

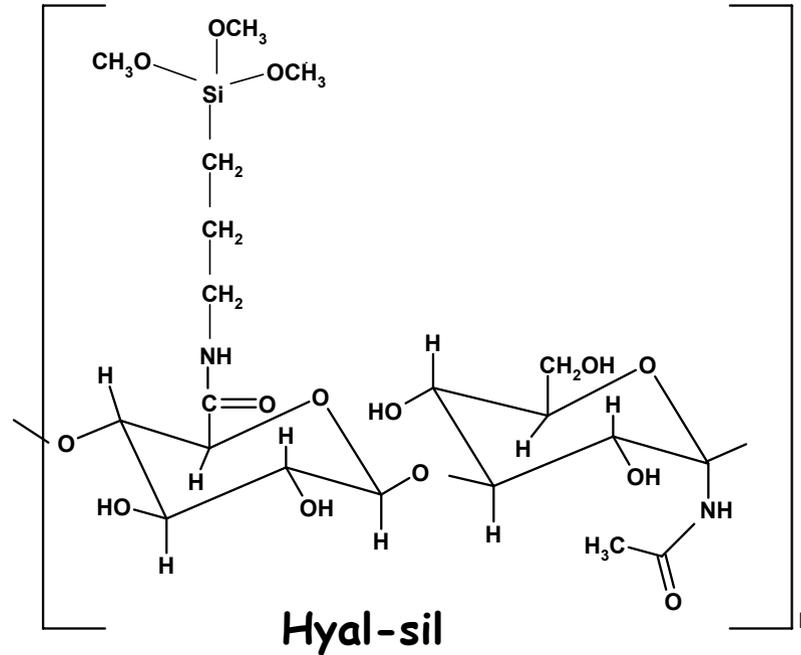
*Fabrication of micro and nano-structured
materials and study of their biomedical
application*

Workpackage 1
Soft tissue

Research Unit C.R.I.S.M.A

Università di Siena

Polimero per la funzionalizzazione di superficie (glass)



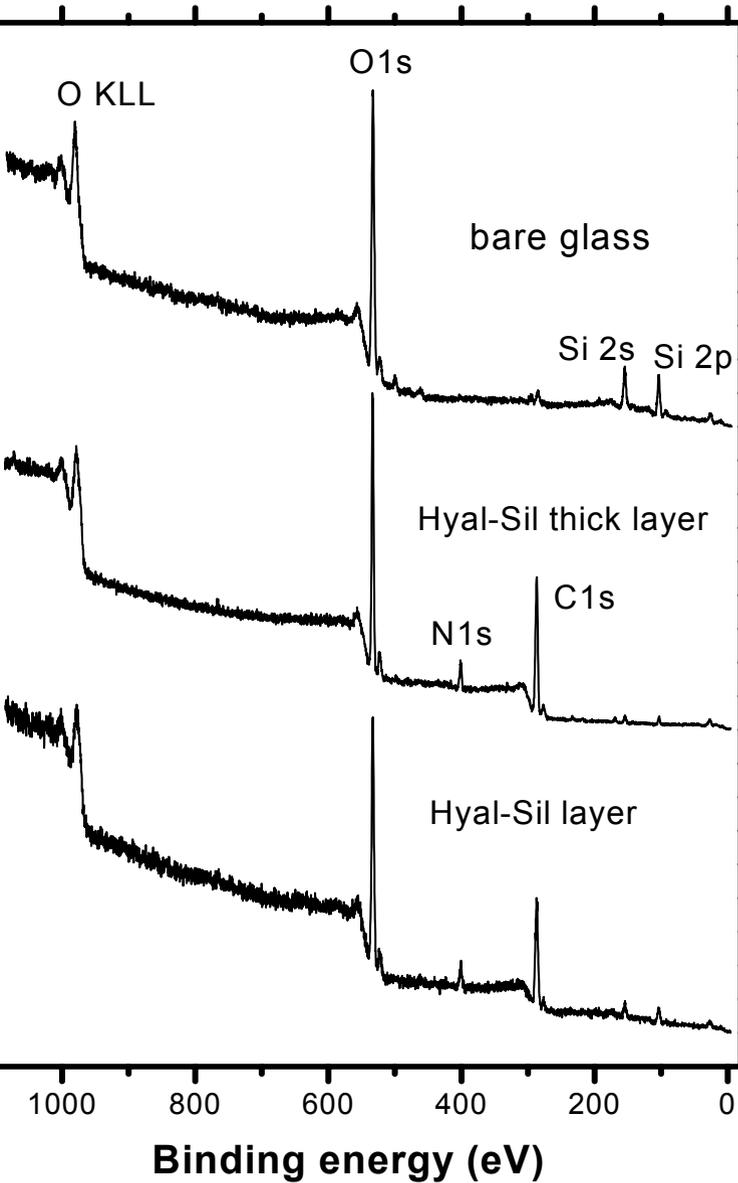
Analisi elementare

Element	Determined composition (3 days of dialysis)	Determined composition (7 days of dialysis)
C	37.39%	34.91%
H	6.74%	6.57%
N	6.57%	5.43%
O	44.30%	39.0%
Si	3.38%	1.90%

Grafting ratio about 20%

Ratio N/Si = 6

Hyal-Sil layer: analisi XPS



Sample	% O 1s	% N 1s	% K 2p	% C 1s	% Si 2p
Bare glass	71.6	=	1.1	6.4	20.9
Hyal-sil modified glass	40.6	5.9	=	48.6	4.9
Hyal-sil thick layer	37.7	7.3	=	53.6	1.6

Hyal_sil monolayer
Ratio Si/N = 0.83
Ratio Si/C = 0.10

Hyal_sil thick layer
Ratio Si/N = 0.21
Ratio N/Si = 4.9
Ratio Si/C = 0.032
Ratio C/Si = 31,2

Bare cleaned glass
Ratio C/Si = 0.04
Ratio Si/C = 25.0

Grafting ratio
Hyal_sil 25%

Lo spessore del film è stato calcolato mediante due metodi:

1) Attenuazione segnale del Si2p del substrato dopo ricoprimento con il film

spessore del film calcolato: 23.5\AA

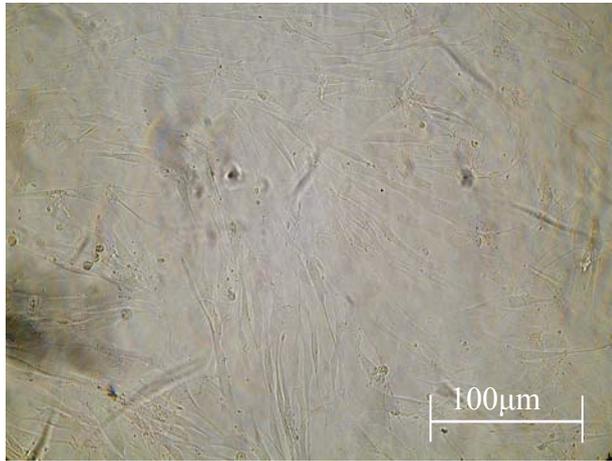
2) In base al rapporto dell'intensità del segnale del C1s e Si2p nello strato spesso e nel monolayer

spessore del film calcolato: 22.0\AA

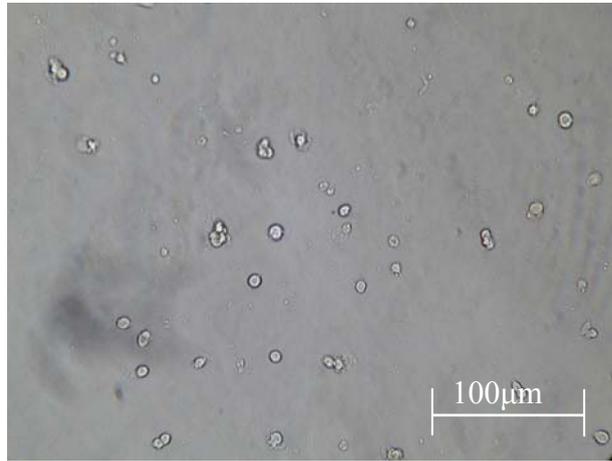
I calcoli sono stati effettuati supponendo che il film sia omogeneamente distribuito sulla superficie.

