



Università degli Studi di Pavia
Facoltà di Ingegneria
Dipartimento di Ingegneria Civile e Architettura
Laurea Magistrale in Bioingegneria delle cellule e dei tessuti

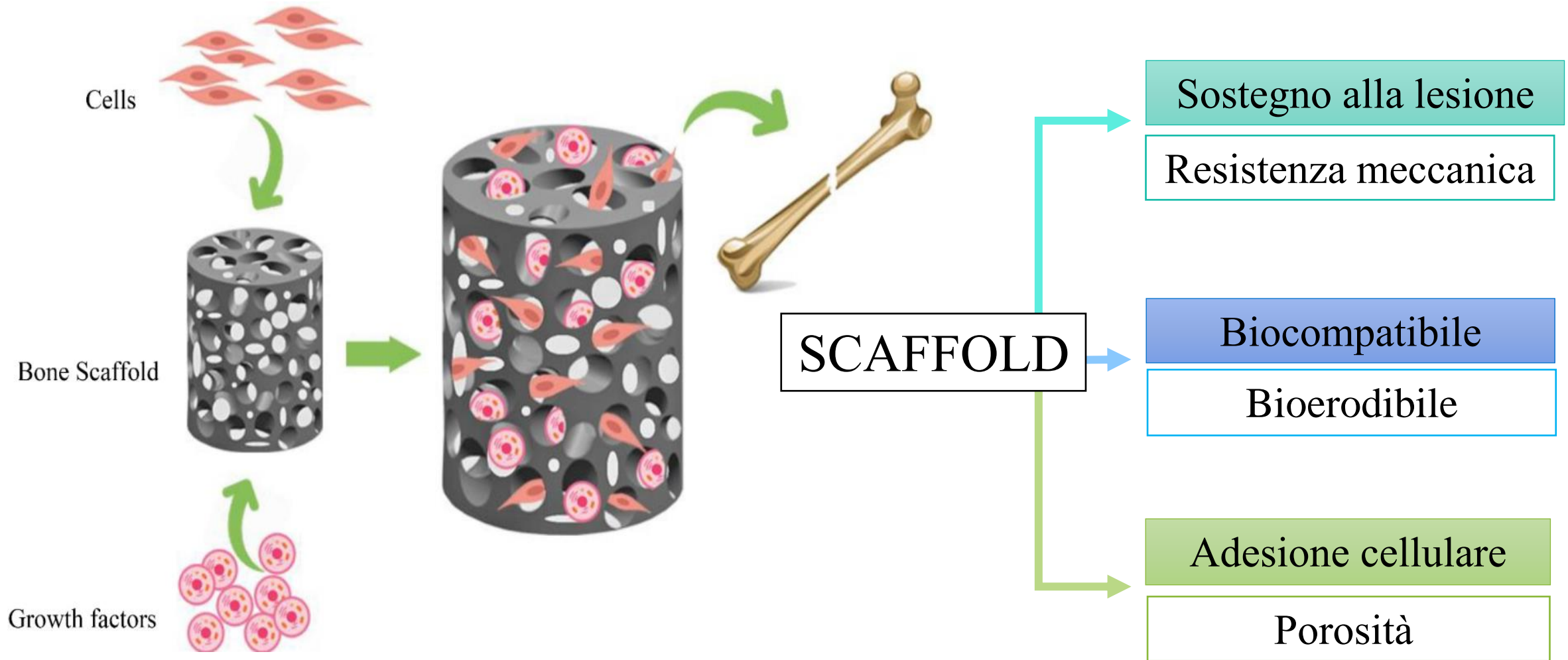
CARATTERIZZAZIONE MECCANICA E BIOLOGICA DI SCAFFOLD STAMPATI IN 3D CARICATI CON LIOSECRETOMA

Relatore: Prof.re Michele Conti

Co-relatore: Eng. Franca Scocozza

Candidato: Martina Iaquina

SCAFFOLD PER L'INGEGNERIA DEL TESSUTO OSSEO

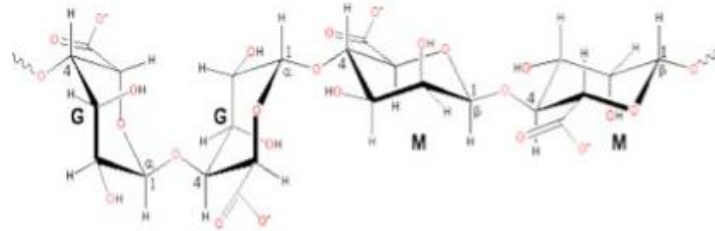


MATERIALI BIOCOMPATIBILI

Polimeri naturali:

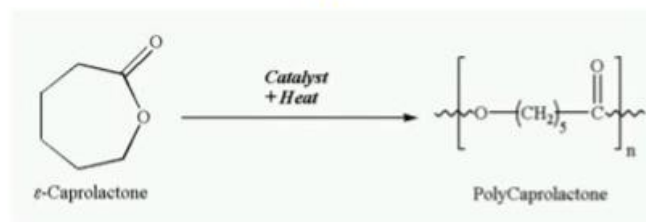
collagene, fibroina di seta, chitosano, alginato e acido ialuronico

