



Università Campus Bio-Medico di Roma

Corso di Dottorato di Ricerca in  
Rigenerazione Tissutale dell'Apparato Locomotore  
ed Applicazioni Tecnologico-Sperimentali  
(XXII ciclo anno 2007)

**Membrane di nanofibre di Chitosano puro e  
Chitosano/Idrossiapatite per applicazioni  
ortopediche, realizzate con electrospinning:  
caratterizzazione dei biomateriali e  
biocompatibilità su cellule staminali umane**

**Dott. Alberto Corrado Di Martino**

Coordinatore  
Prof. Vincenzo Denaro

Supervisor  
Prof. Francisco Forriol Campos

Tesi di dottorato in Rigenerazione Tissutale dell'Apparato Locomotore ed Applicazioni Tecnologico-Sperimentali,  
di Alberto Corrado Di Martino,  
discussa presso l'Università Campus Bio-Medico di Roma in data 18/01/2010.  
La disseminazione e la riproduzione di questo documento sono consentite per scopi di didattica e ricerca,  
a condizione che ne venga citata la fonte.

*A Margherita*

### **Ringraziamenti:**

Il primo ringraziamento va al mio Direttore e Coordinatore di questo Corso di Dottorato di Ricerca, il Prof. Vincenzo Denaro, che mi ha insegnato l'attitudine critica al lavoro di ricerca e la necessità dell'integrazione delle conoscenze frutto degli studi con le esigenze cliniche del malato.

Ringrazio la Prof.ssa Marcella Trombetta, presso il cui laboratorio il lavoro oggetto di questa tesi è stato realizzato, per la disponibilità e la benevolenza con cui mi ha accolto all'interno del Suo gruppo di ricerca, iniziandomi alle tecnologie per la progettazione e la realizzazione dei biomateriali.

Ringrazio con affetto il mio Supervisore del Corso di Dottorato di Ricerca, il Prof. Francisco Forriol Campos, mio primo Tutor della ricerca già quando da studente di medicina frequentavo il laboratorio di Ortopedia Sperimentale all'Università di Navarra.

Ringrazio l'equipe del Laboratorio di Chimica e Biomateriali. Senza la collaborazione e l'aiuto di questi professionisti, fra cui ricordo con affetto soprattutto il Dott. Ing. Alberto Rainer, il Dott. Ing. Liliana Liverani, e la Dott.ssa Franca Abbruzzese, il lavoro oggetto di questa tesi non sarebbe stato realizzato.

A mia moglie Francesca, per i sacrifici di questi anni che ci hanno visto crescere insieme come persone e come famiglia, oggi più che mai.

## **Introduzione**

Il termine “ingegneria tissutale” è stato coniato ad un meeting sponsorizzato dalla NSF (National Science Foundation) nel 1987. Durante un successivo workshop sponsorizzato dalla NSF, è stata fornita la seguente definizione: “l’ingegneria tissutale è l’applicazione dei principi e metodi dell’ingegneria e delle scienze biologiche per ottenere una conoscenza fondamentale delle relazioni tra strutture e funzioni dei tessuti di mammiferi in condizioni patologiche e di normofunzionalità e lo sviluppo di sostituti biologici per ripristinare, conservare e migliorare la funzione di un tessuto.”

Esistono altre definizioni. Langer e Vacanti nel 1993 hanno definito l’ingegneria tissutale come “un campo interdisciplinare che applica i principi dell’ingegneria e delle scienze biologiche verso lo sviluppo di sostituti biologici che ripristinano, conservano e migliorano la funzione del tessuto”.

Galletti, Hellman e Nerem nel 1995 hanno elaborato la seguente definizione di ingegneria tissutale: “è la scienza fondamentale e lo sviluppo di sostituti biologici per l’impianto nel corpo o allevamento di tessuti con lo scopo di restituire, riparare, rigenerare, ricostruire o arricchire funzioni del tessuto”.

Si può notare come le ultime definizioni sopra riportate ripetano i concetti fondamentali esposti e contenuti nella prima definizione.

Ultimamente sono stati introdotti altri due termini, impropriamente usati come sinonimi di ingegneria tissutale, che sono: biologia riparativa e medicina rigenerativa, che pone maggiore enfasi sull’uso di cellule staminali per la produzione di tessuti.

Riassumendo è possibile affermare che l'ingegneria tissutale si occupa della progettazione e della produzione di tessuti, o parte di essi, dell'organismo umano. Tali tessuti forniscono un supplemento o una sostituzione della funzione di organi danneggiati o rimossi, oppure possono essere direttamente impiantati nell'organismo, o utilizzati in dispositivi extracorporei. La ricerca scientifica si sta evolvendo in questo settore con l'obiettivo ambizioso di realizzare in vitro interi organi. Attualmente, lo stato di avanzamento della tecnologia permette la realizzazione di tessuti impiantabili, come la pelle e la cartilagine, ma non di organi complessi [20].

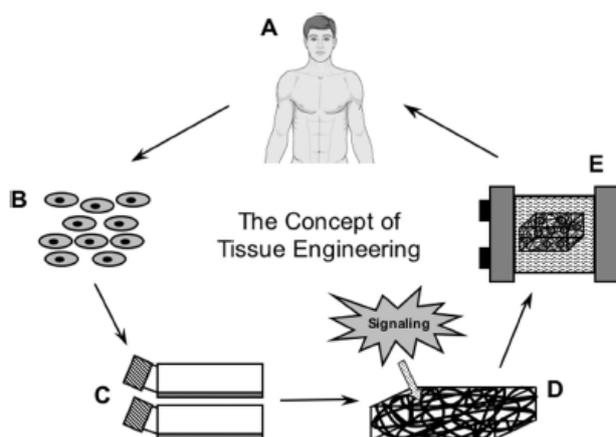
L'ingegneria tissutale cerca di fornire una nuova soluzione alla perdita di tessuti, che consiste nella sostituzione delle funzioni di tessuti e organi tramite una struttura contenente specifiche popolazioni di cellule viventi. A differenza dei tradizionali approcci per il trattamento della perdita di funzioni di tessuti e organi, l'ingegneria tissutale si prefigge l'obiettivo di realizzare tessuti viventi disegnati e costruiti per rispondere ai bisogni di ogni singolo paziente [1,2,3,4]. Infatti, le cellule possono essere isolate da un sito sano nel paziente, espanse in vitro e/o modificate tramite terapia genica e poi reimpiantate nel paziente nella posizione appropriata sotto opportune condizioni per ripristinare la funzione compromessa. Risulta, a questo punto, importante combinare le tecniche dell'ingegneria tissutale con gli strumenti della chirurgia minimamente invasiva, al fine di ottenere un elevato e moderno livello tecnologico nel trattamento di questo tipo di patologie [5,6].

Tre linee di ricerca principali sono state intraprese nella rigenerazione di tessuti: l'iniezione di cellule isolate, lo sviluppo di sistemi incapsulati (sistemi chiusi) e il trapianto di cellule in matrici (sistemi aperti).

L'iniezione isolata di cellule è stata esplorata prevalentemente a livello cardiaco, epatico e sottocutaneo [7-13]. La possibilità di trapiantare cellule staminali o cellule muscolo-scheletriche è stata esaminata ed è ancora oggetto di ricerca [14].

I sistemi chiusi prevedono l'incapsulamento di cellule all'interno di una membrana semipermeabile ed è stato sviluppato per proteggere le cellule dal sistema immunitario ospite. Questo approccio ha prodotto risultati interessanti viceversa nel trattamento di patologie quali il diabete e il morbo di Parkinson in studi sperimentali su modelli animali [15-16], ma sono gravati da un'alta percentuale di fallimento per incapsulamento da tessuto fibroso che conduce ad una ridotta diffusione dei prodotti del metabolismo e dei nutrienti e necrosi delle cellule impiantate.

Nei sistemi aperti le cellule sono coltivate all'interno di matrici polimeriche, proliferate e/o espanse in vitro e successivamente impiantate. Infine, quando il polimero si degrada, le cellule vengono incorporate all'interno del tessuto o dell'organo di impianto. Il polimero serve come struttura per guidare l'organizzazione e la crescita cellulare e permettere la diffusione di nutrienti alle cellule impiantate. Biomateriali come il collagene, il chitosano o l'alginato, o polimeri sintetici (come polimeri dell'acido glicolico) [18] possono essere usati come supporti strutturali per il trasporto cellulare (Figura 1) [19,20].



**Figura 1:** Il concetto di ingegneria tissutale. (A) Tessuto umano. (B) Cellule prelevate e isolate. (C) Cellule espanse in colture cellulari. (D) Cellule coltivate in scaffold di tessuto ingegnerizzato. (E) Costrutti cellulari mantenuti in bioreattori [21].

Le cellule target (differenziate o non differenziate) sono espanse in colture in vitro. Di solito sono coltivate in scaffold (naturali o sintetici) tridimensionali, realizzati con biomateriali altamente porosi, in condizioni biologicamente favorevoli. Dopo un periodo di coltura, lo scaffold cellulare, racchiuso all'interno di un impianto cellulare simile ad tessuto naturale, riceve stimoli chimici e fisici necessari per la crescita cellulare. Tali scaffold biologicamente funzionalizzati svolgono un ruolo critico nel processo di ingegneria tissutale, poiché provvedono a realizzare una struttura tridimensionale per le funzioni cellulari come l'attaccamento, la migrazione, la proliferazione e la differenziazione e/o servono come veicolo per il rilascio di cellule nel sito di impianto. Il successo di questo processo è determinato dalla similitudine biologica e funzionale tra il tessuto ingegnerizzato e il tessuto naturale da sostituire. Pertanto, l'obiettivo principale del design di scaffold per l'ingegneria tissutale è di creare una struttura che può simulare la matrice extra-cellulare originaria (ECM)

finché le cellule impiantate nello scaffold non sintetizzino una nuova matrice naturale.

Per raggiungere questo obiettivo, il materiale con cui si realizza lo scaffold deve essere attentamente selezionato e l'architettura del medesimo deve essere propriamente disegnata per assicurare biocompatibilità con le cellule impiantate [21].

### **Caratteristiche dello scaffold**

Le cellule vengono impiantate in strutture artificiali capaci di supportare formazioni di tessuto tridimensionali. Queste strutture, dette scaffold, assolvono i seguenti compiti:

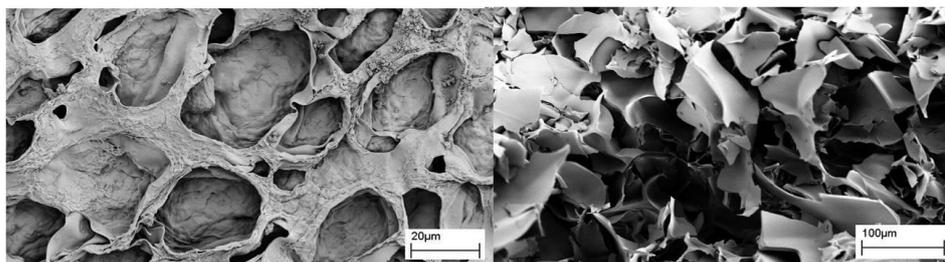
- permettere l'attaccamento e la migrazione delle cellule;
- rilasciare e trattenere cellule e fattori biochimici;
- abilitare la diffusione dei nutrienti vitali per le cellule;
- esercitare influenze meccaniche e biologiche per modificare il comportamento delle cellule;
- servire come barriera per prevenire l'infiltrazione dei tessuti circostanti che potrebbe impedire il processo di rigenerazione;
- essere biocompatibile e biodegradabile, con velocità di degradazione controllata che sia confrontabile con la crescita del tessuto nello scaffold.

Per raggiungere l'obiettivo della ricostruzione tissutale, lo scaffold deve avere alcuni requisiti specifici:

- Proprietà fisiche:
  - Elevata porosità.
  - Adeguata dimensione dei pori.

Sono necessarie per facilitare l'impianto delle cellule e la diffusione attraverso l'intera struttura di cellule e nutrienti.
  
- Proprietà chimiche:
  - Biodegradabilità: è un fattore essenziale perché lo scaffold deve essere assorbito dai tessuti circostanti senza necessità di essere rimosso tramite intervento chirurgico.
  - La velocità di degradazione deve coincidere con la velocità di formazione del tessuto: questo comporta che mentre le cellule stanno fabbricando una struttura a matrice naturale intorno a loro stesse, lo scaffold è in grado di provvedere alla sua integrità strutturale nel corpo. Nel momento in cui lo scaffold si romperà, lascerà il tessuto nuovo in grado di sopportare il carico meccanico.
  
- Proprietà meccaniche:
  - Forza e relative proprietà (per esempio resistenza all'usura).
  - Modulo di elasticità.

Per evidenziare la fondamentale importanza delle proprietà meccaniche e strutturali appena elencate, si riportano in figura 2 alcuni esempi di diverse strutture di scaffold.



**Figura 1** scaffold porosi per applicazioni di ingegneria tissutale .

Gli scaffold possono essere realizzati con diversi materiali: sintetici, naturali, biodegradabili e permanenti. Molti dei materiali che sono stati studiati per applicazioni dell'ingegneria tissutale sono già correntemente utilizzati nel settore medico per le suture biorassorbibili. In tabella 1 si riporta un elenco di materiali usati per la realizzazione di scaffold.

**Table 2.** Materials for scaffolds.

---

Collagen into which cells are cast or inserted	
Collagens modified by chemical cross-linking of the molecules	
Artificial molecularly engineered polypeptides	
Some polyaminoacids	
Hyaluronic acid and related compounds	
Agarode	
Alginates	
Poly-lactide fibre	} these four are biodegradable polymers
Poly-glycolide fibre	
Polydioxanone	
Polycaprolactone	
Polyvinyl alcohols (soluble slowly in body fluids)	
Non-degradable polymers such as polyethylene	
Silicones	
Hydroxyapatite (the bone mineral)	
Bioglasses, degradable or otherwise	
Metallic materials, usually titanium, some stainless steels	

---

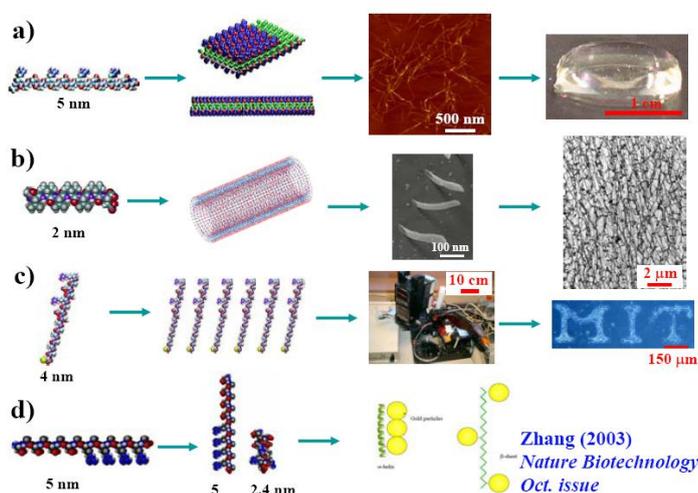
**Tabella 1** Materiali utilizzati per la realizzazione di scaffold [23]

Nuovi materiali sono al momento oggetto di analisi della ricerca scientifica per rispondere alle specifiche esigenze funzionali dell'applicazione e per ottenere materiali con proprietà ideali come iniettabilità, manifattura sintetica, biocompatibilità, non immunogenicità, trasparenza, fibre di dimensioni nanometriche.

Un materiale sintetico usato per la realizzazione di scaffold è il PLA (acido polilattico) che degrada all'interno del corpo umano formando acido lattico. Altri materiali correntemente utilizzati sono il PGA (acido poliglicolico) e il PCL (policaprolactone): il loro meccanismo di degradazione è simile a quello del PLA, ma mostrano rispettivamente una più veloce e una più lenta velocità di degradazione confrontata con quella del PLA.

Gli scaffold possono essere realizzati con materiali naturali. In particolare, diversi derivati della matrice extracellulare sono stati studiati per valutare la loro abilità di supportare la crescita cellulare. Sono risultati adatti in termini di compatibilità cellulare, ma presentano ancora problemi inerenti l'immunogenicità, i materiali proteici, come il collagene e la fibrina, e i materiali polisaccaridi come il chitosano o i glicosamminoglicani (GAG). Tra i GAG, l'acido ialuronico, possibilmente in combinazione con agenti di crosslinking, è uno dei possibili materiali da utilizzare per la realizzazione degli scaffold. [22]

Nella figura sottostante (Figura 3) sono illustrati differenti tipi di scaffold realizzati con materiali diversi con varie applicazioni.



**Figura 2** Realizzazione di diverse morfologie di scaffold con materiali diversi.[22]

Ad oggi, il chitosano rappresenta uno dei biopolimeri più promettenti per applicazioni di ingegneria tissutale e possibili applicazioni ortopediche. In particolare, la possibilità di generare strutture con diametro dei pori variabili e

biodegradabilità riproducibile fanno del chitosano un materiale candidabile quale graft in procedure ortopediche.

Ciononostante, ricerche adeguate con l'obiettivo di migliorare le proprietà meccaniche di biomateriali a base di chitosano risultano fondamentali per migliorarne le applicazioni.

Di grande importanza è anche la capacità del chitosano di legare molecole anioniche quali fattori di crescita, GAG e DNA per realizzare matrici per applicazioni di ingegneria tissutale in ortopedia [23].

## **Le cellule utilizzate per l'ingegneria tissutale**

L'ingegneria tissutale richiede l'uso di cellule viventi. Le tecnologie disponibili consentono di conservare e coltivare molti tipi di cellule al di fuori del corpo umano per periodi prolungati.

Sono riportate nella seguente tabella 2 le possibili fonti di cellule per applicazioni di ingegneria tissutale.

**Table 1.** Possible sources of cells.

---

Cells from the patient (autologous)
Used <i>in situ</i> migrating from nearby tissues
Directly extracted
Extracted and expanded in number (by growth outside the body)
Cloned (selected for some desired feature and expanded in number)
Genetically modified (involving cloning and expansion) after insertion or silencing of genes
Cells from another human (allogeneic)
Directly extracted
Extracted and expanded
Cloned
Genetically modified
Cells from another species (xenogeneic)

---

**Tabella 1** Possibili fonti di cellule per applicazioni di ingegneria tissutale [23]

Le cellule autologhe (ovvero le cellule estratte dal paziente) sembrano essere preferibili rispetto agli altri tipi di cellule, ma potrebbero essere malate o essere insufficienti per la ricostruzione del tessuto nei tempi desiderati. L'uso di tale tipo di cellule, non comporta problemi di tipo legale legati al loro utilizzo e non dovrebbero essere presenti problemi di reazioni immunitarie. Nonostante ciò, si pone il problema della senescenza cellulare e di quante divisioni cellulari potrebbero verificarsi. Inoltre, si dovrebbe avere la certezza dell'impossibilità di formazioni tumorali e di espressioni geniche non corrette. Finora si riteneva che la maggior parte dei tessuti adulti contenesse nessuna o poche cellule capaci di espansione efficace come le cellule normali. Tali cellule indifferenziate sono conosciute con il nome di cellule staminali, ed è possibile trovarle nell'embrione. Si riteneva che tali cellule, che hanno un considerevole potenziale per differenziazione e moltiplicazione, morissero, per maggior parte dei tessuti, durante lo sviluppo. Solo la pelle, gli altri epiteli e le cellule rinnovabili nel midollo osseo per globuli bianchi e rossi, sembravano essere popolazioni di cellule staminali che persistevano durante la vita. Negli ultimi anni sono state scoperte numerose popolazioni di cellule staminali in molti tessuti adulti ed anche tra le cellule nervose nei cervelli dei topi. Nonostante tutti questi vantaggi legati all'uso intrinseco di cellule staminali, rispetto all'utilizzo di altri tipi di cellule, si presenta il problema di riuscire a far crescere popolazioni cellulari, con cellule del paziente, in tempi rapidi, relativamente all'applicazione, per poterle poi reimpiantare nel paziente stesso.

Tutti le altre tipologie cellulari presentano problemi legati al donatore ed all'organismo ospite. L'ingegneria genetica, tramite l'aggiunta di espressioni geniche umane e la rimozione di espressioni geniche pericolose e indesiderate, potrebbe

rappresentare una possibilità per l'utilizzo di cellule allogeniche e di altri tipi, per le applicazioni dell'ingegneria tissutale sull'uomo. [23]

### **Obiettivo del lavoro**

Obiettivo del presente lavoro di tesi è la realizzazione di nuovi scaffold biocompatibili per le applicazioni di ingegneria tissutale dell'apparato locomotore. In particolare, si sono realizzati biomateriali a base di chitosano (capitolo1), puro o con idrossiapatite, tramite la tecnica dell'electrospinning (capitolo2) per ottimizzare le interazioni cellule-biomateriale (capitolo 3).

Il lavoro sperimentale (capitolo 4), oltre alla realizzazione dei biomateriali, è stato volto alla ottimizzazione del processo di produzione, alla loro completa caratterizzazione, ed alla valutazione delle prove di biocompatibilità su cellule staminali mesenchimali umane.

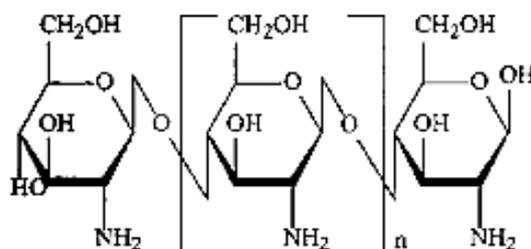
## **Bibliografia:**

- [1] T.E. Starzl, A.J Demertis, D. Van Thiel; Liver transplantation. N. Engl. J. Med. 1989; 321 pp.1014
- [2] R.J. Stratta, R.J. Taylor, J.S. Bynon, J.A. Lowell, R. Sindhi, T.O. Wahl, T.F. Knight, L.G. Weide, W.C. Duckworth; Surgical treatment of diabetes mellitus with pancreas transplantation. Ann. Surg.1994; 220 p. 809.
- [3] R. Langer, J.P. Vacanti; Tissue Engineering. Science 1993; 260 p. 920.
- [4] J.P. Vacanti, R.L. Langer; Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. Lancet 1999; 354 pp. 32.
- [5] D.W. Rattner; Beyond the laparoscope: minimally invasive surgery in the new millennium. Surgery 1999; 125 p. 19.
- [6] D.W. Rattner; Future directions in innovative minimally invasive surgery. Lancet 1999; 353(suppl 1) p.12.
- [7] M.N. Gould, W.F. Biel, K.H. Clifton; Morphological and quantitative studies of gland formation from inocula of monodispersed rat mammary cells. Exp. Cell Res. 1977; 107 p. 405.
- [8] S.Gupta, R. Johnstone, H. Darby, C. Selden, Y. Price, H.J. Hodgson; Transplanted isolated hepatocytes: effect of partial hepatectomy on proliferation of long-term syngeneic implants in rat spleen. Pathology 1987; 19 p. 28.
- [9] M. Mito, H. Ebata, M. Kusano, T. Onishi, T. Saito, S. Sakamoto; Morphology and function of isolated hepatocytes transplanted into rat spleen. Transplantation 1979; 28 p.499.
- [10] S.C. Strom, R.L. Jirtle, R.S. Jones, D.L. Novicki, M.R. Rosenberg, A. Novotny, G. Irons, J.R. McLain, G. Michalopoulos; Isolation, culture, and transplantation of human hepatocytes. J. Natl. Cancer Inst. 1982; 68 p. 771.
- [11] Matas, A.J., Sutherland, D.E.R., Steffes, M.W., Mauer, S.M., Sowe, A., Simmons, R.L., Najarian, J.S.: Hepatocellular transplantation for metabolic deficiencies: decrease of plasma bilirubin in Gunn rats. Science 192:892, 1976
- [12] J. Leor, M. Patterson, M.J. Quinones, L.H. Kedes, R.A. Kloner; Transplantation of fetal myocardial tissue into the infarcted myocardium of rat. A potential

- method for repair of infarcted myocardium? *Circulation* 1996; 94(Suppl.II) p. 332.
- [13] R-K. Li, Z-Q. Jia, R.D. Weisel, D.A. Mickle, A. Choi, T.M. Yau; Survival and function of bioengineered cardiac grafts. *Circulation* 1999; 100:II p. 63.
- [14] S. Makino, K. Fukuda, S. Miyoshi, F. Konishi, H. Kodama, J. Pan, M. Sano, T. Takahashi, S. Hori, H. Abe, J. Hata, A. Umezawa, S. Ogawa; Cardiomyocytes can be generated from bone marrow stromal cells in vitro. *J. Clin. Invest.* 1999; 103 p. 697.
- [15] A.M. Sun, G.M. O'Shea, M.F.A., Goosen; Injectable microencapsulated islet cells as a bioartificial pancreas. *Appl. Bioch. Biotech.* 1984 10 p. 87.
- [16] P. Aebischer, S.R. Winn, P.M., Galletti; Transplantation of neural tissue in polymer capsules. *Brain Res.* 1988; 448 p. 364.
- [17] J. Rozga, L. Podesta, E. LePage, E. Morsiani, A.D. Moscioni, A. Hoffman, L. Sher, F. Villamil, G. Woolf, M. McGrath; A bioartificial liver to treat severe acute liver failure. *Ann. Surg.* 1994; 219 p. 538.
- [18] J.P. Vacanti, M.A. Morse, W.M. Saltzman, A.J. Domb, A. Perez- Atayde, R. Langer; Selective cell transplantation using bioabsorbable artificial polymers as matrices. *J. Pediatr. Surg.* 1988; 23 p. 3.
- [19] S. Lalan, I. Pomerantseva, J.P. Vacanti; Tissue Engineering and Its Potential Impact on Surgery. *World J. Surg.* 2001; 25 pp. 1458–1466.
- [20] L. V. McIntire, H. P. Greisler, L. Griffith, P.C. Johnson, D.J. Mooney, M.Mrksich, N.L. Parenteau, D. Smith; *WTEC Panel Report on Tissue Engineering Research* (2002).
- [21] W.-J. Li, R.M. Shanti, R.S. Tuan *Nanotechnologies for the Life Sciences Vol. 9 Tissue, Cell and Organ Engineering.* 2006 Edited by Challa S. S. R. Kumar - capitolo terzo: Electrospinning Technology for Nanofibrous Scaffolds in Tissue Engineering.
- [22] M. Spector; Principles and Practice of Tissue Engineering, course organized by Harvard-Massachusetts Institute of Technology Division of Health Science and Technology.
- [23] Di Martino A, Sittiger M, Risbud MV. Chitosan: A versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. *Biomaterials* 26 (2005) 5983–5990.

