



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PALERMO

L'Univercittà



Ministero dell'Università e della
Ricerca Scientifica e Tecnologica

Università degli Studi di Palermo

Facoltà di Farmacia
Dipartimento di Chimica e Tecnologie Farmaceutiche

DOTTORATO DI RICERCA
in
“Tecnologie delle Sostanze Biologicamente Attive”
XXII CICLO, A.A. 2007/2008

SSD CHIM/09

Preparazione e caratterizzazione di nuovi scaffold biocompatibili
per applicazioni nella medicina rigenerativa

Coordinatore:

Ch.mo Prof. Gaetano Giammona

Tesi di Dottorato di Ricerca del:

Dott. Calogero Fiorica

Tutor:

Ch.mo Prof. Gaetano Giammona

INDICE

1. INTRODUZIONE	pag	1
1.1 Medicina Rigenerativa ed ingegneria tissutale		1
1.2 Ingegneria dei tessuti epiteliali e dei tessuti connettivi		6
1.3 Biomateriali: applicazioni in ingegneria tissutale		15
1.4 Tecniche di preparazione degli scaffold: idrogeli ed elettrospinnati		21
1.5 Applicazioni in ingegneria tissutale: la cornea		29
1.6 Applicazioni in ingegneria tissutale: l'apparato tegumentario		36
2. SCOPO DELLA TESI		49
3. RISULTATI E DISCUSSIONE		56
3.1 Produzione di idrogeli-scaffold biocompatibili come sistemi di rilascio cellulare nella rigenerazione dell'epitelio corneale		56
3.1.1 Sintesi del derivato etilendiamminico dell' PHEA (PHEA-EDA)		57
3.1.2 Idrogeli compositi a base di acido ialuronico (HA) e α , β -poli(N-2-idrossietil)(2-amminoetilcarbammato)-D,L-aspartammide (PHEA-EDA): preparazione e caratterizzazione		59
3.1.3 Analisi FT-IR		61
3.1.4 Studi di swelling		62
3.1.5 Studi di degradazione chimica		64
3.1.6 Studi di citocompatibilità		65
3.1.7 Studi di adesione cellulare		67
3.1.8 Realizzazione di lenti a contatto rivestite dal film HA-PHEA-EDA		72

3.2 Produzione di scaffold fibrillari a base di PLGA per il trattamento delle ferite a tutto spessore nell'apparato tegumentario	76
3.2.1 Elettrospinning e valutazione delle caratteristiche morfologiche degli scaffolds	77
3.2.2 Studi di degradazione idrolitica degli scaffold elettrospinnati	78
3.2.3 Produzione del tessuto tegumentario bioingegnerizzato	81
3.2.4 Produzione di nuova ECM sui tessuti bioingegnerizzati	84
3.3 Produzione di scaffold fibrillari a base di PHEA-PLA per il trattamento delle ferite croniche dell'apparato tegumentario	87
3.3.1 Sintesi del copolimero graft PHEA-g-PLA	88
3.3.2 Sintesi del copolimero PHEA-g-PLA-(IBU)	90
3.3.3 Elettrospinning e valutazione delle caratteristiche fisiche degli scaffolds	94
3.3.4 Studi di swelling e degradazione	98
3.3.5 Studi di rilascio del farmaco	102
3.3.6 Prove di citocompatibilità	105
3.4 Produzione di scaffold fibrillari a base di PHEA-EDA-g-PLA per la ritenzione di agenti chemotattici nel trattamento delle ferite croniche dell'apparato tegumentario	107
3.4.1 Sintesi del copolimero PHEA-EDA-g-PLA	108

3.4.2	Elettrospinning e valutazione delle caratteristiche morfologiche dello scaffold	110
3.4.3	Funzionalizzazione dello scaffold di PHEA-EDA-g-PLA Elettrospinnato	111
3.4.4	Saggio colorimetrico con Toluidina blu	113
4.	CONCLUSIONI	115
5.	PARTE SPERIMENTALE	120
5.1.	Produzione di idrogeli-scaffold biocompatibili come sistemi di rilascio cellulare nella rigenerazione dell'epitelio corneale	120
5.1.1	Materiali	120
5.1.2	Apparecchiature	121
5.1.3	Culture cellulari	122
5.1.4	Derivatizzazione dell' α,β -poli(N-2-idrossietil)-DL-aspartammide (PHEA) con etilendiammina	124
5.1.5	Preparazione di idrogeli compositi a base di acido ialuronico (HA) e α,β -poli(N-2-idrossietil)(2-amminoetilcarbammato)-D,L-aspartammide (PHEA-EDA)	125
5.1.6	Preparazione degli idrogeli di collagene	126
5.1.7	Analisi FT-IR degli idrogeli di HA-PHEA-EDA	127
5.1.8	Studi di swelling degli idrogeli di HA-PHEA-EDA	127
5.1.9	Studi di idrolisi chimica degli idrogeli di HA-PHEA-EDA	128
5.1.10	Studi di citocompatibilità degli idrogeli di HA-PHEA-EDA	128

5.1.11	Studi di adesione cellulare sugli idrogeli di HA-PHEA-EDA	130
5.1.12	Realizzazione di lenti a contatto rivestite dal film HA-PHEA-EDA	132
5.2	Produzione di scaffold fibrillari a base di PLGA per il trattamento delle ferite a tutto spessore nell'apparato tegumentario	133
5.2.1	Materiali	133
5.2.2	Apparecchiature	133
5.2.3	Isolamento e coltura di fibroblasti e cheratinociti	134
5.2.3	Elettrospinning e valutazione delle caratteristiche morfologiche degli scaffolds	134
5.2.4	Studi di degradazione idrolitica degli scaffold elettrospinnati	135
5.2.5	Produzione del tessuto tegumentario bioingegnerizzato	136
5.2.6	Produzione di nuova ECM sui tessuti bioingegnerizzati	138
5.3	Produzione di scaffold fibrillari a base di PHEA-PLA per il trattamento delle ferite croniche dell'apparato tegumentario	139
5.3.1	Materiali	139
5.3.2	Apparecchiature	139
5.3.3	Sintesi del copolimero graft PHEA-g-PLA	140
5.3.4	Sintesi del copolimero PHEA-g-PLA-(IBU)	141
5.3.5	Elettrospinning e valutazione delle caratteristiche fisiche degli scaffold	143
5.3.6	Studi di swelling e degradazione	144
5.3.7	Studi di rilascio del farmaco	145
5.3.8	Prove di citocompatibilità	145

5.4. Produzione di scaffold fibrillari a base di PHEA-EDA-g-PLA per la ritenzione di agenti chemotattici nel trattamento delle ferite croniche dell'apparato tegumentario	147
5.4.1 Materiali	147
5.4.2 Apparecchiature	147
5.4.3 Sintesi del copolimero graft PHEA-EDA-g-PLA	148
5.4.4 Elettrospinning e valutazione delle caratteristiche fisiche degli scaffold	149
5.4.5 Funzionalizzazione degli scaffold elettrospinnati con eparina	150
5.4.6 Saggio colorimetrico con toluidina blu	150
Bibliografia	152

Capitolo 1

Introduzione

1.1. Medicina Rigenerativa ed ingegneria tissutale

Sin dall'antichità, le scienze mediche hanno dovuto affrontare il problema della sostituzione di parti del corpo umano perse o menomate in seguito a vari tipi di lesioni traumatiche o derivanti da malattie congenite. La necessità di ovviare alla mancanza di una parte dell'organismo ha ragioni sia estetiche che funzionali. Tuttavia, a causa della complessità e alta organizzazione istologica dei tessuti degli animali superiori, questa incombenza clinica ha rappresentato da sempre una delle sfide più difficili alla quale la medicina è stata chiamata.

I primi rudimentali tentativi di sostituzione dei tessuti irrimediabilmente compromessi si limitavano all'impiego di protesi grossolane prive di alcuna funzione biologica e fisiologica e atte solamente a sostituire fisicamente la parte del corpo menomata (ad esempio arti in legno).

Solo con l'inizio del ventesimo secolo, grazie allo sviluppo delle biotecnologie, all'affinamento delle tecniche chirurgiche, ed alla nascita di discipline come la tecnologia farmaceutica e l'ingegneria dei materiali, si comincia delineare una branca specifica delle scienze mediche, la medicina rigenerativa, che si propone come scopo non più la sostituzione dei tessuti quanto la rigenerazione degli stessi.

In particolare, durante il XX secolo, le rivoluzioni in campo scientifico che hanno portato alla nascita della medicina rigenerativa sono state:

- l'isolamento e la coltura in vitro di cellule derivate da vari tessuti e organi degli organismi animali,
- la nascita della chirurgia dei trapianti.

Grazie all'avvento di queste tecniche di laboratorio e chirurgiche infatti, è stato possibile per la prima volta, da un lato, avere a disposizione fonti cellulari coltivate ed espanse *in vitro* e potenzialmente applicabili in vivo, dall'altro sostituire tessuti e organi compromessi con altri integri provenienti da donatori compatibili.

Tuttavia, l'impossibilità di impiantare nell'organismo umano cellule in sospensione ed il numero limitato di donatori d'organo o tessuto disponibili rispetto ai pazienti richiedenti, hanno fatto sì che nuove alternative cliniche e terapeutiche si sviluppassero.

Oggi, la "Food and Drugs Administration" definisce la medicina rigenerativa come l'insieme di tutte le discipline mediche che si propongono di favorire il ripristino biologico, fisiologico e funzionale degli organi o delle parti del corpo umano gravemente compromesse in seguito a traumi di vari natura o a difetti congeniti [1].

Le pratiche mediche in medicina rigenerativa si possono distinguere in, agenti in vivo ed agenti ex vivo.

Tra le pratiche mediche in vivo si annoverano la terapia cellulare e la terapia genica che si propongono di indurre direttamente nelle cellule dell'organismo umano gli stimoli atti a correggere un eventuale funzione biologica che inibisce il corretto sviluppo dei tessuti o ne impedisce il ripristino delle proprietà morfologico-funzionali perse.

Le pratiche mediche ex vivo, in medicina rigenerativa, invece, hanno lo scopo di sviluppare in vitro tessuti biologici funzionali in grado di essere trapiantati in sostituzione dei tessuti nativi danneggiati, per favorirne una momentanea sostituzione e una graduale rigenerazione. Tutte le pratiche mediche ex vivo fanno parte di una vasta disciplina che prende il nome di ingegneria tissutale [2, 3].

L'ingegneria tissutale è un emergente settore scientifico nato per fornire un'alternativa per la rigenerazione di tessuti od organi persi o lesionati. Questa disciplina si propone di riparare o rigenerare i tessuti utilizzando tessuti bioingegnerizzati in grado di sostituire funzionalmente, durante la rigenerazione, la porzione lesa e di integrarsi, alla fine del processo, con il tessuto ospite, evitando il ricorso a "pezzi di ricambio"[4].

Grazie all'ingegneria tissutale è quindi possibile superare le limitazioni dei trattamenti convenzionali basati sul trapianto d'organo, tramite l'applicazione di tessuti o organi artificiali totalmente creati *in vitro*, non immunogenici ed in grado di ripristinare le funzioni fisiologiche delle aree danneggiate [5].

I principi fondamentali ai quali si rifà l'ingegneria tissutale per la produzione dei tessuti bioingegnerizzati sono:

- l'isolamento e coltura cellulare da vari tessuti biotipici per l'ottenimento di una fonte cellulare espandibile in vitro,

- l'ottenimento di biomateriali a partire da macromolecole sintetiche e/o naturali in grado di rappresentare un ottimale substrato per la coltura cellulare e il successivo impianto *in vivo*.

Le cellule isolate vengono coltivate *in vitro* sul biomateriale per la realizzazione del tessuto bioingegnerizzato che potrà essere impiantato *in vivo* in sostituzione del tessuto lesso.

Naturalmente le caratteristiche anatomiche e fisiologiche oltre che chimico-fisiche e meccaniche, del tessuto da trattare, influenzeranno la scelta del biomateriale e la sua funzione *in vivo*.

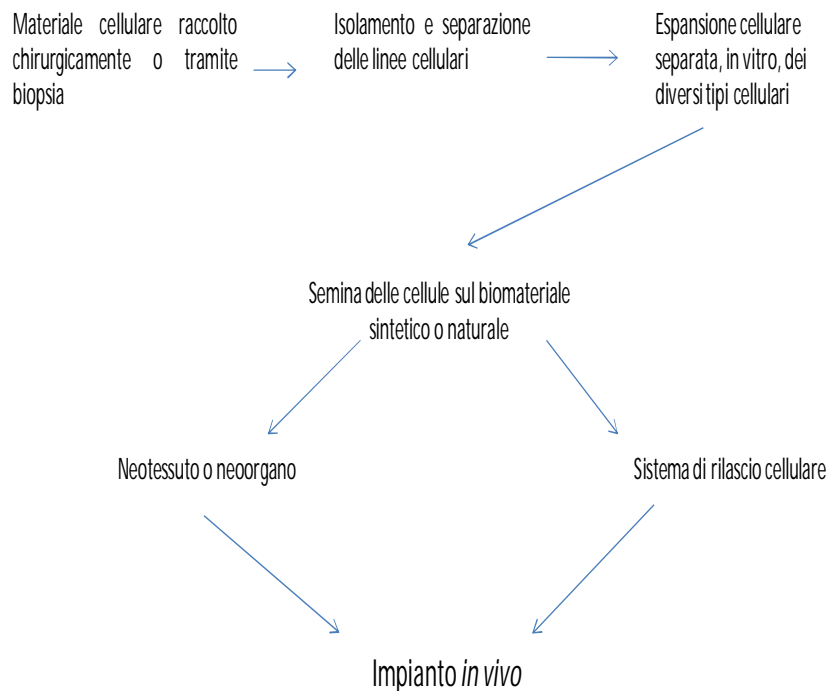
Una volta impiantato nell'organismo un biomateriale può agire in due modi:

- rilasciando le cellule che sono state in esso coltivate *in vitro*,
- sostituendo in toto l'area danneggiata favorendone una rigenerazione graduale.

In generale l'approccio medico dell'ingegneria tissutale può essere riassunto dai seguenti punti:

- Studio anatomico e fisiologico del tessuto da rigenerare,
- Isolamento e coltura delle cellule del tessuto interessato,
- Produzione di un biomateriale con caratteristiche morfologiche e chimico-fisiche simili a quelle del tessuto da rigenerare,

- Coltura *in vitro* delle cellule sul biomateriale per l'ottenimento di un tessuto bioingegnerizzato o di un sistema di rilascio cellulare,
- Impianto del costruito in vivo [6,7].



Schema 1: modalità in ingegneria tissutale: dal *vitro* al *vivo*

Mentre l'ingegneria tissutale d'organo, ossia quella che tenta di produrre *in vitro* organi come fegato, cuore, polmoni e reni integralmente funzionali, è ancora una disciplina in fase di sviluppo con pochissimi risvolti positivi in fase applicativa; l'ingegneria tissutale dei tessuti connettivali ed epiteliali è ormai una realtà affermata in campo scientifico e clinico-applicativo.

I tessuti epiteliali differiscono da quelli connettivali per la mancanza di una matrice extracellulare che funge da connessione e supporto per le cellule del tessuto.

Tuttavia sia i tessuti epiteliali che connettivali sono dotati di una precisa configurazione spaziale che, durante la produzione del tessuto bioingegnerizzato, deve essere ricreata *in vitro* per permettere alle cellule di crescere e distribuirsi correttamente nello spazio formando un tessuto quanto più simile a quello nativo da rigenerare [8].

Rigenerare un tessuto significa infatti ricrearne le caratteristiche morfologiche e funzionali in grado di riattivare la funzione primaria alla quale il tessuto stesso è preposto.

1.2. Ingegneria dei tessuti epiteliali e dei tessuti connettivi

Una profonda conoscenza anatomica dei tessuti dell'organismo così come dei fenomeni biochimici e fisiologici che ne determinano l'omeostasi, è di fondamentale importanza per comprendere l'esigenza di sviluppare tessuti bioingegnerizzati con specifiche caratteristiche funzionali oltre che morfologico-strutturali.

Gli epiteli sono quei tessuti a contatto con l'ambiente esterno che rappresentano la prima barriera per tutto l'organismo verso offese di natura chimica e biologica e contribuiscono a bilanciare gli scambi di calore tra l'interno e l'esterno del corpo.

Questi tessuti, sono costituiti da cellule di varia forma che possono dare vita a epiteli mono o multistrato situati sopra una membrana di origine proteica definita membrana basale.

Le connessioni intercellulari, di tipo *gap-junction*, favoriscono gli scambi di ossigeno e nutrienti tra le varie cellule epiteliali e contribuiscono a formare l'effetto barriera.

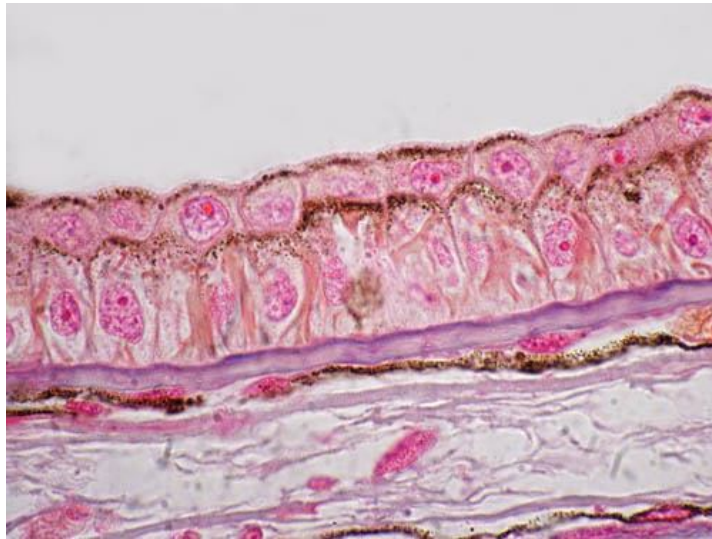


Figura 1: analisi istologica di una tipica struttura epiteliale poggiante sulla membrana basale

I tessuti epiteliali sono caratterizzati da un continuo turnover delle cellule costituenti. Queste infatti sono periodicamente rimpiazzate da nuove cellule derivanti dalla differenziazione di cellule staminali situate in *loci* prossimali al distretto epiteliale [9].

La presenza di questi *reservoir* di cellule non differenziate, e con alto potenziale replicativo, conferisce al tessuto epiteliale proprietà auto-rigenerative.

Infatti, danni tissutali di lieve entità che non comportano la distruzione delle riserve di cellule staminali, sono generalmente seguiti dalla auto riparazione tissutale data dalla proliferazione e differenziazione delle cellule che ripopolano epitelio.

Quando invece vengono danneggiati i *loci* delle cellule staminali si ha la perdita della capacità auto-ripartiva e la necessità di intervenire dall'esterno rilasciando cellule in fase proliferativa per la rigenerazione del tessuto.

Questo tipo di intervento si esplica, in ingegneria tissutale, tramite l'applicazione di sistemi di rilascio cellulare, ossia tessuti bioingegnerizzati in grado di:

- favorire *in vitro* la proliferazione delle cellule epiteliali sia staminali che differenziate,
- favorire la formazione delle giunzioni intercellulari e quindi la formazione di un nuovo epitelio,
- rilasciare *in vivo* il neo-epitelio formato.

In altre parole, il biomateriale funge da membrana basale artificiale e favorisce *in vitro* la formazione di un epitelio funzionante da trasferire sul difetto tissutale per la rigenerazione sia delle aree funzionali che dei *reservoir* di cellule staminali.

I tessuti connettivi sono quei tessuti con funzione di riempimento, di protezione e di nutrizione dei parenchimi.

L'unità funzionale dei tessuti connettivi dell'organismo degli animali superiori è il cosiddetto microambiente. Questo è costituito da tre unità fondamentali tra di loro strutturalmente e funzionalmente correlate:

- le cellule di supporto (parenchimali),
- le cellule funzionali (mesenchimali),
- la matrice extracellulare (ECM) [10].

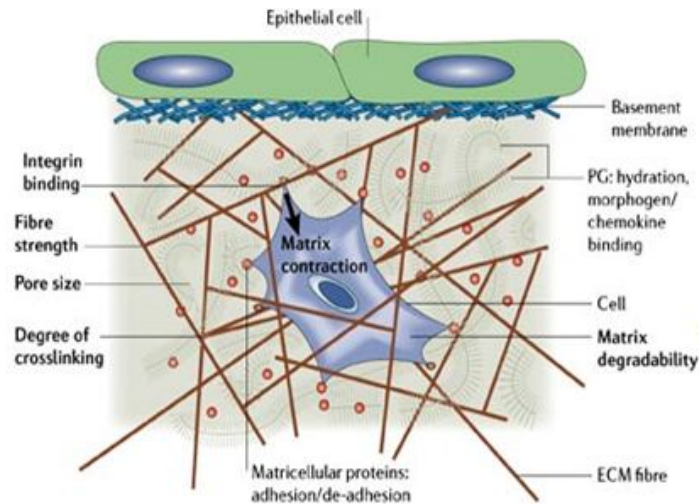


Figura 2: rappresentazione schematica del microambiente[11]

La fisiologia del microambiente è regolata da mediatori biologici molecolari (molecole segnale), interazioni intercellulari, molecole costituenti la ECM e stimoli meccanici.

Nelle diverse aree dell'organismo, questi agenti di regolazione agiscono in maniera differente per influenzare lo sviluppo di tessuti con differenti caratteristiche chimico-fisiche e funzionali.

La ECM è il mezzo di coltura naturale nel quale le cellule proliferano, si differenziano e migrano, essa è considerata il *gold standard* per l'ingegneria dei tessuti connettivi nello sviluppo di nuovi tessuti bioingegnerizzati (12,13).

La tabella 1 mostra la composizione della ECM.

Tabella 1: composizione della matrice extracellulare dei tessuti connettivi

Molecola	Funzione biologica	Sede	Rif.
Collagene	Impalcatura del tessuto, conferisce resistenza alla tensione Favorisce le interazioni Cellula-ECM e cellula-cellula Attivazione dei fibroblasti	Ubiquitario	14,15
Proteoglicani	Rivestono il collagene Conferiscono resistenza alle forze di compressione Trasporto di nutrienti Favoriscono la proliferazione di fibroblasti e condrociti Favoriscono la differenziazione di cellule endoteliali ed epiteliali	Ubiquitari	16,17
Acido ialuronico	Trasporto di metaboliti e nutrienti Conferisce resistenza alle forze di compressione Favorisce la migrazione e la proliferazione cellulare	Ubiquitario	18,19
Laminina	Favorisce la differenziazione cellulare Segnale intracellulare Favorisce la differenziazione cellulare Favorisce il movimento cellulare	Membrana basale	20
Fibronectina	Favorisce l'adesione delle cellule alla ECM Favorisce la migrazione e la proliferazione cellulare	Ubiquitaria	21
Fattori di Crescita	Molecole segnale	Ubiquitari	22,24

La ECM nativa può essere considerata come un idrogel complesso composto da proteine fibrillari (collagene) localmente secrete e da polisaccaridi (acido ialuronico, condroitin solfato).

Queste molecole sono orientate in maniera da ottenere una struttura tridimensionale interconnessa rappresentante un ottimo substrato per l'adesione, il movimento e la proliferazione cellulare.

L'interazione tra cellule ed ECM è specifica e biunivoca. Le cellule sintetizzano, assemblano e degradano i componenti della ECM in risposta a specifici segnali e, dall'altra parte, la ECM, grazie alle sue

caratteristiche strutturali, controlla e guida funzioni cellulari specifiche come la differenziazione.

Questa continua collaborazione tra cellule ed ECM è fondamentale per lo sviluppo e la rigenerazione dei tessuti.

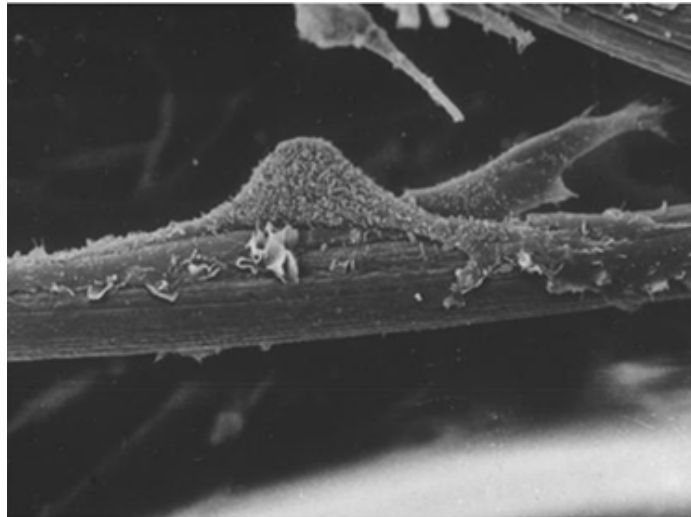


Figura 3: immagine SEM dell'interazione tra cellula ed ECM [25]

In condizioni fisiologiche, la composizione della ECM deriva dall'omeostasi. Questo fenomeno è un equilibrio dinamico tra rigenerazione, differenziazione e morte programmata delle cellule (apoptosi), che favorisce il continuo rimodellamento della ECM attraverso la sintesi e la degradazione proteica.

Le cellule sono sensibili e rispondono ad una grande varietà di segnali sia chimici che meccanici.

I segnali come i fattori di crescita, i fattori di differenziazione, le citochine e il gradiente di ioni, vengono definiti segnali solubili ed influenzano, la capacità proliferativa, la morte programmata e la sintesi di molecole anaboliche e cataboliche da parte delle cellule.

Le forze meccaniche, gli stimoli elettrici, sono invece segnali di tipo fisico che influenzano il comportamento ed il fenotipo cellulare.

Le cellule esprimono recettori di membrana per il riconoscimento di varie componenti della ECM. Tramite queste strutture le cellule sono in grado di tradurre vari stimoli meccanici in segnali che influenzano la loro crescita, divisione e differenziazione [26].

Un tessuto bioingegnerizzato che si propone la rigenerazione dei tessuti connettivi deve avere caratteristiche morfologiche, strutturali e chimico-fisiche simili a quelle della ECM nativa.

Solo in questo caso sarà in grado di:

- favorire l'adesione e la proliferazione delle cellule
- integrarsi in maniera ottimale con i tessuti dell'ospite,
- stimolare le cellule endogene a colonizzarlo,
- essere allontanato gradualmente dall'organismo una volta formato il tessuto di nuova sintesi.

In dipendenza dell'entità del danno tissutale il tessuto bioingegnerizzato potrà avere la funzione di sostituire la ECM o il tessuto *in toto*.

Nel primo caso lo scaffold impiantato è privo di cellule e si comporta come sostituito della ECM persa o danneggiata per favorire l'adesione e la proliferazione delle cellule endogene che sintetizzeranno il tessuto di neosintesi.

Nel secondo caso lo scaffold impiantato dovrà essere un vero e proprio sostituto tissutale avente cellule, matrice extracellulare, comunicazioni intercellulari, interazioni cellule-matrice e fattori di crescita.

La possibilità di rilasciare cellule autoctone proprie del tessuto da rigenerare è di fondamentale importanza per il ripristino completo della funzionalità dell'area lesa.

Infatti, l'autorigenerazione dei tessuti, nella maggior parte dei casi porta alla formazione di un tessuto aspecifico definito tessuto cicatriziale fibroso che consente solo un parziale ripristino delle condizioni fisiologiche del tessuto naturale. Tale tessuto cicatriziale si forma in seguito alla iperproliferazione di cellule parenchimali di supporto che non possono svolgere le funzioni delle cellule specifiche mesenchimali [27].

Ad esempio, le fibrocellule muscolari del miocardio sono in grado rispondere agli stimoli elettrochimici producendo contrazioni e rilassamento. Durante l'infarto queste cellule vanno in ipossia e muoiono, questo causa una perdita di tessuto funzionale che viene ripristinato da tessuto cicatriziale formato in seguito alla proliferazione di fibroblasti aspecifici. Il nuovo tessuto non sarà in grado di rispondere agli stimoli elettrochimici così come il tessuto nativo. In questo caso si avrà quindi una perdita permanente di funzionalità del miocardio [28].

Ancora, ferite di lieve e media entità dell'apparato tegumentario provocano la perdita di strutture annesse come i peli o cellule secernenti i pigmenti della pelle. La rigenerazione mediata dall'iperproliferazione dei fibroblasti del derma porta alla formazione di cicatrici che non presentano pigmentazione e strutture annesse [29].

La "rigenerazione parziale", quindi, così come potremmo definirla, porta ad avere problemi sia funzionali nel caso specifico del cuore, che estetici nel caso della cute.

Queste problematiche possono essere superate tramite l'applicazione di un materiale bioingegnerizzato sulle aree in fase di rigenerazione. Infatti grazie alle sue caratteristiche peculiari, tale materiale può veicolare il rilascio di cellule parenchimali proprie del tessuto precedentemente isolate, e ripristinare l'equilibrio tra la proliferazione delle cellule funzionali autoctone e le cellule di supporto mesenchimali.

Naturalmente sarà di fondamentale importanza anche la struttura macroscopica tridimensionale dello scaffold.

Infatti, in funzione del tipo di tessuto da rigenerare, lo stesso potrà avere svariate forme.

Ad esempio scaffold tubulari vengono impiegati per favorire la rigenerazione di tessuti connettivali vascolari o nervosi [fig x]; mentre scaffold di forma cilindrica o discoidale vengono impiegati nella rigenerazione di tessuto connettivale osseo e cartilagineo.

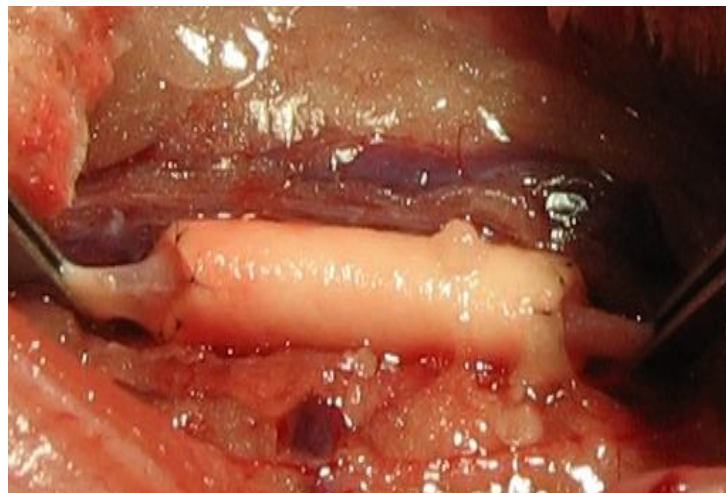


Figura 4: esempio di scaffold tubulare impiantato sull'animale da esperimento in sostituzione di una porzione di vaso sanguigno [30]

1.3. Biomateriali: applicazioni in ingegneria tissutale

Abbiamo definito un sistema prodotto in laboratorio in grado di ricreare le caratteristiche morfologiche e funzionali dei tessuti nativi, tessuto bioingegnerizzato o scaffold.

Questi sistemi, una volta impiantati nell'organismo dovranno essere in grado di integrarsi completamente con i tessuti dell'ospite svolgendo, in un primo momento, le funzioni del tessuto che hanno sostituito e favorendone, in un secondo momento, la completa rigenerazione.

Pertanto, un ottimale tessuto bioingegnerizzato dovrà essere quanto più simile ai tessuti nativi, sia dal punto di vista morfologico che chimico-fisico; inoltre esso dovrà essere allontanato spontaneamente in maniera graduale dall'organismo man mano che il tessuto di nuova sintesi viene prodotto [31].

I tessuti bioingegnerizzati vengono prodotti a partire da materiali di supporto, definiti biomateriali che fungono da mezzo di coltura per cellule di varia natura sostituendo temporaneamente la matrice extracellulare nativa, nel caso dei tessuti connettivali, o la membrana basale nel caso dei tessuti epiteliali.

Naturalmente, la scelta del biomateriale influenza in maniera determinante la capacità del tessuto bioingegnerizzato di svolgere la funzione per la quale esso viene progettato.

Infatti, variando il tipo di biomateriale è possibile modulare le caratteristiche dello scaffold sia in funzione del tessuto che deve essere rigenerato ma anche in funzione dell'entità del danno tissutale.

Ad esempio, i tessuti di alcune ferite, caratterizzate dalla presenza di infezioni e infiammazioni croniche, necessitano di essere rigenerati tramite l'applicazione di un tessuto bioingegnerizzato costituito da un biomateriale in grado di veicolare farmaci di varia natura e molecole bioattive.

Ancora, la rigenerazione di tessuti sottoposti fisiologicamente a stress meccanici di varia entità, necessita l'applicazione di scaffold costituiti da biomateriali con particolari caratteristiche meccaniche.

In ogni caso i biomateriali devono essere biocompatibili, per evitare fenomeni di rigetto e/o infiammazioni locali, e biodegradabili, per favorire la loro eliminazione dall'organismo senza causare fenomeni di accumulo o tossicità.

Macromolecole polimeriche naturali e/o sintetiche sono state largamente adoperate come biomateriale di partenza per la produzione di svariati tessuti bioingegnerizzati.

La scelta di una classe di polimeri rispetto ad un'altra risiede nelle caratteristiche, meccaniche, chimico-fisiche e morfologiche, che lo scaffold finale deve avere.

I polimeri naturali generalmente mostrano una maggiore affinità verso le cellule, hanno una migliore biocompatibilità e sono meno immunogenici rispetto ai polimeri sintetici [32].

D'altra parte i polimeri di sintesi presentano caratteristiche chimico-fisiche facilmente modulabili e posseggono ottime proprietà di resistenza meccanica.

I polimeri di origine naturale di origine proteica o polisaccaridica sono stati largamente impiegati come biomateriali per la rigenerazione di tessuti di varia natura.

Ad esempio, il collagene, l'acido ialuronico, e il condroitin solfato, sono stati applicati come sostituenti per la rigenerazione di tessuti molli [33-35], mentre altri polimeri come l'elastina, la fibroina sono stati impiegati per la realizzazione di strutture tubulari per la rigenerazione dei vasi sanguigni [36-37].

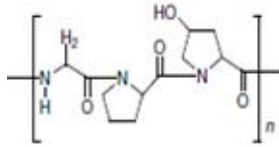
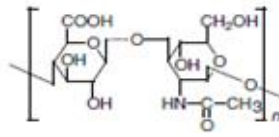
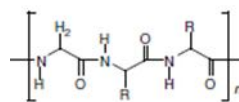
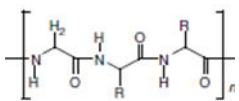
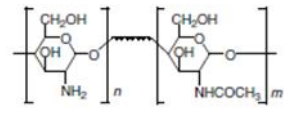
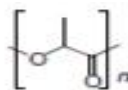
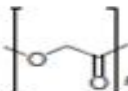
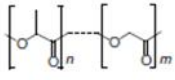
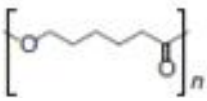

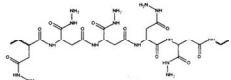
Il chitosano, un altro polimero di origine naturale, ha trovato impiego come materiale di partenza nella realizzazione di tessuti bioingegnerizzati per la rigenerazione ossea e cartilaginea [38-39].

Tra i polimeri sintetici, i poliesteri biodegradabili come l'acido poliglicolico (PGA), l'acido polilattico (PLA) e il loro copolimero acido polilattico-co-glicolico (PLGA) sono utilizzati come biomateriali per la crescita e la differenziazione di condrociti o condroblasti per applicazioni nell'ingegneria tissutale ossea o cartilaginea [40-42].

Inoltre, questi polimeri sono stati impiegati come materiali di partenza per la realizzazione di valvole cardiache artificiali e strutture vascolari sintetiche [43-45].

Un altro polimero sintetico ampiamente utilizzato come biomateriale è il policaprolattone (PCL). Questo, a differenza dei polimeri sintetici sopracitati, mostra una lentissima velocità di degradazione nei fluidi fisiologici ed è stato impiegato per la realizzazione di numerosi tessuti bioingegnerizzati tra i quali il tessuto nervoso [46-48].

Tabella 2: principali polimeri naturali e sintetici applicati in ingegneria tissutale

POLIMERO	ORIGINE	STRUTTURA
Collagene	Naturale	
Acido ialuronico	Naturale	
Elastina	Naturale	
Fibroina	Naturale	
Chitosano	Naturale	
Acido polilattico (PLA)	Sintetico	
Acido poliglicolico (PGA)	Sintetico	
Acido polilattico-co-glicolico (PLGA)	Sintetico	
Policaprolattone (PCL)	Sintetico	
Polietilenglicole (PEG)	Sintetico	
α , β -poliaspartilidrazide (PAHy)	Sintetico	

Come più volte ribadito, un biomateriale in grado di mimare e quindi sostituire il tessuto nativo, deve avere caratteristiche quanto più simili ai tessuti stessi in maniera tale da fornire o un ottimale ECM momentanea o un ottimale sistema per il rilascio per cellule in esso coltivate.

Nella maggior parte dei casi l'impiego di un solo biomateriale di origine naturale o sintetica non consente la realizzazione di tessuti bioingegnerizzati che soddisfino tutte le caratteristiche fondamentali del tessuto da trattare.

