



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II

DOTTORATO DI RICERCA

IN

INGEGNERIA DEI MATERIALI E DELLE STRUTTURE

XX CICLO

NUOVI MATERIALI FUNZIONALI PER L' INGEGNERIA DEL TESSUTO VASCOLARE

Coordinatore
Ch.mo Prof. Domenico Acierno

Candidata
Dott.ssa Olimpia Oliviero

Tutor
Ch.mo Prof. Paolo A. Netti

A mio marito e a tutte le persone a me care

CAPITOLO 1

Introduzione

1 I principi dell'Ingegneria dei tessuti.....	pag. 7
2 L'ingegneria del tessuto vascolare.....	pag. 8
3 Interazioni cellula-materiale.....	pag. 11
4 Recettori cellulari: le integrine.....	pag. 12
5 Ruolo dei biomateriali nell'ingegneria dei tessuti.....	pag. 14
6 Il collagene.....	pag. 22
7 Acido ialuronico.....	pag. 22
8 Acido poli(lattico-co-glicolico) (PLGA).....	pag. 23
9 Acido poliglicolico (PGA).....	pag. 24
10 Proprietà del PLGA.....	pag. 25
11 Polietilene glicole (PEG).....	pag. 26

CAPITOLO 2

Processi di vasculogenesi ed angiogenesi in vivo

1 Eventi biologici e molecolari nella formazione dei vasi.....	pag. 31
2 Struttura e funzione della matrice extracellulare.....	pag. 35
3 I glicosamminoglicani (GAG).....	pag. 38
4 Scopo del lavoro di tesi.....	pag. 40

CAPITOLO 3

Sprouting Angiogenico direzionato indotto da gradienti di acido ialuronico

<i>1 INTRODUZIONE</i>	pag. 43
<i>2 MATERIALI E METODI</i>	pag. 44
1 Materiali.....	pag. 44
2 Realizzazione dello scaffold.....	pag. 44
3 Colture cellulari.....	pag. 45
4 Produzione di sferoidi endoteliali.....	pag. 45
5 Saggio di sprouting angiogenico "in vitro" in matrici isotropiche.....	pag. 46
6 Saggio di sprouting angiogenico "in vitro" in gradienti di HA.....	pag. 46
7 Microscopia elettronica a scansione (SEM).....	pag. 47
8 Analisi dei dati.....	pag. 47
<i>3 RISULTATI</i>	pag. 48
1 Effetto dell'acido ialuronico sullo sprouting angiogenico	

in 3D SIPNs.....	pag. 48
2 I gradienti di HA inducono lo sprouting angiogenico direzionato.....	pag. 51
4 <i>DISCUSSIONE</i>	pag. 55

CAPITOLO 4

Rilascio di VEGF da Microbiglie di PLGA in Matrici di Collagene

1 <i>INTRODUZIONE</i>	pag. 61
2 <i>MATERIALI E METODI</i>	pag. 62
1 Materiali.....	pag. 63
2 Preparazione delle microsfele.....	pag. 64
3 Morfologia e grandezza delle microsfele.....	pag. 64
4 Dosaggio di VEGF.....	pag. 64
5 Efficienza di incapsulamento.....	pag. 65
6 Le cellule.....	pag. 65
7 Saggio di angiogenesi in vitro.....	pag. 65
8 Saggio di sprouting angiogenico in vitro.....	pag. 66
9 Scaffolds a base di collagene contenenti microsfele di PLGA.....	pag. 67
10 Saggio in vivo sulla membrana corioallantoidea di pollo(CAM).....	pag. 67
3 <i>RISULTATI</i>	pag. 68
1 Proprietà delle microsfele.....	pag. 68
2 La bioattività del VEGF rilasciato.....	pag. 70
3 Efficacia delle microsfele di PLGA caricate con il VEGF.....	pag. 71
4 Studi in vivo.....	pag. 72
4 <i>DISCUSSIONE</i>	pag. 73

CAPITOLO 5

Realizzazione di matrici polimeriche macroporose a base di Polietilene Glicole(PEG)

1 <i>INTRODUZIONE</i>	pag. 79
1 Adesione cellulare a materiali sintetici.....	pag. 79
2 Polimeri non Adesivi.....	pag. 80
3 Immobilizzazione di proteine su polimeri per adesione cellulare specifica.....	pag. 81
• Peptidi RGD.....	pag. 83
• Peptidi derivati dalla laminina.....	pag. 84

• Peptidi REDV.....	pag. 84
• Peptidi che legano proteoglicani.....	pag. 85
5 Modificazioni farmacologiche di biomateriali polimerici: immobilizzazione di fattori di crescita.....	pag. 86
6 Matrici Tridimensionali.....	pag. 88
2 <i>MATERIALI E METODI</i>	pag. 90
1 Sintesi di matrici porose a base di PEG.....	pag. 90
2 Analisi morfologiche al microscopio elettronico a Scansione (SEM).....	pag. 91
3 Analisi al porosimetro.....	pag. 92
4 Prove di adesione cellulare in idrogeli a base di PEG.....	pag. 92
5 Analisi Istologica.....	pag. 93
6 Saggio di vitalità cellulare (calceina).....	pag. 93
7 Prove in vivo su membrana corioallantoidea di pollo.....	pag. 94
8 Analisi istologica degli idrogeli impiantati in vivo.....	pag. 94
9 Reazione di metacrilazione dell'eparina.....	pag. 95
10 Spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (¹ HNMR).....	pag. 96
11 Preparazione dello scaffold a base di PEGDA crosslinkati con eparina metacrilata.....	pag. 96
12 Interazione tra eparina e VEGF.....	pag. 97
13 Studio delle cinetiche di rilascio di VEGF.....	pag. 97
14 Analisi dei dati.....	pag. 98
3 <i>RISULTATI</i>	pag. 98
1 Caratterizzazione morfologica e strutturale dello scaffold di PEG poroso.....	pag. 98
2 Interazione cellula – materiale.....	pag. 100
3 Invasione cellulare in vitro.....	pag. 100
4 Localizzazione delle cellule mediante CLSM.....	pag. 101
5 Processi di vasculogenesi in vivo.....	pag. 102
6 Analisi istologica degli idrogeli impiantati in vivo.....	pag. 103
7 Spettri NMR per rilevare il grado di metacrilazione.....	pag. 104
8 Efficacia dello scaffold a base di PEGDA ed Hp-Met per il rilascio di VEGF.....	pag. 106
4 <i>DISCUSSIONE</i>	pag. 107

CAPITOLO 6

Conclusioni	pag. 111
--------------------------	----------

CAPITOLO 7

Bibliografia	pag. 115
---------------------------	----------

CAPITOLO 1
INTRODUZIONE

1 I principi dell' Ingegneria dei tessuti

L'ingegneria tessutale è una disciplina che indaga le relazioni funzionali-strutturali dei tessuti sani o malati del corpo umano nel tentativo di ripristinare, mantenere o migliorare il funzionamento dei tessuti viventi. Questo campo combina l'esperienza e la perizia dei ricercatori di quattro discipline: la biologia, la chimica, la medicina e la bioingegneria, e non si può prescindere da nessuna di loro. La biologia si occupa delle cellule in senso stretto, dalla selezione di quelle da coltivare fino allo stadio dell'evoluzione di quelle impiantate. La medicina fissa i target da raggiungere per avere un prodotto finale clinicamente utilizzabile, ossia finalizzato a determinate patologie e impiantabile; il medico deve seguire di persona tutte le fasi del trapianto e osservare la risposta biologica dell'organismo all'impianto. La chimica studia i polimeri per la realizzazione dei supporti, la loro interazione con le cellule e l'evoluzione di questi nel tempo. Il bio-ingegnere coadiuva e coordina le altre discipline fornendo loro i supporti tecnici e i feedback per migliorare il lavoro: si occupa della realizzazione del supporto polimerico e della sua caratterizzazione, discutendone i risultati con il chimico; implementa una serie di algoritmi per giudicare con più precisione la crescita cellulare sul supporto valutando col biologo i fattori caratteristici per il successo della cultura; parametrizza l'attività funzionale del supporto (ad esempio una valvola cardiaca) e ne discute eventuali anomalie con il medico. Attraverso le collaborazioni reciproche dello staff medico sopra descritto, l'ingegneria tessutale si pone principalmente il compito di sostituirsi, nel campo del recupero d'organi e tessuti danneggiati, all'utilizzo di protesi artificiali e al trapianto di organi. Questi tipi d'intervento chirurgico presentano notevoli limitazioni intrinseche che, malgrado i notevoli progressi circa il recupero di alcune funzioni, sembrano insuperabili. Il motivo principale di queste difficoltà sta in una ipotesi di

fondo piuttosto debole, nel voler cioè sostituire una parte di un complesso sistema vivente con una protesi, cioè un sistema artificiale inevitabilmente più semplificato. Di qui tutti i problemi legati alla risposta dell'organismo alla presenza di corpi estranei, di fatto mai completamente risolvibili. Il progresso degli ultimi anni, soprattutto la ricerca di nuovi materiali, ha comunque portato a dei risultati apprezzabili, in alcuni campi più che in altri. Il diverso approccio legato al trapianto, nonostante consenta di recuperare integralmente le funzionalità dell'organo da sostituire, presenta due grossi problemi. Il primo è il *rigetto*, ossia una risposta immunitaria negativa dell'organismo nei confronti dell'organo trapiantato. Il secondo è la scarsa disponibilità di organi: da una recente ricerca negli Stati Uniti, si è rilevato che su 40000 pazienti in attesa di trapianto di cuore solo 2300 lo hanno ottenuto (il 5,7%).

2 L'ingegneria del tessuto vascolare

Molti studi clinici dimostrano che tessuti ingegnerizzati *in vitro* non possono sopravvivere senza un apporto sanguigno adeguato. La necessità di vascolarizzazione capillare e la difficoltà di ottenerla rappresenta il limite principale per buona parte degli approcci cellulari per la rigenerazione dei tessuti. I primi tentativi di sviluppare dei vasi sostitutivi si erano basati sull'uso di trapianti di vasi costituiti da vasi sintetici. I materiali sintetici utilizzati per questi scopi sono stati il Nylon, il Teflon, l'Orlon, il polietilene, il poliuretano e il Dacron. Di questi, il nylon fu scartato fin da subito a causa della sua rapida degenerazione *in vivo*; il dacron grazie alle sue proprietà meccaniche si è rilevato, insieme al politetrafluoroetilene espanso (ePTFE), il materiale più adatto per sostituti vascolari di grandi dimensioni. Questi materiali vengono trattati con sostanze biologiche quali collagene, albumina, eparina, fibronectina e/o insemnati con un monostrato di cellule endoteliali; questi trattamenti

forniscono una naturale interfaccia tra il sangue e il sottostante materiale sintetico ovviando al problema dell'adesione di piastrine sulla superficie di questi dispositivi vascolari. La sostituzione di vasi di grandi dimensioni (del diametro di 6-10mm) è spesso accompagnata da successo terapeutico, ma nel caso del sistema coronario, dove il diametro dei vasi è minore, la formazione di trombi porta rapidamente all'occlusione degli stessi. Il passo successivo è stato quello della insemminazione di cellule endoteliali su protesi vascolari sintetiche. La premessa a questo tipo di approccio è che se la pervietà dei vasi di piccolo diametro è limitata da trombosi, probabilmente è possibile diminuire questo fenomeno fornendo una superficie non trombogena come nei vasi normali ad esempio un monostrato di cellule endoteliali. In ogni caso, sono richiesti più di un accorgimento e i vasi sostitutivi devono possedere non solo una superficie non-trombogena ma anche proprietà meccaniche vasoattive. Un primo approccio nella terapia delle cardiopatie si basa sull'utilizzo di vasi ingegnerizzati *in vitro* (Figura 1A). Principalmente la crescita di un vaso *in vitro* richiede che le cellule endoteliali siano guidate da almeno due tipi di stimoli del microambiente: biochimici e biomeccanici.

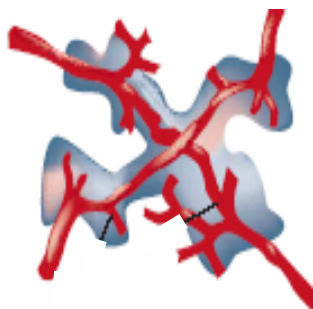


Figura 1.1A. Tessuto ingegnerizzato con ECs

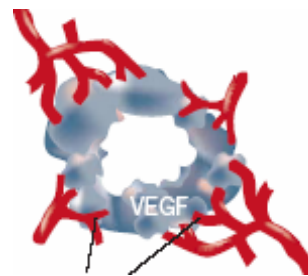


Figura 1.1B. Tessuto bioattivato con fattori pro-angiogenici

Per quanto riguarda gli stimoli biomeccanici, le forze utilizzate per questo scopo sono gli stress radiale e circonferenziale. Poco si conosce circa il ruolo degli stimoli

biochimici e la modulazione dell'espressione genica durante la costruzione dei vasi *in vitro* attorno ad una struttura. Un secondo approccio si basa sul rilascio in modo controllato nel tempo e nello spazio di fattori pro-angiogenici da parte dello scaffold (Fig.1.1B), in modo da determinare l'invasione del dispositivo impiantato da parte di cellule endoteliali favorendone la vascolarizzazione. Le dimensioni della struttura che verrà inseminata con le cellule e successivamente impiantate nell'organismo, hanno inoltre, un limite inerente alla densità cellulare e ai livelli metabolici del tessuto poiché il rifornimento di nutrienti in seguito al trapianto avviene essenzialmente per diffusione e i vasi impiegano giorni, settimane a svilupparsi. Quindi è necessario, che queste strutture o matrici siano tali da promuovere e regolare la vascolarizzazione nei tessuti ingegnerizzati durante la costituzione di vasi di piccolo diametro stabilendo le condizioni migliori per l'attecchimento e l'espansione delle cellule endoteliali che andranno a colonizzarle. A questo proposito risultano, però limitate le conoscenze sui fattori solubili che determinano il profilo d'espressione genica per le cellule endoteliali seminate su queste strutture. Per tutte queste ragioni si comprende come l'angiogenesi e l'ingegneria tessutale vascolare rappresentino un nuovo bersaglio terapeutico che ha come principali obiettivi la realizzazione sia di vasi da utilizzare in trapianti sia di una rete vascolare per i tessuti realizzata *in vitro*.

Nonostante i primi risultati incoraggianti ottenuti previa somministrazione diretta di un induttore dell'angiogenesi, quali il VEGF-A, o indiretta con somministrazione di virus, cellule o frammenti di DNA geneticamente modificati contenenti il gene codificante per VEGF-A, studi angiografici hanno dimostrato che questo tipo di trattamento promuove la formazione di vasi anomali, disorganizzati e iperpermeabili. Inoltre il possibile ruolo di VEGF-A nella patogenesi delle placche aterosclerotiche, e il rischio della formazione di emangiomi durante il trattamento, suggeriscono che il

fattore VEGF-A non sia da solo sufficiente per indurre una rivascolarizzazione fisiologica del tessuto ischemico.

Tuttavia questa gran quantità di dati disponibili sulle molecole e i meccanismi molecolari alla base del processo d'angiogenesi, non bastano per spiegare completamente la formazione della struttura tridimensionale dell'albero vascolare e come i vasi in via di formazione trovino la giusta traiettoria.

Un altro problema irrisolto riguarda la variabilità fenotipica dei diversi letti vascolari in termini di risposta agli stimoli angiogenici e anti-apoptotici. A causa della scarsità di studi di dose-risposta, poche sono le conoscenze sul dosaggio appropriato dei fattori angiogenici, sulla durata del trattamento e sui protocolli con le combinazioni dei fattori. Questi dati, quindi, rilevano la necessità di ulteriori passi nella ricerca e suggeriscono che il trattamento combinato di modulatori dell'angiogenesi, agenti in diversi stadi del processo permetterà una maggiore efficacia della terapia angiogenetica.

3 Interazioni cellula-materiale

Le interazioni cellula-matrice sono mediate dal legame delle proteine cellulari di superficie e i proteoglicani interagenti con le proteine immobilizzate della matrice. Ci sono quattro principali classi di recettori di membrana responsabili dell'adesione cellulare, di cui tre sono principalmente coinvolti nell'adesione cellula-cellula, mentre quella delle integrine, è coinvolta sia nelle adesioni cellula-cellula sia cellula-matrice. Si tratta di glicoproteine transmembrana, la cui porzione extracellulare è ripiegata in cinque domini simili, tre dei quali contengono siti di legame per il Ca^{++} . Si pensa inoltre, che il dominio extracellulare più lontano dalla membrana media i fenomeni d'adesione intercellulari; mentre la sequenza His-Ala-Val presente sempre in questo dominio sembra essere coinvolta in questi processi poiché studi eseguiti

con peptidi che comprendono questa sequenza hanno opportunamente evidenziato questo ruolo inibendone l'adesione mediata dalle caderine. Infine, la coda citoplasmatica, notevolmente conservata nei diversi tipi di caderine, interagisce con l'actina del citoscheletro mediante un certo numero di proteine intracellulari di connessione, tra cui le catenine.

4 I Recettori cellulari: le integrine

Le **integrine** sono coinvolte principalmente nelle interazioni cellula-matrice. Sono eterodimeri composti da due subunità glicoproteiche transmembrana (di tipo I, con l'estremità carbossilica intracellulare e l'estremità ammino-terminale extracellulare) associate non covalentemente, dette α e β che contribuiscono entrambe al legame con le proteine della matrice (le singole subunità isolate perdono la capacità di legare il ligando). Ogni subunità è costituita da un ampio dominio extracellulare, da una porzione transmembrana e un breve dominio citoplasmatico.

Le catene α e β sono entrambe glicosilate e sono unite da legami non covalenti. Nel recettore per la fibronectina, la catena α viene inizialmente sintetizzata come una singola catena polipeptidica di 140 Kd che è poi scissa in una piccola catena transmembrana e una grossa catena extracellulare che restano unite mediante ponti disolfuro; questa catena extracellulare è ripiegata in 4 domini che legano cationi divalenti (il legame delle integrine ai loro ligandi è dipendente da cationi divalenti, Ca^{2+} o Mg^{2+} : svolgono un ruolo essenziale nella regolazione dell'attività delle integrine). La parte extracellulare della catena, vicino al dominio transmembrana, contiene una regione ripetuta ricca in cisteine.

Le integrine differiscono dai recettori di membrana per ormoni e altre molecole solubili che trasmettono segnali alle cellule poichè si legano al loro ligando con un'affinità relativamente bassa e sono di solito presente sulla superficie cellulare ad

una concentrazione 10-100 volte più alta. Questo tipo d'organizzazione ha senso in quanto il legame simultaneo anche se debole ad un gran numero di molecole della matrice, consente alle cellule di esplorare l'ambiente circostante, senza perdere del tutto la connessione ad esso (se il legame fosse troppo forte le cellule sarebbero attaccate alla matrice irreversibilmente e sarebbero incapaci di muoversi).

Sono stati descritti circa una ventina di eterodimeri di integrine, formate da 15 tipi di subunità α e 8 di subunità β (codificati da geni distinti) e continuano ad esserne scoperte di nuovi. Le integrine sono distinte in sottofamiglie in base alla subunità β condivisa dai membri di ciascuna classe. Le sottofamiglie β_1 , β_2 e β_3 sono tra le integrine più espresse; l'integrina β_2 è coinvolta principalmente nel riconoscimento cellulare, ad esempio $\alpha_L\beta_2$ lega ICAM1 e ICAM2, molecole d'adesione intercellulare della famiglia delle Ig. Invece le integrine β_1 e β_3 legano essenzialmente elementi della matrice extracellulare. 10 integrine β_1 sono state caratterizzate, da $\alpha_1\beta_1$ a $\alpha_9\beta_1$ e $\alpha_V\beta_1$. Una caratteristica della maggior parte delle integrine β_1 è la capacità di legarsi a più di un ligando (Fig. 1.2). Altri β_1 includono recettori della laminina: $\alpha_6\beta_1$ e $\alpha_7\beta_1$; della fibronectina $\alpha_4\beta_1$ e $\alpha_5\beta_1$ (riconoscono la sequenza RGD)

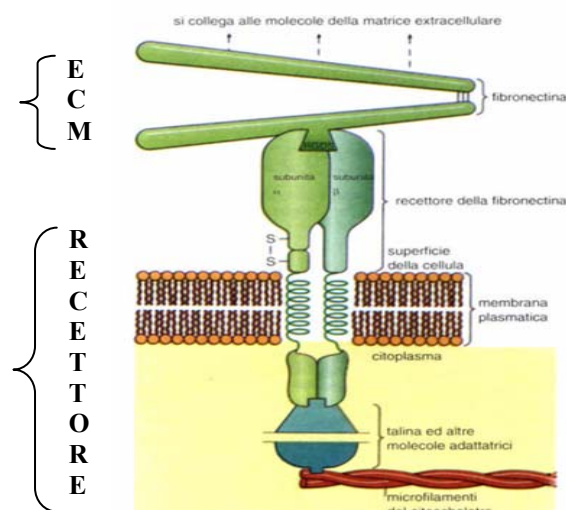


Figura 1.2. Rappresentazione schematica dell'interazione cellula-matrice extracellulare (ECM) mediata da integrine.

Alcune integrine sembrano interagire solo con una molecola della matrice come la fibronectina (classico recettore per la fibronectina: $\alpha_5\beta_1$) o la laminina ($\alpha_6\beta_1$), altre invece interagiscono con più molecole (collagene, fibronectina, vitronectina, fattore di von Willebrand e laminina).

Generalmente le integrine che riconoscono lo stesso ligando interagiscono con regioni diverse della molecola di ligando, questo è il caso dei recettori della fibronectina $\alpha_4\beta_1$ e $\alpha_5\beta_1$, e della laminina $\alpha_6\beta_1$ e $\alpha_1\beta_1$, in altri casi, come nel caso $\alpha_5\beta_1$ e $\alpha_3\beta_1$, le due integrine interagiscono con lo stesso sito della stessa proteina di ECM. Queste integrine che interagiscono con lo stesso sito della stessa proteina di ECM non necessariamente svolgono la stessa funzione nella cellula; questa osservazione è basata sul fatto che i domini citoplasmatici delle subunità che costituiscono le integrine, soprattutto delle diverse subunità α , mostrano notevoli divergenze nelle loro sequenze aa, il che indica che ciascuna subunità può contribuire a distinte funzioni intracellulari.

5 Ruolo dei biomateriali nell'ingegneria dei tessuti

L'ingegneria tessutale non può prescindere dallo sviluppo dei biomateriali, in quanto essi sono indispensabili per lo sviluppo delle cellule in ambiente tridimensionale, condizione necessaria per il raggiungimento di un'organizzazione spaziale simile a quella esistente nei tessuti nativi [1-4].

Il termine “ biomateriale “ può essere inteso in due differenti accezioni: nella prima come materiale biologico, come ad esempio i tessuti; nella seconda come materiale da impianto utilizzato per sostituire la funzione di materiali biologici.

Secondo la sua definizione ufficiale (Clemson Advisory Board for Biomaterials, 1974) “ un biomateriale è una sostanza inerte sia da un punto di vista sistemico che farmacologico, progettata per impianto o interazione in sistemi viventi”. Una

definizione più recente [5] definisce un biomateriale come un “ materiale non vitale “ utilizzato in un “device” medico la cui applicazione consiste nella sua interazione con sistemi biologici. In questo momento tantissime sono le applicazioni che comportano l'utilizzo di biomateriali. Essi sono utilizzati in varie applicazioni farmacologiche, ad esempio come rivestimento di pastiglie o capsule o come componenti delle placche trasdermiche. Rivestono un ruolo fondamentale nel rilascio controllato di farmaci [6-8], nelle apparecchiature extracorporee quali ad esempio le lenti a contatto, gli apparecchi d'emodialisi, gli ossigenatori del bypass cardiopolmonari; inoltre sono elementi essenziali degli impianti, dalle protesi vascolari ai pacemaker cardiaci [9,10]. Lo sviluppo dei biomateriali ha seguito un processo evolutivo. Molti biomateriali non sono originariamente nati come materiali destinati alle applicazioni odierne, ma erano utilizzati in altri campi ed il loro ingresso in campo biomedico è dovuto all'impiego che ne hanno fatto alcuni medici per risolvere problemi clinici e chirurgici; gli esempi sono numerosi, basti ricordare che alcuni polimeri utilizzati per le protesi vascolari come il Dacron, avevano il loro impiego nell'industria tessile.

Volendo tracciare una breve storia dello sviluppo dei biomateriali per uso biomedico, dal 1950 ad oggi, è possibile distinguere tre distinte generazioni che si sono evolute nel tempo, ognuna con una propria differente caratteristica [1-3]. I biomateriali di “prima generazione” sono “materiali bioinerti” materiali, cioè, capaci di ripristinare la funzionalità del tessuto danneggiato grazie a specifiche proprietà fisiche senza però interagire col tessuto biologico circostante e riducendo al minimo la risposta immunitaria nell'organismo ospite. Appartengono a questa classe, oltre al silicone, il polietilene ad altissimo peso molecolare, gli ossidi di tantalio, titanio, zirconio e l'allumina.

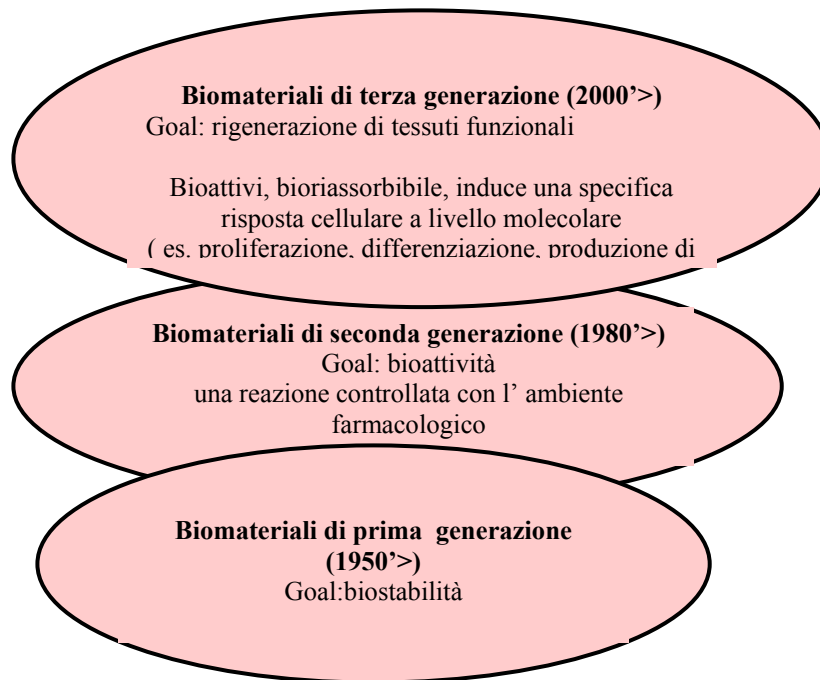


Figura 1.3. Sviluppo dei biomateriali . Tre distinte generazioni di biomateriali per impianti biomedici si sono evolute nel tempo: si è passati dal biomateriale inerte (con minima interazione col tessuto) al biomateriale bioattivo (funzionalizzato attraverso trattamenti di superficie o a seguito del riempimento dei pori del materiale con molecole biologicamente attive quali fattori di crescita, inibitori di crescita, fattori angiogenici e/o agenti immunosoppressori) , al biomateriale biointerattivo (capace di rigenerare la funzionalità tessutale).

Vari studi hanno dimostrato che l'impiego di materiali inerti non ha portato risultati soddisfacenti: nessun dispositivo che sia tollerato passivamente dall'organismo e non stimolino un'incorporazione ed un riconoscimento, può assicurare la stabilità delle sue prestazioni a lungo termine. I motivi di tale insuccesso sono sicuramente da ricercare nella mancata comprensione, da parte del progettista, dell'importanza che rivestono i segnali biochimici, biomeccanici e biofisici attraverso i quali la cellula comunica con il materiale extracellulare nel quale è immersa per formare un tessuto correttamente funzionante [1-4].

I biomateriali inerti hanno così lasciato il passo ai cosiddetti biomateriali di “seconda generazione”; si tratta di materiali bioattivi in grado di promuovere un'interazione con il tessuto biologico, al quale è consentita la crescita sulla superficie del materiale.

Appartengono a questa classe di materiali utilizzati in chirurgia ortopedica ed odontoiatrica tra gli altri, l'idrossiapatite ad alta densità e alcuni biovetri. Molti dei metodi descritti in letteratura riguardano modificazione della superficie di contatto del polimero; fra questi i metodi di irraggiamento che usano fasci ionizzanti, i trattamenti al plasma in radiofrequenza, i trattamenti con il UV/ozono, sono in grado di adsorbimento delle proteine e l'adesione cellulare al variare delle proprietà superficiali idrofiliche/idrofobiche. In altri studi, sequenze peptidiche sono state inserite all'interno della struttura del polietilenglicole (PEG) [11,12]. Fra questi studi, risultati promettenti per le applicazioni future sono stati ottenuti dall'immobilizzazione all'interno delle matrici di brevi sequenze aminoacidiche responsabili dell'adesione delle cellule col materiale (quale il motivo RGD) [13].

In altri lavori sequenze peptidiche suscettibili di modifica da parte di enzimi secreti dalle cellule come ad esempio dalle collagenasi (LGPA) ed elastasi (AAAAAA) sono stati inseriti direttamente tra due bracci di PEG, per realizzare matrici enzimaticamente degradabili in grado di mimare la matrice extracellulare, attraverso il rimodellamento del tessuto polimerico [13].

I biomateriali di seconda generazione comprendono anche i cosiddetti "materiali riassorbibili", materiali che subiscono una progressiva dissoluzione all'interno del sistema biologico, senza suscitare alcuna reazione di rigetto e senza effetti tossici. In questo caso i problemi di interfaccia tra tessuto ospite e il biomateriale sono superati dal momento che il biomateriale man mano che si erode, progressivamente viene rimpiazzato dal tessuto dell'ospite, fino a scomparire del tutto dall'ambiente biologico e rendendo più difficile discernere il sito di impianto dal tessuto ospite. Questi materiali possono presentare un diverso grado di degradazione. Un esempio di materiale bio-assorbibile è dato dai comuni fili di sutura costituiti da polimero

composto dell'acido polilattico (PLA) e poliglicolico (PGA). Appartengono a questa classe, tra gli altri, l'idrossiapatite porosa e alcuni poliuretani.

I biomateriali di I e II generazione, però, diversamente dai tessuti nativi non sono in grado di rispondere a cambiamenti fisiologici e a stimoli biologici in maniera dinamica a seconda delle esigenze specifiche: questo segna il limite di questi materiali. Appare sempre più chiaro che un biomateriale ideale per applicazioni biomediche deve favorire la crescita e differenziazione delle cellule in un appropriato ambiente tridimensionale, non funzionando semplicemente come supporto meccanico su cui crescere le cellule, ma è necessario che esso interagisca in modo continuo e dinamico con le cellule in esso contenute. Perché questo si verifichi è necessario "scrivere" all'interno dei materiali tutti quei segnali biologici e biofisici che dirigono una cellula a crescere, migrare e differenziarsi. In questo modo saranno le stesse cellule a riconoscere e leggere in modo intelligente questi messaggi, e specificare i dettagli più fini che presiedono alla ricostruzione di un tessuto.

Si afferma così una terza generazione di biomateriali; si tratta di materiali "bioattivi e biorassorbibili" nello stesso tempo e sono questi ultimi a trovare grande impiego nei processi di ingegneria tessutale [1,14,15,16].

Essi infatti devono essere capaci di interagire con le cellule supportandone la crescita e la produzione dei componenti della matrice extracellulare, nonché con l'ambiente in cui vengono impiantati. Contemporaneamente il biomateriale, una volta impiantato, deve essere degradato, lasciando spazio alla crescita di altre strutture, come ad esempio i vasi, garantendo quindi la piena integrazione del tessuto ingegnerizzato. I biomateriali fin' ora utilizzati in ingegneria tessutale comprendono materiali naturali, semisintetici e sintetici.

