

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI

“FEDERICO II”



FACOLTÀ DI INGEGNERIA

**DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DEI MATERIALI
E DELLA PRODUZIONE**

DOTTORATO DI RICERCA IN INGEGNERIA

DEI MATERIALI E DELLE STRUTTURE

XX° CICLO

MATRICI POLIMERICHE BIODEGRADABILI

POROSE OTTENUTE ATTRAVERSO

SINTERIZZAZIONE DI MICROPARTICELLE

Coordinatore:

PROF. D. ACIERNO

Tutor:

PROF. P.A. NETTI

Candidato:

ALESSIA LUCIANI

Indice

<i>Introduzione.....</i>	<i>1</i>
<i>Capitolo 1 - Tessuto osseo.....</i>	<i>5</i>
<i>1.1 – Proprietà meccaniche dell’osso.....</i>	<i>6</i>
<i>1.2 – Stati di sollecitazione dell’osso.....</i>	<i>10</i>
<i>1.3 – Rimodellamento osseo.....</i>	<i>14</i>
<i>Capitolo 2- Ingegneria dei tessuti.....</i>	<i>17</i>
<i>2.1 – Cellule.....</i>	<i>19</i>
<i>2.2 – Scaffold.....</i>	<i>20</i>
<i>2.2.1 – Proprietà.....</i>	<i>21</i>
<i>2.2.2 – Materiali utilizzati.....</i>	<i>24</i>
<i>2.2.3 – Principali tecniche di realizzazione.....</i>	<i>29</i>
<i>2.3 – Growth Factor.....</i>	<i>38</i>
<i>2.4 – Drug Delivery in Ingegneria dei Tessuti.....</i>	<i>39</i>
<i>2.4.1 - Criteri per la progettazione di sistemi di rilascio di fattori di crescita...40</i>	
<i>2.4.2 - Tecniche per la realizzazione di scaffold per il rilascio di fattori di crescita.....</i>	<i>41</i>

<i>Capitolo 3- Analisi sperimentale: Strumenti e Metodi</i>	47
3.1 – <i>Materiali utilizzati</i>	47
3.2 – <i>Preparazione delle microsfere di PCL</i>	55
3.2.1 – <i>Singola emulsione</i>	55
3.2.2 – <i>Doppia emulsione</i>	56
3.2.3 – <i>Tipologie di campioni</i>	58
3.3 – <i>Scaffold ottenuti per sinterizzazione di microsfere di PCL</i>	60
3.3.1 – <i>Sinterizzazione termica</i>	60
3.3.2 - <i>Sinterizzazione con solvente</i>	61
3.4 - <i>Preparazione delle microsfere di chitosano-gelatina</i>	62
3.5 - <i>Analisi dei campioni</i>	64
3.5.1 - <i>Analisi morfologica</i>	64
<i>Microscopio a scansione elettronica (SEM)</i>	64
<i>Microscopia Confocale</i>	67
<i>Analisi delle immagini</i>	70
<i>Porosimetro ad intrusione di mercurio</i>	71
<i>Microtomografia computerizzata</i>	75
3.5.2 - <i>Analisi dimensionale: Coulter Counter</i>	77
3.5.3 - <i>Analisi del rilascio della proteina incapsulata</i>	78
3.5.4 - <i>Analisi dell'attività della proteina rilasciata</i>	81
3.5.5 - <i>Analisi termica</i>	82
3.5.6 - <i>Caratterizzazione meccanica</i>	85

<i>Capitolo 4 – Risultati sperimentali e Discussione.....</i>	<i>87</i>
<i>4.1 – Microsfere di PCL ottenute mediante singola emulsione.....</i>	<i>87</i>
<i>4.1.1 – Analisi morfologica.....</i>	<i>87</i>
<i>4.1.2 – Analisi calorimetria a scansione differenziale</i>	<i>89</i>
<i>4.2 – Microsfere di PCL ottenute mediante doppia emulsione</i>	<i>90</i>
<i>4.2.1 – Analisi morfologica (SEM).....</i>	<i>91</i>
<i>4.2.2 – Analisi porosimetrica ad intrusione di mercurio.....</i>	<i>92</i>
<i>4.2.3 – Analisi della morfologia interna delle microsfere (SEM)... ..</i>	<i>94</i>
<i>4.2.4 – Analisi al microscopio confocale.....</i>	<i>97</i>
<i>4.2.5 – Analisi delle immagini</i>	<i>100</i>
<i>4.2.6 - Analisi dimensionale (Coulter Counter).....</i>	<i>101</i>
<i>4.2.7 – Analisi della cinetica di rilascio.....</i>	<i>102</i>
<i>4.2.8 – Attività della proteina rilasciata.....</i>	<i>105</i>
<i>4.3 - Scaffold ottenuti mediante sinterizzazione di microparticelle.....</i>	<i>107</i>
<i>4.3.1 - Scaffold ottenuti mediante sinterizzazione termica.....</i>	<i>108</i>
<i>Analisi morfologica (SEM).....</i>	<i>111</i>
<i>Microscopia confocale.....</i>	<i>113</i>
<i>Analisi porosimetrica ad intrusione di mercurio.....</i>	<i>114</i>
<i>Microtomografia computerizzata.....</i>	<i>115</i>
<i>Caratterizzazione meccanica.....</i>	<i>117</i>
<i>Analisi della cinetica di rilascio della BSA dagli scaffold.....</i>	<i>118</i>
<i>4.3.2 - Scaffold ottenuti mediante sinterizzazione con solvente.....</i>	<i>120</i>
<i>Analisi morfologica (SEM).....</i>	<i>121</i>
<i>Analisi porosimetrica ad intrusione di mercurio.....</i>	<i>123</i>

<i>Caratterizzazione meccanica</i>	125
4.4 – <i>Microsfere di chitosano/gelatina ottenute mediante singola emulsione</i>	126
<i>Analisi morfologica (SEM)</i>	126
<i>Conclusioni</i>	129
<i>Bibliografia</i>	131

Introduzione

Negli ultimi anni, le limitazioni legate all'impiego di organi e tessuti artificiali o derivanti da donatori, hanno portato allo sviluppo di una nuova scienza, l'Ingegneria dei Tessuti, che è diventata rapidamente un importantissimo filone di ricerca, oggetto di rilevanti investimenti [1].

“L'Ingegneria dei Tessuti è quel settore interdisciplinare che applica i principi dell'ingegneria e delle scienze che studiano la vita per lo sviluppo di sistemi in grado di restituire, conservare e migliorare le funzioni del tessuto” (Vacanti 1995).

“Il suo obiettivo primario è quello di ripristinare le funzionalità dei tessuti mediante l'impianto di elementi “viventi” che siano in grado, in tempi clinicamente accettabili, di diventare parte integrante dell'organismo in cui vengono introdotti, con ridotti margini di insuccesso postimpianto” [2].

Tale scienza mira alla rigenerazione di tessuti danneggiati grazie all'utilizzo di tre fattori chiave: cellule, scaffold e fattori di crescita [1]. In particolare, le cellule hanno il ruolo di sintetizzare il nuovo tessuto. Recenti studi dimostrano, tuttavia, che cellule isolate sono difficilmente in grado di organizzarsi spontaneamente per formare tessuti complessi, in assenza di strutture tridimensionali che le guidino e ne stimolino le attività [3]. Il ruolo dello scaffold è quello di indurre la rigenerazione tessutale fornendo una “guida temporanea” per la crescita cellulare, sotto appropriate condizioni di coltura, per assecondare il programma di differenziazione [1]. Il terzo fattore chiave dell'ingegneria dei tessuti è rappresentato dai fattori di crescita, proteine il cui ruolo è di promuovere e guidare le cellule nella rigenerazione del neotessuto [1, 4-9]. L'iniezione diretta di fattori di crescita risulta inefficiente, a causa del rapido allontanamento del fattore dal sito d'interesse e della sua rapida digestione enzimatica o deattivazione. Inoltre, il rilascio locale e prolungato di molecole bioattive è necessario per minimizzare la propagazione indesiderata del segnale a altre cellule e tessuti e assicurare un'esposizione prolungata, al fine di ottenere la completa rigenerazione del tessuto [10]. I tre fattori chiave dell'ingegneria dei tessuti non sono sempre simultaneamente utilizzati. Tuttavia, recenti studi clinici hanno dimostrato che il successo degli approcci terapeutici che si rifanno a tale scienza è fortemente influenzato dalla loro delicata e

dinamica interazione reciproca. E' stato, infatti, evidenziato che la rigenerazione funzionale del tessuto danneggiato dipende dall'opportuna integrazione di tali fattori [1].

Uno scaffold ideale per applicazioni nell'ambito dell'ingegneria del tessuto osseo, oggetto di tale studio, dovrebbe possedere una struttura tridimensionale altamente porosa e dotata di pori interconnessi, essere biocompatibile e biodegradabile, con velocità di degradazione coordinata con quella di formazione del nuovo tessuto *in vitro* o *in vivo*, nonché possedere proprietà meccaniche compatibili a quelle del tessuto osseo [11]. Inoltre, tale scaffold dovrebbe promuovere e guidare la rigenerazione del tessuto attraverso il controllo locale del microambiente, rilasciando opportuni segnali al sito d'interesse in maniera controllata nel tempo [12, 13].

Recenti studi sono focalizzati sull'integrazione delle tecnologie di progettazione degli scaffold per l'ingegneria dei tessuti con quelle del rilascio controllato di farmaci, al fine di favorire la morfogenesi di tessuti complessi [14, 15]. Gli approcci più ampiamente utilizzati, si basano sull'interdispersione del fattore di crescita all'interno dello scaffold [1, 14], o sull'incapsulazione dello stesso in microparticelle, successivamente incluse nello scaffold [17]. Tuttavia, tali approcci non permettono un controllo indipendente del grado di porosità, dimensione e interconnessione dei pori, nonché del rilascio di agenti bioattivi.

Tra i polimeri sintetici biodegradabili, utilizzati per realizzare scaffold per la rigenerazione del tessuto osseo, grande diffusione ha avuto il policaprolattone (PCL), preso in esame in tale lavoro di tesi. Il suo impiego è legittimato dalle caratteristiche chimiche e fisiche compatibili con quelle del tessuto osseo, soprattutto in relazione alla cinetica di degradazione del polimero, nonché ad acclerate doti di biocompatibilità, ampiamente documentate in letteratura [18].

In tale lavoro di tesi si propone l'utilizzo del PCL per la realizzazione, attraverso un approccio innovativo, di scaffold multifunzionali con proprietà morfologiche e meccaniche modulabili, capaci, inoltre, di rilasciare in maniera controllata nel tempo fattori bioattivi.

In particolare, tali scaffold sono stati realizzati mediante un approccio *bottom-up* basato sulla sinterizzazione di microparticelle di PCL, ottenute mediante la tecnologia di emulsione.

La prima fase di questo lavoro è stata focalizzata sulla realizzazione e caratterizzazione di microsfere in policaprolattone, ottenute attraverso due metodologie: singola emulsione (O/W) e doppia emulsione (W/O/W). Il processo di preparazione delle microsfere in PCL è stato ottimizzato per ottenere una distribuzione dimensionale adeguata alla realizzazione di matrici polimeriche biodegradabili mediante sinterizzazione.

Inoltre, il metodo della doppia emulsione consente di incapsulare efficientemente una proteina modello, *Bovine Serum Albumine* (BSA). In particolare, sono state realizzate sei tipologie di microsfere, mediante doppia emulsione, variando opportunamente diversi parametri, al fine di modulare la dimensione delle microparticelle, la loro morfologia interna e, conseguentemente, la cinetica di rilascio della proteina incapsulata.

La seconda fase di tale lavoro di tesi si focalizza sulla realizzazione e progettazione di matrici realizzate attraverso sinterizzazione di microparticelle. In particolare, sono stati realizzati scaffold tridimensionali mediante sinterizzazione termica o compattazione chimica (attraverso l'utilizzo di un'opportuna miscela di solventi) di microsfere in policaprolattone.

Sono stati realizzati scaffold tridimensionali mediante sinterizzazione di microsfere compatte, ottenute mediante singola emulsione (*scaffold protein-free*). Successivamente, sono realizzate matrici bioattive dalla sinterizzazione di microsfere contenenti la proteina, ottenute mediante doppia emulsione, e microsfere di dimensioni maggiori, ottenute mediante singola emulsione; utilizzando le stesse condizioni di processo ottimizzate per la realizzazione di scaffold *protein-free*. La dimensione dei pori e le proprietà meccaniche degli scaffold possono essere controllati dalla scelta delle dimensioni delle microsfere compatte, ottenute mediante singola emulsione. Il rilascio della proteina incapsulata può essere, invece, modulato dall'opportuna scelta della formulazione di microsfere ottenute mediante doppia emulsione.

Sulla base dei risultati ottenuti dallo studio e dalla completa caratterizzazione delle microparticelle di PCL e della loro sinterizzazione per ottenere matrici tridimensionali, l'ultima fase di tale lavoro di ricerca si è focalizzato sulla realizzazione di microparticelle composite chitosano-gelatina. La realizzazione di tali microparticelle è

focalizzata ad estendere l'approccio della sinterizzazione termica e chimica ai materiali naturali.

Capitolo 1

Tessuto osseo

Nella progettazione e nella realizzazione di materiali innovativi per applicazioni biomediche è necessario innanzitutto comprendere a fondo le problematiche che si dovranno affrontare nella ricerca; pertanto il primo aspetto è analizzare “*come progetta la natura*” ovvero valutare come l’evoluzione naturale abbia permesso la realizzazione di tessuti biologici con prestazioni così specifiche e così straordinarie, consentendo di operare l’ottimizzazione della microstruttura di ciascun tessuto in base alla specifica funzione fisiologica richiesta. Nella realizzazione di un materiale sintetico non è possibile ripercorrere le stesse procedure evolutive del tessuto naturale, ma, valutando le proprietà meccaniche e fisiche dei tessuti biologici e studiando le correlazioni che esse presentano con le funzioni, è possibile comprendere ed ottimizzare la microstruttura in funzione delle proprietà richieste [19]. In quest’ottica si ritiene allora necessario introdurre alcune considerazioni sulla struttura e sulla composizione dei tessuti ossei, applicazione oggetto di tale studio.

L’osso è un materiale composito naturale, caratterizzato da una matrice di fibre di collagene altamente orientate rinforzata da particelle di fosfato di calcio, immersa in un fluido fisiologico (circa 10% in peso), che conferisce una certa plasticità al materiale. Al suo interno la presenza di cellule (prevalentemente **osteociti** ed **osteoblasti**) che ricoprono circa il 15% del suo peso, consentono la continua ricostruzione dei tessuti, motivo per il quale l’osso viene definito un *tessuto vivente*

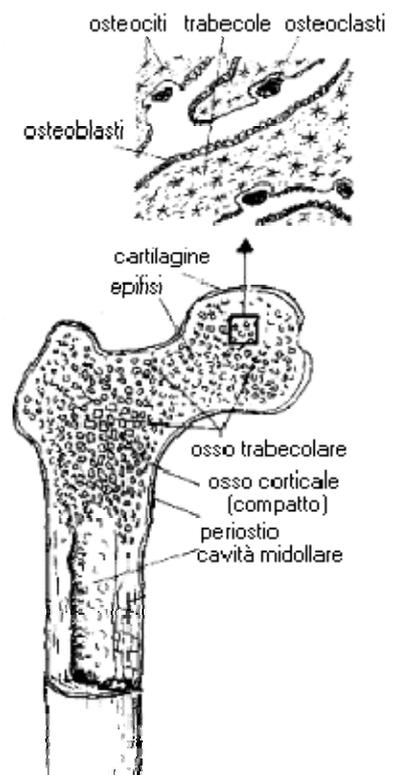


Fig. 1.1 Schematizzazione del tessuto osseo

[20]. Ma esso è innanzitutto un tessuto duro mineralizzato, in virtù del fatto che la matrice extracellulare è per la maggior parte impregnata di cristalli minerali, in prevalenza di fosfato di calcio, che le permettono di trasmettere e sorreggere gli sforzi.

COMPONENTI	QUANTITA' IN PESO (%)
Minerale (apatite)	69
Matrice organica <ul style="list-style-type: none"> • Collagene • altro 	22 90÷96% della matrice organica 4÷10% della matrice organica
Acqua	9

Tab. 1.1: Composizione osso[2]

La presenza di minerali, così come la particolare distribuzione delle componenti organiche nella sostanza intercellulare, conferiscono a questo tessuto spiccate proprietà meccaniche (durezza e resistenza alla compressione, alla trazione e alla torsione), congiuntamente ad una notevole leggerezza. In virtù di queste proprietà, il tessuto osseo costituisce un materiale ideale per la formazione delle ossa dello scheletro, che costituiscono nel loro insieme l'impalcatura di sostegno dell'organismo. Inoltre, dato il notevole contenuto in sali di calcio, il tessuto osseo rappresenta il principale deposito di ione calcio per le necessità metaboliche dell'intero organismo [21]. La deposizione del calcio nell'osso e la sua mobilizzazione, finemente controllate da meccanismi endocrini, contribuiscono in modo sostanziale alla regolazione dei livelli plasmatici di questo ione.

1.1 Proprietà meccaniche dell'osso

Le proprietà meccaniche dell'osso sono molto variabili in virtù della loro dipendenza da due fattori:

- *fattori compositivi*
- *fattori organizzativi*

I principali fattori composizionali sono il grado di mineralizzazione e la porosità; è intuitivo che la resistenza e la rigidità aumentano al crescere del contenuto di fase minerale nell'osso e diminuiscono all'aumentare della porosità del materiale. Tra i fattori organizzativi, invece, ha un peso notevole la disposizione delle fibrille di collagene, nonché l'organizzazione spaziale delle trabecole [22].

Ciò che rende in realtà complessa la valutazione globale delle proprietà meccaniche dell'osso è il fatto che tali variabili sono fortemente anisotrope: ciò è dovuto al fatto che nell'osso è possibile distinguere una ben definita organizzazione gerarchica che prevede diversi livelli strutturali, per ognuno dei quali è necessario individuare le relazioni che legano le proprietà meccaniche alla struttura stessa [23].

Le proprietà meccaniche dell'osso dipendono da molteplici fattori:

1. CONTENUTO DI ACQUA NEL TESSUTO

Un campione secco mostra un leggero aumento del modulo di elasticità ma minore resistenza a rottura, minore allungamento ed in genere minore tenacità.

2. DIREZIONE DI APPLICAZIONE DEL CARICO

L'effetto della direzione del carico è sensibile in quanto la struttura dell'osso è fortemente anisotropa.

3. VELOCITÀ DI APPLICAZIONE DEL CARICO

Il tessuto osseo può essere considerato un materiale **viscoelastico**. In particolare, al crescere della velocità di carico il materiale risponde più rigidamente mostrando un modulo elastico più elevato. Tale risposta può essere attribuita ad un'azione prevalente della componente minerale. Al contrario, per velocità di carico più modeste, la risposta della componente fibrosarisulta preponderante ed il modulo, quindi, risulta progressivamente più piccolo.

4. AMMONTARE DI FASE MINERALE

L'aumento di sostanza minerale causa un aumento di densità, una diminuzione del lavoro necessario per rompere l'osso e della resistenza a flessione aumentando il modulo di Young [20].

In Tab. 1.2 sono riportati alcuni valori delle proprietà meccaniche di diverse tipologie di ossa in condizioni di riferimento:

Tipo di osso	Direzione della prova	Modulo di elasticità [GPa]	Sforzo a rottura per Trazione [MPa]	Sforzo a rottura per compressione [MPa]
Ossa arto inferiore				
femore	Longitud.	17,2	121,0	167
tibia	"	18,1	140,0	159
perone	"	18,6	146,0	123
Ossa arto superiore				
omero	"	17,2	130,0	132
radio	"	18,6	149,0	114
ulna	"	18,0	148,0	117
Vertebre cervicale	"	0,23	3,1	10
lombare	"	0,16	3,7	5
Cranio	tangenz. radiale	-	25,0	-
			-	97

Tab. 1.2: Proprietà meccaniche dell'osso [20]

Da un punto di vista macroscopico, si distinguono due varietà di osso: l'osso spugnoso e l'osso compatto, mostrati in Fig.1.2.

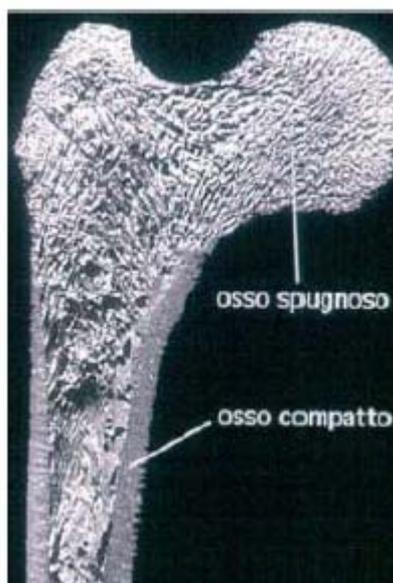


Fig. 1.2: Osso compatto e osso corticale

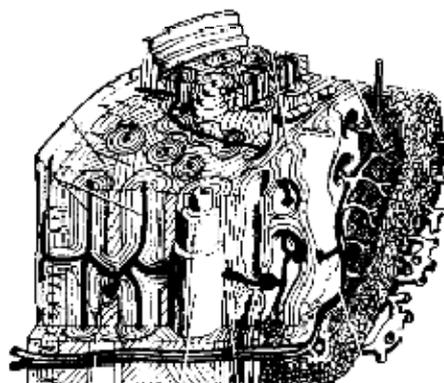


Fig. 1.3: Osso corticale

L'osso **compatto** o **corticale** (Fig. 1.3):

- rappresenta l'80% dello scheletro;
- è componente quasi esclusiva delle ossa lunghe e piatte;
- assume forma tubolare nelle ossa lunghe, delimitando il canale midollare;

- è rivestito all'esterno dal periostio ed all'interno dall'endostio;
- ha un comportamento anisotropo, presenta cioè maggiore resistenza alle forze applicate lungo il proprio asse verticale;
- ha una densità di $1,8 \text{ g/cm}^3$.

L'osso **trabecolare** o **spugnoso** (Fig. 1.4):

- è organizzato in trabecole, prevalentemente orientate in senso perpendicolare tra loro, delimitanti le cavità midollari;
- lo si ritrova principalmente a livello delle ossa brevi, delle ossa piatte e delle epifisi delle ossa lunghe;
- le trabecole verticali sono più grosse e sopportano il carico;
- le trabecole orizzontali stabilizzano le verticali;
- la parte di spazio non occupata da tessuto osseo è costituita da midollo ematopoietico e tessuto adiposo;
- L'architettura è tutt'altro che casuale in quanto le trabecole sono conformate secondo l'andamento delle linee isostatiche (ovvero quelle direzioni lungo cui sono dirette esclusivamente tensioni normali e pertanto l'osso risulterà semplicemente teso o compresso) corrispondenti alla sollecitazione prevalente a cui sono sottoposte
- la sua densità può variare tra $0,1$ ed 1 g/cm^3 [24, 25].

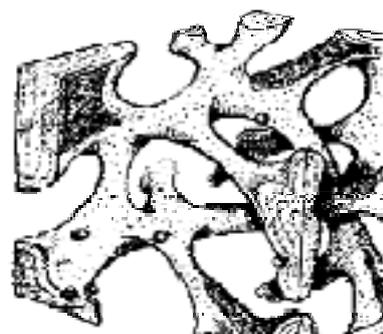


Fig. 1.4: Osso trabecolare

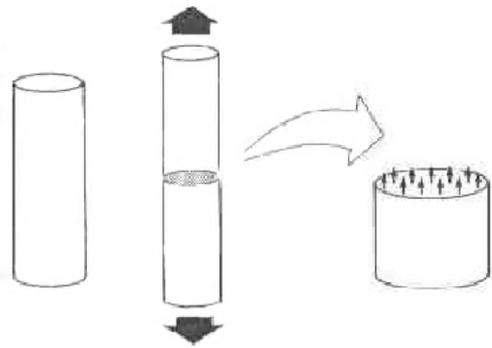
Caratteristiche strutturali	Corticale	Spongioso
Fraz.volumetrica (mm^3/mm^3)	0.90 (0.85-0.95)	0.20 (0.05-0.60)
Superficie/Volume (mm^2/mm^3)	2.5	20
Volume totale (mm^3)	1.4×10^6	0.35×10^6
Superficie interna (mm^2)	3.5×10^6	7.0×10^6

Tab. 1.3: Alcune caratteristiche strutturali dell'osso corticale e spongioso [26]

1.2 Stati di sollecitazione dell'osso

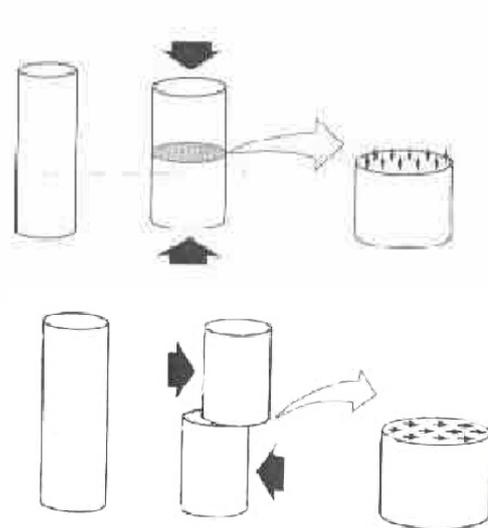
Le ossa, durante la loro attività giornaliera, sono sottoposte a varie tipologie di sollecitazioni meccaniche (trazione, compressione, piegamento, taglio, torsione etc.). In realtà, nell'organismo vivente, tutte le sollecitazioni possono intervenire contemporaneamente, il che rende piuttosto difficoltosa una modellazione teorica dello stato di sollecitazione in grado di riprodurre quantomeno fedelmente i comportamenti reali. Si riportano i tipi di sollecitazione caratteristici delle ossa :

I. **Trazione:** in tal caso due carichi uguali ed opposti sono applicati alle estremità del tessuto verso l'esterno, in modo tale che all'interno della struttura risulti una distribuzione uniforme di forze diretta lungo l'asse di applicazione dei carichi. In queste



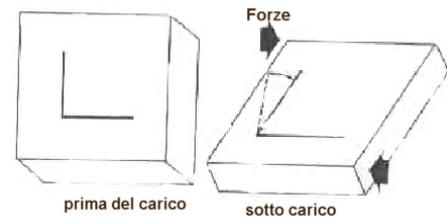
condizioni la struttura si allunga in direzione assiale e si assottiglia lungo le altre due direzioni.

II. **Compressione:** carichi uguali e opposti sono applicati alle estremità dell'osso, ma stavolta diretti verso l'interno: anche in questo caso si osserva, all'interno della struttura, una distribuzione uniforme di forze, su un piano perpendicolare alla direzione di applicazione del carico, che determina un accorciamento in direzione assiale ed un allargamento del corpo in direzione radiale. La valutazione delle



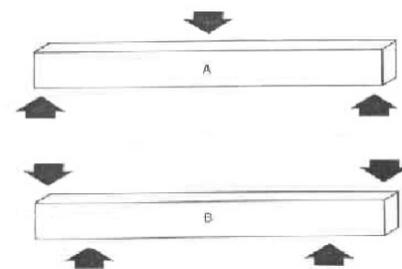
sollecitazioni a compressione è molto importante in quanto esse sono spesso la causa di fratture, ad esempio, nelle vertebre, in soggetti affetti da patologie degenerative del tessuto osseo quali l'osteoporosi.

III. Carichi in direzione di **taglio**: viene applicata una tensione parallelamente alla superficie della struttura. Ne risultano forze di taglio e tensioni all'interno della struttura. La forza di taglio può essere pensata come una distribuzione di forze



che agisce sulla superficie della struttura, su un piano parallelo a quello in cui è applicato il carico. Una struttura sottoposta a una sollecitazione di questo tipo si deforma internamente. Forze di taglio possono essere presenti nel caso in cui ci sia l'azione sia di sollecitazioni a trazione che a compressione. In vivo, fratture dovute a forze di taglio si osservano principalmente nell'osso spugnoso.

IV. **Flessione**: i carichi sono applicati in modo che la struttura subisca una curvatura lungo il proprio asse. Il campione, in questo modo, è sottoposto sia a sforzi di trazione che di compressione. Poiché il tessuto osseo non ha una struttura omogenea, le tensioni non sono distribuite in modo simmetrico. Una flessione può essere ottenuta mediante



l'applicazione di diverse forze contemporaneamente (in tal senso possono essere realizzate prove di flessione a tre o a quattro punti). Sollecitazioni flessionali sono tipiche di fratture in particolare nelle ossa lunghe (tibia, femore, ossa del braccio).

V. **Torsione**: il carico è applicato in modo da ottenere una rotazione attorno ad un asse, e all'interno della struttura si ottiene una coppia: in questo caso le forze di taglio sono presenti sull'intero sistema.



VI. **Carichi combinati**: Solo teoricamente è possibile pensare ad un osso sottoposto a un singolo tipo di sollecitazione come quelle viste in precedenza. Generalmente, anche nei movimenti che appaiono più semplici, le ossa subiscono sollecitazioni più complesse.

Tali sollecitazioni combinate a cui sono sottoposte le ossa dipendono anche da molteplici fattori di diversa natura [27].

- **l'azione dei muscoli**, la quale può produrre tensioni di compressione che sono in grado di compensare (parzialmente o totalmente) forze di trazione cui è sottoposto l'osso; tale capacità di compensazione si riduce con l'aumentare dell'affaticamento del muscolo.
- la **velocità** di applicazione del carico, poichè l'osso è un materiale viscoelastico. In Fig. 1.5 è mostrato il differente comportamento di una porzione di osso corticale sottoposto a carichi applicati con diversa velocità.

Questo fattore è importante, poiché influenza il modo in cui un osso subisce una frattura e, di conseguenza, condiziona il grado di danneggiamento dei tessuti molli circostanti. In particolare, se la velocità di carico è bassa, l'energia immagazzinata nell'osso si può dissipare in un'unica rottura (e i tessuti circostanti rimangono intatti) in quanto la risposta del materiale risente, in maniera proporzionale alla velocità di carico della presenza delle fibre di collagene che riducono la rigidità (in quanto abbassano il modulo elastico complessivo) ma ne aumentano la tenacità.

Al contrario, se la velocità di carico è alta, l'energia si dissipa in fratture multiple, provocando la formazione di numerosi frammenti in grado di rovinare anche i tessuti circostanti il segmento osseo. Tale comportamento è dovuto ad una risposta di natura fragile dovuta alla maggior incidenza della componente minerale di idrossiapatite nella risposta meccanica del tessuto osseo naturale.

- la **ripetitività** con cui un carico è applicato all'osso (**carichi ciclici**): le fratture oltre ad essere provocate da un carico maggiore rispetto della massima tensione sopportata del tessuto, possono essere originate dall'applicazione ripetuta di carichi di minore intensità e comunque al di sopra di un certo valore di soglia legato alla natura del materiale ed alla sua resistenza a fatica. In particolare, esperimenti

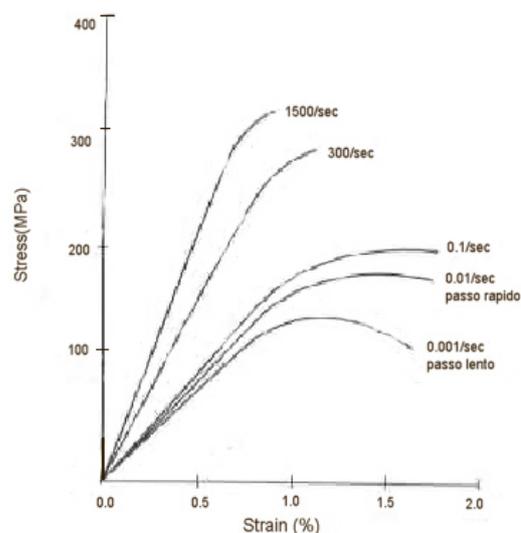


Fig. 1.5: Differente risposta dell'osso in relazione alla velocità di carico: all'aumentare della frequenza di carico aumenta il modulo elastico.[27]

compiuti su campioni di ossa in vitro, hanno permesso di osservare che l'applicazione ripetuta di piccoli carichi è sempre causa di microfratture che, mediamente, in un soggetto normale vengono riassorbite mediante processi di rimodellamento osseo. Solo in caso di frequenze di carico troppo elevate tali microfratture possono essere degenerative, in quanto i processi fisiologici di rimaneggiamento osseo non sono in grado di ripararle adeguatamente [27].

- La **geometria dell'osso**: la morfologia e le dimensioni delle ossa influenzano significativamente la risposta meccanica del tessuto; ad esempio, il carico a rottura (nel caso di sforzi a compressione e a trazione) e la rigidità di un segmento osseo sono proporzionali alla sezione dell'osso stesso, poichè ad una sezione maggiore corrisponde un osso più rigido e più resistente. Anche la lunghezza dell'osso ne influenza le proprietà meccaniche, soprattutto in risposta alle sollecitazioni flessionali e agli sforzi a compressione a seguito dell'accentuarsi dei problemi di svergolamento.
- L'**età** del soggetto: con l'aumentare degli anni si riduce la densità dell'osso. Ciò determina un progressivo assottigliamento nell'osso corticale, una riduzione generale della massa nell'osso trabecolare, a seguito dell'assottigliamento delle trabecole longitudinali e del riassorbimento di quelle trasversali. Ad esempio nel 1990 **Mosekilde** studiando il corpo vertebrale ha riscontrato, in funzione dell'incremento dell'età, una perdita nella continuità delle trabecole. Una perdita di continuità e di elementi strutturali può essere la causa di fratture locali associate alla formazione di microcalli. Mosekilde sulla base di sperimentazioni condotte su vertebre lombari ha osservato in soggetti con età nell'intervallo tra 18-85 anni una riduzione progressiva del modulo elastico E del 17%, per decade, in direzione assiale. Inoltre, è stata osservata una riduzione della resistenza alla rottura stimata del 6%, per decade, ed un notevole incremento dell'anisotropia dell'architettura trabecolare.

La causa meccanica più comune di fallimento delle protesi osee è la perdita di fissazione del componente protesico all'osso, che spesso è il risultato del cedimento dell'osso. La migrazione dei componenti protesici può essere inteso come un fenomeno meccanico, piuttosto che come un processo biologico. Poichè tutte le

protesi sono sostenute da osso spongioso da molti è ammesso che la migrazione a medio termine sia dovuta al collasso o al riassorbimento dell'osso periprotetico.

Queste sollecitazioni teoriche nell'osso spongioso superano la resistenza a fatica “in vitro”, con la possibilità di collasso del tessuto per lunghi periodi di tempo. Il rischio di cedimento dell'osso spongioso può essere direttamente proporzionale all' entità delle sollecitazioni e inversamente proporzionale alla capacità dell'osso di sopportarle [28].

1.3 Rimodellamento osseo

Il tessuto osseo è metabolicamente molto attivo poichè in esso coesistono continui processi di riassorbimento e di deposizione ossea, mirati ad adeguarne la struttura alle diverse e variabili sollecitazioni meccaniche a cui l'osso è sottoposto, contribuendo alla regolazione del quantitativo di calcio presente nell'organismo, in equilibrio con gli ioni calcio liberi presenti nel plasma [29]. Le modificazioni morfo-funzionali del tessuto osseo vengono indicate con il termine di **rimodellamento osseo**, inteso come il risultato di fenomeni di riassorbimento e di deposizione di osso, rivelabili microscopicamente, che non comportano cambiamenti macroscopici della forma del segmento osseo coinvolto [30]. In altri termini il rimodellamento osseo è un fenomeno per il quale l'osso è in grado di ottimizzare la sua forma in funzione del carico che deve sopportare. Ciò significa che sia la forma, sia le dimensioni delle sezioni resistenti delle ossa hanno capacità “*adattative*” in risposta alle sollecitazioni meccaniche a cui l'osso è sottoposto [20].

Il rimodellamento osseo si realizza in virtù della presenza di una varietà di cellule nel tessuto che svolgono diverse funzioni; esso inizia con il reclutamento di **preosteoclasti**, che vengono spinti nel sistema circolatorio e indotti a convertirsi in osteoclasti, una volta giunti nelle sedi in cui deve avvenire il riassorbimento di osso. Gli **osteoclasti** hanno la capacità di consumare lentamente il tessuto osseo grazie alla secrezione di acido lattico, che scioglie i minerali di calcio e di magnesio depositati sull'osso, e grazie ad uno speciale enzima proteolitico, che scompone e digerisce la sostanza organica del tessuto osseo in cui i sali sono contenuti [31].

Analogamente, altre cellule dette **osteoprogenitrici**, danno vita a nuovi osteoblasti che aderiscono alle pareti delle cavità di riassorbimento e depongono strati successivi di osso formando le lamelle concentriche di una struttura cilindrica che prende il nome di **osteone**. I residui delle precedenti generazioni di osteoni, non completamente riassorbiti, andranno ad alimentare la **breccia ossea**. Nell'essere umano, già a partire dal primo anno di vita, viene depositato soltanto osso lamellare (cosiddetto **osso secondario**) che rimpiazza rapidamente i residui di osso fibroso (cosiddetto **osso primitivo, o primario**). Si può osservare che, col progredire dell'età dell'individuo, si assiste ad una perdita progressiva di tessuto osseo, con riduzione della massa ossea totale, che causa la patologia, nota in medicina come **osteoporosi**, che determina un maggiore fragilimento delle ossa le quali divengono suscettibili a fratture spontanee o a traumi di modesta entità [32].

Molti studi sono stati compiuti nel tentativo di definire l'origine di tale fenomenologia; nel diciannovesimo secolo il chirurgo **Julius Wolff** affermò: “*la forma dell'osso segue la funzione*“ intendendo che l'architettura dell'osso è influenzata dagli stress meccanici associati al normale funzionamento [33] e che l'attivazione dei meccanismi di formazione di osteoclasti e osteoblasti che determinano il rimodellamento dell'osso si realizza in presenza degli sforzi mentre laddove il carico non è applicato si verifica un fenomeno di riassorbimento osseo [34]. Successivamente egli ha mostrato che la formazione dell'osso aumenta nelle zone di compressione mentre diminuisce nelle zone soggette a tensione [35].

Da qui la definizione delle **leggi di Wolff** riassunta dalle seguenti tre leggi qualitative:

- 1) il rimodellamento osseo è governato da sollecitazioni flessionali, non dagli sforzi principali;
- 2) il rimodellamento osseo è stimolato da carichi dinamici ciclici, non da carichi statici;
- 3) la flessione dinamica produce una crescita ossea nella zona in cui la flessione causa la concavità [20];

Per un carico ottimale applicato, la formazione di nuovo osso prevale sul riassorbimento, mentre laddove le condizioni di carico non risultino adeguate, in quanto troppo modeste o eccessivamente elevate, il meccanismo di riassorbimento dominerebbe sulla deposizione ossea [36].

Ricerche compiute negli anni 50, ad opera dello scienziato **Iwao Yasuda**, sottolineano il ruolo che possono avere, in tali meccanismi, le proprietà piezoelettriche dell'osso; esse sono attribuibili al fatto che, quando si applica uno sforzo meccanico sulla struttura fortemente anisotropa del tessuto osseo, esso genera un impulso elettrico che stimola gli osteociti a registrare, attraverso correnti piezoelettriche, il carico e le torsioni sulla parte di lamella ossea interessata dal carico e a costruire una struttura ossea adeguata alle funzioni meccaniche richieste [37].

Un'altra valutazione interessante è stata compiuta da **Bassett and Becker**, nel 1962 che, in questa direzione, hanno improntato dei modelli teorici tesi ad identificare l'osso, in qualità di composito, in una giunzione P-N nella quale le fibre di collagene costituiscono il componente di tipo N e l'apatite il componente di tipo P ottenendo dei risultati che qualitativamente concordano con le leggi di Wolff [38].

Capitolo 2

Ingegneria dei Tessuti

Negli ultimi decenni, la cura di anomalie congenite e di traumi caratterizzanti tessuti o organi del corpo umano è stata realizzata attraverso l'impiego di organi e tessuti artificiali o derivanti da donatori. Tali tecniche presentano, però, notevoli limitazioni, legate principalmente a problemi di rigetto, possibilità di infezioni nel sito di innesto e rischio di trasmissione di patologie di varia natura. Il problema principale, legato all'utilizzo di organi artificiali, sta nell'ipotesi di fondo, piuttosto debole, di voler sostituire una parte di un complesso sistema vivente con una protesi, cioè un sistema artificiale inevitabilmente più semplificato. Anche se tale approccio è stato notevolmente implementato negli ultimi anni, grazie ai progressi fatti nel campo dell'ingegneria biomedica, ad oggi si riscontrano ancora problemi legati alla biocompatibilità e biofunzionalità. In particolare, la biofunzionalità si riferisce alle proprietà che un dispositivo deve avere per riprodurre una determinata funzione del tessuto, dal punto di vista fisico e meccanico; la biocompatibilità, invece è la capacità del materiale di integrarsi nel tessuto-bersaglio senza causare reazioni di rigetto o in qualsivoglia modo nocive all'organismo.

Il diverso approccio legato al trapianto, nonostante consenta di recuperare integralmente le funzionalità dell'organo da sostituire, presenta, oltre ai problemi sopraelencati, una limitazione legata alla carenza di donatori a fronte di una sempre maggiore richiesta di organi e tessuti.

Tali limitazioni legate all'impiego di organi e tessuti artificiali o derivanti da donatori, hanno portato negli ultimi anni allo sviluppo di una nuova scienza, l'Ingegneria dei Tessuti, che è diventata rapidamente un importantissimo filone di ricerca, oggetto di rilevanti investimenti [1].

L'Ingegneria dei Tessuti (TE) è una scienza multidisciplinare che, attraverso i principi della chimica, della biochimica, della medicina, dell'ingegneria, della fisica e della matematica, si propone di costruire *in vitro* tessuti biologici destinati alla sostituzione di parti del corpo umano danneggiate o affette da patologie [39].

Il termine **Tissue engineering** è stato introdotto per la prima volta dagli organizzatori del Ist congress NSF nel 1988 per identificare “l’insieme dei principi e dei metodi delle scienze mediche ed ingegneristiche atti a stabilire le relazioni fondamentali tra struttura e funzioni di tessuti sani o patologici di mammiferi” [40].

Nel tempo il concetto di ingegneria dei tessuti ha subito notevoli evoluzioni passando attraverso molteplici definizioni continuamente arricchite e perfezionate.

Le definizioni, riportate nel seguito, introdotte dagli scienziati **Langer** e **Vacanti**, racchiudono in maniera completa ed esaustiva i principi essenziali sui quali si fonda tale scienza:

“L’Ingegneria dei Tessuti è quel settore interdisciplinare che applica i principi dell’ingegneria e delle scienze che studiano la vita per lo sviluppo di sistemi in grado di restituire, conservare e migliorare le funzioni del tessuto” (Vacanti 1995);

“Il suo obiettivo primario è quello di ripristinare le funzionalità dei tessuti mediante l’impianto di elementi “viventi” che siano in grado, in tempi clinicamente accettabili, di diventare parte integrante dell’organismo in cui vengono introdotti, con ridotti margini di insuccesso postimpianto” (Langer 1999) [2].