Infatti, l'impiego di sole macromolecole naturali porta molto spesso alla realizzazione di scaffold con alta attività biologica (grande affinità per le cellule) e scarsa resistenza meccanica.

Al contrario, l'impiego dei soli polimeri sintetici porta alla produzione di materiale scarsamente affine all'ambiente biologico ma con ottimali caratteristiche meccaniche.

Naturalmente non è possibile affermare in maniera generale i principi sopracitati poiché le caratteristiche del tessuto bioingegnerizzato dipendono volta per volta dal tessuto nativo da trattare.

Tuttavia, molto spesso nasce la necessità di ottenere scaffold con caratteristiche tipiche sia dei polimeri naturali che sintetici.

Questa necessità ha portato alla realizzazione di strutture ibride ottenute per miscelazione fisica di due o più polimeri di diversa natura o alla sintesi di *graft* o *block copolymer* o *network* chimici polimerici dove il polimero naturale e sintetico fanno parte di un'unica struttura macromolecolare.

Naturalmente, variando le composizioni e le quantità relative delle macromolecole polimeriche, è possibile potenzialmente ottenere un

numero quasi infinito di biomateriali con caratteristiche chimico-fisiche e biologiche differenti.

Biomateriali prodotti a partire da miscele fisiche di PCL e chitosano hanno mostrato caratteristiche di maggiore biodegradabilità rispetto ai materiali ottenuti a partire da solo PCL, e maggiore resistenza meccanica rispetto alle matrici ottenute a partire dal solo chitosano [49].

Ancora, scaffold per la rigenerazione del tessuto connettivo vascolare sono stati ottenuti miscelando collagene tipo I, PLGA, ed elastina in vari rapporti molari. L'aggiunta di PLGA migliora, nel biomateriale ottenuto, le proprietà meccaniche e la compliance rispetto agli scaffold formati soltanto da collagene ed elastina [50].

Il *graft copolymer* CHITO-PEG, ottenuto legando chimicamente molecole di polietilenglicole (PEG) al backbone polisaccaridico del chitosano, è stato impiegato come biomateriale per la rigenerazione del tessuto tegumentario.

In questo caso è la presenza del polimero di sintesi (PEG) a influenzare positivamente l'interazione con le cellule proprie del tessuto [51].

Altri esempi di strutture macromolecolari ibride sono, come accennato i network chimici polimerici.

Molto interessante sia dal punto di vista chimico-fisico che biologico è un reticolato tra HA e il PHAy potenzialmente utilizzabile in svariate applicazioni di ingegneria tissutale [52].

1.4. Tecniche di preparazione degli scaffold: idrogeli ed elettrospinnati

Nel paragrafo precedente è stata illustrata l'importanza della scelta del biomateriale nella realizzazione di tessuti bioingegnerizzati con particolari caratteristiche in funzione dell'applicazione *in vivo*.

Una fase altrettanto importante, nella produzione di uno scaffold, è rappresentata dalla scelta della tecnica di manipolazione del biomateriale.

Metodiche di produzione differenti portano infatti all'ottenimento di biomateriali con caratteristiche morfologiche microscopiche e macroscopiche diverse che possono influenzare l'interazione del tessuto bioingegnerizzato con le cellule impiantate e con i tessuti dell'ospite.

In generale, per la realizzazione di sistemi di rilascio cellulare, dove, come precedentemente discusso, il biomateriale deve fungere da membrana basale sintetica per favorire la formazione di nuovi tessuti epiteliali ed il loro rilascio sulle aree superficiali danneggiate dell'organismo, i metodi di manipolazione dei biomateriali vertono alla realizzazione di strutture planari uniformi e compatte.

Biomateriali in forma di film e dischetti polimerici sono stati ottenuti a partire da polimeri idrofili in grado di formare un network macromolecolare con capacità di trattenere grandi quantità di acqua.

Tali biomateriali vengono definiti idrogeli e posseggono caratteristiche chimico-fisiche e meccaniche dipendenti dalla natura dei polimeri costituenti e dalle interazioni che essi instaurano per la formazione del network macromolecolare [53].

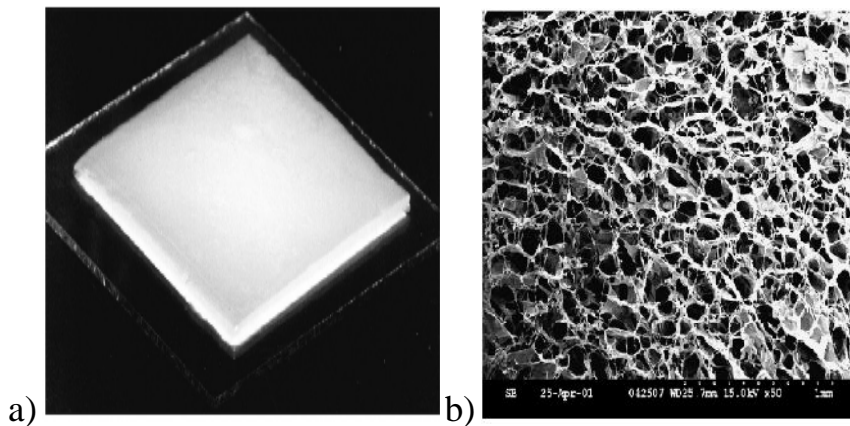


Figura 5: a) struttura macroscopica e b)immagine SEM della superficie di un idrogel di chitosano-alginato [37]

La capacità di questi materiali di trattenere ingenti quantità di acqua, così come la possibilità di ottenere strutture di varie forme e dimensioni, ha fatto sì che essi siano stati ampiamente impiegati sia in campo biomedico, come drug delivery system [54-55], che nel campo dell'ingegneria tissutale, per la rigenerazione di tessuti come la cartilagine [56-57], il tessuto tegumentario[58] e i tendini [59].

La superficie di idrogel sottili ottenuti sottoforma di film può rappresentare un ottimale supporto per l'adesione e la crescita di varie cellule epiteliali.

Quest'ultime infatti, rivestendo parti dell'organismo a contatto con l'esterno, vivono fisiologicamente all'interfaccia tra i fluidi fisiologici e l'aria.

Tale interfaccia può essere ricreata in vitro dagli idrogel, grazie alla grande quantità di acqua presente all'interno del network polimerico e alla presenza sulla superficie di numerosi punti di ancoraggio per le cellule.

Grazie a queste proprietà gli idrogeli rappresentano degli ottimali biomateriali per la realizzazione di tessuti bioingegnerizzati a rilascio cellulare per la rigenerazione dei tessuti epiteliali.

Il successivo rilascio delle cellule sull'area danneggiata potrà essere causato o dalla biodegradazione dell'idrogel o dal distacco dell'epitelio neo-formato che migra spontaneamente verso l'area in fase di rigenerazione.

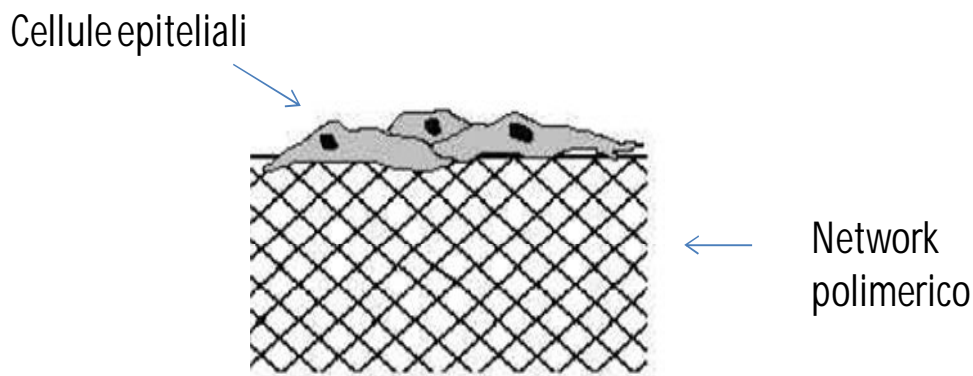


Figura 6: rappresentazione schematica della disposizione cellulare sulla superficie dell'idrogel

Nella produzione di tessuti bioingegnerizzati per la rigenerazione dei tessuti connettivali, si tende all'ottenimento di strutture quanto più simili alla ECM nativa, con caratteristiche meccaniche atte a favorire il loro impianto in varie sedi dell'organismo.

Una delle caratteristiche fondamentali che gli scaffold devono possedere è la fibrillarità.

Come precedentemente illustrato infatti, nella ECM nativa, la presenza delle fibrille collagene, favorisce il corretto orientamento e la corretta comunicazione tra le cellule nei tessuti e conferisce a tutta

la struttura una microporosità ottimale per la diffusione di nutrienti ed ossigeno.

Una tecnica che consente l'ottenimento di fibre polimeriche a partire da polimeri in soluzione o da polimeri fusi è l'elettrospinning o elettrofilatura.

Con questo termine si indica un processo attraverso il quale è possibile, tramite l'applicazione di forze elettrostatiche, l'ottenimento di fibre dal diametro compreso tra 10 nm e 3mm a partire da soluzione di materiali polimerici o da polimeri allo stato fuso.

Benché la sua nascita risalga al 1902 [60], l'elettrospinning ha ricevuto interesse scientifico solo all'inizio degli anni novanta, quando numerosi gruppi di ricerca hanno cominciato ad applicare i materiali elettrospinnati nella realizzazione di membrane filtranti [61-63], sensori ottici e chimici [64-69], elettrodi [70-73] e tessuti bioingegnerizzati per la medicina rigenerativa [74-77].

L'apparato per l'elettrospinning consiste di tre componenti principali: un generatore di alto voltaggio, una siringa con un ago del diametro inferiore ad 1 mm e un collettore metallico (una piastra o un rotore cilindrico)(Figura 7).

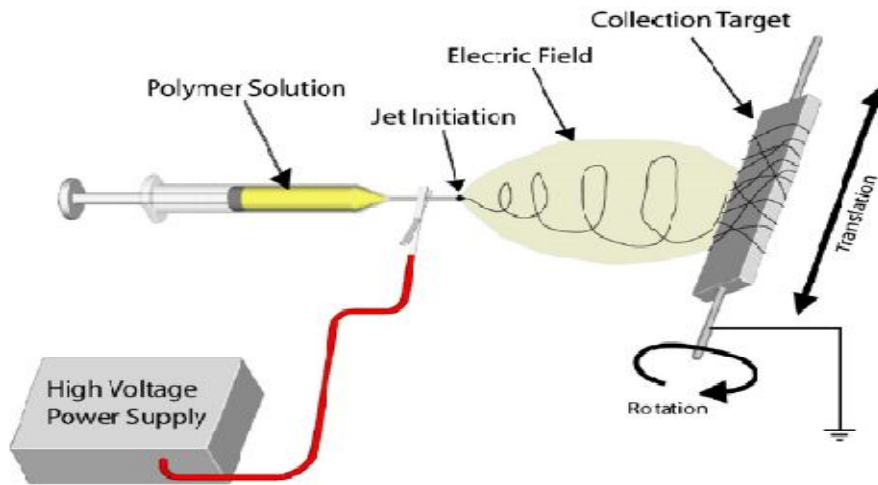


Figura 7: rappresentazione del processo di elettrospinning [78]

Una differenza di potenziale viene applicata tramite due elettrodi posti rispettivamente alla punta dell'ago della siringa e al collettore metallico. Quando una soluzione polimerica viene spinta fuori dalla siringa, tramite l'uso di una pompa programmabile, incontra un campo elettrico e diventa elettricamente carica. Se l'entità del capo elettrico è tale da superare la tensione superficiale della soluzione, allora si ha la deformazione della superficie del liquido con formazione del cosiddetto cono di Taylor (Figura 8) dal quale si diparte, elongandosi, la fibra polimerica che verrà raccolta nel collettore metallico.

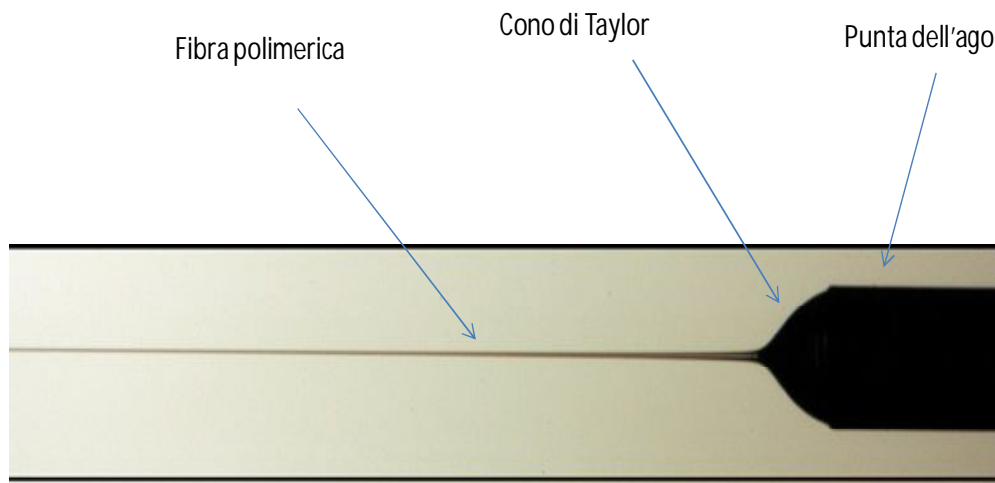


Figura 8: formazione del cono di Taylor all'uscita della punta dell'ago[79]

La distanza tra la punta dell'ago e il collettore e il tempo impiegato dalla fibra per percorrere tale spazio sono chiamati rispettivamente spazio e tempo di volo.

Durante il tempo di volo il solvente utilizzato per solubilizzare il polimero evapora favorendo la deposizione di una fibra polimerica solida.

Questo spiega perché la maggior parte dei solventi utilizzati per solubilizzare polimeri da elettrospinnare, sono solventi organici polari e volatili.

Nel campo elettrico, durante il tempo di volo, a causa dell'instabilità delle cariche elettriche, la traiettoria del fluido in volo subisce delle deviazioni dando vita ad un processo definito "bending" che causa la deposizione disordinata delle fibre con ottenimento di strutture interconnesse con porosità variabile.

Per minimizzare gli effetti del bending, nel caso in cui l'applicazione dello scaffold richieda un orientamento ordinato delle fibre polimeriche che detti una specifica disposizione nello spazio delle

cellule, si utilizzano collettori rotanti con alte velocità di rotazione (Figura 9).

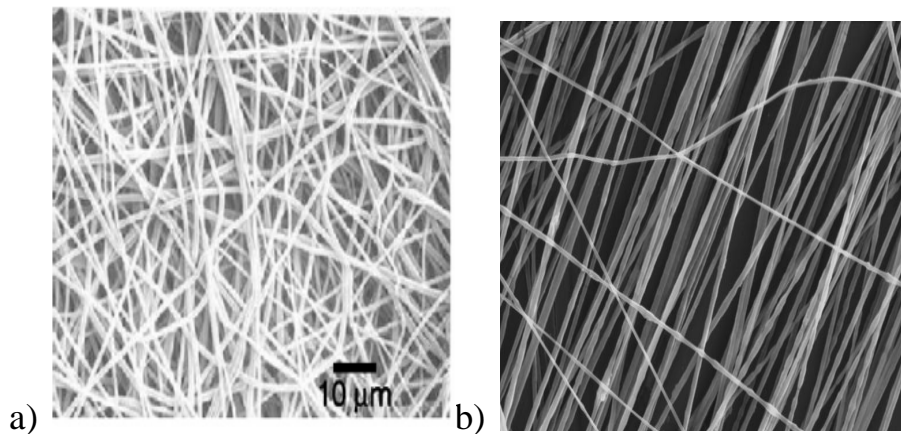


Figura 9: immagini SEM di fibre di PLA elettrospinnate e raccolte in maniera random (a) o ordinata (b) [79]

Lo spessore e la morfologia delle fibre elettrospinnate possono variare in funzione di numerose variabili che sono distinte in variabili di processo e variabili di soluzione. Le variabili di processo sono: l'intensità del campo elettrico applicato, la distanza tra ago e collettore, il tipo di collettore, la temperatura e l'umidità dell'ambiente dove viene condotto il processo. Le variabili di soluzione sono intrinseche del sistema che deve essere filato e sono: la viscosità, la densità, la tensione superficiale e la conduttività.

Le variabili di soluzione dipendono dalla natura chimica del polimero e dal solvente utilizzato per solubilizzarlo.

Affinché una soluzione polimerica possa formare fibre tramite l'azione di un campo elettrico, tra le catene di polimero nella soluzione stessa non deve esserci soluzione di continuità data dal solvente. Questa particolare condizione viene definita

“entanglement” ed influenza fortemente la concentrazione della soluzione polimerica da elettrospinnare.

Soluzioni troppo diluite infatti non possono essere elettrospinnate poiché durante il passaggio attraverso il campo elettrico, l’elongazione è impedita da aree in cui non è presente il polimero ma solo il solvente. In questi casi si ha la formazione di goccioline di polimero che verranno raccolte sul collettore.

D’altro canto, quando le soluzioni polimeriche sono molto concentrate, la viscosità e la tensione superficiale del sistema sono talmente elevate da non consentire la formazione delle fibre.

È chiaro quindi che, ogni polimero avrà un solvente d’elezione con il quale dovrà essere solubilizzato in uno stretto range di concentrazione, al fine di ottenere scaffold composti da fibre con caratteristiche ottimali.

L’impiego dell’elettrospinning come tecnica per la produzione di tessuti bioingegnerizzati è di recente accezione.

Scaffold nano-microfibrillari a base di polimeri sintetici, naturali e ibridi, sono stati utilizzati come substrati per l’immobilizzazione di enzimi [80-83], come rivestimenti di ferite superficiali (wound dressing) [84,85], nel trattamento post operatorio di ferite per impedire l’adesione cellulare [86-87] e come veicoli per il rilascio controllato di farmaci o di geni specifici[88-92].

Fibre elettrospinnate, a seconda delle dimensioni e della forma del collettore metallico, possono essere raccolte in varie forme tridimensionali che possono mimare anche macroscopicamente i tessuti da rigenerare.

La Figura 10 mostra ad esempio come è possibile ottenere, a partire da soluzioni di collagene ed elastina, strutture tubulari micro fibrillari che mimano le caratteristiche dei vasi sanguigni umani [78].

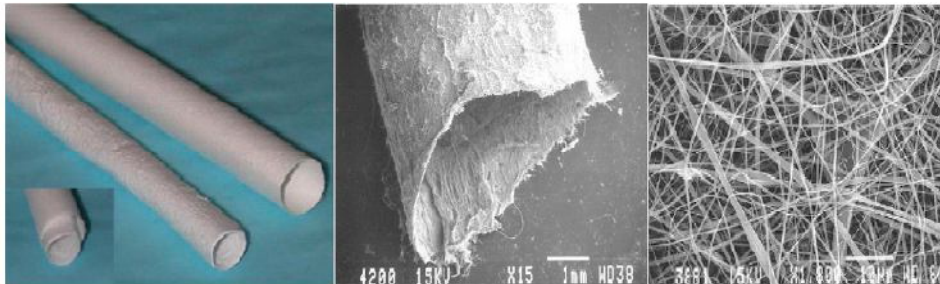


Figura 10: strutture tubulari elettrospinnate ottenute a partire da miscele di collagene ed elastina in soluzione

1.5. Applicazioni in ingegneria tissutale: la cornea

La superficie oculare a contatto con l'ambiente esterno è divisa in tre regioni: la parte centrale, più ampia, chiamata cornea; un'area di transizione definita limbo con caratteristiche simili alla cornea e la parte più esterna chiamata congiuntiva.

La cornea è l'area deputata al passaggio della luce nelle parti più interne dell'occhio, è l'unica delle tre regioni a non essere vascolarizzata, ed è costituita da sei strati che dall'esterno verso l'interno sono: l'epitelio, la membrana basale, la membrana di Bowman, lo stroma, la membrana di Descemet e l'endotelio.

Le cellule epiteliali sono disposte a formare un epitelio a cinque strati e presentano morfologia differente a seconda dello strato di appartenenza.

Infatti, le cellule a contatto con la membrana basale sono di tipo poligonale e diventano via via più appiattite negli strati superiori (Figura 11).

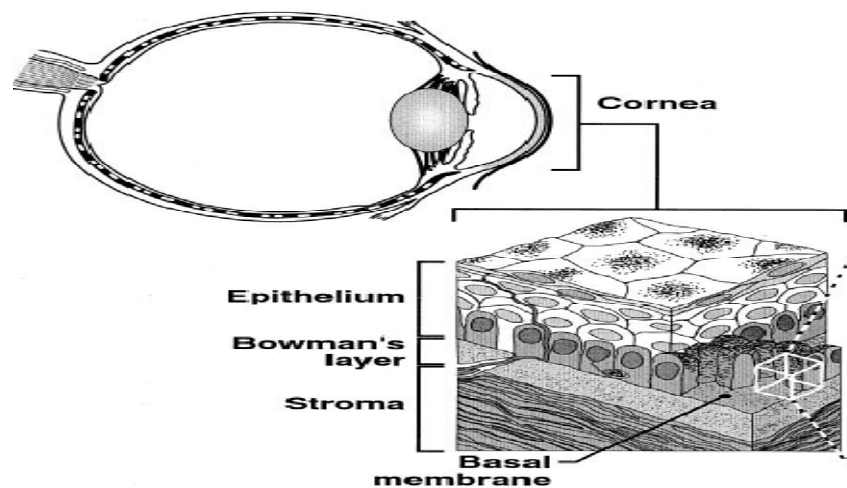


Figura 11: struttura dell'epitelio corneale [9]

La membrana basale, e la membrana di Bowman sono formate in maggior misura da fibre collagene e rappresentano il sito di ancoraggio per tutto l'epitelio corneale.

Lo stroma può essere considerato come una ECM molto lassa nella quale sono sospese cellule di tipo *fibroblast-like* chiamati cheratociti. L'endotelio è ancorato ad una sorta di membrana basale definita di Descemet, è monostrato e contribuisce al mantenimento della trasparenza corneale regolando il livello di idratazione di tutto il distretto tissutale [93-94].

I danni a carico dell'occhio riguardano per circa l'85% il tessuto epiteliale corneale essendo esso la parte più esterna della superficie oculare è quindi la più esposta alle offese provenienti dall'ambiente esterno siano essi di tipo fisico, chimico e biologico.

L'epitelio corneale è un tessuto in continuo rinnovamento. In esso infatti le cellule a contatto con la membrana basale subiscono un processo di trasformazione che le porta ad appiattirsi e spostarsi

gradualmente verso gli strati più superficiali in sostituzione delle cellule più vecchie che costantemente vengono desquamate [95].

Le cellule staminali responsabili del ripopolamento dell'epitelio corneale sono ristrette nella zona del limbo dove si trovano concentrate in aree definiti loci staminali [96].

Secondo l'ipotesi x, y, z , cellule staminali provenienti dai loci limbali proliferano e si differenziano spostandosi nelle strati più bassi dell'epitelio corneale ed entrano quindi a fare parte del ciclo di rinnovamento e desquamazione tipico del tessuto [97-98].

Naturalmente, la perdita di cellule epiteliali, causata da traumi di varia entità, rappresenta una sorta di *input* per le cellule staminali alla proliferazione e differenziazione per il ripristino dell'omeostasi tissutale.

La Figura 12 mostra l'immagine istologica un campione bioptico corneale integro.

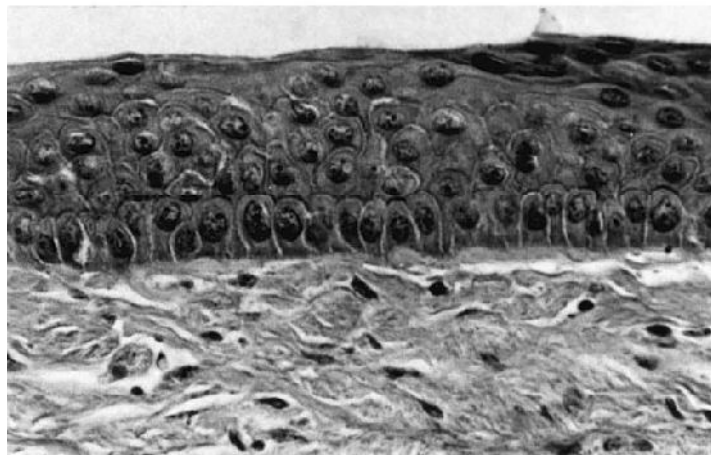


Figura 12 : istologia del tessuto corneale [95]

Traumi di grande entità che comportano danneggiamenti estesi della superficie oculare con interessamento all'area limbale, causano la perdita dei reservoir di cellule staminali e quindi la perdita della capacità autoriparativa dell'epitelio corneale.

In questi casi, la necessità clinica principale è quella di proteggere immediatamente l'area danneggiata e favorire un graduale ripristino della funzione barriera svolta dal tessuto nativo.

Ad oggi, le strategie terapeutiche per ovviare alla perdita della funzionalità corneale sono scarse e molto spesso difficilmente attuabili.

Il trapianto di cornea è la pratica clinica più diffusa nel trattamento sia dei danni oculari di origine traumatica [99] che generati da malattie comportanti la degenerazione delle caratteristiche dell'epitelio corneale o perdita della trasparenza [100-101].

Tuttavia, il numero di donatori compatibili è molto esiguo rispetto al numero di persone che necessitano il trapianto (1,5-2 milioni ogni anno) e che arrivano alla cecità mono o bioculare a causa della mancanza di strategie cliniche alternative efficaci [102].

Grazie allo sviluppo di tecniche bioptiche che hanno consentito l'isolamento sia delle cellule epiteliali corneali, dei cheratociti stromali e delle staminali limbali (Figura 13), nell'ultimo ventennio sono stati fatti, nel campo dell'ingegneria tissutale, dei tentativi di produzione di tessuti bioingegnerizzati per la rigenerazione della cornea.

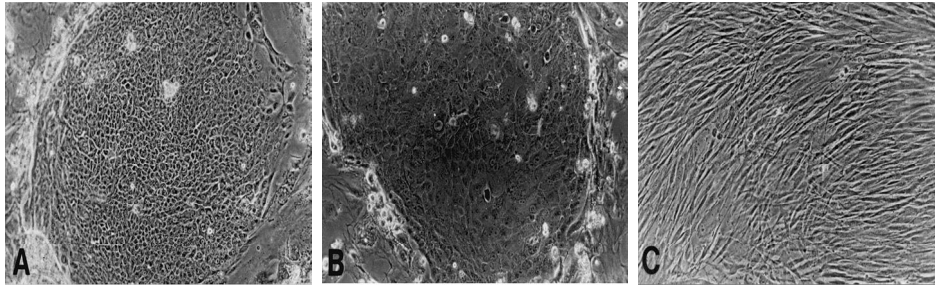
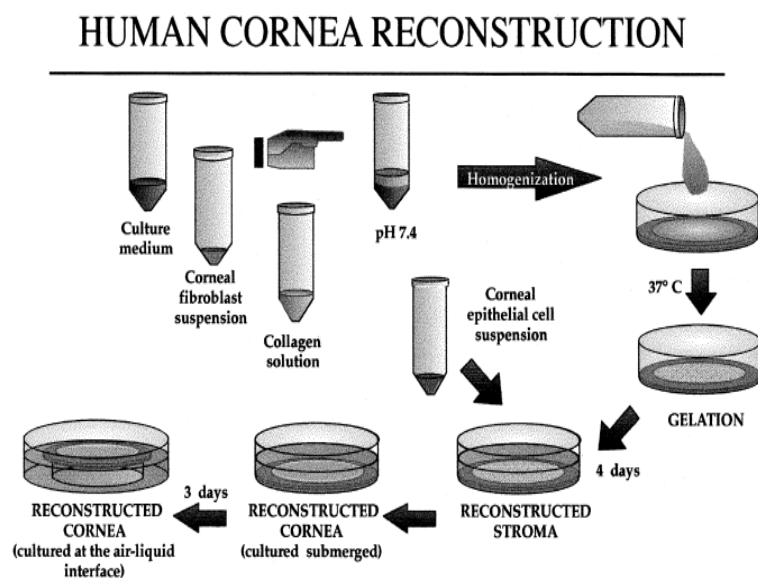


Figura 13: cellule epiteliali corneali (A), staminali limbali (B) e cheratociti stromali (C) in coltura *in vitro* [98]

Germain et al. hanno proposto un modello per la rigenerazione integrale della cornea [95].

L'approccio sperimentale, riassunto nello Schema 2, si basa sull'isolamento dei cheratociti e delle cellule epiteliali staminali e differenziate e sull'utilizzo del collagene come biomateriale per la creazione di un idrogel mimante il tessuto corneale.



Schema 2: rappresentazione schematica del processo di produzione della cornea bioingegnerizzata [95]

La ricostruzione dello stroma viene fatta sospendendo i cheratociti in una soluzione *gel forming* di collagene che viene posta a gelificare su una superficie piana e quindi posta in coltura in immersione nel mezzo cellulare.

Lo *step* successivo concerne nel mettere il costrutto a contatto con una sospensione di cellule epiteliali staminali ed indifferenziate cambiando le condizioni di coltura da immersione a interfaccia liquido aria per consentire l'adesione delle cellule sul collagene e la produzione di un epitelio integro.

La Figura 14 mostra un immagine della cornea bioingegnerizzata [103].

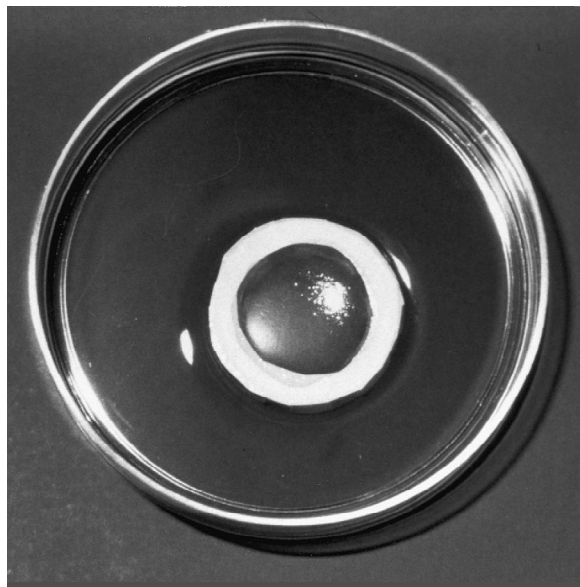


Figura 14: tessuto bioingegnerizzato per la rigenerazione della cornea

L'analisi istologica del tessuto bioingegnerizzato ha mostrato un arrangiamento delle cellule del tutto simile a quello presente nella cornea nativa, tuttavia, a causa della scarsa resistenza meccanica del costrutto in toto, che ne impedisce la sutura, e quindi un corretto e

stabile posizionamento sulla superficie oculare, questo approccio non ha avuto riscontri applicativi in clinica.

Inoltre la mancanza di organizzazione delle fibre collagene presenti nello scaffold, potrebbe minare il corretto passaggio della luce e quindi impedire una corretta visione.

Arora et al. hanno proposto un approccio che prevede l'utilizzo della membrana amniotica come scaffold per il rilascio di cellule epiteliali corneali sulla superficie oculare danneggiata [104].

La membrana amniotica, essendo un tessuto umano prelevato da campioni biotici, rappresenta un ottimo biomateriale di partenza per la coltura delle cellule epiteliali staminali e differenziate.

Inoltre possiede caratteristiche meccaniche tali da consentirne il mantenimento dell'integrità strutturale anche dopo sutura sulla superficie oculare.

Le cellule, coltivate sulla superficie della membrana, instaurano nuovi legami intercellulari e cominciano a sintetizzare un neo-epitelio che verrà rilasciato sulla cornea danneggiata in seguito alla degradazione della membrana amniotica.

Questo approccio che ha avuto notevoli riscontri positivi anche nell'applicazione in clinica, presenta tuttavia notevoli limitazioni legate proprio alla natura organica del biomateriale di partenza.

La membrana amniotica, infatti, ha tempi di biodegradazione molto variabili in dipendenza del donatore e delle condizioni di manipolazione e conservazione subite nelle banche tissutali [105].

Questo causa l'impossibilità di stabilire correttamente i tempi di rilascio cellulare e quindi di ripresa delle condizioni fisiologiche.

Inoltre, nonostante l'estensivo screening biologico delle donatrici, è pressoché impossibile eliminare totalmente il rischio di trasmissione di malattie virali al ricevente [106].

Da quanto detto è evidente che ad oggi c'è una forte necessità clinica di sviluppare sistemi in grado di consentire la rigenerazione dell'epitelio corneale senza ricorrere a costrutti bioingegnerizzati per la ricostruzione totale della cornea, o a sistemi di rilascio poco manipolabili e poco sicuri per il paziente.

1.6. Applicazioni in ingegneria tissutale: l'apparato tegumentario

L'apparato tegumentario è una barriera che protegge gli organi interni del corpo umano e mantiene costante la temperatura corporea consentendo gli scambi di calore tra l'organismo e l'ambiente esterno.

La funzione principale è quindi quella di proteggere l'organismo dagli agenti esterni, siano essi chimici o fisici (sostanze potenzialmente dannose o radiazioni di varia entità) che batterici, fungini o virali.

Proprio a causa della funzione barriera, la cute, è l'organo più esposto alle offese provenienti dall'esterno.

La struttura della cute è riportata in Figura 15[107].

Come si nota la cute è composta da tre strati, questi sono, l'epidermide, il derma e l'ipoderma.

I peli, le ghiandole sebacee e sudoripare e le unghie, vengono definiti annessi cutanei, attraversano il derma e l'epidermide e contribuiscono al corretto svolgimento delle funzioni della cute.

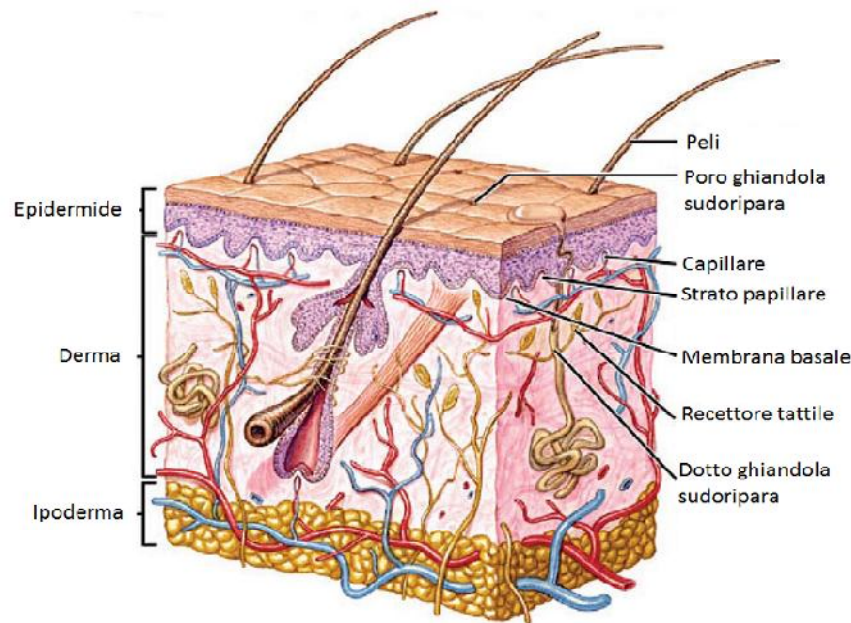


Figura 15: rappresentazione del tessuto tegumentario

L'epidermide è lo strato più superficiale del tessuto tegumentario ed è a contatto con l'ambiente esterno. È un epitelio stratificato pavimentoso il cui diametro medio varia da $30\mu\text{m}$ a $1,5\text{-}2\text{mm}$ a seconda delle sedi dell'organismo.

È composta principalmente da cellule chiamate cheratinociti interconnesse tramite giunzioni serrate che consentono la formazione di una barriera superficiale compatta contenente solo una piccola quantità di ECM.

I cheratinociti sono disposti nell'epidermide a formare cinque strati che si distinguono dall'interno verso l'esterno in: strato basale, strato spinoso, strato granuloso, strato lucido e strato corneo.

Dallo strato basale, che è quello più vicino al derma, i cheratinociti, che ivi presentano una forma cubica, cominciano a moltiplicarsi per mitosi e risalire verso gli strati più superficiali.

Durante questa risalita le cellule si appiattiscono, perdono la loro capacità moltiplicativa e vanno incontro a morte programmata per apoptosi.

Inoltre, sin dallo strato spinoso, esse cominciano a sintetizzare una proteina filamentosa detta cheratina che si accumula nel citoplasma.

Negli strati più superficiali, le cellule perdono i nuclei e vanno incontro ad un processo di desquamazione che le allontana dall'organismo favorendo un continuo turn-over.

Nello strato corneo, la cheratina, e le strutture lipidiche delle membrane cellulari, diminuiscono la permeabilità della cute alle sostanze acquose.

L'epidermide si invagina attorno agli annessi cutanei creando delle sacche che arrivano fino agli strati più profondi del derma.

Proprio in queste sacche risiedono *i loci* delle cellule staminali dell'epidermide che riforniscono continuamente l'epitelio con cellule giovani ad alto potenziale replicativo

Oltre ai cheratinociti, nell'epidermide sono presenti i melanociti, responsabili della melanina, un pigmento che dà alla pelle la sua tipica colorazione; e le cellule di Langerhans, ossia cellule della linea monociti/macrofagi che derivano da precursori emopoietici e hanno il ruolo di captare e presentare molecole estranee ad attività antigenica alle cellule immunocompetenti.