Oggi i materiali naturali tendono ad essere sostituiti dai materiali sintetici. Tra i biomateriali sintetici maggiormente usati nell'ingegneria tessutale, citiamo tra gli

altri, l'acido polilattico e l'acido poliglicolico. Questi ultimi, infatti, possono essere progettati con opportune proprietà meccaniche-strutturali a seconda dell'applicazione che si vuole considerare. Tali materiali possono essere purificati e dare risultati riproducibili. Dal punto di vista economico esistono accettabili rapporti rischio/beneficio e costo/beneficio. Inoltre la crescita di tessuti nello scaffold è fortemente influenzata dalla vascolarizzazione dello scaffold stesso. Infatti, la vascolarizzazione rappresenta il primo passo nel processo di rigenerazione tessutale e nello sviluppo fornendo un adeguato apporto di ossigeno, nutrienti, fattori di crescita, etc. attraverso la formazione di una rete di vasi sanguigni all'interno dello scaffold [4,5].

In sintesi, uno scaffold deve possedere alcune caratteristiche irrinunciabili per essere impiegabile in applicazioni dell'ingegneria tessutale:

- a) La biocompatibilità, ossia non indurre risposta immunitaria e infiammatoria [6].
- b) La biodegradabilità [17]
- c) Una opportuna macrostruttura: una impalcatura tridimensionale. Un modello di guida ottimale deve promuovere la proliferazione cellulare e la biosintesi (formazione di nuovo tessuto) e indirizzare la ricrescita tessutale verso la formazione di tessuto correttamente assemblato [8].
- d) Una opportuna porosità e interconnessione dei pori per garantire la migrazione cellulare e l'invasione tessutale oltre che la libera diffusione delle sostanze nutritive e la rimozione dei rifiuti metabolici [8].
- e) Una determinata dimensione dei pori. La dimensione ideale dei pori dipende dal tessuto da rigenerare: per tessuti molli la dimensione ottimale è compresa fra 20 e 125 μm [9], per tessuti duri da 150 a 400 μm , tra 45 e 150 μm per la rigenerazione di tessuto epatico [10].

f) Un' adeguata area e chimica di superficie: rapporti elevati tra l'area della superficie interna ed il volume delle impalcature coadiuvano l'adesione e la migrazione cellulare.

g) Compatibilità meccanica: le matrici devono provvedere ad un supporto meccanico temporaneo per il tessuto in crescita [10].

In tal senso, i polimeri sintetici biodegradabili rappresentano una struttura di supporto per le cellule e possono facilitare la formazione di nuovi tessuti; una struttura porosa, in particolare, può massimizzare i parametri legati alla diffusione e consentire una vascolarizzazione all'interno dell'impianto stesso con una completa degradazione alla formazione del nuovo tessuto. Materiali di nuova generazione che possono sostituire la matrice extracellulare per l'ingegneria vascolare sono il Polietilen glicole (PEG) [18] l'acido polilattico (PLA) e i suoi copolimeri [19] e il policaprolattone [20] e poliesteri alifatici vista la comprovata biocompatibilità, come i polilattidi (PLLA e PDLLA) ed il poliglicolide (PGA) e i suoi copolimeri, che una volta impiantati in vivo sono suscettibili di riassorbimento a causa della progressiva degradazione idrolitica. Sulla base dei prerequisiti elencati, la sfida scientifica e tecnologica nella progettazione di scaffold consiste nella realizzazione di materiali con una definizione accurata delle caratteristiche macrostrutturali (e.g., forma spaziale, resistenza meccanica, densità, porosità) e microstrutturali (e.g., dimensione, interconnessione dei pori) [9]. Negli ultimi venti anni molta attenzione della comunità scientifica è stata rivolta alla definizione e ottimizzazione di tecniche e processi per il controllo della macrostruttura dei materiali. Numerosi approcci sono stati proposti, tra le quali tecnologie tessili [21], fiber bonding [22], elettrospinning [23], gas foaming [24], solvent casting/particulate leaching [25], solid free form [27]. Sebbene gli scaffold realizzati con tali tecniche siano stati applicati con qualche successo nella medicina rigenerativa, esistono parecchi limiti che restringono il loro

campo di applicazione [9]. Uno degli aspetti fondamentali nella realizzazione di piattaforme idonee alle applicazioni della medicina rigenerativa è il controllo della dimensione e della forma dei pori, nonché del grado di interconnessione di questi ultimi. Tale aspetto risulta particolarmente difficile quando si utilizzano tecniche che prevedono l'impiego di agenti porogeni, in quanto per assicurare un alto grado di interconnessione dei pori all'interno della struttura è necessario raggiungere un'elevata porosità. In generale, le tecniche basate sull'utilizzo di agenti porogeni non consentono un controllo indipendente del grado di interconnessione e del grado di porosità. Una strategia per l'ingegneria vascolare è quella di seminare cellule endoteliali su uno scaffold ingegnerizzato biodegradabile. La possibilità di modulare le proprietà meccaniche di tale materiale e stimolare la crescita e il differenziamento cellulare *in vitro*, così come *in vivo*, permette ai costrutti ingegnerizzati di essere rimodellati e maturare in tessuto funzionale [27].

In tal senso, i polimeri sintetici biodegradabili rappresentano una struttura di supporto per le cellule e possono facilitare la formazione di nuovi tessuti; una struttura porosa, in particolare, può massimizzare i parametri legati alla diffusione e consentire una vascolarizzazione all'interno dell'impianto stesso con una completa degradazione alla formazione del nuovo tessuto. Sulla base dei prerequisiti elencati, la sfida scientifica e tecnologica nella progettazione di scaffolds consiste nella realizzazione di materiali con una definizione accurata delle caratteristiche macrostrutturali (e.g., forma spaziale, resistenza meccanica, densità, porosità) e microstrutturali (e. g., dimensione, interconnessione dei pori) [21-27]. Uno degli aspetti fondamentali nella realizzazione di piattaforme idonee alle applicazioni della medicina rigenerativa è il controllo della dimensione e della forma dei pori, nonché del grado di interconnessione di questi ultimi. L'elevata porosità degli scaffold

consente alle cellule di penetrare i pori e crescere in costrutti tridimensionali, mimando le condizioni fisiologiche.

6 Il collagene

Il collagene conferisce ai tessuti resistenza a trazione, infatti avendo un elevato rapporto lunghezza e diametro, il collagene è incapace di sopportare sollecitazioni di compressione. La particolare struttura delle fibre di collagene è responsabile del suo comportamento meccanico. Infatti, l'arrangiamento elicoidale delle catene proteiche ed i legami intramolecolari fanno sì che nella prima parte dell'allungamento a trazione le fibre abbiano una modesta capacità di sopportare i carichi. Le fibre ruotano e si flettono modificando la loro geometria spaziale dalla forma elicoidale a quella lineare. Quando le catene peptidiche sono distese le proprietà meccaniche aumentano diventando dipendenti dai legami intra e intermolecolari.

I tessuti ricchi di collagene vengono impiegati nella fabbricazione di protesi e strutture impiantabili. Per l'uso dei tessuti a base di collagene di origine animale occorre prevedere trattamenti chimici atti a devitalizzarli e a garantire la stabilità chimico-fisica nel tempo. La necessità di devitalizzare i tessuti riguarda la presenza di una qualche attività immunogena (cioè capace di indurre una risposta immune nell'ospite) provocata da parte dell'ospite, una reazione immunitaria che tende a distruggere il tessuto impiantato. E' necessario l'uso di sostanze chimiche che distruggono sia le cellule, sia gli elementi immunogeni dei tessuti prima di impiantarli. La sostanza che è più adatta per il trattamento chimico dei tessuti ricchi di collagene è la glutaraldeide.

7 Acido ialuronico

L'acido ialuronico è un glicosamminoglicano non solfatato ad alto peso molecolare, avente unità disaccaridiche ripetute di acido glucuronico/ N- acetilglucosammina (Fig.1.4) ed è presente ubiquitariamente in piccole quantità nella ECM di tutti i

tessuti [28,29] Insieme alle altre macromolecole della ECM, come proteine acide secrete e ricche in cisteina [30,31], decorina[32], e trombospondina [33,34] l'attività biologica di HA è dipendente dalla sua massa molecolare [35,36]

L'utilità di questa molecola come biopolimero, è dovuta alla semplicità delle sue unità ripetitive. Diversamente, dagli altri componenti della sua famiglia, non si lega a proteine.

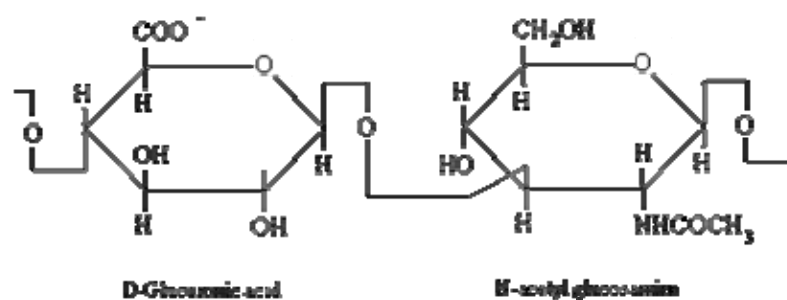


Figura 1.4. Struttura molecolare della molecola di acido ialuronico.

Le soluzioni di HA sono viscoelastiche e pseudoplastiche. Le proprietà viscoelastiche delle soluzioni di HA danno informazioni utili per il suo uso come biomateriale, poiché esse dipendono dalla sua concentrazione e dal peso molecolare delle sue catene. Il suo peso molecolare varia tra 10^4 e 10^7 Da.

8 L'acido poli (lattico-co-glicolico) (PLGA)

E' un polimero amorfo ottenuto per copolimerizzazione degli acidi lattico e glicolico. L'Acido polilattico (PLA) è, invece, un poliesteri lineare biodegradabile prodotto a partire dall'acido lattico. Per la presenza del centro chirale al carbonio α esistono le due forme isomeriche D- ed L-, riportate in figura 1.5:

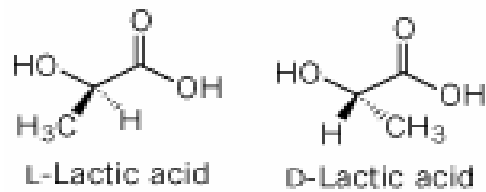


Figura 1.5. Rappresentazione schematica della molecola di acido polilattico

Il PLA, per la presenza del gruppo metilico laterale ha proprietà chimiche, fisiche e meccaniche diverse rispetto al PGA. L'acido poli(L-lattico) (PLLA) è un polimero biocompatibile e biodegradabile. È un materiale semicristallino estremamente idrofobico con temperatura di transizione vetrosa intorno ai 65°C e temperatura di fusione di circa 170°C; è meno cristallino del PGA, con grado di cristallinità intorno al 35%. L'acido poli(D,L-lattico) (PDLLA) ha una distribuzione casuale degli isomeri D- ed L- lungo la catena; è un materiale amorfo e trasparente e il suo punto di transizione vetrosa varia con il peso molecolare restando intorno ai 50-60°C, (tabella 3.1). La cinetica di degradazione del PDLLA è perciò più veloce di quella del PLLA. Secondo le dimensioni e lo spessore del campione, l'idrolisi del PDLLA si completa in 2-12 mesi. Indipendentemente dal peso molecolare, la cristallinità e la composizione del copolimero influenzano la velocità di degradazione [37].

9 L'acido poliglicolico (PGA)

È un polimero solido cristallino la cui cristallinità è compresa tra 35-75%, la transizione vetrosa avviene tra 35 e 40°C e la temperatura di fusione è di 225-230°C; è stabile termicamente e il tempo di degradazione è 6-12 mesi (tabella 1). Il PGA è lentamente idrolizzato dall'acqua e degrada, conseguentemente, in ambiente fisiologico fino ad essere assorbito in circa 4 settimane dall'impianto ed escreto in 4-6 mesi [38].

Polymer	Glass Transition Temperature (°C)	Melting Point (°C)	Crystallinity
Poly(glycolic acid) $\text{-(O-CH}_2\text{-CO)-}_n$	36	230	Highly crystalline
Poly(D-lactic acid) $\left(\begin{array}{c} \text{Me} \\ \\ \text{O-CH-CO} \end{array} \right)_n$	67	180	Highly crystalline
Poly(D, L-lactic acid) $\left(\begin{array}{c} \text{Me} \\ \\ \text{O-CH-CO} \end{array} \right)_n$	57		Amorphous glass

Tabella 1.1 Caratteristiche e formule di struttura del PGA, PDLA e PDLLA

10 Proprietà del PLGA

E' il copolimero degli acidi lattico e glicolico. Il copolimero formato da PLA tra il 30 e il 50% è più facilmente processabile e solubile e di solito si usano composizioni che vanno dallo 0 al 50% di PLA. Il PLGA è un polimero amorfo che degrada lentamente. La forma equimolare presenta la maggiore velocità di degradazione e il suo tempo di emivita in vivo è di circa 15 giorni, come mostrato in figura 1.6. La completa degradazione si ha in 63 giorni. [39] E' stato usato il PLGA 50-50 (lattico/glicolico %) RG 504H prodotto dalla Boehringer Ingelheim, (Ingelheim, Germany), il cui peso molecolare è 53 kDa.

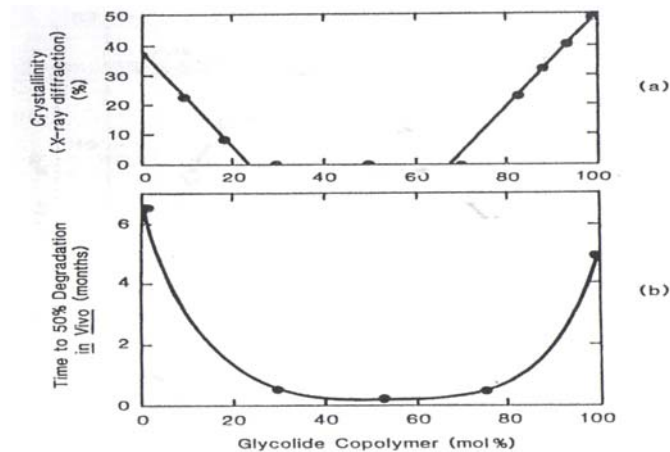


Figura 1.6. Proprietà del PLGA in funzione della composizione

11 Il Polietilene glicole (PEG)

Fin dagli inizi degli anni '90, l'idrogel di poli(etilene glicole) PEG è stato considerato un substrato standard per applicazioni biocompatibili. Questo è possibile alla sua abilità di essere un materiale biocompatibile e non tossico. Tale idrogel è idoneo per somministrazioni in vivo di farmaci: proteine "PEGilate" sono state usate per la maggiore resistenza alla degradazione enzimatica [40,41], per l'aumentata stabilità termica e per la ridotta risposta immunitaria. L'utilizzo di PEG riduce l'assorbimento proteico su una varietà di substrati idrofobici [42], quali polimeri solidi o liposomi [43,44] e minimizza le deposizioni di piastrine su superfici esposte a flusso sanguigno [45].

Una particolare attenzione dedicata al PEG è stata motivata anche per peculiari proprietà chimiche: possiede un "backbone" con una bassa polidispersione di peso molecolare; risulta solubile in acqua, come in molti altri solventi; è commercialmente ottenibile con vari tipi e gradi di modificazioni chimiche, in particolare, nella sua forma acriloil derivata, può facilmente essere fotopolimerizzato ed eventualmente intrappolare, in modo semplice, biomolecole di dimensioni più o meno grandi; nella forma nativa è sostanzialmente non adesivo per le cellule ma può essere

funzionalizzato e coniugato con diverse molecole bioattive [46,47] tra cui peptidi recanti segnali di adesione cellulare (e.g. RGD) e non solo.

In particolare, gli idrogeli di PEG fotopolimerizzato hanno trovato utilizzo in un ampio range di applicazioni biomediche, che essenzialmente possiamo riassumere in:

- Utilizzo come “barriere”
- Utilizzo come sistema di rilascio controllato di farmaci (drug delivery systems)
- Utilizzo come “scaffold”

Grazie alla natura anti-adesiva degli Idrogel di PEG diacrilato e alla possibilità di essere formato direttamente sulle superfici dei tessuti, tale materiale risulta un promettente candidato per rivestimenti biospecifici di tessuti (*barriers*).

Diverse applicazioni fanno leva sull’abilità di questo materiale di essere applicato su tessuti come soluzione liquida prepolimerica ed, in seguito, essere fotopolimerizzato in situ per formare un film di Hydrogel sulla superficie del tessuto in questione. Forme biodegradabili di PEG diacrilato (blocchi di copolimeri acrilati ABA; A = acido lattico, B = PEG) sono state utili, ad esempio, per evitare adesioni post-operatorie [48]. Per realizzare rivestimenti molto sottili (10 μ m) di tessuti, è stata inoltre utilizzata la fotopolimerizzazione interfacciale, in cui il fotoiniziatore è assorbito dalla superficie del tessuto, mentre non è presente all’interno della soluzione prepolimerica precorritrice di PEG diacrilato. Questi idrogeli di PEG diacrilato aderiscono alla superficie del tessuto su cui sono fatte polimerizzate grazie allo scorrimento del liquido precursore, non ancora fotopolimerizzato, all’interno del tessuto o alla sua diffusione all’interno della matrice extra-cellulare (ECM) con l’effetto di avere rispettivamente o un’interazione meccanica o un network polimerico interpenetrante col tessuto. Diverse applicazioni hanno riguardato, inoltre, rivestimenti di sensori da impianto, per aumentarne la biocompatibilità [49].

Altro campo di ricerca degli idrogeli di poli(etilene glicole) è stato quello di matrici per rilascio controllato di farmaci. Per queste applicazioni è stato indispensabile poter contare su una buona biocompatibilità, sulla compatibilità con farmaci idrofilici e macromolecolari quali proteine o oligonucleotidi, e sulla facilità di controllare il rilascio di farmaco regolando l'assorbimento d'acqua, la densità di crosslink e la degradazione.

Mellott (2001) ha utilizzato idrogeli di PEG-diacrilato altamente crosslinkati, contenenti un poliacrilato, il pentaeritritol triacrilato (PETA), come agente crosslinkante, e il 2-2'-dimetossi-2-fenil-acetofenone come fotoiniziatore (Fig 1.8).

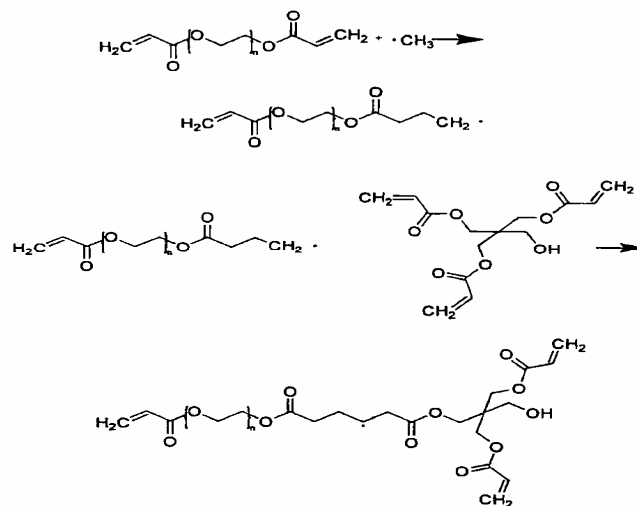


Figura 1.8. Struttura molecolare della molecola di PEG.

È stato studiato il rilascio di proteine (BSA, MW 66000) da tali gel ed in particolare l'effetto dell'aggiunta di diversi comonomeri sul rilascio stesso. I comonomeri sono stati scelti in base alla loro influenza sul contenuto d'acqua dei gel e sulla loro possibile interazione con la BSA. In particolare si è scelto l'acido acrilico per la sua interazione ionica negativa col BSA e l'allilammina e l'acrilammina per l'interazione ionica positiva. Diversi sono stati i lavori di Peppas riguardo l'uso di gel di PEG per rilascio di farmaci. Poiché le proprietà fisico-meccaniche d'idrogeli di PEG possono essere modulate (per esempio variando la concentrazione di monomero iniziale o di

agenti crosslinkanti) ed eventualmente andare a mimare le proprietà di molti tessuti soffici, questi materiali risultano interessanti quali “scaffold” per lo sviluppo e la rigenerazione dei tessuti stessi.

CAPITOLO 2

PROCESSI DI VASCULOGENESI E ANGIOGENESI IN

“VIVO”

1 Eventi biologici e molecolari nella formazione dei vasi

Nei vertebrati, la funzionalità dei tessuti dipende da un adeguato apporto di ossigeno e nutrienti che viene assicurato dal sistema vascolare.

In condizioni fisiologiche, lo sviluppo di un sistema vascolare stabile e funzionale dipende dall'equilibrio dei segnali angiogenetici e stabilizzanti i vasi, e dai segnali che promuovono la regressione dei vasi stessi.

In situazioni patologiche il processo angiogenico è quanto mai anomalo e dipende dall'alterazione di questa fine omeostasi. Le cellule endoteliali e i periciti che formano i capillari, sono depositari di tutte le informazioni geniche necessarie allo sviluppo dell'intero sistema capillare. Questo processo è finemente controllato per merito di molecole solubili rilasciate dalle stesse cellule endoteliali, da cellule stromali e dall'infiltrato leucocitario, da proteine della matrice extracellulare e da forze fisiche. La loro complessa regolazione deriva dal risultato di un bilancio operato da peptidi che stimolano l'angiogenesi (Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Fibroblastic Growth Factor (FGF), Interleukin 4, Interleukin 8, e altri) e fattori endogeni che la inibiscono (Trombospondina, Angiostatina, Endostatina). Il meccanismo che regola tale equilibrio si altera, o per una ridotta produzione di fattori ad attività inibitoria come accade nelle più comuni cardiopatie, o per una eccessiva produzione e liberazione di sostanze ad azione pro-angiogenica come accade nel caso di angiogenesi tumore-associata. Esistono tre distinti processi coinvolti nella formazione del letto vascolare: vasculogenesi, angiogenesi e arteriogenesi, e questi stessi intervengono in modo alterato nelle cardiopatie.

La vasculogenesi è il processo di formazione dei vasi a partire dalle cellule staminali durante lo sviluppo embrionale, cioè la differenziazione dei progenitori mesodermici, gli angioblasti, in cellule endoteliali e la formazione "de novo" di un network vascolare. Questo processo ha inizio con la formazione di isolotti di sangue ("blood

islands”) composti di cellule che comprendono angioblasti (EPCs) alla periferia e cellule staminali ematopoitiche al centro (HSCs). Questi due tipi di cellule condividono numerosi determinanti antigenici (KDR, Tie-2/Tek e CD34) , il che fa pensare ad un precursore mesodermico, come emangioblasti.

I precursori delle cellule endoteliali (EPCs) sono state trovate nel sangue periferico dell’adulto, e si è visto che la principale fonte di queste cellule è rappresentata dalle vene del cordone ombelicale umano (Fig.2.1).

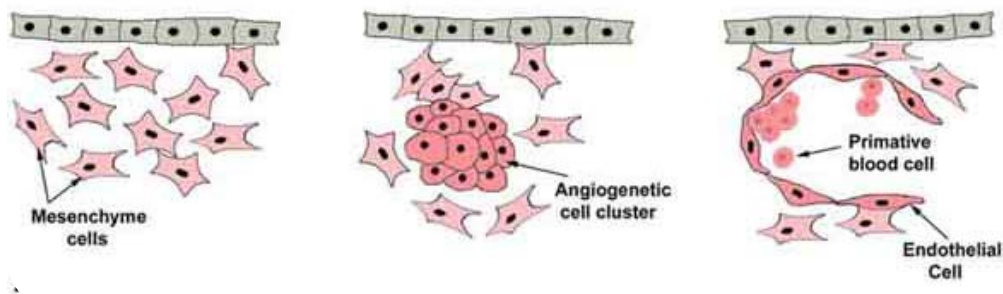


Figura 2.1. Rappresentazione schematica del processo di vasculogenesi in vivo.

Il termine *angiogenesi*, invece, si riferisce al processo di ramificazione e di crescita di capillari pre-esistenti. Tale processo si riscontra nel corso dello sviluppo embrionale, mentre non è normalmente attivo nei tessuti di un individuo adulto, tranne che a livello endometriale durante il ciclo mestruale.

La formazione di nuovi vasi è inoltre indispensabile nei processi infiammatori e di riparazione delle ferite. Questo complesso processo consiste di quattro fasi caratterizzate da programmi genetici differenti e in parte sovrapposti, che includono l’attivazione e migrazione di preesistenti cellule endoteliali mature già completamente differenziate, degradazione e rimodellamento dell’ECM, proliferazione delle cellule endoteliali e formazione di nuovi vasi (Fig. 2.2).

Si individuano varie tappe nel processo angiogenico (Fig. 2.2):

- 1- Reclutamento e differenziamento di progenitori endoteliali da parte di fattori solubili (VEGF, PlGF, Ang1, citochine)
- 2- Quiescenza di cellule endoteliali ed interazione con i principali componenti della ECM (collagene, fibronectina, fibrina e laminina).
- 3- Attivazione delle ECs, proliferazione, migrazione attraverso il rilascio di metalloproteinasi (MMPs) e plasmina
- 4- Differenziamento e morfogenesi delle cellule endoteliali
- 5- Reclutamento delle cellule della muscolatura liscia (SMC) ad opera di fattori solubili (PDGF, Ang1, PlGF, etc)
- 6- Stabilizzazione dei vasi

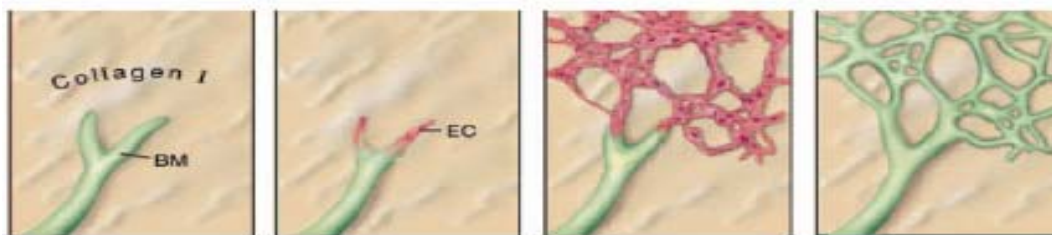


Figura 2.2. Rappresentazione schematica del processo di angiogenesi in vivo

Sotto l'azione dei fattori angiogenici (come, ad esempio, VEGF e FGF), le cellule endoteliali rilasciano enzimi proteolitici (MMPs) che degradano la membrana basale dei capillari pre-esistenti, e esprimono specifiche integrine per la migrazione, le cellule endoteliali iniziano così a migrare (per chemiotassi) penetrando attraverso lo stroma verso la fonte del fattore angiogenico, ove si moltiplicano e si dispongono a formare il nuovo vaso. Queste fasi sono regolate in parte da fattori di crescita specifici per l'endotelio vascolare che attualmente comprendono, diversi membri della famiglia di VEGF (VEGF₁₆₅, VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₈₉, VEGF₁₈₃, ecc), quattro membri della famiglia delle angiopoietine e membri della famiglia delle efrine;

nonché fattori di crescita pleiotropici (PDGFs, TGFs, FGFs, HGF, Interleuchine, semaforine), dai recettori cellulari integrinici (in particolare le integrine $\alpha_v\beta_3$ e $\alpha_v\beta_5$), da proteine di adesione cellulare della matrice extracellulare e da metalloproteinasi (MMPs). Tutte queste molecole concorrono in maniera complementare e coordinata a formare un sistema vascolare funzionale. L'*arteriogenesi* descrive, infine, il processo di maturazione dei vasi inseguito al reclutamento delle cellule muscolari lisce e dei periciti, che porta al rimodellamento del sistema vascolare primitivo. Queste fasi sono regolate in parte da fattori di crescita specifici per l'endotelio vascolare che attualmente comprendono: 1) cinque membri della famiglia di VEGF; 2) quattro membri della famiglia delle angiopoietine; 3) membri della famiglia delle eferine. Una regola sembra essere che tutte queste molecole concorrono in maniera perfettamente complementare e coordinata a formare un sistema vascolare funzionale. Il VEGF sembra avere un ruolo prioritario nelle fasi di inizio e progressione dell'angiogenesi, le angiopoietine nella maturazione e l'efrina B-2 nell'indirizzare le cellule endoteliali verso un destino arterioso o venoso. Inoltre molti altri fattori solubili (PDGFs, TGFs, FGFs, HGF, semaforine, chemochine, citochine) sono egualmente richiesti per la formazione del sistema vascolare, sebbene questi stessi fattori svolgano un ruolo pleiotropico in molti altri sistemi. I segnali provenienti dalla matrice hanno un ruolo chiave nella regolazione dello sviluppo del sistema vascolare, cruciale per la sopravvivenza dei vasi in via di formazione, per la specificità degli effetti mediati dai recettori tirosino-chinasici degli induttori angiogenici. Durante lo sviluppo VEGF agisce legandosi ai recettori Flk1/ KDR per promuovere la differenziazione delle cellule endoteliali, proliferazione e formazione del vaso primitivo. Successivamente Ang-1 agisce via recettore Tie2 per rimodellare il primo abbozzo di vaso e promuove interazioni tra le cellule endoteliali e la matrice extracellulare per stabilizzare il vaso

maturato. Negli adulti, Ang-2 è espresso nelle regioni di rimodellamento, e qui si pensa che blocca la stabilizzazione costitutiva dovuta all'azione di Ang-1. È stato proposto che la destabilizzazione dovuta ad Ang-2 in assenza di VEGF porta alla regressione del vaso, mentre questa destabilizzazione in presenza di alti livelli di VEGF attiva la risposta angiogenica. Lo stimolo comune per la trascrizione delle molecole che regolano la vasculogenesi, l'angiogenesi e l'arteriogenesi è la diminuzione della pressione parziale di ossigeno. Dati recenti dimostrano che l'ipossia attiva fattori di trascrizione che agiscono come principali attivatori dell'aumento dell'espressione genica degli induttori angiogenici.

2 Struttura e funzione della matrice extracellulare

Per ottimizzare le proprietà dei materiali sintetici, è necessario uno studio del microambiente naturale in cui le cellule sono esposte in vivo. La formazione di un tessuto è garantita da un'interazione dinamica tra le cellule che lo costituiscono e il loro microambiente che risulta essere sostanzialmente costituito dalla matrice extracellulare e da altri citotipi (fibroblasti, macrofagi, mastociti, plasmacellule) con i quali la popolazione cellulare interagisce.

La matrice extracellulare naturale comprende una varietà di proteine e polisaccaridi, secreti localmente, che si aggregano in un reticolo organizzato in maniera compatta e connesso alla superficie della cellula che l'ha prodotto.

Le matrici sono costituite da proteine strutturali di natura fibrosa (i diversi tipi di collagene ed elastina), unite ad una componente interstiziale formata da glicoproteine di natura adesiva (fibronectina, laminina, entactina, vitronectina, trombospondina, condronectina, osteonectina, fibrina), imbevute in una sostanza "fondamentale" gelatinosa e fortemente idratata costituita da proteoglicani e glicosamminoglicani (eparan-solfato ed eparina, condroitin-solfato, dermatan-solfato, cheratan-solfato,

acido ialuronico). I gels di polisaccaridi consentono la diffusione di sostanze nutritive, metaboliti ed ormoni tra il sangue e le cellule dei tessuti assicurando resistenza alle forze compressive esercitate sulla matrice; le fibre di collagene rinforzano la matrice, la organizzano e ne assicurano resistenza alla trazione, le fibre dell'elastina, invece, ne assicurano l'elasticità. Le proteine di adesione agevolano la connessione delle cellule alla parte più appropriata della matrice extracellulare: la fibronectina favorisce il congiungimento dei fibroblasti e di varie altre cellule con la matrice dei tessuti connettivi, mentre la laminina favorisce quello delle cellule epiteliali con la lamina basale. E' la diversa combinazione di questi componenti che conferisce alle matrici extracellulare dei diversi tessuti specifici requisiti funzionali. Ad esempio l'abilità dei tendini di resistere alla trazione e della cartilagine e delle ossa di resistere alla compressione, risulta da differenze locali dell'organizzazione e composizione dell'ECM. Ancora l'elasticità della pelle dipende dalla presenza di un gel idratato composto da collagene interstiziali, proteoglicani, glicoproteine e soprattutto dalla presenza di abbondante elastina.