Alginato



Polimeri sintetici: PLA, PCL, PGA, PLGA

PCL



METODO DI FABBRICAZIONE

MODELLO
CAD

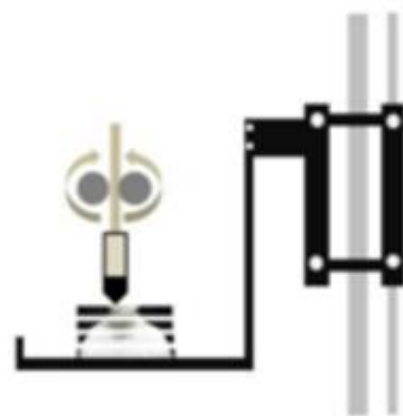
OGGETTO
3D



**3D CAD
Model**



**Printable
File (e.g. STL)**



**AM
Process**



**Physical
3D Object**

LIMITAZIONE DELLO SCAFFOLD



Il materiale termoplastico stampato in 3D ha scarsa bioattività

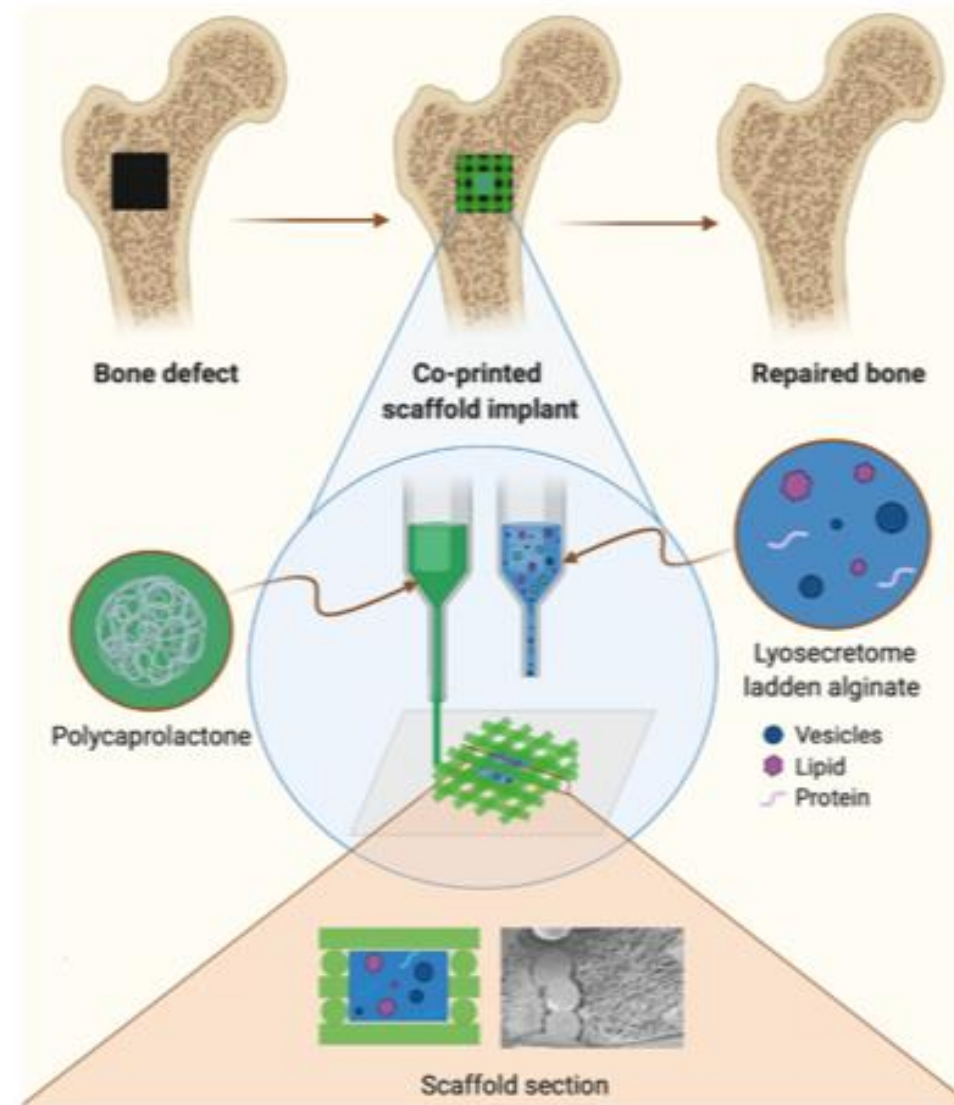
Incorporare sostanze bioattive, come il liosecretoma, per migliorare l'interazione tra lo scaffold e il tessuto

STUDIO PRELIMINARE

Bari et al. (2021)

Arricchimento dello scaffold in PCL con liosecretoma per:

- Promuovere la proliferazione e l'osteinduzione cellulare
- Studiare la cinetica di rilascio della sostanza bioattiva



Ringraziamenti: E. Bari, M. Sorlini, S. Perteghella, M. L. Torre (Dip. Scienze del Farmaco UniPV)
F. Scocozza, F. Auricchio, M. Conti (Dicar UniPV)

OBIETTIVO DEL LAVORO

Procedere con la caratterizzazione biologica in vitro e meccanica di scaffold in PCL stampati in 3D caricati con liosecretoma, in vista dell'applicazione in vivo nell'ambito della rigenerazione del tessuto osseo

ATTIVITÀ

1. Fabbricazione degli scaffold in PCL con inclusioni interne di idrogel di alginato al 10% (p/v) tramite tecnica della co-stampa
2. Caratterizzazione cellulare
3. Caratterizzazione meccanica: test di compressione

ATTIVITÀ

1. Fabbricazione degli scaffold in PCL con inclusioni interne di idrogel di alginato al 10% (p/v) tramite tecnica della co-stampa
2. Caratterizzazione cellulare
3. Caratterizzazione meccanica: test di compressione

Lo scaffold

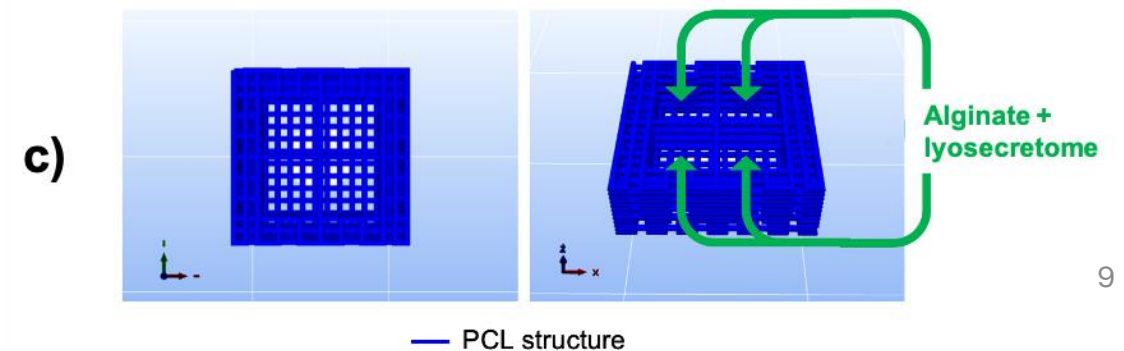
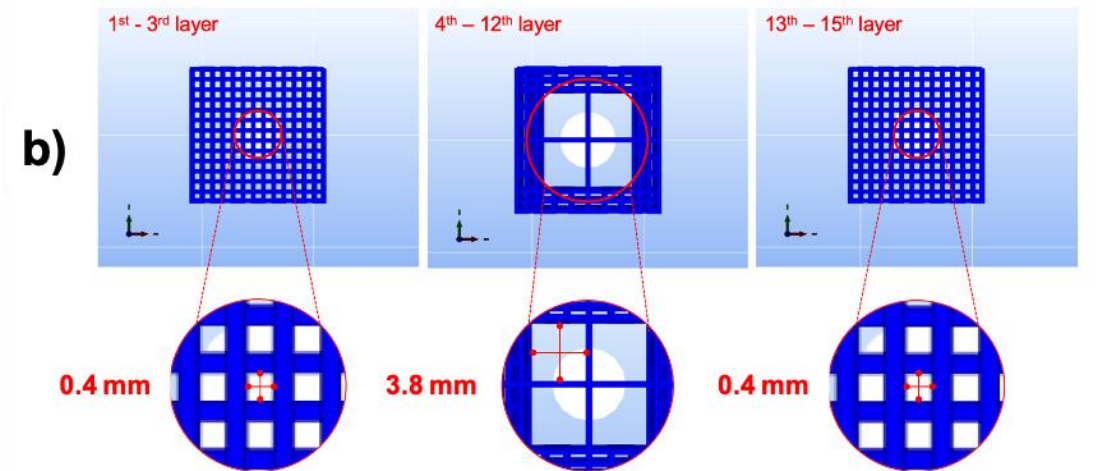
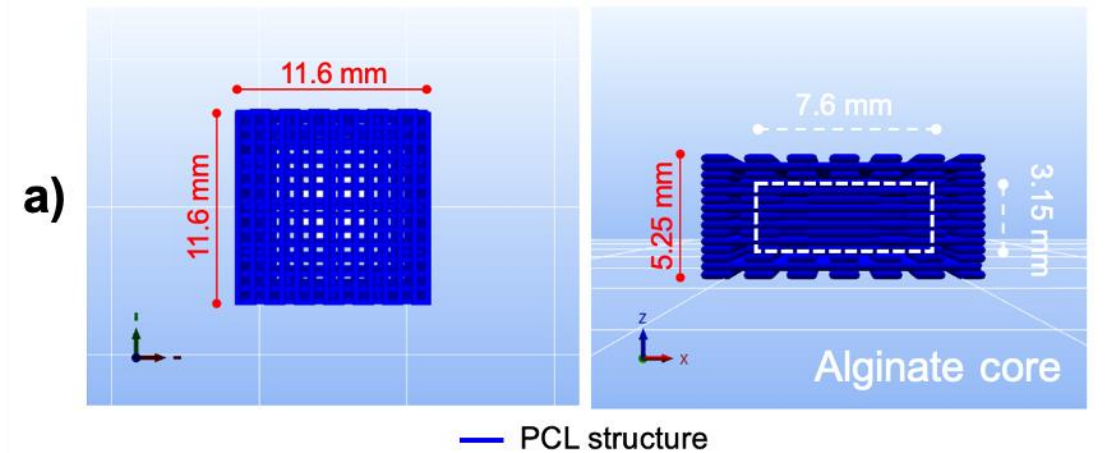
15 layer

