

Politecnico di Torino

Tesi magistrale di Ingegneria Biomedica



**Politecnico
di Torino**

Tesi Magistrale

**Realizzazione di scaffold elettrospinnati a base di
collagene per potenziale rigenerazione cutanea**

Relatrice

Prof.ssa Chiara Vitale Brovarone

Co-relatrice

Dott.ssa Giorgia Montalbano

Candidata

Elisabetta Messina

Anno Accademico 2020/2021

INDICE

ABSTRACT	8
1. INTRODUZIONE	10
1.1 Ingegneria tissutale.....	10
1.2 Rigenerazione di ferite cutanee: Wound Healing.....	14
1.2.1 Struttura dell'apparato tegumentario.....	17
1.2.2 Matrice extracellulare.....	20
1.3 Ingegnerizzazione di scaffold per rigenerazione cutanea.....	22
1.4 Biomateriali per rigenerazione del tessuto cutaneo.....	27
1.4.1 Materiali polimerici.....	28
1.4.1.1 Polimeri sintetici.....	29
1.4.1.2 Polimeri naturali.....	30
1.4.2 Collagene di tipo I.....	31
1.4.2.1 Strategie di reticolazione di sistemi a base di collagene.....	33
1.4.3 Chitosano.....	40
1.5 Fabbricazione di scaffold tramite tecnica di elettrofilatura (electrospinning)	41
1.5.1 La tecnica	43
1.5.2 Scaffold nanofibrosi elettrofilati per rigenerazione cutanea	49
2. MATERIALI E METODI	51
2.1 Preparazione delle soluzioni a base di collagene (20%NCOL in 40% AA).....	51
2.2 Preparazione delle soluzioni di collagene contenenti Rose Bengal (20%NCOL + 0,1%RB in 40% AA).....	52
2.3 Preparazione delle soluzioni a base di collagene e chitosano (COLL/CS in 40%AA).....	52
2.4 Caratterizzazione reologica delle soluzioni.....	53
2.5 Realizzazione delle membrane tramite electrospinning.....	56
2.6 Reticolazione delle membrane elettrofilate.....	58
2.6.1 Reticolazione chimica tramite EDC-NHS.....	59
2.6.2 Fotoreticolazione delle membrane	59

2.7 Test delle ammine libere e spettroscopia UV-VIS	60
2.8 Caratterizzazione morfologica delle membrane tramite microscopia a scansione elettronica (SEM)	61
2.9 Caratterizzazione chimico-fisica	63
2.9.1 Spettroscopia infrarossa FTIR-ATR	63
2.9.2 Caratterizzazione Termica: Analisi Termogravimetrica	64
2.10 Test di degradazione.....	66
3. RISULTATI E DISCUSSIONE	67
3.1 Sviluppo e caratterizzazione di membrane elettrofilate a base di collagene	67
3.2 Sviluppo e caratterizzazione di membrane fotoreticolabili a base di collagene.....	86
3.3 Sviluppo e caratterizzazione morfologica delle membrane a base di collagene e chitosano ...	96
4. CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI.....	101
5. BIBLIOGRAFIA.....	105

LISTA DELLE FIGURE

Figura 1: Schematizzazione degli elementi costitutivi dell'ingegneria dei tessuti [7]	11
Figura 2: Rappresentazione schematica dei diversi passaggi compresi nella ingegnerizzazione di un tessuto [6].....	13
Figura 3: Andamento delle pubblicazioni scientifiche aventi come parole chiave “wound healing” dal 1960 al 2019 effettuata tramite scopus.com.....	15
Figura 4: Rappresentazione delle fasi di rigenerazione cutanea, molecole implicate e loro time line nel processo di guarigione delle ferite [26].....	16
Figura 5: Rappresentazione del tessuto tegumentario [29].....	17
Figura 6: Principali componenti della matrice extracellulare e loro interazioni [25]	20
Figura 7: Rappresentazione struttura molecola di collagene [79].....	31
Figura 8: Schema illustrativo delle diverse tecniche di reticolazione maggiormente utilizzate per scaffold a base di collagene.	35
Figura 9: Meccanismo di reticolazione tramite EDC/NHS [89].....	37
Figura 10: Rappresentazione della reazione di attivazione del Rose Bengal in seguito a irraggiamento con luce verde [87].	39
Figura 11: Composizione Chimica della Chitina e deacetilazione in Chitosano [107]	40
Figura 12: Influenza della morfologia dello scaffold sull'adesione e spreading cellulare [111].....	42
Figura 13: Rappresentazione schematica degli elementi costitutivi del sistema Electrospinning [115]	44
Figura 14: Formazione del cono di Taylor [116].....	45
Figura 15: Immagini SEM) di diverse morfologie delle fibre all'aumentare della viscosità e della concentrazione della soluzione polimerica [122].....	47
Figura 16: Set up dell'electrospinning con differenti collettori: a) Piatto per ottenere fibre con allineamento casuale; b) Cilindro rotante per ottenere fibre allineate [125].....	49
Figura 17: Rappresentazione schematica delle fasi di preparazione della soluzione a base di collagene	Error! Bookmark not defined.
Figura 18: Rappresentazione schematica delle fasi di preparazione della soluzione contenente il fotoinziatore	52
Figura 19: Rappresentazione schematica delle fasi di preparazione della soluzione a base di collagene e chitosano	53
Figura 20: Rappresentazione delle sollecitazioni applicate tramite reometro rotazionale.....	54
Figura 21: Reometro rotazionale DHR-2 utilizzato per le analisi	55
Figura 22: Strumento dell'electrospinning usato per la produzione delle membrane	56

Figura 23: Differenti set-up utilizzati per la realizzazione delle membrane: a) collettore piano; b) collettore cilindrico rotante	58
Figura 24: Reticolazione fisica delle membrane di collagene contenenti fotoiniziatore tramite irraggiamento.	60
Figura 25: Rappresentazione del principio di funzionamento di un dispositivo per microscopia a scansione elettronica [142].....	62
Figura 26: Principio di funzionamento della tecnica di riflettanza totale attenuata (ATR) [143]	64
Figura 27: Rappresentazione schematica dello strumento per analisi termogravimetrica [144]	65
Figura 28: Rampa di flusso della soluzione 20% NCOL in 40%AA.....	69
Figura 29: Immagini SEM delle membrane 20% NCOL in 40%AA ottenute variando la distanza tra emettitore e collettore di: A) 14 cm; B) 12 cm; C) 10 cm; D) 8 cm; E) 6 cm;	70
Figura 30: Parametri ambientali e di processo impostati per l'elettrofilatura su collettore piano delle membrane 20% NCOL in 40%AA	71
Figura 31: Immagini SEM delle membrane al 20% NCOL in 40%AA al variare della velocità di rotazione del collettore cilindrico rotante: A) 200 rpm; B) 400 rpm; C) 600 rpm; D) 800 rpm; E) 1200 rpm; F) 1600 rpm; G) 2000 rpm	74
Figura 32: Istogrammi relativi al diametro medio delle fibre al 20% NCOL in 40% AA al variare della velocità di rotazione del collettore cilindrico rotante.....	75
Figura 33: Immagini SEM degli scaffold 20%NCOL in 40% AA realizzati a seguito di 3 ore di electrospinning su collettore piano (A1, A2), collettore cilindrico rotante (B1, B2), e spessore di un campione realizzato su collettore piano (C).....	76
Figura 34: Immagini SEM delle diverse membrane 20% NCOL in 40%AA (A) pre-reticolazione; B) post-reticolazione tramite EDC/NHS; C) Spessore campioni 20%NCOL in 40%AA -EDC/NHS; .	79
Figura 35: Spettro relativo all'analisi UV-Vis delle membrane di collagene pre e post trattamento con EDC/NHS.....	81
Figura 36: Degradazione idrolitica delle membrane 20%NCOL in 40%AA reticolate tramite EDC/NHS fino a 14 giorni.....	82
Figura 37: Curve termogravimetriche relative ai campioni 20%NCOL pre e post reticolazione EDC/NHS.....	83
Figura 38: Confronto tra gli spettri FTIR delle membrane prima e dopo reticolazione tramite EDC/NHS.....	84
Figura 39: Confronto delle curve di flusso ottenute dalla soluzione prima e dopo l'inserimento del rose bengal.	87

Figura 40: Immagini SEM delle membrane 20% NCOL + 0,1 %RB in 40% AA realizzate tramite 3 ore di electrospinning su: A1, A2) collettore piano; B1, B2) collettore cilindrico rotante.....	88
Figura 41: Immagini SEM delle diverse membrane sottoposte a differenti trattamenti di reticolazione: A) 20%NCOL in 40% AA- EDC/NHS; B) 20%NCOL + 0,1%RB in 40%AA fotoreticolata per 30 min;.....	90
Figura 42: Spettro relativo all'analisi UV-vis di campioni 20%NCOL+ 0,1%RB in 40%AA pre e post reticolazione con diverse tempistiche di irraggiamento.	91
Figura 43: Degradazione idrolitica delle membrane fotoreticolate a diverse tempistiche di irraggiamento e confronto con membrane reticolate con EDC/NHS.	92
Figura 44: Curve termogravimetriche delle membrane 20% NCOL + 0,1%RB in 40% AA pre-reticolazione e post-reticolazione a diverse tempistiche di irraggiamento.	94
Figura 45:Spettri ATR-FTIR delle diverse membrane a base di collagene prima e dopo i diversi trattamenti di reticolazione.....	95
Figura 46: Confronto delle curve di flusso ottenute dalle diverse soluzioni	98
Figura 47: Immagini SEM degli scaffold COLL/CS 95/5 in 40% AA realizzati a seguito di 3 ore di electrospinning su collettore piano (A1, A2), collettore cilindrico rotante (B1, B2), e spessore di un campione realizzato su collettore piano (C).....	99

LISTA DELLE TABELLE

Tabella 1: Molecole principali costituenti l'ECM della cute e loro funzione	21
Tabella 2: Proprietà ideali di scaffold nanofibrosi per applicazioni di wound healing	26
Tabella 3: Distribuzione e funzioni delle diverse tipologie di collagene nella cute [25].....	33
Tabella 4: Parametri di processo per l'elettrofilatura delle soluzioni realizzate.....	57
Tabella 5: Parametri ambientali e di processo impostati per l'elettrofilatura su collettore piano delle membrane 20% NCOL in 40%AA	71
Tabella 6: Valori di diametro medio e deviazione standard delle fibre delle fibre al 20% NCOL in 40%AA al variare della distanza emettitore-collettore	72
Tabella 7: Valori di diametro medio e deviazione standard delle fibre delle fibre al 20% NCOL in 40%AA al variare della distanza emettitore-collettore	73
Tabella 8: Valori del diametro medio e deviazione standard delle fibre delle fibre al 20% NCOL in 40% AA al variare della velocità di rotazione del collettore cilindrico rotante.....	75
Tabella 9: Parametri ambientali e di processo impostati per l'elettrofilatura su collettore piano (A) e cilindrico rotante (B) delle membrane 20%NCOL + 0,1% RB in 40% AA.....	88
Tabella 10: Parametri ambientali e di processo impostati per l'elettrofilatura su collettore piano (A) e cilindrico rotante (B) delle membrane COLL/CS in 40% AA.....	99

ABSTRACT

Negli ultimi decenni, l'ingegneria tissutale ha suscitato grande interesse come strumento alternativo alle più comuni pratiche cliniche nella rigenerazione di diversi tessuti, tra cui quello cutaneo. Il principio alla base di questa disciplina prevede la combinazione di una matrice biodegradabile, lo *scaffold*, con cellule e molecole biologicamente attive, al fine di sviluppare un supporto biomimetico e bioattivo capace di guidare l'attività cellulare. La sintesi di nuovi biomateriali in grado di favorire la rigenerazione di tessuti in seguito a lesioni o condizioni patologiche, e superare le limitazioni delle medicazioni attualmente utilizzate, è uno degli obiettivi primari di questo ramo della medicina rigenerativa. I sostituti ingegnerizzati per *wound dressing* sono emersi come una strategia promettente per un corretto e accelerato processo di guarigione delle ferite che creano spesso condizioni invalidanti per i pazienti. Le caratteristiche dei materiali e dei dispositivi finali utilizzati nella rigenerazione cutanea devono essere multiple, in quanto è necessario sempre garantire non solo un'eccellente biocompatibilità e protezione dei tessuti da infezioni, ma anche capacità di assorbimento degli essudati e un adeguato grado di umidità nel letto della ferita.

In questo scenario, sistemi a base di biopolimeri naturali tra cui il collagene di tipo I hanno dimostrato di essere promettenti per mimare le caratteristiche composizionali e nano-strutturali della matrice extracellulare (ECM) dei principali tessuti, tra cui la cute. Partendo da questi materiali, l'uso di tecniche di elettrofilatura (*electrospinning*) può essere sfruttato per realizzare strutture nanofibrose e porose, capaci di fornire supporto strutturale e meccanico per la corretta rigenerazione del tessuto nel processo di guarigione della ferita.

Sulla base delle precedenti considerazioni, l'obiettivo di questo lavoro di tesi è stato quello di valutare la fabbricazione di membrane nanofibrose a base di collagene di tipo I tramite tecniche di elettrofilatura, in grado di mimare la morfologia dell'ECM dei principali componenti della cute, creando un potenziale strumento a supporto delle diverse fasi di rigenerazione cutanea. Inizialmente, la processabilità di soluzioni di collagene di tipo I in acido acetico è stata valutata ottimizzando i parametri di elettrofilatura e valutando l'uso di diversi collettori (piano e cilindrico rotante), per ottenere membrane omogenee e con diverse morfologie. Tale fase è stata supportata da un'analisi reologica delle diverse soluzioni realizzate. La morfologia, la disposizione e il diametro delle fibre sono stati valutati tramite microscopia a scansione elettronica. Per garantire una migliore stabilità dei costrutti, sono stati valutati gli effetti di due diverse topologie di reticolazione: una chimica tramite l'uso di una soluzione contenente i reticolanti 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimide (EDC) e N-idrossisuccinimide (NHS), e una fisica tramite l'uso di un fotoiniziatore citocompatibile (Rosa

Bengala) sensibile a radiazioni nello spettro visibile. L'effetto dei diversi trattamenti di reticolazione sulle proprietà finali delle membrane è stato analizzato tramite diverse tecniche di caratterizzazione delle proprietà fisico-chimiche e meccaniche. L'effettiva reticolazione del materiale è stata valutata tramite la misura del numero di ammine libere, analisi termogravimetriche e test di degradazione.

Una seconda fase dello studio ha valutato la combinazione di collagene di tipo I e chitosano per migliorare la processabilità del materiale e le caratteristiche finali dei costrutti. Sono state testate diverse concentrazioni di chitosano e la formulazione ottimizzata è stata processata per ottenere membrane nanofibrose, successivamente caratterizzate e confrontate con le precedenti matrici di solo collagene.

1. INTRODUZIONE

1.1 Ingegneria tissutale

Sin dall'antichità, le scienze mediche hanno dovuto affrontare il problema della sostituzione di diversi tessuti e organi, danneggiati a seguito di vari tipi di lesioni traumatiche o a causa di malattie congenite. La necessità di rigenerare e ripristinare questi tessuti ha ragioni oltre che estetiche, funzionali. Tuttavia, a causa della complessità e alta organizzazione istologica dei tessuti, questa incombenza clinica ha rappresentato da sempre una delle sfide più difficili alla quale la medicina è tenuta a rispondere. I grandi progressi della scienza medica e delle tecniche chirurgiche hanno permesso al trapianto di tessuti e organi di diventare una delle principali opzioni per ripristinare le funzioni native di molte parti danneggiate del corpo umano. Ciononostante, essendo la crescente richiesta di trapianti nettamente superiore rispetto all'effettiva disponibilità dei tessuti di donatori utilizzabili, e in seguito a questioni quali problemi immunologici o contaminazione del tessuto donatore, tale pratica ha incontrato diversi limiti [1]. Nel corso degli anni è emersa quindi la necessità di tecniche innovative per ridurre la discrepanza tra fabbisogno clinico e tessuti e organi sani disponibili. In tale scenario all'inizio del ventesimo secolo, grazie allo sviluppo delle biotecnologie, all'affinamento delle tecniche chirurgiche, ed alla nascita di discipline come la tecnologia farmaceutica e l'ingegneria dei materiali, si comincia a delineare una branca specifica delle scienze mediche definita medicina rigenerativa, il cui scopo prefissato non corrisponde più alla sostituzione dei tessuti quanto alla rigenerazione degli stessi. Oggi, la *Food and Drugs Administration* definisce la medicina rigenerativa come l'insieme di tutte le discipline mediche che si propongono di favorire il ripristino biologico, fisiologico e funzionale degli organi o delle parti del corpo umano gravemente compromesse in seguito a traumi di vari natura o a difetti congeniti [2]. La fondamentale distinzione tra le pratiche mediche caratterizzanti la medicina rigenerativa avviene tra pratiche *in vivo* e pratiche *ex vivo*: tra le pratiche mediche *in vivo* si annoverano la terapia cellulare e la terapia genica che si propongono di indurre direttamente nelle cellule dell'organismo umano gli stimoli atti a correggere un eventuale funzione biologica che induce il corretto sviluppo dei tessuti o ne impedisce il ripristino delle proprietà morfologico-funzionali perse [3]. Le pratiche mediche *ex vivo*, invece, hanno lo scopo di sviluppare *in vitro* costrutti biocompatibili funzionali in grado di essere trapiantati in sostituzione dei tessuti nativi danneggiati, per favorirne una temporanea sostituzione e una graduale rigenerazione. Nello specifico, le pratiche mediche *ex vivo* fanno parte di una delle branche della medicina rigenerativa che prende il nome di ingegneria tissutale [4].

L'ingegneria tissutale venne definita per la prima volta nel 1993 da Langer e Vacanti come "un campo interdisciplinare che applica i principi dell'ingegneria e delle scienze della vita per la realizzazione

di sostituti biologici che ripristinino, mantengano o migliorino le funzioni originali di tessuti o organi” [5]. Nell’ultimo ventennio tale approccio ha registrato importanti sviluppi permettendo di migliorare il risultato clinico sui pazienti, pur mantenendo costi contenuti, superando le limitazioni dei trattamenti convenzionali basati sul trapianto d’organo, tramite l’applicazione di tessuti o organi artificiali totalmente creati *in vitro*, non immunogenici ed in grado di ripristinare le funzioni fisiologiche delle aree danneggiate [6]. Gli elementi cardine di cui si avvale l’ingegneria tissutale sono fondamentalmente tre [5], [7]: 1) scaffold; 2) cellule, di differente tipologia in base all’applicazione del costruito finale; 3) segnali regolatori, che possono comprendere fattori di segnalazione, molecole presenti nella nativa matrice extracellulare (ECM). Per rendere lo scaffold biomimetico vengono spesso usate stimolazioni di diversa natura, grazie alla combinazione dei diversi elementi citati precedentemente (Figura 1).

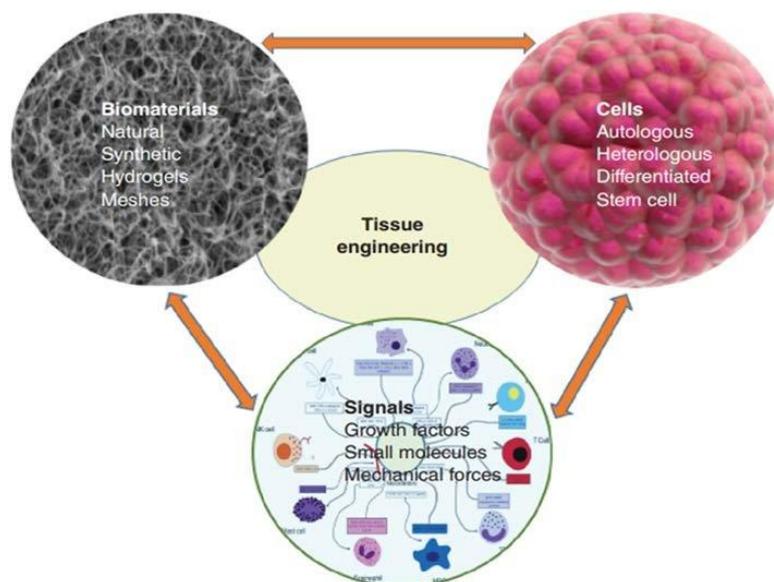


Figura 1: Schematizzazione degli elementi costitutivi dell'ingegneria dei tessuti [7]

Lo *scaffold* rappresenta un’impalcatura tridimensionale che mima l’ECM nativa, che può essere realizzato a partire da macromolecole sintetiche o naturali in grado di rappresentare un ottimale substrato per la coltura cellulare e successivo impianto *in vivo* [8]. Gli scaffold prodotti dovrebbero essere biocompatibili per precludere una risposta immunitaria avversa nell'ospite dopo l'impianto, avere una cinetica di degradazione concomitante con il tessuto di neoformazione e avere proprietà meccaniche simili a quelle del tessuto nativo. È opportuno inoltre che l’architettura che faciliti i processi cellulari come la diffusione, la vascolarizzazione e la rimozione dei prodotti di rifiuto [9]. La stimolazione della produzione di matrice extracellulare da parte delle cellule può essere indotta da

segnali biofisici come quelli applicati da un bioreattore [10], dalla somministrazione di molecole bioattive [11], o dalla microarchitettura e morfologia del substrato stesso [12]. Per quanto riguarda le possibili fonti cellulari, queste includono cellule staminali o cellule derivanti dai tessuti del paziente prelevate tramite biopsia e tipicamente coltivate *ex vivo* sul biomateriale prima dell'impianto [13].

In questo scenario, una delle principali sfide della traslazione dell'ingegneria tissutale alla pratica clinica è la difficoltà di ricreare la complessità dei tessuti e degli organi nativi, in modo da ricreare costrutti in grado di sostituire in tutto e per tutto le funzioni degli organi o tessuti compromessi. I tessuti sono costituiti da cellule e matrice extracellulare, e differiscono tra loro per tipologia, contenuto e organizzazione di questi, ragion per cui queste differenze devono essere attentamente prese in considerazione per una corretta scelta dei biomateriali e per progettare scaffold in grado di adempiere ad una specifica applicazione. L'approccio medico su cui si basa l'ingegneria tissutale comprende una serie di passaggi sequenziali, riportati in Figura 2:

- 1) Studio anatomico e fisiologico del tessuto da rigenerare;
- 2) Isolamento e coltura delle cellule del tessuto interessato;
- 3) Produzione di un biomateriale con caratteristiche morfologiche e chimico-fisiche simili a quelle del tessuto da rigenerare;
- 4) Coltura *in vitro* delle cellule sul biomateriale per l'ottenimento di un tessuto bioingegnerizzato;
- 5) Impianto del costrutto *in vivo* [14].

Tuttavia, le strategie adottabili per la rigenerazione di tessuti persi, danneggiati o malati, sono varie e altamente dipendenti dal tessuto d'interesse, il quale determina il tipo di approccio scelto.

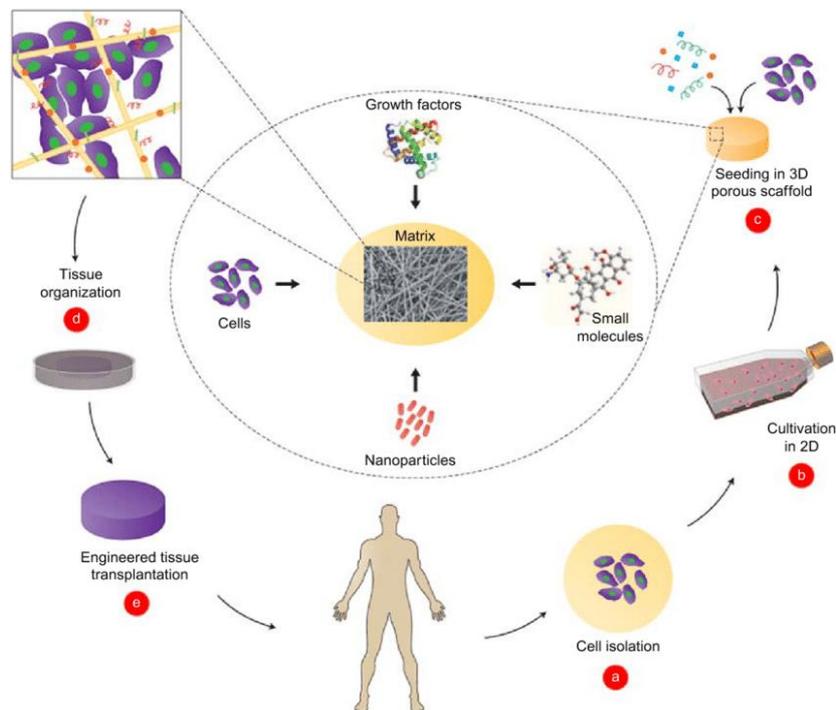


Figura 2: Rappresentazione schematica dei diversi passaggi compresi nella ingegnerizzazione di un tessuto [6]

In questo approccio, l'elemento fondamentale per un corretto esito clinico è quindi lo scaffold [15], il cui impiego varia in base all'applicazione prevista, ma che negli approcci più comuni viene utilizzato per l'inseminazione di cellule previo impianto, o per la creazione di tessuti *in vitro* e successivo impianto di scaffold senza cellule per supportare il crosstalk fisiologico e favorire la rigenerazione tissutale in situ. Quale che sia la scelta, lo scaffold deve fornire una struttura tridimensionale che supporti la crescita di nuovo tessuto al suo interno con proprietà simili al tessuto che deve essere sostituito.

Mentre l'ingegneria tissutale d'organo, ossia quella che tenta di produrre *in vitro* organi integralmente funzionali, è ancora una disciplina in fase di sviluppo con pochi risvolti positivi in fase applicativa, l'ingegneria tissutale mirata alla rigenerazione dei tessuti connettivali ed epiteliali è ormai una realtà affermata in campo scientifico e clinico-applicativo. Essendo questi tessuti dotati di una precisa configurazione spaziale, la produzione del tessuto bioingegnerizzato deve essere in grado di replicarla *in vitro* per permettere alle cellule di crescere e distribuirsi correttamente nello spazio formando un tessuto quanto più simile a quello nativo da rigenerare [8]. Rigenerare un tessuto significa infatti ricrearne le caratteristiche morfologiche e funzionali in grado di riattivare la funzione primaria alla quale il tessuto stesso è preposto.

1.2 Rigenerazione di ferite cutanee: Wound Healing

La guarigione delle ferite cutanee, o ulcere, rappresenta una sfida continua per gli operatori sanitari impegnati in ambito vulnologico nonché un grave onere per i sistemi sanitari di tutto il mondo, essendo una procedura di routine nella pratica medica facilmente soggetta a complicanze in grado di causare ritardi nella guarigione con conseguente aumento del carico clinico ed economico per il Sistema Sanitario Nazionale [16]. Il termine ulcere cutanee indica delle lesioni caratterizzate da una mancanza di cicatrizzazione spontanea, caratteristica dovuta a diversi fattori, tra cui patologie come quelle vascolari, il diabete e, più in generale condizioni che causano l'allettamento del paziente [17]. La crescente attenzione su questo tipo di ferita è dovuta alla natura estremamente invalidante per i pazienti, che sono infatti soggetti a forti dolori e spesso gravi conseguenze, tra cui amputazioni e nei casi più gravi anche decesso. Stime epidemiologiche condotte a livello internazionale evidenziano che il numero di persone affette da piaghe da decubito, ulcere degli arti inferiori, lesioni del piede in presenza di diabete e deiscenze di ferite traumatiche e/o chirurgiche è estremamente elevato. Negli Stati Uniti ogni anno si contano circa 6,5 milioni di ulcere cutanee croniche da pressione, da stasi venosa e da diabete mellito [18]. Numeriche epidemiologiche di queste dimensioni hanno conseguenze economiche di estrema rilevanza tanto che si stima che il Sistema Sanitario Americano investa per i processi di guarigione di ferite croniche circa 15 miliardi di dollari all'anno [18]. Nel Regno Unito invece uno studio (rapporto THIN, *The Health Improvement Network*, 2012-2013), ha evidenziato che, in termini economici, la gestione delle ulcere cutanee si aggira intorno ai 4/5 miliardi di sterline all'anno, equivalente al 4% circa dei costi totali del Sistema Sanitario Anglosassone, percentuale destinata a crescere costantemente con l'invecchiamento della popolazione [19]. Un'analisi condotta dallo stesso gruppo di ricerca ha mostrato inoltre che una ferita con guarigione spontanea costa al sistema sanitario tra le 698 e le 3.998 sterline per paziente, mentre il costo di una mancata guarigione di ulcere croniche oscilla tra 1.719 e 5.976 sterline a paziente [20], a evidenza del fatto che il costo sanitario è in media del 135% più elevato di quello di una ferita con corretta guarigione. In Italia circa 2 milioni di individui sono affetti da tali patologie e rappresentano una componente importante della spesa del Servizio Sanitario Nazionale. L'impatto sociale delle patologie ulcerative (coinvolgenti oltre 600.000 famiglie) è tra i più alti e rappresentano una delle patologie più diffuse nel panorama sanitario mondiale. Il costo annuale per il sistema sanitario italiano è stimato superiore a 1,5 miliardi di euro [21]. L'impatto che questo tipo di lesioni ha sul bilancio economico del Servizio Sanitario Nazionale ha portato negli ultimi anni, come mostrato nel grafico in Figura 3, la ricerca ad evolversi e trovare strategie innovative per migliorare l'efficienza e la rapidità delle terapie per il trattamento delle ferite e favorire una completa rigenerazione dei tessuti lesi.

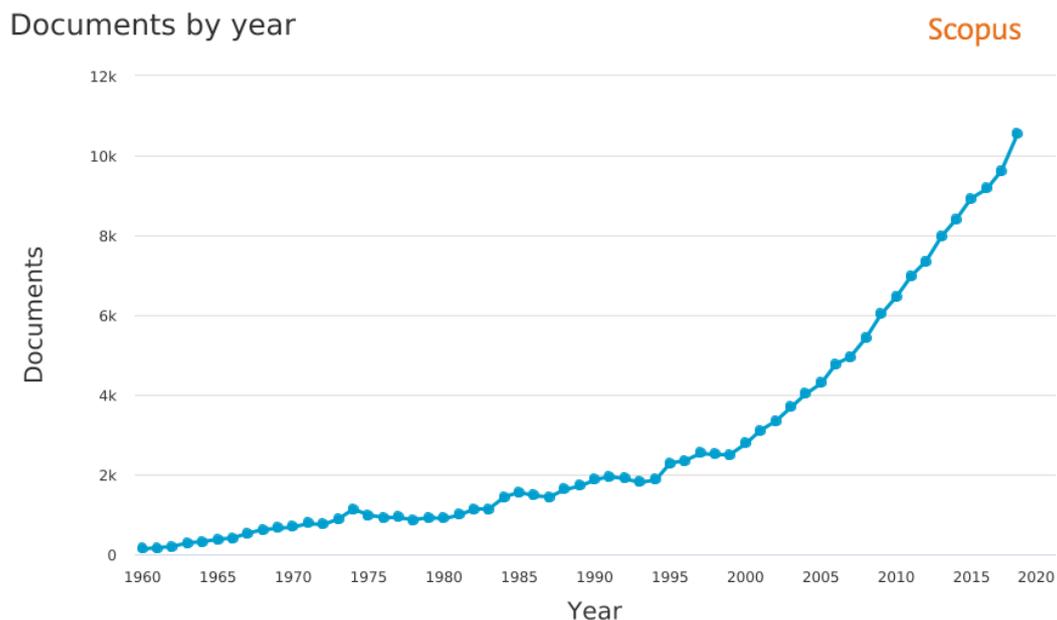


Figura 3: Andamento delle pubblicazioni scientifiche aventi come parole chiave “wound healing” dal 1960 al 2019 effettuata tramite scopus.com.

La rigenerazione dell’apparato tegumentario, o cute, tipicamente detta *wound healing* è comunemente descritta come un processo delicato costituito da quattro fasi sovrapposte e coordinate [22]: emostasi, infiammazione, proliferazione e rimodellamento, rappresentate in Figura 4. Si tratta di una serie orchestrata di eventi che include segnali molecolari, cellulari e sub-cellulari e che prevede la migrazione e la proliferazione delle cellule, così come la deposizione di nuova ECM, la formazione di nuovi vasi sanguigni (angiogenesi) e il rimodellamento del tessuto neoformato [23-24]. In questa serie ordinata di eventi, i fattori di crescita quali il FGF (fattore di crescita dei fibroblasti), VEGF (fattore di crescita delle cellule endoteliali vasali) e EGF (fattore di crescita delle cellule epiteliali), giocano un ruolo fondamentale nella corretta stimolazione della proliferazione e differenziazione cellulare.

In seguito ad una lesione, il processo di riparazione cutanea inizia con il fenomeno di emostasi in cui l'emorragia è controllata dall'aggregazione delle piastrine nel sito della lesione. La successiva formazione del coagulo di fibrina arresta l'emorragia e fornisce un'impalcatura per l'attacco e la proliferazione delle cellule [25]. La seconda fase, la fase infiammatoria primaria, inizia al momento stesso della lesione, quando l'attivazione della cascata della coagulazione provoca un rilascio di citochine che stimolano la chemiotassi dei neutrofilii seguiti dai macrofagi nella ferita per il “*debridement*” (rimozione di materiale necrotico) precoce della ferita. Dopo tre giorni successivi al processo infiammatorio inizia la fase proliferativa. I fibroblasti vengono attratti nella ferita per sintetizzare il tessuto di granulazione. Questo tessuto di granulazione è composto da collagene, elastina, proteoglicani e acido ialuronico e consente la crescita di nuovi vasi sanguigni che forniscono

nutrimento e ossigeno al tessuto in crescita e consentono ai leucociti di entrare nel sito della ferita. I cheratinociti forniscono il principale componente cellulare della barriera più esterna all'ambiente e servono a ripristinare la funzione barriera della pelle. Una volta chiusa la ferita, la cicatrice immatura può passare alla fase di rimodellamento finale. Le molecole della ECM deposte durante la fase proliferativa in maniera disorganizzata vengono riallineate e reticolate. Questa fase di rimodellamento può durare fino ad un anno a seconda della gravità della ferita, che nel tempo si contrae gradualmente per ritrovare la sua integrità [23].

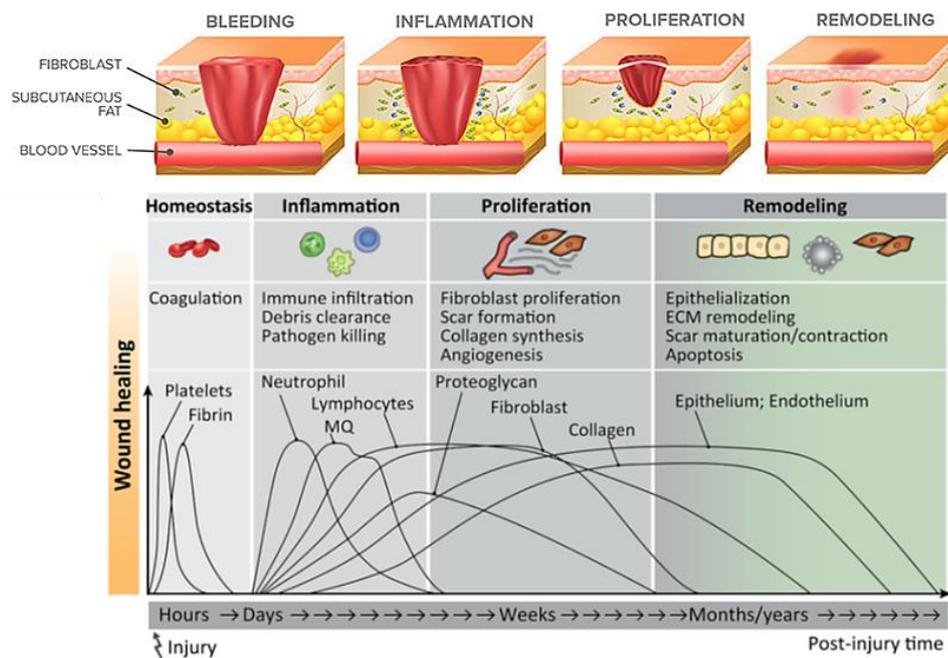


Figura 4: Rappresentazione delle fasi di rigenerazione cutanea, molecole implicate e loro time line nel processo di guarigione delle ferite [26]

Il fallimento di una qualsiasi di queste fasi può portare le ferite a diventare croniche e ad avere un'anormale cicatrizzazione. Le ferite croniche, come precedentemente descritto, influiscono notevolmente sulla qualità della vita dei pazienti, poiché richiedono trattamenti ripetuti e comportano costi medici considerevoli. Pertanto, notevoli sforzi sono stati concentrati nella ricerca di nuovi approcci terapeutici per il trattamento delle ferite e sebbene il problema sussista e venga studiato già da diversi anni, manca ancora una sua ottimale risoluzione. La complessità della struttura della pelle, che permette all'organo di svolgere numerose funzioni vitali, risulta essere allo stesso tempo di difficile replicazione in laboratorio nella creazione di sostituti cutanei non solo biologicamente compatibili, ma soprattutto funzionalmente efficienti. In particolar modo vascolarizzazione ed innervazione del neo-tessuto sono fattori critici per questi costrutti. I fattori da tenere in considerazione per la realizzazione di un sostituto ingegnerizzato cutaneo sono quindi molteplici e dipendenti dalla complessità dell'organo da sostituire, di seguito descritto, e per comprendere più a

fondo come avviene il meccanismo di guarigione, è opportuno illustrare la complessa struttura stratificata della cute umana.

1.2.1 Struttura dell'apparato tegumentario

La cute (o tegumento) è un organo complesso che ricopre l'intera superficie corporea e svolge diverse funzioni, tra le quali la principale è quella di barriera fisica tra il corpo umano e l'ambiente circostante: si tratta infatti della prima linea di difesa dell'organismo contro eventuali aggressioni esterne da parte di agenti patogeni e microorganismi [27]. Permette, e allo stesso tempo limita, il passaggio da e verso l'organismo di acqua ed elettroliti ai fini di mantenere il giusto equilibrio idrico dei tessuti e di altre sostanze che conferiscono protezione contro microorganismi, radiazioni ultraviolette e agenti tossici. Grazie al suo ruolo fondamentale e alla sua complessità, la cute rappresenta uno tra i più complicati campi di applicazione dell'ingegneria tissutale. La cute è anatomicamente costituita da tre strati, diversi per localizzazione, struttura e proprietà, come visibile in Figura 5. Partendo dalla superficie ed arrivando in profondità si trovano epidermide, derma e ipoderma (o strato sottocutaneo) [28]. Completano la struttura dell'apparato tegumentario i cosiddetti annessi cutanei, che comprendono ghiandole, e terminazioni nervose.

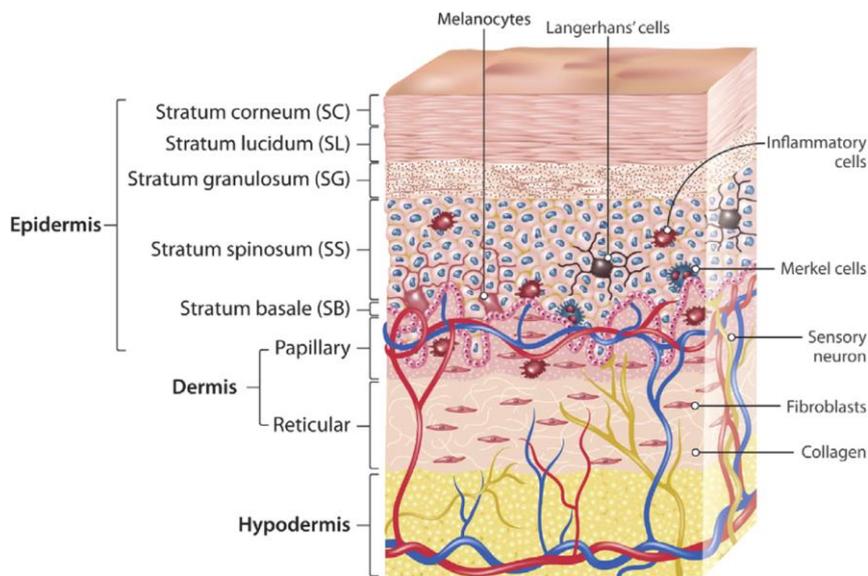


Figura 5: Rappresentazione del tessuto tegumentario [29]

Il componente più superficiale del tegumento è l'*epidermide*, che funge essenzialmente da barriera, impedendo da un lato la penetrazione di sostanze estranee e microorganismi e dall'altro la perdita di

acqua ed elettroliti. L'epidermide è costituita da un epitelio stratificato pavimentoso il cui diametro medio varia da circa 30 μm sino a raggiungere valori di 1-2 mm a seconda della parte del corpo, ed è composto principalmente da cellule chiamate cheratinociti, interconnesse tramite giunzioni serrate che consentono la formazione di una barriera superficiale compatta contenente solo una piccola quantità di matrice extracellulare (ECM) [30]. I cheratinociti sono disposti nell'epidermide in conformazione tale da formare cinque strati che si distinguono dall'interno verso l'esterno in: strato basale, strato spinoso, strato granuloso, strato lucido e strato corneo. Dallo strato basale, quello più vicino al derma, i cheratinociti, che qui presentano una forma cubica, cominciano a moltiplicarsi per mitosi e risalire verso gli strati più superficiali. Durante questa risalita le cellule si appiattiscono, perdono la loro capacità moltiplicativa e vanno incontro a morte programmata per apoptosi. Inoltre, sin dallo strato spinoso, cominciano a sintetizzare una proteina filamentosa detta cheratina che si accumula nel citoplasma, nello strato lucido e corneo. Le cellule perdono i nuclei e vanno incontro ad un processo di desquamazione che ne favorisce l'eliminazione, favorendo un continuo turn-over. Nello strato corneo, la cheratina, e le strutture lipidiche delle membrane cellulari, diminuiscono la permeabilità della cute alle sostanze acquose. L'epidermide si invagina attorno agli annessi cutanei creando delle sacche che arrivano fino agli strati più profondi del derma, nei quali risiedono *i loci* delle cellule staminali dell'epidermide che riforniscono continuamente l'epitelio con cellule giovani ad alto potenziale replicativo. Oltre ai cheratinociti, nell'epidermide sono presenti i melanociti, responsabili della produzione di melanina, e le cellule di Langerhans, ossia cellule della famiglia dei monociti/macrofagi che derivano da precursori emopoietici e hanno il ruolo di captare e presentare molecole estranee ad attività antigenica alle cellule immunocompetenti.

L'epidermide è ancorata allo strato sottostante, il derma, tramite una struttura chiamata membrana basale costituita da fibre di collagene, che permette l'ancoraggio dei cheratinociti tramite dei recettori di membrana chiamati emidesmosomi. Questo secondo strato della cute, *il derma*, è costituito principalmente da molecole quali collagene, reticulina, elastina e polisaccaridi, interconnesse ed orientate in maniera da formare una struttura tridimensionale complessa in grado di resistere a forze di trazione e stimoli pressori. È uno strato altamente vascolarizzato e ospita diverse strutture annesse come i follicoli piliferi, le ghiandole sebacee e sudoripare, i recettori tattili, termici e nocicettori. La componente cellulare del derma è invece rappresentata da fibroblasti, che sintetizzano il collagene e gli altri componenti fondamentali della ECM, fibrocellule muscolari lisce e cellule endoteliali appartenenti ai vasi sanguigni, cellule nervose e le mastocellule del sistema immunitario. Infine, l'*ipoderma* si trova sotto lo strato dermico reticolare insieme al pannicolo adiposo e consiste in un tessuto connettivo lasso vascolarizzato da cui si dipartono i capillari dei vasi sanguigni che vanno ad irrorare il derma.