E' stato osservato che il processo con cui i singoli componenti della matrice si assemblano tra loro in vivo è un processo unidirezionale e irreversibile. Ciò vuol dire che la ricostruzione in laboratorio di un polimero a partire dai componenti estratti dalla matrice extracellulare di un tessuto non necessariamente presenterà tutte le proprietà che invece mostra quando gli stessi componenti si assemblano in vivo. Ciò è dovuto al fatto che la composizione, l'organizzazione e la distribuzione dei diversi componenti delle matrici varia non solo a seconda del tessuto, ma anche in base a modificazioni del potenziale di legame di queste proteine tra loro e con i loro recettori cellulari. Inizialmente si pensava che la matrice extracellulare dei vertebrati servisse da impalcatura relativamente inerte in grado di stabilizzare la struttura fisica dei tessuti. E' oramai chiaro che la matrice nativa svolge un ruolo attivo e complesso

nella regolazione del comportamento delle cellule con cui entra in contatto, influenzandone sviluppo, migrazione, proliferazione, forma e funzione metabolica. L'interazione tra cellule e matrice è bidirezionale e dinamica. Esiste una continua ricognizione biologica, da parte delle cellule, dei segnali presenti nella matrice circostante: le cellule attraverso i recettori di membrana interagiscono con le molecole dell'ECM e trasmettono segnali attraverso la membrana a molecole citoplasmatiche. Questi segnali danno inizio ad una cascata di eventi che dal citoscheletro arrivano fino al nucleo regolando l'espressione di specifici geni, i cui prodotti influenzano a loro volta la matrice in vario modo.

Distinguiamo due forme distinte di ECM: la matrice interstiziale dei tessuti connettivi, e la lamina basale (BM) degli epitelii. Nel primo tipo le molecole dell'ECM circondano le cellule riempiendo gli spazi interstiziali intercellulari, nella BM le molecole dell'ECM sono deposte solo sulla superficie basale dell'epitelio su cui sono deposte le cellule. Inoltre mentre nella matrice interstiziale le molecole tendono a formare un lattice tridimensionale, la BM si organizza in un piano. Questa differente organizzazione è dovuta principalmente a differenze nel self-assembling delle molecole di collagene. È importante inoltre, sottolineare che la ECM non è una struttura statica, e non è secreta in modo casuale. Essa è una componente dinamica di tutti i tessuti e il suo ruolo nel processo di angiogenico e di vasculogenesi è ormai noto.

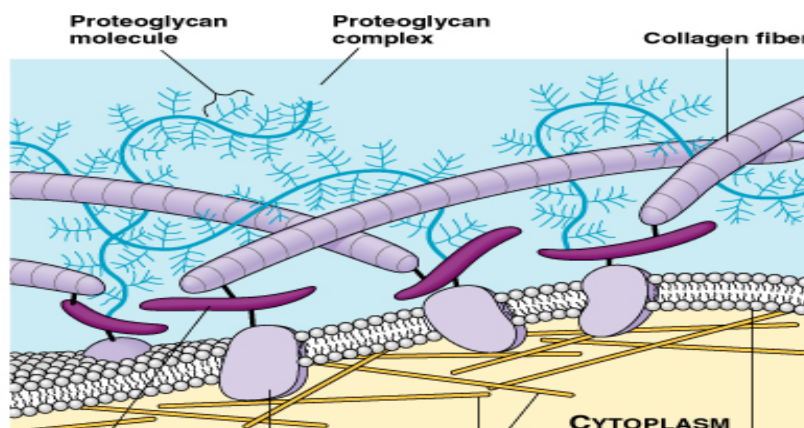


Figura 2.3 Rappresentazione schematica della ECM

Durante il processo di vasculogenesi, le cellule endoteliali interagiscono con i componenti della matrice per migrare, proliferare e per formare strutture tubulari tridimensionali [46]. I vari componenti della matrice supportano la formazione di tubuli a partire da cellule endoteliali. In vitro, sia il collagene di tipo I che la membrana basale (Matrigel) inducono la formazione di strutture simili a validi cellule endoteliali. Le cellule si attaccano ad entrambi i gels, migrano e si allineano per formare tubuli e generare vasi cavi. Il processo è più lento sul collagene che su Matrigel, richiede vari giorni, e i capillari hanno la loro membrana basale depositata all'interno del lume. In vivo, è stato dimostrato che la membrana basale è una componente critica durante i primi processi di sviluppo, i suoi componenti principali sono la laminina, il collagene di tipo IV e vari fattori di crescita [47].

La laminina funziona da impalcatura iniziale del processo di sviluppo embrionale ed è importante nel processo sia di vasculogenesi che di angiogenesi nell'adulto.

3 I Glicosamminoglicani (GAG)

Le catene dei glicosamminoglicani occupano ampi spazi e formano gel idrati. I GAG sono catene di polisaccaridiche non ramificate composte da unità di disaccaridi ripetute. Sono detti GAG perché uno dei due residui di zucchero nel disaccaride ripetuto è sempre un ammino zucchero (N-acetilglucosamina) che nella maggior parte dei casi è solfato. Il secondo zucchero è di solito un acido urico (glucuronico o iduronico). Poiché ci sono gruppi solforici o carbossilici sulla maggior parte residui glucidici, i GAG sono caratterizzati da un'elevata carica negativa. In base ai residui glucidici, al tipo di legame tra i residui e al numero e alla posizione dei gruppi solforici si distinguono 4 principali gruppi di GAG: 1) acido ialuronico, 2) condroitin-solfato e dermatan-solfato, 3) eparan-solfato ed eparina, 4) cheratan-solfato.

Le catene di polisaccaridi, diversamente dalle catene polipeptidiche, sono troppo rigide per ripiegarsi su se stesse e formare compatte strutture globulari. Per di più, esse sono fortemente idrofile. I GAG tendono ad assumere nello spazio conformazioni distese che occupano un volume enorme rispetto alla loro massa e formano gel anche a concentrazioni molto basse. A causa dell'elevata densità delle loro cariche negative attraggono una nube di cationi, quali il Na^+ , che sono osmoticamente attivi, provocando l'afflusso di grandi quantità d'acqua nella matrice. Ne deriva una tendenza al rigonfiamento, o turgore, che rende la matrice capace di resistere alle forze di compressione. Per questo motivo, la matrice della cartilagine che avvolge l'articolazione del ginocchio può resistere a pressioni di centinaia di atmosfere. La quantità di GAG nel tessuto connettivo è di solito meno del 10% in peso rispetto a quella delle proteine fibrose. Tuttavia poiché le catene dei GAG formano gel porosi e idratati, occupano gran parte dello spazio extracellulare, fornendo un supporto meccanico ai tessuti e consentendo, contemporaneamente, la diffusione di molecole idrosolubili e la migrazione delle catene. La prima e principale funzione dell'ECM è di supporto per l'ancoraggio delle cellule. E' stato osservato che trattando un tessuto con enzimi proteolitici che degradano la ECM, il tessuto viene distrutto e le cellule si dissociano. Diversamente l'assemblaggio di cellule dissociate da un tessuto viene promosso se le cellule vengono poste su una matrice intatta. La seconda funzione è dovuta alla presenza di regolatori di crescita insolubili (solid-state): recenti studi in vitro hanno dimostrato che sebbene sia le molecole dell'ECM e che i fattori di crescita diffusibili agiscono in concerto nel controllo della morfogenesi, sono le molecole dell'ECM i regolatori dominanti. E' stato osservato che sono esse a determinare il destino cellulare, a stabilire se le cellule devono proliferare, morire o differenziare.

L'ancoraggio cellulare all'ECM è anche la base per il controllo della crescita ancoraggio dipendente.

4 Scopo del lavoro di tesi

Lo scopo di questo progetto di dottorato, è stato quello di ingegnerizzare matrici polimeriche per modulare il microambiente a cui le cellule endoteliali sono esposte, per poi quantizzare gli effetti che i gradienti di regolatori angiogenici hanno sulle funzioni delle cellule endoteliali e sulla loro riorganizzazione tridimensionale, in vitro ed in vivo. In particolare, un primo obiettivo è stato la progettazione di matrici polimeriche naturali a base di collagene capaci di direzionare lo sprouting angiogenico in vitro. A tal fine, sono state realizzate matrici semi-interpenstrate di collagene ed acido ialuronico a varie concentrazioni ed è stato studiato l'effetto dell'HA ad alto peso molecolare sul processo di sprouting angiogenico.

Un secondo approccio per l'ingegneria del tessuto vascolare è stato quello di realizzare microbiglie di PLGA per il rilascio controllato del fattore di crescita vascolare (VEGF). Le cinetiche di rilascio e l'effetto biologico del VEGF è stato studiato sia in vitro che in vivo. Infine, la nostra attenzione si è spostata sull'uso di matrici sintetiche per la realizzazione di scaffold vascolarizzati. Il materiale preso in considerazione è stato il PEG-diacrilato per le sue note caratteristiche di biocompatibilità, biodegradabilità e bioattività [8-11].

Per lo studio della vascolarizzazione direzionale indotta dal materiale e per una appropriata distribuzione spazio-temporale dei regolatori angiogenici sono stati tenuti in considerazione vari parametri:

- Definizione dei parametri geometrici, strutturali, tecnologici più idonei per la progettazione e la realizzazione delle matrici polimeriche composite
- Caratterizzazione e ottimizzazione dei dispositivi polimerici per l'inclusione ed il successivo rilascio dei fattori biologicamente attivi

- Definizione dei profili spaziali e temporali ideali dei fattori biologici per l'ottimizzazione dei processi di angiogenesi
- Ricerca dei tipi di cellule ingegnerizzate e della relativa tecnica di ingegnerizzazione per l'inclusione nelle matrici polimeriche di cellule capaci di produrre agenti regolatori/induttori angiogenici

CAPITOLO 3

SPROUTING ANGIOGENICO DIREZIONATO

INDOTTO DA GRADIENTI DI SEGNALI

1 INTRODUZIONE

L'angiogenesi gioca un ruolo importante nella medicina rigenerativa, essendo necessaria per lo sviluppo di un nuovo tessuto. Infatti, per la rigenerazione di un tessuto indotto dal materiale, la formazione e l'invasione di vasi sanguigni in scaffold tridimensionali (3D), sono essenziali per determinare la funzionalità finale di un dispositivo impiantato. Anche se spesso è osservata la ricrescita di vasi, la vascolarizzazione è troppo lenta o limitata agli strati più esterni dell'impianto e perciò insufficiente a provvedere al giusto apporto di ossigeno e nutrienti alle cellule più interne. Quindi, il destino di un impianto dipende fortemente dalla abilità di un costrutto a stimolare una rapida e direzionata ricrescita vascolare nell'ospite. Negli ultimi anni sono stati fatti progressi migliorando le prestazioni di biomateriali per innescare la ricrescita vascolare. Questi approcci sono basati sull'inclusione di fattori solubili angiogenici dentro la matrice [8,50,51] o nell'ingegneria di matrici bioattive [52-59]. È stato dimostrato che il rilascio di potenti induttori angiogenici (come VEGF), inclusi dentro specifici "serbatoi" all'interno di scaffolds polimerici, aumentano la vascolarizzazione di un dispositivo impiantato [51,60]. Tuttavia questi approcci sono in parte limitati dalla bassa infiltrazione di cellule endoteliali, dall'instabilità biologica dei fattori angiogenici e dalla loro velocità di rilascio. Dall'altra parte, materiali bioattivi codificano per segnali cellulari che regolano e aumentano lo sviluppo vascolare. Tra questi materiali troviamo matrici naturali come gel di collagene [59], fibronectina, laminina [60], idrogeli crosslinkati di collagene ed heparan-solfato [54] e fibrina [61]; così come materiali sintetici e semisintetici ingegnerizzati per attivare specificamente le cellule endoteliali [62]. In vivo, il grado e la direzionalità degli sprouts vascolari sono controllati da gradienti temporali e spaziali di segnali diffusibili e segnali della matrice extracellulare [59,63].

Perciò ci attendiamo che, dalla modulazione dei gradienti spaziali dei segnali matricellulari, è possibile guidare e direzionale gli sprout vascolari in matrici 3D. Per testare questa ipotesi abbiamo quantificato l'estensione e la direzionalità degli sprout vascolari di sferoidi di cellule endoteliali (EC) in matrici tridimensionali composti da un network semiinterpenetrante (SIPNs) di collagene ed acido ialuronico (HA). La distribuzione di queste molecole, aventi ruoli diversi nell'angiogenesi, è stata spazialmente modulata dentro il SIPNs esponendo sferoidi di EC a gradienti di fattori solubili. Abbiamo, quindi, dimostrato che i gradienti di matrici possono essere utilizzati per direzionare e aumentare lo sprouting angiogenico in scaffold 3D.

2 MATERIALI E METODI

1 Materiali

Una soluzione acida (pH2) di collagene di tipo I di derma bovino (Vitrogen) è stato acquistato da Angiotech Biomaterials (Palo Alto, Ca). L'acido ialuronico di sale di peso molecolare $1,55 \times 10^5$ Da è stato fornito in polvere dalla FAB (Fidia Advanced Biopolimers S.P.A., Abano Terme, Italy). L'acido ialuronico di sale marcato con fluoresceina isotiocianato (FITC) è stato fornito dal Dipartimento di Medicina Chimica dell'Università dello Utah.

2 Realizzazione dello scaffold

I gels di collagene sono stati preparati seguendo le procedure della casa produttrice. In breve, 8 mL di collagene sono stati miscelati con 1 mL di terreno di coltura DMEM 10X (Gibco, Life Technologies) e con 1 mL di soluzione di NaOH 0.1N. Il pH della soluzione è stato poi portato a 7.4 ± 0.2 aggiungendo goccia goccia una soluzione 0.1N di NaOH. La fibrillogenesi del collagene è avvenuta incubando la soluzione a 37°C per 45 minuti, fino ad ottenere un gel stabile. I SIPNs di collagene-acido ialuronico (CHA SIPNs) sono stati ottenuti promuovendo la fibrillogenesi del

collagene in presenza di HA, seguendo un protocollo riportato in letteratura [64]. Per ottenere i materiali compositi CHA ad una concentrazione finale di collagene 1.2 mg/mL, uno stock di collagene 2.4 mg/mL è stato miscelato in modo alterno con soluzioni di HA a varie concentrazioni, rispettivamente 10, 5, 2 mg/mL, ottenute sciogliendo la polvere in DMEM. La soluzione è stata poi sterilizzata per filtrazione. Le soluzioni risultanti avevano una concentrazione di HA finale, rispettivamente, di 5, 2.5, e 1 mg/mL. Le soluzioni sono state incubate a 37° per 35 minuti per permettere la fibrillogenesi del collagene. Dopo l'incubazione, il materiale semi-interpenetrato appariva come un gel idratato.

3 Colture cellulari

Cellule endoteliali di aorta porcina (PAE) sono state donate dal Prof. F. Bussolino, Istituto per la ricerca e la cura del cancro (IRCC), Università di Torino (Candiolo, Italia). Le cellule sono state coltivate in terreno Ham's F12 (BioWittaker, Cambrex) in presenza del 10% di siero fetale bovino inattivato (HI-FBS) (Gibco, Life Technologies).

4 Produzione di sferoidi endoteliali

Gli sferoidi di ECs sono stati prodotti seguendo un modello descritto in letteratura [65]. Un monostrato confluyente di cellule PAE è stato tripsinizzato. Le cellule (700 cellule per sferoide) sono state sospese in un terreno di coltura contenente lo 0.25% (peso/volume) di carbossimetilcellulosa (Sigma), seminate all'interno di piastre non aderenti da 96 pozzetti (Greiner, Germany) e cresciute a 37° C, 5% CO₂, e 100% di umidità. In queste condizioni, tutte le cellule sospese formavano un singolo sferoide di EC. Questi sferoidi sono stati raccolti entro 24 h e trasferiti nelle matrici.

5 Saggio di sprouting angiogenico “in vitro” in matrici isotropiche

Gli sferoidi sono stati raccolti e centrifugati per 30 min a 800 rpm. Gli sferoidi di PAE sono stati isolati e sospesi in una soluzione di collagene di tipo I di origine bovina (1.2 mg/mL) o in CHA SIPNs a concentrazioni crescenti di HA (1, 2.5, 5 mg/mL), in terreno Ham's F12 (BioWittaker, Cambrex) ad una concentrazione finale del 5% di siero (HI-FBS) (Gibco, Life Technologies). La sospensione di sferoidi è stata versata in piastre per coltura cellulare (Corning) ed è stata incubata a 37° C per 45 minuti per permettere la polimerizzazione del collagene; prima di aggiungere la sospensione cellulare è stato fatto uno strato di gel di collagene senza cellule, per evitare l'adesione degli sferoidi sul fondo della piastra. Approssimativamente, 12 sferoidi di PAE sono stati inclusi nei gels. Dopo la polimerizzazione, è stato aggiunto terreno Ham's F12 (BioWittaker, Cambrex) alle piastre per coprire i gels. Questi ultimi sono stati, poi, incubati a 37° C, 5% CO₂, e 100% di umidità.

6 Saggio di sprouting angiogenico “in vitro” in gradienti di HA

Per gli esperimenti in matrici anisotropiche (C-CHA; C-CHA-C), i gradienti di HA sono stati generati all'interno di matrici di gel di collagene. In matrici di C-CHA5, i gradienti di HA dentro la matrice di collagene sono stati ottenuti versando collagene senza cellule (1.2 mg/mL) e una soluzione di CHA5 mg/mL in ognuna delle due metà di una piastra Petri da 35mm. Le due soluzioni, separate da uno spazio di 1mm, sono state indotte a miscelarsi riempiendo la fessura con una sospensione di sferoidi sospesi in CHA5 mg/mL. In matrici di C-CHA5-C, una soluzione di collagene senza cellule (1.2 mg/mL) è stata versata in ognuna delle due metà della piastra. La fessura è stata poi riempita da una sospensione di sferoidi in una matrice di CHA 5 mg/mL. I campioni sono stati incubati a 37° C 5% CO₂, e 100% di umidità per permettere la polimerizzazione delle matrici e poi ricoperti da terreno Ham's F12 povero di siero. Per visualizzare il profilo del gradiente, l'intensità della fluorescenza dell'acido

ialuronico marcato con FITC è stata misurata con un passo di 1mm lungo il diametro del campione mediante un microscopio confocale Zeiss LSM 510, dotato di un laser argon, ad una lunghezza d'onda di 488 nm e un obiettivo 10x. Le immagini sono state acquisite con una risoluzione di 512 x 512 pixels (949 x 949 μ m). La fluorescenza emessa è stata indagata utilizzando i filtri LP 505 e HFT 488.

7 Microscopia elettronica a scansione (SEM)

Le analisi strutturali dei gel semi-interpenetrati sono state effettuate al microscopio elettronico a scansione (SEM). I campioni sono stati fissati in 2.5% di glutaraldeide a temperatura ambiente tutta la notte, velocemente congelati in azoto liquido, tagliati, e poi liofilizzato per 20 h (K 850 Emitech). I campioni seccati sono stati attaccati ad opportuni supporti, ricoperti con un film d'oro di 15 nm ed esaminati al SEM (Hitachi S-2300, Japan). Le immagini sono state ottenute ad un voltaggio di 20 kv.

8 Analisi dei dati

Lo sprouting angiogenico in gel è stato quantificato analizzando ogni 24 h per 3 giorni, le immagini di un singolo sferoide utilizzando il software di analisi di immagine MetaMorph collegato ad un microscopio invertito (IX50-Olympus). Per quantificare la direzionalità dello sviluppo dello sprouting, l'immagine dello sferoide è stata divisa in 8 settori di 45°. Le analisi di direzionalità sono state misurate rispettando le coordinate xy della mezza linea di coltura in cui il gradiente è stato generato. Infine, in ogni settore sono stati misurati il numero, la lunghezza totale e la lunghezza media di tutte le strutture simili a vasi (CLS) originate dallo sferoide. Sono stati esaminati, per ogni gruppo sperimentale, un minimo di cinque sferoidi. Gli esperimenti sono stati effettuati in duplicato e ripetuti cinque volte. Le analisi statistiche sono state effettuate utilizzando il test ANOVA ad 1 via in cui il valore di p era < 0.05 è considerato statisticamente significativo.

3 RISULTATI

1 Effetto dell'HA sullo sprouting angiogenico in 3D SIPNs

L'effetto delle composizione della matrice sull'estensione e il grado dello sprouting è stato analizzato coltivando gli sferoidi di PAE in CHA SIPNs. La concentrazione di HA è stata variata tra 1 e 5 mg/mL, mentre la composizione di collagene è stata mantenuta costante ad 1.2 mg/mL. Quattro diverse matrici sono state analizzate: (1) C (collagene 1.2 mg/mL), (2) CHA (collagene 1.2 mg/mL + HA 1mg/mL), (3) CHA2.5 (collagene 1.2 mg/mL + HA 2.5 mg/mL), (4) CHA5 (collagene 1.2 mg/mL + HA 5 mg/mL). Le analisi video a rallentatore al microscopio (Fig. 3.1) indicavano che non era presente lo sprouting angiogenico in CHA2.5 nessuna matrice entro 3 h dalla coltura. Dopo 24 h, gli sferoidi coltivati in C [Fig.3.1.A)], CHA1, e CHA2.5 [Fig.3.1 (B,C)], mostravano una prominente risposta angiogenica. In queste matrici, gli sferoidi avevano un incremento di strutture simili a capillari (CLS) in modo radiale, con la tendenza all'aumento in lunghezza, spessore e ramificazione con il passare del tempo di coltura [Fig. 3.1 (I-K)]. Diversamente un forte effetto inibitorio è risultato evidente in matrici CHA5 [Fig 3.1D)], dove gli sferoidi non presentavano

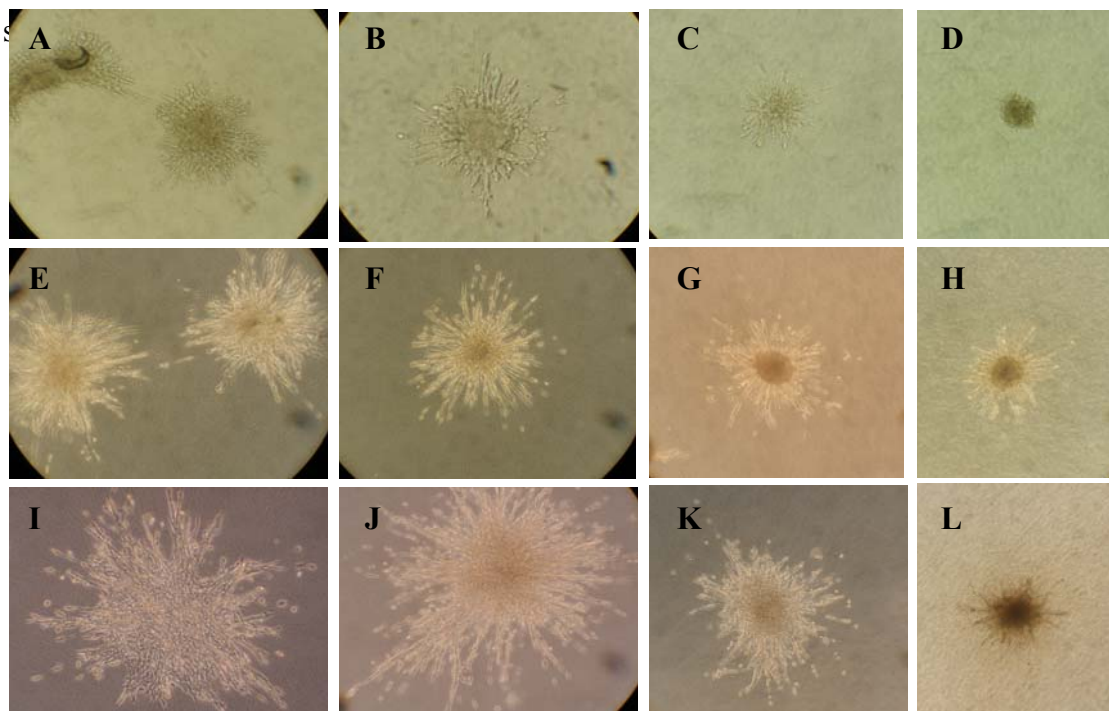


Figura 3.1. Sprouting in matrici isotropiche. Lo sprouting di sferoidi di ECs inclusi in gels 3D e in CHA SIPNs a diverse concentrazioni di HA. Immagini al microscopio ottico di sferoidi cresciuti in collagene 1.2mg/ml, C(A,E,I); collagene-HA 1mg/ml, CHA1(B,F,J); collagene-HA 2.5mg/ml, CHA2.5(C,G,K); collagene-HA 5mg/ml, CHA5(D,H,L) per 24 (A,B,C,D), 48 (E,F,G,H), e 72 ore (I,J,K,L).

L'estensione dello sprout, la velocità e il numero dello sprouting si riducevano progressivamente con l'aumentare delle concentrazioni di HA [Fig.3.2 (A-C)]. La lunghezza media dello sprout era rispettivamente di 96.2 μm in gel di collagene, 83.4, 73.3, e 9 μm in gel di CHA1, CHA2.5, CHA5; oltretutto, per le stesse matrici la densità degli sprouts variava rispettivamente da 78 sprouts/sferoide in gel di collagene a 56, 43, e 12 sprouts/sferoide. Tuttavia, la velocità di sprouting era tra 4 $\mu\text{m}/\text{h}$ in gels di collagene a 3.48 (CHA1), 3 (CHA2.5), e 0.05 $\mu\text{m}/\text{h}$ (CHA5) [Fig. 3.2 (B)]. A 48 e 72 h di cottura, lo sprouting era osservato anche in gels di CHA5, anche se la lunghezza e il numero medio degli sprouts erano negativamente influenzati dall'HA e non raggiungevano mai il valore osservato con le altre matrici. In modo evidente, a 48 h il grado di sprouting aumentava con la concentrazione di HA, mentre era inversamente correlato alla concentrazione di HA a 72 h. L'insieme di questi risultati indicavano che la presenza di HA dentro lo scaffold porta ad un effetto inibitorio sui primi stadi dell'angiogenesi (prime 24 h), determinando un ritardo nello sprouting. Le analisi al SEM delle SIPNs mostrano che la presenza di HA nei gels di collagene induce un ispessimento della fibra (Fig. 3.3), mentre non sono alterate in modo significativo le proprietà meccaniche (dati non mostrati) o il tempo necessario di gelificazione (dati non mostrati).

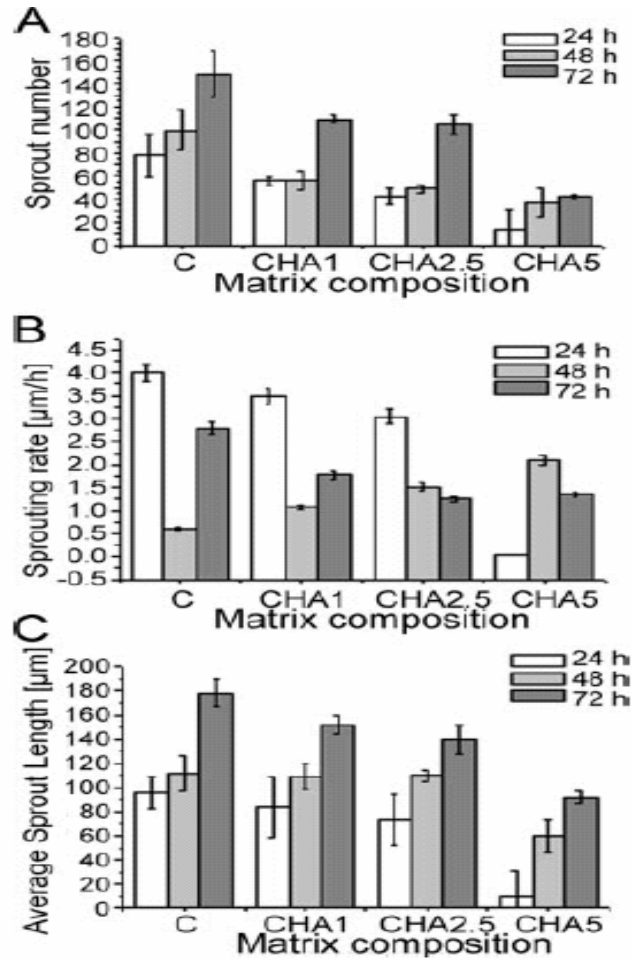


Figura 3.2. Analisi quantitativa degli sprout in matrici isotropiche. Gli istogrammi degli sprouting di sferoidi in matrici di collagene 3D e in CHA SIPNS a diverse concentrazioni (1, 2.5, 5, mg/ml) dopo 24, 48, e 72 ore di coltura. I grafici rappresentano la media \pm SD del numero (A), la velocità degli sprout dovuta ai singoli sferoidi, e (C) la lunghezza media degli sprouts. Sono stati fatti tre esperimenti diverse e per ognuno sono stati esaminati 5 sferoidi. Il test Anova : $p < 0.05$.

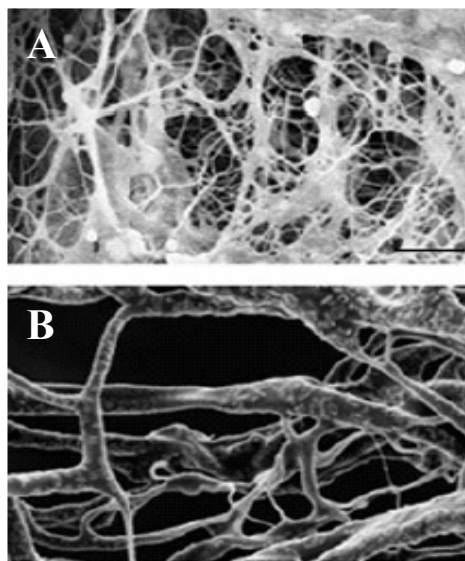


Figura 3.3. Analisi strutturale SEM di gels di collagene (A) e CHA5 SIPNs (B).

2 I gradienti di HA inducono lo sprouting angiogenico direzionato

A causa del diverso effetto del collagene e dell'HA sullo sprouting angiogenico di ECs, abbiamo postulato che la modulazione spaziale di queste molecole potrebbe essere coinvolto nello sprouting direzionale. Per supportare questa ipotesi, i gradienti di HA sono stati creati all'interno dei gels di collagene. La distribuzione di HA è stata quantificata utilizzando HA marcato con FITC ed è stato misurato il profilo d'intensità fluorescente (Fig. 3.4). Come riferimento, è stata misurata l'intensità di fluorescenza di matrici isotropiche di concentrazione nota di HA. [Fig.3.4 (A)]; come atteso, la fluorescenza di HA era costante in ogni regione dello stesso campione e aumentava con la concentrazione di HA. Diversamente, in matrici anisotropiche, la distribuzione di HA risultava essere sigmoideale in C-CHA5 [Fig.3.4 (B)] e in matrici di C-CHA5-C [Fig.3.4 (C)]. Per il gradiente sigmoideale formato, il significato dell'intensità fluorescente andava da valori caratteristici di C a quelli di CHA5, dentro una regione di 10mm attorno alla linea centrale della piastra Petri, indicando un gradiente di HA approssimativamente di 0.5 mg/mL/mm. Per il gradiente simmetrico formato, la relazione spaziale delle due regioni su entrambi i lati della linea centrale era comparabile a quella di 0.5 mg/ml/mm.

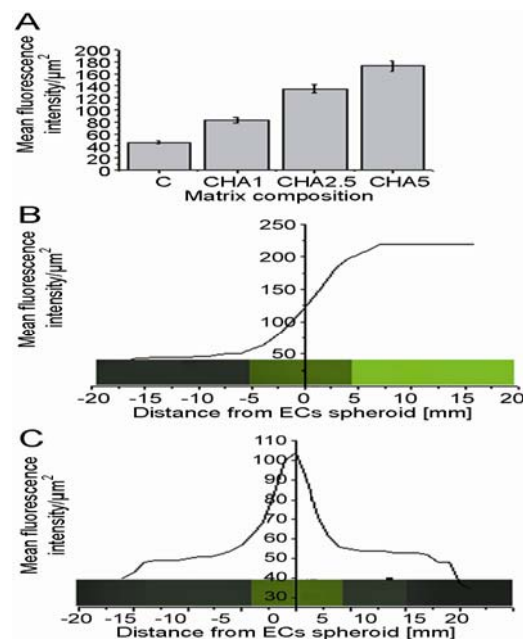


Figura 3.4. Quantificazione dell'intensità di fluorescenza di HA. I diagrammi dell'intensità fluorescente di HA misurati in matrici isotropiche (A) ed anisotropiche C-CHA5 (B) e C-CHA5-C(C). L'intensità della fluorescenza è una misura della concentrazione di HA. Il grafico mostra che la distribuzione della fluorescenza è costante in matrici isotropiche e aumenta all'aumentare della concentrazione di HA (A), sigmoidale in C-CHA5(B), e in modo gaussiano in C-CHA5-C(C). Le immagini sono rappresentative dell'intensità dei profili di fluorescenza misurati lungo le matrici (B,C).

