



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

Dipartimento Scienze della Vita e dell'Ambiente
Corso di Laurea Scienze Biologiche

TESI DI LAUREA

SPETTROSCOPIA VIBRAZIONALE E IMAGING: APPLICAZIONI IN
INGEGNERIA TISSUTALE

“VIBRATIONAL SPECTROSCOPY AND IMAGING: APPLICATIONS FOR
TISSUE ENGINEERING”

Tesi di Laurea di:
Giorgia Zappacosta

Docente Referente:
Elisabetta Giorgini

Sessione Autunnale
Anno Accademico 2018/2019

INDICE

1. Ingegneria dei tessuti	3
2. Metodologie per la valutazione dei biomateriali da ingegneria tissutale	4
3. La spettroscopia infrarossa	5
4. Ingegneria del tessuto cartilagineo articolare.....	6
4.1 Analisi FTIRI-MIR della cartilagine ingegnerizzata	7
4.2 Analisi FTIR-NIR della cartilagine ingegnerizzata	8
5. Ingegneria dei tessuti ossei	10
5.1 Analisi FTIRI-MIR di ossa ingegnerizzate	11
6. Osservazioni conclusive	13
7. Riferimenti	14

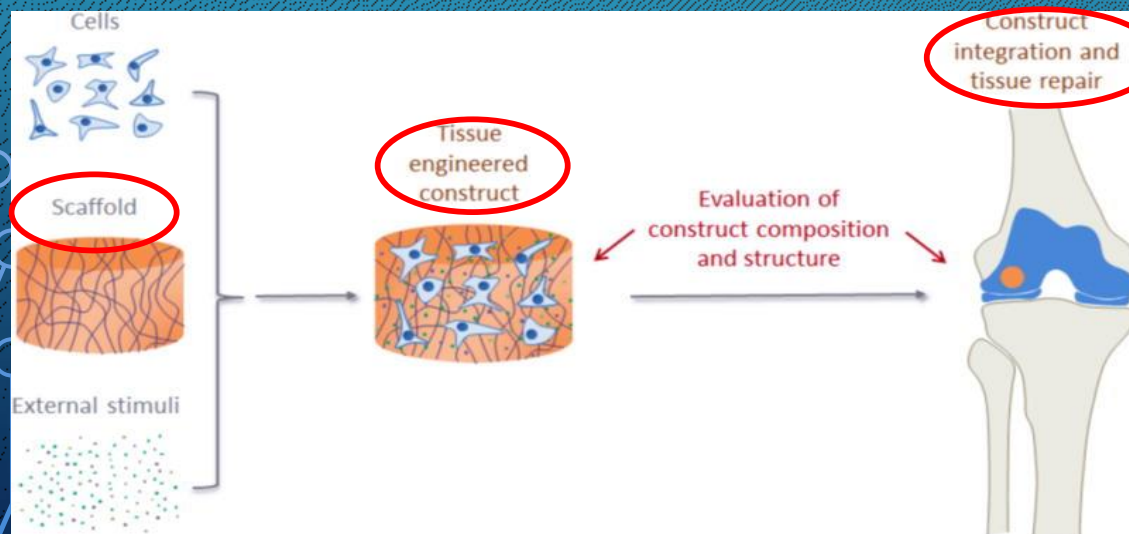
INGEGNERIA DEI TESSUTI

L'Ingegneria tissutale (TE) è un settore multidisciplinare, a cavallo tra biologia e ingegneria, che studia l'utilizzo di cellule e materiali biocompatibili per il ripristino delle funzionalità originali di tessuti e organi danneggiati ⁽¹⁾.

Negli ultimi anni sono stati condotti numerosi studi per l'introduzione di nuove tecniche di fabbricazione di tessuti e organi ingegnerizzati:

- ❖ Deposizione di cellule su matrice extracellulare di origine sintetica o naturale (ECM) o di uno scaffold;
- ❖ Decellularizzazione → lascia invariata la ECM degli organi interni e rimuove, mediante una serie di lavaggi successivi, le cellule primarie e il materiale nucleico ⁽²⁾⁽³⁾.

Gli scaffold per l'ingegneria dei tessuti sono costituiti da polimeri sintetici e naturali, prevalentemente a base di collagene, in grado di abbattere le risposte immunitarie del paziente e mantenere invariata l'integrità strutturale ⁽⁵⁾⁽⁶⁾.



Le cellule, gli scaffold e gli stimoli interni sono combinati per produrre tessuti ingegnerizzati.

I materiali che attualmente vengono maggiormente utilizzati nel campo dell'ingegneria tissutale sono la ceramica ⁽⁷⁾ e gli idrogel.