L'apparato tegumentario risulta quindi costituito da due tipologie di tessuto: epiteliale e connettivo, e tale caratteristica è fondamentale per la corretta progettazione di un sostituto ingegnerizzato. I tessuti epiteliali sono caratterizzati da un continuo turnover delle cellule costituenti, le quali sono periodicamente rimpiazzate da nuove cellule derivanti dalla differenziazione di cellule staminali situate in *loci* prossimali al distretto epiteliale [31]. La presenza di questi *reservoir* di cellule non differenziate, e con alto potenziale replicativo, conferisce al tessuto epiteliale proprietà autorigenerative. Infatti, danni tissutali di lieve entità che non comportano la distruzione delle riserve di cellule staminali, sono generalmente seguiti dalla auto riparazione tissutale data dalla proliferazione e differenziazione delle cellule che ripopolano l'epitelio. Quando invece vengono danneggiati i *loci* delle cellule staminali si ha la perdita della capacità auto-riparativa e la necessità quindi di intervenire dall'esterno, ripristinando le cellule in fase proliferativa per la rigenerazione del tessuto. Questo tipo di intervento si esplica, nell'ingegneria tissutale, tramite l'utilizzo di scaffold, ossia impalcature di supporto o tessuti bioingegnerizzati in grado di:

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

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

I tessuti connettivi, al contrario, sono tessuti con funzione di riempimento, di protezione e di nutrizione dei parenchimi. L'unità funzionale di questi tessuti è il cosiddetto microambiente. Questo è costituito da tre unità fondamentali tra di loro strutturalmente e funzionalmente correlate: le cellule di supporto (parenchimali), le cellule funzionali (mesenchimali), la matrice extracellulare (ECM). La fisiologia del microambiente è regolata da mediatori biologici molecolari (molecole segnale), interazioni intercellulari, molecole costituenti la ECM e stimoli meccanici. Nelle diverse aree dell'organismo, questi agenti di regolazione agiscono in maniera differente per influenzare lo sviluppo di tessuti con differenti caratteristiche chimico-fisiche e funzionali. La matrice extracellulare è il mezzo di coltura naturale nel quale le cellule proliferano, si differenziano e migrano, essa è infatti considerata il modello per l'ingegneria dei tessuti connettivi nello sviluppo di nuovi tessuti bioingegnerizzati [32].

1.2.2 Matrice extracellulare

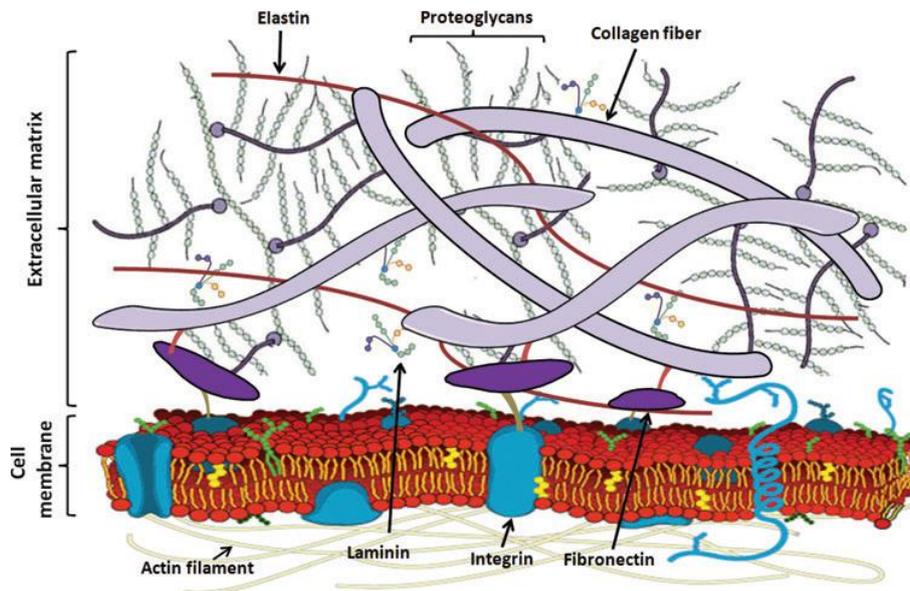


Figura 6: Principali componenti della matrice extracellulare e loro interazioni [25]

La cute, come tutti gli organi e i tessuti, è costituita da una componente cellulare (come descritto nella sezione 1.2.1), che si distribuisce all'interno di un reticolo tridimensionale estremamente organizzato, la matrice extracellulare, che ne rappresenta la maggior parte del volume (Figura 6). La composizione e la struttura della ECM variano a seconda del tessuto di appartenenza influenzandone le proprietà fisiche e chimiche. Sulla base dei primi studi istologici, si riteneva che questa matrice avesse una semplice funzione passiva di sostegno e riempimento dei tessuti. Tuttavia, nonostante si tratti di materia organica non vitale, nel corso degli anni si è compreso il ruolo fondamentale che svolge nel regolare la crescita, l'adesione, la migrazione, la differenziazione e la morte cellulare, e come influenzi anche l'azione delle citochine e dei diversi segnali intracellulari, svolgendo quindi una funzione bioattiva. Il rapporto tra le cellule e il substrato risulta dunque essere bidirezionale, poiché la cellula percepisce un segnale fisiologico dall'ECM e in risposta modifica la sua morfologia [33]. La matrice extracellulare è composta da due classi principali di macromolecole secrete dalle cellule: i proteoglicani e le proteine fibrose. I proteoglicani, catene di eteropolisaccaridi legati covalentemente ad una proteina, sono macromolecole idrofiliche che mantengono l'ambiente extracellulare idratato. I proteoglicani formano strutture ricche di acqua con dimensioni dei pori e densità di carica variabili; possono quindi servire da filtro selettivo per regolare il passaggio di cellule e di molecole in base alla carica e alle dimensioni delle stesse. Le proteine fibrose si dividono in proteine strutturali (collagene ed elastina) e proteine adesive (laminina e fibronectina). Tra queste, le fibre di collagene rinforzano l'ECM e conferiscono una buona resistenza meccanica a trazione. L'elastina assicura elasticità, infatti

è abbondante in tutti quei tessuti che hanno la necessità di contrarsi in maniera ciclica. Infine, le proteine adesive promuovono l'ancoraggio delle cellule sulla matrice.

Come più volte evidenziato, una delle principali sfide della traslazione dell'ingegneria tissutale alla clinica è proprio la difficoltà di ricreare la complessa organizzazione e composizione dei tessuti e degli organi, i quali differiscono tra loro per tipologia, contenuto e organizzazione dei costituenti cellulari e della matrice extracellulare. Nell'ingegneria tissutale queste differenze devono essere considerate al fine di scegliere biomateriali appropriati e progettare scaffold per una specifica applicazione. Gli elementi principali della matrice extracellulare dei tessuti costituenti la cute, e la loro funzione biologica, sono elencati in Tabella 1.

Tabella 1: Molecole principali costituenti l'ECM della cute e loro funzione

MOLECOLA	FUNZIONE BIOLOGICA
Collagene	Impalcatura del tessuto, conferisce resistenza a trazione, favorisce le interazioni cellula-ECM e cellula-cellula,
Proteoglicani	Creano legami con proteine collageniche, conferiscono resistenza alle forze di compressione, permettono il trasporto di nutrienti, favoriscono la proliferazione di fibroblasti e condrociti e la differenziazione di cellule endoteliali ed epiteliali
Acido Ialuronico	Trasporto di metaboliti e nutrienti, conferisce alta resistenza a compressione, favorisce la migrazione e la proliferazione cellulare
Laminina	Favorisce la differenziazione e la migrazione cellulare,
Fibronectina	Favorisce l'adesione, la migrazione e la proliferazione cellulare
Fattori di Crescita	Molecole segnale

Tra gli elementi sopracitati, proteine come la fibronectina, le diverse tipologie di collagene, e i proteoglicani, giocano un ruolo primario nel processo di rigenerazione delle ferite in quanto possono legare diversi fattori di crescita, come FGF23, VEGF, EGF e alle proteine morfogenetiche ossee (BMP). Pertanto, la degradazione delle proteine da parte degli enzimi proteolitici che si verifica in risposta all'infiammazione acuta dovuta da lesione può indurre il rilascio locale di questi fattori di crescita, modulando e interferendo così con il processo di guarigione [25].

L'interazione tra cellule e matrice influenza fortemente il processo di guarigione di una lesione, nel rimodellamento e nell'omeostasi dei tessuti. L'iniziale adesione cellulare alla matrice è data da deboli interazioni idrofobiche e affinità di carica. Successivamente, le integrine transmembrana, presenti sulla superficie cellulare, stabilizzano il legame specifico e reversibile, che permette alla cellula di differenziarsi e trasmettere segnali. La comunicazione tra cellule e matrice è bidirezionale in quanto, l'attivazione delle integrine presenti sull'ECM inizia la trasduzione del segnale intracellulare

modificando la trascrizione genica per la cellula. Contemporaneamente la cellula aderente influenza l'espressione di molecole di superficie delle componenti della ECM [25].

Un tessuto bioingegnerizzato che si propone la rigenerazione dei tessuti connettivi deve avere caratteristiche morfologiche, strutturali e chimico-fisiche simili a quelle della ECM nativa. Solo in questo caso sarà in grado di favorire l'adesione e la proliferazione delle cellule, integrarsi in maniera ottimale con i tessuti circostanti, stimolare le cellule endogene a colonizzarlo ed essere degradato gradualmente una volta formato il tessuto di nuova sintesi. In dipendenza dell'entità del danno tissutale il tessuto bioingegnerizzato potrà avere la funzione di sostituire la ECM o il tessuto *in toto*. Nel primo caso lo scaffold impiantato è privo di cellule e si comporta come sostituito della ECM persa o danneggiata per favorire l'adesione e la proliferazione delle cellule endogene che sintetizzeranno il tessuto di neosintesi. Nel secondo caso lo scaffold impiantato dovrà essere un vero e proprio sostituto tissutale avente cellule, matrice extracellulare e in grado di garantire le comunicazioni intercellulari [25].

1.3 Ingegnerizzazione di scaffold per rigenerazione cutanea

Nel corso degli anni il processo di cura delle ferite ha subito importanti modifiche passando dalla tradizionale copertura del sito lesionato utilizzando un materiale di medicazione che prevenisse disidratazione e infezioni, a medicazioni multifunzionali avanzate e/o sostituti ingegnerizzati [34]. Medicazioni convenzionali, economiche e facilmente reperibili, come garze e bende, possono sostanzialmente proteggere la ferita dagli agenti esterni, ma creano localmente un ambiente secco, che può portare a complicazioni, come successive infezioni [35-36]. Negli ultimi anni, sono stati compiuti notevoli progressi nella progettazione di medicazioni volte a proteggere la ferita da disidratazione e infezione e facilitare il processo di guarigione invece di limitarsi al semplice rivestimento della stessa [37] [38]. A tal proposito, gli sviluppi tecnologici nell'ambito della realizzazione di scaffold multifunzionali hanno permesso di realizzare medicazioni per ferite sotto forma di idrogeli [39], idrocolloidi [40], spugne [41] e pellicole trasparenti [38], alcuni dei quali attualmente disponibili in commercio. Benché questi materiali risultino diversi per le loro caratteristiche intrinseche, come idrofobicità, permeabilità e capacità di adsorbimento, il ruolo primario di uno scaffold, è quello di fungere da modello tridimensionale, che sostituisca temporaneamente la matrice danneggiata, per favorire e indirizzare la crescita cellulare e la rigenerazione del tessuto. L'adesione, la proliferazione e il differenziamento delle cellule sono fortemente influenzati dal microambiente associato allo scaffold così come dalla dimensione, dalla geometria, dalla densità dei pori e dalle proprietà della superficie [42]. Elemento chiave nella progettazione dello scaffold è dunque quello di riuscire a riprodurre le caratteristiche della ECM del

tessuto da sostituire. Le proprietà da tenere in considerazione nella progettazione di uno scaffold dipendono fortemente dal campo di applicazione e dal tipo di sostituto da ingegnerizzare. Tuttavia, è importante considerare alcune caratteristiche e aspetti fondamentali che qualsiasi costrutto ingegnerizzato deve avere:

- *Biocompatibilità*: è la “capacità di un biomateriale di svolgere la funzione desiderata rispetto a una terapia medica, senza suscitare effetti indesiderati locali o sistemici nel paziente, ma generando la risposta cellulare o tissutale benefica più appropriata in quella specifica situazione e ottimizzando le prestazioni clinicamente rilevanti di tale terapia” [43]. Uno scaffold ideale dovrebbe infatti presentarsi come un substrato favorevole per le cellule e garantirne una corretta attività senza innescare una reazione immunitaria avversa, locale o sistemica, anche in relazione ai sottoprodotti della degradazione [44].
- *Biodegradazione controllata*: la velocità di degradazione del biomateriale dovrebbe corrispondere alla contemporanea produzione di nuova matrice extracellulare *in vivo*. Se il tasso di degradazione è troppo lento la formazione di tessuto nascente potrebbe essere ostacolata e viceversa, se la velocità di degradazione fosse troppo rapida, la stabilità meccanica, e quindi la funzione del tessuto ingegnerizzato risulterebbe inefficace e lo scaffold non sarebbe in grado di assicurare il processo di guarigione [45].
- *Composizione chimica*: dovendo il biomateriale interagire e influenzare la fisiologica attività cellulare è opportuno che presenti una composizione adeguata (siti di legame e/o peptidi di segnalazione) che faciliti tali interazioni [46][47]. Per la realizzazione di uno scaffold è necessario valutare la composizione chimica dei materiali da utilizzare, siano essi sintetici o naturali, la quale dovrebbe essere il più possibile simile a quella della matrice extracellulare del tessuto/organo da sostituire. Nel caso in cui si utilizzino polimeri sintetici lo scaffold viene in genere funzionalizzato con proteine adesive o sequenze peptidiche in modo da facilitare l’adesione cellulare, la colonizzazione e la proliferazione.
- *Porosità*: il grado di porosità e la dimensione dei pori sono dei parametri essenziali per uno scaffold specialmente nell’ambito della rigenerazione cutanea in cui permeabilità cellulare, fattori di crescita e citochine hanno un ruolo primario per la riparazione del tessuto [48]. Il requisito di porosità è tuttavia altamente tessuto-specifico/dipendente, poiché i differenti tipi cellulari prediligono diverse dimensioni dei pori [49]. Scaffold con pori di dimensioni comprese tra i 100 e 1000 μm favoriscono la crescita cellulare, la diffusione di nutrienti e prodotti di scarto metabolico, nonché la formazione di una corretta rete angiogenica e l’incrementano del livello di vascolarizzazione, mentre porosità intorno ai 50 μm favoriscono la colonizzazione dello scaffold e la migrazione cellulare. In generale una elevata porosità

(90%) promuove oltre alla colonizzazione dello scaffold una migliore diffusione dei nutrienti e l'eliminazione dei prodotti di scarto [50]. Un altro elemento da tenere in considerazione è l'interconnessione dei pori, dove una percentuale elevata supporta sia la migrazione cellulare che l'infiltrazione della ECM del tessuto desiderato. Tuttavia, valori troppo elevati di porosità spesso compromettono le proprietà meccaniche dello scaffold[50]. Dal punto di vista dell'applicazione, la dimensione dei pori e la porosità influenzano anche la neovascolarizzazione *in vivo*. Tra i tanti problemi dell'ingegneria tissutale, un sufficiente apporto di ossigeno e nutrienti tramite lo scaffold è difatti considerato come un prerequisito fondamentale per ottenere un'accettabile vitalità delle cellule. Una rete intricata di pori interconnessi riduce al minimo lo spazio inutilizzato, al contrario la sua eccessiva tortuosità potrebbe alterare la circolazione del liquido interstiziale ed il trasporto di massa [51].

- *Architettura*: la morfologia e l'architettura dello scaffold ha un'importanza sempre maggiore nell'ingegneria tissutale, e ciò ha portato ad un cambiamento di tendenza nella progettazione degli stessi, variando da scaffold isotropici a scaffold "biomimetici", eterogenei e anisotropi, il cui obiettivo è quello di mimare l'organizzazione delle cellule (come l'allineamento o il clustering) e/o della ECM del tessuto di interesse [52]. Impalcature con topografia simile al tessuto nativo hanno la capacità di influenzare e dirigere l'adesione di cellule e strutture subcellulari favorendo così la proliferazione e formazione di nuovo tessuto [53].
- *Proprietà meccaniche*: Il biomateriale dovrebbe simulare dal punto di vista meccanico l'ambiente del sito anatomico target [54]. È necessario sempre garantire un supporto meccanico e resistenza alle sollecitazioni fisiologiche, fino a completa rigenerazione del nuovo tessuto. Diversi lavori in letteratura riportano la necessità di realizzare scaffold aventi modulo di Young nello stesso range del tessuto da sostituire. Nel caso della cute ad esempio, gli scaffold dovrebbero avere modulo di elasticità che varia da 10 kPa a 50 MPa [55]. Proprietà meccaniche, come l'elasticità, sono di grande importanza per applicazioni di ingegneria tissutale, poiché la deformazione elastica del materiale regola le risposte cellulari attraverso la trasduzione biomeccanica. Una bassa rigidità favorisce infatti la segnalazione e migrazione cellulare accelerando quindi la colonizzazione dello scaffold e formazione di nuovo tessuto [56-57] La combinazione di proprietà meccaniche (quali un'adeguata elasticità e bassa rigidità) e porosità risulta spesso complicata, in quanto queste due caratteristiche sono contrastanti. Gli esempi di scaffold prodotti in modo da avere delle buone proprietà meccaniche a discapito della porosità sono numerosi, in quanto hanno dimostrato un buon potenziale *in vitro* ma hanno fallito *in vivo*, a causa della scarsa angiogenesi. È dunque

necessario trovare il giusto equilibrio in modo da garantire la colonizzazione da parte delle cellule e una sufficiente vascolarizzazione del tessuto.

In aggiunta a questi aspetti è necessario inquadrare le proprietà che contraddistinguono il tessuto da sostituire e adattarle allo scaffold per realizzare un sostituto in grado di integrarsi al meglio con l'ambiente circostante.

Specificatamente, uno scaffold per wound dressing ideale dovrebbe isolare la ferita da fattori esterni avversi, assorbire gli essudati dalla superficie della ferita, proteggere il sito danneggiato dall'infezione batterica, avere una funzione antinfiammatoria e indurre la proliferazione cellulare per facilitare la rigenerazione dei tessuti e accelerare il processo di guarigione. Inoltre, tra le caratteristiche maggiormente richieste per un costrutto bioingegnerizzato in grado di facilitare la guarigione di ferite cutanee risulta fondamentale la capacità di promuovere l'angiogenesi e la sintesi del tessuto connettivo [58]. Con il termine angiogenesi si definisce il processo di formazione di nuovi capillari da vasi sanguigni preesistenti, composto dalle seguenti fasi: rottura della membrana basale vascolare, espansione e allineamento delle cellule endoteliali, germinazione e migrazione attraverso la penetrazione nell'ECM fino ad arrivare alla maturazione di nuovi vasi e alla loro stabilizzazione. [59]. A seguito di una qualsiasi lesione, il danneggiamento dei vasi sanguigni appare come l'evento più comune. Pertanto, lo sviluppo di costrutti funzionali ingegnerizzati in grado di ristabilire rapidamente il flusso sanguigno ai tessuti danneggiati è di primaria importanza affinché il processo di guarigione si possa concludere correttamente. Un corretto flusso di sangue fornisce ossigeno, nutrienti, molecole di segnalazione e fattori di crescita ai siti danneggiati, rimuovendo i sottoprodotti di scarto dall'ambiente circostante. Tutti questi eventi si traducono in una migliore vitalità del tessuto, prevenendo condizioni ischemiche e necrotiche [50].

Ad oggi, sono state sfruttate numerose strategie e tecniche di fabbricazione differenti per promuovere la neovascolarizzazione, tra cui la realizzazione di tessuti vascolarizzati [60] e l'incorporazione di molecole pro-angiogeniche in costrutti tridimensionali [61]. Nell'ampio scenario delle tecniche attualmente in uso per la fabbricazione di scaffold biomimetici l'utilizzo dell'electrospinning (tecnologia descritta più nel dettaglio nei paragrafi successivi) per la realizzazione di matrici nanofibrose ha guadagnato ampio interesse come un '*semplice*' metodo di fabbricazione per preparare costrutti tridimensionali angiogenici e accelerare il processo di guarigione delle ferite [50]. Una chiara evidenza delle proprietà di pro-angiogenesi di scaffold elettrofilati è stata presentata dallo studio di Lai et al. [62], nel quale sono state realizzate membrane elettrofilate costituite da nanofibre di collagene e acido ialuronico con rilascio modulato di specifiche molecole pro-angiogenesi quali diversi fattori di crescita (VEGF, PDGF, bFGF, e EGF). Questi costrutti, capaci di mimare l'ECM nativa grazie alla struttura nanofibrosa in collagene e combinare al tempo stesso stimoli pro-

angiogenesi, sono risultati estremamente efficaci nell'accelerare la ri-epitelizzazione e formazione di vasi sanguigni quando applicati a modelli di ferite croniche in vivo.

Tra le principali caratteristiche ricercate per la produzione di scaffold per la cura delle ferite è infatti presente la capacità di realizzare medicazioni sotto forma di membrane nanofibrose [63]. Scaffold dalla morfologia nanofibrosa sono costituiti da fibre polimeriche non tessute, ultrasottili con diametri compresi tra le decine di micrometri che possono raggiungere valori anche inferiori ai 100 nm. Le membrane nanofibrose hanno diverse proprietà intrinseche, che le rendono particolarmente interessanti per le applicazioni di wound healing, tra cui la possibilità di realizzare un'impalcatura sintetica in grado di mimare fedelmente la struttura dell'ECM naturale grazie al loro diametro nanometrico e all'allineamento casuale delle fibre all'interno della matrice. Inoltre, è stato dimostrato che le reti nanofibrose favoriscono l'emostasi dei tessuti lesi grazie alla presenza di piccoli interstizi e all'elevata area superficiale [63]. Quest'ultima caratteristica risulta essenziale per l'assorbimento dei fluidi, per una migliore somministrazione dermica di farmaci e antimicrobici e offre l'opportunità di modificare la superficie delle fibre con molecole bioattive o farmaci per fornire specifiche funzionalità allo scaffold. Nello studio di Pires et al. [64] è stata infatti dimostrata la maggiore velocità del processo di rigenerazione della cute lesa applicando scaffold con morfologia simile a quella dell'ECM nativa e molecole antibatteriche. Nello specifico sono stati realizzate matrici nanofibrose composte da PCL e gelatina, aventi fibre con diametro medio pari a 200 nm, e successivamente funzionalizzate con molecole antibatteriche (EGCG).

Gli scaffold nanofibrosi mostrano un'elevata interconnessione dei pori, con valori compresi tra 60-90%,[65] consentendo la respirazione cellulare e l'elevata permeazione di gas nonché la prevenzione dell'essiccazione e della disidratazione della ferita. Inoltre, uno scaffold ideale per la guarigione delle ferite dovrebbe avere pori di dimensioni nanometriche, impedendo così l'infiltrazione di microrganismi dall'ambiente esterno e scoraggiando la crescita interna di cellule/tessuti [66]. In Tabella 2 sono riassunte alcune tra le proprietà chiave che una medicazione per ferite efficace dovrebbe possedere.

Tabella 2: Proprietà ideali di scaffold nanofibrosi per applicazioni di wound healing

CARATTERISTICA	EFFETTI SU PROCESSO DI WOUND HEALING
Diametro Fibre	Diametri compresi tra i 50 e 500 nm mimano la fisiologica struttura dell'ECM naturale
Orientamento Fibre	Nanofibre allineate promuovono neovascolarizzazione e migrazione cellulare
Elevata Porosità (60-90%)	Permeazione degli essudati e dei gas, migliore respirazione e migrazione cellulare, prevenzione dalla disidratazione della ferita
Elevata area superficiale (superficie/volume)	Migliore capacità di funzionalizzazione del costruito, promuove l'angiogenesi attraverso il legame a fattori di crescita angiogenici (VEGF, HGF), promuove l'emostasi
Degradazione dei Polimeri	Una più lenta degradazione del polimero porta ad una maggiore mobilitazione cellulare e angiogenesi a causa della formazione di un ambiente meno acido

Le nanofibre elettrofilate presentano dunque numerosi vantaggi, tra i quali la versatilità nella selezione dei polimeri utilizzabili, naturali e sintetici o loro composti [66] [67]. Nel paragrafo successivo verrà illustrata una breve panoramica dei biomateriali maggiormente utilizzati nelle applicazioni di ingegneria tissutale.

1.4 Biomateriali per rigenerazione del tessuto cutaneo

Scaffold nanofibrosi elettrofilati per la rigenerazione del tessuto cutaneo, come quello che ci si è proposti di realizzare in questo progetto di tesi, sono progettati per essere posti a diretto contatto con l'area della ferita; pertanto, è importante una accurata selezione dei materiali da usare. Avendo come fine ultimo quello di mimare e temporaneamente sostituire la matrice extracellulare nativa, l'interesse dei ricercatori si è focalizzato principalmente su proteine naturali e polisaccaridi, per poter fabbricare dei costrutti con un elevato livello di biomimetività, nonché proprietà antimicrobiche, antinfiammatorie ed emostatiche [68] [26]. Naturalmente, la scelta del biomateriale influenza in maniera determinante la capacità del tessuto bioingegnerizzato di svolgere la funzione per la quale esso viene progettato. Variando il tipo di biomateriale è possibile modulare le caratteristiche dello scaffold sia in funzione del tessuto che deve essere rigenerato ma anche in funzione dell'entità del danno tissutale. I materiali che meglio rispondono a tali caratteristiche sono i polimeri. Vari tipi di biopolimeri naturali sono stati utilizzati per produrre sostitui ingegnerizzati della cute. Questi polimeri sono generalmente classificati in due classi: polimeri naturali a base di proteine e polimeri naturali a base di carboidrati [38]. Tra i polimeri a base di proteine, il collagene, gelatina, elastina e fibroina sono stati efficacemente utilizzati per produrre scaffold per la guarigione delle ferite. Mentre chitosano, acido ialuronico, destrano e cellulosa sono i polimeri a base di carboidrati più ampiamente esplorati. Questi polimeri mostrano un'eccellente biocompatibilità, bassa antigenicità e una bioattività favorevole che promuove l'attaccamento e la proliferazione delle cellule [38]. Tuttavia, grazie alla resistenza meccanica superiore e alla facilità di lavorazione, numerosi biopolimeri sintetici sono stati utilizzati nel campo di rigenerazione cutanea. Tra questi, i poliesteri alifatici, come il poli(acido glicolico) (PGA), il PLA, il suo copolimero (PLGA), e il policaprolattone (PCL), sono stati studiati ampiamente per applicazioni di rigenerazione cutanea. Questi polimeri sono biodegradabili, hanno elevata biocompatibilità e di solito rilasciano prodotti di degradazione non tossici. D'altra parte, polimeri super idrofili come polietilenglicole (PEG), PVA, e polivinilpirrolidone (PVP) hanno mostrato molte caratteristiche interessanti favorevoli per le applicazioni di wound dressing [38]. Belenkaya et al. hanno realizzato scaffold fibrosi completamente biodegradabili e idrofili mediante elettrofilatura di miscele PLGA/ PVP per applicazioni di guarigione delle ferite. Queste membrane hanno dimostrato di avere una straordinaria capacità di adsorbimento di liquidi biologici, compreso

il sangue, senza generare fenomeni di 'swelling', un tasso di biodegradazione programmabile e una buona attività antimicrobica. Sono state inoltre confermate proprietà emostatiche apprezzabili e capacità antisettiche [35].

Oltre ai polimeri, nella ricerca sull'utilizzo di materiali innovativi per la cura delle ferite della pelle, particolare attenzione è stata posta sulle nanoparticelle di silice mesoporosa (MSN) e i vetri bioattivi mesoporosi (MBG). Tali materiali offrono grandi opportunità nel trattamento delle ferite acute e croniche [69]. L'efficacia terapeutica di MSN e MBG, in forme differenti (polvere fine, fibre, compositi ecc.) è stata dimostrata in tutte e quattro le fasi della normale guarigione della ferita, tra cui emostasi, infiammazione, proliferazione e rimodellamento [69]. I principali meriti di questi materialiporose possono essere riassunti in eccellente biocompatibilità e nella capacità di funzionalizzazione. Grazie ai mesopori, infatti, presentano una maggiore area superficiale che consente di arricchire questi materiali con una vasta gamma di molecole bioattive, farmaci e sostanze chimiche bioattive sia idrofobiche che idrofile. Tali materiali consentono quindi un approccio fattibile e pratico per preparare scaffold personalizzati per una migliore rigenerazione della cute.

I progressi fatti nella scienza dei materiali hanno quindi notevolmente ampliato il ventaglio di possibilità e di combinazioni per la generazione di biomateriali all'avanguardia volti ad ottimizzare i trattamenti clinici esistenti e sviluppare cure più sicure ed efficaci per una migliore qualità della vita umana [70]. Nella fabbricazione di scaffold per ingegneria tissutale si adoperano principalmente *polimeri naturali*, *polimeri sintetici* e *materiali ceramici*, i cosiddetti *materiali semplici* [68]. Tuttavia, considerando che l'uso di un singolo materiale può presentare diversi svantaggi, è sempre più comune l'uso di materiali *compositi*, ossia materiali composti da due o più fasi le cui proprietà complessive sono superiori a quelle dei materiali che costituiscono le singole fasi. Di seguito una breve descrizione delle due principali categorie di polimeri categorie.

1.4.1 Materiali polimerici

Tra i materiali maggiormente utilizzati nell'ambito dell'ingegneria tissutale sono presenti i polimeri, macromolecole costituite da un elevato numero di unità ripetitive uguali, dette monomeri, unite tra loro da legami chimici in modo da formare strutture lineari, ramificate o reticolate ad alto peso molecolare. I polimeri si contraddistinguono dalle altre classi di biomateriali per la vasta scelta di proprietà meccaniche e chimico-fisiche che presentano, ma anche per la processabilità e per la possibilità di funzionalizzazione superficiale attraverso diverse tecniche [71]. Un'ulteriore caratteristica, particolarmente utile nell'ingegnerizzazione di diversi tessuti è la degradabilità dei polimeri. In relazione alle proprietà di degradazione è possibile distinguere polimeri biostabili,

bioinerti, bioriassorbibili e biodegradabili. Tra questi, i polimeri biodegradabili sono quelli maggiormente utilizzati per la realizzazione di scaffold, in quanto permettono di offrire un supporto temporaneo per la rigenerazione dei tessuti e allo stesso tempo non necessitano di essere rimossi dopo l'impianto. Tale processo avviene senza innescare alcuna risposta infiammatoria dovuta generalmente dalla presenza dei prodotti di scarto. Questo è tanto più vero quanto più la cinetica di degradazione del polimero è controllata rispetto alla crescita del tessuto, poiché se il materiale degrada velocemente rilascia nel tempo una maggiore quantità di prodotti di degradazione aumentando la possibilità d'infiammazione.

1.4.1.1 Polimeri sintetici

I polimeri sintetici sono materiali polimerici sintetizzati industrialmente e che vengono spesso utilizzati nell'ambito dell'ingegneria dei tessuti poiché presentano numerosi vantaggi quali la facilità di sintesi, proprietà riproducibili e ripetibili. È dunque possibile ottenere strutture con caratteristiche chimiche, fisiche, morfologiche, meccaniche e degradative differenti, modulabili e conformi al tipo di applicazione biomedicale per cui sono impiegati o al tessuto che si desidera rigenerare [72]. Tuttavia, la diversità di struttura rispetto ai polimeri costituenti la matrice extracellulare nativa, comporta una mancanza di gruppi funzionali che garantiscano la corretta adesione delle cellule, portando di conseguenza ad una scarsa bioattività. Per ovviare a questo problema è possibile funzionalizzare questi polimeri con biomolecole quali peptidi, proteine o polisaccaridi, rendendoli bioattivi, e quindi in grado di instaurare un legame con il tessuto biologico e di innescare reazioni cellulari utili alla formazione di nuovo tessuto sano [73].

I polimeri sintetici maggiormente utilizzati nell'ingegneria tissutale appartengono alla classe dei poli(a-idrossiacidi) che comprende l'acido polilattico (PLA), il policaprolattone (PCL), l'acido poliglicolico (PGA), e i loro copolimeri come il PLGA. Nonostante le buone proprietà meccaniche che gli consentono di essere largamente utilizzati per fabbricare scaffold di supporto, alcuni biopolimeri sintetici possono rilasciare prodotti di degradazione acidi che causano un'alterazione del pH nell'ambiente circostante in grado di influenzare la vitalità cellulare e causare reazioni avverse e infiammatorie. Inoltre, la mancanza di affinità di questi polimeri nel legame con peptidi regolatori, fattori di crescita e altri segnali biologici, non favoriscono né l'adesione né l'espressione diretta di un determinato fenotipo cellulare. Sulla base delle precedenti limitazioni, la medicina rigenerativa si è volta ad investigare l'uso di polimeri naturali come valida alternativa nella realizzazione degli scaffold.

1.4.1.2 Polimeri naturali

I polimeri naturali sono una famiglia di materiali, di origine animale o vegetale, largamente utilizzata nella produzione di scaffold per l'ingegneria dei tessuti grazie all'elevata biocompatibilità e biodegradabilità, caratteristiche che permettono alle cellule, nel tempo, di produrre nuova ECM e sostituire lo scaffold degradato. Differiscono dai polimeri sintetici per la bioattività e la capacità di promuovere l'adesione e la crescita cellulare [74]. Tra i limiti nell'utilizzo dei polimeri naturali è presente la cinetica di degradazione. Nonostante la degradazione di questi polimeri non porti al rilascio di prodotti citotossici, come spesso accade per i polimeri sintetici, spesso degradano velocemente impedendo quindi al biomateriale di svolgere in modo ottimale il suo ruolo di supporto. Per ovviare a tale problema è spesso necessario combinare questi polimeri con materiali di natura diversa, o sottoporre il prodotto finale a trattamenti di reticolazione col fine di incrementare la stabilità e le proprietà meccaniche del costruito finale. I biomateriali di derivazione naturale possono essere suddivisi in due gruppi: le proteine (es. collagene, fibroina di seta, elastina, fibronectina, gelatina) e i polisaccaridi (chitosano, cellulosa, alginato, chitina). I polimeri a base proteica sono tipicamente di origine animale e contengono molecole bioattive che mimano in maniera ottimale l'ambiente extracellulare, mentre i biomateriali a base di polisaccaridi possono essere ottenuti da alghe, come nel caso dell'alginato, da fonti batteriche come nel caso del gellano o da piante, come nel caso della cellulosa. In applicazioni biomedicali i polimeri naturali possono essere processati attraverso numerose tecniche per essere poi utilizzati sotto forma di scaffold micro o nanoporosi, idrogeli o film [74]. Benché i numerosi vantaggi li rendano particolarmente attraenti per la realizzazione di scaffold, tra le problematiche principali si annoverano scarse proprietà meccaniche e difficoltà nell'ottenere risultati riproducibili in termini di composizione e proprietà, oltre che una velocità di degradazione spesso troppo elevata [70]. Molti polimeri naturali sono inoltre idrofili, caratteristica che conferisce loro una scarsa stabilità in ambiente acquoso e che richiede un processo di reticolazione (*cross-linking*) fisico o chimico prima del loro utilizzo per migliorarne la stabilità. Tuttavia, poiché lo studio di questi materiali è in continua evoluzione, si stanno sviluppando nuovi approcci per la loro produzione, estrazione e per consentire un maggior controllo delle loro proprietà in modo da progettare biomateriali sempre più performanti e per la realizzazione di scaffold che supportino lo sviluppo di tessuti più funzionali [75].

Essendo l'obiettivo principale dell'ingegneria tissutale quello di sviluppare sostituti in grado di imitare le caratteristiche naturali della matrice extracellulare per promuovere la rigenerazione del tessuto funzionale, la scelta del materiale si basa sugli elementi che naturalmente compongono la matrice nativa del tessuto da ingegnerizzare. Sulla base delle precedenti considerazioni appaiono evidenti le grandi potenzialità offerte dai polimeri naturali per adempiere a tale scopo. Nonostante la

vasta scelta di polimeri applicabili per applicazioni di wound dressing, quali chitosano, fibroina della seta, elastina e gelatina, il collagene risulta essere il materiale più utilizzato [76]. Sono infatti numerosi i lavori che riportano i benefici nell'utilizzo del collagene, principale componente dell'ECM del tessuto cutaneo, per la realizzazione di scaffold biocompatibile per rigenerazione cutanea [76].

Per tali ragioni per questo lavoro di tesi si è deciso di utilizzare il collagene di tipo I per la realizzazione di scaffold biocompatibili tramite la tecnica dell'elettrofilatura. Per valutare l'effetto della combinazione di due polimeri naturali sulle proprietà degli scaffold elettrofilati è stato scelto il chitosano come secondo polimero.

1.4.2 Collagene di tipo I

Tra le proteine più abbondanti in natura si trova il collagene di tipo I, il quale costituisce circa il 30% della massa proteica totale dei tessuti poiché sintetizzato e secreto principalmente, all'interno dell'ECM, dai fibroblasti [77]. Si tratta di una proteina strutturale biodegradabile, biocompatibile e altamente non immunogenica, il che la rende un valido biomateriale adatto per svariate applicazioni biomedicali [78]. Come mostrato in Figura 7, il collagene presenta una conformazione gerarchica complessa che può essere divisa in quattro diverse strutture.

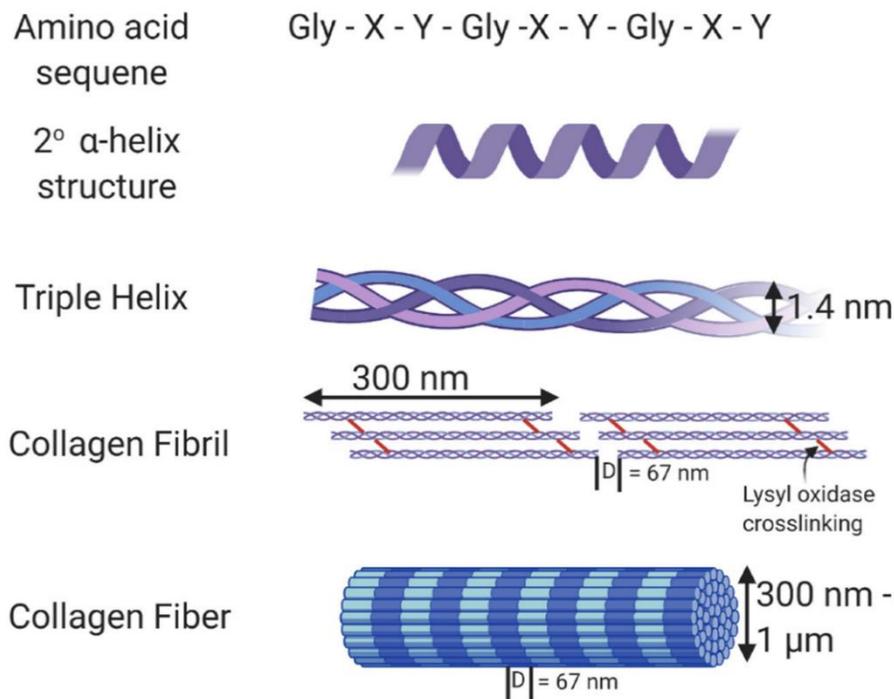


Figura 7: Rappresentazione struttura molecola di collagene [79]

La *struttura primaria* è costituita da una sequenza di tre amminoacidi (glicina-prolina-idrossiprolina) legati tra loro da legami peptidici. La glicina si ripete in sequenza ogni tre residui amminoacidici lungo tutta la lunghezza della catena costituita da circa mille amminoacidi, mentre la prolina stabilizza la conformazione ad elica di ciascuna catena α . La ripetizione regolare della struttura primaria costituisce un filamento, e ogni filamento assume poi una *struttura secondaria* elicoidale sinistrorsa: queste catene polipeptidiche sono dette *catene pro- α* [80]. Le singole catene polipeptidiche presentano alle estremità un propeptide amminoterminale (N) ed uno carbossiterminale (C). L'unione di tre catene α in una conformazione di super-elica destrorsa costituisce una struttura a tripla elica chiamata *procollagene*. I propeptidi terminali svolgono principalmente due funzioni: la prima consiste nel guidare la formazione intracellulare di molecole di procollagene, mentre la seconda è quella di impedire la formazione intracellulare di fibrille di collagene di dimensione elevata, che potrebbero determinare effetti negativi per la cellula stessa. All'esterno della membrana plasmatica i propeptidi delle estremità N e C sono asportati dagli enzimi procollagene peptidasi. In questo modo si ottiene il *tropocollagene*, unità base del collagene, che viene stabilizzato da legami ad idrogeno, che si formano, tra i gruppi *N-H* della glicina e i gruppi *O-H* dell'idrossiprolina di una catena adiacente. Il tropocollagene costituisce la struttura terziaria, rappresenta cioè la conformazione tridimensionale della proteina e tiene conto delle relazioni a lungo raggio nella sequenza amminoacidica. Le molecole di tropocollagene, super-eliche, si dispongono tra loro in file parallele sfalsate, formando *fibrille* (di diametro compreso tra 20 e 100 nm). Le fibrille submicroscopiche si auto-assemblano in *fibre di collagene*, che rappresentano la struttura quaternaria. Le fibre di collagene sono saldate da legami crociati covalenti fra residui di lisina, e formano strutture altamente resistenti a trazione, con diametri e organizzazione differenti a seconda del tessuto interessato.

In natura esistono 28 tipi di collagene, tra questi le tipologie I, II, III, V, XI, XXIV e XXVII sono collagene fibrillari costituiti dalla struttura precedentemente descritta, mentre gli altri tipi sono caratterizzati da un'organizzazione non fibrillare alternativa, come il collagene IV che forma specificamente un reticolo bidimensionale [81]. Essendo la proteina più abbondante nella matrice extracellulare, risulta implicata in una vasta gamma di funzioni, tra cui l'adesione cellulare, la migrazione cellulare, morfogenesi, sostegno e riparazione dei tessuti.

Nella cute sono espresse diverse tipologie di collagene [25], alcune delle quali elencate nella Tabella 3. Queste proteine fibrillari non solo forniscono supporto strutturale alle cellule residenti, ma regolano anche la loro funzione e hanno un ruolo primario nei processi infiammatori. Il collagene di tipo I, ad esempio costituisce circa il 70-80% del derma [26], caratteristica che lo ha reso il polimero di prima scelta per applicazioni di wound healing. la proteina può essere inoltre modificata sfruttando i suoi

gruppi funzionali in modo da aumentare i *cross-links* o legare biomolecole specifiche, nel tentativo di modulare e migliorare le sue proprietà meccaniche e biologiche.