Quando gli sferoidi di Ecs sono stati messi in gradienti di matrici sigmoidali di HA, lo sprouting era direzionato in maniera opposta al gradiente di HA e gli sferoidi assumevano una forma emicircolare [Fig.3.5 (B)]. Allo stesso modo, quando gli sferoidi di ECs sono stati messi in gradienti di matrici simmetriche di HA, gli sferoidi assumevano una forma appiattita, dovuta allo sprout direzionato verso le matrici ricche di collagene [Fig.3.6 (B)]. In tutti i casi, gli sferoidi mostravano una morfologia polarizzata, differendo dalla distribuzione dello sprouting in modo radiale osservata in matrici isotropiche C o CHA (confronta con la Fig. 3.1). L'orientamento degli sprouts è stato valutato misurando il numero e la lunghezza media delle CLS originate da ognuno degli otto settori nei quali gli sferoidi sono stati idealmente divisi (Figs 3.5 e 3.6, pannelli A, C, D). A ventiquattro ore di coltura, la maggior parte degli sprouts (> 60%) erano direzionati in direzioni opposte ai gradienti di HA (Fig.3.5, settori 4 e 5) e non sono state osservate deviazioni degli sprouts orientati verso la regione ricca in HA. In matrici C-CHA5, il numero totale degli sprouts (74.5) è stato paragonato a quello misurato nelle matrici di collagene [62], indicando che tutte le cellule formanti lo sferoide sono reclutate a formare il CLS attraverso la matrice ricca di collagene. Tuttavia, il CLS diretto verso la matrice ricca di collagene (Fig. 3.5, settore 4 e 5) mostrava una lunghezza media due volte maggiore di quella in matrici isotropiche di collagene. Quindi, la velocità di sprouting misurata in matrici anisotropiche C-CHA5 era 5.6 $\mu\text{m}/\text{h}$ contro 4 $\mu\text{m}/\text{h}$ in matrici isotropiche di collagene.

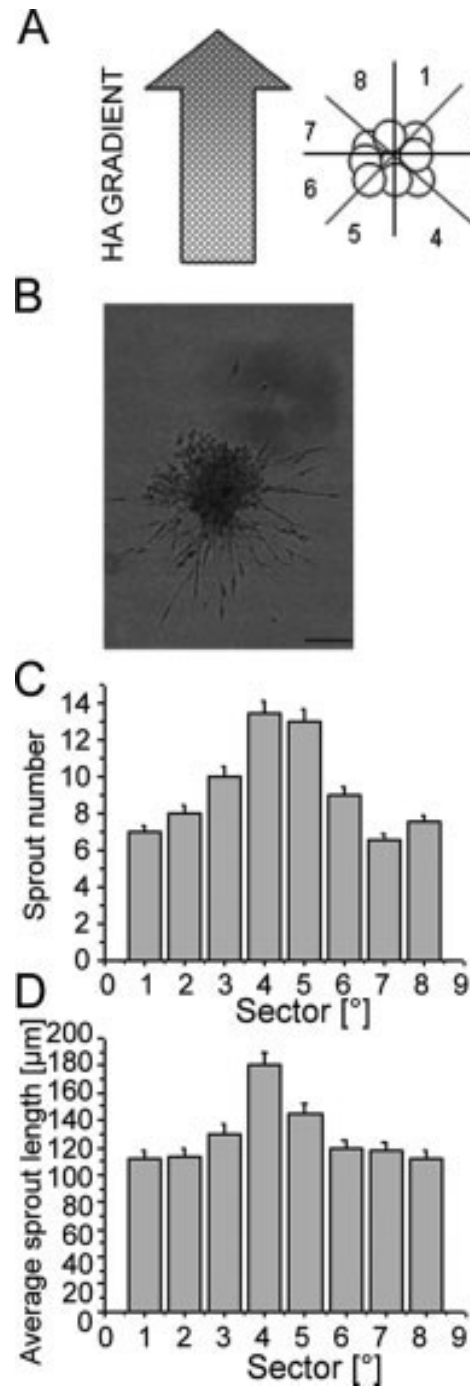


Figura 3.5. Analisi quantitativa degli sprouting in matrici di C-CHA5. In una sospensione di CHA5 sono stati seminati sferoidi di ECs tra matrici di C e CHA5. Rappresentazione schematica di matrici di C-CHA5(A) con sferoidi posti all' interfaccia C-CHA5. Il "cartoon" mostra le otto regioni in cui gli sferoidi sono stati divisi per le analisi quantitative dello sprouting. Immagine microscopica di uno sferoide (B) in matrici di C-CHA5 a 24 ore di cultura, caratterizzato dallo sprouting direzionato. Le foto rappresentano la media \pm SD di : il numero degli sprouts (C); la media della lunghezza degli sprout (D) originati da un singolo sferoide esposto al gradiente di HA. Sono stati esaminati 5 sferoide per punto di tre diversi esperimenti. Il test Anova $p < 0.05$.

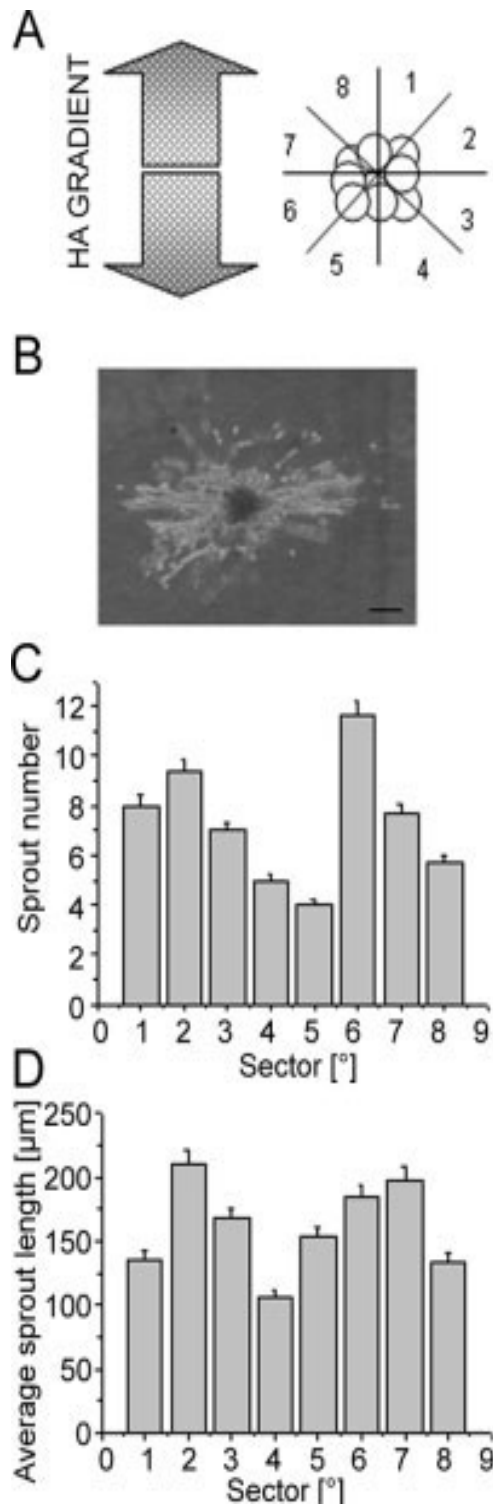


Figura 3.6 Analisi quantitativa degli sprouting in matrici di C-CHA5-C. In una sospensione di CHA5 sono stati seminati sferoidi di ECs tra matrici di C e CHA5. Rappresentazione schematica di matrici di C-CHA5-C(A) con sferoidi posti all' interfaccia C-CHA5. Il "cartoon" mostra le otto regioni in cui gli sferoidi sono stati divisi per le analisi quantitative dello sprouting. Immagine microscopica di uno sferoide (B) in matrici di C-CHA5-C a 24 ore di coltura, caratterizzato dallo sprouting direzionato. Le foto rappresentano la media \pm SD di : il numero dello sprout (C); la media della lunghezza degli sprout (D) originati da un singolo sferoide esposto al gradiente di HA. Sono stati esaminati 5 sferoide per punto di tre diversi esperimenti. Il test Anova $p < 0.05$.

Nelle matrici anisotropiche C-CHA5-C, il numero totale degli sprout era ridotto quando paragonato a matrici isotropiche di collagene (58 contro 78) , mentre la lunghezza media degli sprout diretti verso i siti ricchi di collagene risultava drasticamente aumentata [Fig.3.6, settore 2 -3 e 6-7]; paragona [Fig. 3.6 (D) con Fig. 3.2 (B)]. Questi dati mostrano che le matrici anisotropiche possono essere utilizzate per direzionare e velocizzare il processo angiogenico. Infine, vale la pena notare che le analisi delle singole immagini ha portato alla luce l'esistenza, dentro un singolo sprout, di cellule con una diversa vitalità. Le cellule situate vicine al bordo dello sprout angiogenico sembrano esplorare il substrato attraverso l'estrusione di filopodia in molte direzioni e le cellule formanti lo sprout seguono le prime.

4 DISCUSSIONE

Un primo fattore limitante la misura di tessuti ingegnerizzati è la mancanza di nutrienti prontamente disponibili per le cellule trapiantate una potenziale soluzione è di incoraggiare una rapida ricrescita direzionata di un tessuto vascolare dentro matrici 3D. Molti progressi sono stati ottenuti nell'identificazione di fattori che controllano le varie fasi del processo angiogenico [66]. Inoltre , fattori solubili, della ECM [30] hanno un ruolo chiave nella vitalità delle cellule endoteliali funzionando sia come risorsa di segnali di posizione [67-71] sia come deposito di molecole secrete ad attività di "signaling". Anche se la bilancia quantitativa tra fattori pro-angiogenici solubili ed insolubili ed i fattori anti-angiogenici è ormai ampiamente accettata [72] poco è noto su come la combinazione di queste molecole è tradotta in un'organizzazione architettonica precisa, inclusa la distribuzione 3D, la combinazione dei rami, della grandezza e della direzione dello sviluppo vascolare. Qui, abbiamo dimostrato che lo sprouting angiogenico, in termini di numero degli sprout, l'estensione e la velocità, dipende dalla matrice (Fig.3.1 e 3.2). Più precisamente, l'attività angiogenica del collagene di tipo I è ridotta dalla presenza di

HA nella matrice. Inoltre, quando le cellule PAE sono organizzate in sferoidi in CHA SIPNs, entrambi il numero e la lunghezza dello sprout sono inibiti dall' aumento della concentrazione di HA, con una completa inibizione nelle prime 24 h in matrici di HA 5 mg/ml (Fig.3.2). Questa inibizione non è causata dalla morte cellulare, dato che questi sferoidi sono stati precedentemente colorati con un tracciante vitale (dati non mostrati). I risultati indicano che l'HA provvede ad un inibizione più forte sul numero che sulla propagazione dello sprout, suggerendo che il meccanismo di inibizione di questa molecola è probabilmente correlato al processo di nucleazione dello sprout.

Lo sprouting angiogenico in materiali 3D avviene in un processo a tre stadi:

(1) adesione, (2) migrazione, (3) proliferazione. Mentre l'adesione è il primo step per l'inizio del processo di sprouting, l'allungamento dello sprouting potrebbe essere influenzato dalla proliferazione o migrazione, dipendendo dal tempo e non dal numero di cellule dello sferoide. La relazione che esiste tra i processi di migrazione e di proliferazione possono spiegare la sopravvivenza non monotomica della propagazione dello sprouting osservato [Fig.3.2 (B)]. In particolare, le matrici di collagene inducono un primo stimolo intenso di movimento per le ECs, innescando la loro protusione dal centro dello sferoide, migrazione e formazione dello sprout. Inoltre, nelle prime 24 h, non c'è proliferazione cellulare o elongazione dello sprout per migrazione cellulare. A tal punto, tutte le ECs che formano la superficie dello sferoide sono coinvolte nella formazione del CLS. Una volta che i CLS si sono formati, l'estensore dello sprout richiede la proliferazione cellulare. Di conseguenza, a 48 h, è osservata una riduzione del grado di sprouting [Fig.3.2 (B)]. A 72 h, tuttavia, il grado di sprouting cresce ancora, dovuto all'effetto fitogenico del collagene. Un comportamento simile può essere osservato in CHA1. La riduzione dello sprouting durante le prime 24 h è dovuta all'inibizione dell'adesione e di

migrazione dovuta all'HA [73,74]. Il numero ridotto di sprouting indica che non tutte le cellule disponibili dello sferoide sono coinvolte nella formazione della struttura tubulare a 24 h. Tuttavia, dato che lo sprouting si verifica nelle successive 24 h, sia per migrazione che per proliferazione, segue che il grado di sprouting è più alto in CHA1 che in collagene. Diversamente, a concentrazioni di HA 2.5 mg/ml (CHA 2.5), il grado di sprouting diminuisce con il tempo, portando l' assenza di un picco a 72 h che caratterizza le matrici C e CH1. Questo comportamento può essere spiegato con l'effetto anti-mitogenico dell'HA a 2.5 mg/ml. Infine, in CHA 5 l'effetto inibitorio di HA (CHA 5) è più evidente a stadi più precoci. La quasi completa assenza dello sprouting durante le prime 24 h, seguita da un rapido incremento del grado di sprouting a 48 h, suggerisce che l'adesione è impedita, portando un ritardo a 24 h. In ogni modo, una volta che le cellule hanno interagito con la matrice, la migrazione può avvenire. Entrambi, collagene ed acido ialuronico, sono coinvolti nella normale morfogenesi e differenziazione [75,76]. Tuttavia, mentre è stato largamente studiato il ruolo del collagene di tipo I nell'angiogenesi [71], ma resta ancora incerta la funzione di HA sul comportamento cellulare.

I nostri dati suggeriscono, in accordo con studi precedenti, che l'alto peso molecolare di HA ha attività anti-angiogenica sia in vivo che in vitro [75,29]. Le diverse proprietà meccaniche delle matrici potrebbero escludere questo meccanismo, poiché non ci sono differenze nelle proprietà meccaniche e fisiche. Infatti, le immagini SEM (Fig.3) mostrano un ispessimento delle fibre in presenza di HA, non sono stati osservati cambiamenti significativi in termini di proprietà meccaniche [81]. Il ritardo dello sprouting osservato in CHA5 SINPs potrebbe essere spiegato dall'effetto inibitorio della presenza di HA sull'interazione collagene-integrine. Infatti, Xin et al. [81] hanno riportato che, quando l'HA non modificato è all'interno del collagene, esso ricopre completamente le fibre di collagene, mascherando i siti di legame delle

cellule con il collagene. La presenza dello sprouting osservato al 2° giorno di coltura potrebbe essere dovuto alla degradazione di HA. Avendo dimostrato che la composizione della matrice controlla il meccanismo di sprouting, è possibile ipotizzare che i gradienti di segnali in matrici 3D possono modulare sia la velocità che la direzione dello sprouting. Inoltre seminando sferoidi di ECs in gel di collagene contenenti gradienti di HA, gli sprouts vascolari erano in direzione opposta alla matrice di HA. (Figs. 3.5 e 3.6). Abbiamo dimostrato, quindi, in modo preliminare che le cellule dello sprouting riconoscono l'anisotropia del materiale. Infatti, anche se in gels isotropici, gli sprouts nascenti crescono radialmente (Fig.3.1) in gradienti di HA in C-CHA5 SIPNs (Figs 3.4 e 3.5), gli sferoidi rispondono ad un profilo sigmoidale del gradiente, assumendo una forma semicircolare, essendo lo sprouting limitato solo da un lato. Diversamente, in gradienti di HA di C-CHA5-C SIPNs (Fig. 3.4–3.6), gli sferoidi rispondono ad un profilo di curva Gaussiana assumendo una forma fusa, essendo lo sprouting limitato a due poli opposti dello sferoide. Interessante è che il grado dello sprout nelle prime 24 h è più alto che in collagene puro, suggerendo che tutti gli sferoidi di ECs rivolti direttamente verso i gradienti di HA sono reclutati negli sprouts. La riduzione dell sprouting verso le regioni ricche di HA porta ad un aumento della lunghezza dello sprout in regioni ricche di collagene. Quindi, il gradiente porta non solo ad una direzionalità del CLS ma anche ad un incremento nella velocità dello sprouting in direzione opposta al gradiente di HA

L'analisi dei singoli "stacks" ha evidenziato l'esistenza di due popolazioni cellulari con diverso comportamento all'interni dei singoli sprouts: le cellule situate all'estremità portante dello sprout angiogenico, sembrano esplorare il substrato attraverso i filopodia e le cellule formanti lo stelo dello sprout, proliferano attraverso una linea tracciata dalle prime cellule. Recentemente, è stato dimostrato in vivo, che gli sprout vascolari in crescita sono guidati da cellule endoteliali specializzate dette

“tip cells”, identificate sia per la loro morfologia che per la loro espressione genica [77,78]. E’ noto che le “tips cells” sono responsabili di direzionare i gradienti di fattori solubili, mentre poco è noto su come esse rispondono a gradienti allo stato solido. Anche se molti passi sono stati fatti nello sviluppo di materiali bioattivi, nuovi biomateriali occorrono per ricreare i microambienti biologici, per indurre una rapida vascolarizzazione (angiogenesi terapeutica). Il limite principale è la difficoltà di generare in vitro gradienti di segnali solubili in scaffold 3D.

CAPITOLO IV

RILASCIO SOSTENUTO DI VEGF DA MICROBIGLIE DI PLGA

IN MATRICI DI COLLAGENE

1 INTRODUZIONE

Le strategie di un tessuto ingegnerizzato in seguito ad un danno o il riparo di organi danneggiati, richiedono un tessuto rigenerato indotto da cellule. La proliferazione e il differenziamento cellulare si ottiene promuovendo un appropriato microambiente locale [79]. Quindi, per indurre un effetto terapeutico tessuto-specifico la progettazione di uno scaffold multifunzionale deve presentare segnali appropriati al sito desiderato, con una dose locale per un tempo sufficiente tale da indurre un effetto biologico. E' noto che segnali solubili e insolubili della matrice extracellulare (ECM) danno alle cellule sia segnali chimici che fisici [80]. Così, la giusta combinazione dei fattori biofisici può guidare e controllare il destino di cellule seminate in uno scaffold 3D [81]. Tra le molecole segnale, i fattori di crescita e i loro geni corrispondenti sono responsabili di aumentare la rigenerazione tissutale indotta da cellule. Uno scaffold dovrebbe trasmettere segnali che guidino eventi cellulari specifici all'interno dei tessuti dell'ospite e regolino il controllo spazio-tempo del microambiente a cui le cellule sono esposte. A tal fine, vari sistemi derivati naturalmente (collagene, idrogeli di arginato) o sintetici (PLGA, microsfele di PLGA o PLGA poroso) sono stati osservati per il trasporto di fattori solubili a cellule bersaglio sia in vivo che in vitro [82]. Tuttavia la strategia migliore consiste nel trasporto locale di molecole segnale semplicemente disperse nello scaffold [83-85], perciò portanti vari limiti. Il rilascio dei GFs direttamente interdispersi nella matrice è necessario per una cinetica controllata da proprietà fisico-chimiche del materiale costituente lo scaffold. Infatti, l'attività della molecola può essere seriamente ridotta dalla degradazione della matrice e dalla rapida divisione enzimatica che prende luogo quando la macro-molecola è esposta all'ambiente in vivo. Per superare queste limitazioni, è stato constatato che dentro lo scaffold [56,88] dovrebbero essere integrati specifici strumenti, abili a controllare il profilo di rilascio e a proteggere le

molecole la cui emivita è molto breve. Attraverso i sistemi di trasporto del farmaco, le microsfere a base di PLGA hanno dimostrato la loro potenzialità per il rilascio dei GFs in tessuti specifici [86,87,89]. Tali microsfere, come sistemi temporalmente controllati, possono regolare il tempo di rilascio della proteina (per esempio fattori multipli rilasciati ad intervalli di tempo diversi) anche per tempi prolungati durante lo sviluppo di un tessuto. Inoltre, una distribuzione spaziale delle molecole segnale può essere capace di controllare sia l'estensione che la struttura nella formazione di un tessuto [88]. Nello sforzo, di ingegnerizzare piattaforme di materiali abili a promuovere e guidare il processo di vascolarizzazione attraverso la neo-formazione di un vaso sanguigno nell'ospite, è stato realizzato uno scaffold 3D di collagene con microsfere di PLGA contenenti VEGF, potente stimolatore angiogenico. Tale scaffold è stato programmato per indurre un rilascio localizzato e sostenuto del VEGF per un periodo di varie settimane. La bioattività del fattore lasciato da tali microsfere è stata valutata su cellule della vena del cordone ombelicale umano (HUVEC) sia in 2D che in 3D e confrontate con campioni contenenti VEGF libero. E' stata studiata la quantità minima di VEGF rilasciata in grado di stimolare lo sprouting vascolare in 3D seminando cellule endoteliali in matrici di collagene in presenza di VEGF caricato in microsfere. La potenzialità dello scaffold ad attivare l'endotelio dell'ospite in vivo e promuovere e guidare lo sprouting vascolare è stato validato dal modello CAM (membrana corioallantoidea di pollo).

2 MATERIALI E METODI

1 Materiali

Acido polilattico co-glicolico (PLGA) (Resomer RG 504 H; peso molecolare 50 kDa; viscosità 0.5 dl/g) è stato comprato da Boehringer Ingelheim (Germania). E' stato usato il fattore di crescita endoteliale umano (VEGF) acquistato da R&D Systems (Minneapolis, USA). Una soluzione di VEGF (10µg/ml) è stata preparata in

condizioni sterili in soluzione salina fosfato 1M (PBS) contenente lo 0.1% (peso/volume) di albumina di siero bovino (BSA). E' stato usato il terreno di coltura Dulbecco (DMEM), terreno di crescita per cellule endoteliali SFM, siero fetale bovino inattivato (HI-FBS) penicillina G e streptomina acquistati da GIBCO (USA). Il collagene di tipo I (Vitrogen; 3.0 mg/mL; pH2) è stato fornito da Nutacon (Olanda). La BSA rodaminata (BSA-rhod) è stata fornita dalla Molecular Probes (Olanda). La BSA, l'eparina (Hp), l'eparina-cumarina (Hp-Cum), il fattore di crescita di cellule endoteliali, polivinilalcol (PVA, Mowiol 40-88), carbossimetilcellulosa, potassio fosfato monobasico e bibasico, cloruro di sodio e cloruro di potassio sono stati forniti da Sigma-Aldrich (USA). Il blu di metilene e l'acido cloridrico sono stati acquistati da Carlo Erba (Italia).

2 Preparazione delle microsfere

Le microsfere di PLGA contenenti VEGF (0.1 µg per mg di microsfere) sono state preparate con la tecnica della doppia emulsione. BSA e Hp sono state co-incapsulate per stabilizzare il VEGF durante l'incapsulazione e il rilascio (VEGF/Hp/BSA 1:1:70 in peso). Una soluzione di VEGF/Hp/BSA in PBS sterile ha pH 7.4 è stata miscelata con 1 ml di PLGA e metilcloride (10% peso/volume). La prima emulsione è stata ottenuta con un omogenizzatore ad alta velocità (DiAx 900 dotato di un supporto 6 G, Heidolph, Germania) a 15000 rpm per 2 minuti. Per ottenere le emulsioni multiple, alla prima emulsione sono stati aggiunti 10 ml di una soluzione 0.5 % (peso/volume) di PVA. Successivamente la soluzione è stata emulsionata ad 8000 rpm (supporto 10F) per 1 minuto. L'evaporazione del solvente e l'indurimento delle microsfere sono state ottenute da un agitatore magnetico (MR 3001 K, Heidolph, Germania) a temperatura ambiente. Dopo 3 h, le microsfere sono state raccolte, lavate 3 volte con acqua distillata per centrifugazione (Universal 16R, Hattich Zentrifugen, Germania) e liofilizzate per 24 h (0.01 atm, -60° C, Modulo, Edwards, UK). Sono stati prodotti 3

lotti diversi di microsfere. Il VEGF fluorescente caricato nelle microsfere è stato ottenuto dall'incapsulazione di sonde colorate, come BSA-Rhod ed Hp-Cum. Le microparticelle contenenti solo Hp e BSA (0.1 µg e 7 µg per mg di microsfere) sono state usate come controllo.

3 Morfologia e grandezza delle microsfere

La forma e la morfologia di una microsfera sono state analizzate al Microscopio Elettronico a Scansione (SEM) (Leica S440, Germania). I campioni sono stati attaccati su un supporto e ricoperti con oro sottovuoto. Il diametro medio e la distribuzione sono state determinate dal laser light scattering (Coulter LS 110Q, USA) sulla dispersione di microsfere liofilizzate in una soluzione acquosa 0.5 % (peso/volume) di PVA. La grandezza di una particella espressa come diametro medio \pm la deviazione standard dei valori raccolti da 3 diversi lotti. La distribuzione di VEGF, Hp-Cum e BSA-Rhod dentro una singola microsfera è stata osservata al microscopio confocale (CLSM) Zeiss LSM 510 dotato di un microscopio invertito con una lente obiettivo Zeiss 20X/3 NA (Carl Zeiss, Germania). E' stato usato un laser argon (λ_{ex} 543 nm/ λ_{em} 572 nm per BSA-Rhod; λ_{ex} 488 nm/ λ_{em} 525 nm per Hp-Cum).

4 Dosaggio di VEGF

Il VEGF in soluzione è stato quantificato con un saggio immuno enzimatico (ELISA) secondo le procedure indicate (Quantikine Kit, R&D System, USA). In breve 50 µl di diluente (RD1W) e 200 µl di soluzione standard di VEGF o di campioni opportunamente diluiti sono stati aggiunti ai pozzetti di una micropiastra coperta con un anticorpo monoclonale di topo che riconosce il VEGF ed incubata a temperatura ambiente per 3 h. Le piastre sono state lavate 3 volte con la soluzione di lavaggio. Dopo la completa rimozione di tale soluzione, l'anticorpo policlonale per il VEGF legato a perossidasi è stato aggiunto ad ogni pozzetto ed incubato per 2 h a

temperatura ambiente. Dopo il lavaggio 200 μ l di soluzione “substrate” (composto da 1:1 perossido di idrogeno e tetrametilbenzidine cromogena) sono stati aggiunti ad ogni pozzetto ed incubati per 20 minuti a temperatura ambiente. Dopo le piastre sono state lavate e sono stati aggiunti 50 μ l di soluzione “stop” (2 N acido solforico). In seguito allo sviluppo di colore, la densità ottica (O.D.) è stata misurata a una lunghezza d’onda di $\lambda = 450$ nm dal lettore (Wallac 1420 VICTOR 3, PelkinElmer) entro 30 minuti.

5 Efficienza di incapsulamento

La quantità di VEGF realmente presente nelle microsfele è stata misurata agitando una soluzione contenente un mg di particelle degradate caricate con VEGF in una soluzione 0.05 N di NaOH. Dopo 24 h, le soluzioni sono state centrifugate a 5000 rpm a 4 °C e il sovrinatante è stato analizzato per il contenuto di VEGF con il saggio ELISA. I risultati sono stati riportati come caricamento reale (ng incapsulati per mg di microsfele) e l’efficienza di incapsulazione (rapporto tra la quantità reale e la quantità teorica caricata X 100) \pm la deviazione standard dei valori raccolti da tre lotti diversi.

6 Le cellule

HUVECs, preparate e caratterizzate come precedentemente descritto [90], sono state coltivate nel terreno di crescita basale SFM in presenza di HI-FBS, fattore di crescita delle cellule endoteliali (100 μ g/mL), eparina porcina (100 μ g/mL), 1 % pen/strep (10000 U/mL penicillina sodica G e 10000 μ g/mL di streptomicina solfato in 0.85 % salina) e usate a passaggi precoci (I-IV).

7 Saggio di angiogenesi in vitro

Una piastra da 24 pozzetti è stata coperta con 230 μ l/pozzetto di Matrigel 13 mg/mL (R&D Systems) incubata per 30 minuti a 37°C fino alla formazione del gel. Le

HUVECs sono state piastrate su Matrigel ad una densità di 8×10^4 cellule/ml in un terreno senza siero in presenza di microsfere caricate con VEGF o VEGF diffuso. Le cellule sono state incubate a 37°C per permettere l'adesione allo strato di gel. Dopo 6 h di incubazione, la formazione di strutture simili a vasi è stata esaminata al microscopio a fase invertita. Le cellule sono state fissate con PBS contenente 0.2% di glutaraldeide, 1% di paraformaldeide, fotografate e l'estensione del network è stato analizzato con il software Scion Image.

8 Saggio di sprouting angiogenico in vitro

L'attività biologica del VEGF è stata determinata attraverso un saggio angiogenico a base di sferoidi di cellule endoteliali [91]. È stato tripsinizzato un monostrato confluyente di HUVECs. Le HUVECs (800 cellule per sferoide) sono state sospese in un terreno di coltura contenente lo 0.25 % (peso/volume) di carbossimetilcellulosa, seminate su piastre da 96 pozzetti non trattate per coltura (Grainer, Frickenhausen, Germania) e tenute a 37°C , 5% CO_2 , 100% di umidità relativa (RH). Questi sferoidi sono stati raccolti entro 24 h, centrifugati per 30 minuti a 800 rpm e sospesi in scaffold a base di collagene. Brevemente, gli scaffold sono stati ottenuti miscelando sferoidi di cellule endoteliali con una soluzione di collagene di tipo I a pH 7.4 (1.2 mg/ml) ed è stata indotta la fibrillogenesi a 37°C per 1 h. Prima di aggiungere la sospensione di collagene con sferoidi, le piastre sono state ricoperte da uno strato di gel di collagene senza cellule per evitare che gli sferoidi si attaccassero al fondo della piastra. Nei gels sono stati inseriti circa 12 sferoidi. Dopo la polimerizzazione, un terreno senza siero contenente VEGF diffuso o VEGF caricato in microbiglie è stato aggiunto alle piastre per coprire i gel fibrillati e i gel incubati a 37°C 5% CO_2 , 100% di RH. Dopo 24 e 48 h è stata osservata angiogenesi in vitro ed è stata quantificata mediante una misura semiautomatica della lunghezza cumulativa di tutti gli sprouts originati dal piano centrale di un singolo sferoide utilizzando il software di analisi di

immagine MetaMorph. Il numero di sprouts per sferoide di cellule endoteliali è stato calcolato misurando, a 24 e 48 h la lunghezza di tutti gli sprouts originati da ciascun sferoide. La lunghezza totale e la lunghezza media degli sprouts sono state calcolate analizzando immagini mediante il software di analisi MetaMorph collegato ad un microscopio invertito (IX50 Olympus). Le analisi statistiche sono state effettuate utilizzando il test ANOVA. I valori di “p” uguali o minori di 0.05 sono considerati statisticamente significativi.

9 Scaffolds a base di collagene contenenti microsfere di PLGA

Sono stati preparati scaffolds di collagene contenenti microsfere secondo procedure riportate precedentemente [92]. In breve i gels di collagene sono stati ottenuti diluendo il collagene (2.4 mg/ml di partenza) ad 1.2 mg/ml in un rapporto 1:1 con terreno DMEM. Le microsfere sono state omogeneamente disperse nel collagene per ottenere una soluzione finale di microsfere di 5.6 mg/ml. La fibrillogenesi dello scaffold di collagene è stata ottenuta incubando la soluzione a 37°C per circa 45 minuti, fino ad ottenere un gel solido. Sono stati preparati, come controllo, scaffolds fatti solo di collagene.

