

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

CAMPUS DI CESENA

SCUOLA DI INGEGNERIA E ARCHITETTURA

CORSO DI LAUREA TRIENNALE IN INGEGNERIA BIOMEDICA

**MISURE OTTICHE PER L'ANALISI NON DISTRUTTIVA DI
MATRICI TRIDIMENSIONALI DI ALGINATO**

Tesi in

Fondamenti di Ingegneria dei Tessuti Biologici LM

Relatore:
Prof. Emanuele D. Giordano

Presentata da:
Valentina Betti

Correlatori:
Dott. Joseph Lovecchio
Dott.ssa Marilisa Cortesi
Dott. Enrico Ravagli

Sessione II
Anno Accademico 2017/2018

*A mia nonna e mia mamma.
I pilastri della mia vita.*

Indice

Abstract	5
1 L'UTILIZZO DI SCAFFOLDS NELL'INGEGNERIA DEI TESSUTI	7
1.1 Introduzione	7
1.2 Dal 2D al 3D: i vantaggi della terza dimensione	8
1.3 Scaffolds in idrogel a base di alginato	10
1.4 Approcci per la caratterizzazione di scaffolds	15
1.4.1 Presto Blue	16
1.4.2 Trypan Blue	17
1.4.3 Misure di impedenza	18
1.4.4 Misure spettrofotometriche	19
1.4.5 FTIR	24
1.5 Scopo: misure ottiche in ambiente biologico	25
2 MATERIALI E METODI	29
2.1 Il lettore multi piastra Tecan	29
2.2 Lo spettrofotometro portatile	31
2.3 Acquisizione dati	33
2.4 Elaborazione dati	37
2.5 Correlazione	40
2.6 Grafico di Bland-Altman	40
3 RISULTATI E DISCUSSIONE	43
3.1 Risultati dello spettrofotometro professionale	45
3.1.1 Andamento dell'assorbanza nel tempo	45
3.2 Risultati dello spettrofotometro portatile	48
3.2.1 Andamento dell'assorbanza nel tempo (L1)	49
3.2.2 Andamento dell'assorbanza nel tempo (L2)	51
3.2.3 Valutazione dei due orientamenti L1 e L2	53
3.3 Correlazione	54

3.4 Grafico di Bland-Altman	57
Conclusioni e sviluppi futuri	61
Bibliografia	62
Ringraziamenti	71

Abstract

L'ingegneria tissutale è un settore multidisciplinare che applica i principi dell'ingegneria per realizzare dei sostituti biologici capaci di ripristinare una determinata funzione dell'organismo. Si avvale dell'utilizzo di alcuni dispositivi, come bioreattori, e di scaffolds, ovvero strutture tridimensionali capaci di sostenere e promuovere la formazione e la crescita cellulare.

I recenti progressi in questo campo e nella medicina rigenerativa hanno dimostrato l'importanza di comprendere le complesse interazioni delle cellule con il microambiente circostante, al fine di sviluppare sistemi terapeutici di successo. Pertanto, sono necessarie tecniche di valutazione efficaci fin dalle fasi iniziali di ricerca e sviluppo, in modo da selezionare o progettare scaffolds con proprietà adeguate. La valutazione dello stato e delle caratteristiche delle popolazioni cellulari all'interno di queste strutture, inoltre, risulta fondamentale per poter sfruttare al meglio le tecniche di coltura cellulare in 3D.

Per questa ragione, una linea di ricerca attiva presso il laboratorio di Ingegneria Cellulare e Molecolare "Silvio Cavalcanti" DEI - UOS Cesena si propone di sviluppare metodi non invasivi al fine di caratterizzare le strutture tridimensionali e di studiare il comportamento di popolazioni cellulari cresciute al loro interno. Lo scopo principale di questa tesi è stato lo studio dell'efficacia di un metodo alternativo per la quantificazione dell'assorbanza di scaffolds polimerici vuoti a diverse concentrazioni di calcio, utilizzando uno strumento di dimensioni ridotte che possa essere integrato in un bioreattore. Tali misure sono state confrontate con quelle di uno strumento professionale, ovvero il lettore multiplastrata Tecan, in modo da analizzarne la precisione e la validità.

Dai risultati ottenuti, queste tecniche di indagine sembrano essere molto promettenti per la valutazione non distruttiva di scaffolds per colture cellulari 3D.

Capitolo 1

L'UTILIZZO DI SCAFFOLDS NELL'INGEGNERIA DEI TESSUTI

1.1 Introduzione

L'ingegneria tissutale è una branca dell'ingegneria biomedica che utilizza cellule umane e supporti innovativi al fine di creare sostituti biologici biocompatibili e funzionali in grado di ripristinare tessuti danneggiati con maggiore efficacia rispetto a strutture inerti. La progettazione di queste tecnologie, che può essere eseguita sia su cellule in coltura *in vitro* sia sull'organismo vivente *in vivo*, avviene attraverso l'utilizzo di tre importanti componenti: cellule, bioreattori e scaffolds. Questi ultimi si possono definire come strutture artificiali capaci di sostenere e promuovere la formazione e la crescita di tessuti nelle tre dimensioni. Gli scaffolds, infatti, sono ingegnerizzati per permettere una miglior adesione, crescita, differenziamento e diffusione cellulare oltre a fornire un supporto strutturale in grado di definire la forma finale dell'organo o del tessuto da rigenerare [1].

Un certo numero di materiali biodegradabili e biorisorbibili sono stati studiati sperimentalmente e/o clinicamente. Idealmente, uno scaffold dovrebbe

avere le seguenti caratteristiche:

1. deve essere tridimensionale e altamente poroso con una rete di pori interconnessi per la crescita cellulare e il trasporto del flusso di nutrienti e rifiuti metabolici;
2. deve essere biocompatibile e biorassorbibile con un tasso di degradazione e di riassorbimento controllabile per far corrispondere la crescita di cellule/tessuti *in vitro* e/o *in vivo*;
3. deve possedere un'adeguata chimica di superficie per l'attaccamento, la proliferazione e il differenziamento delle cellule;
4. deve avere le proprietà meccaniche simili a quelle dei tessuti nel sito di impianto.

Un aspetto che necessita di approfondimento è proprio quello della tridimensionalità: infatti, la struttura 3D dello scaffold favorisce la crescita cellulare in una dimensione in più rispetto alla semina in 2D, adattandosi meglio nella successiva fase di impianto nel paziente.

1.2 Dal 2D al 3D: i vantaggi della terza dimensione

I modelli cellulari tradizionali *in vitro* si sviluppano su 2 dimensioni e quindi rappresentano in maniera semplificata il tessuto preso in analisi (Gillet et al., 2013). Questi sistemi, inoltre, presentano numerosi limiti nella riproduzione del comportamento cellulare (es.: nella divisione, proliferazione, migrazione, differenziamento) [2]. Tali limitazioni possono portare a valutazioni errate circa i comportamenti cellulari e sono quindi responsabili della bassa correlazione *in vitro-to-in vivo* [3]. Pertanto, sono stati sviluppati modelli tridimensionali (3D) *in vitro* al fine di ricreare un ambiente maggiormente rappresentativo del contesto fisiologico.

I nuovi modelli di coltura cellulare in 3D possono infatti riflettere più accuratamente le complesse interazioni delle cellule con il microambiente circostante, non solo a livello biochimico e biomeccanico, ma anche a livello dell'espressione genica e proteica (Friedrich et al., 2009). Ad esempio, il lavoro di Mina Bissell, è stato centrale nel fornire le prime prove sperimentali su come l'utilizzo di sistemi coltura cellulare 3D, e quindi la rappresentazione *in-vitro* del microambiente extracellulare, possa fare la differenza nella ricerca sul cancro [4], mettendo a disposizione dei ricercatori nuovi stimoli e strategie per trattare questa patologia. L'efficacia di questi metodi innovativi è dimostrata dall'alto numero di modelli di coltura 3D *in vitro*, sviluppati a partire da cellule tumorali umane, attualmente disponibili [5].

L'utilizzo di questi nuovi metodi è stato fondamentale anche per lo studio di alcuni aspetti delle cellule staminali; si è potuto infatti dimostrare che il comportamento di queste, quando lavorano collettivamente, può essere molto più sofisticato di quanto ci si potrebbe aspettare [6]. Questi risultati dimostrano la maggiore accuratezza e affidabilità dei sistemi di coltura 3D [7] [8], e quindi la loro potenziale utilità in applicazioni di medicina rigenerativa [9]. Negli ultimi decenni, scaffolds di idrogel - matrici reticolate che possiedono un elevato contenuto di acqua - hanno attratto sempre più attenzione nel tentativo di imitare le condizioni *in vivo*. La struttura reticolare di catene polimeriche con elevato contenuto di acqua produce una serie di caratteristiche desiderabili nel microambiente cellulare: supporto per la crescita cellulare; porosità per la migrazione cellulare; facile trasporto di ossigeno, nutrienti, rifiuti e fattori solubili [10] [11].

Gli idrogel possono essere formati da un'ampia gamma di fonti naturali come il collagene, la fibrina, l'acido ialuronico, il chitosano o l'alginato, ovvero, materiali biocompatibili con proprietà bioattive che promuovono la sopravvivenza cellulare, la proliferazione, il differenziamento e la funzione cellulare di molti tipi di cellule [12] [13]. Nel seguente elaborato verranno discussi metodi innovativi utili per la caratterizzazione di scaffolds 3D a base di alginato.

1.3 Scaffolds in idrogel a base di alginato

Gli idrogel costituiscono un gruppo di materiali polimerici, la cui struttura idrofila li rende capaci di trattenere grandi quantità di acqua nelle loro reti tridimensionali, senza perdere stabilità [14] [15]. Si possono considerare ottimi materiali per costruire scaffolds in quanto strutturalmente simili alla matrice extracellulare di molti tessuti: hanno una bassa citotossicità, possono spesso essere lavorati in maniera relativamente semplice e hanno ottime proprietà antimicrobiche [16] [17]. Generalmente presentano elevata biocompatibilità e non immunogenicità e la loro struttura reticolata crea un ambiente favorevole all'incapsulamento delle cellule; inoltre possiedono un'alta permeabilità all'ossigeno e ai nutrienti essenziali [18] [19]. Uno dei materiali prevalentemente utilizzato come idrogel nelle applicazioni di ingegneria tissutale è l'alginato, di cui in seguito si approfondisce la struttura chimica.

L'alginato è un copolimero lineare derivato dai polisaccaridi di acido (b)-D-mannuronico (M) e acido α -l-guluronico (G) (1-4) reticolati, ed è derivato principalmente da alghe brune e batteri [20], [21]. All'interno del polimero di alginato, i monomeri M e G sono distribuiti sequenzialmente in blocchi sia ripetitivi che alternati, e la quantità e la distribuzione di ciascun monomero dipende dalla specie, dalla posizione e dall'età delle alghe da cui è isolato l'alginato. La sua struttura è illustrata in figura 1.1.

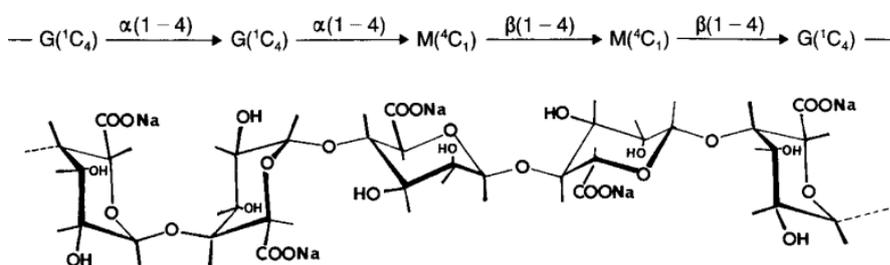


Figura 1.1: Struttura chimica di sodio ed alginato. acido α -l-guluronico (G), acido (b)-D-mannuronico (M).

I gel si formano quando cationi bivalenti come Ca^{2+} , Ba^{2+} e Sr^{2+} interagiscono cooperativamente con blocchi di monomeri G per formare ponti ionici tra diverse catene polimeriche. Possono anche essere formati da alginato di reticolazione covalente con idrazide adipica e PEG usando la chimica standard di carbodiimmide [22], [23].

La densità di reticolazione e quindi le proprietà meccaniche dei gel reticolati ionicamente possono essere facilmente manipolate variando il rapporto M a G: in generale l'elasticità, la porosità e la stabilità del gel aumentano incrementando il contenuto di G, la lunghezza dei blocchi G ed il peso molecolare. Un'altra proprietà dei blocchi G consiste nella loro capacità di chelare gli ioni calcio e per questo motivo riescono a creare una rete di connessioni intermolecolari e intramolecolari crociate, nelle quali lo ione calcio coordina i gruppi carichi negativamente appartenenti a due catene diverse di alginato. In questo modo si forma una maglia che imprigiona il solvente formando una sorta di gel molto compatto [24].

La porosità su scala nanometrica di una rete di gel di alginato è regolabile nell'intervallo da 5 a 200 nm [25]: ciò permette il passaggio delle sostanze nutritive e la rimozione dei prodotti di scarto ed, eventualmente, di prodotti sintetizzati (come ad esempio insulina, dopamina, endostatina e fattori di crescita [26]). Di conseguenza, la possibilità di controllare la dimensione dei pori assume un'importanza fondamentale: infatti, pori di piccole dimensioni migliorano l'attaccamento cellulare e lo scambio di segnali intracellulari, mentre i pori grandi garantiscono il giusto trasporto bidirezionale di ossigeno e nutrienti [27].

La reticolazione ionica tra cationi multivalenti e alginato non avviene semplicemente mescolando direttamente questi due componenti. Due tecniche principali sono state sviluppate per fornire un'introduzione controllata degli ioni gelificanti agli alginati con una successiva formazione di un gel: la gelificazione esterna e la gelificazione interna.

1. La gelificazione esterna è caratterizzata dal fatto che essa consente agli ioni gelificanti di diffondersi dall'esterno verso l'interno della struttura

di alginato. Questa metodologia viene comunemente utilizzata per la preparazione di perle di idrogel che saranno formate istantaneamente quando una soluzione di alginato viene gocciolata in una soluzione contenente ioni gelatinosi (solitamente $CaCl_2$) [28].

2. La gelificazione interna è caratterizzata da un rilascio controllato di ioni gelatinizzanti che si diffondono da una fonte inerte dissolta o sospesa all'interno della soluzione di alginato. Esempi di fonti di ioni gelatinizzanti includono sali di carbonato ($SrCO_3$ o $CaCO_3$), calcio EDTA, calcio citrato, calcio solfato ($CaSO_4$), calcio alginato (Ca-alginato) e calcio gluconato [29] [30] [31]. Il rilascio di ioni gelatinizzanti può essere indotto da una variazione del pH, ad esempio incorporando il glucono- δ -lattone (GDL) a idrolisi lenta.

In questo lavoro di tesi, gli scaffolds sono stati realizzati con quest'ultima procedura, addizionando all'alginato carbonato di calcio $CaCO_3$ e glucono- δ -lattone (GDL). Gli ioni calcio, addizionati alla soluzione di alginato, interagiscono con i gruppi COO^- e OH^- dell'acido gulonico fino a saturazione formando una struttura ripiegata su se stessa che ricorda la forma delle scatole di uova: viene perciò detta struttura "egg box" (figura 1.2).

Questa configurazione spaziale si forma nella fase di cross-linking e causa un impacchettamento maggiore rispetto alle singole catene, con conseguente aumento della densità e inizio del processo di gelificazione.

L'aggiunta di GDL comporta inoltre la formazione di CO_2 , la quale forma delle bolle che rimangono intrappolate nella struttura dello scaffold.

Il presente lavoro di tesi nasce a partire da un progetto di ricerca già attivo presso il laboratorio di Ingegneria Cellulare e Molecolare "Silvio Cavalcanti" DEI - UOS Cesena [32] e prevede la caratterizzazione di scaffolds di alginato attraverso misure spettrofotometriche.

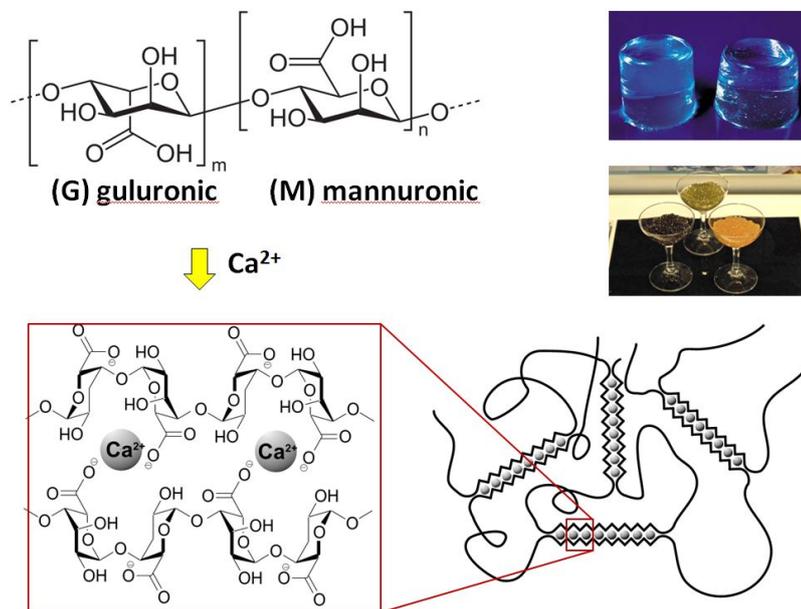


Figura 1.2: Tipica struttura “egg box” dell’alginate.