METODOLOGIE PER LA VALUTAZIONE DEI BIOMATERIALI DA INGEGNERIA TISSUTALE

I biomateriali da ingegneria tissutale, una volta realizzati, devono essere testati e convalidati in vitro e in vivo:

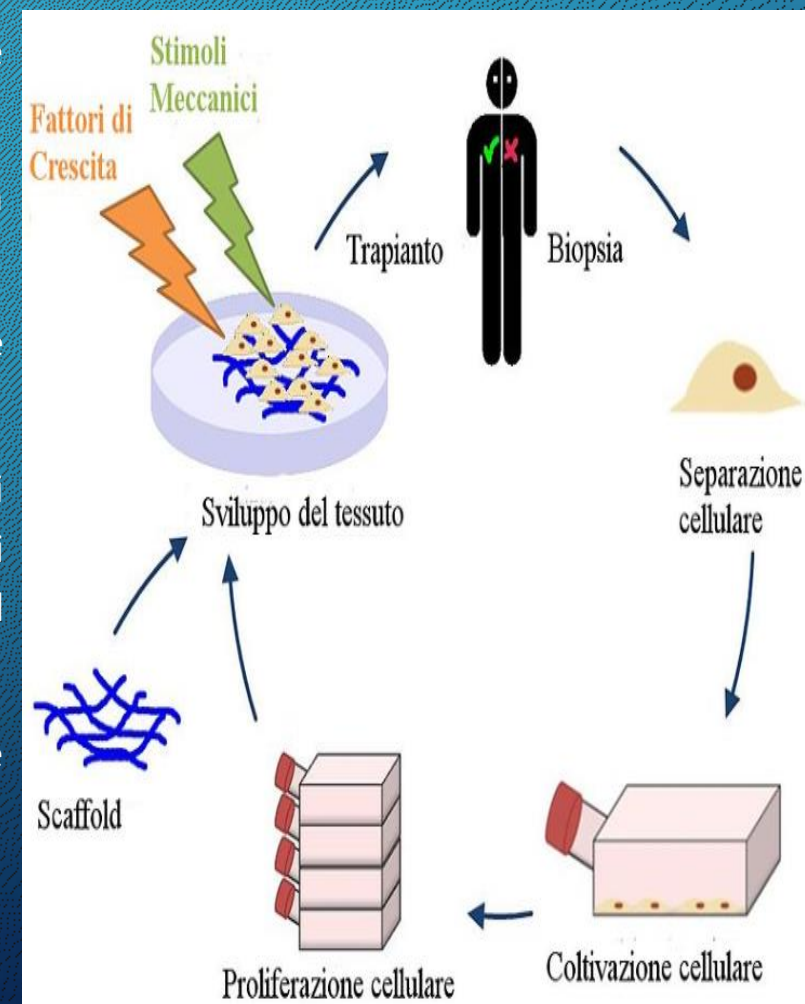
- ❖ valutazione proprietà biochimiche, meccaniche e di biocompatibilità del tessuto neosintetizzato;
- ❖ analisi istologiche → fissazione del tessuto neosintetizzato e sezionamento.

Valutata la deposizione di ECM i biomateriali devono essere digeriti mediante papaina o proteasi-K ⁽⁸⁾, mentre il contenuto di glicosaminoglicani solfati (GAG) viene determinato spettrofotometricamente dal legame del colorante blu dimetilmetilene ⁽⁹⁾.

Queste tecniche prevedono però la distruzione meccanica o l'elaborazione del campione → eseguite e testate su diversi biomateriali.

Metodi alternativi non distruttivi:

- ❖ risonanza magnetica (NMR) ⁽¹⁰⁾;
- ❖ imaging a ultrasuoni ⁽¹¹⁾;
- ❖ imaging a raggi X ⁽¹²⁾.

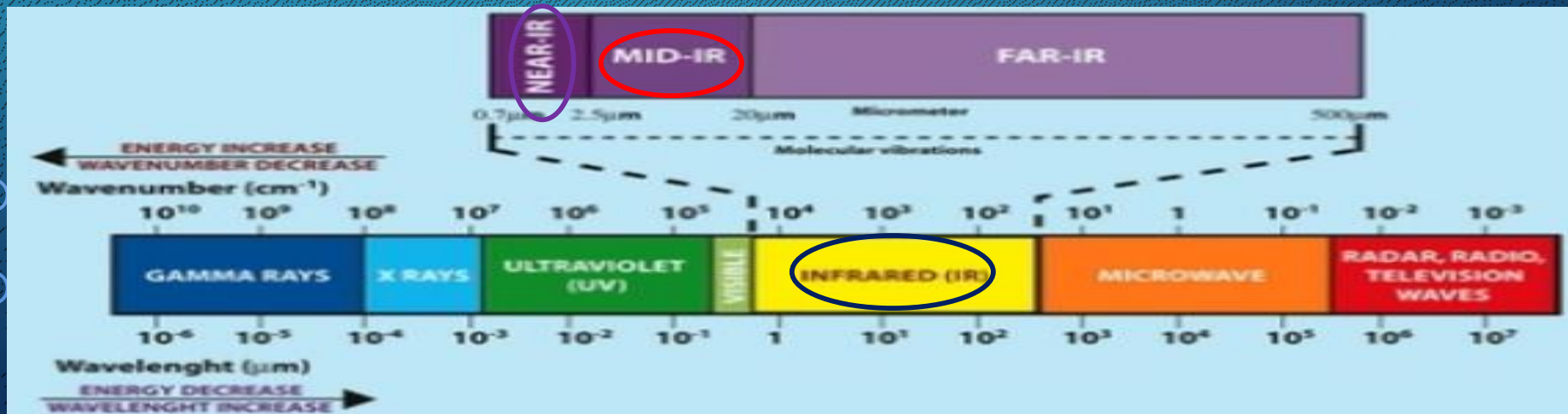


LA SPETTROSCOPIA INFRAROSSA

Per una valida valutazione della composizione e della struttura del tessuto ingegnerizzato neosintetizzato, può essere utilizzata la Spettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier (FTIR) → informazioni sulla composizione e struttura mediante un approccio di tipo non distruttivo ⁽¹³⁾.