10 Saggio in vivo sulla membrana corioallantoidea di pollo (CAM)

Il saggio CAM è stato effettuato come precedentemente descritto [93]. Le uova di pollo fecondate sono state incubate in condizioni di umidità costante a 37°C. Al quarto giorno di incubazione, è stata aperta una finestra nel guscio dell’uovo dopo aver rimosso 3-4 ml di albume. La finestra è stata sigillata con un pezzo di nastro adesivo e le uova sono state incubate a 37°C. Al nono giorno, le matrici di collagene contenenti VEGF libero, VEGF caricato in microsfere, o microsfere bianche contenenti solo BSA ed eparina (come controllo) sono state impiantate al di sopra della CAM in sviluppo attraverso la finestra fatta nel guscio dell’uovo. Le uova sono state successivamente incubate a 37°C e le CAMs sono state esaminate. Al 12°

giorno, le CAMs sono state fotografate nell'uovo con macchina fotografica digitale (Olympus) sotto uno stereomicroscopio Olympus SZX9 e sono stati contati il numero dei vasi allantoici attorno all'impianto.

3 RISULTATI

1 Proprietà delle microsfere

Le particelle sono state preparate con un diametro di circa $21.5 \pm 1.2 \mu\text{m}$ poichè è stato provato che questa misura è adatta per l'inclusione in scaffolds di collagene [92]. Per evitare l'inattivazione, il VEGF è stato co-incapsulato con BSA ed eparina. La BSA è stata usata per competere con il VEGF per le interazioni all'interfaccia, mentre l'eparina è stata utilizzata per stabilizzare la complessazione con il VEGF [94]. L'efficienza di incapsulazione era maggiore del 70 % ($71.6 \pm 10.6 \text{ ng}$ di VEGF per mg di microsfere). Le immagini al CLSM dei gels di collagene integrati con microsfere contenenti VEGF fluorescente e contenenti Hp-Cum e BSA- Rhod sono state mostrate in figura 4.1. Non è stata individuata fluorescenza nei gels attorno alle microsfere. La fluorescenza rossa di BSA-Rhod era distribuita dentro la struttura microporosa del PLGA e sulla superficie dei macropori (Fig. 4.1 A), mentre la fluorescenza verde di Hp-Cum era principalmente osservata all'interno dei macropori delle particelle (Fig. 4.1 B). La distribuzione di BSA dentro la microsfera indicava che la BSA proteggeva effettivamente la localizzazione del VEGF all'interfaccia. D'altra parte, poiché è noto che il VEGF interagisce fortemente con l'eparina è ragionevole assumere che anche il VEGF è principalmente localizzato dentro i micropori. Il rilascio in vitro di VEGF da microsfere è riportato in figura 4.2 come ng di fattore rilasciato attivo per 1 mg di microsfere nel tempo. Le particelle davano un basso rilascio iniziale di VEGF nelle prime 24 h di incubazione ($< 10 \text{ ng/mg}$) seguito da un rilascio sostenuto di VEGF di circa 0.6 ng/giorno per mg di microsfere per i successivi 60 giorni.

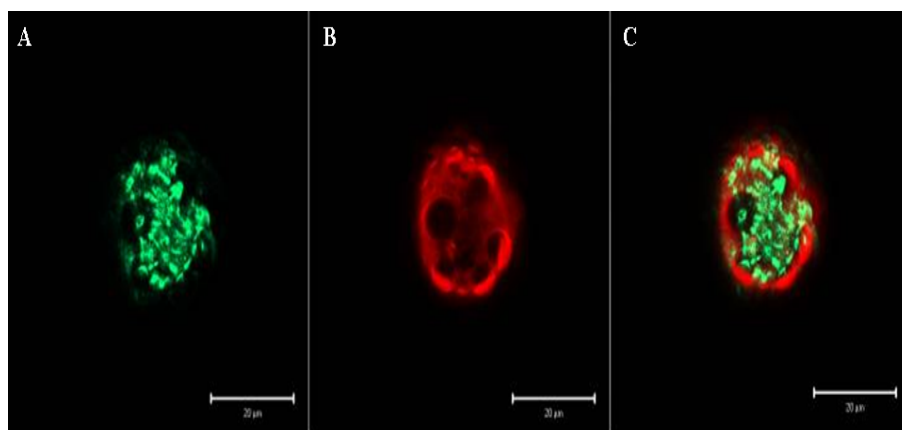


Figura 4.1. Immagini a scansione al microscopio confocale (CLSM) di microsfele contenenti VEGF: A) Hp-Cum (in verde); B) BSA/Rhod (in rosso); C) sovrapposizione di Hp-Cum e BSA/Rhod. La barra è di 20μm.

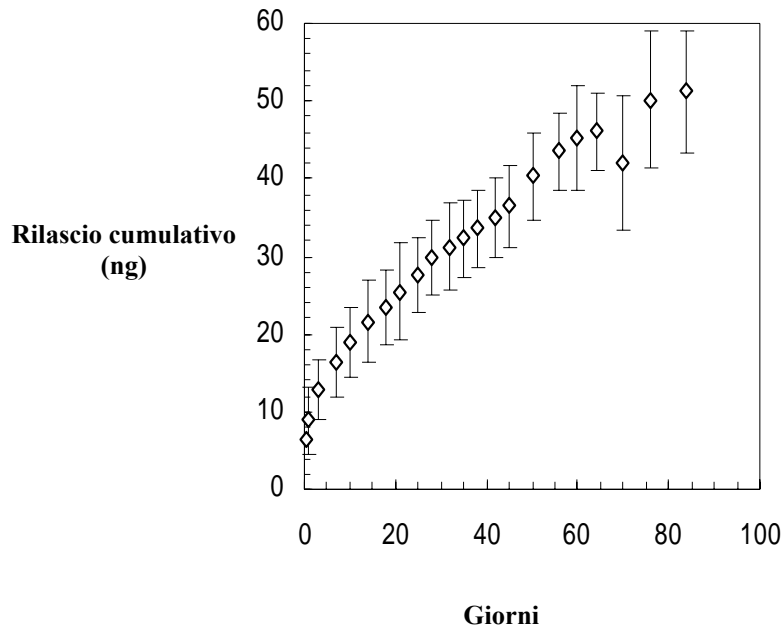


Figura 4.2. Rilascio cumulativo di VEGF da microsfele di PLGA in PBS a pH 7.4 a 37°C. I dati sono la media ± SD di tre duplicati.

2 La bioattività del VEGF rilasciato

La mancanza di citotossicità esercitata dalle microsfere di PLGA è stata valutata coltivando ECs in presenza di terreno di coltura pre-condizionato con microsfere o terreno contenente microsfere. In entrambi i casi le ECs erano vitali e proliferanti (dati non mostrati). In seguito abbiamo valutato se l'attività del VEGF era preservata dopo la produzione delle microboglie e il successivo rilascio da esse utilizzando un saggio per la formazione dei vasi (Fig. 4.3). Le HUVECs sono state piastrate su uno strato sottile di Matrigel ed è stata misurata la risposta angiogenica in relazione all'estensione e alla forma dei capillari, ottenuti dalla risposta delle cellule alle microsfere caricate con VEGF dopo 6 h di coltura. Le microsfere contenenti VEGF inducevano una rete vascolare paragonabile a quella indotta dal VEGF solubile (Fig. 4.3 A). Un aumento nel numero di intersezione delle strutture simile a vasi, è stato misurato con il software Scion Image (Fig 4.3 B).

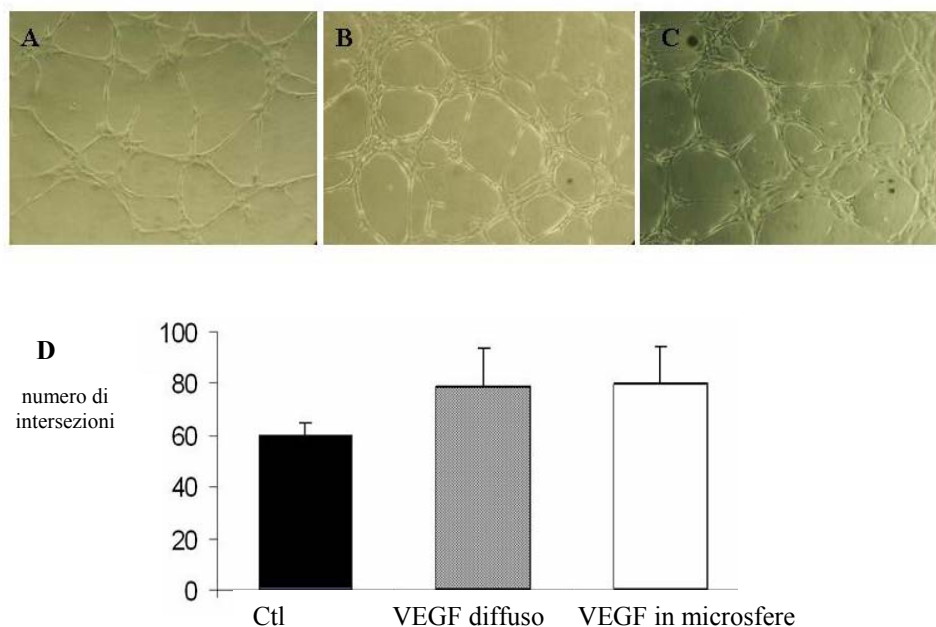
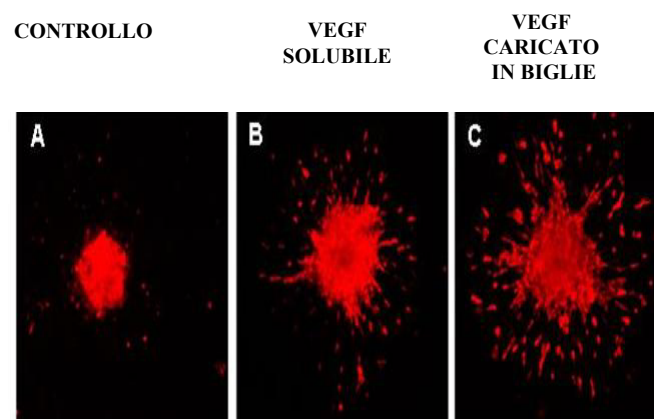


Figura 4.3. Immagini rappresentative al microscopio della rete vascolare di Huvecs su matrigel (A), nel gel di collagene con VEGF diffuso (B), e nel gel di collagene con microsfere contenenti VEGF (C). Nell'immagine D sono state calcolate le intersezioni del network capillare originato dalle Huvecs dopo 6 ore di coltura su matrigel, senza VEGF nel terreno (controllo), con VEGF diffuso (40ng/ml) nel mezzo, e con una quantità di microsfere tali da rilasciare una dose di VEGF di 40ng/ml dopo 24 ore. Il numero delle intersezioni è stato calcolato con il software Scion Image

3 Efficacia delle microsfere di PLGA contenenti VEGF

Le microsfere contenenti VEGF sono state analizzate per le loro capacità di stimolare angiogenesi utilizzando un modello di sprouting angiogenico di sferoidi di ECs [91]. Gli sferoidi di HUVECs sono stati coltivati in matrici 3D per ricreare il microambiente e la struttura a cui le cellule sono sottoposte in vivo. In particolare, gli sferoidi di ECs “sproutavano” ed invadevano il gel di collagene formando strutture simili a capillari sia in presenza di VEGF diffuso che di VEGF rilasciato dalle microsfere (Fig. 4.4 B-C); diversamente dal controllo (Fig. 4.4.A), senza il trasportatore angiogenico, era assente lo sprouting dello sferoide. Il trasporto sostenuto di VEGF da microsfera e da VEGF diffuso inducevano una lunghezza dello sprouting simile nelle prime 24 h (Fig. 4.4 D). La lunghezza media dello sprout era di 250 μm per il collagene contenente microsfere caricate con VEGF e di 240 μm per il collagene contenente il VEGF diffuso. Diversamente, nelle successive 24 h, lo sprouting indotto dai gels di collagene in cui erano presenti le microsfere caricate con VEGF era maggiore di quello presente nel collagene con VEGF libero ($p < 0.05$). La lunghezza media dello sprout era di 255 μm in collagene con il VEGF libero e di 300 μm in presenza di VEGF incapsulato in microsfere.



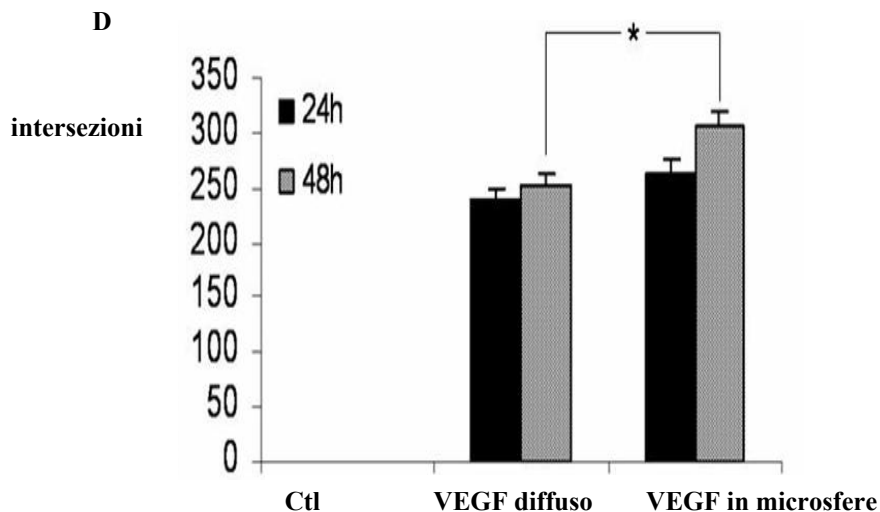


Figura 4.4. Immagini al microscopio confocale di sferoidi di Huvecs dopo 24 ore di coltura (A-C). Analisi quantitativa della lunghezza media degli sprouts degli sferoidi inclusi in matrici di solo collagene (controllo), in matrici di collagene e VEGF diffuso (40 ng/ml) o in matrici di collagene con microsfere contenenti VEGF, dopo 24 e 48 ore di incubazione \pm SD.

4 Studi in vivo

E' stata studiata la potenzialità angiogenica dei gels di collagene attivati con VEGF rilasciato da microsfere mediante il saggio in vivo sulla membrana corioallantoidea di pollo (CAM). L' impianto di gels di collagene contenenti microsfere caricate con VEGF dava una maggiore risposta angiogenica rispetto al controllo di solo collagene. Gli effetti angiogenici di un esperimento rappresentativo sono stati mostrati in Figura 4.5. Il saggio è stato eseguito utilizzando microsfere di PLGA contenenti VEGF ad una concentrazione finale di 0.1 μ g/mg di microsfere. Sono state usate microsfere vuote come controllo negativo (Fig. 4.5 A). Gli scaffolds di collagene sono stati impiantati sulla CAM al nono giorno di incubazione. E' stato evidenziato, dopo 72 h dall'impianto, un aumento dell' attività angiogenica attorno agli scaffolds di collagene bioattivati con microsfere contenenti VEGF rispetto al controllo. Le analisi quantitative hanno rilevato che le matrici di collagene contenenti microsfere di PLGA caricate con VEGF inducevano una forte risposta angiogenica di

vasi sanguigni neo-formati in vivo di circa 2.5 volte maggiore rispetto al collagene con microsfere vuote ($P < 0.05$).

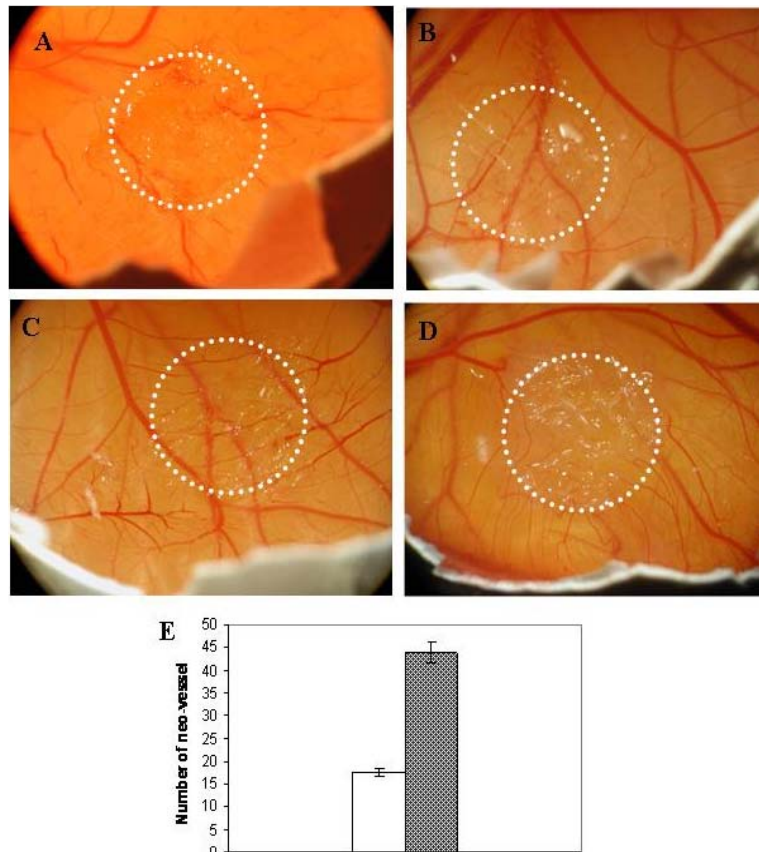


Figura 4.5 Immagini allo stereomicroscopio in ovo delle CAMs al giorno 12 di incubazione. Le CAMs impiantate con solo collagene (A), con collagene e biglie vuote (B), con collagene e VEGF diffuso (C), con collagene e biglie contenenti VEGF (D). Nel grafico (E) è riportata la quantificazione dei neo-vasi nell' impianto con solo collagene (colonna bianca) e nell' impianto con collagene e biglie contenenti VEGF (colonna nera).

4 DISCUSSIONE

I “serbatoi” polimerici incapsulanti il VEGF, inclusi in scaffolds di collagene forniscono un controllo efficace sulla distribuzione, sulle cinetiche e sulla disponibilità di segnale bioattivo e perciò sulla risposta cellulare. Mentre il rilascio spaziale e temporale di segnali bioattivi è regolata dai meccanismi di movimento e di legame di proteine nella ECM nativa, l'ingegnerizzazione di scaffolds a base di

biomateriali può rappresentare un modello per sequestrare, trasportare in modo altamente specifico fattori morfogenetici, può funzionare da piattaforma multifunzionale nel controllo del processo di rigenerazione tissutale [95]. Sono stati realizzate nuove piattaforme applicando i concetti fondamentali del trasporto del farmaco alla progettazione di uno scaffold in grado di attivare segnali biologici favorevoli per la complesse morfogenesi tissutali [96]. In ogni caso, molti di questi approcci si basano sulla dispersione di segnali bioattivi in matrici polimeriche avendo come risultato quello di uno scarso controllo sulla quantità di farmaco rilasciato nel tempo. Inoltre, il grado di rilascio di biomolecole interdisperse dentro una matrice è controllato dalle proprietà fisico-chimiche e strutturali dello scaffold e non a cinetiche predefinite. D'altra parte, gli opportuni segnali dovrebbero essere esposti nella forma attiva al sito desiderato, con una opportuna dose per un tempo necessario ad indurre un effetto terapeutico tessuto-specifico.

Tuttavia, i dati migliori sono stati ottenuti includendo dispositivi micrometrici nella struttura dello scaffold capaci di preservare l'attività dei fattori morfogenetici generalmente labili e di accordarsi con le loro cinetiche di rilascio. Seguendo questa linea, abbiamo realizzato scaffolds di collagene contenenti microsfele di PLGA contenenti VEGF per aumentare lo sprouting vascolare. Per preservare la sua attività biologica, il VEGF è stato co-incapsulato con eparina e BSA. Per evitare, l'inattivazione del VEGF dovuta alla sua emivita breve e all'interfaccia con il microambiente durante la preparazione dello scaffold di collagene, è stato preparato il complesso VEGF/Hp/BSA (Fig. 4.1). Le microsfele sono state capaci di sostenere il rilascio del VEGF biologicamente attivo per varie settimane ad una concentrazione costante di 0.6 ng/giorno per mg di microsfele (Fig.4.2). E' stato dimostrato che il collagene attivato con microsfele caricate con VEGF aumentava fortemente lo sprout vascolare di sferoidi di cellule endoteliali, quando paragonato al collagene attivato

con VEGF diffuso (Fig.4.4). Questo risultato indicava chiaramente che il VEGF interdisperso dentro la matrice polimerica non porta ad un reale stimolo angiogenico. Invece, anche se la quantità di VEGF interdisperso all'interno del collagene era uguale alla quantità di VEGF incluso nelle microsfele, l'effetto angiogenico delle due matrici era paragonabile nelle prime 24 h e risultava maggiore per la matrice attivata da microsfele durante le successive 24 h (Fig. 4.4). L' incremento della risposta angiogenica nel gel di collagene attivato con microsfele, era dovuto al miglior controllo nella somministrazione di VEGF fornito dalle microsfele di PLGA. La quantità eccessiva di VEGF prodotto nello scaffold di collagene attivato con VEGF diffuso, non risultava dare in alcun caso un maggiore effetto pro-angiogenico nelle prime 24 h di trattamento ed esso potrebbe risultare addirittura anti-angiogenico [97]. D'altra parte, l'ulteriore allungamento dello sprouting presente nelle matrici di collagene attivate con microsfele durante le successive 48 h confermava che il rilascio sostenuto del VEGF dalle microsfele portava ad una risposta angiogenica prolungata. Abbiamo dimostrato che le microsfele caricate con VEGF in scaffolds di collagene aumentano l'angiogenesi terapeutica anche in vivo dimostrando un incremento di vasi sanguigni nell'ospite di 2.5 volte quando confrontati con lo scaffold di collagene attivato con VEGF diffuso (Fig.4.5). Tutti questi risultati indicano chiaramente la necessità di controllare il grado di rilascio di VEGF dallo scaffold per attivare e guidare i processi angiogenici. Poiché la funzionalità finale di qualunque costrutto cellulare impiantato dipende dal suo apporto di nutrienti, il successo della rigenerazione tissutale guidata dal materiale fa affidamento sulla formazione e sull'invasione di vasi sanguigni in uno scaffold a base di materiale. Tuttavia, scaffolds di nuova generazione dovrebbero essere capaci di stimolare una rapida ricrescita vascolare direzionata nell'ospite. Recentemente, scoperte importanti sono state fatte per migliorare la prestazione di biomateriali capaci di guidare la

crescita vascolare. Questi approcci dipendono dall'inclusione di fattori solubile angiogenici dentro la matrice [86,98,99]; o l'ingegnerizzazione di matrici bioattive capaci di promuovere e guidare la formazione di vasi sanguigni [59,53,56,62,100-103]. Il VEGF [104] è una glicoproteina dimerica di 45 kDa che agisce come potente mitogenico per le cellule endoteliali. E' essenziale per indurre l'endotelio dell'ospite a formare nuovi vasi sanguigni ed ha un ruolo centrale nella stabilizzazione dei vasi una volta che essi si sono formati. E' stato dimostrato che il trasporto di VEGF diffuso o incluso in specifici "serbatoi" all'interno di scaffolds polimerici aumenta la vascolarizzazione della matrice [60,86] attraverso la creazione di un gradiente spaziale di VEGF. Questi approcci sono in parte limitati dal rilascio incontrollato, generalmente molto veloce, e quindi dall'incapacità di sostenere gradienti stabili di fattori angiogenici attraverso l'interfaccia scaffold-tessuto. Infatti, l'angiogenesi porta il movimento di cellule endoteliali nella direzione dei gradienti di VEGF, per cui il gradiente sostenuto di VEGF attraverso l'interfaccia scaffold-tessuto diventa cruciale per controllare e guidare la vascolarizzazione di un biomateriale. Oltretutto, a causa della sua breve emivita (< 90 min), i gradienti di VEGF possono essere sostenuti solo se c'è un rilascio continuo e costante di VEGF che bilanci il VEGF degradato. I nostri dati dimostrano che un rilascio incontrollato di VEGF da uno scaffold di collagene non è capace di sostenere una risposta angiogenica reale sia in vitro (Fig. 4.4) che in vivo (Fig. 4.5). Gli scaffolds di collagene quando sono attivati con microsfere caricate con VEGF sono capaci di sostenere un trasporto costante di VEGF (Fig. 4.2) e di mantenere un effetto terapeutico angiogenico in vitro (Fig. 4.4) e in vivo (Fig. 4.5). Il controllo della quantità di VEGF rilasciato alla dose terapeutica evita effetti indesiderati come la vascolarizzazione di un tessuto non voluta che può accadere nel trasporto di una dose eccessiva di fattori angiogenici. I GFs morfogenetici generalmente agiscono a concentrazioni molto basse (nano

moli o picomoli) e guidano una risposta cellulare attraverso gradienti spaziali e temporali [72,105-107]. Abbiamo dimostrato che le microparticelle di PLGA caricate con la proteina agiscono come una singola sorgente quando incluse in uno scaffold di collagene, con un rilascio regolato dalla composizione di un dispositivo polimerico e dipendente dalle proprietà di trasporto della matrice di collagene (14). Una volta conosciuti i meccanismi di trasporto e i tempi di degradazione biologica delle molecole bioattive, è virtualmente possibile ingegnerizzare complessi gradienti di distribuzione statica o dinamica dentro lo scaffold. Qui abbiamo dimostrato che microdispositivi di PLGA inclusi in scaffolds di collagene possono sostenere il rilascio locale di VEGF ad una concentrazione costante di 0.6 ng/mg al giorno per varie settimane inducendo una risposta angiogenica sia in vivo che in vitro. Un simile approccio può essere esteso ad altre molecole terapeutiche, di vario tipo, per promuovere un rilascio multiplo di fattori morfogeni nel tempo e nello spazio.

CAPITOLO 5

REALIZZAZIONE DI MATRICI POLIMERICHE

MACROPOROSE A BASE DI POLIETILENE GLICOLE

INTRODUZIONE

1 Adesione cellulare a materiali sintetici

Dal processo di adesione di una cellula ad un biomateriale dipenderà la loro capacità di proliferare, migrare, differenziare e, infine, generare un tessuto. Le cellule possono interagire con il materiale sia mediante meccanismi non specifici che specifici. Un meccanismo non specifico di interazione cellula-materiale comporta un tipo di interazione non mediata da integrine, ma bensì da legami chimici deboli, quali legami idrogeno, elettrostatici, interazioni polari o ioniche tra le molecole della membrana cellulare ed i gruppi chimici funzionali del polimero. Questo tipo di interazioni non assicura però la trasmissione dei segnali dall'ambiente extracellulare né la sopravvivenza delle cellule. Sono invece le interazioni specifiche, quelle che avvengono tra proteine della matrice extracellulare e i recettori di membrana (integrinici e non integrinici), che determinano risposte cellulari precise (proliferazione, migrazione, differenziamento, apoptosi). Pertanto, un grande interesse scientifico è sorto intorno alla realizzazione di materiali bioattivi, in grado di veicolare informazioni molecolari necessarie per favorire l'interazione con le cellule.

I polimeri bioattivi sono materiali basati su polimeri sintetici, nei quali vengono incorporate molecole "bioattive" (proteine, peptidi o carboidrati), cioè capaci di indurre una specifica risposta biologica [53]. Le molecole bioattive possono essere immobilizzate o adsorbite al materiale. I materiali possono essere bioattivati sia con intere molecole dell'ECM oppure solo brevi sequenze oligopeptidiche (cioè composte da pochi aminoacidi), corrispondenti ai siti di legame delle molecole dell'ECM con i recettori di membrana (integrinici e non). Mentre molti dei peptidi adesivi per le cellule riconoscono recettori su di un ampio spettro di tipi cellulari,

altri peptidi possono essere specifici per determinati tipi cellulari, dando la possibilità di creare materiali che sono adesivi per un tipo cellulare ma non per altre.

2 Polimeri non Adesivi

Un requisito essenziale dei materiali per ingegneria dei tessuti è quello di essere capace di interagire specificamente con certi tipi cellulari e non consentire l'adesione di altri. Pertanto, i polimeri non adesivi rappresentano la base per costruire polimeri che favoriscano l'adesione specifica di certi fenotipi cellulari. Come è noto, l'adesione cellulare è mediata dall'interazione di una proteina di adesione (per es. fibronectina) o di un proteoglicano con un recettore di superficie (integrina). Chiaramente le cellule non possiedono recettori per polimeri sintetici; pertanto, ci si potrebbe aspettare che i polimeri sintetici non consentano l'adesione cellulare. Tuttavia, quando materiali polimerici vengono impiantati *in vivo* o seminati con cellule *in vitro*, quasi tutti consentono l'adesione di cellule. Questo effetto è dovuto all'adsorbimento di proteine adesive presenti nei fluidi del corpo o nel mezzo di coltura, rispettivamente, sui materiali polimerici ed alla successiva adesione delle cellule alle proteine adsorbite, piuttosto che all'interazione diretta con il materiale. I materiali polimerici sono in qualche modo idrofobici, mentre le proteine dei fluidi corporei sono, generalmente anfifiliche (cioè hanno porzioni della molecola con proprietà idrofiliche, altre con proprietà idrofobiche). Pertanto, le proteine si adsorbiranno ai polimeri, esponendo le regioni idrofobiche al materiale polimerico e quelle idrofiliche al fluido circostante, per creare uno stato termodinamicamente più favorevole. Anche le interazioni elettrostatiche possono essere importanti per l'adsorbimento proteico, dal momento che le proteine posseggono sia cariche positive che negative. Poiché l'adsorbimento delle proteine è guidato da interazioni idrofobiche ed elettrostatiche, i materiali idrofilici e non carichi in genere non favoriscono l'adsorbimento proteico e, di conseguenza, quello cellulare. Idrogeli

non-anionici, network non anionici stabilizzati e polimeri solubili in acqua, sono relativamente non adesivi, a causa della loro natura idrofilica ed elettroneutra. Gli idrogeli hanno, generalmente, basse proprietà meccaniche; tuttavia, una grossa mole di ricerca è incentrata sulla sintesi di polimeri con proprietà di superficie simili a quelle degli idrogeli [6,108], ottenuti sia legando un materiale idrofilico alla superficie sia usando matrici polimeriche con regioni idrofobiche e idrofiliche, in modo tale che le molecole idrofiliche siano presenti sulla superficie quando il materiale viene in contatto con l'acqua.

3 Immobilizzazione di proteine su polimeri per adesione cellulare specifica

Il primo fenomeno che si verifica quando un materiale sintetico è messo a contatto con un fluido biologico (come sangue, plasma o un qualsiasi mezzo per coltura cellulare) contenente proteine disciolte di diverso tipo, è l'adsorbimento proteico sulla superficie del polimero. L'adesione cellulare e la riorganizzazione in tessuti sono processi successivi e dipendono dalla natura e qualità dello strato proteico che si è adsorbito. Il processo di adsorbimento proteico (di proteine della ECM) in quantità appropriata, spettro, conformazione spaziale, flessibilità e accessibilità alle integrine è fortemente influenzato dalle proprietà fisiche e chimiche del materiale (bagnabilità, carica elettrica, ruvidezza, topografia, proprietà meccaniche, quali rigidità o flessibilità, cristallinità, porosità, solubilità e pH), dalla natura della proteina e dalla soluzione in cui la proteina è disciolta. Questi fattori determinano il modo in cui molecole biologiche sono adsorbite al materiale, l'orientamento delle molecole adsorbite e la risposta delle cellule a contatto con esso. La differenza nella risposta cellulare a materiali diversi dimostra che le cellule hanno la capacità di discriminare la chimica del materiale [6, 108]. Il ruolo che i diversi componenti della ECM hanno sul comportamento cellulare può essere facilmente osservato piastrando

un certo tipo cellulare su substrati inerti di vetro o poliestere pretrattati con proteine dell'ECM. I substrati pretrattati con proteine presentano, tuttavia, numerosi limiti:

1. non è possibile conoscere la densità dei ligandi effettivamente disponibili ai recettori cellulari; pur conoscendo la densità della proteina fatta adsorbire al substrato, la configurazione spaziale e l'orientamento assunto dalle proteine adsorbite potrebbe mascherare i ligandi interessati al legame; la distribuzione dei ligandi è per lo più eterogenea;
2. le proteine adsorbite vanno incontro a denaturazione o a cambiamenti conformazionali. Tali modificazioni e, quindi, l'attività proteica, sono difficilmente prevedibili, in quanto dipendono da numerose variabili (struttura della proteina, la natura del substrato, il pH e la temperatura);
3. le proteine del rivestimento ("coat") possono modificare la propria attività sia interagendo con altre proteine contenute nel mezzo di coltura sia in seguito ad attività enzimatica e biosintetica operata dalle cellule con cui entrano in contatto;
4. l'adsorbimento proteico può essere reversibile: se le proteine vengono adsorbite alla superficie polimerica, piuttosto che legate covalentemente, il de-sorbimento (il distacco della proteina) renderà instabile la natura bioattiva.