Tabella 3: Distribuzione e funzioni delle diverse tipologie di Collagene nella cute [25]

COLLAGENE	% Total	LOCAZIONE	FUNZIONE
I	80	Derma	Determina la struttura e integrità della cute
III	15	Derma	Fornisce tenacità, flessibilità e determina il diametro delle fibrille di collagene
IV	2-4	Membrana basale	Separa il derma dall'ipoderma e fornisce supporto alle cellule
V	<1	Derma e membrana basale	Riempie e stabilizza l'interfaccia tra epiderma e derma
VI	<1	Strato Papillare del derma	Fornisce resistenza a trazione, e contribuisce al mantenimento della funzione barriera della pelle
VII	<1	Membrana basale	Stabilizza l'associazione della parte inferiore della membrana basale al derma sottostante
XIV	<1	Follicoli Piliferi derma	Può agire nel modulare l'adesione cellula-matrice
XVI	<1	Strato Papillare del derma	Ancora le microfibrille alle membrane basali
XVII (BP180)	<1	Cheratinociti della membrana basale	Mantiene l'aderenza dell'epidermide alla membrana basale

1.4.2.1 Strategie di reticolazione di sistemi a base di collagene

L'utilizzo del collagene come materiale per la realizzazione di tessuti ingegnerizzati per guarigione delle ferite è ampiamente riportato in letteratura. Sistemi a base di collagene vengono infatti utilizzati per ottenere idrogeli, scaffold porosi, membrane e nano/microparticelle per il rilascio di agenti bioattivi disponibili in varie forme e dimensioni, spesso disponibili anche come prodotti commerciali. Tra questi, risultati importanti sono stati ottenuti in ambito clinico nella rigenerazione della cute in seguito a lesioni o ustioni di diverso grado, grazie all'applicazione di sostituti cutanei a base di collagene quali Integra®, Apligraf® e Matriderm® [82]. Integra® è un modello di sostituto cutaneo costituito da collagene bovino, condroitina-6-solfato in forma di membrana. Questo prodotto è ampiamente diffuso per il trattamento clinico di ustioni a spessori parziale e totale della cute. Apligraf® è un equivalente di pelle vivente bilaterale. È composto da collagene bovino di tipo I, cheratinociti allogenicici e fibroblasti neonatali. Tale sostituto ha dimostrato di accelerare il processo di guarigione e chiusura della ferita. Matriderm® è una matrice strutturalmente intatta di collagene bovino di tipo I arricchita con elastina. Viene utilizzato per la rigenerazione cutanea, nel caso di ulcere croniche. La matrice funge da struttura di supporto per l'ingresso di cellule e vasi grazie alla sua particolare

architettura che grazie alla presenza dell'elastina migliora la stabilità e l'elasticità del tessuto rigenerante [82].

L'ampio utilizzo del collagene come elemento di prima scelta nell'ambito di rigenerazione cutanea è dovuto oltre al suo ruolo di principale componente delle ECM, anche alle eccellenti caratteristiche biologiche e buone proprietà fisico-chimiche. Ciononostante, uno dei più grandi limiti dei costrutti a base di collagene è la scarsa resistenza meccanica, dovuta ad uno scarso livello di reticolazione (cross linking) nella matrice di collagene ricostituita in vitro, che interessa per lo più legami deboli tra le molecole [83]. I costrutti scarsamente reticolati sono quindi meno resistenti agli enzimi tissutali o batterici responsabili della degradazione dei dispositivi di collagene impiantati, compromettendo il loro ruolo di barriera fisica. Nella matrice extracellulare naturale infatti le molecole di collagene adiacenti sono legate covalentemente attraverso l'azione di enzimi specifici come la lisina idrossilasi e la lisil-ossidasi che agiscono principalmente sui residui di lisina e idrossilisina, garantendo la formazione di una matrice stabile e rigida composta da un denso imballaggio fibrillare, altamente resistente alla degradazione [84]. Considerando che questi meccanismi non si verificano in vitro, per fornire ai costrutti finali caratteristiche meccaniche migliori e cinetiche di degradazione più lente sono necessari trattamenti chimici o fisici di reticolazione aggiuntivi, in grado di aumentare non solo la loro stabilità in ambiente fisiologico ma anche la resistenza del costrutto. I trattamenti di reticolazione sfruttano i gruppi laterali del polimero (ossidrilici e amminici) per la formazione di legami covalenti e non covalenti tra le molecole proteiche. All'aumentare del grado di reticolazione si ottengono delle strutture più rigide, con migliori proprietà meccaniche e con una maggiore stabilità in ambiente acquoso [83]. I metodi di reticolazione attualmente in uso sono molteplici, e comprendono metodi chimici, fisici o enzimatici, ciascuno dei quali presenta vantaggi e svantaggi che vengono valutati in funzione dell'applicazione del dispositivo.

Alcuni delle strategie maggiormente utilizzate sono illustrate in Figura 8. Questi trattamenti mirano alla reticolazione tra le molecole di collagene o le tra le singole eliche, e la loro efficacia è funzione di diversi fattori come la stabilità dei legami, l'energia associata e il numero di residui coinvolti nel trattamento [85]. È infatti possibile modulare il grado di reticolazione per conferire specifiche proprietà finali allo scaffold. In assenza di reticolazione covalente, le matrici di collagene ricostituite presentano una scarsa stabilità meccanica legata a una minore densità proteica e a una reticolazione molecolare incompleta rispetto alla ECM nativa, risultando quindi non adatte per applicazioni in vivo.

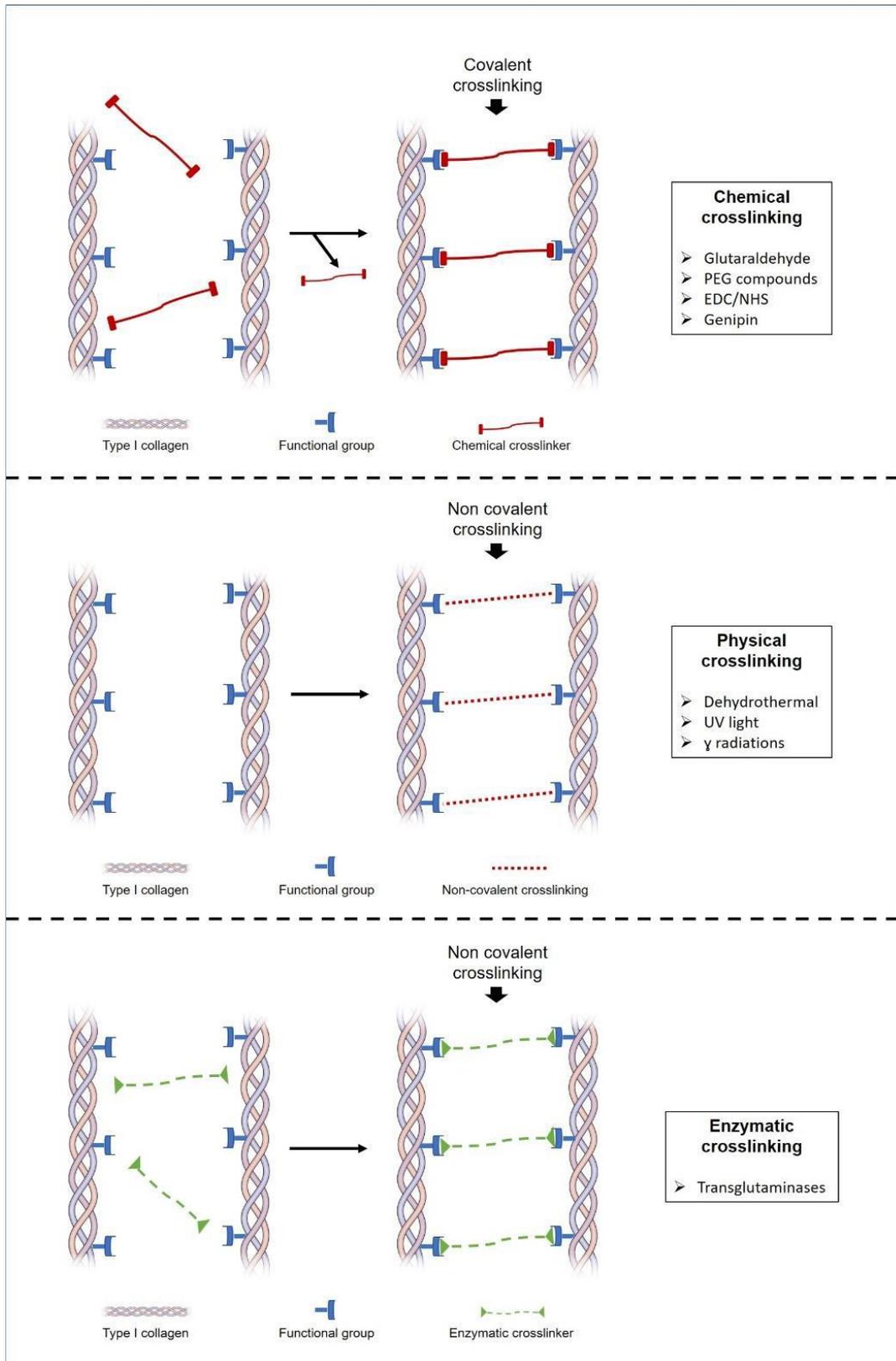


Figura 8: Schema illustrativo delle diverse tecniche di reticolazione maggiormente utilizzate per scaffold a base di collagene.

Benché le strategie siano differenti lo scopo finale è comune e permette di ottenere dei costrutti che meglio si adattano alle specifiche richieste ad un determinato sostituto ingegnerizzato per applicazione in vivo [86]. Tra gli agenti chimici, la glutaraldeide (GTA) è quella più utilizzata. L'efficacia della GTA è dovuta alla sua elevata reattività con diversi gruppi funzionali presenti sulle proteine, e alla sua capacità, ad alte concentrazioni, di formare lunghe catene polimeriche che promuovono il legame di residui amminici situati molto distanti, aumentando quindi lo spazio di azione del reticolante [83]. Nonostante la notevole stabilità e resistenza ottenuta grazie all'azione della GTA sulle matrici a base di collagene, si sono osservati spesso effetti citotossici, sia *in vitro* che *in vivo*, indotti dalla presenza di aldeidi residue non legate alla matrice che vengono rilasciate durante la sua degradazione [86]. Altri agenti reticolanti chimici, come formaldeide, resina epossidica, e agenti di origine vegetale, come esperidina, proantocianidina, epigallocatechina gallato [87], sono stati studiati negli ultimi anni, ma sebbene siano efficaci nel reticolare il collagene, risultano spesso poco adatti, a causa della scarsa efficienza di reticolazione o possibile citotossicità.

Le carbodimmidi, più precisamente la 1-etil-3-(3-dimetilamminopropil) carbodiimmide (EDC) associata alla N-idrossisuccinimide (NHS), sono tra i più comuni reticolanti del collagene, ed offrono un'alternativa non citotossica per reticolazione a *lunghezza zero* (zero-length) rispetto ai metodi sopracitati [88]. La reticolazione a lunghezza zero si ottiene grazie alla capacità delle carbodiimmidi di formare legami covalenti tra i residui amminoacidici adiacenti [86], seguendo un meccanismo di reazione, come illustrato nella Figura 9. Questi legami incrociati si verificano tra glutammato e arginine/lisine, tra cui si creano legami covalenti tra gruppi carbossilici e amminici di molecole di collagene, dove l'urea idrosolubile rappresenta l'unico prodotto di reazione, che può essere facilmente rimosso limitando quindi la citotossicità. Il risultato di tale reticolazione è un costrutto dall'aumentata idrofilicità superficiale, caratteristica vantaggiosa per le applicazioni di rigenerazione cutanea in quanto favorisce l'attività della fibronectina [89].

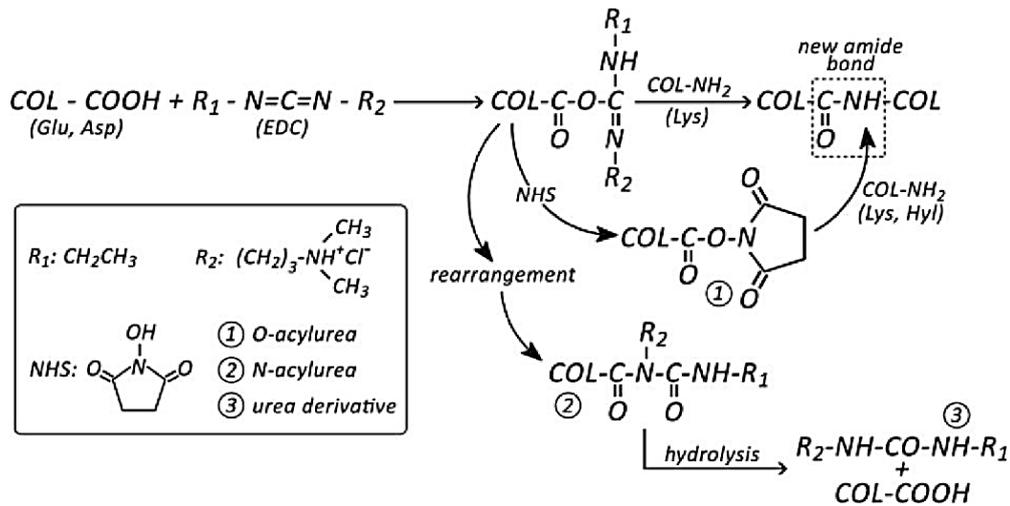


Figura 9: Meccanismo di reticolazione tramite EDC/NHS [89]

Nonostante i buoni risultati evidenziati dall'utilizzo delle carbodiimidi per la reticolazione di materiali a base di collagene, è noto che l'efficienza di questa reticolazione chimica è limitata. Tale limite è da ricondurre all'incapacità delle carbodiimidi di formare legami covalenti oltre a quella che viene definita 'lunghezza zero'. Ciò ostacola infatti il legame tra residui amminoacidici distanti all'interno della stessa molecola di collagene, o fibrille di collagene adiacenti [86]. Diversi studi in letteratura hanno infatti riportato risultati contrastanti circa l'effettivo aumento delle proprietà meccaniche di scaffold a base di collagene dopo i trattamenti EDC, proponendo dei modi alternativi per incrementare l'efficienza di questa reticolazione chimica. Ad esempio, nello studio riportato da Kwangwoo et al., tra le strategie suggerite per aumentare il grado di reticolazione è stata valutata la possibilità di modulare attentamente il tempo e la temperatura del processo, nonché l'uso di etanolo al posto dei solventi a base acquosa [90].

Sulla base di queste considerazioni la ricerca si è spostata verso metodi di reticolazione alternativi, aventi migliore efficienza di reticolazione e privilegiando reticolazioni prive di residui di reticolante nel prodotto finale.

Tra i metodi alternativi, particolare attenzione è stata posta nella possibilità di sfruttare fotoiniziatori di origine diversa per ottenere la reticolazione di sistemi a base di collagene sfruttando l'esposizione a diverse fonti luminose. Particolarmente interessante per le applicazioni nell'ambito della rigenerazione della cute, è l'utilizzo del Rosa Bengala [91],[92],[93]. Il Rosa Bengala (4,5,6,7-tetracloro-20,40,50,70-tetraiodofluoresceina) è un derivato della fluoresceina, dal colore rosa brillante, caratteristica da cui prende il nome [94], con picchi di assorbanza identificati tra 514 nm e 562 nm [95]. Tra i più conosciuti campi di applicazione troviamo l'oftalmologia, in cui viene spesso utilizzato per rilevare danni alla cornea [96]. In aggiunta sono attualmente in fase di sviluppo nuovi

trattamenti medici basati sulla formazione di legami incrociati proteina-proteina indotti da irraggiamento utilizzando il Rosa Bengala (RB) per la reticolazione di sistemi a base di collagene. Tra le applicazioni più promettenti nel campo della rigenerazione delle ferite è infatti presente la possibilità di sigillare le ferite senza sutura semplicemente applicando il RB sulla superficie della stessa, seguita da una breve irradiazione di luce verde (Figura 10). Questa applicazione è nota come legame tissutale fotochimico o PTB [93], [97]. Uno dei principali vantaggi della PTB è la minima cicatrizzazione e fibrosi prodotta rispetto a quella della sutura [98]. Il cross-linking proteico indotto da irraggiamento luminoso previene inoltre dai cambiamenti deleteri del tessuto in risposta a pressioni fisiologiche, rendendo il tessuto meno incline a infiammazione, nota come passivazione tissutale fotochimica [95]. La fotoreticolazione può avvenire secondo due meccanismi distinti: meccanismo diretto o indiretto. Nel **meccanismo diretto** il fotoiniziatore, attivato dall'irraggiamento, reagisce in maniera diretta, creando dei legami covalenti con le molecole circostanti. Inoltre, in seguito all'attivazione del fotoiniziatore, questo produce specie reattive dell'ossigeno come perossido di idrogeno (H_2O_2) e radicali liberi che a loro volta reagiscono con le molecole proteiche presenti favorendo la reticolazione del materiale [99]. Al contrario, nel **meccanismo indiretto**, il reagente fotosensibile attivato dalla luce, interagisce con l'ossigeno allo stato fondamentale presente, producendo ossigeno singoletto (3O_2) specie molto reattiva dell'ossigeno, che ossida le molecole circostanti. La reticolazione e l'aggregazione delle proteine potrebbe quindi essere ricondotta alle attivazione delle specie reattive formatesi in seguito a questa reazione sulle proteine fotoossidate [99-100]. Ciò potrebbe quindi favorire un'interazione di tipo elettrostatico tra molecole adiacenti. Si ipotizza che alcuni amminoacidi presenti nelle molecole di collagene come tirosina, istidina e metionina siano vulnerabili a questo tipo di reazione [99].

Tuttavia, malgrado il numero crescente di usi medici della reticolazione proteica mediata da RB, come ad esempio realizzazione di film a base di chitosano per copertura e rigenerazione delle ferite [95], i meccanismi molecolari sottostanti rimangono in gran parte sconosciuti, e le applicazioni per reticolazione di membrane nanofibrose a base di collagene ancora scarsamente indagate. Per tale motivo nel presente lavoro di tesi si è cercato di investigare gli effetti che il fotoiniziatore potesse avere nei sistemi a base di collagene realizzati tramite tecnica di electrospinning, per valutare le eventuali differenze presenti con il metodo di reticolazione tradizionale effettuato tramite reticolazione chimica con EDC/NHS.

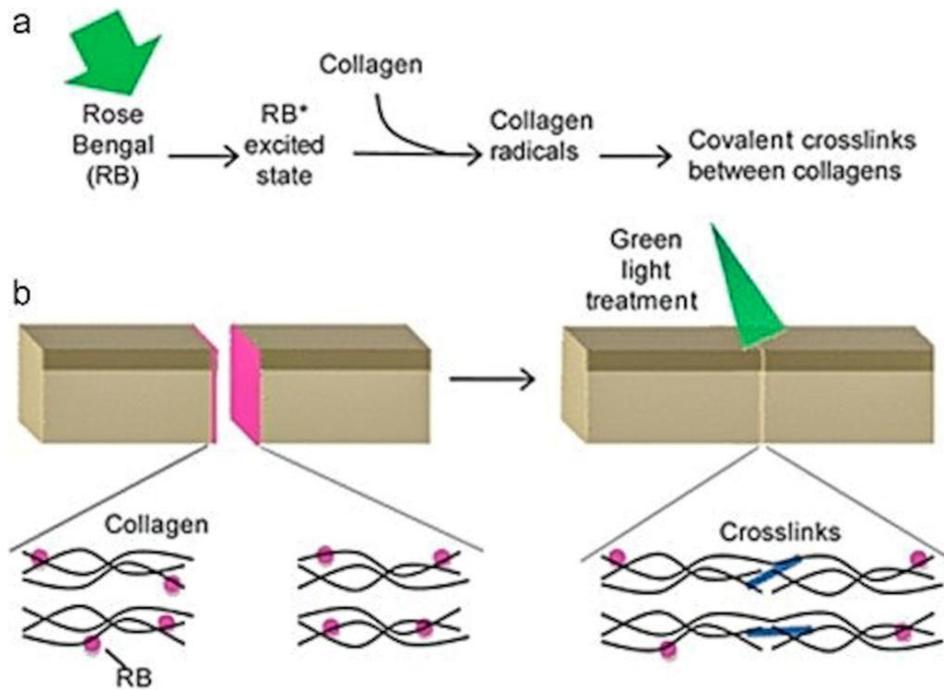


Figura 10: Rappresentazione della reazione di attivazione del Rosa Bengala in seguito a irraggiamento con luce verde [87].

Nonostante gli sforzi e i progressi compiuti nell'ambito delle tecniche di reticolazione, gli scaffold realizzati esclusivamente in collagene, come per tutti i costrutti a base di polimeri naturali, non sempre sono in grado di raggiungere stabilità e proprietà meccaniche adeguate. Di conseguenza, la scelta di usare biomateriali compositi è sempre più frequente, in modo da combinare le ottime caratteristiche biologiche e di superficie del collagene, adatte a promuovere l'adesione cellulare, ad una maggior resistenza meccanica e strutturale caratteristica di altre fasi.

Un'alternativa interessante e innovativa è quindi quella di combinare diversi polimeri naturali per sfruttare al meglio non solo le comuni proprietà di biocompatibilità e biomimeticià ma anche i differenti benefici dei diversi polimeri. Negli ultimi anni, particolare interesse è stato riscontrato nell'uso del chitosano, che ha dimostrato avere buona biocompatibilità, processabilità e ottime proprietà antimicrobiche contro batteri e virus, particolarmente utili per applicazioni nella rigenerazione cutanea [101]. L'efficacia di tali proprietà è stata dimostrata nello studio di Antunes et al. in cui sono state realizzate membrane elettrofilate a base di chitosano da utilizzare per la medicazione delle ferite. In questo studio, il chitosano è stato modificato con arginina per aumentare efficacemente il numero di gruppi carichi positivamente e incrementare così le interazioni elettrostatiche che si generano con la parete cellulare dei batteri [102]. Queste proprietà hanno avviato il suo uso nella produzione di medicazioni per ferite disponibili sul mercato, come HidroKi®, Patch®, Chitopack® [101].

1.4.3 Chitosano

Il chitosano è uno tra i polimeri naturale più utilizzati, ottenuto tramite la deacetilazione alcalina della chitina. È un polimero biocompatibile e biodegradabile con interessanti proprietà antibatteriche e natura policationica che lo rendono adatto ad applicazioni per la rigenerazione delle ferite. È possibile infatti realizzare scaffold a base di chitosano in diverse forme tra cui gel [103], film [104] o matrici fibrose [105]. La chitina è un polisaccaride abbondante in natura che viene ricavato da diversi insetti e crostacei. La sua struttura, visibile in Figura 11, presenta un gruppo acetammide (-NHCOCH₃) particolarmente utile. A causa dell'elevata idrofobicità, è difficilmente solubile in acqua e in altri solventi organici, caratteristica che rende difficile la sua applicazione in ambiente biomedicale [106].

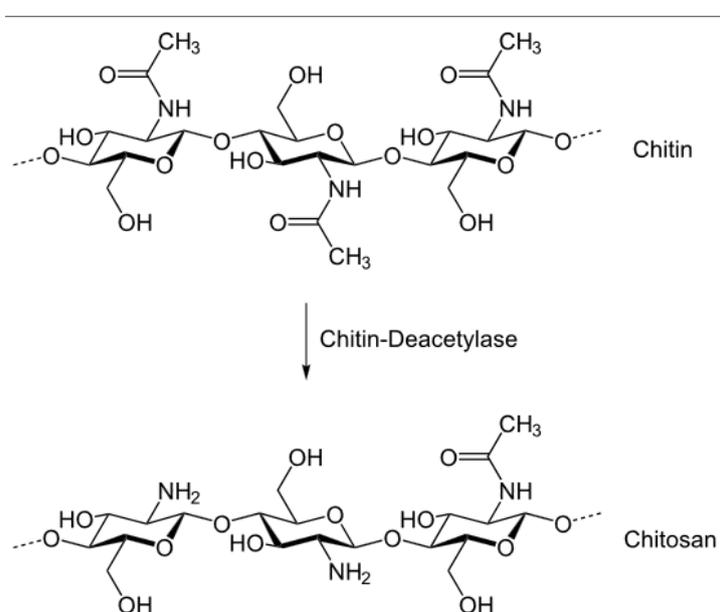


Figura 11: Composizione Chimica della Chitina e deacetilazione in Chitosano [107]

Il chitosano è preparato mediante parziale deacetilazione della chitina in condizioni alcaline tramite idrossido di sodio o per depolimerizzazione della chitina mediante trattamento enzimatico con chitina deacetilasi [106]. Il chitosano è un copolimero a blocchi di D-glucosammina e N-acetil D-glucosammina, e tale organizzazione conferisce la tipica struttura semicristallina al materiale. Sono presenti tre tipi di gruppi funzionali in catena, utili per apportare eventuali modifiche al polimero: un gruppo amminico e due gruppi idrossilici.

Il metodo di preparazione influisce sulle caratteristiche dello stesso, in particolare il grado di deacetilazione e il peso molecolare (da 10000 a 1000000 di Dalton). Il grado di deacetilazione deriva dal rapporto tra la D-glucosammina e la somma tra N-acetil D-glucosammina e D-glucosammina.

Tramite questo è possibile ricavare il numero di gruppi amminici presenti nella catena. Tuttavia, affinché si possa considerare chitosano, è necessario che la chitina abbia un valore di deacetilazione maggiore del 60% [107]. In commercio sono disponibili differenti tipologie di chitosano con peso molecolare medio che varia tra i 4 kDa fino a raggiungere i 20 kDa e grado di deacetilazione compreso tra il 66% e il 95%. Questi due parametri influenzano le caratteristiche fisico-chimiche del materiale, tra cui la solubilità. Infatti, il chitosano presenta un comportamento pH-dipendente, che può essere sfruttato nella realizzazione di scaffold poiché permette la formazione di legami con altre molecole, quali ad esempio proteine. A pH minore di 6.5, il polimero solubilizza in soluzioni acide organiche (particolarmente utilizzato è l'acido acetico) o inorganiche, in seguito alla protonazione dei gruppi NH_2 .

A causa della natura cationica in soluzione, della rigida struttura chimica e delle interazioni inter e intra molecolari, numerosi problemi sono stati riscontrati nel processare il chitosano mediante tecniche di *electrospinning*. Infatti soluzioni a base di chitosano si presentano estremamente viscosi a pH acido e temperatura ambiente, per cui si rende necessario l'utilizzo di basse concentrazioni, spesso in combinazione con altri polimeri, come effettuato in questo lavoro di tesi [108]. Inoltre, come descritto per il collagene, è spesso necessario l'utilizzo di agenti reticolanti, in modo da aumentare la stabilità delle fibre in ambiente acquoso e neutralizzare il loro pH acido.

1.5 Fabbricazione di scaffold tramite tecnica di elettrofilatura (electrospinning)

Nella produzione di tessuti bioingegnerizzati per la rigenerazione cutanea, l'obiettivo è l'ottenimento di strutture quanto più simili alla ECM nativa, con caratteristiche meccaniche atte a favorire il loro impianto in diverse sedi dell'organismo. Come precedentemente illustrato, la presenza delle fibrille di collagene favorisce il corretto orientamento e l'efficace comunicazione tra le cellule nei tessuti, creando inoltre una microporosità ottimale per la diffusione di nutrienti ed ossigeno. Una delle caratteristiche fondamentali che gli scaffold devono possedere è dunque una struttura fibrillare [109].

Una fase importante nella progettazione di uno scaffold è rappresentata dalla scelta della tecnica di fabbricazione del costrutto. Tecniche differenti portano infatti all'ottenimento di strutture con caratteristiche morfologiche, microscopiche e macroscopiche diverse che possono influenzare l'interazione del biomateriale con le cellule impiantate e con i tessuti dell'ospite. Tra gli elementi fondamentali differenziano le varie tecniche vi è la possibilità di controllare l'architettura del prodotto finale. L'architettura degli scaffold alla microscala ha infatti un ruolo decisivo nel guidare l'organizzazione tridimensionale cellulare e il successivo recupero delle funzioni tissutali. Uno scaffold può essere fabbricato essenzialmente con tre diverse architetture, correlate alla struttura dei

pori: microporosa, microfibrata e nanofibrata. La figura sottostante (Figura 12) rappresenta alcuni esempi di come l'architettura dello scaffold possa influenzare il comportamento cellulare. Le cellule seminate su scaffold microporosi o fibrosi, composti da strutture porose con dimensioni di decine di micron, tendono ad attaccarsi e appiattirsi come se fossero coltivate su una superficie piana bidimensionale. Questa condizione di coltura porta a uno squilibrio nell'attaccamento del recettore e ligando in ambiente fisiologico, generando l'attivazione innaturale della segnalazione intracellulare [110]. Negli scaffold nanofibrati, d'altra parte, le dimensioni delle fibre sono uno o due ordini di grandezza inferiori rispetto a quelle delle cellule, e simulano più da vicino la matrice nanofibrata naturale, aumentando i siti di legame cellulare e dirigendo il comportamento e la funzionalità cellulare. Scaffold con l'architettura alla nanoscala inoltre hanno un elevato rapporto superficie-volume che è utile per un più efficace adsorbimento di proteine e molecole bioattive. Ciò significa che un maggior numero di siti di legame e segnalazione potranno essere inseriti nello scaffold per essere presentati ai recettori delle cellule avendo quindi importanti implicazioni per la biomimetica delle funzioni dell'ECM nativo nella produzione di scaffold [110].

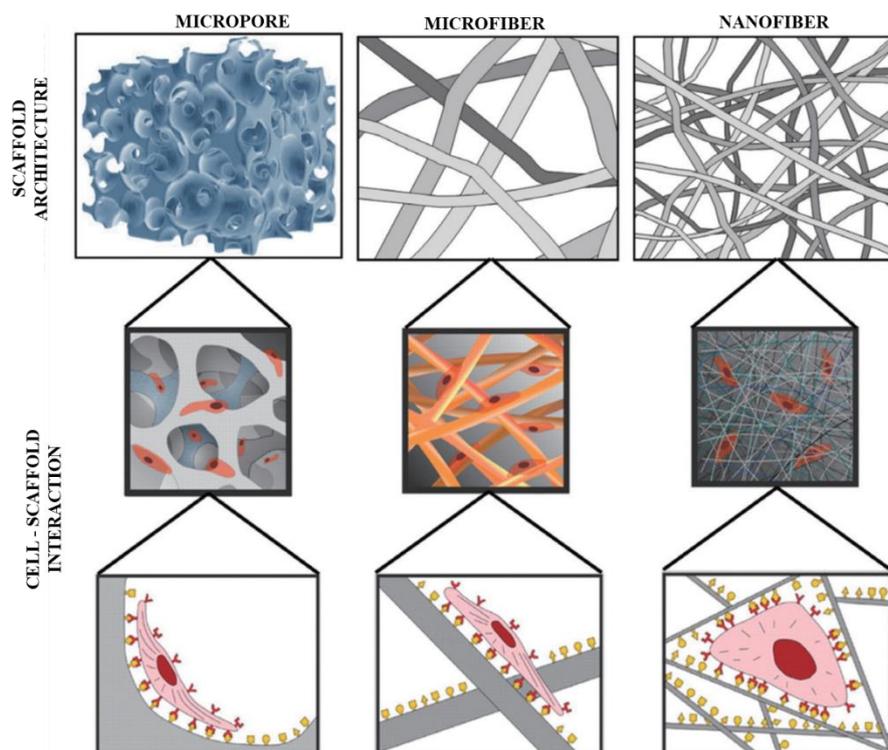


Figura 12: Influenza della morfologia dello scaffold sull'adesione e spreading cellulare [111]

Le tecniche comunemente usate per fabbricare scaffold nanofibrati sono la separazione di fase, il *self-assembly* e l'elettrofilatura. La separazione di fase è una tecnica per la separazione di una soluzione polimerica in domini ricchi di polimeri e solventi, indotti termicamente o con l'aggiunta di

un non solvente del polimero per formare un gel. Questo è seguito da un processo di raffreddamento per fissare la morfologia, e un processo di liofilizzazione per rimuovere il solvente. Tuttavia, la produzione di scaffold con separazione di fase richiede attrezzature specializzate e non permette di ottenere fibre allineate come invece è possibile con l'elettrofilatura [110]. Il *self-assembly* è un processo di auto-organizzazione autonoma delle molecole in modelli e strutture senza l'intervento umano. Ad esempio, molecole anfifiliche che possiedono sia segmenti idrofili che idrofobici, possono auto-assemblarsi in strutture ben ordinate se disperse in solventi acquosi raggiungendo architetture nanofibrose. Tuttavia, il basso rendimento e la complessità della procedura di fabbricazione rendono questa tecnica di difficile applicazione per l'ingegneria dei tessuti su larga scala [110]. Solo l'elettrofilatura è emersa quindi come una tecnica efficiente per produrre in maniera controllata una varietà di nanofibre polimeriche [111].

Nonostante la nascita di questa tecnica risalga al 1902 [112], l'effettivo interesse scientifico per l'*electrospinning* inizia solo all'inizio degli anni novanta, quando numerosi gruppi di ricerca hanno cominciato ad esplorare l'applicazione di diversi materiali nella realizzazione di membrane filtranti, sensori ottici e chimici, elettrodi e tessuti bioingegnerizzati per la medicina rigenerativa.

1.5.1 La tecnica

L'*electrospinning* è una tecnica che permette di ottenere la deposizione di nanofibre polimeriche partendo da una soluzione o un fuso polimerico, sfruttando un sistema di guida elettrostatica e deposizione controllata su un substrato. Diversamente dalle altre tecniche di fabbricazione di scaffold, capaci di produrre fibre con diametri dell'ordine dei micrometri, l'*electrospinning* permette di realizzare scaffold nanofibrosi aventi pori interconnessi con diametri variabili tra i 3 nm e 2 μ m, ma tipicamente aventi valori di poche centinaia di nm [113], e con possibilità di processare sia polimeri naturali che sintetici con sufficiente peso molecolare. Il *set-up* tipico per l'*electrospinning*, rappresentato in Figura 13, è costituito dai seguenti componenti [114]:

- Alimentatore ad alta tensione in corrente continua;
- Siringa in cui viene caricata la soluzione polimerica;
- Pompa per l'erogazione costante della soluzione polimerica ad un flusso costante controllato;
- Collettore conduttore tipicamente di alluminio, che rappresenta la superficie sulla quale si depositano le fibre polimeriche. Esistono diverse tipologie possibili di collettore che

producono membrane con caratteristiche morfologiche differenti. Il collettore può essere: piano, cilindrico rotante, a piani paralleli, a griglia e a disco.

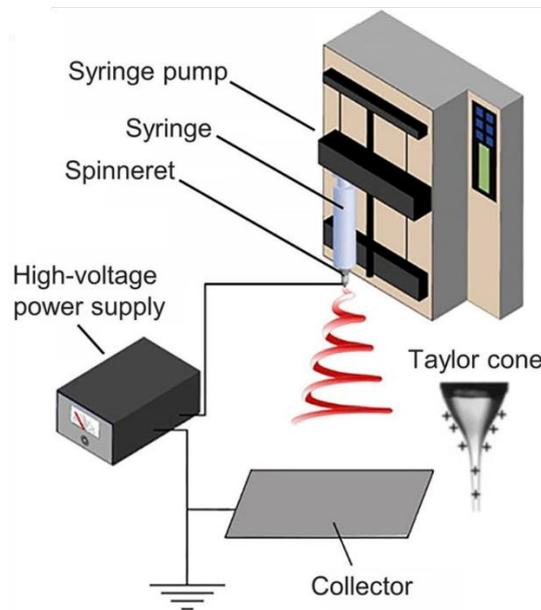


Figura 13: Rappresentazione schematica degli elementi costitutivi del sistema Electrospinning [115]

Il processo prevede l'applicazione di un elevato campo elettrico su un fluido polimerico in soluzione estruso da una siringa regolata da una pompa volumetrica. La tensione impartita (solitamente tra i 5 e i 40 kV) genera una forza elettrostatica che prevale sulla tensione superficiale e gli sforzi viscosi della massa polimerica, permettendo la formazione di un getto che si proietta dall'ago in direzione dell'elettrodo opposto, formato da un apposito collettore generalmente metallico, per la deposizione delle fibre. Il getto elettricamente carico viene accelerato e assottigliato attraversando il campo elettrico. Con l'aumentare della differenza di potenziale il menisco della soluzione all'uscita dall'ago si deforma, e quando si raggiunge un valore critico di tensione in cui la forza elettrica supera la forza della tensione superficiale, il menisco della soluzione polimerica assume una forma conica, nota come cono di Taylor (Figura 14). Il getto carico esce dalla punta del cono ed ha inizio il processo di electrospinning, in cui la direzione del getto è funzione della direzione del campo elettrico. Le cariche trasportate dal getto arrivano al collettore collegato a terra completando così il circuito elettrico. La distanza tra la punta dell'ago e il collettore e il tempo impiegato dalla fibra per percorrere tale spazio sono chiamati rispettivamente spazio e tempo di volo. Durante il tempo di volo il solvente utilizzato per solubilizzare il polimero evapora favorendo la deposizione di una fibra polimerica solida. Si forma

così un non tessuto di fibre con allineamento dipendente dal collettore usato e con diametri dell'ordine dei nanometri [114].

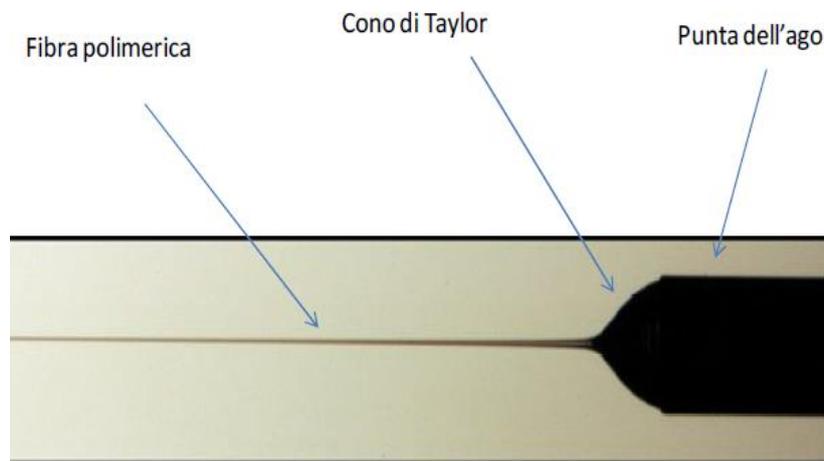


Figura 14: Formazione del cono di Taylor [116]

Numerosi sono i parametri in grado di influenzare la buona riuscita del processo. Tra questi la necessità di assicurarsi che la fibra filata sia del tutto secca nel momento in cui raggiunge il collettore, garanzia di una completa evaporazione del solvente. La scelta del solvente, la distanza tra ago e collettore e la temperatura devono quindi essere valutati attentamente. Questo spiega perché la maggior parte dei solventi utilizzati per solubilizzare polimeri da elettrospinnare, sono solventi organici polari e volatili.

Per aumentare la volatilità del materiale lavorato e promuovere la corretta evaporazione del solvente durante la fase di deposizione si ricorre spesso a solventi tossici e aggressivi [117], fattore che diminuisce la citocompatibilità finale dei costrutti elettrofilati [118]. In particolare, è stato riportato che questi aspetti compromettono la processabilità di polimeri di derivazione naturale come il collagene con tecnologie di elettrofilatura. Di conseguenza, sono attualmente in atto diverse strategie che sfruttano l'uso di solventi meno aggressivi e tossici con l'obiettivo di preservare le caratteristiche fisico-chimiche di materiali più sensibili, quali ad esempio il collagene, garantendo al tempo stesso un'elevata citocompatibilità dei costrutti. Tra questi solventi possiamo trovare ad esempio soluzioni a base di acidi relativamente innocui a basse concentrazioni, quale acido acetico, o soluzioni acquose a base di etanolo o sali ionici [119].

Sebbene sia sempre descritto come una tecnica di processo semplice, l'elettrospinning è governato da un alto numero di parametri che influenzano la formazione delle fibre e la loro struttura finale. Il processo di elettrofilatura è governato da molteplici fattori, classificati in parametri della soluzione, parametri di processo e parametri ambientali [114]. Ciascuno di questi parametri influenza in modo

significativo la morfologia delle fibre ottenute. La corretta ottimizzazione di questi fattori può portare alla creazione di matrici caratterizzate da nanofibre di morfologia e diametro desiderato. Di seguito sono quindi elencati i principali **parametri di processo dipendenti dallo strumento utilizzato**:

- ***Voltaggio***: è necessario applicare un voltaggio minimo per garantire la formazione delle fibre. All'aumentare del voltaggio le fibre mostrano dei diametri minori in quanto le forze di repulsione all'interno del getto aumentano favorendone l'assottigliamento. Molti studi però dimostrano che la dipendenza del diametro dalla differenza di potenziale applicata sia ambigua, probabilmente a causa della maggiore incidenza di altri parametri. In alcuni lavori è infatti riportato un incremento del diametro all'aumentare della tensione [114].
- ***Flusso di materiale***: il flusso della soluzione incide sulla velocità complessiva del processo. Per bassi flussi di materiale, il processo è più lento e permette una migliore evaporazione del solvente prima che le fibre raggiungano il collettore. Al contrario, se il flusso è troppo elevato, il solvente non riuscirà ad evaporare totalmente e si ottengono spesso fibre poco omogenee caratterizzate dai tipici difetti di elettrofilatura '*beads*' [114].
- ***Distanza tra ugello e collettore***: è stato riscontrato in diversi studi che all'aumentare della distanza tra emettitore e collettore il diametro delle fibre diminuisce [114]. Esiste infatti una distanza minima al di sotto della quale non si ottiene la formazione delle fibre in quanto il solvente non ha sufficiente tempo per evaporare, generando quindi un flusso instabile.

I **parametri di sistema** dipendono invece principalmente dalla soluzione polimerica utilizzata. Tra questi troviamo:

- ***Concentrazione e viscosità***: il livello di concentrazione di soluto è un parametro fondamentale poiché se tale valore è al di sotto di una soglia minima si instaura il processo dell'*'electrospray'* in cui, a causa della viscosità della soluzione eccessivamente bassa, il getto si trasforma in goccioline [120]. Una bassa viscosità non permette la produzione di fibre continue (Figura 15), mentre una viscosità troppo alta rischia di far bloccare la soluzione nell'ugello della siringa, impedendo un processo continuo a causa della difficoltà di formazione del getto. L'aumento della concentrazione di polimero in soluzione, e quindi della viscosità finale del sistema riduce la formazione di difetti (*beads*), ma incrementa le dimensioni delle fibre [114].
- ***Tensione superficiale***: è un parametro profondamente correlato al solvente utilizzato. Generalmente riducendo la tensione superficiale è possibile minimizzare la formazione di goccioline e di difetti sulle fibre [114]. Infatti, se la tensione superficiale è elevata si

incrementa la presenza di difetti sul prodotto finale poiché le fibre vengono prodotte in maniera discontinua.

- **Conduttività:** è legata a diversi parametri, tra cui il tipo di polimero utilizzato, il solvente in cui viene disciolto e la presenza di sali in soluzione. Ad esempio il cloruro di sodio e il cloruro di calcio possono essere aggiunti alle soluzioni polimeriche per incrementare la conduttività complessiva del sistema [114]. Da tale parametro dipende il diametro delle fibre, infatti, per una conduttività maggiore il diametro aumenta, mentre se la conduttività è troppo bassa le fibre saranno discontinue e caratterizzate da difetti. Tuttavia anche valori troppo elevati rendono il flusso poco stabile in presenza di campi elettrici intensi generando fibre poco uniformi [121].
- **Peso molecolare:** ha un effetto significativo sulle proprietà reologiche, e quindi la viscosità, la tensione superficiale, e la conduttività della soluzione. Se il peso molecolare del polimero viene aumentato mantenendo la concentrazione costante, la viscosità della soluzione aumenta significativamente, riducendo la velocità di evaporazione del solvente. Le fibre raggiungeranno il collettore ancora relativamente umide, acquistando quindi una morfologia appiattita. Per bassi pesi molecolari al contrario la velocità di evaporazione del solvente aumenta.