Si tratta di un monolayer di Hyal_sil

Adesione Fibroblasti Umani



Cleaned glass



Hyal_sil monolayer

Le superfici di Hyal_sil risultano antiadesive

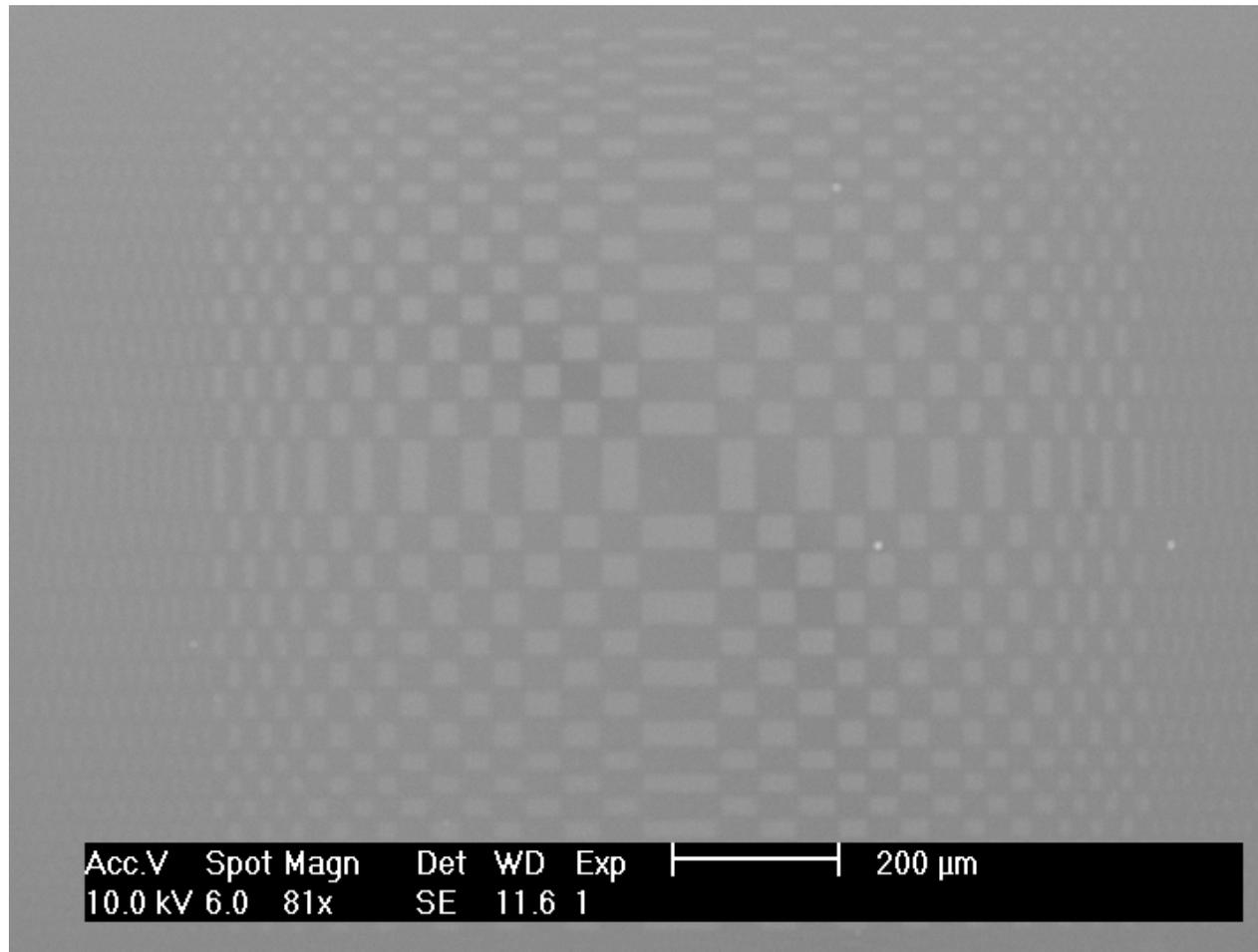
Adsorbimento proteine

Sulle superfici di Hyal-sil non è stata identificata la presenza di proteine del plasma