Figura 5.1 Substrato sintetico viene condizionato con mezzo di coltura per indurre adsorbimento proteico. Le proteine che si depositano sulla superficie del materiale assumono diverse conformazioni e sono diversamente orientate. Non tutti i ligandi (zone scure) sono effettivamente disponibili ai recettori cellulari.



4 Incorporazione di Oligopeptidi per favorire l'adesione cellulare bio-specifica

Numerose brevi sequenze peptidiche, derivate da proteine adesive, sono state identificate: come sequenze in grado di legare recettori di superficie e mediare l'adesione cellulare con un'affinità simile a quella della proteina intera [109]. Gli

oligopeptidi possono essere preferibili alle proteine intere dal momento che non vanno soggetti a denaturazione e a proteolisi. Alcuni di questi, e le loro proteine di origine, sono mostrati in tabella 1.

- **Peptidi RGD**

La sequenza Arg-Gly-Asp (RGD) (si tratta di tre aminoacidi: Arginina, Glicina e Acido Aspartico), si trova in molte proteine di adesione e interagisce con numerosi recettori integrinici su una varietà di tipi cellulari. Pertanto, il peptide RGD può legare numerosi tipi cellulari. Inoltre, questo peptide è capace di indurre adesione cellulare con un'efficacia paragonabile a quella delle proteine integre. Questo dominio è stato il primo ad essere identificato ed è stato, pertanto, il più studiato per applicazioni di ingegneria dei tessuti. Numerosi studi sono stati realizzati con peptidi contenenti RGD, combinati a polimeri [11,52,53,110]. L'oligopeptide Gly-Arg-Gly-Asp-Tyr (GRGDY) è stato immobilizzato su substrati di vetro modificati con polimeri. Una densità peptidica di 10 fmol/cm^2 ($1 \text{ fmole} = 1 \times 10^{-15} \text{ moli}$) si è dimostrata sufficiente per favorire l'adesione e l'estensione di fibroblasti, il clustering delle integrine e la formazione di fibre di stress; per una concentrazione di 1 fmol/cm^2 le cellule erano completamente distese, ma la morfologia delle fibre da stress era anormale e le cellule non formavano contatti focali. In un altro caso, peptidi Gly-Arg-Gly-Asp-Ser (GRGDS) sono stati applicati su network semi-interpenetrati contenenti polietilenglicole (PEG). Questo sistema, non ha la capacità di adsorbire proteine, nè, pertanto, di favorire l'adesione cellulare. L'applicazione dei peptidi GRGDS su questi materiali migliora drasticamente l'adesione cellulare, al contrario di peptidi non specifici, che non stimolano l'adesione cellulare. Oltre che essere applicati sulla superficie, i peptidi possono essere incorporati all'interno delle matrici polimeriche tridimensionali, per permettere l'adesione cellulare attraverso tutta la matrice. Peptidi RGD, per esempio, sono stati incorporati in idrogeli formati

da PEG diacrilato, consentendo un buon grado di adesione cellulare. I peptidi RGD sono stati utilizzati per varie applicazioni in vivo. Questi peptidi, accoppiati ad idrogeli di N-(2-idrossiprolil)metacrilamide favoriscono la crescita di cellule gliali nell'idrogelo, quando vengono impiantati nel tessuto cerebrale di ratti. Potrebbe essere possibile usare questi idrogeli per guidare la rigenerazione di nervi periferici.

- **Peptidi derivati dalla laminina**

La laminina è il principale componente della membrana basale e lega sia le integrine che recettori non-integrinici. La laminina contiene la sequenza ubiquitaria RGD (tab. 2), così come altre sequenze adesive, specifiche della laminina. Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg (YIGSR) è un peptide derivato dalla laminina che è capace di promuovere l'adesione cellulare [112], legandosi ad un recettore non-integrinico presente su molti tipi cellulari. Studi quantitativi sono stati svolti con peptidi contenenti YIGSR, sia adsorbiti che immobilizzati covalentemente su superfici polimeriche. In questo caso, la distensione cellulare avviene quando l'oligopeptide è immobilizzato covalentemente, suggerendo che la conformazione del ligando è importante per una interazione ottimale. La laminina è un potente stimolatore della crescita dei neuriti e peptidi derivati dalla laminina possono avere applicazioni in ingegneria dei tessuti per lo sviluppo di materiali polimerici per la rigenerazione di nervi periferici. Il peptide derivato dalla laminina Ile-Lys-Val-Ala-Val (IKVAV) promuove l'adesione dei neuroni tramite recettori non integrinici. La laminina può rappresentare una sorgente di ligandi adesivi cellulo-specifici, dal momento che recettori non-integrinici sono più probabilmente selettivi per determinati tipi cellulari.

- **Peptidi REDV**

La sequenza peptidica REDV, derivata dalla fibronectina, è capace di favorire l'adesione di cellule endoteliali, mentre non consente l'adesione di altre cellule vascolari o derivate dalla parete dei vasi, quali piastrine, fibroblasti, o cellule

muscolari lisce. Questa sequenza può avere importanza clinica per la creazione di dispositivi vascolari che favoriscono l'adesione delle cellule endoteliali, ma limitano l'adesione di piastrine, cellule muscolari lisce e fibroblasti, che possono causare il fallimento del dispositivo vascolare. Il peptide GREDVY è stato utilizzato per favorire l'adesione selettiva di cellule endoteliali su dispositivi vascolari. Il peptide è stato attaccato sulla superficie di protesi vascolari di Dacron, impregnate con ossido di polietilene per renderle non adesive. La presenza di GREDVY ha aumentato l'adesione delle cellule endoteliali, mentre ha diminuito l'adesione di fibroblasti in vitro. Questo rappresenta il primo risultato relativo all'uso di sequenze peptidiche, che favoriscono l'adesione di un singolo tipo cellulare in polimeri bioattivi.

- **Peptidi che legano proteoglicani**

I proteoglicani, componenti della membrana basale, sono proteine dotate di lunghe catene glicosaminoglicaniche laterali e servono da recettori a bassa affinità di legame. Poiché la maggior parte dei glicosaminoglicani sono solfati, i proteoglicani portano una carica netta negativa e il legame dei glicosaminoglicani alle proteine di adesione avviene tramite interazioni ioniche. Sequenze che legano i proteoglicani sono state identificate su fibronectina, vitronectina e laminina. Queste sequenze possono essere importanti per bioattivare materiali per ingegneria dei tessuti.

SEQUENZA	PROTEINA
RGD	fibronectina, vitronectina, laminina, collagene, fibrinogeno, trombospondina, fattore di von Willebrand, entactina, tenascina
YIGSR	laminina
LRE	laminina
IKVAV	laminina
LGTIPG	laminina
PDSGR	laminina
RNIAEIIKDA	laminina
REDV	fibronectina
VTXG	trombospondina
VGVAPG	elastina

Tabella 5.1 Schema rappresentativo delle sequenze dei domini di legame delle proteine della matrice extracellulare I metodi che si usano per legare i peptidi includono l'adsorbimento fisicochimico, il chemiassorbimento e l'attacco covalente. Qui considereremo solo quest'ultimo. La natura dei polimeri sintetici che fanno da substrato per l'adesione del peptide è importante per la capacità della cellula di interagire con il peptide. Per esempio, l'idrofobicità e l'impedimento sterico sulla superficie sembrano essere fattori importanti; in alcuni materiali può essere necessaria la presenza di bracci spaziatori. In alcuni casi, anche l'orientamento del peptide può essere importante. Gli oligopeptidi sono stati legati sia a matrici polimeriche bi.dimensionali che tri-dimensionali.

5 Modificazioni farmacologiche di biomateriali polimerici :

immobilizzazione di fattori di crescita

I materiali bioattivi per applicazioni di ingegneria dei tessuti possono essere modificati con molecole che alterano la funzione cellulare così come con ligandi di adesione. Questi materiali possono essere utili per aumentare la proliferazione cellulare o alterare la cascata enzimatica, come quella che avviene durante la

coagulazione del sangue. Le molecole incorporate possono includere proteine, peptidi o gruppi dotati di cariche.

Durante la rigenerazione di un tessuto naturale occorrono sistemi complessi per il trasporto di fattori di crescita che rilasciati in modo controllato nel tempo e nello spazio guidano tale processo. I fattori di crescita possono essere incorporati nei polimeri bioattivi per aumentare proliferazione, migrazione o differenziamento cellulare. Essi sono, in genere, piccole proteine (meno di 200 aminoacidi) che legano i recettori presenti sulla membrana cellulare per stimolare l'attività cellulare, mediante una cascata di segnali intracellulari. Tra i più comuni troviamo il fattore di crescita dei fibroblasti (Fibroblast Growth Factor, FGF), il fattore di crescita simile all'insulina (insulin-like growth factor, IGF), il fattore di crescita epidermico (epidermal growth factor, EGF) e il fattore di crescita derivato dalle piastrine (platelet derived growth factor, PDGF), il fattore di crescita endoteliale (VEGF) [51,55,57,86,87,95,97]. L'uso di fattori di crescita per conferire proprietà bioattive ai materiali polimerici è limitato dagli stessi problemi dell'immobilizzazione di intere proteine di adesione, e cioè la potenziale instabilità del fattore dovuta a denaturazione e a degradazione proteolitica. Affinché uno scaffold possa mimare le caratteristiche della ECM per il rilascio dei fattori endogeni è necessario che lo scaffold abbia le seguenti caratteristiche [113]:

- mantenere le funzioni delle proteine, glicoproteine e di altre molecole biologiche durante la realizzazione dello scaffold;
- controllare in modo preciso le cinetiche di rilascio dei fattori di crescita;
- controllare potenzialmente il rilascio di due o più tipi di molecole con cinetiche di rilascio diverse;
- rilasciare in modo mirato fattori specifici ad una determinata popolazione cellulare.

Diversi sono i punti da tenere in considerazione quando incorporando fattori di crescita nello scaffold se ne vogliono studiare le cinetiche di rilascio:

- “capacità di caricamento” definita come la quantità di fattore che può essere legata allo scaffold;
- capacità di distribuzione, poiché è necessario che i fattori siano dispersi all’interno dello scaffold;
- “affinità di legame” definita come la capacità dei fattori di legare lo scaffold; questa affinità dovrebbe essere tale da permettere in seguito il rilascio dei fattori legati;
- un opportuno rilascio dei fattori nel tempo tale da determinare una risposta biologica adeguata;
- “stabilità a lungo termine” dei fattori di crescita in modo tale che una volta incorporati all’interno dello scaffold conservino la loro struttura e la loro attività per un periodo di tempo prolungato.

Numerose sono le funzioni della ECM, tra cui riserva e localizzazione di fattori di crescita endogeni, prevenzione della loro rapida degradazione e aumento del legame dei loro recettori con le cellule. Scaffold a base di eparina possono essere utilizzati in modo simile alla ECM. Molte proteine, infatti, contengono siti di legame per l’eparina. Numerosi sono stati gli studi condotti sull’eparina immobilizzata nello scaffold per sequestrare molecole che trasmettono un segnale e proteine coinvolte nel processo di adesione cellulare [114-116].

6 Matrici Tridimensionali

Le cellule *in vivo* si trovano immerse in un ambiente tridimensionale e proprio le proprietà biochimiche e biofisiche di questo ambiente influenzano in modo sostanziale la crescita e il differenziamento cellulare.

Nel caso di costrutti tridimensionali, la bioattività del materiale viene indotta non da trattamenti di superficie ma da incorporazione o immobilizzazione di molecole biologicamente attive all'interno del materiale. *In vivo*, l'ECM fornisce substrati adesivi con ligandi multivalenti in una configurazione 3D e impone, inoltre, una barriera spaziale e una resistenza fisica alle cellule in esso contenute. Le cellule non devono solo interagire con ligandi adesivi, ma devono superare la resistenza biomeccanica imposta dalla matrice. Il cambiamento della morfologia cellulare, ad esempio, è una delle strategie adottate dalle cellule per superare le resistenze imposte dalla ECM. Un'altra strategia è la proteolisi della ECM [56,117], che crea delle vie di migrazione. Proteasi, quali collagenasi, elastasi, ecc. possono essere secrete dalle cellule per rimuovere le barriere imposte dall'ECM. Diversi modelli 3D proposti, includono costrutti a base di matrici naturali, quali gel di fibrina, di collagene da solo o combinato a fibronectina o ad acido ialuronico, e materiali sintetici. Tra questi il più utilizzato è il PEG (poli-etilen-glicole). Tali sistemi hanno permesso di mimare l'architettura biochimica e biofisica dei tessuti, offrendo dei modelli per lo studio *in vitro* dei processi necessari alla rigenerazione tissutale. Mentre i materiali naturali rendono spesso indecifrabile la reale correlazione tra causa ed effetto di un comportamento cellulare, in quanto incorporano essi stessi una varietà di fattori che sono fuori dal controllo dello sperimentatore, i materiali sintetici bioattivati, sono sistemi su cui l'operatore ha un maggior controllo.

Fin dagli anni '90, il PEG è stato considerato il materiale di elezione per substrati biocompatibili [118] inerti per la sua capacità di prevenire l'adsorbimento proteico [119] e quindi l'adesione cellulare e la deposizione di piastrine su superfici esposte a flusso sanguigno [120]. Recentemente, idrogeli fotopolimerizzabili costituiti da derivati di PEG diacrilato, sono stati ampiamente utilizzati come materiali

biomimetici, grazie alla facilità con cui le estremità delle catene di PEG possono essere funzionalizzate.[46,47]. Le catene di PEG sono state funzionalizzate con:

- sequenze di adesione tipo RGD, per favorire l'adesione cellulare [110,111] ;
- sequenze peptidiche riconosciute dalle proteasi cellulari (tali matrici possono favorire la migrazione cellulare previa degradazione enzimatica indotta dalle cellule in esse seminate) [56,117];
- con diversi fattori di crescita [62,121].

In seguito a fotopolimerizzazione, si forma un idrogel in cui i peptidi sono stati immobilizzati covalentemente, attraverso una catena linker flessibile.. Diversi sono i metodi utilizzati per incorporare le molecole bioattive, come cross-link enzimatico e addizione Michaelis. Un singolo idrogel può contenere diversi segmenti proteolitici, diversi ligandi adesivi e svariati fattori di crescita; ciò consente all'operatore di poter opportunamente variare la funzionalità biologica del materiale e ricreare molte delle proprietà dell'ECM in un materiale sintetico.

2. MATERIALI E METODI

1 Sintesi di matrici porose a base di PEG

La realizzazione di matrici porose è stata eseguita come descritta in letteratura [122]. Il PEG (SUNBIO, Korea) viene sciolto in Hepes Buffer 10mM, soluzione tampone PH 7.4 (Euroclone), per formare soluzioni al 10% in peso di polimero. Si aggiunge acido acrilico, pluronico 127 (Sigma Aldrich) che è un agente schiumogeno, un fotoiniziatore che è il Daroucure 1183 fornito dalla Ciba (2-hydroxy-2 metilpropiofenone). A questa soluzione si aggiunge acroil-PEG-RGD (struttura costituita da una sequenza peptidica RGD coniugata ad un PEG monoacrilato) in concentrazioni di 5mM, 10mM e 20mM. Infine viene aggiunto il bicarbonato di

sodio (NaHCO_3 , Sigma) 40mg/ml per permettere attraverso *salt leaching* la formazione dei pori nello scaffold e fuoriuscita di CO_2 . Segue una fotopolimerizzazione mediante irradiazione da raggi UV (365nm , $10\text{mW}/\text{cm}^2$) per due minuti, per attivare il fotoiniziatore e formare l' idrogel (Fig.5.2).

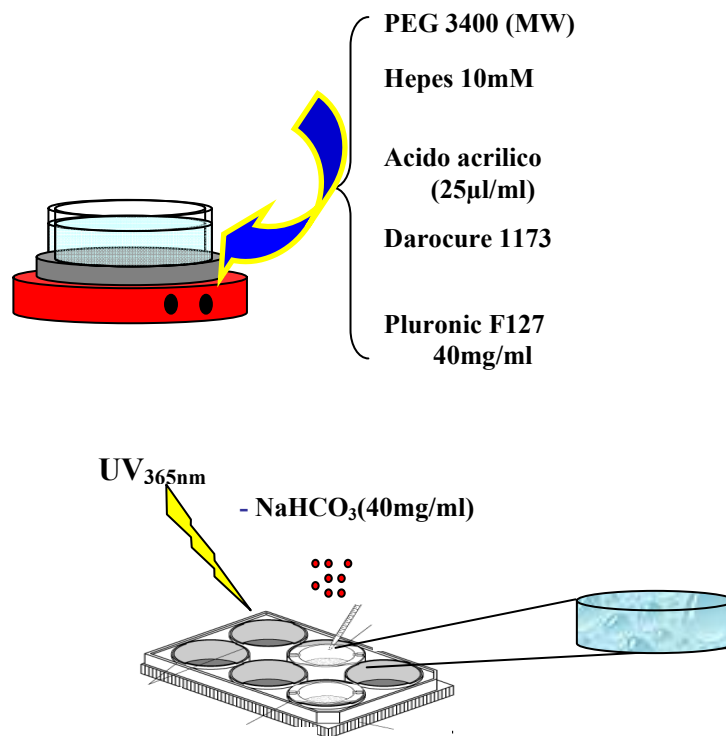


Figura 5.2. Rappresentazione schematica della reazione di fotopolimerizzazione dell' idrogel a base di PEG.

2 Analisi morfologica al microscopio elettronico a scansione (SEM)

Le analisi strutturali dei gel a base di PEG sono state effettuate al microscopio elettronico a scansione (SEM). I campioni sono stati fissati in 2.5% di glutaraldeide a temperatura ambiente tutta la notte, velocemente congelati in azoto liquido, tagliati, e poi liofilizzato per 20 h (K 850 Emitech). I campioni seccati sono stati attaccati ad opportuni supporti, ricoperti con un film d'oro di 15 nm ed esaminati al SEM (Hitachi S-2300, Japan). Le immagini sono state ottenute ad un voltaggio di 20 kv.

3 Analisi al porosimetro

Il porosimetro ad intrusione di Mercurio è stato utilizzato per misurare la dimensione media dei pori degli idrogeli porosi. I campioni sono stati analizzati mediante due diversi porosimetri. Il porosimetro Pascal 240 ad alta pressione (0.1-200 MPa) è stato utilizzato per rilevare la presenza di macropori mentre il porosimetro Pascal 140 a bassa pressione (0.1-400 KPa) è stato utilizzato per rilevare la presenza dei micropori (3.7-7500 nm) all'interno degli idrogeli schiumati. Tuttavia solo i dati ottenuti dal porosimetro Pascal 140 sono stati utilizzati per determinare la porosità media del materiale poiché le alte pressioni rovinavano il materiale vista la loro eccessiva compressibilità. I dati sono stati analizzati utilizzando l'equazione di Laplace:

$$d = -4\gamma\cos\theta / P$$

dove d è il diametro dei pori, P è la pressione applicata, c ed h sono rispettivamente la tensione superficiale e l'angolo di contatto del liquido intruso. La tensione superficiale del mercurio è di 480 dyne/cm, e l'angolo di contatto è stato assunto essere "141.38". La formula sopra si riferisce a pori di forma cilindrica. I risultati riportati si riferiscono a tre esperimenti separati.

4 Prove di adesione cellulare in idrogeli a base di PEG

I saggi di adesione delle cellule all'interno dello scaffold sono stati condotti in idrogeli porosi di PEG3400 al 10%(peso/volume), a diverse concentrazioni di RGD (5,10,20mM). La soluzione viene fatta fotopolimerizzare in multiwell da 48, per realizzare campioni cilindrici. Questi vengono poi spostati in multiwell da 24 e piastrati con cellule endoteliali del cordone ombelicale umano (HUVECs) sospese in terreno senza siero (Human endothelial medium, Gibco), per evitare l'effetto che il siero potrebbe avere sull'adesione cellulare, ad una densità di 1×10^6 cellule/ml. Gli scaffold contenenti le cellule, dopo 6 ore dalla semina, sono stati ricoperti da terreno di coltura privo di siero al 10% di una soluzione non tossica di colorante vitale

(ALAMAR BLUE, Biocompare) e lasciati in incubatore a 37°C, 5% di CO₂, 90% di umidità. Dopo 4 ore, in seguito al cambiamento di colore, la densità ottica (O. D.) è stata misurata ad una lunghezza d'onda di $\lambda = 595$ nm dal lettore (Wallac 1420 VICTOR 3, Pelkin Elmer).

5 Analisi Istologica

Gli scaffold seminati con le cellule, dopo 6h dalla semina, sono stati fissati con una soluzione di formalina al 10% (peso/volume) a temperatura ambiente. Dopo la disidratazione in alcol, i costrutti sono stati inclusi in paraffina. Sezioni di 5 μ m in spessore sono state ottenute al microtomo (MICROM, HM 355S). La presenza delle cellule negli scaffold è stata rilevata mediante colorazione con ematossilina-eosina.

6 Saggio di vitalità cellulare (Calceina)

La vitalità delle cellule all' interno degli scaffold è stata determinata mediante colorazione con calceina (Molecular probes), la quale colora in verde le cellule vive una volta esposte ad un opportuno laser. Il colorante liofilizzato è stato sciolto in DMSO e risospeso in terreno povero di siero ad una concentrazione finale di 15 μ M. Dopo 30 minuti è stato aspirata la soluzione, le cellule sono state ricoperte con terreno senza rosso fenolo al 10% di siero ed osservate al microscopio confocale a scansione (CLSM, Zeiss, LSM 510).Il laser utilizzato per eccitare la calceina è stato un laser He-Ne, ad una lunghezza d'onda di 543nm I campioni colorati con calceina sono stati osservati al microscopio confocale con un obiettivo 20X. Le immagini sono state acquisite a fluorescenza ed a trasmissione . In questo modo è stato possibile visualizzare la distribuzione delle cellule all' interno dello scaffold. I campioni utilizzati per l' analisi devono essere marcati con un probe (*o dye*) fluorescente. Il laser eccita solo i fluorocromi appartenenti al piano focale. Il principio di funzionamento di un microscopio confocale è che la luce emessa dal laser viene deviata dallo specchio dicroico, investe il campione e lo eccita. I suoi

fluorocromi emettono una radiazione luminosa che, catturata dalle lenti dell'obiettivo, colpisce nuovamente lo specchio diroico, attraverso il quale la luce riflessa è deviata, mentre la luce fluorescente viene inviata prima al pinhole e poi ad un filtro, giungendo così al fotomoltiplicatore. In questo modo solo il segnale luminoso relativo al piano focale contribuisce alla formazione dell'immagine finale. Il fotomoltiplicatore trasforma invece l'intensità luminosa rilevata in un segnale elettronico proporzionale all'intensità stessa. Tale segnale è poi elaborato via software, e viene così registrata l'intensità luminosa in ogni punto. I valori di intensità sono utilizzati per ricostruire l'immagine video: ogni punto del campione corrisponde ad un pixel, e l'intensità luminosa di ogni punto è rappresentata da un tono di rosso.

7 Prove in vivo su membrana corioallantoidea di pollo

Il saggio CAM è stato effettuato come precedentemente descritto. In breve, le uova di pollo fecondate sono state incubate in condizioni di umidità costante a 37°C. Al quarto giorno di incubazione, è stata aperta una finestra nel guscio dell'uovo dopo rimozione di 3-4 ml di albume. La finestra è stata sigillata con un pezzo di nastro adesivo e le uova sono state incubate a 37°C. Al nono giorno, le matrici a base di polietilene glicole, matrici bioattivate con il peptide RGD a diverse concentrazioni di 5, 10, 20 mM, sono state impiantate al di sopra della CAM crescente attraverso una finestra fatta nel guscio dell'uovo. Le uova sono state successivamente incubate a 37°C e le CAMs sono state esaminate. Al 12° giorno, le CAMs sono state fotografate nell'uovo con macchina fotografica digitale (Olympus) sotto un stereomicroscopio Olympus SZX9 ed è stato contato il numero dei vasi allantoici attorno all'impianto.

8 Analisi Istologica dei campioni impiantati in vivo

Dopo 3 giorni dall'impianto in vivo, gli idrogeli a base di PEGDA e di Acr-PEG-RGD sono stati estratti e fissati in una soluzione di formalina al 10% (peso/volume) a

temperatura ambiente. Dopo la disidratazione in alcol, i costrutti sono stati inclusi in paraffina. Sezioni di 5 μ m in spessore sono state ottenute al microtomo (MICROM, HM 355S). L' invasione dei vasi negli scaffold è stata rilevata mediante colorazione con ematossilina-eosina.

9 Reazione di metacrilazione dell' eparina

L' eparina (estratta dalla mucosa intestinale porcina come sale di sodio, Serva, Germany, peso molecolare di circa 12 KDa) (figura 5.3) è stata metacrilata seguendo la procedura sintetica descritta in letteratura da Smeds et al. [123].

E' stata preparata una soluzione di eparina al 2% (peso/volume) in acqua bidistillata e fatta reagire con 10 equivalenti di anidride metacrilica (Sigma Aldrich). Il pH della soluzione è stato portato a 8.5 utilizzando una soluzione 5N di NaOH. La miscela risultante è stata lasciata sotto agitazione per tutta la notte alla temperatura di 4°C. La mattina seguente, l'eparina metacrilata (figura 5.4), è stata precipitata con una miscela di etanolo-acqua al 95%, centrifugata e quindi puificata mediante dialisi (Spectrum, 1000 MW cut-off) per 48 ore in acqua bidistillata.

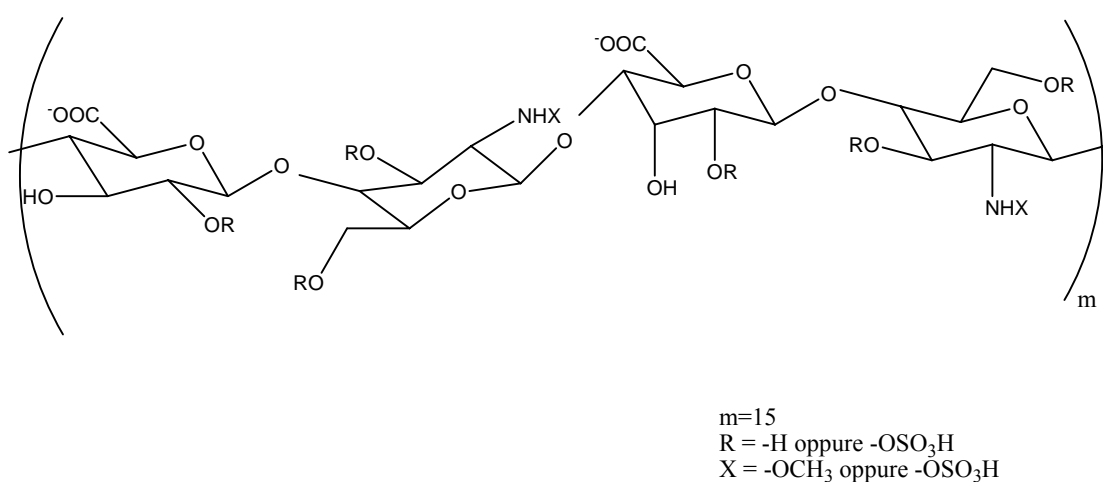


Figura 5.3. Struttura molecolare dell'eparina

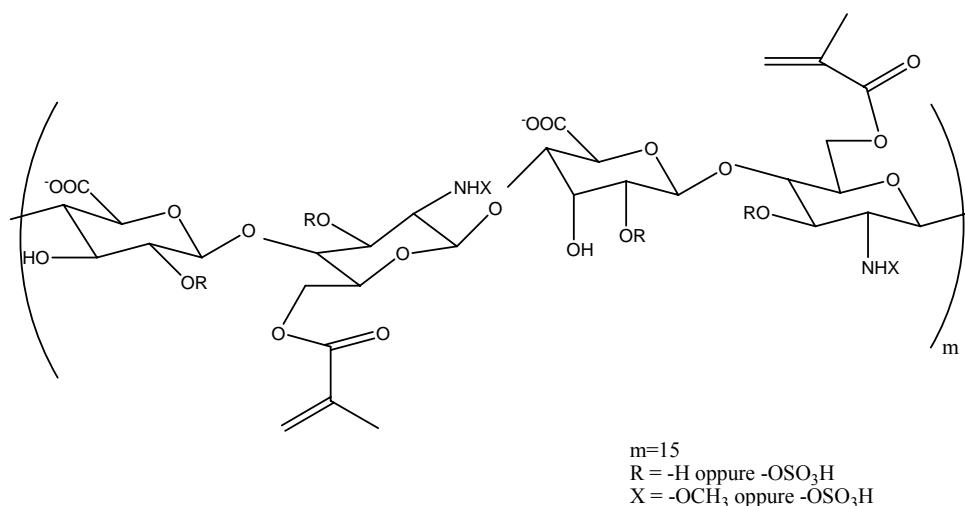


Figura 5.4. Eparina metacrilata

10 Spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (1H NMR)

L'eparina metacrilata e la percentuale di metacrilazione dell'eparina sono stati analizzati mediante spettroscopia di risonanza magnetica nucleare, utilizzando lo spettrometro Varian Unity Inova 400 MHz, gentilmente messo a disposizione al nostro gruppo di ricerca dall'Istituto di Biostrutture e Bioimmagini del CNR, Napoli.

11 Preparazione di scaffold a base di PEGDA crosslinkati con eparina metacrilata

Le matrici porose a base di PEG sono state preparate come precedentemente descritto [Materiali e Metodi paragrafo 1]. In breve, il PEG (SUNBIO, Korea) viene sciolto in Hepes Buffer 10mM, soluzione tampone PH 7.4 (Euroclone), per formare soluzioni al 10% in peso di polimero. Si aggiunge acido acrilico, pluronico 127 (Sigma Aldrich) che è un agente schiumogeno, un fotoiniziatore che è il Daroucure 1183 fornito dalla Ciba (2-hydroxy-2 metil-propiofenone). A questa soluzione si aggiunge eparina metacrilata 5% in un rapporto di 2:1 in peso con il polimero (Fig. 3.2). Infine viene aggiunto il bicarbonato di sodio 40mg/ml (Sigma) per permettere attraverso la tecnica di *salt leaching* la formazione di pori nello scaffold. Segue una

fotopolimerizzazione mediante irradiazione da raggi UV (365nm, 10mW/cm²) per due minuti, per attivare il fotoiniziatore e formare l' idrogeno.

12 Interazione tra eparina e VEGF

Gli scaffold a base di PEGDA con eparina metacrilata al 5% e senza eparina (utilizzati come controllo) sono stati caricati con il VEGF(R&D System) sciolto in PBS/BSA 0.1% in peso ad una concentrazione finale di 2µg per scaffold. I campioni sono stati lasciati tutta la notte a 4°C per permettere l' interazione eparina-VEGF. Ogni giorno la soluzione di PBS contenente VEGF rilasciato dallo scaffold è stata prelevata e sostituita con un eguale volume di PBS fresco.