Come tutti gli epiteli, l'epidermide non è vascolarizzata e rappresenta oltre alla prima barriera dell'organismo un ottimo sistema per ridurre l'evaporazione dei liquidi tissutali.

L'epidermide è ancorata al derma tramite una struttura chiamata membrana basale costituita da fibre collagene.

I cheratinociti si ancorano a questa struttura tramite dei recettori di membrana chiamati emidesmosomi.

Il derma è costituito principalmente da molecole della ECM come collagene, reticulina, elastina e polisaccaridi, interconnesse ed orientate in maniera da formare una struttura tridimensionale complessa in grado di resistere a forze di trazione e stimoli pressori. È altamente vascolarizzato e ospita varie strutture annesse come i follicoli piliferi, le ghiandole sebacee e sudoripare i recettori tattili, termici e nocicettori.

Le cellule presenti nel derma sono i fibroblasti, che sintetizzano il collagene e gli altri componenti della ECM, le fibrocellule muscolari lisce e le cellule endoteliali appartenenti ai vasi sanguigni, le cellule nervose e le mastocellule del sistema immunitario.

L'ipoderma è costituito principalmente da tessuto adiposo vascolarizzato.

Da questo strato si dipartono i capillari dei vasi sanguigni che vanno ad irrorare il derma.

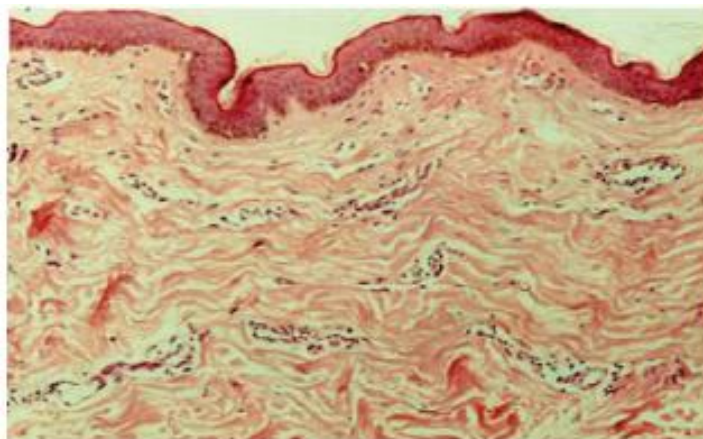


Figura 16: istologia del tessuto tegumentario [107]

Ferite che interessano perdita di sostanza a vari livelli dell'apparato tegumentario, rappresentano una minaccia di vita per il paziente.

Nella prime fasi post traumatiche infatti, il letto della ferita può essere considerato come un varco dal quale vari agenti patogeni possono penetrare all'interno dell'organismo danneggiandolo anche in maniera irreparabile.

Inoltre, come si evince dalla descrizione anatomico-fisiologica della cute, la perdita di sostanza fondamentale causa la perdita di varie strutture annesse con conseguenti ripercussioni dal punto vista estetico e funzionale.

Le ferite autorigeneratesi con tessuto cicatriziale, ad esempio, mancano di cellule come i melanociti o i cheratinociti, oltre che di vari tipi di recettori ed il tessuto di neo-sintesi risulta, funzionalmente non integrato con i tessuti originali (Figura 17).



Figura 17 : tessuto cicatriziale in un caso di grave ustione [107]

La rigenerazione dell'apparato tegumentario tipicamente detta *wound healing* è una serie orchestrata di eventi che include segnali molecolari cellulari e sub-cellulari che prevede la migrazione e la proliferazione delle cellule, così come la deposizione di nuova ECM, la formazione di nuovi vasi sanguigni (angiogenesi) e il rimodellamento del tessuto neoformato [108-109].

In questa serie ordinata di eventi, i fattori di crescita come il FGF(fattore di crescita dei fibroblasti), VEGF (fattore di crescita delle cellule endoteliali vasali) e EGF (fattore di crescita delle cellule epiteliali), giocano un ruolo fondamentale nella stimolazione della proliferazione e differenziazione cellulare.

Le ferite che interessano l'apparato tegumentario vengono distinte in base alle aree interessate dal danno tissutale in: ferite a spessore parziale e ferite a tutto spessore.

Nelle ferite a spessore parziale si ha la perdita dell'epidermide e delle aree più superficiali del derma, mentre, nelle ferite a tutto spessore, profonde più di 4 cm, si ha la perdita totale della struttura tegumentaria.

Nelle ferite a spessore parziale i fibroblasti del derma rimasto integro, in presenza di un corretto afflusso sanguigno nel letto della ferita, che apporta fattori di crescita e ossigeno, e di un supporto strutturale in grado di favorirne l'adesione e proliferazione, sintetizzano nuova ECM rigenerando il tessuto.

Inoltre se il distretto tegumentario interessato dal danno, presenta fisiologicamente numerosi annessi cutanei, le cellule staminali dell'epidermide presenti nei *loci* dello strato inferiore del derma potranno risintetizzare anche una neo-epidermide.

Nelle ferite a spessore totale (Figura 18) si ha la necessità di sostituire sia la ECM perduta che le cellule dei vari distretti cutanei. Fino all'inizio degli anni novanta questo tipo di lesioni venivano trattate tramite un trapianto autologo o eterologo di tessuto tegumentario. In questi casi l'epidermide e parte del derma venivano esportati da una parte dell'organismo integra (prelievo a spessore parziale) ed innestata sulla parte danneggiata.

Il trapianto, sia autologo che eterologo, ha naturalmente molte limitazioni legate soprattutto all'estensione dell'area da trattare e alla possibilità di trasmissione di malattie virali.



Figura 18: ferita di tipo traumatico a spessore totale [110]

Un altro tipo di ferite dell'apparato tegumentario sono le ferite croniche o piaghe (Figura 19).

Esse derivano da malattie come il diabete, che causano squilibri alla circolazione sanguigna periferica, o da malattie che causano un'immobilità forzata del paziente (piaghe da decubito).

Sono ferite a spessore parziale caratterizzate dalla mancanza di un corretto afflusso sanguigno nel tessuto cutaneo oltre che dalla presenza di infezioni e stati infiammatori costanti che causano la necrosi dell'epidermide e del derma e l'inibizione della proliferazione cellulare.



Figura 19: ferita cronica di origine diabetica [107]

Un inadeguato apporto di sangue nel letto della ferita causa ipossia tissutale che impedisce il ripristino delle condizioni fisiologiche per la ripresa della sintesi di nuova ECM.

I fibroblasti degli strati inferiori del derma infatti, entrano in uno stato di quiescenza bloccando i loro processi replicativi [111,112].

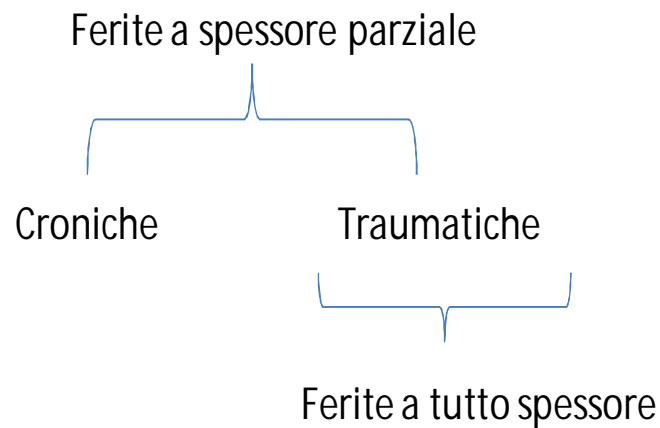


Figura 20 : classificazione delle ferite cutanee

Naturalmente la scelta del tessuto bioingegnerizzato da applicare per la rigenerazione del tessuto nativo dipenderà dal tipo di ferita da trattare.

In particolare, ferite croniche a spessore parziale, poiché hanno ancora la potenzialità di autorigenerarsi, anche se tale potere è reso latente da condizioni patologiche particolari, richiedono l'impiego di uno scaffold in grado di veicolare molecole bioattive capaci di ripristinare le condizioni fisiologiche dell'area interessata e di stimolare quindi la ripresa della proliferazione cellulare e la formazione di nuovo tessuto.

Invece, ferite a spessore parziale di natura traumatica, richiedono l'applicazione di uno scaffold in grado, oltre che di rilasciare molecole bioattive con potere profilattico verso le infezioni, di fornire un supporto per la crescita e proliferazione delle cellule tissutali.

Nelle ferite a tutto spessore, dove le lesioni comportano perdite di ingenti quantità di tessuto, lo scaffold dovrà fungere come sistema di rilascio cellulare per consentire il ripopolamento della sede lesa.

In tutti i casi, gli scaffold devono avere capacità meccaniche tali da favorire un innesto sulla ferita facile e non invasivo, devono aderire alla ferita in maniera omogenea per ripristinare la funzione barriera persa con la perdita della cute, non devono essere occlusivi ma devono favorire gli scambi di liquidi e gas con l'ambiente esterno, devono essere biodegradati in seguito alla formazione del tessuto di neo-genesi.

La tabella 3 mostra gli scaffold attualmente in commercio ed utilizzati in clinica per la rigenerazione del tessuto tegumentario.

Tabella 3: principali prodotti commerciali per la rigenerazione del tessuto tegumentario

SCOPO	APPROCCIO	PRODOTTO (nome commerciale)
Rigenerazione epidermide (sistemi di rilascio cellulare)	Coltura di cheratinociti su biomateriali in forma di film per il rilascio cellulare	Epicell [113-114] Epidex [115] MySkin [116-119]
Rigenerazione del derma	Fornire una ECM sintetica cellularizzata o acellulare	Integra [120-121] Permacol [122] Apligraf [123,124] Dermagraft [125]

Ta i prodotti riportati in tabella, l'Intergra® è stato ed è ad oggi sicuramente il più utilizzato avendo favorito il conseguimento dei risultati più soddisfacenti.

È composto da una membrana tridimensionale microporosa, costituita da collagene reticolato con condritin solfato, in grado di essere invasa sia dalle cellule endogene che da eventuali cellule espanse in vitro.

Infatti, in dipendenza dal tipo di lesione, l'Integra® è stato applicato sia in presenza di cellule espanse in vitro che come scaffold acellulare [120-121].

La presenza delle componenti naturali della ECM, costituisce un elemento fondamentale che permette al biomateriale di mimare le caratteristiche fisiologiche del derma nativo favorendo la crescita sia dei fibroblasti che dalle cellule dei vasi sanguigni dell'ospite che, in presenza dei corretti stimoli fisiologici, ricostituiranno il derma tramite la sintesi di nuova ECM e vasi sanguigni.

Una pellicola sottile di silicone riveste la parte superficiale dell'Integra e rappresenta un sostituto momentaneo dell'epidermide che viene rimosso una volta che il neo-derma è stato formato.

Se la ferita trattata è a tutto spessore, per la rigenerazione dell'epidermide sarà necessario o un trapianto autologo di tessuto o l'applicazione di un sistema di rilascio cellulare per la rigenerazione degli epiteli.

La necessità di due interventi chirurgici sequenziali, uno per l'innesto dello scaffold e l'altro per il trattamento dell'epidermide, rappresenta la maggiore limitazione di tutti i prodotti attualmente in commercio ed elencati in tabella.

Un'altra limitazione è la mancanza di versatilità chimica dei biomateriali costitutivi che impedisce agli scaffold di essere sfruttati come sistemi di rilascio controllato per molecole bioattive o farmaci.

Come precedentemente illustrato, una o delle priorità terapeutiche nel trattamento di lesioni alla cute, è il trattamento farmacologico mirato a curare le infezioni batteriche e accelerare i processi guaritivi.

La somministrazione topica della maggior parte delle molecole bioattive, causa il non raggiungimento delle dosi biodisponibili all'interno della finestra terapeutica se non con somministrazioni protratte nel tempo che possono peggiorare le condizioni già critiche del tessuto danneggiato.

Un biomateriale ottimale deve quindi possedere la capacità di veicolare in maniera controllata molecole bioattive di varia natura sfruttando le proprie caratteristiche chimico-fisiche per instaurare con la molecola stessa interazioni che gli consentano di trattenerla e rilasciarla in maniera intelligente.

Ad oggi, anche la maggior parte dei biomateriali in fase di sviluppo sperimentale manca della versatilità chimica necessaria per l'impiego come *drug delivery system* o, questa proprietà, pur se posseduta, non viene sfruttata per la veicolazione di farmaci e molecole bioattive.

Numerosi polimeri sono oggetto di studio per la realizzazione di scaffold microporosi fibrillari per il trattamento delle lesioni cutanee in sostituzione dei prodotti attualmente in commercio.

In particolare tramite la tecnica dell'elettrospinning sono stati prodotti biomateriali dalle caratteristiche chimico-fisiche e morfologiche soddisfacenti a partire polimeri sintetici come PCL [126], il PLA [126,127]; il poli(diossanone-co-L-lattato)-poli(etilenglicole) (PPDO/PLLA-b-PEG) *block copolymer* [129]; o da polimeri naturali e di semisintesi come la fibroina, l'acido ialuronico, l'elastina e il carbossimetilchitosano [130].

Tutti questi materiali, pur avendo dimostrato un'alta biocompatibilità associata a buone caratteristiche meccaniche e di biodegradazione, non rappresentano dei vettori per la veicolazione di principi attivi o molecole bioattive.

Questo ha rappresentato e rappresenta la maggiore limitazione per il passaggio di tali scaffold dalla fase sperimentale alla fase clinica.

Capitolo 2

Scopo della tesi

Lo scopo del progetto di dottorato di ricerca è stato quello di sintetizzare nuovi biomateriali per applicazioni in ingegneria tissutale in grado di favorire la rigenerazione dei tessuti, sia epiteliali che connettivi, utilizzando macromolecole di partenza naturali e/o sintetiche in grado di superare le limitazioni riguardanti i tessuti bioingegnerizzati attualmente utilizzati in clinica o in fase sperimentale.

In particolare, durante il primo anno di corso è stato sviluppato un sistema di rilascio cellulare per il trattamento delle lesioni corneali in sostituzione della membrana amniotica attualmente utilizzata in clinica e comportante svariati rischi riguardanti sia il buon fine della rigenerazione che la salute del paziente trattato.

È stato pertanto sintetizzato un idrogel-scaffold, mimante la membrana basale dei tessuti epiteliali, costituito da un biomateriale ibrido a base di un polimero naturale quale l'acido ialuronico (HA) e di un derivato dell' α,β -poli(N-2-idrossietil)-DL-aspartamide (PHEA), un polimero a struttura poliaminoacidica sintetica ampiamente utilizzato per varie applicazioni biomediche come la sintesi di profarmaci macromolecolari [131], la produzione di sistemi per il *drug delivery* [54] e per la produzione di matrici geneticamente attivate per il gene delivery [132].

La Figura 21 riporta la struttura chimica del PHEA.

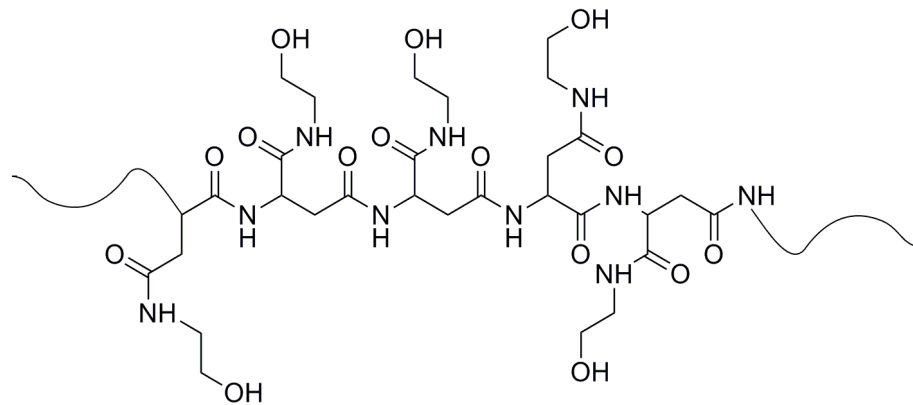


Figura 21: struttura chimica del PHEA

Il derivato amminico del PHEA, l' α,β -poli(N-2-idrossietil)(2-aminoetilcarbammato)-D,L-aspartammide (PHEA-EDA), è stato fatto reagire a vari rapporti molari con HA in soluzione acquosa in presenza di agenti attivanti per l'ottenimento di idrogeli (HA-PHEA-EDA) sottoforma di film sottili da utilizzare come supporto momentaneo per l'adesione di cellule epiteliali corneali e per il loro successivo rilascio in sede oculare.

Le soluzioni *gel forming* sono state reticolate sulla superficie interna di lenti a contatto commerciali di tipo soft al fine di creare un sistema facilmente impiantabile sulla superficie della cornea in grado anche di rappresentare, grazie alla sua lenta degradazione in vivo, una protezione poco invasiva fino alla completa guarigione dell'epitelio corneale.

Successivamente, lo scopo della ricerca è stato mirato all'ottenimento di scaffold fibrillari per la rigenerazione del tessuto tegumentario perso in seguito a lesioni di tipo traumatico o derivanti da patologie a carico di vari sistemi dell'organismo.

Allo scopo di ottenere tessuti bioingegnerizzati, in grado di integrarsi con i tessuti nativi non solo da un punto di vista morfologico e strutturale, ma anche dal punto di vista biochimico; sono stati prodotti, tramite la tecnica dell'elettrospinnig, degli scaffold in grado di veicolare fibroblasti e cheratinociti in fase di proliferazione nelle ferite a tutto spessore di tipo traumatico, e degli scaffold acellulari "medicati", per il rilascio controllato di farmaci o la ritenzione di molecole chemotattiche nelle ferite a spessore parziale di tipo cronico.

Per il trattamento di ferite cutanee a spessore totale di tipo traumatico, caratterizzate dalla perdita di ingenti quantità di ECM e cellule, è stato elettrospinnato il polimero sintetico PLGA, al fine di ottenere uno scaffold fibrillare e microporoso capace di favorire l'adesione e la proliferazione di fibroblasti e cheratinociti per la realizzazione in vitro di un tessuto bioingegnerizzato in grado di rimpiazzare, una volta impiantato in sede di rigenerazione, tutti i costituenti del microambiente.

Il copolimero *block* PLGA è altamente biocompatibile, e mostra una cinetica di degradazione in vitro dipendente dal rapporto molare tra i monomeri costituenti PLA e PGA.

I nostri studi hanno mirato a dimostrare che le cellule coltivate sul supporto elettrospinnato di PLGA sono in grado di produrre già in vitro nuova matrice extracellulare e che il tessuto bioingegnerizzato è quindi un ottimale sostituto temporaneo del derma e dell'epidermide.

Per il trattamento delle ferite croniche a spessore parziale sono stati prodotti scaffold elettrospinnati a partire da due graft copolimeri derivati dal PHEA.

Questi biomateriali al contrario della maggior parte dei polimeri sintetici, naturali e ibridi, attualmente utilizzati per la produzione di scaffold elettrospinnati, sono in grado di associare a delle ottimali caratteristiche meccaniche una versatilità chimica che consente di legare covalentemente molecole bioattive di varia natura per favorirne il rilascio prolungato o la ritenzione nella sede di applicazione.

La necessità terapeutica fondamentale per il trattamento delle ulcerazioni croniche è proprio l'opportuna veicolazione di molecole bioattive in grado di ripristinare le caratteristiche fisiologiche dei tessuti trattati e favorire la ripresa della sintesi di ECM.

Infatti, la somministrazione per via topica della maggior parte dei farmaci e molecole bioattive somministrate in forma libera, a causa della bassa emivita e della suscettibilità alla degradazione chimica, non consente l'ottenimento di dosi all'interno della finestra terapeutica.

Per questa ragione le molecole bioattive sono state incorporate negli scaffold sfruttando i gruppi funzionali disponibili della catena polimerica di PHEA o tramite miscelazione fisica nella soluzione di elettrospinning.

Lo scopo del nostro studio è stato quello di dimostrare che gli scaffold "medicati" ottenuti sono in grado di preservare l'integrità delle molecole bioattive rilasciandole o ritenendole in base al tipo di legame instaurato.

Il primo scaffold è stato prodotto a partire da un copolimero *graft* del PHEA con il PLA (PHEA-g-PLA).

La presenza delle catene alifatiche di PLA legate chimicamente al backbone di PHEA, consente l'ottenimento di un copolimero affine all'acqua, con caratteristiche meccaniche ottimali per l'ottenimento di

fibre elettrospinnate ed in grado di essere allontanato spontaneamente dall'organismo senza creare fenomeni di accumulo.

PHEA-g-PLA, recante gruppi ossidrilici liberi, è stato funzionalizzato chimicamente con l'antiinfiammatorio ibuprofene [PHEA-g-PLA-(IBU)] o miscelato fisicamente ad esso, quindi elettrospinnato per l'ottenimento dello scaffold fibrillare.

L'ibuprofene, un antiinfiammatorio non steroideo la cui struttura chimica è riportata in Figura 22, è stato scelto come farmaco modello grazie alle sue proprietà analgesiche e alla bassa tossicità.

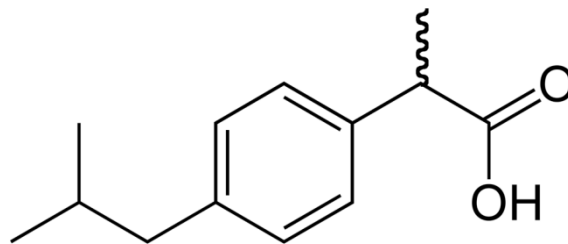


Figura 22: struttura chimica dell'Ibuprofene

L'infiammazione cronica dei tessuti circostanti la lesione causa un costante dolore che non è trattabile per via sistemica se non con alte dosi e continue somministrazioni di antiinfiammatori o analgesici che causano dipendenza e tolleranza.

Gottrup et al. [133], hanno dimostrato che il rilascio continuato di ibuprofene nelle ferite croniche diminuisce nei pazienti il dolore e aumenta la velocità di rigenerazione tissutale.

L'applicazione di polimeri non biodegradabili, o con una biodegradazione molto lenta, per la realizzazione di dispositivi medici

come rivestimenti di ferite croniche, comporta la necessità di sostituire nel tempo il patch.

Questa procedura fa scaturire i fenomeni infiammatori aumenta il dolore nel paziente e inibisce la completa guarigione dei tessuti.

Lo scopo di questo lavoro è stato pertanto l'ottenimento di uno scaffold fibrillare biodegradabile in grado rilasciare in maniera controllata l'ibuprofene per favorire in un'unica somministrazione la rigenerazione delle ulcerazioni croniche.

Sui biomateriali ottenuti sono stati fatti studi di degradazione e di swelling al fine di valutare la capacità di incorporare acqua, e la velocità di scomparsa dall'organismo.

Inoltre, sono state investigate le cinetiche di rilascio da scaffold contenenti il farmaco legato e/o in forma libera e la biocompatibilità delle fibre elettrospinnate su fibroblasti del derma umano.

Utilizzando come materiale di partenza il copolimero graft dell' α,β -poli(N-2-idrossietil)(2-aminoetilcarbammato)-D,L-aspartammide (PHEA-EDA) con l'acido polilattico (PLA), (PHEA-EDA-g-PLA) è stato prodotto, sempre tramite la tecnica dell'elettrospinnig, un secondo scaffold fibrillare ad alta funzionalizzabilità per il trattamento delle ferite croniche.

Lo scopo del lavoro in questo caso è stato quello di sfruttare i gruppi amminici liberi presenti nel copolimero di partenza per legare covalentemente tramite un legame poco suscettibile all'idrolisi chimica l'eparina, un polisaccaride naturale che svolge fisiologicamente un ruolo fondamentale nella rigenerazione dei tessuti.

A differenza dello scaffold medicato con ibuprofene, questo scaffold è stato progettato con lo scopo di favorire quanto più la ritenzione della molecola bioattiva eparina tra le maglie dello scaffold elettrospinnato. Infatti, durante i processi di rigenerazione dei tessuti l'eparina, un polisaccaride solfonato sintetizzato dai granulociti, agisce da chemotattico interagendo con numerosi fattori di crescita e prolungandone la permanenza in sede di rigenerazione per la promozione della proliferazione e differenziazione delle cellule.

La Figura 23 mostra la struttura chimica dell'eparina.

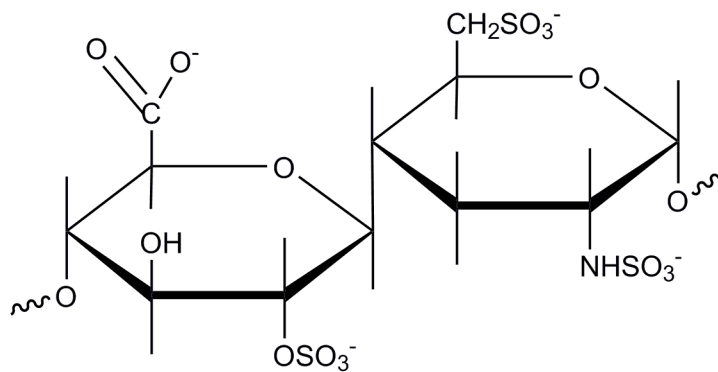


Figura 23: struttura chimica dell'eparina

L'eparina è stata legata covalentemente direttamente alle fibre elettrospinnate di PHEA-EDA-g-PLA tramite reazione in eterofase.

Il legame tra copolimero ed agente bioattivo è stato valutato qualitativamente e quantitativamente tramite saggio colorimetrico utilizzando il reattivo toluidina blu.

Studi sul comportamento di swelling, sulla cinetica di biodegradazione, e sulla caratterizzazione biologica sono attualmente in corso.

Capitolo 3

Risultati e discussione

3.1. Produzione di idrogeli-scaffold biocompatibili come sistemi di rilascio cellulare nella rigenerazione dell'epitelio corneale

Con l'obiettivo di sviluppare un sistema di rilascio cellulare per il trattamento dei danni a carico dell'epitelio corneale, nel presente lavoro sono stati prodotti e caratterizzati degli idrogeli-scaffold a base di HA reticolato con il derivato etilendiamminico del PHEA (PHEA-EDA).

Tre differenti biomateriali ibridi sono stati ottenuti variando il rapporto molare tra il polimero naturale e quello sintetico.

La biocompatibilità degli scaffold ottenuti è stata valutata utilizzando gli stessi come supporto per la crescita di fibroblasti isolati dal derma umano.

Studi di adesione e rilascio cellulare sono stati fatti utilizzando cellule immortalizzate dell'epitelio corneale umano (HCEC), o fibroblasti (RLF) e cellule epiteliali (RLEC) primarie isolate dalla zona limbale dell'occhio di coniglio.

Per questi studi, idrogeli a base di collagene, sono stati utilizzati come controllo positivo di adesione essendo il collagene stesso il maggiore componente della membrana basale nativa supportante l'adesione delle cellule epiteliali.

Naturalmente, un sistema di rilascio cellulare ottimale dovrebbe, al contrario del collagene, favorire un'adesione temporanea delle

cellule in maniera tale da consentire *in vitro* la formazione dei legami intercellulari e il successivo il rilascio delle cellule stesse sul tessuto trattato.

Allo scopo di sviluppare *medical devices* di facile e poco invasiva applicazione, gli idrogeli sono stati prodotti sottoforma di film sottili direttamente sulla superficie interna di lenti a contatto morbide (Hilafilicon B) ed è stato investigato l'andamento di adesione e rilascio delle cellule primarie di coniglio coltivate sui sistemi ottenuti.

3.1.1. Sintesi del derivato etilendiamminico dell' PHEA (PHEA-EDA)

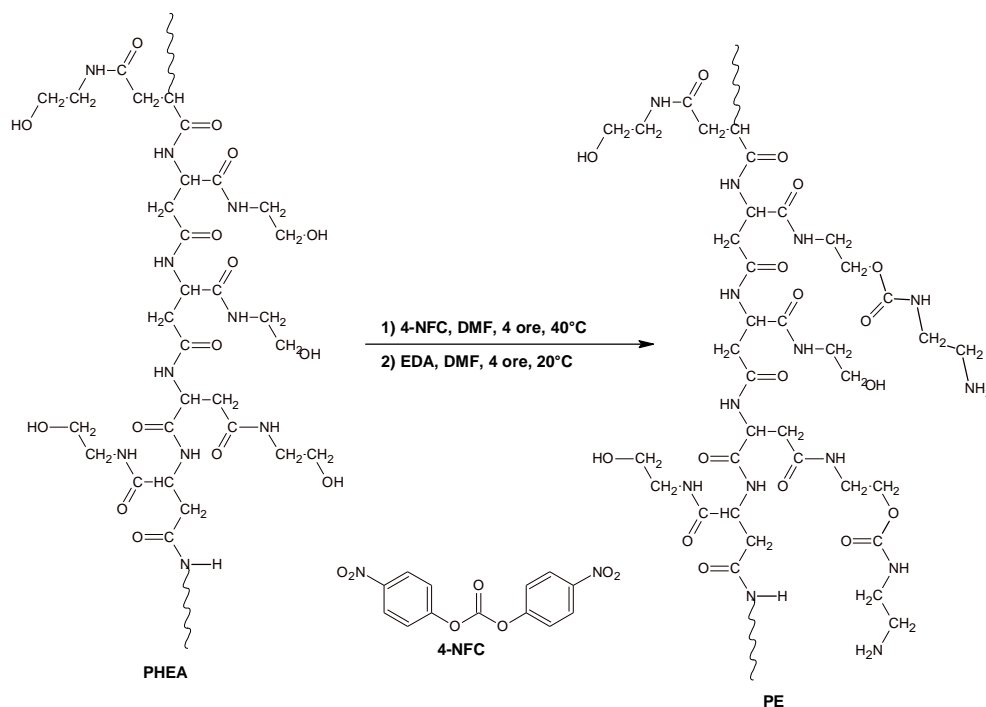
L' α,β -poli(N-2-idrossietil)-DL-aspartammide (PHEA) è stato preparato e purificato secondo quanto riportato in letteratura[Giammona et al. 1987]. Il peso molecolare medio del lotto di PHEA usato in questo studio, determinato mediante analisi SEC è risultato 41,0 kDa ($M_w/M_n=1,8$) [134].

La reazione di derivatizzazione del PHEA con etilendiammina (EDA), è stata condotta in fase organica (DMF anidra), in due step successivi: il primo, condotto a 40°C, consiste nell'attivazione dei gruppi ossidrilici del PHEA con 4-nitrofenilcarbonato (4-NFC), un agente attivante che, al termine della reazione lascia un gruppo carbonilico legato all'OH; il secondo step, consiste nella reazione del PHEA attivato con l'EDA, a 25°C. Variando opportunamente il tempo di attivazione con 4-NFC e le quantità relative di attivante e di EDA, è possibile produrre derivati con diverso grado di derivatizzazione molare % (DD). Il PHEA-EDA usato in questo lavoro è stato preparato usando 4-NFC ed EDA in quantità tali da rispettare i valori $R_1=1$ ed $R_2=5$, essendo:

$R_1 = \text{moli di 4-NFC} / \text{moli di unità ripetitive di PHEA}$

$R_2 = \text{moli di EDA} / \text{moli di unità ripetitive di PHEA}$

Inoltre, sia lo step di attivazione del PHEA, che la successiva reazione con EDA, sono stati condotti per 4 ore. In tal modo è stato ottenuto un derivato con un DD pari a 47 mol%. Questo è stato caratterizzato mediante analisi spettroscopica FT-IR e $^1\text{H-NMR}$, e i dati ottenuti si sono rivelati in accordo a quanto riportato in letteratura [135].

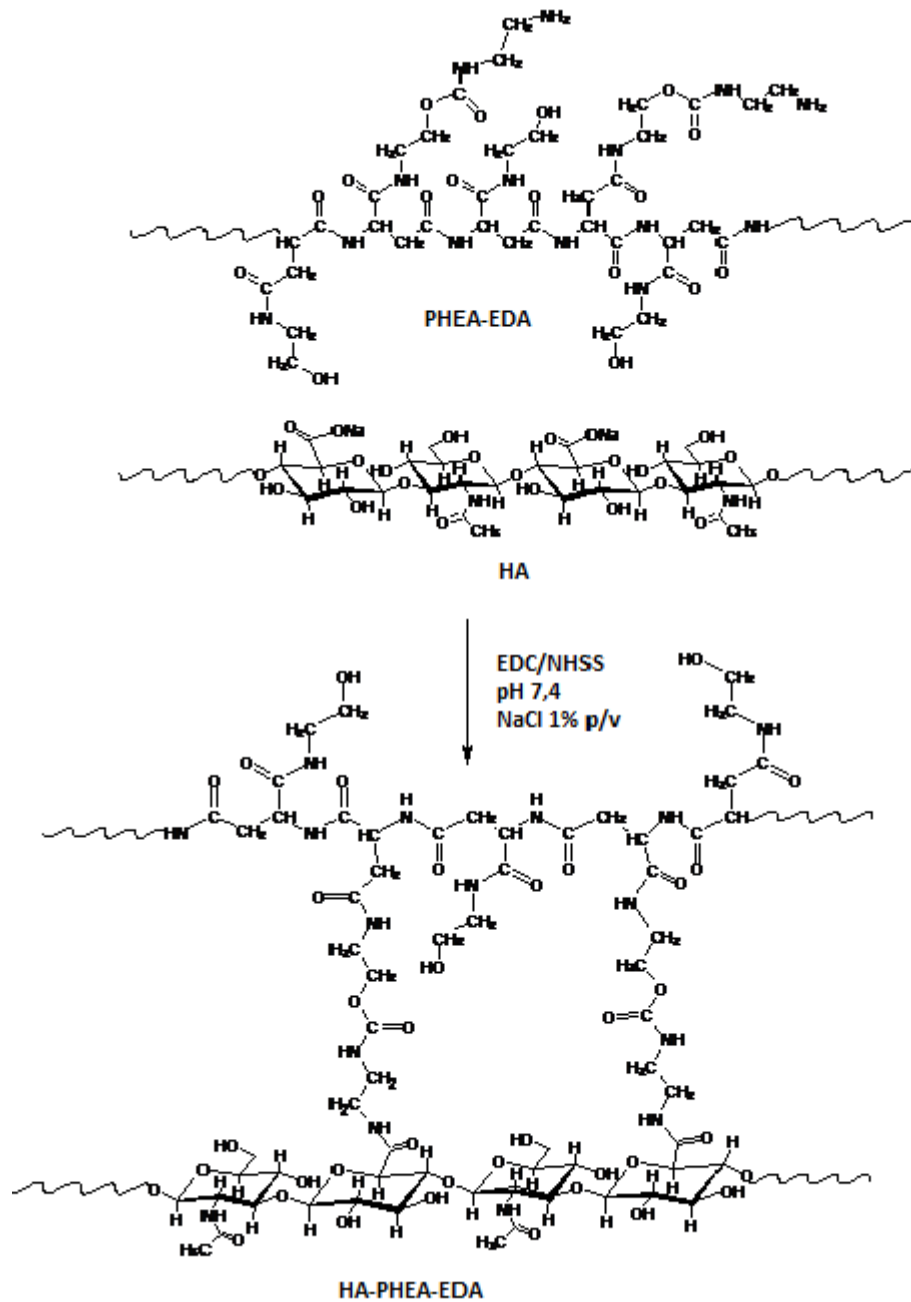


Schema 3: reazione di derivatizzazione del PHEA con etilendiammina

3.1.2. Idrogeli compositi a base di acido ialuronico (HA) e α,β -poli(N-2-idrossietil)(2-amminoetilcarbammato)-D,L-aspartammide (PHEA-EDA): preparazione e caratterizzazione

La reazione di reticolazione dell'HA con il PHEA-EDA, riportata nello Schema 4, è stata condotta in soluzione acquosa di NaCl 1% p/v a pH 7,4, mediante attivazione mediata da carbodiimmide.

In particolare, al fine di attivare i gruppi carbossilici dell'HA nei confronti della reazione di sostituzione nucleofila acilica da parte dei gruppi amminici del PHEA-EDA, sono stati impiegati due attivanti idrosolubili, l'1-etil-3-[3-(dimetilammino)propil]carbodiimmide idrocloruro (EDC) e l'N-idrossisulfosuccinimide sale sodico (NHSS), secondo un metodo già descritto da Bulpitt e collaboratori [136].



Schema 4: reazione di reticolazione tra HA e PHEA-EDA

La reazione è stata effettuata miscelando adeguati volumi di soluzioni madre di HA (3,75% p/v) e PHEA-EDA (6,1% p/v) a pH 7,4, in modo da ottenere tre soluzioni *gel forming* aventi tre diversi rapporti molari tra i gruppi amminici del PHEA-EDA e i gruppi carbossilici dell'HA

(indicati dai valori di X), pari a 0,5, 1,0 o 1,5. Successivamente, gli attivanti EDC ed NHSS sono stati aggiunti alla miscela di reazione uno alla volta, in uguale rapporto molare rispetto ai gruppi amminici del PHEA-EDA ($Y = \text{moli di attivante/moli di unità ripetitive etilendiamminiche nel PHEA-EDA}=1$).

