

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN
Scienze Biomediche e Neuromotorie

Ciclo XXXI

Settore Concorsuale: 05/H1

Settore Scientifico Disciplinare: BIO/16

TITOLO TESI

3D BIOPRINTING GRAFT SCAFFOLDS A BASE DI FIBROINA DELLA
SETA PER APPLICAZIONE CLINICA DI RIGENERAZIONE TISSUTALE

Presentata da: Dr. Giancarlo Facchini

Coordinatore Dottorato

Prof. Pietro Cortelli

Supervisore

Prof. Lucio Ildebrando Cocco

Co-Supervisore

Dr.ssa Gina Lisignoli

Esame finale anno 2019

***A mia moglie Margherita
e ai miei figli Andrea e Matteo***

Abstract

La presente tesi è stata svolta presso il centro di ricerca Codivilla-Putti del IRCCS - Istituto Ortopedico Rizzoli di Bologna, nel Laboratorio di Immunoreumatologia e Rigenerazione Tissutale diretto dalla Prof.ssa E. Mariani. Lo studio è intitolato “*3D BIOPRINTING GRAFT SCAFFOLDS A BASE DI FIBROINA DELLA SETA PER APPLICAZIONE CLINICA DI RIGENERAZIONE TISSUTALE*” e ha come obiettivo generale quello di sviluppare un tessuto ingegnerizzato che permetta la rigenerazione delle fratture che vanno incontro a non unione (non-union fracture), partendo da dati radiologici di tomografia computerizzata (TC dual-energy, TC-DE)

La mia attività di ricerca si è sviluppata in tre anni durante i quali sono stati perseguiti i seguenti obiettivi:

Task 1. Dual energy CT data acquisition - Inizialmente sono stati scansionati con TC-DE (Discovery 750 HD, GE) pezzi anatomici da cadaveri (ossa e tessuti molli) per definire i parametri di scansione TC, utili alla ottimizzazione per il successivo utilizzo sul paziente. I dati ottenuti dalla TC-DE hanno permesso di valutare i parametri di scansione (mAs, Kv, rapporto segnale/rumore, filtri d'immagine, software di riduzione artefatti, numero di detettori utilizzati etc.) necessari per analizzare il miglior rapporto tra dose radiante erogata e qualità dell'immagine. Abbiamo evidenziato che il rapporto dose/qualità delle immagini è dipendente dalla sede anatomica scansionata, dallo spessore dei tessuti, dal tipo di protesi metallica presente (titanio, cromo-cobalto etc). Successivamente sono stati analizzati i sistemi di riduzione di dose (VEO e ASIR) per poterli applicare sul paziente senza perdere qualità delle immagini. Abbiamo evidenziato che l'applicazione del sistema VEO permette una valutazione del tessuto osseo ottimale senza ridurre la qualità dell'immagine, utilizzando comunque una dose più bassa di oltre il 50% rispetto al sistema ASIR. L'ottenimento di tali immagini con il sistema VEO implica comunque un tempo di attesa di circa 40 minuti per l'elaborazione dell'immagine. Inoltre abbiamo evidenziato che il sistema ASIR non permette di ottenere immagini dettagliate riducendo la dose come evidenziato con il sistema VEO. Il sistema VEO non è compatibile con il sistema GSI. Con l'uso del sistema GSI abbiamo individuato i livelli mono-energetici che meglio riducono gli artefatti da protesi metallica e

abbiamo valutato l'applicazione del software MAR per la riduzione post-processing degli artefatti.

Task 2. Computer-aided images elaborations and 3D-Bioprinter patient-specific 3D printed scaffold – Sono state valutate varie immagini TC-DE e successivamente importate in formato DICOM in un software dedicato per la visualizzazione, segmentazione e processazione d'immagini per riprodurre l'anatomia esatta del tessuto osseo. Tali immagini sono state trasferite con il software ad un Bioplotter 3D (Bioprinter RegenHu) che ha permesso la stampa di scaffolds 3D che riproducevano segmenti anatomici di tessuto osseo originale. Si è dunque scelto di iniziare con scaffolds 3D con modelli geometrici semplici, le cui caratteristiche fossero facilmente adattabili a strutture più complesse quali quelle anatomiche in vivo. Tali prototipi sono stati inizialmente realizzati con un biomateriale altamente osteoconduttivo a base di calcio fosfato (Osteoink, RegenHu), che mima la composizione chimica dell'osso naturale (fosfati di calcio e matrice extracellulare) e che viene utilizzato per ingegnerizzare tessuti duri. Tuttavia questo prototipo ha presentato problemi di processazione e valutazione istologica quindi dopo numerosi tentativi si è deciso di non proseguire con questa attività ma di continuare le analisi utilizzando idrogeli come biomateriali con cui realizzare lo scaffold. Gli idrogeli sono strutture più facilmente iniettabili nella zona di frattura che permettono un'ottimale valutazione istologica e immunohistochimica. Si è scelto dunque come biomateriale la fibroina della seta nota per le sue buone capacità di rigenerazione tissutale. Per questo studio, la fibroina della seta è stata estratta direttamente dai bozzoli del baco da seta, il *Bombyx mori*. Il processo di estrazione ha previsto una prima fase di rimozione della componente adesiva rappresentata dalla sericina tramite bicarbonato di sodio. Successivamente, attraverso l'utilizzo di bromuro di litio (LiBr), le fibre sono state solubilizzate in acqua ultrapura. I bioink impiegati in questo studio sono stati realizzati unendo fibroina di seta e gelatina in percentuali uguali (5%). L'aggiunta dell'enzima tirosinasi ha permesso la creazione di strutture 3D in quanto favorisce la reticolazione del bioink. Le formulazioni dei due bioink, impiegati nel presente studio, differiscono solo per la presenza di cloruro di calcio. Gli scaffolds sono stati ottenuti utilizzando la stampante bioprinting "3D Discovery™" della RegenHU. Definita l'architettura di interesse, sono stati effettuati sul biomateriale privo di cellule una serie di valutazioni al fine di ottimizzare i parametri di stampa ed ottenere una buona deposizione di materiale. La presente tesi ha previsto l'impiego dei due bioink sopracitati nei quali sono state

successivamente inglobate le cellule mesenchimali (MSCs): il primo costituito da fibroina di seta, gelatina e tirosinasi (SeGeTi) + MSCs e il secondo in cui è stato aggiunto anche il cloruro di calcio (SeGeTi+CaCl₂) + MSCs.

Task 3. In vitro evaluation of 3D printed scaffold – Si è proceduto alla valutazione delle proprietà biologiche di tali scaffolds. In particolare, sono state utilizzate cellule mesenchimali umane (MSC's) isolate dalla cresta iliaca. Successivamente, sono state poste in coltura fino al raggiungimento di un numero adeguato e, infine, sono state risospese nei bioink prima dell'inizio di ogni processo di stampa. Il primo e il secondo esperimento hanno previsto l'impiego del bioink SeGeTi+MSCs e SeGeTi+CaCl₂ + MSCs. Per tutti gli esperimenti sono state condotte analisi sulla vitalità cellulare e analisi in immunofluorescenza o colorazioni istologiche per valutare il rispettivo differenziamento in senso osteogenico. L'ottimizzazione dei parametri di stampa ha permesso di ottenere strutture 3D con una distribuzione cellulare omogenea. Si è confermato che la combinazione a base di fibroina della seta e gelatina è un ottimo biomateriale in grado di riprodurre un microambiente idoneo per l'ancoraggio, la vitalità e il differenziamento cellulare. Infatti, i due esperimenti condotti hanno mostrato che la combinazione dei biomateriali, con e senza CaCl₂, garantisce un'eccellente vitalità delle MSCs inglobate nei bioink a tutti i tempi sperimentali considerati. Si è dimostrata la potenzialità del bioink nell'indurre il differenziamento cellulare in senso osteogenico utilizzando specifici fattori osteogenici (FO). In particolare la colorazione con Von Kossa, che evidenzia la mineralizzazione, ha permesso di evidenziare la presenza di precipitati neri a conferma che il bioink SeGeTi + MSCs è in grado di indurre il differenziamento in senso osteogenico in presenza dei FO. Infine, si è dimostrato che le strutture ottenute dalla stampa del bioink SeGeTi+CaCl₂ + MSCs e differenziate in senso osteogenico presentavano precipitati di calcio sia nelle condizioni di controllo che in presenza di FO. L'aggiunta di CaCl₂ al bioink ha determinato un incremento della mineralizzazione rispetto a quella ottenuta con il bioink SeGeTi nelle strutture coltivate con FO.

Indice

1. Introduzione	10
1.1 Le fratture ossee non-union o pseudoartrosi	10
1.2 La tomografia computerizzata a doppia energia (TC-DE)	11
1.3 La rigenerazione tissutale.....	19
1.4 I biomateriali	21
1.5 Le cellule	28
1.6 I fattori di crescita	30
1.7 Gli scaffolds	30
2. Materiali e metodi.....	31
2.1 Task 1	31
2.2 Task 2	32
2.3 Task 3	38
3. Risultati	41
4. Discussione e conclusioni.....	61
Bibliografia	63
Ringraziamenti	67

1. Introduzione

1.1 Le fratture ossee “non union” o pseudoartrosi

Le fratture ossee post-traumatiche rappresentano un importante problema medico mondiale che produce significative spese sanitarie e sociali. La maggior parte delle fratture ossee è classificata come non grave ed è in grado di guarire attraverso la normale rigenerazione ossea mediante formazione di callo osseo attraverso trattamenti standard. Alcune lesioni sono invece classificate come complesse in quanto non guariscono nelle tempistiche fisiologiche, avendo così un importante peso clinico per il paziente e sociale per la collettività. In Europa, le fratture complesse sono in aumento a causa dell'elevato numero di incidenti stradali, che provocano gravi lesioni traumatiche, con una sempre maggiore sopravvivenza dei pazienti politraumatizzati. L'alta prevalenza di limitazioni specifiche dopo una grave lesione traumatica, è riportata tra il 40 e il 70% dei pazienti. Il genere femminile e le comorbidità (diabete, vasculopatia, età, ecc.) sono fattori prognostici sfavorevoli per la disabilità a lungo termine. Le funzionalità motorie e la qualità della vita nelle persone sopravvissute a lesioni gravi post-traumatiche sono spesso ridotte, e in numerosi casi purtroppo non avviene una completa “*restitutio ad integrum*”. Le fratture ossee complesse si associano a lesioni dei tessuti molli e alterazioni della biologia tissutale (scarsa vascolarizzazione, strato cutaneo danneggiato, frammenti ossei devitalizzati, compromissione tissutale, disinserzioni muscolari, ecc.), spesso determinando problemi di consolidamento della frattura, con conseguente pseudoartrosi [Ringburg AN et al. 2011].

Le fratture “non-union”, note anche con il termine di **pseudoartrosi**, possono verificarsi nel 5-20% delle fratture delle ossa lunghe che non guariscono correttamente *dopo più di 6 mesi*. Esse si associano a morbidità, prolungata ospedalizzazione e aumento della spesa sanitaria [Calori MG et al. 2013; Blokhuis TJ et al. 2013]. La terapia gold-standard per le fratture che vanno incontro a “non unione” consiste nell'innesto osseo autologo, ottenuto dallo stesso paziente, in un diverso sito chirurgico e trapiantato nel sito di non unione. Con oltre 1 milione di innesti ossei all'anno in Europa, l'osso è il tessuto più trapiantato negli esseri umani. L'innesto osseo autologo, spesso ottenuto dalla cresta iliaca, è la migliore opzione biologica attualmente disponibile. Il suo principale vantaggio è quello di fornire una matrice extracellulare, cellule e fattori di crescita del paziente portando all'osteogenesi locale. Tuttavia, l'innesto osseo autologo presenta degli svantaggi dovuti alla ridotta capacità osteointegrativa, al rifiuto del paziente di sottoporsi a tale procedura, al lento recupero, al

dolore nella sede di frattura e alla ridotta quantità di osso disponibile [Loeffler BJ et al. 2012]. In particolare l'efficacia di rigenerazione è limitata (percentuale di successo di circa il 74%) e sono molto alti i costi sociali dovuti al lento recupero e al tempo di invalidità del paziente [Friedlaender GE et al. 2001; Hak DJ et al. 2014].

Le MSC autologhe combinate con scaffolds 3D si stanno rivelando una valida alternativa della medicina rigenerativa rispetto all'innesto osseo autologo nei casi di fratture esitate in pseudoartrosi.

Questo progetto ha lo scopo di dimostrare il valore aggiunto della medicina rigenerativa ossea per curare difetti ossei con problemi di consolidamento.

1.2 La tomografia computerizzata a doppia energia (TC-DE)

La tomografia computerizzata, in radiologia, indicata con l'acronimo TC o CT (dall'inglese computed tomography), è una tecnica di indagine radiodiagnostica con la quale è possibile riprodurre immagini in sezione (tomografia), create da un'analisi generata al computer, dell'attenuazione di un fascio di raggi X mentre passa attraverso una sezione corporea. La metodica alla base della tomografia assiale computerizzata fu inizialmente concepita, nel 1967, dall'ingegnere inglese sir G. Hounsfield che realizzò la prima apparecchiatura TAC insieme al fisico sudafricano A. Cormack, presso il Central Research Laboratories della EMI a Hayes nel Regno Unito [Herman, G. 2009].

Il concetto di tomografia computerizzata a doppia energia (TC-DE) è originato successivamente allo sviluppo della TC a singola energia. Gli scienziati Alvarez e Macovsky furono i primi nel 1976 a studiarne il principio [Alvarez RE, 1976; Macovsky 1976].

La tomografia computerizzata è nota essere la metodica migliore per lo studio di un tessuto a elevata densità come l'osso. Nella tomografia computerizzata standard tuttavia, materiali con diverse composizioni elementari, possono essere rappresentati dagli stessi valori densitometrici TC o da valori densitometrici molto simili, rendendo estremamente difficile la differenziazione e la classificazione dei diversi tipi di tessuto. Un esempio classico è la difficoltà di differenziare le placche calcifiche aterosclerotiche e il sangue contenente mezzo di contrasto iodato. Sebbene questi materiali differiscano considerevolmente nel numero atomico, nella densità di massa o nella concentrazione di iodio, la placca calcificata o l'osso adiacente possono apparire identici al sangue iodato in TC. Oltre alla difficoltà di differenziare e classificare i tipi di tessuto, l'accuratezza con cui la concentrazione dei

materiali può essere misurata viene ridotta dalla presenza di più tipi di tessuto nello stesso spessore. Ad esempio, quando si misura la quantità di presa di contrasto iodato di una lesione dei tessuti molli, il valore medio TC misurato sulla lesione riflette non solo l'aumento dovuto allo iodio, ma anche al tessuto sottostante. La ragione di queste difficoltà nel differenziare e quantificare i diversi tipi di tessuto deriva dal fatto che il valore TC misurato di un voxel (pixel - volume) è correlato al suo coefficiente di attenuazione lineare $\mu(E)$, che non è univoco per ogni singolo materiale, ma varia in funzione della composizione del materiale stesso, dell'energia fotonica che interagisce con il materiale e della densità del materiale. Come si può vedere nella Figura 1, gli stessi valori del coefficiente di attenuazione lineare possono essere misurati per due materiali diversi (ad esempio, iodio e osso) a una data energia, a seconda della densità [McCollough CH, 2015].

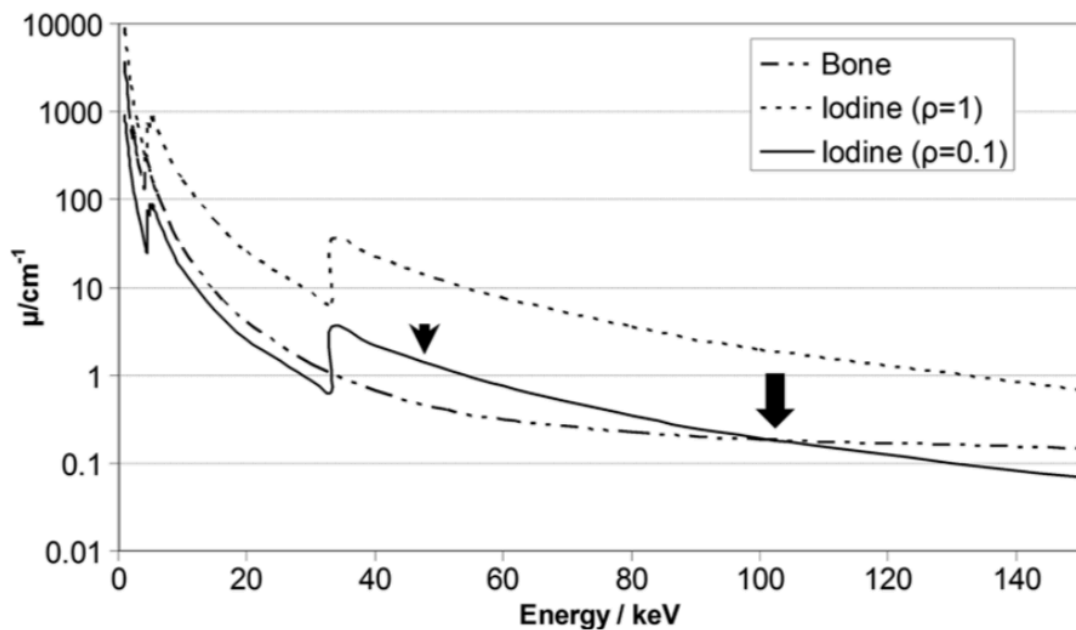


Fig. 1. Grafico dei coefficienti di attenuazione lineare per l'osso (supponendo $r = 1 \text{ g / cm}^3$), iodio (supponendo $r = 1 \text{ g / cm}^3$) e iodio con densità inferiore (supponendo $r = 0,1 \text{ g / cm}^3$) in funzione dell'energia (in kiloelettronvolt). I coefficienti di attenuazione lineare tracciati sono stati generati utilizzando i coefficienti di attenuazione di massa dipendenti dall'energia dall'Istituto nazionale degli standard (INS), successivamente moltiplicati per i valori di densità assegnati. Il risultato è che lo stesso valore di attenuazione lineare ($\mu(E)$) può essere raggiunto anche se i materiali (iodio e osso) sono diversi (freccia). Misurare l'attenuazione a una seconda energia consente di differenziare i due materiali (punta di freccia). Immagini estratte da McCollough CH, 2015.

Nella *TC a doppia energia (TC-DE)*, una misurazione di attenuazione aggiuntiva viene ottenuta con una seconda energia, consentendo la differenziazione dei due materiali (Figura 1). Supponendo l'uso di raggi x monoenergetici, a circa 100 keV si possono misurare gli stessi coefficienti di attenuazione lineare sia per l'osso che per lo iodio (TC standard). I dati acquisiti a circa 50 keV consentirebbero invece la differenziazione dei due materiali. Pertanto, la TC a doppia energia può essere definita come l'uso di misure di attenuazione acquisite con diversi spettri di energia per differenziare e quantificare la composizione del materiale. G. Hounsfield scrisse nel 1973: *"Due foto sono prese dello stesso taglio TC, una a 100 kV e l'altra a 140 kV ... così che le aree di tessuto con numeri atomici alti possono essere maggiormente contrastate. I test effettuati fino ad oggi hanno dimostrato che lo iodio ($z = 53$) può essere facilmente differenziato dal calcio ($z = 20$)"* [Hounsfield GN. 1973].

In commercio sono disponibili numerose macchine TC-DE di diverse aziende, con tuttavia differenti sistemi di acquisizione delle immagini.

Le macchine con cambio rapido del potenziale del tubo a raggi X ("fast kV switching"), nascono negli anni '80 (Somatom DR, Siemens Healthcare, Erlangen, Germania) e sono caratterizzate dalla commutazione rapida del potenziale del tubo per consentire l'acquisizione di misure a bassi e alti voltaggi [Kalender WA. 1987]. La prima applicazione clinica di questa tecnica serviva alla misurazione della densitometria ossea. Tuttavia, la corrente del tubo non riusciva ad essere aumentata abbastanza velocemente perché le misure del potenziale del tubo basso raggiungano livelli di rumorosità paragonabili sia nel set di dati del potenziale basso sia in quello del tubo alto. Questa differenza nel rumore (artefatti) ha limitato l'estensione della tecnica oltre le applicazioni di densitometria ossea. La commutazione del potenziale del tubo tra scansioni consecutive richiede che il tempo di transizione dal potenziale del tubo da basso a quello alto sia inferiore al millisecondo. Inoltre, la transizione deve essere la più rapida possibile per massimizzare la separazione energetica dei dati misurati. Questo approccio è stato sviluppato con successo con la macchina HD 750, GE Healthcare, Waukesha, Wisconsin, USA (Fig.2).

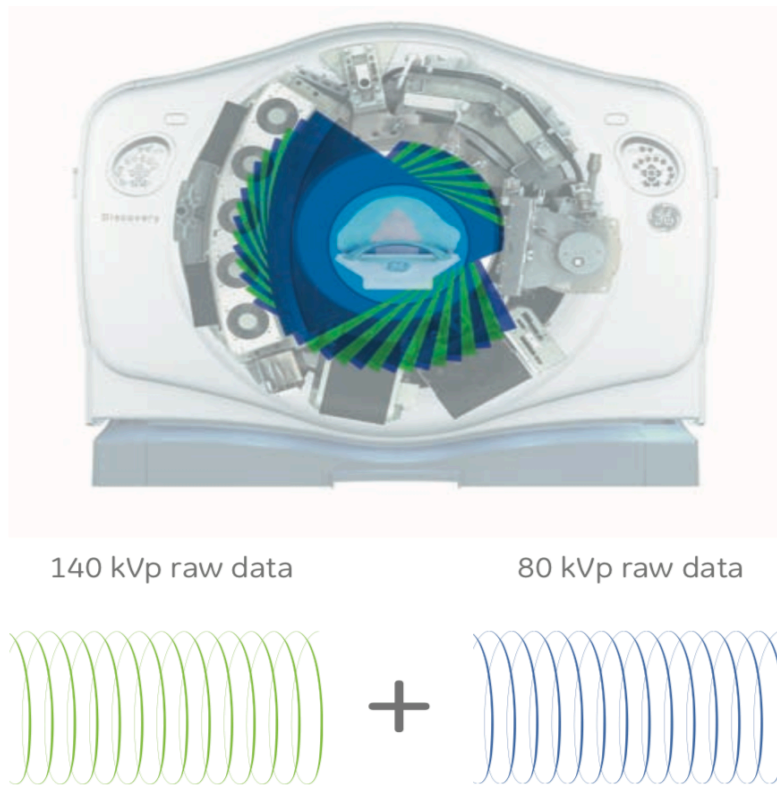


Fig. 2. *Fast kV switching: il potenziale del tubo a raggi X viene commutato rapidamente tra le scansioni successive. Per avere immagini di elevata qualità tecnica e risoluzione temporale, sono necessari detettori molto rapidi. Inoltre, il generatore di raggi X deve essere in grado di transizioni molto rapide tra i potenziali del tubo. (GE, Healthcare).*

Tuttavia, poiché lo stesso tubo a raggi X viene utilizzato sia per il set di dati a bassa che ad alta energia, è tecnicamente difficile ottimizzare la filtrazione spettrale sia per le immagini a bassa che ad alta energia e questo è stato reso possibile solo dai recenti progressi tecnologici. Infine, è necessario un campionamento dei dati molto rapido per evitare di ridurre la risoluzione spaziale nel piano successivo. L'intervallo di tempo molto breve tra le scansioni a bassa e alta energia (meno di 1 millisecondo) forniscono un'acquisizione quasi simultanea dei dati. La capacità della TC a doppia energia di scomporre un materiale nei suoi elementi costitutivi è dipendente dall'energia e dalla capacità dall'elemento di attenuare i raggi X. Nell'intervallo di energia diagnostica ($E=150$ keV), l'attenuazione dei raggi X per materia è principalmente dovuta all'effetto fotoelettrico e ai processi di scattering Compton. Modulando la dipendenza dei processi di interazione fotoelettrica e Compton sulla densità del materiale (ρ) e il numero atomico (Z), è possibile generare una mappa ρZ e ottenere informazioni specifiche sul materiale. Poiché l'attenuazione dei raggi X dipende

principalmente da questi due meccanismi di interazione, il coefficiente di attenuazione di qualsiasi materiale può essere espresso come una combinazione lineare dei coefficienti di attenuazione di due materiali di base [Lehmann LA, 1981].