Dimensioni:

- 11.6 mm x 11.6 mm
- H: 5.25 mm
- Pozzetti: 3.8 mm x 3.15 mm

Idrogel di alginato per scaffold:

- 200 μ l



CO-STAMPA E SETUP DI STAMPA



CELLINK INKREDIBLE+



PCL

Cartuccia di alluminio

- Sterilizzazione per 30' a 120°
- T: 90° per l'estrusione

Pressioni:

- Primi tre strati: 90 kPa
- Zona centrale: 120 kPa
- Tre strati finali: 145 kPa

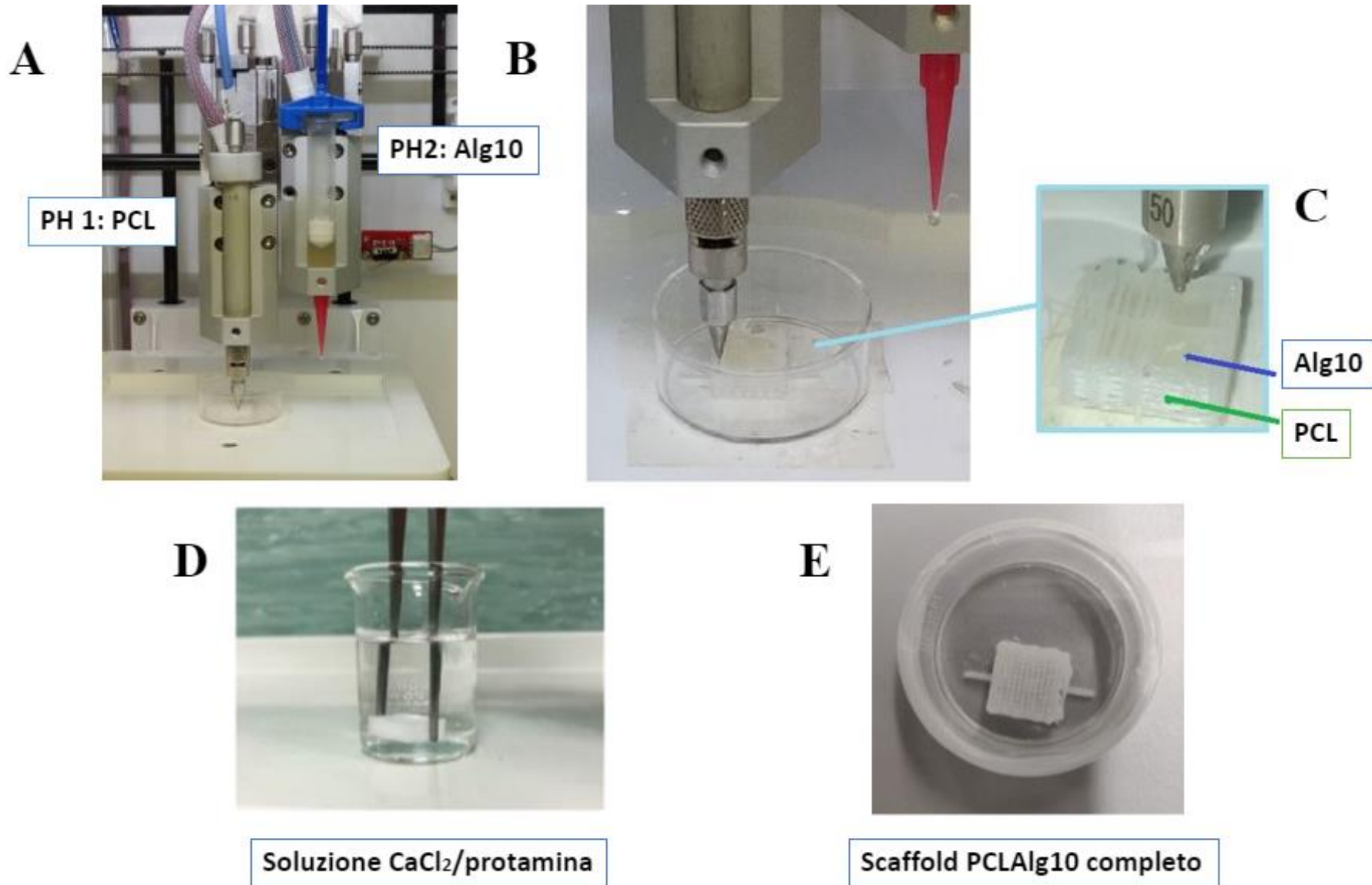
Idrogel di alginato

Cartuccia in plastica

- Sterilizzazione della cartuccia in autoclave

Pressione: 30 kPa

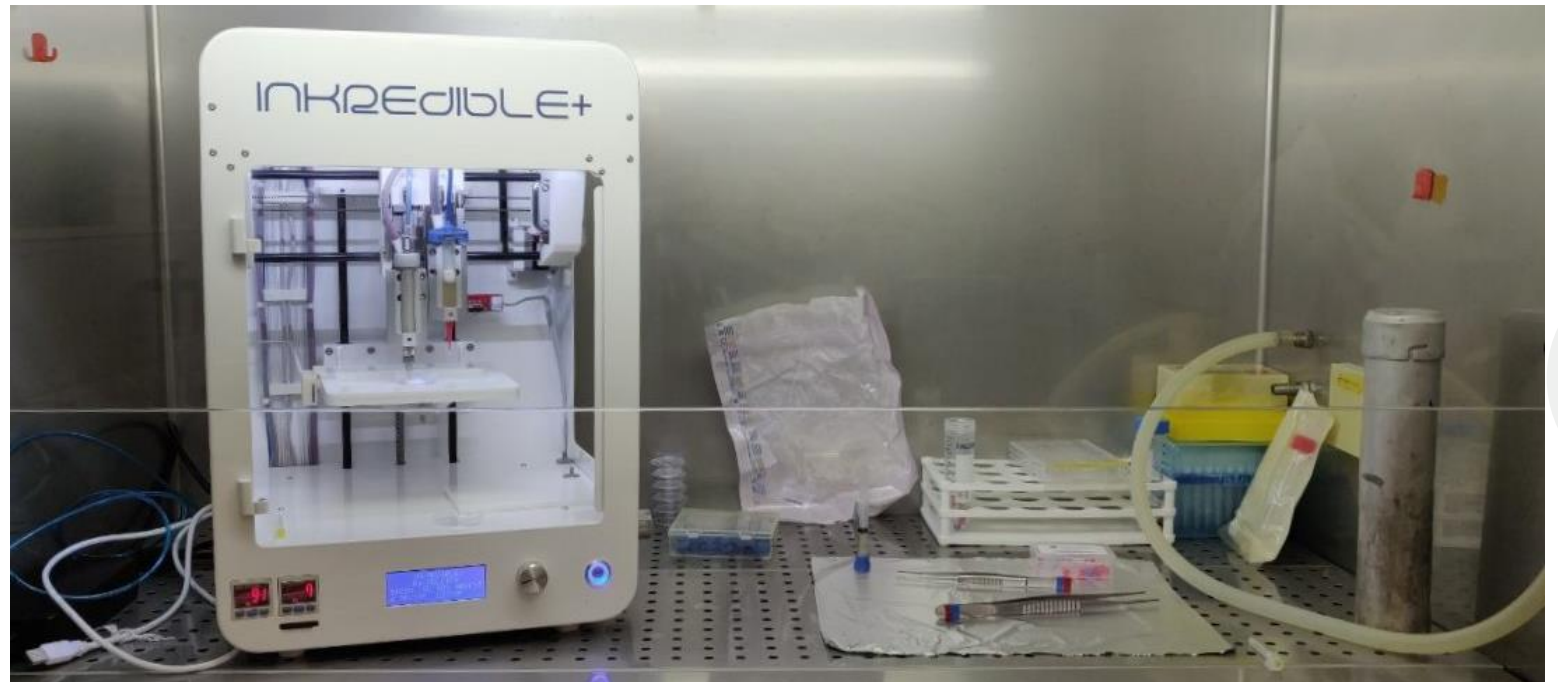
Fasi di stampa



ACCORTEZZE PER LA STERILITÀ

È necessario ridurre al minimo le contaminazioni

1. Procedura di stampa sotto cappa
2. Filtro HEPA H13
3. Pulizia con alcol e sterilizzazione con UV
4. Filtraggio dei reticolanti: CaCl_2 e protamina



ATTIVITÀ

