UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MODENA E REGGIO EMILIA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN BIOTECNOLOGIE MEDICHE

TESI DI LAUREA SPERIMENTALE

SVILUPPO DI NUOVI CARRIERS A BASE DI NANOFIBRE DI ALCOL POLIVINILICO E GELATINA PER LA RIGENERAZIONE DELL'ENDOTELIO CORNEALE

Relatore

Prof. Michele Bianchi

Correlatori

Prof.ssa Graziella Pellegrini

Dott.ssa Alessia Merra

Tesi di laurea di

Andrea Fusco

ANNO ACCADEMICO 2024/2025

Sommario

SEZIONE I - INTRODUZIONE 3
SEZIONE II - BACKGROUND 6
CAPITOLO 1 – ANATOMIA E FISIOLOGIA DELLA CORNEA 6
CAPITOLO 2 – ENDOTELIO CORNEALE 7
CAPITOLO 3 – PATOLOGIE DELL'ENDOTELIO CORNEALE 9
CAPITOLO 4 -STRATEGIE TERAPEUTICHE ATTUALI 11
CAPITOLO 5 - INGEGNERIA TISSUTALE PER L'ENDOTELIO CORNEALE ... 13
CAPITOLO 6 - IL POLIVINIL ALCOOL (PVA) COME CARRIER 15
CAPITOLO 7 – LA TECNICA DELL'ELETTROSPINNING 18
CAPITOLO 8 – UTILIZZO DI FIBRE DI PVA IN MEDICINA RIGENERATIVA . 23
SEZIONE III – MATERIALI E METODI 26
CAPITOLO 1 – PREPARAZIONE DELLA SOLUZIONE POLIMERICA 26
CAPITOLO 2 – SETUP ELETTROSPINNING 28
CAPITOLO 3 – PARAMETRI OPERATIVI ELETTROSPINNING 31
CAPITOLO 4 – TRATTAMENTO POST ELETTROSPINNING 33
CAPITOLO 5 – SEMINA, COLTURA E FISSAZIONE DELLE CEC 34
SEZIONE IV – RISULTATI E DISCUSSIONE 37
CAPITOLO 1 – MESSA A PUNTO DEI PARAMETRI PRINCIPALI PER IL PROCESSO DI ELETTROSPINNING 37
CAPITOLO 2 - ANALISI DELL'ADESIONE DI CEC SUI CAMPIONI DI PVA E PVA/GELATINA 45
SEZIONE V - CONCLUSIONI 48
SEZIONE VI - BIBLIOGRAFIA 51

SEZIONE I - INTRODUZIONE

L'occhio umano è un organo estremamente sofisticato, la cui funzionalità dipende dall'integrità e dalla trasparenza delle sue strutture. Tra queste, la cornea gioca un ruolo cruciale non solo come primo mezzo refrattivo del sistema ottico, ma anche come barriera protettiva. Essa rappresenta la parte anteriore e trasparente della tonaca fibrosa dell'occhio, ed è responsabile di circa i due terzi del potere diottrico totale dell'apparato visivo. La sua trasparenza e curvatura perfettamente regolare sono condizioni imprescindibili per garantire una visione nitida.

Dal punto di vista strutturale, la cornea è composta da cinque strati distinti: epitelio corneale, lamina di Bowman, stroma corneale, membrana di Descemet ed endotelio corneale. Tra questi, l'endotelio corneale, costituito dalle cellule corneali endoteliali (CEC), riveste un ruolo fondamentale per il mantenimento dell'equilibrio idrico dello stroma e, quindi, della trasparenza corneale. l'endotelio corneale è una struttura vulnerabile: le cellule endoteliali sono post-mitotiche e non possiedono capacità rigenerativa. Di conseguenza, qualunque insulto meccanico, metabolico o dovuto a condizioni genetiche che riduca il numero o comprometta la funzionalità delle cellule corneali endoteliali contribuisce alla perdita progressiva della funzione della cornea.

Tra le principali patologie che colpiscono l'endotelio corneale, la distrofia di Fuchs è una delle più frequenti e debilitanti. Essa è una malattia degenerativa su base genetica, caratterizzata da una progressiva perdita di cellule endoteliali e formazione di edemi nella cornea. In stadi avanzati, la distrofia di Fuchs può degenerare in cheratopatia bollosa, una condizione in cui l'edema stromale ed epiteliale compromette in modo grave la funzione visiva. Altro tipo di danno frequente delle cellule endoteliali corneali è quello di origine iatrogena, frequente in seguito a interventi di cataratta o trapianto corneale.

Ad oggi, l'unica tipologia di terapia realmente efficace per il ripristino della funzione endoteliale in caso di danno severo consiste nel trapianto di tessuto endoteliale corneale da donatore. Le tecniche chirurgiche più diffuse includono la Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty (DSAEK) e la più recente Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty (DMEK), che offrono buoni risultati in termini di

miglioramento dell'acuità visiva e recupero funzionale. Tuttavia, queste soluzioni presentano significative limitazioni: complessità tecnica, rigetto immunologico, perdita cellulare post-trapianto e soprattutto scarsità di tessuti donatori. Si stima che, a livello globale, una sola cornea sia disponibile ogni 70 pazienti in attesa di trapianto, questo rende urgente lo sviluppo di approcci terapeutici alternativi.

In risposta a queste criticità, la ricerca scientifica si sta orientando verso strategie basate sulla rigenerazione cellulare e l'ingegneria tissutale. Un filone particolarmente promettente è rappresentato dalla coltura in vitro di cellule endoteliali corneali, al fine di ottenere monostrati cellulari da utilizzare per il trapianto. Questo approccio mira a superare la limitazione del numero di donatori, espandendo in laboratorio le cellule endoteliali isolate da una singola cornea sana, potenzialmente per trapiantare più riceventi. Tuttavia, il successo di tale strategia dipende fortemente dalla qualità del substrato (o carrier) su cui le CEC vengono coltivate.

Il substrato ideale deve replicare le caratteristiche chimiche, meccaniche e topografiche della membrana di Descemet, promuovere l'adesione cellulare e controllare la nanotopografia della superficie del substrato è fondamentale, da esso dipende il mantenimento del fenotipo endoteliale e l'inibizione della transizione epitelio-mesenchimale, evento che comprometterebbe la funzionalità delle CEC. A questo scopo, diversi polimeri sintetici e semi-sintetici risultano avere le caratteristiche adatte, tra di essi il polivinil alcol (PVA), grazie alla sua biocompatibilità, idrofilicità, trasparenza ottica e possibilità di lavorazione in configurazioni tridimensionali.

In medicina rigenerativa, una tecnica di fabbricazione di substrati polimerici che sta prendendo sempre più piede è la tecnica dell'elettrospinning. L'elettrospinning, infatti, consente di ottenere biomateriali altamente porosi e composti da nanofibre, mimando quella che è la morfologia tipica della matrice extracellulare e favorendo in questo l'interazione cellula-substrato in maniera più fisiologica. L'elettrospinning applicato a soluzioni di PVA, eventualmente arricchite con biomolecole bioattive come la gelatina, il collagene o il chitosano, ha dimostrato di migliorare l'adesione e la proliferazione di vari tipi cellulari, inclusi i fibroblasti e le cellule endoteliali.

La presente tesi si inserisce quindi nell'ambito della ricerca sui biomateriali applicati all'ingegneria tissutale dell'endotelio corneale, con l'obiettivo di sviluppare e testare scaffold bio-funzionali per la coltura di cellule endoteliali corneali.
Nello specifico, l'attività sperimentale condotta ha previsto l'impiego della tecnica di elettrospinning per la realizzazione di film nanofibrosi a base di polivinil alcol (PVA) e gelatina, successivamente utilizzati come substrati per la coltura di cellule endoteliali corneali (CEC) di coniglio. La cornea del coniglio presenta infatti numerose similitudini con quella umana. Questo, insieme ad altri fattori, rende il coniglio il modello animale di riferimento nello studio della cornea a fini di ricerca medica; tali aspetti verranno approfonditi nel capitolo 5 della sezione III.
Lo scopo principale della tesi è sviluppare nuovi materiali polimerici biocompatibili, biodegradabili, altamente porosi e nanostrutturati tramite la tecnica elettrospinning capaci di supportare l'adesione ed il mantenimento morfologico delle CEC, valutando se il materiale prodotto possa rappresentare una base idonea per future applicazioni cliniche nella rigenerazione dell'endotelio corneale.

Il lavoro ha quindi perseguito i seguenti *obiettivi specifici*:

-Ottimizzare il protocollo di elettrospinning per ottenere film nanofibrosi stabili e morfologicamente adeguati, impiegando miscele di PVA, gelatina e altri componenti in diverse proporzioni;
-Caratterizzare i film prodotti in termini di morfologia superficiale, omogeneità e stabilità in ambiente acquoso;
-Valutare in vitro la risposta delle CEC di coniglio, messe a contatto con gli scaffold, mediante osservazioni morfologiche e prove di adesione e sopravvivenza cellulare.
Attraverso questo approccio, la tesi intende fornire un contributo sperimentale concreto alla progettazione di supporti polimerici utilizzabili in ambito biomedico, potenzialmente applicabili come alternativa ai substrati biologici tradizionali per la coltura e il trapianto di cellule endoteliali corneali.

SEZIONE II - BACKGROUND

CAPITOLO 1 – ANATOMIA E FISIOLOGIA DELLA CORNEA

1.1 Struttura generale e funzione

Nell'essere umano, la cornea è una componente fondamentale dell'apparato visivo. Si tratta di una membrana trasparente che fa parte della tonaca fibrosa del bulbo oculare, ovvero il suo rivestimento più esterno. La cornea è posizionata esattamente sopra la pupilla e l'iride, si tratta di una membrana convessa e trasparente con uno spessore leggermente maggiore al centro (420-625 μm)[1]. La funzione della cornea è quella di deviare e far convergere le radiazioni luminose che la colpiscono verso l'interno dell'occhio e nello specifico verso la fovea[2].

1.2 Strati superiori della cornea

La cornea è costituita da 5 strati strutturalmente differenti tra loro, quello più esterno è l'epitelio corneale formato da 5-7 strati di cellule[3], al di sotto abbiamo la lamina di Bowman, membrana acellulare formata da collagene e immersa in una matrice di proteoglicani[4]. Lo stroma corneale è il terzo strato e rappresenta l'80-90% dello spessore totale della cornea[5], la sua struttura nanometrica ordinata conferisce alla cornea la capacità di mantenere la curvatura, l'estrema resistenza meccanica e la trasparenza. Lo stroma è infatti costituito da fibre di collagene prevalentemente da isoforme di tipo I e in minor quantità di tipo III, V e VI (il collagene rappresenta il 70% del peso secco dello stroma)[6] le quali sono organizzate in fascicoli che a loro volta formano degli strati, ogni strato dello stroma è costituito da fascicoli paralleli tra loro, l'orientamento dei fascicoli in ogni strato è spostato di 90° rispetto all'orientazione dei fascicoli dei due strati adiacenti (sopra e sotto). Questa disposizione delle fibre collagene garantisce in parte la rigidità e la trasparenza citate precedentemente; infatti, giocano un ruolo cruciale anche le molecole di matrice extracellulare che sono intercalate tra le fibre collagene, si tratta principalmente di proteoglicani legati a glicosaminoglicani solforati (GAG), principalmente cheratan solfato e condroitin solfato[7]. Le molecole di matrice extracellulare hanno l'importante funzione di mantenere costante la spaziatura tra le fibre collagene e inoltre regolano il contenuto idrico dello stroma, il quale deve essere

anch'esso mantenuto costante al fine di garantire la trasparenza della cornea (l'acqua rappresenta il 78% del peso totale dello stroma[8]). Lo stroma corneale non è vascolarizzato, caratteristica anch'essa funzionale al mantenimento della trasparenza, è invece riccamente innervato da fibre nervose provenienti dal nervo trigemino. Altra componente fondamentale dello stroma corneale sono i cheratociti, si tratta di fibroblasti specializzati residenti nello stroma, queste cellule sintetizzano le molecole di collagene I, V e VI e di cheratan solfato che compongono lo stroma stesso[9], il loro numero in una sezione di un mm quadrato di cornea si aggira intorno ai 9600[10]. Sopra lo stroma corneale ci sono altri 2 strati, quello più esterno, ovvero l'epitelio corneale il quale è costituito da 5-7 strati di cellule epiteliali (50-52 μm[11]). In base al fenotipo e al posizionamento, le cellule dell'epitelio corneale si possono distinguere in: cellule basali, le quali sono quelle dotate di capacità rigenerativa[12] (l'epitelio corneale si rinnova ogni 7-10 giorni[13]), wing cells che occupano gli strati intermedi, infine negli strati superficiali (direttamente a contatto con l'ambiente esterno) sono presenti le cellule squamose. Le funzioni dell'epitelio corneale sono quelle di agire come barriera fisica e immunologica, fornire protezione meccanica e contro la radiazione ultravioletta e garantire il mantenimento del film lacrimale[14]. Lo strato di transizione tra epitelio e stroma è denominato lamina di Bowman, si tratta di uno strato acellulare (lamina basale) spesso circa 8-12 μm, è composto da fibrille di collagene (isoforme I e V) orientate casualmente[15]. Lamina di Bowman ed epitelio corneale sono quindi gli strati che si trovano sopra lo stroma corneale, al di sotto dello stroma abbiamo invece la membrana di Descemet su cui posa lo strato più inferiore di tutta la cornea che è l'endotelio corneale, questi due strati sono strettamente correlati tra loro.

CAPITOLO 2 – ENDOTELIO CORNEALE

2.1 membrana di Descemet ed endotelio corneale

La membrana di Descemet è una lamina basale costituita da fibre collagene, , il suo spessore aumenta progressivamente nel corso della vita in quanto il collagene di cui è composta è sintetizzato e depositato continuamente dalle cellule epiteliali dell'endotelio corneale in età adulta può arrivare a circa 8-12 μm mentre alla nascita dell'individuo il suo spessore è di 2-4 μm[16]. Le isoforme del collagene che compongono la membrana di Descemet sono la VIII (presente soprattutto nella parte inferiore, a contatto con

l'endotelio) e in minor quantità la IV[17], nella membrana sono presenti anche componenti di matrice extracellulare non collagenosi quali laminine, fibronectina, nidogen (entactina) e perlecano[18]. Al pari di altre lamine basali, la membrana di Descemet funge da ancoraggio per le cellule epiteliali dell'endotelio corneale. Lo strato più inferiore della cornea, quindi quello che costituisce la sua superficie interna oltre il quale si trova la camera anteriore, è l'endotelio corneale, si tratta di un monostrato di cellule leggermente appiattite ed a stretto contatto tra loro (assumono una forma esagonale).

2.2. Funzione dell'endotelio corneale

La funzione dell'endotelio corneale è indispensabile per la trasparenza della cornea. Come abbiamo detto (capitolo 1.2), lo stroma corneale non è vascolarizzato, nonostante ciò, le cellule dell'epitelio corneale e i cheratociti stromali devono poter accedere a glucosio, amminoacidi, ioni ed altri soluti necessari a mantenersi vitali. Tali nutrienti devono essere veicolati dalle cellule endoteliali corneali, che le assorbono dall'umor acqueo (camera anteriore) e le trasferiscono verso gli strati superiori della cornea dove raggiungono le componenti cellulari della cornea per diffusione. Inoltre l'endotelio corneale, grazie alla stretta coesione tra le cellule endoteliali corneali (sono unite da giunzioni strette), non permette la diffusione passiva dell'acqua presente nell'umor acqueo verso la cornea, l'acqua viene infatti trasportata attivamente dalle cellule dell'endotelio in entrambi i sensi, questo permette di mantenere l'idratazione della cornea a un livello costante e questo è cruciale per far sì che essa abbia un livello di trasparenza sufficiente a permettere la visione. I principali attori della regolazione del passaggio di fluidi dall'umor acqueo allo stroma sono le pompe sodio-potassio delle cellule endoteliali, ma hanno un ruolo anche le acquaporine e il trasportatore codificato dal gene SLC4A11[19].

2.3. Dinamica cellulare

Le cellule endoteliali corneali sono post-mitotiche, prive di capacità rigenerativa, nel primo mese di vita dell'individuo sono circa 6000 per mm quadrato di endotelio, ovviamente il loro numero decresce progressivamente con l'età a causa della perdita di cellule che avviene inevitabilmente per qualsivoglia insulto all'endotelio[20]. Infatti, quando l'endotelio viene danneggiato, quindi si ha la morte di una o più cellule, il danno viene "riparato" dalle cellule rimanenti attraverso polimegatismo, ovvero le cellule adiacenti al foro aumentano la loro dimensione fino a chiuderlo e ristabilire le giunzioni

strette. Già dopo 5 anni di vita, infatti, il numero di cellule per mm quadrato scende mediamente a 3500[21], e la funzionalità dell'endotelio, quindi della cornea, viene compromessa quando si va sotto la soglia di 1000 cellule per mm quadrato[19].

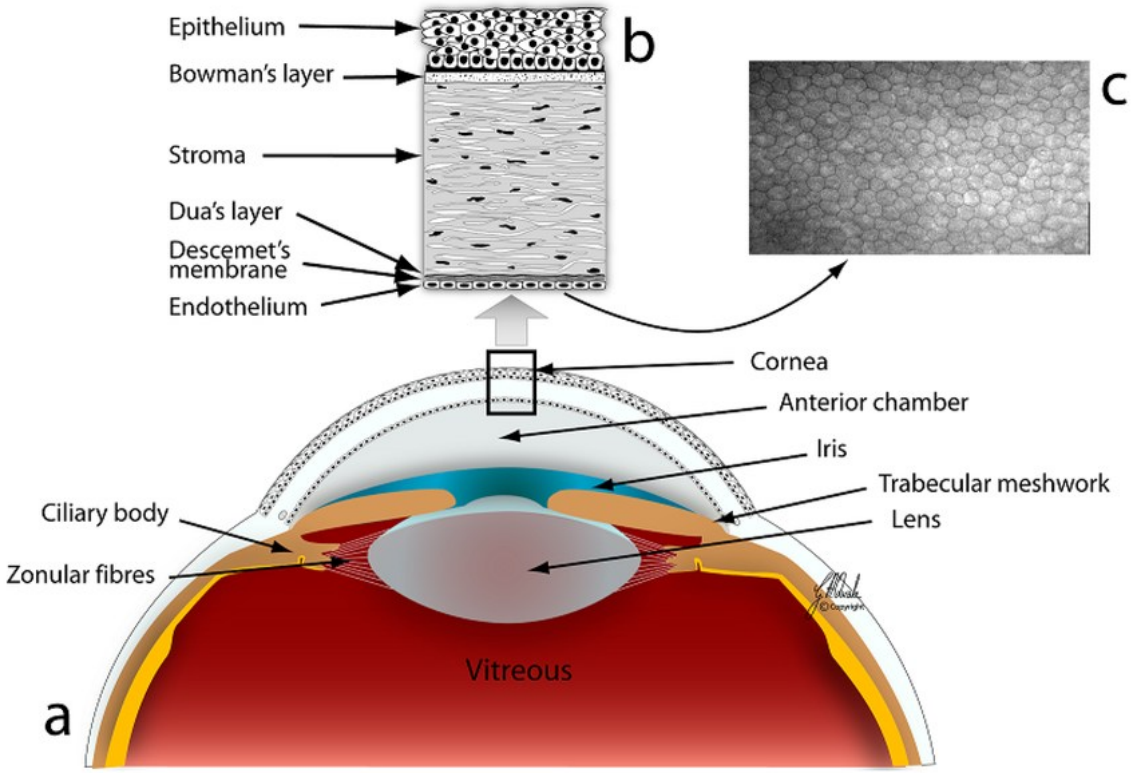


Figura 1: Anatomia della cornea. (a) Sezione della parte anteriore dell'occhio; (b) Sezione della cornea che illustra i suoi sei strati; (c) Immagine in vivo al microscopio confocale dell'endotelio corneale. Immagine riprodotta da: Substrates for Expansion of Corneal Endothelial Cells towards Bioengineering of Human Corneal Endothelium, BioMed Research International, 2015, Fig. 1. Courtesy of Geir A. Qvale. Licenza: CC BY 4.0.