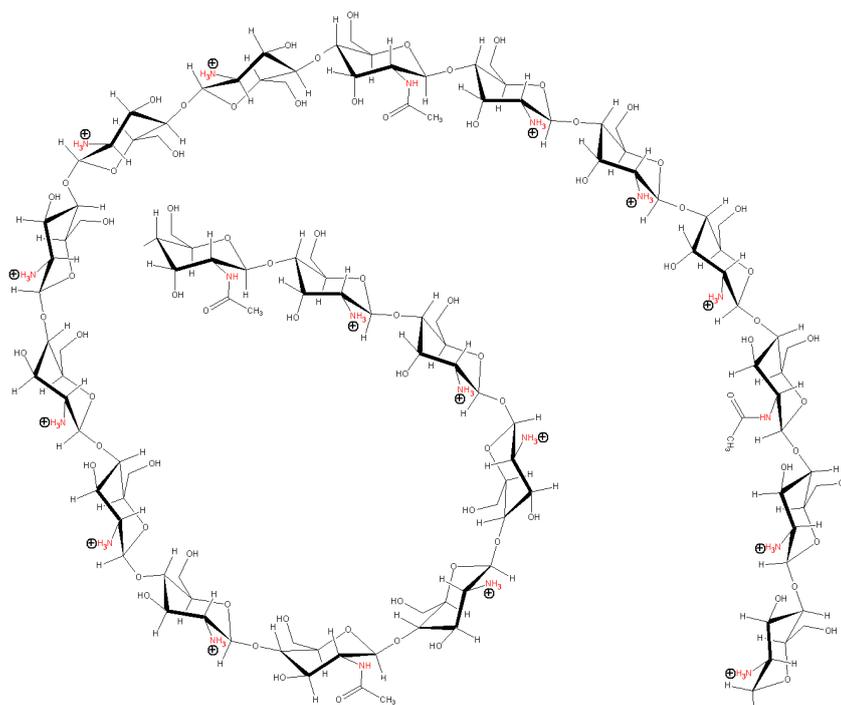
## Capitolo 1: Chitosano e sue applicazioni in ortopedia

Negli ultimi anni, la ricerca sui biomateriali è stata indirizzata verso lo sviluppo e la ottimizzazione di nuovi scaffold per la rigenerazione tissutale; fra i vari biomateriali, il Chitosano (CS), è stato oggetto di numerosi studi per potenziali applicazioni in ambito ortopedico [1]. Il CS è un derivato deacetilato della chitina, il secondo biopolimero ad alto peso molecolare più abbondante in natura, che si estrae comunemente dal guscio dei crostacei e dalla parete cellulare di funghi. Il CS è un polisaccaride lineare composto di glucosamina e N-acetil glucosamina connessi secondo un legame beta (1-4); il rapporto glucosamina/N-acetil glucosamina si intende come grado di deacetilazione del polimero.



**Schema 1:** Formula del chitosano

Sulla base della fonte di CS e dalla modalità di preparazione il suo peso molecolare varia da 300 ad oltre 1000kD, e da gradi di deacetilazione dal 30% al 95%. Nella sua forma cristallina, il CS è normalmente insolubile in acqua in soluzioni sopra pH 7; comunque, in acidi diluiti (pH 6.0), l'aminogruppo libero protonato sulla glucosamina rende più facile la solubilità della molecola [2-4].



**Schema 2.** Rappresentazione del carattere polielettrolita del chitosano a pH acidi, che ne aumenta la solubilità

La natura cationica del CS è primariamente responsabile per l'interazione elettrostatica con I glicosaminoglicani anionici (GAG), proteoglicani ed altre molecole cariche negativamente.

Questa caratteristica è di grande interesse per il gran numero di citochine e fattori di crescita che si lega ai GAG: pertanto, uno scaffold che incorpori CS e GAG può far aderire e concentrare fattori di crescita prodotti dalle cellule ospiti [4]. Inoltre, la presenza del gruppo N-acetilglucosamina sul CS suggerisce la possibilità di attività biochimiche correlate; infatti, gli oligosaccaridi di CS hanno un effetto di stimolo sui

macrofagi, e sia il CS che la chitina hanno proprietà chemioattrattive per i neutrofili sia in vitro che in vivo.

Il lisozima è l'enzima principalmente responsabile per la degradazione in vivo del CS, che avviene mediante idrolisi dei residui acetilati. La rapidità della degradazione inversamente proporzionale al grado di cristallinità e quindi di deacetilazione: le forme ad alto grado di deacetilazione possono rimanere in vivo per diversi mesi. I prodotti di degradazione sono oligosaccaridi di CS di varia lunghezza.

Mao et al. [5] hanno osservato come esista una correlazione diretta fra il grado di acetilazione del CS e l'adesività cellulare.

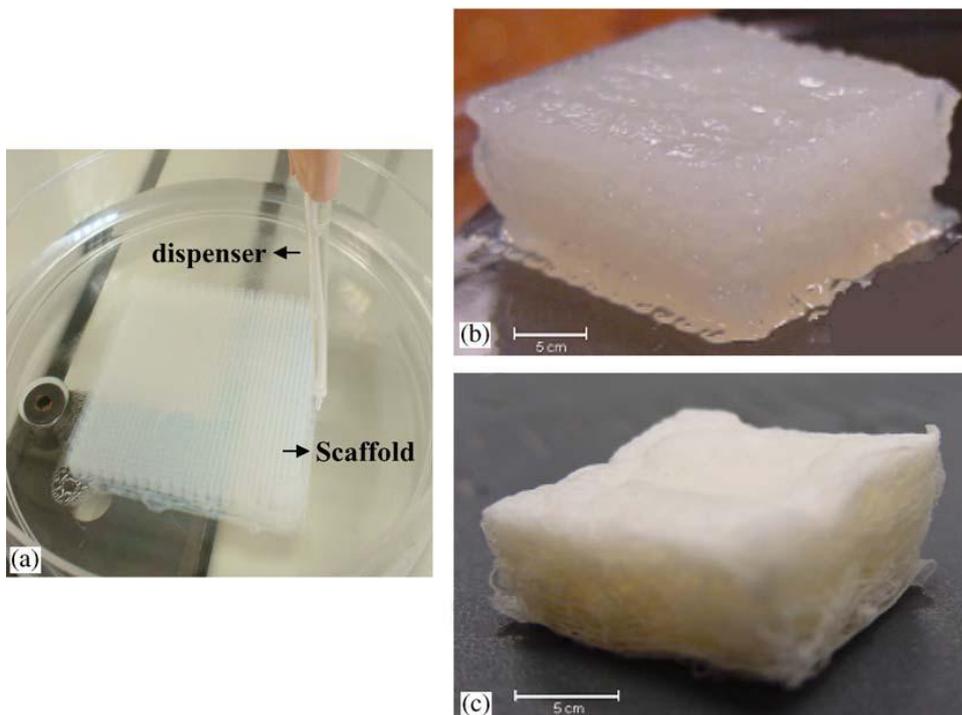
Diversi ricercatori hanno esaminato la risposta tissutale a scaffold a base di CS. In generale, questi biomateriali generano una minima reazione da corpo estraneo con incapsulazione fibrosa minima o assente [6]. La formazione di tessuto fisiologico di granulazione attorno agli impianti è solitamente associate ad angiogenesi accelerate, ed è tipica della risposta tissutale di riparazione tissutale. Questo effetto immunomodulante si pensa possa stimolare l'integrazione degli impianti nell'organismo ospite [7].

Una delle proprietà tipiche del CS è la sua capacità di essere modellato in varie forme [8], ed in strutture porose (tramite freezing e liofilizzazione) [9] o tramite processi quali l'"internal bubbling" (IBP) dove il  $\text{CaCO}_3$  viene aggiunto alla soluzione di CS per generare gel di CS- $\text{CaCO}_3$  [10]. La rimozione di ghiaccio tramite liofilizzazione genera un materiale poroso il cui diametro ed orientamento dei pori può essere controllato tramite variazione della velocità di freezing, dalla dimensione dei cristalli di ghiaccio e dalla geometria dei gradienti termici durante il freezing.

Il materiale ottenuto può essere modellato in membrane porose, blocchi, tubi e beads.

Come atteso, la dimensione dei pori ed il loro orientamento influenza le proprietà meccaniche degli scaffold di CS.

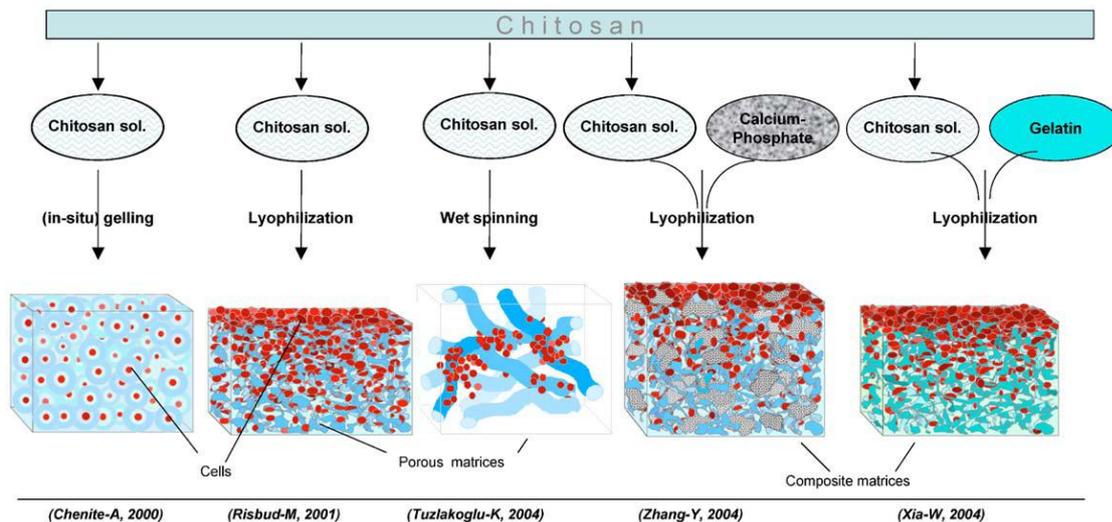
Geng et al. [11] hanno fabbricato scaffold porosi di CS usando un sistema di rapid prototyping (RP), che dispensa in maniera sequenziale soluzioni di idrossido di sodio e CS dissolto in acido acetico realizzando strisce di gel di CS (Figura. 1).



**Figura 1:** sistema di rapid prototyping (RP) per fabbricare scaffolds per applicazioni di ingegneria tissutale (a). Gli scaffold sono realizzati tramite dispensazione sequenziale di chitosano disciolto in acido acetico ed idrossido di sodio. La neutralizzazione dell'acido acetico da parte della soda fa precipitare strisce di gel di CS. CS scaffold a completa idratazione (b) e freeze dried (c)[67].

Un'altra interessante proprietà del CS è la sua attività antibatterica intrinseca. Studi hanno dimostrato che il CS può ridurre la frequenza di osteomieliti sostenute da *Stafilococco Aureo* indotte in ambiente sperimentale in conigli [12]. Sembra che il suo amino gruppo cationico si associ con gli anioni della parete batterica sopprimendone l'attività metabolica; inoltre, il CS inibisce il trasporto di massa attraverso la parete batterica provocando una morte del microrganismo [13]. Data questa capacità, il CS viene studiato come carrier per antibiotici [12, 14].

Il CS è stato coniugato con diversi biomateriali come alginato, idrossiapatite, acido ialuronico, calcio fosfato, PMMA, acido poli-L-lattico (PLLA), e con fattori di crescita per potenziali applicazioni ortopediche, soprattutto per ingegneria tissutale cellulo-mediata [8]. In particolare, le matrici di preparazione per le colture cellulari includono gel [15], spugne [16], o materiali composite di CS con ceramiche [17] o con altri materiali polimerici come collagene o gelatine [18,19] allo scopo di migliorarne la capacità di ospitare cellule ed il suo comportamento meccanico in vivo (Fig. 2).



**Figura. 2.** Tipologie di CS realizzate per applicazioni di ingegneria tissutale: le cellule possono essere incapsulate in gel o seminate su matrici porose come spugne o strutture fibrose. Le combinazioni del CS con altri biomateriali come il calcio fosfato o le gelatina modificano la biomeccanica del biomateriale e le interazioni cellula matrice. Le differenti formulazioni possono ottimizzare il differenziamento cellulare [67].

### CS in applicazioni di ingegneria tissutale per la cartilagine articolare

Gli scaffold tridimensionali rappresentano un importante strumento per applicazioni di ingegneria tissutale della cartilagine articolare. Le loro caratteristiche devono tentare di assomigliare sempre di più a quelle del tessuto ospite [3,20].

Il CS è stato utilizzato come scaffold in applicazioni di ingegneria tissutale della cartilagine articolare [7,21], soprattutto per la sua somiglianza strutturale con i GAG della cartilagine stessa: tale proprietà è di primaria importanza in quanto i GAG hanno un ruolo fondamentale nella modulazione della morfologia, del differenziamento e della funzione dei condrociti.

Il CS è stato inoltre utilizzato per migliorare le capacità biomimetiche di altri materiali quali l'alginato ed il PLLA, allo scopo di aumentare l'aderenza e la proliferazione cellulare in vitro, così come le proprietà meccaniche del biomateriale [19,21,22,23].

Il CS è stato anche coniugato con l'acido ialuronico per ottenere una matrice biomimetica per i condrociti, risultando in una matrice in aumentata adesione e proliferazione cellulare ed aumentata biosintesi di aggregano e collagene tipo II [24]. In maniera analoga, per aumentare l'adesività cellulare del CS, Hsu et al. hanno sviluppato complessi CS-alginato-ialuronato che hanno mostrato dopo semina di condrociti lo sviluppo di neocartilagine in vitro, e la potenzialità di riparazione parziale del difetto cartilagineo in vivo in modelli su coniglio [25].

Scaffold a base di CS possono rilasciare fattori di crescita in maniera controllata per promuovere l'*ingrowth* e la capacità sintetica dei condrociti. Lee et al. [26], hanno realizzato scaffold porosi composite con collagene/CS/GAG e funzionalizzati con TGF-Beta1. Questo scaffold permette un rilascio controllato del TGF-Beta1 e promuove la rigenerazione cartilaginea. Inoltre, l'aggiunta del CS allo scaffold di collagene ne migliora le proprietà meccaniche [26] e la stabilità del network di collagene tramite inibizione dell'azione delle collagenasi [27]. Kim et al. [28] hanno utilizzato uno scaffold poroso di CS realizzato con metodica *freeze-drying* e che incorpora microsfele con TGF- Beta1 per il trattamento dei difetti cartilaginei. Con tale biomateriale composito, il TGF-Beta1 viene rilasciato in maniera sostenuta, ottenendo un a proliferazione della proliferazione condrocitarie e della sintesi di matrice. Mattioli-Belmonte et al. [29] hanno studiato l'effetto delle BMP-7 associate al N,N-dicarbosimetil-CS sull'induzione della riparazione di lesioni cartilaginee

della cartilagine articolare del femore di conigli, supponendo un sinergismo dei rispettivi effetti biologici [29]. Infatti, la BMP-7 è in grado di stimolare la proliferazione in vivo dei condrociti, portando ad una riparazione parziale delle lesioni cartilaginee, mentre il CS porta ad un aumento di tessuto fibrovascolare (la fase iniziale del processo di ossificazione), e funge da carrier per la BMP-7.

Ipotizzando che il CS ed alcuni dei suoi prodotti di degradazione possano essere coinvolti nella sintesi di componenti della matrice articolare quali condroitina, condroitin-solfato, dermatan-solfato, keratan-solfato ed acido ialuronico, Lu et al. hanno studiato l'effetto dell'iniezione intrarticolare di CS sul processo rigenerativo della cartilagine. Lo studio ha mostrato un aumento della cartilagine epifisaria nelle articolazioni tibiale e femorale, parallelamente ad una attivazione della proliferazione condrocitaria. Contemporaneamente, dentro l'articolazione si osserva un tessuto fibrotico per le 6 settimane di durata dell'intervento, assieme a residui del CS iniettato [30].

### **CS in ingegneria tissutale del disco intervertebrale**

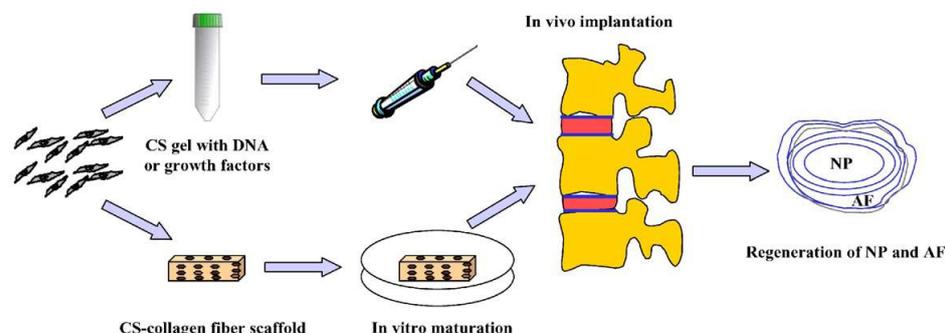
Le possibili applicazioni del CS alla ingegneria tissutale del rachide riguardano tre diversi aspetti, ed in particolare l'artrodesi spinale, la terapia genica, e la rigenerazione del nucleo polposo. Quando un sostituto osseo viene utilizzato in procedure di artrodesi vertebrale, diversi fattori biomeccanici sono da tenere in considerazione. In particolare, graft intersomatici anteriori saranno esposti ad elevate forze in compressione e devono possedere pertanto capacità di sostenere i carichi. Al contrario, graft da applicare posteriormente sono applicati lungo le linee di tensione della colonna vertebrale, non sono sottoposti a stimoli compressivi e pertanto sono

indipendenti da fattori biomeccanici [31]. Biomateriali quali il PLA o il PLA-PEG sono stati sperimentati in condizioni di artrodesi vertebrale, e sono tuttora considerate dei potenziali candidate per la loro plasticità, rigidità, biodegradabilità e capacità di ospitare cellule e rilasciare fattori di crescita come le BMP [32,33]. Una possibile applicazione del CS potrebbe essere nello sviluppo di materiali compositi a degradazione programmata e struttura macroporosa per permettere rilascio di fattori di crescita e supportare l'osteogenesi.

La terapia genica rappresenta un approccio innovativo per promuovere l'artrodesi spinale tramite transfer di cDNA dei geni osteoinduttivi nelle cellule target [34]. Vettori non virali utilizzano substrati fisicochimica per facilitare l'ingresso del materiale genetico all'interno delle cellule. Questo metodo di rilascio è vantaggioso perché è possibile veicolare grandi quantità di materiale genetico come geni di grosse dimensioni. Purtroppo, la efficacia della transfezione non virale è scarsa e la durata dell'espressione delle proteine ha durata ridotta in quanto i geni rimangono a livello episomico, questo problema potrebbe essere superato combinando materiale genetico con scaffold riassorbibili per realizzare una matrice gene-attivata (GAM). Lo scaffold funge da substrato per l'adesione cellulare e facilita il contatto del DNA nudo con le cellule target. Le GAM sono state già utilizzate per promuovere la guarigione di fratture in modelli sperimentali in roditori e cani [35,36]. Grazie alla sua abilità di legare il DNA [37,38] ed alla sua buona bioassorbibilità, il CS potrebbe essere la base per nuove matrici per la terapia genica non virale in procedure di artrodesi spinale.

I dischi intervertebrali posseggono diverse regioni anatomiche e funzionali: il nucleo polposo all'interno, gelatinoso e ricco di proteoglicani, circondato da un annulus

fibroso esterno con lamelle concentriche di fibre collagene. La perdita dei proteoglicani e del contenuto acquoso del nucleo polposo inizia la cascata degenerativa del disco. La rigenerazione di disco intervertebrale è considerata un approccio promettente per ripristinare la integrità biologica del disco intervertebrale [39,40]. Diverse strategie potrebbero essere utilizzate per diversi stadi di degenerazione dei disco intervertebrale tramite rilascio di fattori di crescita e/o farmaci o transfer di materiale genetico [41]. Gel di CS sono stati utilizzati come scaffold per cellule del nucleo polposo, e fattori di crescita sono stati utilizzati per modulare la sintesi di matrice in maniera da produrre un tessuto simile al nucleo polposo. Comunque, in uno studio in vitro, la formazione di tessuto di nucleo polposo non è sembrato facilitato dall'utilizzo di scaffold tridimensionali; nonostante le cellule del nucleo polposo impiantate su gel di CS abbiano prodotto aggregato, piccoli proteoglicani e collagene tipo I e II, la ritenzione di molecole di matrice nello scaffold è stata bassa, con attività sintetica non superiore al 35% rispetto al tessuto proveniente da nucleo polposo di controllo. Ciononostante, i gel di CS sono risultati comunque superiori rispetto ad altri scaffold quali acido ialuronico o collagene, con mantenimento di un fenotipo stabile ed un aumento dell'attività biosintetica, espressione della possibilità di future applicazioni di questa tecnica in futuro [42]. Una ulteriore possibilità è di complessare il CS che è cationico al DN per formare nanoparticelle che possano essere transfettate nel nucleo delle cellule del nucleo polposo per promuovere il differenziamento cellulare e la sintesi di matrice in studi sia in vivo che in vitro (Figura. 3).



**Figura 3.** Schema di possibili applicazioni del CS In ingegneria tissutale a livello spinale. La formulazione di CS può contenere fattori di crescita per rilascio controllato di fattori di crescita o legarsi al DNA per terapia genica. Le cellule (del nucleo polposo o cellule staminali mesenchimali dell'adulto) possono essere disperse in una soluzione di CS (regolata per essere termosensibile e divenire gel a 37°) che sia stata complessata con DNA plasmidico (geni per fattori di crescita) o contenere già fattori di crescita. Questa soluzione può essere iniettata a livello discale tramite un ago sottile. In alternativa, il CS potrebbe essere accoppiato con collagene per realizzare uno scaffold fibroso. Le cellule vengono seminate sullo scaffold e maturano in vitro, successivamente, si effettua impianto in vivo per riparazione del disco o dell'anello fibroso [67].

### CS in ingegneria tissutale ossea

Il CS è stato utilizzato in diverse applicazioni di ingegneria tissutale ossea da quando è stato dimostrato che è in grado di promuovere la crescita e la deposizione di matrice minerale di osteoblasti in coltura [43]. Inoltre, il CS è biocompatibile, biodegradabile, e può essere modellato in strutture porose per promuovere l'osteoconduzione [44]. Diversi studi si sono focalizzati sull'utilizzo di biomateriali compositi di CS–calcio fosfato (CP) [45,46]. Zang ha realizzato una bioceramica tridimensionale macroporosa di CP riempita di spugne di CS [47]. In questo scaffold, le spugne di CS hanno migliorato la capacità meccanica della fase ceramica rinforzando la matrice e la preservazione del fenotipo osteoblastico [48].

Similarmente, sono stati realizzati anche scaffold macroporosi di CS coniugati con gentamicina e rinforzati con beta-tricalcio fosfato (B-TCP) + CP per ingegneria tissutale ossea [46], e scaffold macroporosi con biovetri di idrossiapatite (HA) o CP con porosità interconnessa di circa 100 micrometri [48]. In generale, i biomateriali compositi di CS-CP sembrano avere promettenti applicazioni cliniche nel prossimo futuro, viste anche le loro interessanti proprietà meccaniche [51,52].

Ge et al. [49] hanno realizzato un biomateriale a base di HA-chitina che ha mostrato capacità osteoinduttive, una rapida degradazione e neovascolarizzazione in vivo in un periodo di 3 mesi.

Anche Kawakami et al. hanno studiato l' effetto in vivo di una pasta di CS-HA applicata sulla superficie tibiale dopo deperiostazione [50]. Hu et al. [8] hanno studiato la resistenza meccanica di biomateriali composite a base di CS-HA con elevato resistenza e modulo di bending, che rendono questi materiali applicabili alle applicazioni di fissazione interna delle ossa lunghe

Il CS è stato anche utilizzato come adiuvante dei cementi ossei per migliorarne l'iniettabilità mentre vengono mantenute le proprietà chimico-fisiche che lo rendono adeguato all'uso chirurgico [52, 53].

Wang et al. hanno aggiunto CS fosforilato al CP-cement e l'hanno utilizzato per riempire difetti ossei a livello di difetti ossei a livello del radio e della tibia in vivo; il biomateriale ha dimostrato di essere biocompatibile, osteoinduttivo, biorassorbibile e rimodellato tramite creeping substitution [54]. Xu et al. hanno studiato la fattibilità di realizzare macropori nel CP-cement utilizzando CS ed una mesh riassorbibile, osservando un effetto sinergico fra i due. Questo biomateriale iniettabile presenta macropori interconnessi e conferisce resistenza all'impianto durante la rigenerazione

del tessuto [55]. Il legame ad idrogeno intramolecolare del CS conferisce una buona resistenza al calore, ed infatti biomateriali composti di CS e PMMA presentano una ridotta reazione esotermica ad indurimento [56]. Il biomateriale composito presenta una interconnessione e misura di pori adeguata per osteoconduzione ed ancoraggio con i tessuti adiacenti [56].

La capacità del CS di legarsi ai fattori di crescita e rilasciarli in maniera controllata lo rende adeguato per applicazioni di ingegneria tissutale ossea [57–59].

La natura cationica del Cs può essere aumentata ancora dell'introduzione di un legame covalente con un gruppo imidazolo, biomateriale che ha mostrato la capacità di promuovere la mineralizzazione, indurre la formazione di osso e riempire difetti ossei critici con la deposizione di nuovo osso trasecolare [60].

Utilizzato in difetti nella teca cranica di ratti, spugne di CS con PDGF hanno stimolato la formazione di nuovo osso [57,61]. Kim et al. hanno studiato l'effetto del CS sulla consolidazione ossea precoce per valutare l'osteogenesi dopo distrazione mandibolare in un modello canino, ed in questo studio i biomateriali a base di CS hanno promosso il recruitment e l'adesione di progenitori osteogenici, facilitando la deposizione di nuovo osso [62,63].