13 Studio delle cinetiche di rilascio di VEGF

VEGF in soluzione è stato quantificato con un saggio immuno enzimatico (ELISA) secondo le procedure indicate (Quantikine Kit, R&D System, USA). In breve 50 µl di diluente (RD1W) e 200 µl di soluzione standard di VEGF o di campioni diluiti opportunamente sono stati aggiunti ai pozzetti di una micropiastrea coperta con un anticorpo monoclonale di topo contro il VEGF e incubata a temperatura ambiente per 3 h. Le micropiastre sono state lavate 3 volte con la soluzione di lavaggio. Dopo la completa rimozione di tale soluzione, l'anticorpo policlonale contro il VEGF legato a per ossidasi è stato aggiunto ad ogni pozzetto e incubato per 2 h a temperatura ambiente. Dopo il lavaggio 200 µl di soluzione "substrate" (composto da 1:1 perossido di idrogeno e tetrametilbenzidine cromogena) sono stati aggiunti ad ogni pozzetto ed incubati per 20 minuti a temperatura ambiente. Dopo le piastre sono state lavate e sono stati aggiunti 50 µl di soluzione "stop" (2 N acido solforico). In seguito allo sviluppo di colore, la densità ottica (O.D.) è stata mosurata a una lunghezza d'onda di $\lambda = 450$ nm dal lettore (Wallac 1420 VICTOR 3, PelkinElmer) entro 30 minuti.

14 Analisi dei dati

Il rilascio di VEGF è stato quantificato analizzando ogni 24 h per 7 giorni, una soluzione di PBS contenente VEGF rilasciato dallo scaffold di solo PEG (controllo) e di PEG bioattivato con Hp- Met (5%). Utilizzando il saggio ELISA (come già descritto nel capitolo 4) è stata misurata la densità ottica ad una lunghezza d'onda di $\lambda = 450$ nm dal lettore (Wallac 1420 VICTOR 3, PelkinElmer) entro 30 minuti. Utilizzando la legge di Lambert-Beer siamo risaliti, attraverso una retta di taratura per il VEGF, alla concentrazione della proteina presente negli eluati raccolti ogni 24 ore per 7 giorni.. Gli esperimenti sono stati effettuati in triplicato e ripetuti tre volte. Le analisi statistiche sono state effettuate utilizzando il test ANOVA ad 1 via e la misura è risultata statisticamente significativa ($p < 0.05$).

3 RISULTATI

1 Caratterizzazione morfologica e strutturale dello scaffold di PEG

Una volta ottenuto questo materiale sono state fatte le prime prove preliminari di caratterizzazione. Il porosimetro ad immersione di mercurio ha rilevato una porosità eterogenea del materiale, con una maggiore presenza di pori di dimensioni tra 100 e 1000 μm di diametro come mostrato nel grafico (Fig.5.5). Ulteriori prove di caratterizzazione sono state fatte mediante microscopia elettronica a scansione (SEM). I campioni di PEG sono stati preparati attraverso la tecnica del critical point. Le immagini ottenute (Fig. 5.6) sembrano confermare una porosità del materiale abbastanza eterogenea con interconnessione dei pori elevata che è uno dei parametri fondamentali della vascolarizzazione.

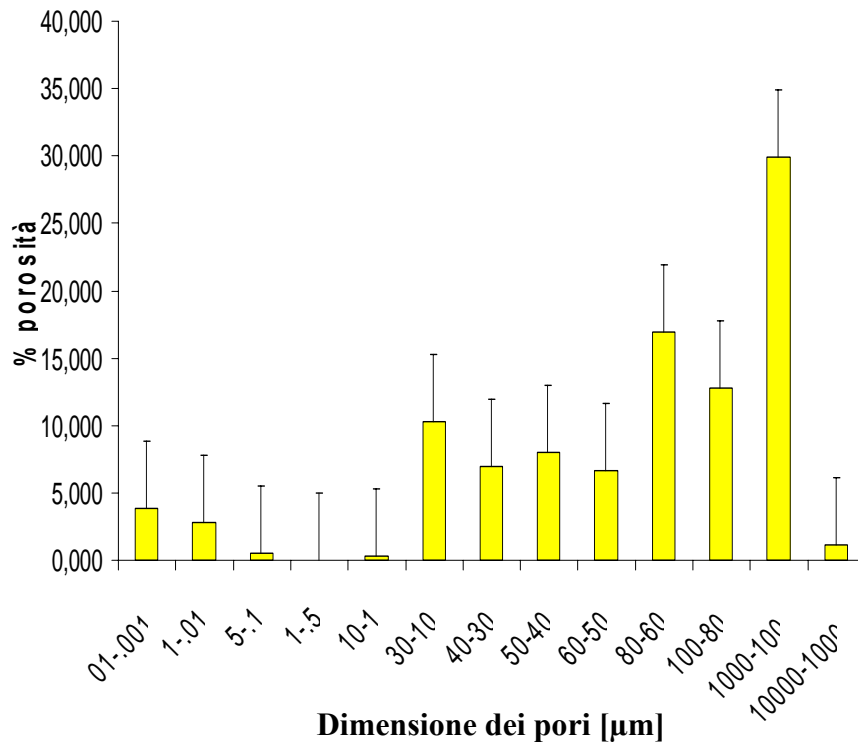


Figura 5.5. Distribuzione della porosità in scaffold a base di PEG. Il grafico è stato realizzato riportando la dimensione dei pori (in µm) in funzione della percentuale di porosità.

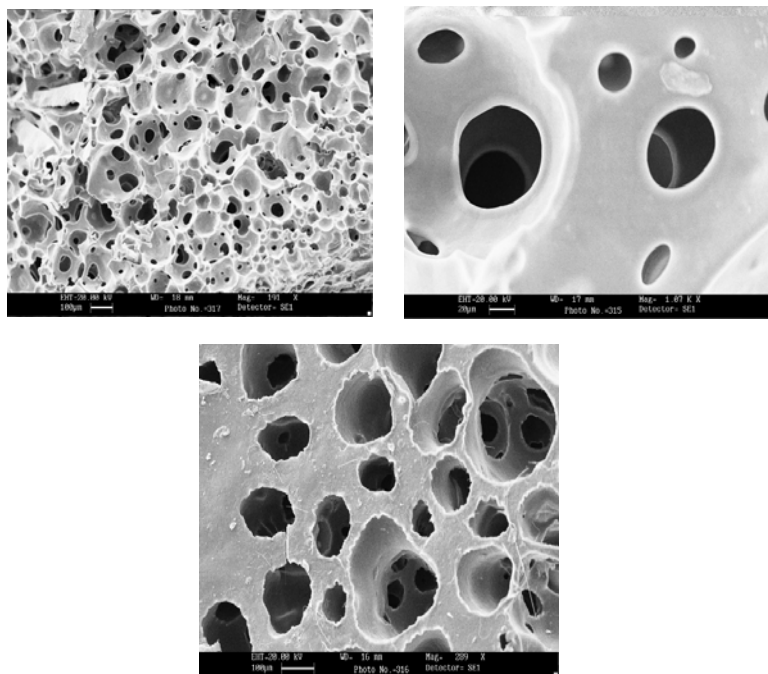


Figura 5.6. Immagini dello scaffold a base di PEGDA al microscopio elettronico a scansione ad un ingrandimento 20x.

2 Interazione cellula - materiale

Un milione di cellule Huvecs sono state seminate sulla superficie di ogni scaffold. Dopo 6 ore dalla semina le cellule non adese sono state contate mediante camera conta globuli (Neubauer) e per differenza sono state calcolate le cellule all'interno dello scaffold. Riportando la composizione della matrice in funzione dell'adesione cellulare si può osservare che l'adesione cellulare è direttamente proporzionale alla concentrazione del peptide RGD incorporato nello scaffold. In particolare sullo scaffold di acriloil-PEG-RGD 10mM sembra esserci il maggior numero di cellule adese.(Fig. 5.7)

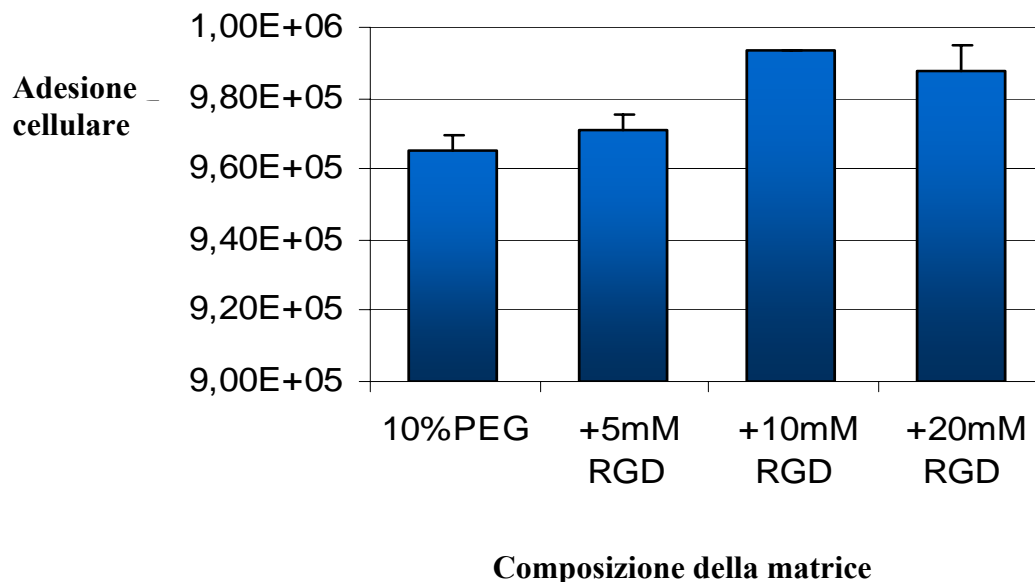


Figura 5.7. Rappresentazione schematica del saggio di adesione cellulare all'interno di scaffold a base di PEG3400, in presenza di Acr-PEG-RGD a concentrazioni di 5, 10, 20mM.

3 Invasione cellulare in vitro

Sono state effettuate anche le prime prove istologiche di invasione cellulare nel materiale. Sulla superficie dei gel di PEG poroso sono stati seminati sferoidi di cellule endoteliali della dimensione di circa 150 μ m. Dopo 72 ore i campioni sono stati fissati in formalina, tagliati con il criostato e colorati con ematossilina-eosina.

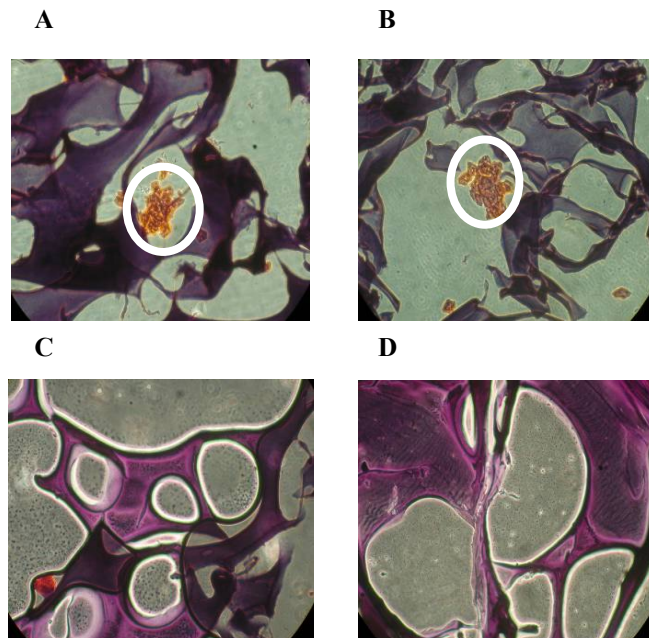


Figura 5.8. Analisi istologica degli idrogeli a base di PEG. Gli scaffolds cellularizzati (A, B) e non cellularizzati (C,D).

Come si può osservare dalle immagini, (Fig. 5.8) abbiamo invasione cellulare, confermando ancora una volta che il materiale è poroso ed è invaso dalle cellule. In questo lavoro gli scaffold sono stati analizzati a distanza di 3-6 settimane mediante analisi istologiche con ematossilina-eosina e analisi di immunofluorescenza con anticorpo CD31 (marker specifico di cellule endoteliali). Entrambi le tecniche rilevano che le cellule mantengono la loro morfologia facendo quindi pensare a numerose applicazioni di questi materiali nell'ingegneria vascolare.

4 Localizzazione delle cellule mediante CLSM

La distribuzione cellulare all'interno dello scaffold è stata rilevata mediante il saggio di colorazione con calceina al microscopio confocale a scansione. Le cellule risultano vitali (Fig. 5.7) e la loro distribuzione è all'interno e all'esterno dei pori. Alcune cellule presentano adesione al materiale mediante estrusione di filopodia.

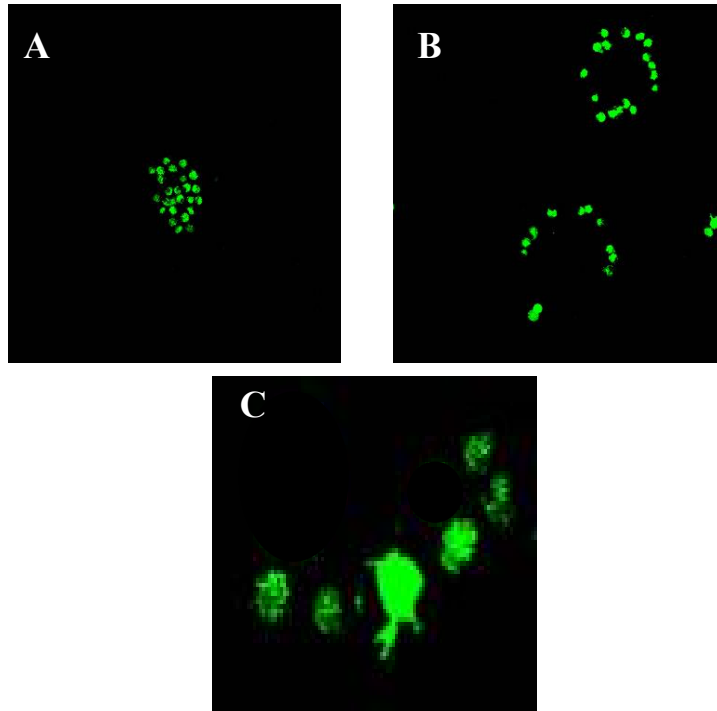


Figura 5.9. Immagini al microscopio confocale di cellule endoteliali (in verde) seminate in scaffold a base di PEG bioattivato con RGD. Distribuzione delle cellule nel materiale:le cellule all' interno dei pori(A); esternamente ai pori(B); estrusione dei filopodia di una cellula.

5 Processi di vasculogenesi in vivo

L' attività angiogenica e la potenziale invasione cellulare dello scaffold sono state infine testate in vivo sulla membrana corionallantoidea di embrioni di pollo (CAM). Sono stati impiantati quattro gruppi di idrogeli a base di PEG al 10% (peso/volume) incorporanti diverse concentrazioni di RGD (0, 5, 10, 20 mM). I gel sono stati disposti sulla membrana corion allantoidea (Fig.5.10) ed esaminati allo stereomicroscopio con ingrandimento di 1.25x. Paragonando le regioni tutte intorno agli scaffolds impiantati dopo 5 giorni (Fig. 5.11) possiamo osservare che l'attività angiogenica è in tutti i contenenti il peptide RGD ma aumenta in modo proporzionale alla concentrazione di RGD in particolare a 10 e 20mM.

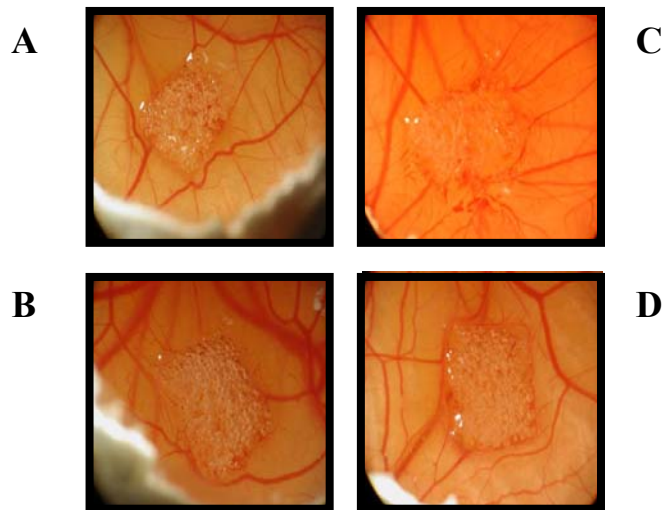


Figura 5.10. Immagini in ovo degli impianti a base di PEGDA(A); Acr-PEG-RGD 5mM(B); Acr-PEG-RGD 10mM(C); Acr-PEG-RGD20mM (D).

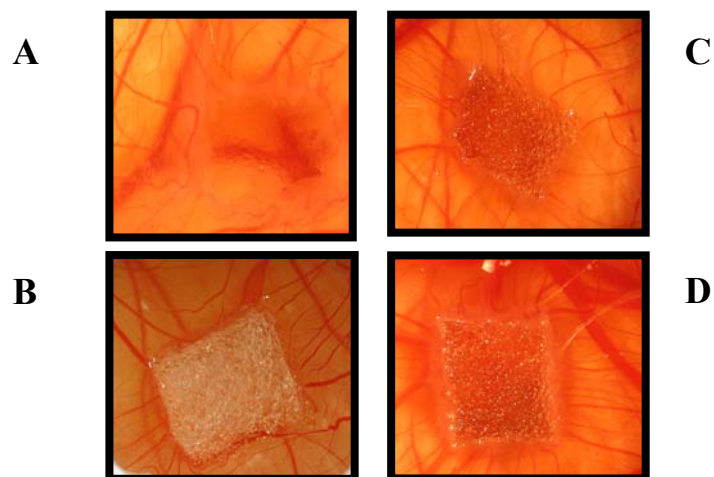


Figura 5.11. Immagini in ovo degli impianti dopo 3 giorni di idrogeli a base di PEGDA(A); Acr-PEG-RGD 5mM (B); Acr-PEG-RGD 10mM (C); Acr-PEG-RGD20mM (D).

6 Analisi istologica degli idrogeli impiantati in vivo

Le CAM attorno agli impianti sono state fissate e colorate con ematossilina ed eosina. Dati preliminari mostrano che la rete vascolare della CAM riesce ad entrare

nella matrice porosa di PEG, in particolare è evidente in matrici a base di PEG contenente 20mM di RGD (Fig. 5.12).

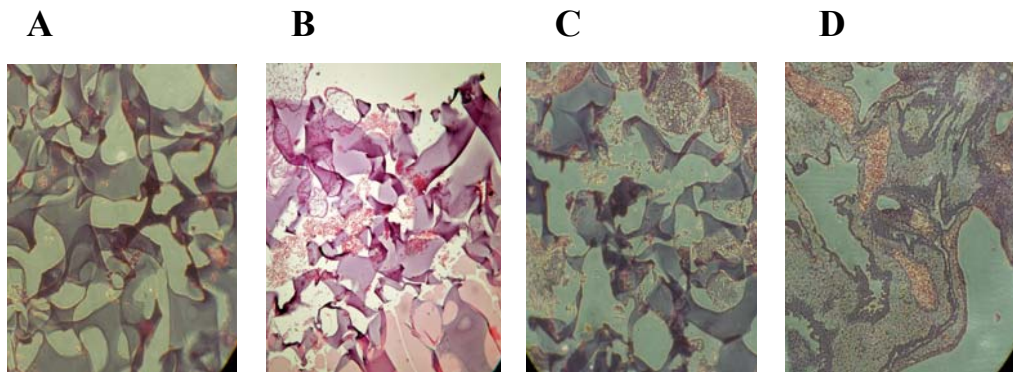


Figura 5.12. Colorazioni istologiche con ematossilina-eosina di scaffold a base di PEGDA (A); Acr-PEG-RGD 5mM (B); Acr-PEG-RGD 10mM (C); Acr-PEG-RGD 20mM (D).

7 Spettri NMR per rilevare il grado di metacrilazione

In figura 5.5 ed in figura 5.6 sono riportati rispettivamente gli spettri ^1H NMR, in D_2O , dell'eparina e dell'eparina metacrilata. La presenza dei due multipletti a valori di chemical shift di 6.09 e 5.65 ppm nello spettro di figura 4 sono indicativi della presenza di due distinti protoni metilenici ($\text{CH}_2=$) a conferma dell'avvenuta reazione di metacrilazione con l'eparina (figura 4). La percentuale di metacrilazione, del 5.7 %, è stata determinata attraverso la misura delle integrazioni relative dei segnali dei protoni metilenici rispetto ai protoni anomerici.

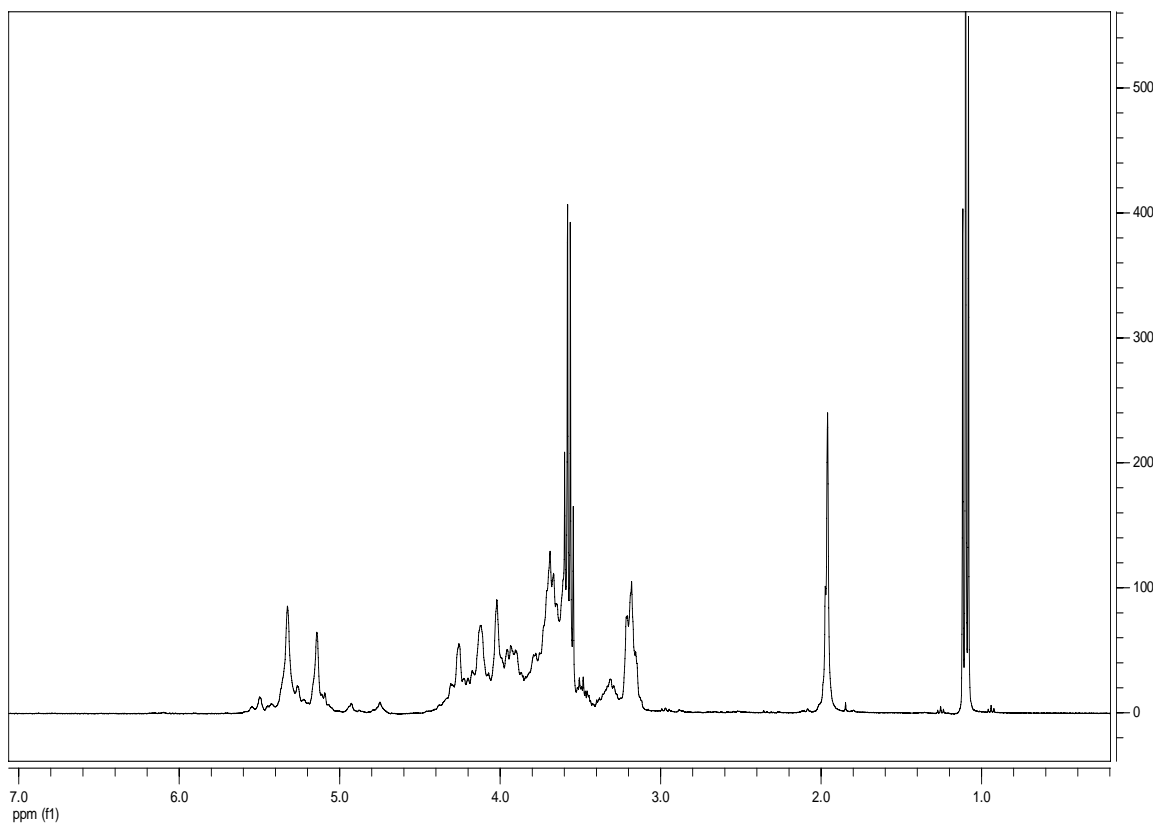


Figura 5.13. Spettro ^1H monodimensionale dell'eparina (~ 12 KDa) in D_2O eseguito a 400 MHz

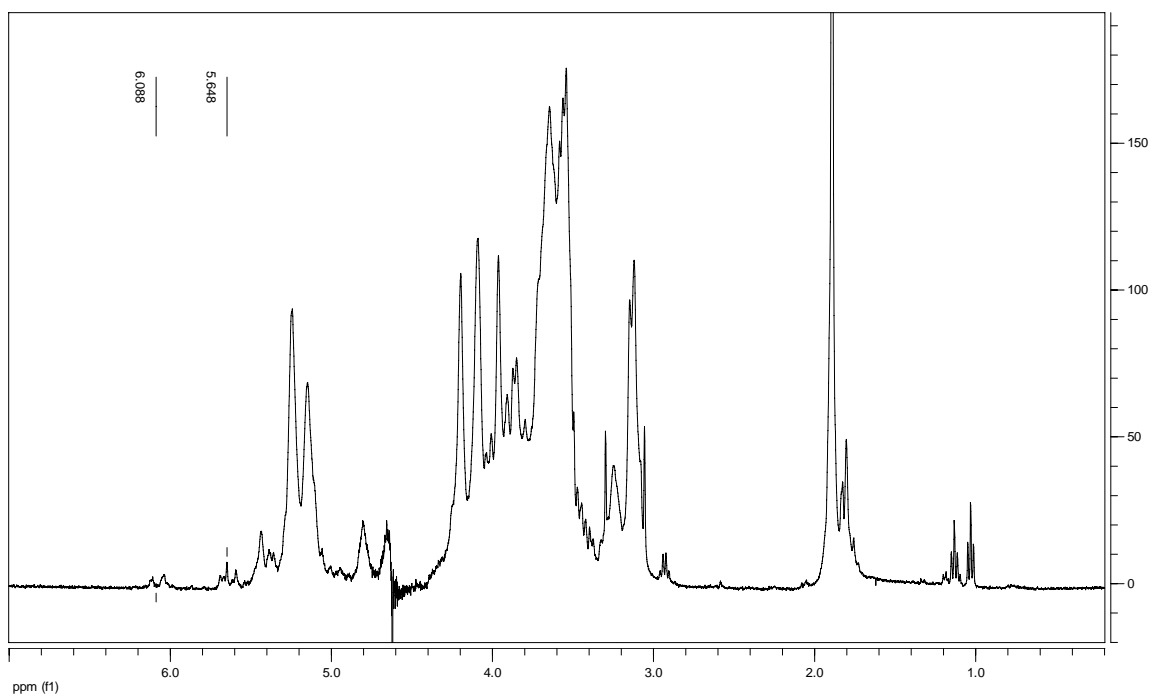


Figura 5.14. Spettro ^1H monodimensionale dell'eparina metacrilata in D_2O eseguito a 400 MHz

8 Efficacia dello scaffold a base di PEGDA ed Hp-Met per il rilascio del VEGF

Il rilascio in vitro di VEGF da scaffold poroso a base di polietilene glicole è riportato in figura 5.12, come rilascio cumulativo di VEGF (ng/ml) per 7 giorni. E' importante premettere che, quando andremo a caricare VEGF negli scaffolds a base di PEG crosslinkato con eparina, avremo due popolazioni di fattore: una sarà di VEGF non legato ma intrappolato nelle maglie dello scaffold; l'altra sarà la popolazione di VEGF che si è legata all'eparina. Abbiamo, perciò, utilizzato come controllo uno scaffold a base di PEG poroso, dal quale è stato possibile calcolare la quantità di VEGF libero nello scaffold. Paragonando le cinetiche di rilascio di VEGF (Fig. 5.15) dallo scaffold a base di PEG (blu) e dallo scaffold a base di PEG crosslinkato con eparina (viola) si può osservare un rilascio iniziale di VEGF di circa 200 ng/giorno per i primi 3 giorni in entrambi i casi. per cui, si tratterà di VEGF trattenuto dallo scaffold. Dal 4° giorno in poi si osserva un rilascio sostenuto di VEGF nello scaffold in cui è presente l'eparina, mentre nello scaffold a base di PEG si raggiunge un plateau. Questi studi preliminari, hanno dimostrato che dal 4° giorno in poi, il rilascio di VEGF, nello scaffold in cui è presente eparina, è dovuto al GAG. Ulteriori esperimenti saranno effettuati per tempi più lunghi abbassando la concentrazione di VEGF iniziale caricato (2µg per scaffold), in modo da ridurre il rilascio nei primi giorni ad una quantità di circa 40ng/giorno che è la dose opportuna per avere un effetto pro-angiogenico.

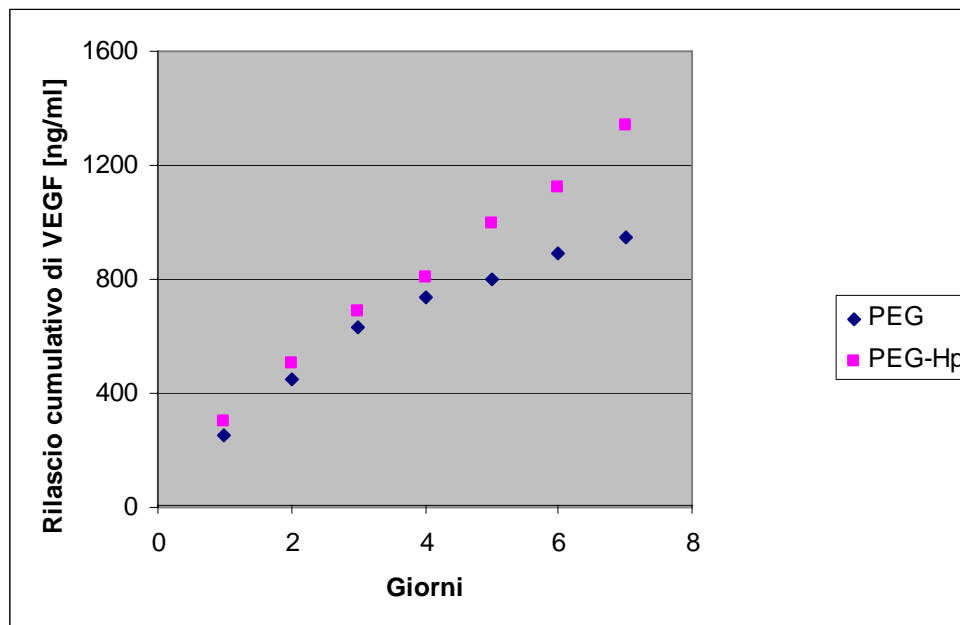


Figura 5.15. Rilascio cumulativo di VEGF da scaffold di PEGDA (blu) e da scaffold di PEG-Hp (viola) in PBS a pH 7.4 a 37°C. I dati sono la media \pm SD di tre duplicati.

DISCUSSIONE

Attualmente, scaffold polimerici possono essere efficacemente impiegati per guidare la rigenerazione di tessuti danneggiati. Tali costrutti tridimensionali devono fornire un supporto geometrico strutturale per la crescita di un tessuto, inducendo corretti meccanismi di rigenerazione biologica e degradare gradualmente con una cinetica confrontabile con quella di crescita del tessuto naturale. La complessa natura delle interazioni cellula-materiale, del controllo della crescita del tessuto, e della graduale degradazione del materiale, richiede l'uso di materiali intelligenti per la progettazione di scaffold con idonee caratteristiche biologiche, chimico-fisiche e strutturali. Tali proprietà riguardano la biocompatibilità, la biodegradabilità, la resistenza meccanica, la lavorabilità come pure dal punto di vista strutturale, la porosità (dimensione, distribuzione e orientazione spaziale). Inoltre la crescita e lo

sviluppo di tessuti all' interno dello scaffold è strettamente influenzata dalla presenza di una rete di vascolarizzazione neo-sintetizzata, che garantisca un appropriato apporto di ossigeno, nutrienti e fattori di crescita all' interno dello scaffold. Inoltre, è sempre più fortemente richiesto e rappresenta una delle maggiori sfide nella progettazione di scaffold per l' ingegneria dei tessuti, la definizione di substrati con adeguata micro e macro-struttura, capaci di promuovere la vascolarizzazione di tessuti. A tale scopo, sono stati messi a punto dei metodi per la produzione di idrogeli macroporosi a base di PEG, utili anche come scaffold in tissue engineering. Si è riusciti ad ottenere delle strutture a pori interconnessi, di geometria sferica, mediante una reazione di foto-reticolazione immediatamente a seguito di un processo di schiumatura basato sulla generazione di CO₂. I campioni sono stati caratterizzati dal punto di vista morfologico mediante SEM e porosimetria al mercurio. I risultati hanno dimostrato che la porosità indotta mediante schiumatura presenta una distribuzione omogenea dei pori caratterizzati da una eterogeneità dei diametri. Numerosi sono, inoltre, gli studi condotti sulla bioattivazione dei materiali [referenze], poiché l'interazione cellula-materiale rappresenta il primo passo in tutti i processi di rigenerazione tissutale. Un ulteriore approccio è, quello di sincronizzare il rilascio spaziale e temporale di segnali morfogenetici in grado di attrarre cellule endogene ed indurre il loro differenziamento attraverso un "pathway" tessuto-specifico [62,95,99]. In questa ultima parte del progetto sono state sintetizzate matrici polimeriche porose a base di PEGDA bioattivato con RGD per promuovere l'adesione cellulare e con eparina per modulare il rilascio di VEGF. Abbiamo dimostrato che cellule endoteliali, seminate in scaffold porosi a base di PEG bioattivati con RGD, aderiscono, proliferano e sono vitali in modo proporzionale all' aumento della concentrazione di RGD. Gli stessi idrogeli, quando impiantati *in vivo*,

determinano attività pro-angiogenica, in particolare lo scaffold ideale sembra essere quello a base di PEG-RGD 20mM.