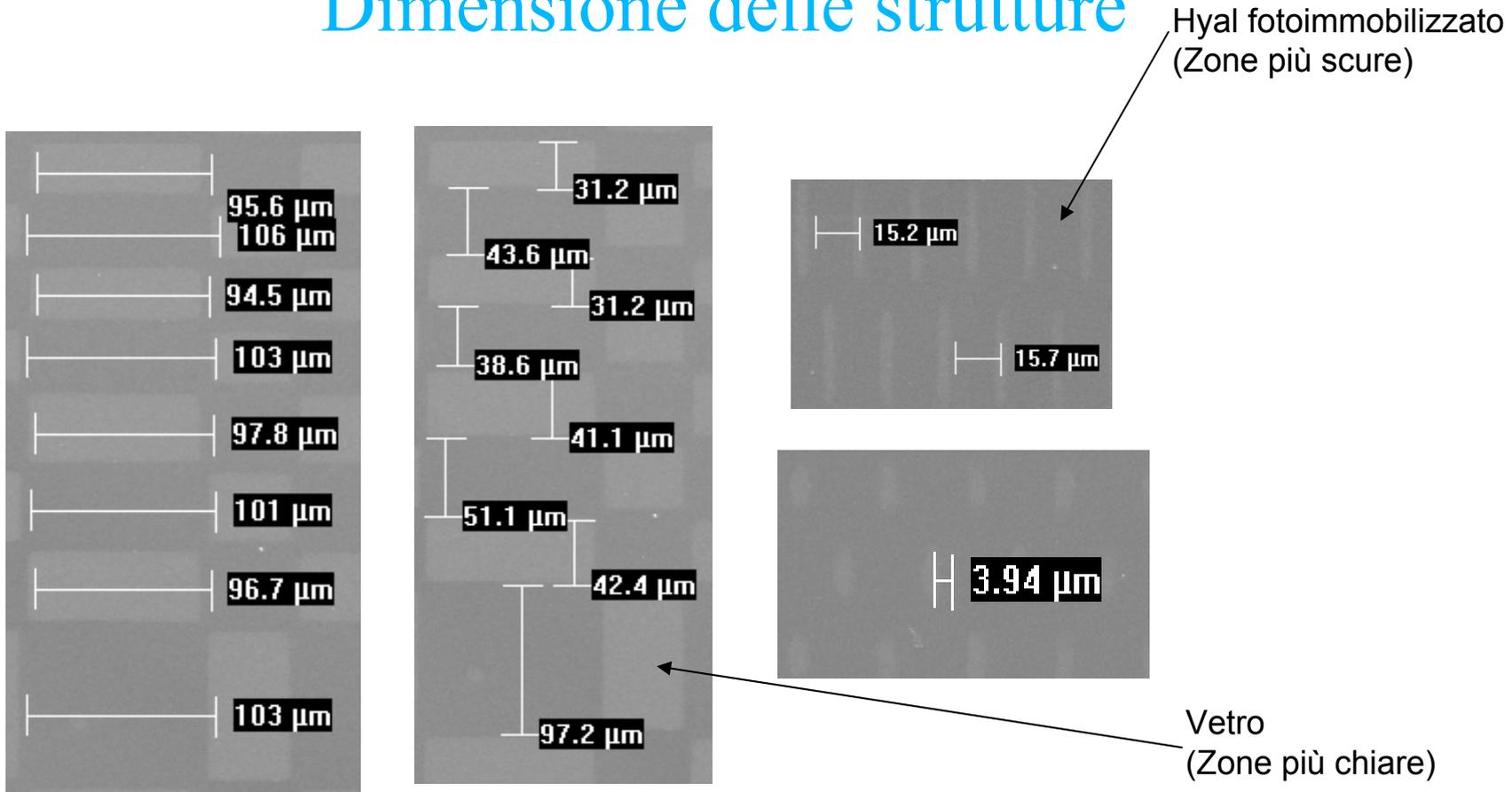
Le superfici sono proteino-resistenti

Interazione cellulare con un
nuovo tipo di pattern con
strutture di diverse dimensioni

Pattern di Hyal fotoimmobilizzato su vetro

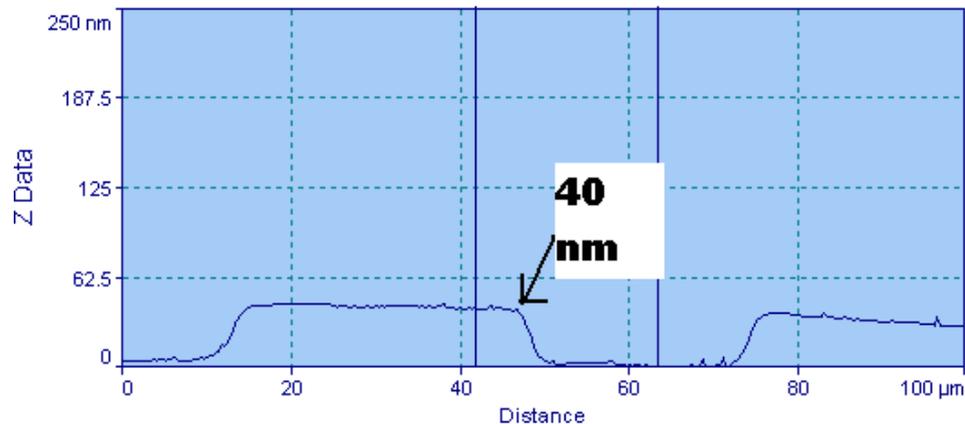
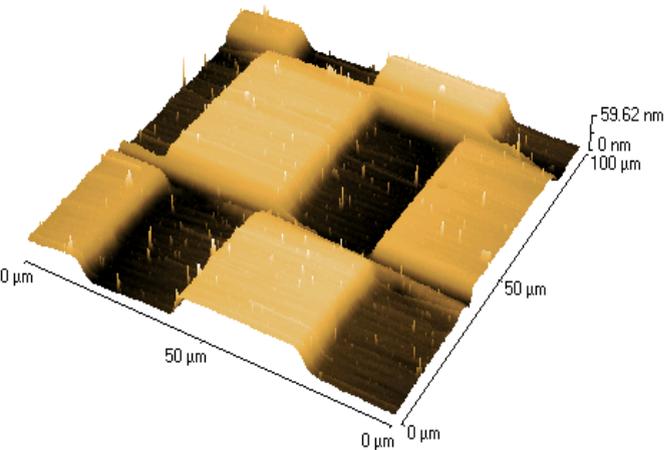
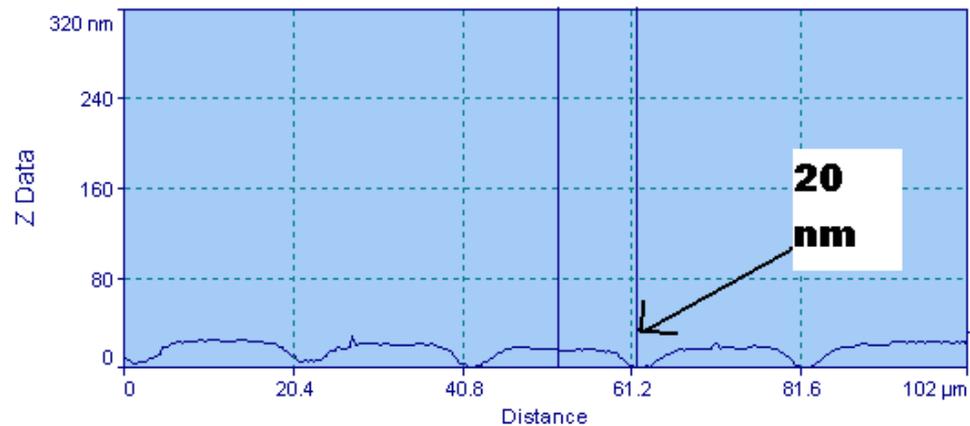
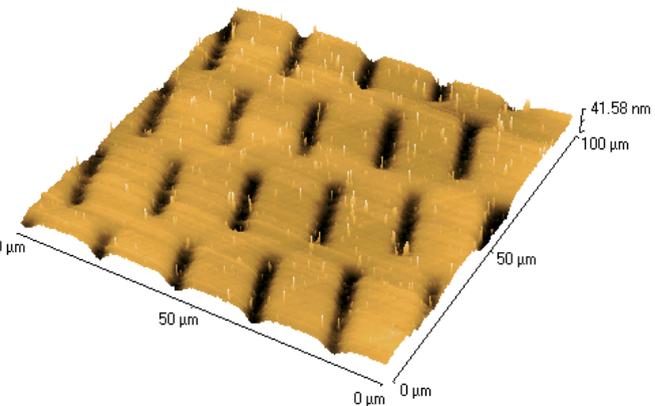