Il CS è stato anche utilizzato per modificare le proprietà di superficie di materiali protesici per migliorare l'adesione di osteoblasti [58]. Superfici di Titanio (Ti) rivestite con CS hanno mostrato un aumento dell'adesione e la proliferazione di osteoblasti [64]. La forza del legame del rivestimento di CS con Ti era nel range di 1.5–1.8MPa, diminuendo progressivamente nelle successive 8 settimane. Questi risultati hanno supportato l'ipotesi che rivestimenti di CS possano promuovere l'osteointegrazione di impianti di Ti solitamente utilizzati in chirurgia ortopedica e

maxillofaciale [64,65]. Wang et al. hanno usato CS per aumentare la biocompatibilità di rivestimenti di apatite elettrodepositata su lega di Ti. È stato pertanto realizzato un rivestimento ibrido di calcio fosfato/CS realizzato tramite elettrodeposizione, rivestimento che ha mostrato una buona adesione delle cellule midollari stromali [66].

### **Bibliografia:**

- [1] Khor E, Lim LY. Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials* 2003;24:2339–49.
- [2] Dornish M, Kaplan D, Skaugrud O. Standards and guidelines for biopolymers in tissue-engineered medical products. *Ann N Y Acad Sci* 2001;944:388–97.
- [3] Athanasiou KA, Shah AR, Hernandez RJ, LeBaron RG. Basic science of articular cartilage repair. *Clin Sports Med* 2001;20: 223–47.
- [4] Madhally SV, Matthew HWT. Porous chitosan scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* 1999;20:1133–42.
- [5] Mao JS, Cui YL, Wang XH, Sun Y, Yin YJ, Zhao HM, De Yao K. A preliminary study on chitosan and gelatin polyelectrolyte complex cytocompatibility by cell cycle and apoptosis analysis. *Biomaterials* 2004;25:3973–81.
- [6] VandeVord PJ, Matthew HW, DeSilva SP, Mayton L, Wu B, Wooley PH. Evaluation of the biocompatibility of a chitosan scaffold in mice. *J Biomed Mater Res* 2002;59:585–90.
- [7] Suh JKF, Matthew HWT. Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. *Biomaterials* 2000;21:2589–98.
- [8] Hu Q, Li B, Wang M, Shen J. Preparation and characterization of biodegradable chitosan/hydroxyapatite nanocomposite rods via in situ hybridization: a potential material as internal fixation of bone fracture. *Biomaterials* 2004;25:779–85.
- [9] Risbud MV, Bhone RR. Polyacrylamide-chitosan hydrogels: in vitro biocompatibility and sustained antibiotic release studies. *Drug Deliv* 2000;7:69–75.

[10] Chow KS, Khor E. Novel fabrication of open-pore chitin matrixes. *Biomacromolecules* 2000;1:61–7.

[11] Geng L, Feng W, Hutmacher DW, Wong Y, Loh H, Fuh JYH. Direct writing of chitosan scaffolds using a robotic system. *Rapid Prototyping J* 2005;11:90–7.

[12] Aimin C, Chunlin H, Juliang B, Tinyin Z, Zhichao D. Antibiotic loaded chitosan bar. An in vitro, in vivo study of a possible treatment for osteomyelitis. *Clin Orthop* 1999;366:239–47.

[13] Hu SG, Jou CH, Yang MC. Protein adsorption, fibroblast activity and antibacterial properties of poly(3-hydroxybutyric acid-co-3-hydroxyvaleric acid) grafted with chitosan and chitoooligosaccharide after immobilized with hyaluronic acid. *Biomaterials* 2003;24:2685–93.

[14] Buranapanitkit B, Srinilta V, Ingvinga N, Oungbho K, Geater A, Ovatlarnporn C. The efficacy of a hydroxyapatite composite as a biodegradable antibiotic delivery system. *Clin Orthop* 2004; 424:244–52.

[15] Chenite A, Chaput C, Wang D, Combes C, Buschmann MD, Hoemann CD, Leroux JC, Atkinson BL, Binette F, Selmani A. Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ. *Biomaterials* 2000;21:2155–61.

[16] Tuzlakoglu K, Alves CM, Mano JF, Reis RL. Production and characterization of chitosan fibers and 3-D fiber mesh scaffolds for tissue engineering applications. *Macromol Biosci* 2004;4: 811–9.

[17] Zhang Y, Zhang M. Cell growth and function on calcium phosphate reinforced chitosan scaffolds. *J Mater Sci Mater Med* 2004;15:255–60.

[18] Xia W, Liu W, Cui L, Liu Y, Zhong W, Liu D, Wu J, Chua K, Cao Y. Tissue engineering of cartilage with the use of chitosan–gelatin complex scaffolds. *J Biomed Mater Res* 2004; 71B:373–80.

[19] Risbud M, Ringe J, Bhande R, Sitterling M. In vitro expression of cartilage-specific markers by chondrocytes on a biocompatible hydrogel: implications for engineering cartilage tissue. *Cell Transplant* 2001;10:755–63.

[20] Sitterling M, Huttmacher DW, Risbud MV. Current strategies for cell delivery in cartilage and bone regeneration. *Curr Opin Biotechnol* 2004;15:411–8.

[21] Lahiji A, Sohrabi A, Hungerford DS, Frondoza CG, Lahiji A, Sohrabi A, Hungerford DS, Frondoza CG. *J Biomed Mater Res* 2000;51(4):586–95; Hsu SH, Whu SW, Hsieh SC, Tsai CL, Chen DC, Tan TS.

Evaluation of chitosan–alginate–hyaluronate complexes modified by an RGD-containing protein as tissue-engineering scaffolds for cartilage regeneration. *Artif Org* 2004;28:693–703.

[22] Iwasaki N, Yamane ST, Majima T, Kasahara Y, Minami A, Harada K, Nonaka S, Maekawa N, Tamura H, Tokura S, Shiono M, Monde K, Nishimura S. Feasibility of polysaccharide hybrid materials for scaffolds in cartilage tissue engineering: evaluation of chondrocyte adhesion to polyion complex fibers prepared from alginate and chitosan. *Biomacromolecules* 2004;5:828–33.

[23] Cui YL, Qi AD, Liu WG, Wang XH, Wang H, Ma DM, Yao KD. Biomimetic surface modification of poly(L-lactic acid) with chitosan and its effects on articular chondrocytes in vitro. *Biomaterials* 2003;24:3859–68.

[24] Yamane S, Iwasaki N, Majima T, Funakoshi T, Masuko T, Harada K, Minami A, Monde K, Nishimura S. Feasibility of chitosan-based hyaluronic acid hybrid biomaterial for a novel scaffold in cartilage tissue engineering. *Biomaterials* 2005;26: 611–9.

[25] Hsu SH, Whu SW, Hsieh SC, Tsai CL, Chen DC, Tan TS. Evaluation of chitosan–alginate–hyaluronate complexes modified by an RGD-containing protein as tissue-engineering scaffolds for cartilage regeneration. *Artif Organs* 2004;28:693–703.

[26] Lee JE, Kim KE, Kwon IC, Ahn HJ, Lee SH, Cho H, Kim HJ, Seong SC, Lee MC. Effects of the controlled-released TGF-beta 1 from chitosan microspheres on chondrocytes cultured in a collagen/chitosan/glycosaminoglycan scaffold. *Biomaterials* 2004; 25:4163–73.

[27] Tarek MN, Domard A. Collagen and its interactions with chitosan, III some biological and mechanical properties. *Biomaterials* 1996;17:451–5.

[28] Kim SE, Park JH, Cho YW, Chung H, Jeong SY, Lee EB, Kwon IC. Porous chitosan scaffold containing microspheres loaded with transforming growth factor-beta1: implications for cartilage tissue engineering. *J Control Release* 2003;91:365–74.

[29] Mattioli-Belmonte M, Gigante A, Muzzarelli RA, Politano R, De Benedittis A, Specchia N, Buffa A, Biagini G, Greco F. N,N-dicarboxymethyl chitosan as delivery agent for bone morphogenetic protein in the repair of articular cartilage. *Med Biol Eng Comput* 1999;37:130–4.

[30] Lu JX, Prudhommeaux F, Meunier A, Sedel L, Guillemin G. Effects of chitosan on rat knee cartilages. *Biomaterials* 1999;20: 1937–44.

- [31] Boden SD. Overview of the biology of lumbar spine fusion and principles for selecting a bone graft substitute. *Spine* 2002; 27(Suppl 16):S26–31.
- [32] Saito N, Takaoka K. New synthetic biodegradable polymers as BMP carriers for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2003;24: 2287–93.
- [33] Alden TD, Varady P, Kallmes DF, Jane Jr JA, Helm GA. Bone morphogenetic protein gene therapy. *Spine* 2002;27(Suppl 16): S87–93.
- [34] Yoon ST, Boden SD. Spine fusion by gene therapy. *Gene Ther* 2004;11(4):360–7.
- [35] Bonadio J. Tissue engineering via local gene delivery: update and future prospects for enhancing the technology. *Adv Drug Deliv Rev* 2000;44:185–94.
- [36] Cha CW, Boden SD. Gene therapy applications for spine fusion. *Spine* 2003;28(Suppl 15):S74–84.
- [37] Lee KY, Kwon IC, Kim YH, Jo WH, Jeong SY. Preparation of chitosan self-aggregates as a gene delivery system. *J Control Release* 1998;51:213–20.
- [38] Koping-Hoggard M, Varum KM, Issa M, Danielsen S, Christensen BE, Stokke BT, Artursson P. Improved chitosanmediated gene delivery based on easily dissociated chitosan polyplexes of highly defined chitosan oligomers. *Gene Ther* 2004; 11:1441–52.
- [39] Gan JC, Ducheyne P, Vresilovic EJ, Swaim W, Shapiro IM. Intervertebral disc tissue engineering I: characterization of the nucleus pulposus. *Clin Orthop* 2003;411:305–14.
- [40] Yung Lee J, Hall R, Pelinkovic D, Cassinelli E, Usas A, Gilbertson L, Huard J, Kang J. New use of a three-dimensional pellet culture system for human

intervertebral disc cells: initial characterization and potential use for tissue engineering. *Spine* 2001;26:2316–22.

[41] An HS, Thonar EJ, Masuda K. Biological repair of intervertebral disc. *Spine* 2003;28(Suppl 15):S86–92.

[42] Alini M, Roughley PJ, Antoniou J, Stoll T, Aebi M. A biological approach to treating disc degeneration: not for today, but maybe for tomorrow. *Eur Spine J* 2002;11(Suppl 2):S215–20.

[43] Seol YJ, Lee JY, Park YJ, Lee YM, Young-Ku, Rhyu IC, Lee SJ, Han SB, Chung CP. Chitosan sponges as tissue engineering scaffolds for bone formation. *Biotechnol Lett* 2004;26:1037–41.

[44] Seeherman H, Li R, Wozney J. A review of preclinical program development for evaluating injectable carriers for osteogenic factors. *J Bone Jt Surg Am* 2003;85A(Suppl 3):96–108.

[45] Zhang Y, Zhang M. Synthesis and characterization of macroporous chitosan/calcium phosphate composite scaffolds for tissue engineering. *J Biomed Mater Res* 2001;55:304–12.

[46] Zhang Y, Zhang M. Calcium phosphate/chitosan composite scaffolds for controlled in vitro antibiotic drug release. *J Biomed Mater Res* 2002;62:378–86.

[47] Zhang Y, Zhang M. Three-dimensional macroporous calcium phosphate bioceramics with nested chitosan sponges for loadbearing bone implants. *J Biomed Mater Res* 2002;61:1–8.

[48] Zhang Y, Ni M, Zhang M, Ratner B. Calcium phosphate/chitosan composite scaffolds for bone tissue engineering. *Tissue Eng* 2003;9:337–45.

- [49] Ge Z, Baguenard S, Lim LY, Wee A, Khor E. Hydroxyapatite-chitin materials as potential tissue engineered bone substitutes. *Biomaterials* 2004;25:1049–58.
- [50] Kawakami T, Antoh M, Hasegawa H, Yamagishi T, Ito M, Eda S. Experimental study on osteoconductive properties of a chitosan-bonded hydroxyapatite self-hardening paste. *Biomaterials* 1992;13:759–63.
- [51] Yin Y, Ye F, Cui J, Zhang F, Li X, Yao K. Preparation and characterization of macroporous chitosan-gelatin/beta-tricalcium phosphate composite scaffolds for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res* 2003;67A:844–55.
- [52] Leroux L, Hatim Z, Freche M, Lacout JL. Effects of various adjuvants (lactic acid, glycerol, and chitosan) on the injectability of a calcium phosphate cement. *Bone* 1999;25(Suppl 2):31S–4S.
- [53] Gutowska A, Jeong B, Jasionowski M. Injectable gels for tissue engineering. *Anat Rec* 2001;263:342–9.
- [54] Wang X, Ma J, Wang Y, He B. Bone repair in radii and tibiae of rabbits with phosphorylated chitosan reinforced calcium phosphate cements. *Biomaterials* 2002;23:4167–76.
- [55] Xu HH, Quinn JB, Takagi S, Chow LC. Synergistic reinforcement of in situ hardening calcium phosphate composite scaffold for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2004;25:1029–37.
- [56] Kim SB, Kim YJ, Yoon TL, Park SA, Cho IH, Kim EJ, Kim IA, Shin JW. The characteristics of a hydroxyapatite–chitosan–PMMA bone cement. *Biomaterials* 2004;25:5715–23.

[57] Park YJ, Lee YM, Park SN, Sheen SY, Chung CP, Lee SJ. Platelet derived growth factor releasing chitosan sponge for periodontal bone regeneration. *Biomaterials* 2000;21:153–9.

[58] Lee JY, Nam SH, Im SY, Park YJ, Lee YM, Seol YJ, Chung CP, Lee SJ. Enhanced bone formation by controlled growth factor delivery from chitosan-based biomaterials. *J Control Release* 2002;78:187–97.

[59] Lee YM, Park YJ, Lee SJ, Ku Y, Han SB, Choi SM, Klokkevold PR, Chung CP. Tissue engineered bone formation using chitosan/tricalcium phosphate sponges. *J Periodontol* 2000;71:410–7.

[60] Muzzarelli RA, Mattioli-Belmonte M, Tietz C, Biagini R, Ferioli G, Brunelli MA, Fini M, Giardino R, Ilari P, Biagini G. Stimulatory effect on bone formation exerted by a modified chitosan. *Biomaterials* 1994;15:1075–81.

[61] Lee YM, Park YJ, Lee SJ, Ku Y, Han SB, Klokkevold PR, Chung CP. The bone regenerative effect of platelet-derived growth factor-BB delivered with a chitosan/tricalcium phosphate sponge carrier. *J Periodontol* 2000;71:418–24.

[62] Kim IS, Park JW, Kwon IC, Baik BS, Cho BC. Role of BMP, betaig-h3, and chitosan in early bony consolidation in distraction osteogenesis in a dog model. *Plast Reconstr Surg* 2002;109: 1966–77.

[63] Cho BC, Park JW, Baik BS, Kwon IC, Kim IS. The role of hyaluronic acid, chitosan, and calcium sulfate and their combined effect on early bony consolidation in distraction osteogenesis of a canine model. *J Craniofac Surg* 2002;13:783–93.

[64] Bumgardner JD, Wiser R, Gerard PD, Bergin P, Chestnutt B, Marin M, Ramsey V, Elder SH, Gilbert JA. Chitosan: potential use as a bioactive coating for orthopaedic and craniofacial/dental implants. *J Biomater Sci Polym Ed* 2003;14:423–38.

[65] Bumgardner JD, Wiser R, Elder SH, Jouett R, Yang Y, Ong JL. Contact angle, protein adsorption and osteoblast precursor cell attachment to chitosan coatings bonded to titanium. *J Biomater Sci Polym Ed* 2003;14:1401–9.

[66] Wang J, de Boer J, de Groot K. Preparation and characterization of electrodeposited calcium phosphate/chitosan coating on Ti6Al4V plates. *J Dent Res* 2004;83:296–301.

[67] Di Martino A, Sittinger M, Risbud MV. Chitosan: A versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. *Biomaterials* 2005;26: 5983–5990.

## Capitolo 2: l' Electrospinning o Elettrofilatura

L'electrospinning (o elettrofilatura) è ad oggi l'unica tecnica che permette la fabbricazione di fibre continue con diametri dell'ordine di pochi nanometri ( $10^{-9}$  m). Infatti, mediante i metodi tradizionali (come per esempio la filatura a secco e la filatura ad umido) si possono ottenere fibre con diametri compresi tra 5 e 500  $\mu\text{m}$  ( $10^{-6}$  m). L'electrospinning può essere applicato a polimeri naturali e sintetici, leghe polimeriche e polimeri caricati con nanoparticelle o agenti attivi. Inoltre, tramite particolari setup di electrospinning, si possono produrre fibre con architetture complesse come core-shell fibers o fibre cave.

I metodi tradizionali utilizzano forze meccaniche per produrre il filato estrudendo polimeri fusi o in soluzione che vengono in seguito stirati per ottenere le proprietà meccaniche e chimico-fisiche desiderate. L'electrospinning si differenzia da questi metodi poiché produce fibre polimeriche tramite l'applicazione di un forte campo elettrico sul fluido polimerico, permettendo così la formazione di un getto di tale fluido [1].

Negli ultimi anni, la tecnologia dell'electrospinning si è diffusa grazie alla fabbricazione di scaffold per l'ingegneria tissutale. Tale risultato è dovuto al crescente interesse per le nanotecnologie e le proprietà uniche, nonché alla relativa facilità di fabbricazione di scaffold mediante l'utilizzo di questo processo. Gli scaffold realizzati mediante l'elettrofilatura hanno un aspetto e una struttura diversi da quelli realizzati con le altre tecniche (come self-assembly e separazione di fase). La tecnologia dell'elettrofilatura risulta utile per la fabbricazione di scaffold per

applicazioni di ingegneria tissutale, non solo perché la strumentazione che costituisce il setup è discretamente economica, ma anche perché le fasi di preparazione e fabbricazione sono relativamente veloci se paragonate alle altre tecniche di realizzazione di scaffold. Inoltre, il setup dell'electrospinning è facile da realizzare e può essere modificato per realizzare scaffold di nanofibre che rispondano a specifiche proprietà strutturali e meccaniche. I vantaggi che presenta tale tecnica la rendono adatta sia alla produzione di piccole quantità per scopi di ricerca, sia alla produzione di massa per usi industriali.

Concludendo, si è osservato che, in termini di proprietà degli scaffold prodotti con metodi diversi, gli scaffold prodotti mediante electrospinning contengono pori interconnessi e possiedono stabilità meccanica e strutturale, presentando, così, caratteristiche superiori rispetto agli scaffold realizzati mediante altre tecniche (come separazione di fase e self-assembly).[2]

### **Le microfibre e le nanofibre**

Le nanotecnologie sono l'insieme degli strumenti teorici e tecnologici che consentono la progettazione, la fabbricazione e l'applicazione di nanostrutture e nanomateriali al fine di sfruttare, a fini pratici, le conoscenze sulle relazioni tra le proprietà fisiche e chimiche e le dimensioni su scala nanometrica.[3]

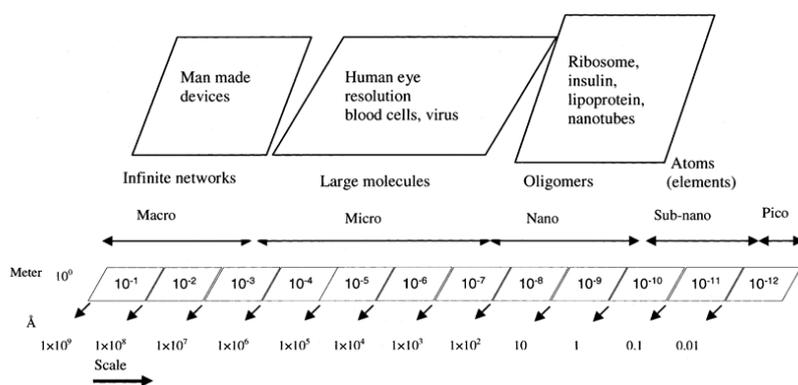
Le nanostrutture sono quelle strutture in cui almeno una delle loro dimensioni è dell'ordine dei nanometri. Tali strutture sono classificabili in [4]:

- Strutture zero-dimensionali: nanoparticelle;
- Strutture monodimensionali: nanofibre e nanotubi;
- Strutture bidimensionali: film sottili.

Quando il diametro delle fibre polimeriche si riduce dai micrometri ai nanometri, si evidenziano nuove caratteristiche:

- Elevato rapporto tra area superficiale e volume (tale rapporto per le nanofibre è incrementato di tre ordini di grandezza).
- Flessibilità nelle funzionalità superficiali.
- Migliori proprietà meccaniche rispetto alle altre forme conosciute di materiali [5].

Le dimensioni nanometriche sono molto rilevanti per i sistemi biologici, perché in tale range sono comprese le dimensioni di proteine, virus e batteri. Nella figura 1 è possibile confrontare i diametri delle nanofibre realizzate con la tecnica dell'electrospinning con i diametri di alcuni elementi biologici. [1]



**Figura 1** Confronto tra i diametri delle nanofibre con quelli di alcuni componenti biologiche [6]

Secondo la National Science Foundation (NSF), i nanomateriali si caratterizzano per avere una dimensione uguale o minore di 100 nm. Materiali con struttura costituita

da fibre in scala nanometrica sono i “building block” di un sistema vivente. Si riportano, come esempio, la doppia elica della molecola di DNA di 1.5 nm, la struttura del citoscheletro con fibre di diametro di 30 nm, la matrice extracellulare. Analogamente alle strutture naturali, le nanofibre polimeriche possono essere considerate “building block” per la realizzazione di nuovi dispositivi e strutture per sistemi di rilascio controllato di farmaci, scaffold per l'ingegneria tissutale ed altre applicazioni. [7]

Le nanofibre polimeriche possono essere realizzate mediante diverse tecniche [4]:

- Drawing;
- Sintesi mediante stampo;
- Separazione di fase;
- Self assembly;
- Electrospinning.

### **Electrospinning**

L'electrospinning è stato sviluppato partendo da osservazioni basate sul fenomeno dell' “electrospray”, descritto per la prima volta da Rayleigh nel 1882. Rayleigh scoprì che una goccia altamente caricata era instabile e poteva dividersi in goccioline più piccole dopo aver attraversato un gradiente di tensione. Tale proprietà è nota con il nome di “instabilità di Rayleigh”. Rayleigh propose che la rottura della tensione superficiale della goccia era il risultato delle forze generate attraverso la repulsione di carica (dovuta alle forze di Coulomb).

L'electrospinning è la diretta estensione del fenomeno di electrospray. Infatti, entrambi i fenomeni sono basati sugli stessi meccanismi fisici ed elettrici. La

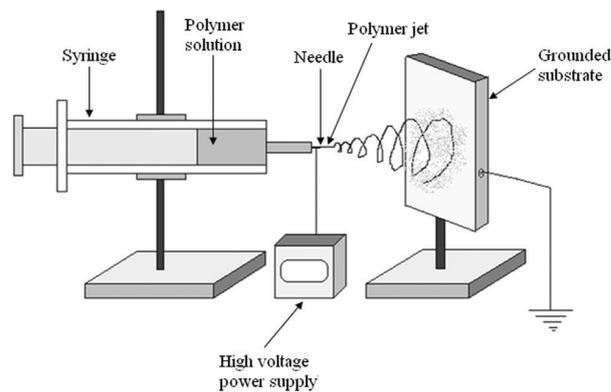
principale differenza tra le due tecniche risiede nel fatto che l'electrospray produce piccole goccioline, mentre l'electrospinning produce fibre continue. [2]

Nonostante il termine electrospinning derivi da "*electrostatic spinning*" e sia stato introdotto recentemente, nel 1994, i fondamenti di tale tecnica sono utilizzati da più di 60 anni. Tra gli anni 1934 e 1944, Formalas pubblicò una serie di brevetti che descrivevano setup sperimentali per la produzione di filamenti polimerici ottenuti mediante forze elettrostatiche. Nel 1952, Vonnegut e Neubauer erano in grado di produrre getti di goccioline uniformi altamente elettrizzate di diametri dell'ordine di 0.1 mm. Nel 1966 Simons brevettò un apparato per la produzione di fibre non-woven ultra sottili e leggere in peso con diverse configurazioni, usando l'electrical spinning. L'elettrodo positivo era immerso nella soluzione polimerica, mentre l'elettrodo negativo era collegato ad una campana dove le fibre venivano raccolte. Nel 1971, Baumgarten realizzò un apparato per l'electrospinning di fibre acriliche con un diametro tra 0.05-1.1 micrometri. Tale apparato comprendeva una pompa ad infusione. Baumgarten scoprì che il diametro delle fibre poteva essere controllato regolando in modo opportuno la velocità della pompa ad infusione. Negli anni ottanta, il processo di electrospinning, simile a quello realizzato da Baumgarten, ha ricevuto molte attenzioni a causa del crescente interesse per le nanotecnologie. Nel 1996, Reneker e Chun hanno dimostrato la possibilità di utilizzare l'electrospinning per molte soluzioni polimeriche. Attualmente i polimeri che possono essere filati sono più di cento tra cui si citano: poliammidi, poliesteri, acrilici e biopolimeri. [4]

L'apparato dell'electrospinning è illustrato nella figura 2 ed è costituito da tre elementi fondamentali:

- un generatore di alta tensione ( 10 kV – 40 kV in DC);

- una siringa dosatrice regolata da una pompa volumetrica;
- una pipetta o un ago di piccolo diametro (circa 1mm) collegati alla siringa;
- un collettore metallico per raccogliere le nanofibre.

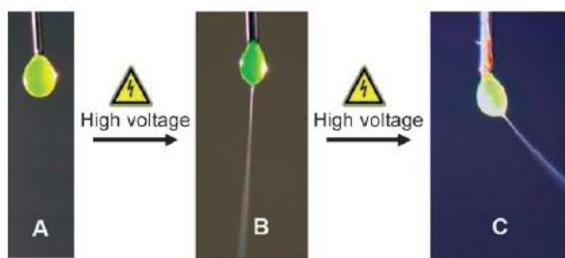


**Figura 2** Setup di elettrospinning per la produzione di nanofibre. [8]

Il processo prevede l'applicazione di un forte campo elettrico su un fluido polimerico (in soluzione o fuso); la tensione impartita (10000 - 40000 Volt) genera una forza elettrostatica che prevale ampiamente sulla tensione superficiale e gli sforzi viscosi della massa polimerica permettendo la formazione di un vero e proprio getto che si proietta in direzione dell'elettrodo opposto.