Gli intervalli spettrali utilizzati sono quelli del medio MIR (400-4000 cm^{-1}) e vicino NIR (4000-12500 cm^{-1}) infrarosso:

- ❖ le bande IR nel MIR → da transizioni vibrazionali molecolari di specifici legami/gruppi chimici;
- ❖ le bande nel NIR → si osservano gli overtone e le bande di combinazione.

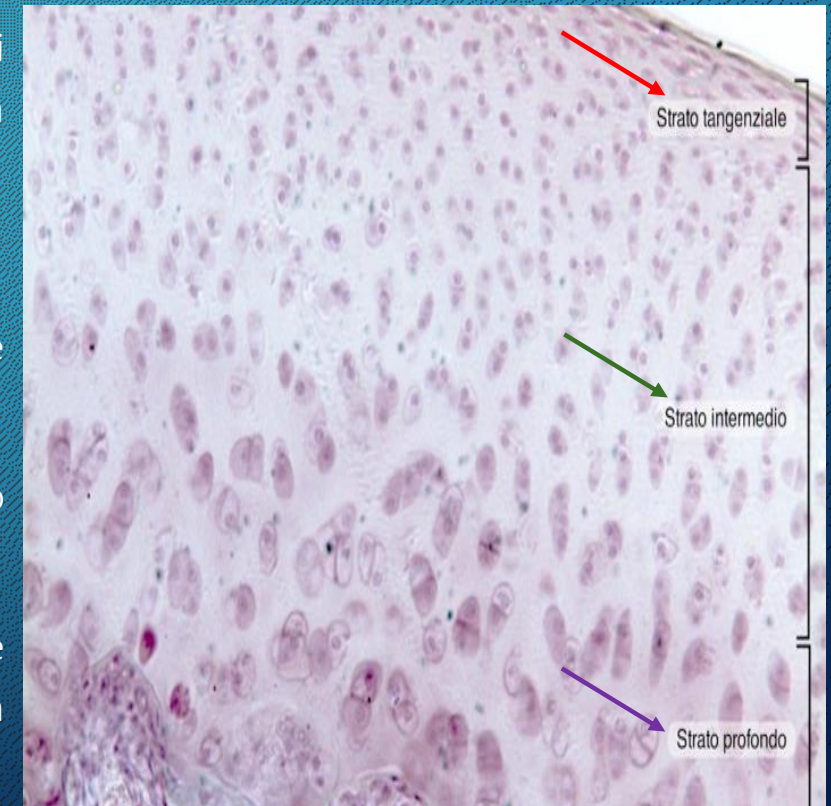


INGEGNERIA DEL TESSUTO CARTILAGINEO ARTICOLARE

La cartilagine articolare è un tessuto connettivo elastico di sostegno altamente specializzato dotato di notevole resistenza sia alla pressione che alla trazione.

Il tessuto è organizzato in zone fondamentali:

- ❖ zona superficiale → fibrille collagene di tipo II compattate e orientate parallelamente alla superficie;
- ❖ zona intermedia → fibrille di collagene con orientamento casuale;
- ❖ zona profonda → fibrille di collagene radialmente orientate con la più alta concentrazione di proteoglicani e la più bassa percentuale di acqua.