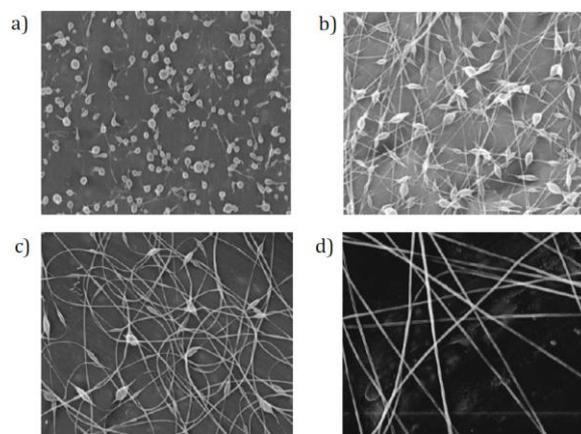


Figura 15: Immagini SEM) di diverse morfologie delle fibre all'aumentare della viscosità e della concentrazione della soluzione polimerica [122]

Il processo di *electrospinning* risulta anche influenzato da parametri di natura ambientale come temperatura e umidità, presenti nella camera. L'**umidità relativa (RH)** modifica la morfologia delle fibre perché può influenzare non solo le proprietà meccaniche che sono correlate alla rigidità, e quindi al diametro delle fibre, ma anche l'evaporazione del solvente e l'eventuale presenza di pori. In generale, un incremento nella RH comporta la formazione di fibre spesse porose superficialmente,

che possono evolvere in fibre eterogenee affette da *beads*. [121]. D'altro canto, una bassa umidità velocizza l'evaporazione del solvente e conferisce alle fibre una superficie liscia ed omogenea. In aggiunta all'umidità, anche la **temperatura** può fortemente influenzare la velocità di evaporazione del solvente e la viscosità della soluzione, e di conseguenza il diametro delle fibre. Inoltre, in base al polimero scelto, a volte è necessario impostare una determinata temperatura per poter mantenere la soluzione polimerica allo stato liquido durante l'intero processo [121].

Un ulteriore elemento da tenere in considerazione è che durante il tempo di volo, a causa dell'instabilità delle cariche elettriche, la traiettoria del fluido subisce delle deviazioni dando vita ad un processo definito '*bending*' che causa la deposizione disordinata delle fibre con ottenimento di strutture interconnesse con porosità variabile. Per minimizzare gli effetti del *bending*, nel caso in cui l'applicazione dello scaffold richieda un orientamento ordinato delle fibre polimeriche che induca una specifica disposizione nello spazio delle cellule, si utilizzano collettori rotanti con alte velocità di rotazione [123]. Infatti, oltre alle proprietà specifiche del materiale e ai parametri di processo, la scelta del collettore determina in modo specifico le caratteristiche morfologiche della matrice risultante. La configurazione più comune prevede l'utilizzo di un collettore a lastra piana per ottenere matrici nanofibrose con orientamento casuale (*random*). In alternativa, come rappresentato in Figura 16, è possibile utilizzare collettori a cilindro rotante e mandrini per ottenere, rispettivamente, scaffold con fibre allineate o strutture tubolari [124]. È infatti noto che le cellule reagiscono in modo diverso alla micro-topografia e nano-topografia. La migrazione cellulare può essere diretta utilizzando vari tipi di segnali, inclusi segnali topografici, chimici e meccanici [114]. Se realizzate con il diametro, l'allineamento, la chimica di superficie e le proprietà meccaniche corretti, le nanofibre possono fungere da substrati o impalcature efficaci per controllare la migrazione di cellule. Sulle nanofibre orientate casualmente, le cellule tendono a migrare lungo tutte le possibili direzioni, determinando quindi una breve distanza di migrazione. Viceversa, su nanofibre allineate, le cellule sono dirette a migrare lungo le stesse, presentando di conseguenza una velocità di migrazione notevolmente aumentata [114].

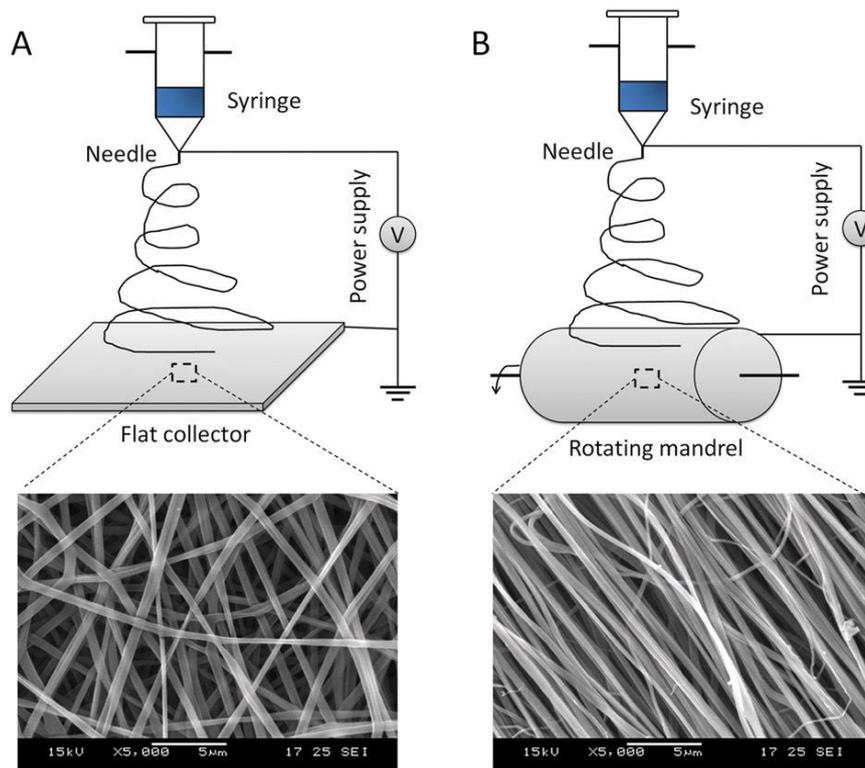


Figura 16: Set up dell'elettrospinning con differenti collettori: a) Piatto per ottenere fibre con allineamento casuale; b) Cilindro rotante per ottenere fibre allineate [125]

1.5.2 Scaffold nanofibrosi elettrofilati per rigenerazione cutanea

Attualmente, gli scaffold nanofibrosi realizzati tramite tecniche di elettrofilatura sono ampiamente utilizzati nelle medicazioni delle ferite a causa della loro eccellente capacità di replicare la nano- e micro-architettura della matrice extracellulare naturale, la buona permeabilità e la possibilità di essere funzionalizzati con differenti molecole bioattive [38]. Membrane formate da fibre orientate in modo casuale, come quelle prodotte dall'elettrofilatura su collettore piano, possiedono una buona anisotropia e un'elevata resistenza a trazione, elementi chiave per la realizzazione di sostituti cutanei [38]. Un esempio può essere rappresentato dallo studio di Liu et al. [126] dove sono state prodotte nanofibre composte da acido poli(lattico-co-glicolico) (PLGA) e collagene aventi diametro medio pari a 250 nm. Le nanofibre non hanno dimostrato in vitro alcuna evidenza di citotossicità, promuovendo invece l'adesione e la proliferazione delle cellule di fibroblasti umani. Il successivo studio in vivo su modelli murini aventi ferite a pieno spessore ha mostrato come l'effetto curativo delle nanofibre di PLGA-collagene fosse più efficace e rapido rispetto alle medicazioni commerciali quali Duoderm® e spugna di garza, ottenendo quindi una diminuzione dell'area della ferita in breve tempo grazie alla formazione di tessuto fibroso di nuova sintesi e ri-epitelizzazione completa. Tra i numerosi vantaggi dell'utilizzo di scaffold nanofibrosi sono da considerare la possibilità di

modifica superficiale e funzionalizzazione, sfruttando la vasta area superficiale esposta, creando dei costrutti più funzionali e bioattivi. Nel caso della rigenerazione cutanea particolarmente interessante è la possibilità di combinare o funzionalizzare le fibre delle membrane con molecole bioattive, antimicrobiche o in grado di promuovere i processi di angiogenesi. In questo contesto, nello studio presentato da Ahmed et al. [127] sono state realizzate matrici nanofibrose a base di chitosano e alcool polivinilico (PVA) arricchite con nanoparticelle di ossido di zinco. La presenza del chitosano e delle nanoparticelle ha dimostrato un'efficace attività antimicrobica contro diversi tipi di batteri, tra cui *Escherichia coli*, *P. Aeruginosa* e *Bacillus subtilis*. Studi *in vivo* sulla rigenerazione della cute lesa sono stati eseguiti su conigli diabetici e le nanofibre chitosano-PVA-ZnO hanno promosso un aumento significativo del tasso di rimarginazione delle ferite. L'analisi istologica ha inoltre dimostrato la capacità delle membrane di promuovere e velocizzare la ri-epitelizzazione e la formazione di tessuto cicatriziale.

La versatilità della tecnica di elettrofilatura consente inoltre di realizzare matrici aventi un'architettura organizzata, con fibre allineate capaci di promuovere la proliferazione cellulare e guidarne maggiormente la differenziazione [38]. Un utile esempio relativo alla realizzazione di matrici aventi fibre con morfologia allineata è quello di Li et al. [128] nel quale sono state fabbricate matrici nanofibrose allineate a base di poli-(l-acido lattico) (PLLA), grazie all'utilizzo di un collettore cilindrico avente velocità di rotazione elevata. Dalle analisi *in vitro* eseguite sulle membrane è stato dimostrato come tale allineamento abbia favorito un aumento della proliferazione cellulare, e un miglioramento *in vivo* nella migrazione delle cellule cutanee epidermiche attraverso la ferita grazie alla presenza dello scaffold in PLLA. Nell'ottica di realizzare costrutti biomimetici, sistemi a base di biopolimeri naturali tra cui collagene di tipo I hanno dimostrato essere particolarmente promettenti per mimare le caratteristiche composizionali della ECM dei principali tessuti, tra cui la cute. Un esempio delle potenzialità di sistemi a base di collagene elettrofilati è stato fornito dal lavoro di Su Rho e collaboratori [129]. In questo studio, scaffold nanofibrosi in collagene di tipo I sono stati elettrofilati per realizzare medicazioni per ferite croniche. Le membrane di collagene risultanti hanno dimostrato un'elevata porosità, eccellente resistenza meccanica, e dimensione delle fibre comparabile con quella dell'ECM naturale. Questi parametri sono risultati essenziali nei test *in vitro* per promuovere l'adesione e la proliferazione dei cheratinociti, le principali cellule del tessuto cutaneo.

Sulla base delle precedenti considerazioni, l'obiettivo di questo lavoro di tesi è stato quello di valutare la fabbricazione di membrane nanofibrose a base di collagene di tipo I tramite tecniche di elettrofilatura, in grado di mimare al meglio la morfologia della matrice extracellulare dei principali componenti della cute, creando un potenziale strumento a supporto delle diverse fasi di rigenerazione cutanea. Volendo inoltre migliorare la scarsa stabilità e resistenza dei sistemi a base di collagene

elettrofilati, sono state valutate due diverse reticolazioni, una chimica mediante l'utilizzo dei reticolanti EDC-NHS, e una fisica, tramite l'utilizzo di un fotoiniziatore citocompatibile (Rosa Bengala). In ultimo, si è cercato di migliorare ulteriormente la processabilità del materiale e la resistenza dei costrutti finali valutando la combinazione con un secondo polimero, il chitosano.

2. MATERIALI E METODI

Nel seguente capitolo verranno riportati i materiali utilizzati per la realizzazione delle membrane elettrofilate, i processi di produzione e le diverse caratterizzazioni effettuate sugli scaffold finali.

2.1 Preparazione delle soluzioni a base di collagene (20%NCOL in 40% AA)

Per sviluppare formulazioni a base di collagene adatte all'elettrofilatura, le soluzioni sono state preparate seguendo un protocollo precedentemente ottimizzato dal gruppo di ricerca [130]. In questo lavoro di tesi è stato utilizzato collagene di tipo I di origine murina (NOVAICOS Srl, Novara). Il collagene, originariamente in forma liquida, è stato sottoposto ad un processo di liofilizzazione sottovuoto ($< 0,1$ mbar) tramite liofilizzatore Lyovapor L-200 (Büchi, Svizzera) e successivamente pesato per poter essere disciolto in concentrazione pari al 20% in peso (w/v) in una soluzione di acido acetico al 40% in acqua (AA). Per favorirne la corretta dissoluzione del collagene (COLL), considerate le elevate concentrazioni, la soluzione è stata lasciata in agitazione durante la notte tramite *stirring* magnetico a 100 rpm a temperatura ambiente e utilizzata subito dopo la preparazione. La Figura 17 schematizza i passaggi fondamentali del protocollo seguito.

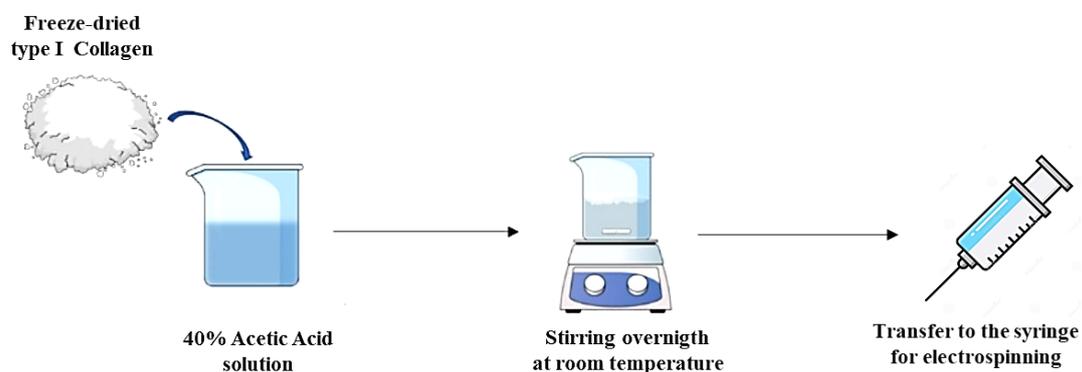


Figura 17: Rappresentazione schematica delle fasi di preparazione della soluzione a base di collagene.

2.2 Preparazione delle soluzioni di collagene contenenti Rosa Bengala (20%NCOL + 0,1%RB in 40% AA)

Come precedentemente descritto nella sezione 2.1 per creare la soluzione di collagene, le polveri precedentemente liofilizzate sono state disciolte in acido acetico al 40% v/v per ottenere una concentrazione finale del 20% (w/v). Per ottenere un sistema fotoreticolabile, in questo lavoro di tesi è stato utilizzato un fotoiniziatore citocompatibile, Rosa Bengala (*Sigma-Aldrich*), avente purezza maggiore dell'85% e sensibile ad una lunghezza d'onda di 514 nm. Sulla base di precedenti studi [131], le polveri di RB sono state disciolte con una concentrazione pari a 0,1% in peso (w/v) nella soluzione di collagene solo in seguito alla completa dissoluzione dello stesso. La soluzione così ottenuta è stata mantenuta in agitazione per 24 ore a 100 rpm a temperatura ambiente (Figura 18). A causa dell'elevata fotosensibilità del fotoiniziatore il processo di preparazione della soluzione è stato svolto evitando l'esposizione di quest'ultima a fonti luminose per ridurre al minimo la possibilità di una prematura reticolazione.



Figura 18: Rappresentazione schematica delle fasi di preparazione della soluzione contenente il fotoiniziatore

2.3 Preparazione delle soluzioni a base di collagene e chitosano (COLL/CS in 40%AA)

Avendo come obiettivo finale quello di migliorare la processabilità del sistema e le caratteristiche finali dei costrutti, è stata testata la combinazione di collagene di tipo I (COLL) e chitosano (CS). A questo scopo, diverse concentrazioni di chitosano sono state testate facendo riferimento a protocolli presenti in letteratura [108], [132]–[134]. Per la preparazione delle soluzioni è stato utilizzato un chitosano avente peso molecolare medio (190 kDA) e grado di deacetilazione compreso tra 75% e 85%. Le soluzioni sono state create in 40% AA mantenendo una concentrazione totale di polimero pari

al 20% (w/v) e variando i rapporti di massa collagene/chitosano al fine di trovare la formulazione più adatta per il processo di elettrofilatura. In particolare, i rapporti collagene/chitosano investigati sono stati: COLL/CS = 90/10 e 95/5 (w/w). In un primo momento le polveri di chitosano sono state pesate e inserite all'interno della soluzione di acido acetico. Per garantire una completa solubilizzazione del chitosano la soluzione è stata mantenuta in agitazione a temperatura ambiente per 72 ore tramite piastra magnetica. Solo in seguito alla completa dissoluzione del chitosano è stato aggiunto il collagene liofilizzato, e la soluzione dei due polimeri è stata mantenuta in agitazione per tutta la notte prima del suo utilizzo (Figura 19).

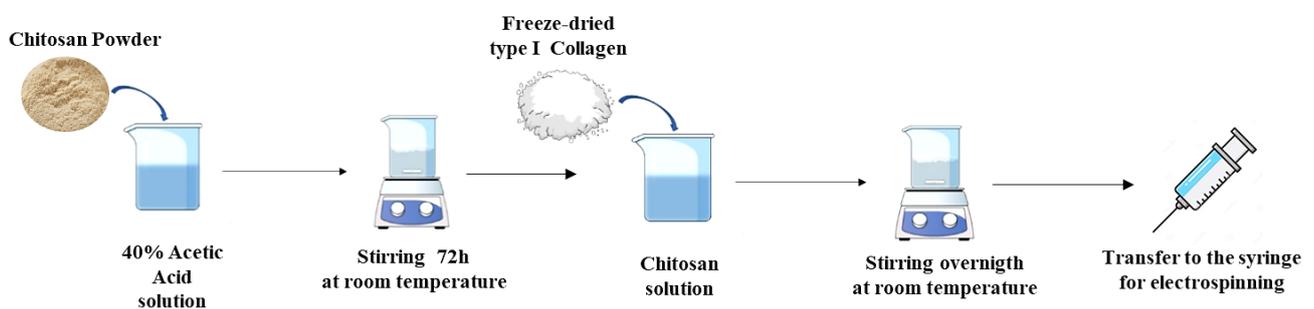


Figura 19: Rappresentazione schematica delle fasi di preparazione della soluzione a base di collagene e chitosano

2.4 Caratterizzazione reologica delle soluzioni

Con l'obiettivo di valutare la viscosità e la processabilità complessiva delle soluzioni realizzate sono state effettuate analisi reologiche sulle diverse formulazioni create (20%NCOL in 40% AA, 20%NCOL + 0,1% RB in 40% AA e COLL/CS in 40%AA).

La reologia è la scienza che studia lo scorrimento e la deformazione della materia in seguito all'azione di una forza ed in relazione all'intensità, alla durata e alla velocità di applicazione della forza [135]. Le analisi reologiche studiano principalmente il comportamento di materiali viscoso-elastici complessi. Tali materiali presentano un comportamento intermedio tra solidi elastici e fluidi, e mostrano una risposta allo sforzo in parte di tipo elastico ed in parte di tipo viscoso. La caratteristica che differenzia questi materiali dagli altri è che, mentre nel caso dei solidi elastici e dei fluidi viscosi la risposta ad uno sforzo o ad una deformazione istantanea è anch'essa istantanea ed indipendente dal tempo, nel caso dei materiali viscoelastici è una funzione del tempo [136]. I principali parametri investigati dagli studi reologici sono la viscosità (misura della resistenza del materiale ad una deformazione) e il modulo di taglio complesso (dato dalla relazione tra la tensione complessa e la deformazione), a seguito dell'applicazione di specifiche sollecitazioni. Durante l'utilizzo di un

reometro rotazione, le principali relazioni tra i parametri fisici coinvolti sono quelle espresse nella Figura 20:

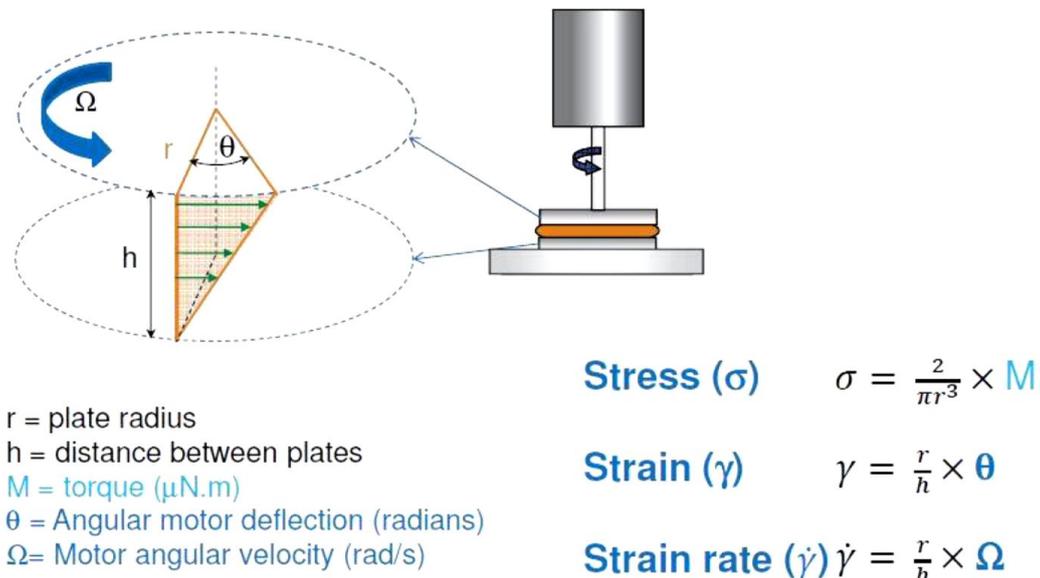


Figura 20: Rappresentazione delle sollecitazioni applicate tramite reometro rotazionale

Tramite questo strumento è possibile eseguire *test di flusso* (in rotazione continua) per indagare la viscosità del materiale, impostando il moto rotatorio della geometria (*shear stress; shear rate*) e la temperatura desiderata.

Oltre alle prove di flusso, è possibile indagare la risposta dei materiali in condizione di sollecitazione oscillatoria, per determinare i parametri viscoelastici come i moduli di conservazione (G') e di perdita (G''), e la loro dipendenza da tempo frequenza e ampiezza dell'oscillazione. È inoltre possibile eseguire prove in transitorio, per studiare la risposta del campione sottoposto a stress costante e il recupero una volta rimosso lo stimolo.

Il valore della viscosità delle soluzioni realizzate è stato studiato per valutare la processabilità delle stesse tramite la tecnica dell'elettrofilatura.

In dettaglio, i test sulle diverse soluzioni sono stati eseguiti utilizzando un reometro a sollecitazione controllata DHR-2 (TA Instruments, Waters) dotato di una geometria a piatti paralleli del diametro di 20 mm e di un sistema Peltier, per controllare costantemente la temperatura del sistema (Figura 21).



Figura 21: Reometro rotazionale DHR-2 utilizzato per le analisi

Per ciascuna soluzione realizzata sono state condotte prove di flusso (*Flow Ramps*) per studiare la viscosità in un ampio intervallo di sollecitazione di taglio. Per l'analisi le diverse soluzioni sono state sottoposte a una sollecitazione di taglio crescente da $0,01 \text{ s}^{-1}$ fino a 1000 s^{-1} mantenendo costante la temperatura a 23°C , ossia la temperatura di processo.

Per poter effettuare le prove reologiche ogni campione di soluzione è stato posto sul piatto di Peltier e la geometria avvicinata a quest'ultimo di un *gap* variabile tra 500 e $800 \mu\text{m}$. Ciascun campione è stato inoltre utilizzato per un solo test e la misura ripetuta per tre volte in modo da ottenere una curva media finale

2.5 Realizzazione delle membrane tramite electrospinning

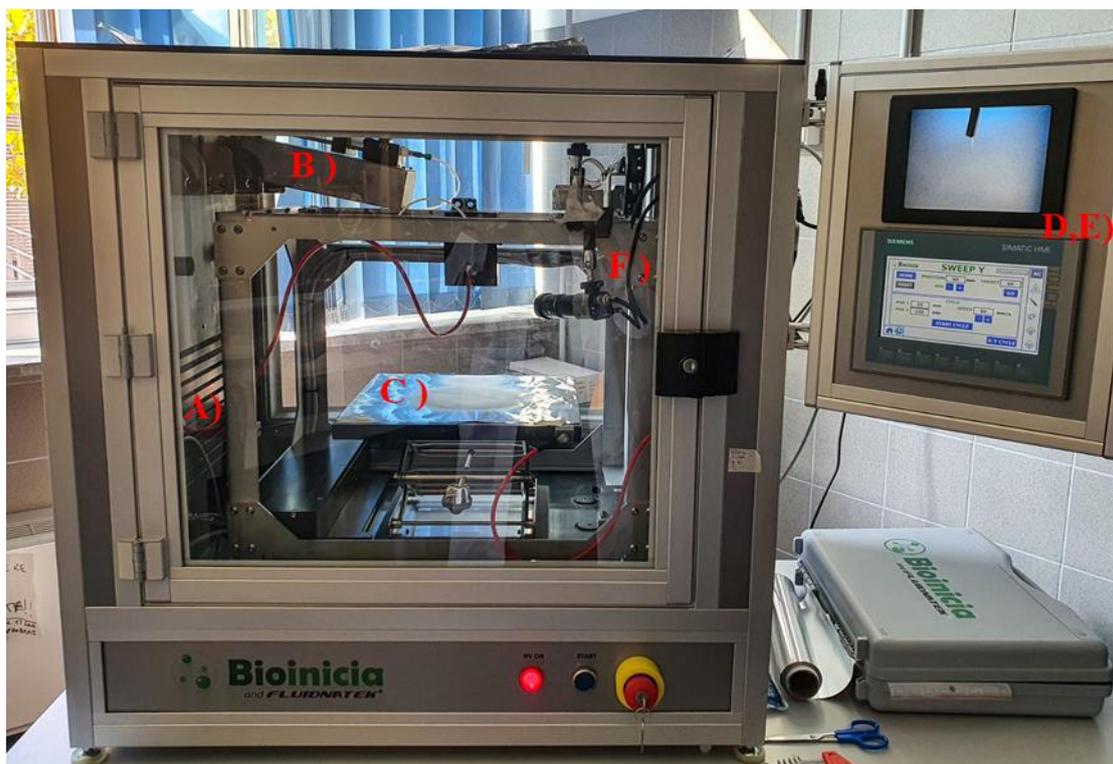


Figura 22: Strumento dell'electrospinning usato per la produzione delle membrane

Con l'obiettivo di realizzare matrici nanofibrose, le diverse soluzioni realizzate seguendo i protocolli descritti nelle sezioni 2.1, 2.2 e 2.3, sono state processate tramite tecnica dell'elettrofilatura.

L'elettrofilatura rappresenta uno strumento promettente per la produzione di scaffold biomimetici in quanto consente la produzione di costrutti nanofibrosi che imitano le caratteristiche della matrice extracellulare su scala micro e nanometrica [108]. Questo processo consiste nella deposizione di fibre a partire da soluzioni polimeriche grazie all'applicazione di elevati campi elettrici che innescano la formazione di filamenti di materiale, successivamente depositati allo stato secco per l'evaporazione del solvente su uno specifico collettore posto a terra. Le soluzioni polimeriche sono normalmente estruse attraverso aghi metallici regolando il flusso del materiale mediante pompe a siringa. L'alimentazione ad alta tensione è invece responsabile della creazione di un campo elettrico che guida il getto materiale, creato quando le forze elettriche superano la tensione superficiale del materiale, verso il collettore di raccolta.

Il dispositivo utilizzato, riportato in Figura 22, corrisponde al modello Fluidnatek LE-50 (Bioinicia) ed è costituito dalle seguenti componenti:

- a) Generatore di tensione regolabile da 0 kV a 30 kV per la polarizzazione dell'emettitore.

- b) Pompa volumetrica a siringa per un controllo accurato dell'estrusione delle soluzioni, con flussi minimi e massimi impostabili pari rispettivamente a 0,1 $\mu\text{L/h}$ - 6000 mL/h e forza lineare pari a 100-200N.
- c) Diverse tipologie di collettore collegato ad una tensione di -2kV : 1) collettore piatto con piastre in acciaio inossidabile di dimensioni 200 mm x 200 mm, con supporto orientabile verticalmente o orizzontalmente; 2) collettore cilindrico in alluminio anodizzato avente diametro di 100 mm e lunghezza di 200 mm che consente di raggiungere velocità di rotazione da 100 giri/min fino a 2000 giri/min.
- d) Interfaccia touch screen per un controllo immediato dello strumento per la regolazione dei parametri di processo e ambientali.
- e) Sistema di controllo di temperatura e umidità rilevate tramite appositi sensori posti all'interno della camera di filatura.
- f) Telecamera analogica collegata con obiettivo per consentire il monitoraggio ravvicinato del Taylor Cone e del getto, per una corretta ottimizzazione dei parametri di filatura.

Le diverse soluzioni preparate (20%NCOL in 40% AA, 20%NCOL + 0,1% RB in 40% AA e COLL/CS in 40%AA) sono state inserite all'interno di una siringa da 5 mL, posizionata nell'apposito alloggiamento collegato alla pompa volumetrica, ed estruse attraverso un ago da 21 G (diametro interno pari 0.8 mm). Per ogni soluzione sono state eseguite prove preliminari di stabilizzazione del flusso, testando diversi parametri di processo come indicato in tabella 4. Tensione, flusso di materiale e distanza tra ago e collettore sono stati variati fino a raggiungimento di una condizione di stabilità, constatata tramite l'osservazione del cono di Taylor nell'apposito monitor. Ciascun set di parametri è stato testato elettrofilando le soluzioni per 20 minuti, annotando le eventuali problematiche riscontrate per effettuare poi le successive valutazioni e confronti. Le membrane così ottenute sono state poi analizzate mediante microscopia elettronica al fine di definire le loro caratteristiche morfologiche in base ai parametri impostati.

Tabella 4: Parametri di processo per l'elettrofilatura delle soluzioni realizzate

PARAMETRI DI PROCESSO	COLLETTORE PIANO	COLLETTORE ROTANTE
TENSIONE	20-24 kV	20-24 kV
DISTANZA AGO-COLLETTORE	8-14 cm	8-14 cm
FLUSSO	100-300 $\mu\text{L/h}$	100-300 $\mu\text{L/h}$
ROTAZIONE COLLETTORE	-	200-2000 rpm

A seguito dell'ottimizzazione dei parametri di processo, sono state realizzate le membrane nanofibrose elettrofilando i diversi sistemi a base di collagene per tre ore consecutive in modo da ottenere uno spessore sufficiente alla seguente manipolazione dei campioni. In particolare, per ottenere delle matrici con fibre non allineate (random) è stato usato un collettore piano (Fig. 23 a), mentre un collettore cilindrico rotante è stato adoperato per la produzione di matrici con nanofibre allineate (Fig. 23 b). In entrambi i casi, i collettori sono stati rivestiti con un foglio di alluminio. Ciò ha permesso di ottenere degli scaffold con uno spessore tale da poter eseguire successivi trattamenti di reticolazione, e i test necessari per la caratterizzazione morfologica, fisico-chimica e meccanica.

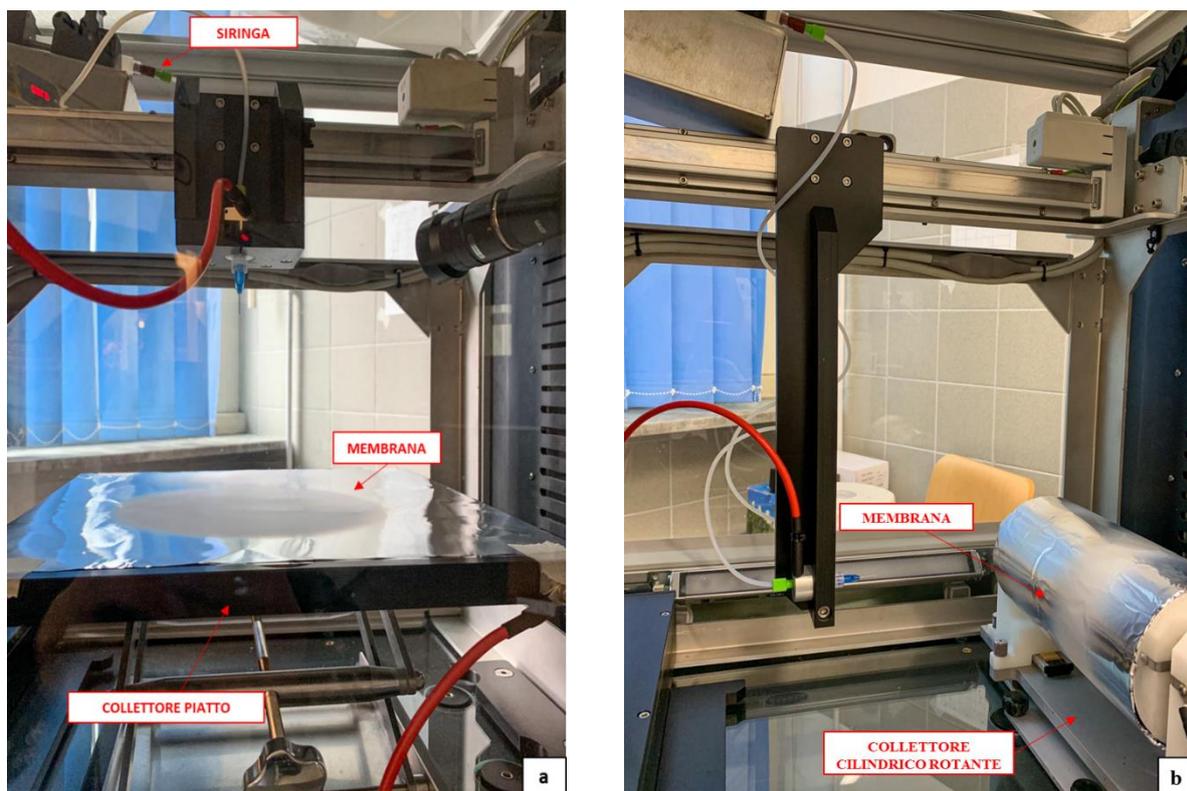


Figura 23: Differenti set-up utilizzati per la realizzazione delle membrane: a) collettore piano; b) collettore cilindrico rotante

2.6 Reticolazione delle membrane elettrofilate

Matrici in collagene ottenute tramite elettrofilatura risultano essere meccanicamente deboli e facilmente solubili in acqua, fattori che le rendono non adatte per applicazioni d'ingegneria tissutale. Per fornire ai costrutti finali migliore stabilità, proprietà meccaniche adeguate e più lente cinetiche di degradazione, sono stati studiati diversi approcci per favorire la reticolazione del collagene tramite la formazione di legami tra le catene del polimero. In particolare, per questo lavoro di tesi, sono stati valutati gli effetti di due diverse tipologie di reticolazione del materiale: una chimica tramite l'uso di una soluzione a base di 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimide (EDC) e N-idrossisuccinimide

(NHS), e una fisica tramite l'uso di un fotoiniziatore citocompatibile (Rosa Bengala) sensibile a radiazioni nello spettro visibile, per lunghezze d'onda nel range dei 500-540 nm. I protocolli seguiti per effettuare la reticolazione delle matrici verranno descritti nei paragrafi successivi.

2.6.1 Reticolazione chimica tramite EDC-NHS

Soluzioni di EDC/NHS rappresentano tra i mezzi reticolanti più comuni per la reticolazione chimica di sistemi a base di collagene [88]. La reticolazione chimica delle matrici nanofibrose a base di collagene è stata eseguita ottimizzando un protocollo presente in letteratura [137]. Le membrane elettrofilate (su supporto) sono state ritagliate in campioni delle dimensioni desiderate e posizionati all'interno di apposite piastre multi-pozzetto. La soluzione di reticolante è stata preparata fissando il rapporto tra EDC e NHS pari a 2:1 e impostando una molarità pari a 10 mM per EDC e 5 mM per NHS. I reagenti così pesati sono stati disciolti in una soluzione di etanolo (ETOH) puro a 4°C. Ogni campione è stato incubato in 3 mL di soluzione reticolante e posto in frigo a 4 °C per 8 h. Al termine del tempo di incubazione la soluzione di reticolante è stata rimossa e sono stati effettuati 3 lavaggi con etanolo puro per rimuovere eventuali residui di soluzione reticolante. Una volta terminati i lavaggi, i campioni sono stati congelati a -20°C, e in seguito liofilizzati per 24 h. Al termine della liofilizzazione è stato possibile rimuovere il supporto in alluminio ottenendo così i campioni necessari per le successive caratterizzazioni.

2.6.2 Fotoreticolazione delle membrane

Per la reticolazione fotochimica degli scaffold di collagene contenenti il fotoiniziatore Rosa Bengala, le membrane sono state tagliate per realizzare dei campioni di dimensioni desiderate e posizionate all'interno di apposite piastre multi-pozzetto o dischi di Petri. Prima dell'irraggiamento è stata eseguita un'incubazione di 15 minuti in etanolo al 99,5%. Una volta rimossa la soluzione d'incubazione, tutti gli scaffold sono stati irradiati con una lampada emittente nella banda del visibile per lunghezze d'onda nel range 400-700 nm, potenza pari a 2,5 W e dimensione dello spot di 9 cm, posizionata a una distanza di 12 cm dai campioni come mostrato in figura 24. Sono state testate diverse tempistiche di irraggiamento :10 minuti, 30 minuti e 1 ora. Dopo la reticolazione, gli scaffold sono stati asciugati all'aria per una notte per rimuovere eventuali residui di etanolo, e solo in seguito è stato rimosso l'alluminio di supporto da ciascuna membrana.

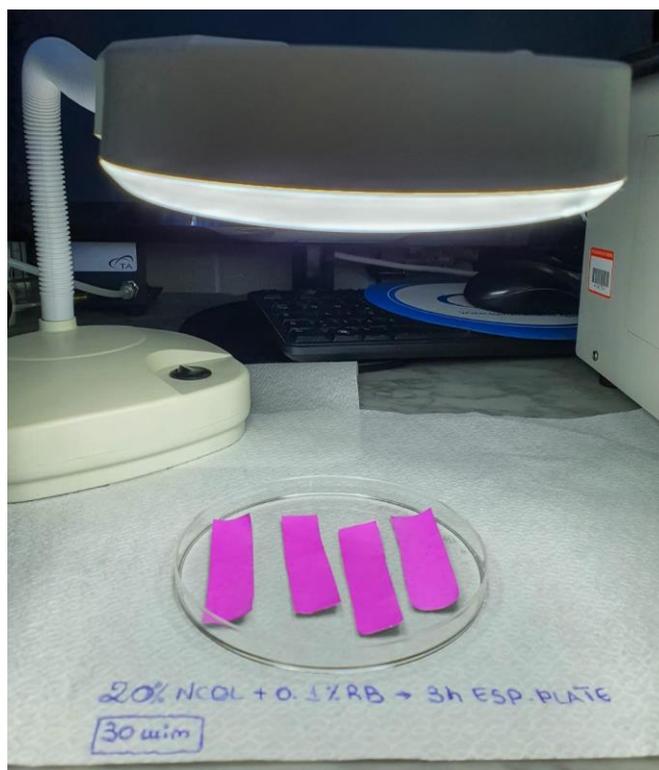


Figura 24: Reticolazione fisica delle membrane di collagene contenenti fotoiniziatore tramite irraggiamento.

2.7 Test delle ammine libere e spettroscopia UV-VIS

L'effettiva reticolazione delle membrane elettrofilate è stata valutata tramite la misura del numero di ammine libere. Il protocollo seguito per effettuare il test è stato ottimizzato sulla base di dati di letteratura [10-11]. Il contenuto dei gruppi amminici primari (residui di lisina) dei campioni prima e dopo reticolazione è stato determinato utilizzando acido 2,4,6-trinitrobenzenesolfonico (TNBS). Le membrane di collagene non reticolate e quelle reticolate tramite EDC/NHS e Rosa Bengala sono state tagliate, rimosse dall'alluminio e pesate, per ottenere dei campioni del peso di circa 11 mg ciascuno (in triplicato per ciascuna tipologia di campione). I campioni così ottenuti sono stati posizionati all'interno di falcon da 15 mL. Dopo aver preparato le soluzioni necessarie, a ciascun campione sono stati aggiunti 1 mL di una soluzione di NaHCO_3 al 4% in peso (pH 9.0) e 1 mL di una soluzione di TNBS allo 0,5% in peso. Le falcon sono state coperte con un foglio di alluminio per evitare eventuale esposizione a fonti luminose capaci di inficiare la lettura seguente, e mantenute in agitazione a 40°C per 4 ore. Al termine delle 4 ore, per ciascuna falcon sono stati aggiunti 3 mL di una soluzione di HCl 6 M e i campioni sono stati nuovamente posti in agitazione ad una temperatura di 90°C per un'ora per garantire una corretta solubilizzazione. Dopo essersi assicurati della completa solubilizzazione dei campioni, la soluzione risultante è stata diluita 1:20 con acqua distillata. Le soluzioni così ottenute sono state poste all'interno di apposite cuvette in vetro per la misura dell'assorbanza a 345 nm

tramite uno spettrofotometro UV/Vis (Carry 5000 1.12, Agilent). La lettura è stata effettuata in modalità *double*, in cui il valore del campione di controllo è stato sottratto da ogni assorbanza del campione analizzato. Per valutare l'effettiva reticolazione dei campioni, l'assorbanza è stata correlata alla concentrazione di gruppi amminici liberi individuati durante l'analisi. Il grado di reticolazione è stato valutato come la differenza tra il valore di assorbanza a 345 nm presente tra i campioni diversamente reticolati, rispetto al loro controllo, analizzando le curve risultanti dall'analisi. Come eseguito nello studio di Ratanavaraporn et al. [140], per ottenere una stima quantitativa del grado di reticolazione è stata utilizzata la formula:

$$\% \text{ RETICOLAZIONE} = \frac{(A_n - A_c)}{A_n} \times 100$$

dove A_c e A_n rappresentano rispettivamente l'assorbanza a 345 nm delle soluzioni relative ai campioni reticolati e non reticolati.