1. Fabbricazione degli scaffold in PCL con inclusioni interne di idrogel di alginato al 10% (p/v) tramite tecnica della co-stampa
2. **Caratterizzazione cellulare**
3. Caratterizzazione meccanica: test di compressione

CARATTERIZZAZIONE CELLULARE

Semina di mesenchimali (MSC) di linea umana isolate da tessuto adiposo

- SEM
- Alizarin Red
- Analisi confocale
- ELISA

SEM	CONFOCALE	ALIZARIN RED
24h: 2 LIO+ 2 NO LIO	24h: 2 LIO+ 2 NO LIO	14gg: 3 LIO+ 3 NO LIO
7 gg: 2 LIO+ 2 NO LIO	7 gg: 2 LIO+ 2 NO LIO	30 gg: 3 LIO+ 3 NO LIO
14 gg: 2 LIO+ 2 NO LIO	14 gg: 2 LIO+ 2 NO LIO	60 gg: 3 LIO+ 3 NO LIO
21gg: 2 LIO+ 2 NO LIO	21gg: 2 LIO+ 2 NO LIO	

Riduzione dei campioni da 50 a 19 a causa di contaminazione batterica

CARATTERIZZAZIONE CELLULARE

Semina di mesenchimali (MSC) di linea umana isolate da tessuto adiposo

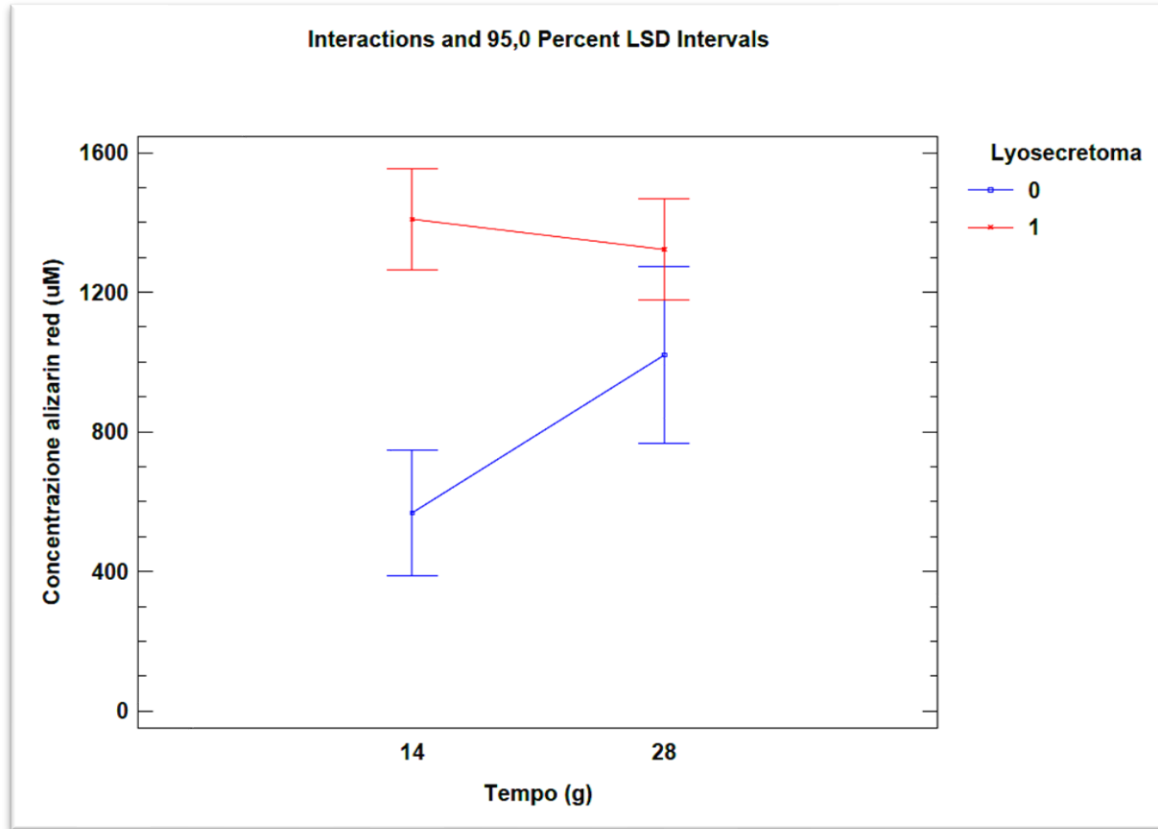
- Alizarin Red
- Analisi confocale
- ELISA