Dopo vigorosa agitazione, le soluzioni sono state versate in piastre di Petri e poste a 37°C fino alla formazione degli idrogeli.

Gli idrogeli ottenuti sono stati lavati esaustivamente con acqua bi distillata per allontanare gli attivanti eventualmente non reagiti.

3.1.3. Analisi FT-IR

L'analisi FT-IR è stata effettuata sui campioni liofilizzati e un tipico spettro dei film HA-PHEA-EDA è riportato in Figura 24 a confronto con gli spettri dei polimeri di partenza, HA e PHEA-EDA. In particolare, nello spettro del network HA-PHEA-EDA, è evidente la presenza dei picchi caratteristici dei polimeri di partenza, come ad esempio il picco a 1654 cm^{-1} attribuibile all'HA e al PHEA-EDA (stretching C=O dell'ammide I), e il picco a 1542 cm^{-1} attribuibile al PHEA-EDA (stretching C=O dell'ammide II). Inoltre, nello spettro del network HA-PHEA-EDA è possibile notare una marcata riduzione dell'intensità della banda centrata a 1376 cm^{-1} , attribuibile allo stretching dei gruppi carbossilici dell'HA, e della banda centrata a 1263 cm^{-1} , che è presente solo nello spettro del PHEA-EDA e che è attribuibile allo stretching dei gruppi C-NH₂; ciò indicherebbe che la maggior parte dei gruppi amminici del PHEA-EDA hanno reagito con i gruppi carbossilici dell'HA nella reazione di reticolazione, essendo convertiti in gruppi

ammidici, il cui stretching C-N dà luogo a bande generalmente a valori minori di 1200 cm^{-1} .

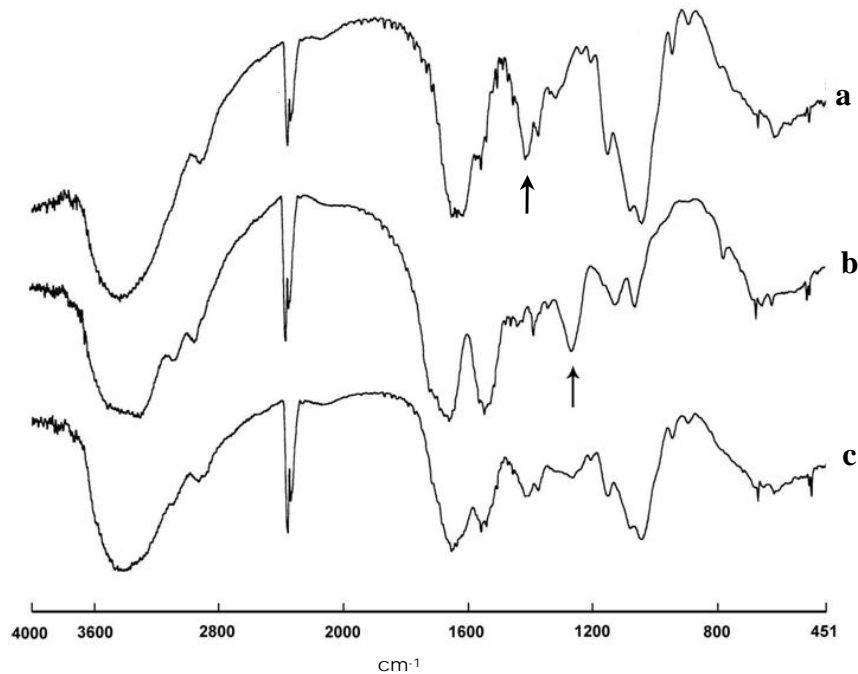


Figura 24: spettri FT-IR dell'HA (a), del PHEA-EDA (b) e del network HA-PHEA-EDA (c); le frecce indicano il picco a 1376 cm^{-1} , attribuibile allo stretching del C=O dei gruppi carbossilici dell'HA, e il picco a 1263 cm^{-1} , attribuibile allo stretching C-N dei gruppi amminici del PHEA-EDA, la cui intensità nello spettro del prodotto (c) è ridotta.

3.1.4. Studi di swelling

Poichè il comportamento di swelling di un idrogel progettato per applicazioni biomediche è un importante indice della sua capacità di interagire con l'ambiente biologico nel sito di applicazione, sono stati condotti studi di swelling sugli idrogeli di HA-PHEA-EDA. In particolare, al fine di simulare l'ambiente biologico, i dati di swelling sono stati determinati dopo incubazione di piccoli campioni circolari

dei film in tampone Dulbecco fosfato (DPBS) a pH 7,4, sotto costante agitazione orbitale, a 37°C per 48 ore. I risultati così ottenuti, espressi come *swelling ratio* (q), ovvero il rapporto tra il peso del film rigonfio (W_s) e il peso del campione secco (W_d), sono riportati in Tabella 4.

Tabella 4 : *swelling ratio* espresso come valore di q , dopo 48h in DPBS a 37°C. I valori sono espressi con la deviazione standard per esperimenti in triplicato

Rapporto molare X	q
0,5	15,4±0,8
1,0	8,5±0,2
1,5	5,3±0,4

Dai dati riportati risulta chiaro che i valori di swelling dipendono dal valore di X. Di conseguenza, la capacità di interagire con il mezzo acquoso è correlata alla densità di reticolazione, che, a sua volta, dipende dalla quantità relativa di PHEA-EDA impiegata: maggiore è la quantità relativa di PHEA-EDA, minore risulta essere il valore di swelling ratio.

3.1.5. Studi di degradazione chimica

Un requisito importante per gli scaffold da applicare come supporto per la crescita ed il rilascio di cellule epiteliali è la loro biodegradabilità nell'ambiente biologico per un periodo di tempo ben definito. E' infatti di fondamentale importanza che la degradazione del biomateriale sia tanto lenta da garantire alle cellule un adeguato supporto affinché esse non abbiano instaurato i legami intercellulari; d'altro canto, il biomateriale-supporto dovrebbe essere lentamente degradato in maniera tale da agire da protezione per il tessuto in via di rigenerazione.

Alla luce di quanto detto, si è ritenuto importante studiare la resistenza idrolitica a lungo termine in condizioni fisiologiche degli idrogeli di HA-PHEA-EDA.

I dati ottenuti da studi di idrolisi, riportati in Figura 25, mostrano che gli idrogeli HA-PHEA-EDA hanno un'eccellente resistenza idrolitica: i film HA-PHEA-EDA, immersi in DPBS (pH 7,4) a 37°C, si degradano molto lentamente e, dopo 30 giorni di incubazione, essi non si degradano più del 10%.

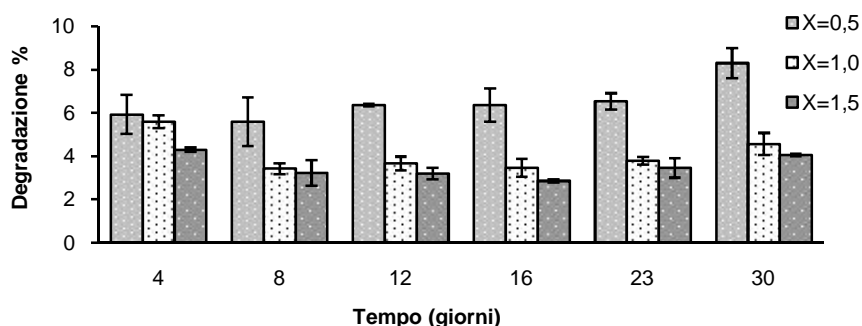


Figura 25 : studi di degradazione idrolitica: i film HA-PHEA-EDA (X = 0,5; 1,0; 1,5) sono stati immersi in DPBS (pH 7,4) a 37°C e la degradazione è stata monitorata mediante il saggio spettrofotometrico al carbazolo

Alla luce di questi risultati e dei dati di citocompatibilità è chiaro che tutti gli idrogeli di HA-PHEA-EDA analizzati in questo studio sono potenzialmente utilizzabili come bendaggio per la protezione della cornea in via di rigenerazione.

3.1.6. Studi di citocompatibilità

Al fine di dimostrare la citocompatibilità degli idrogeli di HA-PHEA-EDA, fibroblasti del derma umano sono stati coltivati a contatto diretto o indiretto con gli scaffold a vari rapporti molari per un tempo di 7 giorni.

Per gli esperimenti riguardanti il contatto diretto tra fibroblasti e HA-PHEA-EDA, le cellule sono state coltivate direttamente sulla superficie rigonfiata degli idrogeli mentre, per le prove vitalità riguardanti il contatto indiretto, i fibroblasti sono stati coltivati con il mezzo di coltura condizionato dalla presenza dell'idrogel.

L'attività metabolica delle cellule in coltura è stata investigata tramite saggio MTT (Figura 26).

In questo saggio, il reattivo 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio bromuro attraversa le membrane cellulari e viene metabolizzato dalle cellule vitali che lo trasformano in cristalli di formazano insolubili nel mezzo di coltura.

I cristalli di formazano hanno una colorazione tipica e vengono dissolti tramite una miscela di isopropanolo e HCl.

L'assorbanza a 540nm delle soluzioni risultanti è direttamente proporzionale al numero di cellule vitali nel campione analizzato.

Dalla figura 26 è possibile notare che tutti i campioni analizzati non hanno interferito con la vitalità dei fibroblasti siano essi coltivati direttamente sulle superfici degli idrogeli di HA-PHEA-EDA o nel mezzo da essi condizionato.

Infatti la vitalità delle cellule nei campioni è paragonabile a quella delle cellule coltivate nel pozzetto in assenza di HA-PHEA-EDA utilizzato come controllo positivo.

Questo, oltre a confermare la non tossicità dei biomateriali di partenza e degli scaffold ottenuti, dimostra il buon fine dei processi di lavaggio mirati ad allontanare gli agenti attivanti non reagiti nella reazione di crosslinking.

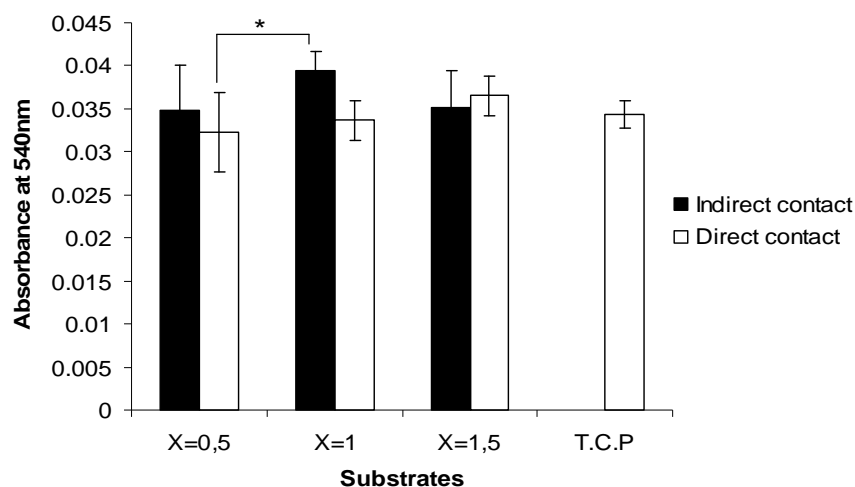


Figura 26: vitalità cellulare misurata tramite saggio MTT per fibroblasti del derma umano coltivati per 7 giorni a contatto diretto o indiretto con HA-PHEA-EDA X=0,5; X=1; X=1,5

Le immagini al microscopio confocale mostrano che i fibroblasti, trattati con Cell Tacker Red che ne colora i citoplasmi, coltivati a

contatto diretto con gli idrogeli a differenti rapporti molari formano, dopo 3 giorni, ampie colonie orientate in maniera ordinata nello spazio. Inoltre, le tutte le cellule mantengono il loro fenotipo e si presentano con la tipica forma allungata a conferma del fatto che gli idrogeli a base di HA-PHEA-EDA sono altamente citocompatibili per questa linea cellulare (Figura 27).

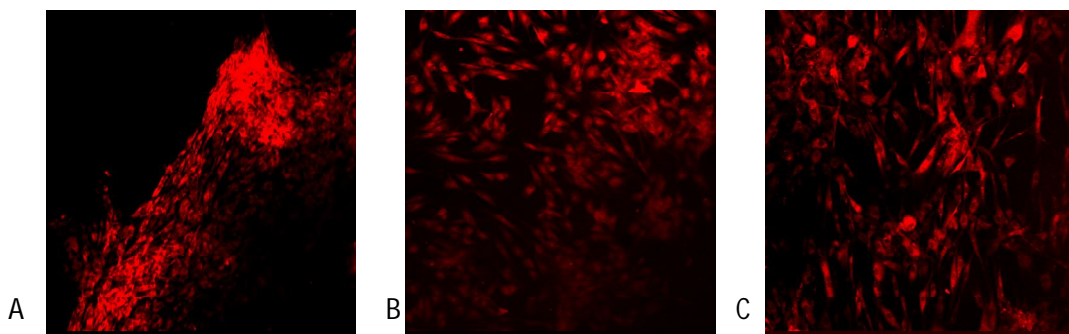


Figura 27: fibroblasti del derma umano coltivati per 3 giorni a contatto con gli idrogeli di HA-PHEA-EDA X=0,5(A); X=1,0 (B); X=1,5 (C)

3.1.7. Studi di adesione cellulare

Gli studi di adesione cellulare sono stati condotti su due linee cellulari differenti utilizzando come controllo positivo idrogeli di collagene.

Inizialmente sono stati coltivati sui vari idrogeli cellule epiteliali corneali umane immortalizzate HCEC. Queste cellule vengono irradiate tramite raggi gamma che consentono il mantenimento del fenotipo cellulare anche dopo svariati passaggi di coltura in vitro. L'opportunità di ottenere un numero elevato di cellule da un sola

linea cellulare ha fatto sì che le cellule immortalizzate siano state ampiamente utilizzate a scopi di ricerca.

Tuttavia, eventuali variazioni a livello genomico, che possono scaturire dall'irradiazione cellulare, potrebbero comportare variazioni nell'espressione delle proteine di membrana e citoplasmatiche, causando variazioni delle caratteristiche metaboliche e fisiologiche delle cellule. Volta per volta è quindi necessario stabilire sperimentalmente se la linea cellulare utilizzata rappresenta un modello attendibile per lo studio in corso.

Le Figure 28 e 29 mostrano le immagini ottenute tramite microscopia confocale delle cellule HCEC coltivate sugli idrogeli di collagene e su HA-PHEA-EDA a vari rapporti molari per tempi di 3, 7 e 14 giorni.

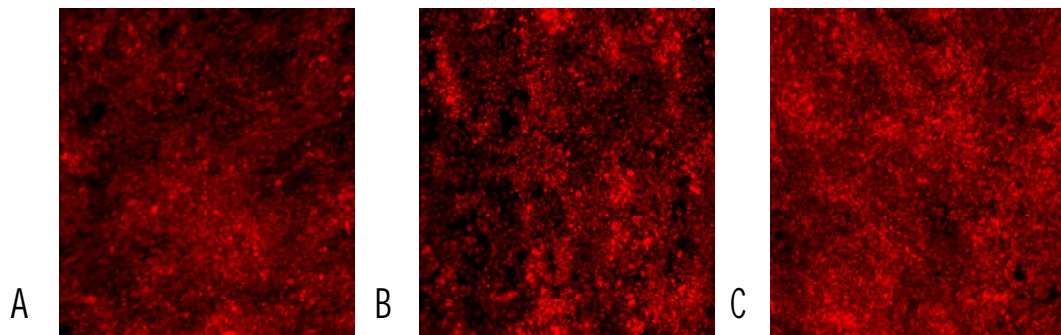


Figura 28: immagini al microscopio confocale di cellule HCEC su idrogeli di collagene dopo 3 (A), 7 (B) e 14 (C) giorni di coltura

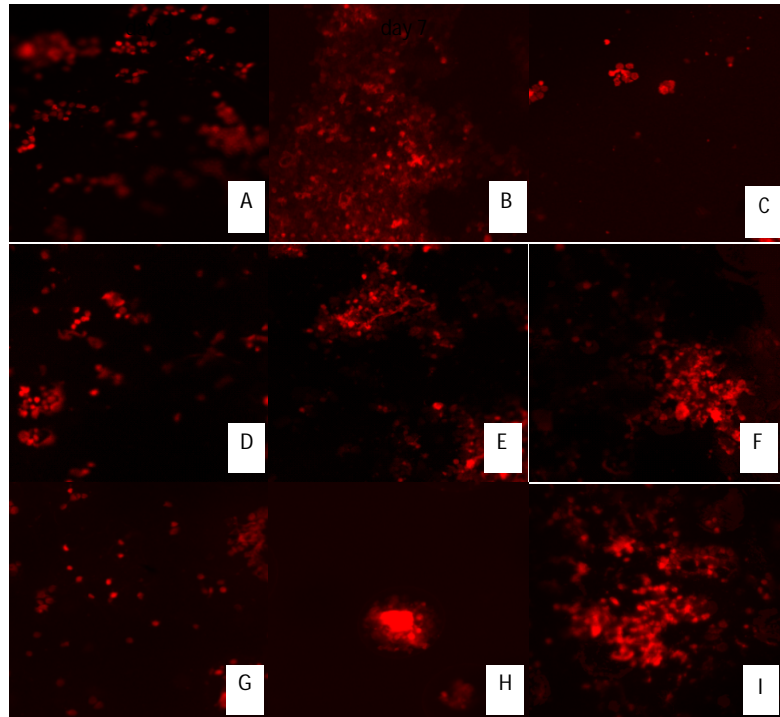


Figura 29: immagini al microscopio confocale di cellule HCEC su idrogeli di HA-PHEA-EDA $X=0,5$ (A-C), $X= 1,0$ (D-F) e $X= 1,5$ (G-I) 3 (A,D,G), 7 (B,E,F) e 14 (C,F,I)giorni di coltura

Come è possibile notare dalle figure, le cellule HCEC mostrano una spiccata tendenza ad aderire sugli idrogeli di collagene (Figura 28) e una minore tendenza ad aderire sugli idrogeli di HA-PHEA-EDA (Figura 29).

In tutti i casi comunque le cellule rimangono adese ai campioni per tutti i giorni di analisi.

Per dimostrare che tale adesione non sia frutto di una sovraespressione dei geni codificanti per l'espressione di integrine, data dall'esposizione delle cellule ai raggi gamma; è stato deciso di valutare il comportamento di adesione di cellule primarie provenienti dall'area limbale dell'occhio di coniglio.

Poiché dal limbo derivano le cellule epiteliali “giovani”, provenienti dalla differenziazione delle cellule presenti nei *loci* staminali, l’espianto da questa particolare area della superficie oculare consente l’ottenimento di cellule ad alto potere proliferativo.

La Figura 30 mostra le immagini al microscopio confocale delle cellule epiteliali RLEC e dei fibroblasti RLF coltivati singolarmente o in co-coltura sugli idrogeli di collagene.

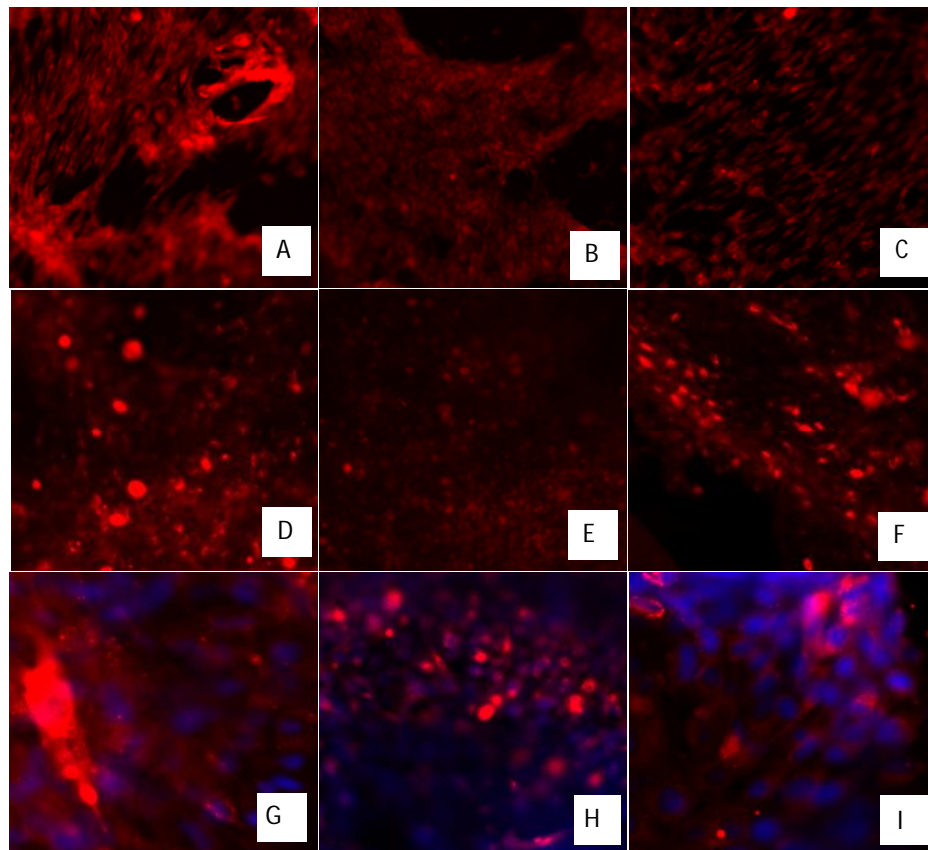


Figura 30: immagini al microscopio confocale di RLF (A-C), RLEC (D-F) e co-coltura (G-I) sugli idrogeli di collagene dopo 3 (A,D,G); 7 (B,E,H) e 14 (C, F,I) giorni di coltura

Dalle immagini risulta chiaro che le sia le cellule RLEC che le cellule RLF riconoscono il collagene come substrato ottimale per la loro adesione.

Nelle immagini riguardanti la co-coltura i due tipi cellulari sono stati colorati con due coloranti differenti per distinguere le cellule RLF (blu) dalle cellule RLEC (rosse).

È interessante notare che in tutti i giorni di analisi il numero di cellule nei campioni in co-coltura risulta essere maggiore rispetto alle colture singole.

Questo significa che, *in vitro* come *in vivo*, i fibroblasti e le cellule epiteliali collaborano influenzando vicendevolmente la loro proliferazione.

Utilizzando come supporto di adesione gli idrogeli di HA-PHEA-EDA, si osserva, da parte delle cellule primarie, un comportamento totalmente differente rispetto agli idrogeli di collagene (Figura 31).

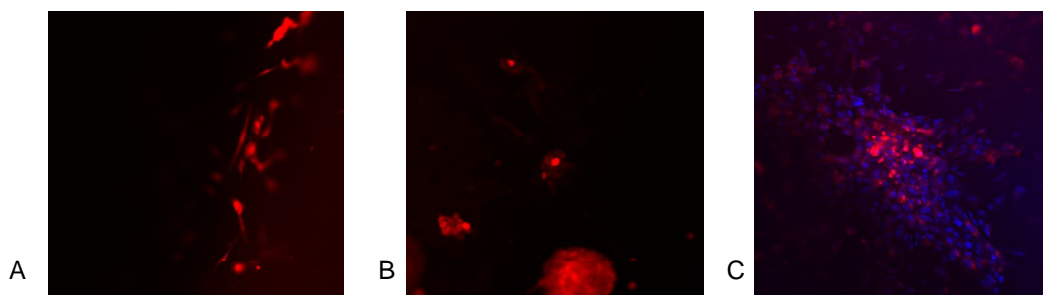


Figura 31: immagini al microscopio confocale di RLF (A), RLEC (D) e co-coltura (C) su HA/PHEA-EDA X=1,0 dopo 3 giorni di coltura

Al terzo giorno di coltura, si ha adesione cellulare solo nel idrogel con X= 1,0 e principalmente quando le cellule sono in co-coltura (C).

Questo dato conferma in maniera definitiva che le cellule primarie si comportano in maniera molto differente rispetto alle cellule immortalizzate HCEC, e che quindi quest'ultime non rappresentano un buon modello per lo studio di adesione sugli idrogeli in esame.

La mancata adesione delle cellule primarie sugli idrogeli di HA-PHEA-EDA con rapporto molare $X=0,5$ e $X=1,5$ può essere probabilmente ricondotta alle caratteristiche meccaniche degli scaffold date dalla compattezza del reticolo polimerico finale e dal contenuto di acqua.

Probabilmente reticoli poco compatti ($X=0,5$) non offrono abbastanza siti di adesione per le cellule primarie a causa dell'eccessiva presenza di acqua all'interno delle maglie dell'idrogel, mentre reticoli troppo compatti probabilmente inibiscono l'adesione delle cellule a causa della maggiore rigidità strutturale.

Dopo il terzo giorno di coltura, tuttavia, anche sugli idrogeli HA-PHEA-EDA con $X=1,0$ non è stato possibile osservare la presenza di cellule.

Questo conferma che gli idrogeli in esame favoriscono un'adesione cellulare solo momentanea e possono quindi potenzialmente essere impiantati *in vivo* come scaffold per il rilascio cellulare.

3.1.8. Realizzazione di lenti a contatto rivestite dal film HA-PHEA-EDA

Qualsiasi dispositivo medico pensato per l'applicazione oculare nel trattamento delle lesioni della cornea deve potere essere stabilmente impiantato sulla superficie corneale in maniera tale da potere esplicare la doppia azione di induttore della rigenerazione e protettore dell'area danneggiata, che, nelle prime fasi post traumatiche, è soggetta a offese dall'esterno di tipo fisico e biologico.

La membrana amniotica, che come detto è attualmente il dispositivo naturale più utilizzato in clinica per questo tipo di trattamento, viene suturata sulla superficie oculare causando, oltre alla ridotta compliance del paziente, possibili reazioni infiammatorie dell'area trattata che possono interferire con il processo di rigenerazione allungandone i tempi e minandone la riuscita.

In questo lavoro, lenti a contatto *soft* di tipo Hilafilicon B sono state utilizzate come veicolo per l'idrogel di HA-PHEA-EDA al fine di sviluppare un dispositivo oculare facilmente impiantabile, poco invasivo e sicuro.

Alla luce dei risultati ottenuti nei test di adesione cellulare, è stato scelto l'idrogel HA-PHEA-EDA con rapporto molare $X=1,0$ per ricoprire la superficie interna delle lenti a contatto e valutare la capacità delle cellule epiteliali primarie di aderire ed essere rilasciate da questo sistema.

La soluzione gel forming è stata posta all'interno delle lenti a contatto e fatta reticolare. Le lenti internamente rivestite sono state lavate più volte con acqua distillata per allontanare gli eventuali agenti attivanti non reagiti.

La Figura 32 mostra le immagini al microscopio ottico delle lenti a contatto sulle quali sono state coltivate le cellule epiteliali.

Lenti a contatto non rivestite sono state utilizzate come controllo.

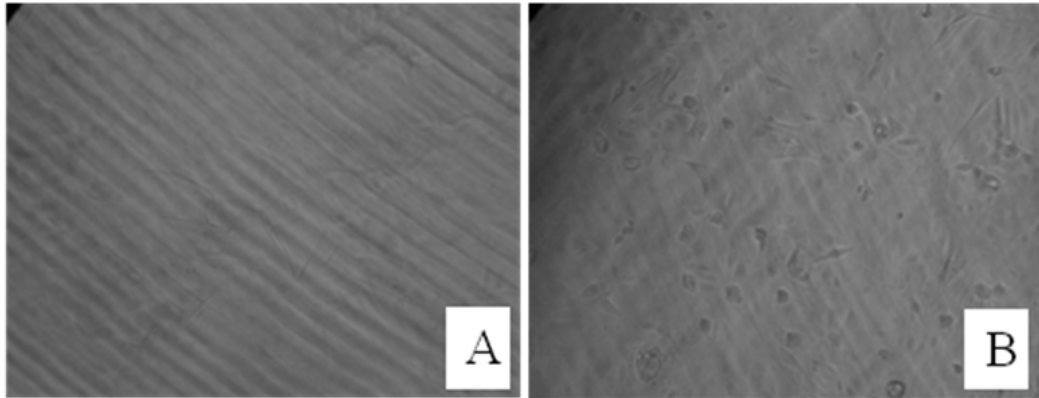


Figura 32: immagini al microscopio ottico della superficie interna di lenti a contatto non rivestite (A) e rivestite con HA-PHEA-EDA X= 1,0 dopo 24 ore a contatto con co-coltura RLEC e RLF

Dalle immagini si riesce a capire che le cellule sono presenti solo sulla superficie delle lenti rivestite con HA-PHEA-EDA X= 1,0 mentre non aderiscono sulla superficie della lente a contatto non rivestita.

Le immagini al microscopio confocale per le cellule coltivate sulle lenti a contatto rivestite con l'idrogel mostrano la presenza di cellule fino al 3° giorno di coltura (Figura 33).

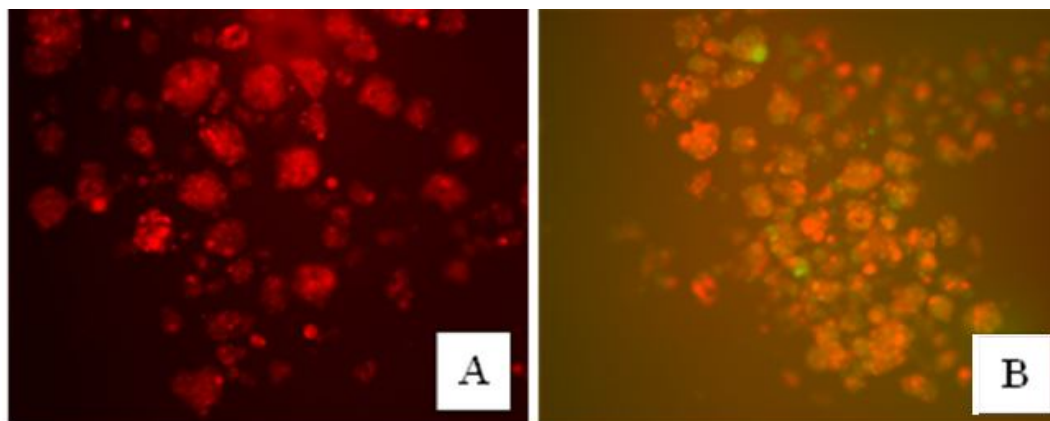


Figura 33: RLEC in mono(A) e co-coltura con RLF (B) adese sulle lenti a contatto rivestite con HA-PHEA-EDA al terzo giorno di coltura. In rosso le cellule RLEC ed in verde le cellule RLF

Anche in questo caso si osserva la collaborazione dei due tipi cellulari nella proliferazione della colonia come dimostra la Figura 33 (B) riguardante la co-coltura dove le RLEC sono marcate in colore rosso (Cell tracker red) e le RLF sono marcate in verde (Cell tracker green).

Inoltre è possibile notare la formazione di agglomerati o *cluster* cellulari che dimostrano l'instaurarsi dei legami intercellulari a discapito dei legami cellula-scaffold.

Infatti, dopo il terzo giorno di coltura, i *cluster* cellulari vengono rilasciati nel pozzetto di coltura e pochissime cellule rimangono sulla superficie delle lenti a contatto (Figura 34).

La vitalità delle cellule rilasciate nel pozzetto di coltura è stata validata qualitativamente tramite saggio MTT.

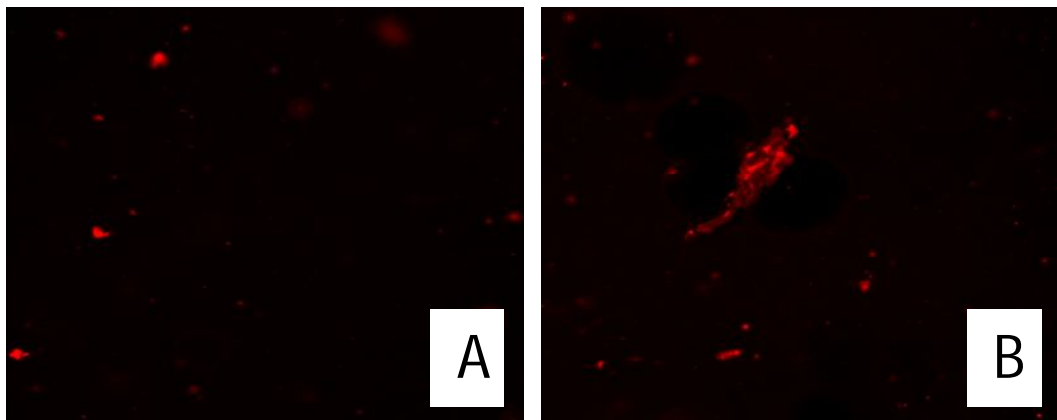


Figura 34 : RLEC in mono(A) e co-coltura con RLF (B) adese sulle lenti a contatto rivestite con HA-PHEA-EDA al quarto giorno di coltura

3.2. Produzione di scaffold fibrillari a base di PLGA per il trattamento delle ferite a tutto spessore nell'apparato tegumentario.

Allo scopo di produrre un tessuto bioingegnerizzato tridimensionale in grado di rappresentare una valida alternativa terapeutica al trapianto autologo o eterologo di cute, nel trattamento di lesioni traumatiche a tutto spessore dell'apparato tegumentario, fibroblasti e cheratinociti, isolati rispettivamente dal derma e dall'epidermide, sono stati coltivati su scaffold fibrillari a base di PLGA, ottenuti tramite la tecnica dell'elettrospinning.

Questo block copolymer è stato approvato dalla *Food and Drugs Administration* per applicazioni in campo biomedico grazie alla sua spiccata compatibilità con i tessuti nativi.

Al fine di favorire il ripristino delle funzioni fisiologiche, lo scaffold deve permanere nella sede di rigenerazione per un periodo tale da consentire la rigenerazione di ingenti quantità di ECM.

Variando il rapporto molare tra il PLA ed il PGA nel copolimero di partenza sono stati ottenuti tre differenti scaffold con proprietà di resistenza alla degradazione chimica differenti.

Sui due scaffold aventi tempi di degradazione più lunghi sono state coltivate in vitro, singolarmente o in co coltura, le cellule dell'apparato tegumentario, ed è stata valutata la capacità proliferativa e di sintesi di nuova ECM.

3.2.1. Elettrospinning e valutazione delle caratteristiche morfologiche degli scaffolds

Sono stati utilizzati tre diversi copolimeri con differenti rapporti molari tra residui di acido lattico e di acido glicolico: PLGA 85:15 (PM 50-75 KDa), PLGA 75:25 (PM 66-107 KDa) e PLGA 50:50 (PM 40-75 KDa).

Tali copolimeri sono stati solubilizzati in diclorometano (DCM), rispettivamente al 24%, 20% e 25% (p/p), ed elettrospinnati applicando un voltaggio di 15 kV e fissando la distanza tra la punta dell'ago e il collettore rotante (300 rpm) a 30 cm.

Le caratteristiche morfologiche degli scaffolds ottenuti sono state analizzate tramite microscopia a scansione elettronica (SEM).

La Figura 35 mostra le immagini ottenute tramite SEM per i campioni elettrospinnati di PLGA con diversi rapporti molari.

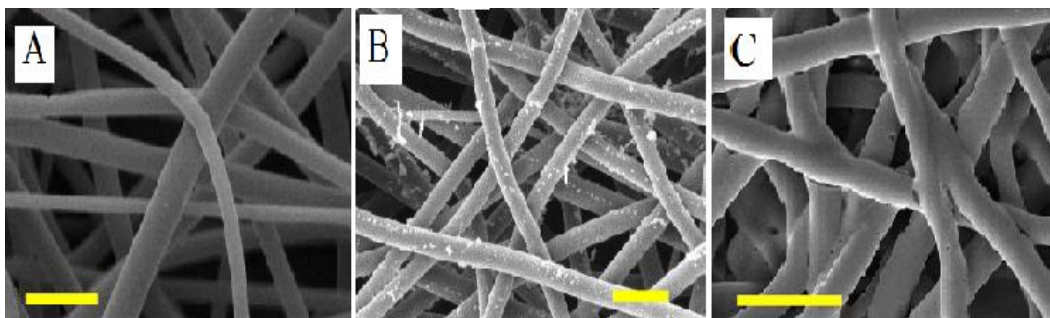


Figura 35: immagini SEM degli scaffold elettrospinnati: PLGA85:15 (A), 75:25 (B) e 50:50 (C)

Come è possibile notare dalle immagini SEM, il diametro delle fibre è uniforme nei singoli scaffold ottenuti ed aumenta in maniera proporzionale quando la quantità relativa di PGA nello scaffold aumenta dal 25 al 50%.

Infatti, il diametro medio delle fibre ottenute a partire dal PLGA 85:15 è di 2,7 μ m, di 4,1 μ m, per lo scaffold ottenuto dal PLGA 75:25 e 4,7 μ m per le fibre di PLGA 50:50.

Il diametro medio dei pori tra le fibre negli scaffolds è, in tutti i casi, compreso tra 5 e 10 μ m.

Queste caratteristiche morfologiche, permettono di pensare agli scaffold analizzati come ottimi materiali di partenza nella realizzazione di tessuti bioingegnerizzati per la sostituzione dell'apparato tegumentario.

Essi, infatti, presentano una fibrillarità ed una microporosità paragonabili alla ECM nativa e rappresentano, grazie anche alla nota biocompatibilità del PLGA stesso, ottimi supporti per la coltura in vitro di fibroblasti e cheratinociti ed il loro successivo impianto in vivo.

