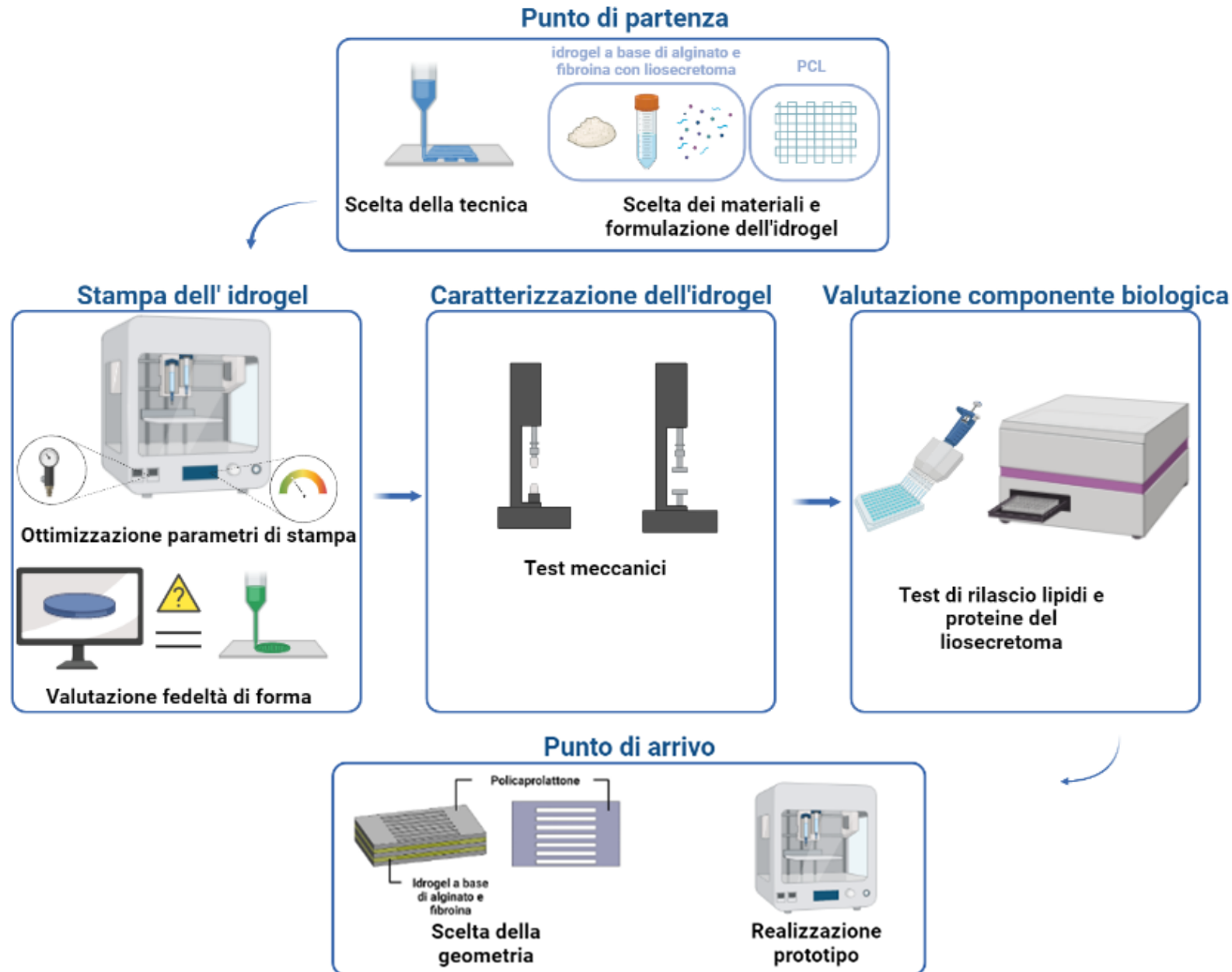


Studio della componente biologica

Condotto dalla professoressa Torre e Elia Bari del Dipartimento di Scienze del Farmaco dell'Università del Piemonte Orientale e Sara Perteghella del Dipartimento di Scienze del Farmaco dell'Università di Pavia