Ulteriori studi, sono stati condotti, sulla bioattivazione del PEG per il rilascio controllato del VEGF. A tal fine, per la bioattivazione del PEG è stata scelta l'eparina per le sue note capacità di sequestrare fattori di crescita normalmente presenti nella ECM. Studi preliminari, hanno dimostrato che scaffold a base di PEG crosslinkato con eparina possono essere utilizzati per il rilascio sostenuto di VEGF.

Concludendo, lo sviluppo di uno scaffold funzionalizzato per le cellule che può indurre una risposta biologica specifica come adesione, proliferazione e sprouting angiogenico è di principale importanza nella medicina rigenerativa. I nostri dati hanno, infine, dimostrato che è possibile progettare nuovi idrogeli porosi in grado di soddisfare tali esigenze.

CONCLUSIONI

Il successo di qualunque impianto nell'ingegneria dei tessuti dipende da una rapida vascolarizzazione del costrutto cellularizzato e perciò dall'abilità dello scaffold di indurre una specifica attivazione dell'endotelio dell'ospite e guidare la crescita dei vasi. Nella prima parte del mio progetto di dottorato, abbiamo realizzato gradienti di acido ialuronico in matrici tridimensionali di collagene, dimostrando come "in vitro" un semplice gradiente macromolecolare può controllare l'organizzazione strutturale di un vaso; inoltre, i gradienti di molecole della ECM possono direzionare lo sprouting per la crescita di un vaso. I nostri dati suggeriscono che, introducendo un gradiente di segnali intercellulari, è possibile guidare ed aumentare il processo di vascolarizzazione. Disegnando matrici sempre più complesse, combinando per esempio, fattori angiogenici (come VEGF) con fattori di crescita legati alle matrici (eparan solfato o fibronectina), sarà possibile aumentare e controllare in vitro in modo più fine la risposta morfogenetica vascolare. Il fattore di crescita vascolare dell'endotelio (VEGF) è un potente stimolatore angiogenico e se rilasciato in modo controllato può aumentare e guidare la vascolarizzazione dello scaffold. Infatti, gli scaffold di tessuti biologici ingegnerizzati richiedono che il fattore di crescita sia presentato in una concentrazione adeguata e in forma di gradiente spaziale e temporale. Questo può essere ottenuto attraverso un accurato studio di dispositivi micrometrici o sub-micrometrici capaci di controllare il rilascio della proteina ad una concentrazione di pico/nanomoli dentro lo scaffold.

A tal fine, sono state realizzate microsfere di acido polilattico glicole (PLGA) caricate con VEGF e poi incluse in matrici di collagene. Lo scopo di questo lavoro è stato di realizzare uno scaffold che funzionasse da serbatoio per il VEGF, in grado di rilasciarlo in modo controllato e valutare l'abilità di tale scaffold di promuovere angiogenesi. E' stato osservato che scaffold di collagene contenenti microsfere caricate con VEGF aumentavano l'attivazione delle cellule endoteliali,

incrementando lo sprouting vascolare sia *in vivo* che *in vitro* quando confrontati con scaffold contenenti VEGF diffuso nel collagene. Quindi, lo sprouting angiogenico dei vasi può essere guidato negli interstizi delle matrici così come trasmessi dai tessuti dell'ospite mediante il rilascio controllato del VEGF all'interno di uno scaffold polimerico.

I segnali indotti da morfogeni non regolati non possono soddisfare la necessità qualitativa e quantitativa delle condizioni del microambiente per il rimodellamento e l'orientamento cellulare e portare ad una crescita non funzionale.

Abbiamo rivolto, infine, la nostra attenzione alla realizzazione di idrogeli a base di PEGDA bioattivati con il peptide RGD per studiare la loro capacità di promuovere adesione, proliferazione e sprouting angiogenico *in vitro* e *in vivo*. I nostri dati dimostrano che le cellule endoteliali quando seminate in tali idrogeli, sono vitali, aderiscono, proliferano in modo proporzionale all'aumento della concentrazione di RGD; in particolare la situazione ottimale, si osserva, *in vitro*, in scaffold a base di PEG (10% in peso) bioattivati con il peptide RGD 10mM; *in vivo*, si osserva, invece, una maggiore risposta angiogenica attorno agli impianti a base di PEG (10% in peso) bioattivati con RGD 20mM. Sono stati ottenuti, inoltre, dati preliminari su idrogeli a base di PEG (10% in peso) bioattivati con Hp-Met (5% in peso). Tali scaffold sono stati progettati come "drug delivery" di molecole pro-angiogeniche. I primi studi sono stati rivolti alla caratterizzazione morfologica, chimica e funzionale dello scaffold e alla sua capacità di controllare il rilascio di VEGF. Dai primi risultati, possiamo affermare che lo scaffold a base di PEG poroso, bioattivato con RGD ed eparina potrà essere utile per promuovere e direzionare il processo di sprouting angiogenico, sia *in vitro* che *in vivo*. L'uso di polimeri bioattivi può favorire la crescita del tessuto ingegnerizzato.

A seconda delle necessità cliniche, il materiale può essere disegnato in maniera tale da avere affinità per un ampio spettro di tipi cellulari o promuovere l'adesione e l'espressione del fenotipo di un determinato tipo cellulare. Ciò ha implicazioni per lo sviluppo di dispositivi medici e tessuti ingegnerizzati avanzati, quali materiali per dispositivi vascolari .

BIBLIOGRAFIA

1. Hench L. and Polak J. M. (2002). Third-Generation Biomedical Materials Science 295 (8):1014-1017.
2. Hubbell J.(1995). Biomaterials in tissue engineering. Biotechnology, 13: 565-576.
3. Peppas, N. & Langer, R. (1994). New challenges in biomaterials. Science 263,1715-1720.
4. Ribatti D., Vacca A., Rinaldi L., Dammacco F. (1996). The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for in vivo research on angiogenesis. Int. J. Dev. Biol. 40: 1189-1197.
5. Gurland BJ, Toner JA, Wilder DE, Chen J, Lantigua R.Impairment of communication and adaptive functioning in community-residing elders with advanced dementia: assessment methods. Alzheimer Dis Assoc Disord. 1994;8 Suppl 1:S230-41. Zisch Andreas H.et al, Cardiovascular Pathology 2003
6. Jeanie L. Drury Mooney DJ. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. Biomaterials 2003 Nov;24(24):4337-51
7. Schoenmakers RG, van de Wetering P, Elbert DL, Hubbell JA.The effect of the linker on the hydrolysis rate of drug-linked ester bonds. J Control Release. 2004 Mar 5;95(2):291-300.
8. Tabata Y, Miyao M, Yamamoto M, Ikada Y. Vascularization into a porous sponge by sustained release of basic fibroblast growth factor. J Biomater Sci Polym Ed 1999;10:957-968.
9. Ratner BD. New ideas in biomaterials science--a path to engineered biomaterials. J Biomed Mater Res. 1993 Jul;27(7):837-50.
10. Peppas NA. A model of dissolution-controlled solute release from porous drug delivery polymeric systems. J Biomed Mater Res. 1983 Nov;17(6):1079-87.

11. West J.L., Hubbell JA. Comparison of covalently and physically cross-linked polyethylene glycol-based hydrogels for the prevention of postoperative adhesions in a rat model. *Biomaterials*. 1995 Oct;16(15):1153-6.
12. Pratt AB, Weber FE, Schmoekel HG, Müller R, Hubbell JA. Synthetic extracellular matrices for in situ tissue engineering. *Biotechnol Bioeng*. 2004 Apr 5;86(1):27-36.
13. Hirashima B. M., Kataoka H., Nishikawa S., Matsuyoshi N., Nishikawa Shin-ichi (1999). Maturation of Embryonic Stem Cells into Endothelial Cells in an In Vitro Model of Vasculogenesis. *Blood*, 93(4):1253-1263.
14. Sittinger M., Bujia J., Rotter N., Reitzel D., Minuth W. W. And Burmester G.R., (1996). Tissue engineering and autologous transplant formation: practical approaches with resorbable biomaterials and new cell culture techniques, *Biomaterials* 17:3.
15. Vacanti J. P. and Langer R., (1999). Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. *Lancet*, 354 Suppl 1: S132-4.
16. Xue L. and Greisler H.P. (2003). Biomaterials in the development and future vascular grafts. *J. Vascular Surgery*, 37(2):472-480.
17. Wu X, Rabkin-Aikawa E, Guleserian KJ, Perry TE, Masuda Y, Sutherland FW, Schoen FJ, Mayer JE Jr, Bischoff J. Tissue-engineered microvessels on three-dimensional biodegradable scaffolds using human endothelial progenitor cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004 Aug;287(2):H480
18. Lutolf MP, Lauer-Fields JL, Schmoekel HG, Metters AT, Weber FE, Fields GB, Hubbell JA. Synthetic matrix metalloproteinase-sensitive hydrogels for the conduction of tissue regeneration: engineering cell-invasion characteristics. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Apr 29;100(9):5413-8. Epub 2003 Apr 9.

19. Lee H, Cusick RA, Browne F, Ho Kim T, Ma PX, Utsunomiya H, Langer R, Vacanti JP. Local delivery of basic fibroblast growth factor increases both angiogenesis and engraftment of hepatocytes in tissue-engineered polymer devices. *Transplantation*. 2002 May 27;73(10):1589-93. Hollister SJ. Porous scaffold design for tissue engineering. *Nat Mater*. 2005 Jul;4(7):518-24
20. Hutmacher DW. Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues--state of the art and future perspectives. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2001;12(1):107-24.
21. K.F. Leong*, C.M. Cheah, C.K. Chua - Solid freeform fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs - *Biomaterials* 24 (2003) 2363-2378
22. Chen G., Ushida T., Tateishi T. - Scaffold Design for Tissue Engineering - *Macromol. Biosci*. 2 (2002) p.69-70.
23. J.Doshi, D.H.Reneker - Electrospinning process and application of electrospun fibers - *J.Electrostatics* 35(1995)
24. Mooney D.J - Synthetic Biodegradable Polymer Scaffolds - Atala, A., Mooney, D.J. (Eds.), 1996
25. Mikos A.G. Temenoff J.S. - Formation of highly porous biodegradable scaffolds for tissue engineering - *Electronic J. Biotech*. 3: (2000) 114-119
26. Landers R, Pfister A, Hubner U, John H, Schmelzeisen R, Mulhaupt R (2002b) Fabrication of soft tissue engineering scaffolds by means of rapid prototyping techniques. *J Mater Sci* 37: 3107-3116.
27. Ch. Schugens, V. Maquet, Ch. Grandfils, R. Jerome,, and Ph. Teyssie - Biodegradable and macroporous polylactide implants for cell transplantation: I. Preparation of macroporous polylactide support by solid-liquid phase separation - *Polymer* 37 (1996):

28. Laurent TC, Fraser JR. Hyaluronan. *FASEB J* 1992;6:2397–2404.
29. Rooney P, Kumar S. Inverse relationship between hyaluronan and collagens in development and angiogenesis. *Differentiation* 1993;54:1–9.
30. Sage EH, Vernon RB. Regulation of angiogenesis by extracellular matrix: The growth and the glue. *J Hypertens Suppl* 1994;12:S145–S152.
31. Sage EH, Reed M, Funk SE, Truong T, Steadele M, Puolakkainen P, Maurice DH, Bassuk JA. Cleavage of the matricellular protein SPARC by matrix metalloproteinase 3 produces polypeptide that influence angiogenesis. *J Biol Chem* 2003;278:37849–37857.
32. Davies C de L, Melder RJ, Munn LL, Mouta-Carreira C, Jain RK, Boucher Y. Decorin inhibits endothelial migration and tube-like structure formation: Role of thrombospondin-1. *Microvasc Res* 2001;62:26–42.
33. Good DJ, Polverini PJ, Rastinejad F, Le Beau MM, Lemons RS, Frazier WA, Bouck NP. A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:6624–6628.
34. Tolsma SS, Volpert OV, Good DJ, Frazier WA, Polverini PJ, Bouck N. Peptides derived from two separate domains of the matrix protein thrombospondin-1 have anti-angiogenic activity. *J Cell Biol* 1993;122:497–511.
35. West DC, Kumar S. The effect of hyaluronan and its oligosaccharides on endothelial cell proliferation and monolayer integrity. *Exp Cell Res* 1989;183:179–196.
36. West DC, Shaw DM. Tumour HA in relation to angiogenesis and metastasis. In: Laurent TC, editor. *The Chemistry, Biology and Medical Applications of HA and its Derivatives*. London: Portland Press; 1998. pp 227–233. Werner-Gren international Series No. 72.

37. J.Schrier, P.P.DeLuca, Porous bone morphogenetic protein-2 microspheres: polymer binding and in vitro release, *AAPS PharmsciTech* 2001; 2(3) article 17
38. S.Yang, K.Leong, Z.Du, C.Chua, The design of scaffolds for use in tissue engineering, *Tissue engineering*, volume7, number 6, 2001, Mary Ann Liebert, Inc
39. H.Okada, H.Toguchi, Biodegradable microspheres in drug delivery, *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 1995; 12(1): 1-99
40. Katre NV. Immunogenicity of recombinant IL-2 modified by covalent attachment of polyethylene glycol.*J Immunol.* 1990 Jan 1;144(1):209-13.
41. Guerra PI, Acklin C, Kosky AA, Davis JM, Treuheit MJ, Brems DN. PEGylation prevents the N-terminal degradation of megakaryocyte growth and development factor. *Pharm Res.* 1998 Dec;15(12):1822-7
42. Abuchowski A, Kazo GM, Verhoest CR Jr, Van Es T, Kafkewitz D, Nucci ML, Viau AT, Davis FF., 1984; Cancer therapy with chemically modified enzymes. I. Antitumor properties of polyethylene glycol-asparaginase conjugates. *Cancer Biochem Biophys.* 1984 Jun;7(2):175-86
43. Andrade SP, Cardoso CC, Machado RD, Beraldo WT. (Angiotensin-II-induced angiogenesis in sponge implants in mice. *Int J Microcirc Clin Exp.* 1996 Nov-Dec;16(6):302-7.
44. Klibanov AL, Maruyama K, Torchilin VP, Huang L. Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes. *FEBS Lett.* 1990 Jul 30;268(1):235-7.
45. Maechling-Strasser C, Déjardin P, Galin JC, Schmitt A, Housse-Ferrari V, Sébille B, Mulvihill JN, Cazenave JP. (Synthesis and adsorption of a poly(N-acetyleneimine)-polyethyleneoxide-poly -acetyleneimine) triblock-copolymer at a silica/solution interface. Influence of its preadsorption on platelet

- adhesion and fibrinogen adsorption. *J Biomed Mater Res.* 1989 Dec;23(12):1395-410.
46. Zalipsky S, Puntambekar B, Boulikas P, Engbers CM, Woodle MC. Peptide attachment to extremities of liposomal surface grafted PEG chains: preparation of the long-circulating form of laminin pentapeptide, YIGSR. *Bioconjug Chem.* 1995 Nov-Dec;6(6):705-8., 1995;
 47. Veronese FM, Mammucari C, Schiavon F, Schiavon O, Lora S, Secundo F, Chilin A, Guiotto A. Pegylated enzyme entrapped in poly(vinyl alcohol) hydrogel for biocatalytic application. *Farmaco.* 2001 Aug;56(8):541-7. , 2001
 48. Hill-West JL, Chowdhury SM, Sawhney AS, Pathak CP, Dunn RC, Hubbell JA. Prevention of postoperative adhesions in the rat by in situ photopolymerization of bioresorbable hydrogel barriers. *Obstet Gynecol.* 1994 Jan;83(1):59-64.
 49. Quinn CP, Pathak CP, Heller A, Hubbell JA. Photo-crosslinked copolymers of 2-hydroxyethyl methacrylate, poly(ethylene glycol) tetra-acrylate and ethylene dimethacrylate for improving biocompatibility of biosensors. *Biomaterials.* 1995 Mar;16(5):389-96
 50. King TW, Patrick CW. Development and in vitro characterization of vascular endothelial growth factor (VEGF)-loaded poly(DL-lactic-co-glycolic acid)/poly(ethylene glycol) microspheres using a solid encapsulation /single emulsion/solvent extraction technique. *J Biomed Mater Res* 2000;51:383–390.
 51. Richardson TP, Peters MC, Ennett AB, Mooney DJ. Polymeric system for dual growth factor delivery. *Nat Biotechnol* 2001;19:1029–1034.
 52. Ruoslahti E. RGD and other recognition sequences for integrins *Ann Rev Cell Dev Biol* 1996;12:697–715.
 53. Hubbell JA. Bioactive biomaterials. *Curr Opin Biotechnol* 1999; 10:123–129.

54. Pieper JS, van Wachem PB, van Luyn MJA, Brouwer LA, Hafmans T, Veerkamp JH, van Kuppevelt TH. Attachment of glycosaminoglycans to collagenous matrices modulates the tissue response in rats. *Biomaterials* 2000;21:1689–1699.
55. Whitaker MJ, Quirk RA, Howdle SM, Shakesheff KM. Growth factor release from tissue engineering scaffolds. *J Pharm Pharmacol* 2001;53:1427–1437.
56. Lutolf MP, Lauer-Fields JL, Schmoekel HG, Metters AT, Weber FE, Fields GB, Hubbell JA. Synthetic matrix metalloproteinase-sensitive hydrogels for the conduction of tissue regeneration: Engineering cell-invasion characteristics. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;29:100:5413–5418.
57. Zisch AH, Lutolf MP, Hubbell JA. Biopolymeric delivery matrices for angiogenic growth factors. *Cardiovasc Pathol* 2003;12:295–310.
58. Ehrbar M, Djonov VG, Schnell C, Tschanz SA, Martiny-Baron G, Schenk U, Wood J, Burri PH, Hubbell JA, Zisch AH. Cell demanded liberation of VEGF121 from fibrin implants induces local and controlled blood vessel growth. *Circ Res* 2004;94:1124–1132.
59. Koike N, Fukumura D, Gralla O, Au P, Schechner JS, RK. Tissue engineering: Creation of long-lasting blood vessels *Jain Nature* 2004;11:428:138,139
60. Carmeliet P, Conway EM. Growing better blood vessels. *Nat Biotechnol* 2001;19:1019,1020.
61. Malinda KM, Nomizu M, Chung M, Delgado M, Kuratomi Y, Yamada Y, Kleinman HK, Ponce ML. Identification of laminin a1 and b1 chain peptides active for endothelial cell adhesion, tube formation, and aortic sprouting. *FASEB J* 1999;13:53–62.
62. Zisch AH, Lutolf MP, Ehrbar M, Raeber GP, Rizzi SC, Davies N, Schmokel H, Bezuidenhout D, Djonov V, Zilla P, Hubbell JA. Cell demanded release of

- VEGF from synthetic, biointeractive cell-ingrowth matrices for vascularized tissue growth. *FASEB J* 2003;17:2260–2262.
63. Akeson AL, Greenberg JM, Cameron JE, Thompson FY, Brooks SK, Wiginton D, Whitsett JA. Temporal and spatial regulation of VEGF-A controls vascular patterning in the embryonic lung. *Dev Biol* 2003;264:443–455.
64. Xin X, Borzacchiello A, Netti PA, Ambrosio L, Nicolais L. Hyaluronic-acid-based semiinterpenetrating materials. *J Biomater Sci Polym Ed* 2004;15:1223–1236.
65. Korff T, Augustin HG. Integration of endothelial cells in multicellular spheroids prevents apoptosis and induces differentiation. *J Cell Biol* 1998;143:1341–1352.
66. Pepper MS. Positive and negative regulation of angiogenesis: From cell biology to the clinic. *Vasc Med* 1996;1:259–266.
67. Folkman J. Angiogenesis: Initiation and control. *Ann NY Acad Sci* 1982;401:212–227.
68. Stupack DG, Cheresh DA. ECM remodeling regulates angiogenesis: endothelial integrins look for new ligands. *Sci STKE*. 2002 Feb 12;2002(119):PE7. Review.
69. Jiang B, Liou GI, Behzadian MA, Calwell RB. Astrocytes modulate retinal vasculogenesis: Effects on fibronectin expression. *J Cell Sci* 1994;107:2499–2508.
70. Wijelath ES, Murray J, Rahman S, Patel Y, Ishida A, Strand K, Aziz S, Cardona C, Hammond WP, Savidge GF, Rafii S, Sobel M. Novel vascular endothelial growth factor binding domains of fibronectin enhance vascular endothelial growth factor biological activity. *Circ Res* 2002;91:25–31.
71. Rapraeger AC. Syndecan-regulated receptor signaling. *J Cell Biol* 2000;149:995–998.

72. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1997;18:4–25.
73. Brecht M, Mayer U, Schlosser E, Prehm P. Increased hyaluronate synthesis is required for fibroblast detachment and mitosis. *Biochem J* 1986;239:445–450.
74. Goldberg RL, Toole BP. Hyaluronate inhibition of cell proliferation. *Arthritis Rheum* 1987;30:769–778.
75. Toole BP. Proteoglycans and HA in morphogenesis and differentiation. In: Hay ED, editor. *Cell Biology of the Extracellular Matrix*, 2nd ed. New York: Plenum; 1991. pp 305–341.
76. Whelan MC, Senger DR. Collagen I initiates endothelial cell morphogenesis by inducing actin polymerization through suppression of cyclic AMP and protein kinase A. *J Biol Chem*
77. Ruhrberg C, Gerhardt H, Golding M, Watson R, Ioannidou S, Fujisawa H, Betsholtz C, Shima DT. Spatially restricted patterning cues provided by heparin-binding VEGF-A control blood vessel branching morphogenesis. *Genes Dev* 2002;16: 2684–2698.
78. Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, Ruhrberg C, Lundkvist A, Abramsson A, Jeltsch M, Mitchell C, Alitalo K, Shima D, Betsholtz C. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol* 2003;161:1163–1177.
79. Langer R, Vacanti JP. Tissue Engineering. *Science* 1993; 260(5110):920-6.
80. Lutolf MP, Hubbell JA. Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. *Nat Biotechnol* 2005; 23(1):47-55.
81. Tabata Y. Tissue regeneration based on growth factor release. *Tissue Eng* 2003; 9 Suppl 1:S5-15.

82. Ennett AB, Mooney DJ. Tissue engineering strategies for in vivo neovascularisation. *Expert Opin Biol Ther* 2002; 2(8):805-18.
83. Langer R. Biomaterials in drug delivery and tissue engineering: one laboratory's experience. *Acc Chem Res* 2000; 33(2):94-101.
84. Saltzman WM, Olbricht WL. Building drug delivery into tissue engineering. *Nat Rev Drug Discov* 2002; 1(3):177-86.
85. Chen RR, Mooney DJ. Polymeric growth factor delivery strategies for tissue engineering. *Pharm Res* 2003; 20(8):1103-12.
86. Richardson TP, Peters MC, Ennett AB, Mooney DJ. Polymeric system for dual growth factor delivery. *Nat Biotechnol* 2001; 19:1029-1034
87. Perets A, Baruch Y, Weisbuch F, Shoshany G, Neufeld G, Cohen S. Enhancing the vascularization of three-dimensional porous alginate scaffolds by incorporating controlled release basic fibroblast growth factor microspheres, *J Biomed Mater Res* 65 A (2003) 489-497.
88. Ungaro F, Biondi M, Indolfi L, De Rosa G, La Rotonda M I, Quaglia F, Netti P. Bioactivated Polymer Scaffolds for Tissue Engineering. In: N. Ashammakhi, R.L. Rise, Sun W. Eds. (2005) *Topics in Tissue engineering Vol. II*
89. Elisseeff J, McIntosh W, Anseth K, Riley S, Ragan P, Langer R. Photoencapsulation of chondrocytes in poly (ethylene oxide)-based semi-interpenetrating networks. *J Biomed Mater Res*. 2000; 51(2):164-71.
90. Bussolino F, Wang JM, Defilippi P, Turrini F, Sanavio F, Edgell CJ, Aglietta M, Arese P, Mantovani A. Granulocyte- and granulocyte-macrophage-colony stimulating factors induce human endothelial cells to migrate and proliferate. *Nature*. 1989;337(6206):471-3.

91. Borselli C, Oliviero O, Battista S, Ambrosio L, Netti P A. Induction of directional sprouting angiogenesis by matrix gradients. *J Biomed Mater Res A*. 2007; 80(2): 297-305.
92. Ungaro F, Biondi M, d'Angelo I, Indolfi L, Quaglia F, Netti PA, La Rotonda MI. Microsphere-integrated collagen scaffolds for tissue engineering: effect of microsphere formulation and scaffold properties on protein release kinetics. *J Control Rel* 2006; 113:128-136.
93. Ribatti D, Gualandris A, Bastaki M, Vacca A, Iurlaro M, Roncali L, Presta M. New model for the study of angiogenesis and antiangiogenesis in the chick embryo chorioallantoic membrane: the gelatin sponge/chorioallantoic membrane assay. *J Vasc Res* 1997; 34: 455–463.
94. van de Weert M, Hennink WE, Jiskoot W, Protein instability in poly(lactic-co-glycolic acid) microparticles. *Pharm. Res.* 2000; 17:1159-1167
95. Peters MC, Isenberg BC, Rowley JA, Mooney DJ. Release from alginate enhances the biological. *J Biomater Sci Polym Ed.* 1998;9(12):1267-78.
96. Holland T A, Mikos A G. Biodegradable polymeric scaffolds. Improvements in bone tissue engineering through controlled drug delivery. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2006; 102:161-85.
97. Fischbach C, Mooney DJ. Polymers for pro- and anti-angiogenic therapy. *Biomaterials* 2007 (12):2069-76.
98. Tabata Y, Ikada Y. Vascularization effect of basic fibroblast growth factor released from gelatine hydrogels with different biodegradabilities. *Biomaterials*. 1999; 20(22):2169-75.
99. King TW, Patrick CW. Development and in vitro characterization of vascular endothelial growth factor (VEGF)-loaded poly(DL-lactic-co-glycolic acid)/poly(ethylene glycol) microspheres using solid encapsulation/single

- emulsion/solvent extraction technique. *J Biomed Mater Res.* 2000; 51(3):383-90.
100. Pieper JS, Hafmans T, Veerkamp JH, van Kuppevelt TH. Development of tailor-made collagen-glycosaminoglycan matrices: EDC/NHS crosslinking, and ultrastructural aspects. *Biomaterials* 2000; 21(6):581-93.
101. Ehrbar M, Djonov VG, Schnell C, Tschanz SA, Martiny-Baron G, Schenk U, Wood J, Burri PH, Hubbell JA, Zisch AH. Cell-demand liberation of VEGF121 from fibrin implants induces local and controlled blood vessel growth. *Circ Res* 2004; 94(8):1124-32.
102. Ruoslahti E. Integrin signaling and matrix assembly. *Tumour Biol.* 1996; 17(2):117-24.
103. Whitaker MJ, Quirk RA, Howdle SM, Shakesheff KM. Growth factor release from tissue engineering scaffolds. *J Pharm Pharmacol.* 2001; 53(11):1427-37.
104. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: molecular and biological aspects. *Curr Top Microbiol Immunol* 1999; 237:1-30
105. Lazarous DF, Shou M, Scheinowitz M, Hodge E, Thirumurti V, Kitsiou AN, et al. Comparative effects of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor on coronary collateral development and the arterial response to injury. *Circulation* 1996; 94(5):1074–82.
106. Helm CL, Fleury ME, Zisch AH, Boschetti F, Swartz MA. Synergy between interstitial flow and VEGF directs capillary morphogenesis in vitro through a gradient amplification mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(44): 15779–84.
107. Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, Ruhrberg C, Lundkvist A, Abramsson A, et al. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol* 2003; 161(6): 1163–77.

108. Hennink WE, van Nostrum CF. Novel crosslinking methods to design hydrogels. *Adv Drug Deliv Rev.* 2002 Jan 17;54(1):13-36. Review.
109. Moon JJ, Lee SH, West JL. Synthetic biomimetic hydrogels incorporated with ephrin-A1 for therapeutic angiogenesis. *Biomacromolecules.* 2007 Jan;8(1):42-9.
110. DeLong SA, Gobin AS, West JL. Covalent immobilization of RGDS on hydrogel surfaces to direct cell alignment and migration. *J Control Release.* 2005 Dec 5;109(1-3):139-48. Epub 2005 Nov 10.
111. Fittkau MH, Zilla P, Bezuidenhout D, Lutolf MP, Human P, Hubbell JA, Davies N. The selective modulation of endothelial cell mobility on RGD peptide containing surfaces by YIGSR peptides. *Biomaterials.* 2005 Jan;26(2):167-74.
112. Taite LJ, Yang P, Jun HW, West JL. Nitric oxide-releasing polyurethane-PEG copolymer containing the YIGSR peptide promotes endothelialization with decreased platelet adhesion. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2007 May 11;
113. Whitaker MJ, Quirk RA, Howdle SM, Shakesheff KM. Growth factor release from tissue engineering scaffolds. *J Pharm Pharmacol.* 2001 Nov;53(11):1427-37. Review.
114. Benoit DS, Anseth KS. Heparin functionalized PEG gels that modulate protein adsorption for hMSC adhesion and differentiation. *Acta Biomater.* 2005 Jul;1(4):461-70.
115. Benoit DS, Durney AR, Anseth KS. The effect of heparin-functionalized PEG hydrogels on three-dimensional human mesenchymal stem cell osteogenic differentiation. *Biomaterials.* 2007 Jan;28(1):66-77.
116. Tae G, Scatena M, Stayton PS, Hoffman AS. PEG-cross-linked heparin is an affinity hydrogel for sustained release of vascular endothelial growth factor. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2006;17(1-2):187-97.

117. Lutolf MP, Hubbell JA. Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. *Nat Biotechnol.* 2005 Jan;23(1):47-55. Review.
118. Harris, J.M. *Poly(Ethylene Glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications.* Plenum Press, NY. 1992.
119. Andrade, J.D., Hlady, V., Jeon, S.I. Poly(ethylene oxide) and protein resistance: principles, problems and possibilities. *Adv. Chem. Ser.* 248, 51-59 1996.
120. Maechling-Strasser C, Déjardin P, Galin JC, Schmitt A, Housse-Ferrari V, Sébille B, Mulvihill JN, Cazenave JP. Synthesis and adsorption of a poly(N-acetyleneimine)-polyethyleneoxide-poly (N-acetyleneimine) triblock-copolymer at a silica/solution interface. Influence of its preadsorption on platelet adhesion and fibrinogen adsorption. *J Biomed Mater Res.* 1989 Dec;23(12):1395-410.
121. Seliktar D, Zisch AH, Lutolf MP, Wrana JL, Hubbell JA. MMP-2 sensitive, VEGF-bearing bioactive hydrogels for promotion of vascular healing. *J Biomed Mater Res A.* 2004 Mar 15;68(4):704-16.
122. Sannino A, Netti PA, Madaghiele M, Coccoli V, Luciani A, Maffezzoli A, Nicolais L. Synthesis and characterization of macroporous poly(ethylene glycol)-based hydrogels for tissue engineering application. *J Biomed Mater Res A.* 2006 Nov;79(2):229-36.
123. Smeds KA, Pfister-Serres A, Miki D, Dastgheib K, Inoue M, Hatchell DL, Grinstaff MW. Photocrosslinkable polysaccharides for in situ hydrogel formation. *J Biomed Mater Res.* 2001 Jan;54(1):115-21