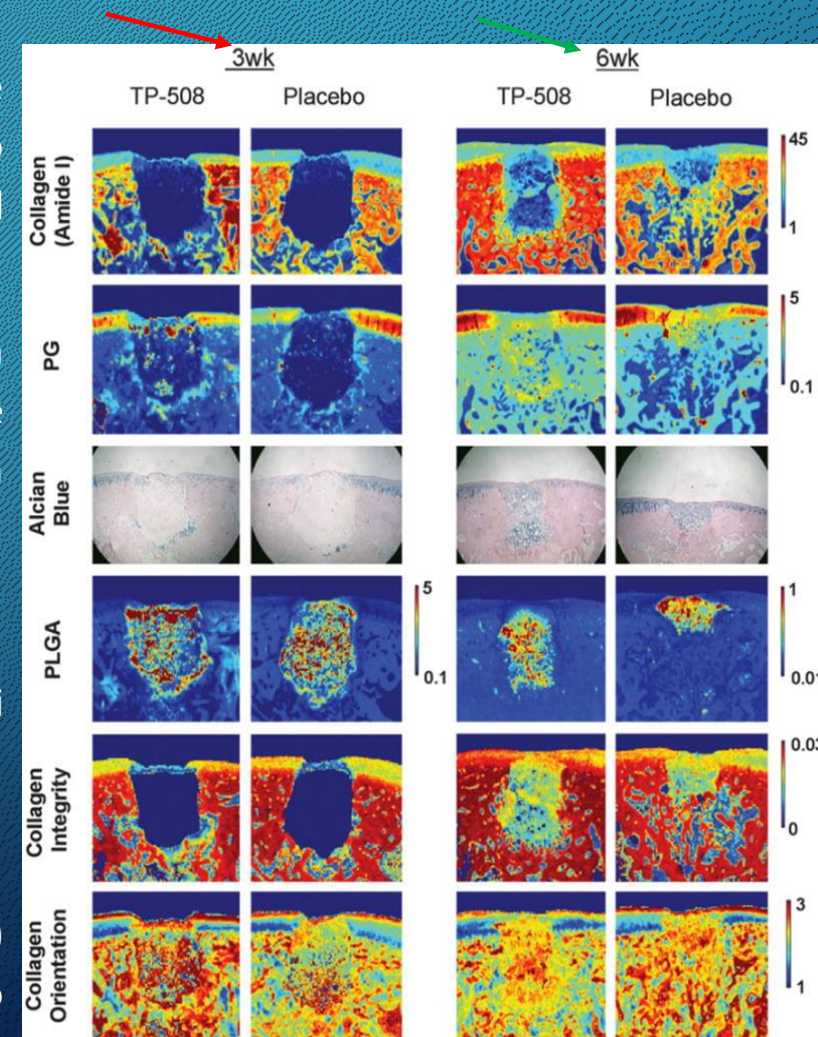
ANALISI FTIRI-MIR DELLA CARTILAGINE INGEGNERIZZATA

L'utilizzo della spettroscopia FTIR nel medio infrarosso (FTIRI-MIR) permette di mappare aree ben precise di campioni biologici non omogenei, fornendo mappe di correlazione relative alle varie componenti macromolecolari del campione stesso.

Camacho e collaboratori → spettroscopia FTIRI-MIR per lo studio della cartilagine ingegnerizzata dimostrando come l'area della banda Ammide I e quella del picco a 1338 cm^{-1} (corrispondente alle vibrazioni della catena laterale del collagene) siano correlate alla concentrazione del collagene.

La spettroscopia FTIRI-MIR applicata anche in altri campi:

- ❖ valutazione del contenuto di proteoglicani nella ECM prodotta dai condrociti in un bioreattore a fibra cava (HFBR) ⁽¹⁴⁾;
- ❖ studio degli effetti dell'organizzazione dei tessuti ingegnerizzati;
- ❖ valutazione della crescita EMC su scaffold di poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) con peptide sintetico della trombina (TP-508) valutando l'integrità e l'orientamento del collagene dopo 3 e 6 settimane.