SEM	CONFOCALE	ALIZARIN RED
24h: 2 LIO+ 2 NO LIO	24h: 2 LIO+ 2 NO LIO	14gg: 3 LIO+ 3 NO LIO
7 gg: 2 LIO+ 2 NO LIO	7 gg: 2 LIO+ 2 NO LIO	30 gg: 3 LIO+ 3 NO LIO
14 gg: 2 LIO+ 2 NO LIO	14 gg: 2 LIO+ 2 NO LIO	60 gg: 3 LIO+ 3 NO LIO
21gg: 2 LIO+ 2 NO LIO	21gg: 2 LIO+ 2 NO LIO	14 gg: 3 LIO+ 2 NO LIO
	14 gg: 3 LIO+ 2 NO LIO	28 gg: 3 LIO+ 1 NO LIO
	28 gg: 3 LIO+ 2 NO LIO	

Riduzione dei campioni da 50 a 19 a causa di contaminazione batterica

RISULTATI E DISCUSSIONI

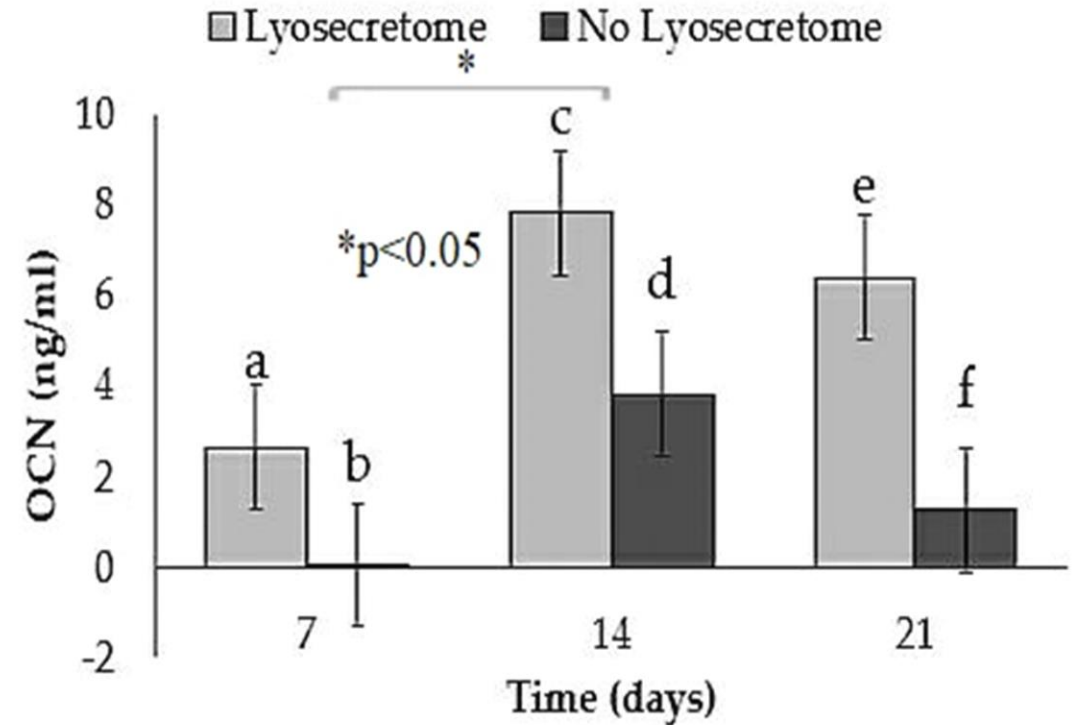
Alizarin Red



- A 14 gg: produzione maggiore di matrice ossea per i campioni con liosecretoma
- A 28 gg: nessuna differenza significativa tra i gruppi

ELISA

OCN: osteocalcina



- A 14 gg: aumento significativo di OCN sugli scaffold con liosecretoma o senza
- I livelli di OCN restano stabili tra 14 gg e i 28 gg