- Il lotto con fibroina sgommata 1 h è quello che presenta il rilascio più rapido
- I lotti con fibroina sgommata 2 h e 4 h non presentano differenze significative nella velocità di rilascio
- Il lotto con solo alginato è quello che rilascia meno velocemente

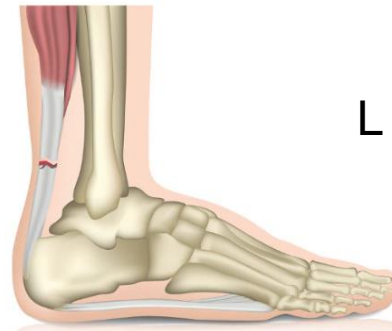
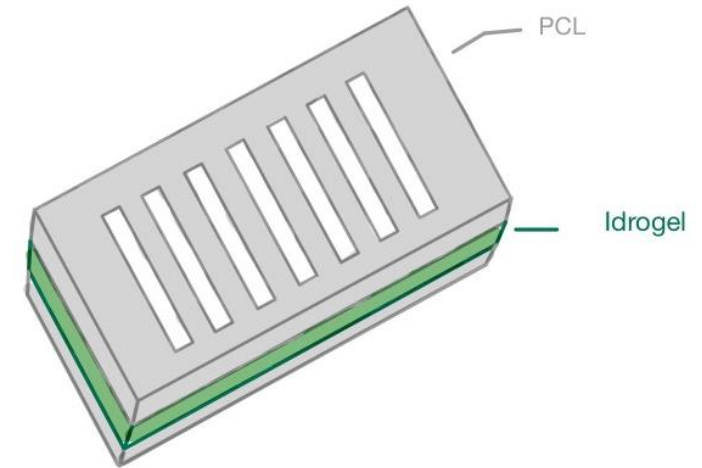


Requisiti geometria:

- Anisotropia
- Resistenza meccanica

Scelta della geometria*:

- Geometria multistrato → alternanza di layer di PCL con layer di alginato (garantisce migliori proprietà meccaniche)
- Cavità parallele in ogni layer che garantiscono anisotropia