CAPITOLO 3 – PATOLOGIE DELL'ENDOTELIO CORNEALE

3.1 distrofia endoteliale di Fuchs

Ci sono una serie di patologie e condizioni cliniche che danneggiano iterativamente l'endotelio corneale determinando la riduzione accelerata del numero di cellule endoteliali corneali e quindi la perdita della trasparenza della cornea. La distrofia endoteliale di Fuchs è una malattia complessa geneticamente eterogenea che determina la degenerazione progressiva dell'endotelio corneale a causa della distrofia delle cellule endoteliali, la mutazione più comunemente associata alla malattia è un'espansione di ripetizioni nel gene TCF4[19]. La patogenesi non è del tutto chiara, i meccanismi possibili

includono canalopatie, stress ossidativo, apoptosi e transizione epitelio mesenchimale delle cellule endoteliali corneali, si ha quindi la morte di tali cellule e la progressiva perdita di funzione dell'endotelio corneale. Questo determina lo squilibrio del contenuto idrico dello stroma corneale, con formazione di edemi nei vari strati della cornea, inspessimento della membrana di Descemet con la formazione su di essa di guttae, ovvero escrescenze di matrice extra cellulare la quale si accumula perché prodotta in quantità anomala dalle cellule endoteliali corneali disfunzionali, tutti questi cambiamenti portano a perdita della trasparenza della cornea con riduzione dell'acuità visiva, dolore oculare, fotofobia e aloni. Nella maggior parte dei casi l'esordio della malattia avviene intorno ai 50-60 anni di età, ma forme precoci esistono[19].

3.2 Cheropatia bollosa

La distrofia di Fuchs può culminare in un'altra condizione che è la cheratopatia bollosa, è causata da edema della cornea a sua volta causato da disfunzione dell'endotelio corneale. Questa patologia il più delle volte si presenta appunto come stadio avanzato della distrofia di Fuchs ma puo essere anche il risultato di trauma di altro genere dell'endotelio (trattato in seguito). Lo squilibrio idrico causato dalla disfunzione endoteliale porta alla formazione di edemi che rompono la struttura ordinata delle molecole di collagene e matrice extracellulare dello stroma, l'edema arriva fino all'epitelio corneale formando delle vescicole (bolle) tra l'epitelio e la lamina di Bowman. Si ha anche qui la perdita della trasparenza della cornea, inoltre le vescicole possono rompersi causando dolore acuto, iperemia, sensazione di corpo estraneo, cicatrizzazione epiteliale, aumento di rischio di ulcere corneali e infezioni.[19]

3.3 Danni iatrogeni post-chirurgici

Il trauma chirurgico/iatrogeno rappresenta un'altra possibile causa di danno dell'endotelio corneale, tali interventi anche se eseguiti perfettamente e senza complicanze accelerano il declino dell'endotelio corneale. Nell'intervento chirurgico alla cataratta, specificatamente negli interventi di facoemulsificazione e estrazione extracapsulare della cataratta (ECCE), in entrambe si ha una perdita del 10-20% di cellule endoteliali corneali nei 6-12 mesi post-intervento[22,23]. Si hanno danni tendenzialmente maggiori nelle procedure chirurgiche di trapianto di cornea, nello specifico interventi di cheratoplastica perforante (circa 30% in 12 mesi[24]), cheratoplastica lamellare e trabeculectomia.

Di seguito si riportano quelle che sono le strategie terapeutiche attualmente più avanzate per ristabilire la funzione dell'endotelio corneale, come si è gia spiegato questo è possibile solo riportando il numero di cellule corneali endoteliali ben oltre la soglia di mille per millimetro quadrato (considerando la perdita progressiva fisiologica).

CAPITOLO 4 -STRATEGIE TERAPEUTICHE ATTUALI

4.1 Terapie farmacologiche

Per quanto riguarda le terapie farmacologiche un approccio ancora in fase di sperimentazione ma che sembra promettente è l'utilizzo di inibitori delle rho-chinasi (ROCK), è stato dimostrato che sulle cellule corneali endoteliali di vari modelli animali (tra cui conigli e primati), queste molecole inducono proliferazione, migrazione e inibizione dell'apoptosi. [19]

4.2 Terapie cellulari

Un altro approccio promettente ma più invasivo rispetto a quello rappresentato dalle terapie farmacologiche è la terapia cellulare, ovvero l'iniezione intracamerale di cellule corneali endoteliali espanse in vitro in modelli animali, ma è stato documentato anche un trial su pazienti umani[25]. Il trattamento ha dato esito positivo aumentando la trasparenza della cornea, in alcuni dei modelli animali la trasparenza è stata ristabilita completamente. Si è visto che questa strategia risulta ancora più efficace se le cellule sono somministrate in combinazione con i ROCK inibitori[26].

4.3 Trapianti

Gli approcci terapeutici attualmente d'elezione per ristabilire la funzionalità dell'endotelio corneale nonché i più invasivi, sono: la Descemet stripping only (DSO), i trapianti di endotelio corneale (DSAEK e DMEK, definiti trapianti corneali lamellari in quanto viene trapiantata solo una sezione trasversale di cornea) e la cheratoplastica perforante (trapianto di cornea con tutti i suoi strati). La DSO consiste nella rimozione della porzione centrale della membrana di Descemet del paziente, che, come abbiamo visto, nelle patologie della cornea causate da disfunzione endoteliale, si inspessisce e si riempie di guttae, la rimozione induce la migrazione delle cellule endoteliali corneali

periferiche verso l'area centrale, queste ripopolano e ricostituiscono la membrana di Descemet rimossa. Questa operazione ha portato nel 77% dei casi (10 su 13 occhi) un miglioramento dell'acuità visiva stabile per almeno 5 anni dopo l'intervento[27,28]. La Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty (DSAEK) è una operazione chirurgica in cui si rimuovono la membrana di Descemet e l'endotelio corneale dall'occhio malato e si sostituiscono con un endotelio sano da donatore. La cornea del donatore viene sezionata tramite un microcheratomo automatizzato che taglia esattamente appena sopra l'interfaccia tra membrana di Descemet e stroma, si scarta la parte superiore al taglio e rimangono quindi solo l'endotelio corneale, la membrana di Descemet e la parte inferiore dello stroma. La membrana di Descemet viene rimossa (processo chiamato Descemetorhexis o Stripping) e sostituita con il lembo di cornea del donatore. L'operazione può essere soggetta a complicanze come il distacco del lembo, il rigetto dell'endotelio, la perdita eccessiva di cellule endoteliali post-trapianto, inoltre gli edemi nella cornea potrebbero persistere anche dopo il trapianto.[29]

La Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty DMEK è un'altra procedura chirurgica di trapianto corneale lamellare, diversamente dalla DSAEK, in questo caso il chirurgo stacca manualmente la membrana di Descemet e l'endotelio corneale (peeling) dalla cornea del donatore, dopodiché vengono posizionati nell'occhio del ricevente in cui la membrana di Descemet malata è stata rimossa tramite Scraping. Nella DMEK si evita di trapiantare la parte inferiore dello stroma, questa è una differenza cruciale che rende la DMEK più efficace rispetto alla DSAEK; infatti, nella prima si ha un miglioramento maggiore dell'acuità visiva, un minore rischio di rigetto e il mantenimento dell'architettura e della curvatura della cornea che nella DSAEK vengono alterati a causa della presenza dello strato di stroma, questo causa astigmatismo. Il principale svantaggio della DMEK è la sua elevata difficoltà tecnica, richiede estrema abilità da parte del chirurgo[30,31]. La cheratoplastica perforante (PK) è l'intervento chirurgico più invasivo tra quelli trattati finora, a differenza degli altri si tratta di un trapianto di cornea a tutto spessore; quindi, la cornea intera viene prelevata dall'occhio donatore e si sutura sul ricevente dopo aver asportato la cornea patologica. In quasi tutti i casi si ha un miglioramento dell'acuità visiva, nonostante ciò, questo approccio viene adottato solamente nei casi in cui non è possibile eseguire un trapianto lamellare, rispetto ad essi la PK è infatti svantaggiosa da numerosi punti di vista, il miglioramento è di entità minore, si ha un rischio maggiore di rigetto, una maggiore perdita di cellule corneali endoteliali post trapianto[32,33].

CAPITOLO 5 - INGEGNERIA TISSUTALE PER L'ENDOTELIO CORNEALE

La quiescenza replicativa delle cellule corneali endoteliali comporta che i trapianti siano, nella totalità dei casi, l'unica terapia efficace per trattare il deterioramento patologico dell'endotelio corneale. La disponibilità di donatori di cornea rimane comunque proibitiva, si stima che solo una cornea sia disponibile per ogni 70 necessarie a livello globale[34].

5.1 Le colture di cellule endoteliali corneali e i carriers

Tale sproporzione spinge la ricerca verso strategie alternative per ottenere tessuti trapiantabili, una di queste è la coltura in vitro di cellule endoteliali corneali, che ha l'obiettivo di espandere un numero limitato di cellule endoteliali corneali sane isolate da un singolo donatore per ottenere monostrati, quindi lembi di endotelio corneale, idealmente sufficienti anche per trapiantare più occhi riceventi.

La coltura di cellule endoteliali corneali richiede particolare attenzione alla morfologia, alla composizione e ovviamente alla funzionalità del substrato o scaffold. Come abbiamo visto, in vivo la lamina basale a cui aderiscono le cellule corneali endoteliali è la membrana di Descemet, la quale è composta principalmente da fibrille di collagene di tipo IV e tipo VIII, da laminina e da molecole proprie della matrice extracellulare. È opportuno che il substrato su cui le cellule vengono coltivate sia biomimetico; quindi, vada ad imitare le caratteristiche chemo-meccaniche ma anche la morfologia della membrana di Descemet, tali caratteristiche del substrato costituiscono un segnale che nelle cellule induce il mantenimento del fenotipo e blocca la transizione epitelio-mesenchimale[35]. sono stati ottenuti risultati promettenti coltivando le cellule su substrati rivestiti da formulazioni di vario tipo come: collagene di tipo I e fibronectina, collagene di tipo IV, condroitin solfato e laminina, matrigel, FNC coating mix; si tratta di molecole con cui le cellule corneali endoteliali devono interagire al fine di mantenere il fenotipo[35–38]. La coltura di cellule corneali endoteliali con lo scopo di trapianto presuppone che esse vengano coltivate su di un substrato che viene definito carrier, il carrier può essere trapiantato insieme alle cellule oppure le cellule possono essere staccate dal carrier trapiantate senza di esso. Il carrier in ogni caso deve avere una nanotopografia, ovvero deve avere delle strutture sulla sua superficie che siano di dimensioni subcellulari, come ad esempio nanofibre, pori o nanopili, questo è ottimale per favorire l'adesione delle

cellule corneali endoteliali ad esso. Come altre cellule epiteliali, infatti, le cellule corneali endoteliali necessitano di una stretta adesione con il substrato (che è la lamina basale in vivo), se questa viene meno, le cellule avviano la transizione epitelio-mesenchimale[35]. Alcuni polimeri sintetici sono risultati particolarmente efficaci come carrier, ad esempio il poli(N-isopropilacrilammide) (PIPAAm)[39] è un polimero termosensibile, sotto il punto di intorpidimento, ovvero 32 °C, il polimero è idrofilo, mentre al di sopra le catene diventano idrofobiche, quindi, la regolazione della temperatura consente sia l'adesione iniziale delle cellule (a 37 °C) sia il successivo distacco (a 20 °C) dal substrato di PIPAAm. Sono stati testati con successo anche materiali semi-sintetici, ovvero substrati bioingegnerizzati per emulare le caratteristiche chemo-meccaniche della membrana di Descemet, ad esempio sono stati ottenuti ottimi risultati in termini di espansione coltivando le cellule endoteliali corneali coltivate su polidimetilsilossano, il quale può essere formulato per avere un modulo elastico paragonabile a quello della membrana di Descemet, rivestito con proteine ECM (fibronectina-collagene, laminina-condroitin solfato)[40].

Sostanzialmente, l'impiego di substrati sintetici polimerici come carrier risulta vantaggioso rispetto ai substrati di origine biologica — quali la membrana amniotica o le cornee decellularizzate — in quanto offre una maggiore standardizzazione compositiva, riduce il rischio di trasmissione di agenti patogeni e immunogenicità nel caso esso sia trapiantato con le cellule, inoltre consente un controllo preciso delle proprietà fisico-chimiche e topografiche (ad es. rigidità, idrofilia e nanotopografia), rivelatesi determinanti per il mantenimento del fenotipo. Inoltre, tali substrati possono essere funzionalizzati tramite rivestimenti con componenti della matrice extracellulare, come collagene di tipo IV, FNC Coating Mix o laminina, al fine di migliorare l'adesione, la vitalità cellulare e la stabilità del monostrato.

Di seguito si ricapitolano le caratteristiche chimico-fisiche, meccaniche e biologiche che un substrato costituito da polimero sintetico deve possedere per supportare efficacemente la crescita di cellule corneali endoteliali. Un polimero destinato a tale scopo deve innanzitutto essere biocompatibile, ovvero non citotossico, non immunogeno e capace di supportare la vitalità e l'integrità morfologica delle cellule nel tempo. È inoltre necessario che presenti una topografia superficiale controllata: numerosi studi hanno dimostrato che superfici con rugosità nanometrica regolare (< 500 nm) o micro/nanostrutture orientate possono favorire l'adesione, l'organizzazione ordinata e il mantenimento della forma

esagonale delle CEC, riducendo al contempo il rischio di transizione epitelio-mesenchimale.

La rigidità meccanica del substrato deve essere attentamente calibrata: substrati eccessivamente rigidi possono alterare le proprietà funzionali delle CEC, mentre una rigidità fisiologicamente simile a quella della membrana di Descemet (media di 50 ± 17.8 kPa e un intervallo di 20–80 kPa[41]) si è dimostrata favorevole alla stabilità fenotipica e all'espressione dei marker funzionali di CEC di coniglio[42].

Altro parametro determinante è l'idrofilicità della superficie, questa favorisce l'adsorbimento di proteine della matrice extracellulare e facilita l'interazione cellula-substrato. Nel caso il carrier polimerico debba essere trapiantato, esso deve essere otticamente trasparente. La possibilità di essere funzionalizzato superficialmente con rivestimenti specifici (es. collagene di tipo IV, laminina, FNC Coating Mix) rappresenta un ulteriore vantaggio, poiché consente di mimare l'ambiente nativo dell'endotelio e migliora l'efficienza dell'adesione e della proliferazione cellulare nei primi stadi della coltura. Infine, dal punto di vista pratico, il materiale deve risultare facilmente maneggiabile e sterilizzabile, lavorabile in configurazioni tridimensionali (film, membrane, inserti) e potenzialmente assorbibile in vivo, pur mantenendo la stabilità dimensionale e funzionale per tutta la durata del processo di coltura.

CAPITOLO 6 - IL POLIVINIL ALCOOL (PVA) COME CARRIER

6.1 Caratteristiche chimico-fisiche del PVA

Uno dei polimeri che potenzialmente può soddisfare tutti questi requisiti è il polivinil alcol (PVA) (**Figura 2**).

Il polivinil alcol è un polimero sintetico idrosolubile, atossico, chimicamente stabile, biodegradabile, utilizzato in campo biomedico per via delle sue proprietà chimico-fisiche, della sua biocompatibilità[43]. Il PVA è ottenuto per idrolisi del polivinil acetato (PVAc), le quali determinano la sostituzione dei gruppi acetato con gruppi ossidrili, in quantità variabile a seconda del grado di idrolisi influenzando in modo determinante proprietà come solubilità, cristallinità, resistenza meccanica e compatibilità biologica (**Figura 3**).