Dimensione delle strutture



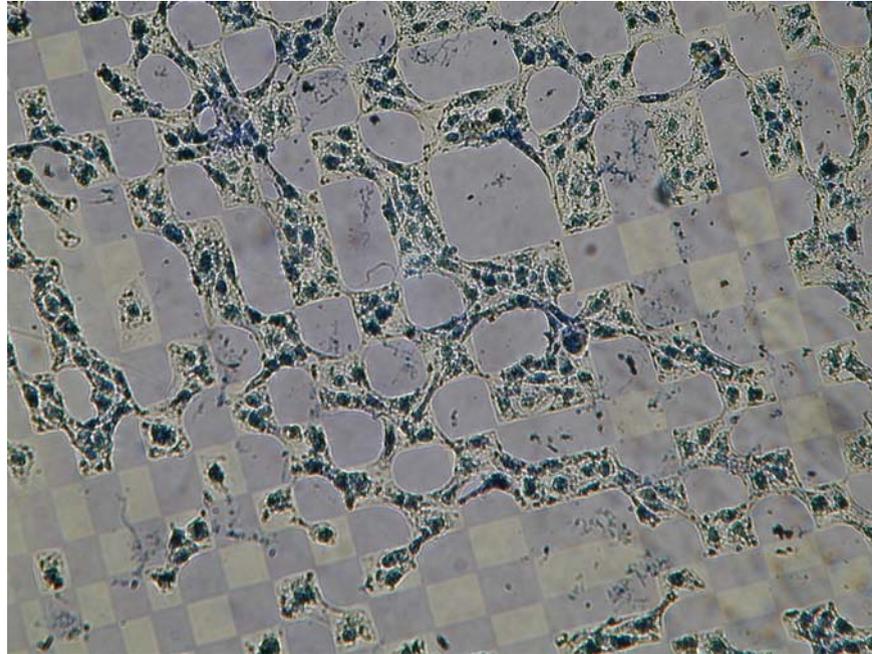
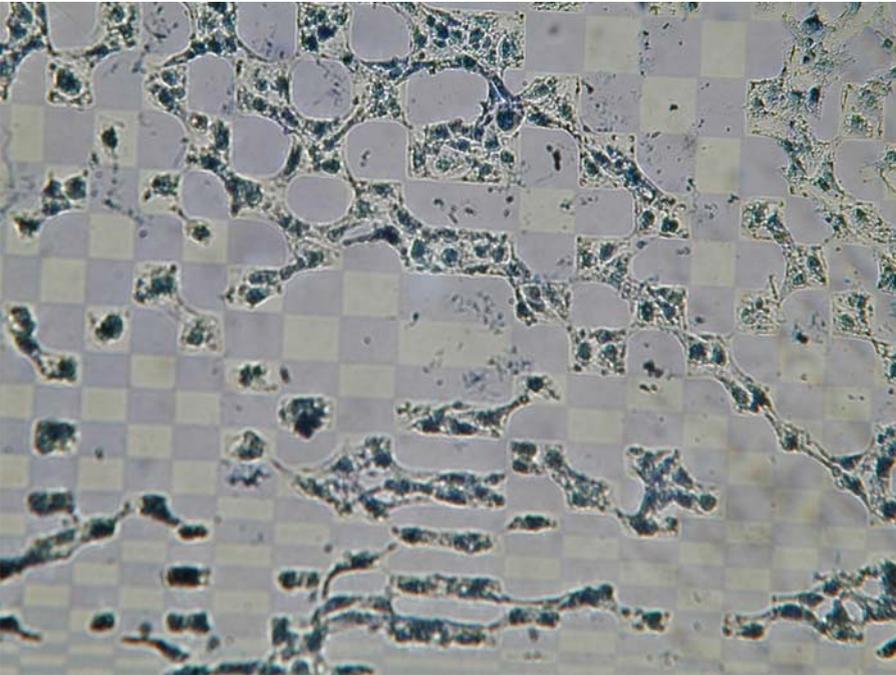
Immagini SEM di alcune delle zone del pattern che mostrano la variabilità nelle dimensioni delle strutture ottenute.

Analisi AFM



Topografie delle microstrutture ottenute con l'AFM in modalità NCM

Cellule endoteliali



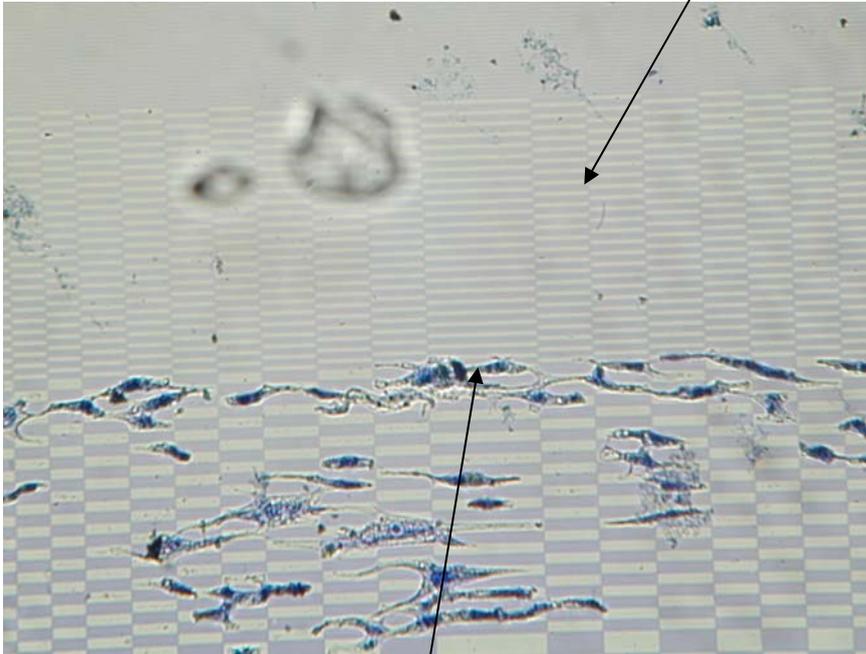
Panoramiche del pattern colorato
Che mostra la distribuzione delle Cellule endoteliali