L = 55 mm



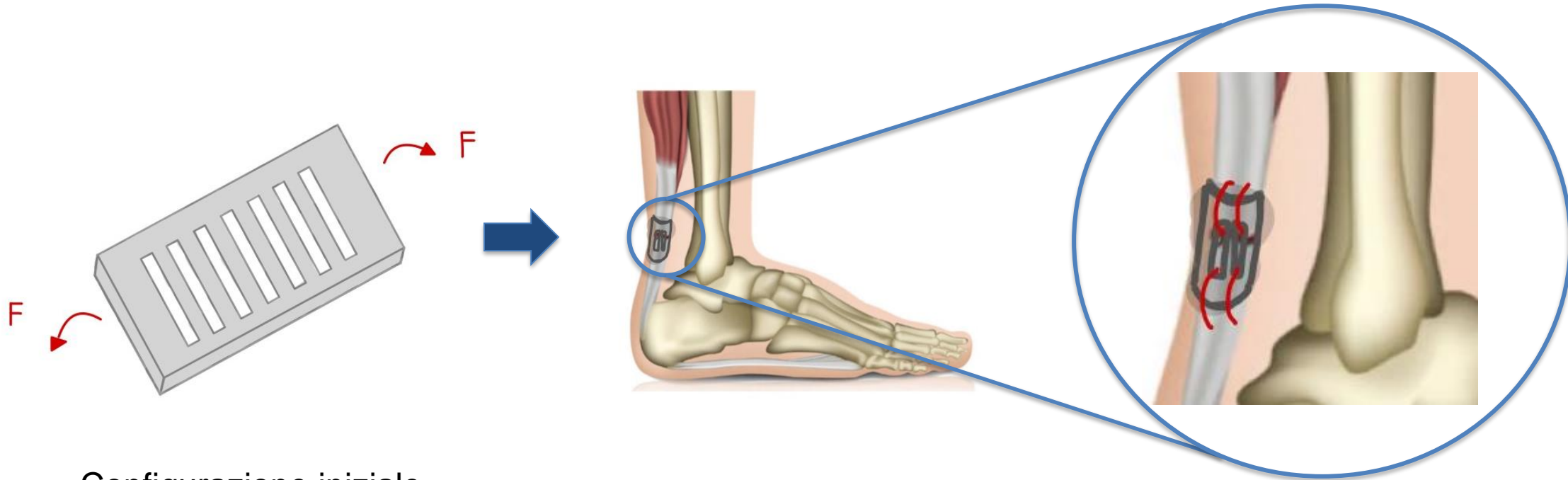
30 x 40 mm

Scelta delle dimensioni

Tendine di riferimento: Tendine d'Achille

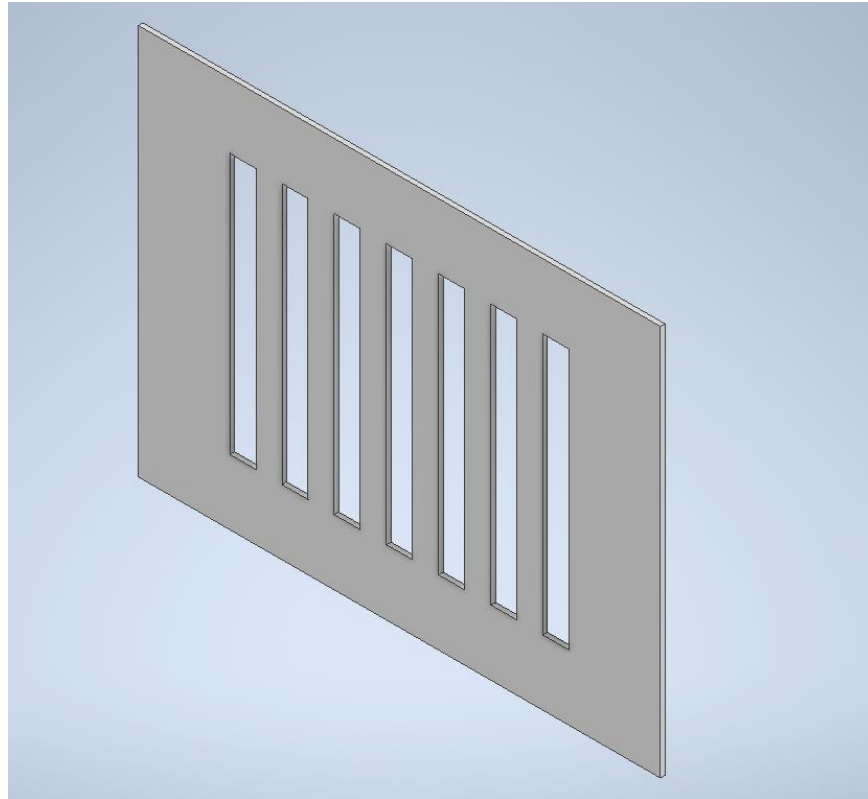
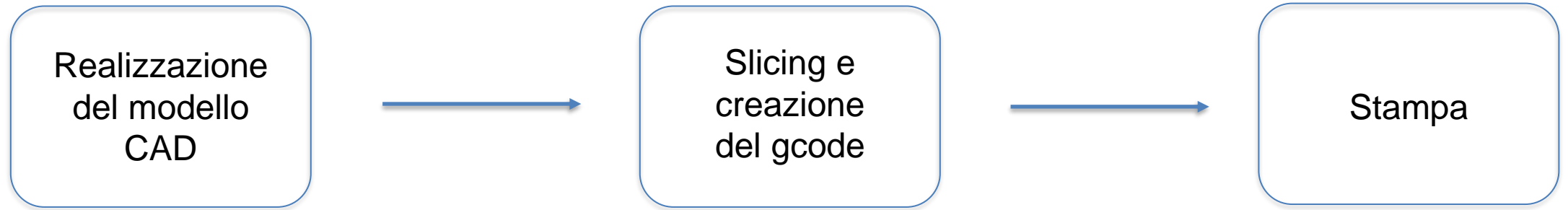
* Xiping Jiang, Shaohua Wu, Mitchell Kuss, Yunfan Kong, Wen Shi, Philipp N. Streubel, Tieshi Li, Bin Duan, 3D printing of multilayered scaffolds for rotator cuff tendon regeneration, Bioactive Materials, Volume 5, Issue 3, 2020.