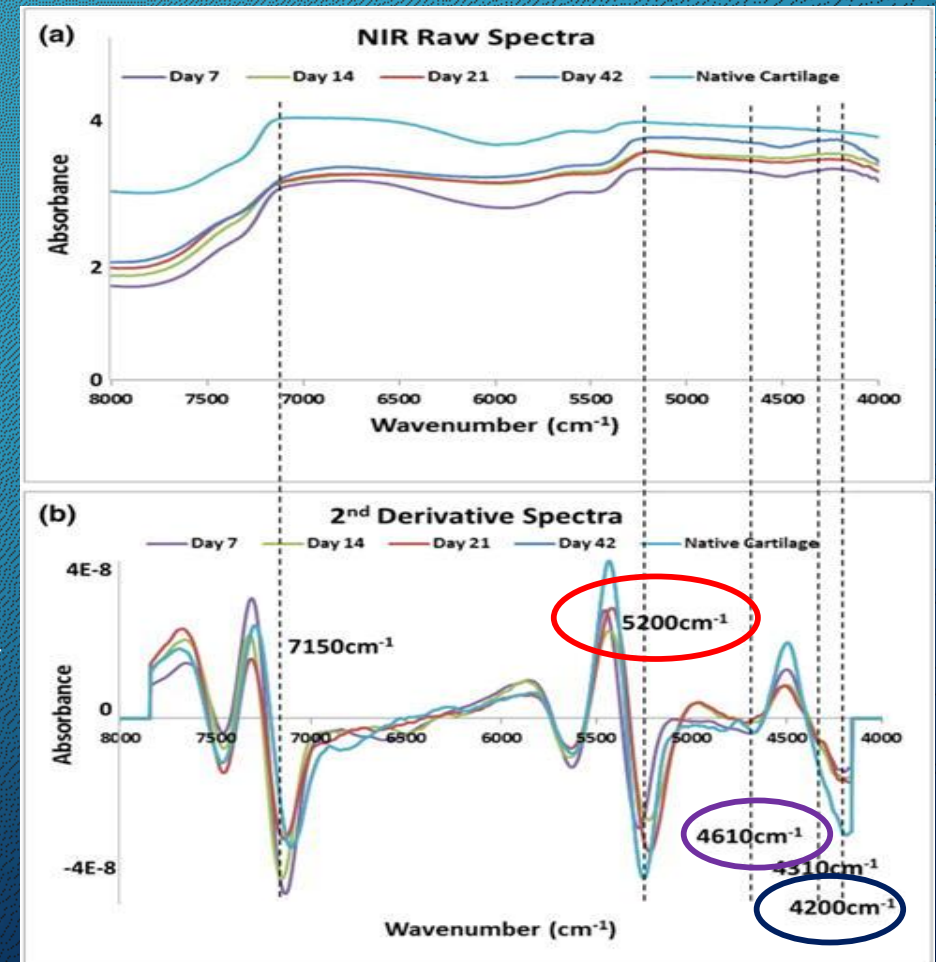


ANALISI FTIR-NIR DELLA CARTILAGINE INGEGNERIZZATA

L'utilizzo della spettroscopia FTIR-NIR è molto più vantaggiosa nei confronti di altre tecniche → raggiungere maggiore profondità di penetrazione.

McGoverin e collaboratori ⁽¹⁵⁾ → utilizzo della spettroscopia FTIR-NIR al fine di monitorare, in modo non distruttivo, la crescita e lo sviluppo di biomateriali di cartilagine artificiale di condrociti bovini in scaffold di acido poliglicolico (PGA).

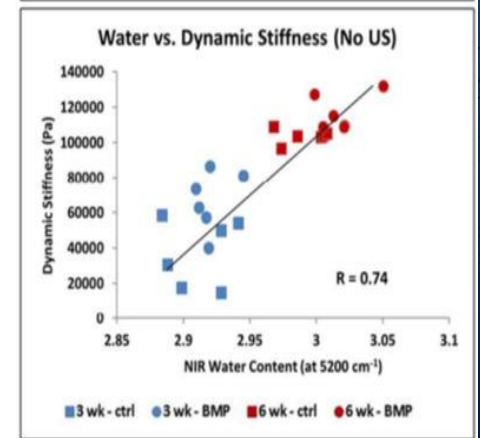
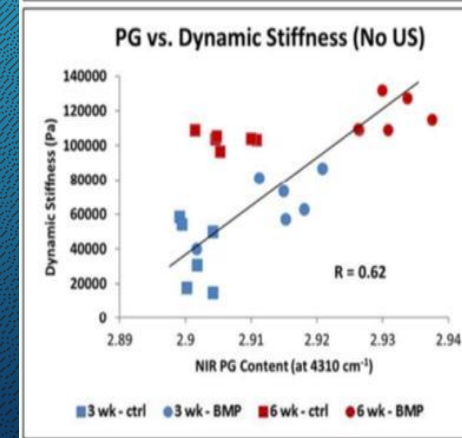
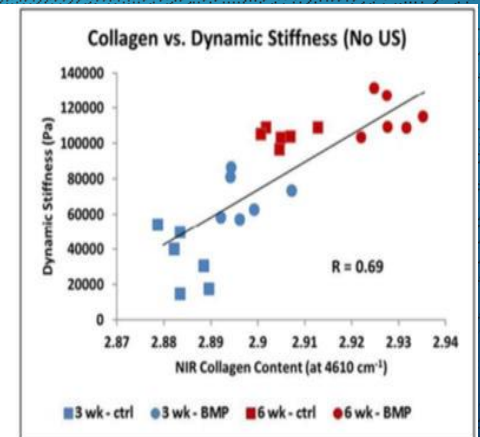
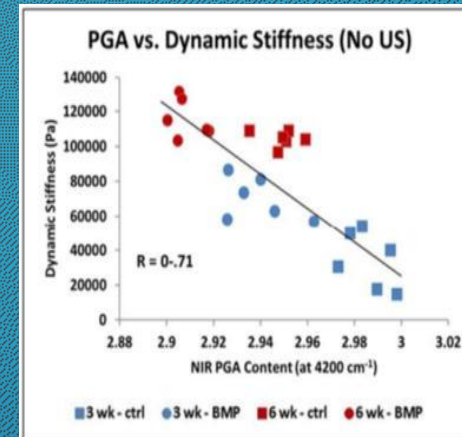
Seguita la crescita in coltura dello scaffold per 42 giorni → acquisizione spettri NIR sull'intero spessore dello scaffold. L'altezza dei picchi a **5200**, **4610** and **4200** cm^{-1} è stata usata per quantizzare il contenuto di acqua, collagene e proteoglicani. Gli spettri della cartilagine nativa sono riportati per confronto.



ANALISI FTIR-NIR DELLA CARTILAGINE INGEGNERIZZATA

Hanifi e collaboratori ⁽¹⁶⁾ hanno osservato una significativa correlazione tra il contenuto di acqua, collagene e proteoglicani e la rigidità dinamica dei biomateriali dei condrociti bovini cresciuti in scaffold di acido poliglicolico (PGA) → identificazione di una correlazione negativa tra il picco NIR del PGA e la rigidità.

Gli spettri NIR possono valutare in modo non distruttivo le proprietà meccaniche della cartilagine ottenuta da condrociti bovini cresciuti su scaffold di polyglycolic acid (PGA) → correlazione positiva fra il contenuto di acqua, collagene e proteoglicani quantificati sulla base degli spettri NIR e la rigidità dinamica misurata mediante test meccanici standard.