Gli steps principali del protocollo di realizzazione degli idrogeli sono:

1. Prendere dei conetti da 2mL e realizzare dei forellini nella loro estremità inferiore con la punta di un saldatore.
2. Avvolgere nel parafilm il coperchio dei conetti e sterilizzarlo sotto raggi UV per un’ora.
3. Chiudere i coni ed utilizzare una siringa da insulina per dispensare l’alginate attraverso il foro.
4. Diluire il CaCO_3 in base alle concentrazioni calcio desiderate:
 - 20 mM: 135 mM di CaCO_3
 - 40 mM: 270 mM di CaCO_3
 - 80 mM: 540 mM di CaCO_3
 dispensarlo poi nei coni (80 μl ciascuno).

5. Agitare con un Vortex ¹ ciascun cono per 1 minuto, così da permettere la miscelazione dei materiali.
6. Aggiungere una quantità corretta di media e GDL.
7. Vortexare “touch and go” per 3 secondi.
8. Lasciare polimerizzare in incubatore per almeno 16 ore.

La quantità dei reagenti utilizzata per ognuna delle tre differenti concentrazioni è la seguente (figura 1.3):

	20 mM	40 mM	80 mM
Alginato	270 μ l	270 μ l	270 μ l
CaCO ₃	80 μ l (@ 135 mM)	80 μ l (@ 270 mM)	80 μ l (@ 540 mM)
RPMI 1640	161.25 μ l	140 μ l	97.5 μ l
GDL	21.25 μ l	42.5 μ l	85 μ l

Figura 1.3: Tabella dei reagenti.

Si ottengono dunque degli scaffolds come in figura 1.4.



Figura 1.4: Scaffolds in alginato con estremità superiore di forma conica.

¹Gli agitatori vortex sono utilizzati per la miscelazione di sostanze. Sono progettati per eseguire un'azione di centrifuga vigorosa e uniforme.

Le tre condizioni presentano, oltre che differenti concentrazioni di calcio, diverso volume di coltura (RPMI 1640) e di GDL. Si utilizza un volume maggiore di GDL in quanto la sua concentrazione deve essere sempre doppia rispetto a quella del $CaCO_3$ per consentire una gelazione più stabile e mantenere un valore di pH di 7.4, mentre il volume di terreno di coltura è stato modificato per mantenere costante il volume totale (575 μ l).

Al fine di valutare come la concentrazione di calcio cambia la struttura e le proprietà meccaniche degli idrogel di alginato, si possono usare diverse tecniche di indagine che verranno adesso discusse.

1.4 Approcci per la caratterizzazione di scaffolds

La struttura e le dimensioni degli scaffolds sono fattori cruciali in quanto influiscono sulla funzionalità dei costrutti ingegnerizzati, sui tessuti e sull'eventuale applicazione in clinica. Pertanto, sono necessarie tecniche di valutazione efficaci fin dalle fasi iniziali di ricerca e sviluppo, in modo da selezionare o progettare scaffolds con proprietà adeguate. La valutazione dello stato e delle caratteristiche delle popolazioni cellulari all'interno di queste strutture, inoltre, risulta fondamentale per poter sfruttare al meglio le tecniche di coltura cellulare in 3D.

Un approccio di valutazione efficace dovrebbe essere rapido, accurato e non distruttivo, fornendo al contempo una panoramica completa delle caratteristiche di interesse. Se consideriamo la valutazione della vitalità cellulare, ad esempio, numerose tecniche sono attualmente disponibili: Presto Blue, Trypan Blue e XTT. Altri approcci si basano su misure di impedenza e ottiche, come la microscopia elettronica a scansione (SEM), l'immunofluorescenza e la valutazione della densità ottica in popolazioni batteriche.

1.4.1 Presto Blue

Presto Blue è un reagente a base di resazurina molto efficace per valutare la vitalità cellulare nel tempo, e in quanto non tossico, è considerato un metodo non invasivo. Altri vantaggi di questo metodo sono la rapidità e la sensibilità [33].

La resazurina viene ridotta dall'attività mitocondriale assumendo un colore fluorescente rosa la cui intensità dipende dal numero di cellule, ed il risultato viene dunque osservato tramite misure di fluorescenza o assorbanza. In alcuni casi (culture statiche), tuttavia, questo metodo ha prodotto risultati contraddittori, che presentano discrepanze tra il numero di cellule e la conversione metabolica della resazurina. Di conseguenza l'affidabilità del Presto Blue risulta dipendente dal tipo di cellula, dalla cultura e dall'impostazione di misurazione [34].

Per determinare se l'uso quantitativo di un assay basato su resazurina sia possibile, è necessario conoscere l'influenza del metodo di coltura cellulare e l'impostazione della misurazione sul tasso di conversione della resazurina e sull'attività metabolica delle cellule [35] [36], ma questi dati non sono sempre noti. Inoltre questa indagine dà indicazioni sulla distribuzione globale delle cellule, ma non chiarisce dove la densità sia maggiore o minore in quanto la colorazione appare uniforme.

Nonostante sia un approccio non distruttivo, di uso comune soprattutto nel caso di colture cellulari bidimensionali, il Presto Blue non è utilizzabile per gli scaffolds impiegati in questo lavoro di tesi, in quanto è stato precedentemente dimostrato che non permette di distinguere tra diverse concentrazioni cellulari [32]. Questa problematica è principalmente legata a due aspetti: i tempi di diffusione del colorante risultano essere troppo lunghi, a causa della necessità dello stesso di entrare ed uscire dalla matrice di alginato; il reagente ha evidenziato un effetto distruttivo nei confronti della struttura tridimensionale.

1.4.2 Trypan Blue

Un elemento fondamentale che permette di distinguere le cellule vive da quelle morte è l'integrità della membrana cellulare [37]. Pertanto, i coloranti capaci di penetrare selettivamente nel citoplasma delle cellule morte sono stati ampiamente usati come coloranti vitali. Il Trypan Blue (TB) è un metodo molto comune per valutare la citotossicità nelle indagini sperimentali in cui le cellule morte assorbono il TB nel citoplasma a causa della perdita della selettività della membrana, mentre le cellule vive rimangono non colorate [38]. Per utilizzare questa tecnica su scaffold 3D è necessario:

- solubilizzare la matrice utilizzando un buffer a base di cloruro di sodio, citrato di sodio e acido etilendiamminotetraacetico (EDTA);
- mettere a contatto le cellule con il colorante e dispensarle nella camera di Burker (figura 1.5).

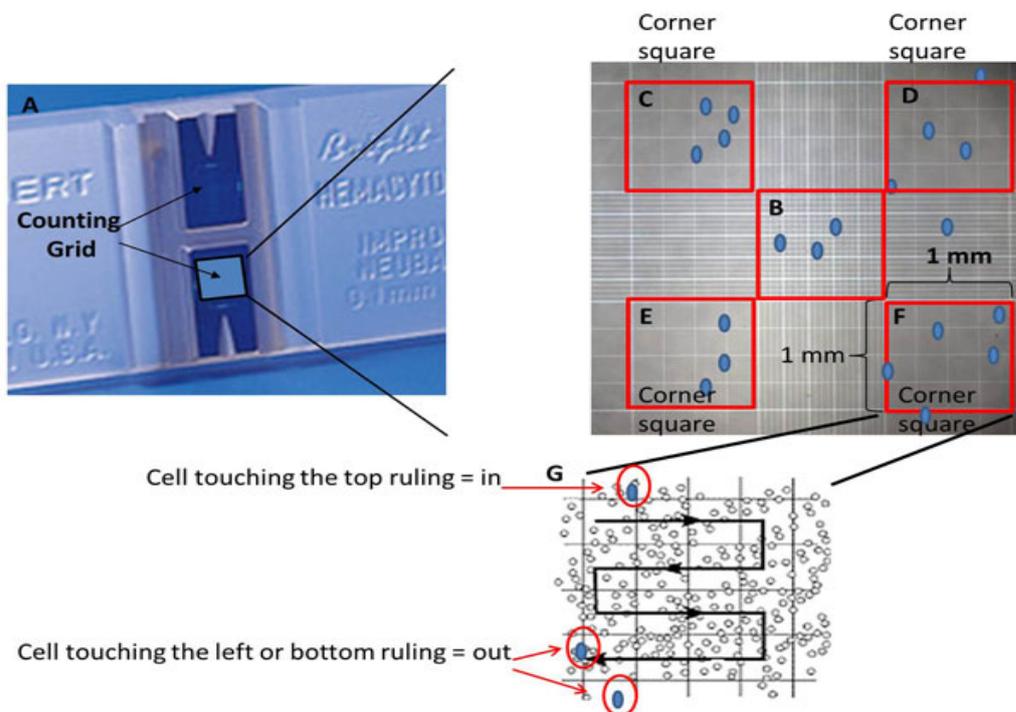


Figura 1.5: Cellule vive e morte differenziabili tramite Trypan Blue.

Il numero relativo di cellule morte e vive viene ottenuto contando al microscopio ottico le cellule colorate (morte) e non (vive).

Questa tecnica valuta la vitalità in maniera indiretta, in base all'integrità della membrana cellulare, perciò è possibile che una cellula, la cui vitalità è stata compromessa, mantenga almeno temporaneamente la sua integrità di membrana o viceversa che una cellula riesca a mantenersi in via pur riscontrando delle anomalie strutturali nella membrana. Di conseguenza questo metodo può fornire risultati di bassa precisione, soprattutto se utilizzato per un numero elevato di campioni [39].

1.4.3 Misure di impedenza

La caratterizzazione elettrica degli scaffold in alginato e la misura della loro impedenza si basa sul concetto che gli ioni presenti all'interno della struttura, o nel terreno di coltura, possano fungere da portatori di carica e che la capacità conduttiva degli scaffold sia legata alla loro concentrazione. Valutando ad esempio l'impedenza a differenti frequenze con una particolare tecnica di misurazione (EIS, ovvero Electrochemical Impedance Spectroscopy), si riesce a caratterizzare anche materiali di una certa complessità ed a valutare la relazione tra la resistenza di uno scaffold e la dimensione dei suoi pori [40]. Ciò dimostra dunque come la morfologia dello scaffold possa influenzarne le proprietà elettriche.

I progressi compiuti anche nel metodo EIT (Electrical Impedance Tomography) hanno reso possibile la ricostruzione di una mappa volumetrica di conducibilità o resistenza del campione analizzato [41]. Questa nuova metodologia risulta di particolare interesse in quanto potrebbe rendere più completa l'informazione ricavata da sistemi di coltura 3D, e potrebbe consentire la localizzazione delle cellule e caratterizzarne la distribuzione nell'idrogel in modo non invasivo e real-time.

La variazione delle caratteristiche elettriche di scaffolds vuoti a diverso contenuto di calcio è stata ampiamente trattata in un lavoro di tesi [42] svol-

to parallelamente al presente, che si focalizza invece sulla valutazione delle caratteristiche ottiche nelle stesse strutture di alginato.

1.4.4 Misure spettrofotometriche

Le misure spettrofotometriche si basano sull'interazione tra la materia e la luce visibile. La spettrofotometria richiede l'uso di spettrofotometri, strumenti in grado di effettuare analisi qualitative e quantitative utilizzando una sorgente luminosa. Le onde elettromagnetiche, a seconda della frequenza e relativa lunghezza d'onda, vengono suddivise secondo il cosiddetto spettro elettromagnetico (figura 1.6).

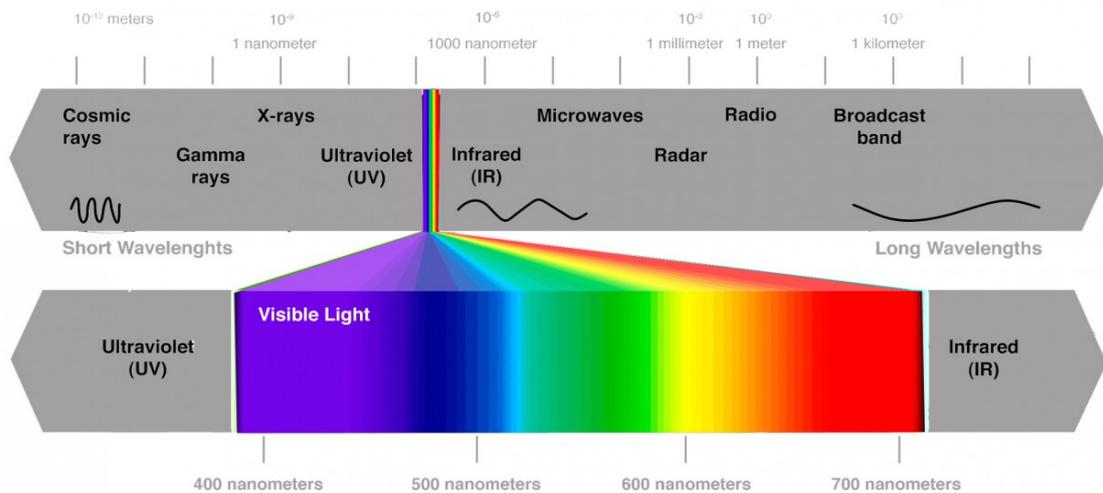


Figura 1.6: Spettro elettromagnetico

L'occhio umano è in grado di distinguere solo una parte di queste radiazioni (all'incirca da 400 nm a 750 nm), per cui questo ristretto campo viene definito come "spettro del visibile".

La luce proveniente dal sole contiene non solo frequenze del visibile ma anche altre, per esempio UV e raggi infrarossi [43]. Quando la luce colpisce un oggetto, questo assume un certo colore: ciò è dovuto al fatto che le componenti

di quell'oggetto, o i pigmenti che lo ricoprono, sono in grado di assorbire determinate frequenze, mentre altre vengono respinte (riflesse). Un oggetto rosso assorbirà quindi le frequenze del blu/viola e rifletterà quelle del giallo/rosso, un oggetto nero è in grado di assorbire tutte le radiazioni dello spettro visibile mentre uno bianco le riflette tutte.

Lo spettrofotometro utilizza proprio questa capacità della luce di essere assorbita, a diverse frequenze, dalle sostanze chimiche o biologiche. Lo strumento è costituito da diverse parti schematizzabili in figura 1.7:

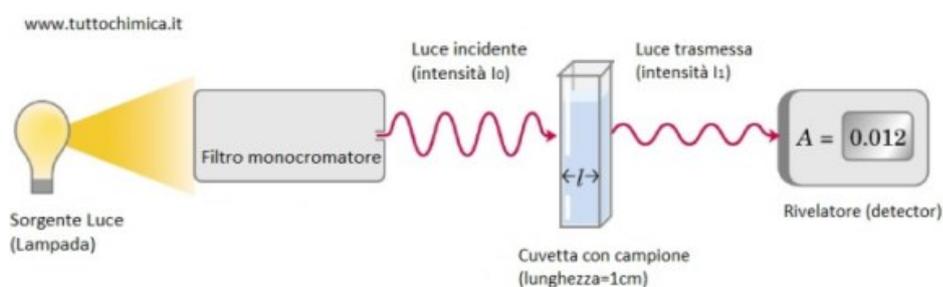


Figura 1.7: Schema di uno spettrofotometro

I componenti essenziali sono:

1. Sorgente di luce policromatica (tungsteno per il visibile, deuterio per l'UV).
2. Filtro o monocromatore (per selezionare una banda di λ definita)
3. Cella o cuvetta contenente il campione.
4. Detector (ha il compito di trasformare il segnale luminoso in impulso elettrico).

Una sorgente di luce, generalmente nell'UV/visibile, genera la luce che viene filtrata da un monocromatore in grado di lasciar passare una singola lunghezza d'onda. Nello strumento l'impostazione della lunghezza d'onda di utilizzo viene effettuata generalmente in via digitale tramite un pannello elettronico

dello strumento. Questa radiazione passa attraverso l'alloggiamento dello strumento in cui viene posto il campione, all'interno di una provetta particolare chiamata cuvetta. Le cuvette possono essere prodotte con specifiche plastiche in grado di lasciar passare le radiazioni tra 300 e 1000 nm, oppure anche con materiali più costosi quali il quarzo, che risulta trasparente alla radiazione anche nell'intervallo 200-300 nm.

Il raggio luminoso, se di lunghezza d'onda opportuna, passando attraverso il campione sarà in parte assorbito, pertanto il raggio incidente e raggio trasmesso avranno intensità luminose differenti (ma stessa frequenza e lunghezza d'onda). Il raggio termina il suo percorso in un detector in grado di valutare l'intensità della radiazione che vi arriva. Lo strumento è in grado di determinare un parametro, l'Assorbanza, definita come:

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I_1}\right) \quad (1.1)$$

dove I_1 e I_0 corrispondono rispettivamente alle intensità di luce trasmessa ed a quella iniziale. L'assorbanza è un numero senza unità di misura, che dunque avrà valore 0 quando $I_1=I_0$, avrà valore 2 quando la luce trasmessa è un centesimo della luce incidente ($\log[100/1]$) e così via. Generalmente, gli spettrofotometri più comuni riescono a leggere nel campo di assorbanze tra 0 e 2, mentre per riuscire a determinare valori maggiori di assorbanza servono strumenti molto più sensibili.

La legge principe della spettrofotometria è la legge di Lambert-Beer, secondo la quale assorbanza e concentrazione del campione in cuvetta sono linearmente dipendenti.

$$A = \epsilon cl \quad (1.2)$$

In questo caso c è la concentrazione molare (M) della sostanza nella cuvetta, l il cammino ottico, cioè la lunghezza della cuvetta in cm, e ϵ il coefficiente di estinzione molare (espresso quindi in $M^{-1}cm^{-1}$), una costante caratteristica per ogni sostanza (varia a seconda della lunghezza d'onda incidente e indica la capacità di quella sostanza di assorbire quella radiazione).