Progettazione scaffold tendineo: posizionamento



Configurazione iniziale

Vengono applicate delle **forze** per flettere la struttura in maniera tale che vada ad abbracciare il tendine lesionato, al quale viene ancorata tramite dei fili di sutura



Realizzazione del singolo layer



Assemblaggio dei vari layer nella fase di slicing

Realizzazione
del modello
CAD



Slicing e
creazione
del gcode

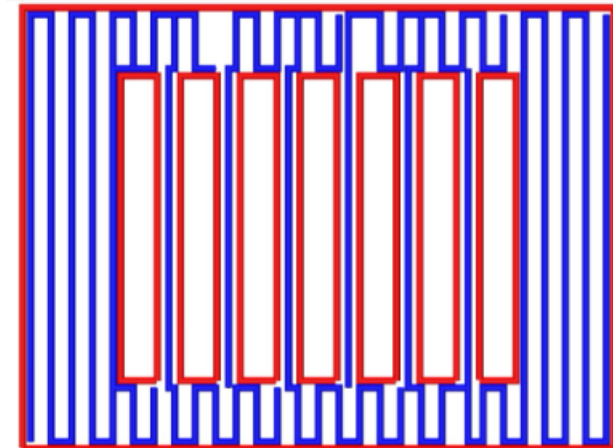
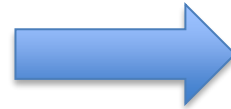


Stampa

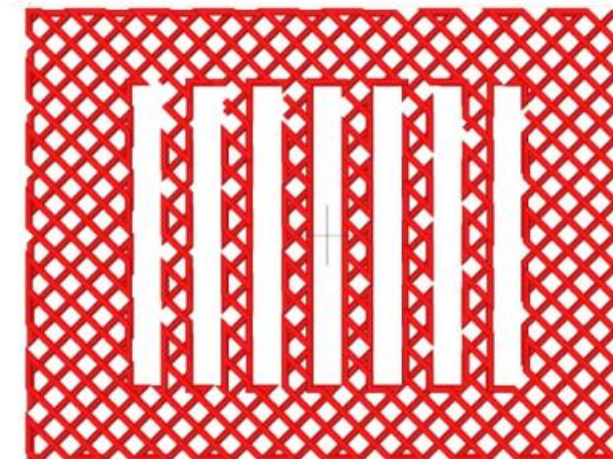
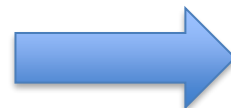
Non è possibile stampare un layer di
PCL sopra un layer di idrogel



È necessario **creare un perimetro di
PCL** intorno all'idrogel



Il layer di PCL deve garantire il
contenimento dell'idrogel per evitare
che questo vada a colare