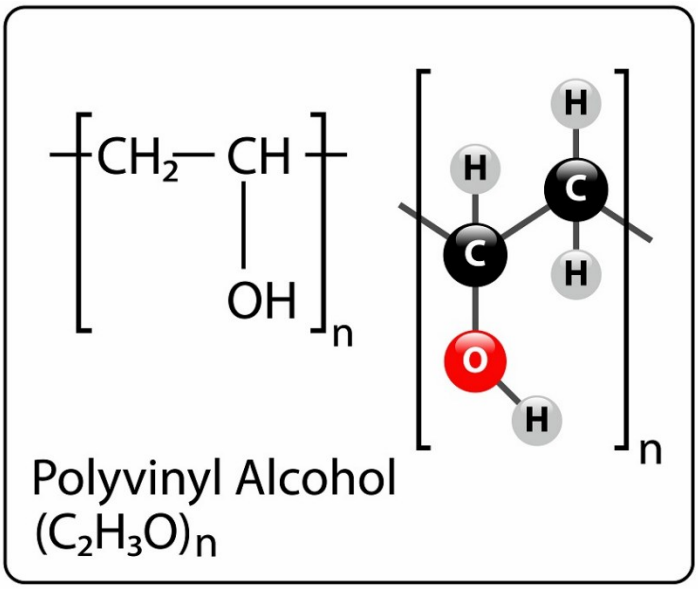


Figura 2: Formula di struttura chimica e modello molecolare in 3D dell'Alcol Polivinilico (PVA),

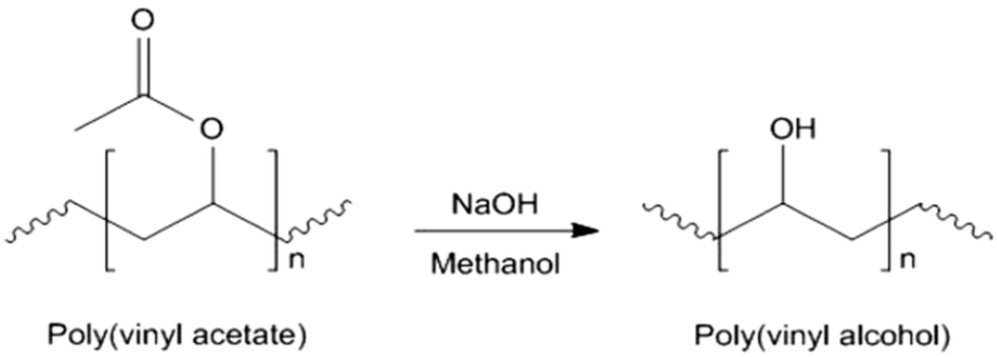


Figura 3: reazione di idrolisi del polivinil acetato (PVAc) in ambiente metanolic, mediante NaOH, per la sintesi del polivinil alcol (PVA)

L'etanolo non può essere polimerizzato direttamente a causa della sua instabilità tautomerica, la polimerizzazione avviene quindi in due stadi: dapprima si ottiene il PVAc tramite polimerizzazione radicalica del vinil acetato, seguito da idrolisi parziale o totale. Il risultato è un polimero lineare, con catene regolari contenenti gruppi -OH laterali, il cui contenuto determina in larga misura le proprietà fisiche del materiale.[44]

6.2 Processazione del PVA

Il PVA presenta una combinazione di proprietà che lo rendono adatto a utilizzi in ambito biologico, ovvero:

- Elevata idrofilicità, conferita dalla presenza dei gruppi ossidrili, essa si traduce in elevata solubilità nei solventi acquosi e nella capacità di formare gel altamente idratati, potenzialmente compatibili con sistemi biologici.[45]

- il PVA può essere impiegato per la formazione di film trasparenti, può essere infatti processato al fine di creare membrane sottili, uniformi e otticamente trasparenti, con trasmittanza ottica nella regione del visibile superiore al 90%, questo lo rende potenzialmente adatto ad applicazioni oftalmiche.[46,47]

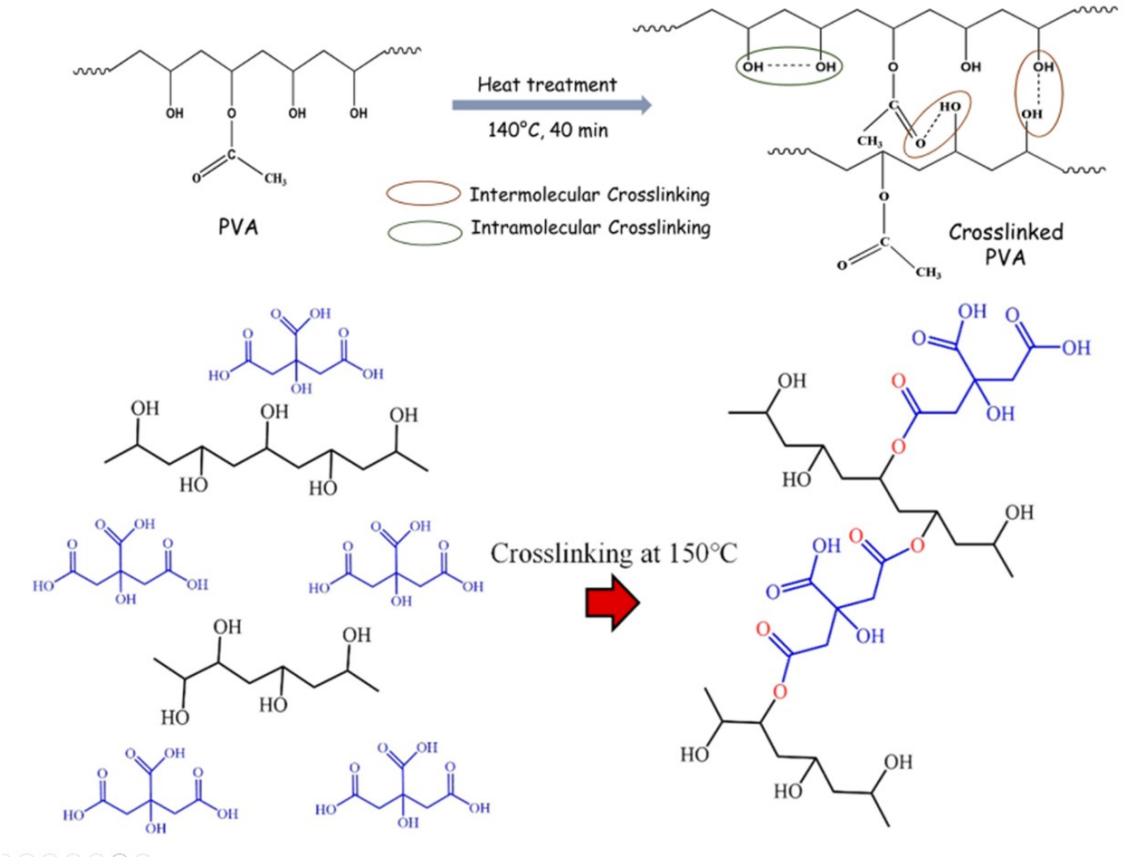


Figura 4 - in alto: crosslinking termico del polivinil alcol (o del polivinil acetato). in basso: crosslinking tramite l'utilizzo di acido citrico (in blu) come reticolante

- Le sue proprietà meccaniche possono essere ulteriormente modulate tramite cross-linking fisico o chimico (**Figura 4**). Con crosslinking fisico si intende la formazione di legami deboli (legami idrogeno in particolare) tra gruppi ossidrilici di catene adiacenti (legami intermolecolari) e all'interno della stessa catena (legami intramolecolari). La formazione di questi legami viene promossa da trattamento termico a temperature prossime ai 140 °C.[48] Nel crosslinking chimico invece, l'interazione con agenti

crosslinkanti come la glutaraldeide[49], l'acido borico[50] o l'acido citrico[51] consente la formazione di legami irreversibili (covalenti) tra gli agenti crosslinkanti e le catene del PVA, rendendo in questo modo il PVA praticamente insolubile in acqua.

- Il PVA è un materiale biocompatibile e atossico, risulta totalmente inerte a contatto con i tessuti umani[43]. In vivo le catene di PVA si dissolvono a causa della loro idrofilicità, quindi per interazione dei gruppi ossidrili con le molecole d'acqua, questo processo è rallentato se il polimero è sottoposto a reticolazione con agenti crosslinkanti.
- Il PVA è un polimero termoplastico, facilmente processabile, e può essere quindi lavorato con tecniche come il casting in soluzione, stampa 3D o elettrospinning[52].
- Il PVA si decompone a temperature superiori a 200°C[53], è quindi termicamente stabile entro un range operativo adeguato per molte applicazioni biomedicali..

CAPITOLO 7 – LA TECNICA DELL'ELETTROSPINNING

Come sottolineato in precedenza (Capitolo 5.1), un substrato/carrier per la coltura di cellule corneali endoteliali deve imitare al meglio le caratteristiche chimiche, fisiche e meccaniche della membrana di Descemet. In questa tesi abbiamo valutato la possibilità di ottenere substrati con tali carriers tramite la tecnica dell'elettrospinning.

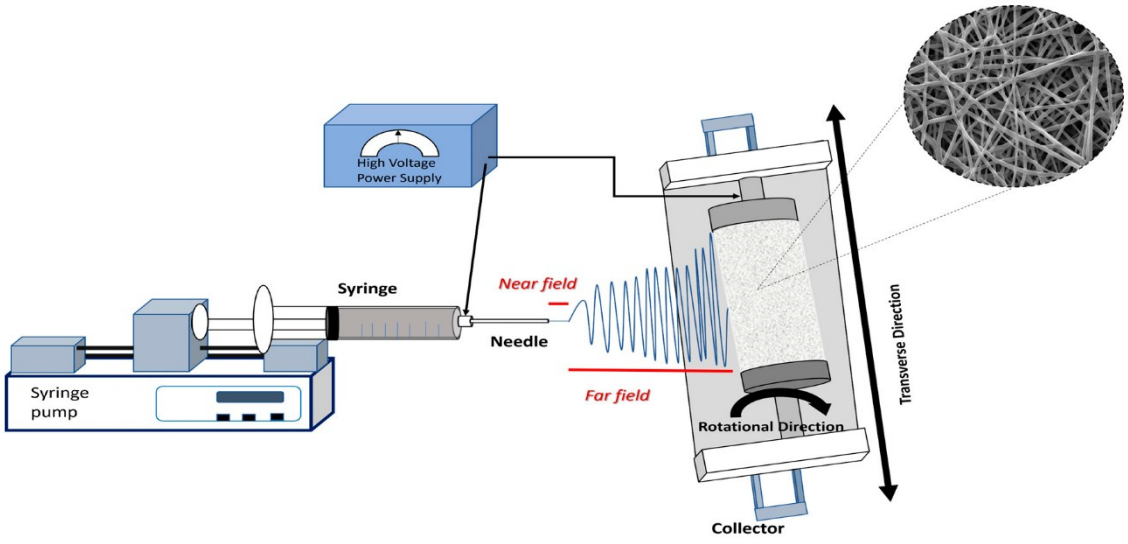


Figura 5: Rappresentazione schematica di un setup per elettrospinning da soluzione.

L'elettrospinning è una tecnica versatile ed economica utilizzata per la produzione di materiali polimerici porosi caratterizzati da fibre con dimensioni micro- e

submicrometriche (da 1 a 1000 nm)[54]. Il principio di funzionamento dell'elettrospinning è basato sulla formazione di un campo elettrico ad alta tensione tra la punta di un ago metallico dal quale fuoriesce la soluzione polimerica e un collettore sul quale si depositano le fibre (**Figura 5**)[55].

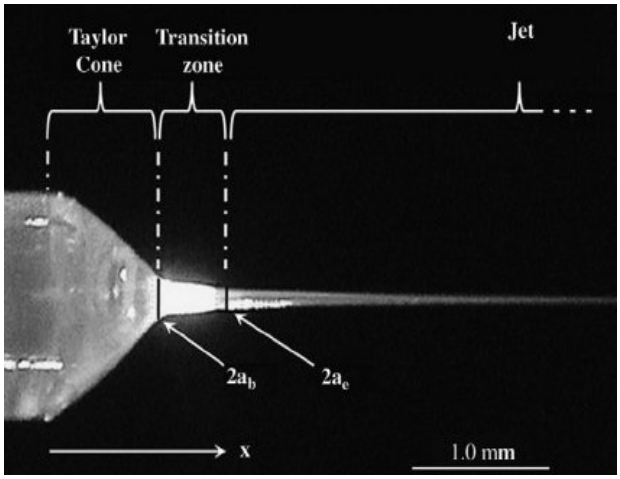


Figura 6: Immagine che mostra la formazione del cono di Taylor. Riprodotta con autorizzazione da Han et al., Polymer 49, 1651 (2008). Copyright 2008 di Elsevier Ltd. https://www.researchgate.net/publication/259439266_Electrospun_metallic_nanowires_Synthesis_characterization_and_applications/figures

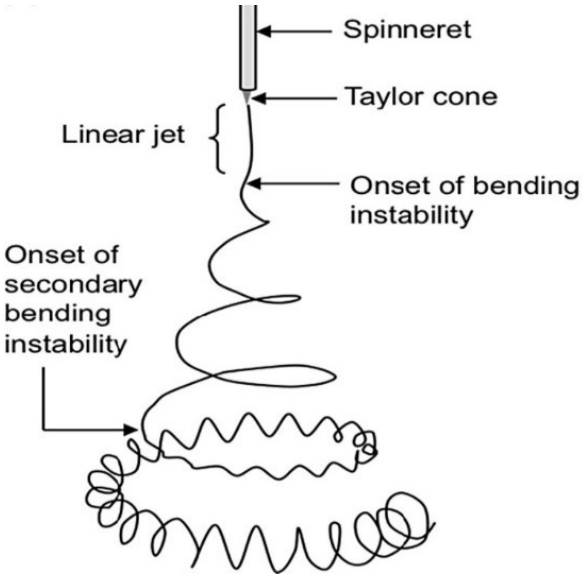


Figura 7: Traiettoria tipica della soluzione polimerica in uscita dall'ago durante il processo di elettrospinning, che mostra la sezione iniziale lineare del getto sottile emesso dal cono di Taylor. L''instabilità di flessione del getto polimerico aumenta mentre si dirige verso il collettore (non mostrato). Il getto si trasforma in spire di dimensioni progressivamente minori lungo la traiettoria a spirale.

Quando la forza elettrostatica supera la tensione superficiale della goccia che fuoriesce dall'ago, si forma una struttura detta "cono di Taylor" (**Figure 6 & 7**), dal quale si origina un getto polimerico che si assottiglia lungo il tragitto verso il collettore, assume un moto a spirale randomico, e che si va a depositare in forma solida (per evaporazione concomitante del solvente) sul collettore messo a terra[56,57]. Il prodotto finale è quindi una rete di fibre continue (a seconda dei parametri di deposizione della soluzione polimerica di partenza), disposte in maniera casuale.

Di seguito sono ripotati nel dettaglio gli elementi principali di un tipico setup di elettrospinning:

- una pompa per siringhe (syringe pump) la quale consente l'erogazione controllata della soluzione polimerica in termini di velocità, volume di soluzione erogata e tempistiche.
- un tubicino capillare con all'estremità ago metallico (spinneret), collegato al polo positivo dell'alta tensione e funge da punto di emissione della soluzione polimerica.
- un collettore conduttivo: può essere piano (per raccolta delle fibre in modalità random) o cilindrico rotante (per ottenere fibre allineate); costituisce il polo negativo dell'alta tensione ed è messo a terra.
- un alimentatore ad alta tensione che fornisce un potenziale elettrico (almeno 6 kv) tra l'ago e il collettore.[58]

Va sottolineato il fatto che il corretto ottenimento del materiale in forma di nanofibre dal diametro regolare e omogeneo dipende da diversi parametri di processo, i quali sono elencati di seguito. Alcuni sono propri della soluzione polimerica, altri del setup sperimentale.

- Proprietà dielettrica del solvente: un'alta costante dielettrica del solvente favorisce fibre più sottili e con meno difetti (beads). Aumenta l'instabilità del getto e la densità di carica, potenziando le forze di allungamento e riducendo il diametro della fibra prodotta. Si possono migliorare le proprietà dielettriche, si possono aggiungere alla formulazione della soluzione polimerica dei solventi quali: Acetonitrile, Acido acetico, m-Cresolo, Tetraidrofurano, Toluene, Acetone, Cloroformio, Acetato di etile, Diclorometano, Dimetilformammide, Etanolo.;

- Densità di carica superficiale della soluzione polimerica: una maggiore densità di carica superficiale permette al getto di subire forze di allungamento superiori, producendo fibre più sottili. basse densità causano difetti (beads), mentre una densità nulla impedisce del tutto la formazione di fibre;
- Tensione superficiale della soluzione polimerica: Nel processo di elettrospinning la tensione superficiale della soluzione deve essere superata dalla forza elettrostatica generata dal campo elettrico per avviare il getto. Valori bassi favoriscono fibre senza difetti, mentre valori elevati causano instabilità e formazione di "beads". La tensione superficiale definisce i limiti operativi del processo e può essere ridotta usando solventi a bassa tensione o aggiungendo tensioattivi.
- Viscosità della soluzione polimerica: la viscosità è cruciale, da essa dipende il grado di entanglement tra le catene di polimero. Se troppo bassa, le fibre sono discontinue; se troppo alta, il campo elettrico non riesce a "stirare" il getto. Un valore ottimale è necessario per ottenere fibre lisce e uniformi. In genere, la viscosità ottimale per la formazione corretta (uniformi e senza difetti macroscopici) di fibre si attesta su valori compresi tra 1 e 200 poise.
- Peso molecolare della soluzione polimerica: l peso molecolare del polimero deve essere adeguato a garantire interazioni intermolecolari tra le catene. Un basso PM causa difetti (beads), un PM crescente produce fibre lisce e un PM molto elevato può portare alla formazione di micro-nastri.
- la concentrazione del polimero: essa influenza viscosità e tensione superficiale. A basse concentrazioni si formano gocce o beads. Aumentandola si ottengono fibre uniformi, ma concentrazioni eccessive possono produrre micro-nastri elicoidali. soluzioni poco concentrate o pesi molecolari troppo bassi in genere sono sfavorevoli all'entanglement tra le catene polimeriche necessari alla formazione della fibra e quindi portano alla generazione di microdroplets sulla superficie del collettore. In queste condizioni il processo prende il nome di "electrospray", un processo utilizzato principalmente per produrre ricoprimenti (coatings) di biomateriali (**Figura 8**).
- voltaggio applicato: Un voltaggio elevato aumenta lo stiramento del getto, generando fibre di diametro inferiore e con maggiore cristallinità. Tuttavia, un voltaggio eccessivo può ridurre il tempo di volo, peggiorando l'allineamento molecolare.

- velocità di estrusione (portata): Una portata lenta è preferibile per ottenere fibre uniformi e senza difetti, dando alla soluzione il tempo di polarizzarsi. Portate troppo elevate aumentano il diametro delle fibre e la tendenza alla formazione di beads.
- distanza ago-collettore: Una distanza ottimale è necessaria. Se troppo corta, le fibre non solidificano bene e presentano difetti. Aumentando la distanza si può ottenere una riduzione del diametro medio delle fibre, ma l'effetto è meno marcato di altri parametri.
- temperatura ambientale: Una temperatura ambiente più alta diminuisce la viscosità della soluzione, favorendo uno stiramento maggiore e quindi fibre più sottili. Può però danneggiare materiali biologici termosensibili come proteine ed enzimi.
- umidità ambientale: Un'umidità crescente può creare pori circolari sulla superficie delle fibre a causa del raffreddamento evaporativo. Un'umidità molto bassa può invece causare l'occlusione della punta dell'ago.[58]

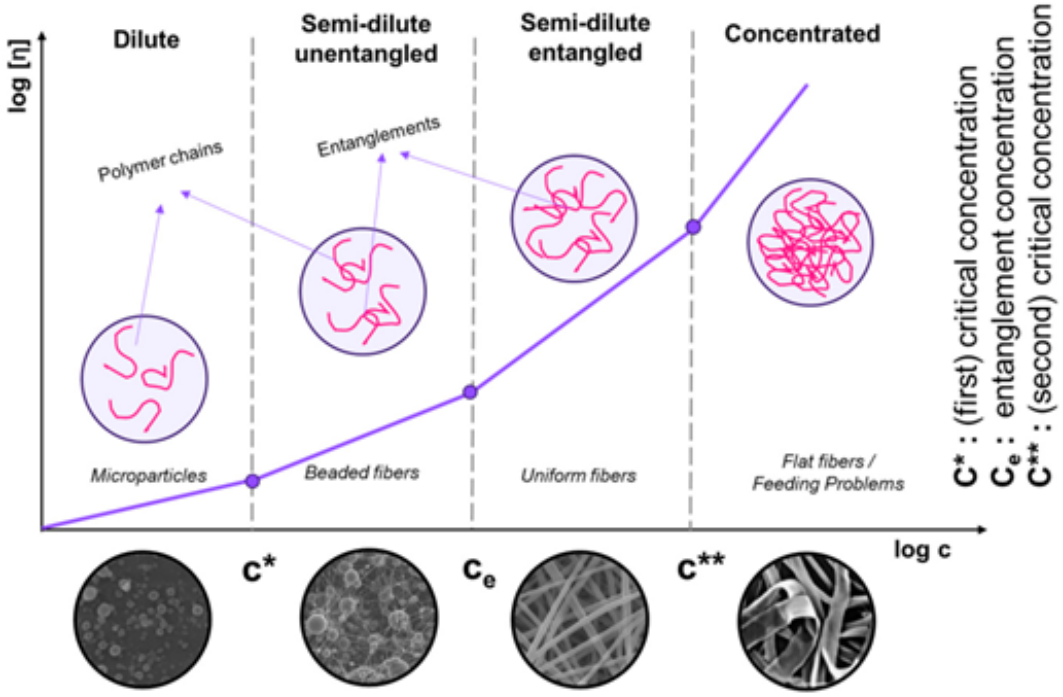


Figura 8: Dipendenza della concentrazione della soluzione polimerica. Relazione di scaling tra la concentrazione critica (C), la concentrazione di entanglement delle catene (Ce) e la viscosità per vari regimi di concentrazione. https://www.mdpi.com/1422-0067/25/3/1668*

Poiché molti polimeri altamente solubili in acqua (come il PVA) rimangono solubili in acqua anche dopo il processo di elettrofilatura, in questo caso è necessario sottoporre le membrane a trattamenti di reticolazione (cross-linking) per migliorarne la stabilità in acqua e la resistenza meccanica (il crosslinking del PVA è stato trattato nel capitolo 6.2).