2.8 Caratterizzazione morfologica delle membrane tramite microscopia a scansione elettronica (SEM)

La microscopia a scansione elettronica (SEM) è una tecnica di caratterizzazione dei materiali non distruttiva per la valutazione la morfologia e topografia superficiale. Tale tecnica sfrutta le interazioni che si generano tra un fascio di elettroni accelerati e la superficie del campione su cui tale fascio incide. Avendo gli elettroni un valore di lunghezza d'onda inferiore rispetto a quello della luce, tramite questa tecnica è possibile raggiungere risoluzioni spaziali 100 volte maggiori rispetto a quelle di un microscopio ottico, con valori pari a 10 nm [141]. La Figura 25 riporta la struttura tipica di un microscopio a scansione elettronica costituito da una colonna di altezza variabile e una camera di alloggiamento per il campione. All'interno della colonna, gli elettroni del fascio incidente, chiamati elettroni primari, vengono emessi da una opportuna sorgente per effetto termoionico, tipicamente un filamento metallico in tungsteno portato ad alte temperature. Una volta emessi gli elettroni vengono accelerati tramite l'applicazione di una differenza di potenziale (0,5 kV e 30 kV). Il fascio così accelerato viene collimato verso la superficie del campione attraverso un sistema di lenti elettromagnetiche. A livello della superficie del campione il fascio di elettroni primari subisce una diffusione, da cui ha origine un fascio di elettroni secondari aventi minore energia. Questi elettroni generano un segnale che viene catturato da specifici rivelatori e convertito in immagine visualizzabile tramite apposito monitor. Per migliorare la qualità delle immagini è necessario che la superficie del campione sia conduttiva e che all'interno della camera venga applicato il vuoto, per evitare interazioni

indesiderate degli elettroni con le particelle dell'atmosfera. È dunque necessario assicurarsi che i campioni siano tali da non alterare lo stato di vuoto, ad esempio attraverso l'emissione di gas o evaporazioni, e qualora non conduttivi, dovranno essere sottoposti a trattamenti di metallizzazione superficiale tramite un processo di sputtering.

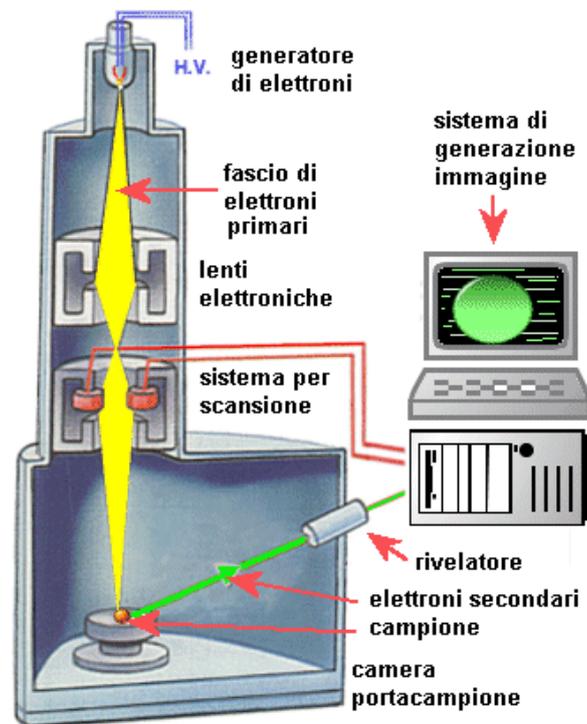


Figura 25: Rappresentazione del principio di funzionamento di un dispositivo per microscopia a scansione elettronica [142]

In questo lavoro di tesi, sono state acquisite immagini SEM per la valutazione della morfologia, del diametro e della disposizione delle fibre delle diverse matrici realizzate. Tramite caratterizzazione morfologica è stato possibile constatare inoltre le differenze esistenti tra le composizioni testate, e le due diverse tipologie di reticolazione. La preparazione dei campioni per la caratterizzazione morfologica è stata effettuata prelevando dei campioni di dimensioni ridotte da ciascuna membrana (con annesso supporto in alluminio). I campioni così ottenuti sono stati fissati alla superficie dello stub tramite l'applicazione di un nastro biadesivo in carbonio, e sottoposti a una procedura di sputtering per la deposizione di un sottile strato d'oro superficiale per permettere un'ottimale visualizzazione delle immagini. A seguito della preparazione, i provini sono stati inseriti nella camera porta campione del microscopio a scansione elettronica SEM Phenom XL per essere poi analizzati. Per una adeguata ricostruzione delle immagini a diversi ingrandimenti (5000x, 10000x, 15000x, 20000x) sono state impostate una distanza lente-campione pari a 15mm e una tensione del fascio di 20 kV. Per valutare le dimensioni dei diametri delle fibre, le immagini ottenute al SEM sono state

esaminate attraverso l'apposito strumento di misura presente nell'interfaccia e sono stati ricavati 20 diametri per ogni campione. Successivamente, i dati acquisiti, riportati in un foglio di lavoro Excel, sono stati utilizzati per calcolare il diametro medio e la deviazione standard.

Tramite il microscopio a scansione elettronica è stato inoltre possibile valutare lo spessore delle diverse membrane realizzate. Per ricavare tale parametro le membrane sono state preliminarmente immerse in azoto liquido per 20 secondi, e successivamente tagliate tramite bisturi. I campioni così ottenuti sono stati posizionati sullo stub in modo da esporre la sezione trasversale e sottoposti ad un trattamento di sputtering con oro.

2.9 Caratterizzazione chimico-fisica

2.9.1 Spettroscopia infrarossa FTIR-ATR

La spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier in riflettanza totale attenuata (FTIR-ATR) è una tecnica spettroscopica di assorbimento utilizzata per la caratterizzazione dei materiali, che permette di indagare i legami chimici dei campioni. La radiazione infrarossa (IR) è la parte dello spettro elettromagnetico che si trova tra la regione del visibile e le microonde, quella maggiormente indagata per la caratterizzazione chimico/fisica è compresa tra i 4000 e i 400 cm^{-1} . Quando una molecola viene investita da una radiazione infrarossa la cui frequenza sia compresa fra 10.000 e 100 cm^{-1} ., l'energia ceduta dalla radiazione stessa viene convertita in energia vibrazionale. Esistono due modi fondamentali in cui la molecola può vibrare, tramite un moto di *stretching* e un moto di *bending*. I moti di *stretching* (stiramento) sono dovuti a uno stiramento ritmico lungo l'asse di legame con conseguente aumento o diminuzione della distanza interatomica. L'altra tipologia di movimento viene definito di *bending* (piegamento), e si verifica in seguito alla variazione dell'angolo di legame o ad uno spostamento di diversi atomi rispetto al resto della molecola.

Lo spettro IR è caratterizzato da una serie di bande di assorbimento (picchi), avente diversa intensità esprimibile sia in termini di assorbanza che di trasmittanza, posizionate in funzione del numero d'onda. In particolare, la trasmittanza è calcolabile come il rapporto tra la potenza radiante trasmessa dal campione e la stessa grandezza incidente sul campione. Nella spettroscopia FTIR-ATR la radiazione IR è convogliata attraverso un particolare cristallo, che può essere formato da diversi materiali, tra cui Germanio, Diamante o ZnSe, trasparente agli IR, che permette la loro totale riflessione. Per effettuare l'analisi il campione viene posizionato a contatto con la superficie del cristallo, per garantire che la radiazione IR penetri nel materiale attenuandosi. In seguito alla riflessione, la radiazione in uscita dal cristallo viene rilevata attraverso un interferometro, che

trasforma l'onda in una curva definita interferogramma, in cui l'assorbimento è descritto in funzione del tempo. In seguito, il software associato al macchinario calcola la trasformata di Fourier dell'interferogramma trasformandolo nel tipico spettro IR in funzione del numero d'onda della radiazione. Il principio di funzionamento su cui si basa questa tecnica è rappresentato in figura 26.

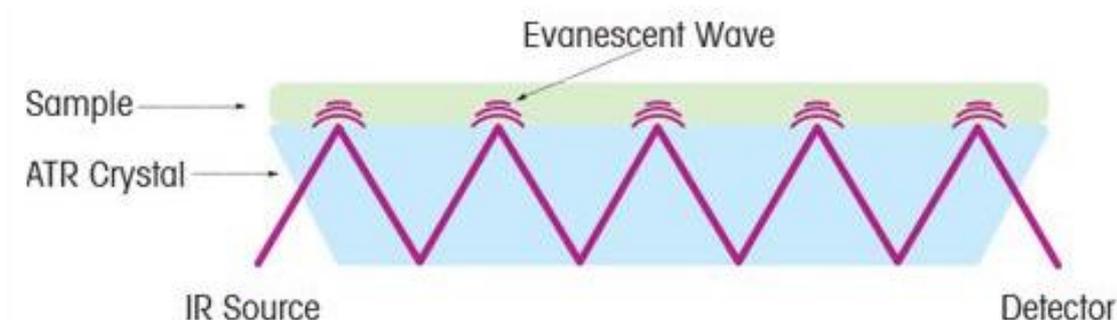


Figura 26: Principio di funzionamento della tecnica di riflettanza totale attenuata (ATR) [143]

Per ottenere gli spettri FTIR, in questo lavoro di tesi è stato utilizzato uno spettrometro Bruker Equinox 55. Grazie a questo strumento, è stata effettuata la caratterizzazione chimico/fisica delle membrane in collagene e i suoi blend, per valutare l'effettiva presenza dei picchi di assorbimento caratteristici dei due materiali puri, ed evidenziare le differenze tra i due metodi di reticolazione studiati. Tale dispositivo consente di visualizzare i picchi di assorbimento, caratteristici delle vibrazioni dei legami, compresi tra i 4000 e i 500 cm^{-1} , con una risoluzione spettrale di 4 cm^{-1} e a seguito di 32 scansioni. Per le prove, le membrane elettrofilate sono state tagliate in campioni delle dimensioni di pochi millimetri e una volta rimosso l'alluminio di supporto sono stati adagiati nell'apposito alloggiamento porta-campione per effettuare la scansione.

2.9.2 Caratterizzazione Termica: Analisi Termogravimetrica

L'analisi termogravimetrica (TGA) è un'analisi termica quantitativa che permette di misurare la variazione di massa subita in funzione del tempo e/o della temperatura da un materiale sottoposto a riscaldamento controllato crescente. Lo strumento, il cui schema è mostrato in figura 27, è costituito tipicamente dai seguenti componenti:

- Bilancia analitica sensibile (con precisione compresa tra i 5 e 20 mg);
- Fornace programmabile con temperature impostabili fino a 1500 °C;

- Sistema di gas di spurgo che garantisce un'atmosfera inerte ed una diffusione omogenea del calore;
- Sistema di elaborazione, acquisizione e visualizzazione dei dati (non presente in figura).

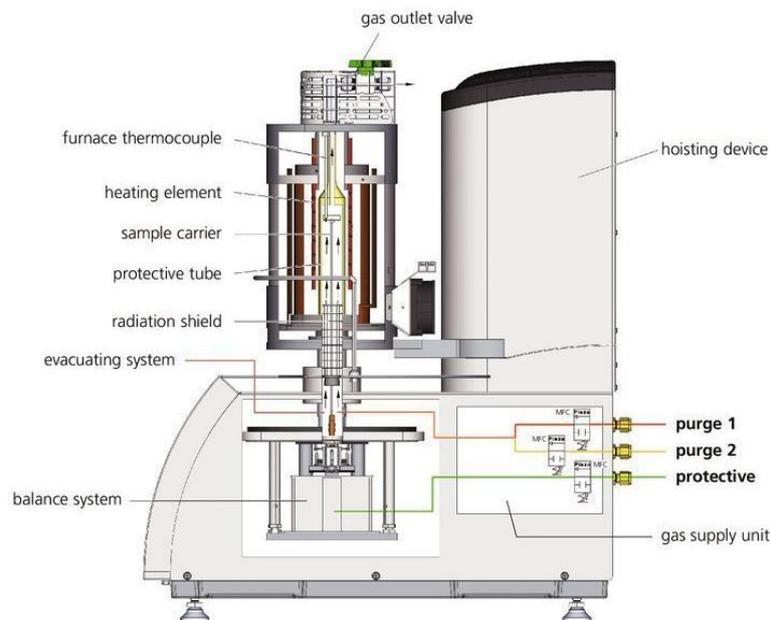


Figura 27: Rappresentazione schematica dello strumento per analisi termogravimetrica [144]

Una variazione nella massa del campione, posto all'interno della termobilancia, dovuta all'aumento della temperatura produce una deflessione del giogo che va ad interporre un otturatore tra la lampada ed uno dei due fotodiodi. La conseguente variazione di corrente del fotodiodo viene amplificata e inviata ad una bobina situata tra i poli di un magnete permanente. Tale corrente viene misurata e tradotta in massa o perdita di massa tramite il sistema di elaborazione [145]. Il risultato dell'analisi viene espresso solitamente con un termogramma, o curva di decomposizione termica che riporta in ascissa la temperatura o il tempo, e sulle ordinate la variazione di massa come valore assoluto o percentuale [145]. Il forno opera solitamente nel range compreso tra temperatura ambiente e 1500 °C, con una velocità di riscaldamento che può essere variata da poco più di zero fino a 200°C al minuto. L'isolamento ed il raffreddamento dell'esterno del forno sono necessari per impedire ogni trasferimento di calore alla bilancia. Per spurgare il forno e prevenire l'ossidazione del campione vengono solitamente utilizzati azoto o argon. La temperatura registrata in un termogramma è teoricamente la temperatura registrata con una piccola termocoppia posizionata il più possibile vicino al contenitore del campione. Pertanto, tali temperature sono di poco inferiori o superiori alla temperatura effettiva del campione. Le termobalances sono comunque dotate di appositi dispositivi di controllo della temperatura gestiti da un elaboratore. Questo tipo di analisi offre la possibilità dello studio dei

fenomeni di decomposizione, di ossidazione, di perdita del solvente, di cristallizzazione di sostanze polimorfe o di sublimazione e di desorbimento [146]. L'analisi termogravimetrica risulta quindi particolarmente utile per lo studio dei polimeri, in quanto è in grado di fornire informazioni sui meccanismi e sulle cinetiche di decomposizione delle molecole, tanto che in alcuni casi possono essere utilizzati per il riconoscimento delle sostanze [146]. Per effettuare le analisi termiche necessarie alla caratterizzazione delle membrane realizzate sono stati ricavati dei campioni del peso di pochi mg (dai 3 ai 5 mg) e inseriti all'interno dell'apposito crogiolo porta campione dello strumento TGA/SDTA851 (Mettler Toledo, USA). I campioni sono stati analizzati impostando un incremento controllato di temperatura, pari a 10°C/min, partendo da 25°C fino a raggiungere gli 800°C. I dati forniti dallo strumento sono stati poi elaborati per ricavare le curve di decomposizione termica di ciascun campione testato e effettuare i diversi confronti tra le membrane.

2.10 Test di degradazione

Le membrane realizzate sono state sottoposte a prove di degradazione idrolitica per valutarne la stabilità in ambiente acquoso. I test di degradazione sono stati condotti sulle membrane a base di collagene e di collagene e chitosano in seguito alle diverse tipologie di reticolazione. Per ciascuna categoria sono stati ritagliati e pesati i campioni in triplicato, posti all'interno di piastre multipozzetto. Per ciascun pozzetto è stata aggiunta la soluzione di tampone fosfato (PBS), in quantità di 2 mL per i campioni avente peso inferiore ai 10 mg e 3 mL per i campioni con peso superiore ai 10 mg, seguendo un protocollo precedentemente riportato in letteratura [147]. I campioni sono stati quindi posti in incubatore/shaker meccanico a 37°C sotto lieve agitazione (70 rpm), e raccolti a intervalli di tempo predefiniti (24 ore, 7 giorni e 14 giorni). Terminato il periodo di incubazione, la soluzione tampone è stata rimossa dai campioni e successivamente le membrane sono state congelate. Una volta congelati, i campioni sono stati inseriti nel liofilizzatore per 24 ore e accuratamente pesati per registrare le variazioni di massa dovute a degradazione. La perdita di massa è stata valutata utilizzando la seguente formula:

$$W = \frac{(W_0 - W_d)}{W_0} \times 100$$

dove W_0 rappresenta la massa iniziale del campione, W_d rappresenta la massa dopo la degradazione e W è la percentuale di perdita risultante. I risultati sono stati riportati come media \pm deviazione standard.

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

Questo capitolo presenterà lo sviluppo di sistemi a base di collagene di tipo I per la realizzazione di scaffold biocompatibili e biomimetici mediante tecniche di elettrofilatura per applicazione nell'ingegneria dei tessuti cutanei.

Nel primo paragrafo verranno riportati i risultati relativi allo sviluppo e alla caratterizzazione di membrane a base di solo collagene di tipo I. Partendo dalle analisi al reometro verranno analizzate le proprietà viscoelastiche delle soluzioni da elettrofilare. Valutate le proprietà reologiche, verranno descritti i risultati relativi alla fase di ottimizzazione dei parametri di processo utilizzati per realizzare le membrane, riportando le immagini ottenute tramite SEM. Da queste analisi verrà valutata la morfologia e i diametri delle fibre associati ai diversi parametri testati. In seguito all'ottimizzazione dei parametri di processo è stato possibile realizzare le membrane da sottoporre a reticolazione chimica tramite EDC/NHS, basandosi su un protocollo precedentemente sviluppato nel gruppo di ricerca. Le matrici risultanti sono state caratterizzate morfologicamente per evidenziare eventuali differenze con le matrici di controllo, mentre l'efficacia del trattamento di reticolazione tramite EDC/NHS verrà discussa sulla base dei risultati ottenuti da diversi test, tra cui l'analisi sulla quantità di ammine libere, test di degradazione, e prove termogravimetriche.

Con l'intento di incrementare maggiormente la resistenza meccanica e la biocompatibilità dei costrutti finali è stata testata una diversa tipologia di reticolazione. A tale scopo, sono state realizzate delle soluzioni a base di collagene contenenti un fotoiniziatore citocompatibile, il Rosa Bengala, per consentire la fotoreticolazione delle membrane elettrofilate. Nel secondo paragrafo, dunque, verranno riportati i risultati emersi dalla caratterizzazione delle membrane fotoreticolate, confrontando inoltre i risultati ottenuti nel caso di reticolazione chimica tramite EDC/NHS.

Infine, sulla base delle limitazioni riscontrate nella realizzazione delle matrici con il solo utilizzo del collagene, si è cercato di migliorare la processabilità del materiale e la resistenza dei costrutti finali, valutando la combinazione con un secondo polimero, il chitosano.

3.1 Sviluppo e caratterizzazione di membrane elettrofilate a base di collagene

Sistemi a base di collagene di tipo I hanno dimostrato essere promettenti per mimare le caratteristiche composizionali e nano-strutturali della matrice extracellulare della cute. Partendo da questo materiale, l'uso di tecniche di elettrofilatura può essere sfruttato per la realizzazione di strutture nanofibrose e porose, capaci di fornire supporto strutturale e meccanico per la corretta rigenerazione del tessuto nel processo di guarigione della ferita. Nonostante la possibilità di creare scaffold biocompatibili capaci di imitare l'architettura definita dell'ECM nativa, il trattamento del collagene in processi di

elettrofilatura ha riscontrato diverse difficoltà e limitazioni dovute alla potenziale denaturazione della proteina a causa dei solventi aggressivi e dei parametri di processo spesso utilizzati. Si rende quindi necessaria una accurata ottimizzazione delle soluzioni da processare [148],[137]. Infatti, nonostante la semplicità e i numerosi vantaggi offerti da questa tecnica di fabbricazione, i parametri da tenere in considerazione per la corretta riuscita del processo sono numerosi. Tra questi la scelta e la concentrazione del solvente, così come quella del polimero, hanno un ruolo chiave in quanto i solventi utilizzati per l'elettrofilatura possono alterare significativamente le proprietà fisico-chimiche native dei polimeri. In particolare, l'utilizzo del collagene per la realizzazione delle soluzioni ha evidenziato diverse complicazioni a causa dell'elevata viscosità e la bassa solubilità del polimero, fattori che conducono spesso all'utilizzo di solventi organici tossici [149].

Tra i solventi maggiormente utilizzati in letteratura per la solubilizzazione del collagene si trovano fluoroalcoli altamente volatili come 1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanolo (HFP) o 2,2,2-trifluoroetanolo (TFE), che tuttavia hanno dimostrato di influire negativamente sulla struttura nativa della proteina causando una parziale denaturazione [148],[137]. A causa di questi problemi, è stato valutato l'utilizzo di solventi meno aggressivi per ottenere membrane elettrofilate a base di collagene preservando la struttura nativa della proteina [148]. L'utilizzo di solventi meno aggressivi quale l'acido acetico, è apparsa come una strategia promettente per consentire la solubilità del collagene anche ad alte concentrazioni e la conservazione della struttura nativa. Sulla base di queste considerazioni e di precedenti studi effettuati dal gruppo di ricerca [130],[150], per la realizzazione delle membrane è stata utilizzata una soluzione avente una concentrazione di collagene pari al 20% disciolta in una soluzione al 40% di acido acetico (20% NCOL in 40%AA). Per valutare la processabilità delle soluzioni a base di collagene così realizzate e confermare l'efficacia dell'acido acetico come solvente, sono state condotte delle analisi reologiche in regime di flusso.

Le proprietà reologiche di un materiale sono considerate importanti fattori fisico-chimici capaci di influenzare la sua processabilità tramite tecniche di elettrofilatura. In questo contesto, è necessaria una comprensione dei parametri reologici delle soluzioni utilizzate per la formazione di nanofibre. Le analisi reologiche permettono infatti di ottenere informazioni predittive sul comportamento dei diversi sistemi in risposta all'applicazione di sollecitazioni e deformazioni, utili nella fase di impostazione dei parametri di processo, quale voltaggio e flusso [151]. Tra i parametri reologici di potenziale interesse, la viscosità delle soluzioni è quello che maggiormente influisce sul risultato finale del processo [152]. Nello specifico per questo lavoro sono state eseguite delle rampe di flusso ad una temperatura di 23°C (temperatura di processo) per valutare la viscosità e la processabilità complessiva dei sistemi di solo collagene, variando il range di shear rate tra 0.1 e 1000 s⁻¹. La figura

28 riporta i risultati dei test eseguiti, risultante dalla media di tre curve di flusso della soluzione 20% NCOL in 40%AA.

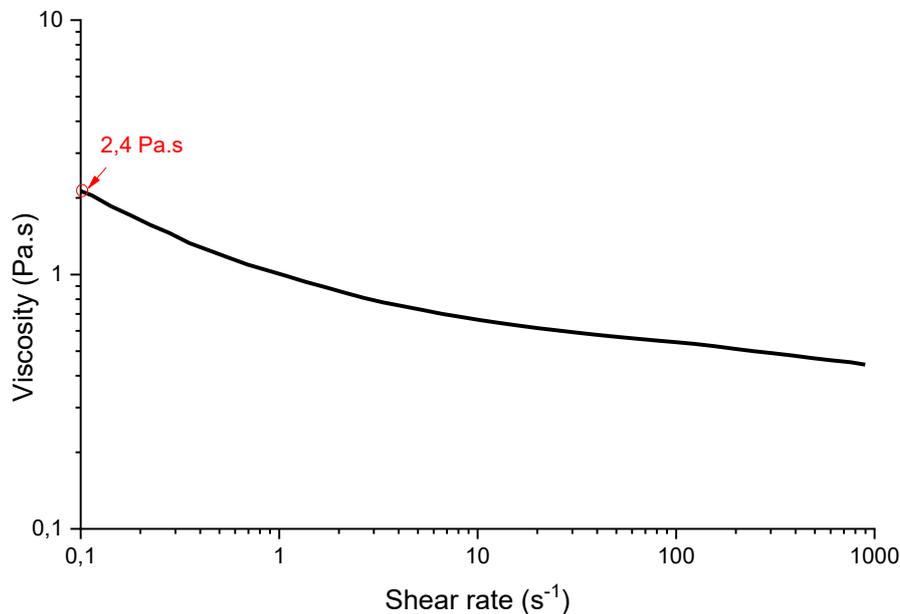


Figura 28: Rampa di flusso della soluzione 20% NCOL in 40%AA

Come mostrato nel grafico, la soluzione realizzata utilizzando come solvente una soluzione di 40% di acido acetico ha mostrato un comportamento di pseudo-plasticità (*'shear thinning behaviour'*) evidenziando valori di viscosità decrescenti nell'ampia gamma di shear rate applicati. I dati ottenuti mostrano valori di viscosità maggiori per condizioni di stress prossime allo zero (0,1 s⁻¹) con valore massimo pari a 2,4 Pa.s, fino a raggiungere 0,44 Pa.s per condizioni di stress elevate (1000 s⁻¹). Tali valori di viscosità risultano coerenti con i dati presenti in letteratura relative alle analisi reologiche di soluzioni di collagene in acido acetico, confermando i benefici del protocollo precedentemente ottimizzato da Montalbano et al. [130]. Questi risultati confermano inoltre il ruolo chiave dell'acido acetico nel promuovere la dissoluzione di molecole di collagene, nonostante le alte concentrazioni di polimero, generando soluzioni dai valori di viscosità bassi e favorendo quindi il processo di elettrofilatura [149].

Sulla base dei risultati ottenuti dalle prove reologiche, la soluzione 20% NCOL in 40%AA è stata utilizzata per eseguire dei test preliminari, con l'obiettivo di ottimizzare i parametri di processo di elettrofilatura e al fine di discriminare meglio il contributo di ciascun parametro nella realizzazione finale della matrice fibrosa, valutando l'uso di due tipologie di collettore. Infatti, accanto alla scelta

del solvente e alla sua concentrazione, le condizioni di processo che maggiormente influiscono sulla morfologia e sulle caratteristiche finali dello scaffold sono il flusso di materiale, la tensione, la distanza tra emettitore e collettore e la velocità di rotazione di quest'ultimo nel caso di collettori rotanti.

Durante i test preliminari di ottimizzazione del processo, ogni set di parametri è stato testato elettrofilando la soluzione al 20% di collagene in acido acetico per 20 minuti, utilizzando inizialmente un collettore piano ricoperto con un foglio di alluminio per facilitare la rimozione delle membrane risultanti. Condizioni di processo diverse, quali tensione applicata, flusso di materiale, distanza tra l'emettitore e il collettore sono state variate per ottenere un flusso stabile e la deposizione di nanofibre omogenee di collagene. In particolare, è stata valutata l'influenza della distanza sulla morfologia e sui diametri delle fibre ottenute diminuendo per ciascuna prova la distanza tra emettitore e collettore, testando i seguenti valori: 14, 12, 10, 8 e 6 cm. Le membrane sono state poi raccolte e analizzate mediante microscopia a scansione elettronica al fine di definire le loro caratteristiche morfologiche e le dimensioni delle fibre in base ai parametri impostati, come mostrato nella figura 29.

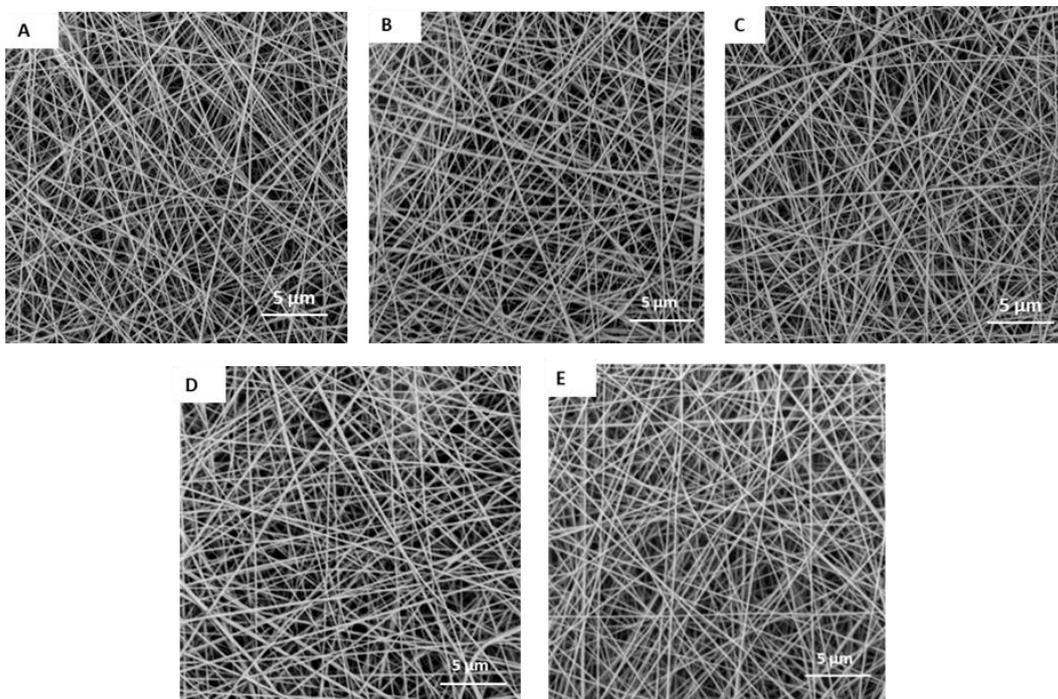


Figura 29: Immagini SEM delle membrane 20% NCOL in 40%AA ottenute variando la distanza tra emettitore e collettore di: A) 14 cm; B)12 cm; C) 10 cm; D) 8 cm; E) 6 cm;

In accordo con diversi studi precedentemente riportati in letteratura, il processo di elettrofilatura su collettore piano ha prodotto matrici fibrose orientate in modo casuale e interconnesse su scala

nanometrica. Come mostrato nella figura 29, una concentrazione di collagene pari al 20% ha portato alla formazione di matrici omogenee prive di difetti significativi aventi fibre continue e dalle dimensioni nanometriche. I diversi parametri di processo impostati e le condizioni ambientali presenti nella camera di elettrofilatura durante ciascun test sono riportati in tabella 5.

	DISTANZA COLLETTORE	TENSIONE	FLUSSO	TEMPERATURA	UMIDITÀ RELATIVA
A	14 cm	22 kV	200 μ L/h	24.1 °C	31%
B	12 cm	22 kV	300 μ L/h	24.2 °C	32%
C	10 cm	20 kV	200 μ L/h	24 °C	33%
D	8 cm	17 kV	200 μ L/h	23.9 °C	32%
E	6 cm	16 kV	200 μ L/h	23.9 °C	32%

Tabella 5: Parametri ambientali e di processo impostati per l'elettrofilatura su collettore piano delle membrane 20% NCOL in 40%AA

Per meglio valutare le differenze morfologiche associate ai parametri di processo è stato inoltre misurato il diametro medio scegliendo in maniera casuale 20 fibre per ciascuna matrice. Dai valori ricavati sono stati calcolati valor medio e deviazione standard per poi rappresentare la distribuzione dei diametri in funzione della distanza emettitore-collettore (Figura 30 e Tabella 6).

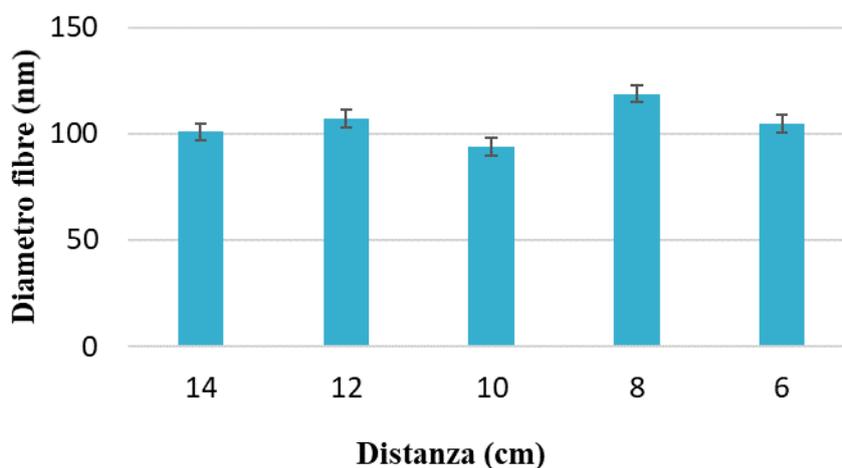


Figura 30: Parametri ambientali e di processo impostati per l'elettrofilatura su collettore piano delle membrane 20% NCOL in 40%AA

Distanza [cm]	14	12	10	8	6
Diametro medio [nm]	100	107	94	118	104
Deviazione standard	13	18	17	20	17

Tabella 6: Valori di diametro medio e deviazione standard delle fibre delle fibre al 20% NCOL in 40%AA al variare della distanza emettitore-collettore

Come è possibile notare dagli istogrammi relativi alla distribuzione dei diametri e dalla tabella 6, in tutte le condizioni sono state realizzate delle matrici aventi fibre con dimensione inferiore ai 120 nm. Inoltre, non sono state rilevate differenze significative confrontando le diverse distanze testate in quanto i diametri delle fibre differiscono tra di loro di poche decine di nm. Benché risultati ottimali dal punto di vista morfologico siano stati ottenuti per tutte le matrici, la soluzione elettrofilata a 22 kV, 300 μ L/h e 12 cm di distanza dal collettore ha mostrato i migliori risultati, dando una matrice fibrosa risultante omogenea, priva di difetti e con fibre di circa 100 nm. Sulla base di queste evidenze, questo set di parametri è stato scelto per la realizzazione degli scaffold da sottoporre al seguente processo di reticolazione.

I risultati ottenuti hanno quindi confermato i diversi studi presenti in letteratura circa l'utilizzo dell'acido acetico in acqua per incrementare la solubilità complessiva delle molecole di collagene aventi concentrazione non superiore al 30% [150]. Grazie alla processabilità delle soluzioni risultanti è stato possibile ottenere fibre omogenee aventi diametri nel range dei 100 nm, capaci dunque di imitare la naturale architettura dell'ECM dei diversi tessuti costituenti la cute.

Membrane fibrose orientate in modo casuale caratterizzate da una buona anisotropia e un'elevata resistenza sono l'obiettivo principale nella ricerca di sostituti per la rigenerazione del tessuto cutaneo in seguito ad una lesione [153]. Tuttavia, un numero sempre maggiore di studi ha dimostrato come membrane costituite da fibre allineate possano controllare la proliferazione cellulare e promuovere significativamente l'angiogenesi [38]. Per tali ragioni in questo lavoro di tesi è stato valutato l'utilizzo del collettore cilindrico rotante, con l'obiettivo di esaminare la processabilità delle soluzioni mediante set-up di elettrofilatura differenti e verificare la corretta riuscita del processo.

Test preliminari analoghi a quelli eseguiti con collettore piano sono stati eseguiti usando un collettore rotante da 10 cm di diametro con l'obiettivo di realizzare delle matrici con fibre allineate. Diversi parametri sono stati quindi testati elettrofilando la soluzione di 20% NCOL in 40%AA per 20 minuti utilizzando un collettore cilindrico rotante rivestito con alluminio. Per valutare l'influenza della velocità di rotazione del collettore sulla morfologia delle matrici, per ogni test è stata utilizzata una velocità differente combinando tale parametro con una specifica distanza tra ugello e collettore. La

velocità di rotazione del collettore è stata variata da 200 a 2000 rpm testando nello specifico 200, 400, 600, 800, 1200, 1600 e 2000 rpm. Tutte le velocità di rotazione selezionate sono state testate a diversi valori di distanza tra emettitore e collettore: 6, 8, 10, 12 e 14 cm. Per ciascuna condizione, flusso e voltaggio sono stati impostati in modo da ottenere la stabilità del getto. La successiva osservazione delle matrici risultanti non ha evidenziato significative differenze al variare della distanza tra emettitore e collettore. Sulla base di questa osservazione si è scelto di mantenere una distanza pari a 12 cm per la realizzazione delle membrane, come impostato per l'uso del collettore piano. In tabella 7 sono riportati i parametri di processo e le condizioni ambientali impostati per ciascun test.

	VELOCITÀ DI ROTAZIONE	DISTANZA COLLETTORE	TENSIONE	FLUSSO	TEMPERATURA	UMIDITÀ RELATIVA
A	200 rpm	12 cm	22 kV	300 µL/h	23.5 °C	22%
B	400 rpm	12 cm	22 kV	300 µL/h	23.3 °C	22%
C	600 rpm	12 cm	22 kV	300 µL/h	23.5 °C	23%
D	800 rpm	12 cm	22 kV	300 µL/h	23.6 °C	23%
E	1200 rpm	12 cm	22 kV	300 µL/h	24.8 °C	30%
F	1600 rpm	12 cm	22 kV	200 µL/h	25.8 °C	30%
G	2000 rpm	12 cm	22 kV	200 µL/h	25.8 °C	30%

Tabella 7: Valori di diametro medio e deviazione standard delle fibre delle fibre al 20% NCOL in 40%AA al variare della distanza emettitore-collettore

Le diverse membrane sono state analizzate mediante microscopia a scansione elettronica al fine evidenziare le differenze morfologiche e le dimensioni delle fibre in base ai parametri impostati, come mostrato nella figura 31.

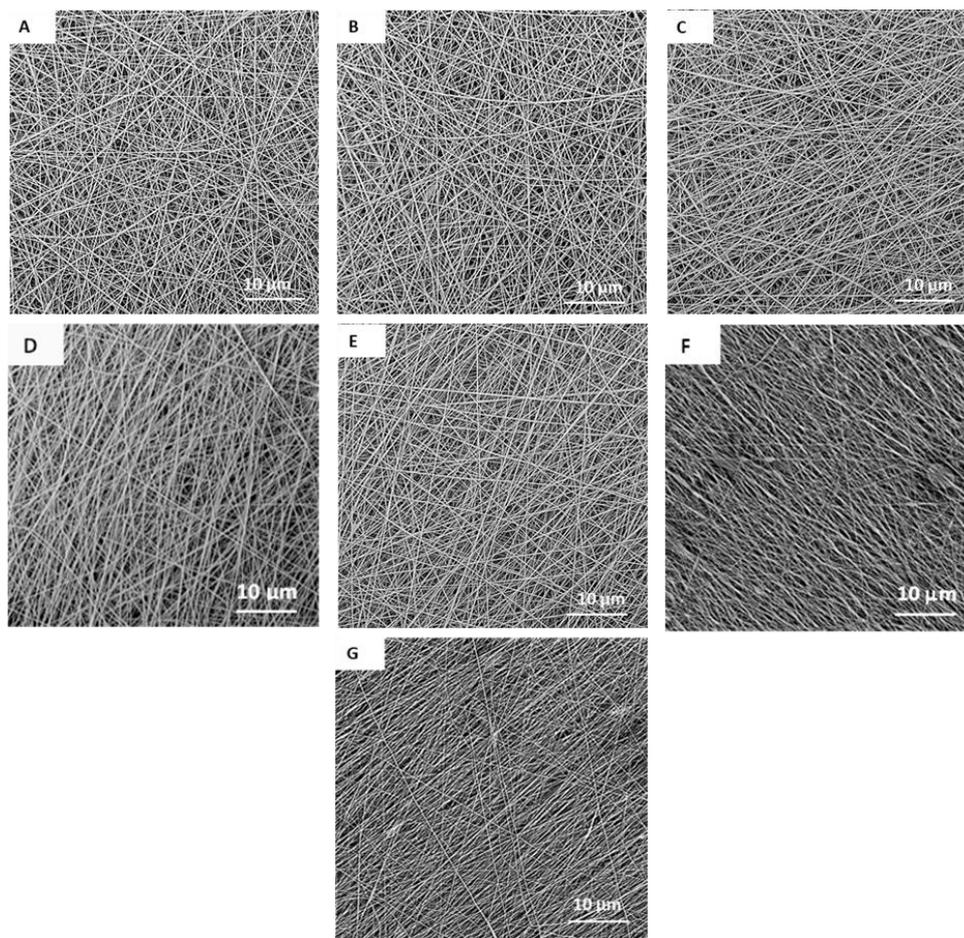


Figura 31: Immagini SEM delle membrane al 20% NCOL in 40%AA al variare della velocità di rotazione del collettore cilindrico rotante: A) 200 rpm; B) 400 rpm; C) 600 rpm; D) 800 rpm; E) 1200 rpm; F) 1600 rpm; G) 2000 rpm

Da un'osservazione qualitativa preliminare delle immagini, è evidente come anche in questo caso le membrane realizzate risultino omogenee e complessivamente prive di difetti. Dall'analisi è inoltre evidente un effettivo incremento dell'allineamento delle fibre all'aumentare della velocità di rotazione del collettore e come queste risultino allineate lungo la direzione di movimento del cilindro rotante. Le fibre realizzate impostando 2000 rpm (Figura 31 G) come velocità di rotazione presentano infatti un'architettura altamente organizzata rispetto a quelle ottenute per velocità di rotazione inferiori. Per una più accurata analisi si è inoltre proceduto alla misura dei diametri delle fibre, per poter confrontare le matrici random e allineate quantitativamente. I dati ottenuti, riportati tramite gli istogrammi in figura 32, hanno evidenziato come per tutte le tipologie di nanofibre i diametri risultino inferiori di 200 nm, e come il diametro delle fibre effettivamente diminuisca per velocità di rotazione superiori e quindi in matrici maggiormente allineate.

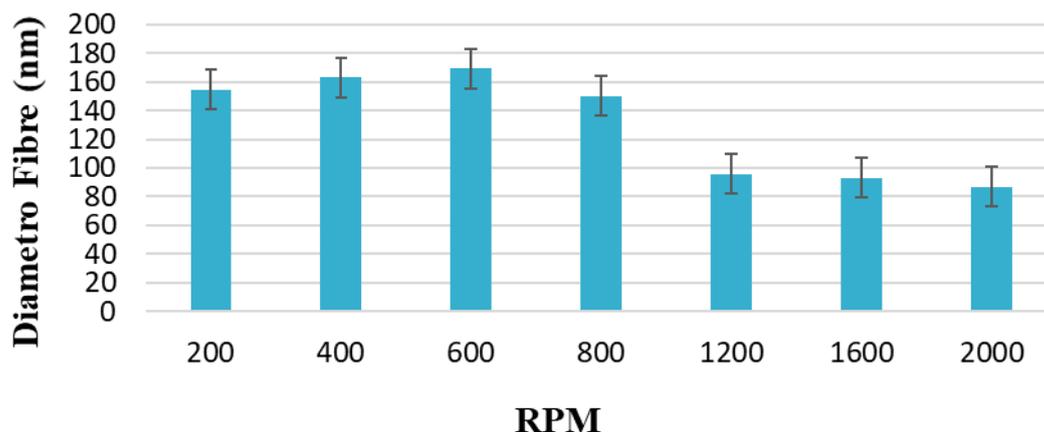


Figura 32: Istogrammi relativi al diametro medio delle fibre al 20% NCOL in 40% AA al variare della velocità di rotazione del collettore cilindrico rotante

RPM	200	400	600	800	1200	1600	2000
Diametro medio [nm]	154	162	169	150	95	93	87
Deviazione standard	28	29	17	18	11	11	14

Tabella 8: Valori del diametro medio e deviazione standard delle fibre delle fibre al 20% NCOL in 40% AA al variare della velocità di rotazione del collettore cilindrico rotante

Come dimostrano i valori riportati in tabella 8 è stata riscontrata una effettiva diminuzione nelle dimensioni delle fibre all'aumentare della velocità di rotazione [53], specialmente per velocità superiori a 1000 rpm. Confrontando i valori relativi ai diametri delle fibre orientate modo casuale (riportati in tabella 6) e quelli delle fibre allineate (tabella 8) non sono emerse differenze significative. Sono stati calcolati valori medi di diametro non superiore ai 120 nm per le fibre orientate in modo casuale e un valor medio inferiore ai 90 nm nel caso delle fibre ottenute sul collettore rotante impostando la più alta velocità testata (2000 rpm). Inoltre, come ragionevolmente previsto, il diametro medio delle fibre allineate è diminuito all'aumentare della velocità di rotazione del collettore, passando da un valore di 154 nm per velocità pari a 200 rpm, a 87 nm di diametro per 2000 rpm di rotazione. I valori relativamente elevati ottenuti per le prime 3 velocità di rotazione testate (200, 400 e 600 rpm) potrebbero essere attribuiti alle condizioni ambientali presenti nella camera di elettrofilatura, come temperatura e umidità relativa presenti al momento della realizzazione delle membrane. Tali parametri risultano infatti difficilmente controllabili e altamente dipendenti a loro volta dalle condizioni ambientali del laboratorio. Se confrontata con l'umidità presente nella camera al momento della realizzazione delle fibre con allineamento casuale (circa 32%), l'umidità registrata durante l'elettrofilatura delle matrici allineate è risultata inferiore (22%). Malgrado sia noto che valori

di umidità bassi favoriscano la completa evaporazione del solvente e la deposizione di fibre dai diametri ridotti, alcuni lavori in letteratura come quello di Haider et al. [121], hanno dimostrato come in alcuni casi bassi valori di umidità possano portare a fibre con diametri elevati.