Parte della componente luminosa potrebbe essere bloccata o dispersa in ogni caso anche dalla cuvetta vuota o dal solvente utilizzato, pertanto lo strumento viene in genere tarato a zero di assorbanza (questa operazione è definita come “fare il bianco”) mediante un apposito pulsante lasciando all’interno dello strumento la cuvetta vuota o la cuvetta con il solo solvente.

Molti spettrofotometri sono impostabili su una lunghezza d’onda per volta ed effettuano letture singole di assorbanza a una specifica lunghezza d’onda. Esistono anche spettrofotometri “a doppio raggio” che presentano due alloggiamenti, uno per la cuvetta del campione e uno per la cuvetta del bianco che viene sottratto in automatico al campione. Ci sono poi spettrofotometri a serie di diodi in grado di effettuare in pochi secondi una lettura di tutte le assorbanze del campione comprese in un range di lunghezze d’onda (in genere UV/visibile). Il risultato di questo secondo tipo di strumento è lo spettro di assorbimento di una specifica sostanza, di cui la figura 1.8 è un esempio.

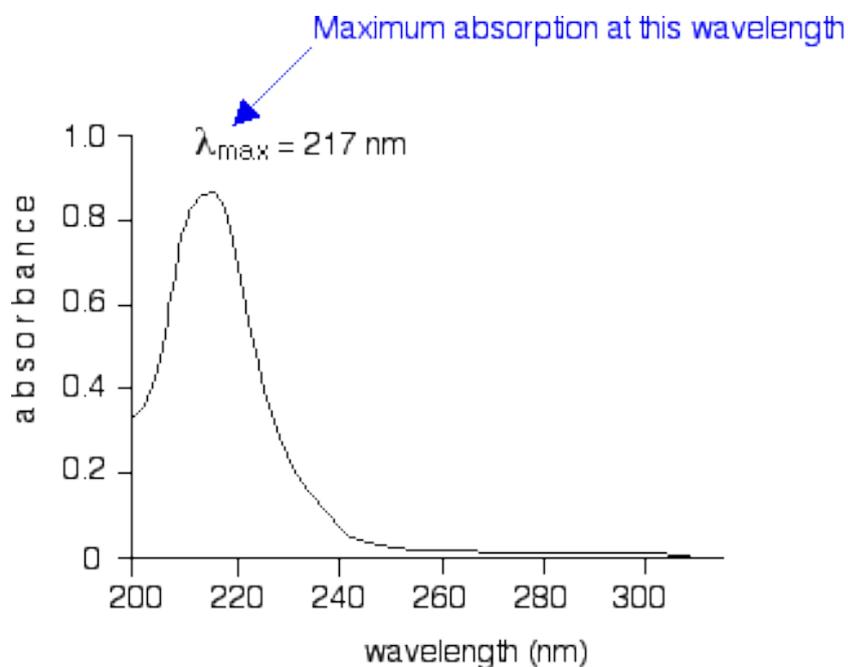


Figura 1.8: Spettro di assorbimento del buta-1,3-diene.

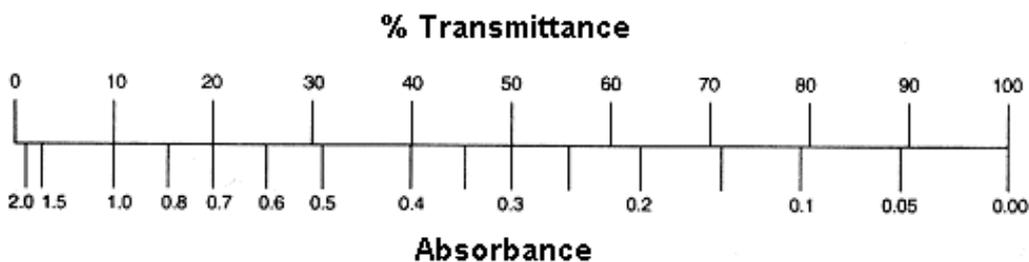
Lo spettro di assorbanza può anche essere ottenuto misurando sequenzialmente questo parametro a lunghezze d'onda diverse. Molti strumenti consentono di effettuare queste misurazioni automaticamente, impostando range di lunghezze d'onda di interesse e risoluzione.

Alcuni strumenti non misurano direttamente l'assorbanza, bensì la trasmittanza. Per convertire quest'ultima in assorbanza, si utilizza la legge di Lambert-Beer:

$$A = 2 - \log_{10}(T\%) \quad (1.3)$$

dove T% corrisponde alla percentuale di trasmittanza.

La relazione tra assorbanza e trasmittanza è illustrata nel seguente diagramma:



Se tutta la luce attraversa una soluzione senza alcun assorbimento, l'assorbanza è 0 e la percentuale di trasmittanza è 100%; se invece tutta la luce viene assorbita, la percentuale di trasmittanza è 0 e l'assorbanza è infinita.

Sono disponibili molti generi di spettrofotometri. Tra le distinzioni più importanti adottate per classificarli vi sono gli intervalli di lunghezze d'onda nei quali operano, le tecniche di misurazione che adottano, le modalità secondo le quali acquisiscono uno spettro e le sorgenti dell'intensità luminosa variabile per la cui misura sono stati progettati. Altri aspetti importanti degli spettrofotometri includono la loro banda spettrale e il loro intervallo di linearità.

Oltre alla spettrofotometria, vi sono altre tecniche spettroscopiche di indagine che sono state utilizzate per valutare le proprietà ottiche di molecole come il carbonato di calcio e di microrganismi quali i batteri. A scopo esemplificativo, se ne riportano alcune.

1.4.5 FTIR

La spettroscopia ad infrarossi in trasformata di Fourier è un metodo di analisi non distruttiva per l'identificazione dei materiali tramite l'analisi delle vibrazioni dei legami chimici. E' basata sull'assorbimento da parte dei materiali della radiazione infrarossa, che viene focalizzata dallo spettrofotometro sul campione per misurare sia le lunghezze d'onda assorbite, le quali danno informazioni dei gruppi chimici presenti, sia l'intensità dell'assorbimento, che indica la concentrazione dei gruppi chimici presenti nel campione. Si produce poi uno spettro tramite trasformata di Fourier [44].

Un nuovo metodo, basato sul rapporto costante, è stato proposto per correggere le interferenze dovute al fatto che gli spettri sono caratterizzati da un alto numero di picchi di assorbanza, per cui alcuni non potrebbero essere utilizzati per l'analisi quantitativa [45]. Queste interferenze possono essere valutate ed eliminate con il metodo proposto, chiamato "metodo di correzione delle assorbanze", ed i picchi possono essere utilizzati nell'analisi.

Sia $A_{a,n}(\nu 1)$ l'assorbanza dell'analita alla frequenza $\nu 1$ nel campione preparato n e $A_{p,n}(\nu 1)$ l'assorbanza dell'interferente alla stessa frequenza nel campione, tale da rappresentare un'interferenza spettrale. Supponendo che l'assorbanza totale del campione preparato $A_n(\nu 1)$ uguale alla somma delle singole assorbanze di ciascun composto, allora:

$$A_n(\nu 1) = A_{a,n}(\nu 1) + A_{p,n}(\nu 1) \quad (1.4)$$

Tenendo presente che nello spettro infrarosso le bande di assorbimento dovute allo stesso composto mantengono una relazione costante, quando la concentrazione di quel composto o lo spessore del campione varia, è possibile predire

l'assorbanza a $\nu 1$ che è dovuta all'interferente $A_{p,n}(\nu 1)$. Questa assorbanza può essere correlata all'assorbanza di un'altra frequenza ausiliaria $\nu 2$ che solo l'interferente assorbe e non l'analita. In altre parole, conoscendo l'assorbanza dovuta esclusivamente all'interferente in un'altra frequenza $\nu 2$, è possibile prevedere l'assorbanza alla frequenza di interesse $\nu 1$, poiché il rapporto tra i due rimane costante.

Vengono dunque misurate le assorbanze dei picchi scelti per l'analita (o gli analiti) e quelli standard. L'assorbanza è misurata come l'altezza del picco rispetto a dei valori di riferimento, che devono essere scelti opportunamente. È stato condotto uno studio per determinare il range di valori di riferimento più appropriato per ciascun caso; per il carbonato di calcio, è risultata essere la banda di numeri d'onda che va da 875cm^{-1} e 712cm^{-1} , corrispondente ad una lunghezza d'onda di circa $10\ \mu\text{m}$, dunque negli infrarossi.

Il vantaggio di questa tecnica è che non richiede una complessa preparazione del campione, come ad esempio avviene volendo fare un'indagine XRF, né dissoluzione o disgregazione del campione come nella spettroscopia di emissione atomica, oltre ad avere un veloce tempo di analisi.

1.5 Scopo: misure ottiche in ambiente biologico

E' possibile usare le misure ottiche anche in ambiente biologico, ad esempio nella ricerca di una soluzione efficace all'infezione batterica, uno dei problemi clinici più gravi associati a significativi costi di mortalità e assistenza sanitaria [46]. Due materiali artificiali, ovvero l'ossido di grafene ed un nanomateriale ibrido in ossido di zinco, sono stati studiati al fine di analizzarne l'efficacia.

Una valutazione quantitativa dell'attività antibatterica è stata eseguita misurando l'OD600, ovvero l'assorbanza ad una lunghezza d'onda di 600 nm,

dei batteri trattati con i nanomateriali artificiali. Nella figura 1.9 si mostrano le curve di crescita di *S. aureus* (figura 1.9 (A)) ed *E. coli* (Fig. 1.9 (B)) trattati con i biomateriali. Tutte le concentrazioni dei due materiali applicati a ciascun batterio sono state registrate a intervalli di tempo e il controllo è stato incluso per la valutazione dell'efficacia del materiale ibrido. Per confrontare l'efficienza rispetto ai singoli costituenti, l'ossido di grafene e il nanomateriale in *ZnO* sono stati inclusi nei diagrammi.

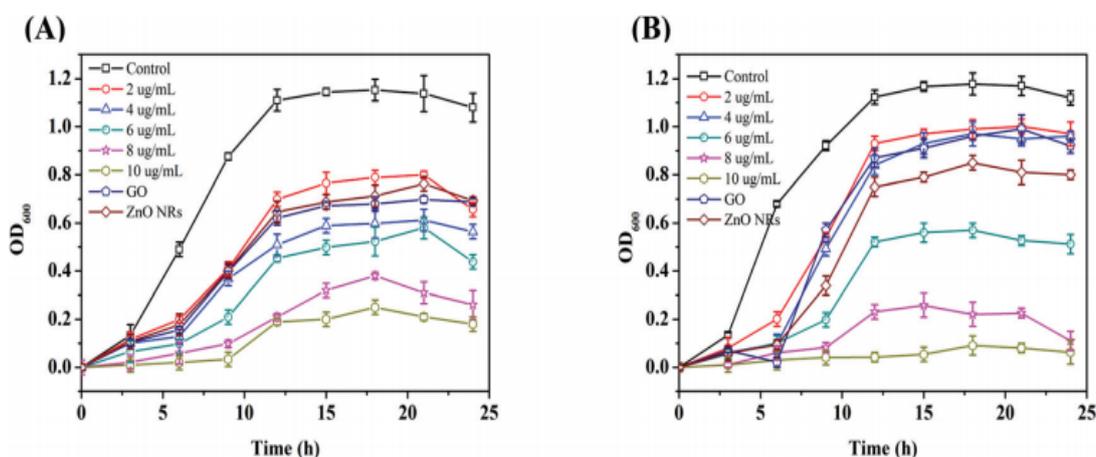


Figura 1.9: Misurazioni della densità ottica dei batteri a una lunghezza d'onda di 600 nm per (A) *S. aureus* and (B) *E. coli*.

Dalla figura 1.9 (A) e (B), si osserva come la densità ottica dei nanomateriali costituenti abbia mostrato la stessa bassa tossicità sia verso i batteri Gram-positivi che quelli Gram-negativi². Per la stessa concentrazione e stesso tempo di ossido di grafene e nanomateriale in ossido di zinco, quest'ultimo materiale ibrido mostra un'attività antibatterica superiore per *E. coli* rispetto a *S. aureus*. I bordi nitidi dell'ossido di grafene sono più distruttivi per il sottile strato di peptidoglicano della parete cellulare dei batteri Gram-negativi

²La colorazione di Gram è l'esame di laboratorio responsabile della classificazione dei batteri in Gram-positivi e Gram-negativi (anche indicati come Gram+ e Gram-). Fu messa a punto nel 1884 dal medico danese Hans Joachim Christian Gram, e mette in evidenza alcune proprietà fondamentali della parete cellulare dei microrganismi.

rispetto ai batteri Gram-positivi come lo *S. aureus*. Grazie a questo studio, si è dimostrato che i due materiali sono efficaci nel sopprimere la crescita batterica e che sia per i batteri *S. aureus* che *E. coli*, la concentrazione ottimale per l'inibizione dei batteri è $8 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Altri studi condotti hanno dimostrato che delle matrici di idrogel con inclusioni regolari di nanoparticelle di lattice di polistirene sono in grado di modificare il grado di rigonfiamento e le loro proprietà ottiche a seconda delle dimensioni e concentrazione delle fasi disperse [47]. Analizzando in particolare la trasmittanza di alcuni campioni con differente concentrazione di particelle sospese, si nota come gli scaffolds possiedono una diversa trasmissione luminosa a diverse lunghezze d'onda e numero di nanoparticelle (figura 1.10). I campioni di idrogel contenenti fase dispersa diffondono infatti l'emissione elettromagnetica dello spettro visibile a seconda della lunghezza d'onda di emissione e della quantità di fase dispersa secondo l'equazione di Rayleigh.

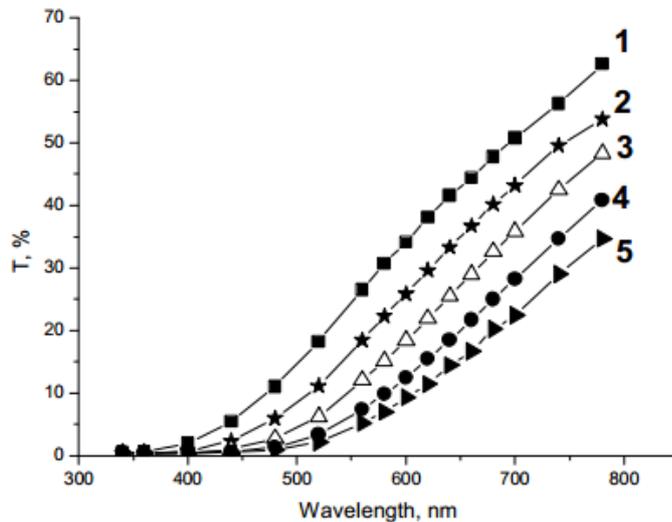


Figura 1.10: Trasmittanza di campioni di idrogel e nanoparticelle con raggio medio di 50nm in relazione alla lunghezza d'onda. La concentrazione di particelle corrisponde (in percentuale) a 0.11 (1);0.15 (2);0.21 (3);0.26 (4) and 0.29 (5)

Questa proprietà può essere utilizzata per costruire analisi diagnostiche, ad esempio per determinare lo zucchero nei sistemi biologici e biotecnologici utilizzando idrogel sensibili al glucosio. Inoltre fornisce un esempio di utilizzo dell'assorbanza per la valutazione di materiali solidi, come i gel.

Come descritto nelle sezioni precedenti, le misure ottiche sono largamente usate per la caratterizzazione dei materiali sia inorganici che organici. Tuttavia, molti approcci si limitano ad analizzare i campioni in due dimensioni ed alcuni, pur studiando i materiali nelle loro tre dimensioni, sono stati mutuati da indagini 2D e perciò presentano notevoli limitazioni.

Una linea di ricerca attiva presso il laboratorio di Ingegneria Cellulare e Molecolare "Silvio Cavalcanti" DEI - UOS Cesena, si propone di sviluppare metodi non invasivi al fine di caratterizzare le strutture tridimensionali e le colture che proliferano al loro interno. Queste tecniche sembrano essere molto promettenti per la valutazione non distruttiva di scaffolds per colture cellulari 3D.

Nel seguente lavoro di tesi, in particolare, si è fatto uso di nuove tecniche non invasive al fine di caratterizzare scaffolds vuoti a diverso contenuto di calcio, a partire dalle loro proprietà ottiche. Le misurazioni sono state svolte tramite due strumenti: un lettore multi piastra Tecan considerato come gold standard, e uno spettrofotometro portatile, realizzato dal Dr. Enrico Ravagli e dal Prof. Stefano Severi, con l'obiettivo futuro di poterlo installare all'interno di un bioreattore per il monitoraggio real-time delle colture cellulari.

Capitolo 2

MATERIALI E METODI

2.1 Il lettore multi piastra Tecan

La serie di lettori di micropiastre Tecan Infinite M200 2.1 permette il rilevamento della fluorescenza, della luminescenza o dell'assorbanza nei campioni studiati. E' dotato di software di controllo (i-control TM), che consente all'utente di configurare facilmente i protocolli per adattarli all'applicazione richiesta [48].