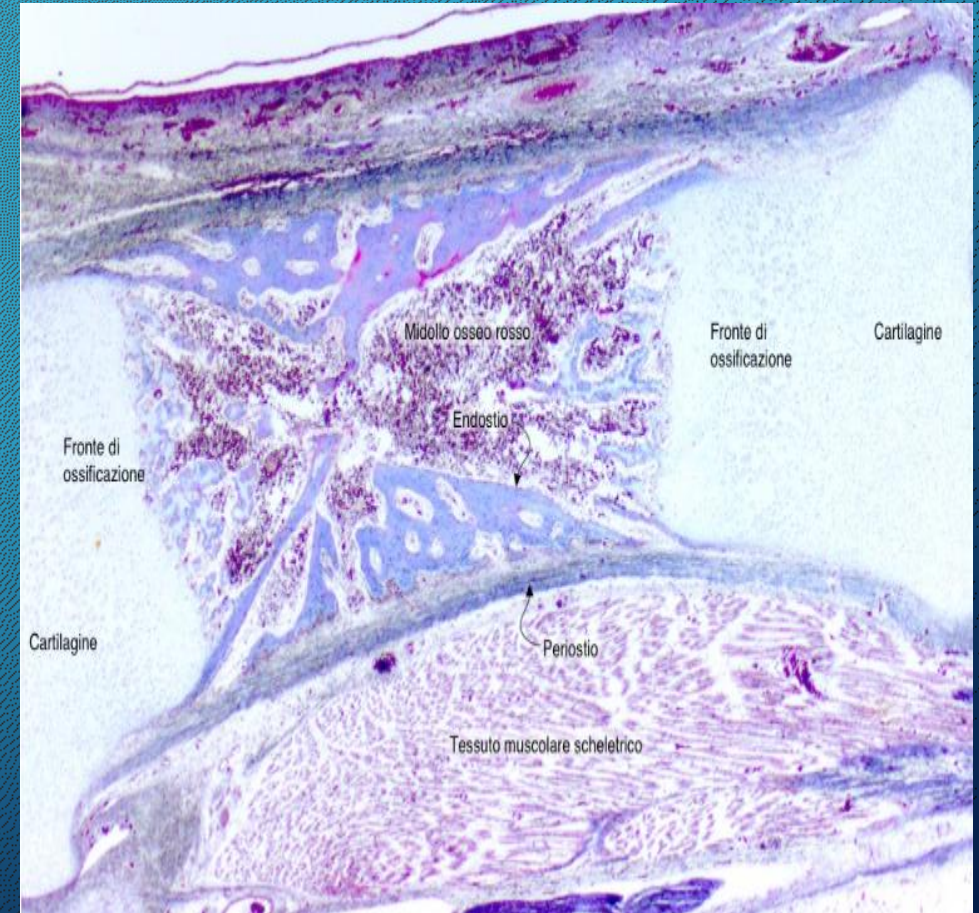


INGEGNERIA DEI TESSUTI OSSEI

Il tessuto osseo è un tessuto contemporaneamente dinamico e plastico. Provvede a modificare la propria struttura a seguito del recepimento di stimoli di natura sia organica che meccanica. È distinguibile in una porzione organica e una porzione inorganica:

- ❖ porzione organica → cellule fondamentali del tessuto osseo e matrice extracellulare;
- ❖ porzione inorganica → sali minerali (fosfati di calcio → elemento fondamentale di costituzione della porzione minerale del tessuto).

La formazione di tessuto osseo a livello di scaffold di ingegneria tissutale viene valutata mediante l'utilizzo di una colorazione istologica → permette di mettere in risalto ed evidenziare la mineralizzazione del tessuto (metodo Von Kossa e Alizarin Red) ⁽¹⁷⁾.