Utilizzando le tecniche di scomposizione dei materiali, è possibile ottenere la densità, il numero atomico effettivo o altre informazioni specifiche del materiale in esame.

La TC a doppia energia si è presentata quindi come la tecnologia in ambito muscoloscheletrico in grado di combinare alcune delle capacità di imaging della risonanza magnetica con quelle della TC, insieme ad alcuni ulteriori recenti vantaggi. Con i progressi tecnologici in continuo avanzamento e lo sviluppo di nuovi software, l'utilizzo della TC-DE ha subito ulteriori enormi miglioramenti:

1. la disponibilità di acquisizione e ricostruzione di dati ad alta definizione HD-TC
2. la Gemstone Spectral Imaging (GSI) con dati monocromatici, per soppressione efficace degli artefatti metallici
3. il software di ricostruzione per la riduzione degli artefatti metallici (MAR)
4. i software di riduzione della dose (sistemi ASIR e VEO)

In particolare:

- lo **scanner HD** può acquisire 2,5 volte più visualizzazioni per rotazione rispetto a un tipico scanner TC (non HD). Ciò si traduce in una migliore risoluzione spaziale. La risoluzione spaziale delle immagini HD può arrivare fino a 230 micron (Fig.3), permettendo la valutazione delle singole trabecole ossee dell'osso spongioso.



Fig. 3. Immagini comparative della normale ricostruzione ossea di routine (A) e la scansione e la ricostruzione HD (B) mostrano una risoluzione spaziale migliorata con dettagli ossei nettamente incrementati nelle immagini dell'osso HD.

- La **“gemstone Spectral Imaging”** (GSI) è una nuova applicazione a doppia energia che si avvale della commutazione rapida dei kV per acquisire i campioni a doppia energia quasi contemporaneamente. In questo modo vengono acquisite informazioni sulla densità del materiale che possono essere usate per separare i materiali e derivare immagini spettrali monocromatiche tramite un algoritmo di ricostruzione basato su proiezioni.

Caratteristiche tecniche (Fig.4):

- Possibilità di scegliere tra 101 livelli di energia monocromatica per la visualizzazione delle immagini.
- Visualizzazione di immagini che riportano la densità del materiale e il numero atomico effettivo per individuare i diversi tessuti.
- Possibilità di utilizzare lo strumento di sovrapposizione delle immagini per fondere le informazioni relative al materiale con quelle relative al numero atomico effettivo in un'unica immagine monocromatica.

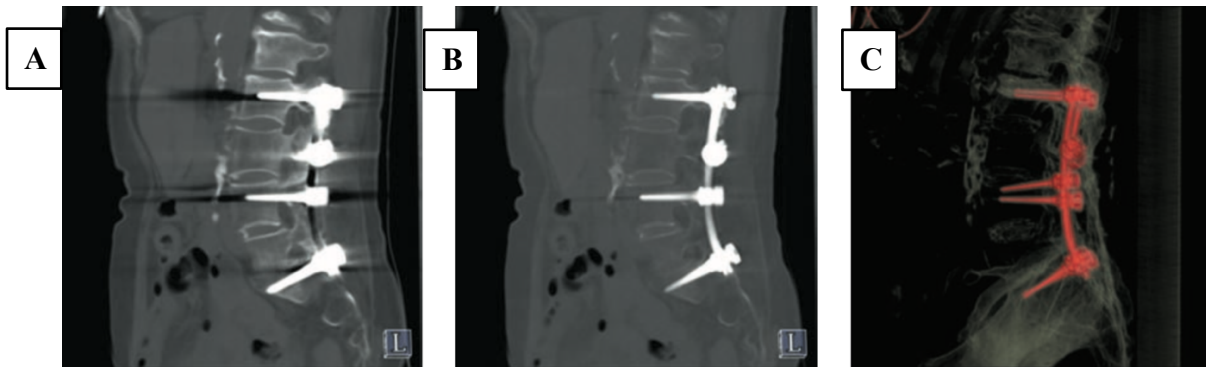


Fig.4. Immagini comparative di stabilizzazione vertebrale. Immagine A acquisizione standard. Immagine B acquisizione con TC-DE a 93 keV con abbattimento degli artefatti metallici. Immagine C ricostruzione 3D con sovrapposizione delle immagini e fusione delle informazioni in un'unica immagine monocromatica.

- **Riduzione della dose:**

Un altro dei più grandi progressi recenti della TC è stata l'introduzione di sistemi che riducessero la dose senza perdere qualità delle immagini. L'ASIR (adaptive statistical iterative reconstruction) è un sistema di riduzione della dose, caratterizzato dalla creazione di "maschere" dei dati statistici delle immagini, che sono continuamente modificati all'arrivare di nuove misurazioni. La densità dei pixel viene così aggiornata e modificata rispetto ai pixel vicini, e questa viene quindi ricalcolata in base al valore medio delle densità riscontrate nelle sottomatrici vicine. Si può decidere in percentuale quanto usare queste ricostruzioni (ad es. ASIR 40%) riducendo progressivamente la dose ma anche riducendo in parte la qualità delle immagini. Il Veo è un sistema successivo al ASIR, ancora più complesso da punto di vista fisico per ridurre la dose (questa tecnologia stabilisce nuovi standard nel rapporto tra qualità dell'immagine e riduzione della dose). Il sistema Veo può fornire informazioni diagnostiche utilizzando una dose radiante nettamente ridotta. (Fig.5)

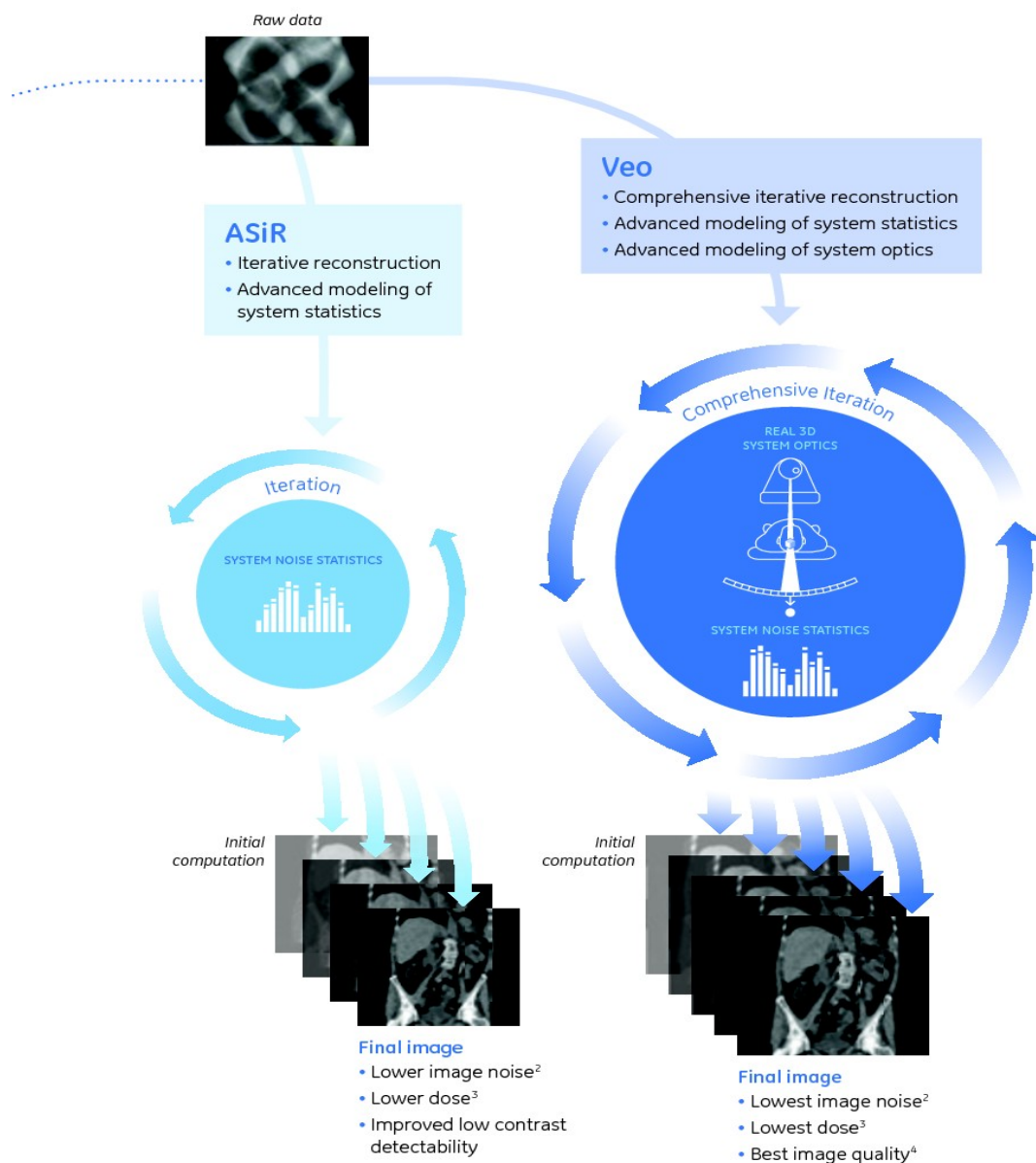


Fig. 5. Comparazione tra i due sistemi di riduzione della dose ASiR e VEO. (GE, Healthcare).

- Software riduzione artefatti (MAR)

Il software di riduzione degli artefatti metallici MAR (metal artifact reduction) è una tecnologia di correzione degli artefatti metallici che utilizza un processo automatizzato a tre fasi per migliorare la qualità dei dati TC. Questa correzione consente di ottenere immagini coerenti con l'immagine non corretta e di qualità eccellente. (Fig 6.) Il sistema presenta:

Fase uno: Vengono identificati i dati corrotti poiché coperti da artefatti metallici.

Fase due: I dati ricostruiti vengono generati sostituendo i dati coperti dalla presenza di metalli con i dati corretti.

Fase tre: L'immagine finale viene generata con un processo iterativo, mostrando dettagli delle parti anatomiche nascoste dagli artefatti.



Fig.6. Stabilizzazione di frattura mediante placca e viti metalliche. Fig. A acquisizione standard. Fig. B uso del software MAR.

1.3 La rigenerazione tissutale

Quando i tessuti o gli organi sono marcatamente danneggiati a causa di patologie, anomalie congenite o traumi, gli interventi clinici risolutivi per risolvere questi problemi sono l'impiego di organi artificiali sostitutivi o il trapianto di organi e tessuti. Un organo artificiale è un dispositivo meccanico progettato per sostituire o cooperare all'attività di un organo danneggiato, ma è caratterizzato da una bassa biocompatibilità [Langer and Vacanti 1995]. Il trapianto di organi ha come ostacoli la mancanza di organi donatori, la possibilità di rigetto e la necessità di terapia immunosoppressiva nel paziente trapiantato.

La medicina rigenerativa si propone di riparare o sostituire tessuti e organi danneggiati con l'intento di restituire l'integrità strutturale e funzionale del tessuto sano [Mao and Mooney 2015]. Il principio base dell'ingegneria tissutale è la creazione di un sostituto bioingegnerizzato che, sfruttando meccanismi fisiologici, riesca a ripristinare, mantenere,

migliorare o rigenerare totalmente le funzioni di tessuti o organi danneggiati (Vacanti and Vacanti 2000).

In generale, gli elementi fondamentali dell'ingegneria tissutale sono tre: *le cellule, gli scaffolds e i fattori di crescita* (Vacanti and Vacanti 2000; Ikada 2006; Costa et al. 2017) (Fig. 7). Le cellule sintetizzano la matrice del nuovo tessuto, gli scaffolds formano l'impalcatura tridimensionale (3D) che sostiene l'architettura cellulare ed infine i fattori di crescita facilitano e stimolano le cellule a rigenerare il nuovo tessuto. Tuttavia, esistono alcuni fattori critici, quali la scelta della sorgente cellulare, la modalità di semina e coltura delle cellule, la progettazione e la realizzazione dello scaffold, la valutazione della produzione della ECM e le proprietà meccaniche del costrutto formato dalle cellule e dal biomateriale.

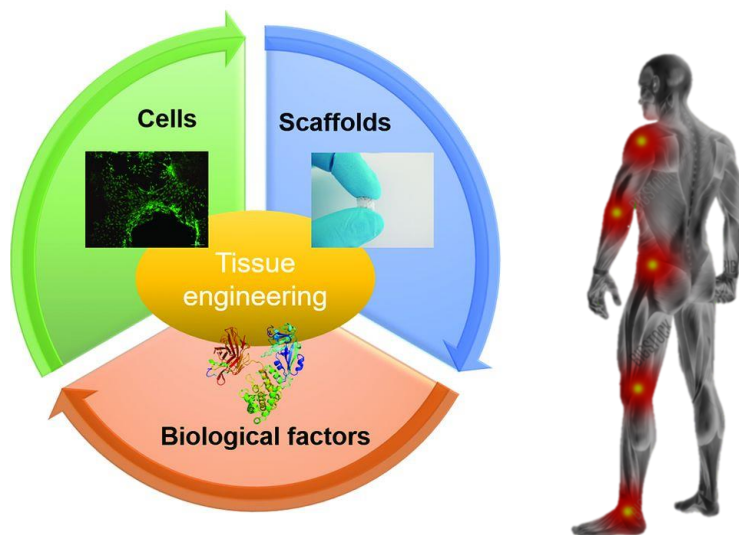


Fig. 7. Paradigma dell'ingegneria tissutale.

Nell'ingegneria dei tessuti, tre strategie sono usate per sostituire o indurre la formazione di nuovi tessuti (Khademhosseini et al. 2006):

- l'utilizzo di cellule;
- l'utilizzo di biomateriali biocompatibili e bioattivi;
- l'utilizzo della combinazione di cellule e biomateriali.

La prima strategia prevede l'utilizzo delle sole cellule che vengono iniettate direttamente nel sito del danno e con opportuni stimoli verranno indirizzate alla riparazione del tessuto danneggiato.

La seconda strategia, detta *in vivo*, prevede l'introduzione di una struttura tridimensionale nel sito danneggiato. Questa strategia si basa sul "*cell homing*", ovvero sulla capacità delle cellule staminali di essere reclutate verso il tessuto danneggiato, in seguito a opportune stimolazioni indotte dal materiale.

La terza strategia, detta *in vitro*, prevede l'impianto nel paziente di un assemblato tissutale (*scaffold*), realizzato e posto in coltura con cellule staminali fino al raggiungimento di un'adeguata proliferazione.

In generale, gli scaffolds sono il comune denominatore dell'ingegneria tissutale poiché devono supportare le cellule provenienti dal tessuto circostante nella strategia *in vivo* e supportare la proliferazione e l'adesione delle cellule nella strategia *in vitro*. In entrambi i casi, i costrutti devono avere caratteristiche idonee e compatibili con la crescita cellulare.

1.4 I biomateriali

I biomateriali sono ogni sostanza o combinazione di sostanze, diversa da un farmaco, di origine sintetica o naturale, che può essere impiegata per qualsiasi periodo di tempo, da sola o come parte di un sistema che tratta, aumenta o sostituisce un qualsiasi tessuto, organo o funzione del corpo. Secondo tale definizione si dovrebbero considerare come biomateriali tessuti e organi trapiantati, i materiali usati nei dispositivi biomedici e tutto ciò che viene utilizzato durante le procedure cliniche. I biomateriali sono stati classificati in diversi modi. La classificazione più immediata e generale fa riferimento alla natura chimica del materiale stesso. Si possono così distinguere *materiali metallici* e *materiali non metallici*. I primi vengono ulteriormente suddivisi in *ferrosi* e *non ferrosi*, mentre i secondi in *organici* e *inorganici*. Fra i materiali organici rivestono particolare importanza i *polimeri* (sia sintetici che di origine naturale), mentre fra quelli inorganici sono da menzionare i *materiali ceramici*.

I materiali metallici sono costituiti da uno o più elementi fra i quali ferro, rame, nichel, cromo, cobalto e titanio. I materiali metallici rappresentano quasi il 30% dei biomateriali impiegati in ambito biomedico. Principalmente vengono impiegati nella fabbricazione di protesi o

impianti per ortopedia, per odontoiatria, come parti di impianti compositi e nella realizzazione di strumenti chirurgici. I metalli maggiormente impiegati come biomateriali sono gli acciai inossidabili, le leghe di cobalto, il titanio e le sue leghe. Tuttavia, i metalli presentano problemi che riguardano la biocompatibilità in relazione a processi d'interfaccia osso-metallo e rilascio di ioni. Gli impianti a base metallica devono essere trattati per impedire l'insorgere di processi infiammatori. Inoltre, dal punto di vista dell'ingegneria tissutale, l'utilizzo di questi materiali è bassissima.

Ognuno dei biomateriali presenta caratteristiche peculiari che li rendono adatti a differenti applicazioni. I materiali maggiormente impiegati nella rigenerazione di tessuti con particolare attenzione alla rigenerazione ossea e cartilaginea sono: ceramici, polimeri sintetici e polimeri naturali.

I materiali ceramici rappresentano circa il 5% delle applicazioni biomediche e a questa categoria appartengono materiali come vetro, ossido di alluminio, ossido di zirconio e fosfato di calcio. Le applicazioni più diffuse riguardano gli impianti ortopedici e odontoiatrici e vengono anche ampiamente utilizzati come riempitivi di cavità ossee. Sono caratterizzati da elevata durezza, elevata resistenza alla temperatura, bassa elasticità ma anche da elevata fragilità. Dal punto di vista biologico, esprimono un'eccellente biocompatibilità grazie all'analogia formulazione chimica e strutturale rispetto al tessuto nativo osseo e favoriscono il differenziamento in senso osteogenico e la proliferazione degli osteoblasti.

I materiali compositi, che rappresentano il 15% dei biomateriali, sono costituiti da due o più tipi di materiali, ciascuno distinguibile in una separata fase. Pertanto, in un materiale composito è sempre possibile determinare la presenza di interfacce fra i diversi componenti. La particolarità dei materiali compositi è che la combinazione di più componenti permette di ottenere proprietà complessivamente migliori di quelle dei singoli costituenti.

L'ingegneria tissutale ossea ha visto largo interesse nello studio dell'idrossiapatite (HA) e del tri-calcio fosfato (TCP) in quanto presentano caratteristiche peculiari se impiegati come particolato di materiali compositi (Koutsopoulos 2002; Samavedi, Whittington, and Goldstein 2013; Wu et al. 2014; Hutmacher et al. 2007).

I materiali polimerici rappresentano il 45% dei biomateriali impiegati in ambito biomedico. Generalmente, sono formati da macromolecole formate dalla ripetizione, più o meno

regolare, di unità base, dette monomeri. I polimeri possono essere amorfi o parzialmente cristallini, presentano basse temperature di rammollimento, fusione e degradazione chimica. Le proprietà metalliche variano molto a seconda della struttura e della natura chimica delle macro-molecole. Essi permettono di realizzare architetture su misura con una velocità di degradazione controllabile. Tuttavia, la loro composizione può portare a fenomeni di rigetto a causa della ridotta bioattività. Inoltre, i fenomeni di degradazione tramite idrolisi può comportare il rilascio di diossido di carbonio (CO₂) con il conseguente innalzamento del pH locale, dannoso per le cellule e con conseguente necrosi del tessuto circostante (Vroman and Tighzert 2009).

Analizzando i fattori critici nell'utilizzo di polimeri sintetici, un materiale per essere impiegato nella rigenerazione tissutale deve subire una progressiva degradazione in prodotti che possono essere metabolizzati o eliminati dal corpo. Il tasso di degradazione è fondamentale in fase di valutazione, in quanto deve corrispondere al tasso di rigenerazione del tessuto sia per garantire l'integrità meccanica ed evitare danni al tessuto circostante, sia per permettere alle cellule di avere un ambiente idoneo alla proliferazione e al differenziamento. Tuttavia, la biodegradabilità può essere adattata alle esigenze modificando diversi parametri chimici e fisici del singolo materiale, quali la composizione, il peso molecolare e la cristallinità. Inoltre, il processo di degradazione è influenzato da alcuni parametri come la temperatura, il pH ed il carico meccanico a cui la struttura è sottoposta in ambito fisiologico.

Diversi polimeri sintetici non biodegradabili sono frequentemente utilizzati in applicazioni di ingegneria tissutale per differenti tessuti, ad esempio, in campo ortopedico per la rigenerazione della cartilagine l'alcol polivinilico (PVA), il poliammide (PA) e il poli-N-isopropilacrilammide (PNIPAm), mentre per l'osso il polietilene (PE) e il polietilentereftalato (PET).

I polimeri naturali

Grande spazio va riservato ai materiali di origine naturale anche se rappresentano circa il 5% dei biomateriali. Essi presentano un'eccellente biocompatibilità, promuovono l'adesione e la crescita cellulare e stimolano le cellule a produrre la ECM e rimpiazzare lo scaffold degradato. Tuttavia, presentano proprietà meccaniche ridotte.