3.2.2. Studi di degradazione idrolitica degli scaffold elettrospinnati

La degradazione chimica degli scaffolds elettrospinnati è stata fatta incubando gli stessi in PBS pH 7, a 37 °C nell'incubatore rotante per mimare le condizioni fisiologiche.

La valutazione della degradazione dei campioni è stata fatta al microscopio sia al microscopio ottico che al SEM.

La Figura 36 mostra le immagini degli scaffolds ottenute al microscopio ottico dopo differenti giorni di incubazione.

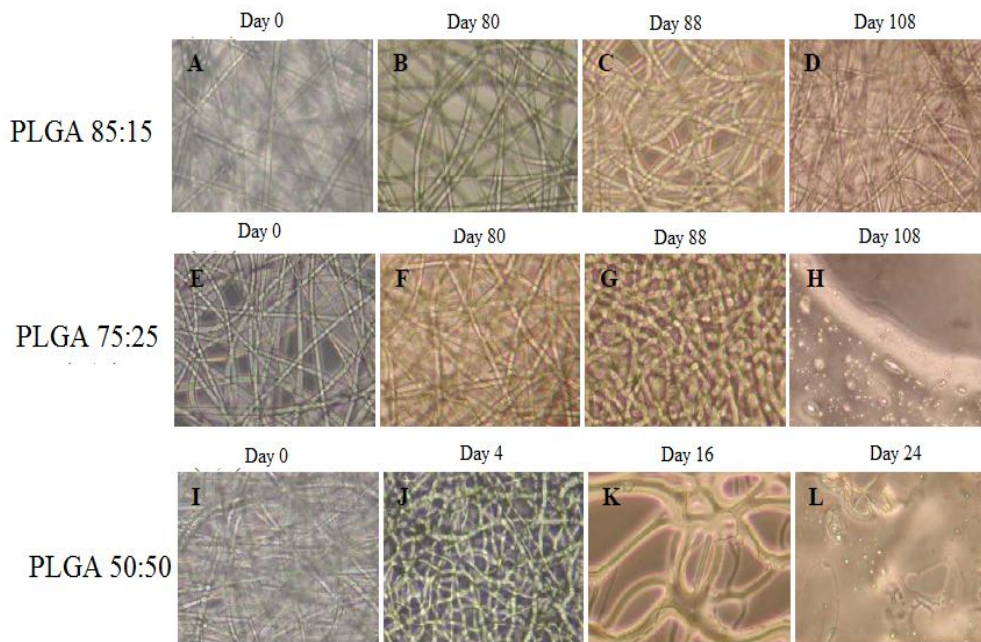


Figura 36 : immagini ottenute al microscopio ottico per PLGA 85:15 (A-D), PLGA 75:25 (E-F) e 50:50 (I-L), dopo differenti giorni di degradazione chimica

Come è possibile notare, mentre per lo scaffold di PLGA 85:15, non c'è alcuna apprezzabile variazione della struttura delle fibre dopo 108 giorni, lo scaffold di PLGA 75:25 comincia a mostrare segni di degradazione già dopo 80 giorni ed è completamente degradato al giorno 108.

La degradazione dello scaffold di PLGA 50:50 comincia dopo 8 giorni e la struttura fibrosa del polimero scompare completamente dopo 24 giorni.

Anche le immagini SEM confermano quanto visto al microscopio ottico (Figura 37).

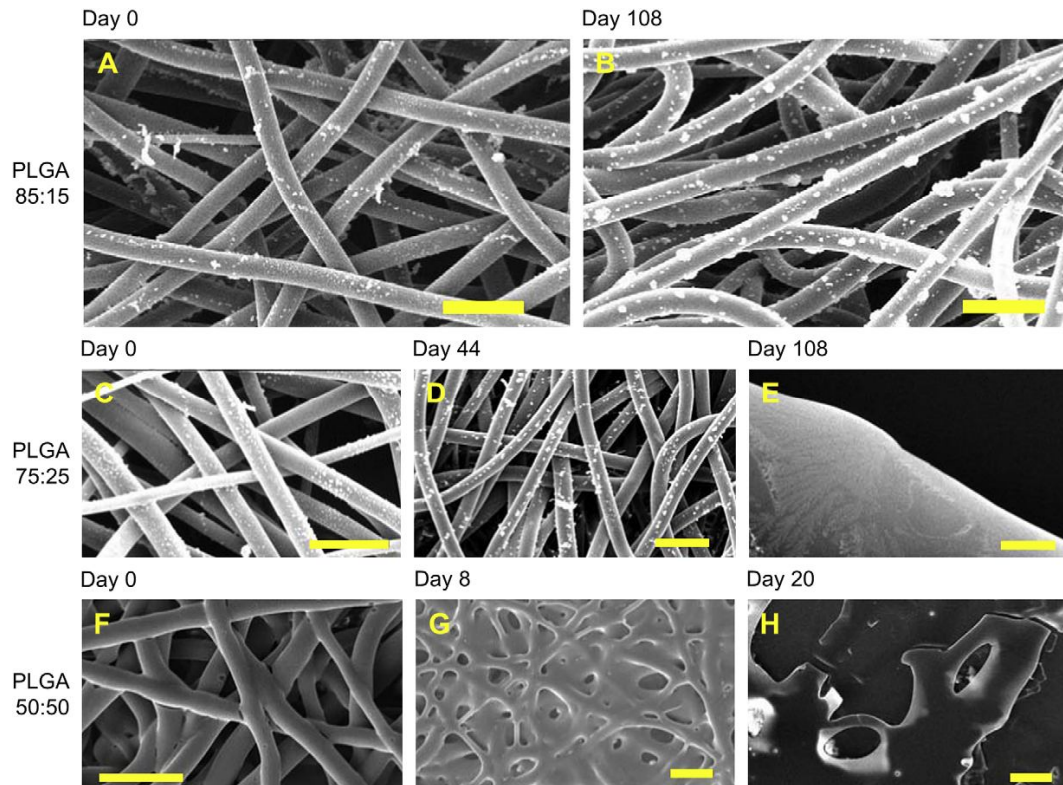


Figura 37 : immagini SEM per PLGA 85:15 (A-B), PLGA 75:25 (C-E) e 50:50 (F-H), dopo differenti giorni di degradazione chimica

In queste immagini si osserva un rigonfiamento e una fusione parziale delle fibre elettrospinnate di PLGA 50:50 al giorno 8 di incubazione (Figura 37 G) e una fusione totale delle fibre di PLGA 75:25 al giorno 108.

La velocità di degradazione degli scaffold aumenta all'aumentare della quantità relativa di PGA nel copolimero di partenza.

È evidente che, il bilancio tra le funzioni lipofile di PLA e quelle più idrofile di PGA nel copolimero di partenza influenza la capacità dello scaffold di incorporare il mezzo acquoso tra le fibre elettrospinnate. Essendo il PLGA un polimero di natura esterea, la sua cinetica di

degradazione dipende fortemente dalla presenza di acqua nell'ambiente circostante.

Quindi, gli scaffold contenenti maggiori quantità di PGA, essendo in grado di assorbire più acqua, si degradano in tempi più brevi.

Alla luce di tali risultati e per quanto discusso nei paragrafi precedenti, risulta chiaro che il PLGA 50:50, a causa dell'eccessiva velocità di degradazione non rappresenta un biomateriale ottimale nella realizzazione di tessuti bioingegnerizzati per il trattamento di ferite a tutto spessore dell'apparato tegumentario.

Per tale motivo quindi sono stati scelti gli scaffold formati da PLGA 85:15 e 75:25 per la coltura dei fibroblasti e dei cheratinociti nella preparazione dei tessuti bioingegnerizzati.

3.2.3. Produzione del tessuto tegumentario bioingegnerizzato

Al fine di produrre in vitro dei sostituti bioingegnerizzati della pelle, fibroblasti e cheratinociti sono stati coltivati in mono e co-coltura sugli scaffold di PLGA 85:15 e 75:25 per 7 e 14 giorni.

Il numero totale di cellule per scaffold è stato fissato a 3×10^5 e il rapporto tra i due tipi cellulari in co-coltura è di 1:1.

La vitalità delle cellule dopo i giorni di coltura è stata determinata tramite saggio MTT.

In quest'analisi, le deidrogenasi delle cellule vive, riducono l'MTT in sali di formazano insolubili in PBS. Tali cristalli vengono solubilizzati in isopropanolo e l'assorbanza delle varie soluzioni, calcolata tramite spettrofluorimetro, è direttamente proporzionale al numero di cellule vive.

La Figura 38 mostra le immagini dei costrutti (7 giorni di coltura) dopo 40 min di incubazione in soluzione di MTT, prima della dissoluzione dei cristalli di formazano (in blu nella figura) con isopropanolo.

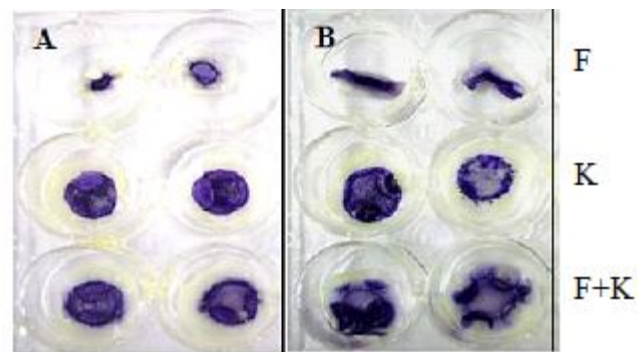


Figura 38 : cristalli di formazano formati sugli scaffold PLGA 75:25 (A) e 85:15 (B) per le colture di (F), cheratinociti (K) o per le cellule in co-coltura (F+K)

La figura 39 mostra l'andamento della vitalità cellulare nei due differenti scaffold dopo 7 e 14 giorni di coltura.

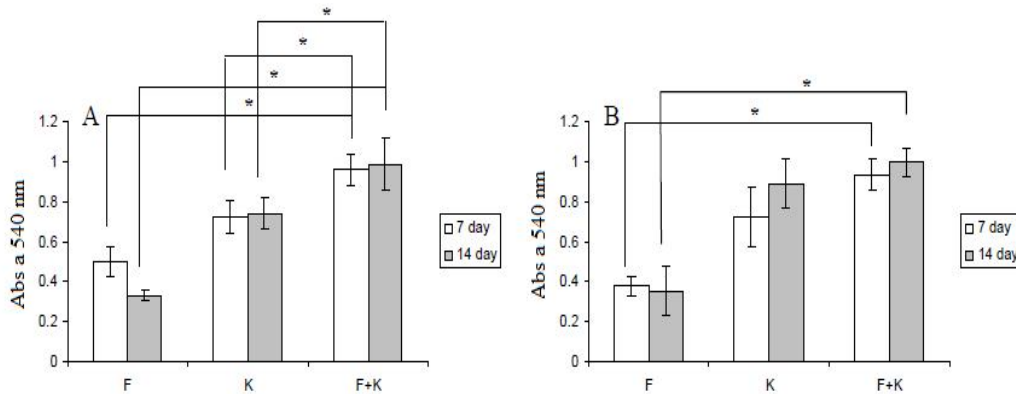


Figura 39: andamento della vitalità di fibroblasti (F), cheratinociti (K) o di entrambi i tipi cellulari in co-coltura (F+K); negli scaffolds PLGA 75:25 (A) e 85:15 (B)

Come è possibile notare dai grafici, la vitalità cellulare è maggiore quando entrambi i tipi cellulari sono presenti sugli scaffolds in co-coltura.

Anche in questo caso si è dimostrato, come nel caso delle cellule epiteliali e dei fibroblasti corneali (vedi paragrafo 3.1.7), una collaborazione dei due tipi cellulari nella coltura sullo scaffold in vitro. Tale evidenza sperimentale è di rilevante interesse biologico.

Essa infatti ci permette di affermare che vi è una influenza positiva reciproca tra le cellule epiteliali e le cellule connettivali non solo nei tessuti vitali ma anche sui tessuti bioingegnerizzati studiati in vitro.

Il tessuto bioingegnerizzato ottenuto dalla co-coltura dei due tipi cellulari è stato analizzato tramite analisi SEM per valutare la disposizione delle cellule nello scaffold elettrospinnato a base di PLGA 75:25 (Figura 40).

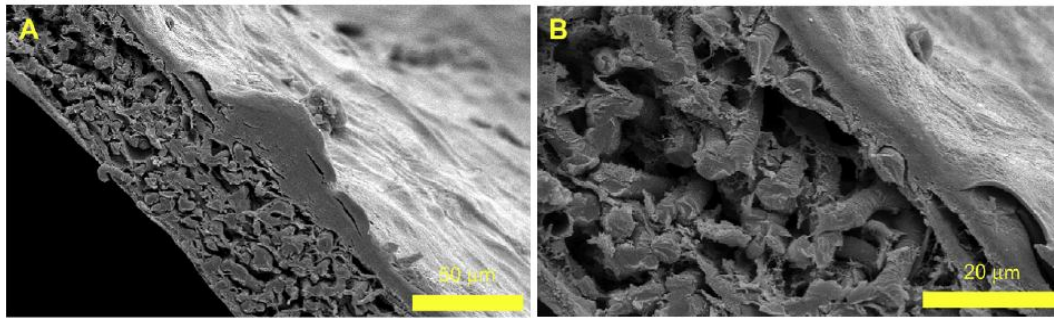


Figura 40: immagini SEM per il tessuto bioingegnerizzato a base di PLGA 75:25 a $\times 500$ di magnificazione (A) e $\times 1500$ (B)

Le immagini mostrano che la superficie dello scaffold è ricoperta da uno strato continuo di cheratinociti mentre i fibroblasti si trovano intercalati tra le fibre elettrospinnate.

Questo conferma che gli scaffold a base di PLGA rappresentano un ottimale supporto di crescita per le cellule dell'apparato tegumentario in grado di ricreare l'organizzazione istologica dei tessuti nativi.

3.2.4. Produzione di nuova ECM sui tessuti bioingegnerizzati

La produzione di nuova ECM da parte delle cellule presenti nei tessuti bioingegnerizzati, è stata dimostrata tramite il saggio Sirius Red.

In questo saggio viene usato un colorante (Figura 41) contenente dei gruppi solfonici che interagiscono con i gruppi amminici dei residui lisinici e idrossilisinici presenti nel collagene.

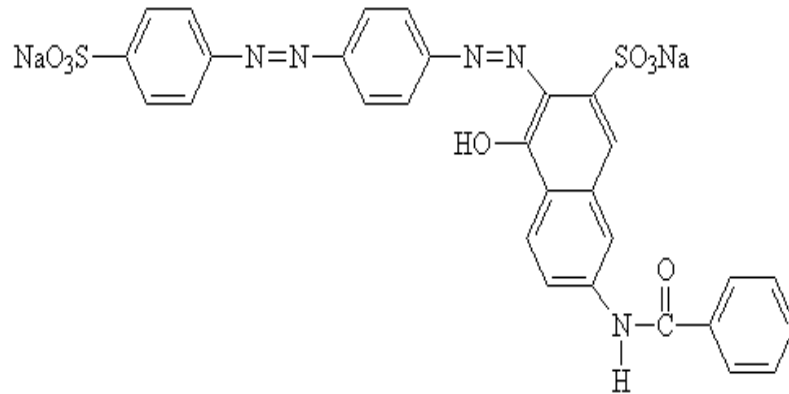


Figura 41: struttura chimica del colorante Sirius Red

In seguito a tale interazione si ottiene la formazione di prodotti con un colore rosso acceso (Figura 42) che viene eluito con una miscela 1:1 di metanolo e NaOH 0,2 M.

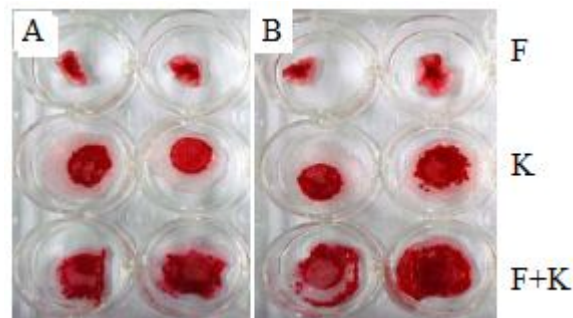


Figura 42: composti colorati formati nel saggio Sirius Red sugli scaffolds PLGA 75:25 (A) e 85:15 (B) (7 giorni di coltura)

L'assorbanza delle soluzioni a 450 nm ottenute è proporzionale alla quantità di collagene e quindi di nuova ECM prodotta dalle cellule sugli scaffold (Figura 43).

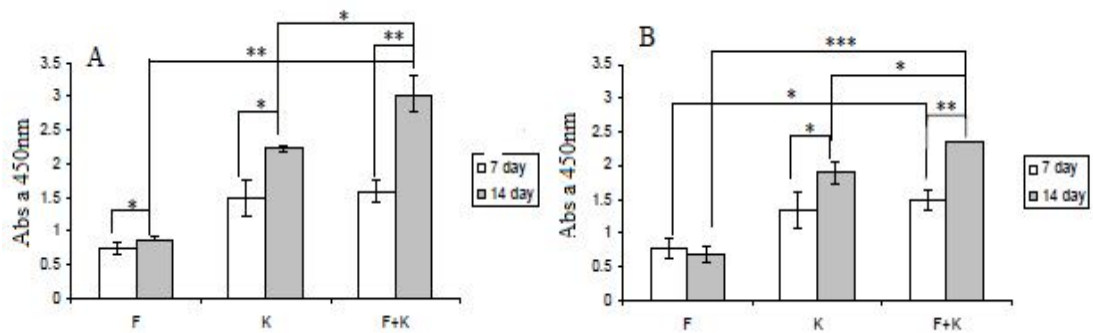


Figura 43: quantizzazione del collagene formato sugli scaffold PLGA 75:25 (A) e 85:15 (B) dopo 7 e 14 giorni di coltura

Dai grafici si nota che la deposizione di collagene aumenta in tutti i casi notevolmente passando dal settimo al quattordicesimo giorno di coltura.

Inoltre, si nota che, la presenza di entrambi i tipi cellulari in co-coltura favorisce una deposizione della proteina maggiore rispetto che nelle monoculture.

3.3 Produzione di scaffold fibrillari a base di PHEA-PLA per il trattamento delle ferite croniche dell'apparato tegumentario

Il trattamento delle ferite croniche dell'apparato tegumentario necessita, come precedentemente descritto, l'applicazione di scaffold in grado di ripristinare l'omeostasi tissutale tramite la veicolazione di molecole bioattive nella sede di rigenerazione.

Essendo le ferite croniche delle lesioni di tipo a spessore parziale caratterizzate dalla perdita della zona superficiale del derma e quindi di una piccola quantità di matrice extracellulare, necessitano, una volta ripristinate le condizioni fisiologiche proprie del tessuto, tempi di rigenerazione molto più brevi rispetto alle ferite a tutto spessore di cui si è discusso nel precedente paragrafo. Pertanto, uno scaffold ottimale per il trattamento delle ulcerazioni croniche, oltre ad essere morfologicamente simile alla ECM nativa ed in grado di veicolare opportunamente molecole bioattive, deve potere essere allontanato dall'organismo in tempi brevi per potere essere rimpiazzato dai tessuti connettivi superficiali di neogenesi.

Il nostro approccio è stato quello di produrre tramite la tecnica dell'elettrospinning, uno scaffold a base di un copolimero graft del PHEA con il PLA (PHEA-g-PLA) altamente versatile dal punto di vista chimico, con lo scopo di legare covalentemente il farmaco antiinfiammatorio ibuprofene e rallentare il rilascio nel mezzo fisiologico.

Le caratteristiche anfifiliche del copolimero di partenza, conferiscono allo scaffold una buona affinità per il mezzo acquoso, un'opportuna velocità di degradazione e caratteristiche meccaniche ottimali.

3.3.1. Sintesi del copolimero graft PHEA-g-PLA

È stata sperimentata una metodologia semplice e riproducibile per la sintesi del copolimero graft PHEA-g-PLA. Tale metodologia ha permesso l'ottenimento di un grado di funzionalizzazione in PLA della catena polimerica di PHEA pari 10 mol%.

Il copolimero graft prodotto ha ottime caratteristiche di resistenza meccanica (grazie alle catene di PLA) e una buona affinità per l'acqua. Inoltre il backbone polimerico presenta ancora gruppi ossidrilici funzionalizzabili che possono essere sfruttati per il legame con agenti biologicamente attivi.

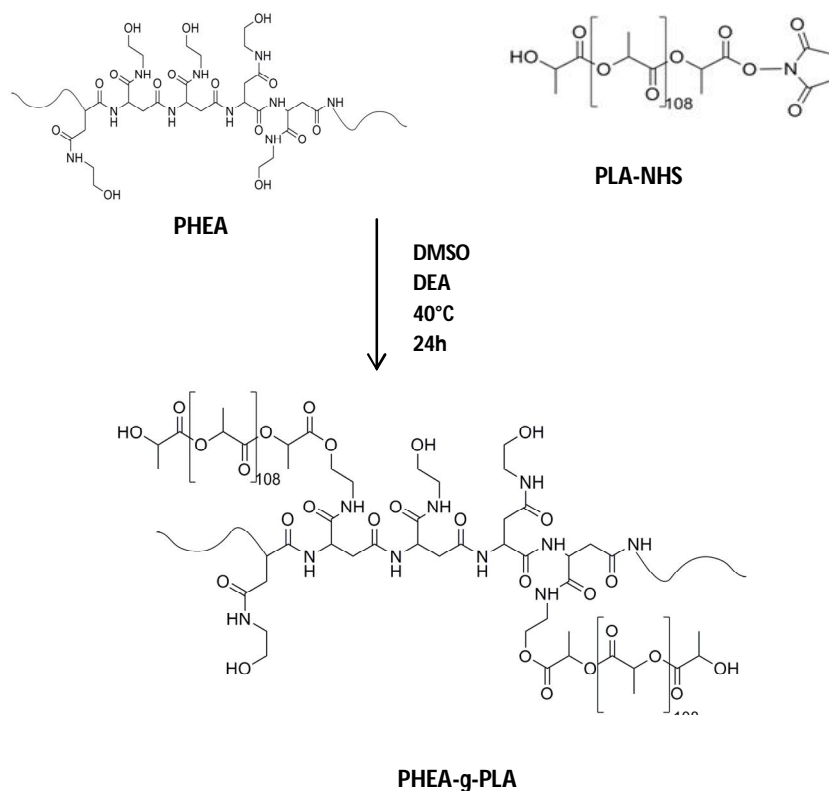
Per aumentare la reattività del gruppo carbossilico del PLA è stato necessario sintetizzare il suo derivato N-idrossisuccinimmidico seguendo la metodica riportata in letteratura da Palumbo et al [55].

Il PLA-NHS ottenuto è stato isolato, caratterizzato e fatto reagire con il PHEA.

La reazione è stata condotta in DMSO anidro per 24 ore a 40°C utilizzando DEA (dietilammina) come catalizzatore. Il rapporto (X) tra moli di PLA-NHS e moli delle unità ripetitive del PHEA è di 0,1.

La reazione è riportata nello Schema 5.

La purificazione del PHEA-g-PLA è stata eseguita mediante dialisi della soluzione di reazione contro DMSO e quindi contro acqua per rimuovere il solvente organico. Si ottiene una sospensione del copolimero in acqua che viene essiccata tramite freeze-drying.



Schema 5: sintesi del copolimero PHEA-g-PLA

La Figura 44 riporta lo spettro $^1\text{H-NMR}$ del copolimero PHEA-g-PLA che ha permesso di calcolare il grado di derivatizzazione ottenuto mettendo in relazione l'intensità dei segnali attribuiti ai gruppi metilenici (m , $2\text{H } -\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$) del PHEA (δ 3,1), con i segnali attribuiti ai gruppi metilici ($-\text{O}-\text{CO}-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{O}-$) del PLA (δ 1,5 e δ 1,6).

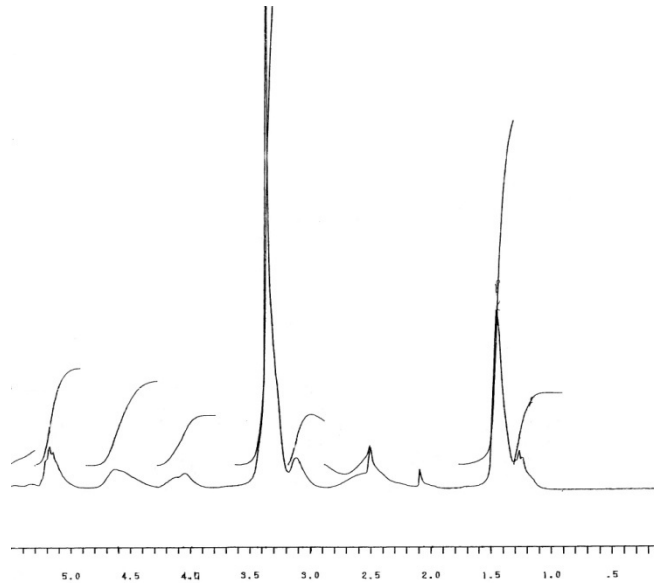


Figura 44: spettro $^1\text{H-NMR}$ del copolimero PHEA-g-PLA

3.3.2. Sintesi del copolimero PHEA-g-PLA-(IBU)

Una delle caratteristiche fondamentali degli scaffold ottenuti tramite la tecnica dell'elettrospinning è l'ampia superficie specifica data dalle fibre nano-micrometriche costituenti il materiale.

Questa proprietà fa sì che le eventuali molecole bioattive presenti in forma libera tra le catene polimeriche, che costituiscono l'impalcatura delle fibre elettropinnate, diffondano velocemente nei fluidi con i quali gli scaffold vengono a contatto.

Al fine di prolungare il rilascio dell'ibuprofene dagli scaffold elettrospinnati, è stata sfruttata la versatilità chimica del PHEA-g-PLA per instaurare un legame covalente tra il farmaco ed il copolimero.

Il legame dell'Ibuprofene con il PHEA-g-PLA è stato realizzato facendo reagire il gruppo carbossilico del farmaco, precedentemente attivato con la dicicloesilcarbodiimmide (DCC), con i gruppi ossidrilici liberi presenti sulla catena principale di PHEA-g-PLA in presenza di dimetilamminopiridina (DMAP) come attivatore.

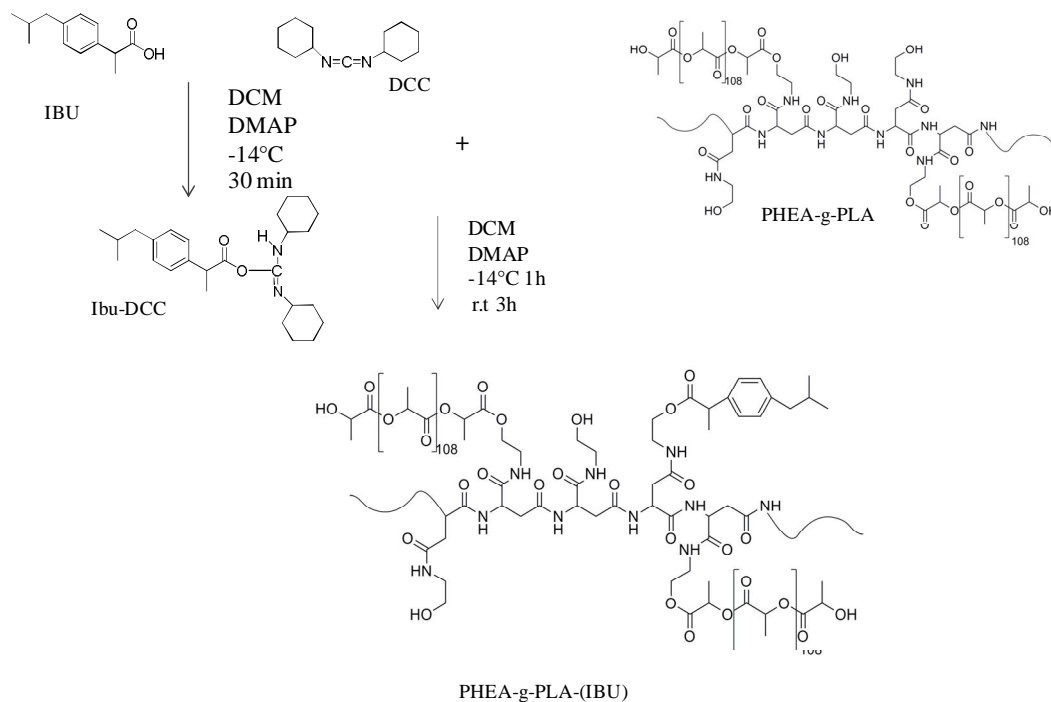
La reazione è stata condotta in DCM complessivamente per 4 ore delle quali la prima a -14°C e le tre successive a temperatura ambiente.

La formazione del legame tra l'ibuprofene attivato e il PHEA-g-PLA causa la formazione della dicicloesilurea che è stata allontanata, a fine reazione, tramite filtrazione su carta.

Il DCM della soluzione di reazione è stato allontanato per evaporazione ed il solido, aderito alle pareti del pallone di reazione è stato lavato in etanolo per allontanare le eventuali molecole non reagite.

Il solido ottenuto è stato sospeso in acqua e recuperato per freeze-drying con una resa in peso rispetto al PHEA-g-PLA di partenza pari al 95%.

La reazione è mostrata nello Schema 6.



Schema 6: sintesi del copolimero PHEA-g-PLA-(IBU)

La presenza del farmaco nel backbone polimerico è stata confermata qualitativamente e quantitativamente tramite analisi $^1\text{H-NMR}$ e tramite spettrofotometria UV calcolando l'assorbanza del farmaco a 230nm.

Nella figura 45, mostrante lo spettro $^1\text{H-NMR}$ ottenuto per il copolimero PHEA-g-PLA-(IBU), è possibile notare la comparsa, di picchi con chemical shift (scala δ) a 7,4 attribuibili ai gruppi -CH- dell'anello aromatico dell'ibuprofene.

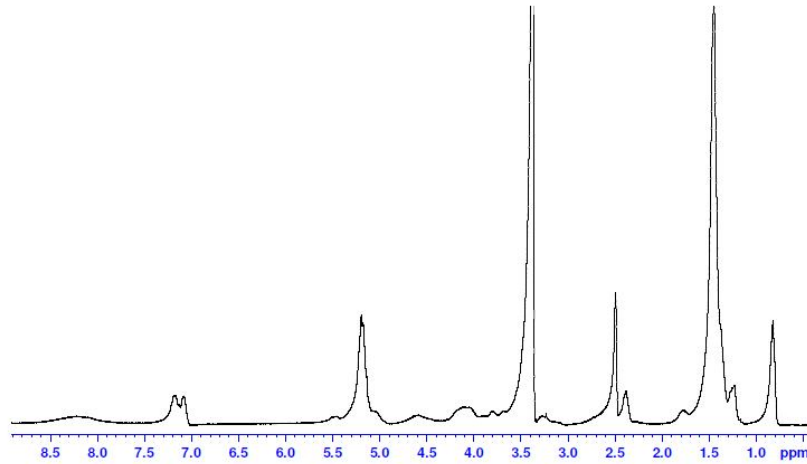


Figura 45: spettro ^1H - NMR del copolimero PHEA-g-PLA-(IBU)

Comparando tali segnali con quelli relativi ai gruppi metilenici (m , $2\text{H } -\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$) del PHEA-g-PLA, è stato possibile calcolare il grado di derivatizzazione in ibuprofene del copolimero finale che è risultato essere il 20% in moli, espresso come percentuale di farmaco legato per unità ripetitiva di PHEA-g-PLA.

La quantità di farmaco covalentemente legata al copolimero, che corrisponde ad una funzionalizzazione in peso pari al 5%, rappresenta una dose disponibile ottimale per il trattamento delle infiammazioni topiche derivanti dalle ulcerazioni croniche cutanee.

Lo spettro ^1H -NMR, ha confermato, inoltre, che il legame del farmaco non ha avuto nessuna ripercussione sul grado di funzionalizzazione in PLA del PHEA.

3.3.3. Elettrospinning e valutazione delle caratteristiche fisiche degli scaffolds

Il copolimero PHEA-g-PLA è stato solubilizzato in miscele di solventi differenti al fine di ottenere una soluzione con concentrazione e viscosità ottimali per il successivo processo di electrospinning.

Per essere opportunamente elettrofilata, una soluzione polimerica deve avere una concentrazione tale da consentire alle catene polimeriche di essere interconnesse tra di loro senza soluzione di continuità data dal solvente. Tale condizione viene definita *entanglement* polimerico.

La concentrazione ottimale del polimero quindi dipenderà dal peso molecolare medio di quest'ultimo, dalla sua natura e dalle caratteristiche chimico-fisiche del solvente utilizzato.

La Tabella 5 riporta i solventi, le concentrazioni, i parametri ed i risultati per il processo di elettrospinnig di PHEA-g-PLA.

Tabella 5: soluzioni, condizioni e risultati per l'elettrospinning del copolimero PHEA-g-PLA +++= ottimo, ++= buono, + discreto, -/+ = scarso, - = molto scarso, -- = nullo

SOLVENTE	CONCENTRAZIONE % p/v	VOLTAGGIO APPLICATO (kV)	DISTANZA AGO- COLLETTORE (cm)	RISULTATO
CHCl ₃	30-40	20-25	15	--
DCM	30-40	20-25	15	-
(CH ₃) ₂ CO	20-40	22	15	-/+
DMF	90-100	15	20	+
DMF/(CH ₃) ₂ CO 80:20 v/v	90-100	15-18	15-20	++
DMF/(CH ₃) ₂ CO 65:35 v/v	90-100	18	15-20	+++
DMF/(CH ₃) ₂ CO 20:80 v/v	70-90	18-20	15-20	+

Utilizzando solventi come il DCM, cloroformio (CHCl₃) o acetone (CH₃)₂CO non si riesce ad ottenere un flusso del jet polimerico continuo e le poche fibre ottenute non si distaccano dal sistema di raccolta a causa dell'alto contenuto residuo di solvente che funge da vero e proprio collante.

L'elettrospinning di soluzioni di PHEA-g-PLA in DMF consente l'ottenimento di un flusso continuo anche se gli scaffold prodotti risultano poco resistenti alle sollecitazioni meccaniche.

Utilizzando la miscela DMF/Acetone sono stati ottenuti i migliori risultati in termini di continuità di flusso e caratteristiche morfologiche degli scaffold finali.

Variando la quantità relativa dei due solventi si è potuto produrre uno scaffold con pliabilità ottimale.

Inoltre, l'utilizzo di questa miscela consente di ottenere soluzioni a bassa tensione superficiale che necessitano, per la formazione delle fibre polimeriche l'applicazione di bassi voltaggi che non rappresentano un pericolo per l'operatore.

Le immagini SEM mostrate in Figura 46, mostrano le variazioni morfologiche delle fibre di PHEA-g-PLA ottenute dall'elettrospinning di soluzioni in DMF o in miscele DMF/Acetone.

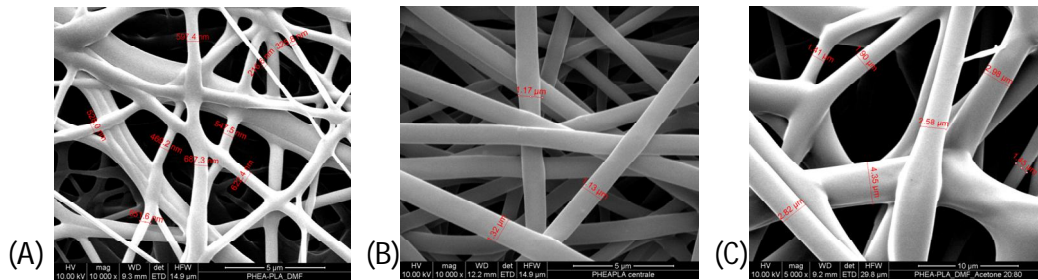


Figura 46: immagini SEM dei campioni elettrospinnati a partire da soluzione in DMF (A), DMF/Acetone 65:35 (B), DMF/Acetone 50:50(C)

Come è possibile notare, all'aumentare della concentrazione di DMF diminuisce il diametro e l'uniformità delle fibre.

Si passa infatti da un diametro medio di circa 600 μm (solo DMF) a un diametro medio di 2,5 μm (la miscela DMF/Acetone 20:80 v/v).

La diminuzione del diametro e dell'uniformità delle fibre si traduce in una diminuzione della resistenza meccanica dei materiali elettrospinnati.

Per gli studi di caratterizzazione è stato scelto come scaffold di elezione quello ottenuto dalla soluzione di PHEA-g-PLA nella miscela

DMF/Acetone 65:35 (v/v) utilizzando le condizioni sperimentali riportate in tabella.

Gli stessi parametri di processo e le stesse condizioni di solubilizzazione sono stati utilizzati per elettrospinnare il copolimero funzionalizzato chimicamente con l'ibuprofene, PHEA-g-PLA-(IBU).

Al fine di confrontare l'influenza del legame covalente tra il farmaco ed il copolimero costituente le fibre elettrospinnate sulla cinetica di rilascio del farmaco stesso, è stato elettrospinnato uno scaffold contenente ibuprofene, al 5% p/p, in forma libera nella soluzione di elettrospinning del PHEA-g-PLA.