CAPITOLO 8 – UTILIZZO DI FIBRE DI PVA IN MEDICINA RIGENERATIVA

Nanofibre di PVA ottenute tramite elettrospinning sono state realizzate per diversi studi recenti nel campo della medicina rigenerativa. I lavori più significativi trovati in letteratura sono esposti qui di seguito:

In uno studio del 2012, il PVA è stato miscelato con chitosano e processato tramite elettrospinning, le fibre ottenute hanno mostrato porosità e stabilità adeguate per la coltura cellulare[59]. In particolare, le cellule PC12 hanno evidenziato maggiore vitalità e proliferazione rispetto a fibre costituiti solo da PVA. La **figura 9(d)** riporta immagini al SEM dell'adesione delle cellule nervose PC12 su scaffold nanofibrosi in PVA/chitosano; il grafico rappresenta l'analisi MTT dei campioni in PVA e PVA/chitosano. Un altro studio del 2016 (Nature) ha prodotto membrane elettrofilate da soluzioni acquose di PVA/gelatina[60]. Rispetto alla soluzione con solo PVA, l'inclusione della gelatina ha migliorato significativamente l'adesione, l'espansione e l'allungamento del citoscheletro dei fibroblasti 3T3, mostrando una morfologia cellulare più estesa e una proliferazione superiore. La **figura 9(a)** rappresenta uno schema riassuntivo dello studio.
In un articolo del (2021) è stata utilizzata una composizione ternaria PVA/chitosano/gelatina ha generato, attraverso elettrospinning, scaffold biocompatibili destinati a cellule beta pancreatiche e fibroblasti[61]. Questi scaffold, caratterizzati da elevata porosità, flessibilità, rigidezza meccanica e stabilità in ambiente acquoso, hanno sostenuto la proliferazione celluare la quale è testata tramite saggio di vitalità MTT. La **figura 9(b)** rappresenta uno schema riassuntivo dello studio.
In un altro studio del 2021, sono state sviluppate e ottimizzate fibre elettrofilate a base di polivinil alcol (PVA) e alginato di sodio (SA)[62].

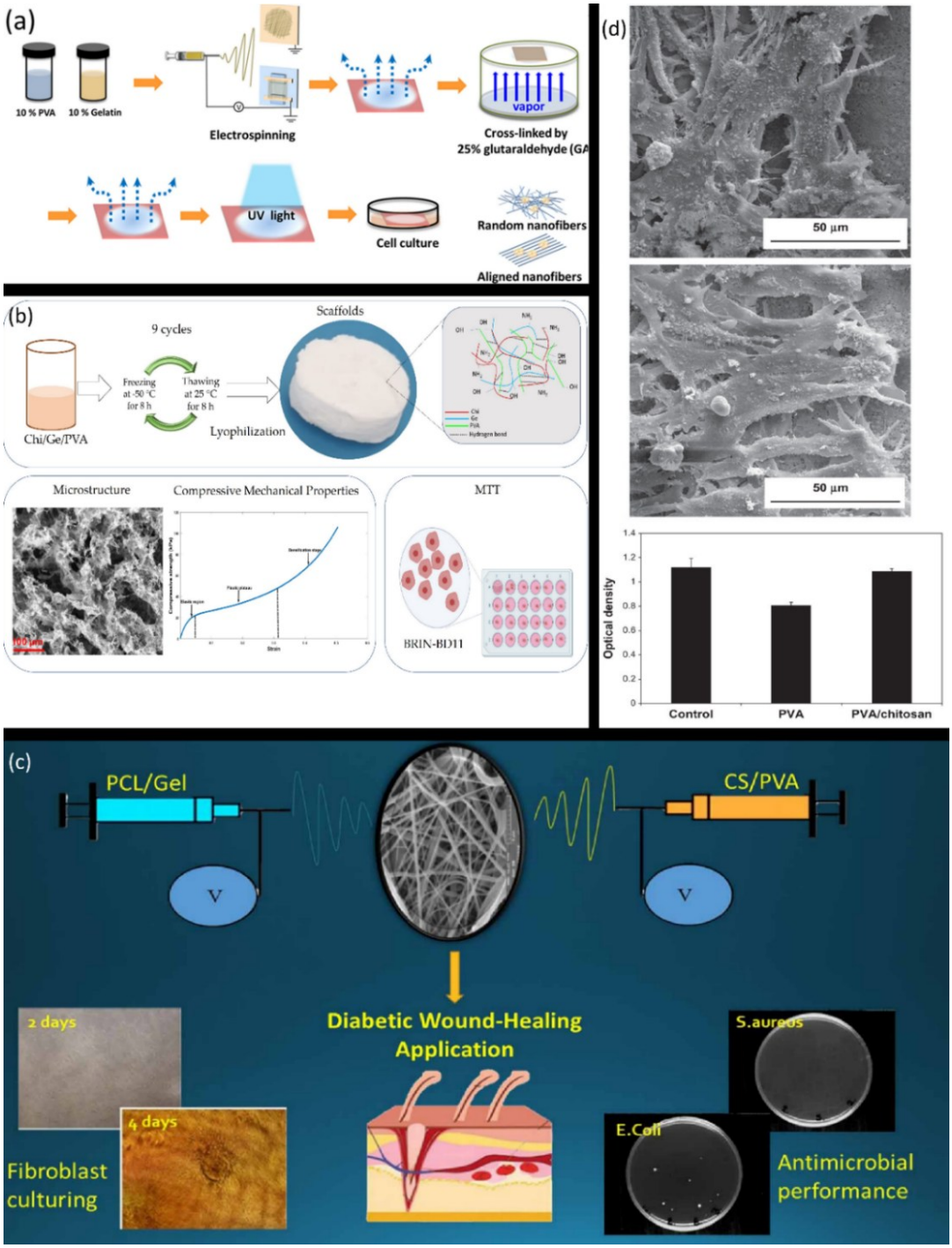


Figura 9: serie di immagini riassuntive degli articoli riportati nel capitolo 8.

Gli autori hanno studiato diverse composizioni e parametri di processo per ottenere scaffold nanofibrillari stabili e idonei alla coltura cellulare. Le fibre risultanti hanno mostrato buona uniformità, idrofilia e stabilità in ambiente acquoso. Le prove biologiche con fibroblasti hanno evidenziato un'elevata adesione e proliferazione cellulare, indicando che gli scaffold PVA/SA possiedono proprietà promettenti per applicazioni nell'ingegneria tissutale e nella medicina rigenerativa.

Piu recentemente (2024) uno studio ha ideato e testato uno scaffold multistrato ottenuto da due getti (PVA/chitosano + gelatina/(epsilon-caprolacton)[63]. Esso è stato testato con cellule mesenchimali (MSC). Il supporto ha dimostrato un'ottima adesione e proliferazione cellulare, suggerendo potenzialità per applicazioni rigenerative in vivo. La **figura 9(c)** rappresenta uno schema riassuntivo dello studio.

Infine, sempre nel 2024, è stato pubblicato un articolo in cui si testa uno scaffold nanofibroso costituito da PVA–gelatina–chitosano–zeina ottenuto tramite elettrospinning per il trattamento ferite[64]. Il PVA associato a proteine naturali (gelatina, chitosano e zeina) e caricato con vitamina E è stato sviluppato per medicazioni avanzate. I test di biocompatibilità hanno confermato che il supporto promuoveva crescita cellulare e ritardo di degradazione in vitro.

SEZIONE III – MATERIALI E METODI

In questa sezione verranno descritti nel dettaglio i materiali utilizzati, le procedure e i parametri sperimentali adottati per ottenere le nanofibre di PVA oltre alle tecniche di caratterizzazione principali utilizzate nel mio lavoro di tesi.

CAPITOLO 1 – PREPARAZIONE DELLA SOLUZIONE POLIMERICA

Il polivinil alcol (PVA, Sigma-Aldrich) utilizzato in questa tesi ha un peso molecolare di 89-98 kDa e un grado di idrolisi >99%. Inizialmente mi sono occupato della messa a punto della soluzione, in termini di massa di polimero e di volume di solvente necessari per ottenere soluzioni con adeguata viscosità, tale da poter essere elettrofilata.
La preparazione della soluzione polimerica destinata al processo di elettrospinning è stata condotta seguendo un protocollo standardizzato, al fine di garantire la riproducibilità degli esperimenti e l'ottenimento di fibre omogenee e stabili. In primo luogo, è stato utilizzato PVA. La massa di PVA da introdurre dipendeva dal volume totale di soluzione da preparare; nella quasi totalità delle prove sperimentali è stato adottato un volume di soluzione di base (PVA + acqua + etanolo, esclusi eventuali additivi) di 4 mL, mentre la quantità di PVA era del 13,5% w/w rispetto al volume totale della soluzione, corrispondente a un quantitativo di 540 mg di PVA. Tali parametri sono quelli adottati anche nelle prove definitive.

Dunque, in condizioni ottimizzate, vengono pesati su bilancia analitica (accuratezza ± 0,1 mg) 540 mg di polimero, poi accuratamente trasferiti in una vial di vetro, e disciolto in 3,2 mL di acqua ultrapura (H_2O) prelevata mediante micropipetta tarata. La vial vienesigillata tramite il tappo a vite e poi con pellicola parafilm per prevenire evaporazione del solvente e contaminazioni esterne; quindi, viene posta su agitatore magnetico riscaldante impostato a 500 rpm e 130 °C per una durata di 90 minuti. Al termine di questo passaggio, la soluzione appare come un liquido limpido e viscoso, privo di residui polimerici solidi. Successivamente, immediatamente dopo aver rimosso la vial dall'agitatore, si aggiungono gli 0,8 mL di etanolo mediante micropipetta, al fine di modulare la tensione superficiale della soluzione e ottimizzare così il comportamento

durante la successiva elettrofilatura. Dopo un periodo di riposo a temperatura ambiente per 5 minuti, si pone nuovamente la vial sull'agitatore magnetico a 60 °C e 500 rpm per ulteriori 60 secondi, allo scopo di favorire l'omogeneizzazione completa.
Parallelamente, è stata preparata una soluzione a base di gelatina da introdurre nella miscela. La gelatina ha lo scopo di migliorare l'adesione cellulare. La si ottiene per denaturazione del collagene, quindi ne conserva tutta la struttura primaria, incluse le sequenze RGD in grado di promuovere l'adesione con le integrine cellulari ed il mantenimento del fenotipo cellulare; Questo secondo effetto è particolarmente rilevante nel caso delle CEC, che in vivo aderiscono alla membrana di Descemet, e pertanto traggono beneficio da segnali biochimici di matrice presenti sul substrato artificiale. Dunque, a tal fine, 500 mg di gelatina sono stati disciolti in 2 mL di acqua ultrapura all'interno di una seconda vial. Anche in questo caso, il campione è stato sottoposto ad agitazione magnetica a 60 °C e 500 rpm per 10 minuti, fino al completo scioglimento del solido e alla formazione di una soluzione omogenea. Trascorso il tempo necessario, mediante micropipetta sono stati prelevati 500 μL della soluzione di gelatina, che sono stati aggiunti alla soluzione principale contenente PVA. La miscela risultante (PVA + gelatina) è stata mantenuta in agitazione per 10 minuti a 60 °C e 500 rpm, così da assicurare una dispersione uniforme della componente proteica e favorire le prime interazioni intermolecolari tra i polimeri.

In un secondo momento, quando è stata valutata la poca resistenza e l'alta solubilità in acqua dei film elettrofilati crosslinkati per via termica, è stato introdotto l'acido citrico come agente crosslinkante naturale e non tossico, in varie concentrazioni m/m rispetto al PVA (vedi capitolo 1 sezione IV). In particolare, la quantità di CA è del 15% del peso complessivo di PVA e gelatina presenti in soluzione. Considerando 540 mg di PVA e 125 mg di gelatina (pari al contenuto di 500 μL di soluzione madre), il quantitativo corrispondente di acido citrico è risultato pari a 99,75 mg. Dopo l'aggiunta, la soluzione è stata sottoposta a ulteriore agitazione magnetica a 60 °C, 500 rpm per 20 minuti, così da consentire un'omogenea distribuzione del cross-linker e prevenire precipitazioni o gradienti di concentrazione.
Infine, la soluzione completa è stata lasciata riposare a temperatura ambiente per 1 ora, condizione utile a favorire il rilassamento della catena polimerica e la stabilizzazione della miscela. Prima del caricamento nella siringa collegata alla pompa a siringa per l'elettrospinning, la soluzione è stata nuovamente agitata a temperatura ambiente per 5

minuti, al fine di eliminare eventuali micro-aggregati e assicurare la perfetta omogeneità della sospensione da filare.

Questa sequenza metodologica ha consentito di ottenere una soluzione polimerica stabile, con caratteristiche chimico-fisiche adeguate alla formazione di nanofibre uniformi e riproducibili, mantenendo al contempo un profilo di biocompatibilità coerente con l'impiego previsto come substrato per la coltura di cellule endoteliali corneali.

CAPITOLO 2 – SETUP ELETTROSPINNING

Il sistema di deposizione "Elettrospinning" (**Figura 10**) in dotazione del laboratorio di Biomateriali Avanzati del Dipartimento di Scienze della Vita di UNIMORE (Responsabile Prof. Michele Bianchi) è costiutito dai seguenti elementi principali:

- (i) una pompa per siringhe (syringe pump) per la fornitura controllata della soluzione polimerica;
- (ii) una siringa caricata con la soluzione polimerica da spinnare;
- (ii) un tubicino di PVC per portare la soluzione polimerica dalla siringa all'ago metallico;
- (iii) un ago metallico montato su un supporto isolante e collegato all'uscita del generatore di alta tensione (anodo);
- (iv) un collettore cilindrico motorizzato che funge da contro-elettrodo (catodo) e su cui avviene la deposizione delle fibre;
- (v) un alimentatore ad alta tensione e relativo cablaggio, messa a terra e infrastruttura generale (supporti, staffe, contenitore sperimentale).

I componenti principali sono prodotti dal medesimo fornitore (Linari Nanotech), ma la descrizione che segue è indipendente dalla marca e si concentra sul ruolo funzionale di ciascun elemento.

Pompa per siringa (syringe pump)

La pompa per siringhe è un dispositivo a motore passo-passo che assicura la somministrazione della soluzione polimerica a portata costante verso l'ago. La capacità di regolazione fine del flusso è critica per controllare il volume di materiale fornito e pertanto la morfologia delle fibre. La pompa è dotata di un display digitale per la programmazione e il monitoraggio del flusso. Prima dell'uso la siringa viene caricata in

condizioni asettiche, deve essere priva di bolle d'aria e montata saldamente sul supporto della pompa per evitare gioco meccanico.

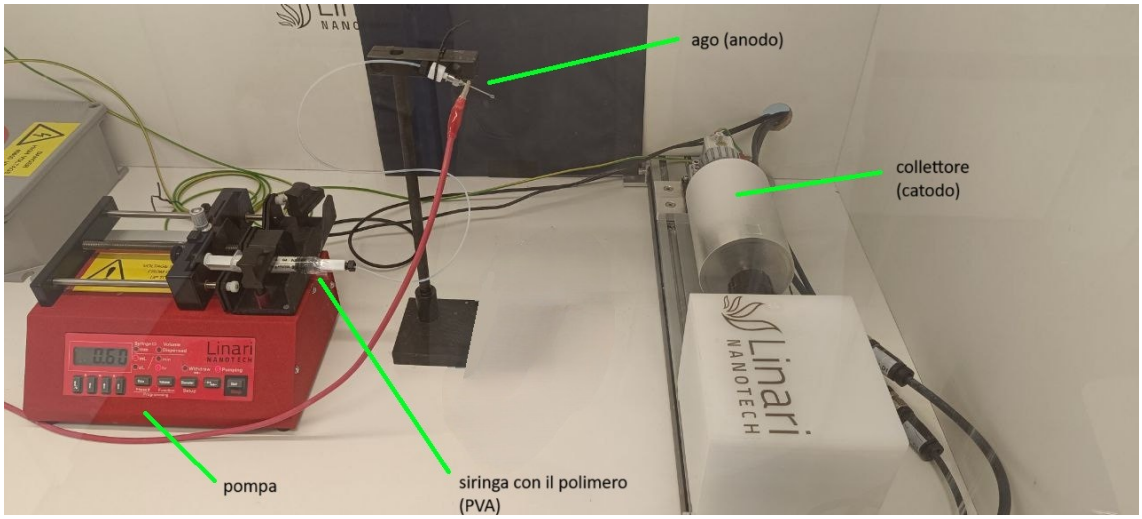


Figura 10: setup del sistema di elettrospinning utilizzato.

Siringa e ago

La soluzione polimerica è contenuta in una siringa (in plastica o in vetro) a cui è fissato un tubicino di PVC, il quale collega la siringa con l'ago metallico montato su un supporto isolante. La presenza del tubicino e del supporto consentono di modificare in maniera rapida e controllata la distanza e l'angolazione tra l'ago e il collettore. La scelta del diametro della cannula (gauge) influisce su viscosità apparente e formazione del filo: aghi a sezione più ampia (p. es. gauge minore) agevolano il passaggio di soluzioni più viscose, mentre aghi più sottili possono favorire la formazione di fibre più sottili ma al contempo aumentare il rischio di ostruzione del polimero all'interno dell'ago,

Alimentazione ad alta tensione e cablaggio

L'ago è connesso all'alimentatore HV (high-voltage), che applica una differenza di potenziale tra l'anodo (ago) e il catodo (collettore). Nel setup l'elettrodo dell'anodo è riconoscibile dal cablaggio rosso collegato all'ago. La gestione dei cavi (isolamento, distanza minima da parti conduttive non isolate, fissaggio con morsetti isolanti) è un requisito di sicurezza fondamentale, tutte le connessioni sono protette da guaine isolanti e il generatore HV deve essere dotato di interruttori di sicurezza e indicatori di guasto.