Comportamento al bordo

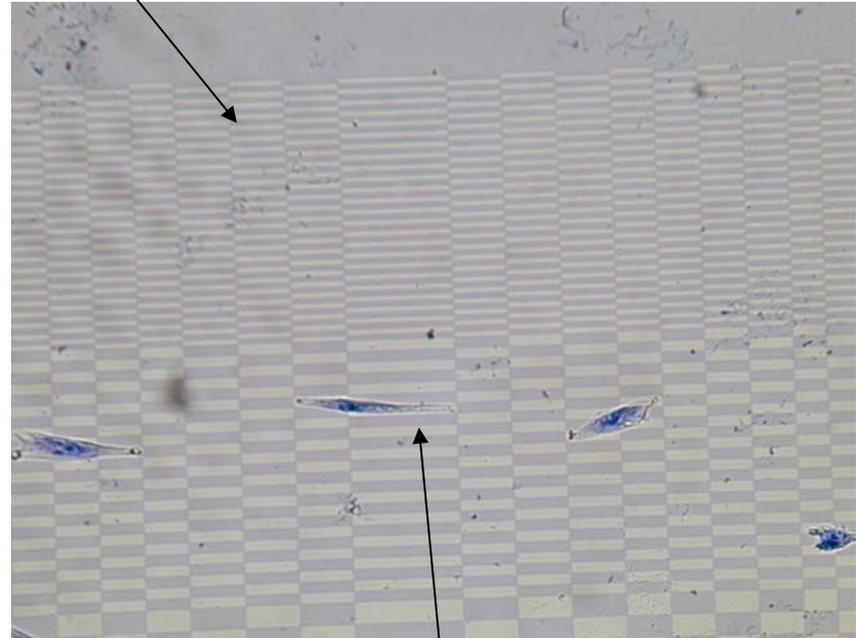
Cellule endoteliali

Quadretti di
circa 4
micron di
spessore

Fibroblasti



Spessore dei quadretti
circa 15 micron

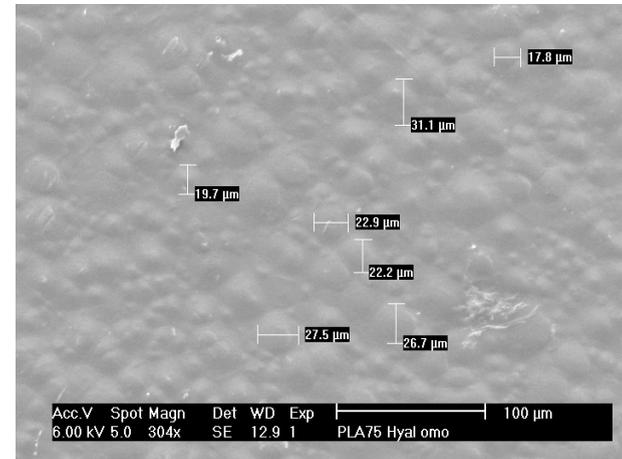
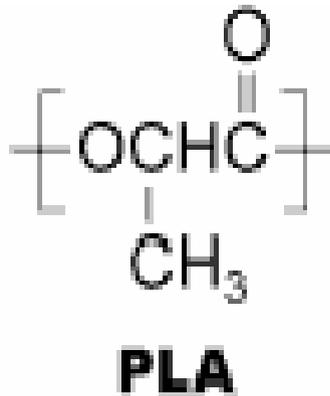


Spessore dei quadretti
circa 15 micron

Superfici microstrutturate Hyal PLA

Scopo: realizzazione di superfici microstrutturate su polimeri riassorbibili per test "in vivo"

La cinetica di degradazione dipende da:
- tipo di stereoisomero,
- purezza,
- cristallinità,
- peso molecolare



In genere, poli-L-lattico degrada più lentamente del poli-D,L-lattico

Film utilizzato per il progetto: ottenuto per casting da soluzione di acido poli-L-lattico in cloroformio.

> MW > 200.000

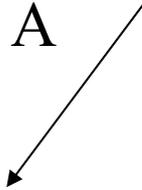
> superficie idrofobica (WCA 70-80°)

> rugosità di superficie ~ 4-5 μm, bumps Ø ~ 20 μm

Fornito da Università di Trento (Prof. Migliaresi)

Pre-trattamenti di superficie

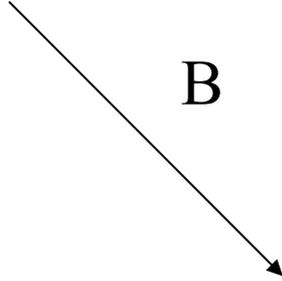
A



Esposizione della superficie alla radiazione UV dopo immersione in H_2O_2 (30% peso) *

- Tempi di esposizione UV scelti:
15min, 45min, 75min

B



Inserimento di gruppi idrofilici via plasma (da fare con film di PLA con rugosità minore)

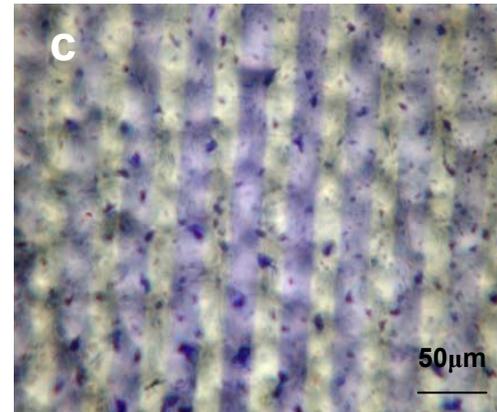
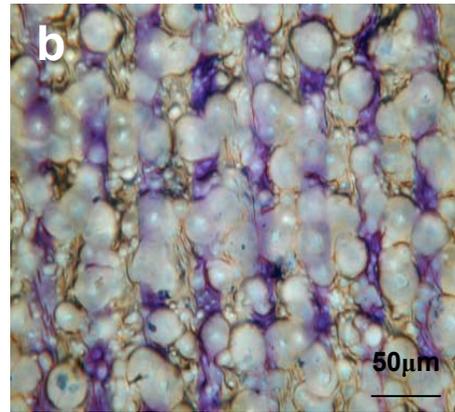
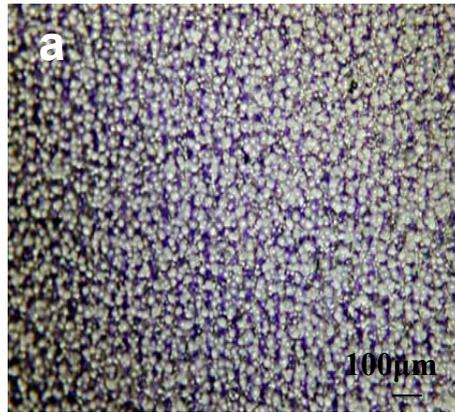
* Ma Z., Gao C, Shen J. Journal of Biomaterials Science, polymer Edition, (2003) vol 14, 1, p 13-25.
Zhu A., Zhang M., Wu J., Shen J. Biomaterials (2002) 23, p. 4657-4665.