In questo caso, il rapporto volumetrico tra DMF ed Acetone nella soluzione di spinnaggio è stato variato in 50:50 e la concentrazione finale della miscela fisica tra copolimero e farmaco è stata fissata in 80% p/v.

La Figura 47 mostra le immagini SEM per gli scaffold ottenuti a partire da PHEA-g-PLA, PHEA-g-PLA-(IBU) e PHEA-g-PLA/IBU 5%.

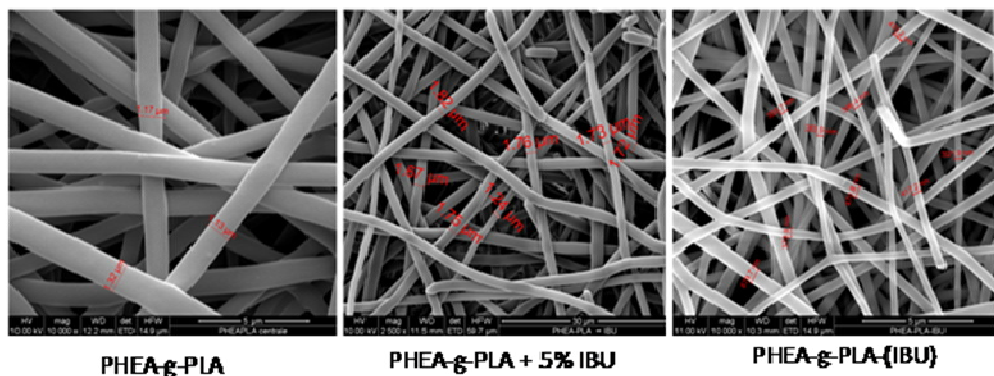


Figura 47: Fibre di PHEA-g-PLA, PHEA-g-PLA/IBU 5% e PHEA-g-PLA-(IBU)

Come si nota, in tutti e tre gli scaffold le fibre ottenute sono omogenee e presentano un diametro compreso tra 600nm e 1,8 μ m. L'omogeneità delle fibre e la loro distribuzione disordinata conferiscono agli scaffold a base di PHEA-g-PLA caratteristiche morfologiche simili a quelle della ECM nativa.

Tali scaffold quindi possono rappresentare un buon supporto temporaneo per l'adesione delle cellule favorendone una ottimale disposizione nello spazio.

Tutti gli scaffold ottenuti hanno mostrato delle buone caratteristiche meccaniche che hanno consentito una facile manipolazione per tutti gli esperimenti condotti.

3.3.4. Studi di swelling e degradazione

La capacità degli scaffold elettrospinnati di richiamare e trattenere l'acqua è una caratteristica molto importante nel trattamento delle ulcerazioni croniche. Infatti il trattenimento dell'essudato nel letto della lesione favorisce l'ossigenazione dei fibroblasti e la diffusione di fattori di crescita necessari alla ripresa della proliferazione cellulare.

Gli studi di swelling degli scaffold elettrospinnati ottenuti sono stati eseguiti immergendo i campioni dello scaffold in tampone fosfato DPBS ed incubandoli in orbital shaker a 37 °C per mimare le condizioni fisiologiche per un tempo massimo di 28 giorni.

La morfologia degli scaffold ai giorni di analisi è stata valutata tramite analisi SEM.

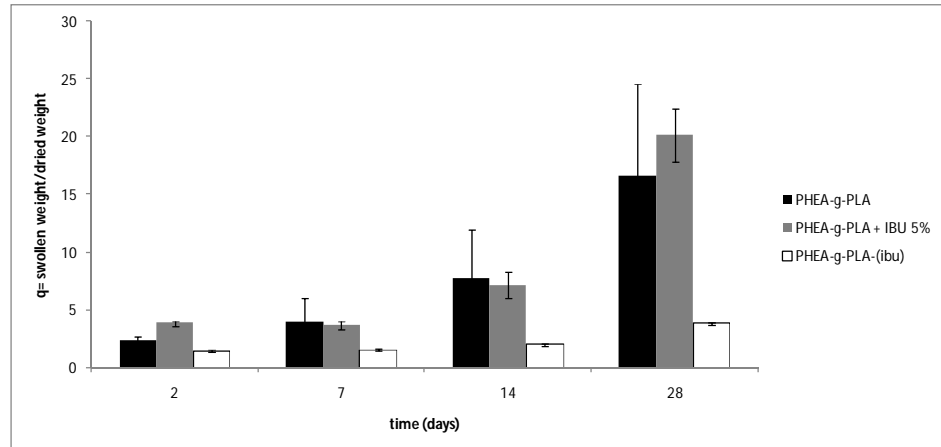


Figura 48: swelling dello scaffold elettrospinnato PHEA-g-PLA, PHEA-g-PLA/IBU 5%, PHEA-g-PLA-(IBU)

Come si evince dal grafico in Figura 48, tutti gli scaffold sono in grado di inglobare acqua fino a 28 giorni.

Lo scaffold PHEA-g-PLA-(IBU) mostra una minore tendenza ad incorporare acqua a causa dell' ibuprofene, molecola altamente lipofila, legata covalentemente al PHEA-g-PLA formante le fibre polimeriche.

Questi risultati sono in accordo con i dati di degradazione chimica mostrati in Figura 49.

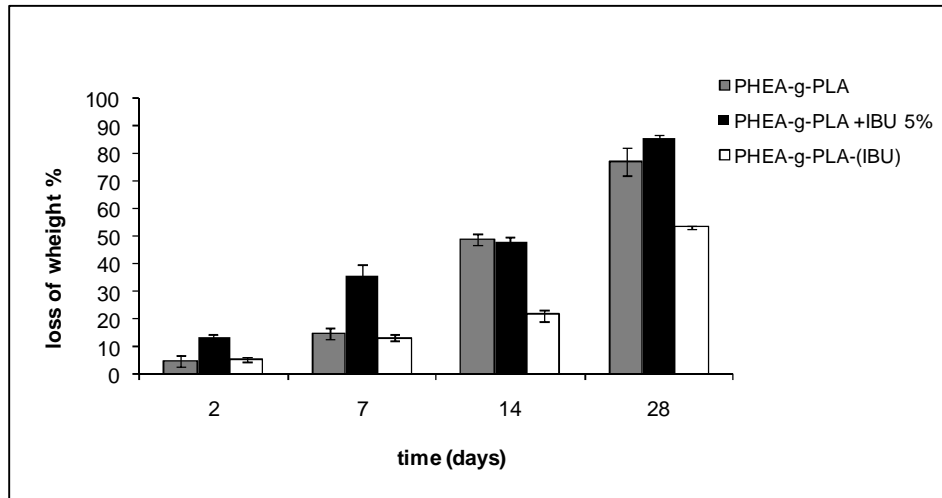


Figura 49: degradazione chimica degli scaffolds elettrospinnati PHEA-g-PLA, PHEA-PLA/IBU 5% e PHEA-g-PLA-(IBU)

Il grafico mostra chiaramente come il peso degli scaffold PHEA-g-PLA e PHEA-g-PLA/IBU 5% cominci a dimezzarsi già al quattordicesimo giorno di incubazione a causa dell'erosione provocata dalla presenza massiva di acqua tra le fibre dello scaffold mentre, per il copolimero PHEA-g-PLA-(IBU) è necessario raggiungere il giorno 28 per ottenere lo stesso grado di degradazione.

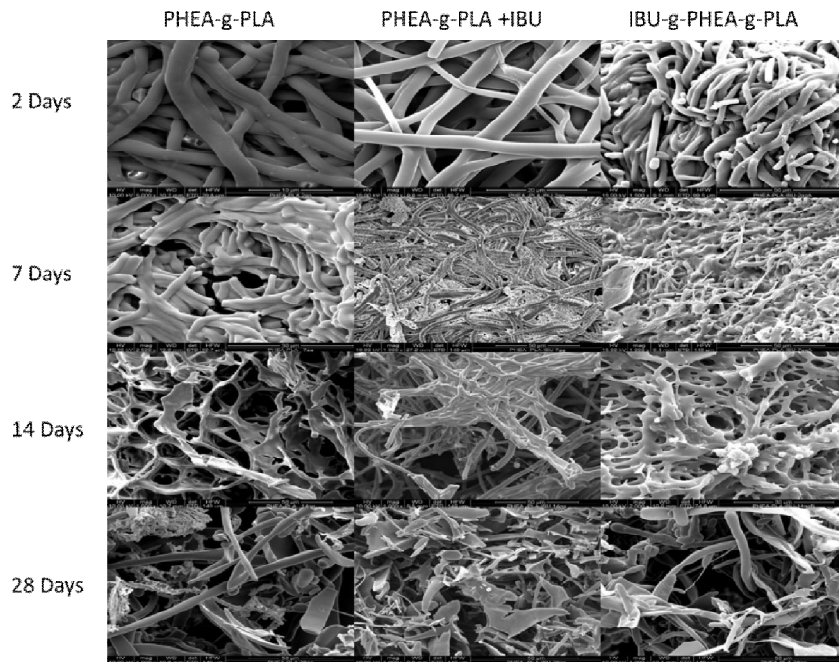


Figura 50: immagini SEM degli scaffold elettrospinnati PHEA-g-PLA, PHEA-g-PLA/IBU 5% e PHEA-g-PLA-(IBU) dopo la degradazione chimica

La figura 50 mostra l'andamento di degradazione di PHEA-g-PLA, PHEA-g-PLA/IBU 5% e PHEA-g-PLA-(IBU) elettrospinnati fino a 28 giorni di incubazione in DPBS a 37 °C.

Le fibre incorporano acqua, rigonfiandosi e raddoppiando il loro diametro di partenza fino al settimo giorno; cominciano a degradarsi al quattordicesimo giorno, e si disgregano completamente dopo 28 giorni di incubazione.

La cinetica di degradazione in ambiente fisiologico osservata, per tutti gli scaffold in esame, combacia con i tempi necessari ai fibroblasti del derma per la sintesi di nuova ECM.

3.3.5. Studi di rilascio del farmaco

Gli studi di rilascio dell'Ibuprofene sono stati condotti sugli scaffold medicati ottenuti a partire dal PHEA-g-PLA-(IBU) o dalle miscela fisica tra il farmaco ed il copolimero.

Inoltre, al fine di valutare la possibilità di modulare ulteriormente la cinetica di rilascio dell'antiinfiammatorio, è stato ottenuto uno scaffold "ibrido" elettrospinnando uguali quantità di PHEA-g-PLA-(IBU) e PHEA-g-PLA/IBU 5%, solubilizzati al 80% p/v in miscela DMF/Acetone 50:50 v/v.

I rilasci sono stati condotti ponendo pezzetti circolari di ogni scaffold, dal diametro di circa 1cm, nell'agitatore rotante a 37°C in plasma umano per simulare le condizioni fisiologiche.

La presenza del farmaco nel mezzo di rilascio è stata valutata tramite analisi HPLC secondo i parametri riportati nella sezione sperimentale paragrafo 5.3.2.

La figura 51 mostra le cinetiche di rilascio dell'Ibuprofene per gli tutti gli scaffold medicati ottenuti.

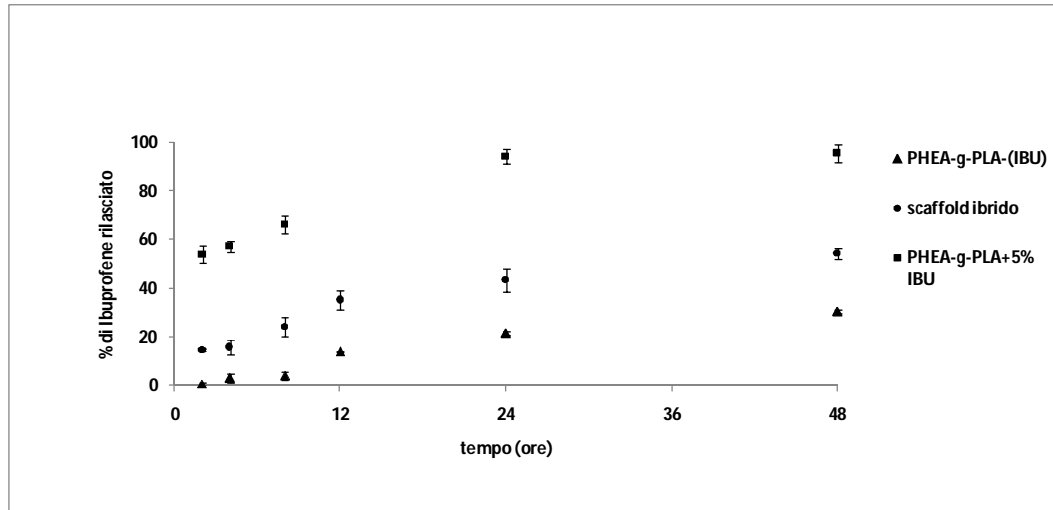


Figura 51: rilascio dell'ibuprofene dagli scaffold medicati a base di PHEA-g-PLA.

Come è possibile per notare, la cinetica di rilascio dell'ibuprofene, per lo scaffold contenente il farmaco in forma libera, PHEA-g-PLA/IBU 5%, è caratterizzata da un burst effect alle 4 ore dove il 50% dell'ibuprofene viene rilasciato nel plasma. Per questo scaffold il rilascio è completo già alla ventiquattresima ora.

Questa rapidità nel rilascio del farmaco è data principalmente dall'ampia superficie specifica che lo scaffold offre al mezzo di rilascio.

Inoltre, durante il processo di solidificazione delle fibre, indotto dall'evaporazione del solvente, il farmaco lipofilo viene trascinato in prossimità della superficie delle fibre e si trova immediatamente disponibile ad essere rilasciato.

Se da un lato il burst effect fornisce una dose di ibuprofene immediatamente disponibile per il trattamento degli stati infiammatori dei tessuti ulcerativi, dall'altro, la mancanza di un rilascio sostenuto potrebbe provocare la ripresa dello stato

infiammatorio prima che i fibroblasti siano rientrati nella fase proliferativa causando il fallimento del trattamento.

Nello scaffold ottenuto a partire dal PHEA-g-PLA-(IBU) dove l'ibuprofene è covalentemente legato alle catene polimeriche formanti le fibre, la cinetica di rilascio è completamente differente.

Infatti, non si osserva più il burst effect e solo il 20% di farmaco è rilasciato dopo 48 ore di incubazione.

Il rilascio del farmaco dal PHEA-g-PLA-(IBU) è consequenziale all'idrolisi del legame estereo tra farmaco e copolimero ed è quindi funzione della quantità di acqua presente tra le fibre elettrospinnate.

Quindi, gli studi di rilascio, sono in accordo con i dati riportati dagli studi di swelling che avevano evidenziato una ridotta capacità dello scaffold PHEA-g-PLA-(IBU), rispetto a tutti gli altri scaffold studiati, di incorporare acqua.

Quando nello scaffold finale l'ibuprofene è presente sia in forma libera che legato covalentemente, come è possibile notare dalla curva di rilascio dello scaffold ibrido, si riesce ad ottenere una cinetica di rilascio intermedia, in grado di fornire sia una dose di "pronto attacco" di che un rilascio del farmaco protratto nel tempo.

È evidente che variando le quantità relative di PHEA-g-PLA-(IBU) e di PHEA-g-PLA/IBU 5% è possibile modulare la cinetica di rilascio in funzione dell'entità dello stato infiammatorio e dell'estensione della ferita trattata.

3.3.6. Prove di citocompatibilità

Al fine di stabilire se l'eventuale presenza di solventi residui dalla soluzione di spinnaggio così come la cinetica di rilascio dell'ibuprofene possano influenzare la vitalità delle cellule a contatto con gli scaffold, sono stati condotti studi di citocompatibilità coltivando fibroblasti, isolati dal derma umano, a diretto contatto con i tutti gli scaffold prodotti. Gli scaffold e le cellule sono stati incubati per 7 giorni in mezzo di coltura DMEM a 37°C in atmosfera di CO₂ al 5%. Come controllo positivo sono state utilizzate cellule piastrate sui pozzetti della piastra di coltura (T.C.P)

La vitalità delle cellule è stata valutata tramite saggio MTS dopo 3 e 7 giorni di coltura.

Tramite questo saggio è possibile mettere in relazione la vitalità cellulare con l'intensità ottica di una soluzione di reattivo nella quale i campioni vengono incubati per 4 ore a 37°C.

Le deidrogenasi delle cellule vive, infatti, trasformano la molecola di MTS in derivati di formazano che assorbono ad una lunghezza d'onda di 490nm.

La figura 52 mostra il grafico della citocompatibilità con i 3 diversi scaffolds prodotti.

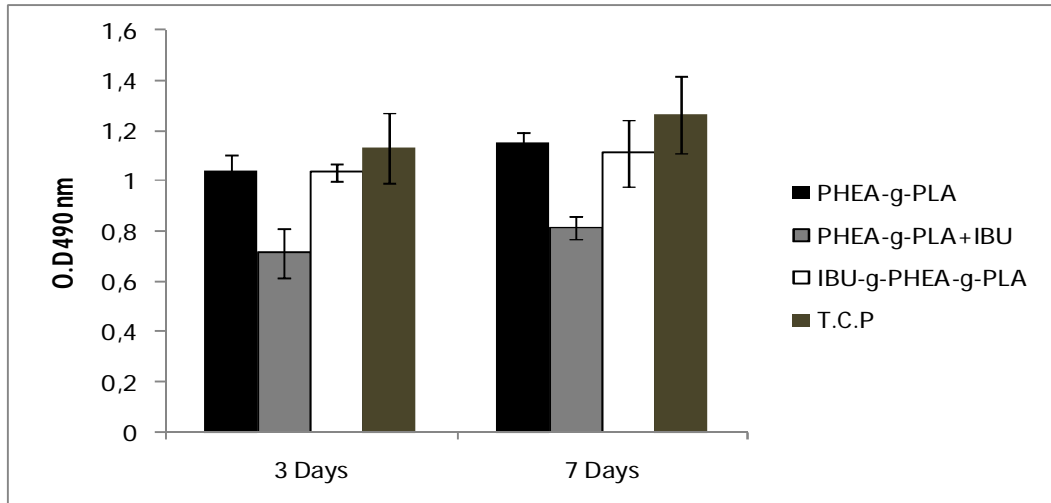


Figura 52: vitalità dei fibroblasti umani in contatto con gli scaffolds elettrofilati PHEA-g-PLA, PHEA-PLA/IBU 5% e IBU-g-PHEA-g-PLA

La vitalità delle cellule nello scaffold di PHEA-g-PLA e PHEA-g-PLA-(IBU) è comparabile a quella delle cellule coltivate in nel pozzetto controllo sia al terzo che al settimo giorno di coltura comparabile al controllo.

Per scaffold a base di PHEA-g-PLA/IBU 5%, il numero di cellule vitali dopo 3 e 7 giorni è di poco inferiore al controllo.

Probabilmente il burst effect osservato per questo scaffold provoca un'iniziale inibizione della proliferazione cellulare data dalla presenza di grandi quantità di Ibuprofene nel mezzo di coltura.

3.4. Produzione di scaffold fibrillari a base di PHEA-EDA-g-PLA per la ritenzione di agenti chemotattici nel trattamento delle ferite croniche dell'apparato tegumentario

La progettazione di uno scaffold per il trattamento delle ferite croniche dell'apparato tegumentario, come più volte ribadito nel corso di questa trattazione, deve tener conto delle particolari condizioni patologiche dei tessuti da trattare che influenzeranno lo sviluppo di un biomateriale di partenza con particolari caratteristiche chimico-fisiche, meccaniche e biologiche.

Nei paragrafi precedenti è stata discussa l'importanza di veicolare, nel letto della ferita e con un'opportuna cinetica di rilascio, farmaci in grado di debellare le patologie concomitanti alla lesione tissutale ed innescare la ripresa dei processi rigenerativi.

La velocità del processo di rigenerazione è fortemente influenzata dalla presenza, nei tessuti danneggiati, dei fattori di crescita che stimolano le cellule alla proliferazione e le indirizzano verso una corretta differenziazione.

Queste molecole a struttura polipeptidica subiscono facilmente fenomeni di degradazione chimica in funzione di variazioni del pH o della temperatura e hanno una brevissima emivita se somministrate per via topica.

In vivo, il sito di legame naturale per i fattori di crescita è l'eparina.

Questa consente una prolungata permanenza delle molecole bioattive nel sito di azione preservandone l'integrità chimica e l'attività biologica.

Al fine di sviluppare uno scaffold biologicamente simile ai tessuti nativi ossia in grado di richiamare spontaneamente fattori di crescita

nel letto della ferita, è stato elettrospinnato uno scaffold a base del PHEA-EDA con il PLA, il PHEA-EDA-g-PLA, al quale è stata successivamente legata, tramite reazione in eterofase, l'eparina.

La scelta del copolimero di partenza è influenzata dalla presenza dei gruppi amminici liberi sfruttabili per l'instaurazione di un legame stabile con l'eparina in grado di favorirne la ritenzione nello scaffold finale.

3.4.1. Sintesi del copolimero PHEA-EDA-g-PLA

La sintesi del PHEA-EDA-g-PLA è stata condotta utilizzando come parametri di riferimento le condizioni di reazione per l'ottenimento del PHEA-g-PLA.

Il rapporto molare tra la forma attivata del PLA (PLA-NHS) e PHEA-EDA è stato fissato in 0,1, ed anche in questo caso è stato ottenuto un grado di derivatizzazione in PLA nel copolimero finale di 10 mol%.

Il PHEA-EDA di partenza (vedi paragrafo 3.3.1) ha un grado di funzionalizzazione in gruppi etilendiamminici pari al 47 mol%.

La purificazione è stata condotta mediante dialisi contro DMSO, per eliminare l'eventuale PLA-NHS non reagito, quindi contro acqua per allontanare il solvente organico.

Lo Figura 53 mostra la struttura chimica del PHEA-EDA-g-PLA.

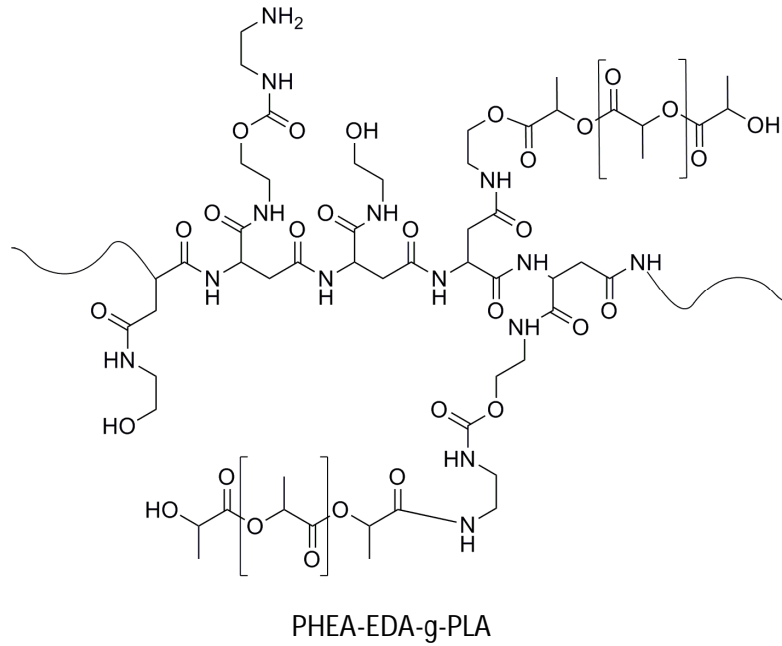


Figura 53: struttura chimica del PHEA-EDA-g-PLA

Nella rappresentazione della struttura chimica del copolimero ottenuto si nota che il PLA è legato sia all'ossidrile appartenente alla catena di PHEA che ai gruppi amminici liberi provenienti dai residui etilendiamminici.

Tuttavia, essendo il legame ammidico più stabile rispetto a quello estereo, possiamo supporre che, la reazione avviene in maggior misura a favore della formazione del prodotto termodinamico rispetto a quello cinetico e che quindi solo una piccola quantità di PLA sia legata agli ossidrili del PHEA.

Nel copolimero finale, la presenza sia di gruppi amminici che di gruppi ossidrilici liberi conferisce un'alta versatilità chimica al biomateriale.

Lo spettro $^1\text{H-NMR}$, riportato in figura 54, ha permesso di calcolare il grado di funzionalizzazione in PLA.

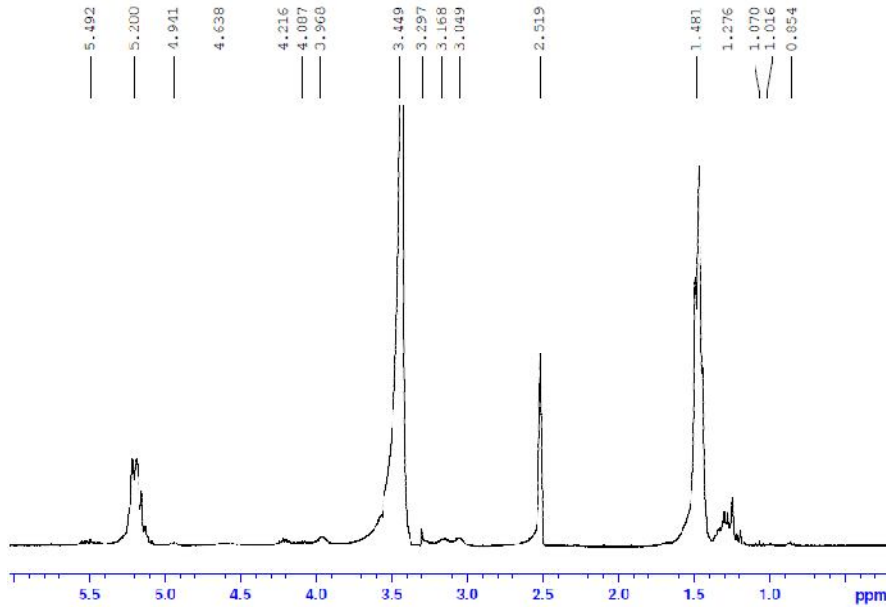


Figura 54: spettro ^1H - NMR del copolimero PHEA-EDAg-PLA

3.4.2. Elettrospinning e valutazione delle caratteristiche morfologiche dello scaffold

L'elettrospinning del PHEA-EDA-g-PLA è stato condotto da una soluzione al 90% p/v del copolimero in miscela DMF/DCM 50:50 v/v utilizzando gli stessi parametri di processo per l'elettrospinning del PHEA-g-PLA (paragrafo 3.3.3).

Lo scaffold ottenuto ha mostrato buone caratteristiche meccaniche in termini di resistenza alla trazione e al piegamento.

Le fibre costituenti lo scaffold, mostrate nella figura 55 hanno un diametro medio compreso tra 800nm e 1 μm .

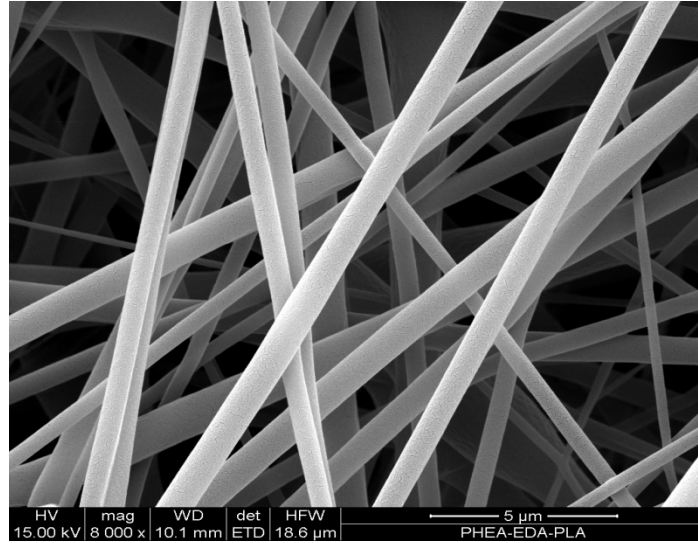


Figura 55: scaffold elettrospinnate di PHEA-EDA-g-PLA

Anche in questo caso, come per i derivati del PHEA-g-PLA, l'omogeneità delle fibre e la loro distribuzione disordinata conferiscono allo scaffold a base di PHEA-EDA-g-PLA caratteristiche morfologiche simili a quelle della ECM nativa.

3.4.3. Funzionalizzazione dello scaffold di PHEA-EDA-g-PLA elettrospinnato

La realizzazione di uno scaffold con caratteristiche morfologico-strutturali simili a quelle della ECM nativa non è di per se condizione fondamentale affinché il biomateriale sia riconosciuto dalle cellule come un substrato di crescita ottimale.

Per questa ragione la funzionalizzazione dello scaffold, con molecole segnale fisiologicamente presenti nei tessuti viventi, è di fondamentale importanza al fine di realizzare un sistema sintetico quanto più biologicamente simile ai tessuti nativi.

In questo lavoro lo scaffold elettrospinnato a base di PHEA-EDA-g-PLA è stato funzionalizzato con eparina a basso peso molecolare (2500 Da) , tramite una metodica chimica specifica e riproducibile, al fine di ottenere un biomateriale in grado di consentire la ritenzione dei fattori di crescita nelle lesioni ulcerative di tipo cronico ed aumentare la velocità dei processi di rigenerazione tissutale.

La reattività del gruppo carbossilico dell'eparina è stata incrementata tramite funzionalizzazione con N-idrossisuccinimide, successivamente la reazione di eparinizzazione delle fibre elettrospinnate è stata condotta in eterofase immergendo gli scaffold elettrospinnati nella soluzione del polisaccaride attivato.

La reazione è stata condotta in tampone MES, avente un pH 5.5, per 24 ore.

Gli scaffold sono stati lavati con soluzioni saline al fine di allontanare l'eparina non reagita che può rimanere nelle maglie dello scaffold interagendo elettrostaticamente tramite formazione di coppie ioniche.

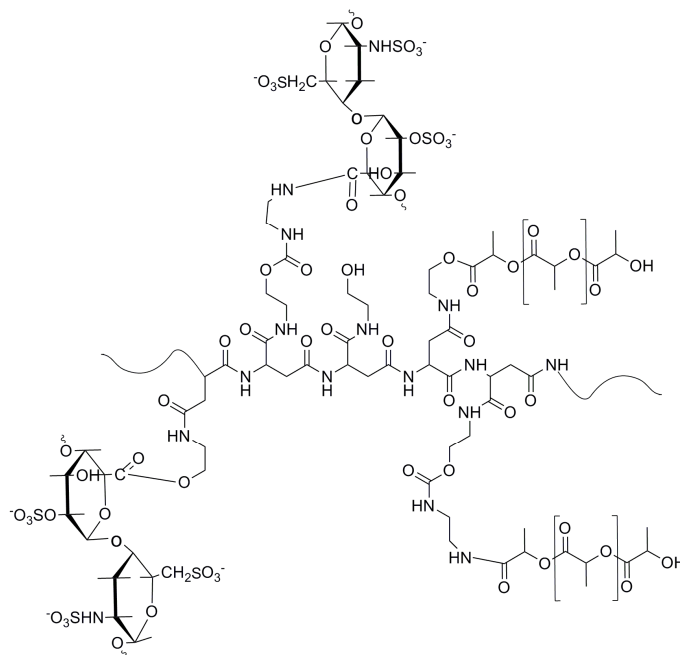


Figura 56: struttura chimica del PHEA-EDA-g-PLA funzionalizzato con eparina

Come descritto in precedenza per il legame del PLA-NHS, la funzionalizzazione può avvenire sia all'ossidrilico che al gruppo amminico libero del backbone polimerico di PHEA-EDA, anche in questo caso comunque, la formazione del legame ammidico dovrebbe essere favorita in quanto il prodotto finale è termodinamicamente più stabile.

3.4.4. Saggio colorimetrico con Toluidina blu

La toluidina blu è una molecola in grado di interagire elettrostaticamente con le molecole di eparina, grazie alla formazione di una coppia ionica tra i gruppi solforici presenti nel polisaccaride e la carica positiva delocalizzata nel colorante.

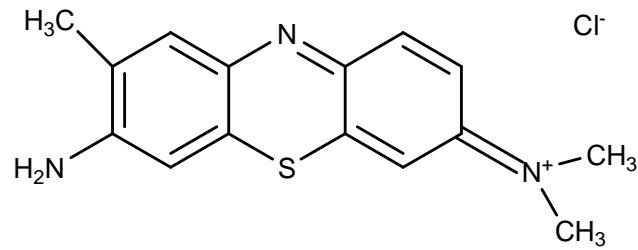


Figura 57: Struttura chimica della toluidina blu

Gli scaffold eparinizzati e non eparinizzati sono stati incubati a 37°C con una soluzione di questo reattivo per 4 ore, il reattivo in eccesso è stato allontanato tramite lavaggi esaustivi in acqua bidistillata.

Tutti gli scaffold trattati hanno assunto una colorazione blu intenso ma solo quelli trattati con eparina hanno mantenuto tale colorazione dopo il lavaggio.

La quantità di eparina legata agli scaffold è stata calcolata tramite analisi U.V. misurando l'assorbanza a 530 nm delle soluzioni ottenute dalla solubilizzazione degli scaffold con una miscela di Etanolo/NaOH 0,1 M (4:1 v/v) facendo riferimento ad una curva di taratura ottenuta mediante trattamento di eparina libera in soluzione con toluidina blu. È stato calcolato che il rapporto di funzionalizzazione è di 36µg di eparina per mg di scaffold.

Secondo le nostre conoscenze e riferendosi ai lavori riportati da precedenti gruppi di ricerca [137], tali quantità di eparina sono soddisfacenti e sufficienti a favorire in vivo l'attività chemotattica dell'eparina.

Capitolo 4

Conclusioni

Nel corso di questa trattazione sono stati discussi i principi sui quali si basa la disciplina della la medicina rigenerativa.

In particolare, la nostra attenzione è stata rivolta a quelle tecniche di laboratorio e cliniche che nel loro insieme costituiscono quella che probabilmente è la branca più grande della medicina rigenerativa e cioè l'ingegneria tissutale.

L'ingegneria tissutale rappresenta un importante e innovativo settore di sviluppo che ha come scopo la rigenerazione di tessuti ed organi danneggiati dell'organismo umano sfruttando come principio di base l'interazione tra vari tipi di cellule coltivate *in vitro* e supporti sintetici di varia natura definiti biomateriali.

È stato dimostrato che l'ingegneria tissutale è il punto di incontro tra varie discipline mediche, biologiche e tecnologico-farmaceutiche.

Infatti, partendo dallo studio anatomo-patologico dei tessuti danneggiati, si sfruttano conoscenze chimico-fisiche, biologiche e tecnologiche per confezionare *in vitro* un tessuto bioingegnerizzato capace di integrarsi con i tessuti nativi e favorire una progressiva rigenerazione delle aree danneggiate.

Il lavoro svolto durante il corso di dottorato è stato mirato alla preparazione e caratterizzazione di biomateriali polimerici per applicazioni in ingegneria tissutale.

In particolare, nella prima parte del lavoro è stata messa a punto la produzione di nuovi idrogeli polimerici compositi a base di acido ialuronico (HA) e di un polimero sintetico a struttura simil proteica, l' α,β -poli(N-2-idrossietil)(2-amminoetilcarbammato)-D,L-aspartammide (PHEA-EDA).

Gli idrogeli ottenuti sono stati caratterizzati in vitro da un punto di vista chimico-fisico e biologico in relazione ad un potenziale impiego nel campo della medicina rigenerativa come sistemi di rilascio cellulare per il trattamento delle lesioni corneali in sostituzione della membrana amniotica attualmente utilizzata in clinica.

La ratio del lavoro è basata sulla possibilità di sfruttare le proprietà del biomateriale composito per la momentanea adesione delle cellule corneali ed il loro successivo rilascio in sede oculare.

Il crosslinking chimico tra HA e PHEA-EDA ha permesso di ottenere film con buona capacità di interagire con il mezzo acquoso, alto valore di swelling e resistenza idrolitica a lungo termine.

Tali risultati, insieme alla citocompatibilità mostrata in vitro su fibroblasti del derma umano, hanno suggerito la possibilità di utilizzare i film a base di HA e PHEA-EDA nel campo dell'ingegneria tissutale.

Gli idrogeli di HA-PHEA-EDA con differenti rapporti molari tra HA e PHEA-EDA, sono stati utilizzati per studiare il comportamento adesivo di cellule corneali umane immortalizzate (HCEC) e di cellule primarie isolate dall'occhio di coniglio (RLEC e RLF).

Inoltre, è stata messa a punto una procedura per rivestire la superficie interna di lenti a contatto con gli idrogeli di HA-PHEA-EDA per la produzione di un dispositivo facilmente impiantabile sulla superficie oculare.

E' stato dimostrato che:

- le cellule immortalizzate non rappresentano un buon modello per lo studio di adesione cellulare in vitro a causa della loro scarsa selettiva nei confronti di differenti materiali,
- cellule epiteliali corneali necessitano, in vitro così come in vivo, della presenza di fibroblasti per la loro corretta adesione e proliferazione,
- l'idrogel di HA-PHEA-EDA con rapporto molare $X=1,0$ può essere sfruttato come sistema di rilascio cellulare in sede oculare grazie alla capacità di favorire l'adesione delle cellule per un periodo di tempo non superiore ai 3 giorni.