RISULTATI E DISCUSSIONI

Analisi confocale

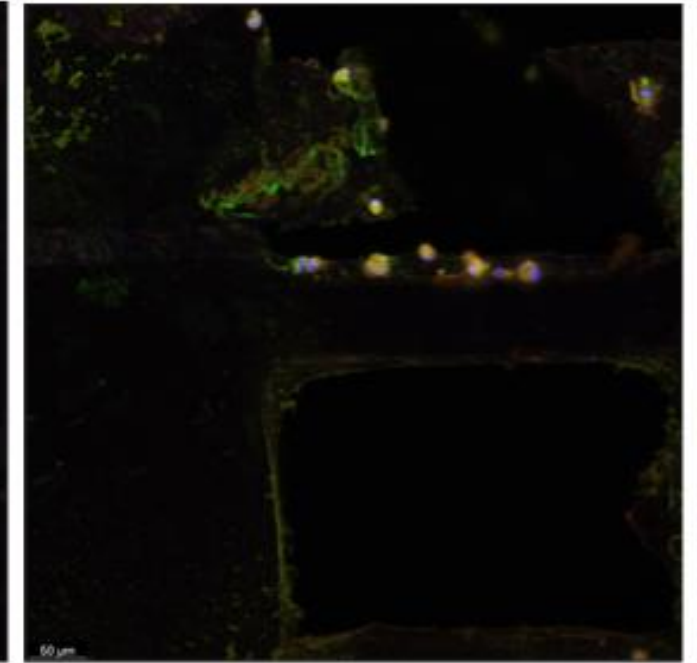
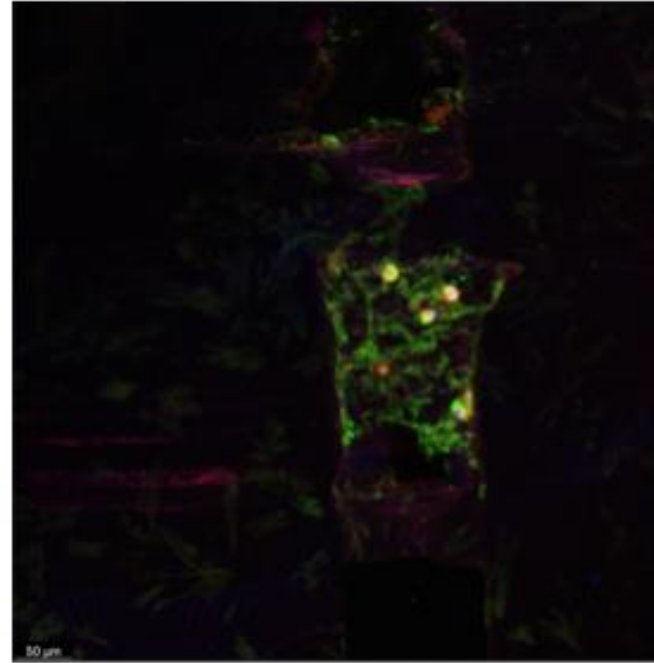
Colorazioni: nuclei in blu,
actina nel citoscheletro in rosso
e matrice mineralizzata in verde

- A 14 gg: evidente produzione di matrice ossea per i campioni con liosecretoma rispetto ai controlli
- A 28 gg: prevalenza di rosso che mostra processi cellulari frequenti e complessi sulla superficie dello scaffold

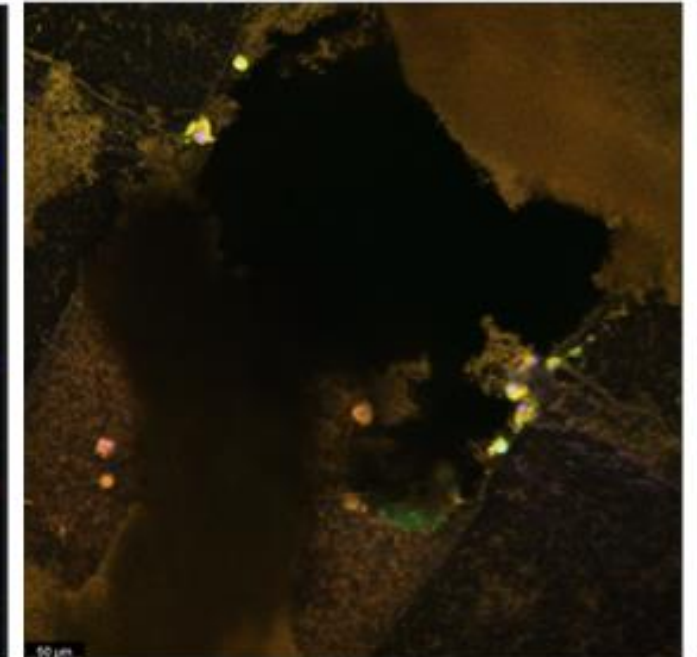
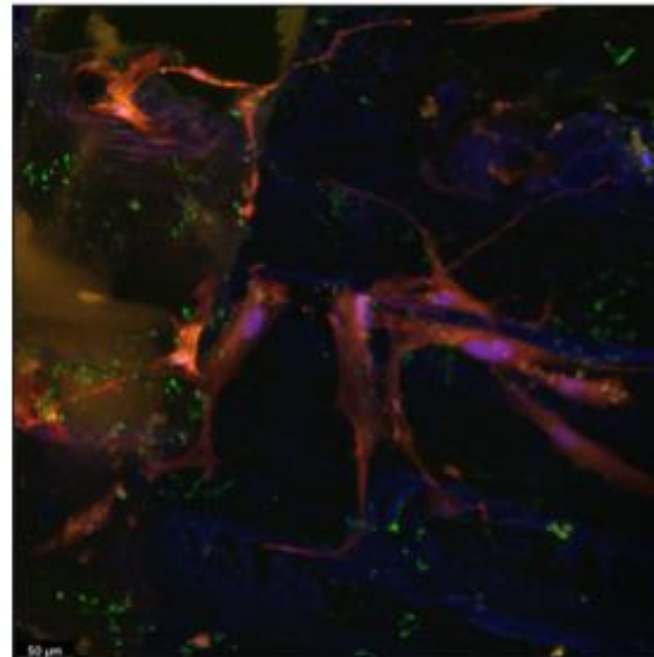
Liosecretoma

Controllo

14 giorni



28 giorni



ATTIVITÀ

1. Fabbricazione degli scaffold in PCL con inclusioni interne di idrogel di alginato al 10% (p/v) tramite tecnica della co-stampa
2. Caratterizzazione cellulare
3. Caratterizzazione meccanica: test di compressione

PROVA DI COMPRESSIONE

Tramite i test in compressione si valutano le caratteristiche meccaniche della geometria utilizzata

- Cella di carico da 10kN

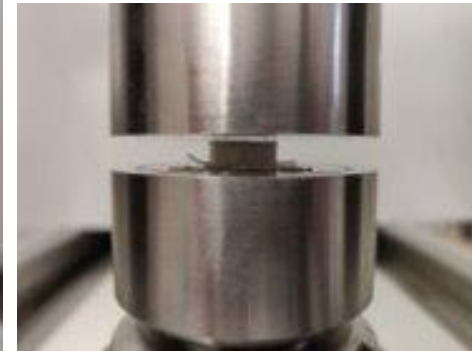
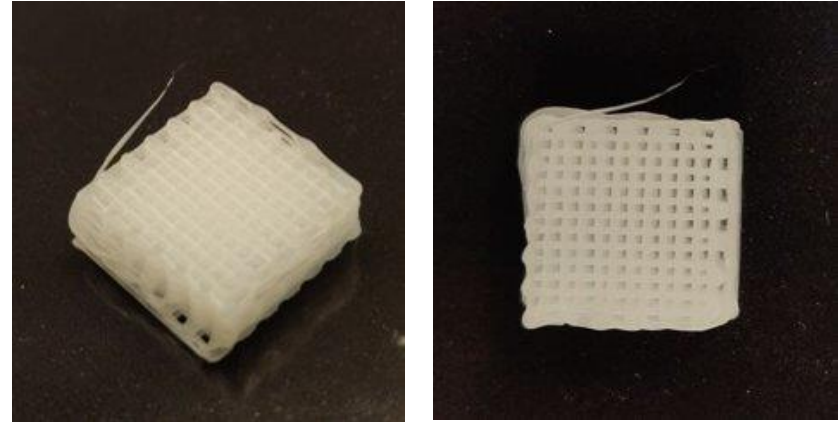
Software TestWorks