Figura 2.1: Tecan Infinite 200 Pro (<https://www.news-medical.net/Infinite-200-PRO-Microplate-Reader-from-Tecan>)

I componenti principali di questo strumento, riportati in figura 2.2 sono:

1. lampada flash
2. condensatore
3. ruota del filtro
4. monocromatore di eccitazione
5. fascio di fibre ottiche
6. monitor della lampada

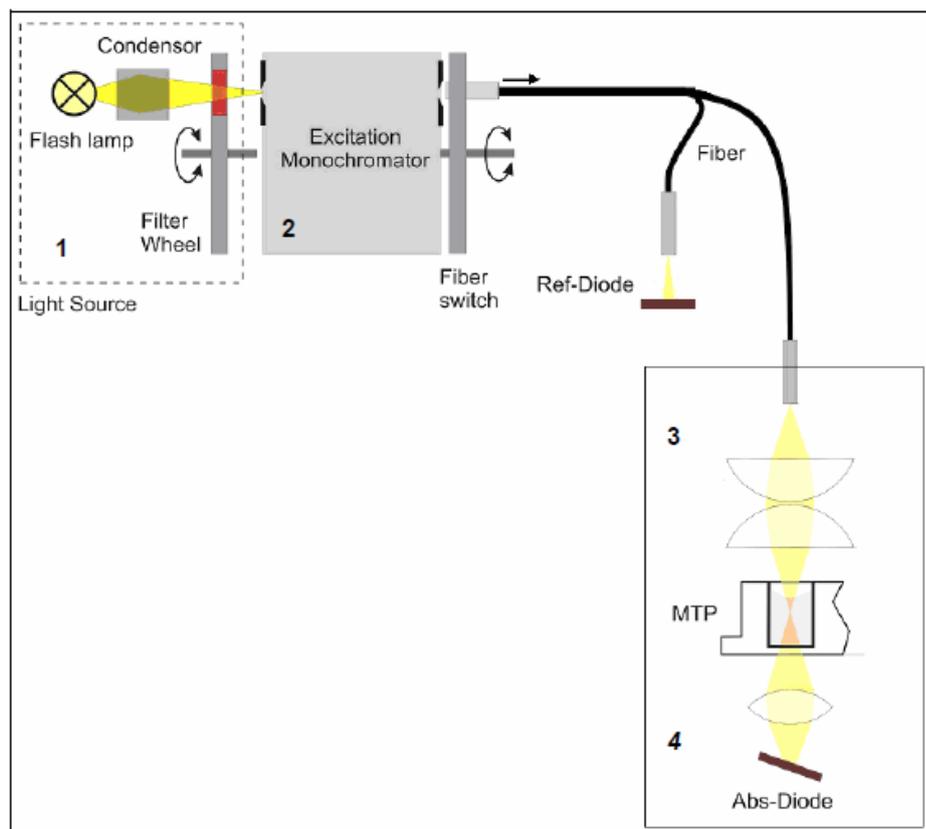


Figura 2.2: Schema di funzionamento del lettore multiplastra Tecan

Un fascio di fibre guida la luce dal monocromatore di eccitazione alla lente della micropiastra di assorbanza (MTP), che focalizza la luce nei pozzetti. La dimensione del fascio luminoso che viene indirizzato è di 0.7 mm di diametro.

Il modulo di misurazione dell'assorbanza MTP si trova sotto il piattino di supporto; questa componente viene utilizzata per misurare la luce trasmessa attraverso il campione. Prima di effettuare qualsiasi misura sulla micropiastra, viene eseguita una misurazione di riferimento con il piattino fuori dal fascio di luce.

In questo studio il Tecan è stato utilizzato come strumento gold standard, ovvero come riferimento per le misure di assorbanza. I valori ottenuti con questo strumento, considerando un range di lunghezze d'onda di stimolazione tra 400 e 1000 nm, sono stati confrontati con i risultati dello spettrofotometro portatile.

2.2 Lo spettrofotometro portatile

Come descritto nel capitolo precedente, lo scopo principale di questa tesi è la valutazione dell'efficacia di un metodo alternativo per la quantificazione dell'assorbanza di scaffold polimerici, utilizzando uno strumento di dimensioni ridotte, che possa essere integrato in un bioreattore.

Questo strumento, realizzato dall' Ing. Ravagli e disponibile presso il laboratorio di Ingegneria Cellulare e Molecolare "S. Cavalcanti", utilizza uno spettrometro della serie MS (C11708MA) che integra tecnologie dei micro-sistemi (MEMS) e sensori di immagine. Questi ultimi sono stati realizzati con la tecnologia CMOS e integrano un ricevitore di luce a fessura, mentre il sistema ottico interno è composto da una lente convessa sulla quale è impressa una griglia tramite la tecnica del nanoimprint (figura 2.3). Questo dispositivo ha una risoluzione spaziale di 20 nm e dimensioni decisamente ridotte (27.6 x 16.8 x 13 mm) e, pur combinato con la scheda di acquisizione e una struttura idonea al supporto dei campioni, risulta essere altamente

portatile e facilmente integrabile altri strumenti e sistemi per colture cellulari complesse [49].

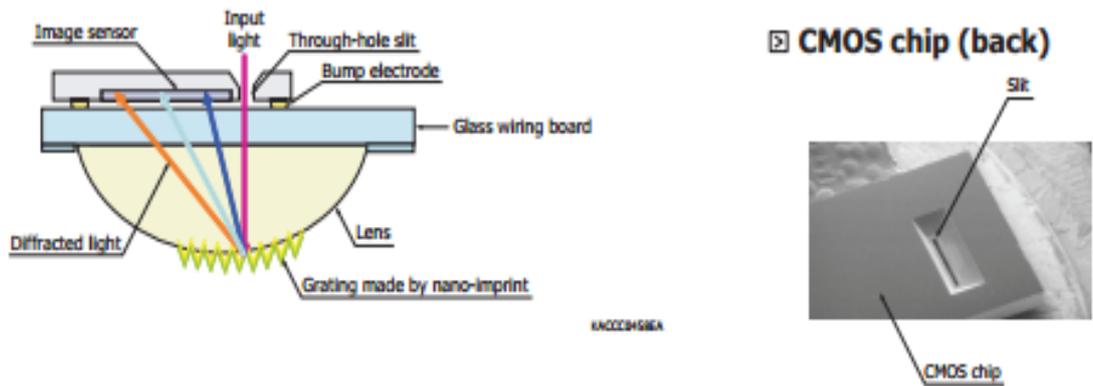


Figura 2.3: Sistema ottico dello spettrofotometro portatile.

Il sistema di alloggiamento dei campioni è stato realizzato *ad hoc* in stampa 3D, utilizzando il fotopolimero biocompatibile PolyJet (MED610), un materiale rigido per la prototipazione medica rapida che presenta un'elevata stabilità dimensionale ed è trasparente [32]. Una sua versione preliminare, in materiale non trasparente, è riportata in figura 2.4.

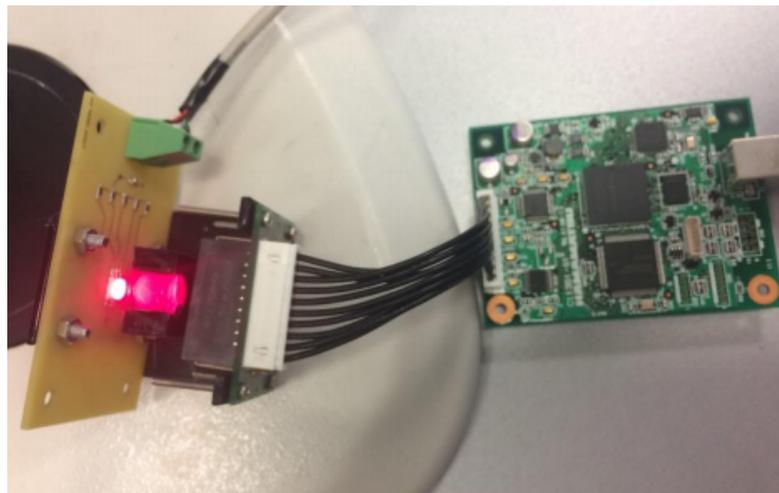


Figura 2.4: Configurazione dello spettrofotometro durante l'acquisizione dati.

Lo spettrofotometro, soprannominato “Casper”, misura la trasmittanza in un intervallo di lunghezze d’onda tra i 589 nm ed i 1093 nm. Per confrontare le misure acquisite con questo strumento e quelle acquisite con lo spettrofotometro professionale, si deve perciò convertire la trasmittanza in assorbanza, utilizzando la legge di Lambert-Beer trattata nel capitolo precedente.

2.3 Acquisizione dati

I due strumenti appena descritti sono stati utilizzati per misurare l’assorbanza di scaffolds vuoti, ovvero senza cellule, a diverso contenuto di calcio: 20 mM, 40 mM e 80 mM. Questo range permette di ottenere scaffolds con diverse caratteristiche microscopiche e macroscopiche e quindi di valutare accuratamente le performances del sistema di misura proposto. Gli scaffolds, inoltre, sono stati valutati a 0, 4, 7 e 11 giorni dalla polimerizzazione, in modo da studiare come la misura di assorbanza varia in funzione del tempo trascorso nelle normali condizioni di coltura, ovvero scaffolds mantenuti in ambiente liquido (terreno di coltura RPMI-1640) e ad una temperatura di 37°C.

Le misure sono state acquisite prima con lo spettrofotometro portatile e successivamente con quello professionale, in quanto le prime non richiedono la distruzione degli scaffolds (i campioni vanno invece sezionati per entrare all’interno della piastra di lettura del Tecan). Gli esperimenti si sono svolti in diverse giornate, acquisendo in media dalle 2 alle 6 misure per ogni concentrazione.

La misura con lo strumento portatile, effettuata con il software fornito dalla casa produttrice (HSMEvaluation), consiste nel posizionare lo scaffold nell’alloggiamento e coprirlo in modo da evitare l’interferenza della luce esterna prima di avviare l’acquisizione (“Start Measure Mode”).

In figura 2.5 si riporta un esempio di spettro di trasmittanza ottenibile con il sistema portatile, utilizzando un tempo di esposizione¹ di 5 ms e un measurement count (numero di misure per lunghezza d'onda) pari a 10.

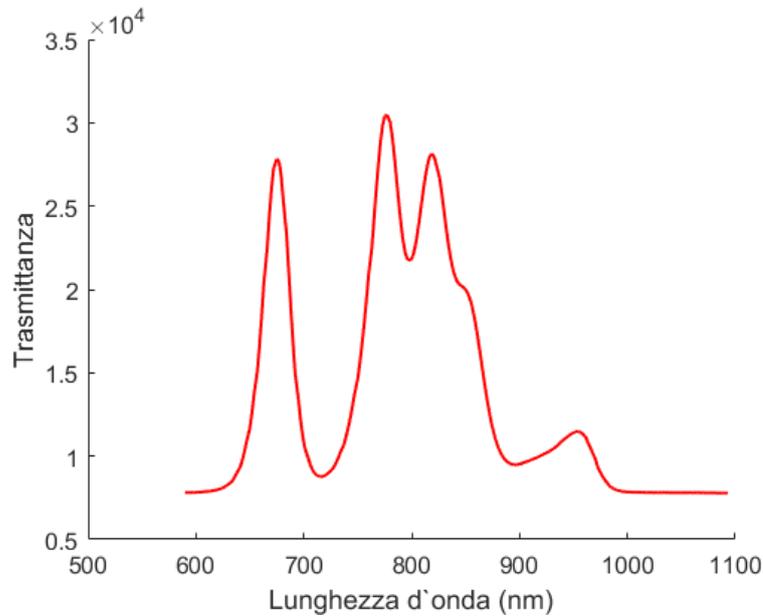


Figura 2.5: Spettro di uno scaffold al giorno 4 (20 mM).

Le misure vengono eseguite per entrambi i lati dello scaffold, visto che, in alcuni casi, il calcio precipita in fase di polimerizzazione e crea degli accumuli sul “fondo”. Di conseguenza la misura da entrambi i lati della struttura permette di valutare come queste imperfezioni in fase di produzione influenzino la misura. Nel seguito con L1 verranno indicate le misure nelle quali il “fondo” era rivolto verso la fonte di luce, mentre L2 identificherà le misure ottenute con il “fondo” più vicino al ricevitore.

Per l’acquisizione dei dati attraverso lo spettrofotometro professionale, i campioni devono essere sezionati in modo tale da entrare nella piastra di lettura.

¹Il tempo di esposizione, noto anche come velocità dell’otturatore, è il tempo in cui l’otturatore rimane aperto, permettendo alla luce di attraversare il sistema ottico [50]

In un primo momento gli scaffolds venivano sezionati con un bisturi cercando di riprodurre la geometria e le dimensioni del pozzetto; successivamente è stato sviluppato un nuovo metodo più consistente, che prevedeva il posizionamento dello scaffold sul pozzetto e l'inclusione all'interno di quest'ultimo aspirando l'aria sottostante lo scaffold con una siringa. Questo procedimento evita la variabilità dovuta alla precisione dell'operatore, in quanto l'integrità e la forma di alcuni scaffolds risultava più compromessa rispetto ad altri. Risulta inoltre essere una metodica più veloce e ripetibile.

Dopo aver selezionato i pozzetti di interesse, si procede anche con questo strumento all'acquisizione dati; questi vengono poi salvati su tabelle Excel.

Il numero totale di misure rilevate con i due spettrofotometri viene riportato di seguito nelle tabelle 2.1, 2.2, 2.3, divise per ogni concentrazione.

	giorno 0	giorno 4	giorno 7	giorno 11
14/05	0	2	0	0
17/05	3	0	3	0
21/05	0	3	0	0
24/05	3	0	3	0
28/05	0	3	0	3
31/05	0	0	3	0
04/06	0	3	0	3
07/06	5	0	3	0
11/06	0	3	0	3
14/06	0	0	0	0
TOTALE	11	14	12	9

Tabella 2.1: Numero di misure effettuate su scaffolds a 20mM di calcio

	giorno 0	giorno 4	giorno 7	giorno 11
14/05	0	2	0	0
17/05	3	0	2	0
21/05	0	3	0	0
24/05	3	0	3	0
28/05	0	3	0	3
31/05	0	0	3	0
04/06	0	2	0	3
07/06	6	0	2	0
11/06	0	3	0	3
14/06	0	0	1	0
TOTALE	12	13	11	9

Tabella 2.2: Numero di misure effettuate su scaffolds a 40mM di calcio

	giorno 0	giorno 4	giorno 7	giorno 11
14/05	0	2	0	0
17/05	3	0	2	0
21/05	0	3	0	0
24/05	3	0	3	0
28/05	0	3	0	3
31/05	0	0	1	0
04/06	0	2	0	3
07/06	6	0	3	0
11/06	0	4	0	3
14/06	0	0	2	0
TOTALE	12	14	11	9

Tabella 2.3: Numero di misure effettuate su scaffolds a 80mM di calcio

2.4 Elaborazione dati

Alla fine di ogni acquisizione, si è proceduto all'elaborazione dei dati attraverso uno Script di Matlab in modo da avere una valutazione preventiva degli spettri di assorbanza.

Si è graficato dunque l'andamento di assorbanza e di trasmittanza ponendo sulle ascisse le lunghezze d'onda ed in ordinata la media delle misure alla stessa concentrazione di calcio. Inoltre si è scelto di utilizzare la funzione *errorbar*, la quale grafica media e deviazione standard o errore standard per ogni lunghezza d'onda presa in esame, così da quantificare la variabilità delle misure.

ERRORE STANDARD L'errore standard (SE) di una statistica (di solito una stima di un parametro) è la deviazione standard della sua distribuzione campionaria. Se il parametro o la statistica è la media, come in questo caso, viene chiamato l'errore standard della media (SEM). Questo parametro valuta la variabilità del dato stimato, che in questo caso corrisponde alla media di tutti i campioni relativi alla stessa condizione. Si calcola dividendo la deviazione standard σ della popolazione per la radice quadrata del numero di n esperimenti effettuati, in questo caso 3:

$$SEM = \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \quad (2.1)$$

Al fine di ottenere una migliore rappresentazione, i dati sono stati inoltre normalizzati dividendo per il valore di lunghezza d'onda a 560 nm, che corrisponde alla lunghezza d'onda del terreno di coltura contenuto in ogni scaffold. Esempi di rappresentazioni così ottenute sono illustrati in figura 2.6 e 2.7, e riguardano l'assorbanza e la trasmittanza media di una popolazione di campioni.