Tra i principali biomateriali naturali impiegati nella rigenerazione tissutale troviamo:

- Collagene
- Gelatina
- Fibroina della seta

Collagene

Il collagene è la proteina principale presente nei tessuti connettivi animali. Il collagene subisce degradazione enzimatica e possiede importanti proprietà biologiche se usato come biomateriale naturale (Vroman and Tighzert 2009). Il collagene è presente per l'89% nella ECM e per il 32% nella composizione dell'osso sia corticale che spongioso. Per questo è uno dei candidati più idonei ad essere impiegato nell'ingegneria tissutale ossea. La proteina presenta performance biologiche eccellenti in quanto favorisce l'ancoraggio, la crescita e la proliferazione cellulare, bassa immunogenicità e favorisce la cicatrizzazione e la coagulazione del sangue (Doillon et al. 1986). Tuttavia, scaffolds a base di solo collagene evidenziano insufficienti proprietà meccaniche necessarie per mimare la struttura dell'osso, ottenendo valori di rigidità inferiori a quella dell'osso (Al-Munajjed and O'Brien 2009).

Per incrementare definitivamente la rigidità e migliorare anche la biocompatibilità dei costrutti a base di collagene, viene impiegato questo materiale in unione all'HA e al TCP. Normalmente, il collagene è impiegato sotto forma di granuli, membrane, film, idrogel, spugne e nano-particelle per rilasciare farmaci, proteine o geni; per il trattamento di infezioni locali; per il trattamento di ulcere, ferite o bruciature. È impiegato anche come agente emostatico o materiale da sutura.

Gelatina

Dalla denaturazione e/o degradazione fisico-chimica del collagene viene prodotta la gelatina, un polipeptide ad alto peso molecolare. Le proprietà meccaniche dei prodotti a base di gelatina dipendono dalle caratteristiche fisiche e chimiche della materia prima. (Vroman and Tighzert 2009). La gelatina è reperibile a basso costo dal derma bovino, dalla pelle suina o dalle loro ossa. La proteina risultante è biocompatibile, biodegradabile, non mostra una risposta immunogenica ed è solubile in acqua. Allo stato naturale, la gelatina è una proteina che presenta proprietà non idonee a supportare la rigenerazione di un tessuto.

Combinare la gelatina con altri materiali incrementa le sue proprietà fisiche, meccaniche e strutturali. Infatti, mimare le caratteristiche della ECM è vantaggioso per il successo della rigenerazione del tessuto danneggiato. Una possibile soluzione è la fabbricazione di scaffolds compositi a base di nano-fibre di gelatina e HA per mimare l'architettura fisica e la composizione chimica della ECM ossea. Questi scaffolds esibiscono una maggiore area superficiale, eccellente biocompatibilità e proprietà meccaniche elevate. Inoltre, incrementano l'ancoraggio, la proliferazione e il differenziamento delle cellule pre-osteoblastiche. (Holzwarth and Ma 2011).

Fibroina della seta

La fibroina di seta è un polimero naturale che viene estratto dai bozzoli del *Bombyx mori*, baco della seta originario dell'India e della Cina. Negli ultimi anni, questo materiale è stato oggetto di numerosi studi in quanto riconosciuto dalla "US Food and Drug Administration" (FDA) come biomateriale a tutti gli effetti già dal 1993. Storicamente, la seta del *Bombyx mori* è stata apprezzata, in campo medico, come materiale di sutura ma ha registrato un crescente interesse anche nell'ingegneria tissutale ossea e cartilaginea. Infatti, presenta proprietà ottime in termini di biocompatibilità, velocità di degradazione, supporto meccanico, fisico e strutturale alle cellule staminali mesenchimali impiegate nella differenziazione in senso condrogenico e osteogenico (Melke et al. 2016a).

La fibra della seta è costituita da filamenti di una proteina fibrosa, detta fibroina, rivestiti da una matrice a base di sericina che le tiene unite insieme (Altman et al. 2003; Sutherland et al. 2009). In Fig. 8 è possibile osservare sia le fibre di seta in cui è presente la sericina.

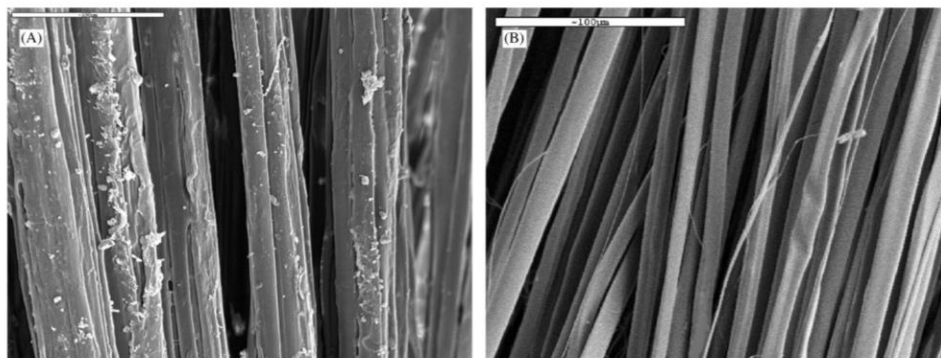


Fig. 8. A) immagine SEM della seta del *Bombyx mori* in cui è presente la glicoproteina adesiva (sericina) che ricopre la fibroina; B) immagine SEM della fibroina di seta privata della sericina. Immagini estratte da Altman et al. 2003.

Per le applicazioni mediche è richiesta la rimozione della componente glicoproteica adesiva (sericina) dalla proteina core seguendo una corretta procedura di estrazione, allo scopo di ridurre notevolmente la risposta immunitaria e aumentare le proprietà meccaniche (Rockwood et al. 2011). Infatti, dal punto di vista meccanico sono stati evidenziati valori riconducibili a quelli dell'osso (Pérez-Rigueiro et al. 2002).

Da un punto di vista biologico, è stato dimostrato che la fibroina della seta è un materiale biocompatibile (Cao and Wang 2009) e favorisce l'adesione, la crescita e il differenziamento cellulare (Minoura et al. 1995). Inoltre, durante la formazione del nuovo tessuto, la seta presenta una velocità di degradazione della struttura β -sheet controllata e non tossica in quanto il rilascio e il riassorbimento degli aminoacidi, sia *in vivo* che *in vitro*, è biocompatibile (Li, Ogiso, and Minoura 2003).

In letteratura sono presenti molti studi sull'ancoraggio, sulla proliferazione, la crescita e il differenziamento delle cellule messe a contatto con la fibroina della seta. Le immagini, ottenute dopo 5 minuti, 1 ora, 7 giorni e 40 giorni dalla semina cellulare hanno evidenziato un sorprendente ancoraggio (Fig. 8.A e 8.B) e la produzione di ECM (Fig. 4.C e 4.D) (Altman et al. 2003).

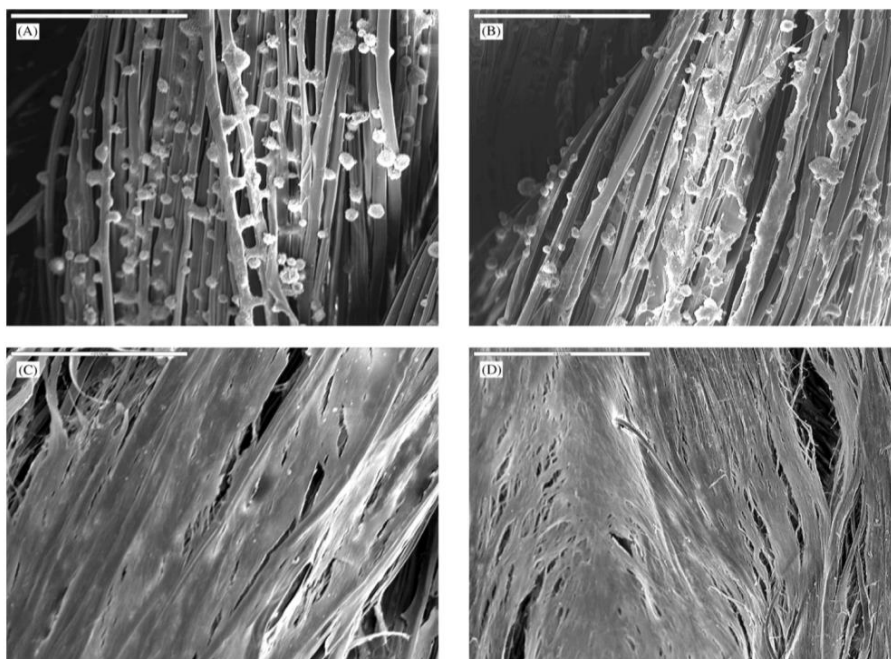


Fig. 8. A) Iniziale ancoraggio delle BMSCs sulle fibre di seta dopo 5 minuti dalla semina; B) iniziale espansione dopo 1 ora dalla semina; C) evidente formazione di uno strato di ECM dopo 7 giorni; D) spesso strato di ECM presente dopo 14 giorni dalla semina cellulare. Immagine estratta da Altman et al. 2003.

Importante rilievo è stato dato alle differenze tra la seta prodotta da animali e quella raccolta dalla pianta. In particolare, è stato mostrato che la seta prodotta da ragni o dal baco della seta ha proprietà superiori in termini di osteoinduttività (capacità di stimolare i progenitori cellulari a differenziare in osteoblasti e a produrre matrice mineralizzata specifica per il tessuto osseo in formazione) (Sahu et al. 2015). L'osteointegrazione è una caratteristica imprescindibile nella rigenerazione del tessuto specifico. Essa è stata valutata nei ratti (Melke et al. 2016) utilizzando un costrutto poroso a base di fibroina di seta: lo scaffold ha esibito un'architettura con un'organizzazione che è comparabile con l'osso trabecolare e corticale e ha facilitato l'osteogenesi nel sito del danno. La fibroina di seta crea così un sofisticato modello per la rigenerazione tissutale utile allo studio della mineralizzazione della ECM, al riassorbimento di minerali, alla vascolarizzazione e alla differenziazione in senso osteogenico delle MSCs (Melke et al. 2016b). Inoltre, è stato dimostrato che costrutti di fibroina di seta possono in parte mimare il collagene di tipo I dell'osso sano e servire come riempimento per la riparazione e/o la rigenerazione del danno (Midha et al. 2016).

È stato inoltre dimostrato che la fibroina di seta, arricchita con il peptide RGD, induce la crescita del tessuto osseo *in vitro*, quando seminata con cellule già differenziate (osteoblasti) (Altman et al. 2003). La sequenza di riconoscimento RGD (Arg-Gly-Asp) promuove le interazioni delle integrine per l'adesione cellulare e induce la formazione dell'osso. Si è pensato quindi di combinare la fibroina di seta con un biomateriale ricco di questo peptide come la gelatina.

La combinazione di seta e gelatina favorisce il differenziamento dei progenitori mesenchimali in senso condrogenico e la soppressione del differenziamento ipertrofico. Infatti, un confronto con il "gold standard" rappresentato dagli sferoidi funzionalizzati con MSCs, evidenzia che i costrutti tridimensionali a base di seta e gelatina inducono le cellule a esprimere il fattore di trascrizione della cartilagine (Altman et al. 2003).

Ne consegue che nell'ingegneria tissutale, la seta, assieme anche alla gelatina, rappresentano un'alternativa valida ai biomateriali sintetici impiegati comunemente nella realizzazione di scaffolds per la formazione di tessuto osseo e cartilagineo.

1.5 Le cellule

Le cellule, che rappresentano le attrici della rigenerazione tissutale, possono essere classificate in cellule autologhe, cellule allogeniche e cellule xenogeniche. Le cellule autologhe, prelevate dal paziente stesso, sono le più appropriate per la rigenerazione tissutale in quanto la loro attività rimane elevata e non comportano reazioni immunologiche. Il problema principale risiede nella raccolta di un numero sufficiente di cellule, soprattutto in pazienti anziani, che richiede la necessità di condurre l'espansione in coltura cellulare. Le cellule allogeniche provengono da un secondo individuo donatore diverso dal paziente. Necessitano di terapia immunosoppressiva per poter ingegnerizzare il tessuto in quanto possono dare origine a reazioni immunologiche. L'ultima sorgente cellulare (cellule xenogeniche) ha origine animale e per questo motivo il rischio di infezioni virali è elevato (Ikada 2006).

Negli ultimi anni, l'impiego di cellule staminali ha riscosso un grande successo nella medicina rigenerativa. Le cellule staminali, grazie alle loro proprietà, sono la sorgente cellulare più adatta alla rigenerazione tissutale. Esse possono colonizzare gli scaffolds, differenziarsi, crescere e costituire il tessuto *ex-novo* che andrà a integrarsi con quello circostante. Le due caratteristiche fondamentali delle cellule staminali sono l'auto-rinnovamento e la potenza. L'auto-rinnovamento è la capacità di andare incontro a numerosi cicli di divisione cellulare mantenendosi in uno stato differenziato, mentre la potenza è la capacità di differenziarsi in diversi tipi cellulari. Nell'uomo adulto, la sorgente principale di questo tipo di cellule risiede nel midollo osseo che è l'unico organo in cui due diverse sorgenti cellulari, sistema emopoietico e componente stromale, coesistono e cooperano funzionalmente. L'interazione avviene in modo bidirezionale tramite contatto intercellulare, interazioni cellula-matrice e tramite la secrezione e l'azione di citochine e fattori di crescita (Bianco et al. 2001; Van Damme et al. 2002). In particolare, le cellule provenienti dal midollo osseo sono cellule staminali ematopoietiche (HSCs) e cellule staminali/stromali mesenchimali (MSCs). Le linee eritroidi, mieloidi e linfoidi compongono il sistema ematopoietico e danno origine alle cellule del sangue e del sistema immunitario. Le cellule stromali svolgono importanti funzioni quali la creazione di nicchie per l'emopoiesi, la produzione di citochine, fattori di crescita, molecole di adesione e ECM: differenziano in osteociti, condrociti, adipociti, fibroblasti, miociti, cellule endoteliali, neuronali e reticolari, epatociti e tenociti (Kotobuki et al. 2004; Bordignon et al. 1999). La localizzazione delle

MSCs non è comunque circoscritta al midollo osseo, ma sembra essere diffusa in diversi tessuti del corpo umano adulto. Le altre fonti di cellule mesenchimali sono il tessuto adiposo, l'osso trabecolare, il periostio, la membrana sinoviale, il muscolo, la cute e il sangue (Tuan, Boland, and Tuli 2002).

Le cellule staminali mesenchimali e il loro differenziamento

Le MSCs sono state studiate approfonditamente in quanto presentano numerosi vantaggi nel loro utilizzo: semplicità di isolamento, coltura ed espansione, mantenimento del potenziale replicativo anche per diversi passaggi e l'assenza di problemi etici che esistono nell'uso delle cellule staminali embrionali. Queste cellule possono differenziare in tutti i tipi cellulari e rappresentano la sorgente principale per indurre condrogenesi e osteogenesi, in quanto possiedono un potere di differenziamento superiore rispetto alle cellule terminalmente differenziate. Quando combinate con i fattori di crescita e le citochine, le quali promuovono la differenziazione, le cellule staminali sono le candidate ideali per lo sviluppo della rigenerazione tissutale.

Le MSCs, insieme alle altre cellule staminali adulte, costituiscono una riserva di cellule riparative: infatti in seguito ad una lesione nella quale si instaurano i processi infiammatori adatti per il richiamo di progenitori, queste cellule migrano verso di essa e differenziano nel tipo cellulare tessuto-specifico favorendo la rigenerazione e creando le condizioni che incentivano le cellule endogene al riparo (Conrad and Huss 2000; Herzog, Chai, and Krause 2003). Le MSCs sono una popolazione di cellule normalmente quiescenti ma che, in seguito a opportuni stimoli *in vitro* e *in vivo*, sanno proliferare e differenziarsi in colonie simil-cartilaginee o simil-ossee (Minguell, Conget, and Erices 2000).

Differenziamento osteogenico delle MSCs

Il differenziamento delle cellule staminali mesenchimali in senso osteogenico avviene trattando le cellule con dexametasone, β -glicerfosfato, acido ascorbico o con specifici fattori quali le Bone Morphogenetic Proteins (BMPs). In queste condizioni, la coltura cellulare aumenta di dimensioni formando aggregati o noduli e incrementa la produzione di fosfatasi. Le cellule, durante questa delicata fase, iniziano ad accumulare sempre più calcio e a deporre ECM di idrossiapatite mineralizzata. Vengono, inoltre, espressi altri marcatori osteogenici quali l'osteopontina, l'osteocalcina e il collagene di tipo I (Xiao, Xiang, and Shao 2007).

1.6 I fattori di crescita

L'ingegnerizzazione di tessuti prevede l'utilizzo di proteine che giocano un ruolo chiave nella proliferazione e differenziazione delle cellule. Queste proteine, chiamate fattori di crescita (*Growth Factor*, GF), sono secrete in maniera endogena nel corpo dalle cellule stesse (autocrine) o come risultato della comunicazione con le cellule circostanti (paracrine). I fattori di crescita che sono frequentemente impiegati nell'ingegnerizzazione per indurre la formazione della cartilagine e dell'osso sono il Trasforming Growth Factor- β (TGF- β) e le Bone Morphogenetic Proteins (BMPs).

Il problema principale nell'utilizzo dei fattori di crescita è legato alla modalità di trasporto nel sito interessato, poiché l'iniezione di un bolo costituito da fattori di crescita in soluzione non è significativamente efficace: le molecole si allontanano repentinamente dal sito del danno. Tuttavia, sono disponibili tre metodi per risolvere questo inconveniente. Il primo utilizza il DNA plasmide che codifica il gene del fattore di crescita desiderato e lo fa produrre dalle cellule a cui viene in contatto; il secondo metodo consiste nel trasferire il gene codificante di un certo fattore di crescita in uno specifico tipo di cellula che verrà impiantata nel corpo; la terza tipologia di trasporto prevede l'utilizzo diretto del fattore di crescita attraverso un vettore di trasporto (Ikada 2006). L'ultimo approccio ha visto un largo consenso nella ricerca. I requisiti nella scelta del vettore sono di indurre la denaturazione delle molecole del fattore di crescita in misura minima durante la loro incorporazione o intrappolamento così da facilitare il rilascio ottimale e l'assorbimento nel corpo. I vettori impiegati più frequentemente sono il collagene e la gelatina, sottoprodotto del collagene stesso.

1.7 Gli scaffolds

Coadiuvati dal progresso delle tecnologie di fabbricazione e della scienza dei materiali, gli scaffolds hanno subito un importante sviluppo all'interno della ricerca dell'ingegneria tissutale. La definizione di scaffold comprende tutti i costrutti con un'architettura capace di favorire la formazione del nuovo tessuto, attraverso l'adesione e la proliferazione delle cellule. Intuitivamente, lo scaffold migliore per un tessuto ingegnerizzato dovrebbe essere la ECM stessa del tessuto nel suo stato nativo (Chan and Leong 2008).

2. Materiali e metodi

2.1 Task 1. Dual energy CT data acquisition

Inizialmente sono stati scansionati 10 pezzi anatomici da cadaveri (ossa e tessuti molli) per definire i parametri TC utili alla standardizzazione e al successivo utilizzo sul paziente della macchina TC-DE (Discovery 750 HD, GE). Sono stati raccolti i dati di milliamperaggio (mAs), kilovoltaggio (Kv), rapporto segnale/rumore, tempo di rotazione, pitch, il numero di detettori utilizzati, la lunghezza della scansione, tutti dati che modificano la qualità dell'immagine e la dose assorbita del paziente (Fig. 9).

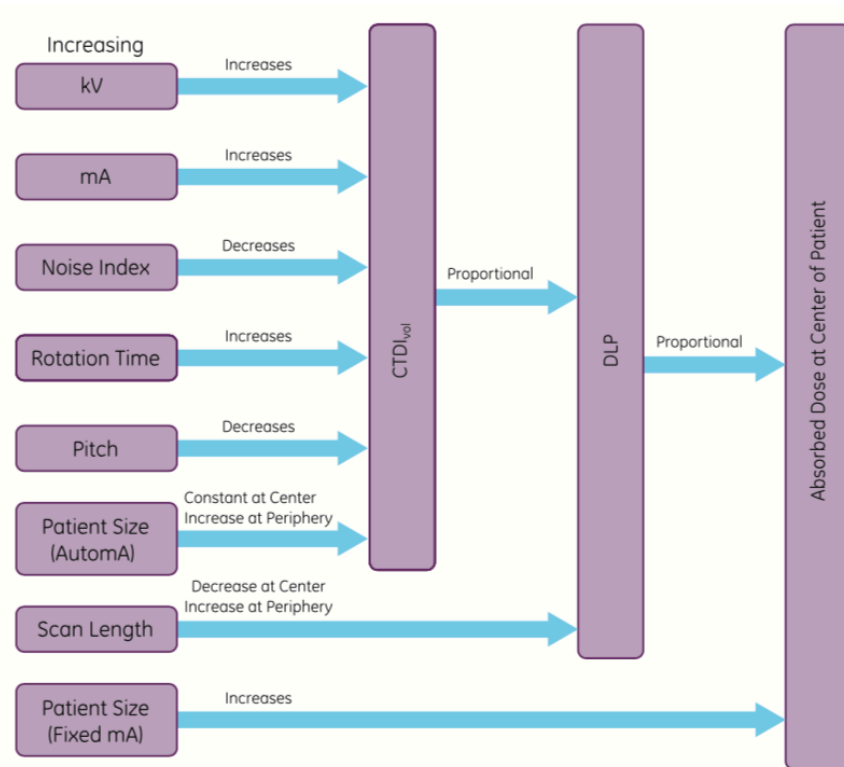


Fig.9. Parametri che modificano la qualità dell'immagine e la dose assorbita dal paziente.

Dal momento che le pseudoartrosi sono normalmente stabilizzate con mezzi di sintesi (mezzi di sintesi interni – chiodi o viti / esterni – Ilizarov) in quanto considerate alterazioni non stabili meccanicamente, si è dunque deciso di analizzare anche la riduzione degli artefatti dati dai mezzi di sintesi metallici presenti nel volume di scansione. Si sono valutati anche pezzi anatomici che portassero protesi metalliche. Sono state stati raccolti i dati riguardo i materiali di fabbricazione (titanio o cromo-cobalto) per poter analizzare con il sistema GSI quali fossero i migliori livelli energetici per ridurre gli artefatti che limitavano la

valutazione del difetto osseo nel sito di frattura esitato in pseudoartrosi. Sono state effettuate diverse scansioni con diversi picchi energetici con differenti keV (sistema GSI).

Successivamente sono stati analizzati i sistemi di riduzione di dose (VEO e ASIR) per poterli applicare sul paziente senza perdere qualità delle immagini. La dose è stata valutata come valore di DLP (mGy-cm). (Fig. 10).