La TE è caratterizzata dalle seguenti fasi di sperimentazione (Langer, 1999):

- I. **Scelta delle cellule da impiantare:** esse devono essere identificate, isolate e moltiplicate in maniera sufficiente per la proliferazione in vivo;
- II. **Realizzazione di substrati** su cui depositare le colonie cellulari: progettazione della composizione e struttura dei materiali, e della loro geometria;
- III. **Coltivazione in vitro:** le cellule sono uniformemente distribuite sul substrato e lasciate crescere in ambiente fisiologico simulato

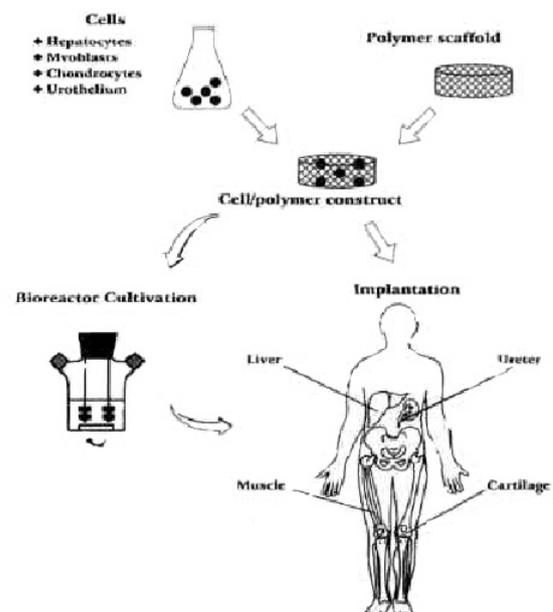


Fig. 2.1: Schema rappresentativo delle fasi di sperimentazione che caratterizzano la tissue regeneration [41]

all'interno di un bioreattore;

IV. **Impianto in vivo:** la struttura ingegnerizzata, caricata con le cellule, viene collocata nel sito di interesse al fine di ottenere un'integrazione ottimale con i tessuti circostanti [2].

L'ingegneria dei tessuti mira, pertanto, alla rigenerazione di tessuti danneggiati grazie all'utilizzo di tre fattori chiave: cellule, scaffold e fattori di crescita. In particolare, le cellule hanno il ruolo di sintetizzare il nuovo tessuto, mentre lo scaffold deve fornire un supporto temporaneo alla crescita del nuovo tessuto, permettendo alle cellule di assolvere alla propria funzione. Inoltre, scaffold di ultima generazione mirano non solo a fornire un supporto strutturale alla crescita del nuovo tessuto, ma anche a guidare il processo di rigenerazione attraverso il rilascio controllato nello spazio e nel tempo di specifici fattori bioattivi. I fattori di crescita sono proteine, il ruolo è di promuovere e guidare le cellule nella rigenerazione del neotessuto [1].

2.1 Cellule

Le cellule sono, insieme ai materiali che costituiscono i substrati, la materia prima alla quale si attinge nell'ingegneria dei tessuti. Al loro interno esse presentano una struttura ben definita caratterizzata da un nucleo centrale all'interno del quale è conservato il corredo cromosomico, che definisce il patrimonio genetico (genoma) della cellula (Fig. 2.2).

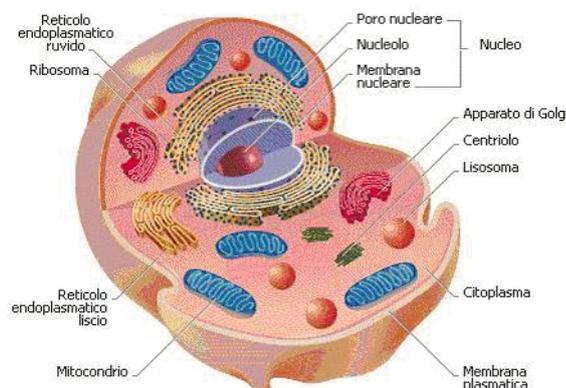


Fig. 2.2: Rappresentazione di una cellula in sezione

Esternamente esse sono rivestite da una membrana cellulare costituita da molecole lipidiche rivolte con la loro estremità idrofilica verso la matrice extracellulare esterna [42].

All'interno del corpo umano sono presenti circa 200 tipologie di cellule differenti, aventi tutte lo stesso corredo genetico, ma una differente programmazione della propria attività genetica. In altri termini, le cellule sono “differenziate” in relazione alla presenza di proteine regolatrici all'interno del loro corredo proteico in grado di attivare solo alcune funzioni di tale patrimonio. Parallelamente ad esso sono attivi i processi di riproduzione cellulare necessari alla loro proliferazione: essi favoriti nel caso di cellule indifferenziate (da qui il motivo per cui le cellule staminali, che sono le cellule *ab origine* dell'organismo di ciascun essere vivente, sono quelle più adatte alla coltivazione per la realizzazione di nuovi tessuti).

Sia i meccanismi di differenziamento che quelli di riproduzione cellulare sono alla base dell'ingegneria dei tessuti e tali processi risultano fortemente influenzati dalla presenza di un substrato solido. La proliferazione cellulare, infatti, risulta condizionata in maniera significativa dalla più o meno favorevole adesione delle cellule al substrato; quindi, il successo della TE è fortemente condizionato dalla scelta dei materiali impiegati per la realizzazione della struttura di supporto [41]. La selezione delle tipologie di cellule da utilizzare è basata sul tipo di tessuto da rigenerare. Nell'ambito specifico dell'ingegnerizzazione di scaffold per la rigenerazione del tessuto osseo, in cui si inserisce il presente lavoro di ricerca, sono utilizzati osteoblasti, cellule giovani e molto attive derivanti da cellule mesenchimali presenti nel tessuto connettivo [42].

2.2 Scaffold

Affinché si possa rigenerare il tessuto naturale si devono realizzare strutture tridimensionali cui indurre stimoli adeguati alla ricrescita tessutale. Recenti studi dimostrano, infatti, che cellule isolate sono difficilmente in grado di organizzarsi spontaneamente per formare tessuti complessi in assenza di strutture tridimensionali che le guidino e ne stimolino le attività [3]. Nella quasi totalità dei casi esaminati le cellule in coltura tendono a moltiplicarsi e proliferare soltanto in due dimensioni. La

rigenerazione di tessuti tridimensionali richiede, quindi, un supporto (scaffold) che emuli la matrice extracellulare per l'organizzazione delle cellule in strutture complesse. Il ruolo dello scaffold è quello di indurre la rigenerazione tessutale fornendo una "guida temporanea" per la crescita cellulare, sotto appropriate condizioni di coltura, per assecondare il programma di differenziazione [1].

2.2.1 Proprietà

I materiali (naturali o artificiali), utilizzati nell'ambito della realizzazione di scaffold per tessuti ortopedici, devono soddisfare opportuni requisiti:

- ✓ **Biocompatibilità:** il materiale utilizzato non deve determinare alcun tipo di alterazione nei tessuti con cui viene a contatto. La biocompatibilità è un requisito fondamentale, legato alla necessità di migliorare e/o ripristinare una determinata funzione biologica, senza interferire o interagire in modo dannoso con le attività fisiologiche dell'organismo [20].
- ✓ **Bioattività:** I materiali bioattivi favoriscono le interazioni dirette di tipo biochimico con il tessuto biologico, che può crescere sulla superficie del materiale stesso. Tutto ciò permette l'instaurarsi di un solido legame dal punto di vista meccanico tra il tessuto naturale e l'impianto protesico. In particolare, nell'ambito della rigenerazione del tessuto osseo si può definire: osteoconduzione e osteoinduzione [20].
- ✓ **Osteoconduzione:** intesa come la capacità di favorire una buona adesione delle cellule alla matrice stessa; i materiali impiegati devono infatti facilitare l'adesione cellulare sulla superficie dello scaffold [43].
- ✓ **Osteoinduzione:** intesa come la capacità dello scaffold di favorire, in un ambiente non osseo, la differenziazione di cellule staminali totipotenti in condrociti e osteoblasti per culminare nella formazione di tessuto osseo completo [43].
- ✓ **Bioassorbibilità:** il tempo di degradazione dei materiali che costituiscono l'impalcatura deve essere strettamente coordinato a quello della formazione del nuovo tessuto: la degradazione troppo rapida della matrice non permette la formazione di un tessuto completo e robusto. Tempi troppo lunghi, al contrario

inducono invece la formazione di tessuto attorno allo scaffold in modo imperfetto o incompleto [44].

- ✓ **Compatibilità meccanica:** i materiali impiegati devono mostrare caratteristiche meccaniche (moduli elastici, risposte a tensioni applicate) compatibili con quelle del tessuto sostituito [43].
- ✓ **Chimica di superficie:** la funzionalità chimica della superficie (proprietà che dipende dal materiale) è un fattore importante che influenza sia l'adesione delle cellule, la loro migrazione e la segnalazione intracellulare *in vitro*, che il reclutamento cellulare e la cicatrizzazione dell'interfaccia tessuto-scaffold *in vivo*.
- ✓ **Lavorabilità:** in fase di costruzione e di impianto i materiali impiegati devono essere facilmente modellabili in modo da permettere il loro completo adattamento in funzione del tipo di impiego.
- ✓ **Indeformabilità post-impianto:** Il materiale, una volta impiantato, deve risultare indeformabile per guidare l'avanzamento del tessuto in crescita garantendone il corretto sviluppo all'interno della matrice tridimensionale.

Oltre ai requisiti di base dei materiali, l'ingegneria dei tessuti ha, inoltre, evidenziato l'importanza delle proprietà macro- e microstrutturali degli scaffold.

Alcune proprietà influenzano non solo la sopravvivenza, la crescita, la diffusione e la riorganizzazione delle cellule, ma giocano anche un ruolo fondamentale nell'influenzare il tipo di forma delle cellule e l'espressione genica che è connessa con la crescita cellulare e con la conservazione dei fenotipi originari [45].

Di seguito verranno riportate le proprietà degli scaffold essenziali per la crescita cellulare:

- ✓ **Porosità elevata e interconnessa:** Gli scaffold devono possedere una struttura altamente porosa per permettere la crescita e la riorganizzazione cellulare *in vitro*, fornendo lo spazio necessario per la neovascolarizzazione dei tessuti circostanti *in vivo*. Una microstruttura altamente porosa costituita da un reticolo di pori interconnessi è un requisito fondamentale per la successiva distribuzione uniforme delle cellule nello spazio, la loro sopravvivenza, la loro proliferazione e migrazione *in vitro*. La porosità degli scaffold ed il grado di interconnessione dei pori influisce, infatti, direttamente sulla diffusione delle sostanze nutritive e

sulla rimozione dei rifiuti metabolici. L'elevata porosità e l'interconnessione dei pori negli scaffold consente l'uso di bioreattori per creare microambienti idrodinamici con un minimo numero di vincoli alla diffusione, che rispecchiano fortemente le condizioni fluidodinamiche *in vivo* per ottenere una comunità di cellule ampia e ben organizzata [45]

- ✓ **Dimensione dei pori adeguata all'applicazione d'interesse:** La diversa architettura dei tessuti richiede microambienti differenti per la loro rigenerazione; ciò richiede l'utilizzo di scaffold con una dimensione dei pori ottimale. Per quanto riguarda la rigenerazione del tessuto osseo alcuni ricercatori [46] hanno indicato che occorrono pori con range dimensionale da 200 a 400 μm , mentre Yoshikawa e altri [47-49] hanno utilizzato con successo scaffold con dimensione dei pori di 500 μm . Quando i pori impiegati sono troppo piccoli, in relazione all'applicazione d'interesse, l'occlusione dei pori da parte delle cellule impedisce la penetrazione cellulare e lo sviluppo della matrice all'interno dello scaffold, nonché la diffusione delle sostanze nutritive e la rimozione dei rifiuti metabolici [45].
- ✓ **Elevato rapporto superficie/volume:** Rapporti elevati tra l'area della superficie interna ed il volume degli scaffold sono essenziali per ospitare l'elevato numero di cellule richiesto per sostituire o riparare tessuti o organi. Data l'esistenza di una relazione lineare tra la dimensione dei pori e l'area della superficie interna si deve trovare un compromesso tra queste due proprietà a seconda dell'applicazione dello scaffold.
- ✓ **Proprietà meccaniche compatibili con il tessuto da rigenerare:** Gli scaffold devono avere una sufficiente resistenza meccanica durante la coltura *in vitro* per mantenere gli spazi richiesti per la crescita cellulare e la produzione della matrice. Inoltre, per consentire la rapida mobilizzazione della zona trattata, nel caso di rigenerazione del tessuto osseo, lo scaffold degradabile dovrebbe conservare sufficiente resistenza meccanica in modo da tollerare qualsiasi stress e carichi fisiologici imposti sulla struttura ingegnerizzata *in vivo*. La degradazione degli scaffold deve essere regolata opportunamente in modo che conservi un'integrità strutturale sufficiente affinché il tessuto da poco sviluppatosi possa sostituire la funzione portante che aveva lo scaffold [45].

2.2.2 Materiali utilizzati

I materiali polimerici più ampiamente impiegati in campo biomedico e, più specificamente, in ingegneria dei tessuti, possono essere naturali o sintetici. I materiali naturali in uso [50] presentano spesso il vantaggio di possedere specifiche interazioni cellulari (il cosiddetto “riconoscimento cellulare”). Tuttavia, tali materiali vengono prelevati da tessuti umani o animali e, quindi, non sono sempre disponibili in grandi quantità. Inoltre, i materiali di origine naturale possono essere portatori di agenti patogeni e, inoltre, differiscono anche notevolmente tra loro dipendentemente dall’organismo da cui sono prelevati. Inoltre, tali materiali dispongono di una versatilità limitata nella costruzione di scaffold con proprietà specifiche (ad es. in termini di resistenza meccanica).

Al contrario, i materiali sintetici possono essere industrialmente riproducibili su grande scala e possono essere trasformati in una matrice tridimensionale nella quale la struttura principale, le proprietà meccaniche e la velocità di degradazione possono essere controllate e manipolate. Il principale svantaggio dei materiali sintetici consiste nella mancanza di segnali specifici per il riconoscimento cellulare.

I materiali naturali più ampiamente utilizzati nell’ambito dell’ingegneria dei tessuti sono il collagene, gli alginati, il chitosano e l’acido ialuronico.

- ✓ **Collagene:** è un componente naturale della matrice extracellulare di molti tessuti connettivi, quali ossa, pelle, tendini e legamenti. Da un punto di vista morfologico è costituito da un’intricata rete di fibrille dal diametro compreso tra i 50 e i 500 nm. Da un punto di vista strutturale/molecolare è costituito da sequenze di amminoacidi (principalmente glicina, prolina e idrossiprolina). Se utilizzato come supporto per la rigenerazione dei tessuti, agevola la proliferazione e il metabolismo cellulare. Tuttavia, è difficile regolarne la biodegradabilità e le proprietà meccaniche [51]
- ✓ **Alginati:** Sali dell’acido alginico, sono copolimeri a blocchi composti da due unità monosaccaridi, l’acido L-guluronico (G) e l’acido D-mannuronico (M). Le regioni costituite da blocchi di tipo G formano idrogeli in soluzioni acquose di cationi bivalenti (tipicamente calcio) a temperatura ambiente; tale caratteristica viene sfruttata per incapsulare farmaci, fattori di crescita e/o cellule [52] I processi di fabbricazione di scaffold a base di alginati comprendono

normalmente una fase di gelificazione attraverso la quale si ottiene l'architettura tridimensionale richiesta [52].

- ✓ **Chitosano:** è un polisaccaride derivato dalla chitina e la sua unità monomericale è una glucosammina relativamente semplice. E' biocompatibile e biodegradabile e di relativo basso costo in ragione della sua abbondanza [53].
- ✓ **Acido ialuronico:** è un polisaccaride lineare composto da unità ripetitive di acido glucuronico e N-acetil glucosammina. E' presente nella matrice extracellulare di tutti i tessuti molli e svolge un ruolo importante in diversi processi biologici [54]. Per mezzo di una reazione di esterificazione si può modificarne la struttura ottenendo un biopolimero semisintetico con proprietà fisico-chimiche differenti (in particolare la velocità di degradazione può essere variata), senza però alterarne la biocompatibilità.

I polimeri sintetici più ampiamente utilizzati nell'ambito dell'ingegneria dei tessuti sono i poliesteri biodegradabili.

- ✓ **Acido poliglicolico (PGA)**(Fig. 2.3): Tutti gli omopolimeri del glicolide e suoi sostituiti sono altamente cristallini, con intervallo di temperatura di transizione vetrosa da circa 25°C a 65°C e di temperatura di fusione da circa 185°C a 225°C. Generalmente essi possono essere fusi tramite estrusione o formatura. Il PGA è un polimero altamente cristallino, con cristallinità tipicamente in un intervallo del 35-75%. A causa del suo elevato grado di cristallizzazione, il PGA non è solubile in molti solventi organici; le eccezioni sono i solventi organici altamente fluorinati come l'esafluoroisopropanolo (HFIP). A causa della sua natura idrofilica, il PGA tende a perdere la sua resistenza meccanica rapidamente (50%), in un periodo di circa 2 settimane, e viene riassorbito circa 4 settimane dopo l'impianto [45]. Può essere completamente assorbito in 4-6 mesi.
- ✓ **Acido Polilattico (PLA)** (Fig. 2.3): Sebbene strutturalmente sia molto simile al PGA, il PLA differisce da quest'ultimo per le proprietà chimiche, fisiche e meccaniche a causa della presenza di un gruppo metile in corrispondenza del carbonio α . Questa struttura determina chiralità del carbonio α del PLA e, quindi, è possibile ottenere isomeri L,D e D,L . Dal punto di vista chimico-fisico, il polilattide (PLLA) è un materiale semicristallino relativamente duro, con temperatura di transizione vetrosa di circa 65°C e temperatura di fusione di circa

170-180°C. Il PLLA presenta un grado di cristallinità di circa 35 % [45]. Tale polimero può essere processato fuso in un range di circa 200-250 °C a seconda del suo peso molecolare.

Il PDLLA è un materiale amorfo e trasparente con una temperatura di transizione vetrosa nell'intervallo di 50-60°C, a seconda del peso molecolare. La velocità di degradazione del PDLLA è conseguentemente maggiore di quella del PLLA. In particolare, l'idrolisi del PDLLA può avvenire completamente in un periodo che va dai 2 ai 12 mesi, a seconda delle dimensioni e dello spessore del campione. Sebbene sia noto che il peso molecolare, la cristallinità e la composizione del copolimero influenzino la velocità di degradazione, alcuni aspetti della degradazione *in vitro* e *in vivo* di questi polimeri riassorbibili non sono stati ancora completamente compresi [45].

- ✓ **Policaprolattone (PCL)** (Fig. 2.3): Il policaprolattone è un poliesteri alifatico altamente biocompatibile ottenuto dalla polimerizzazione a ciclo aperto del ε-caprolattone. Dal punto di vista fisico, esso si presenta semicristallino con una temperatura di fusione di 58-63°C e una temperatura di transizione vetrosa di circa -60°C. L'unità ripetitiva del PCL, come riportato in fig. 2.3, è costituita da cinque gruppi nonpolari metilenici ed un gruppo estere relativamente polare. Questa struttura conferisce al PCL proprietà uniche simili alle poliolefine per la presenza di gruppi CH₂, mentre la presenza di collegamenti esteri-alifatici, idroliticamente instabili, causano la degradazione del polimero. Poiché l'omopolimero ha un tempo di degradazione dell'ordine di due anni, sono stati sintetizzati copolimeri per accelerare la velocità di assorbimento.

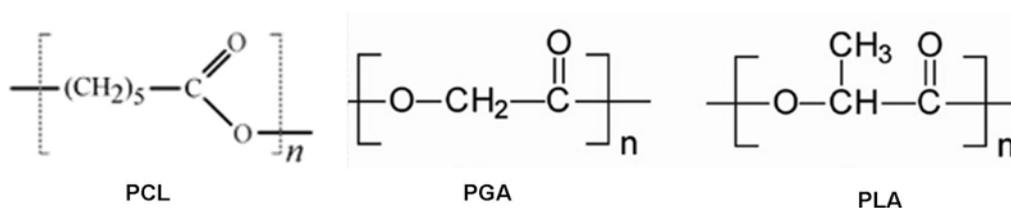


Fig. 2.3: Composizione chimica del PLA, PGA e PCL

I poliesteri sono materiali relativamente rigidi e questo rappresenta un vantaggio, nelle applicazioni di carico portante, ed uno svantaggio quando è richiesta continuità

meccanica con i tessuti soffici o vene sanguigne direttamente a contatto. Infine, nessuno di questi poliesteri possiede gruppi funzionali chimicamente reattivi per la facile adesione dei farmaci o dei mezzi biologicamente attivi [45].

Alcuni studi hanno dimostrato che a seguito del processo di degradazione *in vivo*, tali materiali secernono prodotti non tossici facilmente eliminati dall'organismo [46]. Sulla base di tali proprietà di degradazione, la realizzazione di scaffolds per la rigenerazione dei tessuti si è affermata attraverso due strategie principali di produzione. La prima riguarda le applicazioni che richiedono scaffold in grado di supportare il complesso polimero/cellule/tessuto dal momento dell'impianto delle cellule fino al rimodellamento del tessuto da parte dell'organismo *in vivo*. In particolare tali caratteristiche sono richieste nella rigenerazione di tutti quei tessuti soggetti a forze e tensioni molto intense (ad es. ossa e tessuto muscolare): in tal caso infatti è fondamentale che lo scaffold fornisca un supporto meccanico temporaneo sufficiente a sostenere i carichi che saranno applicati sul tessuto *in vivo*. Pertanto i materiali fabbricati con questa strategia devono presentare un tempo di degradazione tale da garantire la loro consistenza finché il nuovo tessuto non risulta in grado di autosostenersi [44].

In fig. 2.4a è riportato il grafico sperimentale relativo all'impianto di un tessuto secondo questa prima strategia; in cui si può notare che la curva relativa alla degradazione dello scaffold comincia e decrescere solo dopo l'impianto.

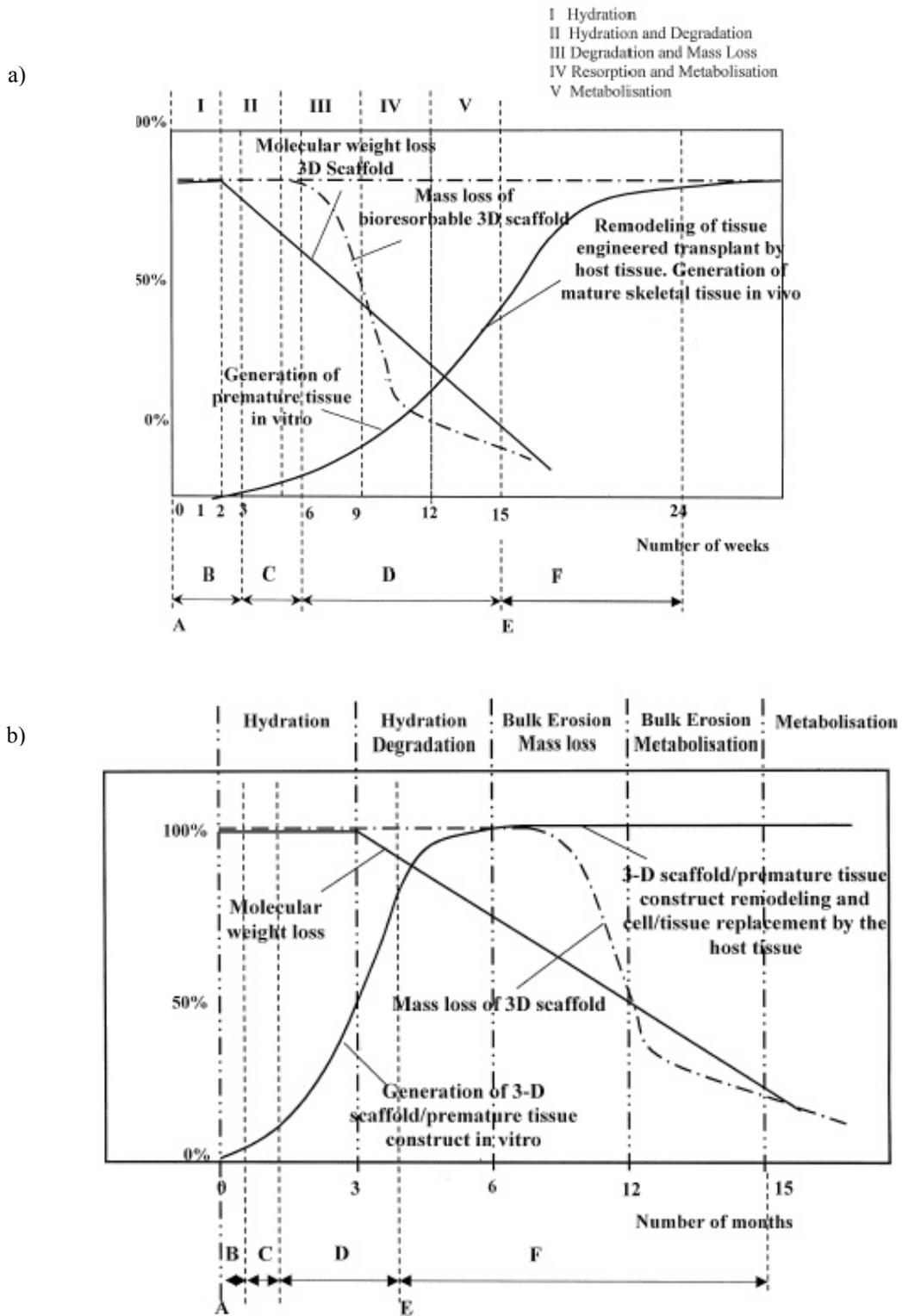


Fig. 2.4: Andamento della perdita di peso molecolare e della perdita di massa dello scaffold in funzione della strategia di produzione seguita: a) I° strategia b) II° strategia [44]

La seconda strategia (Fig. 2.4b), invece, si basa sul presupposto che le proprietà meccaniche intrinseche dello scaffold modellino la proliferazione e la differenziazione cellulare solo nella fase di crescita *in vitro*. Il supporto è mantenuto fino alla piena maturazione di un tessuto *in vitro*; solo che quest'ultimo ha raggiunto proprietà meccaniche sufficienti ad autosostenersi, il polimero si degrada e lo spazio lasciato libero viene riempito dalla crescita del tessuto. In fig. 2.4b è riportato il grafico sperimentale relativo all'impianto di un tessuto per la rigenerazione del tessuto osseo seguendo tale strategia. Da tale grafico, si può notare come al momento dell'impianto in vivo lo scaffold sia quasi completamente degradato [44].

2.2.3 Principali tecniche di realizzazione

Sulla base dei prerequisiti strutturali elencati in precedenza, uno dei principali obiettivi della produzione degli scaffold è quello di assicurare un controllo accurato sulle loro proprietà macroscopiche (e.g., geometria, resistenza meccanica, densità, porosità) e microstrutturali (e. g., dimensione , interconnessione dei pori).

Le tecniche utilizzate variano a seconda del polimero utilizzato e dell'applicazione preposta. Si descrivono nel seguito le principali tecniche utilizzate per la realizzazione di scaffold per la riparazione tessutale, riportate in tab.2.1.

Tecnologie tessili

Molte tecnologie tessili possono essere applicate per la progettazione e la fabbricazione di scaffold estremamente porosi. Le fibre, infatti, forniscono un elevato rapporto area di superficie/volume e sono, quindi, ottimi elementi per la realizzazione di scaffold.

Promettenti risultati nell'ingegneria tessutale dell'osso, della cartilagine, delle valvole cardiache, della vescica e del fegato sono stati ottenuti da sistemi *woven-no-woven*, *fibre intrecciate*, a base di fibre polimeriche di PGA, PGA/PDLA e PGA/PLLA.

Tra i vantaggi nell'utilizzo di reti di fibre vi è l'elevata area superficiale che facilita l'adesione cellulare e la rapida diffusione di agenti nutritivi per la sopravvivenza e la crescita cellulare. L'inconveniente di tali scaffold risulta essere un'insufficiente stabilità strutturale che può essere almeno parzialmente superata con una lavorazione a caldo delle fibre, che provoca un miglioramento dell'orientazione molecolare e della cristallinità [55]. Reti di fibre interconnesse sono state ottenute da Mikos et al. [56]

utilizzando la tecnica denominata *fiber bonding*, che comporta la colata di una soluzione di PLLA su fibre non tessute di PGA. Dall'evaporazione del solvente si ottiene un materiale composito formato da fibre non tessute di PGA immerse in una matrice di PLLA. La saldatura delle fibre avviene durante il successivo trattamento a temperature superiori a quella di fusione del PGA. Infine, la matrice di PLLA viene dissolta in un solvente in cui il PGA è insolubile, ottenendo una rete di fibre saldate.

La tecnica del fiber bonding produce scaffold altamente porosi con una elevata porosità interconnessa, ideale per la tissue regeneration.

Uno degli svantaggi è l'utilizzo di solventi che possono essere tossici per le cellule se non vengono completamente rimossi. Per tale motivo, la struttura ottenuta deve essere essiccata sotto vuoto per diverse ore, rendendo, quindi, difficile il loro utilizzo immediato nelle applicazioni cliniche.

Inoltre, il materiale viene riscaldato ad elevate temperature e la combinazione di sostanze tossiche e temperature estreme può determinare delle difficoltà per l'incorporazione di cellule o molecole bioattive all'interno dello scaffold, durante la sua preparazione [55].

Solvent casting-particulate leaching

Un altro metodo per realizzare scaffold porosi è il *solvent casting-particulate leaching*, che utilizza un agente porogeno idrosolubile, come, ad esempio, NaCl.

Il polimero viene dissolto in un opportuno solvente e, successivamente, si aggiunge l'agente porogeno (Fig. 2.5).

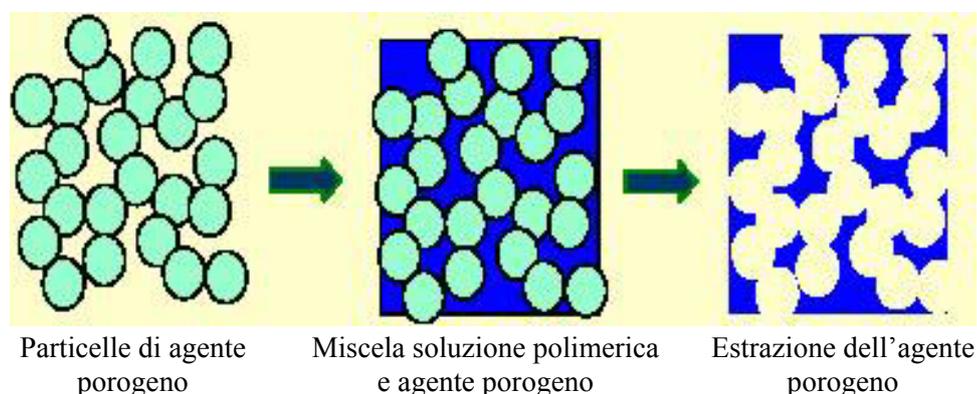


Fig. 2.5: Schematizzazione tecnica del solvent casting- particulate leaching

Successivamente all'evaporazione del solvente, la struttura polimero-sale viene immersa in acqua per permettere una completa rimozione dell'agente porogeno.

La porosità dello scaffold ottenuto può essere controllata tramite l'ammontare di sale aggiunto, mentre la dimensione dei pori dipende dalla dimensione dei cristalli di sale.

Gli scaffold realizzati con tale tecnologia, messi a contatto con diversi tipi di cellule, hanno mostrato di non determinare effetti negativi sulla formazione del nuovo tessuto.

Il problema fondamentale che tale tecnologia di preparazione presenta è che la superficie dello scaffold esposta all'aria ha una morfologia differente, più ruvida, rispetto a quella a contatto con il recipiente che lo contiene, che di contro mostra una riduzione della porosità. Inoltre, al fine di ottenere una struttura con porosità interconnessa, è necessario raggiungere valori di porosità molto elevati (> 90%), a discapito delle proprietà meccaniche.

Con la tecnica del solvent casting/particulate leaching, inoltre, vengono utilizzati solventi organici che in molti casi precludono la possibilità di aggiungere agenti farmacologici allo scaffold durante la sua preparazione [57].

Gas Foaming

La tecnica del gas foaming prevede l'utilizzo di gas (es. CO₂) ad alta pressione per la realizzazione di spugne macroporose. Tale metodo non fa ricorso all'uso di solventi organici, i cui residui andrebbero comunque eliminati prima dell'utilizzo degli scaffold in campo biomedico. A seguito della realizzazione di una soluzione polimero/gas è possibile produrre un fenomeno di instabilità termodinamica, a seguito di una depressione della fase gassosa. La creazione dei pori è legata all'instabilità termodinamica generata con il degasaggio: per minimizzare l'energia libera le molecole di gas coalescono, formando dei nuclei verso i quali altre molecole di gas disciolto diffondono, generando così dei macropori. Questo tipo di processo molto spesso determina la formazione di una struttura a pori chiusi o con scarsa interconnessione, poiché le regioni tra pori nucleanti diventeranno sempre più povere di gas disciolto [58].

Phase separation

Le tecniche di separazione ed inversione di fase consentono di convertire una soluzione polimerica omogenea in un sistema bifasico in cui la fase ricca in polimero forma la

matrice della membrana, mentre la fase povera in polimero da luogo ai pori. Il fenomeno può essere realizzato inducendo una certa instabilità termodinamica per mezzo di un cambiamento di composizione o di temperatura.

E' possibile distinguere diversi processi che sfruttano i meccanismi di inversione di fase [55, 59]:

- ✓ Precipitazione per immersione in un controsolvente (NIPS): tale tecnica consiste nell'immersione (dipping) della soluzione polimerica, preformata in uno stampo, in un bagno di coagulazione contenente un non solvente per il polimero o una soluzione di esso. Il polimero precipita per effetto dell'ingresso del non solvente e della contemporanea uscita del solvente dalla matrice polimerica.
- ✓ Precipitazione in fase vapore: il non solvente, stavolta in fase vapore penetra nella soluzione polimerica. La soluzione viene saturata rapidamente per evitare l'evaporazione del solvente, altamente volatile, dalla soluzione in modo da evitare la formazione di una struttura ad elevata densità.
- ✓ Precipitazione per evaporazione controllata: il polimero viene disciolto in una miscela contenente un solvente ed un non solvente. Il primo ad evaporare sarà il solvente, ne segue la precipitazione del polimero.
- ✓ Precipitazione per via termica: il polimero viene disciolto ad alta temperatura in una soluzione di solvente-non solvente e successivamente si induce un'instabilità termodinamica del sistema attraverso un raffreddamento controllato della soluzione forzando, in tal modo, la precipitazione del polimero.
- ✓ Precipitazione indotta termicamente (TIPS): il polimero viene disciolto ad alta temperatura nel solvente ed in seguito, per effetto di un raffreddamento rapido (quench) si induce la separazione di fase. A questo punto, il solvente può essere eliminato attraverso l'immersione (dipping) in un non solvente per il polimero.

Elettrospinning

L'elettrospinning è una delle tecnologie più impiegate nella realizzazione di fibre su scala micrometrica e nanometrica in molteplici settori dell'ingegneria e non solo [60]. Contrariamente alle convenzionali tecniche di tessitura delle fibre, che sfruttano sollecitazioni di tipo meccanico derivanti dalla natura del processo, l'elettrospinning sfrutta l'azione di forze di natura elettrostatica. In particolare, il suo principio di

funzionamento si basa sull'applicazione di un'elevata differenza di potenziale tra due elettrodi costituiti, rispettivamente, da un capillare contenente il polimero fuso o la soluzione polimerica (catodo) e da un piatto metallico (anodo) sul quale avviene la raccolta di fibre [61]. Di seguito si riporta lo schema di funzionamento dell'elettrospinning (fig 2.6).

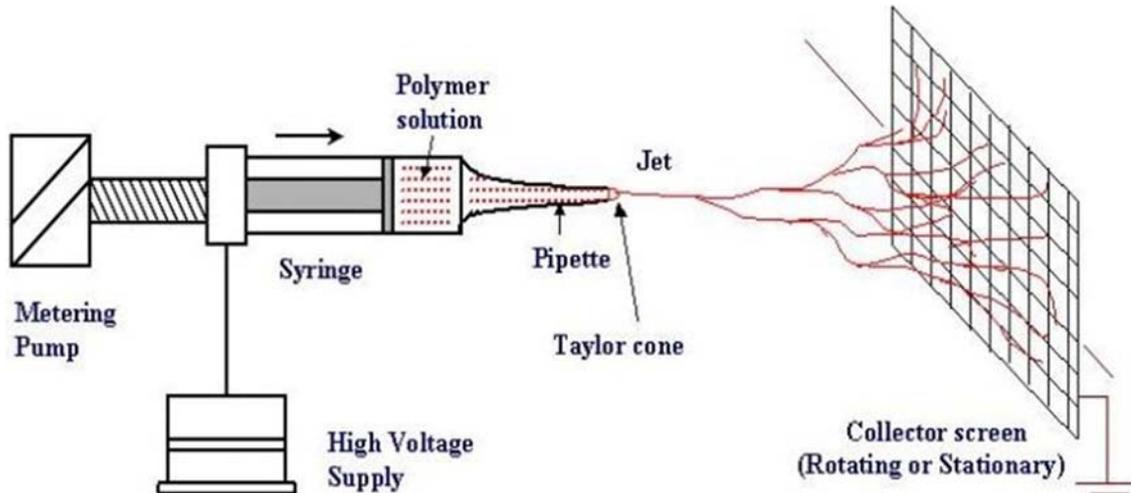


Fig. 2.6: schema di funzionamento dell'elettrospinning

A seguito dell'applicazione di una differenza di potenziale elevata, la soluzione polimerica contenuta nel capillare si polarizza e viene trascinata verso l'anodo in maniera più o meno significativa in relazione alla tensione applicata.

In particolare, sottoponendo una soluzione polimero/solvente con opportuna concentrazione all'azione di una tensione di alcuni kV, è possibile realizzare fibre polimeriche con diametri dell'ordine dei nanometri, dalla cui sovrapposizione è possibile ottenere sistemi 3D caratterizzati da una struttura woven not woven [61] [62]. Il principale vantaggio di tali scaffold risiede nella possibilità che le cellule seminate su tali tessuti non-woven siano in grado di mantenere la loro forma e guidare la crescita in accordo con l'orientazione delle fibre. Inoltre, la struttura del tessuto presenta una morfologia simile alla matrice extracellulare del tessuto nativo. Tuttavia, tale tecnologia non permette un controllo accurato della forma dello scaffold e, inoltre, permette la realizzazione di strutture con spessore limitato.

Solid free form (SFF) fabrication

Tecnologie più recenti sono basate su sistemi di elaborazione automatica delle immagini CAD (computer-aided design) e fabbricazione assistita al calcolatore CAM (computer-aided manufacturing). In campo clinico sono disponibili immagini accurate delle parti interne del corpo (tessuti e organi) grazie alla risonanza magnetica (Magnetic Resonance Imaging, MRI) e alla tomografia assiale computerizzata (TAC). Tali immagini possono essere elaborate con tecnologie denominate Rapid Prototyping (RP) o Solid Freeform Fabrication (SFF) che consentono di predefinire al calcolatore la forma microscopica e macroscopica dello scaffold. [63].

Al fine di ottenere la modellazione dei tessuti, le immagini ottenute mediante TAC e MRI vengono analizzate sulla base di modelli matematici e geometrici per ricostruire virtualmente le caratteristiche anatomiche dei tessuti, sia per una corretta classificazione che per una più accurata diagnosi nel caso di traumi. Le immagini ottenute da TAC e MRI, una volta digitalizzate, sono facilmente convertibili in un formato di dati analizzabili da elaboratori CAD/CAM, che guidano i sistemi RP attraverso appositi software di controllo numerico del computer. Tali tecniche si basano sulla ricostruzione dei tessuti strato per strato.

Sono stati sviluppati molti sistemi di RP, tra i quali stereolitography [64], three-dimensional printing (3-DP) [65] e fused deposition modeling (FDM) risultano essere i più utilizzati [66].

Tuttavia, tali metodologie di progetto, che permettono di controllare con elevata precisione morfologia ed architettura finali dello scaffold, risultano ad oggi alquanto costose, con costi che aumentano in proporzione al numero di iterazioni richieste per la fabbricazione dell'oggetto e quindi col grado di precisione richiesto.

Sinterizzazione di microparticelle

La tecnica di sinterizzazione di microparticelle polimeriche consente la realizzazione di strutture tridimensionali macroporose a seguito di una parziale fusione di particelle adiacenti indotta dalle condizioni fisiche imposte al sistema. In particolare, opportune condizioni di temperatura e/o pressione possono avviare meccanismi di incipiente fusione del polimero a partire dalla superficie delle particelle, favorendo la loro parziale compenetrazione e dando origine, al contempo, ad interstizi interparticellari che determinano la porosità macroscopica all'interno della struttura [55, 67].

Il concetto di sinterizzazione di microparticelle trae origine dal processo di densificazione di polveri, alla base dei metodi di realizzazione di materiali ceramici, e si fonda sul fatto che il sistema è in grado di ridistribuire la propria massa a seguito della formazione di gradienti di materia verso zone ad alta concentrazione di difetti cristallini, innescati da opportune condizioni di temperatura, determinando una densificazione del sistema.

Il caso più semplice di sinterizzazione di una singola fase avviene quando un aggregato di particelle viene riscaldato. Devono essere analizzate due semplici condizioni: uno stato iniziale rappresentato da due particelle in contatto ed una situazione finale in cui i pori sono chiusi in una matrice continua. Il restringimento, la densificazione e l'eliminazione dei pori avviene ad una velocità determinata dalla dimensione iniziale della particella, dal valore dell'energia di superficie e dalla viscosità del materiale. Per ottenere dei materiali porosi la sinterizzazione deve essere arrestata alla prima fase, scegliendo opportunamente i parametri.

Quando le sfere iniziano a coalescere, il colletto presenta un raggio di curvatura piccolo rispetto alla curvatura di superficie delle particelle, determinando una pressione negativa che causa un flusso viscoso del materiale lungo la regione interparticellare (Fig. 2.7) [68].

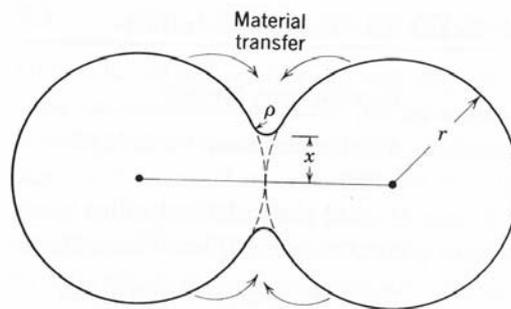


Fig. 2.7: schematizzazione di un colletto formatosi tra due microsfere a contatto

Vi sono una serie di diversi percorsi competitivi per il trasporto di materiale verso l'area del colletto durante lo stadio iniziale. Alcuni di questi conducono alla densificazione, che consiste nel processo di restringimento che determina l'avvicinamento dei centri delle microparticelle. Gli altri meccanismi di trasporto portano al *coarsening*, che

consiste nella crescita del colletto tra le particelle, ottenendo una riduzione dell'area di superficie specifica senza alcun restringimento.

Due possibili percorsi per il trasporto di materia avvengono per evaporazione-condensazione oppure per diffusione superficiale. Tali meccanismi di *coarsening* determinano lo spostamento di materia dalla superficie delle particelle al colletto, determinando una riduzione dell'energia di superficie [68].