Collettore cilindrico motorizzato (rotating mandrel / drum)

Il collettore rappresenta il polo positivo dell'alta tensione ed è connesso alla terra dell'edificio. Si tratta di un mandrino cilindrico metallico, montato su supporto motorizzato e che svolge la duplice funzione di contro-elettrodo e substrato di raccolta. Può essere utilizzato in modalità rotante o statica. La rotazione del cilindro può essere impostata fino ad un massimo di 5000 rpm nel caso del collettore in dotazione dell'apparato utilizzato in questo lavoro di tesi per indurre l'allineamento delle fibre: bassi rpm tendono a produrre elettrofilati con fibre disposte in maniera randomica, da 3500-4000 rpm in su si cominciano ad ottenere fibre allineate dovute alla forza tangenziale agente sulle fibre che si stanno depositando sul collettore rotante. Il materiale del collettore è in genere alluminio e può essere rivestito temporaneamente da fogli di alluminio o anche carta forno (risultata più efficace) per facilitare il distacco del campione e preservare la superficie del collettore. Per una rapida visualizzazione al microscopio ottico delle fibre ottenuti, è possibile (in modalità collettore statico) alloggiare un vetrino o un altro supporto di piccole dimensioni, anche isolante, sul collettore.

Distanza ago–collettore (working distance)

La distanza tra la punta dell'ago e la superficie del collettore (tip-to-collector o working distance) è un parametro critico che influenza il tempo di volo del getto, l'evaporazione del solvente e l'assetto morfologico delle fibre, infatti, aumentando la distanza tra ago e collettore (tenendo costante il flusso, la tensione, la concentrazione del polimero), generalmente si osserva una diminuzione del diametro delle fibre, questo perché la distanza maggiore permette un lasso di tempo più lungo per l'allungamento del getto e l'evaporazione del solvente prima che le fibre raggiungano il collettore. Inoltre, quando la distanza è troppo breve, si può verificare fusione tra le fibre, o formazione di perle ("beads"), questo è determinato dal fatto che il solvente non ha sufficiente tempo per evaporare completamente durante il tempo di volo, ovvero da quando esce dall'ago fino a quando raggiunge la superficie del collettore.

Contenimento ambientale, messa a terra e sicurezza

Gli esperimenti sono svolti in un'area predisposta con adeguata segnaletica di pericolo HV e con messa a terra dell'apparecchiatura. Le interfacce di sicurezza dell'alimentatore HV (emergency stop) sono attive. Tutta l'apparecchiatura è contenuta all'interno di un contenitore fatto di tavole di materiale isolante, l'operatore, durante l'applicazione della tensione, è schermato da una lastra in plexiglass che viene chiusa, appunto, prima di

accendere l'alimentatore e aperta dopo averlo spento. Al momento del mio tirocinio, il sistema di elettrospinning utilizzato non dispone ancora di un sistema di controllo della temperatura e dell'umidità.

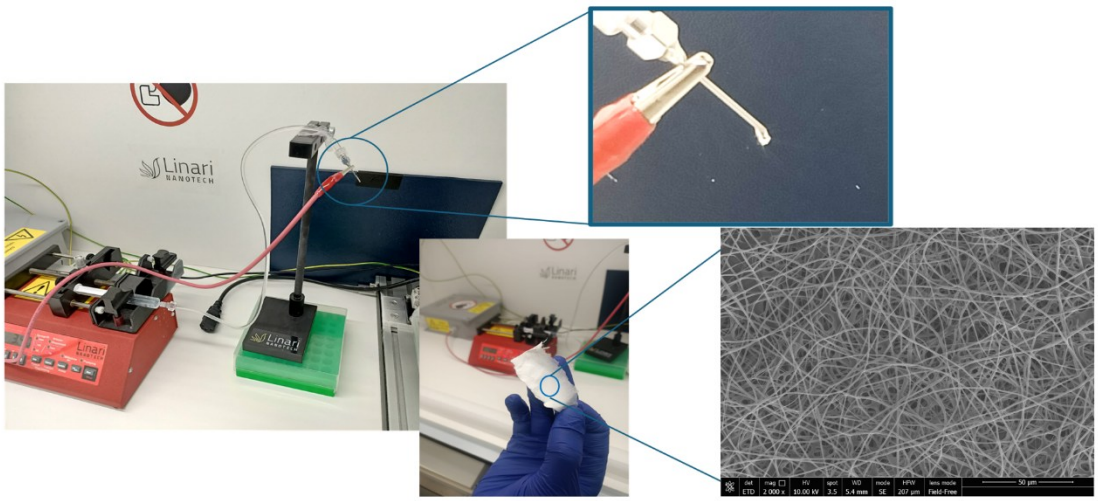


Figura 11: dettaglio della soluzione polimerica in uscita dall'ago, del materiale depositato così come appare una volta rimosso dal collettore e in una micrografia al microscopio elettronico a scansione.

CAPITOLO 3 – PARAMETRI OPERATIVI ELETTROSPINNING

La soluzione polimerica a base di poli (vinil alcol) (PVA), preparata secondo il protocollo descritto in precedenza (CAPITOLO 1 - SEZIONE III), viene prelevata dalla vial mediante l'utilizzo di una siringa sterile monouso, aperta immediatamente prima dell'uso. Ogni siringa viene destinata ad una singola deposizione e successivamente eliminata, al fine di garantire la sterilità e ridurre il rischio di contaminazioni o residui polimerici che potrebbero alterare la riproducibilità degli esperimenti. Prima del montaggio sulla pompa a siringa, la soluzione contenuta nella siringa viene sottoposta a leggera agitazione manuale per rimuovere eventuali bolle d'aria, le quali, se presenti, potrebbero interferire con la regolarità del flusso e compromettere la stabilità del getto elettrofilato.

Successivamente, si apre il pannello in plexiglass dell'involucro di sicurezza che racchiude il sistema di elettrospinning, quindi la siringa viene fissata all'alloggiamento della pompa. Ogni manipolazione all'interno dell'involucro deve essere rigorosamente eseguita indossando guanti monouso, al fine di preservare la sicurezza dell'operatore e ridurre il rischio di contaminazione della soluzione o delle superfici. La pompa con la

siringa viene quindi accesa e programmata mediante i comandi presenti sul pannello digitale: l'impostazione prevede l'inserimento del volume da estrudere, unitamente all'unità di tempo prescelta (minuti od ore). Nelle condizioni sperimentali ottimizzate, la velocità di estrusione è stata fissata a 0,6 mL/h, valore che si è dimostrato ottimale al fine di garantire un flusso costante e un cono di Taylor stabile, minimizzando il rischio di formazione di gocce irregolari all'estremità dell'ago.

Una volta caricata la siringa, viene collegato ad essa il tubicino flessibile all'estremità opposta del quale è montato l'ago metallico, che viene successivamente fissato sul supporto. L'ago costituisce il punto di emissione del getto polimerico; ad esso viene quindi collegato il morsetto del cavo elettrico proveniente dal generatore ad alta tensione (HV). Il collettore, posto alla distanza prestabilita dall'ago, viene rivestito con un foglio di carta da forno, che rappresenta un substrato temporaneo di raccolta e ne facilita il successivo distacco del film nanofibroso elettrofilato.

Completato l'allestimento meccanico, il pannello frontale in plexiglass viene richiuso per garantire l'isolamento della camera e la protezione dell'operatore da eventuali scariche elettriche. Si procede quindi all'accensione del generatore HV, azionabile sia tramite il display touch-screen frontale sia tramite un computer collegato in rete locale. Dopo la disattivazione dell'interruttore di emergenza (emergency stop), viene selezionata la modalità "setup", che consente di impostare i parametri operativi principali: tensione applicata e velocità di rotazione del collettore.

In condizioni ottimizzate, il voltaggio applicato è stato impostato a 18 kV, questo è risultato essere il valore ottimale per la formazione di fibre continue e stabili. La maggior parte degli esperimenti è stata condotta con collettore statico, al fine di ottenere film di spessore uniforme in tempi ridotti. Tuttavia, per la produzione di fibre orientate, il collettore cilindrico è stato posto in rotazione alla velocità di 4000 rpm, condizione necessaria per conferire un allineamento preferenziale alle fibre depositate. In entrambi i casi, tanto la tensione elettrica quanto la velocità di rotazione del collettore sono state aumentate gradualmente: la tensione è portata prima a 10 kV, mantenuta per alcuni secondi; quindi, incrementata a 14 kV e infine al valore target di 18 kV; analogamente, per il collettore rotante, gli rpm sono stati incrementati progressivamente. Questo

approccio riduce il rischio di instabilità elettriche o meccaniche durante l'avvio del processo.

All'avvio della deposizione, monitorata in tempo reale dal display del generatore o dal software PC, è fondamentale verificare costantemente il valore di corrente che fluisce tra gli elettrodi. Tale corrente deve mantenersi nell'intervallo compreso tra 0.01 e 0.02 mA; valori superiori possono indicare la presenza di instabilità nel processo, formazione di scariche parziali o accumulo eccessivo di carica sulla superficie del collettore, con potenziale compromissione della qualità delle fibre.

Durante la deposizione, della durata variabile a seconda dello spessore desiderato, si rende necessario interrompere periodicamente il processo (tipicamente ogni 15–20 minuti) per rimuovere eventuali residui polimerici solidificati all'estremità dell'ago, che potrebbero ostacolare la formazione del cono di Taylor e compromettere la regolarità del getto. Tale operazione è condotta in condizioni di assoluta sicurezza in quanto quando si apre il pannello di plexiglass, si spegne automaticamente l'alta tensione. In aggiunta, è buona regola scaricare le cariche residue eventualmente accumulate nella strumentazione tramite una bacchetta isolante con la punta conduttiva collegata alla massa a terra Terminata l'operazione, il pannello viene richiuso e i parametri operativi vengono riportati gradualmente ai valori precedenti all'interruzione.

Al termine della deposizione, il film costituito da nanofibre raccolto sul collettore viene delicatamente rimosso assieme al supporto di carta da forno e successivamente staccato con attenzione per evitarne rotture o deformazioni. La siringa utilizzata viene smaltita, così come la soluzione residua eventualmente rimasta al suo interno. Tutti i componenti riutilizzabili, inclusi tubicino e ago, vengono accuratamente lavati con acqua distillata e successivamente con etanolo (EtOH), per eliminare ogni traccia di polimero residuo e garantire la piena efficienza del setup nelle deposizioni successive.

CAPITOLO 4 – TRATTAMENTO POST ELETTROSPINNING

Una volta ottenuti, i film di nanofibre di PVA sono ancora solubili in acqua. Come descritto in precedenza (capitolo 7 sezione II), se si vuole rendere il materiale insolubile in solvente acquoso in ottica di testarlo nel mezzo cellulare, è fondamentale effettuare un trattamento post-deposizione che porti alla formazione di legami idrogeno (trattamento termico) o covalenti (trattamento con agente reticolante ad alte temperature). Nel caso dei campioni da me preparati, una volta ottenute le fibre di PVA vengono poste all'interno di una stufa ventilata a temperatura a 140 °C per un tempo di 45 minuti. L'efficacia del trattamento può essere valutata andando a pesare il campione dopo il trattamento di crosslinking (massa iniziale, m_i), mettendolo 24 h a bagno in acqua deionizzata e andandolo poi a pesare nuovamente dopo essicazione completa per almeno 72 ore a temperatura ambiente (massa dry, m_d). La frazione di polimero residua, ovvero $f = (m_i - m_d)/m_i$ indica quale massa di polimero è rimasta dopo immersione in acqua, ovvero quanto polimero è tornato in soluzione. In genere una percentuale sopra il 90% indica che il processo di crosslinking è andato a buon fine e la maggior parte del polimero non si è risolubilizzato. La visualizzazione delle fibre ancora intatte al termine del trattamento di crosslinking tramite microscopia SEM può essere estremamente utile per confermare il dato della pesata. Nel corso della tesi sono state valutato diverse temperature (130, 140 e 150 °C) e tempi (15, 30, 45 e 60 min) di crosslinking al fine di ottenere una frazione polimero superiore al 90%. Sono state effettuate le pesate come indicato e valuta la morfologia delle fibre al termine del processo tramite SEM.

CAPITOLO 5 – SEMINA, COLTURA E FISSAZIONE DELLE CEC

Gli scaffold elettrofilati a base di poli (vinil alcol) sono stati sottoposti preliminarmente a sterilizzazione mediante autoclave, con ciclo standard a 121 °C per 20 minuti, al fine di garantire la completa inattivazione di microrganismi contaminanti e rendere i supporti idonei alla coltura cellulare. Dopo la sterilizzazione, gli scaffold sono stati manipolati in condizioni sterili all'interno di una cappa a flusso laminare verticale, per prevenire contaminazioni crociate durante la fase di semina.

Sugli scaffold prodotti sono state seminate cellule endoteliali corneali (CEC) di coniglio. Il coniglio rappresenta un modello sperimentale ideale per gli studi sulla cornea grazie alla somiglianza anatomica e fisiologica con l'uomo: il diametro, lo spessore corneale e

la densità delle cellule endoteliali sono comparabili, consentendo l'utilizzo degli stessi strumenti chirurgici impiegati in ambito clinico. Inoltre, la risposta all'invecchiamento è analoga, con una progressiva riduzione sia del diametro corneale sia della densità cellulare. A differenza delle cellule endoteliali corneali umane, tuttavia, quelle del coniglio possiedono una notevole capacità rigenerativa, sono infatti in grado di riacquistare attività mitotica e proliferare dopo un danno. Ciò le rende particolarmente adatte allo studio dei processi di rigenerazione e alla creazione di modelli di patologie corneali a lungo termine, nei quali le cellule umane non riuscirebbero a ripararsi. Infine, l'utilizzo di conigli allevati in condizioni standardizzate e sacrificati alla stessa età consente di minimizzare le variazioni interindividuali, garantendo una maggiore riproducibilità e affidabilità dei risultati sperimentali.
Le cellule, precedentemente mantenute congelate in azoto liquido, sono state seminate sugli scaffold ad una densità di 25.000 cellule/cm², valore scelto per garantire un'adeguata distribuzione cellulare iniziale e favorire la formazione di un monostrato coeso. Per ogni condizione sperimentale sono stati testati due approcci differenti: (i) scaffold sottoposti a pre-trattamento con FNC Coating Mix, un rivestimento a base di peptidi e proteine extracellulari (fibronectina, collagene e albumina) applicato per 30 secondi, finalizzato a potenziare l'adesione cellulare imitando la composizione della membrana basale; (ii) scaffold non trattati, utilizzati come controllo, per valutare la capacità intrinseca del materiale di supportare l'adesione e la proliferazione cellulare.

Dopo la semina, gli scaffold sono stati mantenuti in incubatore a 37 °C in atmosfera umidificata contenente 5% CO_2, con sostituzione del terreno di coltura a giorni alterni. Questa procedura garantisce un apporto costante di nutrienti e ossigeno, oltre a rimuovere i metaboliti di scarto prodotti dalle cellule, creando così condizioni microambientali ottimali per la crescita e il mantenimento del fenotipo endoteliale.

Trascorsi otto giorni di coltura, gli scaffold sono stati sottoposti a fissazione secondo due protocolli distinti, scelti in funzione delle successive analisi di caratterizzazione. Una metà dei campioni è stata fissata in glutaraldeide (4% in PBS seguito da passaggi in concentrazione di EtOH crescente, dal 25% al 97%, 10 minuti ciascuno), al fine di preservare la morfologia ultrastrutturale delle cellule e consentirne l'osservazione tramite microscopia elettronica a scansione (SEM). L'altra metà è stata invece fissata in paraformaldeide (PFA) al 3% per 15 minuti a temperatura ambiente; tale fissazione

consente di preservare l'integrità dei nuclei e delle strutture cellulari principali, permettendo successivamente l'applicazione di colorazioni fluorescenti, quali il DAPI (4′,6-diamidino-2-fenilindolo), per la visualizzazione dei nuclei in microscopia confocale o a fluorescenza.

Questo approccio sperimentale ha permesso di valutare sia la morfologia cellulare e l'interazione con le fibre dello scaffold (analisi SEM), sia la densità e distribuzione dei nuclei (analisi DAPI), fornendo un quadro completo sull'adesione, la proliferazione e l'organizzazione delle CEC in coltura sugli scaffold a base di PVA.

SEZIONE IV – RISULTATI E DISCUSSIONE

CAPITOLO 1 – MESSA A PUNTO DEI PARAMETRI PRINCIPALI PER IL PROCESSO DI ELETTROSPINNING

L'ottenimento di film nanofibrosi elettrofilati di qualità adeguata, sia in termini morfologici che di spessore, ha richiesto una fase preliminare di ottimizzazione iterativa. Sia la composizione della soluzione polimerica che i parametri di processo dell'elettrospinning sono stati modificati più volte, fino ad arrivare a condizioni sperimentali stabili e riproducibili, in grado di fornire un prodotto omogeneo e con caratteristiche compatibili con il potenziale utilizzo come scaffold per colture cellulari.

Le prime prove di deposizione sono state calibrate sulla base di quanto riportato in letteratura per sistemi con setup strumentale simile. In tali esperimenti, la soluzione di partenza era composta dai tre componenti principali (PVA, acqua ed etanolo) ma in proporzioni differenti rispetto a quelle adottate nella formulazione finale. Nello specifico, la concentrazione di PVA era fissata al 15% w/w rispetto al volume totale della miscela acqua/etanolo (pari a 5 mL). Il rapporto tra i due solventi era inizialmente impostato a 3:2, ma successivamente modificato a 4:1. Tale variazione si è resa necessaria poiché una maggiore frazione acquosa consente al PVA di solubilizzarsi meglio, garantendo soluzioni più omogenee e viscosità più stabili, mentre un contenuto eccessivo di etanolo può accelerare troppo l'evaporazione durante la filatura, favorendo difetti morfologici.

Per quanto concerne i parametri di processo, la velocità di estrusione iniziale era fissata a 0,7 mL/h, con un voltaggio di 17 kV. La distanza ago–collettore è rimasta invariata a 15 cm in tutte le prove, essendo questo un valore frequentemente adottato in letteratura per garantire un equilibrio tra evaporazione del solvente e stabilità del getto, Inoltre adottando questa distanza non abbiamo riscontrato nessuno dei difetti delle fibre che sono generalmente associati ad una distanza ago-collettore non ottimale (vedi capitolo II sezione III). Inizialmente, l'ago era inclinato solamente verso il basso in modo che sia direzionato esattamente verso il collettore, quindi senza nessuna inclinazione laterale. Tuttavia, tale assetto determinava una dispersione del getto e una deposizione di materiale al di fuori della superficie utile del collettore, questo perché il campo elettrico che si

genera con questa disposizione dei componenti tende a spostare la traiettoria del getto verso sinistra. Introducendo un'inclinazione laterale dell'ago verso destra di circa 30° (mantenendo invariato l'angolo di inclinazione verso il basso) ha consentito una maggiore focalizzazione del flusso di fibre sulla parte centrale della superficie del collettore, o comunque uniformemente per tutta la sua lunghezza. Il tubicino in PVC che connette la siringa all'ago ha un diametro interno di 0,5 mm così come l'ago stesso.