Dose Information				
Unrecognized tube - Dose may vary				
Images	CTDIvol mGy	DLP mGy-cm	Dose Eff. %	Phantom cm
1-54	10.81	356.74	94.94	Body 32
Projected series DLP:		356.74	mGy · cm	
Accumulated exam DLP:		0.00	mGy · cm	

Fig.10. Schermata riassuntiva della scansione con i relativi valori di dose assorbita dal paziente (DLP finale).

Sono state fatte anche ricostruzioni post-acquisizione mediante l'utilizzo del software MAR per la riduzione degli artefatti.

Sono stati successivamente eseguite due scansioni su due pazienti affetti da frattura evoluta in pseudoartrosi per verificare in vivo i parametri studiati sui pezzi anatomici.

2.2 Task 2. Computer-aided images elaborations and 3D-Bioprinter patient-specific 3D printed scaffold

Le immagini TC-DE ottenute sono state importate in formato DICOM in un software dedicato per la visualizzazione, segmentazione e processazione d'immagini per riprodurre l'anatomia esatta del tessuto osseo mancante. Sono state trasferite le prime immagini ottenute con il software ad un Bioplotter 3D che ha permesso la stampa di uno scaffold 3D che ben riproduceva il tessuto osseo originale.

Costrutti a base di calcio fosfato

Inizialmente sono stati sintetizzati prototipi di scaffolds con un biomateriale di prima generazione a base di calcio fosfato e matrice extracellulare (Osteoink, RegenHu), con diverse dimensioni dei pori (300, 400, 500 μm). Su questi costrutti sono state valutate la micro-architettura ed effettuati i test meccanici.

Estrazione della fibroina di seta

Al fine di ottenere una soluzione a base di fibroina di seta partendo dai bozzoli del *Bombyx mori*, è stato seguito il protocollo di estrazione già consolidato in letteratura da Rockwood (Rockwood et al. 2011). Questa procedura ha permesso di ottenere una sospensione di fibre di seta a cui è stata rimossa la sericina, che causa l'adesione tra le stesse.

Sospensione delle fibre di seta in bromuro di litio

Le fibre essiccate sono state frammentate manualmente e pesate. Successivamente, sono state risospese in una soluzione di bromuro di litio (LiBr) in acqua ultrapura per 4 ore per favorire la reazione esotermica che permettesse di dissolvere completamente le fibre.

Al termine della reazione si è ottenuta una soluzione di fibroina di seta ambrata, indice dell'avvenuto discioglimento delle fibre. Durante il processo si sono distinte due fasi: una parte superiore della soluzione più chiara, della consistenza di una schiuma, rappresentata dalla parte di fibre non ancora disciolte, e una parte inferiore più scura, rappresentata dalle fibre completamente disciolte.

Dialisi della fibroina di seta

La soluzione ottenuta dai precedenti passaggi è stata successivamente sottoposta ad una procedura di dialisi necessaria per eliminare il LiBr dal materiale. Una volta terminata la fase di dialisi, il materiale è stato estratto utilizzando una siringa e conservato in una provetta a 4°C per circa 15 giorni. Oltre tale tempo, il materiale va incontro a degradazione naturale e non può essere più utilizzabile.

Selezione della percentuale di calcio

La concentrazione di cloruro di calcio (CaCl_2) è stata scelta conducendo prove di differenziamento osteogenico su colture cellulari 2D di MSCs in presenza di diverse

concentrazioni del medesimo. I valori aggiunti alle piastre di Petri sono stati scelti basandosi su uno studio preliminare del gruppo italiano (Gabusi et al. 2012).

Preparazione dei bioink

Si è proceduto alla preparazione di due formulazioni di bioink (Fig. 11), con e senza CaCl₂, da utilizzare per il 3D bioprinting degli scaffold.

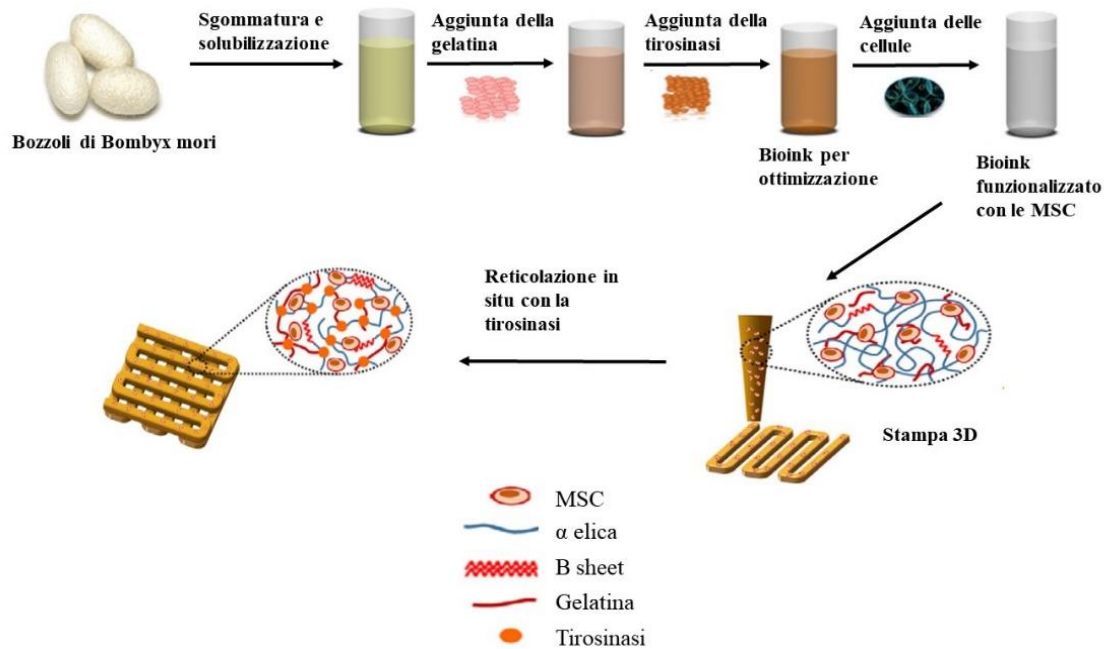


Fig. 11. Preparazione del bioink funzionalizzato con le MSCs. Immagine riadattata da Rockwood et al. 2011.

Bioink 1: Seta – Gelatina - Tirosinasi (SeGeTi)

Il bioink SeGeTi composto da 5% (5 g/100 ml) di fibroina di seta e 5% di gelatina è stato preparato in un volume finale di 1.5 ml. La preparazione è avvenuta in condizioni sterili e mantenendo i reagenti a 37°C. Sono stati aggiunti 1200 μ l di fibroina di seta (5%) a 75 mg di gelatina (5%) e il composto ottenuto è stato posto in bagno a 37°C per 30 minuti e successivamente in incubatore per 5 minuti a 37°C fino all'ottenimento di una soluzione limpida. A questa sono stati aggiunti 150 μ l di D-MEM (10x) e 150 μ l di FBS (10%) ed è stata posta in incubatore a 37°C per ottenere una soluzione omogenea. Successivamente, sono stati aggiunti 21.5 μ l di Tirosinasi (430 U / 1.5 ml). La stampa è iniziata dopo 20 minuti dall'aggiunta dell'enzima.

Bioink 2: Seta – Gelatina -Tirosinasi_CaCl₂ (SeGeTi_CaCl₂)

La seconda formulazione preparata (5% fibroina di seta – 5% gelatina – 2.6 mM CaCl₂) in un volume finale di 1.5 ml. Per questa formulazione, prima di aggiungere 21.5 µl di Tirosinasi (430 U / 1.5 ml), sono stati aggiunti 0.42 mg di CaCl₂ per ottenere una concentrazione finale di 2.6 mM in 1.5 ml. Una volta valutata l'effettiva omogeneità della soluzione, la stampa è iniziata dopo 20 minuti dall'aggiunta dell'enzima.

Caratterizzazione reologica

Prove al reometro

Le prove reologiche valutano la risposta del campione in termini di stress meccanici: shear rate ($\dot{\gamma}$, velocità di rotazione) o strain (γ , ampiezza di oscillazione) dopo aver applicato uno sforzo. Tali valutazioni permettono di misurare i parametri viscoelastici e la viscosità di un materiale in diverse condizioni.

La prima prova è stata eseguita variando la deformazione (γ) nel range [0.1:100]% e mantenendo costante la frequenza (f) pari a 1 Hz, in condizioni di controllo dello spostamento (CD).

La seconda prova è stata eseguita variando la frequenza nel range [1:100] Hz e mantenendo costante la deformazione.

Design dello scaffold

La complessità del modello umano relativo alla patologia non ha consentito un'immediata traslazione sulla stampante 3D dei dati derivati dalla TC dual-energy, per realizzare uno scaffold che fosse identico alla struttura ossea di partenza. Si è dunque scelto di proseguire le analisi utilizzando un modello totalmente nuovo ma con una struttura semplice, le cui caratteristiche fossero successivamente facilmente adattabili a strutture più complesse quali quelle anatomiche in vivo.

Si è dunque realizzato uno scaffold, sviluppato tramite software RoboCAD v.4, che presentava una base quadrata di dimensione 4mm x 4mm (lunghezza x larghezza) e un'altezza di circa 0.32 mm ottenuta attraverso la ripetizione di 8 layer. Le strutture erano caratterizzate da un pattern di deposizione di filamenti con orientamento a 0° e 90° e una distanza inter-filamento (distanza tra il centro di due filamenti consecutivi) di 750 µm. (Fig. 12).

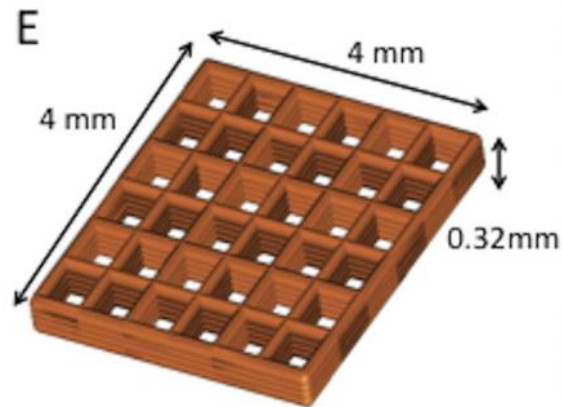


Fig. 12. Design 3D dello scaffold. Sulla base di questa configurazione (Chawla et al. 2017), già consolidata in letteratura, si è deciso di effettuare alcune modifiche. Il design dello scaffold è stato ottenuto tramite il software BioCAD© (RegenHU, Villaz-St-Pierre, CH) distribuito direttamente dall'azienda produttrice della stampante 3D DiscoveryTM (RegenHU) impiegata in questo studio. Lo scaffold è stato modellato con base di dimensioni 5mmx5mm (lunghezza x larghezza). Il pattern interno di deposizione è stato disegnato alternando sempre filamenti paralleli con un orientamento a 0° e 90° ma con una distanza inter-filamento pari a 1000 µm.

Inoltre, si è scelto di stampare una struttura che avesse 10 layer (5 verticali e 5 orizzontali). La rappresentazione 3D, mostrata in Fig.13, è stata caricata nella stampante 3D DiscoveryTM (RegenHU).

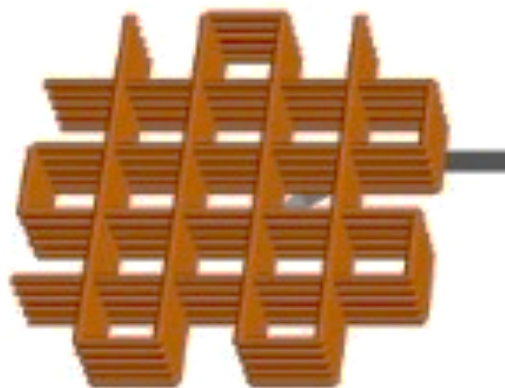


Fig. 13. Immagine 3D dello scaffold.

Ottimizzazione dei parametri di stampa

La prima fase di stampa del bioink SeGeTi è stata fondamentale per individuare la combinazione migliore dei parametri di stampa che portasse alla deposizione controllabile dei filamenti di materiale ed alla realizzazione di strutture con una porosità significativa, così da consentire alle cellule di trovare un ambiente idoneo alla loro crescita, proliferazione e differenziazione.

Parametri di processo

Alla luce dei precedenti studi reologici sul bioink è risultato necessario monitorare la temperatura ambiente durante la stampa così da riprodurre le condizioni ottimali di gelificazione (*cross-linking*) del bioink a seguito dell'attività dell'enzima tirosinasi nel tempo. La temperatura ambiente, pertanto, è stata mantenuta a $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

La stampa delle strutture è stata condotta utilizzando un ago cilindrico di acciaio con un diametro interno di 200 μm .

I test per selezionare i parametri di stampa sono stati condotti valutando la fedeltà tra il modello CAD impostato a priori e le strutture ottenute. In particolare, tale fedeltà è stata misurata rispetto alla distanza inter-filamento del pattern interno di deposizione dei filamenti: le strutture avrebbe dovuto possedere pori con un diametro pari alla differenza tra la distanza inter-filamento stessa e la larghezza del filamento deposto. Nel caso in oggetto, con una distanza inter-filamento impostata a 1000 μm , considerando un filamento largo quanto il diametro dell'ago conico (200 μm), il diametro dei pori risultante avrebbe dovuto essere di 800 μm (1000-200 μm).

Sono stati successivamente analizzati microscopicamente i campioni prodotti utilizzando il microscopio ottico "Nikon Eclipse 90i". Per ogni immagine, calibrata in base all'ingrandimento usato, sono stati misurati la larghezza del filamento deposto ed il diametro dei pori. Su questi valori sono state calcolate la media e la deviazione standard di ogni campione e rappresentati in grafici a istogrammi sovrapposti, per evidenziare il discostamento della distanza inter-filamento ottenuta rispetto al campione di riferimento (modello CAD).

2.3 Task 3. In vitro evaluation of 3D printed scaffold

Isolamento delle cellule mesenchimali

Le cellule mesenchimali umane, che sono state incapsulate nei bioink SeGeTi e SeGeTi_CaCl₂, sono state ricavate da aspirato midollare da cresta iliaca. L'isolamento delle cellule mesenchimali è stato effettuato diluendo il midollo osseo in soluzione fisiologica in un rapporto di 1:8. Le cellule mononucleate sono state separate utilizzando il gradiente di densità Ficoll (Lympholyte – H CL5015) che ha prodotto, dopo centrifugazione a 1300xg per 20 minuti a temperatura ambiente, una stratificazione nella quale si potevano distinguere, dall'alto verso il basso: cellule del tessuto adiposo midollare, terreno di espansione in cui è stato risospeso il midollo, anello di cellule midollari mononucleate, strato di Ficoll e pellet di globuli rossi. Sono state raccolte le cellule mononucleate nel quale sono presenti anche i precursori stromali delle cellule mesenchimali. Per la conta cellulare, è stata utilizzata la soluzione di Turk, che colora le cellule nucleate, e una camera contaglobuli di tipo Neubauer. Una volta raggiunta la confluenza, sono state espanse per ottenere un numero elevato di cellule da inglobare nei bioink preventivamente preparati e sterilizzati in autoclave.

Differenziamento osteogenico in bioink SeGeTi + MSCs

Il primo esperimento effettuato ha previsto l'utilizzo del bioink SeGeTi nel quale sono state incluse 10x10⁶ cellule all'interno del bioink, ottenendo un volume finale pari a 1.5 ml.

Gli scaffolds ottenuti sono stati trasferiti in piastre 24 well non aderenti e il differenziamento osteogenico è stato indotto utilizzando un medium di coltura costituito da D-MEM integrato con 10% FBS, 10 mM β-glicerofosfato, 0.1 mM dexametasone e 50 mM di acido ascorbico. I biomateriali caricati con le cellule sono stati incubati a 37°C e 5% CO₂ e valutati al giorno 1, 14 e 21. Il terreno di coltura è stato cambiato due volte alla settimana.

Differenziamento osteogenico in bioink SeGeTi_CaCl₂ + MSCs

Nel secondo esperimento è stata utilizzata la formulazione di bioink SGT_CaCl₂ in cui sono state inglobate 10x10⁶ cellule ottenendo un volume finale di 1.5 ml. Il differenziamento osteogenico è stato indotto utilizzando un medium di coltura costituito da D-MEM integrato con 10% FBS, 10 mM β-glicerofosfato, 0.1 mM dexametasone e 50 mM di acido ascorbico. I biomateriali caricati con le cellule sono stati incubati a 37°C e 5% CO₂ in piastre e valutati ai giorni 1, 14 e 21.

Caratterizzazione del tessuto ingegnerizzato

Caratterizzazione topologica degli scaffolds

Per valutare la deposizione dei filamenti di biomateriale dopo la stampa delle strutture, sono state acquisite immagini dei costrutti con ingrandimento 10x e 20x al microscopio ottico "Nikon Eclipse 90i". Da tali immagini, come già precedentemente descritto, è stata misurata la larghezza dei filamenti e il diametro dei pori e i dati sono stati espressi come valori di media e deviazione standard.

Caratterizzazione biologica degli scaffolds

La caratterizzazione biologica degli scaffolds è stata effettuata tramite test Live & Dead, colorazioni istologiche e analisi in immunistoichimica. Per quantificare le immagini ottenute dai seguenti saggi è stato impiegato il software di calcolo numerico Matlab® e il software ImageJ.

Inclusione in OCT

Gli scaffolds sono stati inclusi in OCT (Optimal Cutting Temperature). Il blocchetto ottenuto è stato tagliato al criostato (-22°C) in sezioni sequenziali con spessore di 12 µm. In seguito, le sezioni tagliate sono state poste su vetrini e sono state fissate in formalina (4%) per 1 ora.

Valutazione della vitalità cellulare

Al fine di valutare la vitalità cellulare degli scaffolds funzionalizzati e posti in coltura, è stato utilizzato il test Live & Dead ai giorni 1, 14 e 21. Il terreno di coltura è stato rimosso dai pozzetti ed è stato incubato a 37°C per 45 minuti. I costrutti sono stati osservati al microscopio ottico utilizzando due canali di fluorescenza:

- a 495 nm per il FITC (fluorescina isotiocianato) che conferisce una colorazione citoplasmatica verde evidenziando le cellule vive;
- a 510 nm per il TRITC (isotiocianato di tetrametilrodamina) che penetra invece attraverso le membrane cellulari danneggiate evidenziando in rosso le cellule non vitali livello del nucleo.

Analisi istochimica ed in immunofluorescenza

Blu di Toluidina:

Per valutare il livello di formazione della matrice extracellulare ovvero dei proteoglicani è stata eseguita la colorazione con Blu di Toluidina. La soluzione è stata aggiunta alle sezioni precedentemente tagliate e incubata per 30 minuti. I vetrini sono stati lasciati asciugare a temperatura ambiente e successivamente sono stati osservati al microscopio ottico "Nikon Eclipse 90i".

Alizarin Red S:

Allo scopo di valutare la capacità di mineralizzazione della matrice, si è utilizzata la colorazione istologica Alizarin Red. Il colorante è stato aggiunto alle piastre di coltura 2D delle MSCs realizzate per quantificare la mineralizzazione in presenza di CaCl₂.

Per valutare la mineralizzazione negli scaffolds degli esperimenti di differenziamento osteogenico, sono stati lavati i vetrini, ottenuti dall'inclusione in OCT, con acqua ultrapura e sono stati ricoperti con il colorante Alizarin Red precedentemente filtrato. Dopo l'incubazione per 40 minuti, sono stati lavati e poi disidratati in alcool in scala dal 70% al 100% e, infine, diafanizzati in xilolo. I vetrini sono stati successivamente osservati al microscopio ottico "Nikon Eclipse 90i".

Von Kossa:

Per valutare la presenza di calcio, oltre all'Alizarin Red, è stata effettuata l'analisi istologica con il Von Kossa. I vetrini, ottenuti dall'inclusione in OCT, sono stati lavati due volte in acqua ultrapura ed incubati con Nitrato di Argento (1%) per 30 minuti sotto luce ultravioletta. Dopo ulteriori due lavaggi in acqua, sono stati incubati in sodio tiosolfato (5%) diluito in acqua ultrapura per 5 minuti a RT e, infine, lasciati asciugare all'aria. I campioni sono stati osservati al microscopio ottico "Nikon Eclipse 90i".

3. Risultati

Dual energy CT data

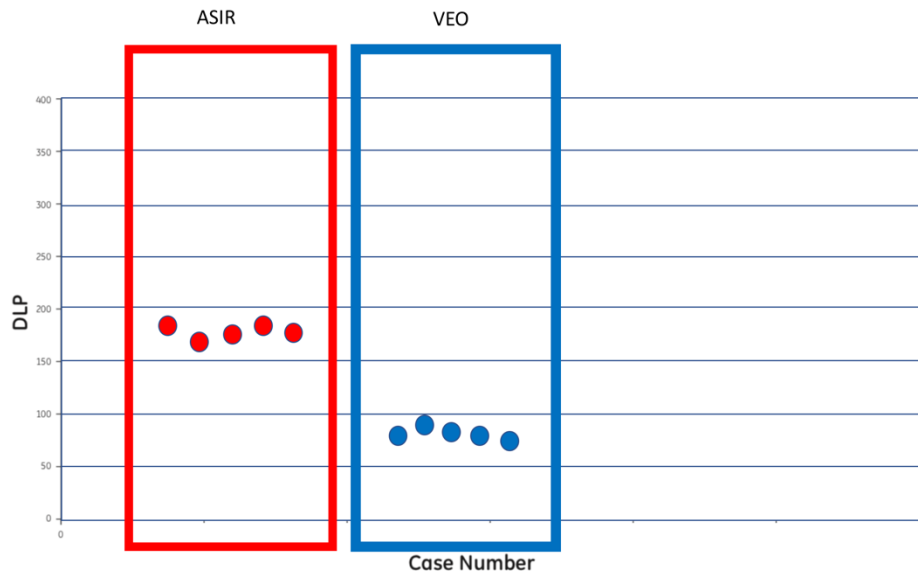
Rapporto dose-qualità immagine

Abbiamo evidenziato che il rapporto tra dose e qualità delle immagini è dipendente dalla sede anatomica scansionata, dallo spessore dei tessuti, dal tipo di protesi metallica presente (titanio, cromo-cobalto etc).