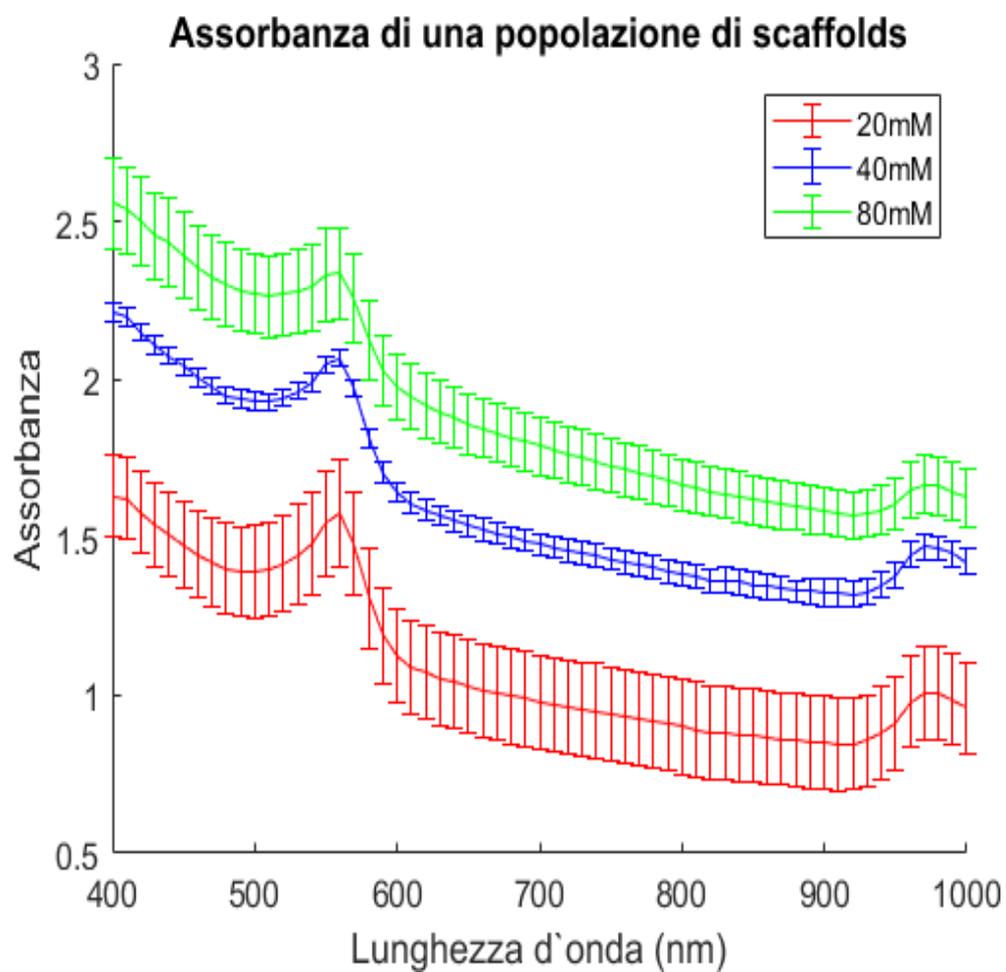


Figura 2.6: Errorbar di campioni al giorno 4 (misure al Tecan).

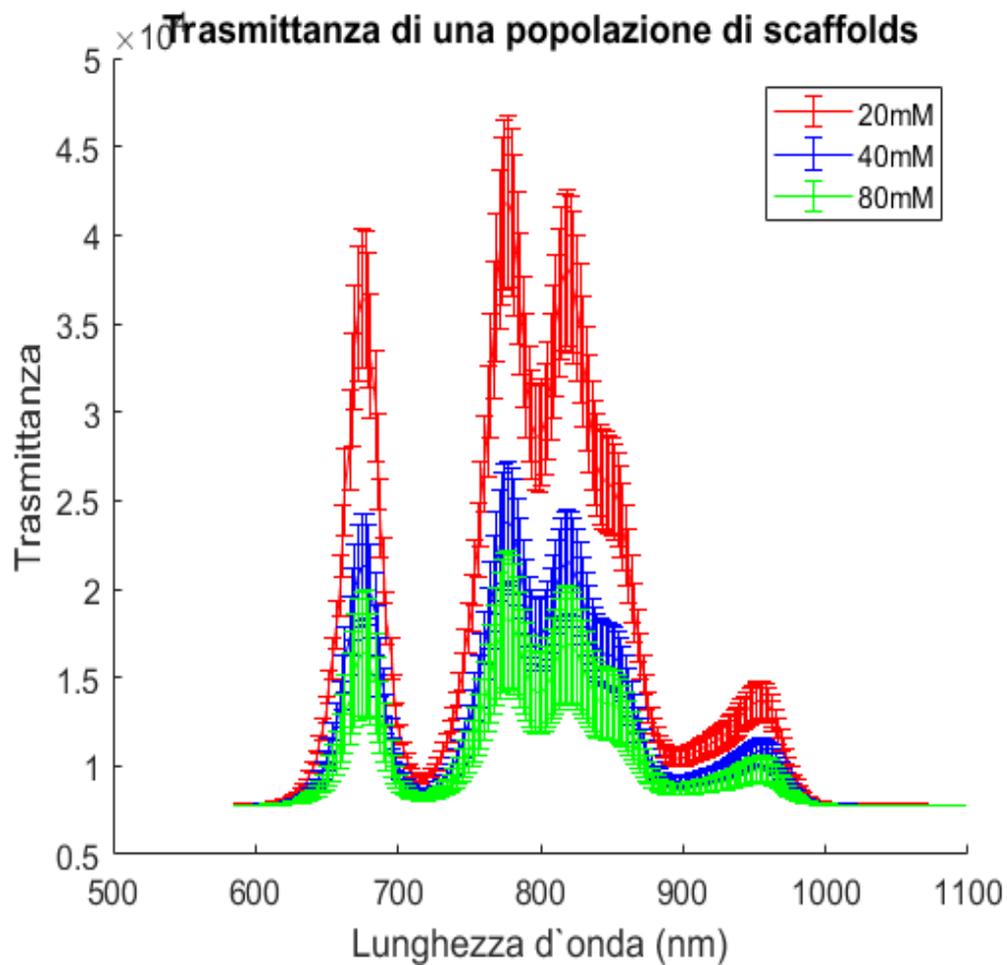


Figura 2.7: Errorbar di campioni al giorno 4, L2 (misure con sistema portatile).

Ci si è avvalso dell'utilizzo di Matlab anche successivamente, sia per valutare l'andamento dell'assorbanza nel tempo, sia per studiare la correlazione tra i due strumenti.

2.5 Correlazione

Per valutare l'affidabilità con cui un valore di assorbanza rilevato dallo strumento portatile corrisponde ad uno rilevato dal *gold standard*, si è utilizzata la correlazione di Pearson o coefficiente di correlazione lineare, un indice che esprime un'eventuale relazione di linearità tra due variabili statistiche. Date due variabili statistiche X e Y , esso si calcola come:

$$\rho_{X,Y} = \frac{cov(X, Y)}{\sigma_X * \sigma_Y} \quad (2.2)$$

dove $cov(X, Y)$ è la covarianza tra X e Y e σ_X , σ_Y sono le due deviazioni standard.

Il coefficiente assume sempre valori compresi tra -1 e 1: in particolare, se è positivo le variabili X e Y si dicono direttamente correlate in modo tanto maggiore quanto $\rho_{X,Y}$ è più vicino a 1, se è negativo le variabili X e Y si dicono inversamente correlate. Se invece l'indice è uguale a zero, i due metodi di misura non sono correlati.

Si è utilizzato uno script in ambiente Matlab per isolare le lunghezze d'onda comuni ad entrambi gli strumenti sulle quali si è poi valutato questo parametro.

2.6 Grafico di Bland-Altman

Il metodo di Bland-Altman è una tecnica statistica che consente sia di valutare la dimensione dell'accordo/disaccordo fra due metodi di misurazione, sia di individuare la presenza di eventuali differenze sistematiche, valori anomali (outlier) e particolari strutture di disaccordo (pattern) [51]. Bland e Altman proposero l'uso di un metodo grafico per rappresentare su un diagramma cartesiano la relazione tra i valori delle differenze di due misurazioni della stessa natura (asse delle ordinate) e la loro media (asse delle ascisse).

Assieme al grafico a dispersione risultante (*scatterplot*) vengono tracciate anche la linea relativa alla media delle differenze delle due misurazioni (*bias*)

e le linee corrispondenti ai limiti di concordanza del *bias* ($bias \pm 2\sigma$, dove σ rappresenta la deviazione standard). Il *bias* (errore medio sistematico) rappresenta la media delle differenze fra i risultati ottenuti con la prima metodica rispetto a quelli ottenuti con la seconda nella misurazione del fenomeno in esame e costituisce il baricentro dei punti sperimentali graficamente rappresentati; l'assunzione di una distribuzione normale delle differenze fra le due misurazioni, dovuta in genere all'effetto esercitato dal caso, consente di affermare che il 95% delle differenze sia compreso nell'intervallo: $bias \pm 2\sigma$. I punti che ricadono all'interno dei limiti di concordanza indicano che le due metodiche forniscono risultati congruenti, mentre i punti fuori dai limiti rappresentano i casi di effettiva discordanza.

Capitolo 3

RISULTATI E DISCUSSIONE

Il presente lavoro di tesi ha come obiettivo principale la caratterizzazione di scaffolds in alginato attraverso misure ottiche, al fine di rilevare le differenti concentrazioni di calcio presenti al loro interno. Tali misure sono state effettuate con uno strumento portatile (realizzato a basso costo) e uno professionale da banco; una comparazione dei due strumenti è stata inoltre effettuata per la validazione dello strumento portatile.

Al fine di ricavare un set di dati sperimentali consistenti, sono stati realizzati scaffolds a diversa concentrazione di calcio. La tabella 3.1 riportata di seguito riassume il numero di campioni processati, rispetto alle giornate/-concentrazioni considerate.

	20 mM	40mM	80mM
GIORNO 0	8	9	9
GIORNO 4	9	8	9
GIORNO 7	9	9	9
GIORNO 11	9	9	9

Tabella 3.1: Dati utilizzati per le successive valutazioni

Come anticipato nella sezione 2.1 sono state considerate due differenti metodologie per l'inclusione degli scaffolds nella piastra da leggere al Tecan.

Questi danno origine a spettri di assorbimento con caratteristiche molto diverse (figura 3.1). I risultati del primo metodo, che prevede di sezionare lo scaffold, sono riportati nel pannello di sopra e sono caratterizzati da una deviazione standard molto maggiore rispetto a quelli del secondo approccio (pannello inferiore), che utilizza una siringa per includere il campione nella piastra.

Questo risultato sottolinea quanto sia importante cercare di preservare l'integrità strutturale degli scaffolds per ottenere misure più coerenti e precise. Per questo motivo tutti i campioni acquisiti con il metodo a sezionatura sono stati esclusi dall'analisi descritta nei prossimi paragrafi.

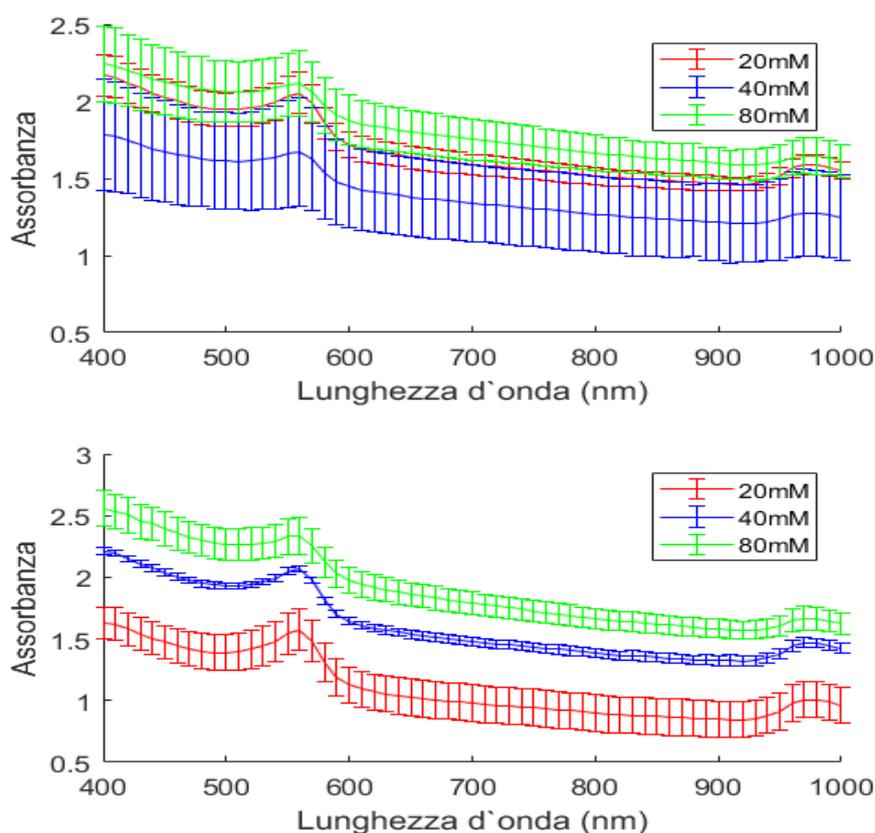


Figura 3.1: Confronto tra due metodi di inclusione degli scaffold nelle piastre da 96 pozzetti. Metodo a sezionatura (sopra) e ad aspirazione (sotto).

3.1 Risultati dello spettrofotometro professionale

3.1.1 Andamento dell'assorbanza nel tempo

Inizialmente la variazione di assorbanza nel tempo, per le diverse concentrazioni di calcio testate, è stata valutata tramite il lettore multi piastra Tecan.

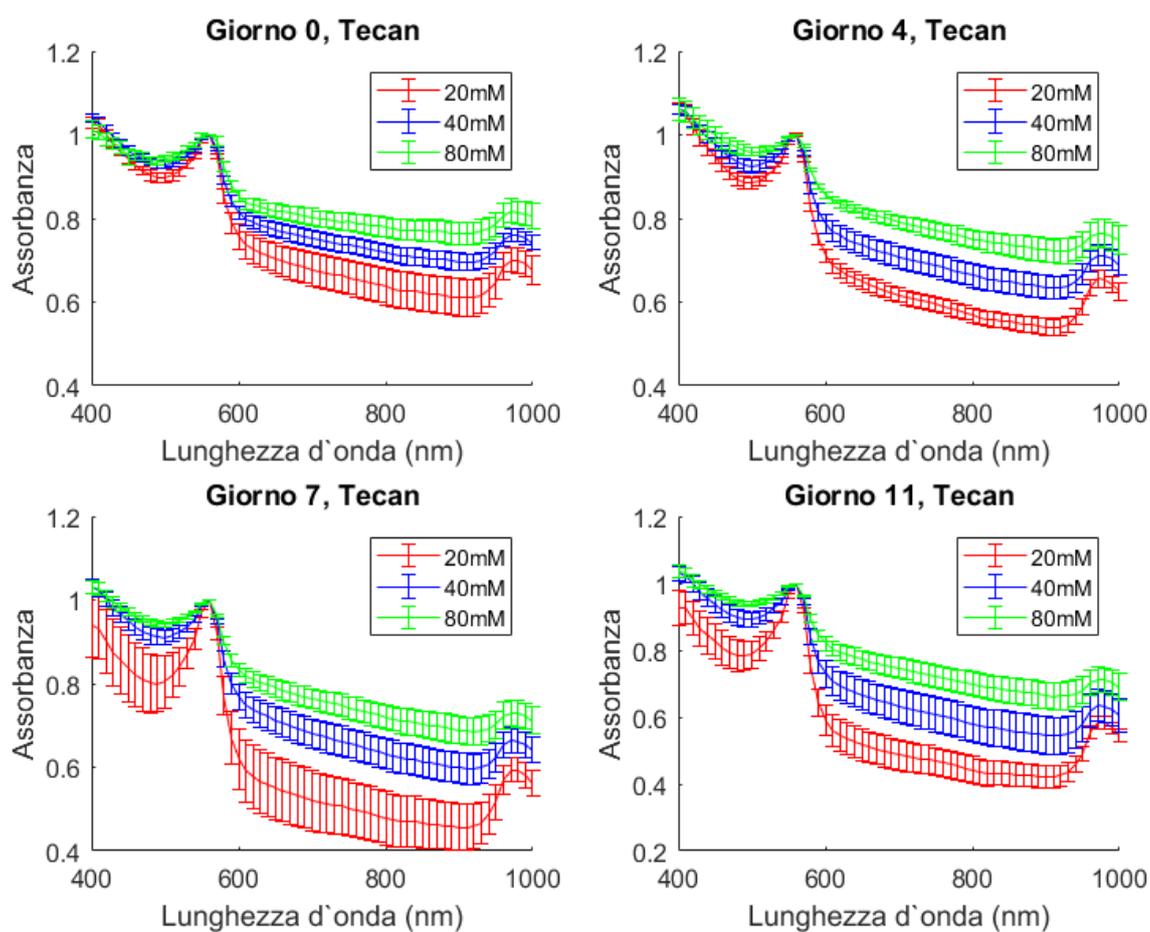


Figura 3.2: Andamenti dell'assorbanza delle tre concentrazioni di calcio nelle quattro giornate (misurati col Tecan).

Questa analisi permette di caratterizzare l'effetto delle normali condizioni di coltura cellulare (ambiente liquido, temperatura di 37°C e 5 % CO₂) sull'integrità strutturale degli scaffolds e sulle loro proprietà ottiche. I risultati di questa analisi sono riportati in Figura 3.2 e descritti in dettaglio nel seguito.

GIORNO 0 Analizzando il grafico in figura 3.2, risulta chiaro come il contenuto di carbonato di calcio degli scaffolds sia discriminabile attraverso le misure di assorbanza, nonostante l'alta similarità tra le condizioni. Al crescere della concentrazione di $CaCO_3$, infatti, l'assorbanza aumenta in tutto l'intervallo di lunghezze d'onda considerato.

Si può dunque affermare che la concentrazione di carbonato di calcio nella struttura risulti proporzionale alla luce assorbita dal campione. Il giorno successivo alla polimerizzazione, tuttavia non è il momento ideale per questa valutazione, vista la più alta similarità tra le condizioni, rispetto alle altre giornate.

GIORNO 4 Dopo quattro giorni dalla polimerizzazione, il range dinamico degli spettri di assorbanza risulta maggiore. Valutando ad esempio l'assorbanza nel range di lunghezze d'onda 600-900 nm, si può constatare come i campioni con concentrazione di carbonato di calcio 20 mM abbiano un'assorbanza minore, rispetto alla prima misura, con un abbassamento medio del 6%. Questo comportamento si verifica anche per gli scaffolds a 40 e 80 mM, seppure con un'ampiezza minore (abbassamento medio del 3.5 e 1.5 %, rispettivamente). Questo fenomeno, probabilmente dovuto ad un'influenza della concentrazione di $CaCO_3$ sulle dinamiche di assestamento degli scaffolds contribuisce a rendere le tre condizioni facilmente distinguibili.