Superfici microstrutturate Hyal PLA

Realizzazione di superfici microstrutturate di Hyal su PLA

• Pre-trattamento del PLA: immersione in H_2O_2 UV per 45min

• Fotoimmobilizzazione di Hyal-N3 (1% in H_2O), UV: 30sec

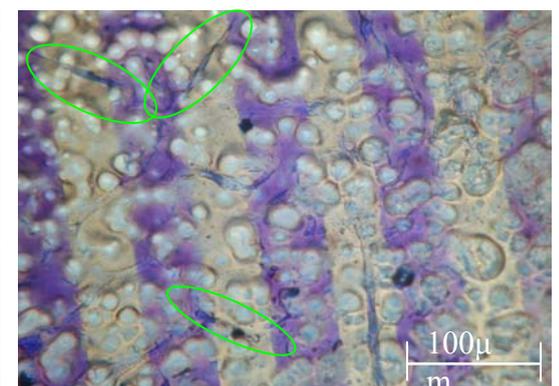
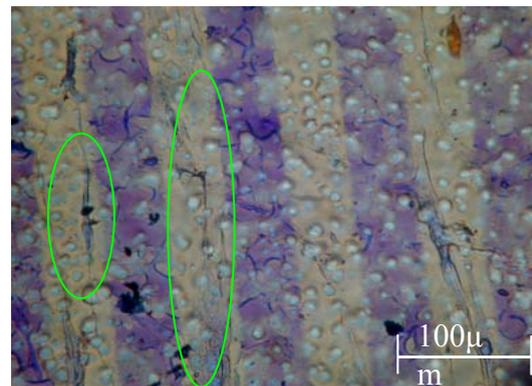
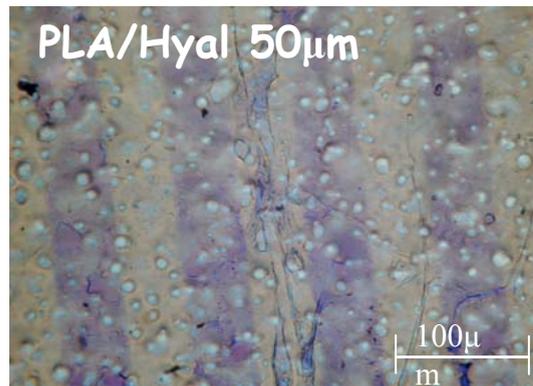
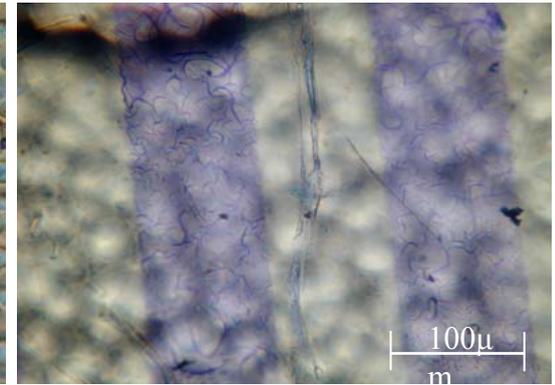
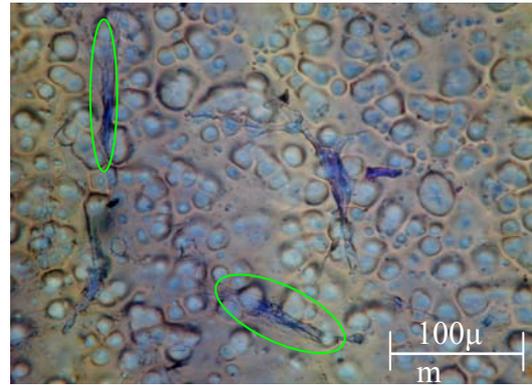
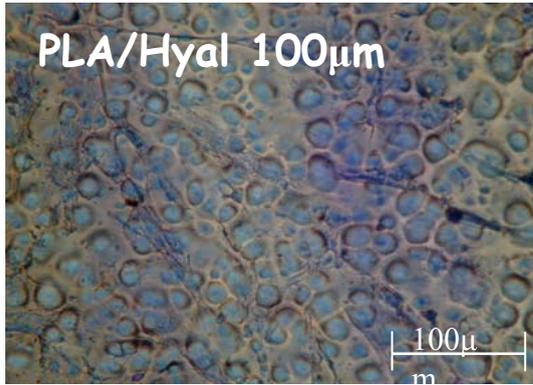
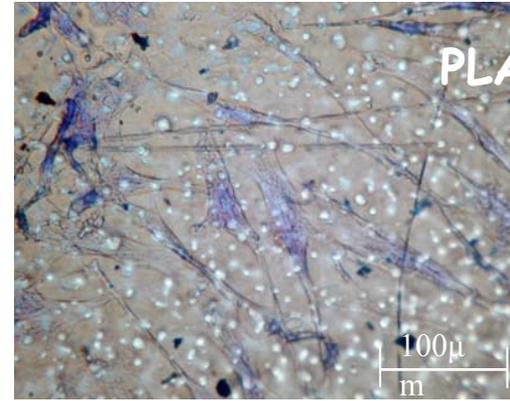


Immagini al microscopio ottico (10X e 40X) di una superficie microstrutturata di Hyal/ PLA dopo colorazione con blu di toluidina

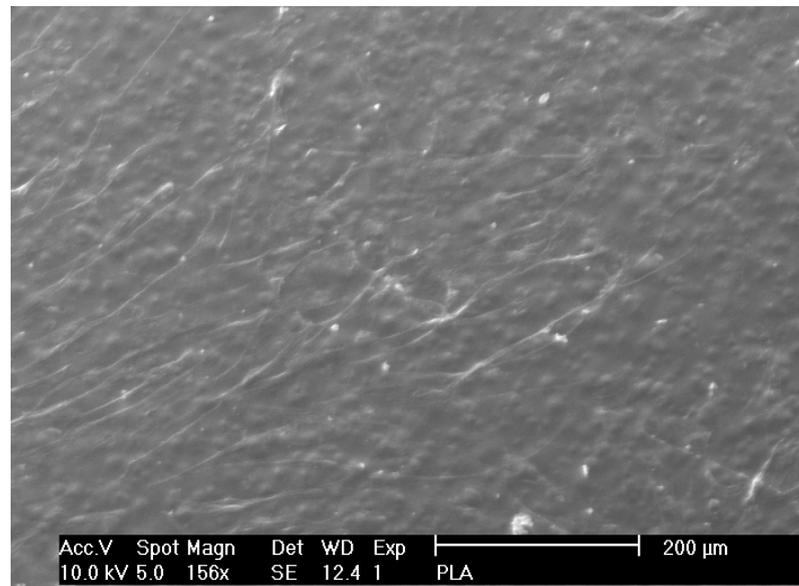
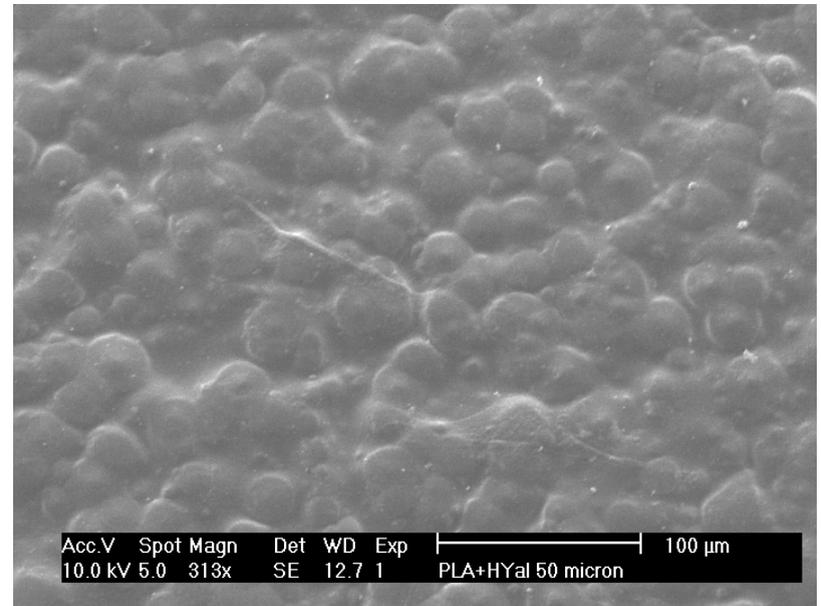
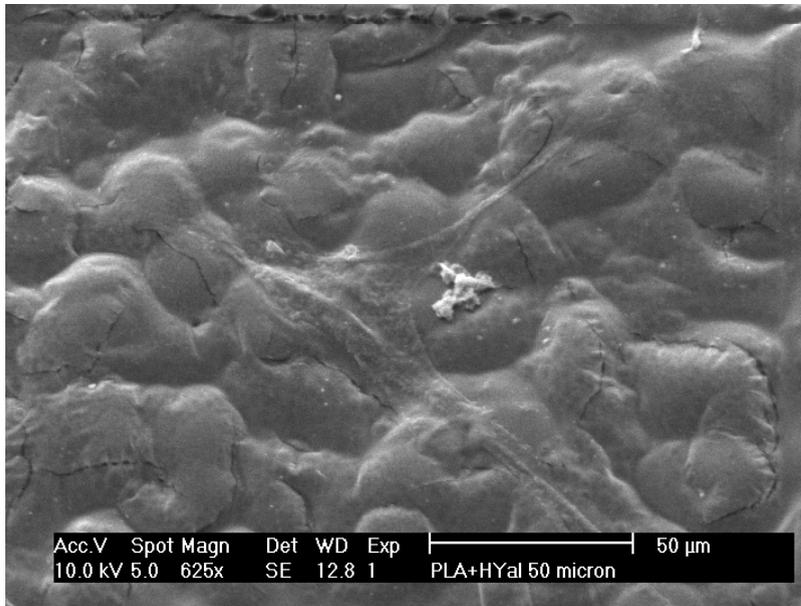
Hyal/PLA strisce 25 μ m

Superfici microstrutturate Hyal/PLA

Esperimento con fibroblasti umani



FIBROBLASTI C54 SU PLA



04/10/2005 Ricevuti da Sorin 4 film di PET+C pirolitico
lotto n 05255/02 (13,5cmx13,5cm)

C.R.I.S.M.A.