Il meccanismo di trasporto che determina la velocità di crescita maggiore del colletto sarà il meccanismo dominante e causerà *coarsening* o densificazione.

La dimensione delle particelle è molto importante nella determinazione della velocità, in quanto, nell'equazione di sinterizzazione vi è una dipendenza inversa dal raggio delle particelle r . A parità di temperatura e composizione l'equazione della velocità per la densificazione e *coarsening* è:

$$\left(\frac{x}{r}\right)^n = \frac{k}{r^p} t$$

dove, k è una costante che contiene la tensione superficiale e il coefficiente di diffusione, n varia tra 2 e 6 e p tra 2 e 4 [68].

Negli ultimi anni, molti lavori in letteratura sono stati incentrati sulla realizzazione di scaffold porosi attraverso la sinterizzazione di microsfele polimeriche o ceramiche, al fine di superare le diverse limitazioni che si riscontrano nelle tecniche convenzionali, legate principalmente alle proprietà meccaniche, interconnessione dei pori, nonché all'utilizzo di solventi tossici. In particolare, è stato proposto un metodo di realizzazione di scaffold 3D con una struttura porosa interconnessa basato sulla sinterizzazione di microparticelle di PLGA [69-72]. Attraverso tale metodo sono stati realizzati scaffold con diametro dei pori compresi tra 100 e 300 μm e proprietà meccaniche confrontabili con quelle dell'osso trabecolare. Successivamente, sono stati progettati e realizzati scaffold compositi, ottenuti dalla sinterizzazione di microsfele di chitosano/PLGA, dotati di proprietà meccaniche idonee ad applicazioni nell'ambito dell'ingegnerizzazione del tessuto osseo [73]. Inoltre, è stato recentemente proposto un nuovo approccio, basato sulla tecnologia delle microsfele, che combina una tecnica di *sphere-templating* con un processo di fotolitografia al fine di controllare la macrostruttura dello scaffold [74].

Tuttavia, sebbene la tecnologia basata sulla sinterizzazione di microparticelle permetta di superare numerose limitazioni, legate all'utilizzo delle tecniche convenzionali, non permette di guidare la rigenerazione tessutale attraverso il rilascio controllato nello spazio e nel tempo di opportuni fattori.

Tecniche	Vantaggi	Svantaggi
Fiber bonding	Facilmente processabile Porosità elevata Elevato rapporto superficie volume	Elevate temperature di processo per polimeri ad elevato grado di cristallinità Scelta limitata di polimeri Bassa resistenza meccanica Solventi residui Basso controllo sulle microarchitetture
Phase separation	Incorporazione di agenti bioattivi Strutture altamente porose	Solventi residui Basso controllo sulle microarchitetture Range limitato delle dimensioni dei pori
Solvent casting/particulate leaching	Strutture altamente porose Ampio range di dimensioni dei pori Controllo indipendente della porosità e della dimensione dei pori	Spessore limitato delle membrane Bassa resistenza meccanica Solventi residui
Elettrospinning	Elevato rapporto superficie volume Strutture su scala submicrometrica	Difficoltà a realizzare strutture 3D Proprietà meccaniche anisotrope
Gas foaming	Assenza di solventi organici Permette l'incorporazione di agenti bioattivi	Superficie esterna non porosa Pori chiusi
Gas foaming/particulate leaching	Assenza di solventi organici Permette l'incorporazione di agenti bioattivi Struttura altamente porosa Ampio intervallo di dimensioni dei pori Controllo indipendente della porosità e della dimensione dei pori	Bassa resistenza meccanica Possibilità di agente porogeno residuo
Solid Freeform fabrication	Elevato controllo della micro e macrostruttura	Limiti nella risoluzione dimensionale delle strutture ottenute
Sinterizzazione di microparticelle	Assenza di solventi organici Permette l'incorporazione di agenti bioattivi	Necessita un controllo accurato delle condizioni di processo

Tab. 2.1: Vantaggi e svantaggi delle tecniche di fabbricazione di scaffold [47]

2.3 Growth Factor

La capacità rigenerativa dei tessuti è fortemente influenzata dal tipo di cellule presenti e dal tipo di lesione. Alcuni tipi di tessuti (i.e. pelle, midollo osseo e mucosa intestinale) possiedono un elevato potere rigenerativo, cioè sono dotati di cellule adeguate ad una completa rigenerazione. Tale capacità è fortemente influenzata da una serie di fattori, quali le dimensioni della lesione, l'età dell'individuo e la causa specifica del difetto. Al contrario, esistono molti tessuti dotati di cellule statiche (i.e. cuore, muscoli e nervi) che difficilmente rigenerano la struttura o la funzione del tessuto danneggiato.

In entrambi i casi, la presenza al sito danneggiato di fattori di crescita, capaci di istruire le cellule presenti per la rigenerazione del tessuto, potrebbe essere il fattore chiave per il successo finale del processo rigenerativo [10].

I fattori di crescita sono proteine secrete da un ampio range di tipi cellulari ed hanno quale principale scopo la trasmissione di segnali in grado di attivare specifici programmi di sviluppo che controllano la migrazione, il differenziamento e la proliferazione cellulare (Fig. 2.8). La trasmissione del segnale avviene grazie al legame dei fattori di crescita ai recettori cellulari presenti sulla superficie delle cellule. Tale segnale viene trasferito attraverso i recettori di membrana e amplificato per ultimare la modifica dell'espressione genica. I fattori di crescita agiscono in maniera dipendente dalla concentrazione e dal tempo; spesso richiedono minuti per stimolare una specifica attività biologica e la loro azione può dipendere da diversi fattori, come la posizione delle cellule all'interno della struttura tessutale e lo stadio del ciclo cellulare. Approfonditi studi hanno rivelato che i meccanismi di differenziamento e proliferazione sono eventi complessi costituiti da una cascata di eventi che coinvolgono diversi fattori di crescita [75]. I segnali di crescita vengono rilasciati dalle cellule per trasmissione immediata del segnale o sono dispersi nella matrice extracellulare (ECM) e rilasciati grazie alla degradazione di quest'ultima, controllata dalla proteolisi. La presenza dei fattori di crescita nell'ECM permette la loro stabilizzazione e fornisce delle guide fisiche alle cellule attraverso l'organizzazione spaziale di tali fattori. Inoltre, il rilascio e la secrezione di fattori di crescita contribuiscono all'esistenza di un sistema biologico di rilascio sensibile e dinamico, mutevole in accordo agli specifici requisiti e processi cellulari.

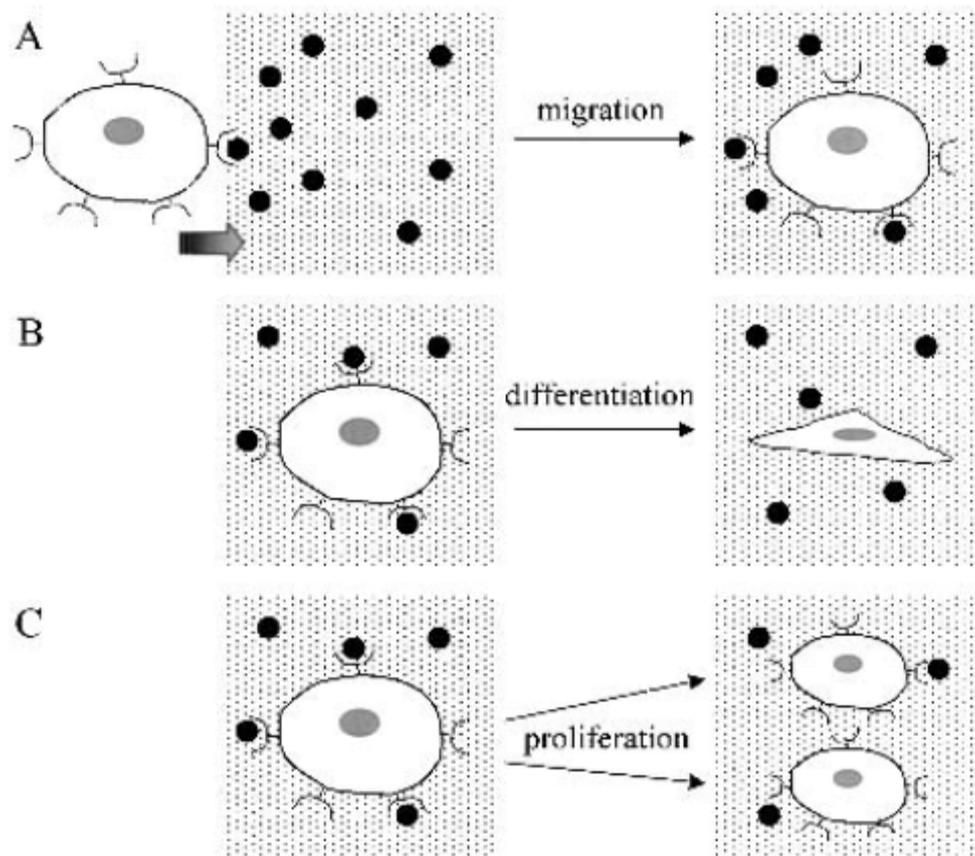


Fig. 2.8: Fattori di crescita legati a recettori di superficie cellulare possono indurre diversi tipi di risposta per rigenerare uno specifico tessuto: a) il legame con il fattore può indurre la migrazione delle cellule al sito danneggiato, b) può verificarsi la differenziazione cellulare per fornire la popolazione cellulare necessaria, c) la proliferazione delle cellule nel sito danneggiato riempie il difetto tissutale [75].

2.4 Drug Delivery in Ingegneria dei Tessuti

Attualmente, la maggior parte dei farmaci vengono rilasciati nel paziente in maniera sistematica (i.e. rilascio orale o intravenoso) senza il supporto di uno scaffold.

L'iniezione diretta di fattori di crescita risulta, però, inefficiente a causa del rapido allontanamento del fattore dal sito d'interesse. Per aumentare i tempi di permanenza del fattore al sito bersaglio si devono progettare degli appositi sistemi per il rilascio controllato di farmaci (DDS) [76]

2.4.1 Criteri per la progettazione di sistemi di rilascio di fattori di crescita

1. Nella progettazione di un sistema di rilascio per fattori di crescita è fondamentale la determinazione del fattore o dei fattori chiave da rilasciare per la particolare applicazione d'interesse. Tale scelta si basa sulla comprensione dei processi di sviluppo biologico coinvolti. I fattori di crescita comunemente utilizzati e le loro principali funzioni sono stati riportati in Tab 2.2. L'utilizzo di fattori di crescita come molecole terapeutiche è stato focalizzato sui fattori meglio caratterizzati e disponibili in grandi quantità.
2. Il sistema di rilascio deve focalizzare il rilascio del fattore alla popolazione di cellule desiderata e minimizzare la propagazione del segnale a tessuti e cellule indesiderati. L'applicazione di fattori di crescita come agenti terapeutici attraverso l'iniezione intravenosa non localizza il farmaco al tessuto bersaglio e, inoltre, risulta inefficace a causa della breve emivita di tali fattori. Inoltre, l'iniezione diretta di fattori di crescita come agenti terapeutici richiede dosi elevate che possono generare effetti indesiderati [77]. Tali problemi hanno motivato lo sviluppo sistemi a rilascio controllato che permettono il rilascio prolungato e localizzato di ridotte quantità di fattori al tessuto bersaglio.
3. Sebbene piccole quantità (picogrammi e nanogrammi) sono sufficienti a generare una risposta cellulare, i fattori di crescita vanno incontro a rapida degradazione. L'emivita del platelet-derived growth factor (PDGF), del basic fibroblast growth factor (bFGF or FGF-2), e vascular endothelial growth factor (VEGF), una volta iniettati, è di 2 [78], 3 [79] e 50 minuti [80], rispettivamente. Il rilascio controllato di fattori di crescita richiede che tali fattori mantengano la propria attività biologica, all'interno del sistema, per un tempo sufficiente. Tali sistemi, quindi, dovrebbero fungere da ECM artificiale in cui i fattori di crescita sono dispersi o incapsulati. Questo è spesso molto impegnativo, poiché i processi utilizzati per la realizzazione di sistemi per il rilascio controllato possono portare alla denaturazione o deattivazione della proteina.
4. Il rilascio del fattore di crescita dovrebbe essere controllato nello spazio e nel tempo in relazione allo specifico tessuto danneggiato. I tessuti necessitano di un'esposizione relativamente prolungata al fine di ottenere gli effetti desiderati.

Inoltre, la localizzazione delle molecole segnale potrebbe controllare non solo l'estensione della formazione del tessuto, ma anche la sua configurazione.

Growth factor	Abbreviation	Molecular weight (kDa)	Known activities	Representative supplier of rH growth factor
Epidermal growth factor	EGF	6.2	Proliferation of epithelial, mesenchymal, and fibroblast cells	PeptoTech Inc. (Rocky Hill, NJ, USA)
Platelet-derived growth factor	PDGF-AA	28.5	Proliferation and chemoattractant agent for smooth muscle cells; extracellular matrix synthesis and deposition	PeptoTech Inc.
	PDGF-AB	25.5		
	PDGF-BB	24.3		
Transforming growth factor- α	TGF- α	5.5	Migration and proliferation of keratinocytes; extracellular matrix synthesis and deposition	PeptoTech Inc.
Transforming growth factor- β	TGF- β	25.0	Proliferation and differentiation of bone forming cells; chemoattractant for fibroblasts	PeptoTech Inc.
Bone morphogenetic protein	BMP-2	26.0	Differentiation and migration of bone forming cells	Cell Sciences Inc. (Norwood, MA, USA)
	BMP-7	31.5		
Basic fibroblast growth factor	bFGF/FGF-2	17.2	Proliferation of fibroblasts and initiation of angiogenesis	PeptoTech Inc.
Vascular endothelial growth factor	VEGF ₁₆₅	38.2	Migration, proliferation, and survival of endothelial cells	PeptoTech Inc.

rH, recombinant human.

Tab. 2.2: Elenco dei fattori di crescita comunemente utilizzati in Ingegneria dei Tessuti [10]

2.4.2 Principali tecniche per la realizzazione di scaffold per il rilascio di fattori di crescita

Il rilascio di fattori di crescita da supporti tridimensionali può essere realizzato attraverso la dispersione diretta o l'incapsulamento di tali fattori all'interno dello scaffold [10].

Le diverse tecniche attualmente utilizzate per l'incapsulamento di fattori di crescita all'interno di costrutti tridimensionali polimerici sono schematicamente rappresentati in Fig. 2.9 e possono essere divisi in due metodi principali: adesione dei fattori di crescita sullo scaffold e incorporazione fisica del fattore all'interno dello scaffold.

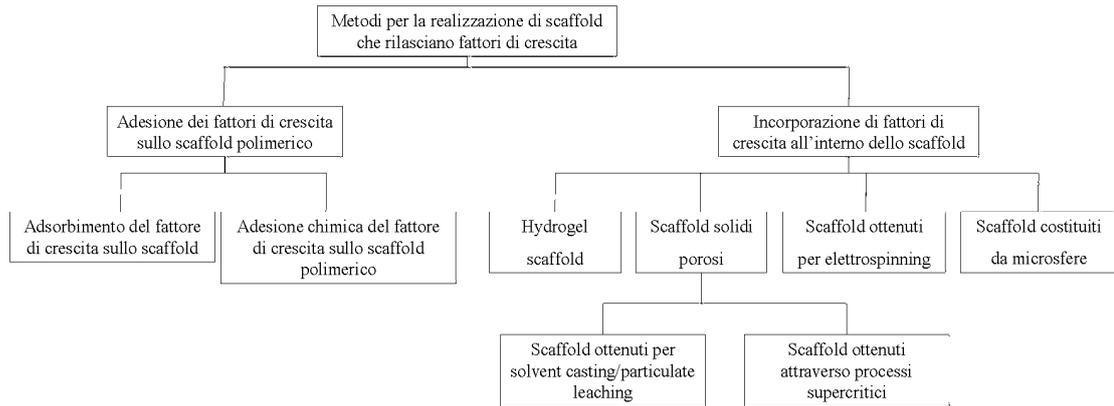


Fig. 2.9: Schema rappresentativo delle principali tecniche di realizzazione di scaffold che rilasciano fattori di crescita [81].

1. Adesione dei fattori di crescita sullo scaffold polimerico

Tale approccio prevede l'adesione dei fattori di crescita su scaffold preformati e si basa sull'immobilizzazione della molecola bioattiva sulla superficie del polimero attraverso crosslinking chimico [82,83], o sull'adsorbimento del fattore sullo scaffold.

Delong et al. [82], hanno realizzato un gradiente di bFGF legando covalentemente il fattore su un idrogel in polietilenglicolide (PEG). Tali costrutti hanno mostrato di direzionare le cellule lungo il gradiente di concentrazione nelle prime 24 ore dalla semina. In alternativa, l'adsorbimento di fattori di crescita sullo scaffold può portare alla formazione di interazioni fisico-chimiche, come la formazione di complessi ionici, tra il materiale polimerico e il fattore di crescita. Park et al., hanno caricato TGF- β 1 su microsferi di gelatina attraverso la formazione di complessi ionici, durante l'incubazione di tali microsferi in una soluzione acquosa di TGF- β 1 a pH 7.4. La formazione del complesso ionico è stata attribuita all'associazione di cariche negative presenti sulle microsferi di gelatina e cariche positive nella molecola di TGF- β 1 [84].

2. Incorporazione di fattori di crescita all'interno dello scaffold

Metodo alternativo all'adesione di fattori di crescita su scaffold polimerici è l'incorporazione di tali fattori direttamente nello scaffold, durante il processo di fabbricazione. Tale approccio, generalmente, prevede la miscelazione del polimero con il fattore di crescita prima della formazione dello scaffold. La principale sfida di tale approccio sta nell'assicurare un rilascio prolungato del fattore, preservandolo dalla denaturazione a causa delle condizioni di processo.

✓ **Hydrogel scaffold**

Le matrici di idrogeli sono costituite da polimeri solubili in acqua e hanno la capacità di rigonfiarsi in ambiente acquoso formando una sostanza gelatinosa [85]. Tali materiali vengono generalmente sottoposti ad un processo di crosslink che può essere realizzato attraverso processi fisici (radiazioni UV, freeze drying o riscaldamento) o chimici (come il crosslinking ionico in presenza di ioni divalenti o utilizzando crosslinkanti chimici come la glutaraldeide e la carbodiimmide). Gli idrogeli possono essere realizzati partendo da polimeri sintetici, come polietilenglicolide (PEG) e polivinilalcol (PVA), o naturali, come il collagene, il chitosano e la gelatina. Il rilascio di fattori di crescita da idrogeli può avvenire per diffusione del fattore attraverso lo scaffold altamente idrofilico, in seguito a stimoli meccanici, o per degradazione idrolitica dello scaffold [85]. Alcuni esempi di sistemi di rilascio realizzati con idrogeli sono stati riportati da Chenite et al. [86]. In tale lavoro, la formazione dell'idrogelo viene indotta dalla temperatura e il fattore di crescita (bone morphogenetic protein, rh BMP), introdotto nello scaffold durante la fabbricazione, risulta promuovere efficientemente la formazione di ossa e cartilagine in vivo. Tuttavia, il rilascio prolungato di proteine da idrogeli non è facilmente realizzabile, a causa della cinetica di rilascio del fattore principalmente controllata dalla diffusione attraverso i numerosi canali presenti nell'idrogelo. L'immobilizzazione del fattore di crescita in idrogeli biodegradabili sembra migliorarne la cinetica di rilascio, poiché questa viene controllata dalla degradazione del materiale. Esistono diversi metodi chimici e fisici per legare uno specifico fattore agli idrogeli. I metodi chimici prevedono l'adesione di gruppi reattivi dell'idrogelo al fattore di crescita e sono molto utilizzati nella rigenerazione di tessuto cartilagineo [87]. I metodi di adesione fisica di fattori di crescita sfruttano, invece, le interazioni elettrostatiche che possono realizzarsi tra le cariche presenti sul fattore e quelle presenti sulle catene polimeriche degli idrogeli [88].

✓ **Scaffold solidi porosi**

La formazione di scaffold porosi, caricati con fattori di crescita, può essere realizzata con diverse tecnologie. Le principali tecniche utilizzate prevedono la formazione diretta di scaffold caricati con fattori di crescita o, in alternativa, la

realizzazione di microsfele che contengano il fattore e la successiva realizzazione dello scaffold.

Solvent casting-particulate leaching

La tecnologia del solvent casting-particulate leaching è una delle prime utilizzate per la realizzazione di scaffold per l'ingegneria dei tessuti, anche se è stata superata da tecniche più sofisticate. Tale tecnica, come precedentemente illustrato, prevede che il polimero sia colato in un letto di particelle porogene di dimensioni definite. La precipitazione del polimero, dovuta all'evaporazione del solvente, e la successiva rimozione delle particelle di agente porogeno, porta alla formazione di uno scaffold altamente poroso. Tale processo di produzione di scaffold è stato utilizzato per la realizzazione di costrutti che inducono l'angiogenesi attraverso il rilascio di fattori angiogenici [89]. Questi ultimi vengono disciolti all'interno della soluzione polimerica prima del processo di solvent casting-particulate leaching. La precipitazione del polimero, a causa dell'evaporazione del solvente, porta all'incapsulamento di fattori angiogenici. Tale tecnologia comporta, però, dei problemi legati al controllo della microstruttura e alle proprietà meccaniche, già esposti precedentemente. Inoltre, l'utilizzo di solventi organici potrebbe portare alla denaturazione del fattore.

Processi supercritici

La causa principale della perdita di attività delle proteine rilasciate risulta essere la denaturazione del fattore di crescita durante il processo di fabbricazione dello scaffold. La necessità di migliorare le attuali tecniche di fabbricazione ha portato alla creazione di scaffold con l'utilizzo di fluidi supercritici. Il principale vantaggio di tali tecnologie risiede nell'evitare l'utilizzo di solventi tossici [90]. I fluidi supercritici (SCF) combinano le proprietà delle due fasi dalle quali sono formati: densità e proprietà di solvatazione simile a quelle dei liquidi, e proprietà diffusive e di viscosità tipiche dei gas. Il gas di CO₂ è il principale candidato nell'utilizzo come SCF, grazie alla sua bassa tossicità, facile utilizzo e basso costo. La fabbricazione di scaffold attraverso tecnologie SCF, generalmente, prevede la dissoluzione del composto polimero/fattore di crescita in CO₂ supercritico. Tale procedura è seguita da una rapida espansione della miscela in un ambiente a basse pressioni e temperatura, che porta alla formazione dello scaffold [91]. Tale processo comporta

il vantaggio che il materiale di partenza non deve essere necessariamente solubile in SCF e, inoltre, non si richiede l'utilizzo di solventi tossici [92]. Mooney et al. per primi mostrarono la possibilità di formare scaffold polimerici attraverso l'utilizzo di gas di CO₂ [93, 94]. Successivamente, essi incorporarono vascular endothelial growth factor (VEGF) durante la fabbricazione dello scaffold e mostrarono il rilascio del fattore in forma attiva per 12 giorni [95]. E' stato inoltre mostrato che scaffold di PLA con VEGF incapsulato stimolano la formazione di una rete di vasi sanguigni [90].

In uno studio realizzato da Yang et al., è stato dimostrato che scaffold porosi di PLA contenenti BMP, ottenuti mediante processi di fluidi supercritici, promuovono l'adesione, la migrazione, la proliferazione e il differenziamento di cellule osteoprogenitrici sullo scaffold tridimensionale. Lo scaffold polimerico caricato con BMP-2 ha mostrato di stimolare la formazione di nuova matrice ossea e cartilaginea, successivamente all'impianto subcutaneo in topi [96].

✓ **Elettrospinning**

Polimeri naturali e sintetici sono stati recentemente processati sottoforma di scaffold porosi fibrosi, per applicazioni nell'ingegneria dei tessuti, attraverso la tecnologia dell'elettrospinning. Tali scaffold sono costituiti da fibre nanometriche con pori interconnessi di dimensioni micrometriche, simili alla matrice extracellulare (ECM). Collagene, fibrinogeno, acido polilattico, policaprolattone, acido polilattico-glicolico rappresentano solo un esempio dei polimeri fin'ora investigati per la realizzazione di costrutti mediante elettrospinning per l'ingegneria dei tessuti. Li C et al. [97] hanno realizzato scaffold fibrosi contenenti BMP-2 attraverso elettrospinning, mostrando anche la capacità di tali costrutti di indurre la formazione in vitro di tessuto osseo da cellule staminali mesenchimali.

✓ **Scaffold costituiti da microsfere**

Scaffold polimerici bioattivi possono essere realizzati grazie all'utilizzo di microsfere caricate con opportuni fattori di crescita. La realizzazione di tali scaffold può essere realizzata attraverso la formazione di uno scaffold composito contenente tali microparticelle. Le microsfere caricate con un opportuno fattore di crescita possono essere realizzate mediante cross-linking chimico in soluzione acquosa di un polimero naturale in presenza del fattore, o mediante emulsione [98]. Attualmente,

vengono utilizzate due variazioni di quest'ultima tecnica, la singola e la doppia emulsione. Il metodo della doppia emulsione comporta la formazione di un'emulsione primaria W/O, grazie alla dispersione di una soluzione acquosa, contenente il fattore di crescita, in una soluzione organica, contenente il polimero. Successivamente, viene formata una seconda emulsione O/W attraverso la dispersione, mediante agitazione meccanica continua, dell'emulsione primaria in un mezzo acquoso contenente un surfattante, come polivinilalcol (PVA) o polietilenglicolide (PEG). Le microsfele così ottenute, vengono collezionate attraverso centrifugazione o filtraggio, lavate e liofilizzate. BMP-2 [99], TGF- β 1 [100] and PDGF-BB [101] sono stati efficacemente incapsulati in microsfele di PLGA, ottenute mediante doppia emulsione.

Il metodo della singola emulsione, salta la prima fase di emulsione W/O, e prevede la dispersione del fattore di crescita direttamente nella soluzione organica contenente il polimero. Le microsfele vengono formate grazie alla formazione dell'emulsione O/W e all'evaporazione della soluzione organica dalle goccioline formatesi. Il fattore di crescita può essere preventivamente liofilizzato con PEG, al fine di aumentarne l'efficienza di incapsulamento [102]. King e Patrick [103] hanno incapsulato VEGF, attivo per 28 giorni, in microsfele polimeriche mediante singola emulsione. Il rilascio di tale fattore dalle microsfele ha mostrato incrementare la proliferazione in coltura di cellule endoteliali umane. In un lavoro descritto da Wei et al. [72], microsfele in cui era stato incapsulato PDGF-BB (platelet derived growth factor) sono state incorporate in uno scaffold nanofibroso di PLLA. La struttura nanofibrosa, simile all'ECM, ha mostrato migliorare l'adesione, la proliferazione e il differenziamento cellulare [104]. Inoltre, grazie alla presenza delle microparticelle nello scaffold è stato possibile ottenere anche un rilascio prolungato del fattore bioattivo. Kempen et al. [105] e Hedberg [106] hanno, invece, mostrato l'applicazione di microsfele di PLGA e di polipropilene fumarate (PPF) nella realizzazione di scaffold compositi per il rilascio controllato di fattori di crescita per l'ingegnerizzazione di tessuti ossei.

Capitolo 3

Analisi sperimentale: Strumenti e metodi

3.1 Materiali utilizzati

Policaprolattone (PCL)

Il policaprolattone (PCL) è uno dei biomateriali di nuova concezione di maggiore diffusione nel settore dell'ingegneria tessutale. Usato inizialmente per la realizzazione di film degradabili e stampi, oggi, esso trova largo impiego in vari settori delle biotecnologie quali l'*organ substitution* nella realizzazione di suture riassorbibili, il *drug delivery* per sistemi a rilascio controllato di farmaci nonché, negli ultimi anni, la *tissue regeneration* per la realizzazione di sistemi sostitutivi del tessuto osseo naturale [18]. Un così ampio e diversificato insieme di impieghi è legittimato dalle caratteristiche chimiche e fisiche del polimero del tutto particolari accompagnate da acclerate doti di biocompatibilità indispensabili per la riuscita della generica applicazione in campo biomedico [18,107].

PROPRIETA' CHIMICHE

Da un punto di vista chimico il policaprolattone (PCL) è un poliesteri alifatico lineare caratterizzato dalla formula di struttura riportata a lato (fig. 3.1). Esso è in grado di sciogliere a temperatura ambiente a contatto con solventi molto diversi tra loro come dimetilacetammide (DMAc), benzene, cloroformio e diclorometano scelti in funzione delle peculiarità specifiche dell'applicazione a cui si fa riferimento [108]

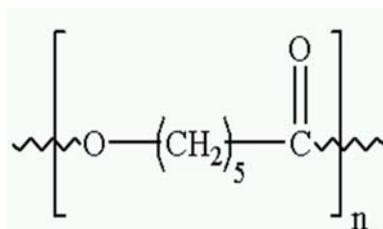


Fig. 3.1: Formula di struttura del Policaprolattone (PCL)[110].

La caratteristica più importante del PCL, da un punto di vista chimico, è la sua capacità di degradarsi in ambiente fisiologico; in particolare esso è interessato da fenomeni di degradazione dovuti alla facile interazione che il legame estere alifatico, presente lungo la catena principale, mostra con le molecole di acqua. Tale meccanismo di degradazione

attivato da idrolisi chimica consente al policaprolattone di essere annoverato quale uno dei principali esponenti della classe dei polimeri bioerodibili [109].

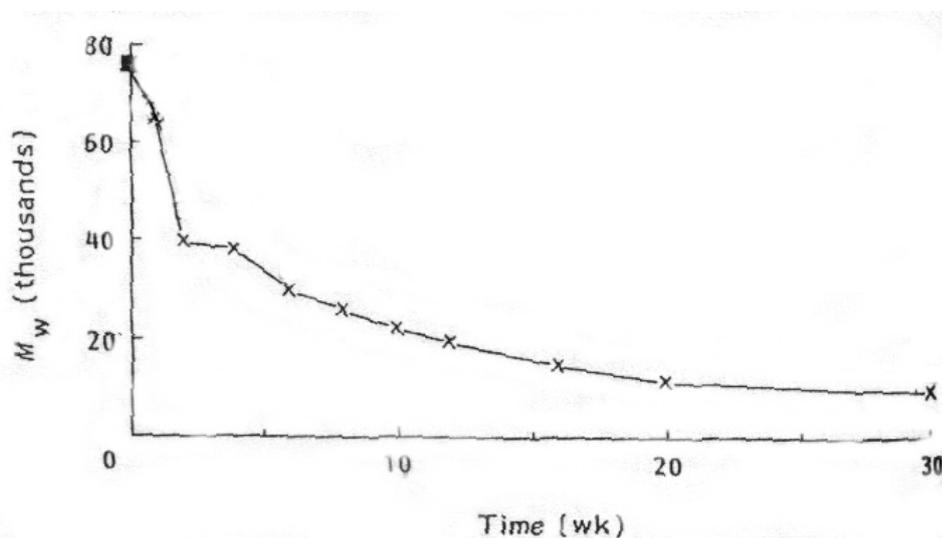


Fig. 3.2: Andamento del peso molecolare ponderale in funzione del tempo dopo l'introduzione in acqua distillata [109]

In particolare, il processo di degradazione del PCL è caratterizzato da almeno due fasi discrete, la prima delle quali si fonda sull'idrolisi non enzimatica di bulk del legame estere, autocatalizzato dai gruppi carbossilici presenti lungo la catena principale (fig. 3.1). Molti sono stati e sono tuttora gli studi mirati ad approfondire le modalità di degradazione del PCL. Ad esempio, alcuni di essi hanno mostrato che radicali liberi ottenuti dalla reazione del gruppo carbossilico con l'ossigeno risultano molto più reattivi che radicali prodotti dalla reazione con il gruppo OH [109].

Altri studi, invece, sono rivolti all'analisi dell'evoluzione delle proprietà fisico-chimiche durante il processo di degradazione. Si riporta l'andamento del peso molecolare ponderale del polimero, M_w , in acqua distillata (fig. 3.2); risulta evidente che, a seguito dell'attivazione di meccanismi di idrolisi, si innesca la rottura dei legami alifatici lungo le macromolecole, le quali divengono via via più corte. Ciò si traduce in una caduta del peso molecolare ponderale, in un primo momento più significativa poi più graduale, fino alla completa degradazione del polimero [109].

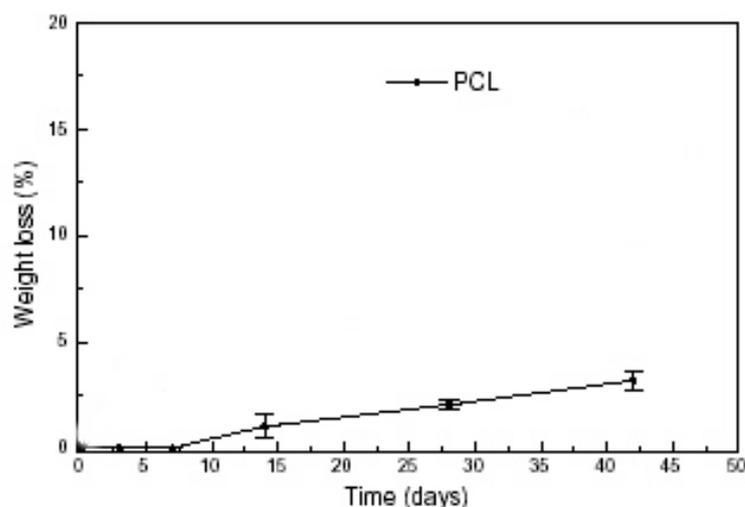


Fig. 3.3: Andamento della perdita di peso del polimero in funzione del tempo dopo l'immersione in acqua distillata [18]

Analogamente, all'avanzare del meccanismo di degradazione, si manifesta una riduzione percentuale della massa di polimero (fig. 3.3) [18]. Come è possibile dedurre dai due diagrammi precedenti (figg. 3.2-3), l'arco temporale lungo cui si realizza il processo di degradazione è piuttosto lungo: in acqua distillata è dell'ordine di circa 30 settimane, mentre, in ambiente fisiologico a contatto con soluzioni saline di varia natura, si riduce a poco meno di sei mesi.

Questo è il motivo principale per cui viene preferito per la realizzazione di tessuti ossei nella tissue regeneration: poiché l'osso è sottoposto a stati di sollecitazione di vario genere e di una certa entità è fondamentale che l'impalcatura offerta dal polimero, oltre a favorire la proliferazione delle cellule, fornisca anche un supporto strutturale fino all'avvenuta crescita del tessuto in neoformazione.

Proprietà	Condizioni	Valore
<i>Conformazione Molecolare</i>		Quasi planare
<i>Peso Mol. (unità ripetitiva) (g/mol)</i>		114
<i>Peso Medio Numerico M_N (g/mol)</i>	GPC	74000
<i>Peso Medio Ponderale M_W (g/mol)¹</i>	GPC	25000

Tab. 3.1: Proprietà chimiche salienti del PCL [111]

PROPRIETA' FISICHE:

Il policaprolattone è un polimero termoplastico e semicristallino, il quale a temperatura ambiente presenta uno stato fisico che ricorda quello di una gomma [111]. Appartenendo alla classe dei termoplastici esso è caratterizzato da un'elevata lavorabilità che ne consente il rapido modellamento nella forma che più è utile ai fini dell'applicazione.

Si tratta di un polimero molto versatile in quanto mostra una elevata propensione a formare miscele compatibili con una grande varietà di polimeri; infatti, viene copolimerizzato facilmente con monomeri quali l'ossido di etilene, il cloroprene e il metilmetacrilato, al fine di realizzare compositi in grado di presentare, oltre ai requisiti di biocompatibilità ampiamente documentati in letteratura, proprietà meccaniche di una certa entità.

Il principale limite del policaprolattone, infatti, risiede proprio nelle proprietà meccaniche piuttosto esigue (resistenza a compressione pari a 1.58MPa [18] e resistenza a trazione pari a 20.7-42 MPa [107] se confrontate con le principali caratteristiche del tessuto osseo naturale.

Proprietà	Condizioni	Valore
Viscosità intrinseca (cm ³ /g)	Diluizione infinita	0.9
Entalpia di polimerizzazione (kJ/mol)	25°C, 1 atm	-28.8
Entropia di polimerizzazione (kJ/mol)	25°C, 1 atm	-53.9
Energia libera di Gibbs (kJ/mol)	25°C, 1 atm	-12.8
Grado di cristallinità (%)	DSC	69
Cella unitaria	X ray diffraction	Ortorombica
Numero di coordinazione	--	4
Densità (g/cm ³)	X ray diffraction	1.094 – 1.200
Elongazione (%)	--	700
Transizione vetrosa T _g (°K)	DSC	201
Temperatura di Fusione T _f (°K)	DSC	331
Calore di fusione ΔH _f (kJ/mol)	DSC	8.9

Tab. 3.2: Proprietà fisiche salienti del PCL [111]

Polivinilalcol (PVA)

Da un punto di vista chimico il Polivinilalcol è un polimero vinilico ovvero è caratterizzato da monomeri dotati di un doppio legame tra due atomi di carbonio. Esso deriva da un altro polimero, il **polivinilacetato**, ottenuto mediante polimerizzazione radicalica come segue:

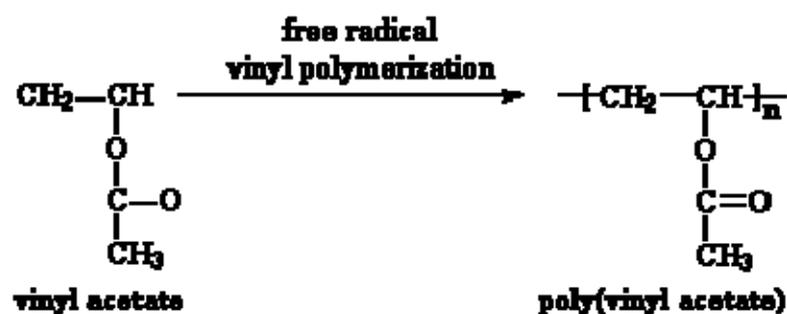


Fig. 3.4: Reazione di polimerizzazione del polivinilacetato

In seguito il polivinilacetato viene sottoposto ad un'ulteriore reazione con idrossido di sodio e metanolo per ottenere il PVA:

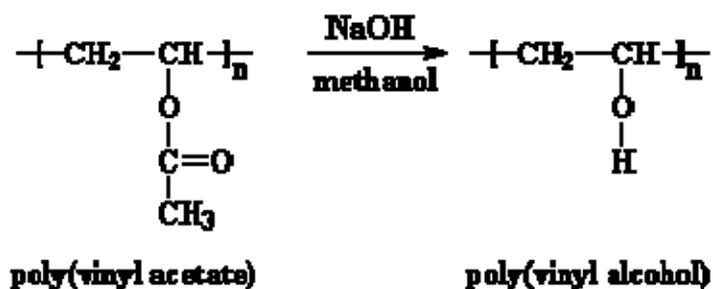


Fig. 3.5: Reazione di conversione del polivinilacetato in polivinilalcol

Il PVA può essere utilizzato come agente emulsionante che ha la caratteristica di stabilizzare l'emulsione. Esso determina una riduzione dell'energia libera delle goccioline formatesi grazie ad un incremento dell'energia dell'energia all'interfaccia.

Bovine Serum Albumine (BSA)

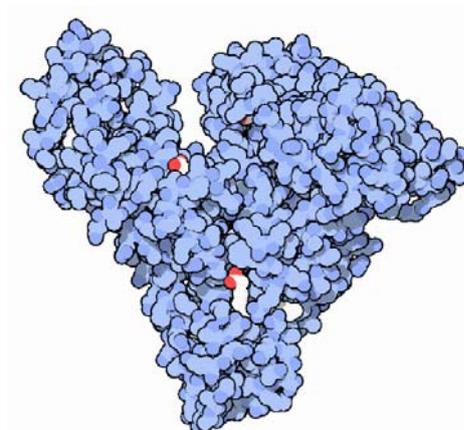


Fig. 3.6: Schema 3D della struttura della BSA

Tutte le cellule hanno bisogno di un apporto continuo di nutrienti, per non andare incontro all'apoptosi (morte). Dopo la nutrizione, il cibo è digerito e le molecole utili vengono trasportate alle cellule, sfruttando la circolazione del sangue come sistema di trasporto. Le molecole solubili in acqua (come lo zucchero) sono trasportate dal flusso sanguigno acquoso e vengono assorbite dalle cellule lungo il percorso. Altri nutrienti, però, non sono idrosolubili, così altri vettori le guidano nel flusso sanguigno. La Siero Albumina trasporta gli acidi grassi nel sangue ed è la proteina più abbondante nel plasma sanguigno. Essendo molto comune nel sangue e facile da purificare, è stata una delle prime proteine ad essere studiata dagli scienziati. Oggi, una proteina simile, la Siero Albumina Bovina, o BSA (fig. 3.6), è estesamente usata nella ricerca quando è necessaria una proteina generica [112]

Chitosano

Il chitosano è un biopolimero naturale cationico ottenuto tramite N-deacetilazione alcalina della chitina (Fig. 3.7), tale reazione non è quasi mai completa [113,114]. La chitina è un mucopolisaccaride naturale che funge da materiale di supporto di crostacei e insetti, ed è il polimero naturale più abbondante dopo la cellulosa [115,116].

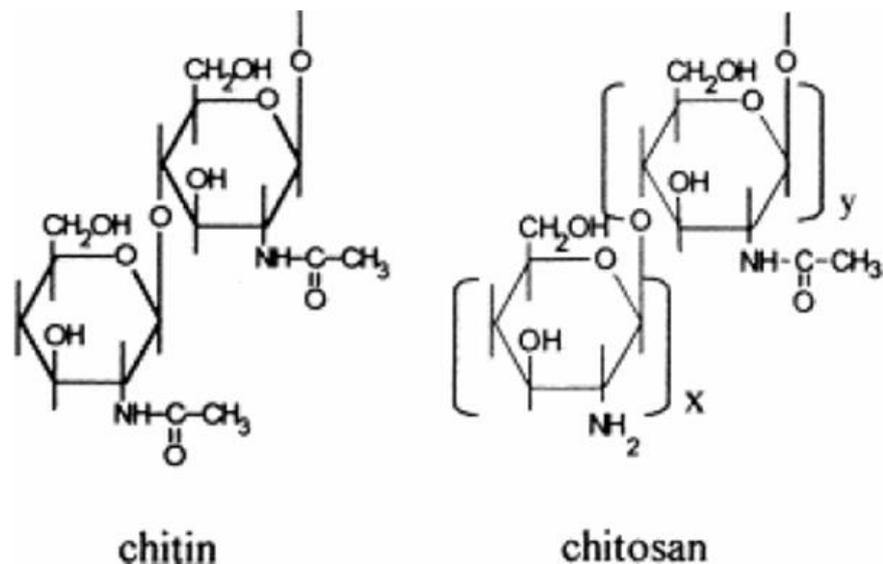


Fig. 3.7: Struttura del chitosano e della chitina

Il chitosano è utilizzato per le sue caratteristiche favorevoli, che sono:

- ✓ buona biocompatibilità;
- ✓ buona biodegradabilità;
- ✓ bassa tossicità;
- ✓ basso costo [117-119];

Per questi motivi principali gli usi del chitosano sono svariati e si possono riassumere in questi:

- ✓ veicolo per medicinali;
- ✓ agente di guarigione per le ferite;
- ✓ filtro-membrana per trattamento di depurazione delle acque;
- ✓ rivestimento o film biodegradabile per imballaggi alimentari [120];

In particolare il chitosano è più rigido e più fragile dei tessuti nervosi e ciò comporta delle difficoltà nel suo uso per la rigenerazione nervosa; per questo motivo si cerca di modificare tale polimero per migliorare le sue caratteristiche meccaniche. Uno di questi metodi consiste nella miscelazione con altri polimeri, per esempio la gelatina [121].