Il fluido è caricato positivamente ed è alimentato ad un orifizio attraverso una siringa dosatrice regolata da una pompa volumetrica. Si viene, così, a creare un getto di soluzione dall'orifizio alimentatore fino ad un apposito dispositivo di raccolta situato in prossimità del catodo. Il getto elettricamente carico, che emerge dalla base del foro, sviluppa una geometria conica (cono di Taylor), viene accelerato e assottigliato attraversando il campo elettrico formando un filamento stirato grazie anche all'evaporazione del solvente.

Il cono di Taylor nasce nel getto quando il trasporto idraulico impartito dallo stantuffo della siringa al fluido, è superato da quello elettrostatico dovuto al forte campo elettrico presente tra gli elettrodi. La forma del cono è stata oggetto di svariati studi che attraverso modellazioni matematiche piuttosto complesse ne hanno relazionato la geometria con altri parametri di processo ed in particolare con la portata.



**Figura 2:** Una goccia di soluzione al 5% di PEO in acqua. A) in assenza di un voltaggio applicato; B) con un voltaggio applicato di 20 kV, con un getto perpendicolare al target; C) con un voltaggio applicato di 20 kV, con un getto diagonale verso il target [1].

In determinate condizioni operative il getto fluido diventa instabile prima di raggiungere il raccogliatore; con fluidi a basso peso molecolare questa instabilità produce uno spray di piccole gocce cariche di elettricità statica, questo processo prende il nome di *electrospraying*. Utilizzando invece polimeri fluidi (in soluzione o fusi), le forze viscoelastiche stabilizzano il getto permettendo la formazione di finissimi filamenti carichi che appaiono come un cono di fluido disperso, i quali una volta depositati sul raccogliatore formano un tessuto non-woven di fibre finissime.

In queste condizioni, si osservano diametri nell'ordine di 0,1 micron, tre ordini di grandezza al di sotto della finezza del getto che entra nella regione di instabilità (100 micron). Tali dimensioni sono, inoltre, ampiamente inferiori rispetto al diametro

delle fibre estruse con forze meccaniche. Nonostante tutto, il meccanismo per il quale si osserva una così drastica riduzione dei diametri è ancora oggi argomento di dibattito. Numerose ricerche hanno dato risultati contrastanti tra loro; una di queste indica come causa l'instabilità elettrostatica derivante dalla mutua repulsione delle cariche che induce alla rottura del filamento principale in numerosi piccoli filamenti in un processo chiamato *splaying* (apertura). Successivamente, con un'osservazione più accurata è stato individuato un meccanismo che prevede una rapida rotazione a spirale del getto accelerato, indistinguibile a occhio nudo dagli altri fenomeni, al quale si è attribuito il nome di *whipping motion* (movimento di frusta). Si considera, pertanto, improbabile che la realizzazione di fibre nanometriche avvenga solo dopo il fenomeno di *splaying*, che permette la rottura e l'apertura del getto principale in numerosi nano filamenti.

Le fibre prodotte vengono raccolte su uno schermo scaricato elettricamente a terra, solitamente di materiale metallico, che può essere un piano statico, con la funzione di raccogliere una stuovia di fibre disordinate, o di geometria cilindrica e messo in rotazione da appositi dispositivi, per una raccolta del filo più ordinato.

Lo schema rappresentato in figura 2, mostra un impianto per elettrofilatura di laboratorio dove tra l'altro è visibile la zona di apertura. Se il fluido, costituito da polimero fuso o in soluzione, è alimentato costantemente, si rende possibile la fabbricazione di nanofibre continue.

L'elettrofilatura è in grado di filare un largo campo di polimeri tra cui poliammidi, polimeri polifunzionali, derivati della cellulosa, polimeri solubili in acqua come il poliossido di etilene, miscele polimeriche, polimeri contenenti nanoparticelle solide o

piccole molecole funzionali. Questo è da considerarsi fondamentale perché rende l'elettrofilatura un processo estremamente versatile [4].

Nella tabella 1 sono riportati i principali polimeri che sono stati elettrofilati:

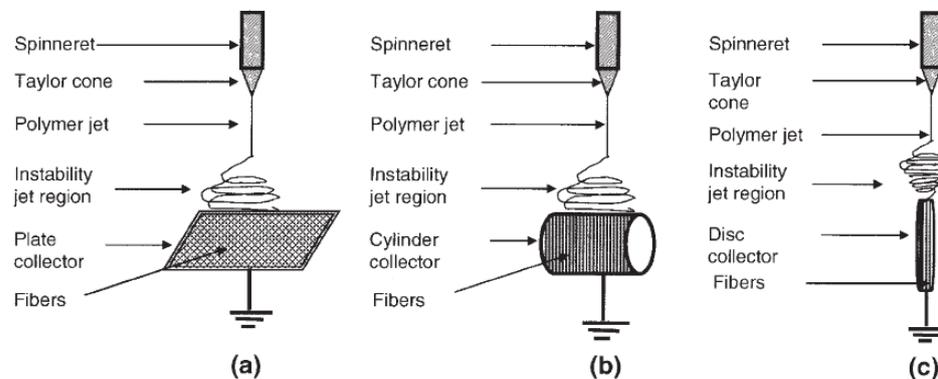
Polymers	Fiber Diameter (nm)		
Poly(L-lactic acid) (PLA)	200 - 250	Fibrinogen	300 - 500
Poly(glycolic acid) (PGA)	630	PLGA/DNA	250 - 875
Poly(lactic-glycolic acid) (PLGA)	400 - 1000	Collagen/Poly(ester urethane) urea	100 - 900
Polycaprolactone (PCL)	200 - 300	Collagen/Glycosaminoglycan	260
Poly(L-lactic acid)-co-poly(ε-caprolactone) (P(LLA-CL))	200 - 300	Gelatin/PCL	700 - 900
Poly(ethylene oxide) (PEO)	100 - 150	Gelatin/Polyaniline	600 - 800
Polyurethane (PU)	100 - 500	Silk fibroin	30 - 120
Polyethylene terephthalate (PET)	200 - 600	PCL/Gel/HA	411
Poly(vinyl alcohol) (PVA)	200 - 300	PLCL/Collagen	120 - 520
Poly(methyl methacrylate)	200 - 300	NGF-BSA/PCLEEP	500 - 3000
Polycarbonate (PC)	200 - 250	PHBV/Collagen	300 - 600
Poly(p-dioxanone-co-L-lactide) block-poly(ethylene glycol)	300 - 400	GDNF/PCLEEP	3960
Polystyrene	60 - 1000	Collagen/PCL	275
Collagen	150 - 300	PGA/Chitin	50 - 350
Chitosan	200 - 650	HA/Gelatin	200 - 400
Gelatin	250 - 500	PCL/CaCO <sub>3</sub>	760
PLLA/HA	500	PHBV/HA	100 - 2000
PCL/HA	350 - 625	HA/PLA	1000 - 2000
Collagen/Elastin/PEO	220 - 600		
Collagen/Elastin/PLGA	720		
Gelatin/Elastin/PLGA	380		
Collagen/P(LLA-CL)	100 - 300		
Silk/PEO/nHA/BMP-2	520 - 575		

**Tabella 1** Principali polimeri elettrofilati in soluzione [9].

Recentemente, la richiesta di materiali fibrosi con funzioni avanzate e diverse strutture ha portato allo sviluppo di vari apparati di electrospinning nuovi e modificati, inclusi sistemi specifici di ugelli e di elettrodi target funzionalizzati. Queste evoluzioni hanno contribuito alla produzione di nanofibre orientate mono e bidimensionali. Inoltre, tramite altri importanti sviluppi è stato possibile controllare

la dimensione delle nanofibre, che risulta criticamente dipendente dall'interazione tra le condizioni di processo e le proprietà elettriche e reologiche del materiale.

Nella seguente figura si riportano le tre più comuni tipologie di setup realizzati con tre differenti tipi di collettori.



**Figura 4:** Schema dei sistemi di elettrofilatura con diversi tipi di collettori: (a) collettore piano; (b) collettore cilindrico; (c) collettore a disco. [6]

Sono molti i parametri che influenzano la trasformazione della soluzione polimerica in nanofibre mediante la tecnica di electrospinning:

Parametri del sistema	Parametri del processo
<ul style="list-style-type: none"> <li>• proprietà della soluzione, come viscosità, tensione superficiale, conducibilità ed elasticità</li> <li>• struttura molecolare, peso molecolare del polimero;</li> <li>• concentrazione del polimero nella soluzione;</li> <li>• costante dielettrica del solvente</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• pressione idrostatica nella siringa regolatrice</li> <li>• potenziale elettrico sulla punta dell'ago</li> <li>• portata del fluido</li> <li>• distanza tra l'estremità capillare e lo schermo di raccolta;</li> <li>• moto del dispositivo raccoglitore;</li> <li>• parametri ambientali (T°C, umidità)</li> </ul>

## **I parametri del sistema**

Le proprietà della soluzione polimerica influenzano significativamente il processo di electrospinning e la morfologia delle fibre risultanti.

- ***La viscosità***

La viscosità della soluzione incide sull'estensione del getto e sul diametro delle nanofibre. Tale parametro dipende dal peso molecolare del polimero. In genere, soluzioni con polimeri ad alto peso molecolare hanno viscosità maggiore di soluzioni aventi come soluti polimeri a basso peso molecolare. Il peso molecolare di un polimero, che rappresenta la lunghezza delle catene polimeriche, ha effetto sulla viscosità della soluzione, poiché la lunghezza del polimero determina la quantità di catene polimeriche che sono poste in relazione con il solvente. Un altro parametro che influenza la viscosità della soluzione è la concentrazione di polimero all'interno della soluzione. Infatti, al fine di aumentare la viscosità è sufficiente aumentare la concentrazione di polimero. In conclusione, sia un aumento del peso molecolare che un aumento della concentrazione del polimero, incrementano le relazioni tra catene polimeriche nella soluzione, migliorando la viscosità e mantenendo la continuità del getto durante l'electrospinning.

Di contro, la viscosità non può essere troppo alta, perché in tal caso è molto difficile pompare la soluzione all'interno dell'ago della siringa. Inoltre un'eccessiva viscosità della soluzione crea una resistenza alla deformazione durante il moto vibrazionale (whipping motion) e provoca la rottura del getto anziché avere l'effetto di trazione e stiro. Se la soluzione ha una bassa

viscosità è facile trovare granuli lungo le fibre depositate sullo schermo di raccolta. All'aumentare della viscosità c'è una graduale variazione nella forma dei granuli, fino ad ottenere una fibra liscia ed omogenea.

Un aumento della viscosità è indice di una maggiore quantità di relazioni tra le catene polimeriche all'interno della soluzione e di una completa distribuzione delle molecole di solvente lungo le catene. Inoltre, un incremento della viscosità comporta anche un aumento del diametro della fibra; questo probabilmente è dovuto alla grande resistenza della soluzione ad essere stirata dalle cariche presenti nel getto. [4]

- ***La tensione superficiale***

La tensione superficiale contribuisce alla formazione di granuli nella fibra. Quando c'è un'alta concentrazione di molecole di solvente libere, c'è una grande tendenza di tali molecole di unirsi e formare elementi sferici a causa della tensione superficiale esistente tra loro. A bassa viscosità le molecole di solvente tendono a raccogliersi in granuli sotto l'azione della tensione superficiale. Ad alta viscosità, essendoci una forte interazione tra il solvente e le molecole di polimero, quando la soluzione è tirata sotto l'influenza delle cariche, le molecole di solvente tendono a distribuirsi uniformemente lungo le catene polimeriche, diminuendo la tendenza ad unirsi per via della tensione superficiale. Un modo per diminuire la tensione superficiale è aggiungere surfattante alla soluzione, al fine di rendere più uniformi le fibre [4].

- ***La conducibilità***

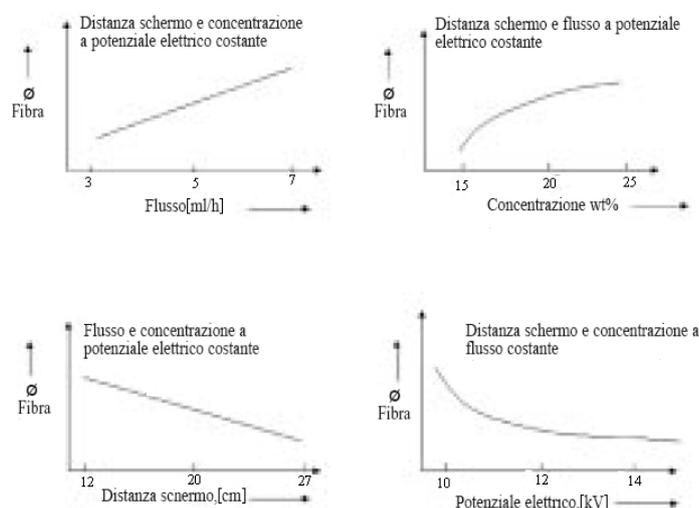
La conducibilità della soluzione è un parametro rilevante, in quanto l'elettrospinning permette lo stiramento del fluido polimerico, grazie alla mutua repulsione delle cariche sulla sua superficie. Se aumenta la conducibilità della soluzione, più cariche sono coinvolte nel processo di elettrofilatura. La conducibilità della soluzione può essere aumentata tramite l'aggiunta di ioni. Ciò comporta un aumento dello stiramento del getto polimerico, l'ottenimento di fibre più omogenee e la riduzione del diametro delle fibre ottenute. Soluzioni preparate usando solventi con alta conducibilità generalmente producono fibre senza granuli, mentre se la soluzione ha conducibilità pari a zero non si formano fibre. Le dimensioni degli ioni possono influenzare la morfologia delle fibre. Ioni aventi piccolo raggio atomico, come sodio (Na) e cloro (Cl), possiedono una maggiore mobilità quando sono soggetti ad un campo elettrostatico esterno; questo provoca la realizzazione di fibre con diametro inferiore. Al crescere del raggio atomico degli ioni, il diametro delle fibre ottenute per elettrospinning aumenta. L'aumento della conducibilità della soluzione può essere ottenuto anche mediante la variazione del pH della soluzione stessa. [4]

- ***La costante dielettrica***

La costante dielettrica del solvente influenza il processo di elettrospinning. Una soluzione con rilevanti proprietà dielettriche, di solito, riduce la formazione di granuli ed il diametro delle fibre [4].

## I Parametri del processo

I parametri del processo sono i vari fattori esterni agenti sul getto polimerico. Nella seguente figura 5, sono sintetizzate le relazioni, calcolate sperimentalmente, che intercorrono tra alcuni di essi.



**Figura 3** Relazioni tra i parametri di processo ricavate sperimentalmente [10].

Questi parametri hanno una sicura influenza sulla morfologia delle fibre prodotte, sebbene meno significativa rispetto ai parametri della soluzione [4], e sono analizzati di seguito i più rilevanti.

- *Il potenziale elettrico*

Un elemento fondamentale nell'electrospinning è l'applicazione di un alto voltaggio alla soluzione. L'applicazione del campo elettrico esterno fornisce alla soluzione le cariche necessarie per permettere l'inizio del processo di

elettrofilatura, che si avvia appena la forza elettrostatica nella soluzione supera la tensione superficiale della soluzione stessa. Si nota che facendo crescere la differenza di potenziale e tenendo costanti gli altri parametri, i diametri delle fibre diminuiscono. Al crescere del voltaggio il getto di polimero è scaricato con una grande repulsione elettrostatica, che provoca, al getto stesso, un notevole sforzo di trazione. Il risultato è l'incremento della finezza. Ad elevate differenze di potenziale i diametri delle fibre tornano comunque a crescere. Si nota quindi come il controllo di tale parametro sia difficoltoso [4].

- *La distanza capillare-schermo*

Nel processo di electrospinning si può anche variare la distanza tra l'ago e lo schermo di raccolta. Se si incrementa la distanza schermo capillare a basse concentrazioni, si forma una struttura a gocce. Al crescere della concentrazione si viene ad avere una configurazione a macchie. Aumentando la frazione di polimero, il diametro medio delle fibre e la dimensione delle gocce aumentano, mentre decrescono incrementando ulteriormente la distanza capillare schermo. Si evidenzia che, per ottenere fibre con piccoli diametri, occorre aumentare la distanza dallo schermo e diminuire per quanto possibile la concentrazione della soluzione [4].

- *La velocità di alimentazione della siringa*

La velocità di alimentazione della siringa determina la quantità di soluzione disponibile per l'electrospinning. Se si desidera mantenere stabile il cono di

Taylor, ad ogni voltaggio corrisponde un'opportuna velocità di erogazione. All'aumento della velocità di erogazione della soluzione polimerica corrisponde un incremento del diametro delle fibre o della dimensione delle "beads". Bisogna, inoltre, ricordare la presenza di un limite all'incremento del diametro delle fibre in presenza di valori molto elevati di velocità di erogazione [4].

- *Il diametro dell'ago*

Il diametro interno dell'ago ha una notevole influenza sul processo di elettrofilatura. Un diametro interno ridotto riduce la formazione di beads sulle fibre elettrofilate. La riduzione del diametro interno dell'ago inoltre, provoca la riduzione del diametro delle fibre elettrofilate. Quando la dimensione della goccia sulla punta dell'ago è ridotta, come nel caso di piccolo diametro interno, aumenta la tensione superficiale della goccia. In tal caso, a parità di voltaggio applicato, è richiesta una maggiore forza di Coulomb per inizializzare il getto. Pertanto, l'accelerazione del getto diminuisce e questo fornisce alla fibra il tempo necessario per elongazione prima di essere raccolta sul target. Inoltre, bisogna ricordare che un diametro dell'ago troppo piccolo, rende impossibile l'estrusione di una goccia di soluzione sulla punta dell'ago [4].

### **Applicazioni dell'electrospinning**

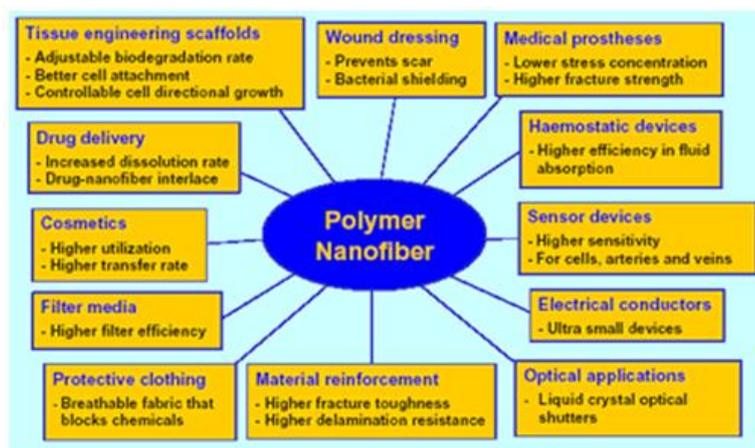
Negli ultimi anni l'interesse scientifico riguardo l'electrospinning ha avuto una crescita esponenziale e questo è indice dell'importanza che potrà avere negli anni

avvenire. È noto che quando le fibre polimeriche passano da diametri micrometrici a nanometrici emergono molte caratteristiche nuove ed interessanti. Tra le più importanti, due sono ritenute maggiormente significative:

- elevato rapporto superficie/ volume (superficie specifica);
- elevate proprietà meccaniche.

Inoltre, lavorando in specifiche condizioni con alcuni polimeri, si riesce a inserire nelle fibre un grado di porosità elevatissimo con dimensione dei pori controllabile.

Nella figura 6 si riportano le potenziali applicazioni delle nanofibre polimeriche realizzate mediante la tecnica dell'electrospinning [11].

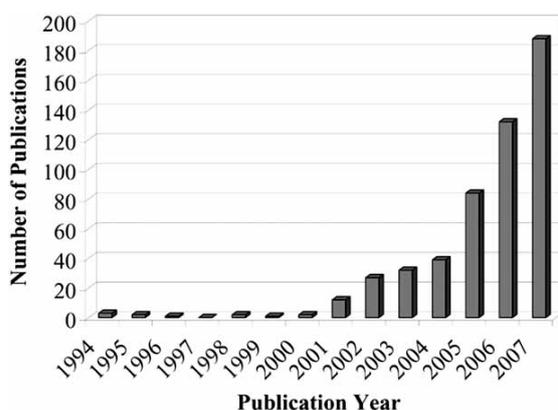


**Figura 4** Potenziali applicazioni delle nanofibre polimeriche ottenute tramite il processo di elettrospinning [5].

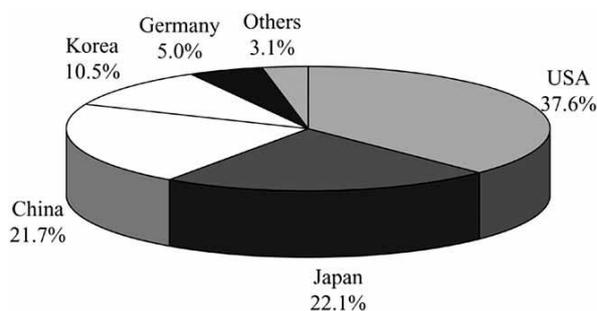
Alcuni studi hanno evidenziato il crescente interesse verso la tecnica dell'electrospinning, come si può notare dalle seguenti figure.

Infatti, il numero di pubblicazioni e brevetti aventi per oggetto l'electrospinning (figura 7) è aumentato esponenzialmente negli anni che vanno dal 1994 al 2007, tali

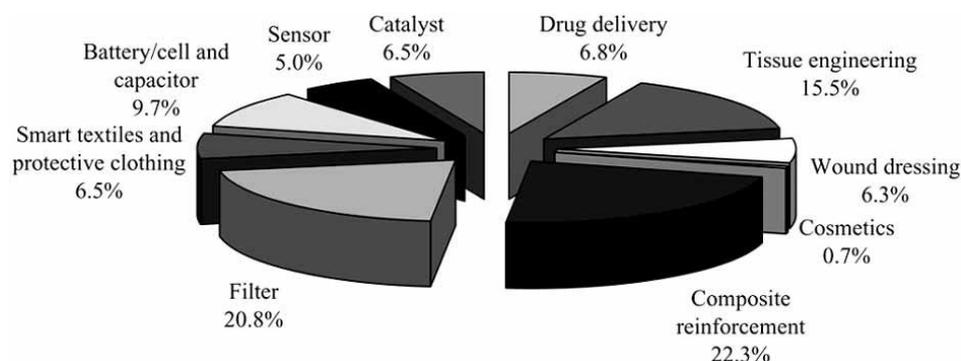
dati partono dal 1994, anno di introduzione del termine “electrospinning”. I dati sulle distribuzioni di queste pubblicazioni (figura 8) mostrano che le applicazioni dell’electrospinning sono state realizzate in molte nazioni di tutto il mondo. Inoltre, i risultati sulle aree di applicazione (figura 9) hanno dimostrato che l’electrospinning è una tecnica versatile con elevato numero di applicazioni in ambito biomedico, energetico, elettronico, ecc. [11]



**Figura 5** Confronto del numero annuale di pubblicazioni da quando il termine “electrospinning” è stato introdotto (1994). [11]



**Figura 6** Distribuzioni delle pubblicazioni e brevetti nel mondo (dati ottenuti mediante analisi con SciFinder Scholar con la combinazione di termini “electrospinning” o “electrospun” o “electrostatic spin” [11].



**Figura 7** Classificazione di brevetti e pubblicazioni secondo l'ambito di applicazione. [11]

Alcune di queste applicazioni dei materiali elettrofilati hanno raggiunto livello industriale a partire dalla ricerca di laboratorio. Il promettente futuro delle applicazioni delle nanofibre elettrofilate ha comportato una crescente attenzione ed un aumento di investimenti in tale ambito da parte di università, governi ed industrie in tutto il mondo [11].

### **Applicazioni in ambito biomedico**

Tra i più importanti ambiti in cui sono state utilizzate le nanofibre ottenute tramite il processo di electrospinning, il settore biomedico è sicuramente uno dei più rilevanti. In un recente report, si afferma che gli investimenti economici su materiali nanostrutturati nelle applicazioni biomedicali nel 2015 sarà dell'ordine di 180 miliardi di dollari [12]. Da un punto di vista strutturale, quasi tutti tessuti umani e gli organi sono caratterizzati da forme o strutture nano fibrose, come per esempio la pelle, le ossa, la dentina, il collagene e la cartilagine.

Le nanofibre elettrospinnate, pertanto, possono facilmente trovare le loro promettenti applicazioni in diverse aree biomedicali. Esempi particolari sono evidenti nei seguenti ambiti: ingegneria tissutale, rilascio di farmaci e riparazione di ferite. [11]

Per quanto riguarda l'ingegneria tissutale, le nanofibre realizzate con tecnica di electrospinning presentano una struttura che permette l'adesione e la proliferazione cellulare. Le cellule coltivate su scaffold, realizzati tramite nanofibre elettrofilate, tendono a mantenere la loro forma fenotipica e la proliferazione avviene seguendo l'orientazione delle nanofibre. La struttura caratteristica di suddetti scaffold imita da un punto di vista morfologico la matrice extracellulare (ECM) di un tessuto naturale, che è caratterizzato da pori con un ampio range di diametro, alta porosità, e ottime proprietà meccaniche.

Storicamente, l'ingegneria tissutale ha utilizzato una varietà di polimeri sintetici per la realizzazione di nanofibre per scaffold. Tuttavia, queste strutture sono sintetiche e non presentano un'adeguata composizione che permetta la critica comunicazione tra le cellule e la matrice extra-cellulare (ECM). Per permettere tale comunicazione, si cerca di realizzare, attraverso il processo di electrospinning, nanofibre costituite dagli elementi base dell'ECM: collagene di tipo I, II, III, elastina e fibrinogeno. In tal modo, le cellule umane trovano un ambiente ideale per proliferare e crescere.

L'electrospinning permette anche il controllo dell'orientazione delle fibre nello scaffold tramite il movimento del collettore e la durata del campo elettrico.