PET/C pirolitico (3)

Superfici PET/C pirolitico-Hyal (3)

Scopo: studio adsorbimento proteine plasma

UniSi - Prof Ziche

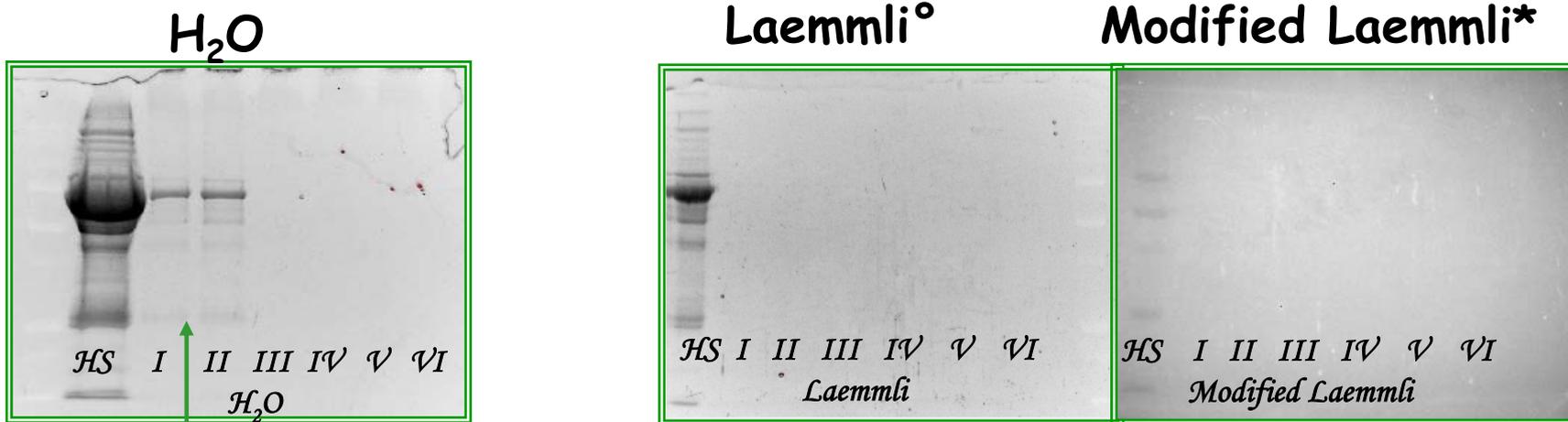
PET/C pirolitico (6+6)

Superfici microstrutturate PET/C pirolitico Hyal 25 μ m (6+6+6)

Scopo: tests "*in vitro*" cellule endoteliali : studio cinetica di adesione (time lapse microscopy), integrine di membrana, espressione delle proteine della matrice

Adsorbimento proteine

Elettroforesi monodimensionale delle proteine plasmatiche adsorbite su una superficie di Hyal fotoimmobilizzato (spessore del film di Hyal ~50nm)



Proteine che interagiscono debolmente con la superficie o in eccesso

Nessuna proteina

° Laemmli buffer (SDS 2%+ glicerolo)

*(SDS 2%+Urea 5M+2-mercaptoethaol 5%)

Hyal non adsorbe proteine

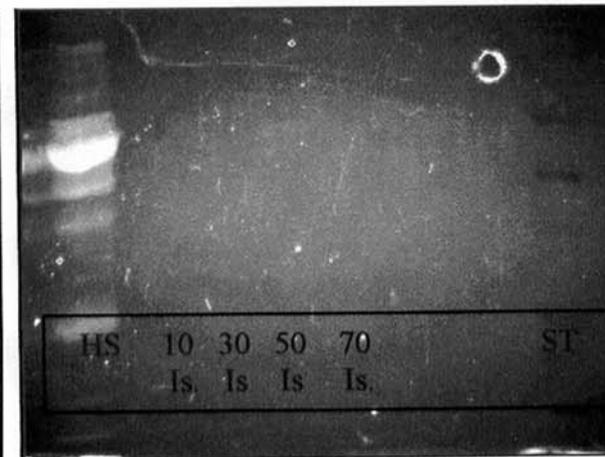
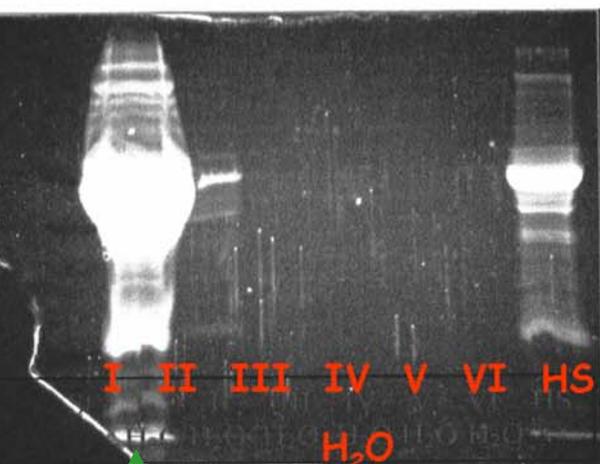
Adsorbimento proteine

Elettroforesi monodimensionale delle proteine plasmatiche adsorbite su una superficie di PET/ C pirolitico "as received"

H₂O

Laemmli°

Isopropanolo



Legenda: HS=siero umano, L=Laemmli, Is =isopropanolo SA= Laemmli buffer, 5% 2-mercaptoetanol, 5M urea

Proteine che interagiscono debolmente con la superficie eluite step 1



Nessuna proteina

L= Laemmli buffer

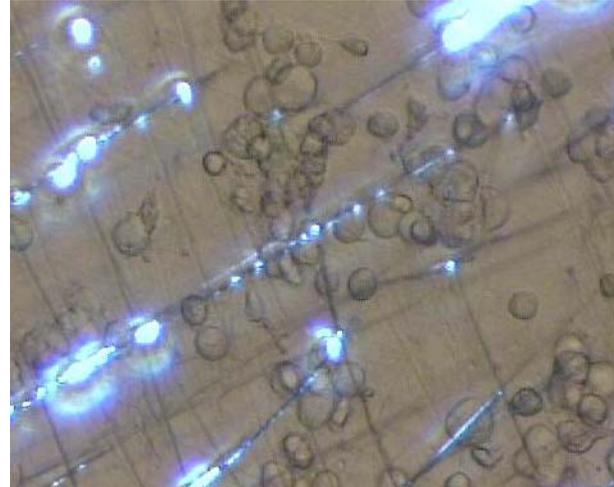
SA = Laemmli buffer+Urea 5M+2-mercaptoethanol 5%)