Durante la seconda parte del corso di dottorato è stato prodotto, tramite la tecnica dell'elettrospinning uno scaffold fibrillare a base di PLGA per la realizzazione di un tessuto bioingegnerizzato da applicare nel trattamento delle ferite cutanee a tutto spessore.

E' stata comparata la resistenza idrolitica di tre scaffold ottenuti a partire da copolimeri di PLGA con differenti rapporti molari tra PLA e PGA ed è stato dimostrato che la velocità di degradazione aumenta all'aumentare della quantità di PLA.

Sugli scaffold ottenuti dal PLGA 85:15 e dal PLGA 75:25 sono stati coltivati cheratinociti e fibroblasti isolati dall'epidermide e dal derma umano ed è stata dimostrata la citocompatibilità così come la capacità dei due scaffold di indurre le cellule a sintetizzare in vitro nuova matrice extracellulare.

Inoltre, tramite analisi SEM è stato dimostrato che nei tessuti bioingegnerizzati cheratinociti e fibroblasti sono in grado di

“comunicare” e disporsi tra le fibre dello scaffold in maniera da ricreare la topografia tipica dei tessuti viventi.

Sempre sfruttando le tecnica dell'elettrospinning, durante l'ultimo anno del corso sono stati prodotti due scaffold fibrillari a partire da due derivati anfifilici ottenuti dalla copolimerizzazione del PHEA o del PHEA-EDA con il PLA.

In questo caso la ratio del lavoro è stata quella di sfruttare le caratteristiche chimico-fisiche e la versatilità chimica dei due copolimeri di partenza per il rilascio controllato o l'immobilizzazione di molecole bioattive utili nel trattamento delle ferite croniche dell'apparato tegumentario.

Un primo scaffold è stato creato utilizzando come polimero di partenza il PHEA-g-PLA per il rilascio controllato farmaco anti infiammatorio ibuprofene.

Scaffold medicati sono stati ottenuti elettrospinnando il copolimero ed il farmaco in miscela fisica o a partire dall'elettrospinning di PHEA-g-PLA-(IBU) dove l'ibuprofene è stato chimicamente legato al copolimero di partenza, tramite una metodica chimica semplice e riproducibile.

Tutti gli scaffold ottenuti hanno mostrato buone capacità di incorporare acqua ed una resistenza alla degradazione appropriata al trattamento delle ferite croniche della cute.

Gli scaffold elettrospinnati sono stati utilizzati come supporto per la coltura di fibroblasti del derma umano e ne hanno supportato l'adesione e la crescita.

È stato dimostrato che, la cinetica di rilascio del farmaco dagli scaffold elettrospinnati è fortemente influenzata dalla presenza di un legame chimico tra il farmaco stesso ed il copolimero.

Infatti, elettrospinnando il PHEA-g-PLA contenente l'ibuprofene in forma libera, è stato ottenuto uno scaffold incapace di sostenere il rilascio di farmaco per più di 24 ore mentre, dall'elettrospinning del PHEA-g-PLA-(IBU) è stato ottenuto uno scaffold capace di dimezzare la velocità di rilascio dell'ibuprofene.

Inoltre, è stato dimostrato che variando la quantità relativa tra il farmaco libero e quello legato chimicamente è possibile ottenere scaffold ibridi con cinetiche di rilascio modulabili in funzione delle particolari condizioni patologiche dell'area da trattare.

Infine, dall'elettrospinning del copolimero PHEA-EDA-g-PLA è stato prodotto uno scaffold fibrillare ad alta versatilità chimica per l'immobilizzazione di molecole bioattive.

I gruppi amminici liberi presenti sulla superficie delle fibre elettrospinnate sono stati sfruttati per instaurare un legame ammidico con l'eparina tramite una reazione in eterofase.

l'eparinizzazione dello scaffold è stata dimostrata tramite saggio colorimetrico.

Ulteriori studi di caratterizzazione chimico-fisica e biologica sono in corso d'opera.

Capitolo 5

Parte sperimentale

5.1. Produzione di idrogeli-scaffold biocompatibili come sistemi di rilascio cellulare nella rigenerazione dell'epitelio corneale

5.1.1. Materiali

Tutti i reagenti impiegati erano di grado analitico se non diversamente specificato. Il collagene estratto dalla coda di ratto, l'etilendiammina (EDA), l'1-etil-3-[3-(dimetilammino)propil]carbodiimmide cloridrato (EDC), l'N-idrossi-sulfosuccinimide (NHSS) e sono stati acquistati alla Fluka (Milano, Italia). L'N,N-dimetilformammide (DMF), il bis(4-nitrofenil)carbonato (4-NFC), il tampone fosfato Dulbecco (DPBS), il Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), la soluzione di tripsina/EDTA, il trypan blue, la glutamina, l'amfotericina B, la soluzione di penicillina e streptomicina, il siero fetale bovino (FBS), il 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio bromuro (MTT) e la Dispase II sono stati acquistati da Sigma-Aldrich (Italia).

Il mezzo di coltura HAM F12, la tossina del colera, l'insulina, il fattore di crescita epidermico (EGF), l'idrocortisone, l'adenina e la transferrina sono state acquistate da Sigma UK.

Il mezzo di coltura Epilife ed il supplemento per la coltura delle cellule corneali sono stati acquistati da Cascade Biologics, UK.

Il DAPI è stato acquistato da Vector Laboratories Inc., USA. Il CellTracker™ Red e Green sono stati acquistati da Invitrogen Ltd, UK.

La soluzione di betadine è stata acquistata da Medlock Medical, Oldham, UK.

L'acido ialuronico (HA) sale sodico (Mw 1500 kDa) è stato gentilmente fornito dalla Novagenit Spa (Milano, Italia). L'HA "low molecular weight" ("HA_{LMW}") impiegato per il presente lavoro, è stato ottenuto per degradazione acida dell'HA ad alto peso molecolare ("HA_{HMW}", Mw 1500 kDa), come già riportato da Shu e collaboratori[138]. In breve, una soluzione all'1% p/v di HA è stata degradata in soluzione di HCl (pH 0,5) a 37°C per 24 ore. Successivamente, il pH è stato regolato a 7,0 e la soluzione ottenuta è stata sottoposta a dialisi esaustiva contro acqua bidistillata in Spectrapor Tubing con un cut-off molecolare di 3500 Da. Dopo dialisi, la soluzione è stata liofilizzata e il peso molecolare, determinato mediante analisi SEC (*Size exclusion chromatography*), è risultato pari a 222 kDa (Mw/Mn =1,85).

L' α,β -poli(N-2-idrossietil)-DL-aspartammide (PHEA) è stato preparato e purificato, secondo quanto riportato in letteratura [139].

Il peso molecolare medio del lotto di PHEA usato in questo studio, determinato mediante analisi SEC è risultato 41,0 kDa (Mw/Mn=1,8)[134].

5.1.2. Apparecchiature

Gli spettri ¹H-NMR (D₂O) sono stati ottenuti usando uno spettrometro Bruker AC-250 operante a 250,13 MHz.

La determinazione del peso molecolare dell'HA, del PHEA e del PHEA-EDA è stata effettuata mediante analisi SEC, con una pompa HPLC 515 (Waters), collegata ad un rifrattometro differenziale e ad un rivelatore di assorbanza. In particolare, per la valutazione del peso molecolare dell'HA, sono state impiegate colonne Ultrahydrogel 250 e 1000 (7,8 mm i.d. x 130 cm) (Milford, MA). Come eluente è stata usata una miscela 80:20 (v/v) di soluzione tampone fosfato 200mM (pH 6,5):MeOH, ad una velocità di flusso pari a 0,3 o 0,5 ml/min, impiegando come standard campioni di HA forniti da Pharmacia, (Uppsala, Sweden). Per la determinazione del peso molecolare del PHEA e del PHEA-EDA è stata utilizzata una colonna Ultrahydrogel 250, come eluente tampone fosfato a pH 8 a 37° C ad una velocità di flusso pari a 0,6 ml/min, usando standard di PEO/PEG.

Le centrifugazioni sono state effettuate tramite una centrifuga International Equipment Company Centra MP4R, dotata di un rotore 854 e di un sistema per il controllo della temperatura.

Gli spettri FT-IR sono stati registrati come compresse in KBr nel range 4000-400 cm^{-1} , usando uno Spettrofotometro Perkin-Elmer 1720 a trasformata di Fourier, con una risoluzione di 1 cm^{-1} , ogni spettro è stato registrato dopo 100 scansioni.

Le cellule sui campioni sono state visualizzate tramite un microscopio confocale LSM 510, Zeiss.

5.1.3. Colture cellulari

Fibroblasti sono stati ottenuti da campioni biotici provenienti da pazienti sottoposti ad abdominoplastica o riduzione del seno.

Tali campioni di pelle sono stati immersi in tripsina soluzione (0,5 g di tripsina in polvere, 0,5 g D-glucosio 0,5 ml di rosso fenolo in 500 ml di PBS) per 18h a 4°C.

I fibroblasti sono stati ottenuti dai pezzi di derma privati dall'epidermide e posti in soluzione di collagenasi A per 18 ore a 22°C.

Il mezzo utilizzato per la coltura dei fibroblasti è stato il Dulbecco Modified Eagles Medium (DMEM) addizionato di FBS al 10% (v/v), 2×10^{-3} mol/l glutamina, 0,625 mg/ml anfotericina B, 100 IU/ml penicillina e 100 µg/ml streptomicina. Le cellule sono state utilizzate per gli esperimenti tra il passaggio 4 e 8.

Le cellule epiteliali corneali umane immortalizzate HCEC sono state acquistate da LGC Promochem, UK. Le cellule sono state coltivate su piastre di coltura con il fondo precedentemente trattato con una soluzione di albumina da siero bovino (0,01 mg/ml), fibronectina (0,01 mg/ml) e collagene di tipo I (0,03 mg/ml).

Il mezzo di coltura utilizzato è stato l'Epilife contenente un supplemento per la crescita delle cellule corneali.

Cellule comprese tra il passaggio 45 e 47 sono state utilizzate per tutti gli esperimenti.

Le RLEC e le RLF corneali sono state isolate dall'occhio di coniglio fornito da Woldsway Foods Ltd UK.

I bulbi oculari sono stati disinfettati con una soluzione di Betadine al 3% p/v quindi è stata isolata la zona limbale che è stata immersa in una soluzione 2 mg/ml di Dispase II ed incubata per 2 ore a 37 °C.

Le cellule epiteliali RLEC sono state escisse dal limbo tramite un bisturi, la sospensione cellulare ottenuta è stata posta in coltura in mezzo cellulare Green contenete: mezzo di coltura cellulare DMEM e

mezzo di coltura Ham F12 (in rapporto 3:1), FBS 10% (v/v), tossina del colera 0,1 μ M, EGF 10ng/ml, idrocortisone 0,4 μ g/ml, adenina 0,18 mM, insulina 5 μ g/ml, transferrina 5 μ g/ml, glutamina 2mM, triiodotironina 0,2 μ M, anfotericina B 0,625 μ g/ml, penicillina 100IU/ml e streptomicina 100 μ g/ml.

RLEC tra il secondo ed il quinto passaggio sono state utilizzate per tutti gli esperimenti.

I tessuti limbal residui sono stati posti in fiasche T-25 ed incubati con mezzo di coltura DMEM per favorire l'espianto spontaneo dei fibroblasti RLF. Queste cellule sono state utilizzate tra il primo e l'ottavo passaggio in coltura per tutti gli esperimenti

5.1.4. Derivatizzazione dell' α,β -poli(N-2-idrossietil)-DL-aspartammide (PHEA) con etilendiammina

La reazione di derivatizzazione del PHEA con etilendiammina (EDA) è stata condotta in fase organica (DMF), usando 4-NFC come attivante, come descritto in un precedente lavoro [135]. In breve, una soluzione di PHEA (0,25 g, 1,57 mmol di unità ripetitive) in 3 ml di DMF è stata aggiunta goccia a goccia ad una soluzione di 4-NFC in DMF, in modo da avere $R_1=1$, essendo R_1 = moli di 4-NFC/moli di unità ripetitive di PHEA. La reazione è stata condotta a 40°C sotto costante agitazione per 4 ore. Successivamente, la miscela di reazione è stata aggiunta lentamente all'EDA, in modo da avere $R_2=5$, essendo R_2 =moli di EDA/moli di unità ripetitive di PHEA, e la reazione è stata condotta a 20°C sotto costante agitazione per 4 ore. Successivamente, la miscela di reazione è stata precipitata in acetone e, dopo centrifugazione per 10 minuti a 9800 rpm e 4°C, il prodotto è stato

recuperato e lavato diverse volte con acetone. Il solido ottenuto è stato dissolto in acqua bidistillata e sottoposto a dialisi esaustiva, mediante Visking Dialysis Tubing con un cut-off molecolare di 12000-14000 Da. Dopo dialisi, la soluzione è stata liofilizzata.

Il derivato α,β -poli(N-2-idrossietil)(2-amminoetilcarbammato)-D,L-aspartammide (PHEA-EDA), è stato ottenuto con una resa del 90-93% (p/p), sulla base del PHEA di partenza. Il prodotto è stato caratterizzato mediante analisi spettroscopica e i dati ottenuti si sono mostrati in accordo con precedenti risultati [135]. Il grado di derivatizzazione del PHEA-EDA, determinato mediante analisi $^1\text{H-NMR}$, è risultato pari al 55 ± 3 mol%. Il peso molecolare del PHEA-EDA, determinato mediante analisi SEC è risultato 35 kDa ($M_w/M_n=1,68$).

5.1.5. Preparazione di idrogeli compositi a base di acido ialuronico (HA) e α,β -poli(N-2-idrossietil)(2-amminoetilcarbammato)-D,L-aspartammide (PHEA-EDA)

Gli idrogeli di HA-PHEA-EDA sono stati preparati mediante il metodo del *casting*. In particolare, sono state preparate due soluzioni madre di HA (3,75% p/v) e di PHEA-EDA (6,1% p/v), mediante dissoluzione di ciascun polimero in soluzione acquosa di NaCl 1% p/v e il pH delle soluzioni ottenute è stato regolato a 7,4. Successivamente, 5,2 ml della soluzione madre di HA sono stati miscelati alla soluzione madre di PHEA-EDA, in rapporti volumetrici tali da ottenere una concentrazione finale di HA in ciascuna soluzione *gel forming* pari al 3% p/v e tre differenti valori di X (X = 0,5; X = 1,0; e X = 1,5), essendo X = moli di gruppi ammidici presenti nel PHEA-

EDA/moli di unità ripetitive dell'HA. Dopo agitazione tramite vortex delle soluzioni polimeriche, a queste sono state aggiunte aliquote opportune di una soluzione acquosa di l'1-etil-3-[3-(dimetilammino)propil]carbodiimmide cloridrato (EDC) e, dopo alcuni minuti, sono state aggiunte aliquote di una soluzione acquosa di N-idrossisulfosuccinimmide (NHSS), in modo da ottenere un rapporto molare unitario (Y) tra l'EDC (o l'NHSS) e i gruppi amminici del PHEA-EDA. Dopo vigorosa agitazione, le soluzioni *gel forming* sono state versate all'interno di piastre di Petri (5,1 cm di diametro) e poste a 37°C per 5 giorni, al fine di permettere la completa evaporazione del solvente. Dopo tale tempo, sono stati ottenuti tre idrogeli HA-PHEA-EDA a differente percentuale di PHEA-EDA; successivamente gli idrogeli prodotti sono stati purificati mediante lavaggi in acqua bi distillata (5 x 50 ml). Dopo essiccamento a temperatura ambiente, gli idrogeli HA-PHEA-EDA sono stati pesati per determinarne la resa e caratterizzati.

5.1.6. Preparazione degli idrogeli di collagene

Il collagene è stato dissolto in una soluzione di acido acetico 0,1M con una concentrazione finale di 5mg/ml.

La soluzione ottenuta è stata posta sotto agitazione per 24 ore e conservata a 4°C fino all'utilizzo.

Per preparare gli idrogeli di collagene, la soluzione madre è stata diluita con DMEM fino ad una concentrazione finale di 2,7 mg/ml, il pH della soluzione ottenuta è stato portato a 7 e sono stati aggiunti 0,9 ml di FBS.

300 μ l della soluzione sono stati posti in ogni pozzetto di una piastra a 24 pozzetti quindi posti in incubatore a 37°C per 20 minuti al fine di consentire la gelificazione del collagene.

5.1.7. Analisi FT-IR degli idrogeli di HA-PHEA-EDA

Lo spettro *FT-IR* (KBr) degli idrogeli HA-PHEA-EDA mostra le seguenti bande: un'ampia banda centrata a 3300 cm^{-1} (*stretching* dei gruppi OH e NH dell'HA e del PHEA-EDA, e *stretching* dei gruppi NH_2 del PHEA-EDA); bande a 1700 cm^{-1} (*stretching* dei gruppi CO uretanici del PE); 1654 cm^{-1} (*stretching* dei gruppi $\text{HNC}=\text{O}$ dell'HA e dell'ammide I del PHEA-EDA); 1542 cm^{-1} (*stretching* dei gruppi $\text{C}=\text{O}$ dell'amide II del PHEA-EDA); 1559 cm^{-1} e 1376 cm^{-1} (*stretching* dei gruppi COO dell'HA).

5.1.8. Studi di swelling degli idrogeli di HA-PHEA-EDA

Campioni circolari di 6mm di diametro degli idrogeli HA-PHEA-EDA sono stati immersi in 4 ml di DPBS a pH 7,4 e incubati in agitatore orbitale (150 rpm) a 37°C per 48 ore. Dopo tale tempo, i campioni sono stati pesati, immediatamente dopo aver rimosso l'acqua superficiale mediante l'impiego di carta da filtro. Quindi gli idrogeli sono stati lavati con acqua bidistillata (5 x 4 ml), liofilizzati e pesati. Il comportamento di swelling è stato espresso come rapporto di swelling (q), che è il rapporto tra il peso del campione rigonfio (W_s) e il peso del campione secco (W_d).

$$q = W_s / W_d$$

Ciascun esperimento è stato condotto in triplicato.

5.1.9. Studi di idrolisi chimica degli idrogeli di HA-PHEA-EDA

Campioni circolari di 6 mm di diametro dei film HA-PHEA-EDA sono stati immersi in 5 ml di DPBS a pH 7,4, all'interno di provette Falcon sterili, e sono stati incubati in agitatore orbitale (150 rpm) a 37°C per 30 giorni. La degradazione idrolitica dei film è stata misurata a tempi prestabiliti, mediante il saggio colorimetrico al carbazolo [140] che permette di determinare la concentrazione di unità di acido glucuronico, liberatesi a seguito dell'idrolisi dell'HA. Ciascun esperimento è stato condotto in triplicato.

5.1.10. Studi di citocompatibilità degli idrogeli di HA-PHEA-EDA

La citocompatibilità dei film HA-PHEA-EDA è stata studiata in vitro usando fibroblasti *human derm*. Prima di eseguire gli esperimenti, i film sono stati sterilizzati mediante trattamento con etanolo (96% v/v) per 30 minuti ed essiccati a temperatura ambiente sotto lampada germicida UV; successivamente, i film sono stati lavati con DPBS e seccati a temperatura ambiente sotto lampada germicida UV per 4 giorni.

Sono stati studiati tre idrogeli HA-PHEA-EDA aventi differente rapporto molare tra le unità ripetitive di PEA-EDA e le unità ripetitive di HA (X=0,5; X=1,0; X=1,5).

Gli idrogeli sono stati fatti rigonfiare in DMEM per 2 ore quindi sono stati posti all'interno di inserti di coltura di tipo ThinCert™ PET (Greiner UK). Questi inserti hanno un fondo costituito da un filtro avente pori dal diametro di 8µm e possono essere inseriti all'interno

dei pozzetti delle piastre di coltura a 24 pozzetti in maniera tale da essere a contatto con il mezzo all'interno del pozzetto.

I fibroblasti sono stati posti in numero di 5×10^4 cellule per campione all'interno dell'inserto, per le prove a contatto diretto con gli idrogeli di HA-PHEA-EDA, o sulla superficie del pozzetto, per la misura della vitalità a contatto indiretto.

Fibroblasti coltivati sui pozzetti della piastra (T.C.P) in assenza di inserti sono stati utilizzati come controllo positivo.

I fibroblasti sono stati coltivati in queste condizioni per 7 giorni ed il mezzo di coltura è stato cambiato ogni 2 giorni.

Al settimo giorno il mezzo di coltura è stato allontanato, i campioni lavati per tre volte con DPBS quindi la vitalità cellulare è stata valutata tramite saggio MTT.

In particolare, a ciascun pozzetto sono stati aggiunti 500 μ l di soluzione di MTT (0,5% p/v) e le piastre sono state incubate per 45 minuti. Dopo tale tempo, i cristalli colorati di formazano prodotti dalle cellule vitali, sono stati solubilizzati usando una miscela isopropanolica (4,5 ml isopropanolo, 0,15 ml HCl 37% p/v; 500 μ l/pozzetto). A questo punto, per determinare la vitalità cellulare, è stata misurata l'assorbanza a 540nm di ciascuna soluzione. Poiché l'assorbanza a questa lunghezza d'onda è infatti proporzionale al numero di cellule vive nel di mezzo di coltura.

Per l'analisi morfologica delle cellule coltivate a contatto diretto con gli idrogeli di HA-PHEA-EDA, i fibroblasti, prima di essere messi in coltura sui campioni, sono stati incubati a 37°C per 45 minuti con una soluzione 25 μ M di Cell tracker red in DMEM quindi recuperati per centrifugazione, risospesi, contati e posti sui campioni in coltura.

Al settimo giorno di coltura gli idrogeli sono stati fissati con una soluzione 3,7% v/v di formaldeide per 30 minuti a temperatura ambiente, lavati più volte con DPBS ed analizzati al microscopio confocale. Tutti gli esperimenti sono stati condotti in triplicato.

5.1.11. Studi di adesione cellulare sugli idrogeli di HA-PHEA-EDA

Le cellule HCEC, trattate con Cell Tracker Red, sono state poste sugli idrogeli di HA-PHEA-EDA o sui geli di collagene in numero di 3×10^5 cellule per campione ed incubate in mezzo di coltura Epilife per 24 ore.

Dopo questo tempo i campioni sono stati posti in condizioni di coltura all'interfaccia liquido/aria tramite delle griglie metalliche che, inserite nei pozzetti di coltura, consentono al campione di ricevere il mezzo cellulare dal fondo del pozzetto rimanendo a contatto con l'aria in superficie.

Queste condizioni di coltura servono per ricreare in vitro le condizioni di crescita fisiologica delle cellule epiteliali.

I campioni sono stati coltivati per 14 giorni ed il mezzo è stato cambiato ogni due giorni.

Ai giorni di analisi gli idrogeli sono stati fissati con una soluzione 3,7% v/v di formaldeide per 30 minuti a temperatura ambiente, lavati più volte con DPBS ed analizzati al microscopio confocale.

Per gli studi di adesione con le cellule primarie di coniglio, le RLEC e le RLF sono state poste in mono o co-coltura sugli idrogeli di

HA-PHEA-EDA o sugli idrogeli di collagene in numero pari a 3×10^5 cellule per campione.

Il rapporto tra i due tipi cellulari nelle co-culture è stato fissato ad 1:1.

I campioni contenenti le RLEC sono stati coltivati in condizioni di interfaccia liquido/aria con mezzo di coltura cellulare Green, mentre quelli contenenti le monoculture di RLF, sono stati coltivati in immersione in mezzo DMEM.

I campioni sono stati coltivati fino al giorno 14 ed il mezzo di coltura è stato cambiato ogni 2 giorni.

Le RLEC e le RLF in monocultura sono state trattate con Cell Tracker Red prima di essere depositate sugli idrogeli.

Ai giorni di analisi i campioni sono stati fissati con formaldeide al 3,7% v/v per 30 minuti a temperatura ambiente, lavati più volte con DPBS ed analizzati al microscopio confocale.

Per i campioni contenenti le co-culture cellulari, solo le RLEC sono state pretrattate con Cell Tracker Red mentre, ai giorni di analisi, dopo il trattamento con la soluzione fissante di formaldeide, i campioni sono stati trattati con una soluzione di DAPI, per colorare il nucleo di tutte le cellule, lavati più volte con DPBS e analizzati al microscopio confocale. Tutti gli esperimenti sono stati condotti in triplicato.

5.1.12. Realizzazione di lenti a contatto rivestite dal film HA-PHEA-EDA

La superficie interna delle lenti a contatto Bausch and Lomb SofLens®59 (Hilafilcon B) è stata rivestita con l'idrogel di HA-PHEA-EDA avente rapporto molare $X=1,0$.

La soluzione gelificante contenente i due polimeri e dei relativi agenti attivanti è stata posta all'interno delle lenti a contatto in maniera tale

da favorire la formazione di un film sottile di idrogel nella zona concava della lente supposta per il contatto con la superficie corneale. Dopo la reticolazione di HA-PHEA-EDA, le lenti rivestite sono state lavate più volte con DPBS sterile per favorire l'allontanamento dei reattivi no reagiti.

Sulle lenti a contatto rivestite sono state poste RLEC e RLF in mono o co coltura in numero pari a 3×10^5 .

Il rapporto tra i due tipi cellulari nelle co-colture è stato fissato ad 1:1. I campioni contenenti RLEC sono stati coltivati con mezzo Green mentre quelli contenenti le sole RLF sono state coltivate con DMEM.

Le RLEC e le RLF sono state, prima della deposizione sulle lenti a contatto, trattate rispettivamente con Cell Tracker Red e Cell Tracker Green.

Ai giorni di analisi i campioni sono stati fissati con formaldeide al 3,7% v/v per 30 minuti a temperatura ambiente, lavati più volte con DPBS ed analizzati al microscopio confocale.

Lenti a contatto non rivestite sono state usate come controllo negativo.

Tutti gli esperimenti sono stati condotti in triplicato.

5.2. Produzione di scaffold fibrillari a base di PLGA per il trattamento delle ferite a tutto spessore nell'apparato tegumentario

5.2.1. Materiali

Tutti i copolimeri di PLGA utilizzati sono stati ottenuti da Sigma-Aldrich (UK).

Sono stati utilizzati tre diversi copolimeri con differenti rapporti molari tra residui di acido lattico e di acido glicolico: PLGA 85:15 (PM 50-75 KDa), PLGA 75:25 (PM 66-107 KDa) e PLGA 50:50 (PM 40-75 KDa).

La glutaraldeide, il DCM, il tampone fosfato PBS, il tetrossido di osmio, MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenitetrazolio bromuro), il Sirius Red F3B e l'acido picrico sono stati acquistati da Sigma UK.

5.2.2. Apparecchiature

Per il processo di elettrospinning è stata utilizzata una pompa per il flusso programmato Aladdin 1000, un generatore ad alto voltaggio Brandenburg, Alpha series III.

L'analisi SEM dei campioni elettrospinnati è stata effettuata tramite un microscopio a scansione elettronica Philips/FEI XL-20 SEM con un voltaggio accelerato di 10-15 kV.

La misurazione dell'assorbanza delle soluzioni è stata fatta tramite uno spettrofotometro UV Shimadzu RF-5301 PC.

5.2.3. Isolamento e coltura di fibroblasti e cheratinociti

Fibroblasti e cheratinociti sono stati ottenuti da campioni biotipici provenienti da pazienti sottoposti ad abdominoplasia o riduzione del seno.

Tali campioni di pelle sono stati immersi in tripsina soluzione (0,5 g di tripsina in polvere, 0,5 g D-glucosio 0,5 ml di rosso fenolo in 500 ml di PBS) per 18h a 4 °C.

L'epidermide è stata quindi separata dal derma ridotta in piccoli pezzetti tramite l'utilizzo di un bisturi.

I cheratinociti ottenuti da tali pezzetti sono stati coltivati in fiasche t-75 con mezzo di coltura Green (vedi paragrafo 5.1.3).

In tutti gli esperimenti sono stati usati cheratinociti tra il primo e il quarto passaggio di coltura cellulare.

(ogni passaggio viene fatto quando le cellule raggiungono una confluenza nelle fiasche t-75 pari all'80%).

I fibroblasti sono stati ottenuti e coltivati come descritto precedentemente nel paragrafo 5.1.3.

5.2.3. Elettrospinning e valutazione delle caratteristiche morfologiche degli scaffolds

La soluzione di polimero è stata caricata dentro una siringa da 1 ml avente un ago di diametro interno di 0,8 mm (I&J Fisnar Inc.).

Un flusso costante di 3,5 ml/min è stato ottenuto tramite una pompa programmabile alla quale è stata collegata la siringa stessa.

E' stata applicata una differenza di potenziale pari a 15 kV tramite un generatore ad alto voltaggio.

L' elettrospinnig è stato condotto orizzontalmente e scaffold fibrosi con uno spessore di 0,1-0,2mm sono stati raccolti tramite dei fogli di alluminio (18 per 16 cm) applicati a un collettore rotante (300 rpm) posizionato ad una distanza di 30 cm dalla punta dell'ago.

Prima dell'analisi SEM dei tessuti bioingegnerizzati, i campioni sono stati fissati in soluzione di glutaraldeide al 2,5% v/v in tampone fosfato 0,1M per 3 ore a 4°C. Un fissaggio secondario è stato condotto quindi in soluzione acquosa di tetrossido di osmio al 2% v/v per 1 ora.

In seguito i campioni sono stati deidratati tramite immersione in soluzioni a concentrazione crescente di etanolo, liofilizzati e sputterati con 25nm circa di oro prima della microscopia SEM.

I campioni elettrospinnati non contenenti cellule sono stati sputterati con oro e direttamente analizzati al SEM.

5.2.4. Studi di degradazione degradazione idrolitica degli scaffold elettrospinnati

Per gli studi di degradazione gli scaffolds sono stati tagliati in maniera tale da ottenere dei dischetti dal diametro di 18mm.

Tali dischetti sono stati sterilizzati tramite immersione in una miscela al 70% v/v di etanolo in acqua per 10 minuti.

L'etanolo è stato in seguito allontanato tramite tre lavaggi consecutivi in PBS.

I dischetti sono stati quindi incubati in PBS a 37°C in atmosfera di CO₂ al 5%.

Il PBS è stato cambiato ogni 4 giorni per un totale di 108 giorni per gli scaffold formati da PLGA 85:15 e 75:25, e 24 giorni per PLGA 50:50.

Gli scaffold sono stati analizzati al microscopio ottico e al microscopio a scansione elettronica per la valutazione dei cambiamenti fisici in seguito alla degradazione chimica.

5.2.5. Produzione del tessuto tegumentario bioingegnerizzato

Per la preparazione della pelle bioingegnerizzata sono stati utilizzati gli scaffold elettrospinnati di PLGA 85:15 e 75:25. Lo scaffold PLGA 50:50 non è stato utilizzato a causa della sua eccessiva velocità di degradazione.

Gli scaffold sono stati tagliati in modo tale da ottenere dei dischi con un diametro di 2cm.

Tali dischi sono stati immersi per 10 min in etanolo al 70% al fine di essere sterilizzati, quindi lavati per tre volte in PBS e per due volte in medium di coltura cellulare Green.

Gli scaffold sono stati quindi posti in piastre a sei pozzetti e sopra ognuno di essi è stato posto un anello di acciaio con un diametro interno di 1cm.

All'interno di ogni anello sono stati posti 300 μ l di una sospensione cellulare contenente 3×10^5 cellule.

Le cellule sono state poste sia in monocultura (solo fibroblasti o solo cheratinociti) che in co-cultura.

In quest'ultimo caso i due differenti tipi di cellule sono stati posti in rapporto di 1:1 con un numero totale di cellule per scaffold pari a 3×10^5 .

I costrutti così ottenuti, sono stati sommersi con medium di coltura Green's e incubati per 18 ore.

Dopo questo tempo, per ricreare in vitro le condizioni fisiologiche di crescita dei cheratinociti, i costrutti contenenti questo tipo di cellule in mono o co-coltura sono stati posti su delle griglie d'acciaio e coltivati in condizioni di interfaccia liquido/aria per 7 e 14 giorni.

I costrutti contenenti solo fibroblasti sono stati invece coltivati immersi in DMEM per 7-14 giorni.

In tutti i casi il mezzo cellulare è stato cambiato ogni 2 giorni.

La vitalità delle cellule nei costrutti bioingegnerizzati è stata valutata dopo 7 e 14 giorni di coltura, nelle condizioni precedentemente descritte, tramite saggio MTT.

I campioni contenenti le cellule sono stati lavati tre volte in PBS, immersi in una soluzione 0,5 mg/ml di MTT (1 ml per campione) e incubati a 37°C in atmosfera al 5% di CO₂ per 40 minuti.

Dopo 40 min la soluzione viene allontanata dai campioni e i cristalli di formazano vengono ridisciolti in isopropanolo acidificato (4,5 ml isopropanolo, 0,15 ml HCl 37 %; 500 µl/pozzetto).

L'assorbanza delle soluzioni ottenute è stata calcolata a 540nm tramite uno spettrofotometro.

Tutti gli esperimenti sono stati condotti in triplicato.

5.2.6. Produzione di nuova ECM sui tessuti bioingegnerizzati

I tessuti bioingegnerizzati, coltivati per 7 o 14 giorni, sono stati lavati per tre volte in PBS e quindi fissati con una soluzione al 10% p/v di formaldeide in PBS (15 minuti a temperatura atmosferica).

Ogni campione è stato quindi immerso, per 18 ore a temperatura ambiente, in una soluzione di Sirius Red F3B in acido picrico (0,1% p/v).

Dopo 18 ore i campioni sono stati lavati con acqua per allontanare l'eccesso di soluzione colorante.

Per l'analisi quantitativa, ogni scaffold è stato trattato con 500µl di una soluzione 1:1 di NaOH 0,2M e metanolo per dissolvere i prodotti colorati.

L'assorbanza delle soluzioni è stata misurata a 490nm tramite uno spettrofotometro.

5.3. Produzione di scaffold fibrillari a base di PHEA-PLA per il trattamento delle ferite croniche dell'apparato tegumentario

5.3.1. Materiali

Il dimetil solfossido (DMSO), l' N-idrossisuccinimide sale sodico (NHS), l' N, N-dimetilformammide (DMF), l' acetonitrile (CH₃CN), il diclorometano (DCM), il cloroformio (CH₃Cl), l' acetone (CH₃COCH₃), l' 1-etil-3-[3-(dimetilammino)propil]carbodiimmide cloridrato (EDC), la dimetilamminopiridina (DMAP), l' ibuprofene, la diciolesil carbodiimmide (DCC), il Dulbecco fosfato (DPBS), la tripsina soluzione, il siero bovino fetale (FBC), la glutamina, la penicillina-streptomicina soluzione, l' anfotericina B e la toliuidina blu sono stati acquistati presso Sigma–Aldrich (Italia). La dietilammina (DEA) è stata acquistata da Fluka (Italia).

Il RESOMER R 202 (D,L acido polilattico PLA 8000 Da) è stato acquistato da Bidachem-Boeringher Ingelheim (Italia).

5.3.2. Apparecchiature

Il processo di elettrospinning è stato condotto tramite una pompa per il flusso programmato Aitecs PLUS SEP-21S ed un generatore ad alto voltaggio Spellman CZE 1000 R.

È stato utilizzato un collettore rotante di manifattura propria.

Gli spettri ¹H-NMR (DMSO-d₆D) sono stati ottenuti con uno strumento Bruker AC 250,13 MHz.

La morfologia delle fibre elettrospinnate è stata investigata tramite un microscopio a scansione elettronica (ESEM QUANTA FEI 200F) con un voltaggio accelerato di 15 kV.

La misurazione dell'assorbanza delle soluzioni è stata fatta tramite uno spettrofotometro UV Shimadzu RF-5301 PC.

Per gli studi di degradazione, swelling e rilascio è stato utilizzato un incubatore rotante Benchtop 808C Orbital Shaker modello 420.

La valutazione della quantità di farmaco rilasciata dagli scaffolds elettrospinnati è stata effettuata tramite HPLC Varian 9012 equipaggiato con un iniettore Rheodyne 7125 (con un loop di 10 μ l), un rilevatore UV Kontron 432 ed un integratore Hewlett Packard 3394. In particolare è stata utilizzata una colonna a fase inversa C18 (Luna 5 μ m, 520 mm \times 4,6 mm i.d., Phenomenex), eluendo con una fase mobile costituita da acetonitrile e soluzione acquosa di acido orto fosforico 0,003% p/v, 45/55, flusso 1 ml/min.

5.3.3. Sintesi del copolimero graft PHEA-g-PLA

Al fine di attivare il gruppo carbossilico del PLA è stato preparato il derivato N-idrossisuccinimmidico (PLA-NHS) secondo una metodica precedentemente riportata da Palumbo et al. [55]

Per la reazione tra PHEA e PLA-NHS è stata preparata una soluzione contenente 600mg di PHEA in 12 ml di DMSO anidro in presenza di DEA come catalizzatore (576 μ l).

A tale soluzione è stata aggiunta goccia a goccia una soluzione di PLA-NHS in 12 ml di DMSO in modo tale da avere un rapporto X pari a 0,1, essendo X= moli di PLA-NHS/moli di unità ripetitive del PHEA.

