

Development of new *in vitro* models based on the use of electrospun scaffolds and their imaging by multiphoton microscopy coupled with fluorescence lifetime imaging microscopy

G.Piccirillo, *Department of Chemistry and Biology, University of Salerno, Italy, PhD in chemistry (Cycle XXX)*.

ABSTRACT

In this thesis, new possible applications of electrospun scaffolds are presented. Besides, the interaction of human dermal fibroblasts (HDFs) with the materials has been investigated using multiphoton microscopy (MPM) coupled with fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM), using a non-invasive, marker-free approach. In the first part of the thesis, pure poly-L-lactide (PLA) scaffolds were obtained and characterized as delivery systems for Diclofenac sodium salt (DCF) and a synthetically obtained prodrug of it for the treatment of actinic keratosis. The Diclofenac prodrug was obtained via solid phase peptide synthesis using a versatile, clean, high yielding procedure. Besides, the drug encapsulation and its release from the scaffold could be imaged using MPM. Moreover, when working with the unmodified DCF we were able to control the release profile by adding small amounts of dimethyl sulfoxide. The DCF-loaded scaffold was used as a delivery system to induce *in vitro* cell death in HDFs. The target cells were imaged using MPM coupled with FLIM, using a non-invasive, marker-free *in vitro* model to investigate drug effects. In the last part of the thesis, we produced and characterized different hybrid gelatin/PLA scaffolds. In this case, the goal was to obtain well-blended scaffolds with tunable properties, such as porosity, hydrophobicity and wettability. This aspect is of great interest since one of the main problems in tissue engineering is the difficulty of reproducing *in vitro* properties that *in vivo* usually differ from tissue to tissue. We were instead able to control them even without changing the employed polymers, by simply modifying few experimental processing conditions. Not least, the hybrid scaffolds were spectroscopically characterized with Raman microspectroscopy, while cellular interaction was analyzed with MPM coupled with FLIM, with all of them being non-invasive, non-destructive and marker-free approaches.

Sviluppo di nuovi modelli *in vitro* basati sull'uso di matrici elettrofilate, analizzati mediante microscopia multifotonica accoppiata con microscopia a tempo di vita di fluorescenza

G.Piccirillo, *Dipartimento di Chimica e Biologia, Università degli Studi di Salerno, Italia, Dottorato in chimica (XXX ciclo).*

ABSTRACT

Nella presente tesi di dottorato sono presentate nuove applicazioni di matrici elettrofilate. Inoltre, le microscopie multifotonica e a tempo di vita di fluorescenza sono proposte come tecniche per l'analisi non invasiva di tali matrici e della loro interazione con cellule umane. Nella prima parte della tesi sono state prodotte e caratterizzate matrici elettrofilate di acido poli-L-lattico contenenti il Diclofenac o un suo profarmaco per la cura della cheratosi attinica. Il profarmaco è stato sintetizzato mediante sintesi su fase solida. Il prodotto finale è stato ottenuto con una resa quantitativa e isolato con elevato grado di purezza. Il corretto incapsulamento del farmaco nelle matrici elettrofilate e il suo rilascio sono stati analizzati in maniera innovativa mediante microscopia multifotonica. Inoltre, il profilo di diffusione del Diclofenac dalla matrice è stato modificato mediante semplice aggiunta di piccoli volumi di Dimetilsolfossido. La matrice contenente il Diclofenac è stata poi usata come sistema per il rilascio controllato del farmaco con effetti citotossici su fibroblasti umani della pelle. Eventi necrotici e apoptotici sono stati visualizzati in maniera non invasiva mediante tecniche di microscopia multifotonica e a tempo di vita di fluorescenza. Nella parte finale della tesi sono state invece prodotte e caratterizzate matrici ibride di gelatina e acido poli-L-lattico aventi porosità, idrofilia e assorbimento controllate. In questo lavoro è stato possibile modificare tali proprietà, che *in vivo* differiscono da tessuto a tessuto, senza cambiare i polimeri utilizzati, bensì solo variando pochi parametri sperimentali. Infine, le matrici ibride sono state caratterizzate spettroscopicamente mediante micro-spettroscopia Raman mentre la loro interazione con fibroblasti umani della pelle è stata analizzata avvalendosi di tecniche di microscopia multifotonica e a tempo di vita di fluorescenza. Tutte queste tecniche permettono l'analisi dei campioni senza modificarli né danneggiarli.