GIORNO 7 La diminuzione di assorbanza valutata al giorno 4 continua anche ad una settimana dalla polimerizzazione, sia per i campioni a 20 mM di calcio che per quelli a 40 mM (abbassamento medio rispetto al giorno 0 di

15.5 e 7.5 % rispettivamente). I campioni contenenti 80 mM di calcio, invece risultano avere un'assorbanza paragonabile a quella registrata al giorno 4.

GIORNO 11 Nelle misurazioni del giorno 11, si confermano gli andamenti delle giornate precedentemente analizzate: l'assorbanza per gli scaffolds a 20 mM diminuisce ancora, così come in modo più lieve quella degli scaffolds a 40 mM. Lo spettro relativo ai campioni a 80 mM risulta quasi inalterato rispetto al giorno 7.

Da questa analisi pare che i campioni con una più alta concentrazione di calcio si comportino in modo diverso dagli altri. Questo potrebbe essere spiegato considerando che campioni con una concentrazione di $CaCO_3$ superiore a 50 mM presentano delle disomogeneità, dovute alla precipitazione del carbonato di calcio. Ciò causa la formazione di due fasi distinte: una gelatinosa e dal colore più trasparente e tendente al rosa; l'altra più concentrata e di colore tendente al bianco (figura 3.3, immagine a destra).



Figura 3.3: Esempio di scaffolds a concentrazione 20, 40, 80 mM di $CaCO_3$.

Questa disomogeneità, presente solo negli scaffolds a concentrazione di calcio più alta (figura 3.3) si traduce, nel tempo, in una perdita di integrità strutturale che influenza la misura di assorbanza.

La diminuzione di assorbanza nel tempo, invece, potrebbe essere legata al processo di gelazione interna discusso nel 1.3, che sfrutta una reazione chimica in grado di scindere il carbonato di calcio in ioni calcio e anidride

carbonica. La formazione di quest'ultima si traduce nella crezione di bolle di CO_2 in quantità proporzionale alla concentrazione di carbonato di calcio che rimangono intrappolate nella matrice di alginato (Figura 3.4). Queste sacche di gas vengono poi gradualmente sostituite dal terreno di coltura andando a modificare l'assorbanza media del campione.

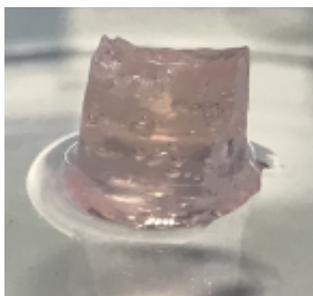


Figura 3.4: Esempio di scaffold con bolle visibili al suo interno.

3.2 Risultati dello spettrofotometro portatile

Le indagini effettuate con il lettore multi piastra Tecan, volte ad indagare le proprietà ottiche delle matrici di alginato, sono state svolte anche con lo spettrofotometro portatile “Casper”, il cui funzionamento è stato spiegato nella sezione 2.2. Uno degli obiettivi di questo lavoro di tesi è stato infatti studiare la relazione che lega le misure ottenute con questi due strumenti.

Anche per i dati ricavati con questo dispositivo si è calcolato media ed errore standard dei campioni acquisiti alla stessa concentrazione. Inoltre, si è provveduto a trasformare la trasmittanza in assorbanza al fine di rendere lo spettro di Casper confrontabile con quello del Tecan.

Avendo acquisito le misure di assorbanza per entrambi gli orientamenti degli scaffolds, si riportano i rispettivi grafici valutandone in seguito anche le differenze.

3.2.1 Andamento dell'assorbanza nel tempo (L1)

Confrontando gli spettri ottenuti con i due strumenti (figure 3.2, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8), si nota come gli spettri di assorbanza abbiano una forma diversa.

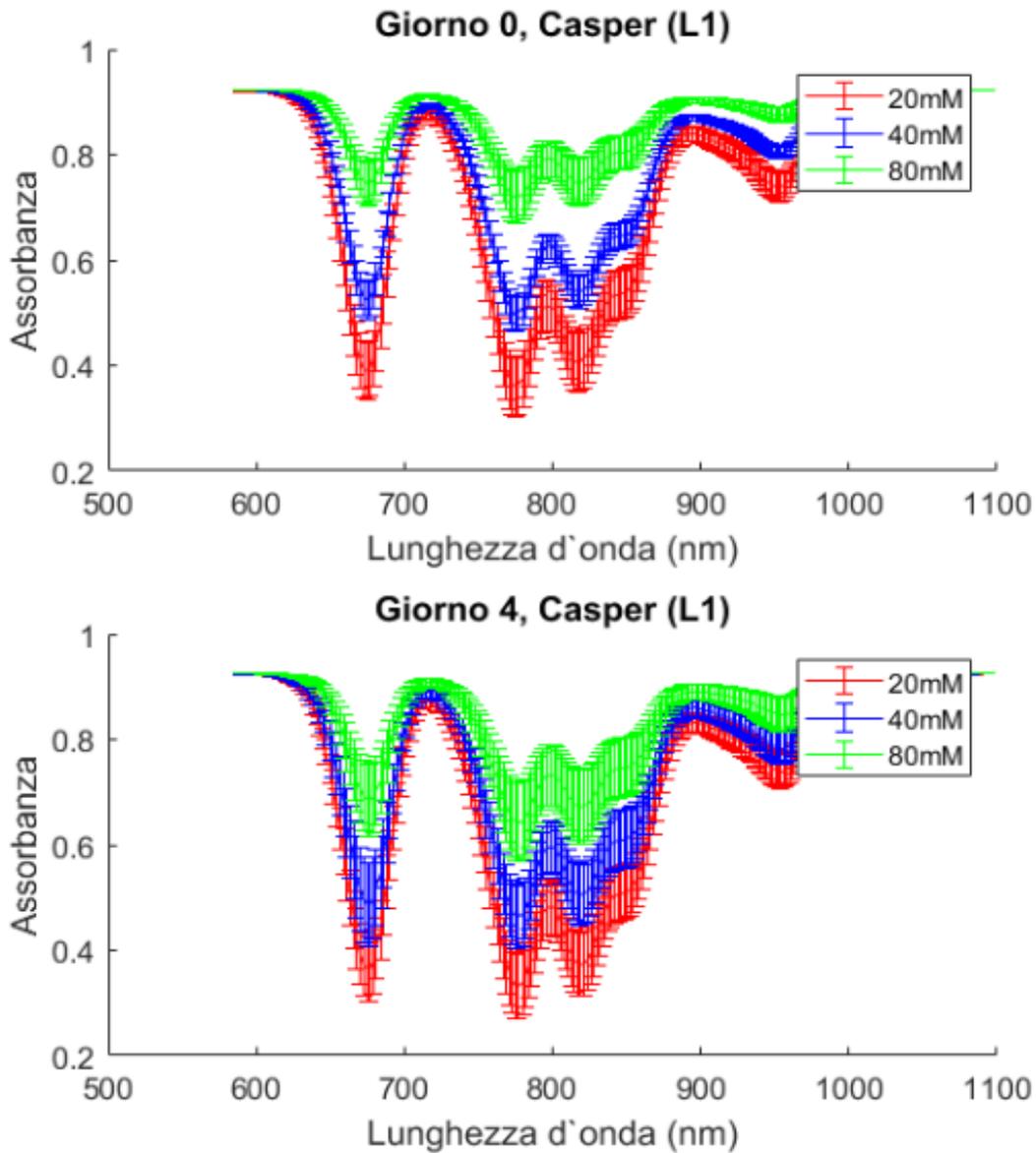


Figura 3.5: Andamenti dell'assorbanza delle tre concentrazioni di calcio al giorno 0 (sopra) e 4 (sotto), lato L1.

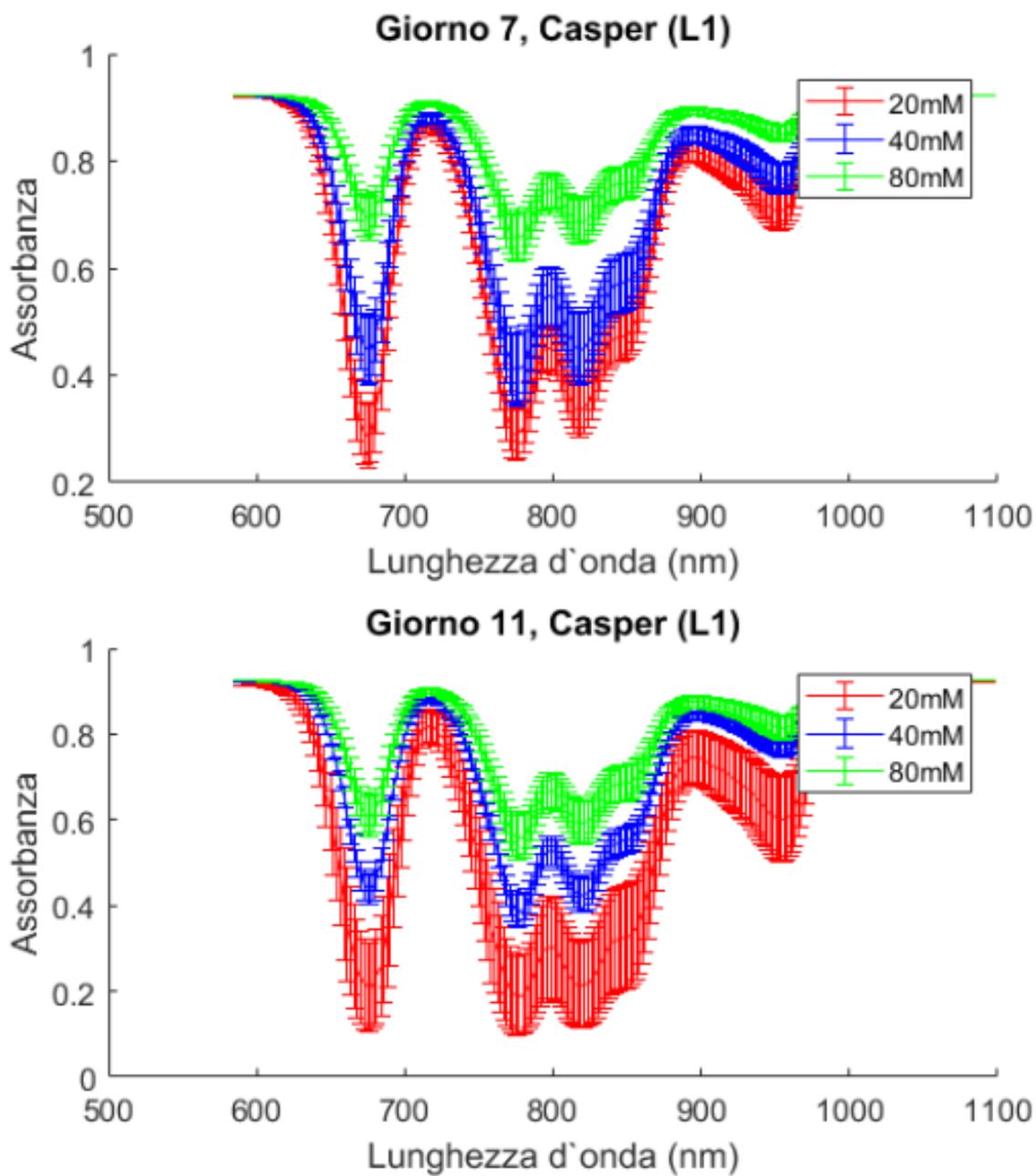


Figura 3.6: Andamenti dell'assorbanza delle tre concentrazioni di calcio al giorno 7 (sopra) e 11 (sotto), lato L1.

3.2.2 Andamento dell'assorbanza nel tempo (L2)

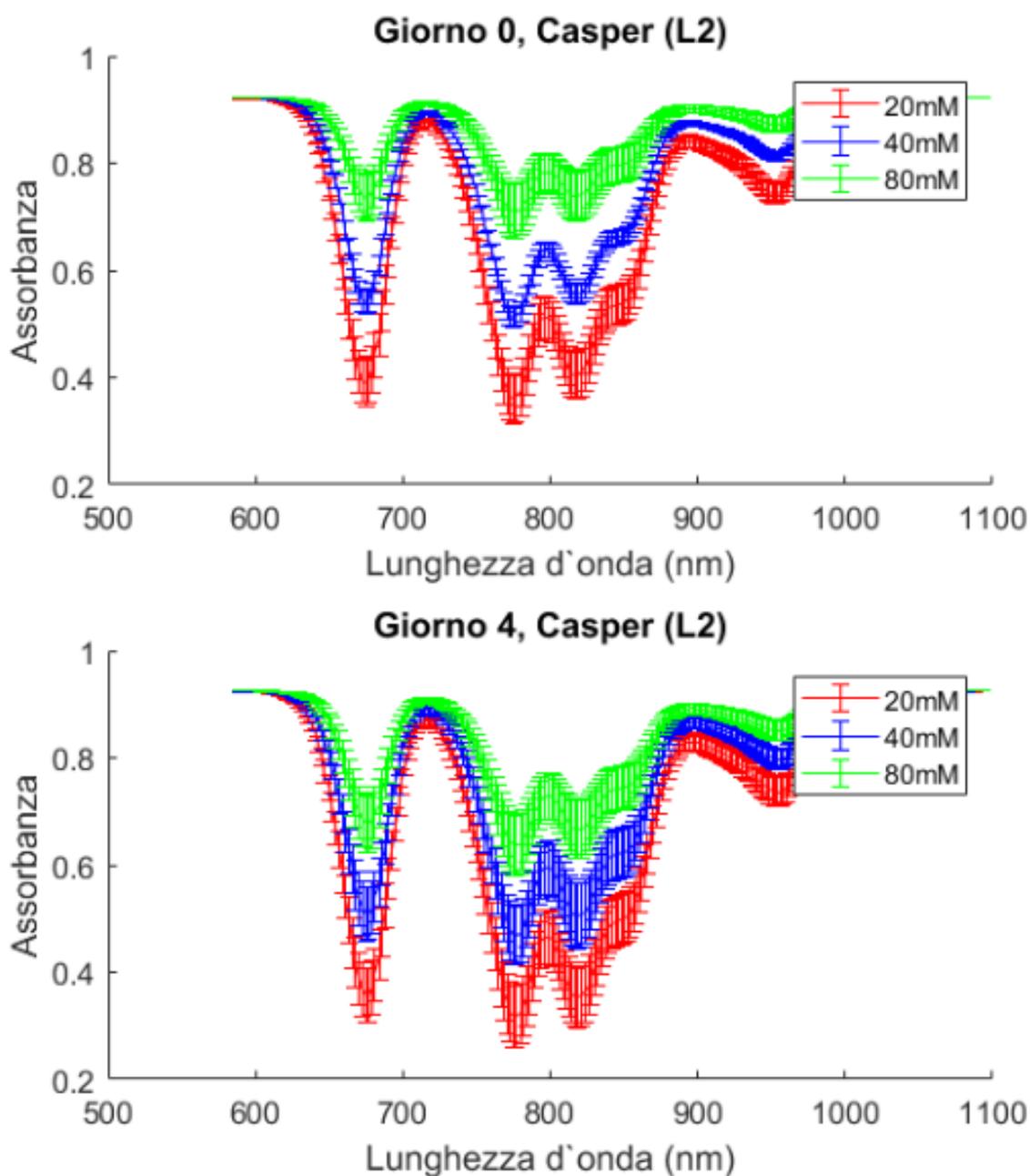


Figura 3.7: Andamenti dell'assorbanza delle tre concentrazioni di calcio al giorno 0 (sopra) e 4 (sotto), lato L2.