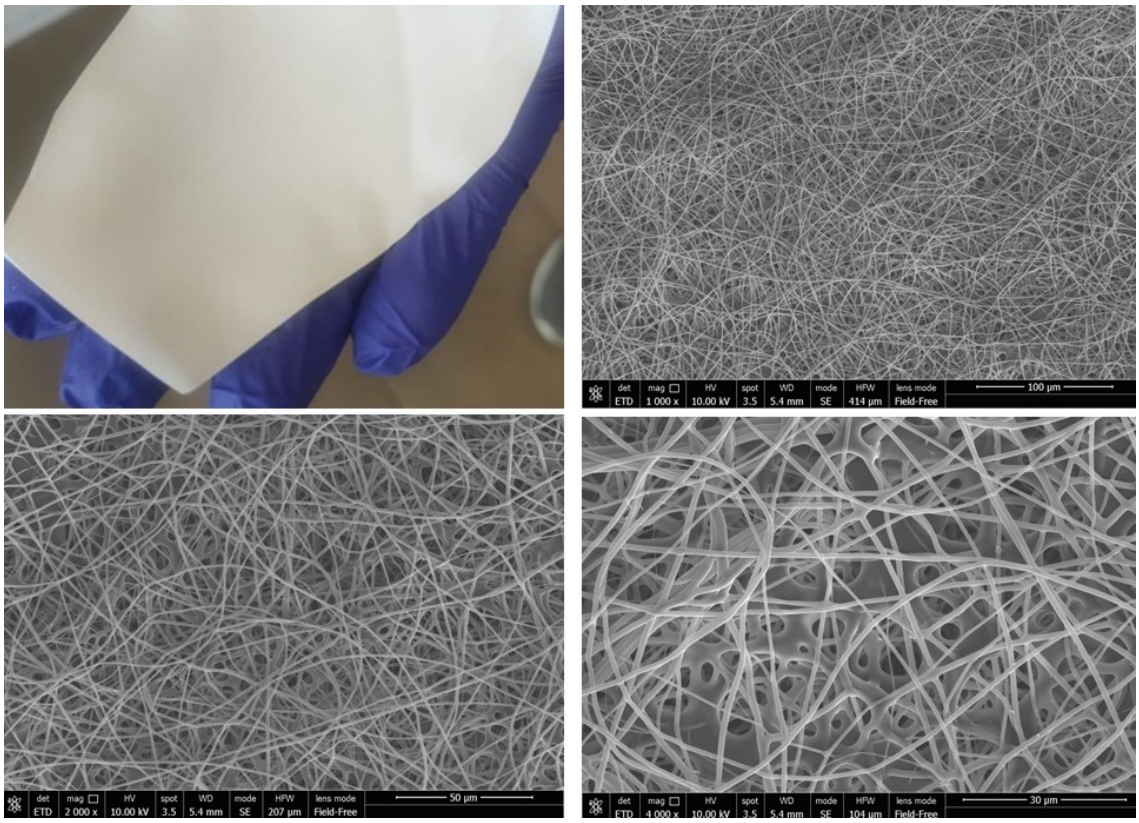


Figura 12: Micrografie al SEM. 13,5 %PVA, V=17 kV, rate= 0.6 ml/h

I principali problemi riscontrati nelle prime fasi di ottimizzazione riguardavano la presenza di "beads": goccioline microscopiche inglobate nella struttura fibrosa, osservabili già al microscopio ottico come rigonfiamenti. Tali difetti si formano quando il tasso di estrusione è troppo elevato rispetto al voltaggio applicato, oppure quando la distanza ago–collettore è insufficiente a permettere la completa evaporazione del solvente. Anche la composizione della soluzione contribuisce significativamente a questo fenomeno, in quanto rapporti non bilanciati tra acqua ed etanolo influenzano tensione superficiale e viscosità, parametri strettamente correlati alla formazione di getti stabili. Oltre ad artefatti come le beads, si potevano riscontrare degli ammassi di materiale come

quelli visibili in profondità nelle micrografie della **Figura 12**. La presenza di tali gocce o ammassi è particolarmente critica in ottica di coltura cellulare: cellule come le CEC, che necessitano di aderire a superfici uniformi, trovano ostacolo in tali discontinuità morfologiche.

Un ulteriore difetto osservato era la formazione di gocce macroscopiche ("droplets") proiettate dall'ago al collettore, causate anch'esse da un non corretto equilibrio tra velocità di estrusione e tensione applicata. Successive modifiche della composizione della soluzione hanno contribuito a ridurre anche questo problema.

Per quanto riguarda la rotazione del collettore, le prime prove sono state condotte a 1500 rpm. L'analisi al microscopio ottico ha tuttavia mostrato che a tale velocità non si otteneva un allineamento significativo delle fibre. Esperimenti successivi hanno evidenziato che valori superiori, in particolare ≥3000 rpm, sono necessari per indurre un orientamento apprezzabile della matrice fibrillare.

A partire dalla sesta prova, la concentrazione di PVA è stata ridotta al 13,5% w/w, mentre il rapporto acqua:etanolo è stato stabilizzato definitivamente a 4:1. Questa scelta ha garantito un miglior bilanciamento tra viscosità della soluzione (essenziale per la continuità delle fibre) e velocità di evaporazione (determinante per evitare la formazione di difetti).

Una volta raggiunte condizioni stabili, i film sono stati valutati tramite microscopia ottica e, successivamente, tramite SEM, verificando parametri quali continuità delle fibre, diametro medio, assenza di difetti macroscopici e porosità complessiva. Solo dopo tale validazione è stato possibile introdurre ulteriori variabili sperimentali, ovvero l'aggiunta di nuovi componenti alla soluzione di partenza.

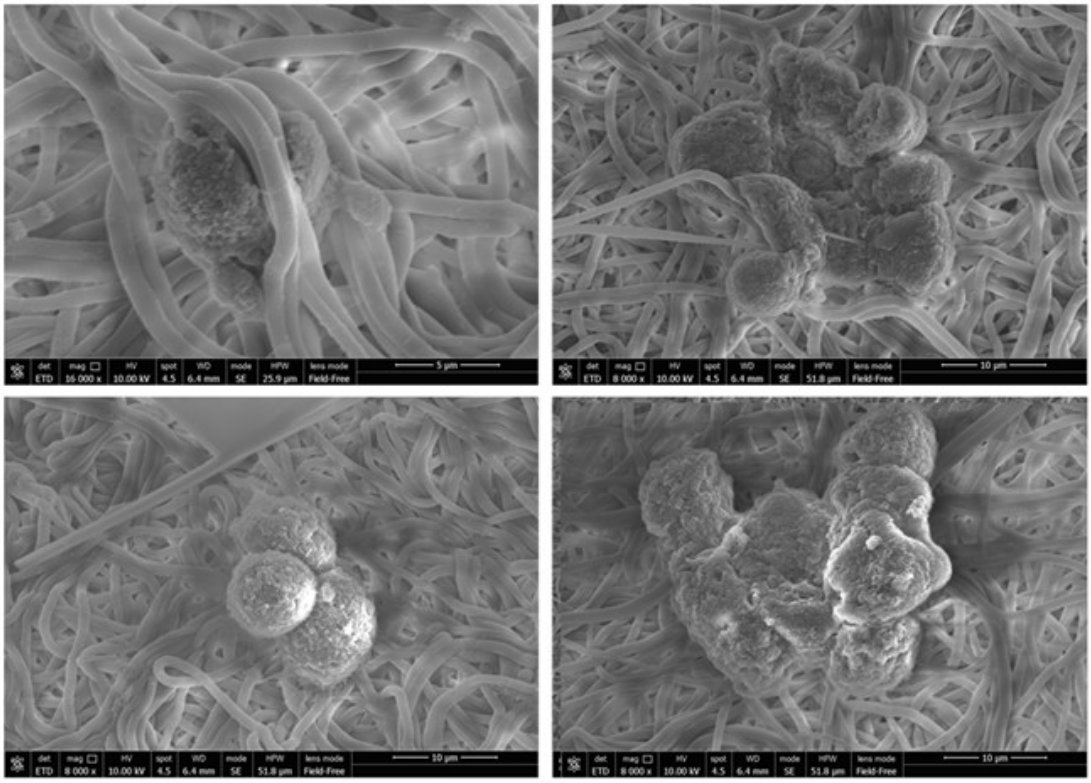


Figura 13: micrografie di CEC seminate sullo scaffold di PVA (no gelatina, no acido citrico) rivestito con FNC coating mix. Ingrandimento 16000x nella foto in alto a sinistra, 8000x nelle altre tre.

La micrografia in **Figura 13** mostra le CEC seminate su uno scaffold PVA e gelatina (protocollo di elettrospinning riportato nel capitolo 3 della sezione III), ma in assenza di acido citrico come agente crosslinkante (gli altri componenti della soluzione sono nelle quantità riportate nel capitolo 3 sezione III). Le cellule risultano ben aderenti al substrato e parzialmente inglobate nella rete di nanofibre, indicando una buona affinità biologica e una forte adesione cellula-materiale mediata dalle componenti proteiche della gelatina. Tuttavia, la struttura fibrosa appare priva di rigidità e compattezza: le fibre risultano collassate e meno definite rispetto agli scaffold sottoposti a reticolazione chimica.

Questa perdita di integrità strutturale è attribuibile all'assenza di legami covalenti tra le catene polimeriche. In tali condizioni, le fibre tendono ad assorbire acqua e a perdere la propria architettura originaria, riducendo la stabilità meccanica del supporto. Sebbene l'adesione cellulare risulti efficace, la mancanza di rigidità compromette la capacità dello scaffold di mimare adeguatamente le proprietà meccaniche della membrana di Descemet, parametro fondamentale per un corretto supporto alla crescita e al mantenimento del fenotipo endoteliale. Questi risultati evidenziano l'importanza del crosslinking chimico

per garantire la stabilità e la funzionalità del biomateriale in applicazioni di ingegneria tissutale corneale.

Aggiunta dell'acido citrico

Gli esperimenti successivi hanno previsto l'aggiunta di acido citrico come agente reticolante chimico. La prima quantità testata è stata del 15% w/w rispetto al PVA. inizialmente i risultati non sono stati soddisfacenti: la quantità di materiale depositato era ridotta e le fibre erano meno regolari e caratterizzate da grande presenza di beads (**Figura 14**) rispetto agli esperimenti senza CA, segno che l'acido citrico modificava eccessivamente le proprietà reologiche della soluzione in assenza di altri componenti, ostacolando la formazione di un getto stabile. Successivamente, dopo aver introdotto la gelatina nella soluzione polimerica, anche la quantità di acido citrico è stata cambiata (le proporzioni adottate sono riportate nel capitolo 1 della sezione III), questo ha determinato un miglioramento della qualità delle fibre.

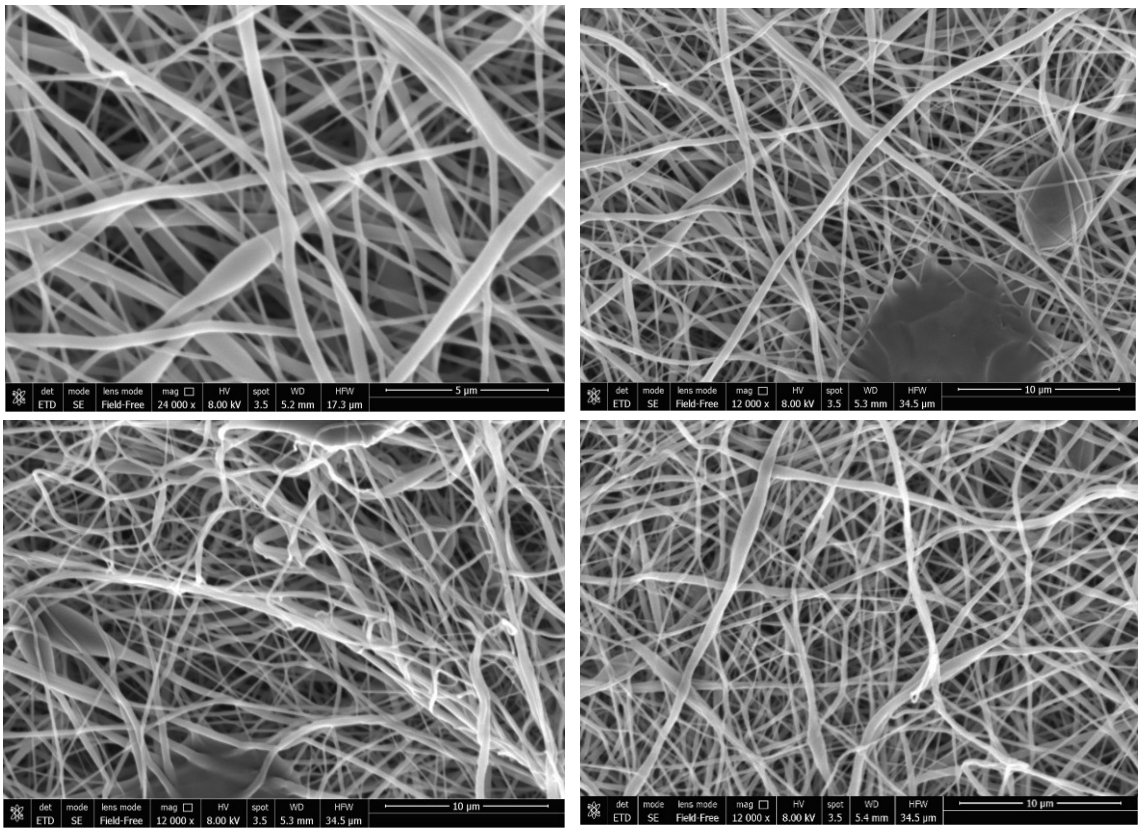


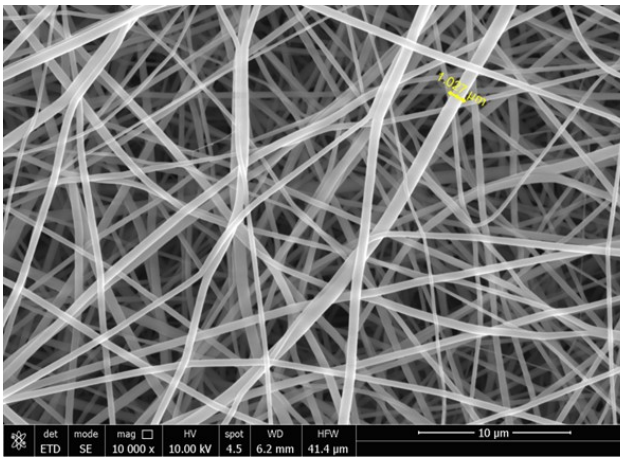
Figura 14: micrografie al SEM, ingrandimento 24000x nella foto in alto a sinistra, 12000x nelle altre tre. In questi film la soluzione polimerica conteneva il 13,5% di PVA e il 15% w/w di acido citrico

Dopo deposizione, i film sono stati sottoposti a trattamento termico per indurre la reazione di esterificazione tra i gruppi carbossilici dell'acido citrico e i gruppi ossidrilici del PVA, portando alla formazione di legami covalenti inter-fibrillari. La verifica del successo della reticolazione è stata effettuata immergendo piccoli frammenti di film in acqua: i campioni correttamente reticolati risultavano insolubili, mentre quelli non reticolati si dissolvevano rapidamente.

Aggiunta di gelatina

Successivamente, è stata testata l'aggiunta di gelatina (gelatin from porcine skin), ovvero collagene denaturato, con l'obiettivo di migliorare l'adesione cellulare al substrato. A differenza dell'acido citrico, l'inclusione di gelatina non ha determinato difetti o instabilità significative durante la deposizione, mantenendo una buona processabilità. Nella **Figura 15** è riportata una micrografia del prodotto di una prova preliminare in cui è stata testata per la prima volta la gelatina come componente della soluzione polimerica (in questo esperimento non è stato usato il CA), di fianco è riportata la distribuzione dei diametri delle nanofibre (50 misurazioni).

La soluzione di partenza è stata quindi modificata come segue: volume totale ridotto a 4 mL (3,2 mL di acqua e 0,8 mL di etanolo); PVA al 13,5% w/w (540 mg); gelatina al 3,2% w/w (125 mg); acido citrico al 15% w/w calcolato sulla somma dei pesi di PVA e gelatina. Quest'ultima proporzione è stata adottata poiché l'acido citrico non interagisce soltanto con i gruppi ossidrilici del PVA, ma anche con i gruppi amminici e carbossilici della gelatina, rendendo appropriato il calcolo sul peso totale dei due polimeri. In questo modo, il reticolante è presente in quantità sufficiente a garantire un crosslinking chimico efficace e stabile del sistema composito.



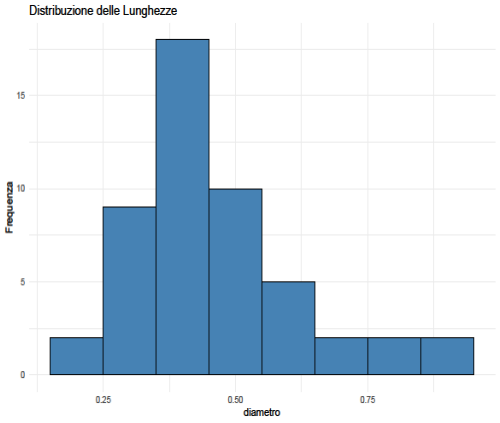


Figura 15: micrografia al SEM, ingrandimento 10000x, composizione della soluzione: 607,5 mg PVA + 4,1 ml acqua +0,9 ml etanolo + 62,5 mg gelatina. Di fianco la distribuzione dei diametri delle fibre (µm)

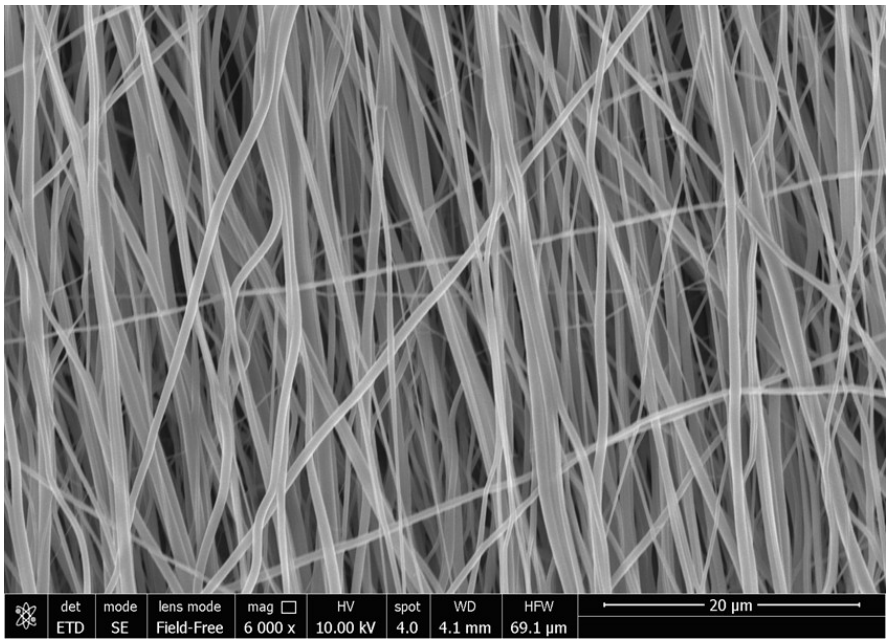


Figura 16: micrografia al SEM, ingrandimento 6000x. Film di nanofibre allineate ottenute elettrofilando una soluzione polimerica preparata secondo il protocollo riportato nel CAPITOLO 1 - SEZIONE III. Velocità di rotazione del collettore: 4000 rpm, V: 18kV, rate di pompaggio: 0,8 ml/h

La micrografia in **Figura 16** rappresenta il risultato migliore per quanto riguarda la topografia nanometrica dello scaffold di PVA-gelatina-CA con fibre allineate (rotazione del collettore a 4000 rpm), la composizione della soluzione polimerica e gli altri parametri di elettrospinning utilizzati nella relativa prova sono poi rimasti invariati in quelle successive e sono quelli riportati nei capitoli 1 e 3 della sezione III.