Abbiamo evidenziato che l'applicazione del sistema VEO permette una valutazione del tessuto osseo ottimale senza ridurre la qualità dell'immagine utilizzando comunque una dose più bassa di oltre il 50% (media $52.5\% \pm 6\%$) rispetto al sistema di riduzione della dose ASIR. L'ottenimento di tali immagini con il sistema VEO implica comunque un tempo di attesa variabile tra 10 e 50 minuti (media 40 ± 8 min) per l'elaborazione dell'immagine, dipendente dal numero di immagini acquisite, con tempo di ricostruzione di circa 0.2-0.5 immagini per secondo. Inoltre abbiamo evidenziato che il sistema ASIR non permette di ottenere immagini così dettagliate, riducendo la dose così come evidenziato con il sistema VEO. Il sistema VEO è tuttavia incompatibile con il sistema GSI. Al sistema GSI può essere applicato il sistema ASIR con una riduzione della dose di circa il 20-30% (valore di riferimento dato dall'azienda).

	kVoltage	mAs	ASIR	VEO	GSI	Metal	DLP mGy-cm
Caso 1	120	0	NO	SI	NO	NO	80
Caso 2	120	0	NO	SI	NO	NO	86
Caso 3	120	0	NO	SI	NO	NO	77
Caso 4	120	0	NO	SI	NO	NO	78
Caso 5	120	0	NO	SI	NO	NO	98
Caso 6	120	3	SI	NO	NO	SI-T	190
Caso 7	120	4	SI	NO	NO	SI-T	158
Caso 8	120	3	SI	NO	SI	SI-T	154
Caso 9	120	5	SI	NO	SI	SI-C	163
Caso 10	120	3	SI	NO	Si	SI-C	191

Tabella 1. kV dei pezzi anatomici per ottimizzare l'immagine. Metal (T-titanio/C-cromo_cobalto); DLP dose length product.



Tab.2. Confronto tra valori dosimetrici di DLP (mGy-cm) tra le scansioni fatte sui pezzi anatomici tra il sistema di riduzione della dose VEO e ASIR.

Sistemi GSI e HD

Abbiamo effettuato diverse scansioni utilizzando il sistema GSI per comprendere a differenti picchi energetici quali fossero le immagini con il miglior rapporto segnale/rumore e che meglio dettagliassero l'osso in assenza di protesi metallica. La miglior valutazione dell'osso in assenza di protesi metallica è in presenza del sistema HD che riesce a dettagliare meglio le singole trabecole dell'osso spongioso. Ai vari picchi energetici come evidenziabile dalle immagini (Fig. 14) con keV bassi (<50) sono meglio caratterizzabili i tessuti molli mentre all'aumentare dei keV non si apprezza un significativo miglioramento della qualità dell'immagine, per quanto riguarda la caratterizzazione dell'osso.

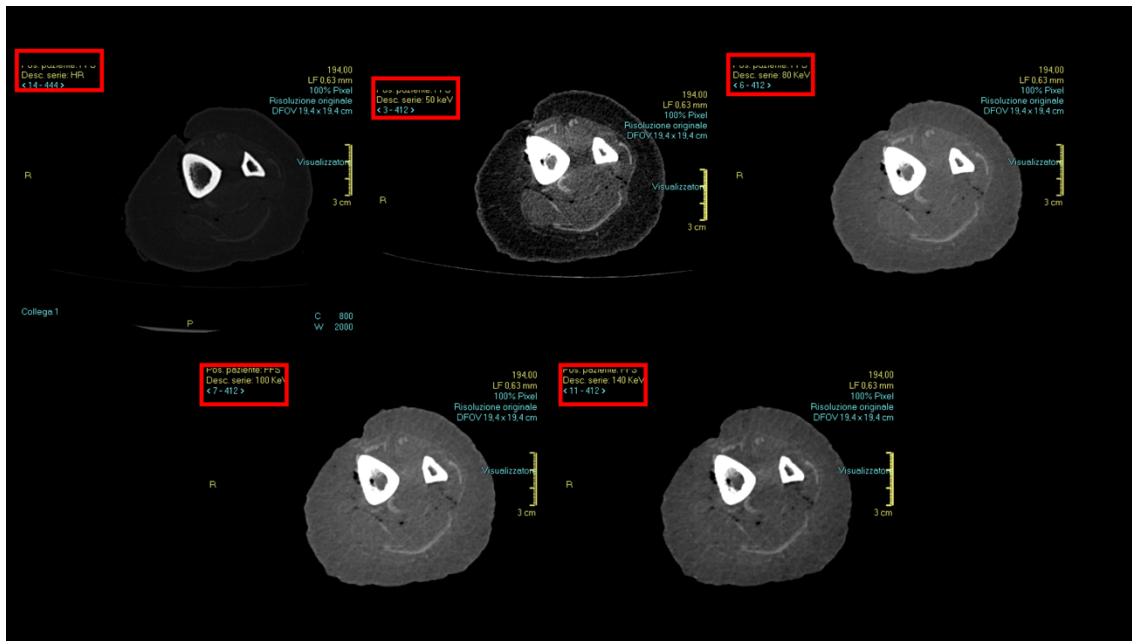


Fig.14. La prima scansione in alto a sinistra evidenzia la migliore valutazione dei dettagli dell'osso trabecolare (acquisizione HD). Le altre immagini acquisite con il sistema GSI caratterizzano i tessuti molli a bassi Kev (50) ma all'aumentare del picco non ci sono sostanziali differenze della qualità dell'immagine.

Riduzione degli artefatti metallici

Gli artefatti metallici sono molto più evidenti nelle protesi costituite da cromo-cobalto rispetto a quello in solo titanio. L'artefatto da protesi in titanio è stato nettamente ridotto utilizzando il sistema GSI, a partire dalla monoenergia di 90Kev e oltre. Mentre per gli artefatti in presenza di protesi in cromo-cobalto si sono nettamente ridotti con l'applicazione di monoenergie di 110Kev e oltre.

La qualità delle immagini è stata inoltre significativamente migliorata con l'uso del software MAR (metal artifact reduction) in post-processazione. Tuttavia si è assistito alla comparsa di qualche nuovo artefatto non presente in precedenza, e alla perdita della parte periferica dei mezzi di sintesi, con sottostima delle dimensioni degli impianti metallici. (Fig.15)

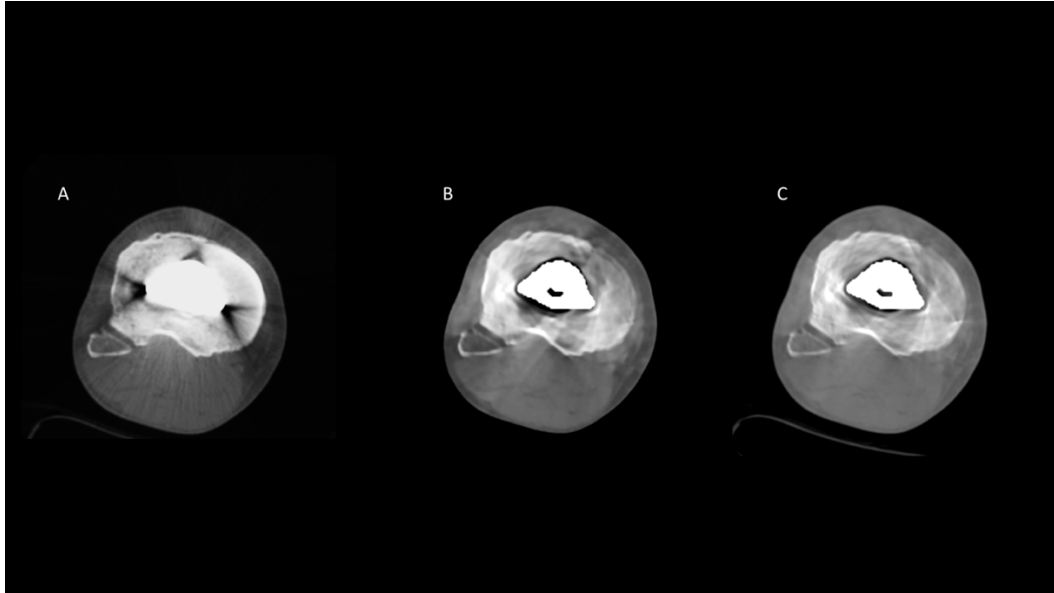


Fig.15. Pezzo anatomico di ginocchio con protesi in titanio. Scansione A, parametri standard; scansione B, applicazione del GSI a 90 keV, con riduzione degli artefatti metallici; scansione C applicazione del GSI a 60 keV + MAR con ulteriore riduzione degli artefatti.

Le analisi effettuate su pezzi anatomici hanno permesso di ottimizzare i parametri di scansione e di ottenere scansioni di buona qualità anche su pazienti affetti da frattura evoluta in “non-unione”. (Fig.16).

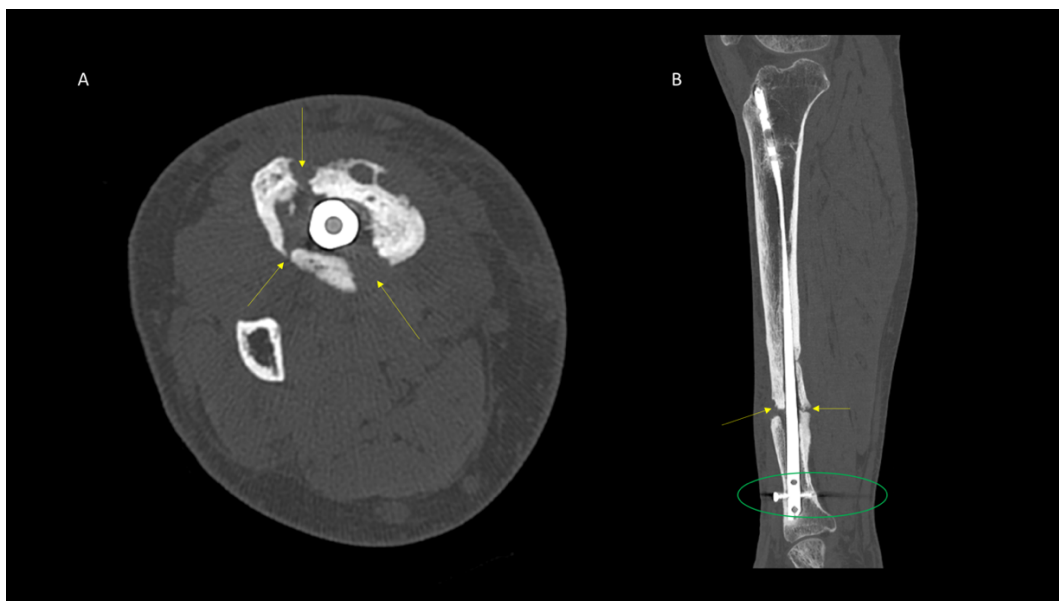


Fig.16. Paziente con pseudoartrosi di tibia, trattato mediante chiodo midollare, si apprezzano le multiple aree di difetto osseo (freccie gialle). L'ottimizzazione dei parametri ha limitato gli artefatti metallici attorno alla vite distale (cerchio verde) fuori dalla sede della frattura “non union”.

Computer-aided images elaborations and 3D-Bioprinter patient-specific 3D printed scaffold

Le immagini TC-DE ottenute sono state importate in formato DICOM in un software dedicato per la visualizzazione, segmentazione e processazione d'immagini per riprodurre attraverso la stampante 3D l'anatomia esatta del tessuto osseo mancante (Fig. 17-18-19).

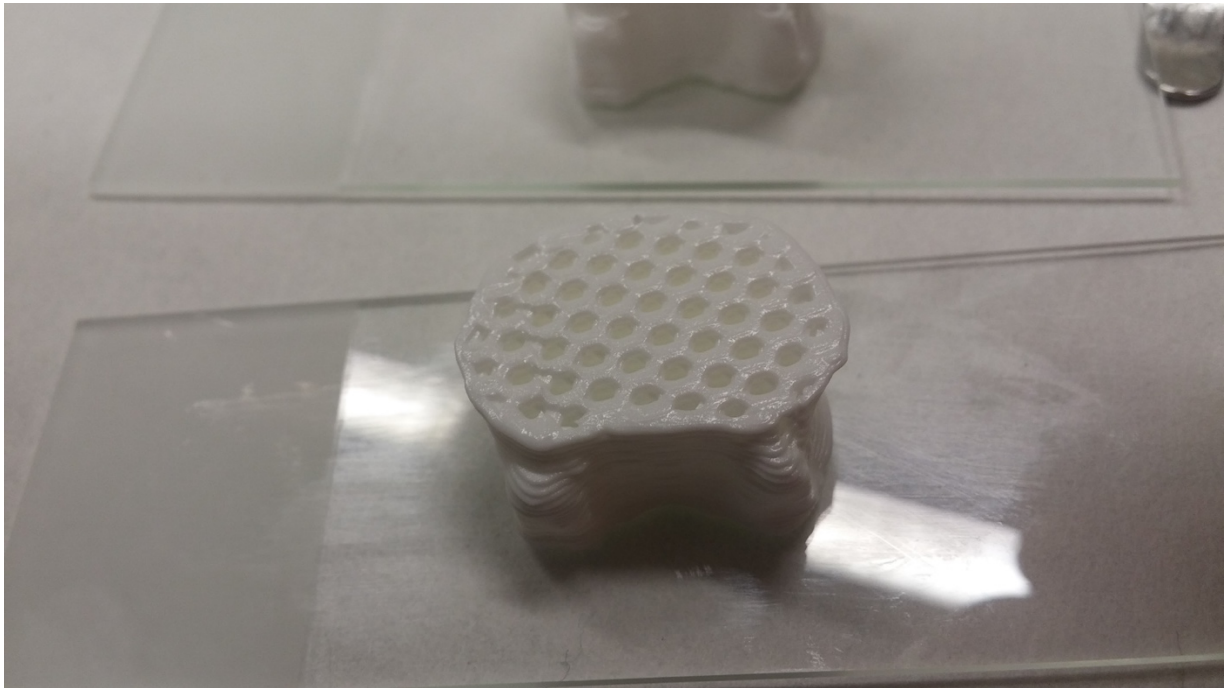


Fig.17. Prototipo 1 di scaffolds 3D che riproduce segmento anatomico di tessuto osseo originale.

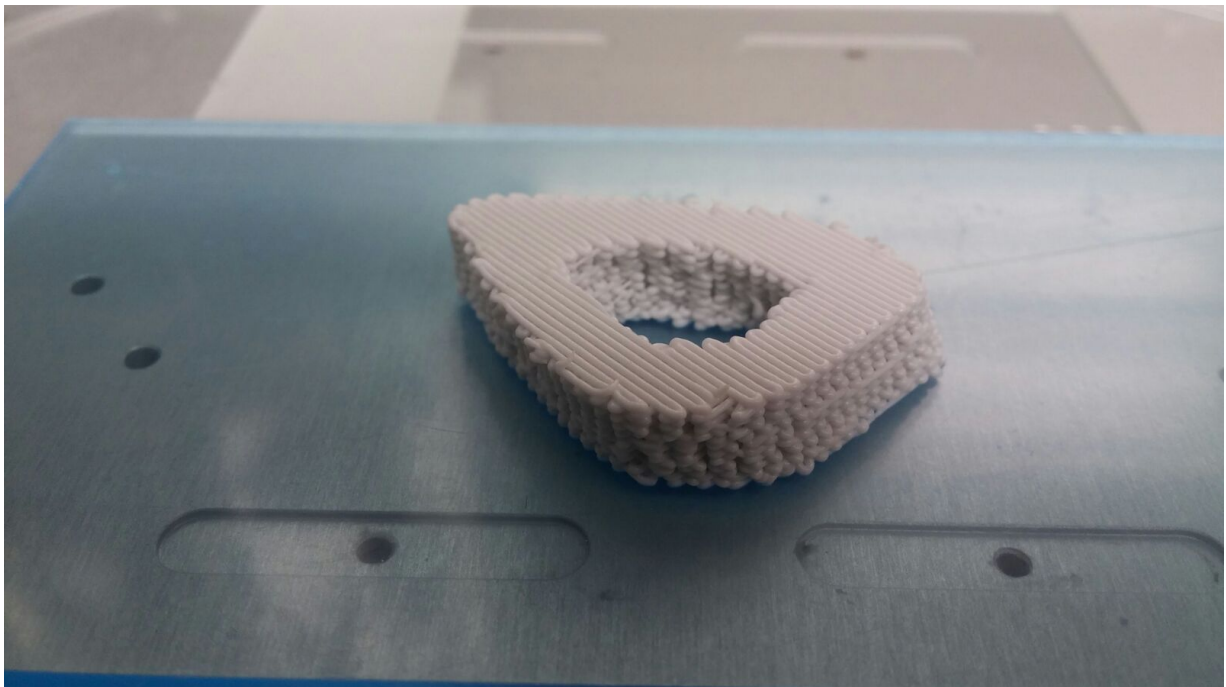


Fig.18. Prototipo 2 di scaffolds 3D che riproduce segmento anatomico di tessuto osseo originale.

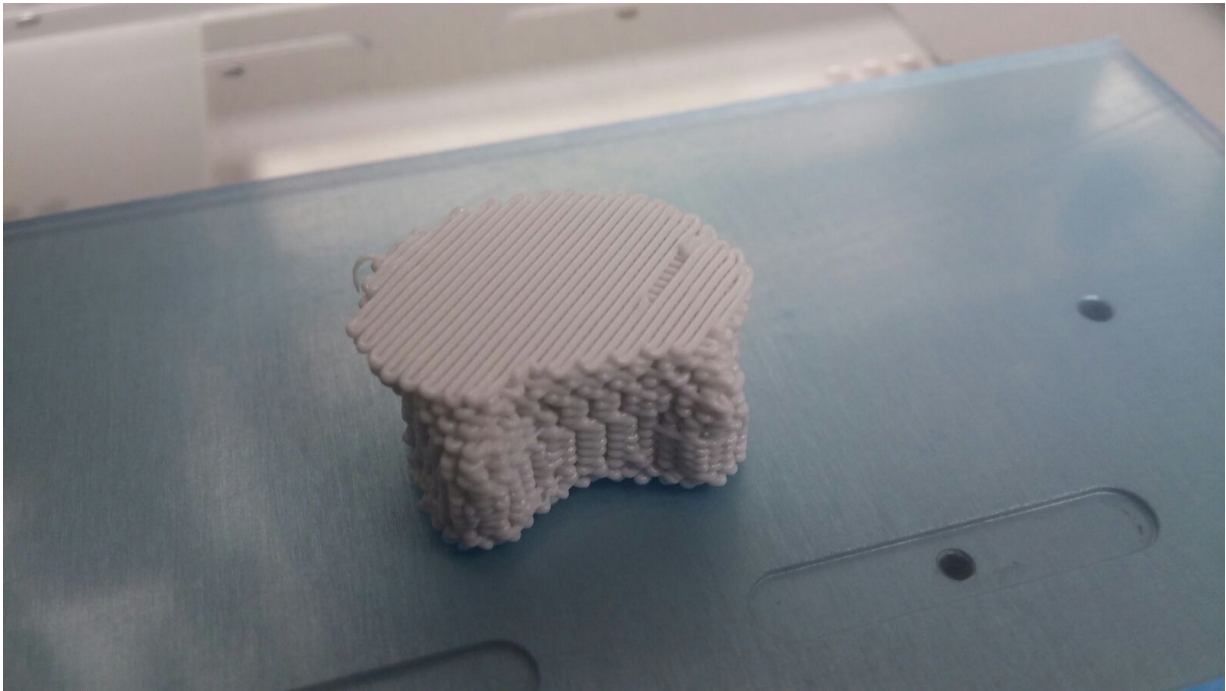


Fig.19. *Prototipo 3 di scaffolds 3D che riproduce segmento anatomico di tessuto osseo originale.*

Valutazione dei costrutti a base di calcio fosfato

I primi prototipi realizzati con il biomateriale altamente osteoconduttivo a base di calcio fosfato (Osteoink, RegenHu), hanno evidenziato un'elevata riproducibilità tra parametri di porosità impostati e lo scaffold ottenuto. In particolare la micro-architettura era caratterizzata da valori di "pori aperti" compresi tra il 25 e il 40% e nessun poro chiuso. I test di compressione meccanica degli scaffolds hanno evidenziato una diretta dipendenza tra la dimensione dei pori e la micro-architettura dello scaffold. La forza massima di compressione delle strutture analizzate è risultata compresa tra 3,4 e 9,3 MPa.

Tuttavia questo prototipo ha presentato problemi di processazione e valutazione istologica (Fig. 20 e 21). Dopo numerosi tentativi si è deciso di non proseguire con l'utilizzo di questo biomateriale.

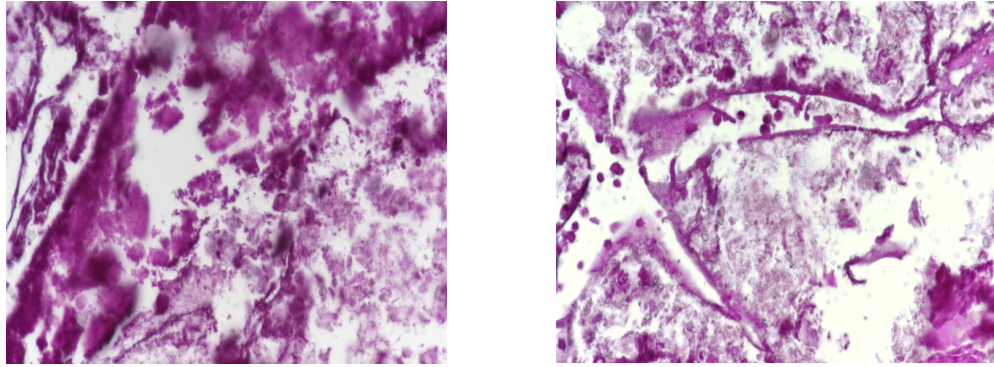


Fig. 20. Analisi istologica e colorazione con ematossilina e eosina che evidenzia la rottura del biomateriale durante il processo di taglio.

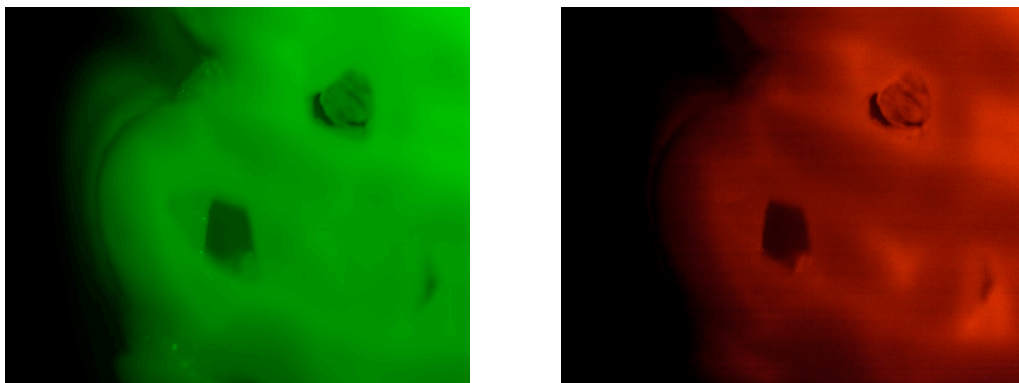


Fig. 21. Valutazione mediante Live and Dead (verde e rosso) che evidenzia un'alta autofluorescenza dello scaffold impedendone una visualizzazione delle cellule.