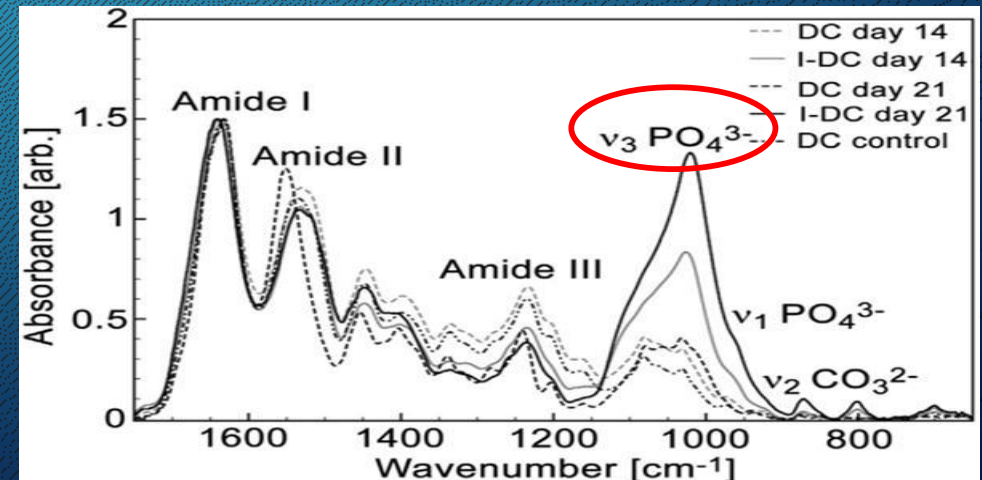


ANALISI FTIRI-MIR DI OSSA INGEGNERIZZATE

L'utilizzo della spettroscopia FTIRI-MIR nella valutazione del tessuto osseo ingegnerizzato permette una valutazione in merito alla funzionalità dei biomateriali messi a punto. L'impiego della spettroscopia MIR favorisce, mediante l'osservazione e lo studio dei picchi emessi, la valutazione della composizione della matrice ossea.

Boyan e collaboratori → spettroscopia FTIR-MIR per la dimostrazione della formazione di apatite ossea e osservazione che il minerale risulta essere strettamente associato alla matrice. Analizzare la formazione e il grado di mineralizzazione della matrice ossea in diversi tipi di scaffold 3D, sulla base dell'intensità della banda $\nu_3\text{PO}_4$ dei fosfati.

Gli spettri MIR di cellule staminali mesenchimali di topo cresciute su collagene denso (DC) e idrogel di collagene denso iniettabile (I-DC) → mostrano l'assenza dei picchi dovuti alla componente minerale negli scaffold DC e una progressiva mineralizzazione negli scaffold I-DC dopo 14 e 21 giorni di coltura.

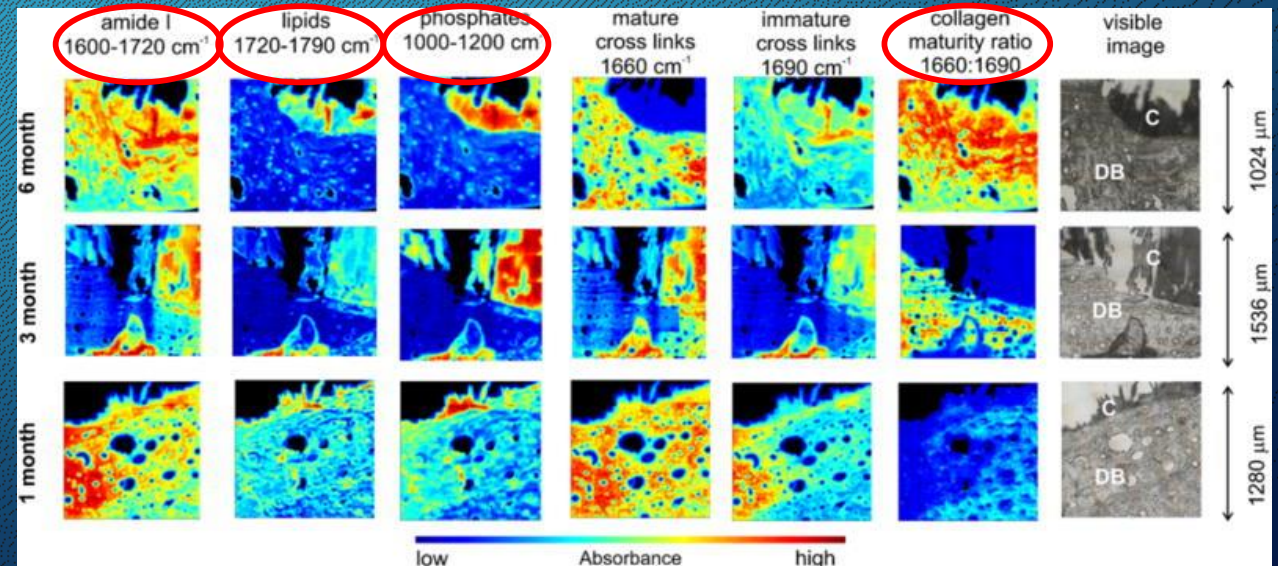


ANALISI FTIRI-MIR DI OSSA INGEGNERIZZATE

La spettroscopia FTIRI-MIR è utilizzata per mettere in evidenza la mineralizzazione ossea formata da cellule staminali embrionali cresciute in biomateriali di alginato 3D in condizioni osteogeniche, e per la valutazione della formazione ossea e della mineralizzazione su scaffold dopo l'impianto negli animali.

Rossi e collaboratori ⁽¹⁸⁾ → spettroscopia MIR per studiare i cambiamenti causati dall'ambiente biologico nelle sfere di idrossiapatite-alginato dopo l'impianto in zone ossee danneggiate in ratti.

Sroka-Bartnicka e collaboratori ⁽¹⁹⁾ → diverse caratteristiche del tessuto osseo formatosi intorno a ponteggi in carbonio idrossiapatite/ β -glucano dopo l'impianto in zone ossee danneggiate in coniglio, osservando la distribuzione spaziale di amidi, lipidi, fosfato e collagene.



OSSERVAZIONI CONCLUSIVE

Review volta a descrivere le più recenti applicazioni della spettroscopia FTIR-MIR e NIR nel campo dell'ingegneria tissutale → valida alternativa alle tecniche analitiche standard normalmente utilizzate.