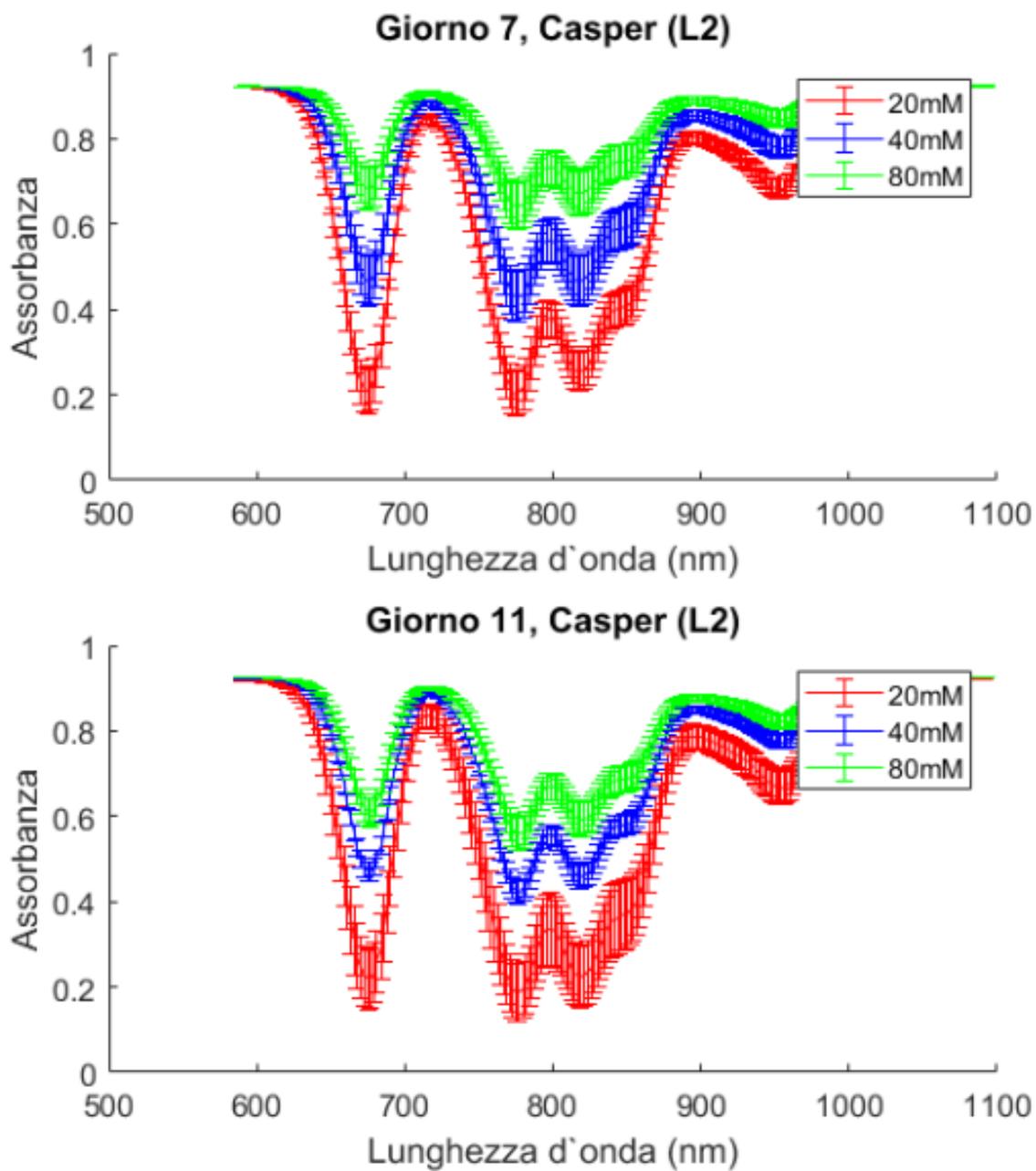


Figura 3.8: Andamenti dell'assorbanza delle tre concentrazioni di calcio al giorno 7 (sopra) e 11 (sotto), lato L2.

Questa divergenza è dovuta al fatto che la sorgente di luce dello strumento portatile è costituita da 5 led - ognuno avente una lunghezza d'onda di eccitazione differente - i quali emettono luce contemporaneamente; la sovrapposizione delle stimolazioni genera uno spettro di intensità non uniforme. Lo strumento professionale, invece, è in grado di emettere ogni lunghezza d'onda di stimolazione singolarmente portando ad una stimolazione uniforme su tutto il range considerato.

Nonostante lo strumento *Casper* sia meno complesso rispetto al *gold standard*, la sua precisione risulta sufficiente ed adeguata per caratterizzare le matrici di alginato. E' infatti possibile osservare come l'andamento degli spettri di assorbimento dei campioni presi in esame sia coerente con quello dello strumento professionale: gli scaffolds a più alta concentrazione assorbono una maggior quantità di radiazioni visibili e infrarosse rispetto a scaffolds a concentrazione minore. Si può dunque affermare che le considerazioni inerenti lo spettrofotometro professionale valgono anche per lo strumento portatile.

3.2.3 Valutazione dei due orientamenti L1 e L2

Le misure eseguite per i due lati dello scaffold sono risultate essere differenti: in particolare, gli spettri di L2 presentano un errore standard decisamente minore. Ciò significa che i valori di assorbanza dei campioni alla stessa concentrazione risultano essere più simili nel lato dove il fondo è più vicino al ricevitore rispetto al lato dove il fondo è rivolto verso la fonte di luce.

La spiegazione di questa diversità è dovuta al fenomeno di dispersione (*scattering* in inglese), ovvero il processo per cui le radiazioni incidenti sulla superficie del campione vengono deflesse a causa della collisione con altre particelle. Lo *scattering* si distingue dalla riflessione e dalla rifrazione in quanto le deflessioni si presentano in modo disordinato e per lo più casuale.

Questo fenomeno avviene con maggior probabilità sul lato L1; la fonte di luce viene subito in contatto con una superficie le cui caratteristiche aumentano la possibilità di un cambio di traiettoria delle onde incidenti. Ciò va a com-

promettere la precisione dei risultati ottenuti dalle misurazioni.

Per questa ragione, le misure effettuate ponendo la parte superiore dello scaffold più prossima alla sorgente di luce sono da preferire. Questa affermazione risulta comprovata anche dalle indagini sulla correlazione riportate in seguito.

3.3 Correlazione

Successivamente è stata eseguita un'analisi di correlazione tra i due strumenti per determinare la concordanza tra le loro misure. Il coefficiente di Pearson è stato calcolato per ogni lunghezza d'onda comune ai due strumenti e l'analisi di questi risultati ha permesso di determinare il segnale di stimolo ottimale per valutare la concentrazione di $CaCO_3$ in scaffolds di alginato. I due lati degli scaffolds sono risultati associati a risultati diversi, 830 nm ($R^2=0.97$) per L1 e 710 nm ($R^2=0.98$) per L2. Di conseguenza risulta chiaro come i valori di assorbanza misurati dai due strumenti siano altamente correlati e come fare acquisizioni secondo la configurazione L2 porti a risultati migliori. Nei grafici in figura 3.9, sono rappresentati dodici punti riferiti ai valori di assorbanza alla lunghezza d'onda per la quale vi è massima correlazione degli scaffolds a 20, 40 e 80 mM nelle quattro giornate. Attraverso la funzione *errorbarxy*, è possibile valutare l'errore standard sulle misure effettuate con lo strumento professionale (in nero) e su quelle con il sistema portatile (in rosa).

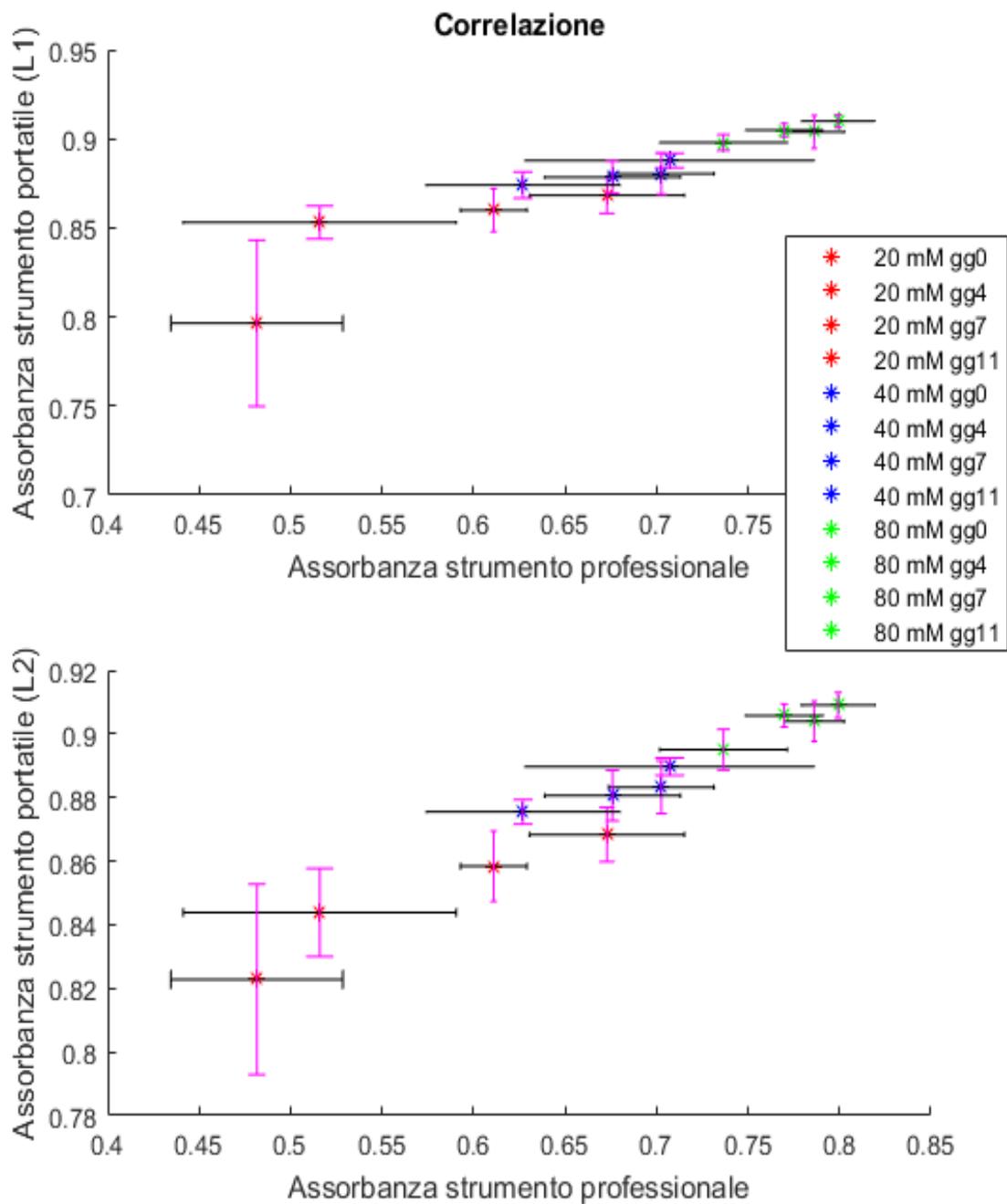


Figura 3.9: Correlazione tra il gold standard ed i due lati dello strumento *Casper*.

Si può notare che esiste una relazione lineare tra le due misurazioni, la cui retta interpolante viene descritta dall'equazione:

$$Assorbanza_{SISTEMAPORTATILE} = a * Assorbanza_{GOLDSTANDARD} + b \quad (3.1)$$

Nel caso di L1, si ha che $a=0.2877$ e $b=0.6824$ (figura 3.10).

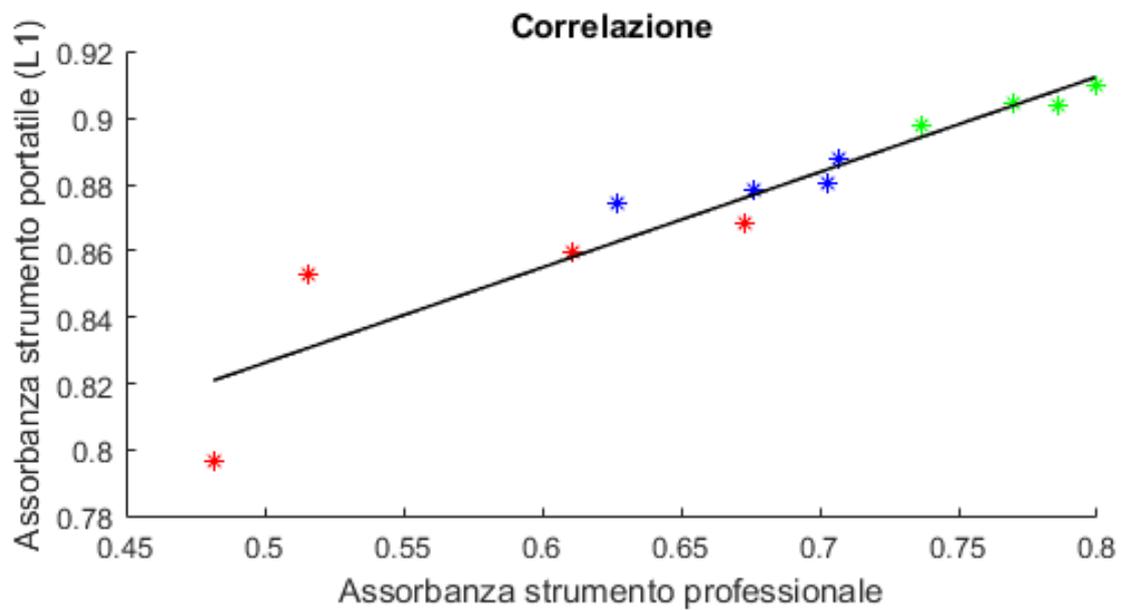


Figura 3.10: Relazione lineare strumento professionale - strumento portatile (L1)

Nel caso di L2, si ha invece che $a=0.2552$ e $b=0.706$ (figura 3.11).

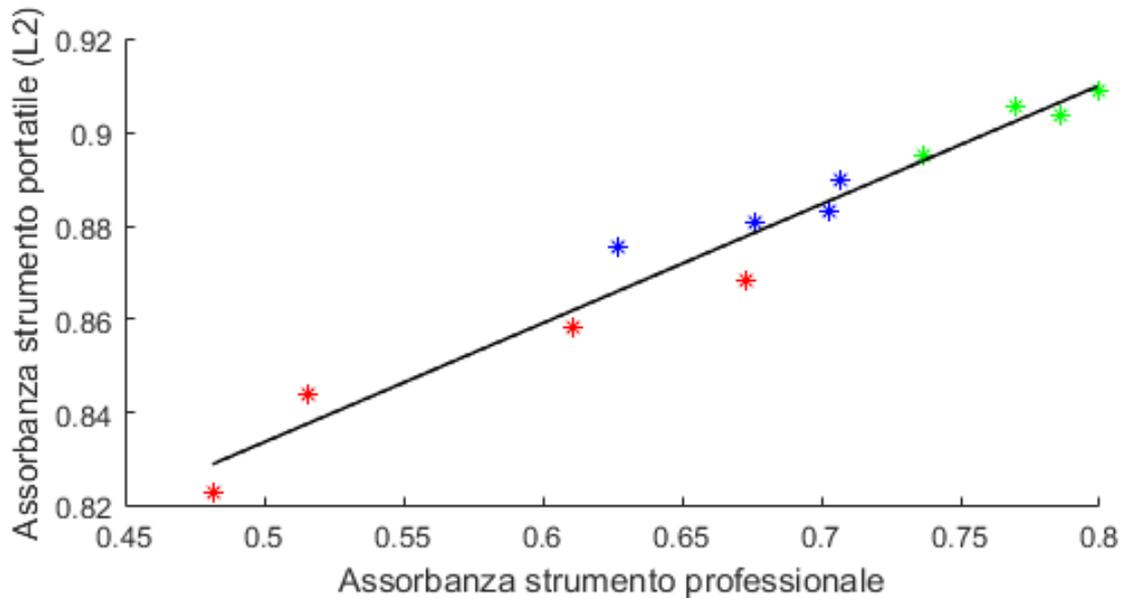


Figura 3.11: Relazione lineare strumento professionale - strumento portatile (L2)

I risultati ottenuti dimostrano l'equivalenza dei due strumenti e quindi la possibilità di quantificare in maniera non distruttiva la concentrazione di calcio in scaffold di alginato.

3.4 Grafico di Bland-Altman

I risultati del confronto tra i due strumenti riportati nella sezione precedente sono ulteriormente confermati dal grafico di Bland-Altman, che riporta la relazione tra la differenza tra le due misure e la loro media. Come mostrato in Figure 3.12 e 3.13 tutti i punti sperimentali si collocano all'interno dell'intervallo di confidenza (linee tratteggiate) e il bias (linea continua) è nullo.

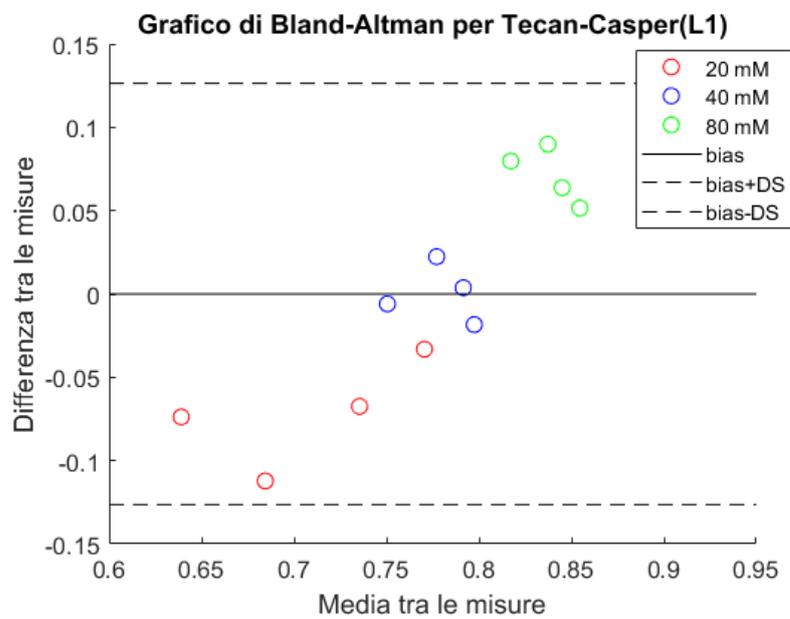


Figura 3.12: Grafico di Bland-Altman strumento professionale - strumento portatile (L1).