Gelatina

La gelatina è un polipeptide con un peso molecolare che va da 15000 g/mol fino a valori superiori a 250000 g/mol, ed è ottenuta per idrolisi del collagene (ricavato, a sua volta, da pelle e da ossa animali) in condizioni acide o basiche a seconda del tipo di collagene adoperato [122].

La gelatina contiene tutti gli amminoacidi essenziali ad eccezione del triptofano ed è usata come ingrediente per cibi. In acqua calda, la gelatina inizialmente si rigonfia rapidamente e poi si dissolve formando una soluzione viscosa [123].

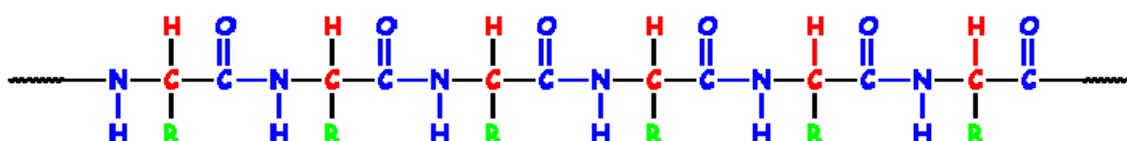


Fig. 3.8: Struttura chimica della gelatina

La proprietà più importante della gelatina è quella di formare gel termo-reversibili con diverso potere gelificante; questa capacità dipende dalla struttura molecolare cioè dalla composizione in amminoacidi, dalla distribuzione del peso molecolare e dalla natura anfotera della gelatina [124].

La gelatina alimentare è composta da:

- ✓ 84-90 % di proteine;
- ✓ 8-12 % di acqua;
- ✓ 2-4 % di sali minerali [125];

La gelatina viene impiegata nei seguenti campi:

- ✓ industria alimentare;
- ✓ industria fotografica;
- ✓ industria farmaceutica [126].

3.2 Preparazione delle microsfere di PCL

In questo lavoro si è proceduto alla realizzazione di microsfere in materiale polimerico utilizzando il policaprolattone (PCL) (*Aldrich Chemical Company 181609-500G, M_w : 65000*). Per la realizzazione di tali particelle sono state utilizzate due metodologie: singola emulsione (O/W) e doppia emulsione (W/O/W).

3.2.1 Singola emulsione

Uno dei metodi più comuni per la realizzazione di microsfere polimeriche consiste nell'emulsione oil-in-water (O/W) in cui una soluzione polimerica organica viene dispersa in una fase acquosa continua.

Nel caso specifico il polimero utilizzato è stato disciolto in un opportuno solvente, diclorometano (MC) (*Aldrich Chemical Company, 99,9%*), in cui il PCL è solubile a temperatura ambiente.

La fase acquosa consiste in una soluzione di 500 ml di acqua bidistillata con una concentrazione dello 0,25% di polivinilalcol (PVA) (*Aldrich Chemical Company, 87-89% idrolizzato, M_w : 13000÷23000*). La presenza di tale agente emulsionante nella fase acquosa è fondamentale per ridurre i fenomeni di coalescenza e aggregazione delle microsfere, in quanto; il suo ruolo è quello di prevenirne la coagulazione durante l'evaporazione del solvente.

La procedura seguita consiste delle seguenti fasi:

1. Preparazione della soluzione acquosa in cui il PVA viene mescolato con l'acqua e posto in agitazione magnetica alla temperatura di circa 100°C, in modo da consentire il completo scioglimento del polimero.
2. La soluzione polimerica è stata ottenuta dissolvendo il policaprolattone in diclorometano (20 ml) al fine di formare un sistema monofasico, attraverso agitazione magnetica a temperatura ambiente.
3. Le due soluzioni così ottenute vengono miscelate per tre ore ad un'opportuna velocità, mediante un agitatore meccanico (*FALC Instruments mod. AT, PW: 85 W*), al fine di ottenere delle microparticelle disperse (Fig. 3.9).

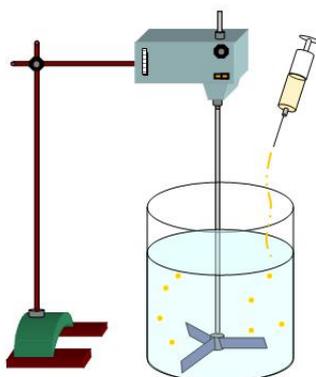


Fig. 3.9: Miscelazione meccanica di O/W

4. Il sistema bifasico ottenuto viene lasciato in agitazione magnetica per circa dodici ore sotto cappa chimica, in modo da consentire la completa evaporazione del solvente organico volatile, il quale risulterebbe nocivo per le successive applicazioni biomediche.
5. La fase successiva consiste nell'isolare le microsferi solide mediante filtraggio ed in tre successivi lavaggi con acqua bidistillata per eliminare l'agente emulsionante.
6. Infine, le microsferi così ottenute vengono lasciate essiccare sotto cappa chimica.

3.2.2 Doppia emulsione

L'emulsione multipla W/O/W consiste in un sistema trifase in cui le goccioline di olio, contenenti una fase acquosa interna, vengono disperse in una fase acquosa esterna. Il metodo di preparazione consiste in due stadi di emulsione che permettono di incapsulare efficientemente un farmaco.

Nel caso specifico, il polimero (PCL) è stato dissolto in un solvente organico, il diclorometano (MC) (*Aldrich Chemical Company*, 99,9%), il quale è caratterizzato da un'elevata volatilità che ne facilita la rimozione mediante evaporazione.

La procedura seguita consta delle seguenti fasi:

1. La preparazione della fase acquosa interna ottenuta dalla dissoluzione di un'opportuna percentuale di polivinilalcol (PVA) (*Aldrich Chemical Company*, 87-89% idrolizzato, M_w : 13000÷23000) in una soluzione salina (PBS) (*OXOID ph 7,3*) di 1 ml, mediante agitazione magnetica alla temperatura di circa 100°C. Tale soluzione, raffreddata a temperatura ambiente, viene addizionata con lo 0,45% di BSA (Bovine Serum Albumine) (*Sigma Aldrich Chemical Company*, M_w : 68000).
La presenza dell'agente emulsionante nella fase acquosa interna è fondamentale al fine di incrementare la stabilità dell'emulsione primaria e l'incapsulazione delle proteine.
2. La soluzione polimerica è stata ottenuta dissolvendo il policaprolattone in diclorometano, al fine di formare un sistema monofasico, attraverso agitazione magnetica a temperatura ambiente.
3. La fase acquosa esterna è stata preparata dissolvendo diverse percentuali di PVA in 250 ml di PBS, mediante agitazione magnetica alla temperatura di circa 100°C.
4. La fase acquosa interna viene emulsionata per un tempo opportuno con la fase oil utilizzando un sonificatore con potenza di 50 W (*GRANT ULTRASONIC BATH XB3, 50-60Hz, 60W*) (Fig. 3.10).
5. Il risultato della prima emulsione (W/O) viene iniettato nella fase acquosa esterna utilizzando una siringa di vetro. Tale soluzione viene miscelata per trenta minuti utilizzando un agitatore magnetico (*FALC Instruments mod. F60*) a temperatura ambiente, impostando un'opportuna velocità (Fig. 3.10).

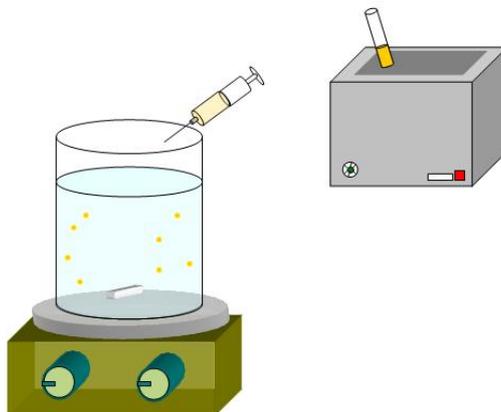


Fig. 3.10: Doppia emulsione

6. Al fine di rimuovere il diclorometano viene aggiunta una soluzione salina (PBS) di 640 ml contenente la stessa concentrazione di PVA della fase acquosa interna ad una velocità di 3 ml/min. In queste condizioni il solvente contenuto nelle microsfere polimeriche viene estratto dal mezzo acquoso (non solvente per il polimero), in modo da accelerarne la rimozione.
7. Successivamente le microsfere solide vengono filtrate e sottoposte a tre lavaggi successivi con acqua bidistillata per eliminare l'agente emulsionante.
8. Infine, le microsfere così ottenute vengono lasciate essiccare sotto cappa chimica.

3.2.3 Tipologie di campioni

Diverse tipologie di microsfere ottenute mediante singola emulsione sono state realizzate variando singolarmente due parametri fondamentali al fine di controllare le dimensioni delle particelle:

- ✓ Concentrazione di polimero nella fase oil
- ✓ Velocità di agitazione meccanica

Le tipologie di campioni realizzati sono riportati nella seguente tabella:

Tipologia	PCL/MC (w/v)	Velocità di agitazione (rpm)
M ₁	8/92	200
M ₂	8/92	400
M ₃	8/92	800
M ₄	16/84	200
M ₅	16/84	400
M ₆	16/84	800
M ₇	24/76	200
M ₈	24/76	400
M ₉	24/76	800

Tab. 3.3: Tipologie di campioni presi in esame

Diverse tipologie di microsfele ottenute mediante doppia emulsione sono state realizzate variando, singolarmente, un ampio spettro di parametri quali ad esempio:

- ✓ Velocità di agitazione magnetica
- ✓ Concentrazione di PCL nella fase oil
- ✓ Concentrazione di PVA nella fase acquosa interna

Sono state analizzate le seguenti tipologie di campioni ottenute variando singolarmente tali parametri al fine di ottimizzare la struttura in termini di morfologia, porosità e dimensioni delle microsfele:

Tipologia	Tempo di sonicazione (s)	Velocità di agitazione (rpm)	PCL in MC (g/ml %)	PVA in W_{interna} (g/ml %)	PVA in W_{esterna} (g/ml %)
D ₁	30	400	3	0.05	0.5
D ₂	30	400	3	0.5	0.5
D ₃	30	400	3	1	0.5
D ₄	30	400	1.7	0.05	0.5
D ₅	30	400	1.7	0.5	0.5
D ₆	30	400	1.7	1	0.5

Tab. 3.4: Tipologie di campioni presi in esame

3.3 Scaffold ottenuti per sinterizzazione di microsfere di PCL

Una volta ottimizzato il processo di realizzazione delle microparticelle di PCL si è proceduto alla loro compattazione utilizzando un impacchettamento random di tali particelle, al fine di ottenere una struttura tridimensionale porosa.

In particolare, sono state utilizzate due diverse tecnologie per la compattazione di microparticelle polimeriche, il primo si basa sulla fusione termica della superficie di microsfere adiacenti, mentre il secondo utilizza una miscela solvente-non solvente per la parziale fusione superficiale delle microparticelle che porta alla formazione di una struttura tridimensionale porosa.

3.3.1 Sinterizzazione termica

Microsfere di PCL ottenute mediante singola emulsione, di un opportuno range dimensionale, sono state posizionate in uno stampo di teflon del diametro di 10 mm e altezza 4 mm. Una volta introdotte le microsfere, tale stampo viene posto in un forno (Undberg/Blue M Tube furnace) e riscaldate a 60 °C per 1h. La matrice tridimensionale ottenuta è lasciata raffreddare a temperatura ambiente e successivamente rimossa dallo stampo.

Le microsfere utilizzate nel processo di sinterizzazione vengono preventivamente setacciate, al fine di isolare i seguenti range dimensionali: 300 ÷ 500 µm e 500 ÷ 630 µm, che risultano idonei alla realizzazione di scaffold con porosità adeguata alla rigenerazione del tessuto osseo. Tale operazione è stata effettuata mediante setacciatore (*ASTM IG/3-EXP SAREL*).

Inoltre, scaffold tridimensionali capaci di rilasciare un farmaco sono stati ottenuti mediante fusione termica di microparticelle adiacenti ottenute attraverso singola e doppia emulsione (75/25 w/w) utilizzando gli stessi parametri di processo (60 °C, 1h) utilizzati per sinterizzare le microsfere ottenute mediante singola emulsione.

In particolare, sono state analizzate due tipologie di scaffold non bioattivi, ottenuti sinterizzando microparticelle ottenute mediante singola emulsione, con due diversi range dimensionali. Inoltre, sono state analizzate sei tipologie di scaffold caricati con BSA, ottenuti sinterizzando microparticelle ottenute mediante singola emulsione, con

diametro variabile tra 300 e 500 μm , e sei diversi campioni di microsferi ottenute mediante doppia emulsione. Le diverse tipologie di campioni sono riassunte in tabella:

Tipologia scaffold	Tipologia microsferi	Range dimensionale microsferi [μm]
SCAFFOLD PROTEIN-FREE	Singola emulsione	300 ÷ 500
	Singola emulsione	500 ÷ 630
SCAFFOLD BIOATTIVI	Singola emulsione +	300 ÷ 500 +
	Doppia emulsione (D1)	50 ÷ 180
	Singola emulsione +	300 ÷ 500 +
	Doppia emulsione (D2)	50 ÷ 180
	Singola emulsione +	300 ÷ 500 +
	Doppia emulsione (D3)	50 ÷ 180
	Singola emulsione +	300 ÷ 500 +
	Doppia emulsione (D4)	50 ÷ 180
	Singola emulsione +	300 ÷ 500 +
	Doppia emulsione (D5)	50 ÷ 180
Singola emulsione +	300 ÷ 500 +	
Doppia emulsione (D6)	50 ÷ 180	

Tab. 3.5: Campioni realizzati mediante sinterizzazione termica di microparticelle

3.3.2 Sinterizzazione con solvente

La seconda tecnica utilizzata per la compattazione di microparticelle consiste nella parziale dissoluzione, a temperatura ambiente, della superficie esterna delle particelle, grazie all'utilizzo di una miscela solvente-non solvente.

Approssimativamente 150 mg di microsferi, preventivamente setacciate per ottenere un opportuno range dimensionale, vengono posizionate in uno stampo di teflon del diametro di 10 mm e altezza 4 mm. Successivamente 300 μl di soluzione cloroformio/etanolo (30/70 v/v) vengono colati sulle microsferi diffondendo per capillarità all'interno degli interstizi formati tra le microsferi. Tale soluzione viene lasciata evaporare per 24h sotto cappa chimica al fine di permettere la completa evaporazione dei solventi utilizzati.

Tipologia scaffold	Tipologia microsfere	Range dimensionale microsfere [μm]
SCAFFOLD PROTEIN-FREE	Singola emulsione	300 ÷ 500
	Singola emulsione	500 ÷ 630
	Singola emulsione	630 ÷ 800
SCAFFOLD BIOATTIVI	Singola emulsione +	300 ÷ 500 +
	Doppia emulsione (D1)	50 ÷ 180
	Singola emulsione +	300 ÷ 500 +
	Doppia emulsione (D2)	50 ÷ 180
	Singola emulsione +	300 ÷ 500 +
	Doppia emulsione (D3)	50 ÷ 180
	Singola emulsione +	300 ÷ 500 +
	Doppia emulsione (D4)	50 ÷ 180
	Singola emulsione +	300 ÷ 500 +
	Doppia emulsione (D5)	50 ÷ 180
	Singola emulsione +	300 ÷ 500 +
	Doppia emulsione (D6)	50 ÷ 180

Tab. 3.6: Campioni realizzati mediante sinterizzazione con solvente di microparticelle

3.4 Preparazione delle microsfere chitosano-gelatina

Le microsfere di chitosano-gelatina sono state realizzate mediante singola emulsione water-in-oil (W/O) in cui una fase acquosa contenente la gelatina e il chitosano viene dispersa in una fase oleosa continua.

Nel caso specifico la fase oleosa è costituita da Cottonseed Oil (*Aldrich Chemical Company*). La fase acquosa consiste in una soluzione di 30 ml al 2% w/v di acido acetico in cui viene dispersa un'opportuna percentuale dei due polimeri naturali.

La procedura seguita consiste nelle seguenti fasi:

1. Preparazione della soluzione acquosa in cui la gelatina e il chitosano vengono disciolti nella soluzione acquosa mediante agitazione magnetica alla temperatura di 60°C, in modo da consentirne il completo scioglimento.
2. La fase oil è stata preriscaldata opportunamente alla temperatura di 60°C.

3. La fase acquosa viene aggiunta goccia a goccia alla fase oil ed il sistema viene miscelato per 30 minuti alla temperatura di 60°C e con un'opportuna velocità, mediante un agitatore meccanico (*FALC Instruments mod. AT, PW: 85 W*), al fine di ottenere delle microparticelle disperse.

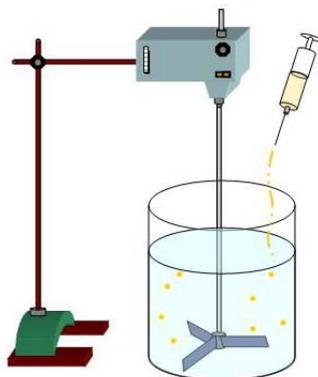


Fig. 3.11: Miscelazione meccanica di W/O a T=60°C

4. Una volta ottenuta l'emulsione, il sistema viene rapidamente raffreddato mediante immersione in un bagno di ghiaccio fino alla temperatura di circa 5°C, in modo da solidificare le microsfele della fase dispersa.
5. La fase successiva consiste nel deidratare le microsfele mediante l'aggiunta di 60 ml di acetone preraffreddato a 5°C.
6. Le microsfele così ottenute vengono filtrate e lavate con acetone preraffreddato a 5°C in modo da eliminare la fase oil.
7. Le microsfele ottenute vengono crosslinkate in una soluzione al 20% w/v di glutaraldeide mediante agitazione magnetica a 800 rpm a 5°C per 24 h.
8. Infine, le microsfele crosslinkate vengono filtrate e lavate con acetone preraffreddato a 5°C.

Diverse tipologie di microsfele sono state realizzate variando la concentrazione di surfattante (SPAN 85) nella fase oil.

Le tipologie di campioni realizzati sono riportati nella seguente tabella:

Tipologia	Velocità di agitazione (rpm)	SPAN 85 (g/ml %)
CG ₁	400	-
CG ₂	400	1,7
CG ₃	400	3,3
CG ₄	400	10

Tab. 3.7:Tipologie di campioni presi in esame

3.5 Analisi dei campioni

3.5.1 Analisi morfologica

Microscopio a scansione elettronica (SEM)

L'analisi della microstruttura dei campioni realizzati è stata eseguita mediante il microscopio a scansione elettronica (SEM) grazie al quale risulta possibile valutare la morfologia delle varie tipologie di campioni.

In particolare, l'analisi SEM sulle microparticelle è stata effettuata sia per studiare la morfologia esterna delle stesse che per analizzare qualitativamente la porosità interna. Per l'analisi della microstruttura interna, le microparticelle sono state congelate in azoto liquido e successivamente sezionate.

L'analisi SEM degli scaffold sinterizzati è stata effettuata per studiare la morfologia e valutare qualitativamente l'estensione dei colletti tra le microsferiche e la porosità.

Preventivamente ciascun campione, asciugato completamente sotto cappa chimica per quarantotto ore, è stato sottoposto ad un processo di metallizzazione indispensabile affinché possa essere acquisita un'immagine ottimale.

Principio di funzionamento del Microscopio a Scansione Elettronica (SEM):

Il microscopio a scansione elettronica è un dispositivo che, sfruttando l'interazione degli elettroni con la materia, è in grado di acquisire l'immagine della superficie di un campione ingrandendola fino a milioni di volte.

L'architettura dello strumento prevede la presenza di due parti essenziali:

- ✓ Un blocco cilindrico in cui sono contenuti vari elementi quali un filamento di tungsteno, sistemi di bobine e lenti condensatrici.
- ✓ Una base sulla quale è collocato il portacampioni in cui è presente il provino nonché una serie di sensori in grado di rilevare gli elettroni che sono deviati secondo diverse modalità.

Infine, lo strumento è corredato di un'unità di elaborazione che permette l'assegnazione delle informazioni necessarie all'esecuzione della prova e gli spostamenti lungo la superficie del campione. In particolare esso è corredato di un monitor CRT sul quale viene visualizzata in tempo reale l'immagine scannerizzata dallo strumento.

Il principio di funzionamento di un SEM è caratterizzato da molteplici fasi.

All'interno del blocco cilindrico è presente un filamento di tungsteno il quale, sottoposto a riscaldamento, è in grado di emettere un fascio di elettroni; esso viene opportunamente accelerato a seguito di una differenza di potenziale applicata ai capi del filamento, che funge da catodo, orientando gli elettroni verso una piastra forata, che funge da anodo.

E' evidente che è possibile regolare la velocità di emissione degli elettroni al variare della tensione applicata (il suo valore può oscillare tra 1KeV e 50KeV). Il fascio di elettroni, prima di giungere al campione, è preventivamente "messo a fuoco" attraverso un sistema di lenti condensatrici e indirizzato per effetto di campi magnetici presenti all'interno di bobine (*scan coils*) percorse da correnti alimentate da un generatore (*scan generator*).

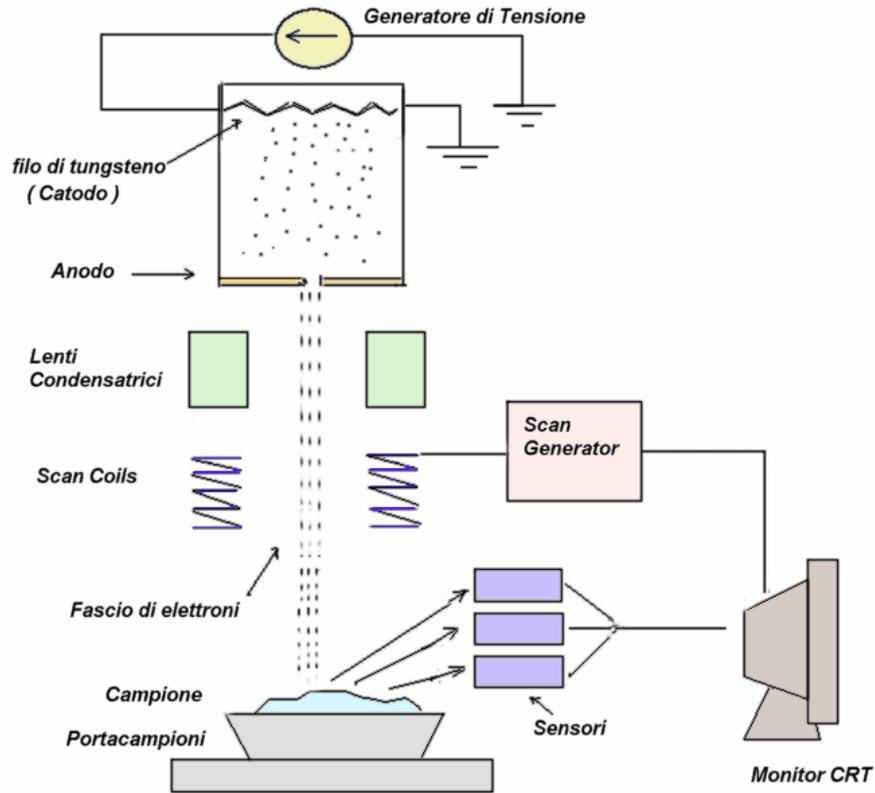


Fig. 3.12: Schema dell'architettura di un microscopio a scansione elettronica SEM

Il fascio di elettroni giunge alla superficie del campione dove si verificano dei fenomeni di interazione tra elettroni e materia e le emissioni vengono rilevate da opportuni sensori, che trasferiscono i segnali, debitamente convertiti, ad un monitor CRT.

L'immagine rilevata è costituita da tanti "spot" luminosi la cui intensità è legata all'intensità delle emissioni; in particolare la presenza di zone più chiare è dovuta alle emissioni relative ad elementi di numero atomico più elevato e quindi in grado di emettere più elettroni, mentre le zone più scure sono riferite ad emissioni relative ad elementi con numero atomico più basso. Un parametro fondamentale nella valutazione di una micrografia SEM è l'**ingrandimento** definito come rapporto di scala tra la dimensione dell'elemento di superficie scansionata b e la dimensione L del corrispondente tratto visualizzato sul monitor:

E' evidente che, al crescere dell'ingrandimento, e pertanto al diminuire del tratto b del provino lungo cui avviene la scansione, aumentano le interazioni tra il fascio di elettroni ed il campione, in quanto gli elettroni interagiscono su porzioni di superficie sempre più ridotte, il che comporta una difficoltà crescente nella messa a fuoco dell'immagine.

Microscopia confocale (LSCM)

L'analisi al microscopio confocale è stata effettuata al fine di determinare la distribuzione delle sacche contenenti BSA all'interno delle microsfeere e la distribuzione delle microparticelle caricate con tale proteina all'interno dello scaffold sinterizzato. A tale scopo, le microparticelle di PCL realizzate mediante doppia emulsione sono state caricate con BSA marcata con rodamina.

E' stato settato il microscopio confocale utilizzando i parametri relativi al probe fluorescente utilizzato, impostando quindi il laser ad Argon che ottimizza la risoluzione per i valori di eccitazione ed emissione della rodamina (Ex: 540 nm, Em: 573 nm).

Principio di funzionamento del Microscopio confocale

In un microscopio confocale la luce di un laser viene fatta convergere dalle lenti dell'obiettivo in un punto estremamente piccolo del campione osservato. Il punto stesso, attraverso un sistema di specchi oscillanti, viene spostato attraverso tutto il campo visivo dell'obiettivo così da effettuare una scansione completa di tutto il piano focale.

Diversamente da quanto avviene in un microscopio tradizionale, in un microscopio a fluorescenza la sorgente luminosa è laser. Grazie alla piccolissima area di campione analizzata, la risoluzione è molto alta e le caratteristiche della luce risultante (estrema coerenza, alta intensità e lunghezza d'onda unica) consentono di evitare i fenomeni di aberrazione e diffrazione tipiche della luce prodotta dalle lampade a incandescenza.

Il laser eccita i soli fluorocromi appartenenti al piano focale, corrispondenti al punto di massima concentrazione del raggio; in questo modo le sezioni non appartenenti al tale piano non vengono eccitate e il risultato complessivo è una riduzione degli aloni e del rumore di fondo [127].

Il principio di funzionamento di un microscopio confocale può essere schematizzato come segue (Fig. 3.13):

- ✓ La luce, emessa dal laser, è deviata dallo specchio dicroico
- ✓ Dopo, la luce investe il campione, eccitandolo. I suoi fluorocromi emettono una radiazione luminosa la quale, catturata dalle lenti dell'obiettivo, colpisce lo specchio dicroico. Attraverso questo la luce riflessa è deviata mentre la luce fluorescente passa attraverso il pinhole e un filtro, giungendo al fotomoltiplicatore.

- ✓ Il pinhole funge da diaframma e impedisce che la luce proveniente dalle zone fuori fuoco raggiunga il fotomoltiplicatore. In questo modo solo il segnale luminoso relativo al piano focale contribuisce alla formazione dell'immagine finale. E' comunque presente un minimo contributo delle zone fuori fuoco dovuto a fenomeni di rifrazione all'interno del campione.
- ✓ Il fotomoltiplicatore trasforma l'intensità luminosa rilevata in un segnale elettrico proporzionale all'intensità stessa.
- ✓ Il segnale elettrico uscente dal fotomoltiplicatore è poi digitalizzato e inviato ad un computer che registra l'intensità luminosa in ogni punto. Questi valori di intensità sono utilizzati per ricostruire l'immagine video: ogni punto del campione corrisponde ad un pixel, e l'intensità luminosa di ogni punto è rappresentata da un certo tono di grigio. L'accostamento di tutti i singoli pixel analizzati fornisce l'immagine finale.

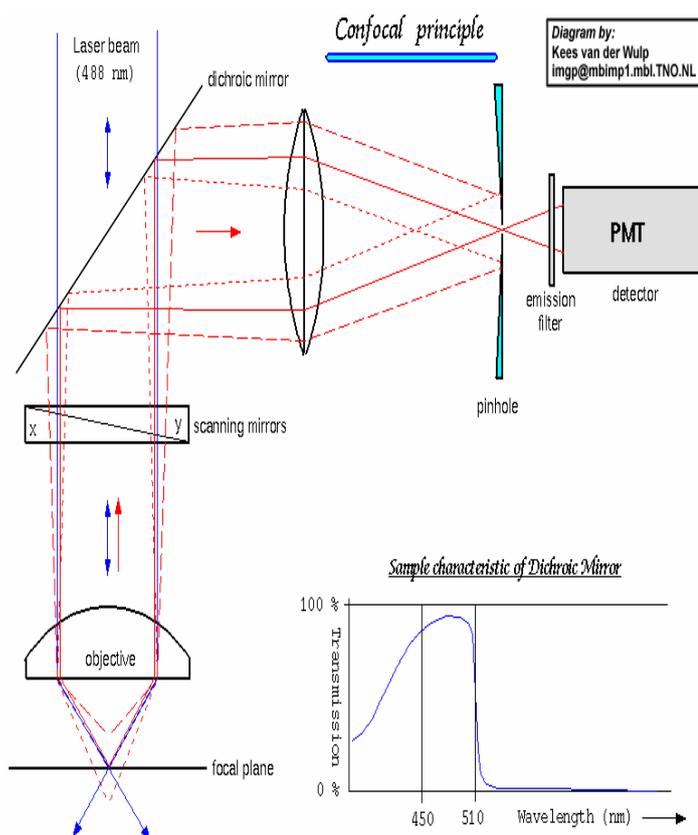


Fig. 3.13: Principio di funzionamento di un microscopio confocale

- ✓ Spostando il campione lungo l'asse verticale dopo ogni scansione è possibile effettuare scansioni di differenti piani focali. Queste scansioni sono dette sezioni ottiche e la loro unione, eseguita via software, consente di ricostruire un'immagine complessiva dell'intero volume, in cui tutti i piani sono contemporaneamente a fuoco. Questa è l'*acquisizione* del volume. (Fig. 3.14) [128].

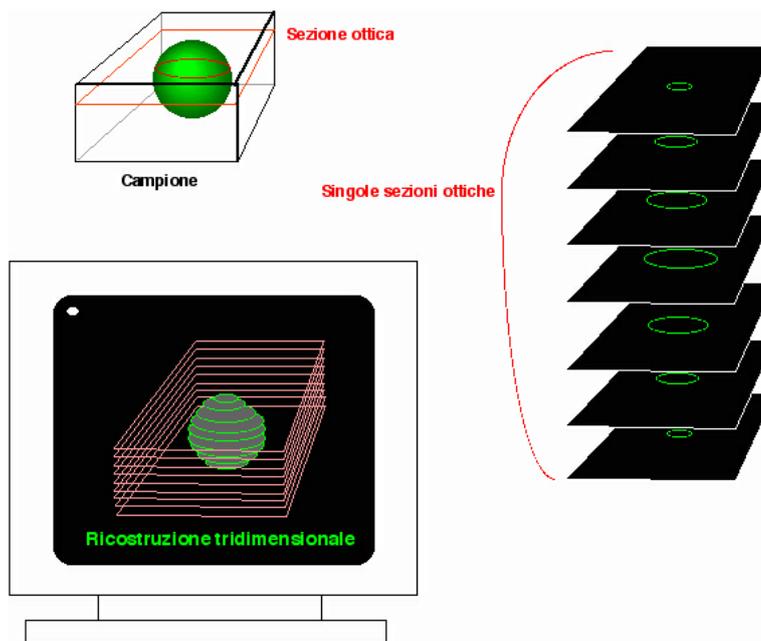


Fig. 3.14: Sezioni ottiche e ricostruzione 3D di un'immagine al confocale

L'immagine acquisita può essere successivamente elaborata per quanto riguarda la regolazione del contrasto, cromia, e rotazione virtuale del volume acquisito attraverso la scansione. È inoltre possibile effettuare un controllo delle dimensioni dei campioni.

I campioni utilizzati per l'analisi con la LSCM devono essere marcati con un *probe* (o dye) fluorescente. Nella scelta del probe da utilizzare è necessario considerare le lunghezza d'onda di eccitazione ed emissione, le linee di laser disponibili, i filtri da utilizzare e la possibilità che, una volta legata al probe, la molecola possa presentare caratteristiche differenti.

Un problema a cui può andare incontro un campione da analizzare al microscopio confocale è il bleaching del marcatore fluorescente. Per bleaching si intende lo

spegnimento irreversibile della fluorescenza, legato all'elevata potenza del laser che investe il campione [129].

Analisi delle immagini

E' stato utilizzato un metodo per la valutazione della porosità di un sistema poroso basato sullo studio bidimensionale e/o tridimensionale delle immagini. Attraverso l'utilizzo di un software dedicato (**Image J**), è stato possibile analizzare le immagini (ottenute al microscopio a scansione elettronica) delle sezioni interne delle microsfele di PCL per ricavare una stima della superficie media dei pori interni.

A seconda della specifica indagine da compiere è necessario elaborare l'immagine attraverso l'utilizzo di diverse funzioni del programma. In primo luogo, è stato attenuato il rumore dell'immagine effettuando uno *smoothing*, o filtraggio passa basso, finalizzato ad eliminare le componenti frequenziali elevate non corrispondenti a quelle dell'immagine. Ciò assicura l'attenuazione di rumori molto diffusi e fastidiosi ai fini dell'elaborazione come il *pepper/salt noise* che consiste nella presenza di pixel isolati caratterizzati da valori di grigio totalmente differenti dai pixel vicini. L'utilizzo della funzione di *sharpening* (filtraggio passa alto) ha permesso di ridurre lo sfocamento dell'immagine ed aumentare la definizione dei contorni, esaltando le frequenze medio alte dell'immagine. Si osserva che tale operazione deve essere necessariamente successiva a quella di *smoothing* altrimenti potrebbe determinare un'esaltazione del rumore alle alte frequenze. Inoltre, esaltando le variazioni repentine dei valori di grigio dell'immagine ed eliminando le variazioni lente (corrispondenti a livelli di grigio uniforme), permette di evidenziare efficacemente i contorni dei pori.

Al fine di regolare in maniera ottimale i contrasti dell'immagine, caso per caso, può essere scelto il range opportuno (threshold) all'interno dell'intervallo 0-255 dei possibili valori della scala dei grigi. A questo punto, l'indagine si completa con l'analisi delle particelle (*Particle Analysis*), attraverso la quale il software riesce ad individuare ed enumerare i pori presenti. In questa fase, in alcuni casi è stato utile l'impiego di uno specifico tool (*Find edges*), il quale è in grado di individuare i contorni più probabili dei pori. Infine, per la stima della superficie media occupata dai pori è stata effettuata una conversione dell'immagine in 8-bit.

Porosimetro ad intrusione di mercurio

Tra le possibili tecniche di misura dei pori, quella di intrusione di mercurio è la tecnica largamente più utilizzata.

La porosimetria a mercurio è una tecnica sviluppata nel 1945 da Ritter e Drake e permette di misurare il volume e le dimensioni dei macropori e mesopori in sostanze solide porose. La tecnica si basa sulla proprietà del mercurio di comportarsi da liquido non bagnante con una grandissima varietà di solidi.

Grazie a questa caratteristica il mercurio penetra attraverso i pori aperti di un campione solido sotto l'effetto di una pressione crescente.

I campioni sono stati analizzati mediante il porosimetro a mercurio Pascal 140/240 al fine di determinare la distribuzione dimensionale dei pori, il diametro medio e la porosità totale.

Nel caso specifico, l'analisi della microporosità delle microsferiche ottenute mediante doppia emulsione è stata realizzata con il Porosimetro Pascal 240, su campioni del peso di circa 50 mg, effettuando due successive pressurizzazioni mediante lo strumento Pascal 240. La porosimetria al mercurio evidenzia due aree di penetrazione: la penetrazione a bassa pressione riguarda la porosità interparticellare, mentre la penetrazione ad alta pressione riguarda i pori delle particelle.

L'analisi della macroporosità mediante lo strumento Pascal 140, munito del kit Ultramacropori, è stata effettuata su campioni sinterizzati del peso di circa 200 mg, impostando un volume di riempimento di mercurio nel dilatometro di 1800 mm³ ed una pressione massima di 400 kPa.

L'analisi della microporosità, mediante lo strumento Pascal 240, è stata effettuata su campioni del peso di circa 200 mg, impostando una pressione di 200 MPa.

Inoltre, è stata effettuata un'analisi della macroporosità su scaffold sinterizzati del peso di circa 150 mg. Tale analisi è stata effettuata con lo strumento Pascal 140 munito del kit Ultramacropori impostando un volume di riempimento del dilatometro pari a 1800 mm³ ed una pressione massima di 400 kPa.

Principi di funzionamento del Porosimetro Pascal 140/240

Un liquido messo in contatto con un solido poroso con il quale si comporti da non bagnante (ovvero, se il liquido presenta con quel solido un angolo di contatto maggiore di 90°) non riesce ad essere assorbito spontaneamente dai pori del solido stesso a causa

della tensione superficiale. Tuttavia, questa resistenza alla penetrazione può essere vinta applicando una pressione esterna.

La pressione richiesta è in funzione della dimensione del poro. La relazione tra la dimensione dei pori e la pressione esercitata, quando il poro è considerato cilindrico, è espressa come:

$$pr = -2\gamma \cos \vartheta \quad (1)$$

dove: r è il raggio del poro, γ la tensione superficiale del mercurio, θ l'angolo di contatto e p la pressione assoluta esercitata.

Questa relazione è comunemente conosciuta come equazione di Washburn.

Sebbene in quasi tutte le sostanze porose non ci sono pori cilindrici, tale equazione viene generalmente usata per calcolare la distribuzione della dimensione dei pori partendo dai dati ottenuti mediante il Porosimetro a mercurio.

L'equazione di Washburn deriva dalle seguenti considerazioni:

In un capillare avente sezione circolare, la tensione superficiale del liquido è esercitata nell'area di contatto oltre una lunghezza pari alla circonferenza del poro. Questa forza, $2\pi r\gamma$, è perpendicolare al piano della superficie di contatto.

La forza tendente a spingere il liquido fuori dal capillare è :

$$- 2\pi r\gamma \cos \vartheta$$

Contro questa forza, la pressione esterna esercitata sull'area all'interno della circonferenza di contatto sarà:

$$\pi r^2 p$$

Quando viene raggiunto l'equilibrio le due forze hanno lo stesso valore.

L'equazione (1) mostra, quindi, che il raggio del poro è inversamente proporzionale alla pressione:

$$r = \frac{-2\gamma \cos \vartheta}{p}$$

Considerando una tensione superficiale di 480 mN/m ed un angolo di contatto di 141,3° e assumendo che tutti i pori siano cilindrici, si ottiene la seguente relazione:

$$r = \frac{7500}{p}$$

dove r è il raggio del poro espresso in nanometri (nm), p è la pressione assoluta applicata espressa in Kg /cm².

Per pori di forma irregolare, il rapporto tra la sezione del poro (riferita alla pressione esercitata) e la circonferenza del poro (riferita alla tensione superficiale) non è proporzionale al raggio e dipende dalla forma del poro.

L'angolo di contatto (preso come $141,3^\circ$) dipende dalla natura del campione e può pertanto essere considerato solo come valore medio. L'angolo di contatto del mercurio misurato su un grande numero di campioni da valori compresi tra 125° e 152° , perciò, $141,3^\circ$ è considerato un valore medio. Inoltre, anche la tensione superficiale è variabile con la temperatura; infatti, alla temperatura di 25°C essa misura $482,2\text{ dynes/cm}$, mentre a 50°C risulta di 472 dynes/cm . Come valore medio è stato scelto 480 dynes/cm . In aggiunta a queste approssimazioni, si deve assumere che la natura delle sostanze porose e la forma del poro rimangano costanti per l'intero range di pressione applicata durante l'analisi.

Il porosimetro Pascal 140, mostrato in fig. 3.15, è uno strumento automatico per la preparazione dei campioni per l'analisi porosimetrica e per la misura della porosità nelle regioni nelle regioni comprese negli intervalli di $2\div 100\ \mu\text{m}$ (analisi macropori) e di $100\div 300\ \mu\text{m}$ (analisi ultramacropori). Lo strumento è particolarmente indicato l'analisi dimensionale di polveri. Il volume poroso viene misurato per mezzo di un sistema capacitivo. Lo strumento deve essere accoppiato ad un PC esterno per la gestione dei dati.

Può essere fornito di un kit Ultramacropori P/N190 06046 per consentire la caratterizzazione di campioni solidi e polveri per raggio dei pori compreso tra 1900 e 300000 nanometri.

Il porosimetro Pascal 140 consiste, essenzialmente, di quattro parti:

dilatometro: contiene il campione da esaminare;

sistema di pressurizzazione: comprende la pompa peristaltica dell'aria;

sistema di depressurizzazione: comprende la pompa peristaltica dell'aria e la pompa da vuoto;

sistema di misura di capacità e della pressione: misura l'intrusione del mercurio nel campione e la pressione di intrusione.

Il porosimetro Pascal 240, mostrato in fig. 3.15, è uno strumento automatico per la determinazione della dimensione e del volume dei pori, nel campo da 3.7 a 7500 nm di raggio, per mezzo dell'intrusione di mercurio ad alta pressione.



Fig. 3.15: Porosimetro Pascal 140 e 240

Nel porosimetro 240, così come nel Pascal 140, il volume di mercurio che penetra nei pori del campione è misurato tramite un sistema capacitivo mentre la pressione di penetrazione è misurata tramite un apposito trasduttore.

Il porosimetro Pascal 240 consiste, essenzialmente, di tre parti:

dilatometro: contiene il campione da esaminare

sistema di pressurizzazione: comprende la pompa di ingranaggi, il moltiplicatore di pressione e l'autoclave

sistema di misura di capacità e della pressione: misura l'intrusione del mercurio nel campione e la pressione di intrusione.

Entrambi gli strumenti forniscono i seguenti risultati:

- ✓ densità di massa (bulk density) (g/ml): la densità di un solido riferita al volume esterno del solido stesso. Il volume esterno è misurabile attraverso tale strumento grazie alla proprietà del mercurio di non bagnare le pareti di un

campione solido e quindi necessita di una pressione per penetrare eventuali pori del campione stesso. Possiamo definire la bulk density come:

$$BD = \frac{W_1 - W_2}{W_s} \cdot \rho_{Hg}$$

dove:

W_1 = peso dilatometro + mercurio all'altezza di riferimento (g)

W_2 = peso dilatometro + mercurio all'altezza di riferimento + peso campione (g)

W_s = peso del campione (g)

ρ_{Hg} = densità del mercurio alla temperatura d'analisi (g/cc)

- ✓ densità apparente (g/ml) è la bulk density corretta del volume specifico dei pori espresso in cc/g oppure mm³/g. Tale densità è definita apparente per due motivi principali: il primo è che se il campione presenta delle microporosità al di sotto del limite minimo di misura, essi non possono essere misurati e quindi non si può tenerne conto nel calcolo della densità. Inoltre, alcuni tipi di campione subiscono l'effetto della compressione durante la pressurizzazione e lo strumento interpreta tale compressione come una presenza di pori.