PET/ C pirolitico non adsorbe proteine

Dopo 5h di coltura



C pirolitico

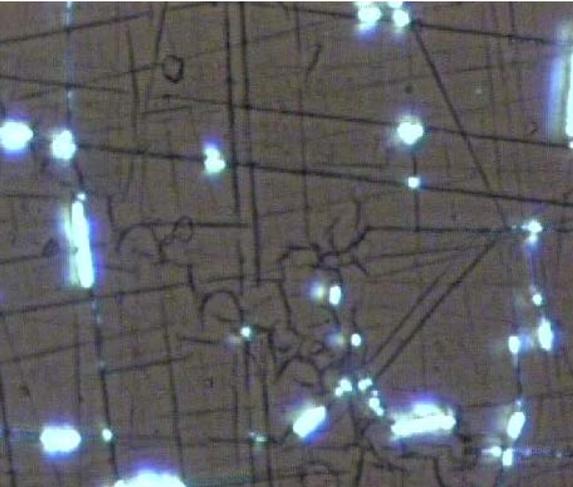


C pirolitico/Hyal 25 μ m

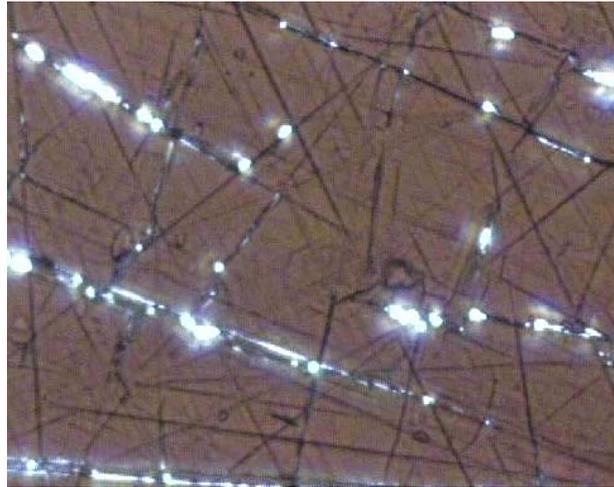


controllo

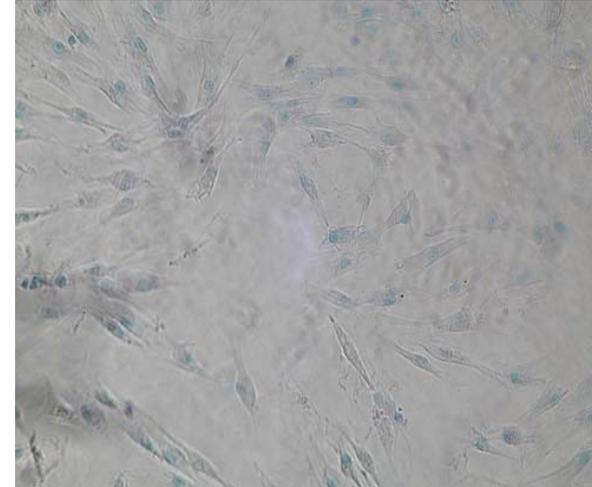
Dopo 4 giorni di coltura



C pirolitico

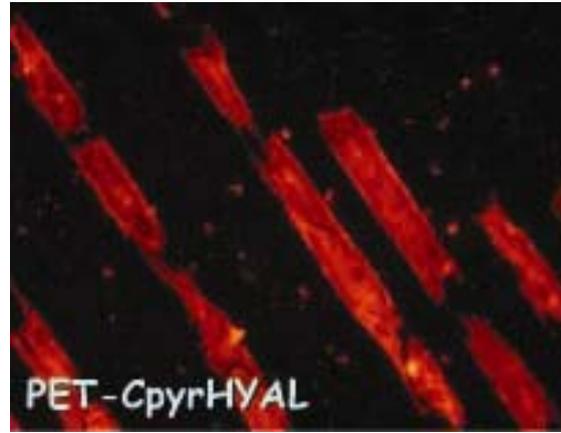
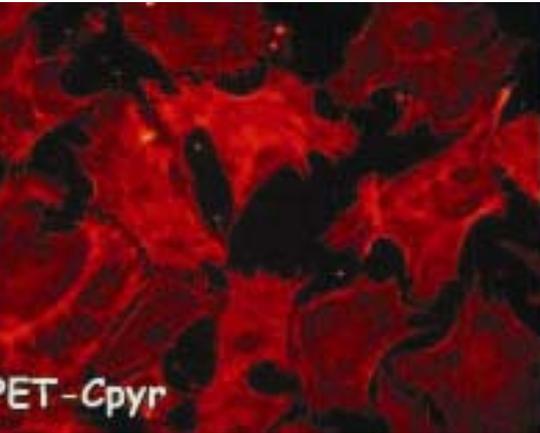


C pirolitico/Hyal 25 μ m



controllo-stained trypan blue

Test in vitro: Cellule endoteliali



Comportamento cellule endoteliali

UniSi- Giugno 2005

San Daniele del Friuli

Risultati sul comportamento cellule endoteliali illustrati da unità di ricerca UniSi (Prof Ziche):

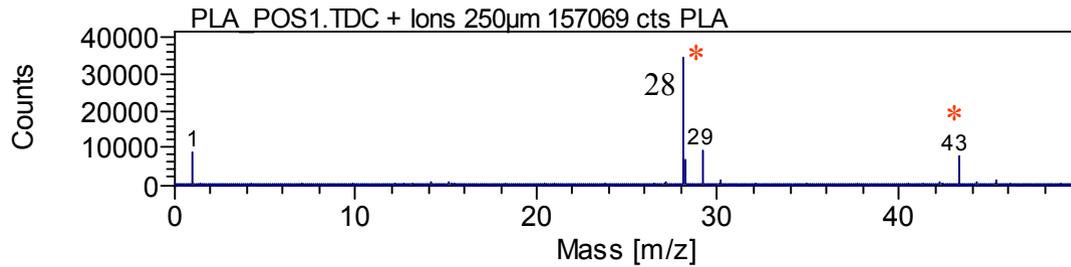
Espressione proteine della matrice

Espressione interine d membrana

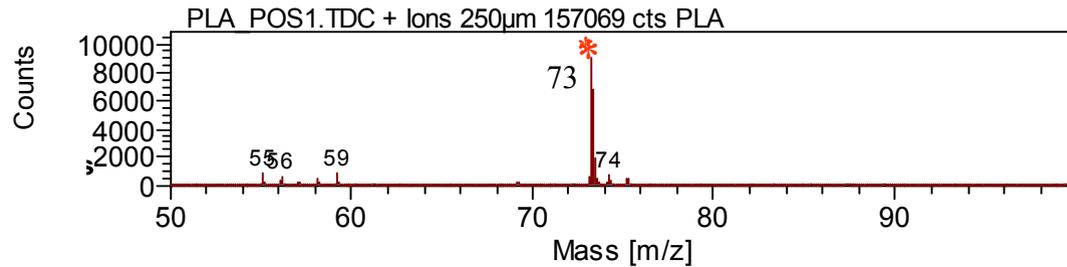
Time lapse microscopy



Spettro ToF-SIMS- ioni positivi



* Picchi caratteristici PDM



La superficie di PLA nativo "as received" presenta una contaminazione di PDMS