Sulla base di tali considerazioni, la membrana realizzata impostando una tensione variabile tra 21-22 kV, 200 μ L/h, 12 cm di distanza dal collettore e velocità di rotazione del collettore pari a 2000 rpm ha mostrato i migliori risultati. Questa matrice risulta omogenea caratterizzata da un evidente allineamento delle fibre, e diametro medio di quest'ultime inferiore ai 90 nm.

In seguito all'ottimizzazione dei parametri di processo è stato possibile realizzare gli scaffold a base di collagene di tipo I, elettrofilando le soluzioni 20% NCOL in 40%AA per tre ore consecutive valutando l'uso dei due diversi collettori (piano e cilindrico rotante), in modo da ottenere membrane omogenee, nanofibrose e con diverse morfologie. Le membrane così realizzate sono state analizzate tramite SEM per confermare i dati ottenuti dai test preliminari e la stabilità del processo per tempi più lunghi, valutando quindi la morfologia e la dimensione delle fibre. È stato inoltre valutato lo spessore degli scaffold realizzati. La figura 33 riporta le immagini a diversi ingrandimenti relative alla morfologia e lo spessore delle membrane realizzate.

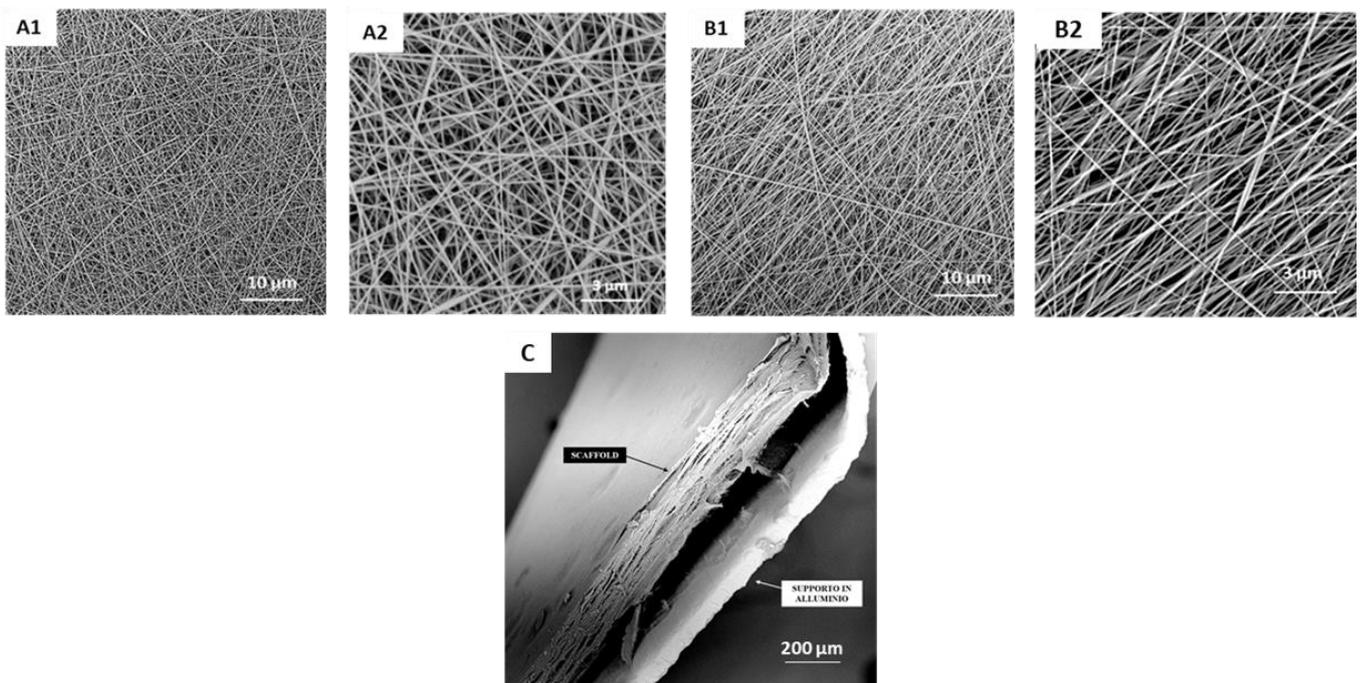


Figura 33: Immagini SEM degli scaffold 20%NCOL in 40% AA realizzati a seguito di 3 ore di electrospinning su collettore piano (A1, A2), collettore cilindrico rotante (B1, B2), e spessore di un campione realizzato su collettore piano (C)

Le analisi morfologiche mostrate in figura rappresentano un'ulteriore conferma della processabilità della soluzione 20% NCOL in 40%AA. Il confronto tra gli scaffold con orientamento delle fibre casuale (A) e quelli con fibre allineate (B), ha evidenziato come in entrambi casi le matrici risultino omogenee con porosità variabile e complessivamente prive di difetti, con fibre aventi diametri nel range dei 100-150 nm, e un evidente allineamento (2000 rpm) nel caso dell'uso del collettore rotante. È stata dunque confermata l'efficienza dei parametri di processo selezionati durante le prove preliminari. Inoltre, in accordo con altri studi presenti in letteratura, gli scaffold realizzati tramite collettore piano presentano uno spessore uniforme con valori di poco superiori ai 100 μm , come evidente in figura 33 C [10],[11]. Tuttavia, non è stato possibile rilevare tale misura nelle membrane realizzate mediante collettore cilindrico rotante poiché troppo sottili. Infatti, la particolare conformazione del collettore combinata alla velocità dello stesso porta alla deposizione del materiale su un'area più estesa se confrontata con il collettore piano, generando membrane più sottili e difficilmente maneggiabili. Le tre ore di electrospinning sono risultate dunque insufficienti per la fabbricazione di matrici con morfologia allineata, motivo per il quale per la realizzazione dei campioni da utilizzare per le diverse caratterizzazioni si è scelto di utilizzare esclusivamente le matrici realizzate su collettore piano.

L'elettrofilatura dei sistemi a base di collagene ha così evidenziato il promettente vantaggio di replicare la nano- e micro-architettura della matrice extracellulare dei principali componenti del tessuto cutaneo, caratterizzata da fibre di collagene di tipo I aventi dimensioni nel range dei 50- 300 nm [156]. Le membrane realizzate risultano quindi ottimi candidati per fornire un supporto temporaneo nella fase di rigenerazione cutanea che si verifica in seguito ad una lesione, imitando la naturale struttura dell'ECM persa. Inoltre, la possibilità di fabbricare fibre di collagene orientate capaci di influenzare la crescita cellulare e le funzioni correlate [149], evidenzia le potenzialità della tecnica di electrospinning nel realizzare costrutti aventi una vasta gamma di applicazioni. È infatti dimostrato come l'allineamento delle fibre elettrofilate rappresenti un meccanismo di segnalazione topografica capace di controllare con precisione l'allineamento cellulare e l'espressione fenotipica speciale [157]. Pertanto, membrane nanofibrose, porose e con morfologie allineate, come quelle ottenute in questo lavoro, eserciterebbe un effetto benefico multiplo sulla crescita cellulare endoteliale e sull'angiogenesi [38],[158] accelerando dunque il processo di rigenerazione cutanea. Tuttavia, una ulteriore ottimizzazione del processo si rende necessaria per permettere la realizzazione di matrici sufficientemente spesse tramite collettore rotante. Studi futuri potrebbero quindi valutare l'uso di collettori rotanti aventi un diametro inferiore in modo da ridurre la superficie di deposizione.

Sulla base dei risultati ottenuti, le membrane di 20% NCOL in 40%AA realizzate tramite collettore piano posto ad una distanza di 12 cm dall'ago di estrusione, sono state selezionate per ottenere scaffold con stabilità e proprietà adeguate ad applicazioni di rigenerazione cutanea.

Caratterizzazione delle membrane a base di collagene e reticolate chimicamente tramite EDC/NHS

L'utilizzo del collagene come materiale per la realizzazione di tessuti ingegnerizzati per guarigione delle ferite è ampiamente riportato in letteratura, grazie alle eccellenti caratteristiche biologiche e buone proprietà fisico-chimiche della proteina. Ciononostante, uno dei più grandi limiti dei costrutti a base di collagene è la scarsa resistenza meccanica, dovuta ad uno scarso livello di reticolazione nella matrice di collagene ricostituita *in vitro* [83]. Di conseguenza, nel tempo sono state valutate diverse strategie per aumentare la stabilità, meccanica e la resistenza a degradazione di costrutti a base di collagene. Nello specifico, per membrane create tramite elettrofilatura, la reticolazione tramite EDC/NHS è tra le strategie maggiormente riportate per migliorare la stabilità in ambiente acquoso della matrice [150]. La scelta dell'agente di reticolazione deve tener conto della sua efficacia nella stabilizzazione della morfologia fibrosa, che può essere completamente persa se le condizioni di reticolazione non sono ottimizzate, nonché dell'effetto della citotossicità. La reticolazione tramite EDC/NHS si ottiene grazie alla capacità delle carbodiimididi di formare legami covalenti tra i residui amminoacidici adiacenti di molecole di collagene [86]. Questi legami incrociati si verificano tra glutammato e arginina/lisina, tra cui si creano legami covalenti tra gruppi carbossilici e amminici, generando l'urea idrosolubile come unico prodotto di reazione, che può essere facilmente rimosso limitando quindi la citotossicità.

Con l'obiettivo di garantire una migliore stabilità dei costrutti a base di collagene, in seguito all'ottimizzazione dei parametri di processo, sono stati realizzati i campioni da sottoporre a reticolazione chimica tramite EDC/NHS per valutare gli effetti di quest'ultima sulla morfologia e sulle proprietà fisico-chimiche e meccaniche delle membrane. Per la realizzazione dei campioni da sottoporre a reticolazione, la soluzione 20% NCOL in 40%AA è stata elettrofilata su collettore piano impostando i parametri precedentemente ottimizzati, e reticolati seguendo il protocollo descritto nel paragrafo 3.3.1.

In breve, le membrane sono state incubate in una soluzione di reticolante, preparata fissando il rapporto tra EDC e NHS pari a 2:1 e impostando una molarità pari a 10 mM per EDC e 5 mM per NHS. Ogni campione è stato incubato in 3 mL di soluzione reticolante e posto in frigo a 4 °C per 8 ore. Al termine del tempo di incubazione la soluzione di reticolante è stata rimossa e sono stati

effettuati 3 lavaggi con etanolo puro per rimuovere eventuali residui di reticolante. I campioni così ottenuti sono stati congelati e in seguito liofilizzati per 24 h. L'effetto del trattamento di reticolazione sulle proprietà finali delle membrane è stato analizzato tramite diverse tecniche di caratterizzazione partendo da un'analisi morfologica sulle membrane risultanti (20%NCOL-EDC/NHS). La figura 34 riporta il confronto tra le membrane prima (A) e a seguito della reticolazione chimica (B), in aggiunta all'indicazione dello spessore dello scaffold finale (C).

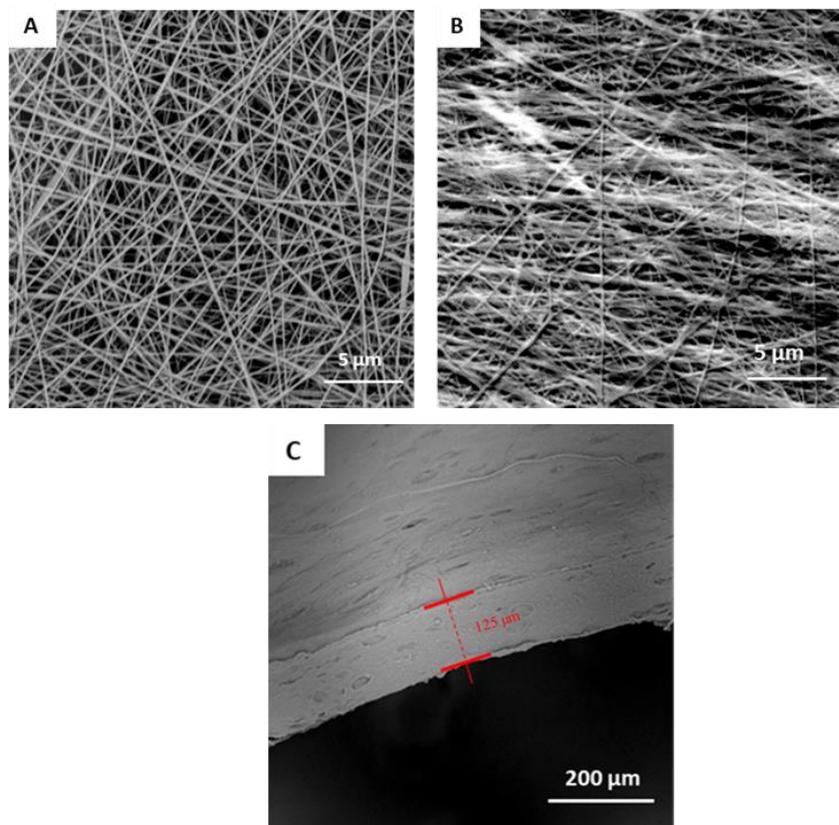


Figura 34: Immagini SEM delle diverse membrane 20% NCOL in 40%AA (A) pre-reticolazione; B) post-reticolazione tramite EDC/NHS; C) Spessore campioni 20%NCOL in 40%AA -EDC/NHS;

Dal confronto delle immagini appare evidente come il trattamento di reticolazione influisca sulla morfologia della membrana. I risultati morfologici relativi alle membrane reticolate, hanno dimostrato come benché il processo alteri la morfologia complessiva, la struttura fibrosa e la porosità della membrana vengano mantenute. Le fibre risultano infatti appiattite con un incremento nella dimensione, raggiungendo valori di diametro medio pari a 250 nm, contro i 120 nm delle membrane non reticolate. Inoltre, come osservabile nella figura 34 C sono stati riscontrati valori di spessore pari a 125 μm, valore che ha permesso una semplice rimozione delle membrane dal supporto in alluminio per le successive caratterizzazioni, passaggio altrimenti impossibile per le membrane non reticolate.

In accordo con alcuni studi presenti in letteratura tra cui quello effettuato da Dong e collaboratori [149], i campioni reticolati tramite EDC/NHS, sono risultati resistenti e compatti, permettendo una manipolazione effettiva dello scaffold, senza però alterare significativamente la morfologia nanofibrosa e porosa originale delle membrane necessaria per l'applicazione finale.

Per confermare l'effettiva reticolazione del materiale è stata inizialmente eseguita la misura del numero di ammine libere nei campioni pre e post reticolazione. Il contenuto di ammine libere nei campioni di collagene è stato determinato in seguito alla reazione dei gruppi amminici primari con l'acido 2,4,6-trinitrobenzenesolfonico (TNBS). Per realizzare il test, i campioni reticolati e non reticolati sono stati sottoposti a idrolisi, tramite incubazione in diverse soluzioni. In una prima fase del test è stata eseguita un'incubazione di 4 ore a 40°C dei diversi campioni nelle soluzioni di 4% di NaHCO₃ e 0.5% di TNBS. Questo primo step ha permesso la reazione dei gruppi amminici primari del collagene con il TNBS, producendo una soluzione dal caratteristico colore giallo. Al termine delle 4 ore, i campioni sono stati incubati in una soluzione di HCl 6 M e posti in agitazione ad una temperatura di 90°C per un'ora per garantire una corretta solubilizzazione delle membrane. Al termine di tale incubazione le soluzioni risultanti dalla completa solubilizzazione dei campioni sono state diluite 1:20 con acqua distillata per poter essere successivamente analizzate tramite spettrofotometro UV/Vis. Per valutare l'effettiva reticolazione dei campioni, l'assorbanza rilevata è stata correlata alla concentrazione di gruppi amminici liberi individuati durante l'analisi. Basandosi sul lavoro di Ratanavaraporn et al. [140], per ottenere una stima quantitativa del grado di reticolazione è stata calcolata la differenza tra il valore di assorbanza a 345 nm rilevato nei campioni reticolati (A_c) e quelli di controllo non reticolati (A_n), analizzando le curve risultanti dall'analisi e utilizzando la formula:

$$\% \text{ RETICOLAZIONE} = \frac{(A_n - A_c)}{A_n} \times 100$$

Il test delle ammine libere è stato eseguito in triplicato sui campioni reticolati e sulle membrane non reticolate utilizzando queste come controllo, riportando la curva media risultante come mostrato in figura 35.

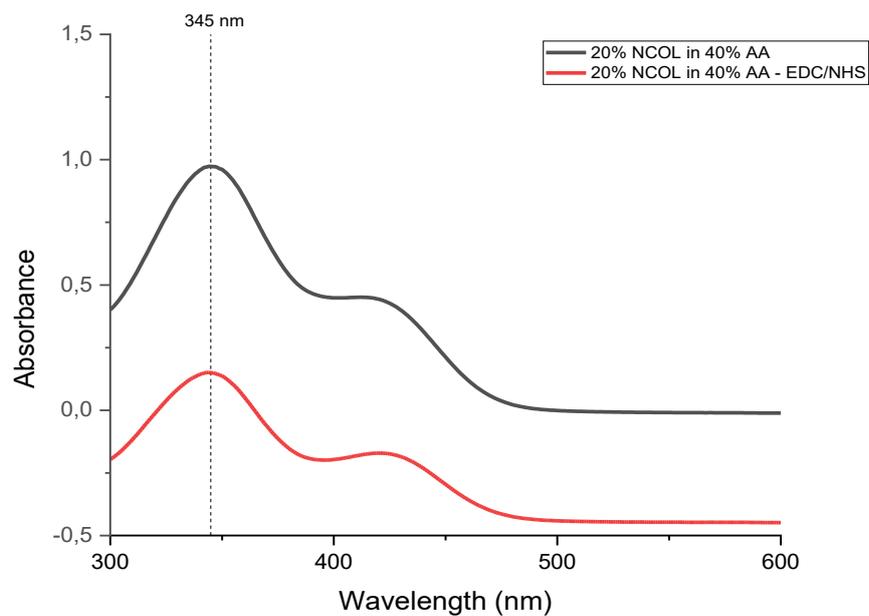


Figura 35: Spettro relativo all'analisi UV-Vis delle membrane di collagene pre e post trattamento con EDC/NHS

Considerando che durante la reticolazione chimica della proteina un buon numero di ammine viene interessato nei legami inter e intramolecolari, l'efficacia del trattamento viene quindi ricondotta a una generale riduzione del valore di assorbanza registrato a 345 nm. Tale reticolazione, come riportato precedentemente, si basa infatti sull'attivazione mediata dall'EDC del gruppo carbossilico dei residui di acido glutammico e aspartico delle molecole di collagene, seguiti dalla loro reazione con gruppi amminici liberi di un'altra catena polipeptidica. Come ragionevolmente previsto, il metodo di reticolazione tramite EDC/NHS si è dimostrato estremamente efficace ed è stato calcolato un grado di reticolazione superiore al 62%. Tale risultato ha confermato l'efficienza dell'uso di soluzioni reticolanti a base di EDC/NHS per incrementare il grado di cross-linking di sistemi a base di collagene [159].

In seguito alla conferma della reticolazione delle membrane realizzate, sono state eseguite diverse tipologie di caratterizzazioni per indagare l'effetto del reticolante sulle proprietà fisico-chimiche delle membrane.

Per comprendere il beneficio della reticolazione dal punto di vista della resistenza finale dei costrutti in ambiente acquoso, sono stati eseguiti dei test di degradazione idrolitica sui campioni. Tale tipo di degradazione è attribuibile alla scissione idrolitica dei legami peptidici della molecola del collagene. Questo porta alla formazione regioni non polari all'interno delle molecole di collagene, o alla formazione di un'unica catena alfa generando quindi l'instabilità complessiva del costrutto e

favorendo la sua degradazione [15],[19]. La degradazione degli scaffold di collagene reticolati è stata dunque valutata monitorando la perdita di massa in percentuale dopo diversi tempi di incubazione (1, 7 e 14 giorni) in soluzione acquosa salina (PBS), come mostrato in Figura 36.

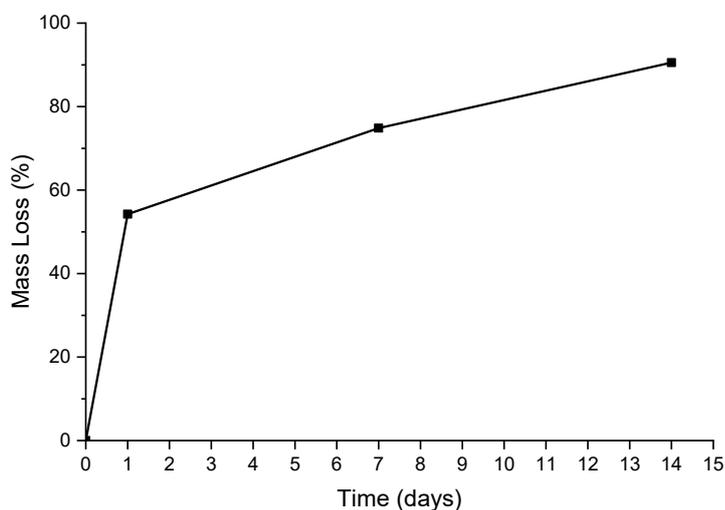


Figura 36: Degradazione idrolitica delle membrane 20%NCOL in 40%AA reticolate tramite EDC/NHS fino a 14 giorni.

Come illustrato in figura, il processo di degradazione dei campioni reticolati con EDC/NHS ha mostrato una perdita di massa superiore al 50% nelle prime 24 ore, raggiungendo un valore dell'85% al giorno 14. Nonostante sia evidente un effettivo miglioramento della resistenza dei costrutti a base di collagene in ambiente acquoso grazie al trattamento di reticolazione, tali risultati mostrano delle percentuali di degradazione superiori se confrontati con i dati presenti in letteratura azione [20],[21],[22]. Nel lavoro di Walters et al. [117] sono state calcolate percentuali di degradazione pari a circa il 30% nelle prime 24 ore per registrare poi una degradazione pari al 60% al terzo giorno di analisi. Tuttavia, la maggiore velocità di degradazione delle matrici 20%NCOL in 40% AA-EDCC/NHS potrebbe essere ricondotta all'elevata porosità mantenuta anche in seguito al trattamento di reticolazione, caratteristica che favorisce la degradazione del costrutto grazie alla semplice infiltrazione della soluzione salina al suo interno. Il mantenimento della morfologia, e quindi della struttura porosa, non sempre è riscontrato in letteratura in seguito al trattamento di reticolazione [117].

Il test di degradazione ha comunque dimostrato l'efficacia della reticolazione tramite cabodiimididi, mostrando una degradazione graduale delle membrane fino a due settimane, evitando la repentina dissoluzione e perdita della struttura caratteristica delle matrici non reticolate. Il profilo di

degradazione delle matrici è risultato coerente con i dati presenti in letteratura circa membrane elettrofilate per applicazioni di rigenerazione cutanea [162]. Infatti, come dimostrato nel lavoro di Bonvallet et al. [163] la degradazione ideale per uno scaffold con ruolo di sostituto cutaneo durante il processo di rigenerazione delle ferite dovrebbe avvenire tra i 14 e 21 giorni. Cinetiche di degradazione di questa durata garantiscono un corretto supporto per il reclutamento e la comunicazione delle cellule coinvolte nella prime fasi del processo di guarigione, consentendo al tempo stesso, grazie alla graduale degradazione dello scaffold, di non interferire con la formazione di tessuto cicatriziale nell'ultima fase della rigenerazione cutanea. Il processo di guarigione delle ferite è infatti un processo multi-step che comprende complesse sequenze biologiche volte a ristabilire la funzione della pelle. Dopo la comparsa di una ferita, le prime due fasi, emostasi e infiammazione, iniziano immediatamente, mentre la fase proliferativa, la più importante, inizia il terzo giorno dal verificarsi della lesione e ha una durata di 2 settimane [162]. I valori ottenuti dagli scaffold reticolati tramite EDC-NHS risultano dunque adattabili al processo di rigenerazione del tessuto che si verifica in seguito a una lesione cutanea. Per investigare ulteriormente la stabilità delle membrane post-reticolazione, sono state eseguite analisi termogravimetriche, sottoponendo i campioni a riscaldamento graduale a partire da 25 °C fino a raggiungere una temperatura di circa 500 °C, valutando e confrontando i campioni reticolati e non reticolati, come mostrato in figura 37.

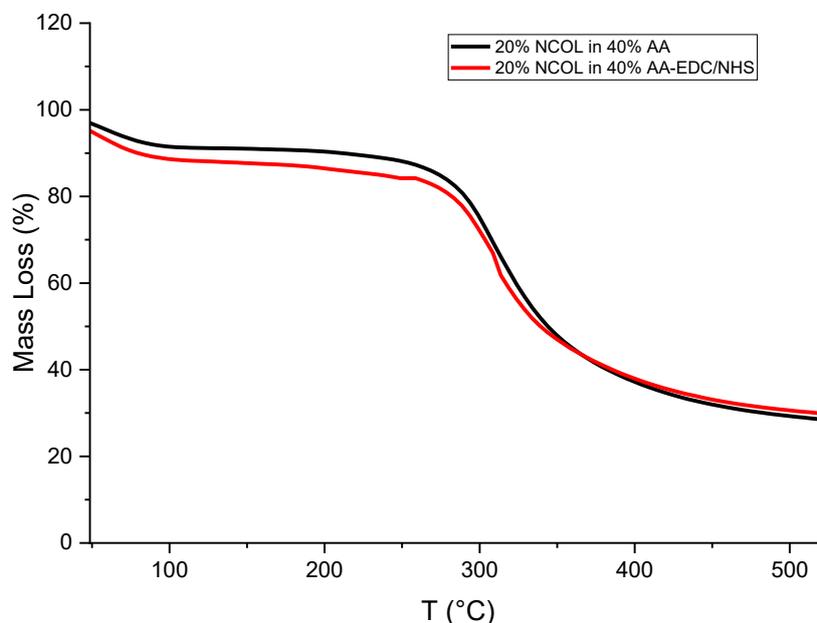


Figura 37: Curve termogravimetriche relative ai campioni 20%NCOL pre e post reticolazione EDC/NHS

Come osservabile in figura, le diverse matrici nanofibrose hanno mostrato un profilo termogravimetrico simile. Per tutti i campioni sono state infatti riscontrate due fasi. La prima fase corrisponde ad una leggera perdita di massa (circa 12-15%) nell'intervallo di temperatura 25-50 °C dovuta all'evaporazione di acqua non legata (cioè umidità) assorbita dal collagene [164],[165]. La seconda regione è attribuita alla denaturazione del collagene, e alla combustione del collagene organico residuo nella matrice [166]. Tale fase si è presentata come una perdita di massa brusca e veloce nel range di temperature comprese tra i 200 e 450°C. In particolare, è stata registrata una perdita di massa pari al 53% per i campioni non reticolati e del 48% per quelli sottoposti a reticolazione, dimostrando un incremento seppur minimo della resistenza delle membrane in seguito a trattamenti di reticolazione e confermando ancora una volta il beneficio di quest'ultima sulle proprietà di sistemi a base di collagene.

Volendo inoltre valutare l'effettiva conservazione delle proprietà fisico-chimiche del collagene in seguito al processo di elettrofilatura e reticolazione sono state eseguite delle analisi ATR-FTIR sulle membrane. In figura 38 sono rappresentati gli spettri FTIR delle membrane a base di collagene prima e dopo il trattamento di reticolazione.

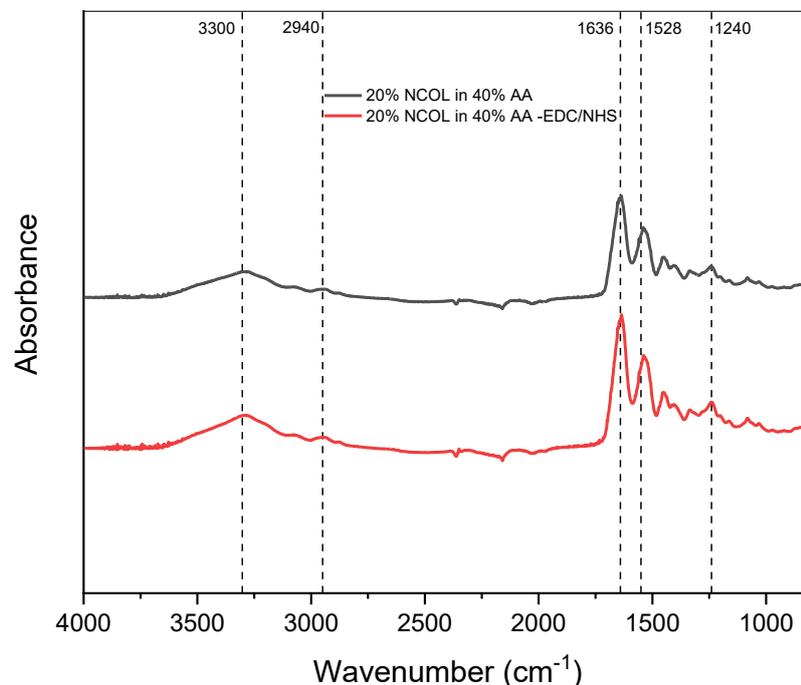


Figura 38: Confronto tra gli spettri FTIR delle membrane prima e dopo reticolazione tramite EDC/NHS

Gli spettri delle diverse membrane a base di collagene mostrano la presenza dei picchi caratteristici associati alla proteina. Le diverse regioni spettrali relative alle bande dell'ammide A, B, I, II e III appaiono rispettivamente alle frequenze di 3330, 2940, 1636, 1528 e 1240 cm^{-1} per entrambi gli spettri, non mostrando differenze significative nell'alterazione e nello spostamento dei picchi caratteristici tra i campioni prima e dopo reticolazione.

La larga banda a 3330 cm^{-1} , relativa alla ammidine A, è dovuta allo *stretching* dei legami peptidici N-H tra gli amminoacidi in catena, e al contributo dei gruppi OH, che conferma la partecipazione attiva dell'acqua nella molecola di collagene [167]. La banda relativa all'ammide I appare tipicamente nell'intervallo 1600-1700 cm^{-1} con un massimo vicino a 1636 cm^{-1} . Tale banda è prodotta principalmente dallo *stretching* del legame peptidico C=O. La banda relativa all'ammide II con un massimo a 1528 cm^{-1} è attribuibile invece al *bending* del legame N-H in combinazione con lo *stretching* di C-N. La mancanza di spostamenti significativi delle bande dell'ammide I e II verso una lunghezza d'onda inferiore, tipicamente associata alla perdita della struttura a tripla elica del collagene, nonché l'evidente presenza del picco relativo all'ammide III a circa 1240 cm^{-1} , dimostrano l'integrità strutturale della proteina in seguito al processo di elettrofilatura e a seguito del trattamento di reticolazione [168]. Inoltre, sulla base del lavoro di Ahamad et al. [169], per confermare ulteriormente la mancata denaturazione del collagene e conservazione della struttura tripla elica, è stato calcolato il rapporto tra il valore di assorbimento dei picchi a 1240 cm^{-1} (ammide III) e 1450 cm^{-1} . Dai risultati è emerso un rapporto pari a 0,8 e 0,7 rispettivamente per i campioni non reticolati e reticolati. Secondo quanto riportato in letteratura [169] valori del rapporto tra i due picchi prossimi a 1 sono indicativi del mantenimento della struttura a tripla elica del collagene, al contrario valori inferiori a 0,5 indicherebbero la denaturazione della proteina. È stato quindi confermato come la reticolazione e il precedente processo di elettrofilatura non abbiano influito significativamente sulla naturale struttura della proteina [169].

I risultati delineati dalle diverse caratterizzazioni effettuate hanno confermato i noti benefici della reticolazione tramite EDC/NHS per migliorare la stabilità e la forza finale dei costrutti elettrofilati a base di collagene. Inoltre, i dati suggeriscono il mantenimento delle proprietà fisico-chimiche della proteina a seguito dei diversi trattamenti di elettrofilatura e reticolazione. Nonostante i buoni risultati evidenziati dall'utilizzo delle carbodiimidi per la reticolazione delle membrane a base di collagene, è noto che l'efficienza di questa reticolazione chimica sia limitata. Tale limite è dovuto all'incapacità delle carbodiimidi di formare legami covalenti oltre a quella che viene definita 'lunghezza zero'. Questo meccanismo di reticolazione ostacola quindi il legame tra residui amminoacidici distanti all'interno della stessa molecola di collagene, o fibrille di collagene adiacenti [86]. Ciò conduce ad

un incremento delle proprietà meccaniche dei costrutti finali limitato se paragonato ad altri trattamenti di reticolazione seppur meno citocompatibili [86]. In aggiunta, alcuni studi in letteratura hanno riportato perplessità circa il beneficio delle cabodiimididi sulle interazioni cellula-collagene, dimostrando come la reticolazione inibisca la naturale proliferazione cellulare [170].

Per migliorare e incrementare le proprietà meccaniche e la resistenza dei costrutti a base di collagene, così come la biocompatibilità dei prodotti finali, la ricerca si è spostata verso reticolazioni alternative. Tra i metodi innovativi, particolare attenzione è stata posta nella possibilità di sfruttare fotoiniziatori per ottenere la reticolazione di sistemi a base di collagene sfruttando l'esposizione a diverse fonti luminose, evitando così l'utilizzo di agenti chimici potenzialmente nocivi. Particolarmente interessante per le applicazioni nell'ambito della rigenerazione della cute, è l'utilizzo del Rosa Bengala, fotoiniziatore recentemente utilizzato nella pratica clinica per la rigenerazione di ferite senza suture. Sulla base delle osservazioni precedenti, in questo lavoro di tesi è stato valutato l'utilizzo di una reticolazione alternativa, creando dei sistemi a base di collagene contenenti rosa bengala per consentire la fotoreticolazione degli scaffold.

3.2 Sviluppo e caratterizzazione di membrane fotoreticolabili a base di collagene

Sulla base dei precedenti risultati, la formulazione ottimizzata di collagene 20%N_COL in 40%AA è stata utilizzata per creare un sistema fotoreticolabile. A questo scopo, una volta creata la soluzione, è stato inserito nella formulazione un fotoiniziatore citocompatibile, il rosa bengala, per ottenere una concentrazione finale dello 0,1% in peso, dove la percentuale è stata scelta sulla base di precedenti studi in letteratura [21-30]. Nonostante l'uso del rosa bengala sia stato già documentato ampiamente in campo clinico, ad oggi pochi studi ne riportano la combinazione con matrici di collagene per la realizzazione di membrane tramite elettrofilatura.

È stato dunque esplorato l'uso di questo fotoiniziatore con lo scopo di ottenere matrici nanofibrose biocompatibili e contemporaneamente sensibili a lunghezza d'onda nella banda del visibile (compresa tra i 400-700 nm) per favorirne la reticolazione fisica, valutando in seguito le differenze con le membrane reticolate chimicamente. In tale reticolazione il reagente fotosensibile attivato dall'irraggiamento interagisce con l'ossigeno producendo delle specie molto reattive di quest'ultimo capaci di ossidare le molecole circostanti. La reticolazione e l'aggregazione delle proteine all'interno del costrutto potrebbe quindi essere ricondotta alla attivazione delle specie reattive formatesi in seguito a questa reazione sulle proteine fotoossidate [99- 100]. Ciò potrebbe quindi a favorire un'interazione di tipo elettrostatico tra molecole proteiche adiacenti.

Prima della realizzazione degli scaffold tramite elettrofilatura, la viscosità delle nuove soluzioni contenenti il fotoiniziatore (20% NCOL + 0,1%RB in 40%AA) è stata valutata e confrontata con quella registrata in precedenza per le soluzioni 20% NCOL in 40% AA, eseguendo delle rampe di flusso ad una temperatura costante di 23 °C. Il confronto tra i due sistemi è riportato in figura 39.

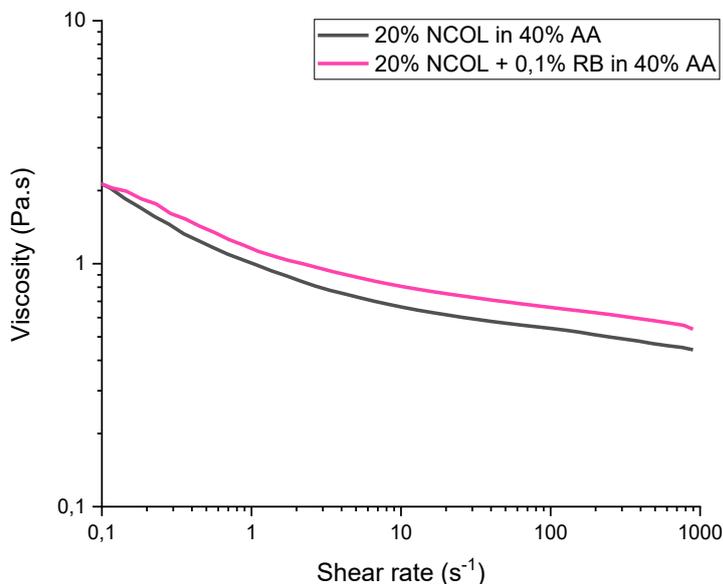


Figura 39: Confronto delle curve di flusso ottenute dalla soluzione prima e dopo l'inserimento del rosa bengala.

La figura 39 mostra la viscosità della due diverse soluzioni di collagene in un ampio range di shear rate. Come precedentemente riscontrato per le soluzioni 20%NCOL in 40%AA anche il sistema contenente il RB presenta un comportamento visco-elastico, presentando un andamento della viscosità decrescente all'aumentare della sollecitazione applicata. Infatti, valori di viscosità maggiori sono stati evidenziati per shear rate prossimi allo zero (0,1 s⁻¹), con valore massimo pari a 2,6 P.s e ultimo valore di viscosità registrato pari a 0,54 Pa.s per condizioni di stress elevate (1000 s⁻¹). Tali valori risultano quindi simili a quelli precedentemente calcolati per il sistema 20% NCOL in 40% AA per il quale sono stati registrati valori di viscosità massima e minima pari rispettivamente a 2,4 Pa.s e 0,44 Pa.s. Benché, la soluzione contenente il fotoiniziatore abbia complessivamente dimostrato una viscosità più elevata dei sistemi di solo collagene, tale aumento è non significativo, come osservabile dal simile andamento delle curve.

Tali valori hanno evidenziato come il fotoiniziatore non alteri le proprietà reologiche del sistema, non influenzando in maniera significativa nella solubilità della proteina in soluzione, confermando ancora una volta il ruolo chiave dell'acido acetico nel promuovere la dissoluzione di molecole di collagene,

generando soluzioni dai valori di viscosità contenuti e adatte al processo di elettrofilatura proposto [1-5].

Tenuto conto delle proprietà reologiche analoghe registrate tra i due sistemi sperimentati, le membrane elettrofilate sono state ottenute utilizzando gli stessi parametri di processo precedentemente ottimizzati e definiti per il sistema 20% COL in 40% AA. Le membrane sono state dunque realizzate elettrofilando le soluzioni per tre ore testando l'uso sia del collettore piano (A, Tabella 9) che del collettore cilindrico rotante (B, Tabella 9), avendo cura durante il processo di evitare l'esposizione a fonti luminose per prevenire una prematura reticolazione. Per verificare la presenza della struttura nanofibrosa i campioni sono stati analizzati tramite microscopia a scansione elettronica (Figura 40).

	VELOCITÀ DI ROTAZIONE	DISTANZA COLLETTORE	TENSIONE	FLUSSO	TEMPERATURA	UMIDITÀ RELATIVA
A	-	12 cm	24 -25 kV	300 μ L/h	23-25°C	40-43%
B	2000 rpm	12 cm	23-24 kV	300 μ L/h	24-24°C	36-39%

Tabella 9: Parametri ambientali e di processo impostati per l'elettrofilatura su collettore piano (A) e cilindrico rotante (B) delle membrane 20%NCOL + 0,1% RB in 40% AA

Le membrane così ottenute sono state successivamente preparate per effettuare una valutazione delle caratteristiche morfologiche tramite microscopia a scansione elettronica, come mostrato in Figura 40.

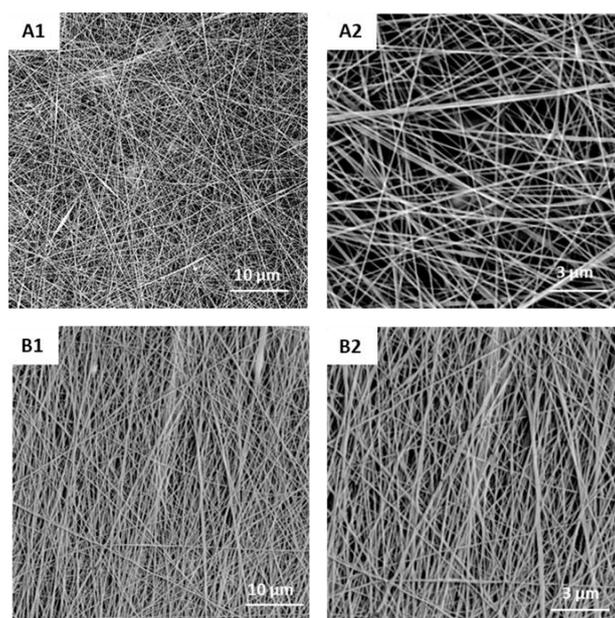


Figura 40: Immagini SEM delle membrane 20% NCOL + 0,1 %RB in 40% AA realizzate tramite 3 ore di electrospinning su: (A1, A2) collettore piano; (B1, B2) collettore cilindrico rotante.

La morfologia degli scaffold ottenuti dalle soluzioni di collagene contenenti il Rosa Bengala è risultata coerente con quanto osservato dalle membrane a base di solo collagene precedentemente realizzate. Come previsto le matrici realizzate utilizzando il collettore piano presentano una organizzazione casuale delle nanofibre. Al contrario le membrane elettrofilate su collettore cilindrico rotante a 2000 rpm hanno dimostrato di avere un'organizzazione ben definita delle fibre con un allineamento marcato nella direzione di movimento del collettore. In entrambi i casi le membrane appaiono porose, prive di difetti e omogenee. Anche in questo caso le matrici sono composte da fibre aventi diametri nel range dei 100-120 nm, con valori di poco inferiori nel caso delle matrici allineate. Dalle immagini è inoltre possibile notare un lieve appiattimento delle fibre se confrontate con quelle costituenti le matrici di solo collagene. Tale risultato è presumibilmente attribuibile ai diversi parametri ambientali (Tabella 9) presenti durante la realizzazione delle membrane quali valori di umidità particolarmente elevati (40-43%), che hanno portato ad utilizzare un voltaggio superiore (23-25 kV) per raggiungere la stabilità del flusso. Benché membrane nanofibrose omogenee siano state ottenute utilizzando entrambi i collettori, come precedentemente osservato per i sistemi 20%NCOL in 40%AA, le tre ore di electrospinning su collettore rotante non sono state sufficienti per realizzare degli scaffold con uno spessore adeguato alla seguente manipolazione dei campioni. Questi risultati hanno ulteriormente confermato la necessità di raddoppiare il tempo di lavorazione per ottenere dei prodotti aventi uno spessore equivalente a quello ottenuto utilizzando il collettore piano o l'uso di collettori cilindrici con un diametro inferiore. Pertanto, per la successiva reticolazione e caratterizzazione sono state selezionate le sole membrane realizzate tramite l'uso di collettore piano.