La densità apparente si può definire nel modo seguente:

$$AD = \frac{1}{\left(\frac{1}{BD} - PV\right)}$$

Dove PV è il volume specifico totale dei pori espresso in cc/g.

- ✓ porosità percentuale (%);
- ✓ distribuzione del volume dei pori in funzione del raggio (campioni solidi);
- ✓ distribuzione percentuale delle dimensioni delle particelle (campioni in polvere);
- ✓ volume specifico dei pori (ml/g);
- ✓ raggio medio dei pori (Å, μm, nm);
- ✓ superficie specifica (cumulativa e differenziale) (m²/g);
- ✓ studio della forma dei pori.

Microtomografia computerizzata

Un'ulteriore analisi quantitativa della porosità degli scaffold sinterizzati è stata ottenuta mediante Tomografia Computerizzata, un metodo radiografico per la produzione di immagini di sezioni trasversali del corpo.

L'informazione ha origine dalla misura dell'attenuazione che i raggi X subiscono nell'attraversamento del campione da analizzare.

Il risultato di tale processo è la formazione di un'immagine bidimensionale (proiezione). Se il campione o il sistema di rivelazione vengono ruotati, si otterranno tante proiezioni quanti sono gli angoli di rotazione. La composizione di tali proiezioni (mediante algoritmi sofisticati) fornisce l'immagine di una slice del campione.

Se alla rotazione di uno dei componenti del sistema, si aggiunge un moto di traslazione del sistema sorgente di raggi X – campione – rivelatore si possono ottenere le singole slice a diverse altezze; sovrapponendo queste ultime è possibile ottenere una ricostruzione dell'intero volume del campione e quindi la completa visualizzazione delle sue strutture interne [130].

Principio di funzionamento del sistema CT

Una volta scelto la struttura da analizzare viene fissato il numero N di strati trasversali e paralleli alla sezione mediana dell'apertura e il numero M di scansioni da effettuare per ciascuno strato.

Il fascio di raggi X può essere parallelo (pencil beam) o a ventaglio (fan beam) ed è sottoposto alla collimazione primaria che ne determina lo spessore.

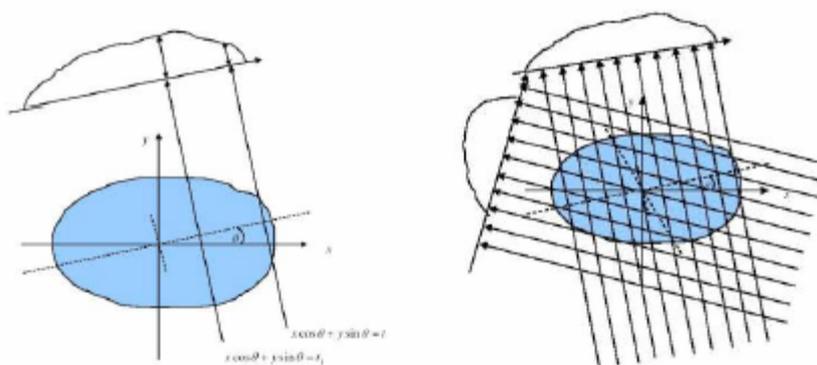


Fig. 3.16: Proiezioni singola e multiple.

Durante la scansione un fascio di raggi X collimato attraversa il corpo da esaminare sullo stesso piano formando una proiezione (**profilo radiografico di assorbimento**) dello strato trasverso appartenente a tale piano; attraverso una sequenza opportuna di movimenti rotatori e traslatori sincroni del complesso sorgente – rivelatore, viene rilevata una serie finita di M profili radiografici di assorbimento, determinati secondo angolazioni – viste diverse, per un angolo di almeno 180°.

Nel caso più semplice per ottenere una proiezione il tubo radiogeno viene fatto traslare sincronicamente al rivelatore mentre con la rotazione del tubo stesso di un angolo prefissato si ottengono delle proiezioni multiple del medesimo strato.

A partire dai dati delle proiezioni multiple tramite un elaborato elettronico e alcuni algoritmi di ricostruzione tramite retroproiezione, vengono calcolati i coefficienti di attenuazione dei tessuti appartenenti allo strato esaminato e questi consentono di costruire un'immagine numerica di ciascun strato. [130]

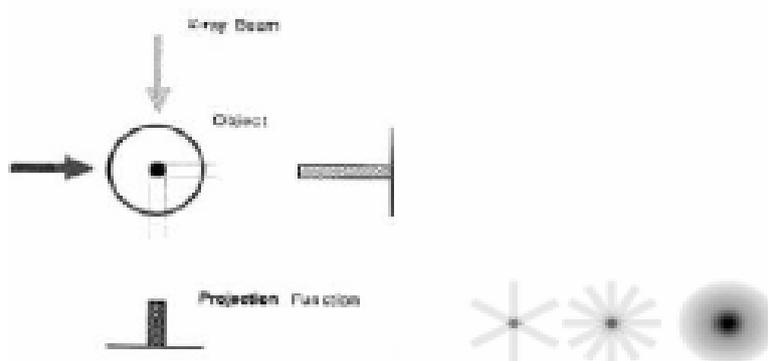


Fig. 3.17: proiezioni e retroproiezioni

3.5.2 Analisi dimensionale: Coulter Counter

Al fine di verificare l'influenza della concentrazione di polimero e della concentrazione di PVA nella fase acquosa interna sulle dimensioni delle microsfele ottenute mediante doppia emulsione, è stata eseguita un'analisi dimensionale sulle diverse tipologie di campioni realizzati. L'analisi dimensionale è stata condotta utilizzando un Coulter Counter della Beckman Coulter modello LS 100Q.

Principio di funzionamento del Coulter Counter

Il Coulter Counter permette di misurare le dimensioni di particelle per diffrazione di un raggio laser incidente. Il metodo di misura delle dimensioni della diffrazione di un raggio luminoso sfrutta il principio dell'ottica per cui piccole particelle investite da un fascio di luce disperdono la luce in caratteristici e simmetrici pattern che possono essere raccolti su uno schermo. La distribuzione delle dimensioni delle particelle può essere ricavata dal pattern dell'intensità della luce dispersa espresso come funzione dell'angolo formato rispetto alla direzione del raggio incidente (flux pattern) (Fig. 3.18).

Il più semplice flux pattern ottenibile è quello relativo ad una distribuzione monomodale di sfere e consiste in uno spot centrale intenso (noto come Airy disk) circondato da anelli concentrici chiari e scuri di intensità decrescente allontanandosi dal centro. L'angolo di diffrazione a cui si ha il primo cerchio scuro (minimo di diffrazione) è legato alle dimensioni delle particelle. Più le particelle analizzate sono piccole più risulta grande l'angolo del primo anello scuro. Nel caso di particelle con due o più dispersioni monomodali il flux pattern risulta costituito dalla sovrapposizione dei pattern di ogni singola popolazione.

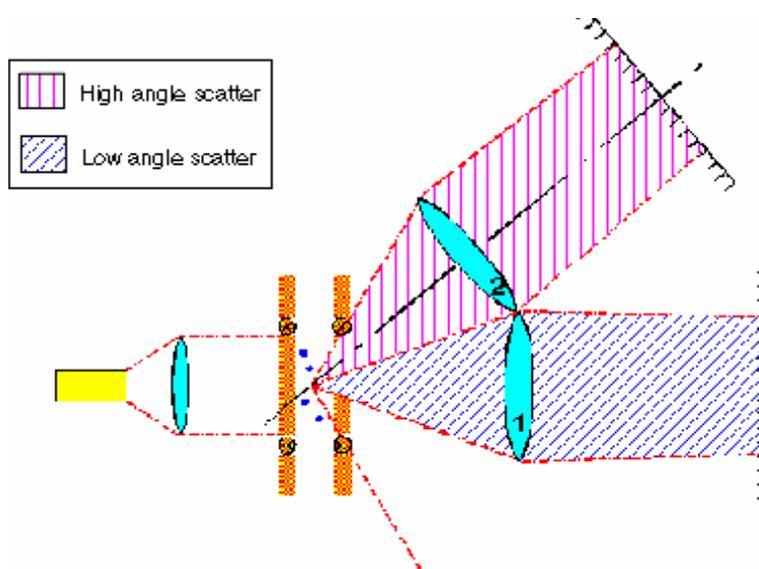


Fig. 3.18: Schema della luce dispersa per interazione con particelle

3.5.3 Analisi del rilascio della proteina incapsulata

Per lo studio della cinetica di rilascio da microsferule ottenute mediante doppia emulsione è stato utilizzato uno spettrofotometro (PERKIN- ELMER WALLAC 1421) provvisto di lampada UV e filtro d'eccitazione a 280 nm.

La procedura per l'analisi della cinetica di rilascio dalle microsferule consta delle seguenti fasi:

- 1) vengono accuratamente pesati 50 mg di microsferule anidre e introdotte in un eppendorf da 1,5 ml ;
- 2) vengono aggiunti 500 µl di acqua bidistillata;
- 3) il campione viene incubato a 37°C ;

- 4) ad intervalli di tempo regolari i campioni vengono centrifugati per 30 min ad una velocità di 10000 rpm per facilitare la deposizione delle microsfele e il prelievo del supernatante;
- 5) da ogni campione vengono prelevati 100 µl di supernatante ed analizzati allo spettrofotometro a 280 nm per la determinazione della BSA rilasciata;
- 6) ad ogni campione analizzato vengono aggiunti 100 µl di acqua bidistillata per il ripristino del volume iniziale;
- 7) i campioni vengono nuovamente incubati a 37°C.

Per ricavare la quantità di BSA rilasciata dagli scaffold, tre campioni per ogni diversa tipologia sono stati accuratamente pesati, immersi in 500 µl di acqua bidistillata e incubati a 37°C. Le misure di assorbimento, anche in questo caso, sono state effettuate su 100 µl della soluzione in cui sono immersi gli scaffold e, successivamente ad ogni misura, a ogni campione sono stati aggiunti 100 µl di acqua bidistillata per riportare il volume al valore iniziale di 500 µl.

Al fine di determinare l'efficienza d'incapsulamento della BSA nelle diverse tipologie di microsfele DE e, quindi, il rapporto tra la quantità di BSA realmente incapsulata, rispetto alla quantità utilizzata nell'emulsione, 10 mg di microsfele anidre sono state disperse in 1ml di diclorometano. Quando le microsfele si sono sciolte, è stato aggiunto 1ml di PBS e la nuova soluzione è stata agitata vigorosamente per cercare di disperdere al meglio una fase nell'altra. Il PBS ha il compito di estrarre la proteina dalla soluzione di polimero. La dispersione è stata centrifugata per 30 minuti a 8000 rpm per ottenere la separazione delle due fasi. 100 µl della fase acquosa (soluzione di PBS) sono stati prelevati e analizzati allo spettrofotometro.

Principio di funzionamento dello spettrofotometro

I metodi di analisi spettrochimici sono basati sull'analisi dello spettro delle sostanze, il quale può essere di emissione o di assorbimento. Infatti ogni sostanza assorbe o emette radiazioni di lunghezza d'onda ben determinata, l'analisi dello spettro permette allora di individuare la natura della sostanza in esame, la misura dell'intensità delle radiazioni emesse o assorbite permette di risalire alla quantità di sostanza analizzata. Per l'analisi sperimentale effettuata è stato utilizzato uno spettrofluorimetro Perkin-Elmer. serie VICTOR 3 mod.Wallac 1421 (Fig. 3.19).



Fig. 3.19: Spettrofotometro

La sorgente luminosa, “**light source**”, è impiegata per massimizzare l'energia di eccitazione che raggiunge i campioni. La luce emessa dalla sorgente luminosa viene focalizzata su un “**monocromatore**” per la selezione della lunghezza d’onda desiderata. I monocromatori permettono la selezione di qualsiasi lunghezza d’onda variabile tra 200 nm e 1000 nm. Successivamente la luce emessa attraversa una fenditura posta nel fuoco del “**collimatore**”. Le lenti del collimatore rendono paralleli i raggi uscenti dalla fenditura e li inviano all'elemento dispersivo, “**prisma**”, che devia i singoli raggi in funzione della loro lunghezza d'onda. La luce che colpisce i campioni e quella che proviene da essi, viene focalizzata per mezzo di un'unica lente. La luce emessa dal campione viene amplificata da un tubo fotomoltiplicatore “**PMT**”. I dati rilevati sono poi trasmessi al computer di controllo e l'analisi viene attuata da un software di riduzione dei dati . In fig. 3.20 è riportato uno schema a blocchi di uno spettrofluorimetro:

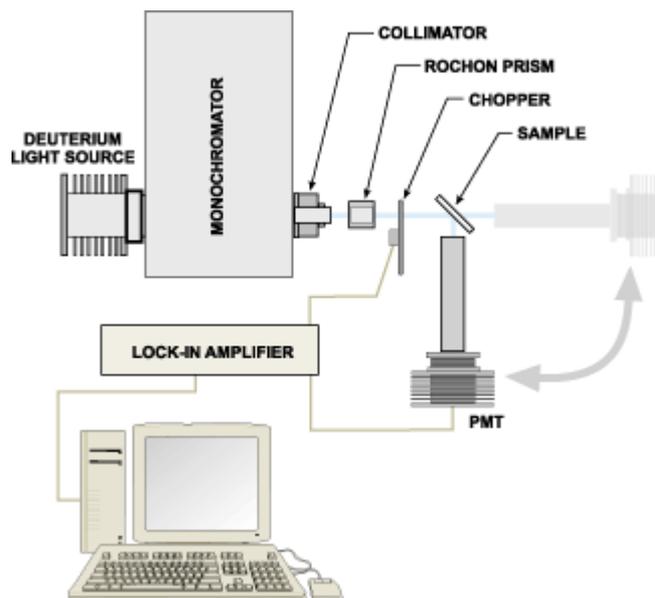


Fig. 3.20 : Schema rappresentativo del principio di funzionamento dello spettrofotometro

3.5.4 Analisi dell'attività della proteina rilasciata

Al fine di verificare che le condizioni del processo di preparazione delle microsfere (contatto con il solvente, agitazione magnetica e sonicazione) non abbiano provocato la denaturazione (perdita della struttura terziaria) della BSA, è stata condotta un'analisi cromatografica per gel filtrazione sulla proteina rilasciata. L'analisi è stata condotta caricando 500 µl di una soluzione di BSA in PBS in una colonna cromatografica di gel filtrazione SUPERDEX 200 (HR10/30) usando un sistema AKTA (Amersham Pharmacia Biotech) ad una velocità di flusso di 0,3 ml/min in un buffer di corsa composto da 25 mM TRIS-HCL a pH 8,15%glicerolo, 500 mM di NaCl, 2,5 mM di MgCl₂.

Principio di funzionamento di un cromatografo per Gel Filtration

La cromatografia per gel filtration o cromatografia a esclusione si fonda su un principio abbastanza semplice: una colonna di particelle di gel o di granuli di vetro poroso è in equilibrio con un solvente adatto alle molecole da separare. Le molecole più grandi, completamente escluse dai pori, passano attraverso gli spazi interstiziali, mentre le molecole più piccole si distribuiscono nel solvente presente sia all'interno che all'esterno del setaccio molecolare e attraversano quindi la colonna a velocità più bassa. La forza che permette all'eluente di scorrere nella colonna è la pressione applicata da una pompa in testa alla colonna che forza la fase mobile a scorrere all'interno della fase

stazionaria.

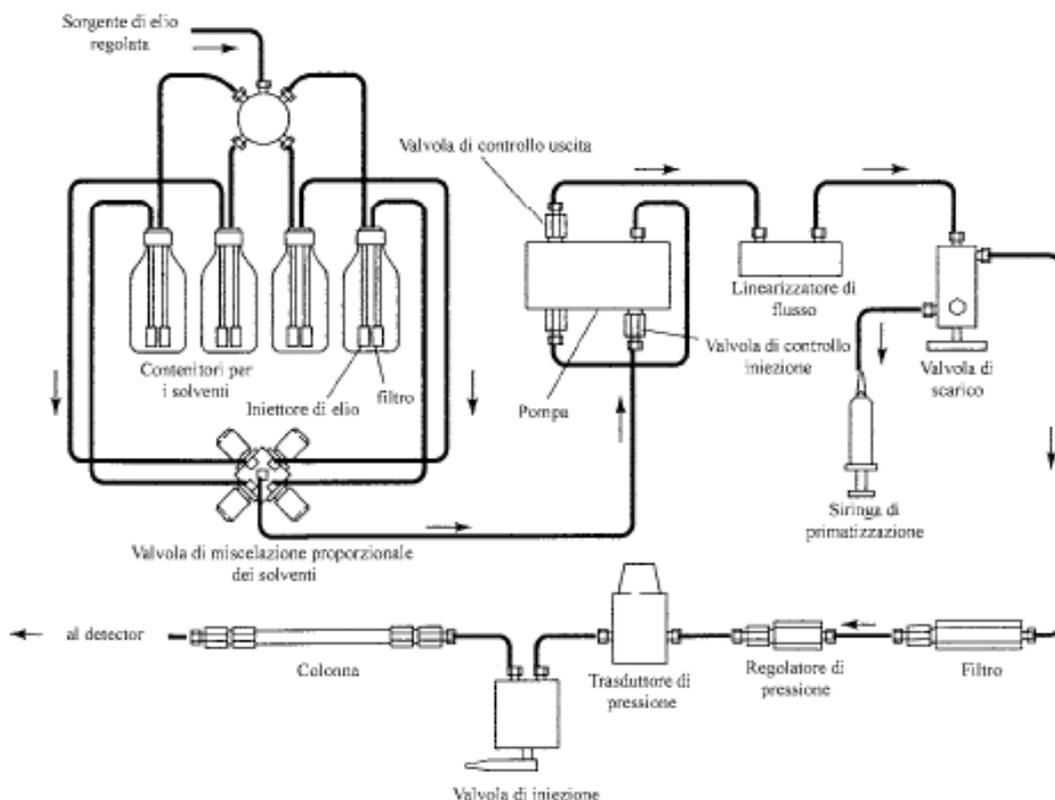


Fig. 3.21: schema di uno strumento per HPLC

I rilevatori più ampiamente usati per la cromatografia liquida si basano sulla misura dell'assorbimento della luce ultravioletta o della luce visibile da parte del campione. Generalmente vengono indagate lunghezze d'onda che vanno dai 200 ai 280 nm poiché molti gruppi funzionali delle sostanze organiche assorbono in questa regione. La sorgente usata può essere il mercurio ma vengono usati anche filamenti di tungsteno o deuterio equipaggiati con filtri di interferenza che eliminano le radiazioni indesiderate.

3.5.5 Analisi termica

L'analisi calorimetria a scansione differenziale è stata condotta allo scopo di valutare l'effetto sulle proprietà termiche del polimero impiegato dovuto alla tecnica di preparazione utilizzata.

L'analisi termica dei campioni è stata effettuata mediante lo strumento della TA Instrument mod. Q1000. Per l'operazione di pesatura sia delle capsule che dei campioni

si è utilizzata una bilancia ad alta precisione, mentre l'operazione di chiusura delle capsule è stata eseguita mediante pressa per chiusura ermetica.

Tutti i campioni sono stati sottoposti ad una scansione di riscaldamento da -100°C a 100°C , con una velocità di $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

Calorimetria a scansione differenziale (DSC)

L'analisi termica a scansione differenziale, generalmente nota come DSC, è un utile strumento nell'analisi dei polimeri. La determinazione delle temperature di fusione e di transizione vetrosa, del calore specifico e lo studio della cinetica di cristallizzazione di materiali a matrice polimerica, sono le più comuni applicazioni di questa tecnica.

Essa si basa sulla rilevazione e registrazione in forma di termogramma dei fenomeni esotermici ed endotermici che avvengono nel provino posto nella cella del calorimetro durante i processi chimico-fisici indotti da variazioni della temperatura.

Ciò avviene misurando la differenza di calore assorbito o ceduto dal campione rispetto a quella di un materiale inerte di riferimento sottoposto allo stesso trattamento termico.

Il calorimetro a scansione differenziale consente di ottenere diagrammi in cui è riportato il calore scambiato (heat flow) in funzione della temperatura o del tempo (fig. 3.22). Il segnale in ordinata, che rappresenta la velocità di assorbimento di calore, è proporzionale al calore specifico del campione (quantità di energia termica necessaria per ottenere un determinato aumento di temperatura).

Ogni transizione, accompagnata da un cambiamento nel calore specifico, produce una discontinuità nel segnale di alimentazione ed i cambiamenti esotermici o endotermici di entalpia determinano dei picchi, la cui area è proporzionale al cambiamento totale di entalpia e alla quantità di sostanza presente.

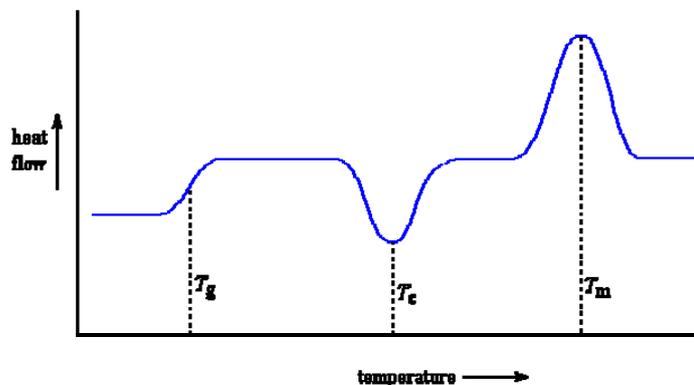


Fig. 3.22: Tipica curva DSC

Nella maggior parte degli strumenti DSC l'apparecchiatura è costituita da un'unica cella, da una fornace programmabile, da un registratore e da un sistema di raffreddamento e controllo, solitamente in azoto liquido.

I campioni, contenuti in opportune capsule, sono collocati su delle apposite piattaforme (dischi di cromo) poste simmetricamente all'interno della base della cella (disco di costantana) e munite di termocoppie per la misura della temperatura. La differenza di temperatura viene ricavata misurando la differenza di potenziale tra il filo di cromo e quello di alluminio connessi a ciascun disco di cromo.

Nel caso specifico, l'analisi sui campioni è stata effettuata mediante il calorimetro a scansione differenziale della TA INSTRUMENT mod. Q1000, rappresentato in fig. 4.23, accoppiato con un sistema di raffreddamento ad azoto liquido.

Questo è un DSC di nuova generazione caratterizzato da una tecnologia avanzata rispetto ai DSC tradizionali principalmente per quanto riguarda le celle. Queste sono munite di una terza termocoppia in cromo e costantana posta in mezzo tra le piattaforme del riferimento e del campione, che a differenza dei DSC tradizionali, sono rialzate rispetto al disco di costantana. Tutto ciò consente una maggiore precisione e sensibilità dello strumento.

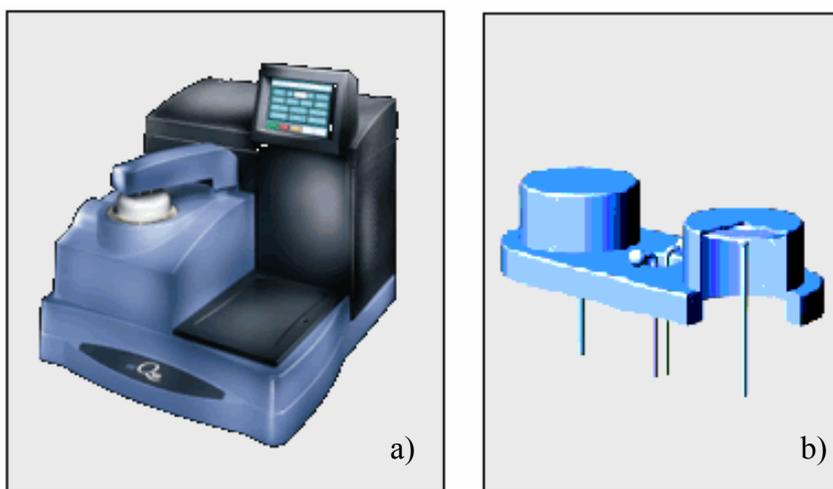


Fig. 3.23: a) Q 1000; b) piattaforme rialzate del campione

3.5.6 Caratterizzazione meccanica

E' stata eseguita una caratterizzazione meccanica dei campioni mediante la macchina dinamometria Instron 4204, al fine di determinare la resistenza a compressione, il modulo elastico e la deformazione.

Le prove a compressione sono state eseguite, in riferimento alla norma ASTM 695/2°, su campioni di geometria cilindrica con diametro di 10 mm e altezza di 5 mm. Si è utilizzata una cella di carico di 1 kN, impostando una velocità della traversa mobile di 1 mm/min.

Principio di funzionamento della macchina dinamometrica Instron 4204:

Una macchina dinamometria è costituita da quattro parti essenziali:

- ✓ Un attrezzatura di applicazione del carico;
- ✓ Un sistema di controllo e di visualizzazione dei parametri meccanici visualizzabili durante la prova;
- ✓ Una consolle per l'acquisizione dei dati;
- ✓ Un computer per l'elaborazione dei dati ricevuti durante la prova.

La prima parte è costituita principalmente da un montante su cui viene collocata la traversa mobile in grado di scorrere con moto verticale ascendente e discendente. Su di essa viene montata la cella di carico il cui peso varia a seconda della prova che deve essere compiuta (assegnata dalle norme ASTM così come la velocità della traversa mobile).

La seconda parte della macchina è il sistema di controllo che provvede al monitoraggio dei valori di sforzo e di deformazione che subisce il campione durante la prova. Per il suo corretto funzionamento è necessario compiere, prima della singola prova, delle operazioni che permettono la lettura della cella di carico, l'azzeramento del carico e della deformazione nonché l'assegnamento di un piccolo precarico indispensabile per il corretto avvio della prova. Infine, la macchina è corredata di sistema automatico costituito da un computer, dotato di software idoneo alla codifica dei dati trasmessi dalla macchina. In particolare l'elaboratore registra in ingresso i parametri della prova da compiere: caratteristiche geometriche del campione, cella di carico, velocità della traversa. Al termine della prova esso fornirà in uscita i parametri richiesti, opportunamente

codificati, in modo da poter essere successivamente elaborati mediante software (foglio elettronico).

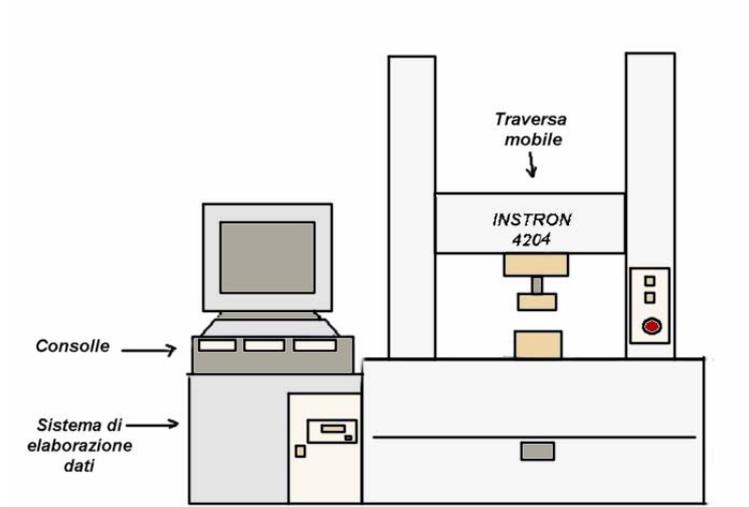


Fig. 3.24: Schema dell'architettura della macchina dinamometrica Instron 4204

Capitolo 4

Risultati sperimentali e discussioni

4.1 Microsfere di PCL ottenute mediante singola emulsione

Le tipologie di campioni realizzati sono riportati nella seguente tabella:

Tipologia	PCL/MC (w/v)	Velocità di agitazione (rpm)
M ₁	8/92	200
M ₂	8/92	400
M ₃	8/92	800
M ₄	16/84	200
M ₅	16/84	400
M ₆	16/84	800
M ₇	24/76	200
M ₈	24/76	400
M ₉	24/76	800

Tab. 4.1: Tipologie di microsfere ottenute mediante singola emulsione

4.1.1 Analisi morfologica

La morfologia dei campioni realizzati è stata valutata mediante SEM. Di seguito si riportano alcune micrografie relative alle microsfere ottenute mediante singola emulsione; in particolare, per ogni tipologia riportata vengono mostrate due micrografie a differente ingrandimento, al fine di evidenziare la distribuzione dimensionale e la morfologia superficiale delle singole microsfere. Le micrografie riportate sono rappresentative di tutti i campioni riportati in tabella 4.1.

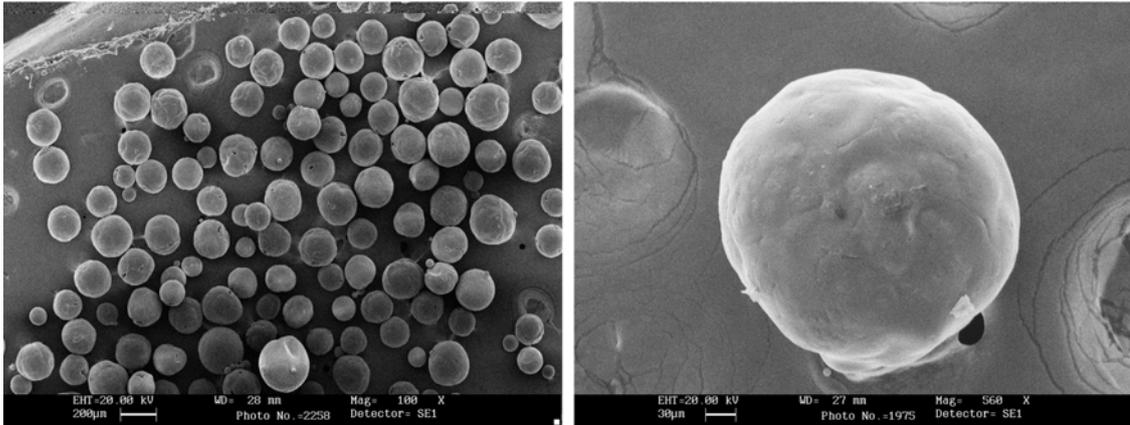


Fig. 4.1:Tipologia M1

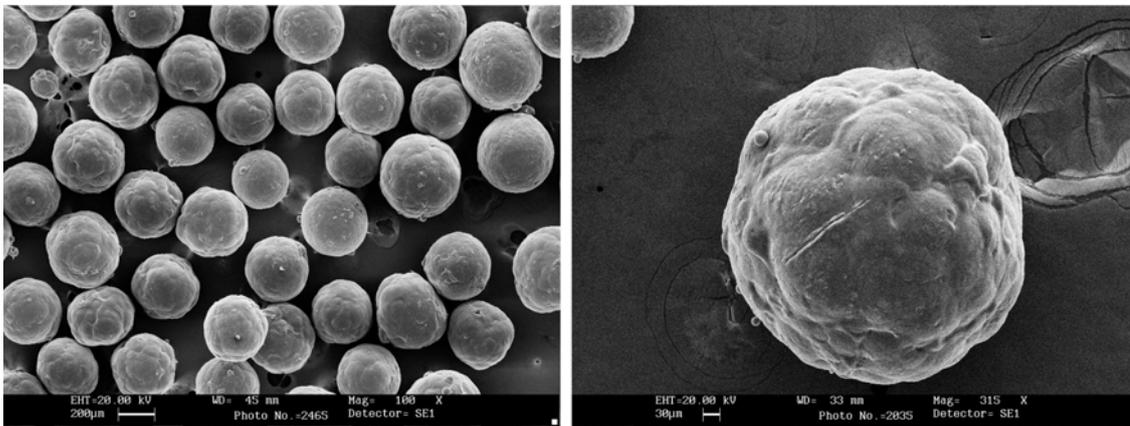


Fig. 4.2:Tipologia M4

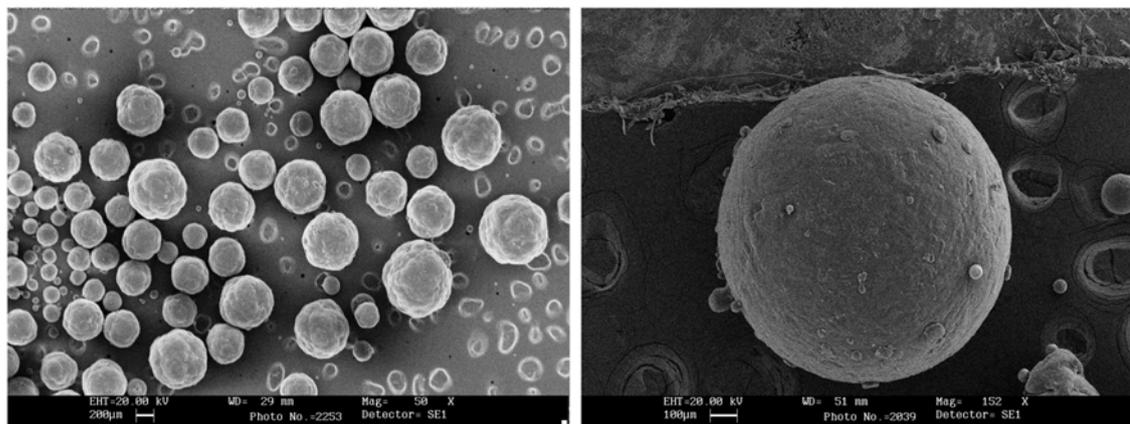


Fig. 4.3:Tipologia M7

Dalle micrografie riportate (Fig. 4.1-3) si riscontra che le microsfele risultano sferiche e non porose. Tali proprietà si mostrano idonee alla realizzazione di scaffold per sinterizzazione, poichè microsfele di forma regolare facilitano la formazione di strutture porose interconnesse, mentre la porosità superficiale non è una condizione necessaria. Inoltre, si osserva, per ciascuna tipologia di campioni, una distribuzione dimensionale piuttosto ampia che non permette un controllo accurato delle proprietà dello scaffold, poichè la presenza di microsfele con range dimensionale ampio può comportare un'occlusione dei pori.

4.1.2 Analisi calorimetria a scansione differenziale (DSC)

Per valutare se la tecnica di preparazione utilizzata ha determinato una variazione delle proprietà termiche del polimero e valutare, al tempo stesso, la temperatura ottimale per il processo di sinterizzazione, i campioni sono stati sottoposti ad analisi calorimetria a scansione differenziale.

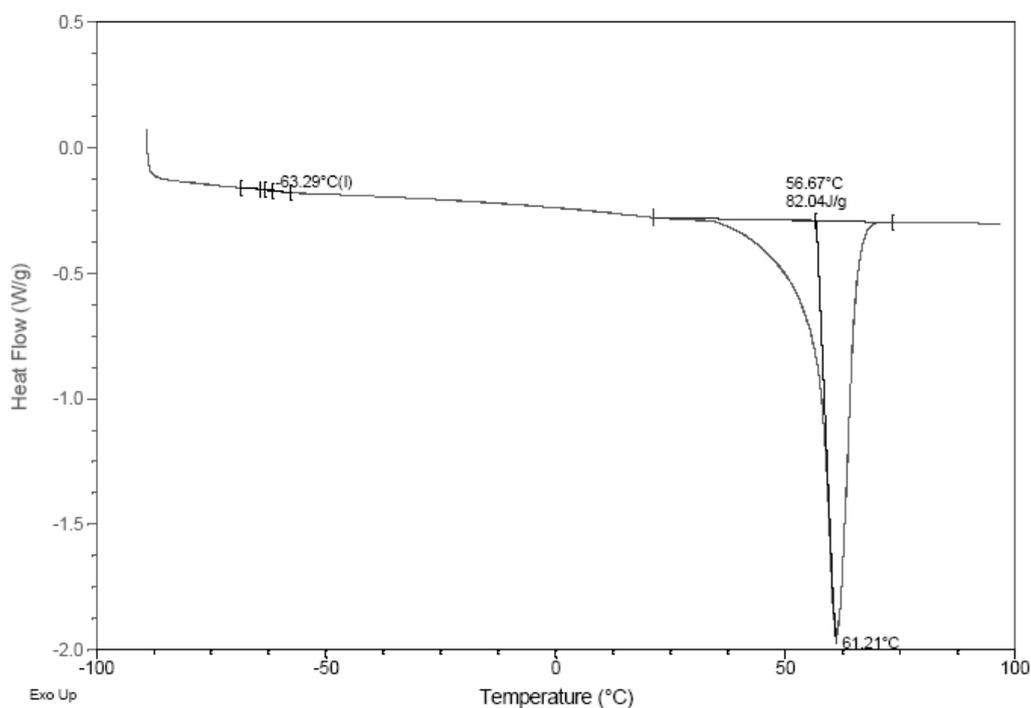


Fig. 4.4: Termogramma microsfele PCL

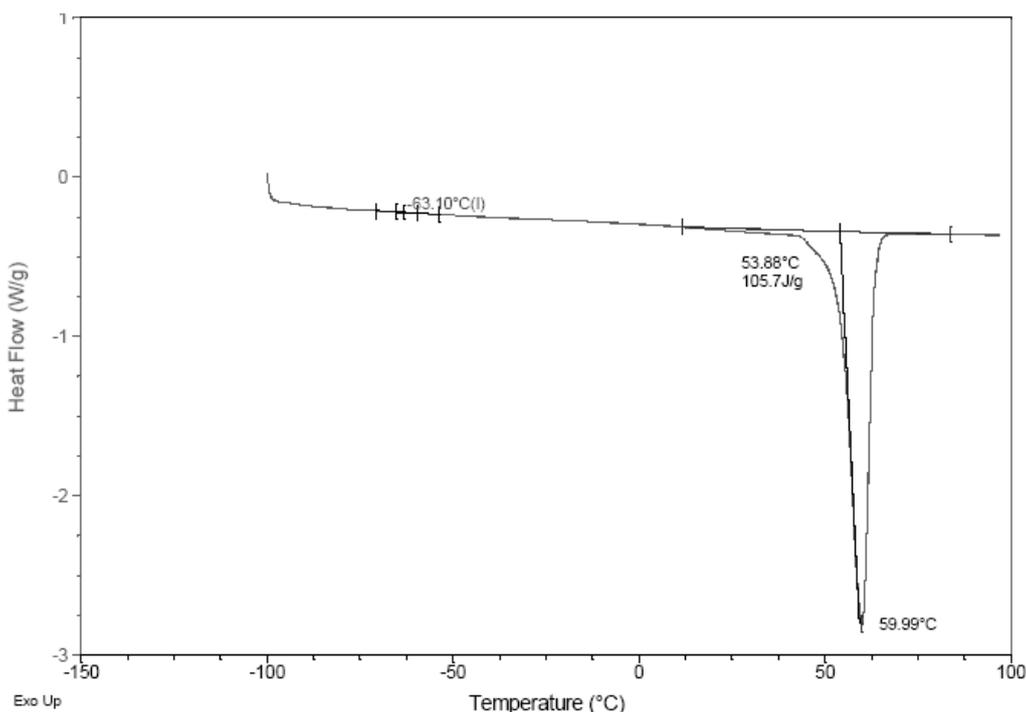


Fig. 4.5: Termogramma PCL non trattato

I termogrammi riportati mostrano un picco endotermico intorno ai 61°C che indica una transizione del primo ordine, attribuibile alla fusione del PCL. Dal confronto delle curve riportate (Fig. 4.4 e 4.5) si evince che il processo di preparazione non induce sostanziali differenze nelle proprietà termiche del polimero. Inoltre, da tale termogramma è stato possibile determinare l'intervallo di temperatura ottimale per il processo di sinterizzazione, che risulta compreso tra 55°C e 61°C.

4.2 Microsfere di PCL ottenute mediante doppia emulsione

Sono state realizzate diverse tipologie di microsfere, mediante doppia emulsione, variando opportunamente i seguenti parametri, al fine di modulare la dimensione e la morfologia delle microsfere, nonché la cinetica di rilascio della proteina incapsulata.

- ✓ Concentrazione di PCL nella fase oil
- ✓ Concentrazione di PVA nella fase acquosa interna

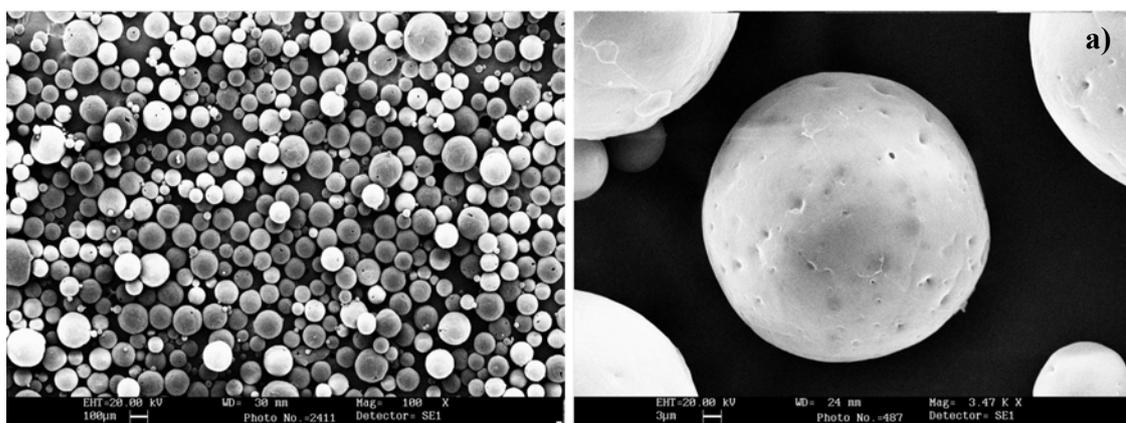
In particolare, sono state utilizzate due differenti concentrazioni di PCL (1.7% e 3% w/v) nella fase organica e tre diverse concentrazioni di PVA nella fase acquosa interna (0,05%, 0,5% e 1% w/v). Le tipologie di microsfele realizzate sono riportate in tabella:

Tipologia	Tempo di sonicazione (s)	Velocità di agitazione (rpm)	PCL in MC (g/ml %)	PVA in $W_{interna}$ (g/ml %)	PVA in $W_{esterna}$ (g/ml %)
D ₁	30	400	3	0.05	0.5
D ₂	30	400	3	0.5	0.5
D ₃	30	400	3	1	0.5
D ₄	30	400	1.7	0.05	0.5
D ₅	30	400	1.7	0.5	0.5
D ₆	30	400	1.7	1	0.5

Tab. 4.2: Tipologie di microsfele ottenute mediante doppia emulsione

4.2.1 Analisi morfologica: SEM

L'analisi della morfologia dei campioni è stata effettuata con un microscopio a scansione elettronica (SEM). In fig. 4.7 sono riportate sei micrografie, a differente ingrandimento, rappresentative dei sei campioni di microsfele realizzati, per evidenziare la distribuzione dimensionale e la morfologia delle singole microsfele.