In questo modo è possibile realizzare qualsiasi struttura composta in modo da imitare l'ECM del tessuto di interesse. [13]

Inoltre, le nanofibre polimeriche elettrofilate possono essere depositate come un sottile film poroso sulla superficie di protesi impiantate all'interno del corpo umano.

Tale rivestimento funge da interfaccia tra la protesi e il tessuto ospite, ed ha la funzione di ridurre la rigidità tra l'accoppiamento tessuto/impianto e quindi diminuire la possibilità di fallimento dell'impianto. [5]

Li et al.[14] hanno ricostruito la cartilagine usando scaffold di policaprolattone (PCL) creati attraverso electrospinning che sono stati seminati con cellule mesenchimali staminali umane derivate da midollo osseo. Il supporto nanofibroso elettrofilato è stato seminato con le cellule ed il complesso cellule-nanofibre è stato coltivato in un bioreattore rotante per generare della cartilagine che possedesse una resistenza alle forze di compressione simile alla cartilagine naturale. Tale cartilagine potrebbe essere utilizzata nel trattamento di malattie degenerative della cartilagine.

Mo et al. [15] hanno studiato la fabbricazione di tessuto nanofibroso elettrofilato contenente chitosano. Lo scaffold è stato brevettato come sostituto di ECM per le seguenti applicazioni: riparazione di pelle, cartilagine, vasi sanguigni e nervi.

Lo scaffold è risultato vantaggioso in termini di biocompatibilità, proprietà meccaniche, porosità e degradabilità nel corpo umano. Lo stesso gruppo di ricerca ha inoltre elettrofilato della seta naturale di ragno e del collagene di tipo I in nanofibre con diametri di 200-260 nm come scaffold per riparazione tissutale [16].

Le nanofibre elettrofilate hanno mostrato una moderata porosità, proprietà meccaniche eccellenti e biocompatibilità, tali scaffold possono essere usati per riparare vasi sanguigni, pelle e tessuto nervoso.

Wang [17] ha fornito una metodica innovativa per la generazione di tessuto 3D formato da strati alternati di nanofibre elettrofilate e cellule di mammiferi. La miscela di collagene di tipo I proveniente da pelle di vitello e PCL è stata elettrofilata per la prima volta in fibre con diametri da 50 nm a diversi micrometri, a seconda

della concentrazione del polimero e delle condizioni di electrospinning. Le nanofibre elettrofilate ottenute con elevata resistenza meccanica hanno mostrato una migliore adesione e la proliferazione cellulare dei fibroblasti rispetto al collagene. I fibroblasti coltivati su nanofibre elettrofilate costituite anche da collagene, hanno mostrato una migliore morfologia di diffusione cellulare, comparata con nanofibre di puro PCL.

Le nanofibre di collagene/PCL possono supportare tutta una serie di tipi cellulari, come osteoblasti, cellule muscolari lisce, cheratinociti, cellule endoteliali, fibroblasti e cellule epiteliali. Liao et al. [18] ha fabbricato una struttura mediante l'electrospinning coassiale per applicazioni di ingegneria tissutale. Tale struttura possedeva una moltitudine di canali che si estendevano dalla superficie fino al nucleo. Uno o più agenti come farmaci, proteine, virus, plasmidi a DNA, cellule batteriche o nanoparticelle cariche di farmaci, sono state incapsulate all'interno del nucleo. I risultati promettenti ottenuti in seguito alle colture cellulari, candidano tali scaffold alle specifiche applicazioni della terapia genica [11].

## **Bibliografia:**

- [1] A. Greiner, J.H. Wendorff; Electrospinning: a fascinating method for the preparation of ultrathin fibers. *Nanotechnology* 2007; 46: pp.5670-5703.
- [2] W.-J. Li, R.M. Shanti, R.S. Tuan; *Nanotechnologies for the Life Sciences Vol. 9 Tissue, Cell and Organ Engineering*. 2006 Edited by Challa S. S. R. Kumar - capitolo terzo: Electrospinning Technology for Nanofibrous Scaffolds in Tissue Engineering.
- [3] *Le nanotecnologie applicate ai materiali*. Università di Padova. Dipartimento di ingegneria meccanica. Corso di materiali nanostrutturati. Prof. A. Martucci.
- [4] S. Ramakrishna, K. Fujihara, W.E. Teo, T.C. Lim; *An introduction to electrospinning and nanofibers*. Edited by World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.
- [5] Z.M. Huang, Y.Z. Zhang, M. Kotaki, S. Ramakrishna; A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Composites Science and Technology* 2003; 63: pp. 2223-2253.
- [6] M. Murugan, S. Ramakrishna; *Nano-Featured Scaffolds for Tissue Engineering: A Review of Spinning Methodologies*. *Tissue Engineering* 2006; 12: pp. 435-447.
- [7] F. K. Ko; *Nanofiber Technology: Bridging the gap between nano and macro world*. Fibrous Materials Research Laboratory, Department of materials science and engineering, Drexel University, Philadelphia.
- [8] R. Vasita, D.S. Katti; *Nanofibers and their applications in tissue engineering*. *International Journal of Nanomedicine* 2006; 1: pp. 15-30.
- [9] J. Venugopal, M.P. Prabhakaran, S. Low, A.T. Choon, Y.Z. Zhang, G. Deepika, S. Ramakrishna; *Nanotechnology for Nanomedicine and Delivery of Drugs*. *Current Pharmaceutical Design*, 2008; 14: pp. 2184-2200.
- [10] A. Ceria; *Electrospinning for ultra-fine fibres*. *Industria tessile*; 2004; 5-6: pp. 336-345.
- [11] P. Lu, B. Ding; *Applications of Electrospun Fibers*. *Recent Patents on Nanotechnology* 2008; 2: pp. 169-182.

- [12] R. Dersch, M. Steinhart, U. Boudriot, A. Greiner, J.H. Wendorff. Nanoprocessing of polymers: applications in medicine, sensors, catalysis, photonics. *Polym Adv Technol* 2005; 16(2-3): pp. 276-282.
- [13] A. Frenot, I. S. Chronakis; Polymer nanofibers assembled by electrospinning. *Current opinion in colloid and interface science*; 2003; 8: pp. 64 – 75.
- [14] Li, W.-J., Tuan, R.S.: WO06138552 (2006).
- [15] X. Mo, F. Chen, C. He. Preparing method and use of chitosan-containing nano fibrous tissue recovery support. CN 1919352. 2007.
- [16] Mo, X., Zhang, L., Xue, Y., He, C.: CN101181648 (2008).
- [17] Wang, H.: US2008112998 (2008).
- [18] Liao, I.-C., Leong, K.W., Chew, S.-Y.: WO08013713 (2008).
- [19] W.E. Teo, W. Hei, S. Ramakrishna; Electrospun scaffold tailored for tissue-specific extracellular matrix. *Biotechnology Journal*; 2006; 1: pp.918 - 929.

### **Capitolo 3: Risposta cellulare su nanofibre elettrofilate**

Nell'ambito dell'ingegneria tissutale ci si trova di fronte ad una sempre maggiore crescita della produzione e manipolazione di architetture 3D dell'ordine dei nanometri al fine di controllare la funzione cellulare [1].

Gli scaffold nanofibrosi sono l'ideale per questo compito perché le loro dimensioni sono simili ai componenti della matrice extracellulare (ECM), mimando così la sua struttura fibrillare e fornendo segnali essenziali per l'organizzazione, la sopravvivenza e la funzione cellulare [2].

L'elettrospinning fornisce un metodo rapido e versatile per fabbricare scaffold nanofibrosi. Gli scaffold elettrofilati, che spesso incorporano polimeri biologici, composti o anche precursori ceramici possono fornire segnali bioattivi [3]. Gli scaffold nanofibrosi hanno, inoltre, elevati porosità e rapporti superficie/volume [4], seppur offrendo una grande varietà di caratteristiche topografiche per favorire l'adesione e la proliferazione cellulare [5].

La funzione cellulare viene influenzata diversamente a seconda della diversa architettura dello scaffold. Generalmente, l'elettrospinning produce una rete 3D di nano e microfibre non tessute. Comunque, l'orientamento delle fibre può essere facilmente cambiato usando differenti dispositivi collettori come doppi anelli [6], mandrini in rapida rotazione [7], o un dispositivo per l'allineamento (gap method) [8].

In questi casi possono essere prodotti degli scaffold direzionati, nei quali le fibre sono altamente allineate, ciò potrebbe risultare utile per replicare la ECM di specifici tessuti come tendini ad es, nei quali le fibrille sono allineate con lo stesso angolo.

Uno dei maggiori risultati dell'ingegneria tissutale è stato la realizzazione e riproduzione dell'effetto che il segnale del microambiente 3D gioca sul comportamento cellulare. Le cellule si comportano diversamente quando coltivate nelle colture 3D rispetto alle tradizionali in 2D, imitando meglio la situazione in vivo dal punto di vista morfologico [5].

La coltura cellulare in 3D altera completamente il segnale meccanico rispetto a quelle in 2D, per quanto riguarda il legame cellula-recettore, il segnale intercellulare e la migrazione cellulare [9,10].

L'ambiente 3D influenza inoltre la diffusione e l'adesione di proteine, fattori di crescita ed enzimi, che assicurano la sopravvivenza cellulare e possono influenzarne la funzione [10].

Le cellule coltivate su scaffold elettrofilati spesso aderiscono alla superficie dello scaffold con una penetrazione minima. Questo potrebbe essere dovuto alla combinazione di ridotte distanze interfibra, diametro delle fibre, dimensione delle cellule e proprietà chimiche e di interfaccia delle fibre stesse. Mentre in questi casi le cellule non migrano all'interno dello scaffold, è ancora tipicamente differente da una superficie piana 2D, infatti le cellule ricevono nutrienti e segnali di crescita tridimensionalmente [11,12].

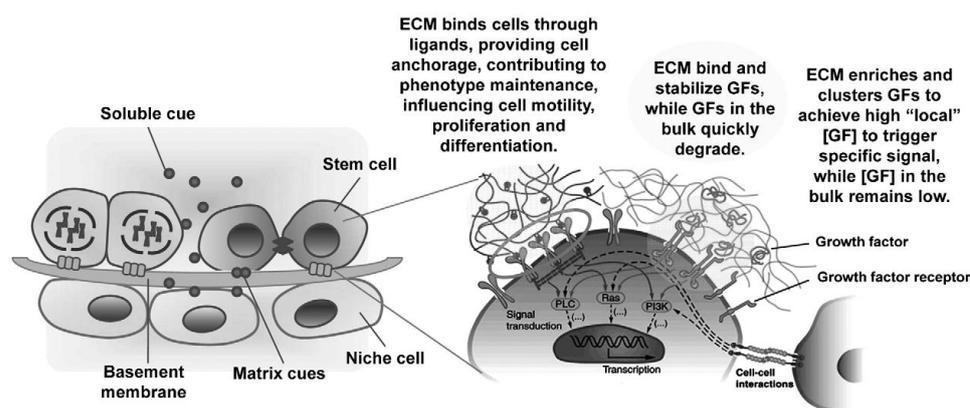
In altri casi le cellule possono migrare attraverso gli scaffold nanofibrosi elettrofilati come in un vero ambiente 3D [13].

Il metodo di influenzare la funzione cellulare usando scaffold elettrofilati rimane una sfida, dal momento che lo scaffold deve mimare alcune delle componenti che caratterizzano la naturale ECM, fornendo così gli appropriati segnali biochimici e meccanici per il microambiente cellulare [10,14]. La ECM è definita come qualsiasi materiale che è largamente riconosciuto nel tessuto, ma che non fa parte della cellula. Le componenti principali che formano la ECM sono le glicoproteine (tra le quali la più abbondante è il collagene), i proteoglicani e l'acido ialuronico [15].

Comunque, la struttura fisica e la composizione della ECM è spesso tipica dello specifico tessuto, e in alcuni casi poco si conosce delle sue componenti e del suo arrangiamento tridimensionale.

La ECM spesso contiene altre molecole a seconda dello specifico tessuto, come la fibrina, l'elastina, la fibronectina, la laminina, l'idrossiapatite (HA), e anche fluidi come il siero. Eventi fisiologici locali possono portare proteasi e fattori di crescita all'interno della ECM [16], fornendo segnali chimici attraverso il quale la ECM può influenzare il comportamento cellulare [17]. La ECM può inoltre influenzare la funzione cellulare attraverso la disposizione fisica della rete di molecole che la costituiscono [18,19]. Dal momento che gli arrangiamenti fibrillari sono tessuto-specifici, è notoriamente difficile replicare le caratteristiche fisiche della ECM per la medicina rigenerativa [2]. Comunque, una piena conoscenza del microambiente delle cellule è un punto di partenza fondamentale per una manipolazione efficace delle cellule negli scaffold 3D.

Le fibre elettrofilate riepilogano le caratteristiche della “*stem cell niche*”. Le cellule staminali esistono in vivo in un microambiente tessuto-specifico chiamato comunemente “*stem cell niche*” (Figura 1).



**Figura 1:** “stem cell niche”, e ruolo della matrice extracellulare nel regolare la sopravvivenza ed i segnali biomolecolari delle cellule staminali. ECM: matrice extracellulare; Fattori di crescita; [GF]: concentrazione dei fattori di crescita. [20]

La matrice extracellulare comprende la componente strutturale della *niche*; oltre a fornire la matrice fisica di supporto per l’adesione cellulare, per la migrazione e la proliferazione cellulare, presenta anche segnali biochimici per le cellule che sono modulati attraverso le interazioni molecolari con le proteine di ECM come i proteoglicani o per le cellule adiacenti [21,22]. Gli scaffold nano fibrosi elettrofilati sono in grado di ricapitolare sia le caratteristiche strutturali della ECM, e attraverso le modificazioni della superficie o del materiale elettrofilato, anche l’ambiente biochimico. Questi scaffold modificati con aumentata funzionalità possono rappresentare un microambiente più biomimetico per applicazioni ex vivo di coltura di cellule staminali.

Uno dei motivi fondamentali per supportare l’utilizzo di scaffold fibrosi elettrofilati quali supporto per colture con cellule Staminali è l’osservazione che questi assomigliano alla scala ed all’arrangiamento tridimensionale delle fibrille collagene

nella matrice extracellulare. Le membrane elettrofilate generalmente sono costituite da fibre non ordinate con diametri di centinaia di nanometri e pori altamente interconnessi di decine di micrometri di diametro [23,24]. L'elevato rapporto superficie – volume di queste membrane assicura anche un'area abbondante per l'adesione cellulare, che permette di coltivare cellule ad alta densità rispetto a superfici bidimensionali piane.

Molto del lavoro iniziale sulle fibre elettrofilate quali matrici per colture di cellule staminali aveva l'obiettivo di stabilire la biocompatibilità dell'architettura di tali scaffold e la possibilità di realizzare strutture tissutali ingegnerizzate in vitro, e ad oggi un grosso sforzo è diretto verso la realizzazione di applicazioni di ingegneria tissutale ossea e cartilaginea con cellule staminali e non.

### **Scaffold elettrofilati per ingegneria tissutale ossea**

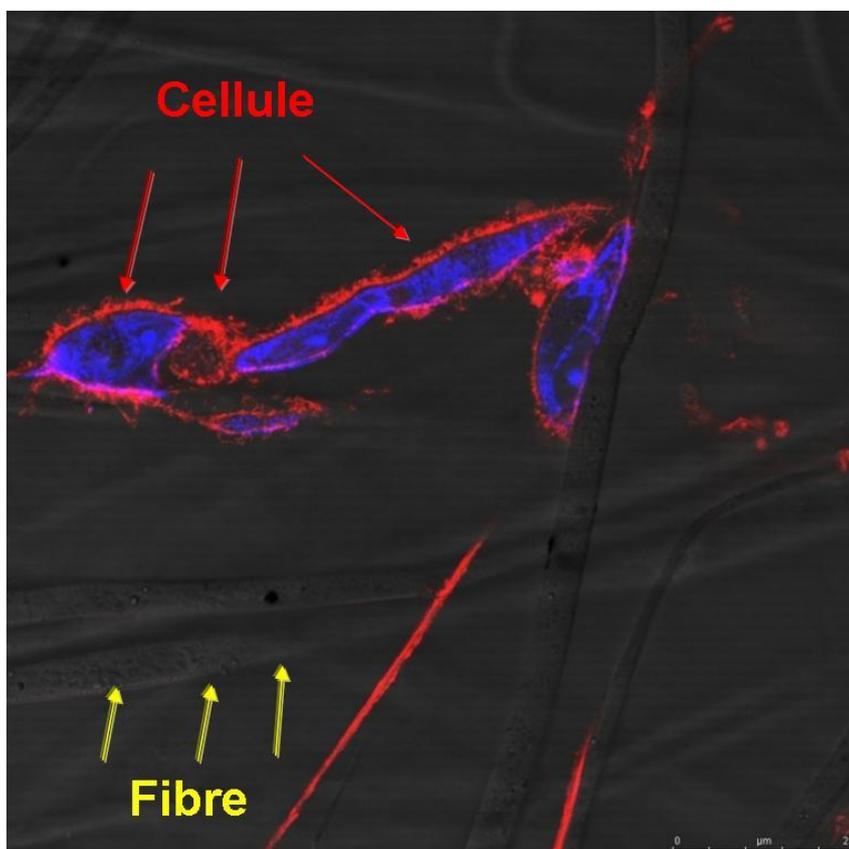
L'osso è un materiale composito costituito da una fase organica di collagene, glicoproteine e glicosaminoglicani (GAGs) e una fase inorganica primariamente costituita da HA ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) [26]. L'osso provvede a tutta una serie di funzioni critiche incluso supporto muscolare, produzione di cellule sanguigne e del sistema immunitario, e come serbatoio minerale che mantiene l'equilibrio elettrolitico nel corpo. Si può perdere osso dopo traumi, cancro, fratture, periodontiti, osteoporosi e malattie infettive e al momento non esiste una terapia definitiva/efficace per la rigenerazione ossea [27]. I trapianti ossei sono sempre più utilizzati, nonostante questi siano afflitti da alti tassi di fallimento che si situano tra il 16 e il 50% [28]. Gli autotrapianti inoltre presentano problemi associati al fatto che ci

sia un secondo sito di operazione così come una limitata riserva e morbidity del sito di donazione [29]. Similarmente anche gli impianti metallici presentano un alto tasso di fallimento e spesso richiedono una seconda procedura chirurgica [30]. Gli approcci dell'ingegneria tissutale sono perciò attualmente mirati al investigare un metodo di rigenerazione nei difetti ossei.

Gli scaffold creati tramite electrospinning sono sempre più utilizzati nonostante siano correntemente carenti nell'integrità meccanica in caso di applicazioni richiedenti un maggiore carico posturale.

Le cellule staminali mesenchimali (MSCs) sono le cellule precursori dell'osso e ricoprono un ruolo centrale nel processo di riparazione del tessuto osseo e connettivale. Quando seminate all'interno delle nanofibre PCL, queste si differenziano in osteoblasti, migrano all'interno dello scaffold e producono collagene [31]. Le strutture dello scaffold sono risultate dimensionalmente stabili e sono diventate marcatamente più rigide dopo le quattro settimane, dovuto presumibilmente alla mineralizzazione. Le MSCs coltivate su scaffold nanofibrosi PCL sono stati impiantati all'interno dell'omento di ratti, dove sono risultati dimensionalmente stabili con evidenza di mineralizzazione e formazione di collagene di tipo I all'interno dello stesso innesto [31].

Quando l'idrossiapatite viene incorporata all'interno delle nanofibre polimeriche va a creare dei costrutti che risultano più biomimetici e con delle proprietà meccaniche potenziate (Figura 2).



**Figura 2:** cellule staminali mesenchimali che aderiscono a fibre di PLGA/HA elettrofilate (modificato da Spadaccio et al.) [25]

Utilizzando un processo per passaggi, i nanocristalli di HA sono stati incorporati nelle fibre di gelatina elettrofilate inizialmente mineralizzando l'HA nella gelatina e poi formando membrane elettrofilate non intrecciate, che sono state solo successivamente incrociate [32].

Più del 40% dell'HA potrebbe essere incorporata con successo usando questa tecnica: oltre questo (questa percentuale), il processo di electrospinning diventa instabile e le fibre si fanno "beads". È stato prodotto dell'altro osso (misurato attraverso la produzione di fattori cellulari derivanti dall'osso e l'attività della

fosfatasi alcalina [ALP]) nel 20 e nel 40% di nanofibre con HA, rispetto al controllo di gelatina.

L'HA e la proteina morfogenetica ossea (BMP) sono state incorporate nelle nanofibre elettrofilate di "silk fibroin" ed hanno promosso la differenziazione delle MSCs umane verso un differenziamento osteogenico [33]. Quando l'HA e il BMP sono state usate in maniera combinata, loro hanno agito sinergicamente per potenziare la mineralizzazione. Il processo di electrospinning acquoso ha evitato la denaturazione del BMP ed è stato previsto che questo processo potrebbe essere usato per la manipolazione di altre proteine labili. Le nanofibre di amido/PCL miscelate (30:70), prodotte dall'electrospinning sono state incorporate tra le microfibre (prodotte attraverso un processo di legame fibroso) dello stesso materiale formando "nanoponti" (il diametro medio delle fibre era 400 nm) [34]. Le microfibre più grandi sono state incorporate per aumentare la dimensione dei pori, in modo da migliorare così la migrazione cellulare. Curiosamente, le cellule stromali di osteosarcoma simil-osteoblastico umane e quelle di midollo osseo di ratto hanno formato ponti con le microfibre usando delle nanofibre. I ponti nano fibrosi hanno inoltre aumentato l'attività metabolica, i tassi di crescita dell'attività dell'ALP.

Badami et al. hanno recentemente affrontato l'aspetto della morfologia dello scaffold nanofibroso rispetto al comportamento del tessuto osseo [35]. Sono state ottenute maggiori densità di cellule osteoprogenitrici quando sono state coltivate in maglie orientate casualmente con un diametro delle fibre di 2.1  $\mu\text{m}$ , rispetto a colture con diametri di fibre più piccoli di 0.14  $\mu\text{m}$  [35]. Non c'è stato aumento nell'attività dell'ALP, il che ci suggerisce che non c'è stata una maggiore propensione a formare strutture simil-ossee. La morfologia cellulare non è stata influenzata dai diametri

delle fibre, ma è risultata minore rispetto alle cellule coltivate nei controlli in 2D. L'aspect ratio delle cellule coltivate nelle fibre più grandi è stata significativamente più alta e ciò è stato attribuito a un aumentato contatto. I contatti con adesione focale sono avvenuti principalmente come grappoli lungo le fibre polimeriche e le fibre da stress actiniche si sono estese perpendicolarmente lungo la fibra polimerica, risultando parallele tra di loro.

#### **Scaffold realizzati con electrospinning per ingegneria tissutale cartilaginea**

La cartilagine articolare delle articolazioni fornisce una superficie liscia e quasi senza frizioni, sebbene si occupi anche di mediare il carico tra l'articolazione e il sottostante osso subcondrale [36-38]. L'architettura dello scaffold è fondamentale e dovrebbe promuovere l'adesione, la proliferazione, la differenziazione e la migrazione cellulare, fornendo allo stesso tempo resistenza alle forze di tensione, compressione e taglio. L'electrospinning può produrre strutture che mimano alcune delle caratteristiche della ECM della cartilagine [39]. Ciò nonostante, mentre l'electrospinning può produrre fibre simili per diametro, composizione e allineamento, la ECM nativa della cartilagine risulta molto più complessa degli scaffold nanofibrosi sviluppati finora. La cartilagine nativa consiste in un complesso arrangiamento di fibre che risultano sia parallele che perpendicolari alla superficie dell'articolazione. Tutt'ora infatti non si è ancora ben compreso quale sia l'esatto arrangiamento strutturale degli scaffold nanofibrosi terrea arrivare al miglior risultato di ingegneria tissutale per la cartilagine articolare. Sembra che nel frattempo il mimare alcune delle caratteristiche della ECM nativa potrebbe essere buono

abbastanza/sufficiente per le applicazioni di ingegneria tissutale fino a/nell'attesa che le cellule sviluppino la loro stessa ECM. Per esempio è stato dimostrato che le fibre submicroscopiche favoriscano la condrogenesi, il che è rilevante per la quantità di cartilagine che potrebbe essere prodotta e quindi per la conseguente integrazione nel tessuto ospite [40].

Gli scaffold nanofibrosi per il tessuto cartilagineo sono stati elettrofilati dal chitosano [40,41], chitosano/PEO (90/10) [39], PLGA [42], PLAPEG [42], PCL [8,43], collagene di tipo II [37] e acido ialuronico [4]. Questi materiali supportano la condrogenesi e possono essere seminati sia con i condrociti che con le MSCs e generalmente l'attaccamento cellulare e la loro proliferazione sulle nanofibre elettrofilate risulta aumentata se comparata con le superfici 2D [44]. Le MSCs coltivate su nanofibre elettrofilate. PCL ad orientamento casuale sono andati incontro a condrogenesi in una quantità significativamente maggiore, paragonata con il benchmark high density cell pellet (CP) protocol [43]. Risulta inoltre necessaria per la condrogenesi la presenza del fattore di crescita trasformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e morfologie cellulari simili sono ottenute con entrambi i sistemi di coltura.

Scaffold elettrofilati incrociati di collagene di tipo II forniscono un ambiente favorevole per la crescita de i condrociti e per la loro infiltrazione in vitro [37]. Le miscele chitosano/PEO (90:10) sono state elettrofilate per produrre fibre allineate da 3  $\mu\text{m}$ , che sono state curiosamente collegate a ponte da nanofibre ancora più piccole, formate probabilmente dal processo di dissipazione del carico [41]. La proliferazione dei condrociti sugli scaffold elettrofilati somigliava a strati appiattiti a 3-7 giorni di coltura (2.25MPa comparato con 1.19 MPa), dimostrando che gli scaffold di chitosano elettrofilato risulterebbero utili per alcune applicazioni da carico.