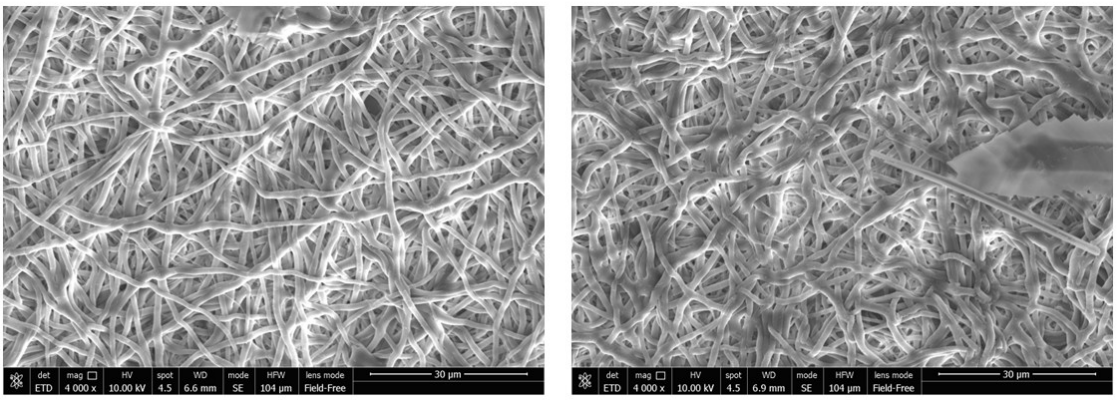


Figura 17: micrografia al SEM dello scaffold SENZA FNC coating mix

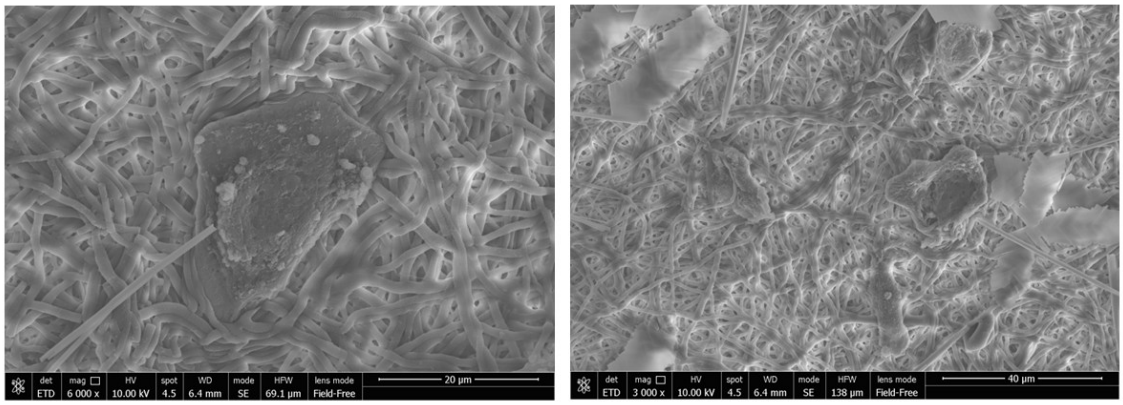


Figura 18: micrografia al SEM dello scaffold CON FNC coating mix

Le micrografie riportate in **Figura 17** e in **Figura 18** mostrano il confronto tra scaffold di PVA/gelatina/acido citrico, ottenuti mediante elettrospinning, sottoposti a semina di cellule endoteliali corneali (CEC) e incubati in condizioni identiche (vedi capitolo 5 sezione III), fatta eccezione per il trattamento superficiale con FNC Coating Mix applicato esclusivamente al campione nella figura 18. Tutti gli altri parametri sperimentali sono stati mantenuti costanti (riportati nei capitoli 1, 2 e 3 della sezione III)

Nella micrografia relativa al campione non trattato con FNC, la superficie del film elettrofilato appare completamente priva di cellule, evidenziando l'incapacità delle CEC di aderire e sopravvivere sullo scaffold. Questa osservazione suggerisce che, nonostante la presenza della gelatina nella matrice polimerica, l'energia superficiale e la composizione chimica del PVA non siano sufficienti a garantire un'adeguata adesione cellulare. La mancanza di gruppi proteici e di siti di legame specifici per le molecole di adesione espresse dalle CEC comporta una scarsa interazione cellula-substrato, con conseguente mancato attecchimento e perdita di vitalità cellulare nelle prime fasi della coltura.

Al contrario, nella micrografia relativa allo scaffold trattato con FNC Coating Mix, si osserva un'evidente colonizzazione della superficie da parte delle cellule endoteliali corneali, si tratta comunque di cellule singole a causa della scarsa quantità di cellule seminate. La presenza del FNC Coating Mix fornisce proteine di matrice extracellulare in grado di mediare l'adesione cellulare attraverso specifiche interazioni con i recettori integrinici, migliorando l'adesione cellulare, il mantenimento del fenotipo e la vitalità.

CAPITOLO 2 - ANALISI DELL'ADESIONE DI CEC SUI CAMPIONI DI PVA E PVA/GELATINA

Le Micrografie SEM presentate (**Figura 19**) offrono una visualizzazione dell'interazione tra le cellule endoteliali corneali (CECs) seminate sullo scaffold di nanofibre di PVA e gelatina elettrofilate e rivestite con FNC Coating Mix (il protocollo utilizzato è riportato nel capitolo 5 della sezione III). La soluzione polimerica utilizzata è quella riportata nel capitolo I della sezione III. Le tre micrografie, ottenute con ingrandimento 6.000x mostrano l'adesione delle cellule sul substrato su cui sono state seminate. In tutte le immagini, è possibile osservare singole cellule o aggregati di CECs che si sono depositati e hanno aderito alla struttura porosa e fibrosa dello scaffold. A causa nel ridotto numero di cellule seminate, ovviamente, non si osserva la confluenza propria del monolayer dell'endotelio corneale; tuttavia, in tutte e 3 le micrografie, è evidente come le CEC abbiano instaurato un'adesione molto stretta alla matrice nanofibrillare.

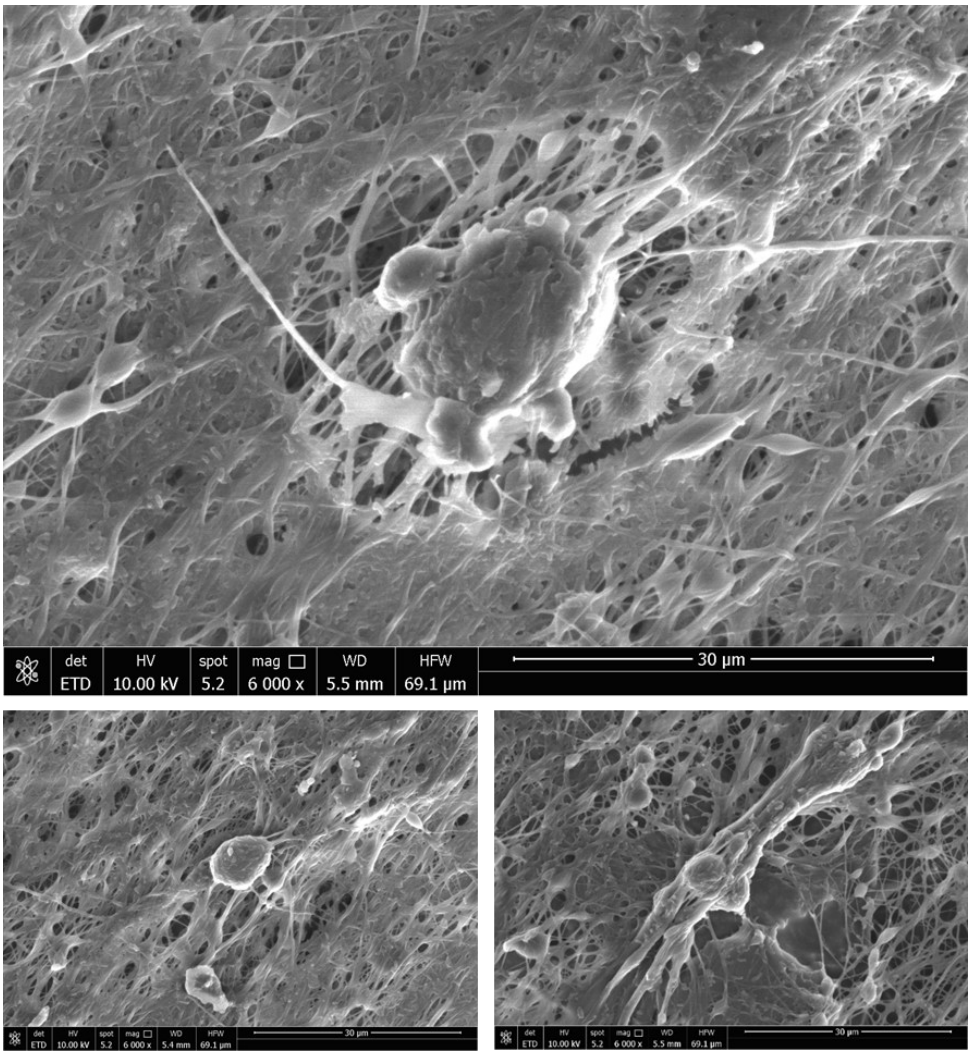


Figura 19: micrografie di CECs seminate su scaffold di PVA/gelatina crosslinkato chimicamente tramite CA e rivestisto con FNC Coating Mix

Nella micrografia in basso a destra, la cellula assume una forma affusolata, con il corpo cellulare teso tra due estremità opposte. Questo allineamento sembra seguire la direzione di allineamento delle fibre sottostanti, questo dimostra che l'allineamento delle fibre è in grado di modificare il comportamento cellulare

Si nota come le cellule non siano semplicemente "appoggiate" ma mostrino segni evidenti di ancoraggio alle nanofibre sottostanti. Questo suggerisce che il coating sia stato efficace nel fornire i siti di legame necessari all'adesione delle CECs al substrato.
Si può concludere che le cellule endoteliali corneali sono in grado di instaurare un'adesione efficace con lo scaffold a base di nanofibre di PVA/gelatina rivestito con FNC Coating Mix.

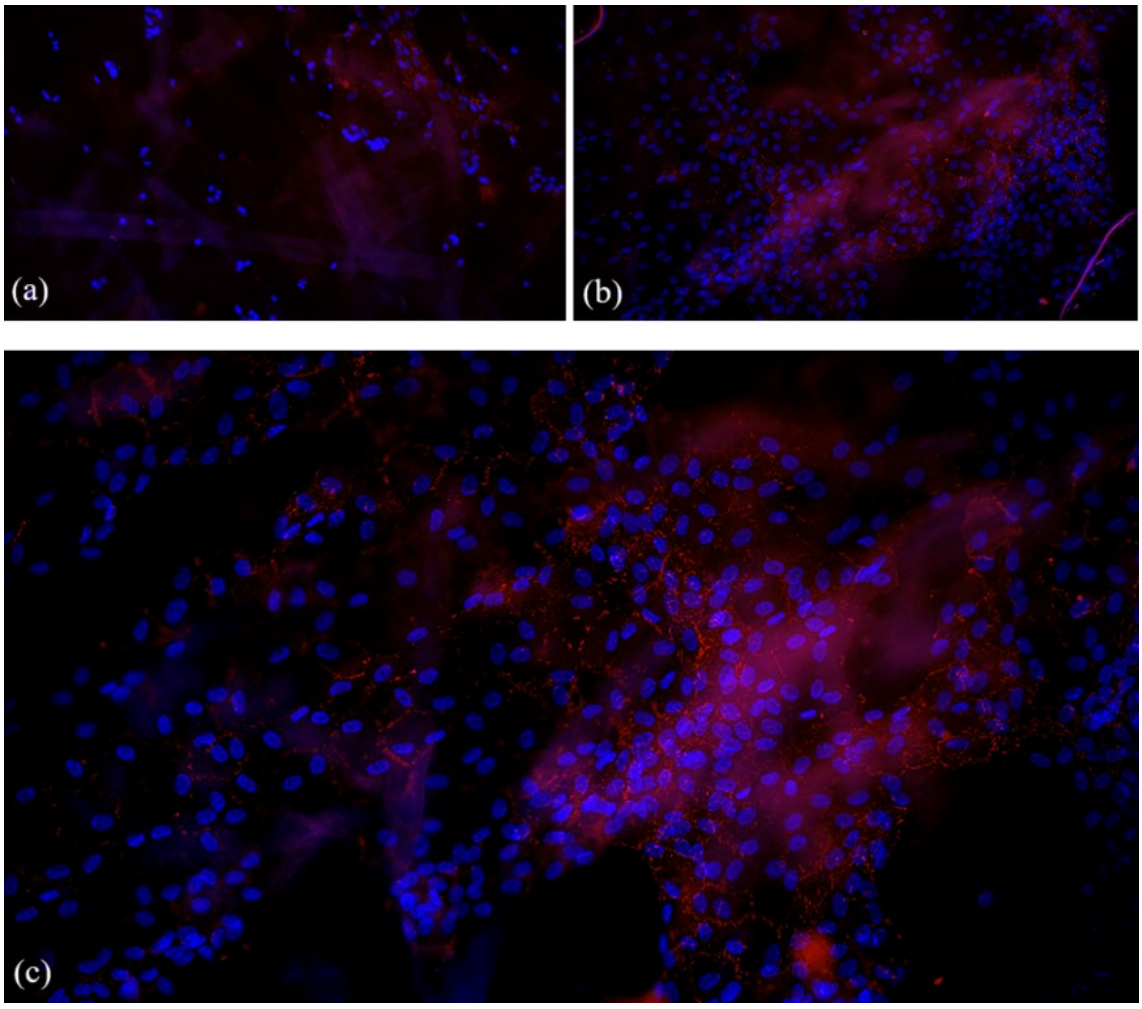


Figura 20: micrografie SEM immunofluorescenza delle cellule endoteliali corneali (CEC) coltivate su scaffold di PVA/gelatina rivestito con FNC Coating Mix. (a) densità cellulare piastrata: 31.000 cells/cm^2; (b) densità cellulare piastrata: 62.000 cells/cm^2; (c) densità cellulare piastrata: 125.000 cells/cm^2.

Le immagini in **Figura 20** mostrano, mediante microscopia a fluorescenza, la morfologia e la distribuzione delle cellule endoteliali corneali (CEC) coltivate su scaffold costituito da nanofibre elettrofilate di PVA e gelatina, trattato superficialmente con FNC Coating Mix al fine di favorire l'adesione cellulare. Il segnale blu corrisponde alla colorazione nucleare con DAPI, mentre la fluorescenza rossa evidenzia l'espressione della proteina ZO-1 (Zonula Occludens-1), marcatore delle tight junctions caratteristiche delle CEC mature e funzionalmente integre.

Nella micrografia (a) si osserva una distribuzione cellulare disomogenea, con nuclei ben definiti ma una densità moderata. Le cellule appaiono aderenti al substrato e in fase di espansione, indicando che il trattamento con FNC favorisce l'ancoraggio delle CEC alle fibre dello scaffold.

Nelle micrografie (b) e (c) si evidenzia maggiore confluenza cellulare, maggior numero di nuclei e una più marcata organizzazione spaziale delle cellule. Il segnale fluorescente relativo a ZO-1 (rosso) mostra un pattern continuo lungo i margini cellulari, suggerendo la formazione di giunzioni intercellulari simili a quelle tipiche del monostrato endoteliale corneale. Tale organizzazione indica che le CEC non solo aderiscono, ma possono stabilire interazioni funzionali cellula-cellula, requisito essenziale per il mantenimento della barriera endoteliale corneale in vitro. L'omogeneità del segnale fluorescente e la disposizione compatta delle cellule suggeriscono che lo scaffold di PVA/gelatina, in combinazione con il rivestimento FNC, offre un microambiente favorevole alla formazione di un monostrato endoteliale stabile e funzionalmente attivo.

I risultati di immunofluorescenza confermano che il substrato composito di PVA e gelatina rivestito con FNC Coating Mix supporta efficacemente l'adesione, la proliferazione e la differenziazione funzionale delle cellule endoteliali corneali. La presenza del marcatore ZO-1 lungo i bordi cellulari dimostra l'instaurarsi di giunzioni strette, segno distintivo di un fenotipo endoteliale maturo. Tali evidenze suggeriscono che lo scaffold sviluppato possieda buone proprietà biocompatibili e possa rappresentare una promettente piattaforma per applicazioni in ingegneria tissutale corneale e studi di rigenerazione dell'endotelio.

SEZIONE V - CONCLUSIONI

Il lavoro di tesi ha avuto come obiettivo la messa a punto e l'ottimizzazione di un sistema di elettrospinning per la produzione di scaffold nanofibrosi a base di poli (vinil alcol) (PVA), finalizzati alla coltura e al mantenimento in vitro di cellule endoteliali corneali

(CEC). Tale studio si inserisce nel contesto dell'ingegneria tissutale corneale, un ambito di ricerca di crescente interesse a causa della scarsità di tessuti donatori disponibili per trapianto e della necessità di sviluppare approcci alternativi basati su substrati biomimetici in grado di supportare la rigenerazione dell'endotelio corneale.

Nella fase iniziale del lavoro è stata approfondita la messa a punto del processo di elettrospinning, con un'analisi sistematica dei parametri operativi e delle condizioni sperimentali che influenzano la morfologia e la qualità delle fibre ottenute. L'ottimizzazione ha riguardato principalmente la composizione della soluzione polimerica, in particolare la concentrazione di PVA e il rapporto tra i solventi acquoso ed etanolico, nonché la tensione applicata, la velocità di estrusione e la distanza ago-collettore. Attraverso un approccio iterativo, basato sull'osservazione diretta del materiale depositato e sull'analisi morfologica tramite microscopia ottica e SEM, è stato possibile individuare le condizioni operative che consentono di ottenere un prodotto omogeneo, privo di difetti macroscopici e caratterizzato da fibre uniformi, con diametri regolari e adeguata densità superficiale. L'ottimizzazione di tali parametri ha rappresentato un passaggio fondamentale per garantire la riproducibilità e la qualità del materiale, prerequisiti indispensabili per le successive applicazioni biologiche.