Con l'obiettivo di ottimizzare il processo di fotoreticolazione, le membrane realizzate sono state tagliate per realizzare dei campioni di dimensioni desiderate e sottoposte a un'incubazione di 15 minuti in etanolo al 99,5% come suggerito dal protocollo ottimizzato nello studio di Liu et al. [131]. Una volta rimossa la soluzione d'incubazione, tutti gli scaffold sono stati irradiati con una lampada emittente nella banda del visibile per lunghezze d'onda nel range 400-700 nm, potenza pari a 2,5 W posizionata a una distanza di 12 cm dai campioni. Sono state testate diverse tempistiche di irraggiamento: 10 minuti, 30 minuti e 1 ora.

A seguito del trattamento, le membrane sottoposte a diverse tempistiche di irraggiamento sono state caratterizzate in termini di proprietà morfologiche, fisico-chimiche e di degradazione. Inizialmente, la morfologia delle membrane fotoreticolate è stata osservata tramite analisi SEM, facendo inoltre un confronto con le matrici reticolate tramite EDC/NHS, come mostrato in figura 41.

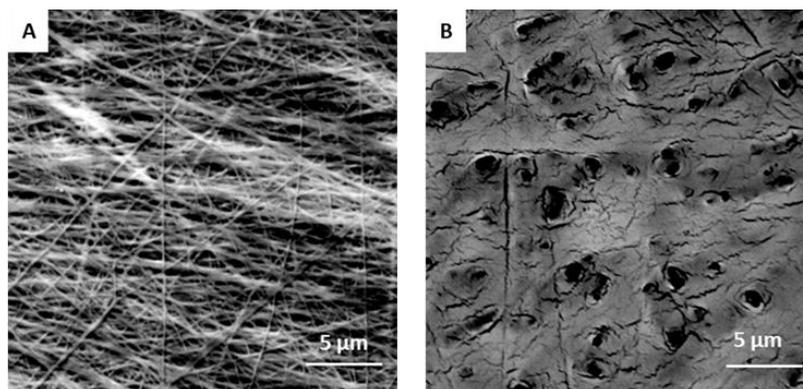


Figura 41: Immagini SEM delle diverse membrane sottoposte a differenti trattamenti di reticolazione: A) 20%NCOL in 40% AA- EDC/NHS; B) 20%NCOL + 0,1%RB in 40%AA fotoreticolata per 30 min;

Non essendo stata riscontrata alcuna differenza nella morfologia delle membrane fotoreticolate con diverse tempistiche di irraggiamento è stata riportata solo l'analisi SEM del campione reticolato per 30 minuti. Dal confronto delle immagini appare evidente la differenza morfologica causata dai diversi trattamenti di reticolazione. Infatti, se confrontati con gli scaffold reticolati tramite EDC/NHS in cui è visibile un mantenimento della struttura fibrosa, per le membrane fotoreticolate (Figura 41 B) è emersa una perdita totale della struttura fibrosa e della porosità della matrice. Benché l'esatto meccanismo di interazione tra Rosa Bengala e collagene rimanga da chiarire, tale risultato potrebbe essere ricondotto a problematiche emerse nella fase di incubazione effettuate prima del trattamento. Nel lavoro Li et al. [171] è stato suggerito ad esempio l'utilizzo dell'isopropanolo come solvente per l'incubazione. Resta quindi da ottimizzare il processo di reticolazione valutando non solo l'utilizzo di diversi solventi per l'incubazione pre-reticolazione, ma anche differenti tempistiche e condizioni di processo per tale fase. Infatti, i risultati positivi ottenuti precedentemente nell'ottimizzazione della reticolazione tramite EDC/NHS hanno suggerito come una bassa temperatura (4°C) durante l'incubazione nella soluzione di reticolante favorisca il mantenimento della struttura fibrosa. Si potrebbe quindi valutare di incubare le matrici 20%NCOL + 0,1%RB in 40%AA alla medesima temperatura o testare differenti temperature di incubazione e valutarne gli effetti. Inoltre, per l'irraggiamento delle membrane è stata utilizzata una lampada emittente in un' ampia banda di lunghezze d'onda (400-700 nm), tuttavia è noto che il rose-bengal sia particolarmente sensibile per lunghezze d'onda variabili tra i 514-532 nm [172]. Un'ulteriore strategia per ottimizzare il processo di fotoreticolazione potrebbe coinvolgere l'utilizzo di strumenti capaci di emettere in lunghezze d'onde specifiche come laser ad argon, utilizzati in diversi lavori tra cui quello di Liu et al.[131]

Nonostante le analisi morfologiche abbiano dimostrato l'effettivo cambiamento delle membrane in seguito all'irraggiamento, sono state eseguite diverse tipologie di caratterizzazioni per confermare l'avvenuta reticolazione e meglio comprendere i processi legati a questo processo.

Come precedentemente eseguito sulle membrane di solo collagene reticolate tramite EDC/NHS, è stato analizzato il contenuto di ammine libere presenti nei campioni fotoreticolati valutando il risultato della reazione dei gruppi amminici primari con l'acido 2,4,6-trinitrobenzenesolfonico (TNBS). Per realizzare il test i campioni 20%NCOL + 0,1%RB in 40% AA reticolati e non reticolati sono stati incubati in diverse soluzioni tra cui: una soluzione NaHCO_3 al 4%, soluzione di TNBS allo 0,5% e in ultimo una soluzione di HCl 6 M per ottenere una completa solubilizzazione delle membrane. Al termine di tale incubazione le soluzioni risultanti dalla completa solubilizzazione dei campioni sono state diluite 1:20 con acqua distillata per poter essere analizzate tramite spettrofotometro UV/Vis e valutare l'effettiva reticolazione dei campioni analizzando i dati relativi all'assorbanza dei diversi campioni. Come precedentemente descritto, basandosi sul lavoro di Ratanavaraporn et al. [140], è stata calcolata una stima quantitativa del grado di reticolazione eseguendo il rapporto tra il valore di assorbanza a 345 nm dei campioni di controllo e di quelli reticolati con diverse tempistiche di irraggiamento. Il test TNBS è stato eseguito in triplicato sui campioni reticolati e sulle membrane non reticolate utilizzando queste come controllo, riportando la curva media risultante come mostrato in figura 42.

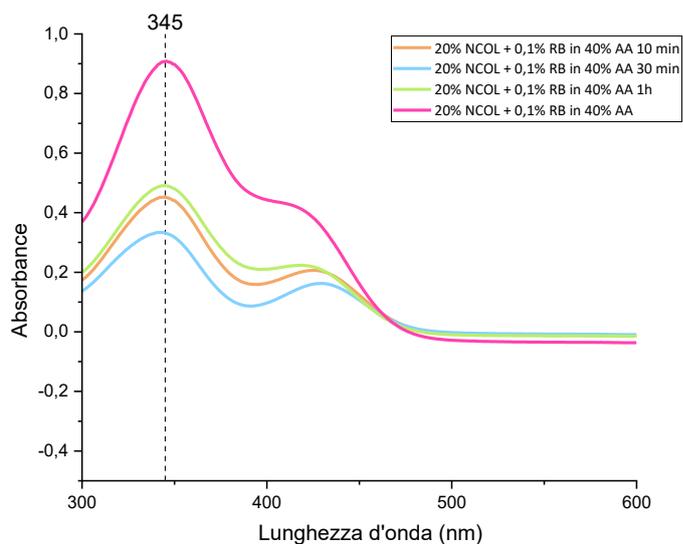


Figura 42: Spettro relativo all'analisi UV-vis di campioni 20%NCOL+ 0,1%RB in 40%AA pre e post reticolazione con diverse tempistiche di irraggiamento.

Anche nel caso dei campioni fotoreticolati è stata riscontrata una significativa diminuzione del numero di ammine libere post trattamento. Come si osserva dai grafici sopra riportati, il valore di assorbanza a 345 nm risulta diminuito per tutti i tempi di irraggiamento valutati. Tuttavia, contrariamente a quanto previsto, l'efficienza di reticolazione maggiore è stata riscontrata per un irraggiamento pari a 30 min corrispondente ad un grado di reticolazione del 70%, contro il 58% e 53% per i campioni reticolati rispettivamente per 10 minuti e 1 ora. I risultati ottenuti per i campioni sottoposti a un irraggiamento di 30 min suggeriscono un'efficienza di reticolazione superiore rispetto a quella ottenuta dalla reticolazione chimica con carbodiimidi. Infatti, i dati precedentemente ottenuti per il sistema 30%NCOL in 40% AA-EDC-NHS (mostrati in figura 35) hanno evidenziato un grado di reticolazione pari al 62%, inferiore quindi al 70% registrato per le membrane fotoreticolate per 30 min.

Tali risultati sono stati ulteriormente supportati dalle analisi di degradazione idrolitica tramite incubazione in PBS per 1,7 e 14 giorni, eseguita sui campioni reticolati con le diverse tempistiche di irraggiamento, come riportato in Figura 43.

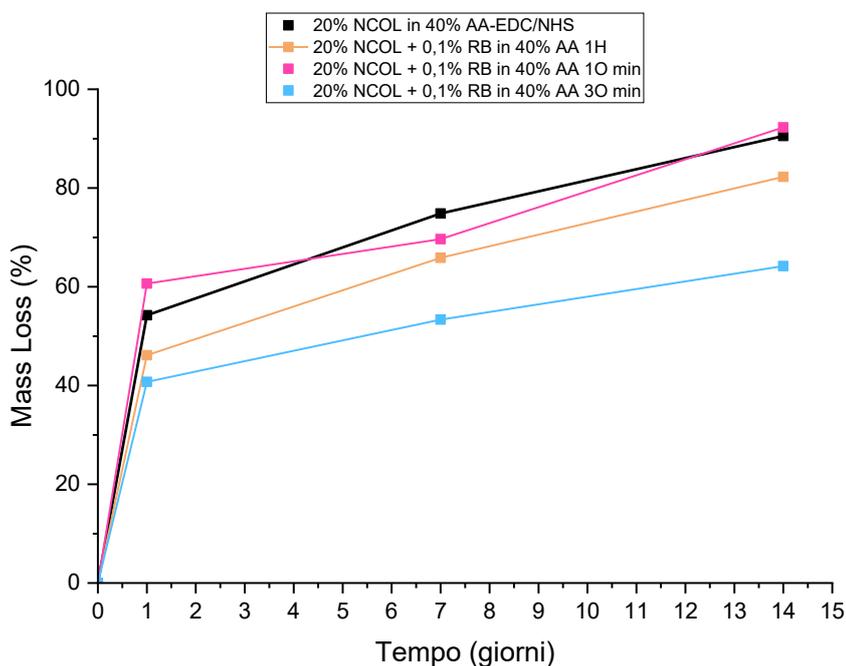


Figura 43: Degradazione idrolitica delle membrane fotoreticolate a diverse tempistiche di irraggiamento e confronto con membrane reticolate con EDC/NHS.

I campioni contenenti il fotoiniziatore e reticolati con diverse tempistiche di irraggiamento hanno mostrato comportamenti diversi. Benché ci si aspettasse una diminuzione della perdita di massa inversamente proporzionale alle tempistiche di irraggiamento, i migliori risultati sono stati ottenuti

dai campioni reticolati per 30 minuti, confermando i risultati ottenuti dalla analisi sul contenuto di ammine libere, e quindi relativo al grado di reticolazione delle matrici. Come osservabile dalla curva azzurra in figura 43 i campioni 20%NCOL +0,1%RB in 40%AA reticolati per 30 minuti hanno raggiunto il 40% della perdita di peso dopo circa 24 ore per poi arrivare a valori di poco superiori al 50% alla fine del tempo di osservazione. I dati ottenuti precedentemente dal test delle ammine libere sembrerebbero quindi essere confermati. Anche in questo caso i campioni reticolati per 30 minuti hanno dimostrato un'efficienza di reticolazione maggiore rispetto a quella ottenuta precedentemente per le matrici reticolate tramite EDC/NHS, per le quali era stata riscontrata una perdita di massa pari circa al 60% già nelle prime 24h. Tale incremento di resistenza nei campioni fotoreticolati potrebbe essere ricondotto alla diversa morfologia delle matrici. Infatti, come mostrato in figura 43, la perdita della struttura fibrosa e la conseguente porosità emersa per i campioni fotoreticolati potrebbero rendere le matrici più resistenti in ambiente acquoso (quale quello simulato dalla soluzione di PBS), impedendo la penetrazione del fluido nella matrice e rallentando quindi il processo di degradazione. L'architettura e la morfologia del costrutto sono infatti dei parametri fondamentali che ampiamente influiscono sulla resistenza complessiva delle membrane elettrofilate [38]. Al contrario, i campioni reticolati per 10 min hanno mostrato complessivamente il grado di degradazione maggiore, con perdite di massa pari al 60% già nelle prime 24 ore fino ad arrivare ad una quasi completa degradazione al quattordicesimo giorno. Infine, i dati relativi ai campioni sottoposti a 1 ora di irraggiamento dimostrano un comportamento intermedio rispetto a quelli precedenti, raggiungendo il 70% di perdita di massa a 14 giorni di incubazione.

Anche in questo caso la velocità di degradazione è risultata adattabile al normale decorso di rigenerazione cutanea in seguito a una lesione, in quanto tutti i campioni hanno mantenuto la loro struttura fino a 14 giorni nonostante la evidente perdita di massa. I dati ottenuti, risultano complessivamente conformi ai profili di degradazione presentati nel lavoro di Liu et al.[131] per la quale è stata riscontrata una perdita di peso pari circa al 40% nelle prime 24h fino a raggiungere una degradazione maggiore all'80% nel giorno 14.

Le membrane sono state ulteriormente caratterizzate eseguendo delle analisi termogravimetriche per valutare la resistenza termica dei campioni dopo il trattamento di reticolazione alle diverse tempistiche, come mostrato in figura 44.

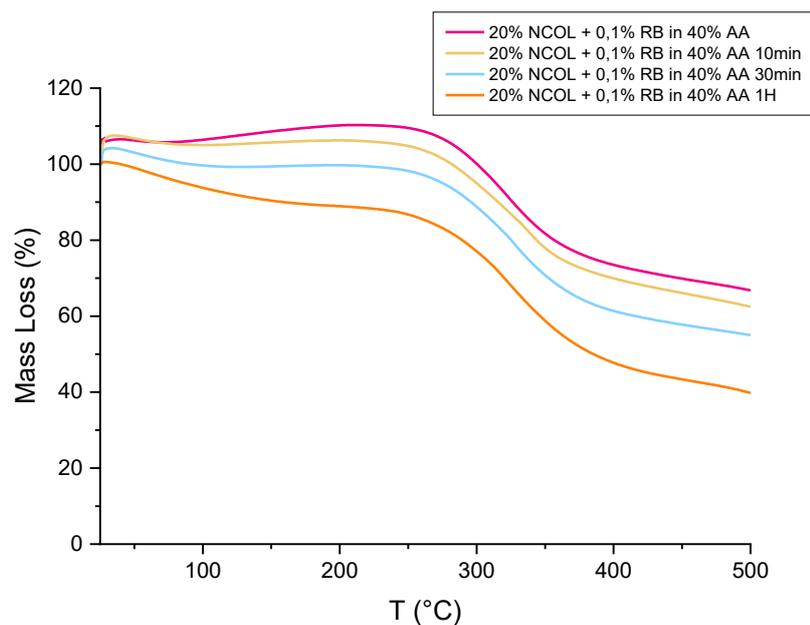


Figura 44: Curve termogravimetriche delle membrane 20% NCOL + 0,1%RB in 40% AA pre-reticolazione e post-reticolazione a diverse tempistiche di irraggiamento.

Come osservato per le matrici reticolate chimicamente, sono state riscontrate due fasi. La prima, corrispondente alla perdita di massa nell'intervallo di temperatura 25-50 °C dovuta all'evaporazione di acqua assorbita dal collagene [164],[165]. La seconda regione caratterizzata da una marcata perdita di peso, è stata attribuita invece alla denaturazione del collagene [166]. I dati hanno evidenziato una perdita di massa contenuta con valori non maggiori del 40% sia per le matrici non reticolate (curva rosa), che per le matrici reticolate con diverse tempistiche di irraggiamento. Nello specifico lo strumento ha registrato una perdita di peso pari al 33%, 35 % e 39% per i campioni fotoreticolati rispettivamente per 10 min, 30 min e 1 h. Tuttavia, come nel caso dei campioni reticolati chimicamente i range di temperatura in cui è stata riscontrata la maggiore degradazione corrispondono agli intervalli compresi tra 200- 400°C.

La perdita di peso dei campioni fotoreticolati risulta dunque nettamente inferiore se paragonata a quella dei campioni 20%NCOL in 40% AA-EDC/NHS (mostrati in figura 39) per la quale erano stati riscontrati dei valori di perdita di peso pari al 40%. I campioni 20%NCOL + 0,1%RB in 40%AA fotoreticolati risultano quindi più resistenti rispetto ai campioni reticolati tramite EDC/NHS anche alla degradazione termica, fattore anche in questo caso attribuibile alla diversa morfologia osservata per queste matrici, prive di struttura nanofibrosa e porosità e caratterizza da una struttura più compatta e resistente.

I risultati ottenuti confermano quindi quanto suggerito precedentemente dai test di degradazione idrolitica e dall'efficienza di reticolazione stimata tramite calcolo delle ammine libere, secondo il quale la reticolazione indotta da fotoiniziatore RB potrebbe essere più efficiente da un punto di vista della resistenza delle matrici a base di collagene rispetto a quella realizzata tramite EDC/NHS.

Infine, per verificare l'effetto della reticolazione sulle proprietà fisico-chimiche del collagene sono state eseguite le analisi ATR-FTIR, per confrontare lo spettro delle membrane prima e dopo la fotoreticolazione, come rappresentato nella figura 45.

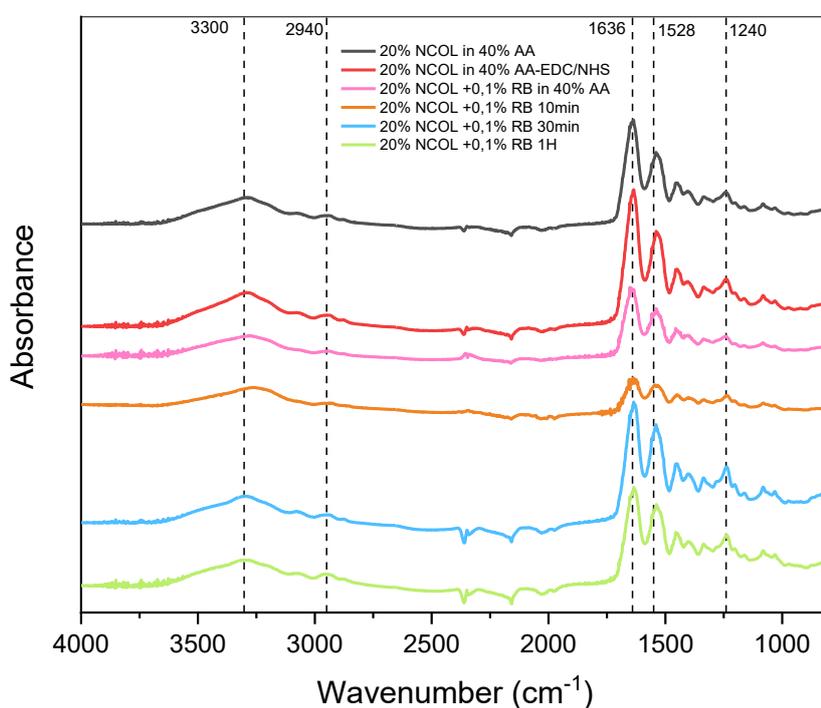


Figura 45: Spettri ATR-FTIR delle diverse membrane a base di collagene prima e dopo i diversi trattamenti di reticolazione.

Come evidente dalle curve riportate in figura, lo spettro dei diversi campioni mostra la presenza dei picchi caratteristici del collagene, confermando le osservazioni precedentemente fatte nel caso dei campioni reticolati chimicamente. Gli spettri relativi ai sistemi 20%NCOL + 0,1%RB in 40% AA e quelli relativi al sistema 20%NCOL in 40% AA appaiono simili sia nel caso delle matrici di controllo che per i campioni reticolati con le due diverse tipologie di reticolazione. L'unica differenza riscontrata nel caso dei campioni contenenti il RB è stata un valore di frequenza nella banda dell'ammide I inferiore rispetto a quello calcolato per i sistemi di solo collagene, pari a circa 1620 cm⁻¹ contro i 1650 cm⁻¹ dei sistemi 20%NCOL in 40%AA pre e post reticolazione. Questo risultato

potrebbe essere tuttavia attribuibile a parziali residui di acido acetico nelle membrane [173]. Inoltre, per i campioni fotoreticolati per 30 minuti sono emersi dei valori di intensità inferiori se paragonati a quelli riscontrati per le altre tempistiche di irraggiamento testate. Ciononostante, l'evidente presenza del picco relativo all'ammide III per tutte le membrane contenenti RB, ha suggerito la buona conservazione dell'integrità della struttura a tripla elica del collagene. Per confermare ulteriormente questo risultato, il rapporto tra i picchi a 1240 cm^{-1} (ammide III) e 1450 cm^{-1} è stato calcolato per tutti i campioni reticolati tramite irraggiamento. I risultati di tale rapporto hanno evidenziato valori compresi tra 0,7 e 0,8 sia per il campione non reticolato che per le matrici reticolate con diverse tempistiche di irraggiamento. Come riportato in letteratura [169] valori di tale rapporto intorno a 1 sono indicativi del mantenimento della struttura a tripla elica del collagene, confermando quindi come il fotoinziatore e i successivi trattamenti di reticolazione non influiscano sulla struttura nativa della proteina.

Le caratterizzazioni eseguite sulle membrane contenenti il rosa bengala hanno evidenziato la possibilità di ottenere migliore stabilità e resistenza degli scaffold a base di collagene tramite un più semplice e veloce trattamento di irraggiamento dei campioni, evitando inoltre la presenza di residui chimici dovuti alla reticolazione, come tipicamente avviene per le reticolazioni chimiche. Nonostante la maggiore stabilità delle matrici ottenute, la perdita della morfologia fibrosa post-irraggiamento risulta una grande limitazione di questo processo. Sulla base di queste osservazioni, sono attualmente in corso delle valutazioni per ottimizzare il processo in modo da ottenere una buona efficienza di reticolazione, preservando la struttura fibrosa dello scaffold.

Tuttavia, come riportato in diversi studi in letteratura, il solo trattamento di reticolazione può non essere sufficiente in alcuni casi per garantire adeguate proprietà meccaniche e stabilità alle matrici di collagene. Di conseguenza, la scelta di usare biomateriali compositi è sempre più frequente, in modo da combinare le ottime caratteristiche biologiche e di superficie del collagene, adatte a promuovere l'adesione cellulare, ad una maggior resistenza meccanica e strutturale caratteristica di altre fasi.

3.3 Sviluppo e caratterizzazione morfologica delle membrane a base di collagene e chitosano

Sulla base dei precedenti risultati, si è quindi valutata la combinazione del collagene con un altro biopolimero, il chitosano. Ad oggi pochi studi riportano la combinazione di questi due polimeri per la realizzazione di scaffold tramite electrospinning, dove inoltre si esplicita l'uso di solventi più aggressivi come ad esempio fluoroalcoli altamente volatili come 1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanolo (HFP) o 2,2,2-trifluoroetano (TFE) o soluzioni a base acida ad elevata concentrazione (tipicamente soluzione al 90% di acido acetico) [174],[132]. Il chitosano è noto per la sua buona biocompatibilità

e le ottime proprietà antimicrobiche contro batteri e virus, particolarmente utili per applicazioni di rigenerazione cutanea.

Una seconda fase dello studio ha quindi valutato la combinazione di collagene di tipo I e chitosano con l'obiettivo di migliorare la processabilità del materiale e le caratteristiche finali dei costrutti. A questo scopo, diverse concentrazioni di chitosano sono state testate e la formulazione ottimizzata è stata processata per ottenere membrane nanofibrose, successivamente caratterizzate morfologicamente e confrontata con le precedenti matrici di solo collagene.

Le soluzioni sono state create mantenendo come solvente la soluzione al 40% di acido acetico e una concentrazione totale di polimero pari al 20% (w/v), variando i rapporti di massa collagene/chitosano al fine di trovare la formulazione più adatta per il processo di elettrofilatura. In particolare, i rapporti collagene/chitosano (COLL/CS) investigati sono stati: 90/10 e 95/5 (w/w).

In un primo momento, è stata testata la soluzione COLL/CS 90/10 realizzata seguendo il protocollo descritto nel paragrafo 2.3. In breve, le polveri di chitosano sono state pesate per ottenere una concentrazione pari al 2% di chitosano da inserire all'interno della soluzione al 40% di acido acetico. Per garantire una completa solubilizzazione del chitosano la soluzione è stata mantenuta in agitazione per 72 ore e solo in seguito alla completa dissoluzione del chitosano è stato aggiunto il collagene liofilizzato, e la soluzione composta dai due polimeri è stata mantenuta in agitazione per tutta la notte prima del suo utilizzo.

Tale soluzione è risultata non processabile tramite electrospinning a causa dell'elevata viscosità che non ha permesso di ottenere una stabilità del flusso. Per tali ragioni si è deciso di dimezzare la concentrazione di chitosano, testando un rapporto COLL/CS di 95/5, corrispondente ad una concentrazione di chitosano pari all'1% in peso nel sistema finale. Per valutare la viscosità della soluzione ottimizzata sono state eseguite le rampe di flusso delle soluzioni contenenti chitosano, e confrontate con i precedenti sistemi realizzati, come mostrato in Figura 46.

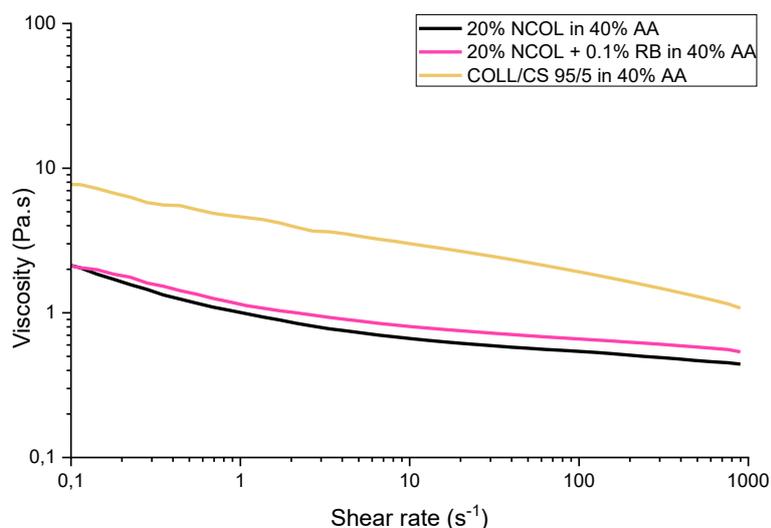


Figura 46: Confronto delle curve di flusso ottenute dalle diverse soluzioni

Le curve mostrate nel grafico in figura 46 evidenziano la netta differenza nella viscosità della soluzione contenente i due polimeri. Benché anche in questo caso il sistema dimostri un comportamento pseudo-plastico come evidente dall'andamento decrescente dei valori di viscosità, i dati relativi alla viscosità delle soluzioni COLL/CS 95/5 sono risultati complessivamente superiori, con valore massimo pari a 8.2 Pa.s per shear rate di 0.1 s^{-1} e valore minimo di viscosità registrato pari a 1,2 Pa.s per shear rate applicati pari a 1000 s^{-1} . Tali valori risultano quindi nettamente superiori se confrontati con i dati ottenuti precedentemente per le soluzioni a base di solo collagene per le quali i valori massimi di viscosità registrati corrispondevano a 2,4 Pa.s e 2,6 Pa.s rispettivamente per i sistemi 20%NCOL in 40%AA e 20%NCOL + 0,1%RB in 40% AA. Tuttavia, l'incremento di viscosità risulta normale considerando che la soluzione analizzata è costituita da due polimeri aventi diverse miscibilità nel solvente, e che la miscibilità di blend polimerici è dipendente dalle interazioni specifiche tra i componenti polimerici [175]. Tali interazioni possono infatti essere relative all'energia libera negativa di miscelazione che porta ad un aumento di viscosità [175]. Inoltre, come riportato da diversi studi tra cui quello di Lin et. al [132], valori di viscosità inferiori per soluzioni di chitosano in acido acetico vengono solitamente ottenuti per concentrazioni di acido pari al 90 %. Nonostante ciò, i valori di viscosità ottenuti per le soluzioni COLL/CS 95/5 in 40% AA hanno dimostrato una buona processabilità del sistema tramite elettrofilatura.

In seguito all'ottimizzazione della soluzione polimerica è stato possibile realizzare le membrane base di collagene e chitosano valutando l'uso del collettore piano e cilindrico rotante. Anche per queste membrane sono state eseguite delle prove preliminari della durata di 20 minuti partendo dai parametri di processo precedentemente ottimizzati per le matrici di solo collagene. È stata dunque scelta una

distanza emettitore-collettore pari a 12 cm, e nel caso del collettore rotante, una velocità di rotazione pari a 2000 rpm. In seguito all'ottimizzazione dei parametri sono state realizzate le matrici definitive elettrofilando le soluzioni per 3 ore sulle due diverse tipologie di collettore. In tabella 10 sono riportati i parametri ambientali e di processo impostati per la fabbricazione delle membrane.

	VELOCITÀ DI ROTAZIONE	DISTANZA COLLETTORE	FLUSSO	TEMPERATURA	UMIDITÀ RELATIVA
A	-	12 cm	100 μ L/h	23°C	30-31%
B	2000 rpm	12 cm	100 μ L/h	23-24°C	30-33%

Tabella 10: Parametri ambientali e di processo impostati per l'elettrofilatura su collettore piano (A) e cilindrico rotante (B) delle membrane COLL/CS in 40% AA

I campioni così realizzati sono stati caratterizzati morfologicamente tramite SEM per indagare la morfologia e la dimensione delle fibre realizzate. In figura 47 sono riportati i risultati relativi all'analisi morfologica e lo spessore delle matrici realizzate.

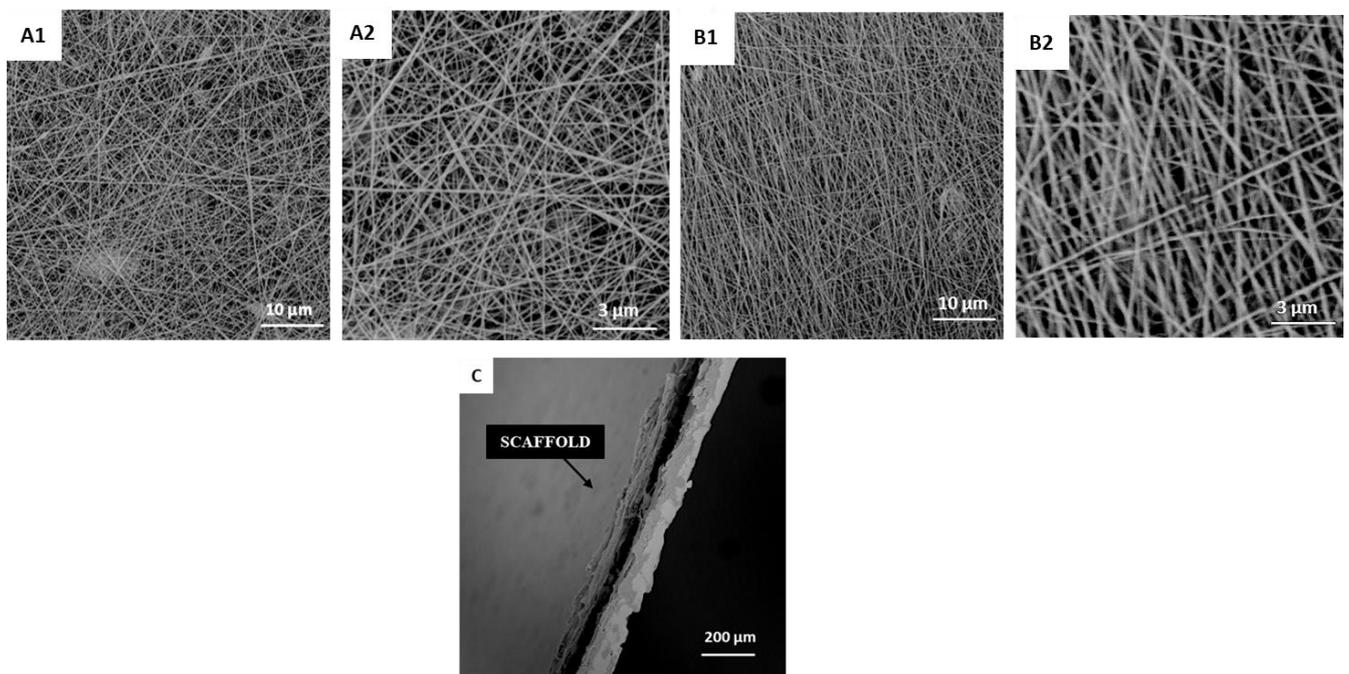


Figura 47: Immagini SEM degli scaffold COLL/CS 95/5 in 40% AA realizzati a seguito di 3 ore di electrospinning su collettore piano (A1, A2), collettore cilindrico rotante (B1, B2), e spessore di un campione realizzato su collettore piano (C)

La morfologia degli scaffold ottenuti dalle soluzioni contenenti il chitosano è risultata coerente con quanto emerso dalle membrane a base di solo collagene precedentemente realizzate. Come previsto le matrici realizzate utilizzando il collettore piano presentano una organizzazione casuale delle nanofibre. Al contrario le membrane elettrofilate su collettore cilindrico rotante hanno dimostrato di avere un allineamento delle fibre nella direzione di rotazione del collettore. In entrambi i casi le membrane appaiono porose e complessivamente omogenee, anche se confrontate con le matrici di solo collagene è possibile osservare la presenza di qualche difetto (*beads*). È apprezzabile, inoltre, una riduzione nelle dimensioni dei diametri delle fibre con valori nel range dei 90-100 nm per entrambe le tipologie di matrici. Ciò può essere ricondotto alla variazione dei parametri di processo utilizzati durante gli esperimenti. Come dimostrano i dati in tabella 10 al fine di raggiungere la stabilità del flusso e poter elettrospinnare le soluzioni è stato necessario diminuire il valore di flusso a 100 $\mu\text{L/h}$, mantenendo dei voltaggi elevati (fino a 25 kV). Tali parametri risultano differenti rispetto a quelli utilizzati per l'elettrofilatura della soluzione 20% NCOL in 40%AA, per la quale era stato impostato un flusso pari a 300 $\mu\text{L/h}$ e tensioni variabili tra i 21-22kV. Queste variazioni di parametri, specialmente di flusso, hanno portato alla realizzazione di matrici aventi uno spessore inferiore rispetto a quello ottenuto per le matrici di solo collagene per la quale era stato calcolato uno spessore di circa 100 μm . Al contrario, come visibile in figura 47 C, per le matrici COLL/CS 95/5 in 40% AA ottenute su collettore piano è stato misurato uno spessore pari a 40 μm , valore inferiore alla metà di quello delle matrici di solo collagene. In aggiunta, così come per le matrici precedentemente realizzate su collettore rotante, le 3 ore di electrospinning per gli scaffold allineati sono risultate insufficienti per ottenere dei prodotti separabili dal supporto in alluminio.

Lo spessore è risultato particolarmente influente nella corretta riuscita del protocollo di reticolazione. Le membrane COLL/CS 95/5, realizzate tramite 3 ore di electrospinning sono state infatti sottoposte a reticolazione chimica tramite EDC/NHS seguendo lo stesso protocollo utilizzato per le matrici di solo collagene. Tuttavia, non è stato possibile ottenere dei campioni utili per le caratterizzazioni in quanto troppo sottili per poter essere separati dal supporto di alluminio.

I risultati morfologici ottenuti hanno comunque confermato l'effettiva processabilità delle soluzioni contenenti chitosano per la realizzazione di membrane dalla caratteristica struttura nanofibrosa ricercata per le applicazioni di ingegneria tissutale. Rimangono tuttavia da ottimizzare i parametri di processo e di lavorazione delle membrane per poter ottenere dei campioni dalle dimensioni e caratteristiche adeguate.

4. CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI

L'ingegneria tissutale è un ramo della medicina rigenerativa che ormai da anni si propone di investigare nuove strategie e materiali innovativi per la rigenerazione di tessuti danneggiati. Tale necessità nasce dall'esigenza di soluzioni alternative o complementari alle più comuni pratiche cliniche nella rigenerazione di diversi tessuti, tra cui quello cutaneo. L'elevata incidenza delle patologie correlate a questo tessuto, tra cui ulcere acute o croniche, ha portato la ricerca a concentrarsi sulla sintesi di nuovi biomateriali biomimetici e bioattivi in grado di favorire la rigenerazione di tessuti epiteliali e connettivi in seguito a lesioni o condizioni patologiche. La fabbricazione di sostituti ingegnerizzati per *wound dressing* è emersa come una strategia determinante per un corretto e accelerato processo di guarigione delle ferite. Tuttavia, le caratteristiche dei materiali e dei dispositivi finali utilizzati nella rigenerazione di ferite cutanee sono multiple, in quanto è necessario sempre garantire una buona biocompatibilità, protezione dei tessuti da infezioni batteriche, ma anche capacità di assorbimento degli essudati e mantenimento di un adeguato grado di umidità nel letto della ferita. La realizzazione di tali sostituti richiede un'accurata valutazione non solo dei materiali ma anche della tecnica di lavorazione di quest'ultimi.

In questo scenario sistemi a base di collagene di tipo I fabbricati tramite tecniche di elettrofilatura hanno dimostrato essere la combinazione più promettente per mimare le caratteristiche composizionali e nano-strutturali della matrice extracellulare (ECM) dei principali tessuti, tra cui la cute. La scelta di tale tecnica per la realizzazione di sostituti ingegnerizzati della cute è dovuta ai numerosi vantaggi offerti dall'elettrofilatura. Tra questi, la potenziale scalabilità, in cui il processo può essere condotto in un laboratorio o scalato per una produzione su larga scala a seguito di alcune modifiche [176]. Tuttavia, la lavorazione di diversi biopolimeri, tra cui il collagene, con questa tecnica ha spesso dimostrato diversi punti critici e limitazioni dovuti all'uso di solventi tossici e aggressivi sfruttati per garantire l'elevata processabilità dei sistemi, che al contrario, possono compromettere le proprietà fisico-chimiche dei materiali e la loro finale citocompatibilità.

Sulla base delle precedenti considerazioni, l'obiettivo di questo lavoro di tesi è stato quello di valutare la processabilità di soluzioni di collagene di tipo I in acido acetico tramite tecniche di elettrofilatura per la fabbricazione di scaffold nanofibrosi in grado di mimare al meglio la morfologia della matrice extracellulare dei principali componenti della cute, creando un potenziale strumento a supporto delle diverse fasi di rigenerazione cutanea.

Inizialmente, una soluzione di acido acetico al 40% è stata utilizzata per sciogliere alte concentrazioni di collagene di tipo I (20% in peso) e ottenere un sistema finale in grado di essere lavorato mediante

elettrofilatura. Nello specifico la processabilità di tale soluzione è stata valutata ottimizzando i parametri di elettrofilatura, quali flusso, tensione applicata e distanza emettitore-collettore, e valutando l'uso di diversi collettori (piano e cilindrico rotante), in modo da ottenere membrane omogenee, nanofibrose e con diverse morfologie. I risultati ottenuti dalle caratterizzazioni morfologiche relative all'elettrofilatura su collettore piano hanno evidenziato la possibilità di ottenere scaffold caratterizzati da una struttura nanofibrosa, omogenea e priva di difetti con spessori pari a circa 100 μm , con fibre orientate in modo casuale e aventi diametri nel range dei 100-120 nm, per tutti i parametri impostati.

Inoltre, l'utilizzo del collettore cilindrico rotante ha dimostrato la possibilità di realizzare matrici nanofibrose aventi una morfologia definita, mostrando un incremento dell'allineamento delle fibre dipendente dalla velocità di rotazione del collettore. Anche in questo caso è stato possibile ottenere delle matrici omogenee, prive di difetti, con fibre aventi diametri nel range dei 90-150 nm, e maggiore allineamento per velocità di rotazioni pari a 2000 rpm. Tuttavia, analizzando e confrontando gli spessori delle matrici realizzate utilizzando le diverse tipologie di collettore è emerso che il collettore cilindrico rotante ha portato alla realizzazione di matrici dallo spessore eccessivamente ridotto. Una ulteriore ottimizzazione del processo si rende dunque necessaria per permettere la realizzazione di matrici sufficientemente spesse tramite questo tipo di collettore. Studi futuri potrebbero quindi valutare l'uso di collettori rotanti aventi un diametro inferiore in modo da ridurre la superficie di deposizione.

L'elettrofilatura dei sistemi a base di collagene ha così evidenziato il promettente vantaggio di replicare la nano- e micro-architettura della matrice extracellulare dei principali componenti del tessuto cutaneo, caratterizzata da fibre di collagene di tipo I aventi dimensioni nel range dei 50- 300 nm [156]. Le membrane realizzate risultano quindi candidati ideali per fornire un supporto temporaneo nella fase di rigenerazione cutanea che si verifica in seguito ad una lesione, imitando la naturale struttura dell'ECM danneggiata. Ciononostante, essendo ben nota la scarsa resistenza di sistemi a base di collagene elettrofilati, con l'obiettivo di garantire una migliore stabilità dei costrutti finali, sono stati valutati gli effetti di due diverse tipologie di reticolazione del materiale: una chimica tramite l'uso di una soluzione contenente i reticolanti EDC /NHS, e una fisica tramite l'uso di un fotoiniziatore citocompatibile (Rosa Bengala) sensibile a radiazioni nello spettro visibile.

I risultati ottenuti dalle diverse caratterizzazioni effettuate in seguito alla reticolazione chimica dei sistemi 20%NCOL in 40%AA, hanno confermato le potenzialità delle cabodiimididi nel migliorare la stabilità e la resistenza a degradazione finale dei sistemi elettrofilati senza alterare eccessivamente la morfologia delle membrane e allo stesso tempo la struttura nativa della proteina. Tale reticolazione

ha infatti permesso non solo di mantenere la struttura nanofibrosa e porosità tipica delle matrici elettrofilate, ma anche di ottenere degli scaffold con una migliore stabilità come dimostrato dai test di degradazione termica e idrolitica eseguiti. Nonostante i buoni risultati evidenziati dall'utilizzo delle carbodiimidi per la reticolazione delle membrane a base di collagene, diversi studi riportano che l'efficienza di questa reticolazione chimica sia limitata, in aggiunta ad opinioni contrastanti riguardo alla finale citocompatibilità dei costrutti [86].