Le problematiche evidenziate utilizzando un biomateriale strutturato ci ha portati a spostare la nostra attenzione su biomateriali più facilmente deformabili capaci di fungere da riempitivi in zone di non unione. Pertanto si sono scelti gli idrogeli per la realizzazione degli scaffolds, in quanto strutture più facilmente iniettabili nella zona di frattura che permettono un'ottimale valutazione istologica e immunohistochimica.

Valutazione della stampabilità dell'idrogelo

Al fine di trovare il set ottimale di parametri di processo per la stampa (velocità e pressione), sono stati realizzati campioni al variare di tutte le possibili combinazioni. L'analisi delle immagini tramite il software del microscopio ottico "Nikon 90i" ha permesso di calcolare i valori di media e deviazione standard della larghezza dei filamenti e del diametro dei pori.

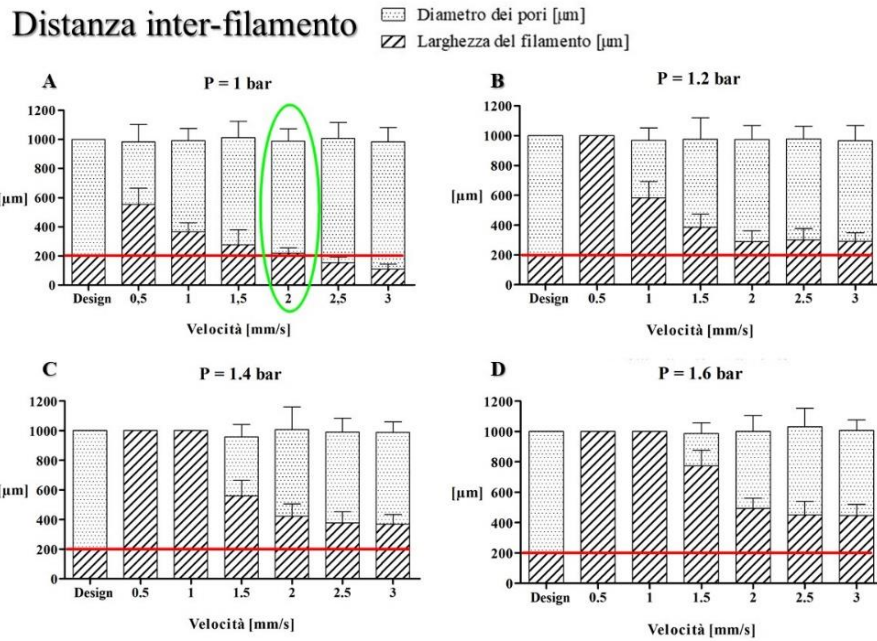


Fig. 22. Rappresentazione della distanza inter-filamento calcolata al variare della pressione e della velocità di stampa. A) $P=1$ bar; B) $P=1.2$ bar; C) $P=1.4$ bar; D) $P=1.6$ bar. In tutti i grafici, la linea rossa è posta a $200 \mu\text{m}$ e indica la dimensione ottimale della larghezza del filamento. L'istogramma racchiuso nella forma verde mostra è relativo alla struttura che minimizza la distanza euclidea dal modello CAD: i suoi parametri di stampa sono quelli ottimali.

La combinazione di parametri di stampa che riproduce più fedelmente possibile il modello CAD progettato è quella con una velocità di stampa pari a 2 mm/s ed una pressione pari a 1 bar (istogramma cerchiato in Fig. 22).

La deposizione è presentata in Fig. 23.

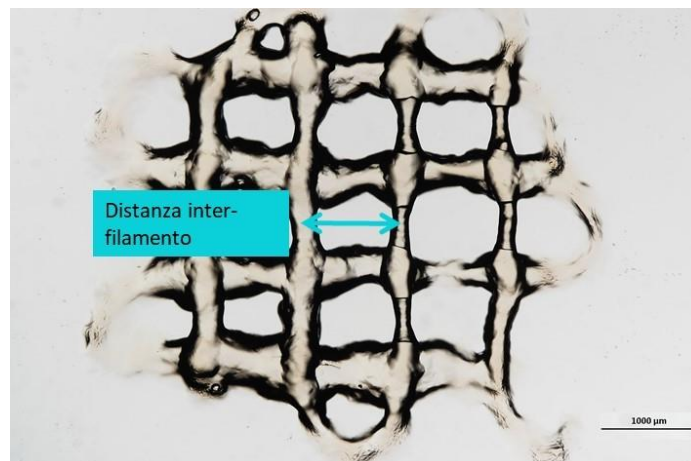


Fig. 23. Deposizione ottenuta dalla selezione della velocità e della pressione di stampa. L'etichetta evidenzia la distanza inter-filamento, cioè la distanza tra il centro di due filamenti consecutivi.

La Fig. 24 mostra che l'altezza del layer pari a 200 μm è l'unica in grado di riprodurre una porosità significativa ed una distanza interfilamento fedele al modello CAD.

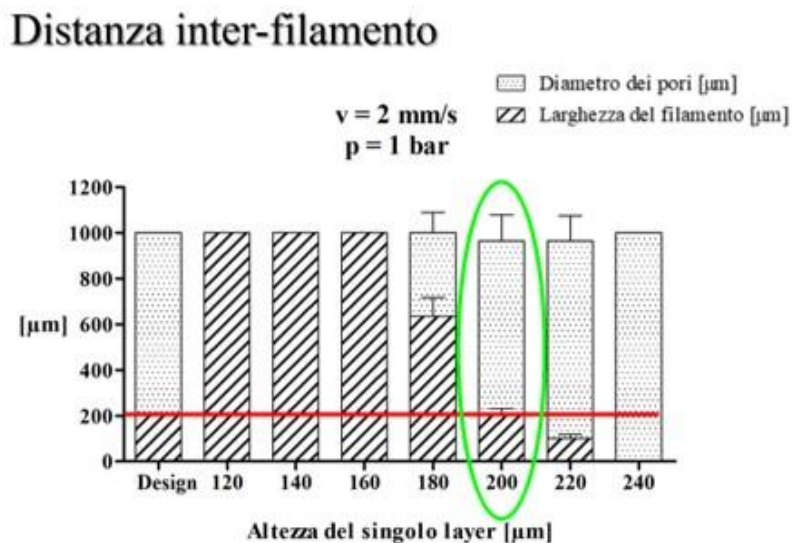


Fig. 24. Rappresentazione della distanza inter-filamento calcolata al variare dell'altezza del singolo layer. La linea rossa è posta a 200 μm e indica la larghezza ottimale del filamento. L'istogramma racchiuso nella forma verde indica l'altezza del layer per cui si ottiene una deposizione ottimale.

Parametri di stampa ottimali

I parametri di stampa ottimizzati sono riassunti in Tab. 2 e in Fig. 25 è rappresentata lo scaffold stampato.

Parametri di processo	<i>temperatura</i>	22°C \pm 1°C
	<i>velocità</i>	2 mm/s
	<i>pressione</i>	1 bar
Parametri di design	<i>Altezza singolo layer</i>	200 μm

Tab. 2. Parametri di stampa ottimizzati.

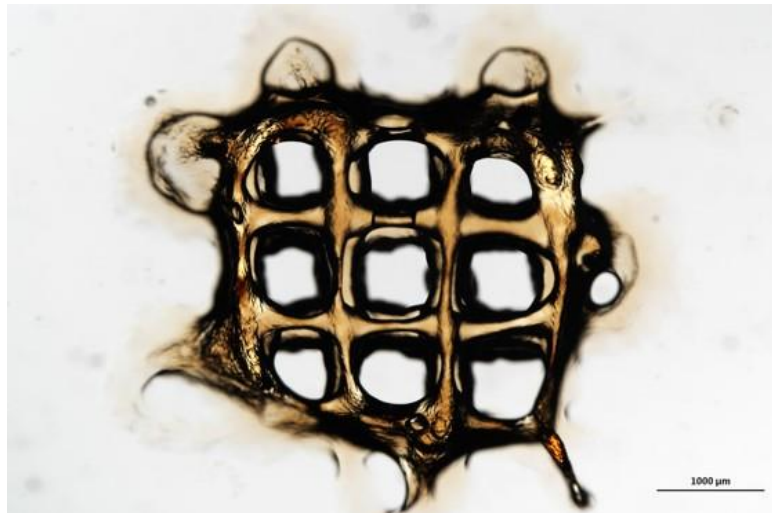


Fig. 25. Scaffold ottenuto dalla selezione dei parametri di stampa.

Caratterizzazione reologica

Prove al reometro

La Fig. 26 mostra l'andamento della viscosità al variare dello shear rate nel grafico logaritmico. Il bioink ha andamento tipico di un fluido pseudoplastico o “*shear thinning*”, poiché la viscosità diminuisce all'aumentare dello shear rate.

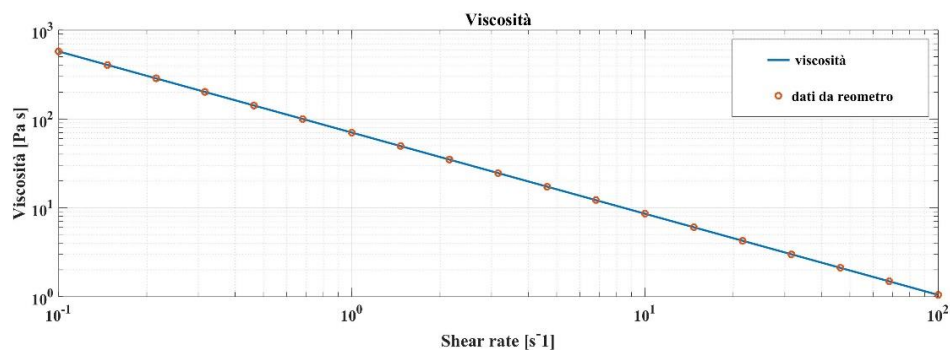


Fig. 26. Andamento della viscosità al variare dello shear rate. I cerchi rossi rappresentano i dati ottenuti sperimentalmente al reometro, mentre la curva blu rappresenta il fitting degli stessi dati. Il grafico è in scala logaritmica.

Valutazione della deposizione del materiale inglobante le MSCs

Durante il processo di stampa tutti parametri non sono stati modificati rispetto alla precedente ottimizzazione.

Dalla valutazione al microscopio ottico invertito si è potuto osservare nella maggior parte delle strutture una porosità significativa ed un impilamento dei layer idoneo. Inoltre, le cellule sono risultate disposte omogeneamente all'interno del bioink e di conseguenza nei filamenti depositi. In Fig. 27 sono mostrate le immagini degli scaffolds, ottenute ad un ingrandimento 10x, che mostrano l'omogeneità delle cellule all'interno del materiale e la porosità. Questa, nonostante un parziale collasso del materiale, è risultata mantenuta fino al giorno 10.

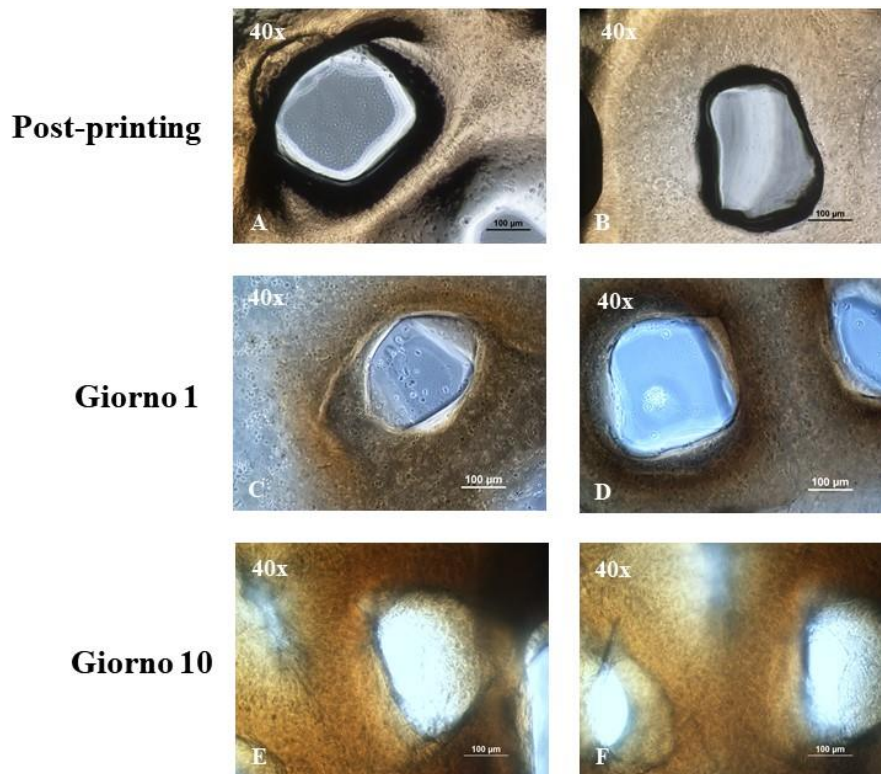


Fig. 27. Immagini catturate al microscopio ottico invertito (ingrandimento 10x) a diversi tempi sperimentali. A-B) immagini catturate dopo 1 ora dalla stampa; C-D) immagini catturate al giorno 1; E-F) immagini catturate al giorno 10. Le strutture si mantengono porose fino al giorno 10.

Analisi test Live & Dead

Il test Live & Dead ha mostrato che la vitalità cellulare (cellule verdi) è conservata all'interno degli idrogeli a tutti i tempi sperimentali esaminati (giorno 1, giorno 14 e giorno 21). In alcune zone dello scaffold sono tuttavia presenti alcune cellule non vitali (cellule rosse), tuttavia in numero inferiore a quelle vitali (Fig. 28).

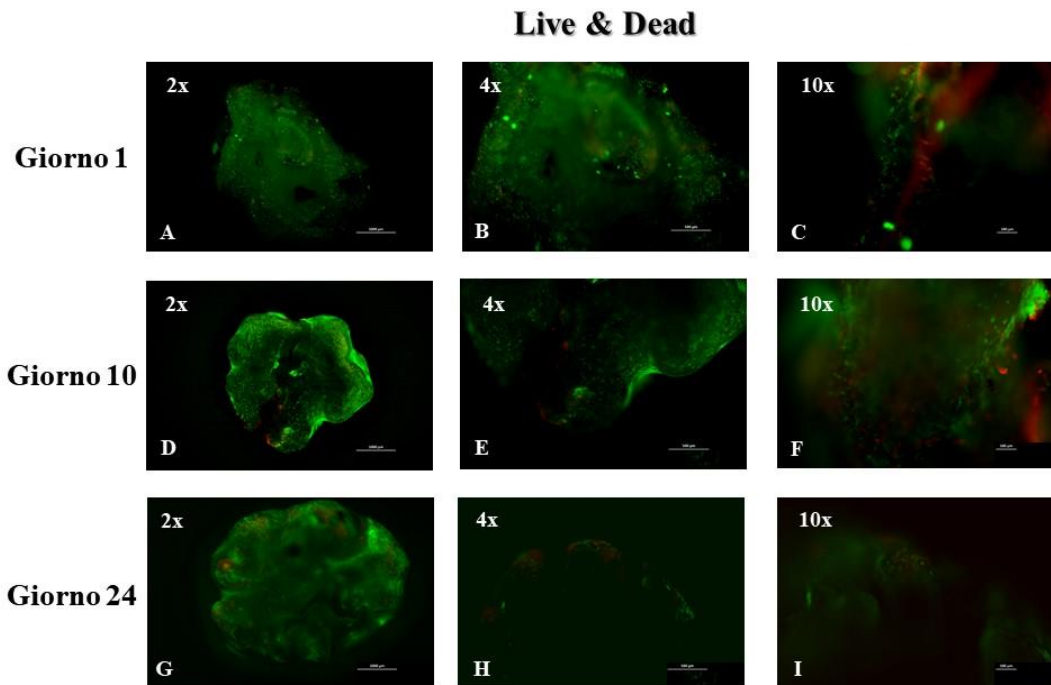


Fig. 28. Immagini Live & Dead degli scaffolds a diversi ingrandimenti (2x, 4x, 10x) e a diversi tempi sperimentali (giorno 1, giorno 10, giorno 14). Le cellule vitali acquisiscono una colorazione verde, le cellule non vitali acquisiscono la colorazione rossa.

Differenziamento osteogenico in scaffold SeGeTi + MSCS

L'obiettivo di questo esperimento è stato quello di valutare se il bioink (SeGeTi + MSCs) inglobante cellule e indotto al differenziamento osteogenico, favorisse la proliferazione cellulare e la mineralizzazione.

Valutazione della deposizione del materiale inglobante le MSCs

I parametri di stampa precedentemente selezionati sono risultati adatti alla stampa del bioink.

Gli scaffolds ottenuti hanno mostrato un'elevata fedeltà rispetto al modello CAD preimpostato. I filamenti sono stati depositi costruendo una struttura 3D con un impilamento dei layer adeguato. Tutte le strutture hanno mostrato una porosità significativa, mantenuta nel tempo fino al giorno 14, come è visibile in Fig. 29. Inoltre, le cellule, inglobate nel bioink, sono state deposte omogeneamente.

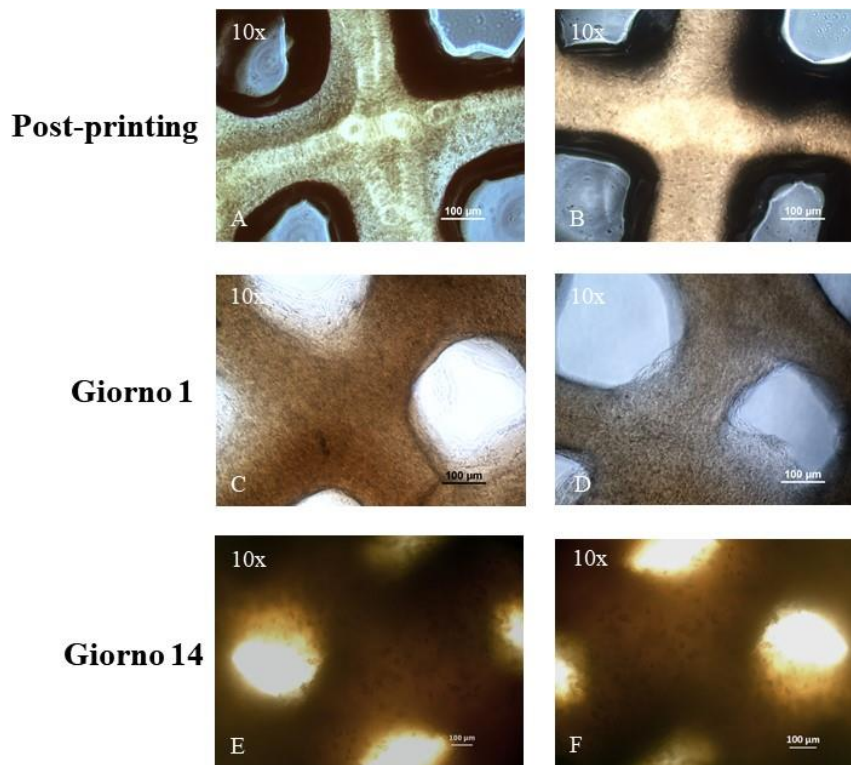


Fig. 29. Immagini catturate al microscopio ottico invertito (ingrandimento 10x) a diversi tempi sperimentali. A-B) immagini post-printing; C-D) immagini catturate al giorno 1; E-F) immagini catturate al giorno 14. Le strutture si mantengono porose fino al giorno 14.

Caratterizzazione biologica degli scaffolds SeGeTi + MSCs

Analisi test Live & Dead

Il test Live & Dead ha mostrato che il processo di stampa non influisce significativamente sulla vitalità cellulare. In particolare, come è mostrato in Fig. 30 che rappresenta l'ultimo set di scaffolds temporalmente stampato, la vitalità cellulare è garantita dopo più di due ore di permanenza della cartuccia a 22°C. La maggior parte delle cellule all'interno degli idrogel sono vitali (verdi) ai diversi tempi sperimentali esaminati (giorno 1, giorno 14 e giorno 21). Solo al giorno 21 si è evidenziato la presenza di cellule non vitali (rosse) (Fig. 30.J).

Live & Dead

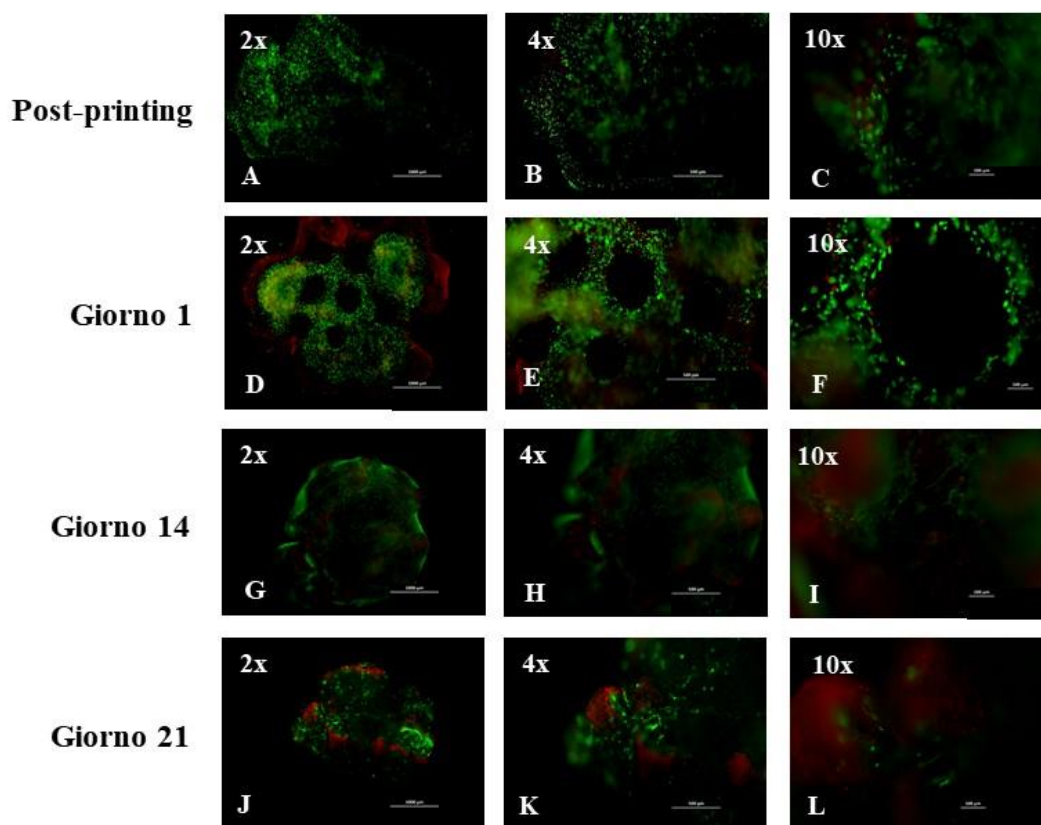


Fig. 30. Immagini Live & Dead degli scaffolds a diversi ingrandimenti (2x, 4x, 10x) e a diversi tempi sperimentali (post-printing, giorno 1, giorno 10, giorno 14, giorno 21). Le cellule vitali acquisiscono una colorazione verde, le cellule non vitali acquisiscono la colorazione rossa.