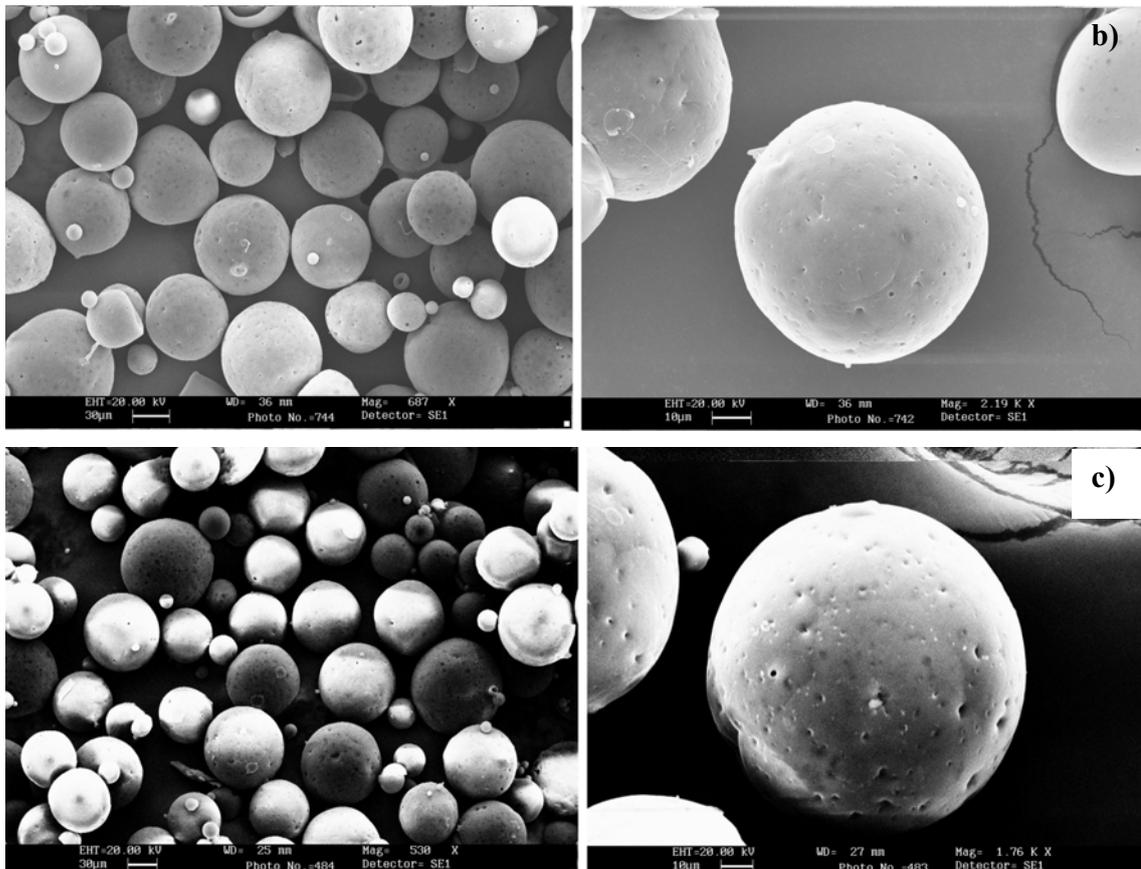


Fig. 4.7: Micrografie rappresentative di microsfele ottenute mediante doppia emulsione: a) tipologia D3, b) tipologia D2, c) tipologia D5.

Dall'analisi delle micrografie SEM, le microsfele appaiono sferiche, polidisperse e porose. Questo tipo di analisi non ha permesso di evidenziare eventuali significative differenze della morfologia esterna e delle dimensioni dei campioni realizzati.

4.2.2 Analisi porosimetrica ad intrusione di mercurio

Per studiare ulteriormente gli aspetti morfologici e strutturali delle microsfele ottenute mediante doppia emulsione, si è effettuata un'analisi porosimetrica sui campioni, che ha consentito di valutare la distribuzione percentuale relativa del volume dei pori in funzione del raggio, la porosità volumetrica percentuale complessiva e la *bulk density*.

Di seguito si riportano i risultati per il campione D5, relativi al volume cumulativo e volume relativo percentuale in funzione del raggio dei pori (Fig. 4.8, 4.9).

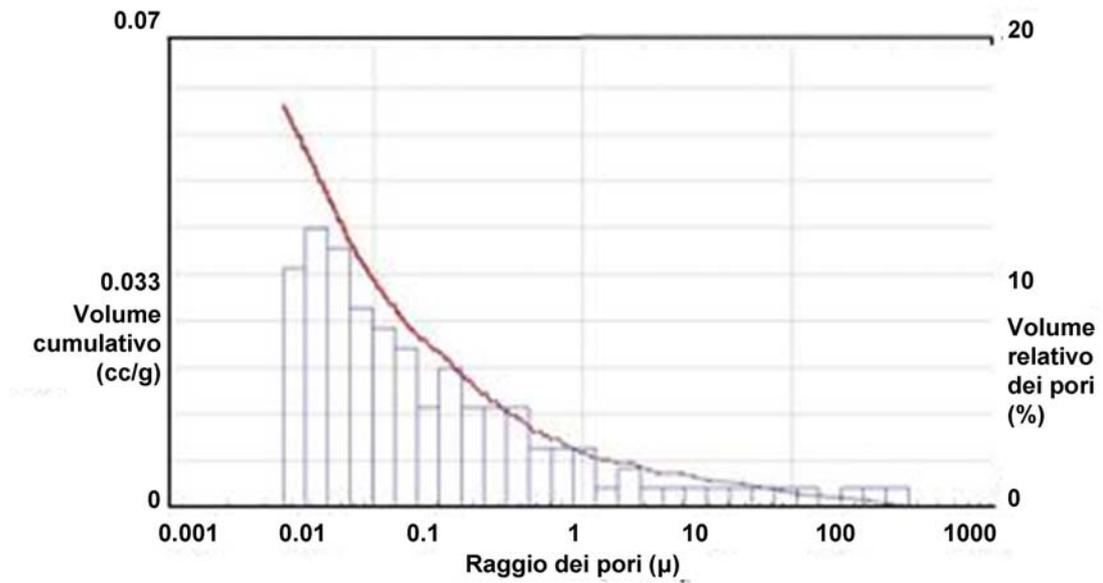


Fig. 4.8: Analisi di porosità del campione D₅

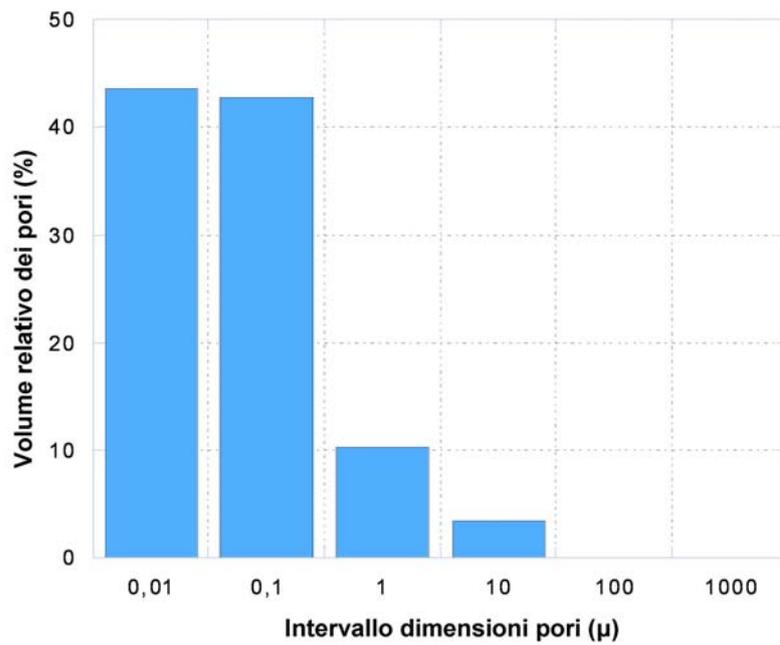


Fig. 4.9: Analisi di porosità del campione D₅

Dall'analisi dei dati risulta che la porosità totale è circa il 4% in volume, con diametro prevalente dei pori compreso tra 0.01 e 0.1 micron. Inoltre, sono stati ottenuti i seguenti parametri:

- ✓ Porosità totale: 3.93%
- ✓ *Bulk Density*: 0.546 g/cm³
- ✓ Densità Apparente: 0.565 g/cm³

Considerando che la *bulk density* indica la densità del materiale comprensivo della porosità aperta ed interconnessa e che la densità apparente, invece, è relativa al solo materiale, è possibile concludere che:

- 1) Lo scarto ridotto tra i due valori di densità calcolati è indice di una bassa porosità aperta del sistema, come confermato dal valore calcolato dallo strumento;
- 2) La densità apparente delle microsfere risulta significativamente inferiore alla densità del PCL per la presenza di cavità chiuse al loro interno.

4.2.3 Analisi della morfologia interna delle microsfere: SEM

Per verificare la presenza di cavità chiuse all'interno delle microsfere e, inoltre, per valutare l'influenza dei parametri di processo sulla morfologia di tali depot, le microsfere sono state sezionate e successivamente analizzate mediante microscopio a scansione elettronica. Si riportano di seguito le micrografie in sezione delle microsfere realizzate.

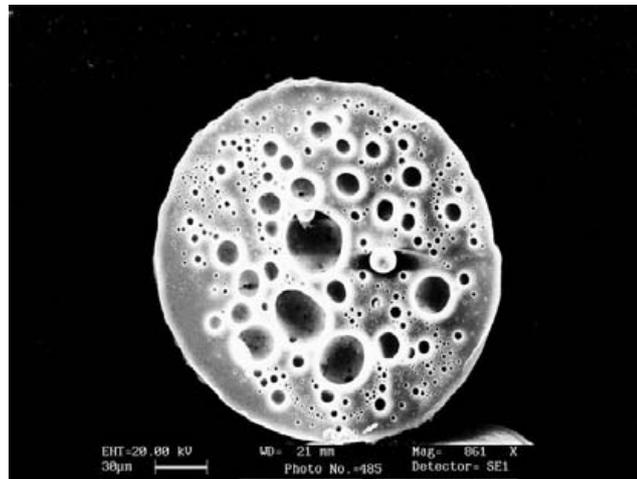


Fig. 4.10: Tipologia D1 861 x

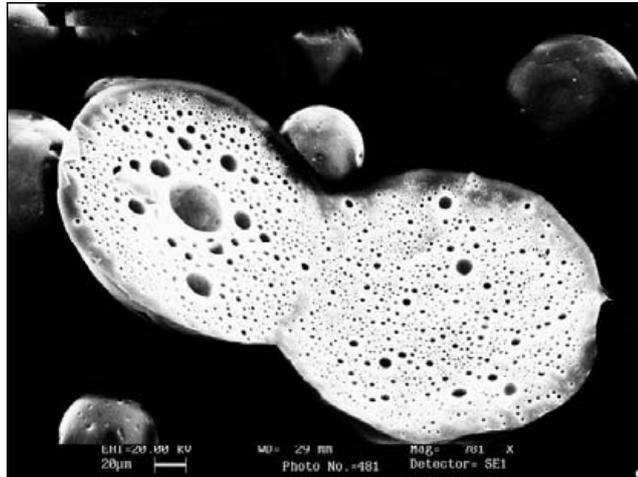


Fig. 4.11: Tipologia D2 781 x

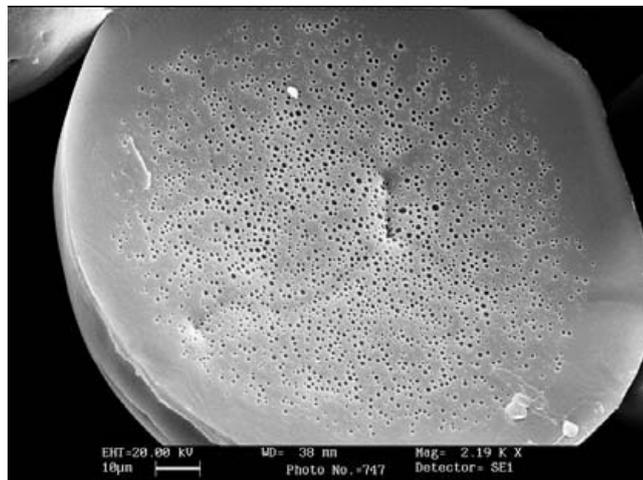


Fig. 4.12: Tipologia D3 2,19 kx

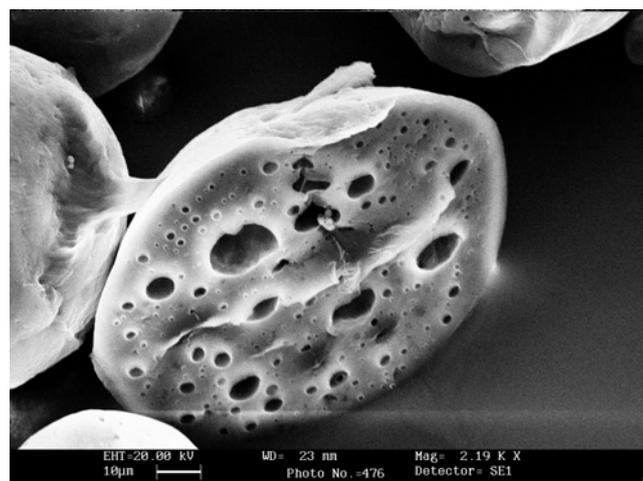


Fig. 4.13: Tipologia D4 2,19 kx

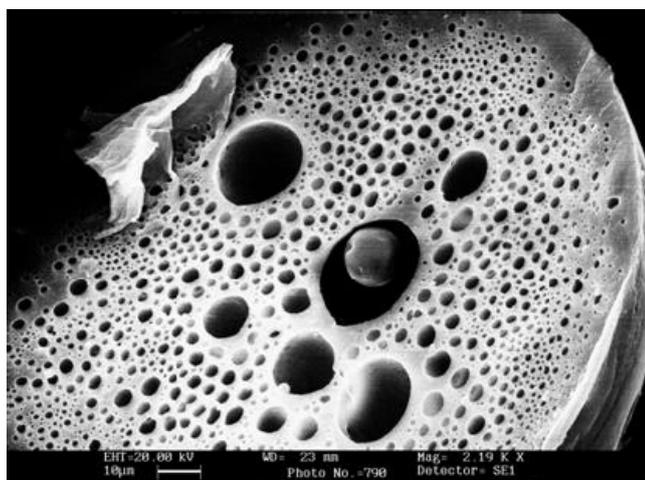


Fig. 4.14: Tipologia D5 2,19 kx

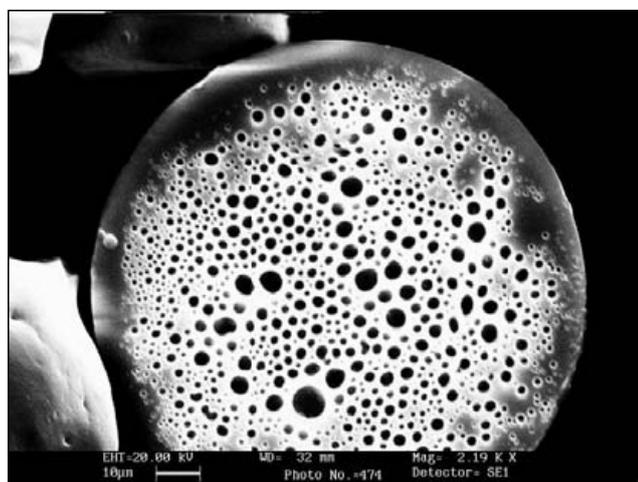


Fig. 4.15: Tipologia D6 2,19 kx

Dall'analisi delle micrografie riportate si evince che all'aumentare della concentrazione di PVA aumenta la stabilità dell'emulsione primaria (W/O) contro la coalescenza, portando alla formazione di depot distribuiti in maniera più omogenea e di dimensioni inferiori. La struttura interna delle microsfele realizzate mediante doppia emulsione è fortemente influenzata dalla concentrazione di surfattante (PVA) nella fase acquosa interna, poiché esso stabilizza le sacche micrometriche ottenute nella prima emulsione W/O. Inoltre, è stata riscontrata una lieve influenza della concentrazione di PCL sulla morfologia interna delle microsfele. In particolare, microsfele realizzate con minori percentuali di polimero mostrano cavità interne di dimensioni superiori rispetto a quelle realizzate con maggiori

percentuali di PCL. Tale risultato può essere attribuito ad una minore viscosità della soluzione che rende più probabile la coalescenza delle goccioline di fase acquosa realizzate durante la prima emulsione. Inoltre, una soluzione polimerica più viscosa è caratterizzata da una coagulazione più rapida, durante la seconda emulsione, e ciò può inibire la coalescenza delle goccioline acquose.

4.2.4 Analisi al microscopio confocale

Per verificare l'influenza della concentrazione di PVA, nella fase acquosa interna, e di PCL, nella fase oil, sulla morfologia interna delle microsfeere è stata utilizzata la microscopia confocale. Tale tecnologia consente di determinare la distribuzione della macromolecola incapsulata attraverso l'utilizzo di un probe fluorescente. Nel caso specifico, durante la preparazione delle microsfeere mediante doppia emulsione, la BSA è stata marcata con rodamina. Si riportano di seguito le immagini ottenute dall'analisi al microscopio confocale:

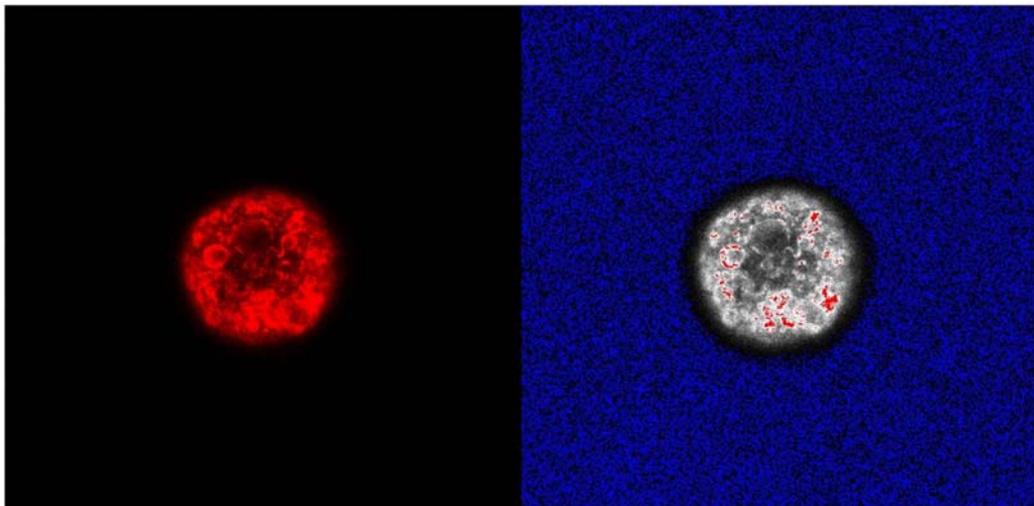


Fig. 4.16: Immagine in fluorescenza (a) e in contrasto (b) della tipologia D1

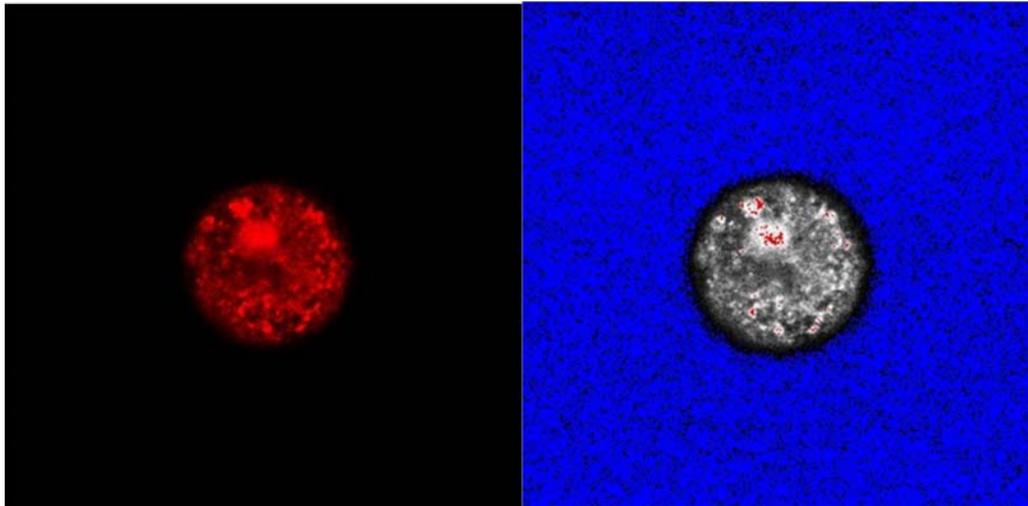


Fig. 4.17: Immagine in fluorescenza (a) e in contrasto (b) della tipologia D2

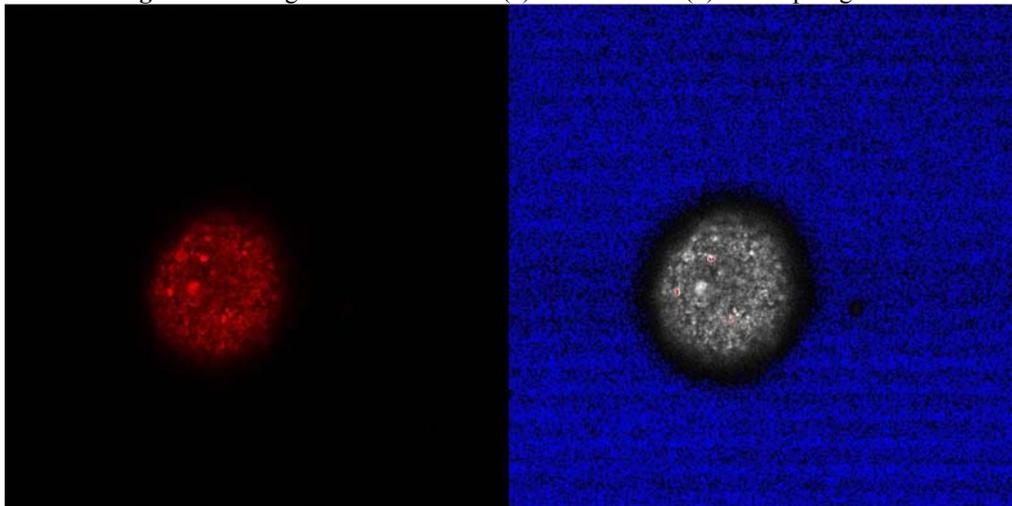


Fig. 4.18: Immagine in fluorescenza (a) e in contrasto (b) della tipologia D3

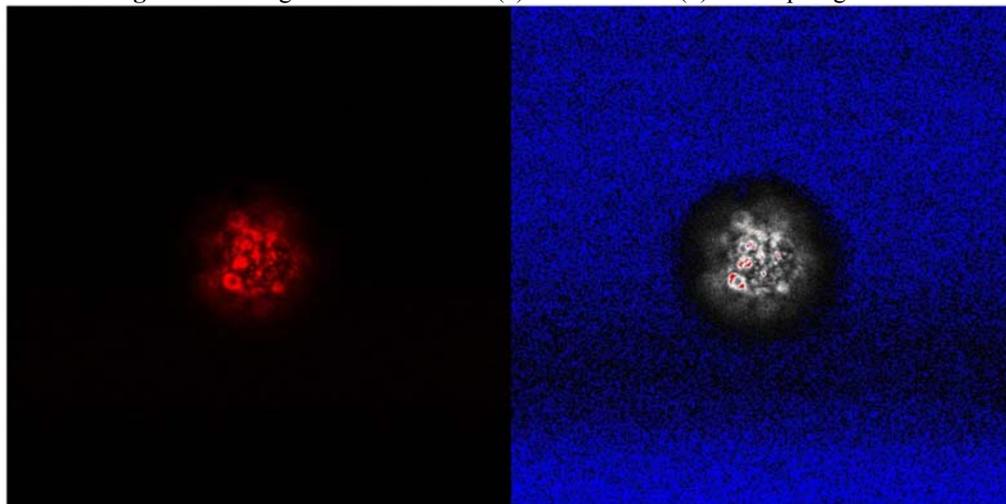


Fig. 4.19: Immagine in fluorescenza (a) e in contrasto (b) della tipologia D4

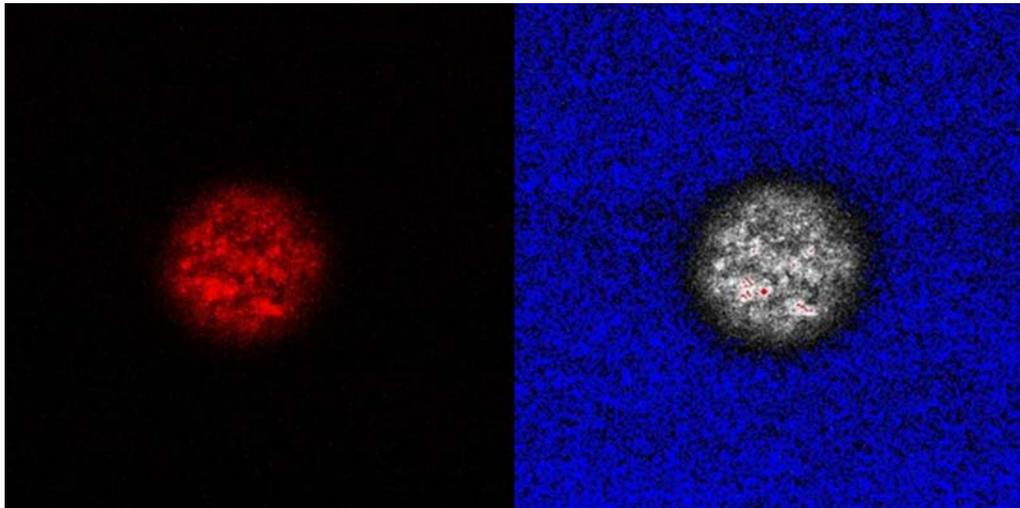


Fig. 4.20: Immagine in fluorescenza (a) e in contrasto (b) della tipologia D5

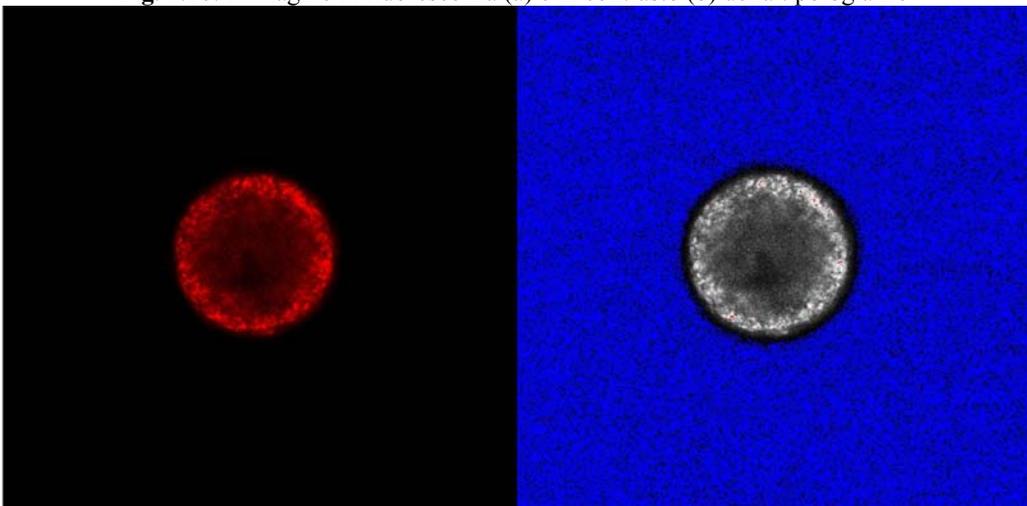


Fig. 4.21: Immagine in fluorescenza (a) e in contrasto (b) della tipologia D6

Dalle micrografie riportate è possibile osservare la distribuzione spaziale della BSA all'interno dei depot della microsfera, da cui si evince, come già evidenziato dalle micrografie SEM, che all'aumentare della concentrazione di PVA nella fase acquosa interna le sacche risultano di dimensioni inferiori e distribuite in maniera più omogenea. Tale andamento viene riscontrato, anche se in maniera meno evidente, anche all'aumentare della concentrazione di PCL nella fase oil, come già evidenziato dalle micrografie SEM.

4.2.5 Analisi delle immagini

Le immagini (ottenute al microscopio a scansione elettronica) delle sezioni interne delle microsfele sono state analizzate, attraverso l'utilizzo di un software dedicato (Image J), al fine di valutare quantitativamente l'influenza della concentrazione di PVA e di PCL sulla porosità interna delle microparticelle.

Come già verificato qualitativamente mediante analisi SEM e al microscopio confocale, è stata riscontrata (Fig. 4.22) una diminuzione della superficie media dei pori al crescere della percentuale di PVA. Inoltre, l'analisi effettuata ha mostrato che la diminuzione della concentrazione di PCL produce un lieve aumento nella porosità interna media.

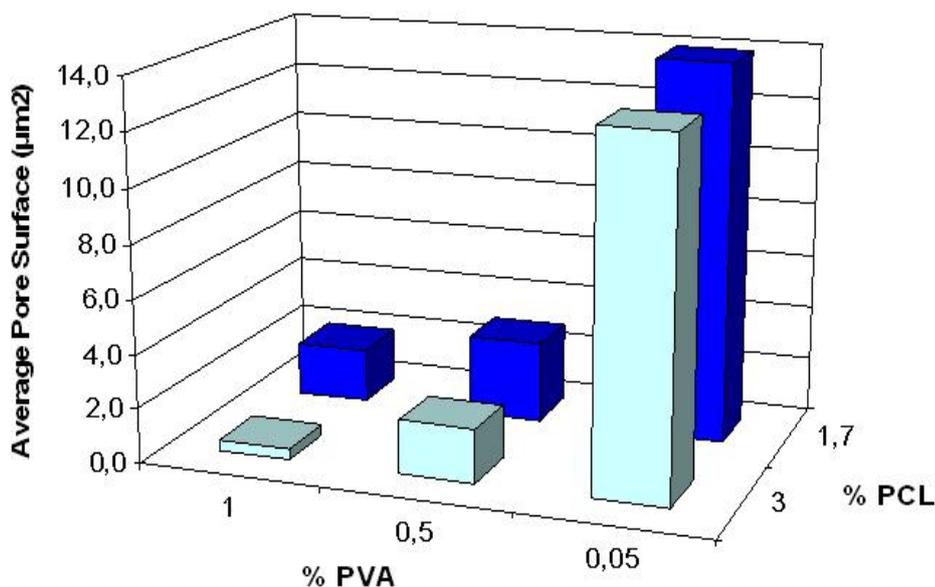


Fig. 4.22: Superficie media della porosità interna delle microsfele in funzione della concentrazione di PVA nella fase acquosa interna e di PCL nella fase organica

Dalle valutazioni qualitative (mediante SEM e CLSM) e quantitative (analisi delle immagini), si può quindi dedurre che, variando opportunamente i parametri di processo, quali concentrazione di PCL nella fase oil e di PVA nella fase acquosa interna, è possibile modulare la dimensione e la distribuzione dei pori interni delle microsfele.

4.2.6 Analisi dimensionale (Coulter Counter)

L'influenza della concentrazione del PCL e del PVA sulle dimensioni delle microsfere è stata studiata analizzando le diverse tipologie di campioni al Coulter Counter.

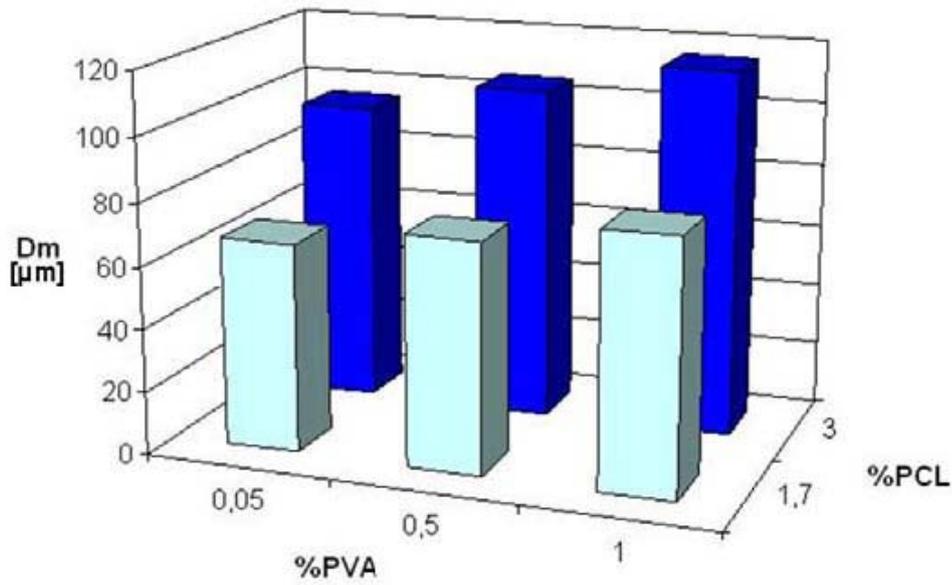


Fig. 4.23: Variazione del diametro medio delle microsfere al variare della percentuale di polimero e di PVA in fase acquosa esterna

In fig. 4.23 vengono riportati i valori medi dei diametri delle diverse tipologie di microsfere al variare della concentrazione di PCL nella fase oil e di PVA nella fase acquosa interna. E' stato riscontrato un aumento delle dimensioni delle microsfere all'aumentare di questi due parametri. In entrambi i casi, tale aumento può essere imputato ad un aumento della viscosità dell'emulsione e, quindi, ad una maggiore difficoltà a rompere la stessa in goccioline più piccole, a parità di potenza applicata. Tale risultato suggerisce che le dimensioni delle microsfere possono essere controllate variando la viscosità della soluzione, attraverso la concentrazione di PCL e di PVA nella fase acquosa interna.

4.2.7 Analisi della cinetica di rilascio

Per lo studio della cinetica di rilascio della BSA da microsferi ottenute mediante doppia emulsione è stato utilizzato uno spettrofotometro provvisto di lampada UV e filtro d'eccitazione a 280 nm.

Prima di analizzare in dettaglio le cinetiche di rilascio delle diverse tipologie di microsferi è necessario riportare l'efficienza d'incapsulamento della proteina incapsulata al variare della concentrazione di polimero nella fase oil e di surfattante nella fase acquosa interna (Tab. 4.3).

Tipologia microsferi	% PCL (w/v)	% PVA (w/v) in W1	Efficienza di incapsulamento (%)
D1	3	0,05	48,2
D2	3	0,5	51,6
D3	3	1	62,9
D4	1,7	0,05	29,1
D5	1,7	0,5	40
D6	1,7	1	59,9

Tab.4.3 : Efficienza d'incapsulamento delle microsferi

Dalla tabella riportata si evince che, per entrambe le concentrazioni di polimero, all'aumentare della concentrazione di PVA aumenta l'efficienza d'incapsulamento; ciò è attribuibile ad una interazione tra il PVA della fase acquosa interna e la BSA. La presenza del PVA, infatti, limita la diffusione della proteina nella fase acquosa esterna con conseguente incremento dell'efficienza d'incapsulamento. Si riscontra, inoltre, un effetto analogo all'aumentare della concentrazione di polimero che può essere dovuto all'aumento della viscosità della fase organica che, inoltre, coagula prima rendendo più difficoltosa la diffusione della proteina.

Il PCL è un polimero semicristallino [18] e, quindi, l'acqua può penetrare facilmente in tale materiale, facilitando il rilascio per diffusione di proteine solubili in acqua, solo attraverso

le zone amorphe. La proteina incapsulata nelle microsfele ottenute mediante doppia emulsione potrà, quindi, essere rilasciata attraverso le zone amorphe del polimero e le cavità interne delle microparticelle.

Di seguito si riportano i grafici delle cinetiche di rilascio della BSA dalle microsfele realizzate:

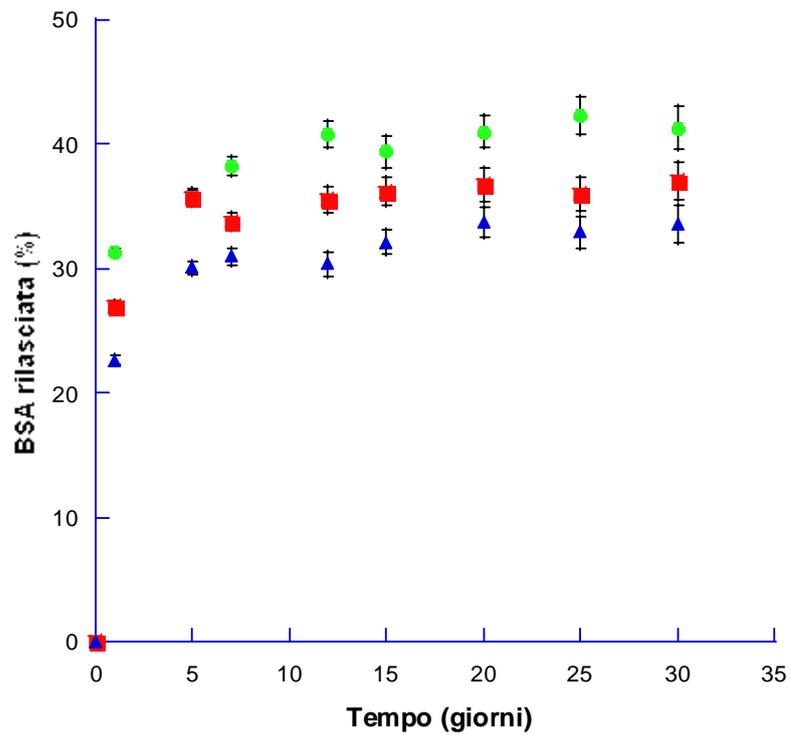


Fig. 4.24 : Cinetica di rilascio della BSA dalle microsfele ottenute mediante doppia emulsione: ▲ 1,7 % PCL 1% PVA, ■ 1,7 % PCL 0,5 % PVA ● 1,7 % PCL 0,05 % PVA.

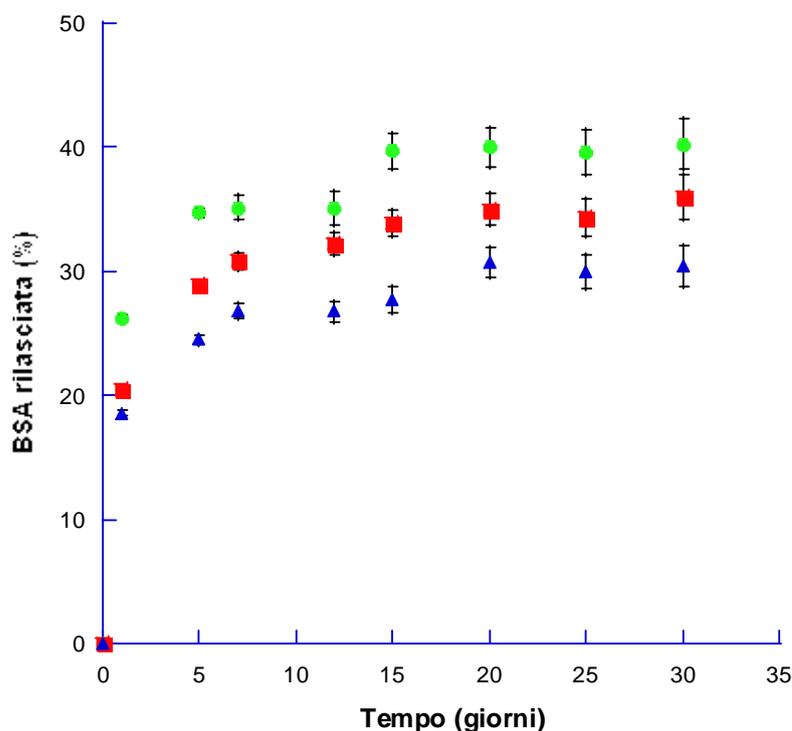


Fig. 4.25: Cinetica di rilascio della BSA dalle microsfero ottenute mediante doppia emulsione: ▲ 3% PCL 1% PVA, ■ 3% PCL 0,5 % PVA ● 3% PCL 0,05 % PVA.

I profili di rilascio ottenuti (Fig. 4.24 e 4.25) mostrano un *burst* iniziale, attribuibile al rilascio della proteina dai pori superficiali della microsfera, seguito da un marcato decremento della velocità di rilascio della BSA. La percentuale di BSA rilasciata durante l'effetto di *burst* iniziale risulta inferiore al 50% per tutte le formulazioni di microsfero.

Dai profili riportati è evidente che la presenza del PVA nella fase acquosa interna influenza la cinetica di rilascio della proteina.

Per entrambe le concentrazioni di polimero (1,7% e 3%), all'aumentare della percentuale di surfattante viene riscontrato un rilascio inferiore di proteina, attribuibile alla morfologia interna delle microparticelle. Come precedentemente dimostrato, infatti, all'aumentare della concentrazione di PVA i depot interni divengono più piccoli e omogeneamente distribuiti. Tale morfologia determina un aumento della tortuosità del percorso della proteina attraverso le zone amorphe del polimero e i depot interni. Inoltre, all'aumentare della percentuale di PVA decresce il grado di vuoto delle microsfero e ciò determina una

maggior probabilità che la proteina rimanga intrappolata dalle zone cristalline del polimero. Al contrario, microsfele ottenute a concentrazioni più basse di PVA presentano una struttura interna caratterizzata da depot di dimensioni maggiori, con superficie media dei pori più elevata. In tal caso, la proteina dovrà attraversare un numero inferiore di regioni amorfe per diffondere attraverso la microsfera e ciò determina un rilascio maggiore. Da tali grafici si evince, inoltre, che la concentrazione di polimero nella fase organica influenza lievemente la cinetica di rilascio. Microsfele ottenute a basse concentrazioni di polimero presentano cavità interne più grandi, rispetto alle microsfele ottenute a concentrazioni di polimero più elevate. Come precedentemente esposto, il profilo di rilascio della BSA è notevolmente influenzato dalla morfologia interna delle microparticelle. Ne consegue che microsfele realizzate a più basse concentrazioni di polimero (1,7% w/v) mostrano un rilascio di proteina maggiore.

4.2.8 Attività della proteina rilasciata

Al fine di verificare che le condizioni del processo di realizzazione dei campioni (elevate temperature, contatto con il solvente, agitazione magnetica e sonicazione) non abbiano provocato la denaturazione (perdita della struttura terziaria) della BSA, è stata effettuata un'analisi cromatografia per gel filtration sulla proteina rilasciata. In fig. 4.26 sono riportati i cromatogrammi relativi alla BSA tal quale e alla BSA rilasciata dalle microsfele.