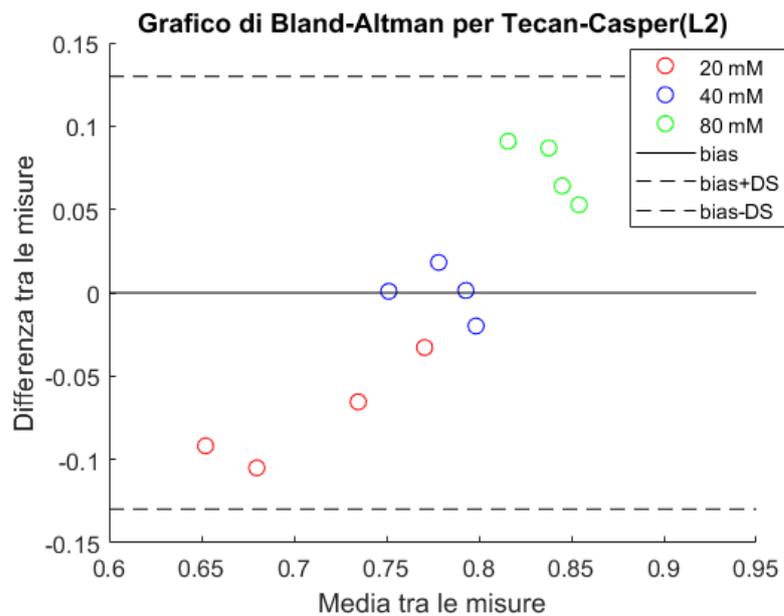


Figura 3.13: Grafico di Bland-Altman strumento professionale - strumento portatile (L2).

Questi grafici evidenziano una dipendenza dell'errore dalla concentrazione di calcio che sembra indicare una tendenza di Casper a sovrastimare l'assorbimento dei campioni a 20 mM e a sottostimare quelli a 80 mM. Questa caratteristica, comune sia a L1 che a L2 tenderebbe ad identificare 40 mM di $CaCO_3$ come la condizione ideale per un futuro utilizzo di Casper per la valutazione della densità cellulare.

Conclusioni e sviluppi futuri

Il presente lavoro di tesi si inserisce in una linea di ricerca attiva presso il laboratorio di Ingegneria Cellulare e Molecolare "Silvio Cavalcanti" DEI - UOS Cesena, che si propone di sviluppare strumenti e metodologie per la misura non invasiva delle proprietà di scaffolds tridimensionali e delle cellule al loro interno. Per questo studio, in particolare, sono stati considerati i metodi di misura ottici, che sono largamente utilizzati per la caratterizzazione dei materiali sia inorganici che organici. Tuttavia, molti approcci correntemente utilizzati si limitano ad analizzare i campioni in due dimensioni ed altri, pur studiando i materiali nelle loro tre dimensioni, sono stati mutuati da indagini 2D e perciò presentano notevoli limitazioni.

Di conseguenza gli scopi principali di questo lavoro sono stati lo sviluppo di un metodo di misura ottico nativo per il 3D in grado di quantificare il contenuto di calcio di scaffold di alginato privi di cellule e la validazione di uno spettrofotometro portatile in grado di effettuare questa misura. Questo sistema ha dimensioni contenute ma performances comparabili a quelle di uno strumento da banco, considerato come gold standard, su tutto il range di concentrazioni di calcio considerate.

Questo risultato apre numerose prospettive future, sia per quanto riguarda lo sviluppo di nuove metodiche di indagine non invasive, sia per l'ingegneria dei tessuti in generale. Infatti il metodo sviluppato in questa tesi verrà ulteriormente caratterizzato e utilizzato su scaffolds contenenti popolazioni cellulari, per valutarne la densità in maniera non-distruttiva.

Le dimensioni ridotte di questo strumento, inoltre, ne permetteranno l'integrazione in un bioreattore, un dispositivo in grado di mantenere efficacemente condizioni di coltura controllate (es. sterilità, temperatura, concentrazione nutrienti) e che permette di monitorare in maniera semplice e veloce i più importanti parametri di crescita e differenziamento. Questo sviluppo fornirà uno strumento importante ai ricercatori che avranno modo di monitorare la crescita delle loro colture 3D in *real-time* e in maniera non distruttiva.

Questi vantaggi si combineranno con quelli delle colture tridimensionali e con il loro progressivo sviluppo. I sistemi analizzati, infatti, mostrano interessanti potenzialità e possono essere sfruttati per diverse applicazioni. Ad esempio, alcuni studi hanno dimostrato la loro efficacia nello screening di farmaci antitumorali data la loro più accurata riproduzione della progressione dei tumori umani [52]. Altri studi hanno invece evidenziato la loro utilità nel campo della rigenerazione tissutale. In questo ambito, infatti, l'utilizzo di strutture 3D che mimino più fedelmente le caratteristiche fisiologiche dei tessuti potrebbe fornire un'importante strumento, sia in ambito di ricerca che in clinica, visto che l'utilizzo di cellule autologhe ridurrebbe la risposta infiammatoria post-impianto.

Per concludere, la validazione di tecniche di indagine capaci di effettuare misure non distruttive nelle tre dimensioni, come quella presentata nel presente elaborato di tesi, costituirà un importante passo in avanti nell'ambito dell'ingegneria tissutale, in quanto fornirà un contributo fondamentale nell'affermazione dei sistemi di coltura cellulare 3D. Questo risultato porterà notevoli miglioramenti nell'ambito della sperimentazione *in vitro* migliorandone la precisione e l'affidabilità.

Bibliografia

- [1] Hutmacher D. W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*, 21:2529–2543, 2000.
- [2] Wang Y.L. Discher D.E., Janmey P. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science*, 310:1139–1143, 2005.
- [3] Poondru S. et al. Lack of in vitro-in vivo correlation of a novel investigational anticancer agent, sh 30. *Invest New Drugs*, 20:23–33, 2002.
- [4] Wang F. Weaver V.M., Petersen O.W. Reversion of the malignant phenotype of human breast cells in three-dimensional culture and in vivo by integrin blocking antibodies. *Journal of Cell Biology*, 1:130–131, 1997.
- [5] Cukierman E. Yamada K.M. Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3d. *Cell*, 130:601–610, 2007.
- [6] Sasai Y. Next-generation regenerative medicine: Organogenesis from stem cells in 3d culture. *Cell Stem Cell*, 12:520–530, 2013.
- [7] Morgan J.R. Achilli T.M., Meyer J. Advances in the formation, use and understanding of multi-cellular spheroids. *Expert Opin Biol Ther*, 12:1347–1360, 2012.
- [8] Castaneda J. Friedrich J., Eder W. A reliable tool to determine cell viability in complex 3-d culture: the acid phosphatase assay. *J Biomol Screen*, 12:925–937, 2007.

- [9] Charnley M. Håkanson M., Cukierman E. Miniaturized pre-clinical cancer models as research and diagnostic tools. *Adv Drug Deliv Rev*, 0:52–66, 2014.
- [10] Bonadio J. Shea L., Smiley E. Dna delivery from polymer matrices for tissue engineering. *Nature Biotechnology*, 17:551–554, 1999.
- [11] Tomlins P.E. Mather M.L. Hydrogels in regenerative medicine: towards understanding structure-function relationships. *Regenerative Medicine*, 5:809–821, 2010.
- [12] Doviner V. Azab A., Orkin B. Crosslinked chitosan implants as potential degradable devices for brachytherapy: In vitro and in vivo analysis. *J Control Release*, 111:281–289, 2006.
- [13] Erickson K. Dawson E., Mapili G. Biomaterials for stem cell differentiation. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60:215–228, 2008.
- [14] Khutoryanskiy V. V. Caló E. Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. *European Polymer Journal*, 65:252–267, 2015.
- [15] Ahmed E. M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *Journal of Advanced Research*, 6:105–121, 2015.
- [16] Mooney D. J. Drury J. L. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials*, 24:4337–4351, 2003.
- [17] Manivasagan P. Venkatesan J., Bhatnagar I. Alginate composites for bone tissue engineering: a review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72:269–281, 2015.
- [18] Mooney D.J. Lee K.Y. Hydrogels for tissue engineering. *Chemical Reviews*, 101:1869–1880, 2001.

- [19] Peppas N. Hydrogels and drug delivery. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 2:531–537, 1997.
- [20] Skjak Brik G. Smidsrød O. Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends in biotechnology*, 8:71–78, 1990.
- [21] Mercer A.D. Johnson F. A., Craig D.Q.M. Characterization of the block structure and molecular weight of sodium alginates. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 49:639–643, 1997.
- [22] Mooney D. J. Drury J. L. Rigidity of two-component hydrogels prepared from alginate and poly(ethylene glycol)-diamines. *Macromolecules*, 32:5561–5566, 1999.
- [23] Eiselt P. Lee K.Y., Rowley J.A. Controlling mechanical and swelling properties of alginate hydrogels independently by cross-linker type and cross-linking density. *Macromolecules*, 33:4291–4294, 2000.
- [24] Marrulli V. *Scaffold 3D in indrogel di alginato per l'ingegneria dei tessuti biologici*. Tesi di laurea, Università degli Studi di Bologna, 2016-2017.
- [25] Wee S.F. Gombotz W.R. Protein release from alginate matrices. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 31:267–285, 1998.
- [26] Skjåk-Bræk G. Martinsen A., Storrø I. Alginate as immobilization material: Iii. diffusional properties. *Biotechnol. Bioeng*, 39:186–194, 1992.
- [27] Huang T. J. Lien S. M., Ko L. Y. Effect of pore size on ecm secretion and cell growth in gelatin scaffold for articular cartilage tissue engineering. *Acta biomaterialia*, 5(2):670–679, 2009.
- [28] Smidsrød O. Martinsen A., Skjåk-Bræk G. Alginate as immobilization material: I. correlation between chemical and physical properties of alginate gel beads. *Biotechnol. Bioeng*, 33:79–89, 1989.

- [29] Paoletti S. Donati I. Material properties of alginates. *Alginates: Biology and Applications*, 13:1–53, 2009.
- [30] Ma P.X. Kuo C.K. Ionically crosslinked alginate hydrogels as scaffolds for tissue engineering: Part 1. structure, gelation rate and mechanical properties. *Biomaterials*, 22:511–521, 2001.
- [31] Ma P.X. Kuo C.K. Effect of injectable alginate implant on cardiac remodeling and function after recent and old infarcts in rat. *Circulations*, 117:1388–1396, 2008.
- [32] Fioravanti A. *Sviluppo di metodi per misure non distruttive di matrici tridimensionali di Alginato*. Tesi di laurea magistrale, Università degli Studi di Bologna, 2016-2017.
- [33] Luyten F.P. Sonnaert M., Papantoniou I. Quantitative validation of the presto blue metabolic assay for online monitoring of cell proliferation in a 3d perfusion bioreactor system. *J Cell Mol Med*, 14:1003, 2010.
- [34] Friis T. Quent V.M.C., Loessner D. Discrepancies between metabolic activity and dna content as tool to assess cell proliferation in cancer research. *J Cell Mol Med*, 14:1003, 2010.
- [35] Fourligas N. Quinn K.P., Bellas E. Characterization of metabolic changes associated with the functional development of 3d engineered tissues by non-invasive, dynamic measurement of individual cell redox ratios. *Biomaterials*, 33:5341, 2012.
- [36] Georgakoudi I. Rice W.L., Kaplan D.L. Two-photon microscopy for non-invasive, quantitative monitoring of stem cell differentiation. *PLoS One*, 5:e10075, 2010.
- [37] Vandenabeele P. Kroemer G., Galluzzi L. Classification of cell death: recommendations of the nomenclature committee on cell death 2009. *Cell Death Differ.*, 3:6–11, 2009.

- [38] Tennant J.R. Evaluation of the trypan blue technique for determination of cell viability. transplantation. *PLoS One*, 2:685–694, 1964.
- [39] Pinto M.C.X. Avelar-Freitas B.A., Almeida V.G. Trypan blue exclusion assay by flow cytometry. *Braz J Med Biol Res*, 47:307–3015, 2014.
- [40] Renaud P. H. Linderholm P., Schoch R. Microelectrical impedance tomography for biophysical characterization of thin lm biomaterials. *TRANSDUCERS, Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems, 12th International Conference on 2003*, 1:284–287, 2003.
- [41] Lehti-Polojarvi M. Electrical impedance tomography applied to stem cells in hydrogel scaffold. 2014.
- [42] Soraruf I. *Utilizzo delle misure di impedenza come nuovo approccio non distruttivo per la caratterizzazione di scaffold biologici*. Tesi di laurea, Università degli Studi di Bologna, 2017-2018.
- [43] Spettrofotometria. http://www.tuttochimica.it/chimica_analitica_spettrofotometro.asp. Visitato il 06.09.2018.
- [44] Ftir. <http://www.qicomposites.com/servizi/analisi-chimiche-ftir/>. Visitato il 08.09.2018.
- [45] Moya Moreno M.C.M. Bosch Reig F., Gimeno-Adelantado J. V. Ftir quantitative analysis of calcium carbonate (calcite) and silica (quartz) mixtures using the constant ratio method. application to geological samples. *Talanta*, 58:811–821, 2002.
- [46] M. C. Wu M. L. Bhaisare, B. S. Wu. Maldi ms analysis, disk diffusion and optical density measurements for the antimicrobial effect of zinc oxide nanorods integrated in graphene oxide nanostructures. *Biomaterials Science*, 2015.

- [47] N. Nosova V. Samaryk, S. Varvarenko. Optical properties of hydrogels filled with dispersed nanoparticles. *Chem. Chem. Technol.*, 11:449–453, 2017.
- [48] Tecan. https://lifesciences.tecan.com/plate_readers/fluorescence_absorbance_luminescence. Visitato il 09.09.2018.
- [49] Hamamatsu. Ultra-compact minispectrometer integrating mems and image sensor technologies.
- [50] Exposure time. <https://www.ridble.com/tempo-di-esposizione/>. Visitato il 11.09.2018.
- [51] Di Napoli A. Franco F. Valutazione della concordanza tra misurazioni di caratteri di tipo quantitativo: il metodo di bland-altman. *G Tec Nefrol Dial*, 29:59–61, 2017.
- [52] Li W. Rijal G., Bathula C. Application of synthetic polymeric scaffolds in breast cancer 3d tissue cultures and animal tumor models. *International Journal of Biomaterials*, Article ID 8074890:9 pages, 2017.
- [53] Pastorin G. Zhao C., Tan A. Nanomaterial scaffolds for stem cell proliferation and differentiation in tissue engineering. *NCBI*, 31(5):654–668, 2012.
- [54] Liu B. Prina-Mello A., Jain N. Culturing substrates influence the morphological, mechanical and biochemical features of lung adenocarcinoma cells cultured in 2d or 3d. *Tissue and Cell*, 50:15–30, 2018.
- [55] Sun X. S. Huang H., Ding Y. Peptide hydrogelation and cell encapsulation for 3d culture of mcf-7 breast cancer cells. *PloS one*, 8(3):e59482, 2013.
- [56] Setton L.A. LeRoux M.A., Guilak F. Compressive and shear properties of alginate gel: effects of sodium ions and alginate concentration. *Journal of Biomedical Materials Research*, 47:46–53, 1999.

- [57] Alsberg E. Bouhadir K.H., Lee K.Y. Degradation of partially oxidized alginate and its potential application for tissue engineering. *Biotechnology Progress*, 17:945–950, 2001.
- [58] Mooney D.J. Bouhadir K.H., Hausman D.S. Synthesis of cross-linked poly(aldehyde guluronate) hydrogels. *Polymer*, 40:3575–3584, 1999.
- [59] Mooney D.J. Lee K.Y., Bouhadir K.H. Degradation behavior of covalently cross-linked poly(aldehyde guluronate) hydrogels. *Macromolecules*, 33:97–101, 2000.
- [60] Kung A.L. Aparicio H. Examining the utility of patient-derived xenograft mouse models. *Nat Rev Cancer.*, 15:311–316, 2015.
- [61] Hackam D.G. Translating animal research into clinical benefit. *BMJ*, 15:163–164, 2007.
- [62] Ghert M. Mak I.W., Evaniew N. Lost in translation: animal models and clinical trials in cancer treatment. *American Journal Of Translational Research*, 6:114–118, 2014.
- [63] Dutta A. K. Dutta R. C. Cell-interactive 3d-scaffold; advances and applications. *Biotechnology Advances*, 27(4):334–339, 2009.

Ringraziamenti

Chi mi conosce bene, sa quanto questi ultimi tre anni siano stati difficili per me. Voglio perciò ringraziare la mia famiglia ed in particolare mia madre: nonostante i tanti dolori e i problemi che mi avete causato, mi avete insegnato ad essere forte, a non avere mai paura, oltre a valori come il rispetto ed il sacrificio. Non sarei quella che sono, senza di voi.

Voglio ringraziare tutte le mie amiche ed amici, sia quelli di Prato che quelli di Cesena: siete stati miei compagni di studio, di serate, di pianti, di risate e di qualsiasi altra cosa io avessi bisogno. Mi avete regalato i migliori momenti possibili e non avrei potuto desiderare di avere accanto nessuno migliore di voi.

Un sincero grazie a Giovanni: i tuoi successi ed il tuo amore sono per me la più grande fonte di ispirazione.

Un enorme ringraziamento al mio relatore Prof. Emanuele Domenico Giordano ed ai correlatori Dott. Joseph Lovecchio e Dott.ssa Marilisa Cortesi per avermi permesso di svolgere questa esperienza di tesi in laboratorio. I vostri consigli, la vostra pazienza e la vostra disponibilità sono stati fondamentali nella riuscita di questo lavoro. Vi ringrazio davvero dal profondo del mio cuore.

Non posso, inoltre, non ringraziare me stessa per la costanza e l'impegno che dedico in ogni cosa che faccio. Nonostante le difficoltà, non ho mai smesso di credere nelle mie potenzialità. Spero di rendere tutti coloro che sono nella mia vita felici e fieri di me anche solo la metà di quanto io lo sono di loro.