Analisi Von Kossa

La colorazione con Von Kossa ha permesso di valutare i processi di mineralizzazione a livello del gruppo di controllo (Fig. 31.A) e del gruppo sperimentale coltivato con fattori osteoinduttivi (FO) (Fig. 31.B).

La percentuale di mineralizzazione è stata ottenuta dal rapporto tra l'area della sezione in cui la mineralizzazione è avvenuta (precipitati di colore nero) rispetto all'area totale della sezione del replicato.

L'immagine RGB è stata analizzata tramite software ImageJ. In particolare, è stata eseguita una sogliatura sul colore nero (tecnica "color threshold") per selezionare e quantificare l'area positiva, mentre è stata eseguita una segmentazione per selezionare e quantificare l'area totale della sezione a causa della forma irregolare e del colore simile allo sfondo della sezione stessa.

Nel controllo, rappresentato da sezioni di scaffold coltivati senza FO, non è stato osservato alcun processo di differenziamento osteogenico. Nelle sezioni di scaffold, coltivate con FO, è stata osservata la presenza di vari precipitati neri, indice di processi di mineralizzazione, a partire dal giorno 14 e che è aumentata nell'ultimo tempo sperimentale (giorno 21). La quantificazione della percentuale di mineralizzazione delle sezioni colorate con il Von Kossa è stata realizzata tramite analisi di immagini. Tale percentuale è stata calcolata come rapporto tra l'area dei precipitati neri rispetto all'area totale della sezione. Al giorno 14, la mineralizzazione dei controlli è nulla mentre è minima per i costrutti coltivati con FO. Viceversa, al giorno 21, in questi ultimi è possibile apprezzare una mineralizzazione superiore al 5% (Fig. 31.C).

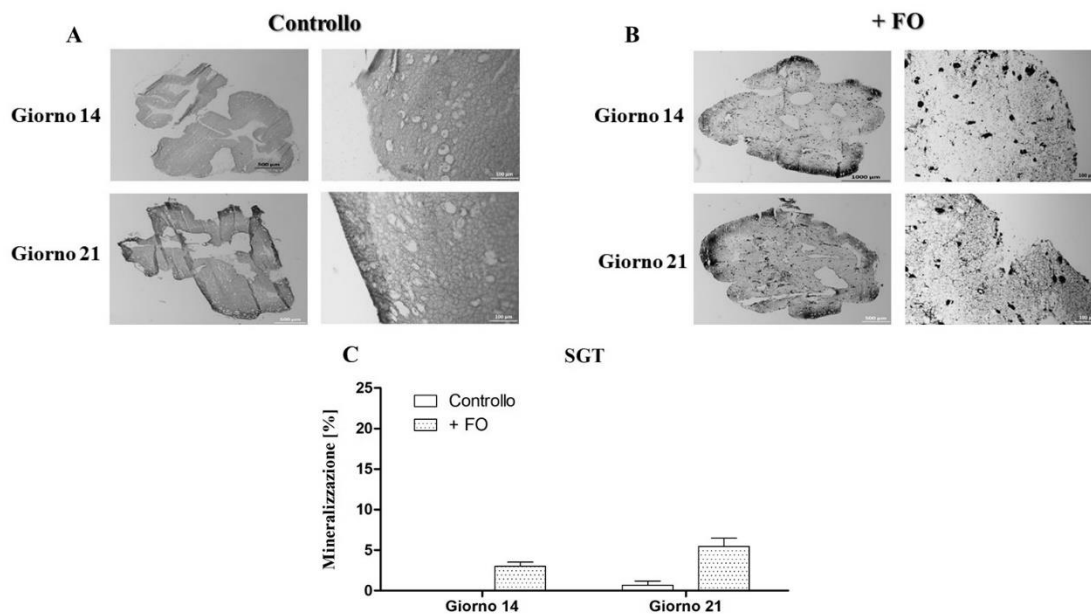


Fig. 31. A) Microfotografia (ingrandimento 2x e 20x) di sezioni di scaffold di controllo coltivati senza FO e colorati con Von Kossa al giorno 14 e al giorno 21. B) Microfotografia (ingrandimenti 2x e 20x) di sezioni di scaffold coltivati con FO e colorati con Von Kossa al giorno 14 e al giorno 21. C) Rappresentazione grafica della percentuale di mineralizzazione del gruppo di controllo e del gruppo sperimentale trattato con FO ai giorni 14 e 21.

Differenziamento osteogenico in scaffold SeGeTi_CACL2 + MSCs

L'obiettivo del secondo esperimento è stato quello di valutare, oltre alla deposizione del materiale e alla vitalità cellulare, se il differenziamento in senso osteogenico era favorito con l'aggiunta del CaCl₂.

Mineralizzazione delle colture 2d di MSCs

La colorazione con Alizarin Red condotta sulle piastre 2D in cui sono state seminate e coltivate le MSCs a diverse concentrazioni di CaCl_2 , ha evidenziato risultati interessanti. In particolare, al giorno 1, la mineralizzazione è presente, in forma di piccoli agglomerati, solo nella piastra con 2.6 mM di CaCl_2 , mentre è assente nelle altre due piastre. Al giorno 14, la mineralizzazione inizia a essere evidente nel controllo, è abbastanza diffusa nella piastra con 1.3 mM di CaCl_2 , mentre è completa nella piastra con 2.6 mM di CaCl_2 . Al giorno 21, tutte le piastre presentano una mineralizzazione completa. In Fig. 32, sono visibili le piastre dopo colorazione con Alizarin Red ai giorni 1, 14 e 21.

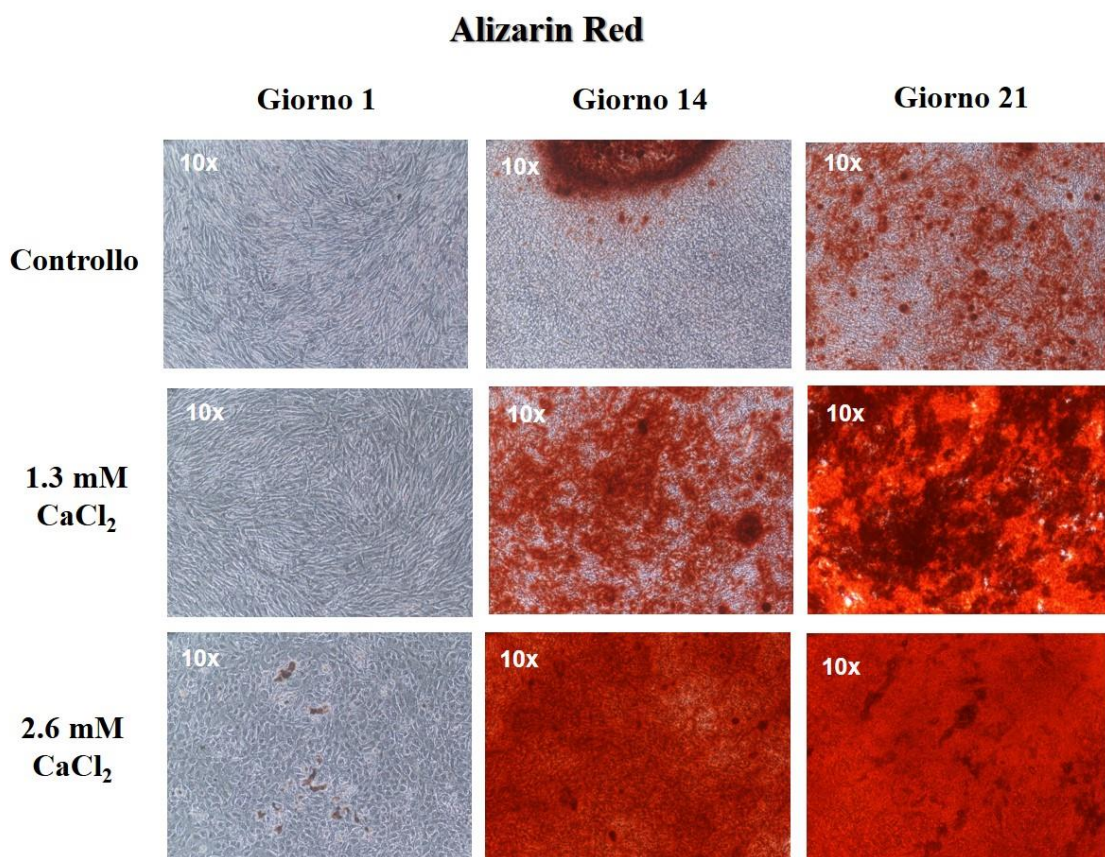


Fig. 32. Mineralizzazione evidenziata con la colorazione Alizarin Red nelle piastre 2D di MSCs con diverse concentrazioni di CaCl_2 indotte al differenziamento osteogenico.

L'analisi dell'assorbanza a 510 nm delle piastre 2D ha permesso di quantificare la mineralizzazione in base al livello di rosso presente. È evidente come la mineralizzazione della piastra con 2.6 mM di CaCl_2 già al giorno 14 sia più alta rispetto alle altre due

condizioni e che si mantenga tale anche al giorno 21. I dati dell'assorbanza a 510 nm sono riportati in Fig. 33.

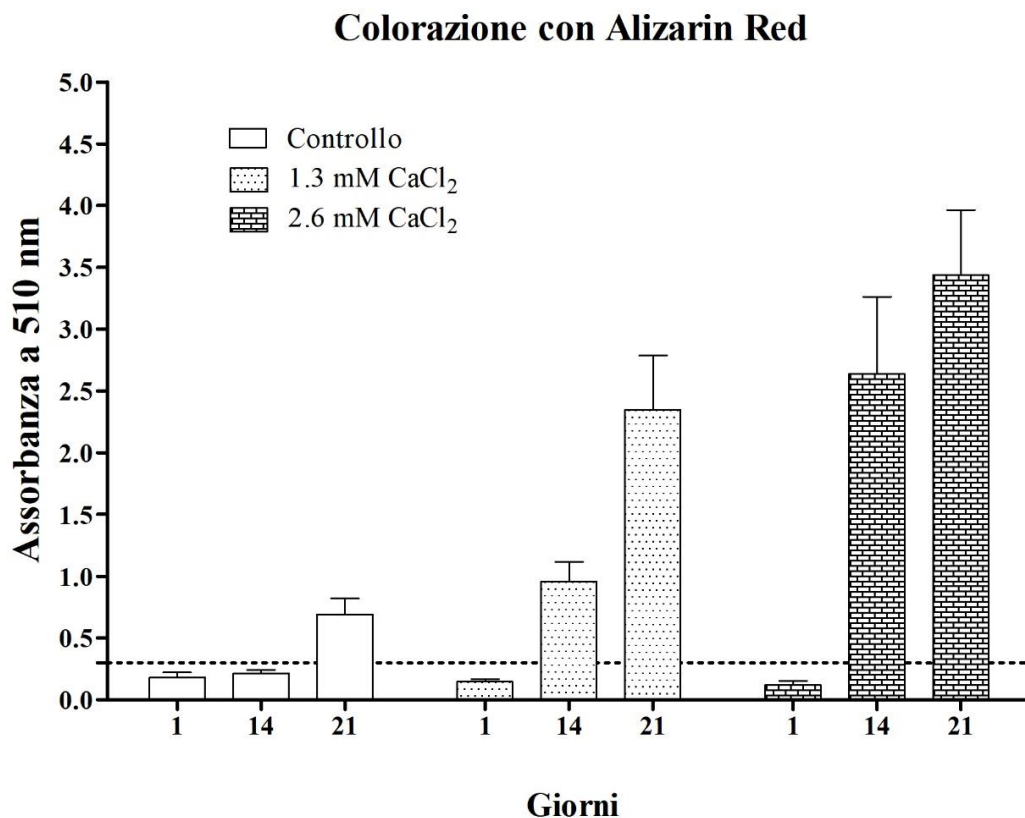


Fig. 33. Quantificazione della mineralizzazione delle piastre 2D con diverse concentrazioni di CaCl₂ tramite assorbanza a 510 nm ai giorni 1, 14, 21. La linea tratteggiata è posta in corrispondenza del livello di mineralizzazione rilevante.

Valutazione della deposizione del materiale inglobante le MSCs

I parametri di stampa selezionati per il bioink SeGeTi sono risultati idonei alla deposizione del secondo bioink SeGeTi_CaCl₂ + MSCs.

Le strutture stampate hanno mostrato al microscopio ottico invertito una deposizione adeguata alle aspettative, una struttura 3D con layer impilati adeguatamente e una dispersione omogenea della componente cellulare nel materiale. La porosità è risultata garantita fino al giorno 14, come mostrato in Fig. 34.

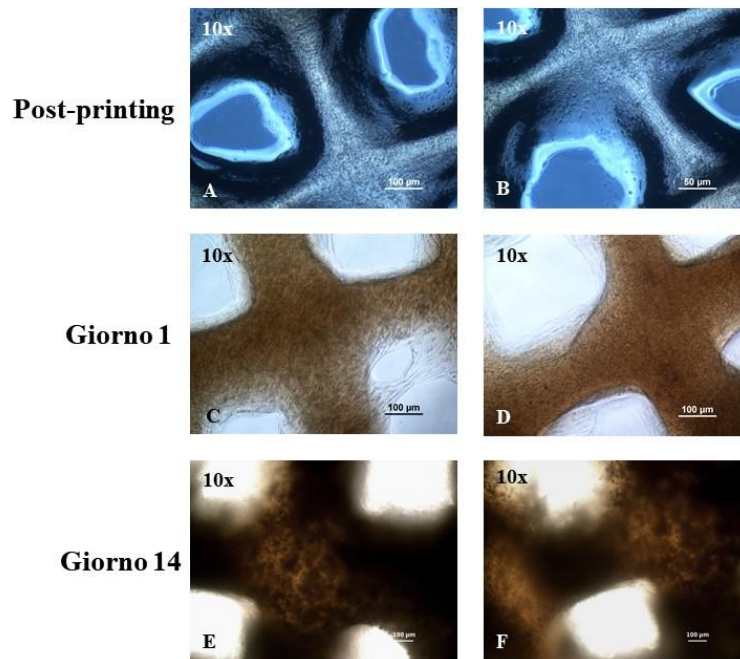


Fig. 34. Immagini catturate al microscopio ottico invertito (ingrandimento 10x) a diversi tempi sperimentali. A-B) immagini post-printing; C-D) immagini catturate al giorno 1; E-F) immagini catturate al giorno 14. Le strutture si mantengono porose fino al giorno 14.

Caratterizzazione biologica degli scaffold SeGeTi_CaCl₂ + MSCs

Analisi test Live & Dead

Il test Live & Dead ha mostrato che la maggior parte delle cellule incapsulate negli scaffold sono risultate vitali (verdi) a tutti i tempi sperimentali (giorno 1, giorno 14, giorno 21). Tuttavia, in alcune aree si sono evidenziate alcune cellule non vitali (rosse) (Fig. 35).

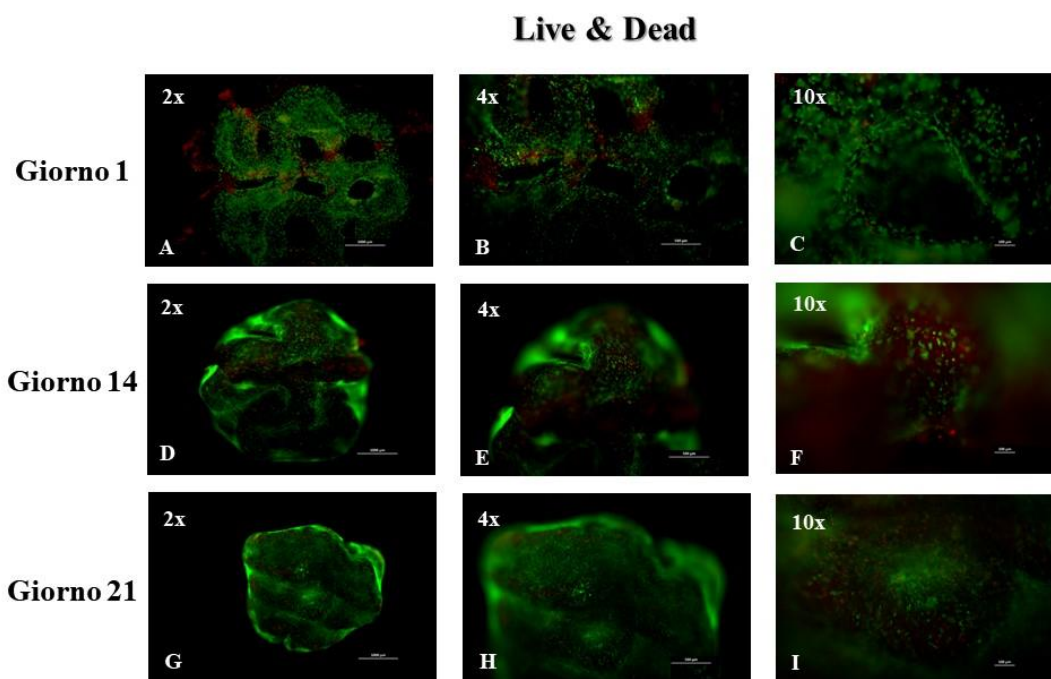


Fig. 35. Immagini Live & Dead degli scaffolds a diversi ingrandimenti (2x, 4x, 10x) e a diversi tempi sperimentali (giorno 1, giorno 14, giorno 21). Le cellule vitali acquisiscono la colorazione verde, le cellule non vitali acquisiscono la colorazione rossa.

Analisi Von Kossa

La colorazione con Von Kossa dei controlli coltivati senza FO (Fig. 36.A) ha evidenziato un basso livello di mineralizzazione, sebbene il costrutto contenesse la percentuale di CaCl_2 . Il gruppo sperimentale, trattato con FO (Fig. 36.B), ha evidenziato una maggiore presenza di precipitati di calcio in particolare nella zona periferica del costrutto ingegnerizzato, rispetto al gruppo di controllo, mostrando un notevole incremento al giorno 21.

Anche in questo caso, tramite l'analisi delle immagini con software ImageJ delle sezioni colorate con il Von Kossa si è calcolata la percentuale di mineralizzazione, analogamente all'esperimento precedente. Al giorno 14, la mineralizzazione dei controlli è minima, mentre è bassa (< 5%) per i costrutti coltivati con FO. Viceversa, al giorno 21, nei controlli è di poco superiore al 5%, mentre nel gruppo sperimentale coltivato con FO è possibile apprezzare una mineralizzazione superiore al 20%, indice che l'aggiunta di ioni calcio, ai FO, favorisce il differenziamento delle MSCs in senso osteogenico (Fig. 36.C).

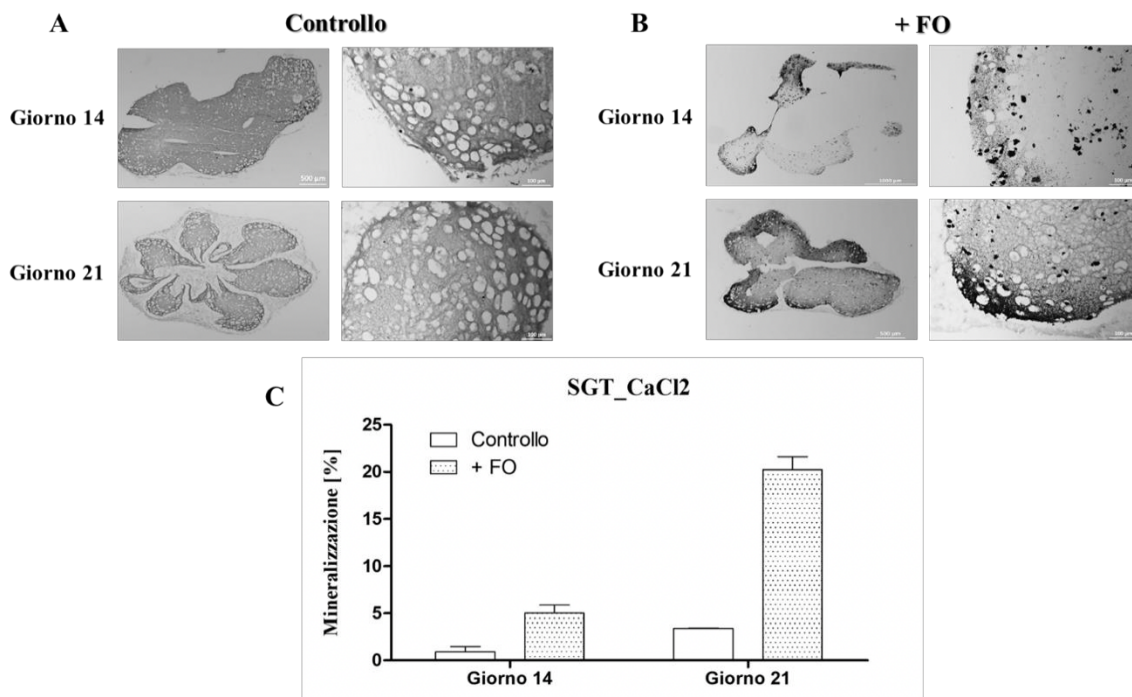


Fig. 36. A) Microfotografia (ingrandimento 2x e 20x) di sezioni rappresentative di scaffold a base di fibroina di seta, gelatina e CaCl₂ nei gruppi di controllo senza FO colorati con Von Kossa ai tempi sperimentali 14 e 21. B) Microfotografia (ingrandimento 2x e 20x) di sezioni rappresentative di scaffold a base di fibroina di seta, gelatina e CaCl₂ nei gruppi sperimentali con FO colorati con Von Kossa ai tempi sperimentali 14 e 21. C) Rappresentazione grafica della percentuale di mineralizzazione del gruppo di controllo e del gruppo sperimentale trattato con FO ai giorni 14 e 21.