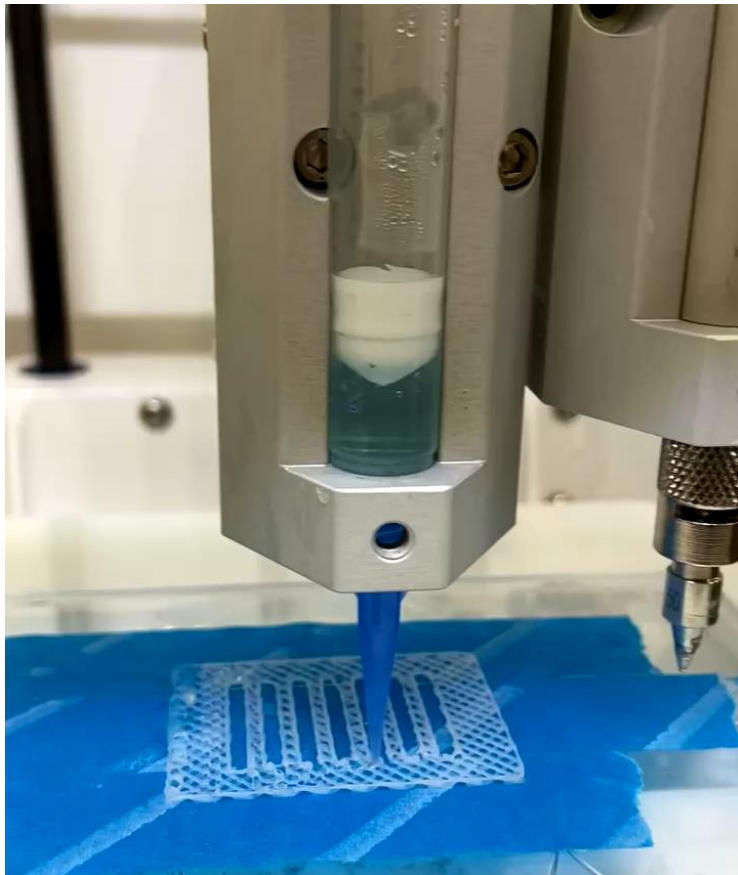
Realizzazione
del modello
CAD



Slicing e
creazione
del gcode

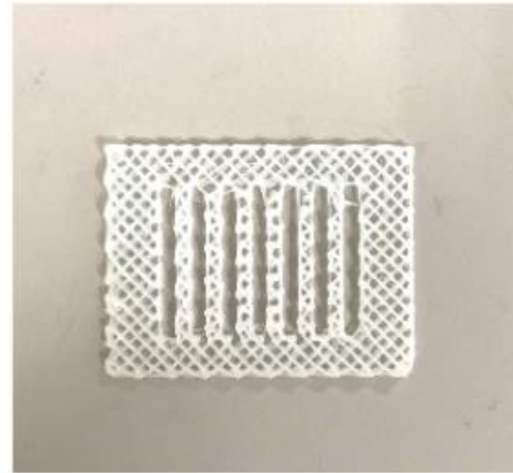


Stampa



Processo di stampa

A)

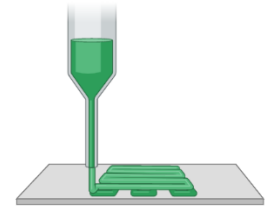


B)

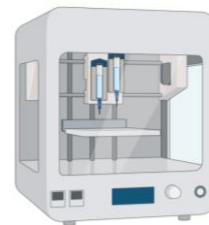


- A) Struttura appena rimossa dal piatto di stampa
- B) Struttura ancorata ad un supporto che mima il Tendine d'Achille

- Si è riusciti a **formulare e caratterizzare un bioinchiostro** per l'ingegneria tessutale tendinea
- **Migliore stampabilità:** lotti con sgommatura 2 e 4 h stampati con ugello da 0.41 mm
- **Proprietà meccaniche** dell'idrogel non paragonabili a quelle del tendine reale → PCL
- Velocità di **rilascio** del liosecretoma in linea con quella ottenuta con l'idrogel di solo alginato, ottenendo però un rilascio cumulativo totale di lipidi maggiore
- **Formulazione dell'idrogel** scelta in base alla stampabilità e influenza sul rilascio del liosecretoma



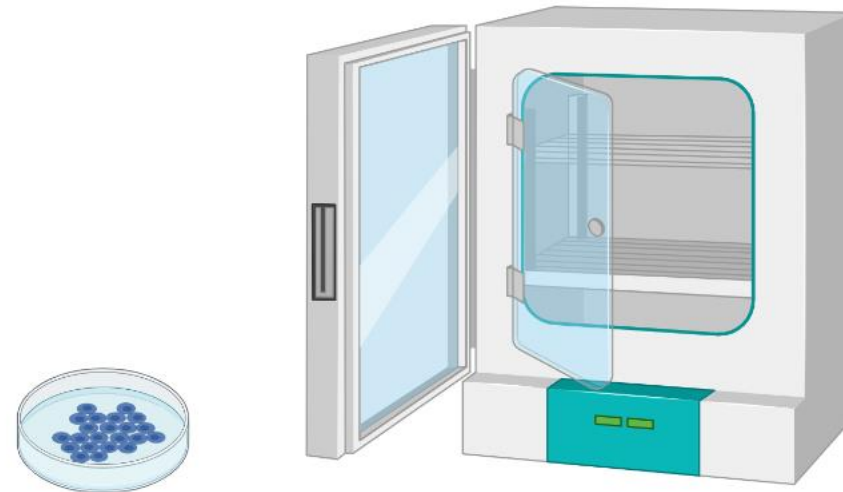
PCL



- Ottimizzazione della geometria

The logo for SIMULIA ABAQUS, featuring a stylized 'S' symbol followed by the word 'SIMULIA' in a smaller font and 'ABAQUS' in a larger, bold font, all in a teal color.

- Caratterizzazione biologica



Grazie per l'attenzione