Input:

- Dimensioni dei provini
- Parametri di controllo

Output:

- Time
- Load
- Crosshead Shift (spostamento della traversa)

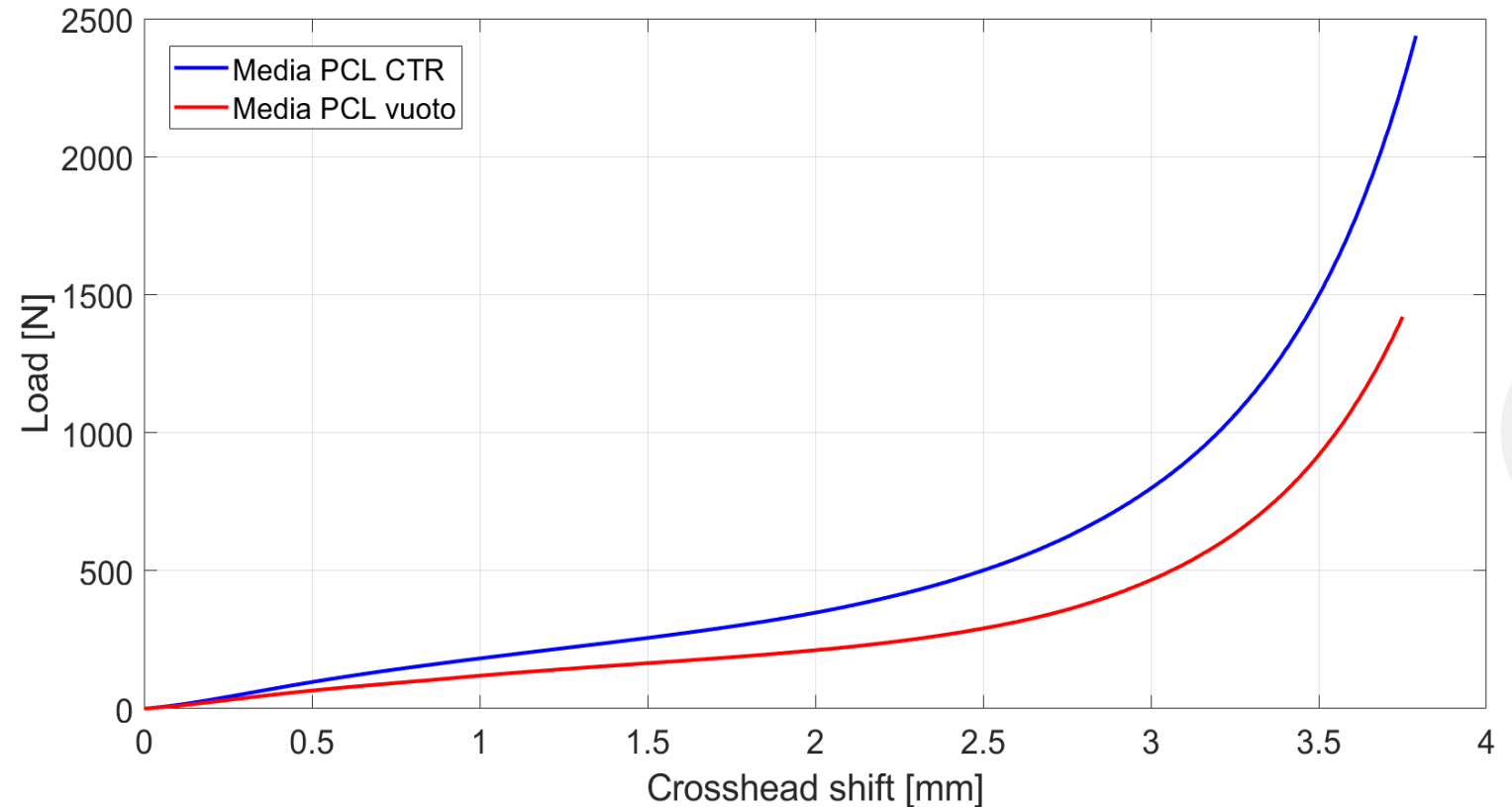


CURVE MEDIE Load-Crosshead Shift

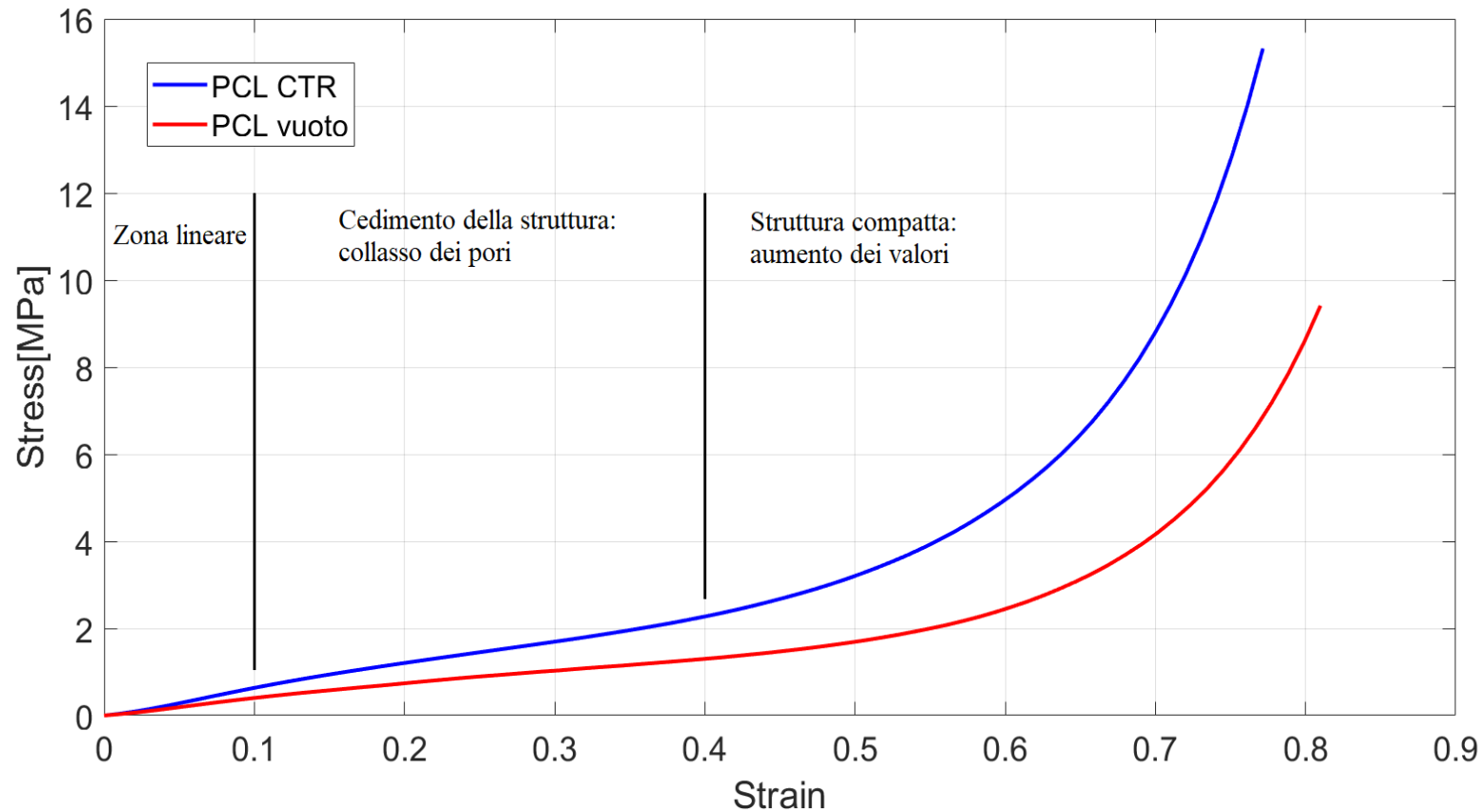
- 7 scaffold in PCL pieni (CTR)
- 8 scaffold in PCL vuoti