Finora, la valutazione dei materiali da scaffold per l'ingegneria tissutale cartilaginea sono stati correlati alla biocompatibilità e alla promozione della proliferazione e infiltrazione cellulare. Sebbene ci siano tutta una serie di risultati positivi derivanti da questa ricerca, ci sono ancora alcune grosse limitazioni che devono essere comprese e superate. In generale uno scaffold elettrofilato con questo tipo d'applicazione verrebbe utilizzato per supportare la rigenerazione e non quindi per un impianto permanente. Comunque, per raggiungere con successo quest'obiettivo, la maggiore sfida/conferma va trovata nella resistenza allo stress di compressione in vivo. Sarà necessaria molta altra ricerca per raggiungere l'integrazione dello scaffold all'interno dei confini tra l'impianto e il tessuto circostante, così come l'attecchimento dell'impianto, o del tessuto una volta che lo scaffold si è degradato in osso. Questo potrebbe richiedere lo sviluppo di avanzati di scaffold "compositi"; per esempio, l'incorporamento di hydrogels all'interno dei materiali elettrofilati per supportare gli stress complessivi o l'inclusione di nano composti all'interno delle fibre elettrofilate al fine di rinforzarle.

### **Conclusioni**

L'Electrospinning offre una rapida e conveniente via di produrre scaffold con elementi in scala nanometrica ed è stato utilizzato per tutta una grande varietà di sistemi polimerici e sforzi/imprese/operazioni nell'ingegneria tissutale.

L'electrospinning permette di realizzare su misura materiali per ogni specifica applicazione e ambiente cellulare. Comunque, rimane tuttora largamente sconosciuto quale sia il migliore diametro delle fibre o la distanza interfibra, per rendere ottimale la funzione cellulare. Questo risulta confuso dal fatto che gli ambienti nanofibrosi

elettrofilati sono abbastanza complessi, e che il cambiamento anche di un solo parametro come il diametro della fibra o il suo allineamento porti automaticamente a cambiare la distanza interfibra, che può influenzare a sua volta la migrazione cellulare.

Molte cellule rispondono diversamente quando soggette a fibre nanometriche in una disposizione 3D, comparate con superfici lisce 2D. Questa risposta, come spesso riferito dalla letteratura, è stato semplicemente attribuito alle similitudini con l'ambiente naturale della ECM. A prescindere che questo sia completamente vero o meno, si sa che esistono cellule in una nicchia 3D e che questi interagiscono con componenti della ECM al livello nanometrico. Solo ora si stanno iniziando a capire i meccanismi sottostanti per un'aumentata risposta cellulare alle nanostrutture, e questo usando delle superfici nanostrutturate altamente regolari e riproducibili ad es., usando il microimprinting [45].

Trasferire comunque le nozioni apprese da questi sistemi-modello agli scaffold elettrofilati 3D altamente complessi è il prossimo passo per quanto riguarda lo sviluppo della tecnica di electrospinning nell'ambito dell'ingegneria tissutale.

Il bisogno di potenziare le proprietà biomeccaniche degli scaffold elettrofilati è fondamentale ed è finora il maggiore ostacolo che gli ingegneri tissutali stanno cercando di superare. Questo ha portato i ricercatori a investigare su fibre composite polimero-ceramiche e trattamenti termali per potenziare il legame tra le fibre [46].

Potrebbe essere richiesto sviluppare scaffold 3D che incorporino strutture stratificate, ad es. strati di fibre allineate e casuali che possono fornire nicchie cellulari tanto quanto regioni per guida da contatto (contact guidance). Dal momento che inoltre si è dimostrato che il diametro delle fibre [23] e la funzionalizzazione della superficie

[47] ha effetto sulla differenziazione delle cellule staminali, si potrebbero prontamente produrre scaffold con gradiente di fibre attraverso la profondità dello scaffold usando l'electrospinning per realizzare strutture tissutali più complesse.

Comunque, volendo guardare più avanti, esiste una chiara necessità per una maggiore ricerca riguardo agli effetti dell'architettura, funzionalizzazione e proprietà di interfaccia delle nanofibre 3D sul comportamento cellulare.

## **Bibliografia**

- [1] Stevens, M.M. and George, J.H. (2005). Exploring and Engineering the Cell Surface Interface, *Science*, 310: 1135–1138.
- [2] Teo, W.E., He, W. and Ramakrishna, S. (2006). Electrospun Scaffold Tailored for Tissue Specific Extracellular Matrix, *Biotechnology Journal*, 1: 918–929.
- [3] Ma, Z., Kotaki, M., Inai, R. and Ramakrishna, S. (2005). Potential of Nanofiber Matrix as Tissue-Engineering Scaffolds, *Tissue Engineering*, 11: 101–109.
- [4] Chiu, J.B., Luu, Y.K., Fang, D., Hsiao, B., Chu, B. and Hadjiargyrou, M. (2005). Electrospun Nanofibrous Scaffolds for Biomedical Applications, *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 1: 115–132.
- [5] Nisbet, D.R., Pattanawong, S., Ritchie, N.E., Shen, W., Finkelstein, D.I., Horne, M.K. and Forsythe, J.S. (2007). Interaction of Embryonic Cortical Neurones on Nanofibrous Scaffolds for Neural Tissue Engineering, *Journal of Neural Engineering*, 4: 35–41.
- [6] Dalton, P.D., Klee, D. and Møller, M. (2005). Electrospinning with Dual Collection Rings, *Polymer*, 46: 611–614.
- [7] Huang, Z.-M., Zhang, Y.-Z., Kotaki, M. and Ramakrishna, S. (2003). A Review on Polymer Nanofibers by Electrospinning and Their Applications in Nanocomposites, *Composites Science and Technology*, 63: 2223–2253.
- [8] Li, D., Wang, Y. and Xia, Y. (2003). Electrospinning of Polymeric and Ceramic Nanofibers as Uniaxially Aligned Arrays, *Nano Letters*, 3: 1167–1171.
- [9] Knight, B., Laukaitis, C., Akhtar, N., Hotchin, N.A., Edlund, M. and Horwitz, A.R. (2000). Visualizing Muscle Cell Migration In Situ, *Current Biology*, 10: 576–585.

- [10] Griffith, L.G. and Swartz, M.A. (2006). Capturing Complex 3D Tissue Physiology In Vitro, *Nature Reviews: Molecular Cell Biology*, 7: 211–224.
- [11] Nur-E-Kamala, A., Ahmeda, L., Kamala, J., Schindlerb, M. and Meinersa, S. (2006). Three-Dimensional Nanofibrillar Surfaces Promote Self-Renewal in Mouse Embryonic Stem Cells, *Stem Cells*, 24: 426–433.
- [12] Schindler, M., Ahmed, I., Kamal, J., Nur-E-Kamal, A., Grafe, T.K., Chung, H.Y. and Meiners, S. (2005). A Synthetic Nanofibrillar Matrix Promotes In Vivo-Like Organization and Morphogenesis for Cells in Culture, *Biomaterials*, 26: 5624–5631.
- [13] Nisbet, D.R., Yu, L.M.Y., Zahir, T., Forsythe, J.S. and Shoichet, M.S. (2008). Characterization of Brain-Derived Stem Cells on Electrospun Poly( $\epsilon$ -Caprolactone) Submicron Scaffolds: Evaluating Their Potential in Neural Tissue Engineering, *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition*, 19: 623–634.
- [14] Yang, S.T. and Ng, R. (2007). A New Dimension to Biomaterials, *Materials Today*, 10: 64.
- [15] Han, D. and Gouma, P.I. (2006). Electrospun Bioscaffolds That Mimic the Topology of Extracellular Matrix, *Nanomedicine*, 2: 37–41.
- [16] Borg, T.K. (2004). It's the Matrix!, *The American Journal of Pathology*, 164: 1141–1142.
- [17] Hoshiba, T., Wakejima, M., Cho, C.S., Shiota, G. and Akaike, T. (2007). Different Regulation of Hepatocyte Behaviors between Natural Extracellular Matrices and Synthetic Extracellular Matrices by Hepatocyte Growth Factor, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*,

85: 228–235.

[18] Murugan, R. and Ramakrishna, S. (2007). Design Strategies of Tissue Engineering Scaffolds with Controlled Fiber Orientation, *Tissue Engineering*, 13: 1845–1866.

[19] Berthiaume, F., Moghe, P.V., Toner, M. and Yarmush, M.L. (1996). Effect of Extracellular Matrix Topology on Cell Structure, Function, and Physiological Responsiveness: Hepatocytes Cultured in a Sandwich Configuration, *The FASEB Journal*, 10: 1471–1484.

[20] Lim SH, Mao HQ. Electrospun scaffolds for stem cell engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews* 61 (2009) 1084–1096

[21] Lutolf M.P, Hubbell J.A. Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering, *Nat. Biotechnol.* 23 (2005) 47–55.

[22] Spradling A, Drummond-Barbosa D., Kai T. Stem cells find their niche, *Nature* 414 (2001) 98–104

[23] Sill T.J., von Recum H.A. Electrospinning: applications in drug delivery and tissue engineering, *Biomaterials* 29 (2008) 1989–2006

[24] Liang D., Hsiao B.S., Chu B. Functional electrospun nanofibrous scaffolds for biomedical applications, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59 (2007) 1392–1412

[25] Spadaccio, C.; Rainer, A.; Trombetta, M.; Vadalá, G.; Chello, M.; Covino, E.; Denaro, V.; Toyoda, Y.; Genovese, J.A. *Ann Biomed Eng.*, **2009**, 37, 1376-89

[26] Rhoades, R. and Pflanzer, R. (1996). *Human Physiology*, 3rd Edn, Saunders College Publishing, Orlando.

- [27] Kimakhe, S., Bohic, S., Larrose, C., Reynaud, A., Pilet, P., Giumell, B., Heymann, D. and Daculsi, G. (1999). Biological Activities of Sustained Polymyxin B Release from Calcium Phosphate Biomaterial Prepared by Dynamic Compaction: An In Vitro Study, *Journal of Biomedical Materials Research*, 47: 18–27.
- [28] Stevenson, S., Emery, S.E. and Goldberg, V.M. (1996). Factors Affecting Bone Graft Incorporation, *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 324: 66–74.
- [29] Goldberg, V.M. and Stevenson, S. (1994). Bone graft options: fact and fancy, *Orthopedics*, 17: 809–810, 821.
- [30] Graves, S.E., Davidson, D., Ingerson, L., Ryan, P., Griffith, E.C., McDermott, B.F., McElroy, H.J. and Pratt, N.L. (2004). The Australian Orthopaedic Association National Joint Replacement Registry, *The Medical Journal of Australia*, 180: S31–34.
- [31]. Shin, M., Yoshimoto, H. and Vacanti, J.P. (2004). In Vivo Bone Tissue Engineering Using Mesenchymal Stem Cells on a Novel Electrospun Nanofibrous Scaffold, *Tissue Engineering*, 10: 33–41.
- [32] Kim, H.W., Song, J.H. and Kim, H.E. (2005). Nanofiber Generation of Felatin-Hydroxyapatite Biomimetics for Guided Tissue Regeneration, *Advanced Functional Materials*, 15: 1988–1994.
- [33] Li, C., Vepari, C., Jin, H.J., Kim, H.J. and Kaplan, D.L. (2006). Electrospun Silk-BMP-2 Scaffolds for Bone Tissue Engineering, *Biomaterials*, 27: 3115–3124.
- [34]. Tuslakoglu, K., Bolgen, N., Salgado, A.J., Gomes, M.E., Piskin, K. and Reis, R.L. (2005). Nano and Micro Fiber Combined Scaffolds: A New Architecture for Bone Tissue Engineering, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 16: 1099–1104.

[35] Badami, A.S., Kreke, M.R., Thompson, M.S., Riffle, J.S. and Goldstein, A.S. (2006). Effect of Fiber Diameter on Spreading, Proliferation, and Differentiation of Osteoblastic Cells on Electrospun Poly(Lactic Acid) Substrates, *Biomaterials*, 27: 596–606.

[36] Woodfield, T.B.F., Malda, J., de Wijn, J., Peters, F., Riesle, J. and van Blitterswijk, C.A. (2004). Design of Porous Scaffolds for Cartilage Tissue Engineering Using a Three-Dimensional Fiberdeposition Technique, *Biomaterials*, 25: 4149–4161.

[37] Shields, K.J., Beckman, M.J., Bowlin, G.L. and Wayne, J.S. (2001). Mechanical Properties of Cellular Proliferation of Electrospun Collagen Type II, *Tissue Engineering*, 10: 1510–1517.

[38] Riesle, J., Hollander, A.P., Langer, R., Freed, L.E. and Vunjak-Novakovic, G. (1998). Collagen in Tissue-Engineered Cartilage: Types, Structure, and Crosslinks, *Journal of Cellular Biochemistry*, 71: 313–327.

[39] Bhattarai, N., Edmondson, D., Veiseh, O., Matsen, F.A. and Zhang, M. (2005). Electrospun Chitosan-Based Nanofibers and Their Cellular Compatibility, *Biomaterials*, 26: 6176–6184.

[40] Subramanian, A., Lin, H.Y., Vu, D. and Larsen, G. (2004). Synthesis and Evaluation of Scaffolds Prepared from Chitosan Fibers for Potential Use in Cartilage Tissue Engineering, *Biomedical Sciences Instrumentation*, 40: 117–122.

[41] Subramanian, A., Vu, D., Larsen, G. and Lin, H.Y. (2005). Preparation and Evaluation of the Electrospun Chitosan/PEO Fibers for Potential Applications in Cartilage Tissue Engineering, *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition*, 16: 861–873.

- [42] Luu, Y.K., Kim, K., Hsiao, B., Chu, B. and Hadjiargyrou, M. (2003). Development of a Nanosturcture DNA Delivery Scaffold Via Electrospinning of PLGA and PLA-PEG Block Copolymers, *Biomaterials*, 89: 341–353.
- [43] Li, W., Tuli, R., Okafor, C., Derfoul, A., Danielson, K.G., Hall, D.J. and Tuan, R.S. (2005). A Three-Dimensional Nanofibrous Scaffold for Cartilage Tissue Engineering Using Human Mesenchymal Stem Cells, *Biomaterials*, 26: 599–609.
- [44] Zhang, Y.-Z., Lim, T.C., Ramakrishna, S. and Huang, Z.-M. (2005). Recent Development of Polymer Nanofibers for Biomedical and Biotechnological Applications, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 16: 933–946.
- [45] Yim, E.K. and Leong, K.W. (2005). Significance of Synthetic Nanostructures in Dictating Cellular Response, *Nanomedicine*, 1: 10–21.
- [46] Lee, S.J., Oh, S.H., Liu, J., Soker, S., Atala, A. and Yoo, J.J. (2007). The Use of Thermal Treatments to Enhance the Mechanical Properties of Electrospun Poly(Caprolactone) Scaffolds, *Biomaterials*, 29: 1422–1430.
- [47] Choi, J.S., Leong, K.W. and Yoo, H.S. (2008). In Vivo Wound Healing of Diabetic Ulcers Using Electrospun Nanofibers Immobilized with Human Epidermal Growth Factor (EGF), *Biomaterials*, 29: 587–596.

## Capitolo 4: Studio sperimentale

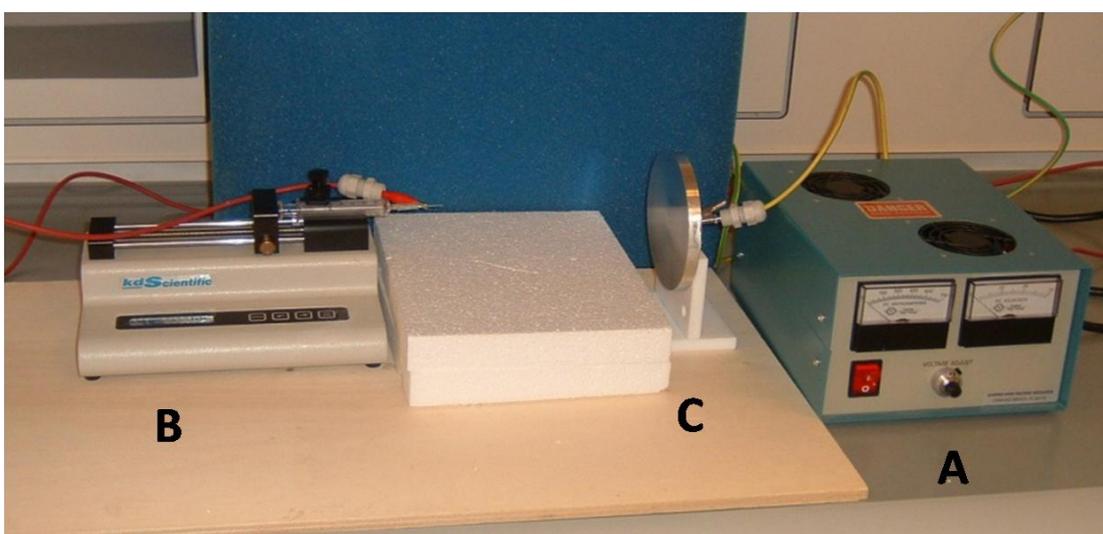
### Membrane di nanofibre di Chitosano puro e Chitosano/Idrossiapatite per applicazioni ortopediche, realizzate con electrospinning: caratterizzazione dei biomateriali e biocompatibilità su cellule staminali umane

#### Materiali e metodi

##### *Setup dell'electrospinning*

Il setup per la realizzazione di nanofibre mediante la tecnica dell'electrospinning è costituito da (Figura 1):

- un generatore di alta tensione (A);
- una pompa volumetrica con siringa dosatrice (Kd Scientific 100), (B);
- un supporto metallico piano di raccolta (target) (C).
- 



**Figura 1:** Setup sperimentale del processo di electrospinning

La pompa volumetrica regola la velocità del flusso della soluzione polimerica contenuta nella siringa. La siringa posizionata sulla pompa, è in vetro (Fortuna Optima). Il target utilizzato per la raccolta delle fibre è un collettore piano). Tale collettore è costituito da una base in teflon (dimensioni: 90 x 70 x 6 mm) e da un piatto di alluminio (diametro 15 cm e spessore 1cm).

### ***Soluzione polimerica per electrospinning***

La realizzazione di scaffolds di chitosano (CS) è stata realizzata tramite electrospinning, partendo da una soluzione di chitosano a medio peso molecolare (MW 190-300 kDa, grado di deacetilazione 75-85%, Sigma, Milwaukee, MI, USA). CS è stato disciolto in una soluzione di acido trifluoroacetico concentrato (TFA, Panreac Quimica, Barcelona, Spain) alla concentrazione di 12.5% w/v in lieve agitazione (Figura 2). La dissoluzione completa del CS è avvenuta in 36h. Il Diclorometano (DCM) (Sigma) è stato quindi aggiunto alla soluzione ad un rapporto volumetrico di 1:4 rispetto al TFA.



**Figura 2:** Soluzione polimerica in agitazione.

Alcune soluzioni di CS in TFA/DCM sono state caricate con nanopolveri di idrossiapatite (HA) all'interno della soluzione polimerica per funzionalizzare le membrane ottenute mediante elettrofilatura. L'idrossiapatite (Sigma-Aldrich), in forma di nanopolvere di colore bianco e peso molecolare 502,31 g/mol e densità 3,140g/cm<sup>3</sup>, è stata aggiunta alla soluzione descritta sopra (dopo la dissoluzione del chitosano) in concentrazione del 5% e del 10% w/w rispetto al chitosano. La soluzione contenente anche l'HA, viene lasciata in agitazione per 30 minuti prima di essere elettrofilata.

#### ***Parametri di electrospinning***

Il processo di electrospinning è stato effettuato a temperatura ambiente utilizzando un apparecchio del tipo DynaSpin (Biomatica, Rome, Italy). La soluzione di CS puro è stata fatta passare attraverso un ago di 23G, la velocità del flusso erogato dalla pompa è stata impostata su 0.1 mL/h, ed elettrofilata verso un collettore piano collegato a terra alla distanza di 15 cm, con un voltaggio di 15 kV. Per le soluzioni di CS/HA (al 5% e 10%), sono stati utilizzati gli stessi parametri appena elencati, ma con velocità di erogazione della soluzione superiore (0.15 mL/h).

#### ***Processo di crosslinking***

La glutaraldeide (GA) è ampiamente usata per migliorare le proprietà strutturali del chitosano e di altri polimeri, unendo con legami atomici incrociati (*crosslinking*, o *reticolazione*) i gruppi amminici [1]. La reazione della glutaraldeide con i gruppi amminici primari per produrre crosslinking è esplorata in molte circostanze per

rilevare la presenza di funzioni organiche dell'ammina libera in residui inorganici ed organici semplici o complessi [2, 3].

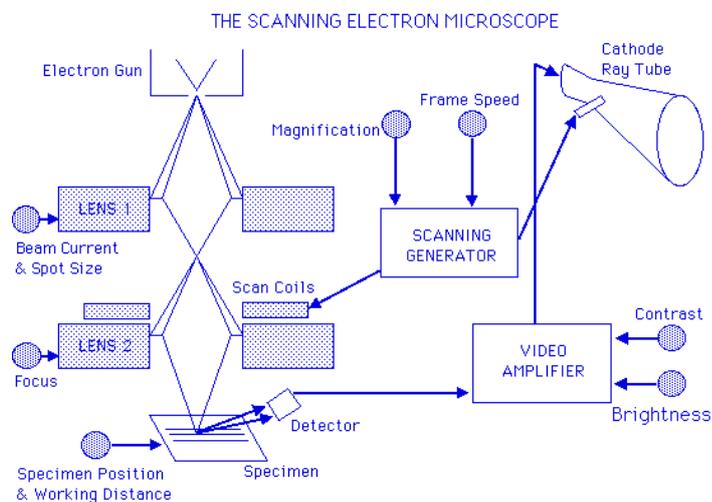
Il meccanismo preciso della reazione e la struttura dei residui chimici formati non sono stati studiati dettagliatamente. Per interpretare questo comportamento, si considerano tre proposte: (a) formazione di solamente una base di Schiff, con un gruppo aldeidico della glutaraldeide, l'altro gruppo aldeidico rimane libero ed è usato per una reazione successiva [4, 5]; (b) crosslinking formato con una molecola di glutaraldeide e due unità di CS, con conseguente formazione di due basi di Schiff che coinvolgono entrambi i gruppi aldeidici della molecola di glutaraldeide; (c) crosslinking formato con glutaraldeide polimerizzata [6, 7].

Le membrane ottenute mediante elettrospinning sono state sottoposte a reticolazione tramite esposizione a vapori di glutaraldeide (Sigma): i campioni sono stati posti in un contenitore in vetro sigillato ed esposti a vapori di soluzione acquosa di glutaraldeide al 25% per 3 ore. Inoltre, sono stati studiati anche campioni sottoposti a crosslinking di 18 e 24 ore.

## Caratterizzazione dei campioni

### Analisi morfologica

L'analisi morfologica dei campioni realizzati è stata realizzata mediante microscopio elettronico a scansione (Figura 3), indicato con la sigla SEM (Scansion Electron Microscope), che fornisce informazioni sull'aspetto, sulla natura e sulle proprietà di superfici e degli strati sottostanti di campioni solitamente solidi, con risoluzione media di 2÷5 nanometri (riferita al segnale "generato" dagli elettroni secondari).



**Figura 3:** Componenti del microscopio a scansione elettronica (SEM)

Per ottenere un'immagine al microscopio elettronico, la superficie di un campione solido è percorsa lungo un *tracciato a reticolo* con un fascio elettronico finemente focalizzato. Un tracciato a reticolo è una forma di scansione simile a quella usata nei

tubi a raggi catodici, in cui un raggio elettronico è fatto scorrere sulla superficie lungo una linea retta orizzontale, riportato alla posizione precedente e traslata verticalmente di un incremento fisso: questo processo è ripetuto finché non è stata indagata tutta l'area prescelta della superficie.

Quando una superficie è "investita" da elettroni ad elevata energia sono prodotti diversi tipi di *segnali*, alla base della microscopia elettronica a scansione sono principalmente due i segnali che interessano: gli elettroni secondari e quelli retrodiffusi (*back-scattered*).

Gli elettroni secondari, o segnale SE (Secondary Electron), sono definiti convenzionalmente come gli elettroni uscenti dal campione con energia minore o uguale a 50 eV. Essi provengono da una profondità di pochi nanometri e scaturiscono dal fascio primario e dall'interazione degli elettroni retrodiffusi con gli elettroni di valenza del campione. Gli SE forniscono informazioni sulla topografia delle superfici e sulla presenza e distribuzione di campi magnetici o elettrici; per rilevarli si fa uso di uno scintillatore/fototubo preceduto da uno stadio acceleratore. L'immagine fornita da tali elettroni appare in rilievo, come se l'osservatore fosse allo stesso livello del diaframma interno e guardasse l'oggetto illuminato da un'ipotetica sorgente situata in corrispondenza del rivelatore.

Gli elettroni retrodiffusi, o segnale BSE (Back-Scattered Electron), sono elettroni di energia maggiore di 50 eV che derivano principalmente dalle interazioni (singole a grande angolo o multiple, elastiche e non) del fascio primario con i nuclei degli atomi del campione. Gli BSE forniscono informazioni riguardo al numero atomico medio della zona di provenienza (circa qualche  $\mu\text{m}$ ), alla topografia e alla struttura cristallina del campione.

I prodotti dell'interazione vengono raccolti da opportuni rivelatori ed i segnali ottenuti, vengono inviati a modulare l'intensità del fascio del tubo a raggi catodici. Il movimento di scansione della sonda e del pennello elettronico del tubo è controllato unicamente da un generatore, che ad ogni posizione della sonda sul preparato ne fa corrispondere una deflitta del pennello sullo schermo del tubo, la cui luminosità dipende quindi dall'intensità del segnale raccolto.

Gli elementi costituenti l'immagine finale prendono il nome di *punti immagine* o *pixels* ( $0.01 \text{ mm}^2$ ). L'ingrandimento ottenuto con un tale sistema ottico, è dato dal rapporto fra la larghezza dello schermo del tubo a raggi catodici e la lunghezza del corrispondente tratto percorso dalla sonda sulla superficie del campione. Il limite alla risoluzione (minima distanza alla quale due punti rimangono distinti) del SEM è dovuto alle dimensioni del diametro geometrico della sonda, migliorabile (a parità di intensità di corrente del fascio, che determina il contrasto) mediante l'uso di sorgenti di alta brillantezza e/o grandi angoli di apertura del cono di elettroni convergenti sulla superficie.

Il sistema ottico dello strumento è costituito da due lenti magnetiche: lente condensatrice e lente obiettivo. La prima (costituita da una o più lenti) serve per il controllo del fascio elettronico che raggiunge l'obiettivo; la seconda determina il fascio di elettroni incidente sulla superficie del campione.