La reazione è stata condotta in atmosfera di argon, a 40°C, per 24 ore. La soluzione di reazione è stata quindi dializzata usando una membrana Visking con un cut-off di 12000-14000 Da per tre giorni

contro DMSO e quindi contro acqua per rimuovere le tracce di solvente organico. Si è ottenuta una sospensione del copolimero in acqua che è stata essiccata tramite freeze-drying.

Lo spettro $^1\text{H-NMR}$ del PHEA-PLA (in DMSO- d_6 D) ha mostrato: δ 1,25 e δ 1,45 (2d, $-\text{O-CO-CH}(\text{CH}_3)\text{-O-}$ del PLA), δ 3,1 (m, 2H $-\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$ del PHEA), δ 4,6 (m, 1H, $\text{NH-CH}(\text{CO})\text{CH}_2\text{-}$ del PHEA), δ 4,1 e δ 5,1 (m, 1H, $-\text{O-CO-CH}(\text{CH}_3)\text{-OH}$ e m, 1H, $-\text{O-CO-CH}(\text{CH}_3)\text{-O-}$ del PLA) .

Il grado di derivatizzazione è espresso come percentuale di PLA (DD1%):

$$\text{DD1\%} = \text{Moli di PLA} / \text{moli delle unità ripetitive del PHEA} \times 100$$

Tale rapporto è stato calcolato comparando l' integrale dei due picchi relativi ai due protoni dei gruppi metilici del PLA a δ 1,25 e δ 1,45, con l'integrale relativo ai protoni del gruppo etanolaminico del PHEA a δ 3,1.

5.3.4 Sintesi del copolimero PHEA-g-PLA-(IBU)

Per formare il legame chimico tra Ibuprofene e PHEA-g-PLA è stata preparata una soluzione contenente 117,15 mg del farmaco in 1,5 ml di DCM in presenza di 7 mg di DMAP.

Tale soluzione posta a -14°C sotto agitazione è stata addizionata di 117,15 mg di DCC e lasciata a reagire per 30 minuti.

Dopo questo tempo è stata aggiunta goccia a goccia una soluzione formata da PHEA-g-PLA in DCM (500 mg in 4,5 ml).

La soluzione di reazione è stata fatta reagire altri 30 minuti a -14 °C, quindi 3 ore a temperatura ambiente.

Alla fine della reazione, la soluzione è stata filtrata e il solvente di reazione evaporato sotto vuoto. Il film polimerico rimasto nelle pareti del pallone di reazione è stato ripreso con etanolo e lavato più volte nello stesso solvente.

Il solido ottenuto è stato essiccato sotto vuoto, solubilizzato in DMSO e posto in dialisi (3500 Da) contro acqua per eliminare il solvente organico. Il prodotto è stato ottenuto per freeze drying della sospensione di dialisi.

Lo spettro ¹H-NMR ha mostrato, oltre ai tipici picchi del copolimero PHEA-g-PLA-(IBU), i picchi a δ 7,4 dei **CH** aromatici della molecola di Ibuprofene.

Il grado di derivatizzazione è stato calcolato come percentuale di IBU (DD%):

$$DD\% = (\text{moli di IBU} / \text{moli delle unità ripetitive del PHEA}) \times 100$$

Tale rapporto è stato calcolato comparando l'integrale relativo dei due picchi relativi ai protoni aromatici dell'ibuprofene a δ 7,4 con l'integrale relativo ai protoni del gruppo etanolamminico del PHEA a δ 3,1.

La quantizzazione dell'ibuprofene legato al PHEA-g-PLA è stata fatta anche tramite analisi UV calcolando l'assorbanza a 264nm delle soluzioni derivate dalla solubilizzazione dello scaffold elettrospinnato PHEA-g-PLA-(IBU) in etanolo.

La curva di taratura è stata ottenuta solubilizzando l'ibuprofene in etanolo a varie concentrazioni e calcolando volta per volta l'assorbanza a 264nm.

5.3.5. Elettrospinning e valutazione delle caratteristiche fisiche degli scaffold

Per la preparazione delle soluzioni di elettrospinning, PHEA-g-PLA o PHEA-g-PLA-(IBU) sono stati solubilizzati in una miscela DMF/Acetone 65:35 v/v con una concentrazione finale pari al 95% p/v.

La miscela fisica tra PHEA-g-PLA e Ibuprofene (PHEA-g-PLA/IBU 5%), contenente il farmaco al 5% p/p rispetto al peso iniziale di PHEA-g-PLA, e la miscela fisica tra PHEA-g-PLA-(IBU) e PHEA-g-PLA/IBU 5%, sono state solubilizzate in DMF/Acetone 50:50 v/v con una concentrazione finale di 80% p/v.

In tutti i casi le soluzioni polimeriche sono state caricate dentro una siringa di plastica da 5 ml, avente un ago di diametro interno di 0,8 mm (Sigma-Aldrich Italy), collegata ad una pompa programmata per ottenere un flusso in uscita di 1 ml/h.

Per permettere il processo di elettrospinning è stata applicata volta per volta una differenza di potenziale compresa tra 18 e 20 kV tramite un generatore ad alto voltaggio.

L' elettrospinning in tutti i casi è stato condotto orizzontalmente e scaffold fibrosi con uno spessore di 0,1-0,2 mm sono stati raccolti tramite dei fogli di alluminio (18 per 16 cm) applicati a un collettore rotante (300 rpm) posizionato ad una distanza di circa 15 cm dalla punta dell'ago.

L'elettrospinnato è stato tenuto sottovuoto per quattro giorni per favorire l'evaporazione di eventuale solvente residuo.

Per l'analisi SEM i campioni sono stati posti su *stab* metallici, sputterati con oro e analizzati al microscopio.

5.3.6. Studi di swelling e degradazione

Per gli studi di swelling e degradazione gli scaffold sono stati tagliati in maniera tale da ottenere dei dischetti dal diametro di circa 4 cm.

Tali dischetti sono stati accuratamente pesati quindi posti in 5 ml di DPBS ed incubati a 37 °C in orbital shaker.

Le analisi sono state fatte dopo 2, 7, 14 e 28 giorni. Il DPBS è stato cambiato ogni 2 giorni.

Nei giorni stabiliti i campioni sono stati pesati per la valutazione dello swelling, dopo essere stati privati dell'acqua in eccesso tramite carta da filtro, lavati 5 volte in acqua bi distillata e congelati.

Il solido recuperato per freeze-drying è stato quindi pesato per valutarne la perdita in peso, e visionato tramite SEM.

Il comportamento di swelling è stato espresso come rapporto di swelling (q), che è il rapporto tra il peso del campione rigonfio (W_s) e il peso del campione secco (W_d).

$$q = W_s / W_d$$

La degradazione dello scaffold è stata espressa in percentuale di perdita in peso secondo la seguente formula:

$$\text{degradazione\%} = \frac{\text{peso iniziale} - \text{peso finale}}{\text{peso iniziale}} \times 100$$

Ciascun esperimento è stato condotto in triplicato.

5.3.7. Studi di rilascio del farmaco

Pezzetti quadrati da 30 mg sono stati ritagliati dagli scaffold medicati, immersi in 4 ml di plasma umano ed incubati in orbital shaker a 37 °C con una rotazione di 100 rpm.

A periodi di tempo predefiniti, 1 ml di plasma è stato prelevato da ogni campione e rimpiazzato con 1 ml di tampone fresco.

Il plasma prelevato è stato addizionato di 1 ml di acetonitrile e centrifugato a 1000 rpm per separare le proteine plasmatiche precipitate.

Il surnatante è stato filtrato con un filtro di nylon da 0,45µm quindi iniettato all'HPLC (20µl) per valutare la quantità di farmaco rilasciata nell'unità di tempo.

La curva di taratura è stata preparata dissolvendo l' Ibuprofene a varie concentrazioni in acetonitrile ed iniettando all'HPLC.

Una prova in bianco di estrazione del farmaco è stata condotta disperdendo l'ibuprofene in una quantità nota di plasma, precipitando le proteine plasmatiche con acetonitrile, filtrando ed iniettando all'HPLC.

5.3.8. Prove di citocompatibilità

I fibroblasti del derma umano sono stati coltivati in mezzo di coltura DMEM (vedi paragrafo 5.1.3).

Gli scaffold elettrospinnati a base di solo PHEA-g-PLA-(IBU), PHEA-g-PLA/IBU 5% (p/p) e PHEA-g-PLA, sono stati tagliati in dischetti del diametro di circa 3 cm ciascuno.

Tali pezzetti sono stati sterilizzati tramite irraggiamento UV quindi imbibiti in PBS e successivamente in DMEM .

Ogni pezzo di scaffold è stato posto in un pozzetto di una piastra a 12 pozzetti.

I fibroblasti, sono stati staccati dalla fiasca di coltura tramite trattamento con una soluzione di tripsina, centrifugati, contati e risospesi con la quantità ottimale di DMEM atta ad ottenere una sospensione con un numero di cellule per ml pari a 850000.

A questo punto 100 μ l della sospensione cellulare sono stati posti su ogni pezzetto di scaffold e in pozzetti vuoti per ottenere un controllo positivo. I campioni sono stati quindi incubati per un ora prima di essere addizionati con 1 ml di DMEM fresco.

Il mezzo di coltura è stato cambiato ogni 2 giorni.

Al terzo e al settimo giorno la vitalità cellulare è stata valutata sostituendo il mezzo di coltura in ogni pozzetto con 1 ml di DMEM contenente 100 μ l di MTS.

I campioni sono stati incubati per 4 ore, quindi 100 μ l del mezzo di ogni pozzetto, sono stati trasferiti in un pozzetto di una piastra a 96 per la lettura dell'assorbanza a 490nm tramite spettrofotometro.

5.4. Produzione di scaffold fibrillari a base di PHEA-EDA-g-PLA per la ritenzione di agenti chemotattici nel trattamento delle ferite croniche dell'apparato tegumentario

5.4.1. Materiali

Il dimetil solfossido (DMSO), l' N-idrossisuccinimide sale sodico (NHS), l' N, N-dimetilformammide (DMF), il diclorometano (DCM), il MES hemisodium salt, l' 1-etil-3-[3-(dimetilammino)propil]carbodiimmide cloridrato (EDC), la diciolesil carbodiimmide (DCC) e la toliuidina blu sono stati acquistati presso Sigma–Aldrich (Italia).

La dietilammina (DEA) è stata acquistata da Fluka (Italia).

L'MTS 96 cell titer è stato acquistato da Promega (Italia).

L' α,β -poli(N-2-idrossietil)(2-aminoetilcarbammato)-D,L-aspartammide (PHEA-EDA) è stata preparata e purificata come riportato nel paragrafo 5.1.4.

Il RESOMER R 202 (D,L acido polilattico PLA 8000 Da) è stato acquistato da Bidachem-Boeringher Ingelheim (Italia).

Eparina sale sodico (PM 2500 Da) è stata generosamente donata dai Laboratori Derivati Organici SPA Torino (Italia).

5.4.2.Apparecchiature

Il processo di elettrospinning è stato condotto tramite una pompa per il flusso programmato Aitecs PLUS SEP-21S, un generatore ad alto voltaggio Spellman CZE 1000 R.

È stato utilizzato un collettore rotante di manifattura propria.

Gli spettri $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-d}_6\text{D}$) sono stati ottenuti con uno strumento Bruker AC 250,13 MHz.

La morfologia delle fibre elettrospinnate è stata investigata tramite un microscopio a scansione elettronica (ESEM QUANTA FEI 200F) con un voltaggio accelerato di 15 kV.

La misurazione dell'assorbanza delle soluzioni è stata fatta tramite uno spettrofotometro UV Shimadzu RF-5301 PC.

Un incubatore rotante Benchtop 808C Orbital Shaker modello 420 è stato utilizzato per la funzionalizzazione dello scaffold con eparina.

5.4.3. Sintesi del copolimero graft PHEA-EDA-g-PLA

Inizialmente è stata preparata una soluzione contenente 600mg di PHEA-EDA in 12 ml di DMSO anidro in presenza di DEA come catalizzatore (576 μl). A tale soluzione è stata aggiunta goccia a goccia una soluzione di PLA-NHS in 12 ml di DMSO in modo tale da avere un rapporto X pari a 0,1, essendo $X = \text{moli di PLA-NHS} / \text{moli di unità ripetitive del PHEA-EDA}$. La reazione è stata condotta in atmosfera di argon, a 40°C, per 24 ore. La soluzione di reazione è stata quindi dializzata usando una membrana Visking con un cut-off di 12000-14000 Da per tre giorni contro DMSO e quindi contro acqua per rimuovere le tracce di solvente organico. Si è ottenuta una sospensione del copolimero in acqua che è stata essiccata tramite freeze-drying.

Lo spettro $^1\text{H-NMR}$ del PHEA-EDA-g-PLA (in $\text{DMSO-d}_6\text{D}$) ha mostrato: δ 1,25 e δ 1,45 (2d, $-\text{O}-\text{CO}-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{O}-$ del PLA), δ 3,1 (m, 2H $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$ del PHEA), δ 4,6 (m, 1H, NH-

CH(CO)CH₂- del PHEA), δ 4,1 e δ 5,1 (m, 1H, -O-CO-**CH(CH₃)-OH** e m, 1H, -O-CO-**CH(CH₃)-O-** del PLA) .

Il grado di derivatizzazione è espresso come percentuale di PLA (DD1%):

$$\text{DD1\%} = \frac{\text{Moli di PLA}}{\text{moli delle unità ripetitive del PHEA-EDA}} \times 100$$

Tale rapporto è stato calcolato comparando l' integrale dei due picchi relativi ai due protoni dei gruppi metilici del PLA a δ 1,25 e δ 1,45, con l'integrale relativo ai protoni del gruppo etanolaminico del PHEA a δ 3,1.

5.4.4. Elettrospinning e valutazione delle caratteristiche fisiche degli scaffold

Il copolimero PHEA-EDA-g-PLA è stato solubilizzato con una miscela DMF/DCM 50:50 v/v ad una concentrazione finale di 90% p/v.

La soluzione polimerica, è stata caricata dentro una siringa di plastica da 5 ml avente un ago di diametro interno di 0,8 mm.

Un flusso costante di 1 ml/min è stato ottenuto tramite una pompa programmabile alla quale è stata collegata la siringa stessa.

E stata applicata una differenza di potenziale pari a 18 kV tramite un generatore ad alto voltaggio.

L' elettrospinnig è stato condotto orizzontalmente e scaffold fibrosi con uno spessore di 0,1-0,2 mm sono stati raccolti tramite dei fogli di

alluminio (18 per 16 cm) applicati a un collettore rotante (300 rpm) posizionato ad una distanza di circa 15 cm dalla punta dell'ago.

Gli scaffold sono stati tenuti sottovuoto per quattro giorni per favorire l'evaporazione di eventuale solvente residuo.

5.4.5. Funzionalizzazione degli scaffold elettrospinnati con eparina

Ad una soluzione di eparina al 2% p/v MES sono stati aggiunti EDC ed NHS in quantità opportune ad ottenere un rapporto molare tra EDC(NHS)/Eparina pari a 0,8.

La soluzione è stata posta a 37°C per 30 minuti per favorire l'attivazione dei gruppi carbossilici dell'Eparina.

Dischetti del diametro di 1cm sono stati tagliati dagli scaffold elettrospinnati, pesati accuratamente ed immersi per 2 ore in tampone MES a pH 5,5.

Dopo 2 ore il MES è stato cambiato con la soluzione di eparina attivata contenente una quantità del polisaccaride tale da avere un rapporto in peso con i dischetti polimerici pari ad 1.

La reazione è stata condotta per 24 ore a 37 °C.

I dischetti trattati con eparina sono stati lavati con soluzione 0,1 M di Na₂HPO₄ per 2 ore quindi per 24 ore con soluzione di NaCl 4 M ed infine per 24 ore con acqua distillata.

5.4.6. Saggio colorimetrico con toluidina blu

Gli scaffold trattati con eparina sono stati incubati per 4 ore a 37°C con una soluzione di toluidina blu allo 0,04% p/v in soluzione 0,01M di HCl contenente lo 0,2% p/v di NaCl.

Il colorante in eccesso è stato quindi allontanato tramite lavaggi esaustivi con acqua bidistillata, gli scaffold sono stati solubilizzati con una miscela di etanolo/NaOH 0,1 M (4:1 v/v) ed è stata valutata l'assorbanza delle soluzioni a 530nm.

Una curva di taratura è stata fatta incubando una quantità nota di eparina in tampone MES con un eccesso di soluzione di toluidina blu.

Il complesso tra l'eparina ed il colorante diventa insolubile in soluzione acquosa ed è stato isolato per centrifugazione. Tale precipitato è stato lavato con acqua bidistillata quindi solubilizzato con quantità diverse di miscela etanolo NaOH 0,1 M per ottenere i punti di calibrazione.

Bibliografia

- [1] Fonte internet dal sito: *www.fda.gov*
- [2] Atala A., American Journal of Transplantation; 4: 58-73 (2004);
- [3] Atala A., British Journal of Urology International; 92: 58-67 (2003);
- [4] Vacanti JP, Langer R., The Lancet; 354(Suppl.1): 32-4 (1999);
- [5] Vacanti CA., Journal of Cellular and Molecular Medicine; 10: 569-76 (2006);
- [6] Alberti C., Mediago M., Chiapello G., Arena G., Urologia; 72: 318-324 (2005);
- [7] Kidoaki S., Kwon I.K., Matsuda T., Biomaterials; 26: 37-46 (2005);
- [8] Salgado AJ, Oliveira JT, Pedro AJ, et al., Current Stem Cell Research & Therapy;1: 345-64 (2006);
- [9] Germain L., Carrier P., Auger F.A., Salesse C., Guérin S. L., Progress in retinal and eye research;19:497-527 (2000);
- [10] Rosati P., Colombo R., Maraldi M., Istologia - Quinta edizione (2006);
- [11] Griffith L.G., Swartz M.A., Nature Reviews Molecular Cell Biology; 7: 211-224 (2006);
- [12] Meredith J.E., Fateli B., Schwartz M.A., Molecular Cellular Biology; 9:953-961(1993);
- [13] Bosman F.T., Stamenkovic I., The Journal of Pathology; 200: 423-428 (2003);

- [14] Olsen B.R., *Current Opinion in Cell Biology*; 7: 720-727 (1995);
- [15] Reichenberger E., Olsen B.R., *Seminars in Cell & Developmental Biology*; 7: 631-638 (1996);
- [16] Schwarz N., *Frontiers in Bioscience*; 5:D649-D655 (2000);
- [17] Wight T.N., Kinsella M.G., Qwarnstrom E.E., *Current Opinion in Cell Biology*; 4: 793-801 (1992);
- [18] Welsh E.J., Rees D.A., Morris E.R., Madden J.K., *Journal of Molecular Biology*; 138: 375-382 (1980);
- [19] Laurent T.C., Fraser J.R., *The FASEB Journal*; 6: 2397-2404 (1992);
- [20]. Lee J.Y., Spicer A.P., *Current Opinion in Cell Biology*; 12: 581-586 (2000);
- [21] Engel J., *Biochemistry*; 31:10643-10651(1992);
- [22] Ruoslahti E., *Journal of Oral Pathology*; 10: 3-13(1981);
- [23] Flaumenhaft R., Rifkin D.B., *Molecular Biology of the Cell*; 3:1057–1065(1992);
- [23] Gumbiner B.M., *Cell*; 84:345-577(1996);
- [24] Taipale J., Keski-Oja J., *The FASEB Journal*; 11:51-59 (1997),
- [25] Renier D., 3° Corso Scuola Dottorale per la formazione avanzata in Discipline Tecnologico-Farmaceutiche Cosenza, (2002);

- [26] Danen E.H., Sonnenberg A., *The Journal of Pathology*; 201; 632–41(2003);
- [27] Sahota P.S., Burn J.L., Heaton M., Freedlander M., Suvarna S.K., Brown N.J., Mac Neil.S., *Wound Repair Regeneration*; 11: 275-284 (2003);
- [28] Porter K.E., Turner N.A., *Pharmacology & Therapeutics*; 123: 255-278 (2009);
- [29] Germain L., Jean A., Auger F.A., Garrel D., *Journal of Surgical Research*; 57: 268–273(1994).
- [30] Mandracchia D., 11° Corso Scuola Dottorale per la formazione avanzata in Discipline Tecnologico-Farmaceutiche Cosenza, (2010);
- [31] Ungaro F., Biondi M., Indolfi L., De Rosa G., La Rotonda M. I., Quaglia F., Netti P., *Topics in Tissue Engineering*; 2: 1-38(2005);
- [32] Chaignaud B, Langer R.S., Vacanti J.P., *Synthetic Biodegradable Polymer Scaffolds*; 1: 1-14(1997);
- [33] Pachence J.M., *Journal of Biomedical Material Research*; 33:35-40(1996);
- [34] Brun P., Cortivo R., Zavan B., Vecchiato N., Abatangelo G., *Journal of Material Science: Materials in Medicine*; 10:683-688 (1999);
- [35] Xin X., Borzacchiello A., Netti P.A., Ambrosio L., Nicolais L., *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*; 15: 1223-1236 (2004);
- [36] Wise S.G., Byrom M.J., Waterhouse A., Bannon P.G., Martin K.C., Weiss A.S., *Acta Biomaterialia*; 7: 295-303 (2011);
- [37] Lovett M., Cannizzaro C, Daheron L., Messmer B., Vunjak-Novakovic G., Kaplan D.L., *Biomaterials*; 28: 5271-5279 (2007);

- [38]Muzzarelli R.A. Carbohydrate Polymers; 83: 1433-1445 (2011);
- [39] Hao T., Wen N., Cao J.K., Wang H.B., Lü S.H., Liu T., Lin Q.X., Duan C.M., Wang C.Y., Osteoarthritis and Cartilage; 18: 257-265 (2010);
- [40] Giurea A., Klein T.J., Chen A.C., Goomer R.S., Coutts R.D., Akeson W.H., Amiel D., Sah R.L. Journal of Orthopaedic Research; 21: 584-589 (2003);
- [41] Le Bolay N., Santran V., Dechambre G., Combes C., Drouet C., Lamure A., Ray C., Powder Technology; 190: 89-94 (2009);
- [42]Schliephake H., Jamil M.U., W. Knebel J.W., Journal of Oral and Maxillofacial Surgery; 56: 616-626 (1998);
- [43]Engelmayr G.C., Hildebrand D.K., Sutherland F.W.H., Mayer J.E., Sacks M.S., Biomaterials; 24: 2523-2532 (2003);
- [44] François S., Chakfé N., Durand B., Laroche G., Acta Biomaterialia; 5:, 2418-2428 (2007);
- [45] Mooney D. J., Mazzoni C. L., Breuer C., McNamara K., Hern D., Vacanti J. P., Lange R., Biomaterials; 17: 115-124 (1996);
- [46] Htay A.S., Teoh S.H., Hutmacher D.W., Journal of Biomaterials Science Polymer Edition; 15:683-700 (2004);
- [47] Kweon H., Yoo M.K., Park I.K., Kim T.H., Lee H.C., Lee H.S., Oh J.S., Akaike T., Cho C.S., Biomaterials; 24: 801-808 (2003);
- [48] Choi S.H., Park T.G., Journal of Biomaterials Science Polymer Edition; 13:1163-1173 (2003);

- [49] Sarasam A., Madihally S.V., *Biomaterials*; 26:5500-5508 (2005);
- [50] Stitzel J., Liu J., Lee S.J., Komura M., Berry J., Soker S., Lim G., Van Dyke M., Czerw R., Yoo J.J., Atala A., *Biomaterials*; 27: 1088-1094 (2006);
- [51] Liu S.J., Kaur Y.C., Chou C.Y., Chen J.K., Wu R.C., Yeh W.L., *Journal of Membrane Science* 355: 53–59(2010);
- [52] Pitarresi G., Palumbo F. S., Cavallaro G., Farè S., Giammona G., *Journal of Biomedical Materials Research Part A*; 4: 770-779 (2008);
- [53] Anseth K.S., Bowman C.N., Peppas L., *Biomaterials*; 17:1647-1657(1996);
- [54] Pitarresi G., Palumbo F.S., Albanese A., Licciardi M., Calascibetta F., Giammona G., *European Polymer Journal*; 44:3764–75 (2008);
- [55] Palumbo F.S., Pitarresi G., Mandracchia D., Tripodo G., Giammona G., *Carbohydrate Polymer*; 66:379–8 (2006);
- [56] Yamaoka H., Asato H., Ogasawara T., Nishizawa S., Takahashi T., Nakatsuka T., Koshima I., Nakamura K., Kawaguchi H., Chung U.I., Takato T., Hoshi K., *Journal of Biomedical Materials Research part A* 78A:1-11 (2006);
- [57] Kisiday J., Jin M., Kurz B., Hung H., Semino C., Zhang S., Grodzinsky A.J., *Proceedings of the National Academy of Science of USA*; 99:9996-10001 (2002);
- [58] Black A.F., Bouez C., Perrier E., Schlotmann K., Chapuis F., Damour O., *Tissue Engineering*; 11:723-733 (2005);
- [59] Fuchs J.R., Kaviani A., Oh J.T., LaVan D., Udagawa T., Jennings R.W., Wilson J.M., Fauza D.O., *Journal of Pediatric Surgery*; 39:834-838 (2004);

- [60] Morton W.J., US Patent; 705:691 (1902);
- [61] Schreuder-Gibson H.L., Gibson P., Tsai P., Gupta P., Wilkes G., International Nonwovens Journal; 13: 39–45(2004);
- [62] Schreuder-Gibson H.L., Gibson P., Wadsworth L., Hemphill S., Vontorcik J., Advances in Filtration and Separation Technology; 15: 525–537(2002);
- [63] Gibson P., Schreuder-Gibson H.L., Rivin D., Colloids and Surfaces A, Physicochemical and Engineering Aspects; 187: 469–481 (2001);
- [64] Wannatong L., Sirivat A., Polymer Materials Science and Engineering; 91: 692–693 (2004);
- [65] Wang X.Y., Kim Y.G., Drew C., Ku B.C., Kumar J., Samuelson L.A., Nano Letters; 4: 331–334 (2007);
- [66] Ding B., Kim J., Miyazaki Y., Shiratori S., Sensors and Actuators. B, Chemical B; 101: 373–380 (2004);
- [67] Ding B., Kim J., Fujimoto K., Shiratori S., Chemical Sensors; 20: 264–265 (2004);
- [68] Wang X.Y., Drew C., Lee S.H., Senecal K.J., Kumar J., Samuelson L.A., Nano Letters; 2: 1273–1275 (2002);
- [69] Liu H.Q., Kameoka J., Czaplewski D.A., Craighead H.G., Nano Letters; 4: 671–675 (2004);
- [70] Kim C., Park S.H., Lee W.J., Yang K.S., , Electrochimica Acta; 50: 877–881 (2004);

- [71] Kim C., Choi Y.O., Lee W.J., Yang K.S., *Electrochimica Acta*; 50: 883–887(2004);
- [72] Kim C., Yang K.S., *Applied Physics Letters*; 83: 1216–1218 (2003);
- [73] Kim C., Yang K.S., Lee W.J., *Electrochemical and Solid-State Letters*; 7: A397–A399 (2004);
- [74] Khil M.S., Bhattarai S.R., Kim H.Y., Kim S.Z., Lee K.H., *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials* 72: 117–124 (2005);
- [75] Ma Z., Kotaki M., Inai R., Ramakrishna S., *Tissue Engineering*; 11: 101–109 (2005);
- [76] Riboldi S.A., Sampaolesi M., Neuenschwander P., Cossu G., Mantero S., *Biomaterials*; 26: 4606–4615 (2006);
- [77] Yang F., Murugan R., Wang S., Ramakrishna S., *Biomaterials*; 26: 2603–2610 (2005);
- [78] Barnes C. P., Sell S. A., Boland E. D., Simpson D. G., Bowlin G. L., *Advanced Drug Delivery Reviews*; 59: 1413–1433 (2007);
- [79] Liang D., Hsiao B.S., Chu B., *Advanced Drug Delivery Review*; 59: 1392–1412 (2007);
- [80] Jia H., Zhu G., Vugrinovich B., Kataphinan W., Reneker D.H., Wang P., *Biotechnology Progress*; 18: 1027–1032 (2002);

- [81] Wang Y., Hsieh Y.L., *Polymer Preprints* (American Chemical Society, Division of Polymer Chemistry); 44: 1212–1213 (2003);
- [82] Wang Y., Hsieh Y.L., *Journal of Polymer Science Part A, Polymer Chemistry*; 42: 4289–4299 (2004);
- [83] Wu L., Yuan X., Sheng J., *Journal of Membrane Science*; 250: 167–173 (2005);
- [84] Khil M.S., Cha D.I., Kim H.Y., Kim I.S., Bhattarai N., *Journal of Biomedical Materials Research Part B, Applied Biomaterials*; 67B: 675–679 (2003);
- [85] Kim H.Y., Lee B.M., Kim I.S., Jin T.H., Ko K.H., Ryu Y.J., *Polymer Materials Science and Engineering Preprints*; 91: 712–713 (2004);
- [86] Zong X., Fang D., Kim K., Ran S., Hsiao B.S., Chu B., Brathwaite C., Li S., Chen E., *Polymer Preprints* (American Chemical Society, Division of Polymer Chemistry); 43: 659–660 (2002);
- [87] Zong X., Li S., Chen E., Garlick B., Kim K.S., Fang D., Chiu J., Zimmerman T., Brathwaite C., Benjamin S.H., Chu B., *Annals of Surgery*; 240: 910–915 (2004);
- [88] Jiang H.L., Fang D.F., Hsiao B.J., Chu B.J., Chen W.L., *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition*; 15: 279–296 (2004);
- [89] Katti D.S., Robinson K.W., Ko F.K., Laurencin C.T., *Journal of Biomedical Materials Research Part B, Applied Biomaterials*; 70B: 286–296 (2004);
- [90] Kim K., Luu Y.K., Chang C., Fang D.F., Hsiao B.S., Chu B., Hadjiargyrou M., *Journal of Controlled Release*; 98: 47–56 (2004);

- [91] Kim K.S., Chang C., Zong X.H., Fang D.F., Hsiao B.S., Chu B., Hadjiargyrou M., Abstracts of Papers of the American Chemical Society; 226: U437 (2003);
- [92] Luu Y.K., Kim K., Hsiao B.S., Chu B., Hadjiargyrou M., Journal of Controlled Release; 89: 341–353(2003);
- [93] Hogan M.J., Zimmerman L.E., Second ed. 277-290 (1962);
- [94] Hogan M J., Alvarado J.A., Weddel J. E., In Histology of the human eye; 85:111-116(1971);
- [95] Germain L., Auger F.A., Grandbois E., Guignard R., Giasson M., Boisjoly H., Guearin S.L., Pathobiology; 67: 140-147(1999);
- [96] Kruse F.E., Eye; 8, 170-183(1994);
- [97] Thoft R.A., Friend J., Investigative Ophthalmology and Visual Science; 24: 1442-1443(1983);
- [98] Rheinwald J.G., Green, H, Cell; 6: 331-343 (1975);
- [99] Whitcher J.P., Srinivasan M., Upadhyay M.P., Bulletin of World Health Organization; 200:179- 214 (2001);
- [100] Daniels J., Harris A., Mason C., Stem Cell Rev; 2: 247-254 (2006);
- [101] Dua H.S., Joseph A., Shanmuganathan V.A., Jones R.E., Eye;17: 877-885 (2003);
- [102] Deshpande P., Notara M., Bullett N., Daniels J.T., Haddow D.B., MacNeil S., Tissue Engineering Part A; 15:2889-2902 (2009);
- [103] Ferber D., Science; 284: 423-427 (1999);

- [104] Arora R., Mehta D., Jain V., *Eye*;19: 273-278(2004);
- [105] Koizumi N., Cooper L.J., Fullwood N.J., Nakamura T., Inoki K., Tsuzuki M., Kinoshita S., *Investigative Ophthalmology and Visual Science*; 43: 2114-2121(2002);
- [106] Pratoomsot C., Taniok H., Hori K., Kawasaki S., Kinoshita S., Tighe P., Dua H., Shakesheff K., Rosamari F., Rosea A., *Biomaterials*; 29: 272-281(2008);
- [107] MacNeil S., *Materialstoday*; 5: 26-35 (2008);
- [108] Singer A.J., Clark R.A., *New England Journal of Medicine* 341: 738–746 (1999);
- [109] Wu Y., Chen L., Scott P.G., Tredget E.E., *Stem Cells*; 25: 2648–2659 (2007);
- [110] Palumbo F.S., *Corso Scuola Dottorale per la formazione avanzata in Discipline Tecnologico-Farmaceutiche Cosenza*, (2002);
- [111] Bruce S.A., Deamond S.F., *Experimental Gerontology*; 26: 17–27 (1991);
- [112] Hehenberger K., Heilborn J.D., Brismar K., Hansson, *Wound Repair and Regeneration*; 6:135–141 (1998);
- [113] O'Connor N.E., Mulliken J.B., Banks-Schlegel S., Kehinde O., Green H., *The Lancet*; 317: 75-78 (1981)
- [114] EpiceI™, Genzyme, fonte dal dal sito: www.genzymebiosurgery.com;
- [115] EpiDex™, Euroderm, fonte dal dal sito: www.euroderm-biotech.com;

- [116] Myskin®, Celltran Ltd., fonte dal sito: www.celltran.co.uk;
- [117] Moustafa M., Simpson C., Glover M., Dawson R. A., Tesfaye S., Creagh F. M., Haddow D., Short R., Heller S., MacNeil S., *Diabetic Medicine*; 21: 786-789 (2004);
- [118] Zhu N., Warner R.M., Simpson C., *European Journal of Plastic Surgery* 28: 319-330 (2005);
- [119] Moustafa M., Bullock A.J., Creagh F.M., Heller S., Jeffcoate W., Game F., *Regenerative medicine*; 2: 887-902 (2007);
- [120] Yannas I.V., Burke J.F., *Journal of Biomedical Materials and Research*; 14: 65-81 (1980);
- [121] Yannas I.V., Burke J.F., Gordon P.L., Huang C., Rubenstein R.H., *Journal of Biomedical Materials and Research*; 14: 107-132 (1980);
- [122] Jarman-Smith M.L., Bodamyali T., Stevens C., Howell J.A., Horrocks M., Chaudhuri J.B., *Journal of Material Science: Materials in Medicine*; 15: 925-932 (2004);
- [123] Bello Y. M., Falabella A. F., *Journal of Wound Care*, 11: 182-183 (2003);
- [124] Apligraf®, Organogenesis, fonte dal sito: www.organogenesis.com
- [125] Marston W.A., Hanft J., Norwood P., Pollak R., *Diabetes Care*; 26: 1701-1705(2003);
- [126] Kim G.H., Yoon H., *Mater Sci Process Applied Physic A: Materials Science and Proceedings*;90:389–94 (2008);

- [127] Heimbach D., Luterman A., Burke J.F., Cram A., Herndon D., Hunt J., Jordon M., McManus W., Solem L., Warden G., Zawacki B., *Annals of Surgery*; 208: 313-330 (1988);
- [128] Sheridan R.L., Hegarty M., Tompkins R.G., Burke J.F., *European Journal of Plastic Surgery*; 17: 91-93 (1994);
- [129] Kim H.Y., Lee B.M., Kim I.S., Jin T.H., Ko K.H., Ryu Y.J., *Polymeric Materials: Science and Engineering Preprints*; 91: 712–713 (2004);
- [130] Khanam N., Mikoryak C., Draper R.K., Balkus K.J., *Acta Biomaterialia*; 3:1050–1059 (2007);
- [131] Giammona G., Puglisi G., Carlisi B., Pignatello R., Spadaro A., Caruso A., *International Journal of Pharmaceutics*; 57: 55-62 (1989);
- [132] Pitarresi G., Palumbo F.S., Calabrese R., Craparo E.F., Giammona G., *Journal of Biomedical Materials Research Part A*; 84: 413-424 (2008);
- [133] Gottrup F., Jørgensen B., Karlsmark T., Sibbald R.G., Rimdeika R., Harding K, Price P., Harding K.G., *British Medical Journal*; 324:160–163 (2002);
- [134] Mendichi R., Giammona G., Cavallaro G., Giacometti Schieron A., *Polymer* 41: 8649–8657 (2000);
- [135] Licciardi M., Campisi M., Cavallaro G., Cervello M., Azzolina A., Giammona G., *Biomaterials* 27: 2066–75 (2006);
- [136] Bulpitt P., Aeschlimann D., *Journal of Biomedical Materials Research* 47: 152-169 (1999);

[137] Ishihara M., Obara K., Ishizuka T., Fujita M., Sato M., Masuoka K., Saito Y., Yura H., Matsui T., Hattori H., Kikuchi M., Kurita A., *Journal of Biomedical Materials Part A*; 64 551-9 (2003);

[138] Shu X. Z., Liu Y., Luo Y., Roberts M. C., Prestwich G. D., *Biomacromolecules*; 3: 1304–1311(2002);

[139] Giammona G., Carlisi B., Palazzo S., *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*; 25: 2813–2818 (1987);

[140] Bitter T., Muir H. M., *Biochemistry*; 4: 330–334 (1962).