Da elaborazione dei dati grezzi ne risulta un grafico Load-Crosshead Shift

Si ricavano le curve medie dei gruppi



STRESS-STRAIN E MODULO DI YOUNG



Comportamento tipico di un materiale poroso sottoposto a deformazione, *Zein et al. (2002) e Lam et al. (2002)*

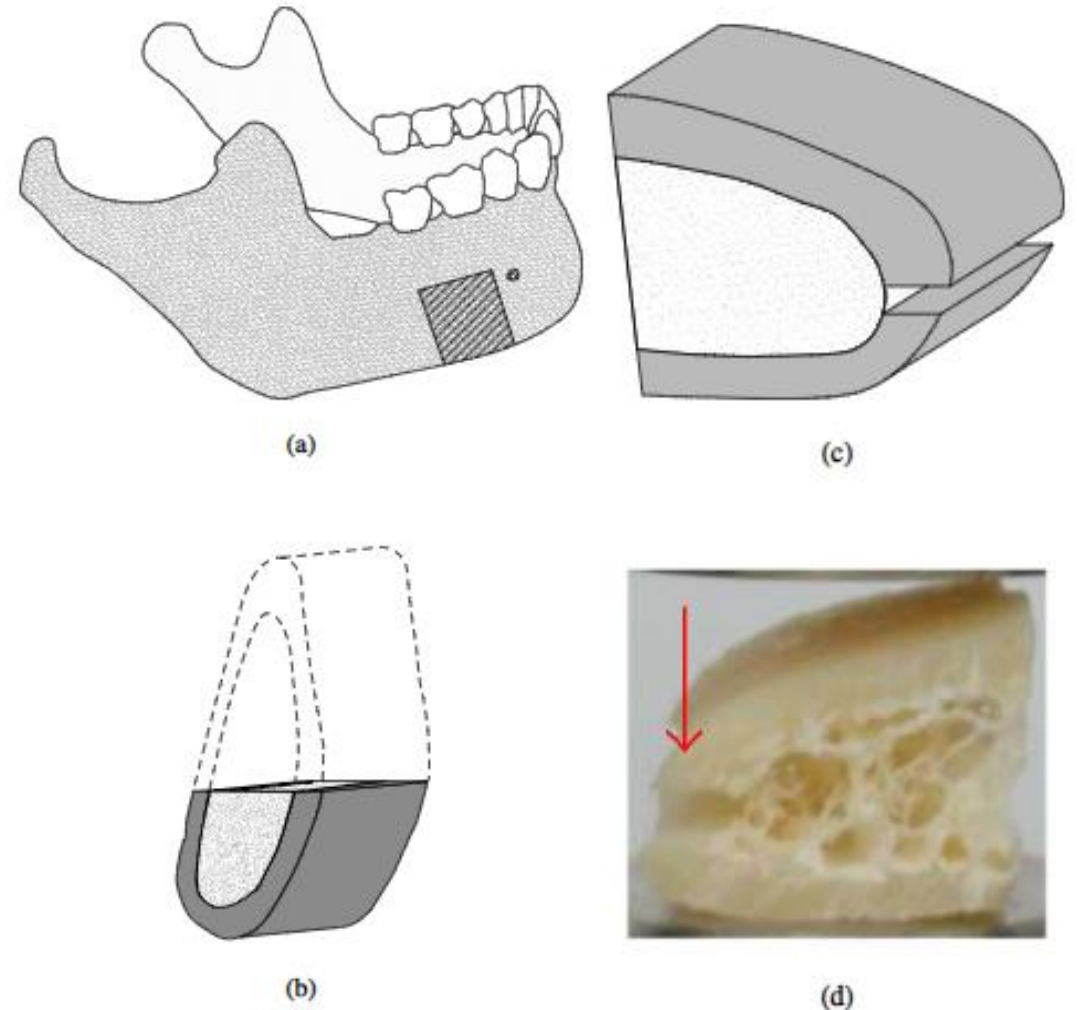
- PCL CTR:
- $E = 5.87 \pm 1.50$ MPa
- PCL vuoto:
- $E = 3.90 \pm 0.97$ MPa

APPLICAZIONE SCAFFOLD CO-STAMPATI

Attraverso test in compressione nella direzione buccolinguale, *Zreiqat et al. (2014)* ricavano i valori del modulo di Young dell'osso trabecolare mandibolare: tra 7 MPa e 200 MPa

Proposte:

- Uso di miscele composite di PCL: es. aggiunta di HA e β -TPC, al fine di migliorare la resistenza della struttura a parità di porosità
- Geometrie a porosità variabile: es. strato esterno più denso e interno a matrice più ampia, *Bartnikowski et al. (2020)*



Conclusioni

Metodo di stampa efficiente ma difficoltà a produrre campioni sterili

I risultati dei test Alizarin red, analisi confocale ed ELISA hanno confermato il ruolo del liosecretoma nel promuovere la rigenerazione ossea

Le proprietà meccaniche in compressione dei campioni rientrano nell'intervallo inferiore dei valori riportati in letteratura per l'osso trabecolare umano

Gli scaffold in PCL e inclusioni di idrogel di alginato presentano una resistenza meccanica insufficiente per l'applicazione nell'osso mandibolare

Sviluppi futuri

Miglioramento delle
condizioni di sterilità

Caratterizzazione
meccanica dell'osso
mandibolare

Miglioramento delle
caratteristiche
meccaniche dello
scaffold

Progettazione lesione-
specifica per impianto
in vivo

Grazie per l'attenzione