La scansione è eseguita per mezzo di due coppie di bobine elettromagnetiche poste internamente alle lenti dell'obiettivo, queste muovono il pennello elettronico sulle coordinate cartesiane X e Y della superficie del campione tramite il segnale elettrico inviatogli. Tali segnali possono essere sia analogici che digitali; questi ultimi hanno

il vantaggio di consentire un migliore movimento ed un eccellente posizionamento del fascio elettronico.

La progettazione delle camere portacampioni è realizzata in modo da facilitare lo scambio dei campioni facendo variare di poco la pressione da quella ambientale a quella di esercizio. La camera portacampioni inoltre può variare nelle direzioni X, Y e Z, ruotando intorno ad essi, per poter esaminare il campione in ogni punto.

Per i campioni conduttori di elettricità lo studio si presenta più facile, poiché il flusso di elettroni a terra non è ostacolato riducendo al minimo gli inconvenienti dovuti all'accumulo di cariche. Inoltre essendo dei buoni conduttori di calore, la degradazione termica è minima.

La tecnica più diffusa per ottenere immagini SEM da campioni non conduttori, consiste nel rivestire la superficie del campione di un sottile film metallico prodotto per *sputtering* o per evaporazione sotto vuoto (Figura 4). Risulta altresì più semplice rivestire la superficie del campione di un sottile strato di grafite [8].



**Figura 4:** Metallizzatore per campioni non conduttori.

La morfologia delle membrane a base di CS prima e dopo crosslinking è stata osservata tramite *Field Emission Scanning Electron Microscopy* (FE-SEM, Supra 1535, Leo Electron Microscopy, Cambridge, UK), riportato in figura 5.

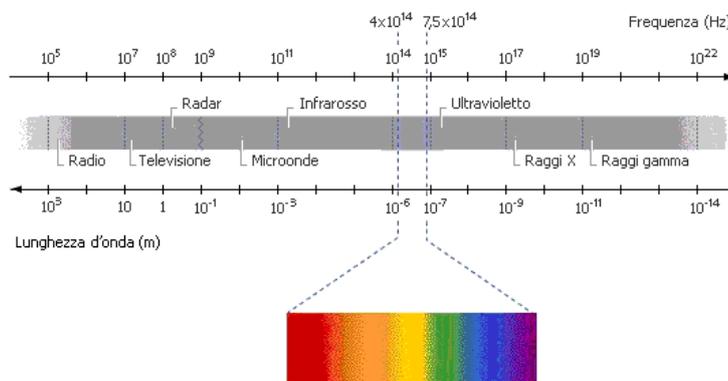


**Figura 5:** FE-SEM, Supra 1535, Leo Electron Microscopy.

Il diametro medio delle fibre e degli opening (distanza tra due fibre adiacenti) delle membrane sono stati calcolati tramite software di analisi dell'immagine (UTHSCSA Image Tool 3.0 version). Il diametro medio delle fibre elettrofilate è stato determinato tramite la media di un campione congruo di diametri di fibre scelte in modo randomico: per definire il range dei diametri delle fibre ottenute, sono stati riportati i diametri minore e maggiore misurati per le varie fibre elettrofilate. Gli openings delle membrane sono stati determinati tramite la media delle distanze fra due fibre adiacenti. Le misurazioni sono state effettuate in triplicato ed i dati sottoposti ad analisi statistica.

### *Analisi ATR/FTIR*

I campioni sono stati analizzati tramite spettroscopia infrarossa. La spettroscopia infrarossa riguarda l'interazione delle molecole del campione analizzato con radiazioni elettromagnetiche. I raggi gamma, i raggi X, la luce ultravioletta, la luce visibile, la luce infrarossa, le microonde e le onde radio sono parte dello spettro elettromagnetico. Poiché la radiazione elettromagnetica si comporta come un'onda che viaggia alla velocità della luce, essa può essere descritta in funzione della sua lunghezza d'onda e della sua frequenza. Le lunghezze d'onda, le frequenze e le energie di varie regioni dello spettro elettromagnetico sono riportate nella seguente figura 6:



**Figura 6:** Spettro elettromagnetico.

La lunghezza d'onda è la distanza tra due qualsiasi punti consecutivi identici su un'onda. La lunghezza d'onda è indicata dal simbolo  $\lambda$  ed è espressa generalmente in metri nel SI.

La frequenza di un'onda è il numero di cicli interi di un'onda che passano attraverso un dato punto in un secondo. La frequenza è indicata con il simbolo  $\nu$  ed è riportata in Hz. Lunghezza d'onda e frequenza sono inversamente proporzionali; l'una può

essere calcolata dall'altra usando la seguente relazione:  $v\lambda = c$ , dove  $c$  è la lunghezza della luce.

Un modo alternativo di descrivere la radiazione elettromagnetica è quello basato sulle sue proprietà come flusso di particelle (fotoni). L'energia in una mole di fotoni è in relazione con la frequenza della radiazione per mezzo dell'equazione:

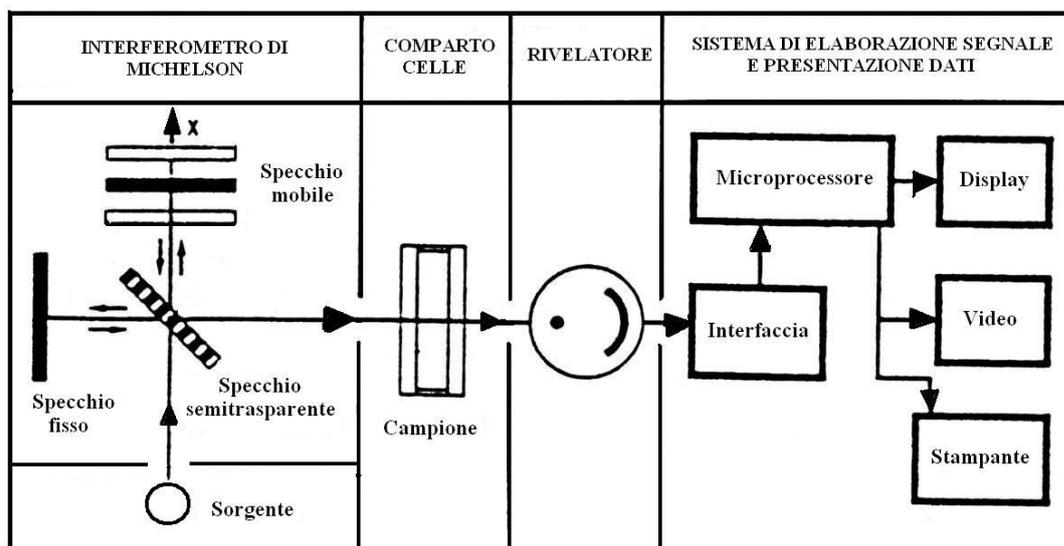
$$E = h \nu = h (c/\lambda)$$

dove  $E$  è l'energia espressa in kcal/mol e  $h$  è la costante di Plank.

Questa equazione ci indica che una radiazione ad alta energia corrisponde ad una bassa lunghezza d'onda e viceversa. In questo modo la luce ultravioletta (energia maggiore) ha una lunghezza d'onda inferiore alla radiazione infrarossa (minore energia).

La spettroscopia molecolare è il procedimento sperimentale attraverso cui vengono misurate le frequenze delle radiazioni assorbite o emesse da particolari sostanze e, successivamente, sono messe in relazione tali frequenze con specifici tipi di strutture molecolari.

Nella spettroscopia infrarossa (IR), un composto viene irradiato con una radiazione infrarossa che causa il passaggio dei legami covalenti da un livello energetico vibrazionale più basso ad uno più alto. Poiché gruppi funzionali diversi hanno differenti forze di legame, l'energia richiesta per provocare queste transizioni varia da un gruppo funzionale ad un altro. In questo modo, nella spettroscopia IR si rilevano i gruppi funzionali dalle vibrazioni dei legami che li costituiscono.



**Figura 7:** Spettrofotometro IR a trasformata di Fourier.

La spettrofotometria in trasformata di Fourier (FT-IR) è una tecnica strumentale basata sulla spettroscopia infrarossa classica. Si tratta di una tecnica recente creata grazie alla computerizzazione del laboratorio strumentale.

Il suo principio di base è rappresentato dalla possibilità di cogliere contemporaneamente tutte le frequenze dello spettro IR nel rivelatore, il che rende superflua la scansione della lunghezza d'onda. Questo è possibile trasformando, per mezzo di un interferometro, la radiazione IR policromatica emessa dalla sorgente (istante per istante con la medesima intensità) in un interferogramma, dove l'assorbimento non è più funzione della frequenza, ma del tempo. Contrariamente agli spettrofotometri tradizionali, quindi, in questa apparecchiatura non si ha un monocromatore a dispersione, ma viene utilizzato l'interferometro di Michelson, il quale produce nel corso di una speciale scansione l'interferogramma della sostanza in esame.

Dopo il passaggio della radiazione così "trattata" attraverso il campione, l'interferogramma viene trasformato dal calcolatore collegato allo strumento in un tradizionale spettro infrarosso mediante un'operazione matematica, la cosiddetta trasformata di Fourier. In questa maniera si passa perciò dall'interferogramma, un grafico dello spazio o del tempo, a uno spettro comune, che rappresenta però la variazione dell'intensità del segnale in funzione della lunghezza d'onda della radiazione.

Una sorgente luminosa ad incandescenza emette un raggio luminoso nel campo dell'IR; tale raggio giunge ad uno specchio semiriflettente (beamsplitter, un cristallo di KBr rivestito di Geranio) che lo divide in 50% ad uno specchio fisso ed un 50% allo specchio mobile. I raggi riflessi da questi specchi sono inviati un'altra volta allo specchio semiriflettente il quale ricongiunge i due raggi e li invia al rivelatore.

Anche se i due raggi hanno raggiunto il rivelatore congiunti essi hanno compiuto un diverso *cammino ottico*: a seconda della differenza del cammino ottico dei due raggi si creano delle interferenze costruttive o distruttive che creano un segnale al rivelatore proporzionale alla differenza di cammino ottico dei due raggi e quindi dalla posizione dello specchio mobile in quell'istante.

In base al movimento del suddetto specchio tutte le radiazioni monocromatiche contenute nella luce emessa dalla lampada danno luogo ad un segnale complessivo di interferenza (interferogramma) che contiene in sé le informazioni riguardanti la frequenza e l'intensità della radiazione emessa.

La trasformata di Fourier, effettuata dal calcolatore dello strumento una volta che il raggio è arrivato al detector, mostra sullo schermo un tradizionale spettro infrarosso,

trasformando il segnale di intensità luminosa in funzione del tempo (spostamento dello specchio) in segnale di intensità in funzione del numero d'onda.

Un requisito fondamentale del FT-IR è quello di ottenere un buon interferogramma, dal quale dipende la precisione dello spettro ottenuto: in altre parole lo specchio mobile deve avere una velocità costante e la sua posizione deve essere nota in maniera esatta in ogni istante. Lo specchio deve inoltre mantenere una planarità costante durante tutto il suo spostamento [9].

La caratterizzazione delle nanofibre elettrofilate prima e dopo il processo di crosslinking è stata effettuata tramite Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infra-Red Spectroscopy (ATR/FTIR). Tale analisi è volta a valutare il grado di deacetilazione del campione, a verificare la modalità con cui è avvenuto il processo di reticolazione delle catene polimeriche ed a valutare la presenza di residui di solvente all'interno dei campioni.

Gli spettri ATR/FTIR sono stati raccolti nel range  $4000\text{--}600\text{ cm}^{-1}$ , con uno spettrofotometro Nicolet Nexus 8700 (Thermo Scientific, Waltham, MA), equipaggiato con una Golden Gate MK2 Diamond Cell (Specac, Orpington, UK), riportato in figura 4.11. Gli spettri sono stati registrati posizionando i campioni sulla cella a temperature ambiente (32 scansioni, risoluzione  $2\text{ cm}^{-1}$ ).



**Figura 8:** Spettrofotometro Nicolet Nexus 8700

### ***Test di biocompatibilità***

Le membrane di nanofibre elettrofilate sono state valutate in termini di citotossicità e proliferazione cellulare utilizzando cellule staminali mesenchimali umane (hMSCs) (cellule al secondo passaggio, Lonza, Basel, Switzerland). Prima di seminare le cellule, le membrane reticolate sono state separate in dischi da 6 mm di diametro e sterilizzate tramite raggi UV.

### **Citotossicità**

La citotossicità è la proprietà di un materiale, o sostanza, di produrre a livello cellulare un qualche effetto tossico che si manifesta sottoforma di deviazioni dalla normale morfologia e funzionalità cellulare. I test di citotossicità rappresentano un metodo di valutazione dei danni biologici provocati dalle sostanze costituenti gli

scaffold tramite l'osservazione degli effetti che queste producono su cellule di mammifero coltivate in vitro in un medium nutriente.

Nel presente lavoro, l'attività citotossica viene valutata mediante la misurazione del rilascio del glucosio 6-fosfato deidrogenasi (G6PD) da parte delle cellule eventualmente alterate o danneggiate dalla presenza del patch. Il rilascio di G6PD nel mezzo di coltura da parte delle cellule è indice della vitalità cellulare e è indice della citotossicità dei campioni analizzati.

Per la citotossicità, le hMSCs sono state seminate in 96-well plates ad una densità di  $3.5 \cdot 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> in  $\alpha$ -MEM (Lonza), addizionato con 10% siero bovino fetale (FBS, Lonza), 1% L-glutamina ed 1% di soluzione di penicillina, streptomina ed amfotericina (Lonza), ed incubate overnight. Per ogni pozzetto, è stato aggiunto un disco di CS, ed è stata valutata la citotossicità a 4, 8 e 24 h tramite Vybrant Citotoxicity Assay Kit (Invitrogen). Tale sistema di valutazione è basato sulla misurazione della Glucosio-6-fosfato Deidrogenasi rilasciata nel medium di coltura dalle cellule che subiscono morte cellulare o apoptosi. Il controllo è stato effettuato su cellule in bianco (nelle stesse condizioni senza le membrane).

### **Proliferazione**

Allo stesso modo, per la proliferazione cellulare, le hMSCs sono state seminate in una multiwell da 96 pozzetti ad una densità di  $7 \cdot 10^3$  cells/cm<sup>2</sup> ed incubate overnight in 200  $\mu$ L di medium di coltura. I dischi di CS sono stati quindi aggiunti al medium di coltura e quindi le cellule sono state poste in coltura per 7 giorni. Il medium è stato cambiato ogni 3 giorni e le colture sono state mantenute in condizioni standard (37°C a 5% CO<sub>2</sub>) in un incubatore umidificato. Le colture di controllo sono state effettuate

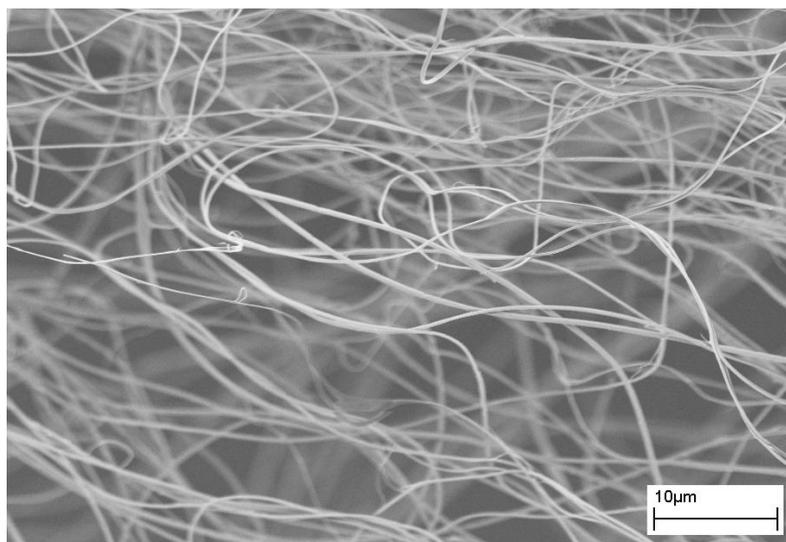
in bianco, senza le membrane. La proliferazione cellulare è stata valutata tramite MTT assay, che si basa sull'attività della deidrogenasi mitocondriale nelle cellule: ad ogni timepoint, i dischi sono stati rimossi e 20  $\mu$ L di 3-(4,5-dimetiltiazolo-2-yl)-2,5-difeniltetrazolo bromide (MTT, Sigma) in soluzione acquosa (5 mg/mL) sono stati aggiunti al medium di coltura. Dopo incubazione per 4 ore, 100 $\mu$ l di dimetil sulfossido (Sigma) sono stati aggiunti ad ogni pozzetto, e l'assorbanza è stata letta a 570nm attraverso lettore di assorbanza (TECAN, Männedorf, Switzerland).

## Risultati

### *Analisi SEM*

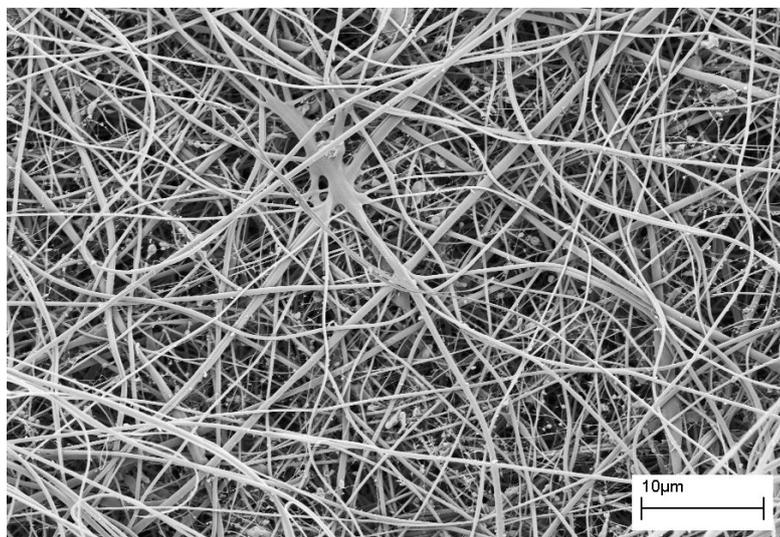
#### **Campioni di chitosano puro elettrofilato**

Le micrografie ottenute tramite analisi SEM hanno mostrato membrane di nanofibre di CS elettrofilato come una rete di fibre sottili, a direzione randomica, senza difetti o beads (Figura 9).



**Figura 9** Micrografia FE-SEM di nanofibre di CS puro elettrofilato.

Il diametro medio delle nanofibre di CS elettrofilato prima del processo di reticolazione, è di  $450 \pm 110$  nm. Il range di diametri varia da 260 a 640 nm, rispettivamente per le fibre di più piccole e grandi dimensioni. La Figura 10 mostra la fotografia SEM delle membrane elettrofilate dopo il processo di crosslinking mediante esposizione a vapori di glutaraldeide per 3h.

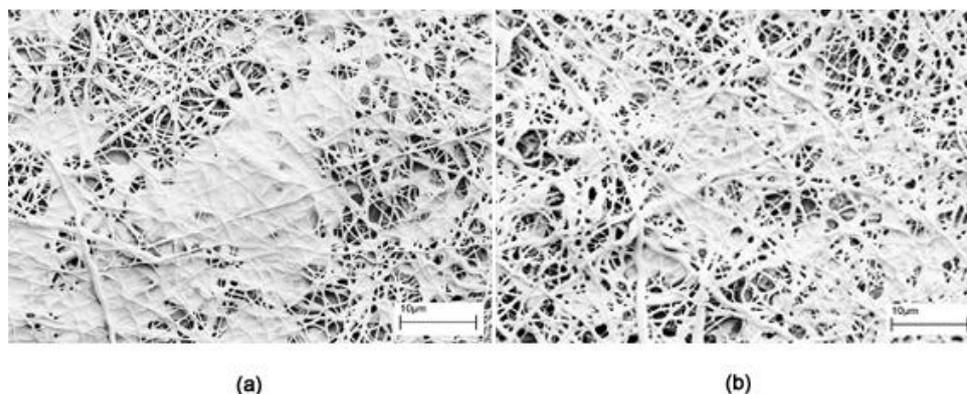


**Figura 10:** Micrografia FE-SEM di fibre elettrofilate di CS puro, dopo cross-linking con vapori di glutaraldeide a temperatura ambiente per 3h.

Dopo il crosslinking (3h), il diametro medio delle fibre è di  $440 \pm 210$  nm, con le fibre più piccolo e più grandi che misurano 290 e 960 nm rispettivamente. Il processo di crosslinking non ha modificato il diametro delle fibre in maniera significativa ( $P > 0.05$ ).

L'analisi tramite software di imaging ha mostrato che i diametri medi degli opening delle membrane sono  $3.16 \pm 1.79$   $\mu\text{m}$  e  $1.22 \pm 0.39$   $\mu\text{m}$ , prima e dopo crosslinking (3h) rispettivamente.

L'influenza del tempo di crosslinking sulla morfologia delle membrane tramite analisi FE-SEM ha mostrato che diversamente da quanto osservato per l'esposizione per 3 ore ai vapori di glutaraldeide, dopo esposizione di 18 and 24 ore (Figure. 11a, 11b, rispettivamente) si apprezza un collasso delle fibre in una morfologia a reticolato, suggerendo che un'esposizione prolungata ai vapori di glutaraldeide non è indicata a mantenere una struttura fibrillare.



**Figura 11:** Micrografia FE-SEM di fibre di chitosano elettrofilate dopo crosslinking con vapori di glutaraldeide a temperatura ambiente per 18 ore (a) e 24 ore (b).

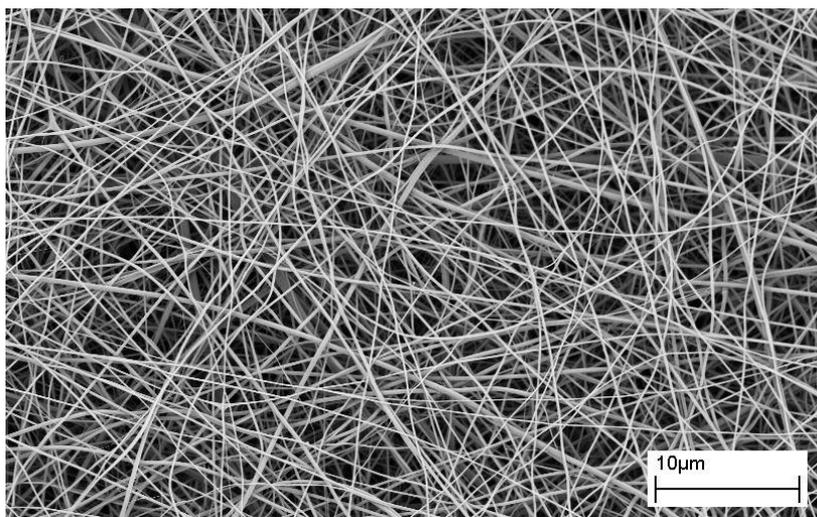
#### **Campioni di CS elettrofilato funzionalizzato con HA**

Dopo l'aggiunta di HA in soluzione, si osserva che la sospensione ottenuta ha viscosità maggiore rispetto alla soluzione polimerica di CS puro precedentemente utilizzata nel processo di electrospinning. Tale differenza ha comportato la modifica del parametro di velocità di erogazione del flusso dalla siringa per ottenere una mesh omogenea di fibre prive di difetti.

Anche con l'aggiunta di HA, in entrambe le percentuali, sono stati ottenute membrane costituite da nanofibre prive di difetti.

Aggiungendo nanopolvere di HA, in entrambe le percentuali, si può osservare una drastica diminuzione del diametro medio delle fibre. Infatti nel caso della membrana elettrospinnata di CS con HA al 5% w/w rispetto al chitosano, riportata in figura 12, il diametro medio delle nanofibre è di  $200 \pm 50$  nm. Il range di diametri varia da 150 a 310 nm, rispettivamente per le fibre di più piccole e grandi dimensioni. L'analisi

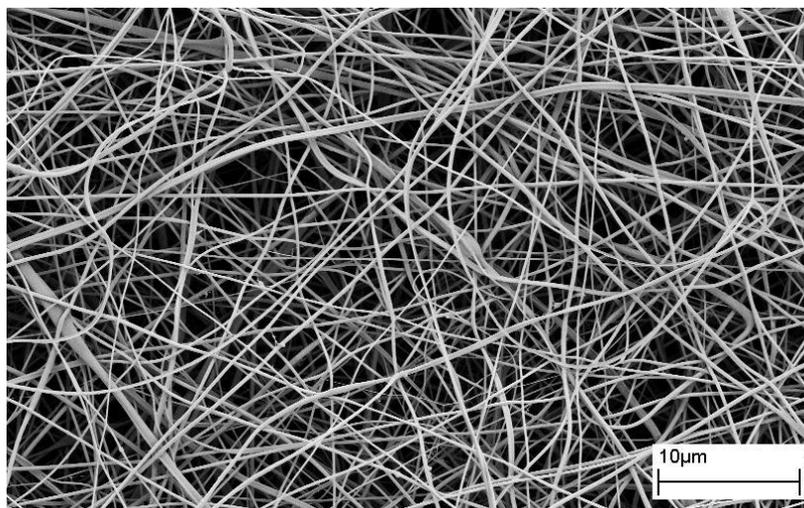
tramite software di imaging ha mostrato che la grandezza media degli opening di tali membrane è  $1.58 \pm 0.49 \mu\text{m}$ .



**Figura 12:** Micrografia FE-SEM di fibre elettrofilate di chitosano con idrossiapatite al 5% w/w rispetto al chitosano.