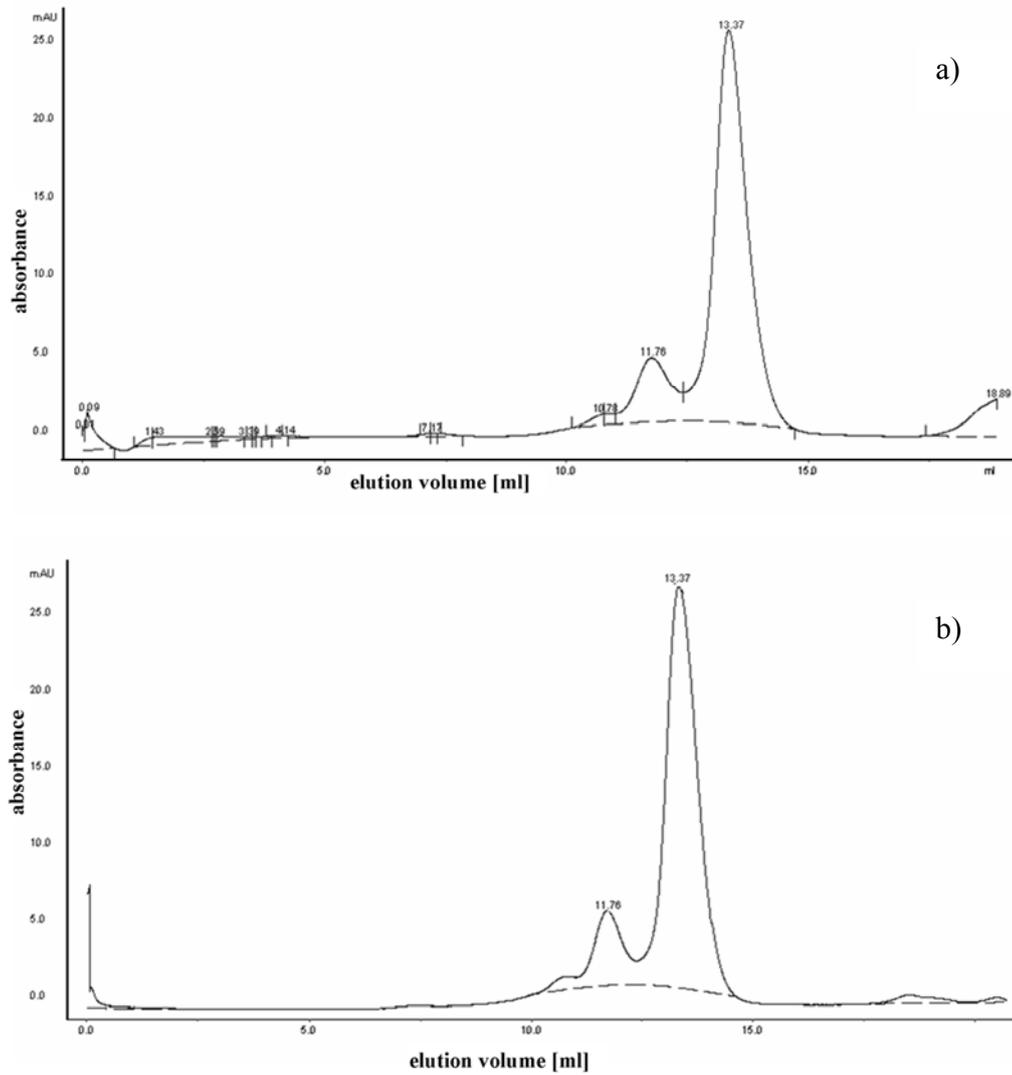


Fig. 4.26: Cromatogramma a) BSA tal quale b) BSA rilasciata

La cromatografia per gel filtrazione ha determinato cromatogrammi molto simili per la BSA tal quale e quella rilasciata. Tale risultato suggerisce che l'integrità strutturale della proteina non è stata modificata dalle condizioni di processo.

4.3 Scaffold ottenuti mediante sinterizzazione di microparticelle

La diversa architettura dei tessuti richiede microambienti differenti per la loro rigenerazione; ciò impone l'utilizzo di scaffold con una dimensione dei pori ottimale. Per quanto riguarda la rigenerazione del tessuto osseo alcuni ricercatori hanno indicato che occorrono pori con range dimensionale da 200 a 400 μm [46], mentre Yoshikawa e altri [47-49] hanno utilizzato con successo scaffold con dimensione dei pori di 500 μm . Sulla scorta dei dati di letteratura [46-49], il presente lavoro è stato finalizzato alla realizzazione di strutture tridimensionali con porosità di dimensioni comprese tra 200 μm e 500 μm . Un semplice modello geometrico è stato utilizzato al fine di valutare l'intervallo dimensionale ottimale delle microsfele per la realizzazione di matrici sinterizzate, caratterizzate da una porosità tale da stimolare l'adesione e la proliferazione di osteoblasti.

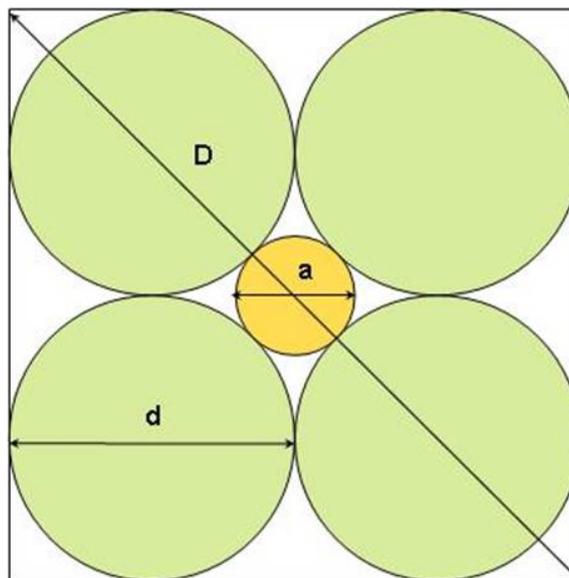


Fig. 4.27: Schematizzazione modello a 4 sfere

Tale modello è costituito da quattro sfere rigide, uguali e disposte simmetricamente lungo le diagonali del quadrato in cui sono inscritte (fig. 4.27).

La dimensione caratteristica a della cavità presente tra le quattro sfere può essere approssimata dal valore del diametro della sfera rigida inscrivibile in essa. :

$$\frac{D - 2d}{2} = a$$

in cui: D è la diagonale del quadrato in cui sono inscritte le sfere, d è il diametro delle sfere rigide di partenza. Da semplici considerazioni geometriche, è possibile indicare quale range dimensionale ottimale delle sfere, da utilizzare per la realizzazione di scaffold per la rigenerazione del tessuto osseo, l'intervallo compreso tra 366 e 610 μm .

Sono state utilizzate due tipologie di microsfeere con due diversi range dimensionali: 300 ÷ 500 μm e 500 ÷ 630 μm . A tal fine, le microsfeere ottenute mediante singola emulsione sono state setacciate nei range dimensionali selezionati mediante setaccio a vibrazione.

4.3.1 Scaffold ottenuti mediante sinterizzazione termica

Matrici tridimensionali sono state ottenute attraverso la fusione della superficie di microsfeere adiacenti di PCL, ottenute mediante emulsione, per ingegnerizzare scaffold sintetici in grado di fornire un supporto per la crescita del tessuto osseo. La temperatura, infatti, è in grado di attivare i movimenti molecolari delle catene polimeriche e ciò determina, nei punti di giunzione tra le particelle, l'interdiffusione delle catene e la conseguente formazione di colletti di connessione tra le microsfeere.

E' stata effettuata un'indagine sistematica dell'influenza della temperatura e del tempo di sinterizzazione, nonché delle dimensioni delle microsfeere, sulla formazione di colletti di giunzione e sull'interconnessione dei pori, al fine di modulare e ottimizzare le proprietà finali dello scaffold. In particolare, sono state selezionate temperature di processo comprese tra 58°C e 61°C (range definito sulla base dei risultati delle analisi termiche effettuate). I campioni trattati a temperature inferiori di 58°C non hanno mostrato, infatti, la formazione di colletti di connessione tra le microsfeere e, quindi, non hanno portato alla realizzazione di una struttura tridimensionale compatta. Al contrario, temperature di processo al di sopra dei 61°C hanno portato alla completa fusione delle microparticelle, con conseguente perdita delle caratteristiche di porosità e interconnessione della matrice, necessarie per applicazioni nell'ambito dell'ingegneria dei tessuti.

L'analisi morfologica, effettuata mediante microscopio a scansione elettronica (SEM), ha rivelato che, trattando le microsferiche ad una temperatura di 60°C, è stato possibile realizzare matrici con colletti di giunzione tra le microsferiche adeguati ad assicurare integrità strutturale allo scaffold, assicurando contemporaneamente una completa interconnessione dei pori (Fig. 4.28).

Per determinare il tempo di sinterizzazione ottimale. A tale scopo, sono state realizzate matrici ottenute dalla sinterizzazione di microparticelle di PCL variando il tempo di sinterizzazione da 30 min a 12 h. I risultati ottenuti dalle valutazioni morfologiche delle matrici realizzate, hanno indicato 1h quale tempo di sinterizzazione ottimale per la realizzazione di colletti di giunzione tra le microsferiche di dimensioni adeguate (Fig. 4.28).

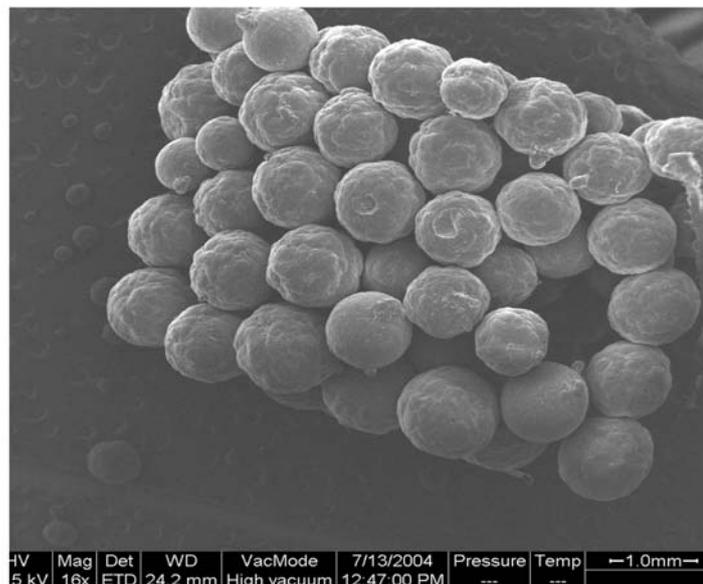


Fig. 4.28: Micrografia rappresentativa di uno scaffold realizzato mediante sinterizzazione termica di microparticelle.



Fig. 4.29: Foto rappresentativa di uno scaffold realizzato mediante sinterizzazione termica di microparticelle.

Nella tabella seguente sono riportati i campioni realizzati:

Tipologia scaffold	Tipologia microsferre	Range dimensionale microsferre [μm]
SCAFFOLD PROTEIN-FREE	Singola emulsione	300 ÷ 500
	Singola emulsione	500 ÷ 630
SCAFFOLD BIOATTIVI	Singola emulsione +	300 ÷ 500 +
	Doppia emulsione (D1)	50 ÷ 180
	Singola emulsione +	300 ÷ 500 +
	Doppia emulsione (D2)	50 ÷ 180
	Singola emulsione +	300 ÷ 500 +
	Doppia emulsione (D3)	50 ÷ 180
	Singola emulsione +	300 ÷ 500 +
	Doppia emulsione (D4)	50 ÷ 180
	Singola emulsione +	300 ÷ 500 +
	Doppia emulsione (D5)	50 ÷ 180
	Singola emulsione +	300 ÷ 500 +
	Doppia emulsione (D6)	50 ÷ 180

Tab. 4.4: Campioni realizzati mediante sinterizzazione termica di microparticelle

Analisi morfologica: SEM

L'analisi della morfologia è stata compiuta avvalendosi del microscopio a scansione elettronica (SEM), grazie al quale è stata valutata qualitativamente la porosità presente all'interno dei campioni in termini di distribuzione, dimensione dei pori e grado di interconnessione. Si riportano alcune micrografie dei campioni realizzati dalla sinterizzazione di microsferette ottenute mediante singola emulsione (Fig. 4.30 e 4.31).

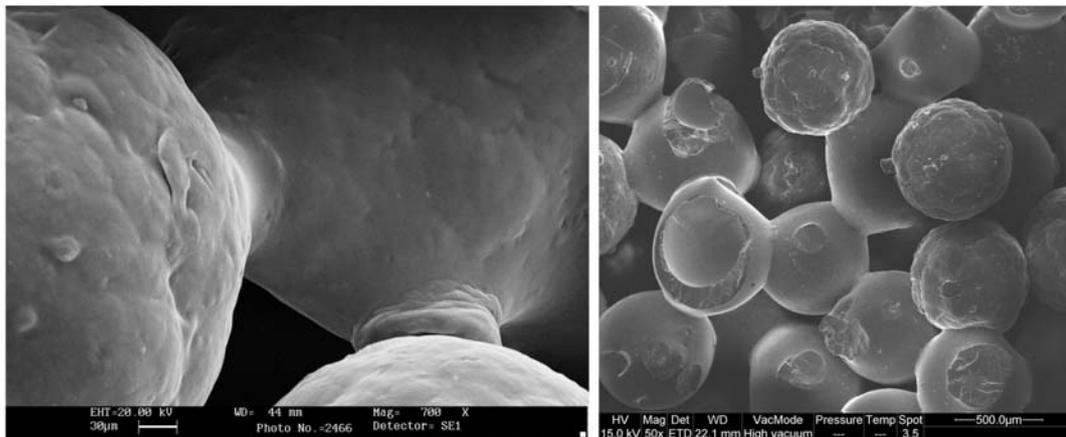


Fig. 4.30: Micrografie a due diversi ingrandimenti di scaffold realizzati per sinterizzazione termica di microsferette ottenute mediante singola emulsione (scaffold protein-free) con range dimensionale di 500 ÷ 630 µm.

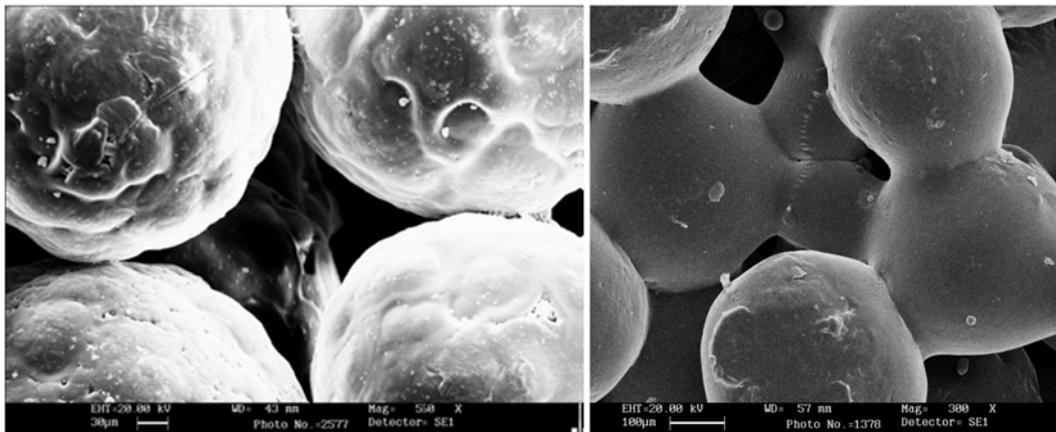
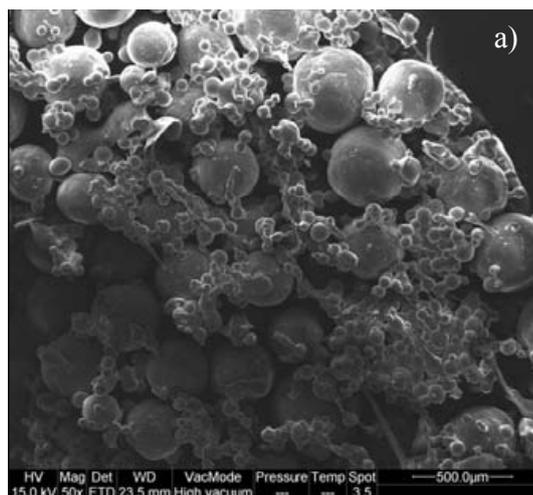


Fig. 4.31: Micrografie a due diversi ingrandimenti di scaffold realizzati per sinterizzazione termica di microsferette ottenute mediante singola emulsione (scaffold protein-free) con range dimensionale di 300 ÷ 500 µm.

Le condizioni ottimali di processo (60°C 1h) hanno portato alla realizzazione di scaffold con una microstruttura tridimensionale ben definita, come illustrato nelle micrografie in Fig. 4.28 e 4.29. L'analisi SEM ha inoltre evidenziato che le microparticelle sono distribuite in maniera random, con colletti di connessione organizzati uniformemente in tutto il volume.

Tali colletti sono caratterizzati da dimensioni tali da garantire un'elevata adesione tra le microsfele. Inoltre, pur essendo ben sviluppati ed allungati (Fig. 4.30a), risultano confinati nell'intorno dei punti di giunzione, determinando una struttura completamente interconnessa.

Matrici bioattive contenenti BSA sono state ottenute attraverso la fusione della superficie di microsfele adiacenti di PCL, ottenute mediante singola e doppia emulsione (75/25 w/w), utilizzando le stesse condizioni di processo ottimali utilizzate per la realizzazione di scaffold protein-free. Le micrografie SEM (Fig. 4.32) hanno mostrato una distribuzione uniforme di microparticelle ottenute mediante doppia emulsione nello scaffold tridimensionale. Tali microsfele, caratterizzate da dimensioni inferiori rispetto a quelle ottenute mediante singola emulsione, sembrano occludere parzialmente i pori, determinando un significativo decremento del volume dei pori all'interno della matrice.



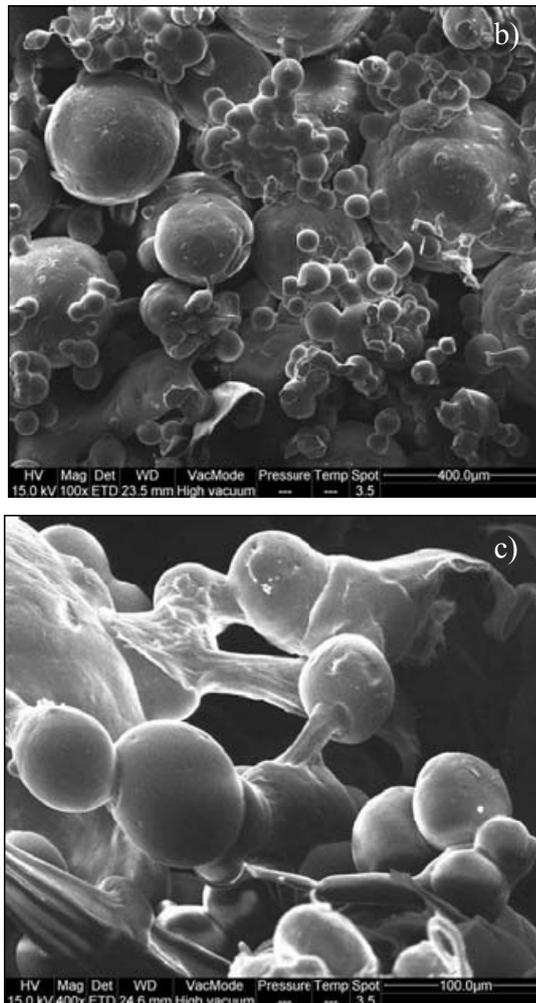


Fig. 4.32: Micrografie di scaffold realizzati per sinterizzazione termica di microsferre ottenute mediante singola emulsione e doppia emulsione (scaffold bioattivi) a tre diversi ingrandimenti: a) 50 x, b) 100 x, c) 400 x.

Microscopia confocale

Per verificare la distribuzione nello scaffold delle microparticelle caricate con BSA, è stata effettuata un'analisi al microscopio confocale. Durante la preparazione delle microsferre mediante doppia emulsione, la BSA è stata marcata con rodamina. Tali microsferre sono state successivamente sinterizzate al fine di ottenere uno scaffold tridimensionale bioattivo.

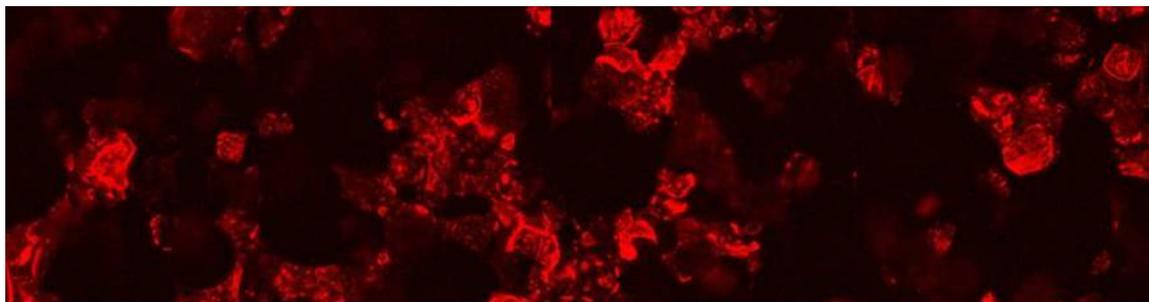


Fig. 4.33: Distribuzione delle microsferiche caricate con BSA marcata con rodamina all'interno dello scaffold sinterizzato, ottenuta mediante microscopio confocale a scansione laser

Dalle micrografie riportate si evince una distribuzione omogenea delle microsferiche contenenti BSA all'interno dello scaffold, come già confermato dalle micrografie SEM.

Analisi porosimetrica a intrusione di mercurio

Sono state effettuate analisi al porosimetro a intrusione di mercurio sui campioni sinterizzati termicamente, al fine di definire e quantificare l'effetto della dimensione delle microparticelle sulle dimensioni dei pori e sulla porosità totale percentuale delle matrici. In Tab. 4.5 sono riportati i risultati ottenuti dalle prove effettuate sulle diverse tipologie di campioni.

Tipologia scaffold	Diametro microsferiche (µm)	Porosità totale (%)	Diametro medio dei pori (µm)
Scaffold protein-free (singola emulsione)	500 ÷ 630	40 ± 3,8	284 ± 24,4
Scaffold protein-free (singola emulsione)	300 ÷ 500	42 ± 4,2	107 ± 2,4
Scaffold bioattivi (singola e doppia emulsione)	300 ÷ 500 50 ÷ 180	29 ± 3,7	51 ± 7,1

Tab. 4.5: Relazione tra le dimensioni delle microparticelle utilizzate e la porosità degli scaffold realizzati valutata mediante porosimetro a intrusione di mercurio.

L'analisi porosimetrica mostra (Tab. 4.5), come precedentemente ipotizzato, che la dimensione media dei pori è strettamente dipendente dalle dimensioni delle microparticelle utilizzate per la realizzazione degli scaffold. I risultati ottenuti evidenziano, infatti, un aumento della dimensione media dei pori all'aumentare delle dimensioni delle microparticelle utilizzate (da circa 107 μm per microsfele di 300 \div 500 μm a circa 284 μm per microsfele di 500 \div 630 μm). Un'ulteriore riduzione del diametro medio dei pori, di circa 51 μm , è stata riscontrata per scaffold bioattivi, realizzati per sinterizzazione di microsfele ottenute mediante singola (300 \div 500 μm) e doppia (50 \div 180 μm) emulsione. Tale risultato suggerisce la possibilità di modulare la dimensione dei pori scegliendo opportunamente la dimensione delle microparticelle da processare.

Inoltre, non sono state riscontrate differenze nella porosità totale percentuale (\approx 40 %), totalmente interconnessa in relazione al principio di funzionamento dello strumento, degli scaffold *protein-free*. La porosità percentuale totale degli scaffold bioattivi (\approx 29 %), invece, diminuisce rispetto a quelli *protein-free* (Tab. 4.5). Tale risultato può essere attribuito all'aggiunta di microsfele ottenute mediante doppia emulsione, di dimensioni inferiori (50 \div 180 μm) rispetto a quelle ottenute mediante singola emulsione (300 \div 500 μm), che possono occludere parzialmente i pori.

Microtomografia computerizzata

Un'ulteriore valutazione qualitativa e quantitativa della porosità è stata realizzata mediante tecniche di analisi delle immagini 3D con l'ausilio di un microtomografo computerizzato. Attraverso le immagini delle sezioni del campione è possibile calcolare alcuni parametri caratteristici delle proprietà strutturali dello scaffold (frazione volumetrica, dimensione media dei pori e distribuzione dei pori), basandosi sulla dimensione del singolo pixel che definisce la risoluzione dell'immagine. Si riportano, i valori ottenuti dall'analisi di immagini realizzata mediante software dedicato (CTAn):

Tipologia scaffold	Diametro microsferre (µm)	Porosità totale (%)	Diametro medio dei pori (µm)
Scaffold protein-free (singola emulsione)	500 ÷ 630	55,09 ±	290 ±
Scaffold protein-free (singola emulsione)	300 ÷ 500	52,39 ±	135 ±
Scaffold bioattivi (singola e doppia emulsione)	300 ÷ 500 50 ÷ 180	34,36 ±	98 ±

Tab. 4.6: Relazione tra le dimensioni delle microparticelle utilizzate e la porosità degli scaffold realizzati valutata mediante Skyscan CTAn per FDC1

I risultati ottenuti mediante microtomografia computerizzata (Tab. 4.6) confermano i dati di porosità ottenuti mediante porosimetro a intrusione di mercurio (Tab. 4.5). Essi, infatti, evidenziano un aumento della dimensione media dei pori all'aumentare delle dimensioni delle microparticelle utilizzate (da circa 135 µm per microsferre di 300 ÷ 500 µm a circa 290 µm per microsferre di 500 ÷ 630 µm). Inoltre, un'ulteriore riduzione del diametro medio delle microparticelle, determinata dall'aggiunta di microsferre ottenute mediante doppia emulsione (50 ÷ 180 µm), ha determinato un diametro medio dei pori pari a circa 98 µm. Tali risultati confermano che è possibile modulare la dimensione dei pori, scegliendo opportunamente la dimensione delle microparticelle da processare.

Inoltre, come già mostrato dall'analisi porosimetrica, non vi sono notevoli differenze nella porosità totale percentuale ($\approx 50\%$) degli scaffold protein-free. L'analisi microtomografica ha confermato un decremento della porosità percentuale totale degli scaffold bioattivi ($\approx 34\%$) rispetto a quelli protein-free. Tale risultato può essere, ancora una volta, attribuito all'aggiunta di microsferre ottenute mediante doppia emulsione, di dimensioni inferiori (50 ÷ 180 µm) che possono occludere parzialmente i pori.

E' stato inoltre possibile ricostruire tridimensionalmente le immagini relative alle sezioni trasversali del campione mediante un opportuno software (CTVol) in grado di riprodurre la struttura originale. Si riportano di seguito la struttura relativa allo scaffold protein-free ottenuto dalla sinterizzazione di microparticelle con range dimensionale 500 ÷ 630 µm:



Fig. 4.34 : rappresentazione 3D dello scaffold protein-free ottenuto sinterizzando microparticelle con intervallo dimensionale $500 \div 630 \mu\text{m}$.

Caratterizzazione meccanica

La resistenza meccanica degli scaffold sinterizzati, nonché l'influenza delle dimensioni delle microparticelle utilizzate su tale proprietà, è stata valutata mediante test a compressione. I risultati ottenuti sono riportati nella tabella seguente:

Tipologia scaffold	Diametro microsfera (μm)	Modulo elastico (MPa)
Scaffold protein-free (singola emulsione)	$500 \div 630$	$15,42 \pm 1,04$
Scaffold protein-free (singola emulsione)	$300 \div 500$	$19,20 \pm 0,96$
Scaffold bioattivi (singola e doppia emulsione)	$300 \div 500$ $50 \div 180$	$30,23 \pm 1,29$

Tab. 4.7: Relazione tra le dimensioni delle microparticelle utilizzate e le proprietà meccaniche degli scaffold realizzati.

Dai dati ottenuti si evince che, a parità dei parametri del processo di sinterizzazione, il modulo elastico aumenta al diminuire delle dimensioni delle particelle. Tale fenomeno può essere attribuito all'aumento del numero di punti di contatto e, quindi, di vincoli strutturali della matrice tridimensionale.

Il modulo elastico degli scaffold bioattivi, realizzati dalla sinterizzazione di microsferi ottenute mediante singola (300÷500 μm) e doppia emulsione 50 ÷ 180 μm , è circa 30 MPa, superiore ai due campioni precedenti. Ciò è imputabile alla presenza di microsferi ottenute mediante doppia emulsione, di dimensioni inferiori rispetto a quelle ottenute mediante singola emulsione, che agiscono da collante per la struttura delle microsferi più grandi e determinano una riduzione delle porosità totale dello scaffold. Inoltre, la presenza di microsferi di dimensioni più piccole determina un aumento dei punti di contatto tra le microsferi e, quindi, dei vincoli strutturali dello scaffold.

Analisi della cinetica di rilascio della BSA dagli scaffold

I profili di rilascio (Fig. 4.35 e 4.36), analizzati mediante analisi spettrofotometrica mostrano un andamento molto simile a quello riscontrato per il rilascio dalla singola microsfera. In particolare, matrici realizzate per sinterizzazione di microsferi ottenute a maggiore percentuale di PVA mostrano un rilascio più elevato.

Tuttavia, per tutte le tipologie di scaffold analizzati, è stato riscontrato un rilascio più lento, rispetto a quello da singola microsfera, probabilmente causato dalla maggiore tortuosità del percorso della BSA. La proteina, infatti, una volta attraversata la microsfera, deve diffondere attraverso le porosità dello scaffold.

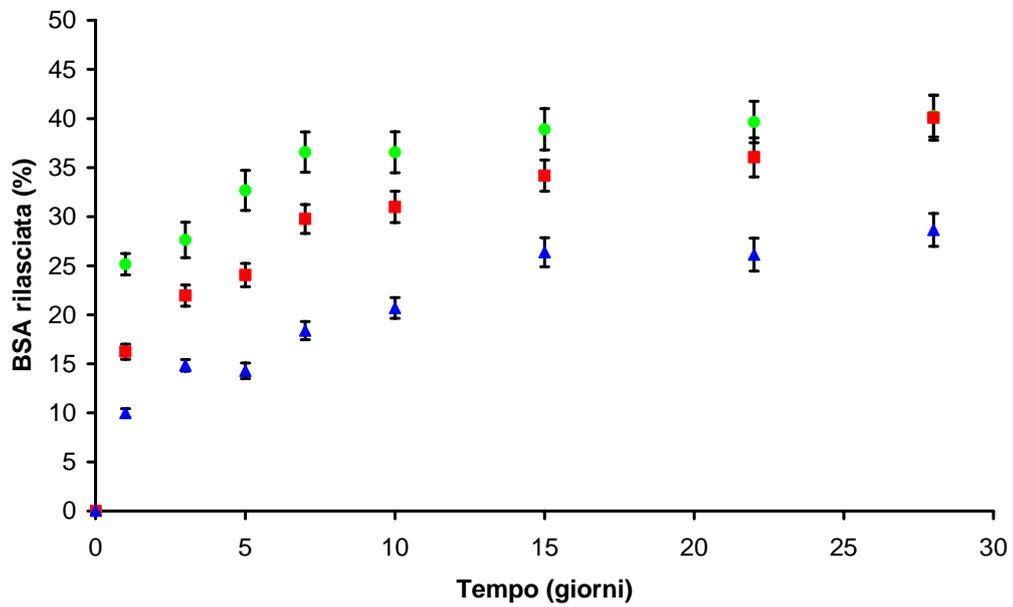


Fig. 4.35: Cinetica di rilascio della BSA dagli scaffold ottenuti mediante sinterizzazione di microparticelle:
 ▲ 1,7 % PCL 1% PVA, ■ 1,7 % PCL 0,5 % PVA ● 1,7 % PCL 0,05 % PVA.

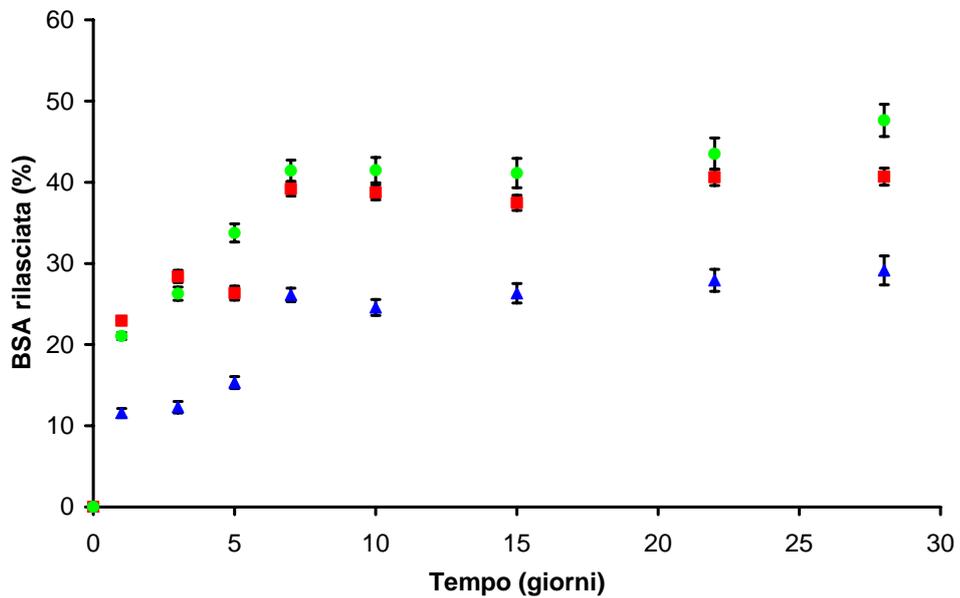


Fig. 4.36: Cinetica di rilascio della BSA dagli scaffold ottenuti mediante sinterizzazione di microparticelle:
 ▲ 3% PCL 1% PVA, ■ 3% PCL 0,5 % PVA ● 3% PCL 0,05 % PVA.

4.3.2 Scaffold ottenuti mediante sinterizzazione con solvente

Al fine di modulare la forza spingente che regola la compattazione di microsferi adiacenti, è stata selezionata un'opportuna coppia solvente-non solvente: cloroformio-etanolo. In particolare, la scelta del cloroformio (solvente) è stata dettata dalla sua elevata capacità di dissolvere il PCL e dalla sua caratteristica cinetica di evaporazione. Inoltre, l'utilizzo dell'etanolo consente di ridurre il potere di dissoluzione del cloroformio. Dall'ottimizzazione del rapporto relativo dei due componenti è stato possibile regolare i meccanismi di dissoluzione ed evaporazione, al fine di ottimizzare la dimensione dei colletti di giunzione e, conseguentemente, la porosità finale. In particolare, sono state realizzate diverse tipologie di campioni (Tab. 4.8), ottenuti dalla sinterizzazione di microparticelle con range dimensionali differenti. Inoltre, è stata valutata la correlazione tra le proprietà morfologiche e meccaniche degli scaffold e la dimensione delle particelle utilizzate.

Tipologia scaffold	Tipologia microsferi	Range dimensionale microsferi [μm]
SCAFFOLD PROTEIN-FREE	Singola emulsione	300 ÷ 500
	Singola emulsione	500 ÷ 630
	Singola emulsione	630 ÷ 800
SCAFFOLD BIOATTIVI	Singola emulsione +	300 ÷ 500 +
	Doppia emulsione (D1)	50 ÷ 180
	Singola emulsione +	300 ÷ 500 +
	Doppia emulsione (D2)	50 ÷ 180
	Singola emulsione +	300 ÷ 500 +
	Doppia emulsione (D3)	50 ÷ 180
	Singola emulsione +	300 ÷ 500 +
	Doppia emulsione (D4)	50 ÷ 180
	Singola emulsione +	300 ÷ 500 +
	Doppia emulsione (D5)	50 ÷ 180
	Singola emulsione +	300 ÷ 500 +
	Doppia emulsione (D6)	50 ÷ 180

Tab. 4.8: Campioni realizzati mediante sinterizzazione con solvente di microparticelle

Analisi morfologica (SEM)

Matrici tridimensionali *protein-free* sono state ottenute a partire da microsfere di PCL, prodotte mediante singola emulsione, grazie all'utilizzo di una miscela cloroformio/etanolo (25/75 v/v).

L'analisi della morfologia è stata compiuta avvalendosi del microscopio a scansione elettronica (SEM). Si riportano alcune micrografie ottenute dei campioni realizzati dalla sinterizzazione di microsfere ottenute mediante singola emulsione (Fig. 4.37 - 4.39).

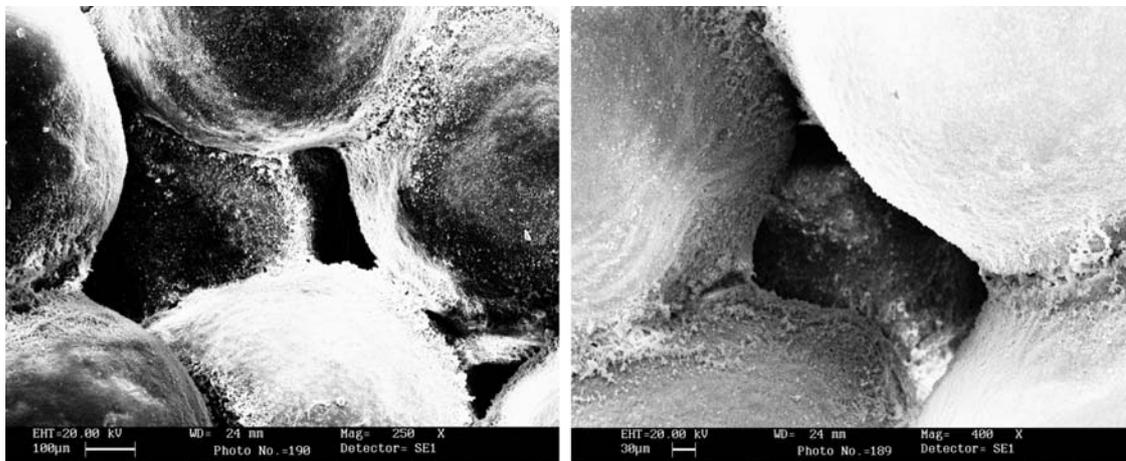


Fig. 4.37: Micrografie a due diversi ingrandimenti di scaffold realizzati per sinterizzazione con solvente di microsfere ottenute mediante singola emulsione (scaffold *protein-free*) con range dimensionale di 630 ÷ 800 µm.

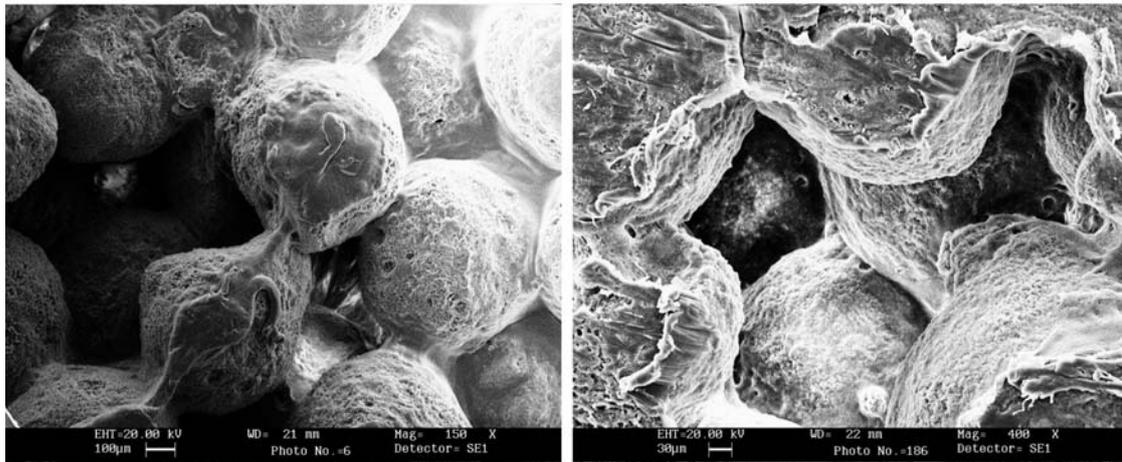


Fig. 4.38: Micrografie a due diversi ingrandimenti di scaffold realizzati per sinterizzazione con solvente di microsferi ottenute mediante singola emulsione (scaffold protein-free) con range dimensionale di 500 ÷ 630 µm.

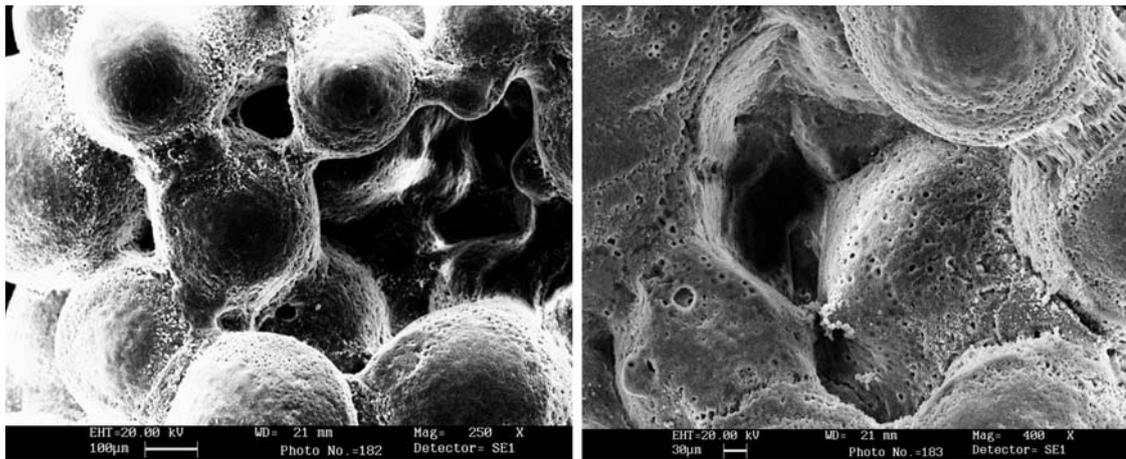


Fig. 4.39: Micrografie a due diversi ingrandimenti di scaffold realizzati per sinterizzazione con solvente di microsferi ottenute mediante singola emulsione (scaffold protein-free) con range dimensionale di 300 ÷ 500 µm.

L'analisi microscopica ha inoltre evidenziato che le microparticelle sono distribuite in maniera random, con colletti di connessione organizzati uniformemente in tutto il volume. E' inoltre evidente, da tali micrografie, la formazione di colletti di giunzione, caratterizzati da dimensioni tali da garantire un'elevata forza di legame tra le microsferi. Tali colletti, pur essendo ben sviluppati ed allungati, risultano confinati nell'intorno dei punti di giunzione,

determinando una struttura completamente interconnessa. Dalle micrografie riportate si nota, inoltre, la presenza di micropori sulla superficie delle microsfele e nei colletti di giunzione, probabilmente dovuta all'evaporazione del solvente.

Matrici bioattive sono state ottenute attraverso la compattazione di microsfele adiacenti di PCL, ottenute mediante singola e doppia emulsione, utilizzando gli stessi rapporti volumetrici solvente/non solvente utilizzati per la realizzazione di scaffold *protein-free* (75/25 w/w). Le immagini ottenute mediante SEM (Fig. 4.40) hanno mostrato una distribuzione uniforme di microparticelle ottenute mediante doppia emulsione nello scaffold tridimensionale. Le microsfele contenenti BSA, caratterizzate da dimensioni inferiori rispetto a quelle ottenute mediante singola emulsione, sembrano occludere parzialmente i pori, determinando un significativo decremento del volume dei pori all'interno della matrice.