4. Discussione e conclusioni

Il progetto di ricerca nell'ambito del quale questo lavoro di tesi è stato realizzato ha come obiettivo lo sviluppo di un tessuto ingegnerizzato in grado di rigenerare lesioni focali dell'osso partendo da dati di imaging clinici. La TC dual-energy si è dimostrata una metodica di imaging in grado di fornire ottimi dettagli anatomici in termini di risoluzione spaziale nei difetti ossei nella pseudoartrosi, specie con l'utilizzo del sistema HD. L'ottimizzazione dei parametri di scansione ha permesso di ottenere un'ottima qualità dell'immagine, con una dose radiante erogata inferiore alle scansioni standard, senza tuttavia perdere qualità dell'immagine. È stato possibile realizzare con la stampante 3D parti anatomiche semplici di tessuto osseo (quali falangi, vertebre) che riproducessero fedelmente la morfologia dell'immagine TC. Tali prototipi sono stati inizialmente realizzati con un biomateriale altamente osteoconduttivo a base di calcio fosfato, che mima più fedelmente la composizione chimica dell'osso naturale (fosfati di calcio e matrice extracellulare) rispetto ad altri biomateriali normalmente utilizzati (polilattico) per l'ingegnerizzazione dei tessuti duri. Questo biomateriale di prima generazione, nonostante i buoni risultati relativi all'architettura e alla meccanica, ha presentato immediatamente dei problemi di processazione e valutazione istologica che sono attualmente oggetto di approfondimento da parte della ditta produttrice. Pertanto siamo stati costretti ad utilizzare un biomateriale più semplice quale l'idrogel che presenta anche caratteristiche di duttilità intrinseche essendo una struttura più facilmente iniettabile nella zona di frattura. Si è scelto un idrogel a base di fibroina della seta, per le sue note buone capacità di rigenerazione tissutale.

La fibroina della seta si è dimostrata un materiale molto utile nella realizzazione di scaffolds in quanto costituisce, assieme alla gelatina, un bioink la cui formulazione è stampabile attraverso la tecnica del 3D bioprinting.

Partendo dagli studi del gruppo indiano (Chawla et al. 2017), è stato caratterizzato il bioink dal punto di vista reologico attraverso prove al reometro. Questo ha permesso di produrre strutture 3D a morfologia definita, sia macroscopicamente, sia a livello di architettura interna, superando quelli che sono i limiti dei principali approcci di fabbricazione impiegati con questo biomateriale, come ad esempio la fabbricazione di scaffolds porosi pre-fabbricati attraverso l'inclusione di sali nel materiale (salt leaching). Dal punto di vista biologico, si confermano le qualità intrinseche della seta di ricreare un microambiente adatto alla vitalità

cellulare. La seta, biomateriale completamente naturale, ha permesso alle cellule di aderire, essere vitali e proliferare a tutti i tempi sperimentali. Si è dimostrato che lo scaffold costituito da SeGeTi permette il differenziamento delle MSCs in senso osteogenico in presenza di fattori osteoinduttivi e che tale processo viene migliorato quando si inserisce il CaCl_2 nel bioink. Il calcio è uno dei fattori chiave per indurre questo fenomeno in popolazioni cellulari mesenchimali. Questi esperimenti, se pur preliminari, confermano dunque che lo scaffold a base di fibroina di seta e gelatina è un ottimo biomateriale per la vitalità e il differenziamento delle MSCs in senso osteogenico e potrebbe essere impiegato nei difetti ossei post-traumatici evoluti in pseudoartrosi.

Uno dei principali limiti emersi dalla TC a doppia energia in nostro possesso è di non poter associare il sistema GSI di riduzione degli artefatti, con il sistema di riduzione della dose VEO. Per quanto riguarda l'architettura degli scaffolds, possono comparire alcuni limiti di realizzazione in base alle dimensioni del difetto osseo da riempire e della sua complessità nel poter essere perfettamente complementari. In un eventuale valutazione sul paziente sono inoltre da considerare anche alcune variabili metaboliche (scarsa vascolarizzazione, età avanzata, ecc) che risultano attualmente difficilmente riproducibili in vitro ma che condizionano enormemente la risposta in senso di rigenerazione ossea nella sede di pseudoartrosi.

Ulteriori studi saranno necessari impiegando macchine diagnostiche ancora più performanti e con la capacità di dettagliare ancora meglio i difetti ossei mediante nuovi software in commercio. Potranno essere sviluppati anche altri materiali, come supporto alla tenacità del bioink. In modo analogo, potrebbe risultare di interesse combinare la fibroina di seta + gelatina con il PEG, per formulare un bioink che riesca a mostrare proprietà meccaniche superiori una volta stampato in strutture 3D.

Bibliografia

- Al-Munajjed, A. A., and F. J. O'Brien. 2009. 'Influence of a novel calcium-phosphate coating on the mechanical properties of highly porous collagen scaffolds for bone repair', *J Mech Behav Biomed Mater*, 2: 138-46.
- Altman, G. H., F. Diaz, C. Jakuba, T. Calabro, R. L. Horan, J. Chen, H. Lu, J. Richmond, and D. L. Kaplan. 2003. 'Silk-based biomaterials', *Biomaterials*, 24: 401-16.
- Alvarez RE, Macovski A. Energy-selective re- constructions in x-ray computerized tomography. *Phys Med Biol* 1976;21(5):733–744.
- Azar, Daniel F. 2015. Targeting Acute Myeloid Leukemia Cells with Novel Photosensitive Ruthenium-Based Metal-Organic Compounds.
- Bernhard, Mueller. 2012. 'Additive Manufacturing Technologies – Rapid Prototyping to Direct Digital Manufacturing', *Assembly Automation*, 32: null.
- Bianco, P., M. Riminucci, S. Gronthos, and P. G. Robey. 2001. 'Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications', *Stem Cells*, 19: 180-92.
- Blokhuis TJ, Calori MG, Schmidmaier G. Autograft versus BMPs for the treatment of non-unions: What is the evidence? *Injury, Int. J. Care Injured* 44 (2013) S1, S40–S42.
- Bordignon, C., C. Carlo-Stella, M. P. Colombo, A. De Vincentiis, L. Lanata, R. M. Lemoli, F. Locatelli, A. Olivieri, D. Rondelli, P. Zanon, and S. Tura. 1999. 'Cell therapy: achievements and perspectives', *Haematologica*, 84: 1110-49.
- Calori MG, Capanna R, Colombo M, Cost effectiveness of tibial nonunion treatment: A comparison between rhBMP-7 and autologous bone graft in two Italian centres *Injury, Int. J. Care Injured* 44 (2013) 1871–1879.
- Cao, Hong, and Noboru Kuboyama. 2010. 'A biodegradable porous composite scaffold of PGA/beta-TCP for bone tissue engineering', *Bone*, 46: 386-95.
- Cao, Yang, and Bochu Wang. 2009. 'Biodegradation of Silk Biomaterials', *International Journal of Molecular Sciences*, 10: 1514.
- Chan, B. P., and K. W. Leong. 2008. 'Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations', *European Spine Journal*, 17: 467-79.
- Chawla, Shikha, Aditi Kumar, Prasad Admane, Amitabha Bandyopadhyay, and Sourabh Ghosh. 2017. 'Elucidating role of silk-gelatin bioink to recapitulate articular cartilage differentiation in 3D bioprinted constructs', *Bioprinting*, 7: 1-13.
- Conrad, Claudius, and Ralf Huss. 2000. 'Adult stem cell lines in regenerative medicine and reconstructive surgery', *Journal of Surgical Research*, 124: 201-08.
- Costa, João Bebiano, Helder Pereira, João Espregueira-Mendes, Gilson Khang, Joaquim Miguel Oliveira, and Rui Luis Reis. 2017. 'Tissue engineering in orthopaedic sports medicine: current concepts', *Journal of ISAKOS: Joint Disorders & Orthopaedic Sports Medicine*.
- Das, Sanskrita, Falguni Pati, Shibu Chameettachal, Shikha Pahwa, Alok R. Ray, Santanu Dhara, and Sourabh Ghosh. 2013. 'Enhanced Redifferentiation of Chondrocytes on Microperiodic Silk/Gelatin Scaffolds: Toward Tailor-Made Tissue Engineering', *Biomacromolecules*, 14: 311-21.
- Diomedede, F., A. Gugliandolo, D. Scionti, I. Merciaro, M. F. Cavalcanti, E. Mazzon, and O. Trubiani. 2018. 'Biotherapeutic Effect of Gingival Stem Cells Conditioned Medium in Bone Tissue Restoration', *Int J Mol Sci*, 19.
- Doillon, C. J., C. F. Whyne, S. Brandwein, and F. H. Silver. 1986. 'Collagen-based wound dressings: control of the pore structure and morphology', *J Biomed Mater Res*, 20: 1219-28.
- Eosoly, S., D. Brabazon, S. Lohfeld, and L. Looney. 2010. 'Selective laser sintering of hydroxyapatite/poly-epsilon-caprolactone scaffolds', *Acta Biomater*, 6: 2511-7.
- Friedlaender GE, Perry CR, Cole JD, et al. Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in the treatment of tibialnonunions. *J Bone Joint Surg* 2001; 83-A Suppl 1(Pt 2): S151-8.
- Gabusi, Elena, Cristina Manferdini, Francesco Grassi, and Gina Lisignoli. 2012. 'Extracellular calcium chronically induced human osteoblasts effects: Specific modulation of osteocalcin and collagen type XV'.
- Ghosh, Sourabh, Sara T. Parker, Xianyan Wang, David L. Kaplan, and Jennifer A. Lewis. 2008. 'Direct-Write Assembly of Microperiodic Silk Fibroin Scaffolds for Tissue Engineering Applications', *Advanced Functional Materials*, 18: 1883-89.
- Grimaud, E., D. Heymann, and F. Redini. 2002. 'Recent advances in TGF-beta effects on chondrocyte metabolism. Potential therapeutic roles of TGF-beta in cartilage disorders', *Cytokine Growth Factor Rev*, 13: 241-57.

- Hak DJ, Fitzpatrick D, Bishop JA, Marsh JL, Tilp S, Schnettler R, Simpson H, Alt V Delayed union and nonunions: epidemiology, clinical issues, and financial aspects. *Injury*. 2014 Jun;45 Suppl 2:S3-7.
- Herman, G. T., *Fundamentals of computerized tomography: Image reconstruction from projection*, 2nd edition, Springer, 2009
- Herzog, Erica L., Li Chai, and Diane S. Krause. 2003. 'Plasticity of marrow-derived stem cells', *Blood*, 102: 3483-93.
- Hockaday, Laura. 2015. '3D Bioprinting: A Deliberate Business', *Genetic Engineering & Biotechnology News*, 35: 14-17.
- Hollister, Scott J. 2005. 'Porous scaffold design for tissue engineering', *Nature Materials*, 4: 518.
- Holzwarth, Jeremy M., and Peter X. Ma. 2011. 'Biomimetic nanofibrous scaffolds for bone tissue engineering', *Biomaterials*, 32: 9622-29.
- Hounsfield GN. Computerized transverse axial scanning (tomography). I. Description of system. *Br J Radiol* 1973;46(552):1016– 1022.
- Huang, B., G. Caetano, C. Vyas, J. J. Blaker, C. Diver, and P. Bartolo. 2018. 'Polymer- Ceramic Composite Scaffolds: The Effect of Hydroxyapatite and beta-tri-Calcium Phosphate', *Materials (Basel)*, 11.
- Hutmacher, D. W. 2000. 'Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage', *Biomaterials*, 21: 2529-43.
- Hutmacher, D. W., J. T. Schantz, C. X. Lam, K. C. Tan, and T. C. Lim. 2007. 'State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective', *J Tissue Eng Regen Med*, 1: 245-60.
- Hutmacher, Dietmar W., Michael Sittinger, and Makarand V. Risbud. 2004. 'Scaffold-based tissue engineering: rationale for computer-aided design and solid free-form fabrication systems', *Trends in Biotechnology*, 22: 354-62.
- Ikada, Yoshito. 2006. 'Challenges in tissue engineering', *Journal of the Royal Society Interface*, 3: 589-601.
- Kalender WA, Klotz E, Suess C. Vertebral bone mineral analysis: an integrated approach with CT. *Radiology* 1987;164(2):419– 423 - Kalender WA, Perman WH, Vetter JR, Klotz E. Evaluation of a prototype dual- energy computed tomographic apparatus. I. Phantom studies. *Med Phys* 1986;13(3): 334–339.
- Kelly, C. N., A. T. Miller, S. J. Hollister, R. E. Guldberg, and K. Gall. 2017. 'Design and Structure-Function Characterization of 3D Printed Synthetic Porous Biomaterials for Tissue Engineering', *Adv Healthc Mater*.
- Khademhosseini, Ali, Robert Langer, Jeffrey Borenstein, and Joseph P. Vacanti. 2006. 'Microscale technologies for tissue engineering and biology', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 2480-87.
- Kotobuki, Noriko, Motohiro Hirose, Yoshinori Takakura, and Hajime Ohgushi. 2004. 'Cultured Autologous Human Cells for Hard Tissue Regeneration: Preparation and Characterization of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow', *Artificial Organs*, 28: 33-39.
- Koutsopoulos, S. 2002. 'Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: a review study on the analytical methods', *J Biomed Mater Res*, 62: 600-12.
- Langer, R., and J. P. Vacanti. 1995. 'Artificial organs', *Sci Am*, 273: 130-3.
- Lawrence, D. A. 1996. 'Transforming growth factor-beta: a general review', *European cytokine network*, 7: 363-74.
- Lehmann LA, Alvarez RE, Macovski A, et al. Generalized image combinations in dual KVP digital radiography. *Med Phys* 1981;8(5):659– 667.
- Li, Mingzhong, Masayo Ogiso, and Norihiko Minoura. 2003. 'Enzymatic degradation behavior of porous silk fibroin sheets', *Biomaterials*, 24: 357-65.
- Loeffler BJ, Kellam JF, Sims SH, Bosse MJ Prospective observational study of donor-site morbidity following anterior iliac crest bone-grafting in orthopaedic trauma reconstruction patients. *J Bone Joint Surg Am*. 2012 Sep 19;94(18):1649-54.
- Lu, Y., G. Mapili, G. Suhali, S. Chen, and K. Roy. 2006. 'A digital micro-mirror device- based system for the microfabrication of complex, spatially patterned tissue engineering scaffolds', *J Biomed Mater Res A*, 77: 396-405.
- Macovski A, Alvarez RE, Chan JL, Ston- estrom JP, Zatz LM. Energy dependent reconstruction in x-ray computerized tomography. *Comput Biol Med* 1976;6(4): 325–336.
- Mandrycky, Christian, Zongjie Wang, Keekyoung Kim, and Deok-Ho Kim. 2016. '3D bioprinting for engineering complex tissues', *Biotechnology Advances*, 34: 422-34.
- Mao, Angelo S., and David J. Mooney. 2015. 'Regenerative medicine: Current therapies and future directions', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112: 14452.
- McCullough CH, Leng S, Yu L, Fletcher JG. Dual- and Multi-Energy CT: Principles, Technical Approaches, and Clinical Applications. *Radiology*. 2015 Sep;276(3):637-53. doi: 10.1148/radiol.2015142631. Review. PubMed PMID: 26302388. PubMed Central PMCID: PMC4557396.

- Melchels, Ferry P. W., Jan Feijen, and Dirk W. Grijpma. 2010. 'A review on stereolithography and its applications in biomedical engineering', *Biomaterials*, 31: 6121-30.
- Melke, J., S. Midha, S. Ghosh, K. Ito, and S. Hofmann. 2016a. 'Silk fibroin as biomaterial for bone tissue engineering', *Acta Biomater*, 31: 1-16.
- Melke, Johanna, Swati Midha, Sourabh Ghosh, Keita Ito, and Sandra Hofmann. 2016b. 'Silk fibroin as biomaterial for bone tissue engineering', *Acta Biomaterialia*, 31: 1-16.
- Midha, Swati, Rohit Tripathi, Hua Geng, Peter D. Lee, and Sourabh Ghosh. 2016. 'Elucidation of differential mineralisation on native and regenerated silk matrices', *Materials Science and Engineering: C*, 68: 663-74.
- Minguell, J.J., P. Conget, and A. Erices. 2000. 'Biology and clinical utilization of mesenchymal progenitor cells', *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 33: 881-87.
- Minoura, N., S. I. Aiba, M. Higuchi, Y. Gotoh, M. Tsukada, and Y. Imai. 1995. 'Attachment and Growth of Fibroblast Cells on Silk Fibroin', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 208: 511-16.
- Mota, Carlos, Dario Puppi, Federica Chiellini, and Emo Chiellini. 2015. 'Additive manufacturing techniques for the production of tissue engineering constructs', *J Tissue Eng Regen Med*, 9: 174-90.
- Murphy, Sean V., and Anthony Atala. 2014. '3D bioprinting of tissues and organs', *Nature Biotechnology*, 32: 773.
- Neame, P. J., H. Tapp, and A. Azizan. 1999. 'Noncollagenous, nonproteoglycan macromolecules of cartilage', *Cell Mol Life Sci*, 55: 1327-40.
- Numata, Keiji, Peggy Cebe, and David L. Kaplan. 2010. 'Mechanism of enzymatic degradation of beta-sheet crystals', *Biomaterials*, 31: 2926-33.
- O'Brien, Fergal J. 2011. 'Biomaterials & scaffolds for tissue engineering', *Materials Today*, 14: 88-95.
- Park, S. A., S. H. Lee, and W. D. Kim. 2011. 'Fabrication of porous polycaprolactone/hydroxyapatite (PCL/HA) blend scaffolds using a 3D plotting system for bone tissue engineering', *Bioprocess Biosyst Eng*, 34: 505-13.
- Pepper, M. E., V. Seshadri, T. Burg, B. W. Booth, K. J. L. Burg, and R. E. Groff. 2011. "Cell settling effects on a thermal inkjet bioprinter." In 2011 Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, 3609-12.
- Pérez-Rigueiro, J., M. Elices, J. Llorca, and C. Viney. 2002. 'Effect of degumming on the tensile properties of silkworm (*Bombyx mori*) silk fiber', *Journal of Applied Polymer Science*, 84: 1431-37.
- Piez, K. A. 1997. 'History of extracellular matrix: a personal view', *Matrix Biol*, 16: 85-92. Poole, A. R., T. Kojima, T. Yasuda, F. Mwale, M. Kobayashi, and S. Laverty. 2001. 'Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair', *Clin Orthop Relat Res*: S26-33.
- Ringburg AN, Polinder S, van Ierland MC, et al. Prevalence and prognostic factors of disability after major trauma. *J Trauma* 2011; 70(4): 916-22.
- Rockwood, Danielle N., Rucsanda C. Preda, Tuna Yücel, Xiaoqin Wang, Michael L. Lovett, and David L. Kaplan. 2011. 'Materials Fabrication from *Bombyx mori* Silk Fibroin', *Nature protocols*, 6: 10.1038/nprot.2011.379.
- Sahu, Neety, Prakash Baligar, Swati Midha, Banani Kundu, Sourabh Ghosh, and Asok Mukhopadhyay. 2015. 'Nonmulberry Silk Fibroin Scaffold Shows Superior Osteoconductivity Than Mulberry Silk Fibroin in Calvarial Bone Regeneration', *Adv Healthc Mater*, 4: 1709-21.
- Samavedi, S., A. R. Whittington, and A. S. Goldstein. 2013. 'Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: a review of properties and their influence on cell behavior', *Acta Biomater*, 9: 8037-45.
- Suntornnond, Ratima, Edgar Yong Sheng Tan, Jia An, and Chee Kai Chua. 2016. 'A Mathematical Model on the Resolution of Extrusion Bioprinting for the Development of New Bioinks', *Materials*, 9: 756.
- Sutherland, Tara D., James H. Young, Sarah Weisman, Cheryl Y. Hayashi, and David J. Merritt. 2009. 'Insect Silk: One Name, Many Materials', *Annual Review of Entomology*, 55: 171-88.
- Tuan, R. S. 2004. 'Biology of developmental and regenerative skeletogenesis', *Clin Orthop Relat Res*: S105-17.
- Tuan, Rocky S., Genevieve Boland, and Richard Tuli. 2002. 'Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering', *Arthritis Res Ther*, 5: 32.
- Tyler, B., D. Gullotti, A. Mangraviti, T. Utsuki, and H. Brem. 2016. 'Polylactic acid (PLA) controlled delivery carriers for biomedical applications', *Adv Drug Deliv Rev*, 107: 163-75.
- Vacanti, C. A. 2006. 'The history of tissue engineering', *J Cell Mol Med*, 10: 569-76. Vacanti, C., and J. Vacanti. 2000. 'The science of tissue engineering', *Orthop Clin North Am*, 31: 351-6.

- Vacanti, Joseph P., Jean-Bernard Otte, and Jason A. Wertheim. 2014. 'Chapter 1 - Introduction: Regenerative Medicine and Solid Organ Transplantation from a Historical Perspective A2 - Orlando, Giuseppe.' in Jan Lerut, Shay Soker and Robert J. Stratta (eds.), *Regenerative Medicine Applications in Organ Transplantation* (Academic Press: Boston).
- Van Damme, A., T. Vanden Driessche, D. Collen, and M. K. Chuah. 2002. 'Bone marrow stromal cells as targets for gene therapy', *Curr Gene Ther*, 2: 195-209.
- Vozzi, G., A. Previti, D. De Rossi, and A. Ahluwalia. 2002. 'Microsyringe-based deposition of two-dimensional and three-dimensional polymer scaffolds with a well-defined geometry for application to tissue engineering', *Tissue Eng*, 8: 1089-98.
- Vozzi, Giovanni, Christopher Flaim, Arti Ahluwalia, and Sangeeta Bhatia. 2003. 'Fabrication of PLGA scaffolds using soft lithography and microsyringe deposition', *Biomaterials*, 24: 2533-40.
- Vroman, Isabelle, and Lan Tighzert. 2009. 'Biodegradable Polymers', *Materials*, 2: 307. Williams, D.F., and European Society for Biomaterials. 1987. *Definitions in Biomaterials: Proceedings of a Consensus Conference of the European Society for Biomaterials*, Chester, England, March 3-5, 1986 (Elsevier).
- Wu, Linbo, and Jiandong Ding. 2004. 'In vitro degradation of three-dimensional porous poly(d,l-lactide-co-glycolide) scaffolds for tissue engineering', *Biomaterials*, 25: 5821-30.
- Wu, Shuilin, Xiangmei Liu, Kelvin W. K. Yeung, Changsheng Liu, and Xianjin Yang. 2014. "Biomimetic porous scaffolds for bone tissue engineering", *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 80: 1-36.
- Xiao, Yong-Tao, Li-Xin Xiang, and Jian-Zhong Shao. 2007. 'Bone morphogenetic protein', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 362: 550-53. 79
- Yoo, Jung U., and BRIAN JOHNSTONE. 1998. 'The Chondrogenic Potential of Human Bone-Marrow-Derived Mesenchymal Progenitor Cells*', *JBJS*, 80: 1745-57.
- Zhou, Wen, Min Wang, Wai Lam Cheung, and Wing Yuk Ip. 2010. *Selective Laser Sintering of Poly(L-Lactide)/Carbonated Hydroxyapatite Nanocomposite Porous Scaffolds for Bone Tissue Engineering*.