❖ L'analisi spettroscopica permette di studiare in maniera dettagliata e non distruttiva componenti cellulari e strutturali di materiali biocompatibili ingegnerizzati → applicazioni di ingegneria cartilaginea e ossea.

❖ La sfida principale nell'uso della spettroscopia FTIR MIR e NIR per applicazioni di ingegneria tissutale è legata all'acquisizione e all'elaborazione di grandi insiemi di dati, che richiedono competenze avanzate e approcci analitici → la scelta delle impostazioni sperimentali, la modalità di campionamento e l'analisi dei dati devono essere ottimizzate e convalidate per ottenere spettri di alta qualità e dati affidabili.

❖ Lo sviluppo di varianti avanzate della spettroscopia vibrazionale, come i laser a cascata quantistica a medio infrarosso (QCL), la spettroscopia a risoluzione spaziale vicina all'infrarosso (SRS) e la spettroscopia coerente anti-Stokes Raman (CARS), potrebbero in futuro portare a progressi ancora maggiori nell'uso della spettroscopia vibrazionale nel campo dell'ingegneria dei tessuti.

RIFERIMENTI

1. Langer R, Vacanti JP. *Science*. 1993;260:920–926. [PubMed] [Google Scholar]
2. Song LJ, Murphy SV, Yang B, Xu YM, Zhang YY, Atala A. *Tissue Engineering Part B-Reviews*. 2014;20:163–172. [PubMed] [Google Scholar]
3. Kawecki M, Łabuś W, Kłama-Baryła A, Kitala D, Kraut M, Glik J, Misiuga M, Nowak M, Bielecki T, Kasperczyk A. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2017 [PubMed] [Google Scholar]
4. Consolo F, Brizzola S, Tremolada G, Grieco V, Riva F, Acocella F, Fiore GB, Soncini M. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2016;10:E101–E112. [PubMed] [Google Scholar]
5. Gunatillake P, Mayadunne R, Adhikari R. *Biotechnology Annual Review, Vol 12*. 2006;12:301–347. [PubMed] [Google Scholar]
6. Dhandayuthapani B, Yoshida Y, Maekawa T, Kumar DS. *International Journal of Polymer Science*. 2011 [Google Scholar]
7. Hench LL. *Journal of Materials Science- Materials in Medicine*. 2015;26. [PubMed] [Google Scholar]
8. Freed LE, Vunjak-Novakovic G, Biron RJ, Eagles DB, Lesnoy DC, Barlow SK, Langer R. *Biotechnology*. 1994;12:689. [PubMed] [Google Scholar]
9. Farndale RW, Buttle DJ, Barrett AJ. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 1986;883:173. [PubMed] [Google Scholar]
10. Irrechukwu ON, Lin PC, Fritton K, Doty S, Pleshko N, Spencer RG. *Tissue Engineering Part A*. 2011;17:407–415. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
11. Xuan JW, Bygrave M, Jiang HY, Vallyeva F, Dunmore-Buyze J, Holdsworth DW, Izawa JJ, Bauman G, Moussa M, Winter SF, Greenberg NM, Chin JL, Drangova M, Fenster A, Lacefield JC. *Cancer Research*. 2007;67:2830–2839. [PubMed] [Google Scholar]
12. Muller B, Beckmann F, Huser M, Maspero F, Szekely G, Ruffieux K, Thurner P, Wintermantel E. *Biomolecular Engineering*. 2002;19:73–78. [PubMed] [Google Scholar]
13. Diem M, Romeo M, Boydston-White S, Miljkovic M, Matthaus C. *Analyst*. 2004;129:880–885. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
14. Kim M, Bi XH, Horton WE, Spencer RG, Camacho NP. *Journal of Biomedical Optics*. 2005;10. [PubMed] [Google Scholar]
15. Baykal D, Irrechukwu O, Lin PC, Fritton K, Spencer RG, Pleshko N. *Applied Spectroscopy*. 2010;64:1160–1166. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
16. McGoverin CM, Hanifi A, Palukuru UP, Yousefi F, Glenn PBM, Shockley M, Spencer RG, Pleshko N. *Annals of Biomedical Engineering*. 2016;44:680. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
17. Wang Y, Von Euw S, Fernandes FM, Cassaignon S, Selmane M, Laurent G, Pehau-Arnaudet G, Coelho C, Bonhomme-Coury L, Giraud-Guille MM, Babonneau F, Azais T, Nassif N. *Nature Materials*. 2013;12:1144–1153. [PubMed] [Google Scholar]
18. Rossi AL, Barreto IC, Maciel WQ, Rosa FP, Rocha-Leao MH, Werckmann J, Rossi AM, Borojevic R, Farina M. *Bone*. 2012;50:301–310. [PubMed] [Google Scholar]
19. Sroka-Bartnicka A, Kimber JA, Borkowski L, Pawlowska M, Polkowska I, Kalisz G, Belcarz A, Jozwiak K, Ginalska G, Kazarian SG. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2015;407:7775–7785. [PubMed] [Google Scholar]