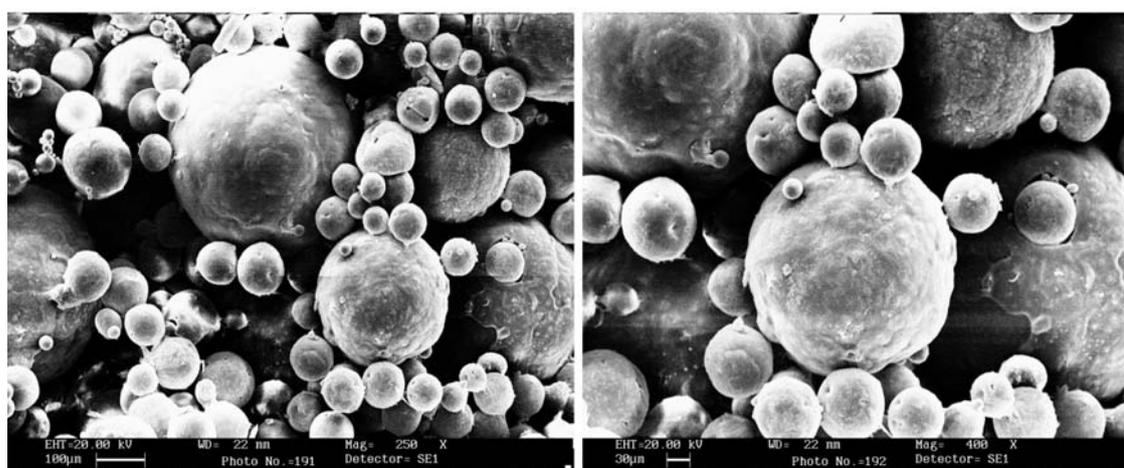


Fig. 4.40: Micrografie di scaffold realizzati per sinterizzazione con solvente di microsfele ottenute mediante singola emulsione e doppia emulsione (scaffold bioattivi).

Analisi porosimetrica a intrusione di mercurio

Per quantificare l'effetto della dimensione delle microparticelle sulle dimensioni dei pori e sulla porosità totale percentuale delle matrici, sono state effettuate analisi al porosimetro a intrusione di mercurio sui campioni realizzati mediante sinterizzazione con solvente. I risultati ottenuti sono riportati in tabella:

Tipologia scaffold	Diametro microsferi (μm)	Porosità totale (%)	Diametro medio dei pori (μm)
Scaffold protein-free (singola emulsione)	630 ÷ 800	51,5 ± 4,2	217,03 ± 23,7
Scaffold protein-free (singola emulsione)	500 ÷ 630	49,3 ± 5,1	96 ± 14,8
Scaffold protein-free (singola emulsione)	300 ÷ 500	47,8 ± 3,9	56 ± 10,7
Scaffold bioattivi (singola e doppia emulsione)	300 ÷ 500 50 ÷ 180	30,2 ± 4,9	35,4 ± 21,3

Tab. 4.9: Relazione tra le dimensioni delle microparticelle utilizzate e la porosità degli scaffold realizzati valutata mediante porosimetro a intrusione di mercurio.

L'analisi porosimetrica dimostra, ancora una volta, che la dimensione media dei pori è strettamente dipendente dalle dimensioni delle microparticelle utilizzate per la realizzazione degli scaffold. I risultati ottenuti mostrano, infatti, un aumento della dimensione media dei pori all'aumentare delle dimensioni delle microparticelle utilizzate (da circa 56 μm per microsferi di 300 ÷ 500 μm a circa 217 μm per microsferi di 630 ÷ 800 μm). Tale risultato è stato ulteriormente confermato dall'analisi di porosità effettuata sugli scaffold bioattivi, realizzati per sinterizzazione di microsferi ottenute mediante singola (300 ÷ 500 μm) e doppia (50 ÷ 180 μm) emulsione, per i quali è stata riscontrata un diametro medio dei pori ancora inferiore, pari a circa 36 μm .

Inoltre, non sono state riscontrate variazioni significative della porosità totale percentuale degli scaffold *protein-free* ($\approx 50\%$). L'analisi ha mostrato, invece, un decremento della porosità percentuale totale degli scaffold bioattivi ($\approx 30\%$) rispetto a quelli *protein-free*. Tale risultato può essere attribuito all'aggiunta di microsferi ottenute mediante doppia emulsione, di dimensioni inferiori (50 ÷ 180 μm) rispetto a quelle ottenute mediante singola emulsione (300 ÷ 500 μm), che possono occludere parzialmente i pori; come ipotizzato dall'analisi SEM.

Confrontando i dati di porosità degli scaffold ottenuti mediante sinterizzazione termica (Tab 4.5) con quelli ottenuti mediante sinterizzazione con solvente (Tab. 4.9) è stato riscontrata una maggiore porosità percentuale totale di questi ultimi. Tale risultato può

essere attribuito alla presenza di pori sui colletti di giunzione tra le microsfere, dovuti all'evaporazione del solvente.

Caratterizzazione meccanica

La resistenza meccanica degli scaffold sinterizzati è stata valutata mediante test a compressione. I risultati ottenuti sono riportati nella tabella seguente:

Tipologia scaffold	Diametro microsfere (μm)	Modulo elastico (MPa)
Scaffold protein-free (singola emulsione)	630 ÷ 800	8,61 ± 1,8
Scaffold protein-free (singola emulsione)	500 ÷ 630	6,68 ± 3,05
Scaffold protein-free (singola emulsione)	300 ÷ 500	10,53 ± 0,71
Scaffold bioattivi (singola e doppia emulsione)	300 ÷ 500 50 ÷ 180	7,54 ± 3,12

Tab. 4.10: Relazione tra le dimensioni delle microparticelle utilizzate e le proprietà meccaniche degli scaffold realizzati.

I campioni analizzati hanno mostrato un modulo elastico compreso tra 6 MPa e 10 MPa circa. Dalla caratterizzazione meccanica dei campioni realizzati non sono state osservate variazioni significative del modulo elastico al variare delle microsfere utilizzate, diversamente da quanto osservato dalla caratterizzazione dei campioni sinterizzati termicamente. Confrontando, inoltre, i moduli elastici di questi ultimi (Tab 4.7) con quelli ottenuti mediante sinterizzazione con solvente (Tab. 4.10) è stato riscontrata, per tutte le formulazioni di campioni, un modulo elastico superiore nel caso di sinterizzazione termica. Tale risultato può essere attribuito alla presenza di pori sui colletti di giunzione tra le microsfere, dovuti all'evaporazione del solvente, che rendono la struttura meno resistente.

4.4 Microsfere di chitosano/gelatina ottenute mediante singola emulsione

Sulla base dei risultati ottenuti dallo studio e dalla completa caratterizzazione delle microparticelle di PCL e della loro sinterizzazione per ottenere matrici tridimensionali, sono state realizzate microparticelle composite chitosano-gelatina. La realizzazione di tali microparticelle è focalizzata ad estendere l'approccio della sinterizzazione di microparticelle ai materiali naturali.

Analisi morfologica (SEM)

Per valutare l'effetto della concentrazione di surfattante sulla morfologia e sulle dimensioni delle microparticelle è stata eseguita l'analisi della morfologia mediante il microscopio a scansione elettronica (SEM). Di seguito si riportano alcuni esempi di micrografie relative alle microsfere ottenute mediante singola emulsione. In particolare, per ogni tipologia riportata vengono mostrate due micrografie a differente ingrandimento, al fine di evidenziare la distribuzione dimensionale e la morfologia superficiale delle singole microsfere. Le tipologie di microsfere prese in esame sono riportate in tabella:

Tipologia	Velocità di agitazione (rpm)	SPAN 85 (g/ml %)
CG ₁	400	-
CG ₂	400	1,7
CG ₃	400	3,3
CG ₄	400	10

Tab. 4.11:Tipologie di microsfere composite chitosano/gelatina ottenute mediante singola emulsione

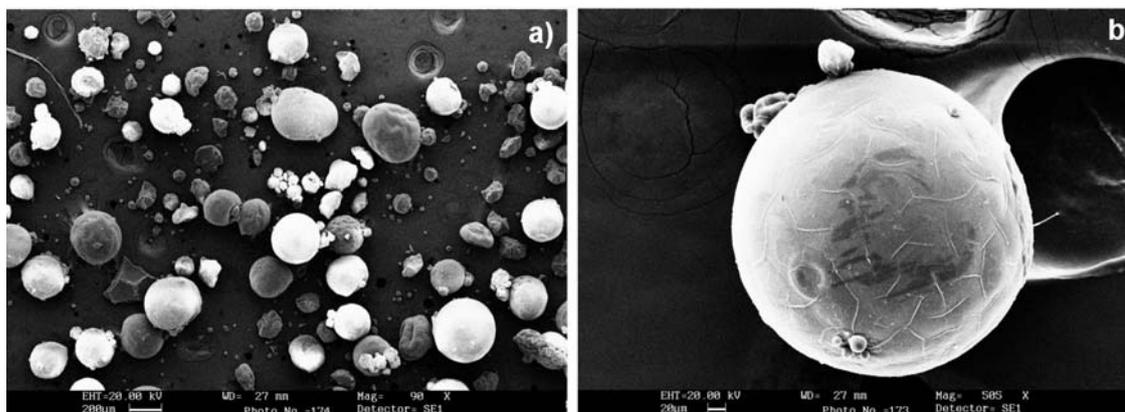


Fig. 4.41: Micrografie a due diversi ingrandimenti rappresentative di microsfele di chitosano-gelatina ottenute mediante singola emulsione, senza l'utilizzo di un surfattante

Le microsfele realizzate mediante singola emulsione, senza l'utilizzo di un surfattante (Fig. 4.41), mostrano un range dimensionale piuttosto ampio e una percentuale ridotta di particelle di forma sferica. Tale morfologia non le rende adatte alla realizzazione di scaffold per sinterizzazione, in quanto l'irregolarità delle forme e la non uniformità dimensionale rendono difficoltosa la realizzazione di strutture porose interconnesse. Per migliorare la distribuzione dimensionale e la morfologia delle microsfele è stato utilizzato un opportuno surfattante (SPAN 85). Di seguito vengono riportate le micrografie di microsfele ottenute mediante singola emulsione, all'aumentare della percentuale di surfattante nella fase oil.

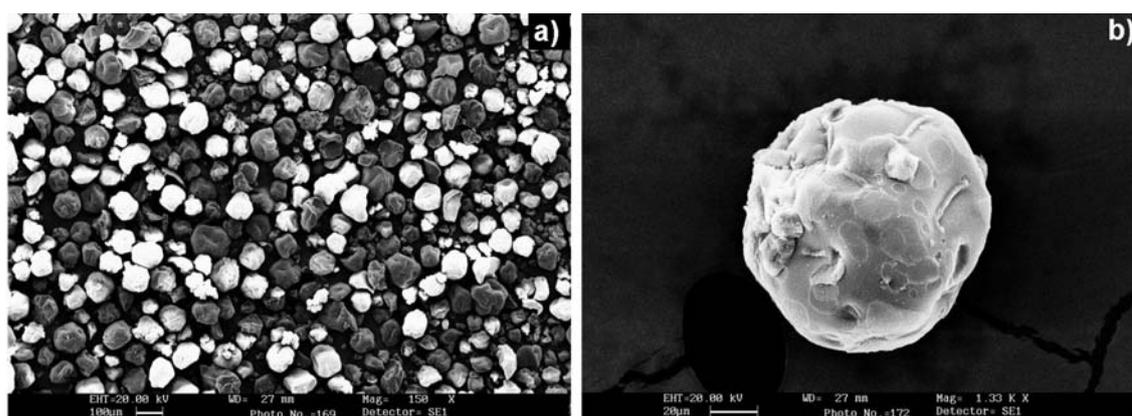


Fig. 4.42: Micrografie a due diversi ingrandimenti rappresentative di microsfele di chitosano-gelatina ottenute mediante singola emulsione, con 1,7 % (w/v) di surfattante (SPAN 85) nella fase oil.

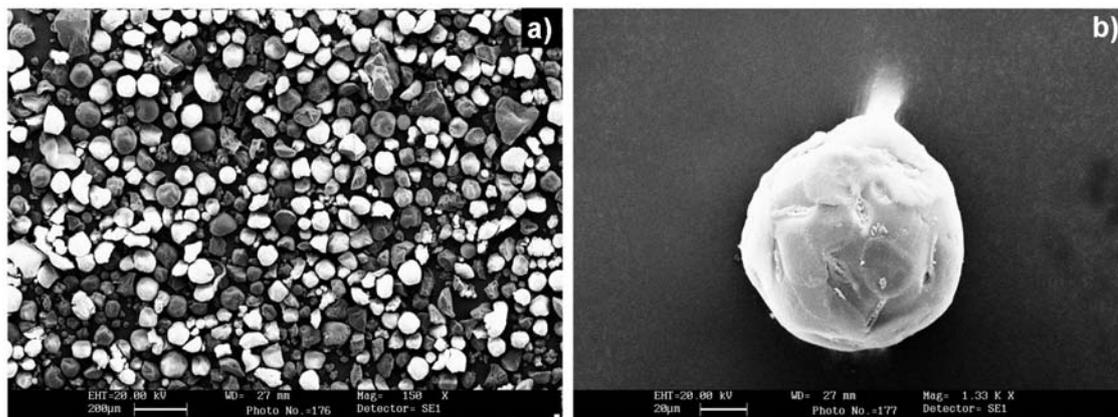


Fig. 4.43: Micrografie a due diversi ingrandimenti rappresentative di microsfele di chitosano-gelatina ottenute mediante singola emulsione, con 3,3 % (w/v) di surfattante (SPAN 85) nella fase oil.

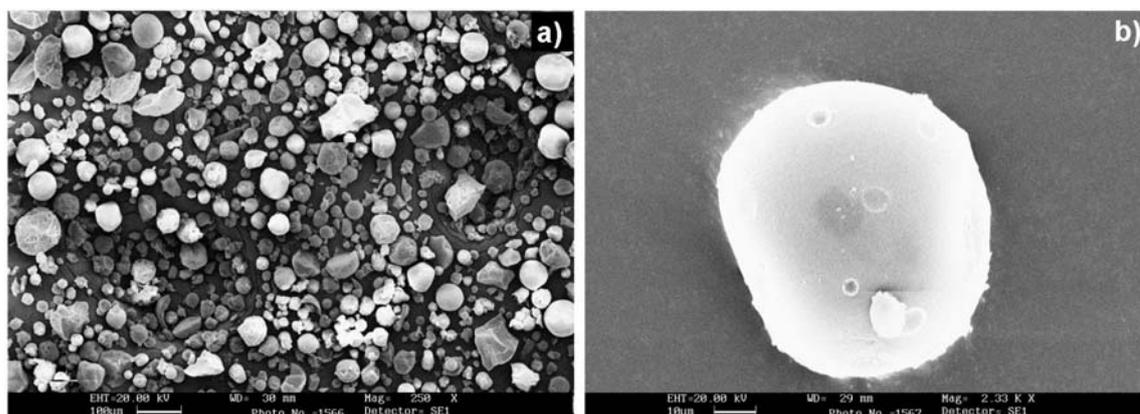


Fig. 4.44: Micrografie a due diversi ingrandimenti rappresentative di microsfele di chitosano-gelatina ottenute mediante singola emulsione, con 10 % (w/v) di surfattante (SPAN 85) nella fase oil.

Le micrografie hanno mostrato un aumento delle dimensioni delle microsfele all'aumentare della concentrazione di SPAN 85. Tale risultato può essere imputato ad un aumento della viscosità dell'emulsione per effetto dello SPAN 85 e, quindi, ad una maggiore difficoltà a rompere la stessa in goccioline più piccole, a parità di potenza applicata. Inoltre, l'aggiunta del surfattante SPAN 85 alla fase oil sembra aumentare la stabilità dell'emulsione contro la coalescenza, portando alla formazione di microsfele con range dimensionale più ristretto (Fig 4.42-4.44). Tale risultato suggerisce che le dimensioni delle microsfele possono essere controllate al variare della viscosità della soluzione.

Conclusioni

In tale lavoro di ricerca è stato proposto e ottimizzato un approccio innovativo per la realizzazione di scaffold tridimensionali bioattivi per la rigenerazione del tessuto osseo. Tale approccio consiste nella sinterizzazione di microparticelle biodegradabili in policaprolattone (approccio *bottom-up*).

Il primo stadio di questo lavoro è stato rivolto allo studio e all'ottimizzazione del processo di preparazione di microsfele in PCL, attraverso l'utilizzo di due metodologie: singola emulsione (O/W) e doppia emulsione (W/O/W). La tecnologia di singola emulsione ha permesso la realizzazione di microparticelle sferiche, non porose e di dimensioni adatte per il loro impiego nel processo di sinterizzazione. Attraverso la tecnologia di doppia emulsione è stato possibile incapsulare efficientemente una proteina modello (BSA). Dalla completa caratterizzazione delle microsfele ottenute mediante doppia emulsione è stato dimostrato che, variando opportunamente parametri di processo, come concentrazione di PCL e ammontare di PVA nella fase acquosa interna, è possibile modulare la dimensione delle microparticelle, la loro morfologia interna e, conseguentemente, la cinetica di rilascio della proteina incapsulata. In particolare, è stato riscontrato un aumento delle dimensioni delle microsfele all'aumentare della percentuale di PCL e di PVA. Inoltre, è stato dimostrato che microsfele ottenute a concentrazioni più basse di PVA e di PCL presentano una struttura interna caratterizzata da depot di dimensioni maggiori, con superficie media dei pori più elevata e ciò determina un rilascio maggiore della proteina incapsulata.

Tale lavoro di ricerca si è poi focalizzato sulla realizzazione di scaffold tridimensionali attraverso sinterizzazione termica o compattazione chimica (attraverso l'utilizzo di un'opportuna miscela di solventi) delle microsfele ottenute e ottimizzate nella prima fase. Per individuare le condizioni ottimali di preparazione, gli scaffold ottenuti con le due diverse tecniche di sinterizzazione sono stati completamente caratterizzati in termini di morfologia (SEM, microscopia confocale, porosimetro a intrusione di mercurio, microtomografia computerizzata) e proprietà meccaniche (test a compressione), nonché della cinetica di rilascio della proteina incapsulata.

Gli scaffold realizzati e ottimizzati hanno mostrato di possedere un'elevata porosità interconnessa e proprietà meccaniche compatibili con l'applicazione d'interesse. Inoltre, dalla caratterizzazione effettuata è stata definita e quantificata la correlazione tra la scelta delle microparticelle utilizzate e le proprietà finali dello scaffold, per entrambe le tecnologie di sinterizzazione. In particolare, è stato possibile dimostrare che la dimensione dei pori e le proprietà meccaniche degli scaffold possono essere controllati dalla scelta delle dimensioni delle microsferiche compatte, ottenute mediante singola emulsione. Contestualmente, il rilascio della proteina incapsulata può essere, invece, modulato dall'opportuna scelta della formulazione delle microsferiche ottenute mediante doppia emulsione.

L'utilizzo di tale approccio *bottom-up* ha permesso la realizzazione di strutture con proprietà microstrutturali in grado di fornire un supporto adeguato alla rigenerazione del tessuto osseo, capaci, inoltre di guidare tale processo di rigenerazione attraverso il rilascio controllato nello spazio e nel tempo di opportuni fattori bioattivi.

L'ultima fase di tale lavoro di ricerca si è focalizzata sulla realizzazione di microparticelle composite chitosano/gelatina mediante singola emulsione, al fine di estendere tale approccio innovativo ai materiali naturali.

Bibliografia

- [1] Ikada Y., Challenges in tissue engineering, *J R Soc Interface* 2006;3:589–601.
- [2] Langer R., Tissue engineering, Review 1999.
- [3] Schugens Ch., Maquet V., Grandfils Ch., Jerome R., Ph. Teyssie, Polylactide macroporous biodegradable implants for cell transplantation. II. Preparation of polylactide foams by liquid-liquid phase separation, *Journal of Biomedical Materials Research* 1995; 30: 449 – 461.
- [4] Porges E., Schade B., Ropte W., Automated flow-through method to determine the dissolution rate of slightly soluble substances, *Pharm Ind* 1985;1:7-86.
- [5] Ruth R.C., Mooney D.J., Polymeric growth factor delivery strategies for Tissue Engineering. *Pharm Res* 2003;20:1103-1112.
- [6] Fuchs J.R., Nasser B.A., Vacanti J.P., Tissue engineering: a 21st century solution to surgical reconstruction, *Ann Thorac Surg* 2001;72:577–591.
- [7] Niklason L.E., Langer R., Prospects for organ and tissue replacement, *J. Am. Med. Assoc.* 2001;285:573–576.
- [8] Stock U.A., Vacanti J.P., Tissue engineering: current state and prospects. *Ann. Rev. Med.* 2001;52:443–51.
- [9] Langer R., Vacanti J.P., Tissue engineering. *Science* 1993;260:920–926.
- [10] Chen R.R., Mooney D.J., Polymeric growth factor delivery strategies for tissue engineering, *Pharm. Res.* 2003;20:1103–1112.
- [11] Laurencin C.T., Ambrosio A.A., Borden M.D., Cooper J.A., Tissue engineering: orthopaedic applications. *Ann Rev Biomed. Eng.* 1999;1:19–26.
- [12] Mikos A.G., Herring S.W., Ocharcon P., Elisseff J., Lu H.H., Kandel R., Schoen F.J., Toner M., Mooney D., Atala A., Van Dyke M.E., Kaplan D., Vunjak-Novakovic G., Engineering complex tissues, *Tissue Eng.* 2006; 12:3307-3339.
- [13] Matsumoto T., Mooney D.J., Cell instructive polymers, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 2006; 102:113-137.
- [14] Holland T.A., Mikos A.G.. Biodegradable polymeric scaffolds. Improvements in bone tissue engineering through controlled drug delivery, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 2006;102:161-85.

- [15] Ungaro F., Biondi M., Indolfi L., De Rosa G., La Rotonda M.I., Quaglia F., Netti P.A., Bioactivated Polymer Scaffolds for Tissue Engineering. In: Ashammakhi N, Rise RL, Sun W. Eds. Topics in Tissue engineering Vol. II; 2005.
- [16] Causa F., Netti P.A., Ambrosio L., A multi-functional scaffold for tissue regeneration: The need to engineer a tissue analogue, *Biomaterials* 2007;28:5093–5099.
- [17] Ungaro F., Biondi M., D'Angelo I., Indolfi L., Quaglia F., Netti P.A., La Rotonda M.I., Microsphere-integrated collagen scaffolds for tissue engineering: Effect of microsphere formulation and scaffold properties on protein release kinetics, *J. Control. Release* 2006;113:128–136.
- [18] Kweon H.Y., Yoo M.K., Park I.K., Kim T.H., Lee H.C., Lee H.S., Oh J.S., Akaike T., Cho C.S., A novel degradable polycaprolactone networks for tissue engineering, *Biomaterials* 2003; 24:801-808.
- [19] Ambrosio L., Peluso G., Progettazione, caratterizzazione chimico-fisica e biologica dei Biomateriale, VII Congresso Nazionale di Chirurgia Maxillo-facciale.
- [20] Pietrabissa R., Biomateriali per protesi e organi artificiali, Patron ed. Bologna 1996.
- [21] Bilezikian J.P., Raisz L.G., Rodan G.A., Principles of bone biology, Academic Press, San Diego, USA, 1996.
- [22] Lawson A.C., Czernuszka J.T., Collagen-calcium Phosphate composites, Department of Materials, University of Oxford, part H 1998; 212:413-425.
- [23] Rho J.Y., Kuhn-Spearing L., Zioupos P., Mechanical properties and the hierarchical structure of bone, *Med. Eng. Phys.* 1998;20:92-102.
- [24] Bani D. – Il tessuto osseo.
- [25] Nicholson P.H.F., Cheng X., Lowet G., Structural and material mechanical properties of human vertebral cancellous bone, *Med. Eng. Phys.* 1997;19:729-737.
- [26] Currey J.D., Mechanical properties of vertebrate hard tissue, *Proc. Inst. Mech. Eng.* 1998 part H ; 212.

- [27] Nordin M., Frenkel V.M., Biomechanics of bone, Basic Biomechanics of the musculo-skeletal system, 2001.
- [28] Wang X., Bank R., TeKoppele J., Agrawal C., The role of collagen in determining bone mechanical properties, Journal of orthopaedic research 2001;19:1021-1026.
- [29] Hancock N.M., Biology of bone, University Press, Cambridge, UK, 1972.
- [30] Marotti G., The structure of bone tissues and the cellular control of their deposition, Ital. J Anat Embryol 1996;101: 25–79.
- [31] Guyton A., Textbook of Medical Physiology, Saunders, Philadelphia, 1991.
- [32] Zallone A., Zambonin G., Cellular basis of bone resorption In: “Bone densitometry and Osteoporosis” Genant, Guglielmi and Jergas Editors, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York Publishers 1998: 83-93.
- [33] Einhorn A., Thomas R., The bone organ system. Form and function, Osteoporosis. Academic Press, San Diego.
- [34] Salter R.B., Textbook of disorders and injuries of the musculoskeletal system (1st ed.) 1970.
- [35] Albright J. A., Richard B. A., The Scientific Basis of Orthopaedics - 2nd ed. Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1987.
- [36] Arthur J., Orthopaedic and Sports Mosby, Physical Therapy, 3rd ed. 1997 p. 21.
- [37] Yasuda I., On the piezoelectric activity of bone, J. Jap. Orthop. Surg. Soc. 1954; 28:267.
- [38] Becker R.O., Bassett C.A.L. and Bachman C.H., Bioelectric factors controlling bone structure. In Bone biodynamics, ed. H. Frost. New York: Little Brown 1964.
- [39] Bhatia S.N., Chen C.S., Biomedical Microdevices, 1999;2:131-144.
- [40] Chapekar M.S., Tissue engineering: challenger and opportunities, Chemistry and life science, June 2000.
- [41] Mussi F., Bertolini G., Portella L., Ingegneria Tissutale: metodologie ed applicazioni.
- [42] Jason A. P., Tony H., Bernhard O. P., Shankar S., Reconstruction of cellular signalling networks and analysis of their properties, Nature Reviews Molecular Cell Biology 2005;6:99 – 111.

- [43] Burg K.J.L., Porter S., Kellam J.F., Biomaterial development for bone tissue engineering, *Biomaterials* 2000.
- [44] Hutmacher D. W., Scaffold in tissue engineering bone and cartilage, *Biomaterial* 2000;21:2529-2543.
- [45] Leong K. F., Cheah C. M., Chua C. K., Solid freeform fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs, *Biomaterials* 2003;24: 2363-2378.
- [46] Robinson B., Hollinger J. O., Szachowicz E., Brekke J., Calvarial bone repair with porous D,L-poly lactide, *Otolaryng Head Neck* 1995; 112(6): 707-13.
- [47] Yoshikawa T., Ohgushi H., Tamai S., Intermediate bone forming capability of prefabricated osteogenic hydroxyapatite, *J Biomed Mater Res* 1996; 32(3): 481-92.
- [48] Yang S., Leong K.F., Du Z., Chua C.K., The design of Scaffold for use in Tissue Engineering. Part I. Traditional Factor, *Tissue engineering* 2001;7:680-683.
- [49] Williams D.F., Review: biodegradation of surgical polymers, *J. Mater. Sci.* 1982; 17:1233-1246.
- [50] Bellamkonda R., Ranieri J.P., Bouche N., Aebischer P., Hydrogel-based three-dimensional matrix for neural cells, *J. Biomed. Mater. Res.* 1995; 29: 663-71.
- [51] Knott, L., Bailey A.J., Collagen cross-link in mineralizing tissues: A review of their chemistry, function, and clinical relevance, *Bone* 1998;22:181-187.
- [52] Wayne R. Gombotz and SiowFong Wee, Protein release from alginate matrices, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1998;31: 267-285.
- [53] Chandy T., Mooradian D.L., Gundu H. R. Rao, Chitosan/polyethylene glycol alginate microcapsules for oral delivery of hirudin, *Journal of Applied Polymer Science* 1998;70: 2143 – 2153.
- [54] Milella E., Brescia E., Massaro C., Ramires P. A., Chemico-physical properties of hyaluronan-based sponges, *Journal of Biomedical Materials Research*, 2002; 52: 695 – 700.
- [55] Chen G., Ushida T., Tateishi T., Scaffold Design for Tissue Engineering, *Macromol. Biosci.* 2002;2:69-70.
- [56] Mikos A.G., Bao Y., Cima L.G., Ingber D.E., Vacanti J.P., Langer R., *J.Biomed. Mater. Res.* 1993; 27:183.
- [57] Guarino V., Causa F., Ambrosio L., Bioactive scaffolds for bone and ligament tissue, *Expert rev. Med. Devices* 2007;4:405-418.
- [58] Mooney D.J., Baldwin D.F., Suh N.P., Vacanti J.P., Langer R., Novel approach to fabricate porous sponges of poly(D,L-lactid-co-glycolic acid) without the use of organic solvents, *Biomaterials* 1996;17:1417-1422.

- [59] Ho M.H., Wang D.M., Preparation of porous scaffolds by using freeze-extraction and freeze-gelation methods, *Biomaterials* 2004; 25:129-138.
- [60] Keune W., Reinke N.A., Electrospinning and electrospinning. *Hauptseminar Angewandte Physik SS 2002*.
- [61] Huang Z.M., Zhang Y.Z., Kotaki M., Ramakrishna S., A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites, *Composites Science and Technology* 2003; 63:2223-2253.
- [62] Reneker D.H., Kataphinan W., Theron A., Zussman E., Yarin A.L., Nanofiber garlands of polycaprolactone by electrospinning, *Polymer* 2002; 43:6785-6790.
- [63] E. Sachlos and J.T. Czernuszka, Making tissue engineering scaffolds work review on the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds, *European Cells and Materials* 2003;5:29-40.
- [64] Clair J.J., *Stereolithography and the biomedical engineering* 1996;57:393-396.
- [65] Lee M.D., James C.Y., Wu B.M., Scaffold fabrication by indirect three-dimensional printing, *Biomaterials* 2005; 26:4281-4289.
- [66] Hutmacher D. W., Schantz T., Zein I., Woei Ng K., Teoh S. H., Tan K. C., Mechanical properties and cell cultural response of polycaprolactone scaffolds designed and fabricated via fused deposition modeling, *Journal of Biomedical Materials Research* 2001;55:203 – 216.
- [67] Laurencin C.T., Ko F.K., Attawia M.A., Borden M.D., Studies on the development of a tissue engineered matrix for bone regeneration, *Cells and Materials* 1998; 8:175-181.
- [68] Chiang Y.M., Dunbar Birnie III, Kingery W.D. - *Physical ceramics* - p.393-403.
- [69] Borden M., Attawia M., Laurencin C.T., The sintered microsphere matrix for bone tissue engineering: In vitro osteoconductivity studies, *Journal of Biomedical Materials Research* 2002; 61:421 – 429.
- [70] Borden M., El-Amin S.F., Attawia M., Laurencin C.T., Structural and human cellular assessment of a novel microsphere based tissue engineered scaffold for bone repair *Biomaterials* 2003;24:597–609.
- [71] Tao Jiang, Wafa I. Abdel-Fattah, Laurencin C.T., In vitro evaluation of chitosan/poly(lactic acid-glycolic acid) sintered microsphere scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials* 2006;27:4894–4903.
- [72] Wei G., Jin Q., Giannobile W.V., Ma P.X., Nano-fibrous scaffold for controlled delivery of recombinant human PDGF-BB *Journal of Controlled Release* 2006;112:103–110.

- [73] Yamamoto M., Tabata Y., Hong L., Miyamoto S., Hashimoto N., Ikada Y., Bone regeneration by transforming growth factor beta 1 released from a biodegradable hydrogel, *J. Control. Release* 2000;64:133–142.
- [74] Miyamoto S., Takaoka K., Okada T., Yoshikawa H., Hashimoto J., Suzuki S., Ono K., Evaluation of polylactic acid homopolymers as carriers for bone morphogenetic protein, *Clin. Orthop. Relat. Res.* 1992;278:274–285.
- [75] Pimentel E., *Handbook of Growth Factors I: General Basic Aspects*, CRC Press, Boca Raton, Florida, 1994.
- [76] Tabata Y., The importance of drug delivery systems in tissue engineering, *Pharmaceutical Science & Technology Today*, 2000; 3:80-89.
- [77] Yancopoulos G. D., Davis S., Gale N. W., Rudge J., Wiegand S. J., and Holash J., Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 2000;407:242–248.
- [78] Bowen-Pope D. F., Malpass T. W., Foster D. M., and Ross R., Platelet-derived growth factor in vivo: levels, activity, and rate of clearance. *Blood* 1984;64:458–469.
- [79] Edelman E. R., Nugent M. A., and Karnovsky M. J., Perivascular and intravenous administration of basic fibroblast growth factor: vascular and solid organ deposition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993;90:1513–1517.
- [80] Lazarous D. F., Shou M., Scheinowitz M., Hodge E., Thirumurti V., Kitsiou A. N., Stiber J. A., Lobo A. D., Hunsberger S., Guetta E., Epstein S. E., and Unger E. F., Comparative effects of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor on coronary collateral development and the arterial response to injury. *Circulation* 1996;94:1074–1082.
- [81] Papkov M.S., Agashi K., Olaye A., Shakesheff K., Domb A.J., Polymer carriers for drug delivery in tissue engineering, *Advanced Drug Delivery Reviews* 2007; 59:187–206.
- [82] DeLong S.A., Moon J.J., West J.L., Covalently immobilized gradients of bFGF on hydrogel scaffolds for directed cell migration, *Biomaterials* 2005;26:3227–3234.
- [83] Mann B.K., Schmedlen R.H., West J.L., Tethered TGF- β increases extracellular matrix production of vascular smooth muscle cells, *Biomaterials* 2001;22: 439–444.
- [84] Park H., Temenoff J.S., Holland T.A., Tabata Y., Mikos A.G., Delivery of TGF b1 and chondrocytes via injectable, biodegradable hydrogels for cartilage tissue engineering applications, *Biomaterials* 2005;26:7095–7103.
- [85] Drury J.L., Mooney D.J., Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications, *Biomaterials* 2003;24:4337–4351.

- [86] Chenite A., Chaput C., Wang D., Combes C., Buschmann M.D., Hoemann M.C.D., J.C. Leroux, Atkinson B.L., Binette F., Selmani A., Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ, *Biomaterials* 2000;21:2155–2161.
- [87] Holland T., Bodde E.W.H., Cuijpers V.M.K.I., Baggett L.S., Tabata Y., Mikos A.G., Jansen J.A., Degradable hydrogel scaffolds for in vivo delivery of single and dual growth factors in cartilage repair, *Osteoarthr.. Cartil.* 2007; 15:187–197.
- [88] Tabata Y., Significance of release in tissue engineering, *Drug Discov. Today* 2005;10:1639–1646.
- [89] Hile D.D., Amirpour M.L., Akgerman A., Pishko M.V., Active growth factor delivery from poly(D,L-lactide-co-glycolide) foams prepared in supercritical CO₂, *J. Control. Release* 66 (2000) 177–185.
- [90] Kanczler J.M., Barry J., Ginty P., Howdle S.M., Shakesheff K.M., Oreffo R.O.C., Supercritical carbon dioxide generated vascular endothelial growth factor encapsulated poly(DL-lactic acid) scaffolds induce angiogenesis in vitro, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007;352:135–141.
- [91] Vasita R., Katti D.S., Growth factor-delivery systems for tissue engineering: a materials perspective, *Expert Rev. Med. Devices* 2006:29–47.
- [92] Quirk R.A., France R.M., Shakesheff K.M., Howdle S.M., Supercritical fluid technologies and tissue engineering scaffolds, *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* 2004;8:313–321.
- [93] Mooney D.J., Baldwin D.F., Suh N.P., Vacanti L.P., Langer R., Novel approach to fabricate porous sponges of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) without the use of organic solvents, *Biomaterials* 1996;17:1417–1422.
- [94] Harris L.D., Kim B.S., Mooney D.J., Open pore biodegradable matrices formed with gas foaming, *J. Biomed. Mater.* 1998;42:396–402.
- [95] Murphy L.M., Peters M.C., Kohn D.H., Mooney D.J., Sustained release of vascular endothelial growth factor from mineralized poly(lactide-coglycolide) scaffolds for tissue engineering, *Biomaterials* 2000;24:2521–2527.
- [96] Yang X., Whitaker M.J., Sebald W., Clarke N., Howdle S.M., Shakesheff K.M., Oreffo R.O.C., Human osteoprogenitor bone formation using encapsulated bone morphogenetic protein 2 in porous polymer scaffolds, *Tissue Eng.* 2004;10:1037–1045.
- [97] Li C., Vepari C., Jin H.J., Kim H.J., Kaplan D.L., Electrospun silk-BMP- 2 scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials* 2006;27:3115–3124.
- [98] Freiberg S., Zhu X., Polymer microspheres for controlled drug release, *Int. J. Pharm.*, 2004;282:1–18.

- [99] Hiraoka Y., Yamashiro H., Yasuda K., Kimura Y., Inamoto T., Tabata Y., In situ regeneration of adipose tissue in rat fat pad by combining a collagen scaffold with gelatin microspheres containing basic fibroblast growth factor, *Tissue Eng.* 2006;12:1475–1487.
- [100] Tabata Y., Ikada Y., Morimoto K., Katsumata H., Yabuta T., Iwanaga K., Kakemi M., Surfactant-free preparation of biodegradable hydrogel microspheres for protein release, *J. Bioact. Compat. Polym.* 1999;14:371–384.
- [101] Nakahara T., Nakamura T., Kobayashi E., Inoue M., Shigeno K., Tabata Y., Eto K., Shimizu Y., Novel approach to regeneration of periodontal tissues based on in situ tissue engineering: effects of controlled release of basic fibroblast growth factor from a sandwich membrane, *Tissue Eng.* 2003;9:153–162.
- [102] Morita T., Sakamura Y., Horikiri Y., Suzuki T., Yoshino H., Protein encapsulation into biodegradable microspheres by a novel S/O/W emulsion method using poly(ethylene glycol) as a protein micronization adjuvant, *J. Control. Release* 2000;69:435–444.
- [103] King T.W., Patrick C.W., Development and in vitro characterisation of vascular endothelial growth factor (VEGF)-loaded poly(DL-lactic-co-glycolic acid)/poly(ethylene glycol) microspheres using a solid encapsulation/single emulsion/solvent extraction technique, *J. Biomed. Mater. Res.* 2000;51:383–390.
- [104] Xu C.Y., Inai R., Kotaki M., Ramakrishna S., Aligned biodegradable nanotubular structure: a potential scaffold for blood vessel engineering, *Biomaterials* 2004;25:877–886.
- [105] Kempen D.H.R., Kim C.W., Lu L., Dhert W.J.A., Currier B.L., Yaszemski M.J., Controlled release from poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres embedded in an injectable, biodegradable scaffold for bone tissue engineering, *Thermec.* 2003;1–5:3151–3156.
- [106] Hedberg E.L., Tang A., Crowther R.S., Carney D.H., Mikos A.G., Controlled release of an osteogenic peptide from injectable biodegradable polymeric composites, *J. Control. Release* 2002;84:137–150.
- [107] Van de Velde K., Kiekens P., Biopolymers: overview of several properties and consequences on their applications, *Polymer Testing* 2002, 21:433–442.
- [108] Nishio Y., Manley R.J., *Polym. Eng. And Sci.* 1990;30:71.
- [109] Ali S.A.M., Zhong S.P., Doherty P.J., Williams D.F., Mechanism of polymer degradation in implantable devices, *Biomaterials* 1993;14.
- [110] Van de Velde K., Kiekens P., Thermoplastic polymers: overview of several properties and their consequences in polymer/flax composites, *Polymer Testing* 2001;20:885-893.
- [111] Iroh Jude O., Poly(ϵ -caprolactone), *Polymer Data Handbook* 1999.

- [112] Thomas L.S., Structural Conformation of Bovine Serum Albumin Layers at the Air-Water Interface Studied by Neutron Reflection, *J Colloid Interface Sci.* 1999 ;15;213 (2):426-437.
- [113] Mi F.L., Tan Y.C., Liang H.F., Sung H.W., In vivo biocompatibility and degradability of a novel injectable-chitosan-based implant , *Biomaterials* 2002;23:181-191.
- [114] Prasitsilp M., Jenwithisuk R., Kongsuwan K., Damrongchai N., Watts P., Cellular responses to chitosan in vitro: The importance of deacetylation, *Journal of materials science: materials in medicine* 2000;11:773-778.
- [115] Ravi Kumar M.N.V., A review of chitin and chitosan applications , *Reactive & Functional Polymers* 2000;46:1-27.
- [116] Ma L., Gao C., Mao Z., Zhou J., Shen J., Hu X., Han C., Collagen/chitosano porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering , *Biomaterials* 2003;24:4833-4841.
- [117] Khan T.A., Peh K.K., Cheng H.S., Mechanical, bioadhesive strength and biological evaluations of chitosan films for wound dressing , *J Pharm Pharmaceut Sci* 2000;3:303-311.
- [118] Li J., Pan J., Zhang L., Yu Y., Culture of hepatocytes on fructose-modified chitosan scaffolds, *Biomaterials* 2003;24:2317-2322.
- [119] Cheng M., Deng J., Yang F., Cong Y., Zhao N., Zhang X., Study on physical properties and nerve cell affinity of composite films from chitosan and gelatin solutions , *Biomaterials* 2003;24:2871-2880.
- [120] Denkbaz E.B., Seyyal M., Piskin E., Implantable 5-fluorouracil loaded chitosan scaffolds prepared by wet spinning , *Journal of membrane Science* 2000;172:33-38.
- [121] Jin J., Song M., Hourston D.J., Novel chitosan-based films cross-linked by genipin with improved physical properties , *Biomacromolecules* 2004; 5:162-168.
- [122] Dick E., An introduction to gelatin , *Business briefing: innovative food ingredients* 2002:64-66.
- [123] Cole C.G.B., Gelatine: its properties and its applications in dairy products , *Dairy Symposium* 2001, Gordon Bay, South Africa, 7 march 2001.
- [124] Bigi A., Cojazzi G., Panzavolta S., Rubini K., Roveri N., Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degrees of glutaraldehyde crosslinking , *Biomaterials* 2001;22:763-768.
- [125] Calero P., Jorge-Herrero E., Turnay J., Olmo N., Lopez de Silanes I., Lizarbe M.A., Martin Maestro M., Arenaz B., Castillo-Olivares J.L., Gelatines in soft tissue biomaterials. Analysis of different crosslinking agents, *Biomaterials* 2002;23:3473-3478.
- [126] Bigi A., Cojazzi G., Panzavolta S., Rubini K., Roveri N., Stabilization of gelatin films by crosslinking with genipin , *Biomaterials* 2002;23:4827-4832.

- [127] Bacallo R., Bomsel M., Stelzer E. H. K., and De Mey J., Guiding principles of specimen preservation for confocal fluorescence microscopy, In "Handbook of Biological Confocal Microscopy" (J. Pawley, ed.), 1990:197-205. Plenum, New York
- [128] Bacallo R., and Garfinkel A., Three- Dimensional Confocal Microscopy: Volume Investigation of Biological Systems, Stevens, J. K. et al., eds., 172-4. Academic Press, London. (1994).
- [129] Tsien R.Y., and Waggoner A., Fluorophores for confocal microscopy: photophysics and photochemistry., In "Handbook of Biological Confocal Microscopy" (J. B. Pawley, ed.) pp. 153-161. Plenum, New York (1990).
- [130] Andrew L. Darling, Wei Sun, Free form fabrication and micro-CT characterization of poly - e – caprolactone tissue scaffolds.