Successivamente, la composizione della soluzione polimerica è stata modificata e arricchita con componenti in grado di migliorare la biocompatibilità e le proprietà meccaniche dello scaffold. L'inclusione della gelatina, proteina derivata dal collagene, ha rappresentato un passaggio cruciale per incrementare l'affinità biologica del materiale nei confronti delle cellule endoteliali corneali. La gelatina, infatti, introduce nella matrice polimerica gruppi amminici e catene peptidiche che favoriscono l'interazione con le integrine di membrana delle cellule endoteliali corneali, migliorando l'adesione e la stabilità delle colture. L'effetto positivo di tale componente è stato confermato dai risultati sperimentali: gli scaffold contenenti gelatina hanno mostrato un'elevata capacità di adesione e un attecchimento stabile delle cellule, con morfologie cellulari regolari e una distribuzione omogenea sulla superficie del substrato.

Parallelamente, è stato ottimizzato l'impiego dell'acido citrico come agente crosslinkante chimico, con lo scopo di incrementare la stabilità meccanica e ridurre la solubilità in acqua del materiale elettrofilato. Tale processo, associato al trattamento termico, ha

contribuito all'organizzazione delle nanofibre del prodotto come reticolo tridimensionale stabile e insolubile. Tale processo di reticolazione si è dimostrato essenziale per conferire rigidità e coesione allo scaffold, preservandone la morfologia fibrosa anche in condizioni di immersione in ambiente acquoso, simulando così le proprietà della membrana di Descemet.

Un ulteriore aspetto fondamentale del lavoro ha riguardato la valutazione dell'effetto del trattamento superficiale con FNC Coating Mix (fibronectina, collagene e albumina) sull'adesione e la proliferazione delle CEC sul materiale nanofibroso a base di PVA. Le prove di coltura cellulare hanno dimostrato che il coating riveste un ruolo determinante nel promuovere l'attecchimento cellulare su questo tipo di materiale. Tuttavia, gli scaffold privi di rivestimento non hanno mostrato alcuna colonizzazione da parte delle cellule. Questo indica che il materiale a base di PVA prodotto tramite elettrospinning non è in grado di supportare la crescita delle CEC senza una funzionalizzazione della superfice.

L'analisi morfologica e funzionale delle cellule coltivate sugli scaffold ottimizzati ha ulteriormente confermato l'efficacia del materiale sviluppato. Le immagini ottenute mediante microscopia elettronica a scansione (SEM) e immunofluorescenza hanno mostrato una disposizione cellulare regolare e compatta, con cellule adese saldamente alla matrice fibrosa e ben integrate nel reticolo tridimensionale. L'espressione del marcatore ZO-1 (Zonula Occludens-1), evidenziata dal segnale di fluorescenza lungo i margini cellulari, ha dimostrato la formazione di tight junctions, segno distintivo di un fenotipo endoteliale maturo e funzionalmente attivo. Questo risultato rappresenta un importante indicatore della capacità dello scaffold di supportare non solo l'adesione e la sopravvivenza cellulare, ma anche il mantenimento dell'identità fisiologica (caratteristiche funzionali, molecolari, morfologiche e metaboliche) delle CEC in vitro.

Nel complesso, i risultati ottenuti permettono di concludere che la combinazione di PVA, gelatina e acido citrico, opportunamente lavorata mediante elettrospinning, sottoposta a trattamento termico di crosslinking, e funzionalizzata a livello di superfice di contatto con il materiale biologico, sia in grado di fornire una base promettente per la realizzazione di scaffold nanofibrosi biocompatibili e meccanicamente stabili utili alla formazione di un monostrato di cellule endoteliali corneali regolare, con applicazioni possibili in ingegneria tissutale corneale. Le osservazioni morfologiche e funzionali complessive

indicano che lo scaffold sviluppato possiede le proprietà necessarie per fungere da supporto biomimetico nella coltura e nel potenziale trapianto di cellule endoteliali corneali, rappresentando un passo significativo verso lo sviluppo di strategie rigenerative avanzate per il ripristino della funzionalità corneale.

Nonostante i risultati incoraggianti, il lavoro non fa che porre le basi per ulteriori sviluppi futuri. Sarà necessario approfondire le analisi meccaniche e reologiche del materiale per definire in modo quantitativo la sua rigidezza e resilienza, nonché condurre studi in vitro a lungo termine per valutare la vitalità, la proliferazione e la funzionalità delle cellule in coltura prolungata. Ulteriori ottimizzazioni potranno includere l'introduzione di altri agenti crosslinkanti biocompatibili o di molecole bioattive in grado di modulare la risposta cellulare e migliorare ulteriormente la performance biologica del materiale. Inoltre, sarà utile valutare in maniera più accurata la completa trasparenza ottica dello scaffold e la sua risposta in condizioni fisiologiche simulate, al fine di verificarne l'idoneità per effettive applicazioni cliniche basate sull'utilizzo di cellule corneali endoteliali umane.

In sintesi, questo lavoro di tesi ha permesso di stabilire un protocollo riproducibile per la produzione e la funzionalizzazione di scaffold nanofibrosi a base di PVA e gelatina, evidenziando il ruolo cruciale del crosslinking chimico e del trattamento superficiale nella definizione delle proprietà strutturali e biologiche del materiale. Tali risultati contribuiscono in modo concreto all'avanzamento delle conoscenze nel campo della bioingegneria corneale e costituiscono una solida base per lo sviluppo di nuovi modelli di sostituti della membrana di Descemet per la rigenerazione dell'endotelio corneale.

SEZIONE VI - BIBLIOGRAFIA

1. Camburu, G., Zemba, M., Tătaru, C. P. & Purcărea, V. L. The measurement of Central Corneal Thickness. *Romanian J. Ophthalmol.* **67**, 168–174 (2023).

2. Cornea. *Wikipedia* (2025).

3. Ehlers, N. *et al.* Morphological evaluation of normal human corneal epithelium. *Acta Ophthalmol. (Copenh.)* **88**, 858–861 (2010).

4. Sridhar, M. S. Anatomy of cornea and ocular surface. *Indian J. Ophthalmol.* **66**, 190–194 (2018).

5. Reinstein, D. Z., Archer, T. J., Gobbe, M., Silverman, R. H. & Jackson Coleman, D. Stromal Thickness in the Normal Cornea: Three-dimensional Display With Artemis Very High-frequency Digital Ultrasound. *J. Refract. Surg. Thorofare NJ 1995* **25**, 776–786 (2009).

6. Espana, E. M. & Birk, D. E. Composition, structure and function of the corneal stroma. *Exp. Eye Res.* **198**, 108137 (2020).

7. Chameettachal, S. *et al.* Prevention of Corneal Myofibroblastic Differentiation In Vitro Using a Biomimetic ECM Hydrogel for Corneal Tissue Regeneration. *ACS Appl. Bio Mater.* **4**, 533–544 (2021).

8. Formisano, N. *et al.* Mechanical Properties of Bioengineered Corneal Stroma. *Adv. Healthc. Mater.* **10**, 2100972 (2021).

9. Ruggiero, F., Burillon, C. & Garrone, R. Human corneal fibrillogenesis. Collagen V structural analysis and fibrillar assembly by stromal fibroblasts in culture. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **37**, 1749–1760 (1996).

10. Quantock, A. J., Young, R. D. & Akama, T. O. Structural and biochemical aspects of keratan sulphate in the cornea. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **67**, 891–906 (2009).

11. Reinstein, D. Z., Archer, T. J., Gobbe, M., Silverman, R. H. & Coleman, D. J. Epithelial Thickness in the Normal Cornea: Three-dimensional Display With Very High Frequency Ultrasound. *J. Refract. Surg. Thorofare NJ 1995* **24**, 571–581 (2008).

12. Kruse, F. E. Stem cells and corneal epithelial regeneration. *Eye Lond. Engl.* **8 (Pt 2)**, 170–183 (1994).

13. Theerakittayakorn, K. *et al.* Differentiation Induction of Human Stem Cells for Corneal Epithelial Regeneration. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 7834 (2020).

14. Bashir, H., Seykora, J. T. & Lee, V. Invisible Shield: Review of the Corneal Epithelium as a Barrier to UV Radiation, Pathogens, and Other Environmental Stimuli. *J. Ophthalmic Vis. Res.* **12**, 305–311 (2017).

15. Wilson, S. E. The Cornea: No Difference in the Wound Healing Response to Injury Related to Whether, or Not, There's a Bowman's Layer. *Biomolecules* **13**, 771 (2023).

16. Murphy, C., Alvarado, J. & Juster, R. Prenatal and postnatal growth of the human Descemet's membrane. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **25**, 1402–1415 (1984).

17. de Oliveira, R. C. & Wilson, S. E. Descemet's membrane development, structure, function and regeneration. *Exp. Eye Res.* **197**, 108090 (2020).

18. Kabosova, A. *et al.* Compositional Differences between Infant and Adult Human Corneal Basement Membranes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **48**, 4989–4999 (2007).

19. Gurnani, B., Somani, A. N., Moshirfar, M. & Patel, B. C. Fuchs Endothelial Dystrophy. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), 2025).

20. Joyce, N. C. Proliferative capacity of the corneal endothelium. *Prog. Retin. Eye Res.* **22**, 359–389 (2003).

21. Bourne, W. M. Biology of the corneal endothelium in health and disease. *Eye* **17**, 912–918 (2003).

22. Walkow, T., Anders, N. & Klebe, S. Endothelial cell loss after phacoemulsification: relation to preoperative and intraoperative parameters. *J. Cataract Refract. Surg.* **26**, 727–732 (2000).

23. Bourne, R. R. A. *et al.* Effect of cataract surgery on the corneal endothelium: modern phacoemulsification compared with extracapsular cataract surgery. *Ophthalmology* **111**, 679–685 (2004).

24. Acar, B. T., Vural, E. T. & Acar, S. Changes in endothelial cell density following penetrating keratoplasty and deep anterior lamellar keratoplasty. *Int. J. Ophthalmol.* **4**, 644–647 (2011).

25. Numa, K. *et al.* Five-Year Follow-up of First 11 Patients Undergoing Injection of Cultured Corneal Endothelial Cells for Corneal Endothelial Failure. *Ophthalmology* **128**, 504–514 (2021).

26. Kinoshita, S. *et al.* Injection of Cultured Cells with a ROCK Inhibitor for Bullous Keratopathy. *N. Engl. J. Med.* **378**, 995–1003 (2018).

27. Hakim, F. E., Nagra, A. K. & Dhaliwal, D. K. Descemet Stripping Only: Long-Term Outcomes. *Cornea* **43**, 994 (2024).

28. Rizk, M. *et al.* Long-Term Follow-Up of Descemet Stripping Only: Data Up to 7 Years Postoperatively. *Cornea* **43**, 1245–1248 (2024).

29. Sharma, N., Maharana, P. K., Singhi, S., Aron, N. & Patil, M. Descemet stripping automated endothelial keratoplasty. *Indian J. Ophthalmol.* **65**, 198–209 (2017).

30. Price Jr, F. W. Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty (DMEK). *Rev. Bras. Oftalmol.* **75**, (2016).

31. Schlögl, A., Tourtas, T., Kruse, F. E. & Weller, J. M. Long-term Clinical Outcome After Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty. *Am. J. Ophthalmol.* **169**, 218–226 (2016).

32. Ang, M., Soh, Y., Htoon, H. M., Mehta, J. S. & Tan, D. Five-Year Graft Survival Comparing Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty and Penetrating Keratoplasty. *Ophthalmology* **123**, 1646–1652 (2016).

33. Yang, K. *et al.* Graft survival and endothelial outcomes after penetrating keratoplasty and Descemet stripping automated endothelial keratoplasty: A systematic review and meta-analysis. *Exp. Ther. Med.* **20**, 2794–2804 (2020).

34. Gain, P. *et al.* Global Survey of Corneal Transplantation and Eye Banking. *JAMA Ophthalmol.* **134**, 167–173 (2016).

35. Palchesko, R. N., Lathrop, K. L., Funderburgh, J. L. & Feinberg, A. W. In vitro expansion of corneal endothelial cells on biomimetic substrates. *Sci. Rep.* **5**, 7955 (2015).

36. Zhao, J. J. & Afshari, N. A. Generation of Human Corneal Endothelial Cells via In Vitro Ocular Lineage Restriction of Pluripotent Stem Cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **57**, 6878–6884 (2016).

37. Engelmann, K., Böhnke, M. & Friedl, P. Isolation and long-term cultivation of human corneal endothelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **29**, 1656–1662 (1988).

38. Hsueh, Y.-J. *et al.* Extracellular Matrix Protein Coating of Processed Fish Scales Improves Human Corneal Endothelial Cell Adhesion and Proliferation. *Transl. Vis. Sci. Technol.* **8**, 27 (2019).

39. Sumide, T. *et al.* Functional human corneal endothelial cell sheets harvested from temperature-responsive culture surfaces. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **20**, 392–394 (2006).

40. Koo, S., Muhammad, R., Peh, G. S. L., Mehta, J. S. & Yim, E. K. F. Micro- and nanotopography with extracellular matrix coating modulate human corneal endothelial cell behavior. *Acta Biomater.* **10**, 1975–1984 (2014).

41. Last, J. A., Liliensiek, S. J., Nealey, P. F. & Murphy, C. J. Determining the mechanical properties of human corneal basement membranes with atomic force microscopy. *J. Struct. Biol.* **167**, 19–24 (2009).

42. Liu, S., Chen, H., Xie, H., Liu, X. & Zhang, M. Substrate Stiffness Modulates Stemness and Differentiation of Rabbit Corneal Endothelium Through the Paxillin–YAP Pathway. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **65**, 15 (2024).

43. Xu, Q. *et al.* Strategies in the preparation of conductive polyvinyl alcohol hydrogels for applications in flexible strain sensors, flexible supercapacitors, and triboelectric nanogenerator sensors: an overview. *Adv. Compos. Hybrid Mater.* **6**, 203 (2023).

44. Hedayati, H. R., Khorasani, M., Ahmadi, M. & Ballard, N. Preparation of well-defined Poly(Vinyl alcohol) by hydrolysis of Poly(Vinyl acetate) synthesized by RAFT suspension polymerization. *Polymer* **246**, 124674 (2022).

45. Gadhave, R. V., Mahanwar, P. A. & Gadekar, P. T. Effect of glutaraldehyde on thermal and mechanical properties of starch and polyvinyl alcohol blends. *Des. Monomers Polym.* **22**, 164–170 (2019).

46. Sirviö, J. A. & Visanko, M. Highly Transparent Nanocomposites Based on Poly(vinyl alcohol) and Sulfated UV-Absorbing Wood Nanofibers. *Biomacromolecules* **20**, 2413–2420 (2019).

47. Tummala, G. K., Lopes, V. R., Mihranyan, A. & Ferraz, N. Biocompatibility of Nanocellulose-Reinforced PVA Hydrogel with Human Corneal Epithelial Cells for Ophthalmic Applications. *J. Funct. Biomater.* **10**, 35 (2019).

48. Sau, S., Pandit, S. & Kundu, S. Crosslinked poly (vinyl alcohol): Structural, optical and mechanical properties. *Surf. Interfaces* **25**, 101198 (2021).

49. Glutaraldehyde Vapor Cross-linked Nanofibrous PVA Mat with in Situ Formed Silver Nanoparticles | ACS Applied Materials & Interfaces. https://pubs.acs.org/doi/10.1021/am401730x?utm_source=chatgpt.com.

50. Choe, S. *et al.* Boric acid-crosslinked poly(vinyl alcohol): biodegradable, biocompatible, robust, and high-barrier paper coating. *Green Chem.* **26**, 8230–8241 (2024).

51. Huang, S.-M., Liu, S.-M., Tseng, H.-Y. & Chen, W.-C. Effect of Citric Acid on Swelling Resistance and Physicochemical Properties of Post-Crosslinked Electrospun Polyvinyl Alcohol Fibrous Membrane. *Polymers* **15**, 1738 (2023).

52. Johari, N., Adabavazeh, Z. & Baino, F. PVA-based bioinks for 3D bioprinting: A comprehensive review of their applications in tissue engineering. *Bioprinting* **49**, e00419 (2025).

53. Kim, S. J., Park, S., Kim, I., Lee, Y. & Kim, S. Thermal characteristics of poly(vinyl alcohol) and poly(vinylpyrrolidone) IPNs. *J. Appl. Polym. Sci.* **86**, 1844–1847 (2002).

54. Elfawal, G. F., Šišková, A. O. & Andicsová, A. E. Electrospinning: A Game-Changer in Fiber Production and Practical Applications. *Fibers Polym.* **26**, 4133–4160 (2025).

55. Bonakdar, M. A., Hamdi, O., Nazarenko, Y., Ariya, P. A. & Rodrigue, D. Highly porous biobased membranes via electrospinning of PBS and CTAB. *Polymer* **280**, 126045 (2023).

56. Khalil, A., Lalia, B., Hashaikeh, R. & Khraisheh, M. Electrospun metallic nanowires: Synthesis, characterization, and applications. *J. Appl. Phys.* **114**, 171301 (2013).

57. Zhang, H., Jin, C., Lv, S., Ren, F. & Wang, J. Study on electrospinning of wheat gluten: A review. *Food Res. Int.* **169**, 112851 (2023).

58. Islam, M. S., Ang, B. C., Andriyana, A. & Afifi, A. M. A review on fabrication of nanofibers via electrospinning and their applications. *SN Appl. Sci.* **1**, 1248 (2019).

59. Alhosseini, S. N. *et al.* Synthesis and characterization of electrospun polyvinyl alcohol nanofibrous scaffolds modified by blending with chitosan for neural tissue engineering. *Int. J. Nanomedicine* **7**, 25–34 (2012).

60. Huang, C.-Y., Hu, K.-H. & Wei, Z.-H. Comparison of cell behavior on pva/pva-gelatin electrospun nanofibers with random and aligned configuration. *Sci. Rep.* **6**, 37960 (2016).

61. Sánchez-Cardona, Y., Echeverri-Cuartas, C. E., López, M. E. L. & Moreno-Castellanos, N. Chitosan/Gelatin/PVA Scaffolds for Beta Pancreatic Cell Culture. *Polymers* **13**, 2372 (2021).

62. Jadbabaei, S., Kolahdoozan, M., Naeimi, F. & Ebadi-Dehaghani, H. Preparation and characterization of sodium alginate–PVA polymeric scaffolds by electrospinning method for skin tissue engineering applications. *RSC Adv.* **11**, 30674–30688 (2021).

63. Ranjbar-Mohammadi, M., Tajdar, F., Esmizadeh, E. & Arab, Z. Co electrospinning - poly (vinyl alcohol)-chitosan/gelatin-poly (ϵ-caprolacton) nanofibers for diabetic wound-healing application. *Biomed. Mater.* **19**, 045017 (2024).

64. Hodaei, H. *et al.* Preparation of biocompatible Zein/Gelatin/Chitosan/PVA based nanofibers loaded with vitamin E-TPGS via dual-opposite electrospinning method. *Sci. Rep.* **14**, 23796 (2024).