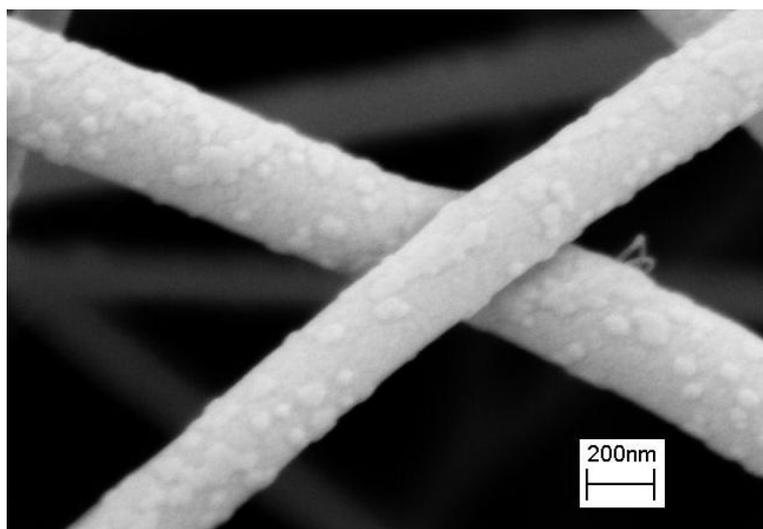
Per quanto concerne la membrana elettrofilata di CS con idrossiapatite al 10% w/w rispetto al chitosano, riportata in figura 13, il diametro medio delle nanofibre è di  $240 \pm 70 \text{ nm}$ . Il range di diametri varia da 190 a 370 nm, rispettivamente per le fibre di più piccole e grandi dimensioni.

L'analisi tramite software di imaging ha mostrato che la grandezza media degli opening di tali membrane è  $2.28 \pm 0.64 \mu\text{m}$ .



**Figura 13.** Micrografia FE-SEM di fibre elettrofilate di CS con HA al 10% w/w rispetto al CS.

Dall'ingrandimento di queste micrografie riportate nelle precedenti figure ed illustrato in figura 14, è possibile notare la presenza di nanoparticelle di HA sulle nanofibre che costituiscono la membrana elettrofilata.



**Figura 14** Ingrandimento di micrografia FE-SEM di fibre elettrofilate di CS con HA al 5% w/w rispetto al CS.

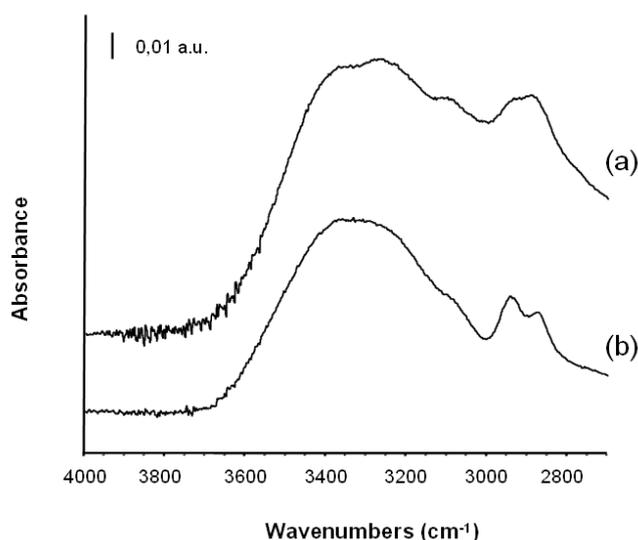
### ***Analisi ATR / FTIR***

L'analisi ATR/FTIR ha permesso di valutare il grado di deacetilazione del campione, l'effetto del crosslinking, ed ha inoltre permesso di identificare il tipo di meccanismo con cui è avvenuto il crosslinking.

Lo spettro ATR/FTIR nella regione di stretching degli OH della membrane elettrofilata di chitosano prima (CS) e dopo il crosslinking con esposizione ai vapori di glutaraldeide per 3 ore (CSX3) sono riportati nelle figure 15a e 15b, rispettivamente. Entrambi gli spettri sono dominati dall'assorbimento del chitosano. Nella regione di stretching degli OH lo spettro CS è caratterizzato da un'ampia banda con due componenti centrate a 3370 e 3260  $\text{cm}^{-1}$ , mentre nel CSX3 è evidente una componente maggiore attorno ai 3330  $\text{cm}^{-1}$ .

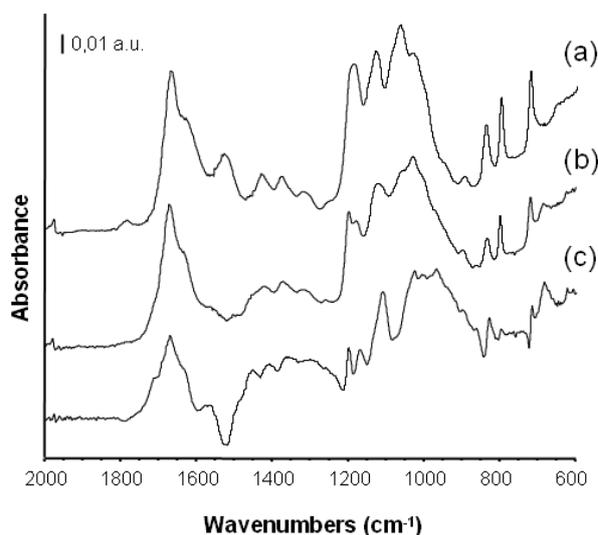
Differenze nei due campioni sono apprezzabili anche nella regione di stretching degli -NH. Il campione CS presenta un assorbimento a 3100  $\text{cm}^{-1}$  dovuto alle vibrazioni stretching  $\nu$  NH dei gruppi (-NH<sub>2</sub>) delle ammine primarie. Nei campioni CSX3 questo segnale era molto minore di intensità, confermando che il processo di reticolazione è avvenuto.

Nel campione CS è presente una banda larga con due componenti a 2940 e 2880  $\text{cm}^{-1}$  dovuta agli stiramenti  $\nu\text{CH}_2$  e  $\nu\text{CH}$ , rispettivamente. L'intensità dell'ultimo segnale è maggiore. Nel campione CSX3, gli  $\nu\text{CH}_2$  diventano predominanti, confermando un aumento dei gruppi metilenici, strettamente associati allo scheletro della glutaraldeide. Nel campione CSX3 l'assenza di glutaraldeide libera è confermata dall'assenza di segnali  $\nu\text{CH}$  tipici dei gruppi aldeidici.



**Figura 15 (a) e (b):** Spettri ATR/FTIR nella regione 4000 – 2700 cm<sup>-1</sup> di membrane di CS elettrofilate prima (a, campione CS) e dopo crosslinking (b, campione CSX3).

Gli spettri dei campioni CS ed CSX3 nella regione dell'impronta digitale sono riportati rispettivamente in figura 16a e 16b. entrambi gli spettri sono dominati dall'assorbimento del chitosano. Per evidenziare e confermare che il processo di crosslinking sia avvenuto, è stato riportato lo spettro di sottrazione di CS da CSX3 in figura 15c. Nello spettro di sottrazione è presente una spalla a 1720 cm<sup>-1</sup>, dovuta allo stiramento del gruppo carbonile, che conferma un crosslinking Michael-type [10] con la formazione di addotti con aldeidi terminali.



**Figura 16 (a), (b) e (c):** Spettro ATR/FTIR nella regione dell'impronta digitale della membrana elettrofilata prima (a, campione CS) e dopo il crosslinking (b, campione CSX3); e spettro di sottrazione (c) = (b)-(a).

Le due componenti a  $1670$  e  $1530\text{ cm}^{-1}$ , presenti nel campione CS, e dovuti a  $\nu\text{NH}_2$  di ammine primarie ( $-\text{NH}_2$ ), sono diminuiti di intensità in CSX3. In particolare, il picco a  $1530\text{ cm}^{-1}$  in CS, è scomparso nel campione CSX3. La perdita di ammine primarie ha confermato l'avvenuta reticolazione. Questo processo ha modificato lo spettro del CS nella regione specifica delle vibrazioni di stretching degli eterociclici. In CSX3 è stato osservato un aumento dell'intensità di queste bande, dovuto all'effetto di attrazione elettronica del legame  $\text{C}=\text{N}$  sul gruppo  $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ . questo effetto è stato osservato a  $1110$  ed a  $970\text{ cm}^{-1}$ (debole).

Si è osservato un altro segnale a  $1170\text{ cm}^{-1}$  dovuto a  $\nu\text{C}=\text{N}$ , che anch'esso conferma l'avvenuto processo di crosslinking.

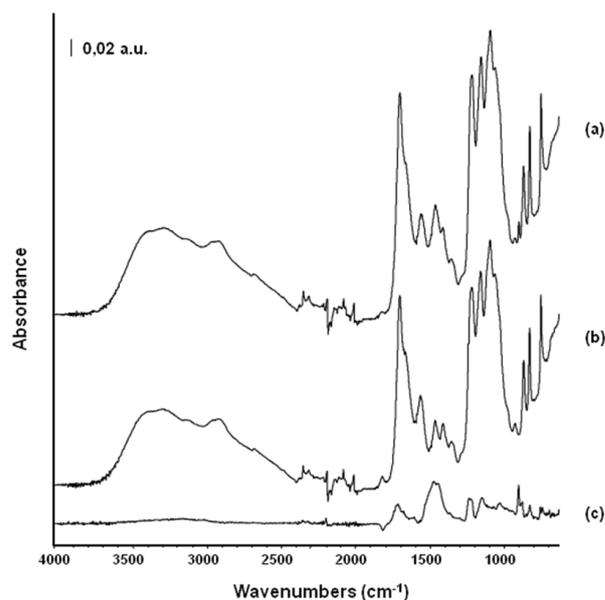
I risultati sopra riportati, confermano che la nostra modalità di sintesi ha permesso di preparare CS con fibre reticolate in due conformazioni: addotti Michael-type con

aldeidi terminali, che portano a formazione di gruppi carbonili, e con formazione di basi di Schiff del tipo delle immine.

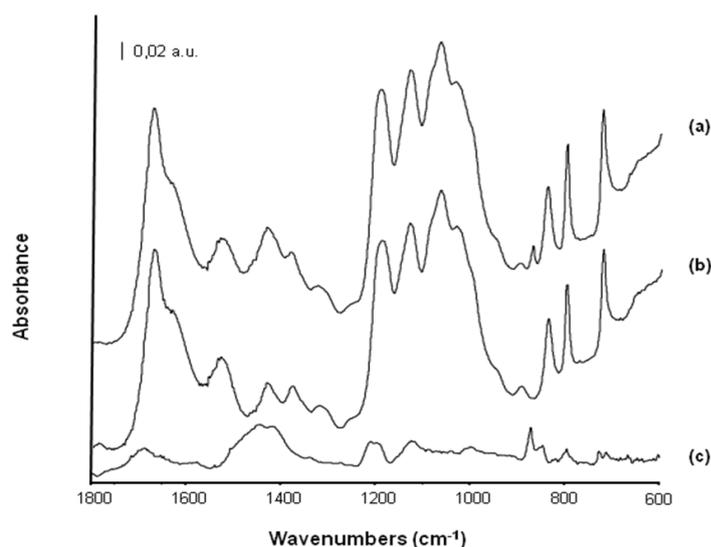
Inoltre, abbiamo osservato un cambiamento nel colore della membrana associato al processo di reticolazione: infatti, il campione CSX3 ha virato da bianco a giallo paglierino dopo esposizione a glutaraldeide. Tale viraggio conferma la formazione di basi del tipo imine di Schiff [11].

Il grado di deacetilazione del campione CS è stato stimato tramite calcolo del rapporto di assorbanza  $A_{1560}/A_{1070}$ , (bande di assorbanza dovute a  $\nu\text{NH}_2$  e  $\nu\text{C-O}$ , rispettivamente) ed ha mostrato un grado di deacetilazione del 70%.

Nelle figure 17 e 18 si riportano gli spettri ATR/FTIR dei campioni di CS con HA (CSHA) al 5% w/w rispetto al chitosano prima del processo di reticolazione. Si è deciso di riportare solamente lo spettro del campione con HA al 5 % w/w e non quello relativo al 10% w/w, in quanto presenta lo stesso tipo di spettro con intensità diverse, proporzionali alla quantità di HA presente nel campione.



**Figura 17 (a), (b) e (c):** Spettro ATR/FTIR della membrana elettrofilata di chitosano con idrossiapatite (a, campione CSHA), della membrana elettrofilata di chitosano puro (b, campione CS); e spettro di sottrazione (c) = (a)-(b).



**Figura 18 (a), (b) e (c):** Spettro ATR/FTIR nella regione dell'impronta digitale della membrana elettrofilata di chitosano con idrossiapatite (a, campione CSHA), della membrana elettrofilata di chitosano puro (b, campione CS); e spettro di sottrazione (c) = (a)-(b).

Gli spettri dei campioni CSHA e CS nella regione dell'impronta digitale sono riportati rispettivamente in figura 4.21a e 4.21b. entrambi gli spettri sono dominati dall'assorbimento del CS.

E' stato, inoltre, riportato lo spettro di sottrazione di CS da CSHA in figura 4.21c. Nello spettro di sottrazione è presente una componente centrata in  $1340\text{ cm}^{-1}$  dovuta allo stiramento del gruppo P=O, presente nella membrana elettrofilata con HA. Tale gruppo funzionale P=O del gruppo fosfato è interessato nella formazione di due legami a idrogeno di diversa natura: uno con l'ossigeno del gruppo ossidrilico ed uno con il gruppo amminico pendente dalla catena polimerica. Infatti, nello spettro di sottrazione si evidenzia una intensa componente centrata a circa  $1680\text{ cm}^{-1}$ , visibile come spalla nello spettro del campione CSHA. Tale intenso assorbimento è attribuibile alle frequenze di deformazione dell'ammina primaria presente nella catena polimerica. Tale maggiore attività rispetto al campione senza HA supporta l'ipotesi precedentemente illustrata relativa alla formazione di legami a idrogeno del gruppo P=O con il gruppo amminico.

A conferma della formazione di legami a idrogeno tra il gruppo fosfato ed i gruppi ossidrilici, si osserva, nello spettro di sottrazione, una banda a due componenti centrata a circa  $1200\text{ cm}^{-1}$ , attribuibile alle vibrazioni del gruppo P=O interessato in legami a idrogeno con i gruppi ossidrilici del polimero.

Si osservano, inoltre, nello spettro di sottrazione, una banda a due componenti centrata in  $1120\text{ cm}^{-1}$  ed una banda centrata in circa  $1000\text{ cm}^{-1}$  che corrispondono alle due componenti del gruppo ionico  $\text{PO}_3^{2-}$  del gruppo fosfato.

La presenza di due categorie di gruppi fosfati coordinati con la catena polimerica conferma l'ottima dispersione delle nanopolveri di ceramico, senza la formazione di cluster che risultano assenti dall'analisi morfologica (analisi SEM), precedentemente riportata. Inoltre, l'assenza di bande relative al gruppo P-O-C alifatico, conferma l'assenza di tale gruppo ed indica la presenza di HA libera nella membrana.

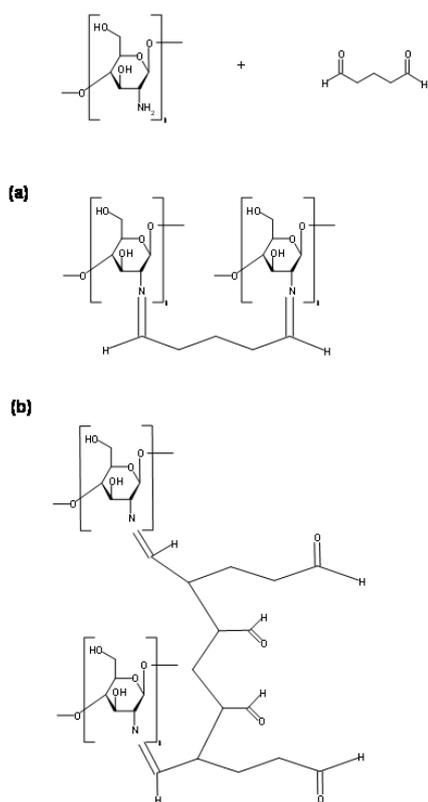
#### ***Test di biocompatibilità delle membrane su hMSCs***

Alle prove di citotossicità, la sopravvivenza cellulare su entrambe le membrane elettrofilate reticolate, sia di chitosano puro che funzionalizzato con HA, è stata maggiore del 90%. Analogamente, nel test di proliferazione cellulare in coltura con entrambe le membrane, si è assistito ad un aumento progressivo del numero di cellule statisticamente significativo al controllo a d7.

## **Discussione**

Nel presente lavoro, si sono realizzate membrane di nanofibre elettrofilate di CS puro e funzionalizzato con HA; tale processo è stato possibile mediante regolazione ed ottimizzazione dei parametri di electrospinning, a partire da una soluzione di chitosano di peso molecolare medio.

L'elettrospinning rappresenta una delle tecnologie emergenti più promettenti per applicazioni in ingegneria tissutale [12]. L'elettrospinning di soluzioni di CS puro è estremamente complesso, in quanto è solitamente associato alla presenza di difetti quali "beads" o pori nelle fibre. Le difficoltà maggiori nell'ottenere una rete di fibre omogenee sono associate prevalentemente alla natura policationica della molecola in soluzione acquosa acida, a dei numerosi gruppi amminici del suo scheletro (schema



1).

**Schema 1:** strutture del chitosano dopo crosslinking con glutaraldeide: (a) Imine Base di Schiff (b) ed addotti con aldeidi terminali Michael-type.

Tale natura policationica aumenta eccessivamente la tensione superficiale della soluzione, ed è pertanto necessaria una elevata forza elettrica per estrarre un getto di polimero dalla soluzione; spesso durante il processo di electrospinning si formano particelle, probabilmente a causa delle forze repulsive fra gruppi ionici nello scheletro del CS [13] una delle maggiori problematiche è la scarsa solubilità del CS e l'alta viscosità della sua soluzione acquosa. A basse concentrazioni di polimero, la soluzione non contiene sufficiente materiale per produrre fibre stabili e solide. Aumentando la concentrazione di polimero, in numero crescente di legami intercatena delle molecole di CS in soluzione aumenta rapidamente e raggiunge un valore critico, formando un network a struttura tridimensionale, un gel ad alta viscosità che non è adeguato per il processo di electrospinning.

Per queste ragioni, il CS è solitamente elettrofilato in associazione con co-polimeri quali il polietilenoossido (PEO), polivinilalcol (PVA), acido polilattico (PLA), fibre di seta (SF), e collagene; inoltre, quale approccio alternativo per aumentare la solubilità e la processabilità del CS, diversi derivati del CS quali l'etanoil chitosano, il chitosano quaternizzato, il N-carbossietilchitosano, e copolimeri di chitosano e L-lattato od oligomeri di polietilenglicole (PEG), sono stati sintetizzati ed elettrofilati senza additivi polimerici [14]. ciononostante, un miglioramento delle tecniche attuali di electrospinning di CS puro e realizzazione di membrane potrebbe potenziarne le applicazioni biologiche in vivo, dato che le fibre di CS elettrofilato sono strutturalmente simili ai glicosaminoglicani della matrice extracellulare (ECM) e matrici di CS nanofibroso potrebbero mimare la ECM, dove le cellule possono aderire, proliferare, e differenziare [15].

Diversi autori hanno descritto la propria tecnica per fabbricare fibre di CS elettrofilato, con risultati variabili a seconda del solvente utilizzato, dell'intensità del campo elettrico e della velocità di elettrospinning [10 - 11, 16-19].

L'acido trifluoroacetico è comunemente utilizzato come solvente per le soluzioni di CS per l'elettrospinning [10, 11, 16,18]. Il diclorometano inoltre viene utilizzato come co-solvente per ottimizzare la rete di fibre e ridurre la presenza di fibre ed artefatti [11, 16]. In letteratura, si ritrovano soluzioni di TFA/DCM a differenti concentrazioni, con rapporti 80/20 e 70/30 v/v come i più diffusi. La nostra soluzione è simile a quella utilizzata da Duan et al [11]; ciononostante, questi autori hanno utilizzato un collettore cilindrico per migliorare la qualità delle fibre elettrofilate e minimizzare gli artefatti. Inoltre, dopo l'elettrofilatura ed il crosslinking con glutaraldeide, le loro fibre erano esposte a 0,1M glicina in soluzione acquosa, e quindi immerse in PBS per 24h, quindi lasciate asciugare overnight a temperatura ambiente.

Tali differenze rendono il processo estremamente più efficace e semplice, inoltre, siamo stati in grado di realizzare membrane praticamente assenti da artefatti o difetti. Gli scaffold nanofibrosi sono stati testati per applicazioni con cellule staminali. In particolare, questi biomateriali elettrofilati sono stati valutati per studi sperimentali sulla riparazione del difetto cartilagineo, dato che possono supportare la differenziazione in vitro verso la linea condrogenica [20]. Inoltre, più recentemente questa tecnologia è stata applicata in vivo su difetti a tutto spessore della cartilagine articolare in modelli suini [21].

Biomateriali a base di CS (con copolimeri) sono già stati testati per applicazioni con cellule staminali per applicazioni sperimentali sia in vivo che in vitro [22-24], in

studi per la riparazione del difetto osteocondrale [23,24] o realizzazione di biomateriali compositi CS/HA [22]. Ciononostante, le hMSCs non sono mai state applicate su membrane di CS puro elettrofilato, ed i nostri dati rappresentano i primi dati di biocompatibilità su questi biomateriali. L'esecuzione di questi test rappresenta uno step fondamentale nella caratterizzazione di questi biomateriali in qualità di scaffold per applicazioni future in medicina rigenerativa che prevedano l'uso di hMSCs. Infatti, la preparazione di questi scaffold prevede l'utilizzo di soluzioni di CS con solventi notoriamente tossici (TFA, DMC). La completa evaporazione di questi solventi durante il processo di elettrospinning è fondamentale per programmare applicazioni biologiche del biomateriale. I nostri risultati suggeriscono che il processo di electrospinning così come descritto non ha alterato la biocompatibilità del chitosano, ed hanno confermato l'assenza di residui di solvente sugli scaffold prodotti, risultato confermato dai risultati dell'analisi spettrofotometrica.

In conclusione, nel presente lavoro è stata ottimizzata una tecnica standardizzabile e riproducibile per produrre membrane reticolate di nanofibre di chitosano puro o composite con idrossiapatite. Il processo non utilizza copolimeri per migliorare la processabilità del polimero mediante elettrofilatura, ma si basa su di un sistema di cosolventi. Le membrane ottenute sono state caratterizzate in termini di morfologia e struttura chimica. La biocompatibilità delle stesse è stata testata su hMSCs, ed i risultati hanno confermato che le membrane elettrofilate sono biocompatibili e pertanto potenziali candidate per applicazioni con cellule staminali in medicina rigenerativa.

Al momento sono in corso studi sul differenziamento delle hMSCs verso le linee cartilaginea ed osteoblastica guidato da questi biomateriali elettrofilati, per definirne il ruolo in applicazioni di ingegneria tissutale in ortopedia.

## Bibliografia

- [1] Rumunan-Lopez C. and Bodmeier R. J. Control. Rel. 1997; 44: 215.
- [2] Berger J., Reist M., Mayer J., Felt O., Peppas N., Gurny R. Eur J Pharm Biopharm 2004;57:19–34.
- [3] Giacomini C., Villarino A., Franco-Fraguas L., Batista-Viera F. J Mol Catal B:Enzym 1998;4:313–27.
- [4] Hardy P. M., Nicholls A. C., Rydon H. N. J Chem Soc Perkin Trans 1972;2:2270–8.
- [5] Cestari A. R., Airoidi C. Langmuir 1997;13:2681–6.
- [6] Ishii H., Minegishi M., Lavitpichayawong B., Mitani T. Int J Biol Macromol 1995;17:21–3.
- [7] Roberts G. A. F., Taylor K.E. Macromol Chem 1989;190:951–60.
- [8] W. D. Callister. Materials Science and Engineering: An Introduction, 7th Edition. 2007 Wiley.
- [9] W. Brown, T. Poon. Introduzione alla chimica organica. 2008 Edises.
- [10] Schiffman, J. D.; Schauer, C. L. Biomacromolecules, 2007, 8, 594 -601.
- [11] Duan, B.; Wu, L.; Yuan, X.; Hu, Z.; Li, X.; Zhang, Y.; Yao, K.; Wang, M. J Biomed Mater Res A, 2007, 83a, 868 - 78.
- [12] Ramakrishna, S.; Fujihara, K.; Teo, W.E.; Lim, T. C.; Ma, Z. An introduction to electrospinning and nanofibers; World Scientific Publishing: Singapore, 2005.
- [13] Min, B.; Lee, S. W.; Lim, J. N.; You, Y.; Lee, T. S.; Kang, P. H.; Park, W. H. Polymer, 2004, 45, 7137–42.

- [14] Lee, K. Y.; Jeong, L.; Kang, Y. O.; Lee, S. J.; Park, W. H. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2009, 61, 1020-32.
- [15] Yusof, N. L.; Wee, A.; Lim, L. Y.; Khor, E. J. *Biomed. Mater. Res. A.*, 2003, 66, 224–32.
- [16] Ohkawa, K.; Cha, D.; Kim, H.; Nishida, A.; Yamamoto, H. *Macromol. Rapid Commun.*, 2004, 25, 1600-5.
- [17] Geng, X.; Kwon, O.; Jang, J. *Biomaterials*, 2005, 26, 5427-32.
- [18] Desai, K.; Kit, K.; Li, J.; Zivanovic, S. *Biomacromolecules*, 2008, 9, 1000–6.
- [19] Klossner, R. R.; Queen, H. A.; Coughlin, A. J.; Krause, W. E. *Biomacromolecules*, 2008, 9, 2947-53.
- [20] Li, W. J.; Tuli, R.; Okafor, C.; Derfoul, A.; Danielson, K. G.; Hall, D. J.; Tuan, R. S. *Biomaterials*, 2005, 26, 599–609.
- [21] Li, W. J.; Chiang, H.; Kuo, T. F.; Lee, H. S.; Jiang, C. C.; Tuan, R. S. *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, 2009, 3, 1–10.
- [22] Jayasuriya, A. C.; Bhat, A. J. *Biomed Mater Res A.*, 2009, [Epub ahead of print].
- [23] Breyner, N. M.; Hell, R. C.; Carvalho, L. R.; Machado, C. B.; Peixoto Filho, I. N.; Valério, P.; Pereira, M. M.; Goes A. M. *Cells Tissues Organs*, 2009, [Epub ahead of print].
- [24] Mrugala, D.; Bony, C.; Neves, N.; Caillot, L.; Fabre, S.; Moukoko, D.; Jorgensen, C.; Noël, D. *Ann Rheum Dis*, 2008, 67, 288-95.