Per migliorare e incrementare le proprietà e la resistenza dei costrutti a base di collagene è stato valutato un secondo metodo di reticolazione creando dei sistemi a base di collagene contenenti rosa bengala per consentire la fotoreticolazione degli scaffold. Il fotoiniziatore è stato incorporato con successo nelle soluzioni di collagene come dimostrato dalle analisi reologiche del sistema 20%NCOL + 0,1%RB in 40%AA per la quale è emerso un valore di viscosità simile a quello dei sistemi di solo collagene. Utilizzando i parametri di processo precedentemente ottimizzati per le soluzioni 20%NCOL in 40%AA, le matrici ottenute hanno evidenziato una morfologia omogenea e priva di difetti, con fibre aventi diametri nel range dei 100-120 nm sia nel caso delle matrici con orientamento casuale, che nel caso delle matrici allineate. Per quest'ultime sono stati inoltre riscontrati gli stessi problemi di spessore precedentemente evidenziati per le matrici realizzate su collettore cilindrico rotante, riscontrando dunque la necessità di un'ottimizzazione del processo.

Le matrici così realizzate sono state sottoposte a fotoreticolazione eseguendo un iniziale step d'incubazione in soluzione di etanolo puro, e irraggiando poi le diverse membrane tramite una lampada emittente nella banda del visibile (400-700 nm) con diverse tempistiche di esposizione.

I risultati ottenuti dalle diverse caratterizzazioni effettuate hanno dimostrato l'effettiva efficacia del fotoiniziatore nel generare legami tra le molecole di collagene del sistema se sottoposto a irraggiamento. In particolare, i test relativi al calcolo delle ammine libere (tramite TNBS) hanno riportato per il sistema reticolato per 30 min un'efficienza di reticolazione pari al 70%, superiore quindi a quella riscontrata per la reticolazione tramite EDC/NHS (62%), risultato ulteriormente confermato dal test di degradazione *in vitro*. I dati relativi alla fotoreticolazione hanno dunque suggerito la facilità con la quale si possa effettivamente migliorare la stabilità e le proprietà dei costrutti finali utilizzando degli strumenti relativamente semplici quale una lampada a emissione nella banda del visibile, che ha permesso di ottenere degli scaffold con una resistenza e stabilità in ambiente acquoso superiore a quella riscontrata nelle matrici reticolate chimicamente. Tuttavia, tra le limitazioni constatate vi è la perdita quasi totale della morfologia fibrosa rilevata per qualsiasi tempistica di irraggiamento. Questa osservazione porta alla necessità di un'ottimizzazione

complessiva del processo, valutando l'utilizzo di diversi strumenti per l'irraggiamento e diverse condizioni per l'incubazione pre-reticolazione, come solventi alternativi o differenti temperature.

Inoltre, per investigare e confrontare ulteriormente gli effetti delle due tecniche di reticolazione utilizzate sulle proprietà meccaniche dei costrutti finali, sono attualmente in corso in collaborazione con l'Università di Pavia dei test meccanici a trazione sugli scaffold 20%NCOL in 40%AA-EDC/NHS e 20%NCOL +0,1%RB in 40%AA fotoreticolati per 30 min.

Come riportato in diversi studi in letteratura, il solo trattamento di reticolazione può non essere sufficiente per garantire adeguate proprietà meccaniche e stabilità alle matrici di collagene. Di conseguenza è stata inoltre valutata la combinazione di collagene e chitosano per ottenere delle matrici maggiormente resistenti e funzionali. In seguito all'ottimizzazione della formulazione contenente un 1% totale in peso di chitosano, sono state realizzate delle matrici nanofibrose tramite elettrofilatura. La diversa viscosità della soluzione, confermata dalle analisi reologiche, ha portato all'utilizzo di parametri di processo diversi se confrontati con quelli impostati con le soluzioni di solo collagene. In particolare, l'utilizzo di flussi bassi, pari a 100 $\mu\text{L/h}$ per il raggiungimento della stabilità del flusso ha influenzato notevolmente lo spessore finale delle matrici, pari circa a 45 μm , valore eccessivamente ridotto per poter effettuare degli ulteriori trattamenti sulle membrane. I risultati morfologici ottenuti hanno comunque confermato l'effettiva processabilità delle soluzioni contenenti chitosano per la realizzazione di membrane dalla caratteristica struttura nanofibrosa, omogenee e prive di difetti, aventi diametri inferiori ai 120 nm e con allineamento marcato nel caso dell'utilizzo del collettore cilindrico rotante. Rimangono tuttavia da ottimizzare i parametri di processo e di lavorazione delle membrane per poter ottenere dei campioni dalle dimensioni e caratteristiche adeguate.

Questi risultati suggeriscono che i materiali realizzati ed i processi utilizzati permettono di ottenere scaffold biomimetici, sfruttabili per la rigenerazione del tessuto cutaneo grazie all'eccellente capacità dei costrutti elettrofilati di mimare la naturale architettura dell'ECM. È inoltre risultato evidente come un trattamento di post reticolazione permetta di produrre degli scaffold stabili in ambiente acquoso.

Di conseguenza, studi futuri, potrebbero testare diverse combinazioni di polimeri per migliorare ulteriormente la processabilità dei sistemi a base di collagene. Inoltre, vista la necessità di realizzare costrutti in grado di favorire la rivascolarizzazione del tessuto lesso per accelerare il processo di guarigione delle ferite, potrebbero essere testate diverse tipologie di funzionalizzazione delle membrane elettrofilate con fattori di crescita quali VEGF, HGF e PDGF, sfruttando la grande area superficiale caratteristica delle nanostrutture realizzate.

5. BIBLIOGRAFIA

- [1] Sheean, “Electrospun Silk Biomaterial Scaffolds for Regenerative Medicine,” *Bone*, vol. 23, no. 1, pp. 1–7, 2013, doi: 10.1016/j.addr.2009.07.005.Electrospun.
- [2] C. Review, N. I. Into, and C. Proliferation, “Tissue Engineering and Regenerative Medicine T ISSUE E NGINEERING AND R EGENERATIVE M EDICINE Concise Review : New Insights Into the Role of Macrophages in b -Cell Proliferation,” vol. 1, pp. 655–658, 2015.
- [3] Y. Ikada, “Challenges in tissue engineering,” *J. R. Soc. Interface*, vol. 3, no. 10, pp. 589–601, 2006, doi: 10.1098/rsif.2006.0124.
- [4] A. Atala, “Tissue engineering for the replacement of organ function in the genitourinary system,” *Am. J. Transplant.*, vol. 4, no. SUPPL. 6, pp. 58–73, 2004, doi: 10.1111/j.1600-6135.2004.0346.x.
- [5] J. P. Vacanti and R. Langer, “Tissue engineering: The design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation,” *Lancet*, vol. 354, no. SUPPL.1, pp. 32–34, 1999, doi: 10.1016/s0140-6736(99)90247-7.
- [6] C. J. Koh and A. Atala, “Tissue Engineering, Stem Cells, and Cloning: Opportunities for Regenerative Medicine,” *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 15, no. 5, pp. 1113–1125, 2004, doi: 10.1097/01.ASN.0000119683.59068.F0.
- [7] N. Almouemen, H. M. Kelly, and C. O’Leary, “Tissue Engineering: Understanding the Role of Biomaterials and Biophysical Forces on Cell Functionality Through Computational and Structural Biotechnology Analytical Methods,” *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, vol. 17, pp. 591–598, 2019, doi: 10.1016/j.csbj.2019.04.008.
- [8] F. J. O’Brien, “Biomaterials & scaffolds for tissue engineering,” *Mater. Today*, vol. 14, no. 3, pp. 88–95, 2011, doi: 10.1016/S1369-7021(11)70058-X.
- [9] D. W. Hutmacher, “Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage,” *Biomater. Silver Jubil. Compend.*, vol. 21, pp. 175–189, 2000, doi: 10.1016/B978-008045154-1.50021-6.
- [10] S. Dermienoudis and Y. F. Missirlis, “Bioreactors in tissue engineering,” *Adv. Eng. Mater.*, vol. 12, no. 11, 2010, doi: 10.1002/adem.201080018.
- [11] T. N. Vo, F. K. Kasper, and A. G. Mikos, “Strategies for controlled delivery of growth

- factors and cells for bone regeneration,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 64, no. 12, pp. 1292–1309, 2012, doi: 10.1016/j.addr.2012.01.016.
- [12] W. L. Murphy, T. C. McDevitt, and A. J. Engler, “Materials as stem cell regulators,” *Nat. Mater.*, vol. 13, no. 6, pp. 547–557, 2014, doi: 10.1038/nmat3937.
- [13] D. J. Weiss *et al.*, “Stem cells and cell therapies in lung biology and lung diseases,” *Proc. Am. Thorac. Soc.*, vol. 8, no. 3, pp. 223–272, 2011, doi: 10.1513/pats.201012-071DW.
- [14] R. Jochen, C. Kaps, G. R. Burmester, and M. Sittinger, “Stem cells for regenerative medicine: Advances in the engineering of tissues and organs,” *Naturwissenschaften*, vol. 89, no. 8, pp. 338–351, 2002, doi: 10.1007/s00114-002-0344-9.
- [15] A. R. Boccaccini, I. Notingher, V. Maquet, and R. Jérôme, “Bioresorbable and bioactive composite materials based on polylactide foams filled with and coated by Bioglass® particles for tissue engineering applications,” *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 14, no. 5, pp. 443–450, 2003, doi: 10.1023/A:1023266902662.
- [16] C. Moffatt and C. Lindholm, “Documento di Posizionamento. Ferite di difficile guarigione : un approccio olistico,” *Eur. Wound Manag. Assoc.*, pp. 1–19, 2008, [Online]. Available: <http://ewma.org/english/publications/position-documents/all-documents.html>.
- [17] T. A. Mustoe, K. O’Shaughnessy, and O. Kloeters, “Chronic wound pathogenesis and current treatment strategies: A unifying hypothesis,” *Plast. Reconstr. Surg.*, vol. 117, no. 7 SUPPL., pp. 35–41, 2006, doi: 10.1097/01.prs.0000225431.63010.1b.
- [18] A. Markova and E. N. Mostow, “US Skin Disease Assessment: Ulcer and Wound Care,” *Dermatol. Clin.*, vol. 30, no. 1, pp. 107–111, Jan. 2012, doi: 10.1016/J.DET.2011.08.005.
- [19] J. F. Guest *et al.*, “Health economic burden that wounds impose on the National Health Service in the UK,” *BMJ Open*, vol. 5, no. 12, pp. 1–8, 2015, doi: 10.1136/bmjopen-2015-009283.
- [20] J. F. Guest *et al.*, “Health economic burden that different wound types impose on the UK’s National Health Service,” *Int. Wound J.*, vol. 14, no. 2, pp. 322–330, 2017, doi: 10.1111/iwj.12603.
- [21] L. Sedi, “Associazione Italiana Ulcere Cutanee,” pp. 2006–2008, 2006.
- [22] J. Ho, C. Walsh, D. Yue, A. Dardik, and U. Cheema, “Current Advancements and Strategies in Tissue Engineering for Wound Healing: A Comprehensive Review,” *Adv. wound care*,

vol. 6, no. 6, pp. 191–209, 2017, doi: 10.1089/wound.2016.0723.

- [23] A. J. Singer and R. A. Clark, “Cutaneous wound healing 1,” *N.Engl.J.Med.*, vol. 341, no. 0028-4793 (Print), pp. 738–746, 1999.
- [24] Y. Wu, L. Chen, P. G. Scott, and E. E. Tredget, “Mesenchymal Stem Cells Enhance Wound Healing Through Differentiation and Angiogenesis,” *Stem Cells*, vol. 25, no. 10, pp. 2648–2659, 2007, doi: 10.1634/stemcells.2007-0226.
- [25] M. Xue and C. J. Jackson, “Extracellular Matrix Reorganization During Wound Healing and Its Impact on Abnormal Scarring,” *Adv. Wound Care*, vol. 4, no. 3, pp. 119–136, 2015, doi: 10.1089/wound.2013.0485.
- [26] M. Serhan *et al.*, “Electrospinning of natural polymers for advanced responsive and adaptive wound care: towards dressings,” *AIChE Annu. Meet. Conf. Proc.*, vol. 2019-Novem, pp. 0–11, 2019, doi: 10.1039/x0xx00000x.
- [27] S. MacNeil, “Biomaterials for tissue engineering of skin,” *Mater. Today*, vol. 11, no. 5, pp. 26–35, 2008, doi: 10.1016/S1369-7021(08)70087-7.
- [28] P. A. J. Kolarsick, M. A. Kolarsick, and C. Goodwin, “Anatomy and Physiology of the Skin,” 2006.
- [29] M. Rahmati, J. J. Blaker, S. P. Lyngstadaas, J. F. Mano, and H. J. Haugen, “Designing multigradient biomaterials for skin regeneration,” *Mater. Today Adv.*, vol. 5, p. 100051, 2020, doi: 10.1016/j.mtadv.2019.100051.
- [30] A. K. Dabrowska *et al.*, “Materials used to simulate physical properties of human skin,” *Ski. Res. Technol.*, vol. 22, no. 1, pp. 3–14, 2016, doi: 10.1111/srt.12235.
- [31] L. P. Guérin *et al.*, *The human tissue-engineered cornea (HTEC): Recent progress*, vol. 22, no. 3. 2021.
- [32] F. Ungaro *et al.*, “Functional structure and composition of the extracellular matrix,” *Top. Tissue Eng.*, vol. 200, no. 4, pp. 423–428, 2003, doi: 10.1002/path.1437.
- [33] A. D. Theocharis, S. S. Skandalis, C. Gialeli, and N. K. Karamanos, “Extracellular matrix structure,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 97, pp. 4–27, 2016, doi: 10.1016/j.addr.2015.11.001.
- [34] S. P. Miguel *et al.*, “An overview of electrospun membranes loaded with bioactive molecules for improving the wound healing process,” *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 139, no. March, pp. 1–22, 2019, doi: 10.1016/j.ejpb.2019.03.010.

- [35] A. Memic, T. Abudula, H. S. Mohammed, K. Joshi Navare, T. Colombani, and S. A. Bencherif, "Latest Progress in Electrospun Nanofibers for Wound Healing Applications," *ACS Appl. Bio Mater.*, vol. 2, no. 3, pp. 952–969, 2019, doi: 10.1021/acsabm.8b00637.
- [36] S. Zhang *et al.*, "Electrospun fibrous mat based on silver (I) metal-organic frameworks-poly(lactic acid) for bacterial killing and antibiotic-free wound dressing," *Chem. Eng. J.*, vol. 390, no. January, p. 124523, 2020, doi: 10.1016/j.cej.2020.124523.
- [37] R. Augustine *et al.*, "Electrospun chitosan membranes containing bioactive and therapeutic agents for enhanced wound healing," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 156, pp. 153–170, 2020, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.03.207.
- [38] Y. Dong *et al.*, "Electrospun Nanofibrous Materials for Wound Healing," *Adv. Fiber Mater.*, vol. 2, no. 4, pp. 212–227, 2020, doi: 10.1007/s42765-020-00034-y.
- [39] J. Qu, X. Zhao, Y. Liang, Y. Xu, P. X. Ma, and B. Guo, "Degradable conductive injectable hydrogels as novel antibacterial, anti-oxidant wound dressings for wound healing," *Chem. Eng. J.*, vol. 362, no. December 2018, pp. 548–560, 2019, doi: 10.1016/j.cej.2019.01.028.
- [40] D. Kong *et al.*, "Adhesion loss mechanism based on carboxymethyl cellulose-filled hydrocolloid dressings in physiological wounds environment," *Carbohydr. Polym.*, vol. 235, no. January, p. 115953, 2020, doi: 10.1016/j.carbpol.2020.115953.
- [41] K. Zhang *et al.*, "Layered nanofiber sponge with an improved capacity for promoting blood coagulation and wound healing," *Biomaterials*, vol. 204, no. March, pp. 70–79, 2019, doi: 10.1016/j.biomaterials.2019.03.008.
- [42] S. W. Choi, Y. Zhang, and Y. Xia, "Three-dimensional scaffolds for tissue engineering: The importance of uniformity in pore size and structure," *Langmuir*, vol. 26, no. 24, pp. 19001–19006, 2010, doi: 10.1021/la104206h.
- [43] D. F. Williams, "On the mechanisms of biocompatibility," *Biomaterials*, vol. 29, no. 20, pp. 2941–2953, 2008, doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.04.023.
- [44] K. F. Leong, C. K. Chua, N. Sudarmadji, and W. Y. Yeong, "Engineering functionally graded tissue engineering scaffolds," *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, vol. 1, no. 2, pp. 140–152, 2008, doi: 10.1016/j.jmbbm.2007.11.002.
- [45] T. J. Sill and H. A. von Recum, "Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering," *Biomaterials*, vol. 29, no. 13, pp. 1989–2006, 2008, doi:

10.1016/j.biomaterials.2008.01.011.

- [46] G. D. Nicodemus and S. J. Bryant, "Cell encapsulation in biodegradable hydrogels for tissue engineering applications," *Tissue Eng. - Part B Rev.*, vol. 14, no. 2, pp. 149–165, 2008, doi: 10.1089/ten.teb.2007.0332.
- [47] B. P. Chan and K. W. Leong, "Scaffolding in tissue engineering: General approaches and tissue-specific considerations," *Eur. Spine J.*, vol. 17, no. SUPPL. 4, 2008, doi: 10.1007/s00586-008-0745-3.
- [48] N. Annabi *et al.*, "Controlling the porosity and microarchitecture of hydrogels for tissue engineering," *Tissue Eng. - Part B Rev.*, vol. 16, no. 4, pp. 371–383, 2010, doi: 10.1089/ten.teb.2009.0639.
- [49] S. C. Owen and M. S. Shoichet, "Design of three-dimensional biomimetic scaffolds," *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 94, no. 4, pp. 1321–1331, 2010, doi: 10.1002/jbm.a.32834.
- [50] V. Karageorgiou and D. Kaplan, "Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis," *Biomaterials*, vol. 26, no. 27, pp. 5474–5491, 2005, doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.02.002.
- [51] J. Malda *et al.*, "The effect of PEGT/PBT scaffold architecture on oxygen gradients in tissue engineered cartilaginous constructs," *Biomaterials*, vol. 25, no. 26, pp. 5773–5780, 2004, doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.01.028.
- [52] M. Singh, C. P. Morris, R. J. Ellis, M. S. Detamore, and C. Berklund, "Microsphere-based seamless scaffolds containing macroscopic gradients of encapsulated factors for tissue engineering," *Tissue Eng. - Part C Methods*, vol. 14, no. 4, pp. 299–309, 2008, doi: 10.1089/ten.tec.2008.0167.
- [53] P. Nitti *et al.*, "Influence of nanofiber orientation on morphological and mechanical properties of electrospun chitosan mats," *J. Healthc. Eng.*, vol. 2018, 2018, doi: 10.1155/2018/3651480.
- [54] H. Geckil, F. Xu, X. Zhang, S. Moon, and U. Demirci, "Engineering hydrogels as extracellular matrix mimics. Geckil, H., Xu, F., Zhang, X., Moon, S., & Demirci, U. (2010). Engineering hydrogels as extracellular matrix mimics. *Nanomedicine (London, England)*, 5(3), 469–84. <http://doi.org/10.2217/nmm.10.12>," *Nanomedicine (Lond.)*, vol. 5, no. 3, pp. 469–84, 2010, doi: 10.2217/nmm.10.12.Engineering.

- [55] X. Zhu, W. Cui, X. Li, and Y. Jin, "Electrospun fibrous mats with high porosity as potential scaffolds for skin tissue engineering," *Biomacromolecules*, vol. 9, no. 7, pp. 1795–1801, 2008, doi: 10.1021/bm800476u.
- [56] T. L. Yang, "Chitin-based materials in tissue engineering: Applications in soft tissue and epithelial organ," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 12, no. 3, pp. 1936–1963, 2011, doi: 10.3390/ijms12031936.
- [57] M. Uzun, S. C. Anand, and T. Shah, "In Vitro Characterisation and Evaluation of Different Types of Wound Dressing Materials," *J. Biomed. Eng. Technol.*, vol. 1, no. 1, pp. 1–7, 2013, doi: 10.12691/jbet-1-1-1.
- [58] S. Nazarnezhad, F. Baino, H. W. Kim, T. J. Webster, and S. Kargozar, *Electrospun nanofibers for improved angiogenesis: Promises for tissue engineering applications*, vol. 10, no. 8. 2020.
- [59] J. Rouwkema and A. Khademhosseini, "Vascularization and Angiogenesis in Tissue Engineering: Beyond Creating Static Networks," *Trends Biotechnol.*, vol. 34, no. 9, pp. 733–745, 2016, doi: 10.1016/j.tibtech.2016.03.002.
- [60] 2011 Xuefeng Chen, et al, "Hierarchical Fabrication of Engineered Vascularized Bone Biphasic Constructs via Dual 3D Bioprinting: Integrating Regional Bioactive Factors into Architectural Design," *Physiol. Behav.*, vol. 176, no. 10, pp. 139–148, 2011, doi: 10.1002/adhm.201600505.Hierarchical.
- [61] L. Wu *et al.*, "Hierarchical micro/nanofibrous membranes of sustained releasing VEGF for periosteal regeneration," *Biomaterials*, vol. 227, no. July 2019, p. 119555, 2020, doi: 10.1016/j.biomaterials.2019.119555.
- [62] H. J. Lai *et al.*, "Tailored design of electrospun composite nanofibers with staged release of multiple angiogenic growth factors for chronic wound healing," *Acta Biomater.*, vol. 10, no. 10, pp. 4156–4166, 2014, doi: 10.1016/j.actbio.2014.05.001.
- [63] Y. Zhang, T. L. Chwee, S. Ramakrishna, and Z. M. Huang, "Recent development of polymer nanofibers for biomedical and biotechnological applications," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 16, no. 10, pp. 933–946, 2005, doi: 10.1007/s10856-005-4428-x.
- [64] F. Pires *et al.*, "Polycaprolactone/Gelatin Nanofiber Membranes Containing EGCG-Loaded Liposomes and Their Potential Use for Skin Regeneration," *ACS Appl. Bio Mater.*, vol. 2, no. 11, pp. 4790–4800, 2019, doi: 10.1021/acsabm.9b00524.

- [65] A. Gide, *NanoScience in Biomedicine*. 1967.
- [66] M. Abrigo, S. L. McArthur, and P. Kingshott, “Electrospun nanofibers as dressings for chronic wound care: Advances, challenges, and future prospects,” *Macromol. Biosci.*, vol. 14, no. 6, pp. 772–792, 2014, doi: 10.1002/mabi.201300561.
- [67] N. G. Rim, C. S. Shin, and H. Shin, “Current approaches to electrospun nanofibers for tissue engineering,” *Biomed. Mater.*, vol. 8, no. 1, 2013, doi: 10.1088/1748-6041/8/1/014102.
- [68] G. D. Mogoşanu and A. M. Grumezescu, “Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing,” *Int. J. Pharm.*, vol. 463, no. 2, pp. 127–136, 2014, doi: 10.1016/j.ijpharm.2013.12.015.
- [69] S. Hooshmand *et al.*, “Mesoporous Silica Nanoparticles and Mesoporous Bioactive Glasses for Wound Management: From Skin Regeneration to Cancer Therapy,” *Materials (Basel)*, vol. 14, no. 12, p. 3337, 2021, doi: 10.3390/ma14123337.
- [70] F. M. Chen and X. Liu, “Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering,” *Prog. Polym. Sci.*, vol. 53, pp. 86–168, 2016, doi: 10.1016/j.progpolymsci.2015.02.004.
- [71] G. Ramar, “Principles of Tissue Engineering Second Edition.”
- [72] P. A. Gunatillake, R. Adhikari, and N. Gadegaard, “Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering,” *Eur. Cells Mater.*, vol. 5, pp. 1–16, 2003, doi: 10.22203/eCM.v005a01.
- [73] S. Hofmann and M. Garcia-Fuentes, “Bioactive Scaffolds for the Controlled Formation of Complex Skeletal Tissues,” *Regen. Med. Tissue Eng. - Cells Biomater.*, no. August, pp. 2014–2017, 2011, doi: 10.5772/22061.
- [74] K. Kaushik, R. B. Sharma, and S. Agarwal, “Natural polymers and their applications,” *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, vol. 37, no. 2, pp. 30–36, 2016.
- [75] J. F. Mano *et al.*, “Natural origin biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine: Present status and some moving trends,” *J. R. Soc. Interface*, vol. 4, no. 17, pp. 999–1030, 2007, doi: 10.1098/rsif.2007.0220.
- [76] S. Chattopadhyay and R. T. Raines, “Review collagen-based biomaterials for wound healing,” *Biopolymers*, vol. 101, no. 8, pp. 821–833, 2014, doi: 10.1002/bip.22486.
- [77] S. Ricard-Blum, “The Collagen Family,” *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 3, no. 1, pp. 1–19, 2011, doi: 10.1101/cshperspect.a004978.

- [78] R. Parenteau-Bareil, R. Gauvin, and F. Berthod, “Collagen-based biomaterials for tissue engineering applications,” *Materials (Basel)*, vol. 3, no. 3, pp. 1863–1887, 2010, doi: 10.3390/ma3031863.
- [79] T. Walimbe and A. Panitch, “Best of Both Hydrogel Worlds : Harnessing Bioactivity and Tunability by Incorporating Glycosaminoglycans in Collagen Hydrogels,” 2020.
- [80] R. P. Boot-Handford and D. S. Tuckwell, “Fibrillar collagen: The key to vertebrate evolution? A tale of molecular incest,” *BioEssays*, vol. 25, no. 2, pp. 142–151, 2003, doi: 10.1002/bies.10230.
- [81] K. E. Kadler, D. F. Holmes, J. A. Trotter, and J. A. Chapman, “Review Article: Collagen fibril formation Karl,” *Biochem. J.*, vol. 11, pp. 1–11, 1996.
- [82] A. S. Halim, T. L. Khoo, and S. J. Shah, “Biologic and synthetic skin substitutes: An overview,” *Indian J. Plast. Surg.*, vol. 43, no. 1 SUPPL. 1, 2010, doi: 10.4103/0970-0358.70712.
- [83] L. Gu, T. Shan, Y. xuan Ma, F. R. Tay, and L. Niu, “Novel Biomedical Applications of Crosslinked Collagen,” *Trends Biotechnol.*, vol. 37, no. 5, pp. 464–491, 2019, doi: 10.1016/j.tibtech.2018.10.007.
- [84] A. Manuscript, “Strategies for Directing the Structure and Function of 3D Collagen Biomaterials across Length Scales Brandan,” vol. 10, no. 4, pp. 734–764, 2015, doi: 10.1016/j.actbio.2013.08.038.Strategies.
- [85] K. Adamiak and A. Sionkowska, “Current methods of collagen cross-linking: Review,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 161, pp. 550–560, 2020, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.06.075.
- [86] G. M. Cunniffe and F. J. O’Brien, “Collagen scaffolds for orthopedic regenerative medicine,” *Jom*, vol. 63, no. 4, pp. 66–73, 2011, doi: 10.1007/s11837-011-0061-y.
- [87] L. M. Nong *et al.*, “The effect of different cross-linking conditions of EDC/NHS on type II collagen scaffolds: an in vitro evaluation,” *Cell Tissue Bank.*, vol. 20, no. 4, pp. 557–568, 2019, doi: 10.1007/s10561-019-09790-7.
- [88] J. Kozłowska and A. Sionkowska, “Effects of different crosslinking methods on the properties of collagen-calcium phosphate composite materials,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 74, pp. 397–403, 2015, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2014.12.023.
- [89] Š. Rýglová, M. Braun, and T. Suchý, “Collagen and Its Modifications—Crucial Aspects with

- Concern to Its Processing and Analysis,” *Macromol. Mater. Eng.*, vol. 302, no. 6, 2017, doi: 10.1002/mame.201600460.
- [90] K. Nam, T. Kimura, and A. Kishida, “Controlling coupling reaction of EDC and NHS for preparation of collagen gels using ethanol/water co-solvents,” *Macromol. Biosci.*, vol. 8, no. 1, pp. 32–37, 2008, doi: 10.1002/mabi.200700206.
- [91] P. Crosslinking, R. W. Redmond, and I. E. Kochevar, “Special Issue Invited Review Medical Applications of Rose Bengal- and Ribo fl avin-Photosensitized,” pp. 1097–1115, 2019, doi: 10.1111/php.13126.
- [92] M. J. Barton, J. W. Morley, M. A. Stoodley, A. Lauto, and D. A. Mahns, “Nerve repair : toward a sutureless approach,” pp. 585–595, 2014, doi: 10.1007/s10143-014-0559-1.
- [93] S. Tsao *et al.*, “Light-activated tissue bonding for excisional wound closure : a split-lesion clinical trial,” pp. 555–563, 2012, doi: 10.1111/j.1365-2133.2011.10710.x.
- [94] X. F. Zhang, J. Zhang, and L. Liu, “Fluorescence properties of twenty fluorescein derivatives: Lifetime, quantum yield, absorption and emission spectra,” *J. Fluoresc.*, vol. 24, no. 3, pp. 819–826, 2014, doi: 10.1007/s10895-014-1356-5.
- [95] A. Lauto, D. Mawad, M. Barton, S. C. Piller, and L. Longo, “Chitosan adhesive films for photochemical tissue bonding,” *AIP Conf. Proc.*, vol. 1364, pp. 87–93, 2011, doi: 10.1063/1.3626916.
- [96] D. Cherfan *et al.*, “Collagen cross-linking using rose bengal and green light to increase corneal stiffness,” *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 54, no. 5, pp. 3426–3433, 2013, doi: 10.1167/iovs.12-11509.
- [97] M. Ark, P. H. Cosman, P. Boughton, and C. R. Dunstan, “Review: Photochemical Tissue Bonding (PTB) methods for sutureless tissue adhesion,” *Int. J. Adhes. Adhes.*, vol. 71, pp. 87–98, 2016, doi: 10.1016/j.ijadhadh.2016.08.006.
- [98] T. O. F. Contents, “Development of a Rapid, Light-activated Peripheral Nerve Repair Technology,” *Britannica*, pp. 1–19, 2019, doi: 10.1055/s-0035-1571247.FIGURE.
- [99] B. P. Chan and K. F. So, “Photochemical crosslinking improves the physicochemical properties of collagen scaffolds,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 75, no. 3, pp. 689–701, 2005, doi: 10.1002/jbm.a.30469.
- [100] M. J. Davies, “Reactive species formed on proteins exposed to singlet oxygen,” *Photochem.*

Photobiol. Sci., vol. 3, no. 1, pp. 17–25, 2004, doi: 10.1039/b307576c.

- [101] D. Simões, S. P. Miguel, M. P. Ribeiro, P. Coutinho, A. G. Mendonça, and I. J. Correia, “Recent advances on antimicrobial wound dressing: A review,” *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 127, no. December 2017, pp. 130–141, 2018, doi: 10.1016/j.ejpb.2018.02.022.
- [102] B. P. Antunes, A. F. Moreira, V. M. Gaspar, and I. J. Correia, “Chitosan/arginine-chitosan polymer blends for assembly of nanofibrous membranes for wound regeneration,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 130, pp. 104–112, 2015, doi: 10.1016/j.carbpol.2015.04.072.
- [103] A. Ghosh, Ramagopal, Bonanno, Brenowitz, “Photocrosslinkable chitosan based hydrogels for neural tissue engineering,” *Physiol. Behav.*, vol. 176, no. 10, pp. 139–148, 2018, doi: 10.1039/c1sm06629c.Photocrosslinkable.
- [104] K. Hermans *et al.*, “Development and characterization of mucoadhesive chitosan films for ophthalmic delivery of cyclosporine A,” *Int. J. Pharm.*, vol. 472, no. 1–2, pp. 10–19, 2014, doi: 10.1016/j.ijpharm.2014.06.017.
- [105] T. T. T. Nguyen, O. H. Chung, and J. S. Park, “Coaxial electrospun poly(lactic acid)/chitosan (core/shell) composite nanofibers and their antibacterial activity,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 86, no. 4, pp. 1799–1806, 2011, doi: 10.1016/j.carbpol.2011.07.014.
- [106] V. Zargar, M. Asghari, and A. Dashti, “A Review on Chitin and Chitosan Polymers: Structure, Chemistry, Solubility, Derivatives, and Applications,” *ChemBioEng Rev.*, vol. 2, no. 3, pp. 204–226, 2015, doi: 10.1002/cben.201400025.
- [107] S. V. Madihally and H. W. T. Matthew, “Porous chitosan scaffolds for tissue engineering,” *Biomaterials*, vol. 20, no. 12, pp. 1133–1142, 1999, doi: 10.1016/S0142-9612(99)00011-3.
- [108] J. P. Chen, G. Y. Chang, and J. K. Chen, “Electrospun collagen/chitosan nanofibrous membrane as wound dressing,” *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 313–314, pp. 183–188, 2008, doi: 10.1016/j.colsurfa.2007.04.129.
- [109] S. G. Kumbar, R. James, S. P. Nukavarapu, and C. T. Laurencin, “Electrospun nanofiber scaffolds: Engineering soft tissues,” *Biomed. Mater.*, vol. 3, no. 3, 2008, doi: 10.1088/1748-6041/3/3/034002.
- [110] E. H. Lim, J. P. Sardinha, and S. Myers, “Nanotechnology biomimetic cartilage regenerative scaffolds,” *Arch. Plast. Surg.*, vol. 41, no. 3, pp. 231–240, 2014, doi: 10.5999/aps.2014.41.3.231.

- [111] Z. M. Huang, Y. Z. Zhang, M. Kotaki, and S. Ramakrishna, "A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites," *Compos. Sci. Technol.*, vol. 63, no. 15, pp. 2223–2253, 2003, doi: 10.1016/S0266-3538(03)00178-7.
- [112] W. J. Morton, "Method of dispersing fluids," *US Pat. 705, 691*, vol. 28, no. 2, pp. 131–134, 1902.
- [113] K. P. Feltz, E. A. Growney Kalaf, C. Chen, R. S. Martin, and S. A. Sell, "A review of electrospinning manipulation techniques to direct fiber deposition and maximize pore size," *Electrospinning*, vol. 2, no. 1, pp. 46–61, 2017, doi: 10.1515/esp-2017-0002.
- [114] J. Xue, T. Wu, Y. Dai, Y. Xia, U. States, and U. States, "Electrospinning and Electrospun Nanofibers: Methods, Materials, and Applications," vol. 119, no. 8, pp. 5298–5415, 2019, doi: 10.1021/acs.chemrev.8b00593.Electrospinning.
- [115] P. Y. X. Dr. Jingwei Xie, "Electrospinning: An Enabling Technique for Nanostructured Materials."
- [116] D. Liang, B. S. Hsiao, and B. Chu, "Functional electrospun nanofibrous scaffolds for biomedical applications," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 59, no. 14, pp. 1392–1412, 2007, doi: 10.1016/j.addr.2007.04.021.
- [117] B. D. Walters and J. P. Stegemann, "Strategies for directing the structure and function of three-dimensional collagen biomaterials across length scales," *Acta Biomater.*, vol. 10, no. 4, pp. 1488–1501, 2014, doi: 10.1016/j.actbio.2013.08.038.
- [118] J. D. Schiffman and C. L. Schauer, "A review: Electrospinning of biopolymer nanofibers and their applications," *Polym. Rev.*, vol. 48, no. 2, pp. 317–352, 2008, doi: 10.1080/15583720802022182.
- [119] Y. Zhou, H. Yao, J. Wang, D. Wang, Q. Liu, and Z. Li, "Greener synthesis of electrospun collagen/ hydroxyapatite composite fibers with an excellent microstructure for bone tissue engineering," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 10, pp. 3203–3215, 2015, doi: 10.2147/IJN.S79241.
- [120] F. E. Ahmed, B. S. Lalia, and R. Hashaikeh, "A review on electrospinning for membrane fabrication: Challenges and applications," *Desalination*, vol. 356, pp. 15–30, 2015, doi: 10.1016/j.desal.2014.09.033.
- [121] A. Haider, S. Haider, and I. K. Kang, "A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and

- biotechnology,” *Arab. J. Chem.*, vol. 11, no. 8, pp. 1165–1188, 2018, doi: 10.1016/j.arabjc.2015.11.015.
- [122] D. Lukáš *et al.*, “Beaded nanofibers formed during electrospinning,” *Text. Prog.*, vol. 40, no. May, pp. 01–140, 2009.
- [123] J. S. Knutson, “Functional Electrospun Nanofibrous Scaffolds for Biomedical Applications,” *Bone*, vol. 23, no. 1, pp. 1–7, 2014, doi: 10.1016/j.addr.2007.04.021.Functional.
- [124] W. Yu *et al.*, “Sciatic nerve regeneration in rats by a promising electrospun collagen/poly(ϵ -caprolactone) nerve conduit with tailored degradation rate,” *BMC Neurosci.*, vol. 12, 2011, doi: 10.1186/1471-2202-12-68.
- [125] P. S. R. Dan Kai, Guorui Jin, Molamma P. Prabhakaran, “Electrospun synthetic and natural nanofibers for regenerative medicine and stem cells.”
- [126] S. J. Liu, Y. C. Kau, C. Y. Chou, J. K. Chen, R. C. Wu, and W. L. Yeh, “Electrospun PLGA/collagen nanofibrous membrane as early-stage wound dressing,” *J. Memb. Sci.*, vol. 355, no. 1–2, pp. 53–59, 2010, doi: 10.1016/j.memsci.2010.03.012.
- [127] R. Ahmed *et al.*, “Novel electrospun chitosan/polyvinyl alcohol/zinc oxide nanofibrous mats with antibacterial and antioxidant properties for diabetic wound healing,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 120, pp. 385–393, 2018, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.08.057.
- [128] S.-Q. K. S. O. D. T. Hagop Kantarjian Guillermo Garcia-Manero Hui Yang, “The Effect of Fiber Alignment and Heparin Coating on Cell Infiltration into Nanofibrous PLLA Scaffolds,” *Bone*, vol. 23, no. 1, pp. 1–7, 2005, doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.01.062.The.
- [129] K. S. Rho *et al.*, “Electrospinning of collagen nanofibers: Effects on the behavior of normal human keratinocytes and early-stage wound healing,” *Biomaterials*, vol. 27, no. 8, pp. 1452–1461, 2006, doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.08.004.
- [130] G. Montalbano, C. Tomasina, S. Fiorilli, S. Camarero-Espinosa, C. Vitale-Brovarone, and L. Moroni, “Biomimetic scaffolds obtained by electrospinning of collagen-based materials: Strategies to hinder the protein denaturation,” *Materials (Basel)*, vol. 14, no. 16, 2021, doi: 10.3390/ma14164360.
- [131] T. Liu, W. K. Teng, B. P. Chan, and S. Y. Chew, “Photochemical crosslinked electrospun collagen nanofibers: Synthesis, characterization and neural stem cell interactions,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 95, no. 1, pp. 276–282, 2010, doi: 10.1002/jbm.a.32831.

- [132] H. Y. Lin, Y. J. Kuo, S. H. Chang, and T. S. Ni, “Characterization of electrospun nanofiber matrices made of collagen blends as potential skin substitutes,” *Biomed. Mater.*, vol. 8, no. 2, 2013, doi: 10.1088/1748-6041/8/2/025009.
- [133] L. Chen *et al.*, “A human-like collagen/chitosan electrospun nanofibrous scaffold from aqueous solution: Electrospun mechanism and biocompatibility,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 99 A, no. 3, pp. 395–409, 2011, doi: 10.1002/jbm.a.33202.
- [134] Z. G. Chen, P. W. Wang, B. Wei, X. M. Mo, and F. Z. Cui, “Electrospun collagen-chitosan nanofiber: A biomimetic extracellular matrix for endothelial cell and smooth muscle cell,” *Acta Biomater.*, vol. 6, no. 2, pp. 372–382, 2010, doi: 10.1016/j.actbio.2009.07.024.
- [135] D. Liesch, “A Basic Introduction to Rheology Shear Flow,” *J Biomech*, vol. 35, no. 4, pp. 415–435, 2016, [Online]. Available: <https://cdn.technologynetworks.com/TN/Resources/PDF/WP160620BasicIntroRheology.pdf>.
- [136] C. Riedel, A. Alegria, J. Colmenero, and P. Tordjém, “Polymer Rheology by Dielectric Spectroscopy,” *Rheology*, 2012, doi: 10.5772/35145.
- [137] N. Ribeiro, S. R. Sousa, C. A. Van Blitterswijk, L. Moroni, and F. J. Monteiro, “A biocomposite of collagen nanofibers and nanohydroxyapatite for bone regeneration,” *Biofabrication*, vol. 6, no. 3, 2014, doi: 10.1088/1758-5082/6/3/035015.
- [138] R. Holmes, X. Bin Yang, A. Dunne, L. Florea, D. Wood, and G. Tronci, “Thiol-ene photo-click collagen-PEG hydrogels: Impact of water-soluble photoinitiators on cell viability, gelation kinetics and rheological properties,” *Polymers (Basel)*, vol. 9, no. 6, 2017, doi: 10.3390/polym9060226.
- [139] S. Torres-giner, J. V Gimeno-alcan, M. J. Ocio, and J. M. Lagaron, “Comparative Performance of Electrospun Collagen Nanofibers Cross-linked by Means of,” vol. 1, no. 1, 2009, doi: 10.1021/am800063x.
- [140] J. Ratanavaraporn, R. Rangkupan, H. Jeeratawatchai, S. Kanokpanont, and S. Damrongsakkul, “Influences of physical and chemical crosslinking techniques on electrospun type A and B gelatin fiber mats,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 47, no. 4, pp. 431–438, 2010, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2010.06.008.
- [141] W. Zhou, R. Apkarian, Z. L. Wang, and D. Joy, “Fundamentals of scanning electron microscopy (SEM),” *Scanning Microsc. Nanotechnol. Tech. Appl.*, pp. 1–40, 2007, doi: 10.1007/978-0-387-39620-0_1.

- [142] "<https://www.microbiologiaitalia.it/microscopia/il-microscopio-elettronico/>."
- [143] "https://www.mt.com/it/it/home/products/L1_AutochemProducts/ReactIR/attenuated-total-reflectance-atr.html."
- [144] K. M. Allen, E. N. Coker, N. Auyeung, and J. F. Klausner, "Cobalt ferrite in YSZ for use as reactive material in solar thermochemical water and carbon dioxide splitting, Part I: Material characterization," *Jom*, vol. 65, no. 12, pp. 1670–1681, 2013, doi: 10.1007/s11837-013-0704-2.
- [145] P. Stagnaro, G. Luciano, and R. Utzeri, "La calorimetria differenziale a scansione e l'analisi termogravimetrica nella caratterizzazione termica dei materiali polimerici," pp. 73–98.
- [146] S. Loganathan, R. B. Valapa, R. Mishra, and G. Pugazhenti, *Thermogravimetry Analysis for Characterization of Nanomaterials*, no. May. 2017.
- [147] M. Salehi, M. Naseri-Nosar, M. Azami, S. J. Nodooshan, and J. Arish, "Comparative study of poly(L-lactic acid) scaffolds coated with chitosan nanoparticles prepared via ultrasonication and ionic gelation techniques," *Tissue Eng. Regen. Med.*, vol. 13, no. 5, pp. 498–506, 2016, doi: 10.1007/s13770-016-9083-4.
- [148] D. I. Zeugolis *et al.*, "Electro-spinning of pure collagen nano-fibres - Just an expensive way to make gelatin?," *Biomaterials*, vol. 29, no. 15, pp. 2293–2305, 2008, doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.02.009.
- [149] B. Dong, O. Arnoult, M. E. Smith, and G. E. Wnek, "Electrospinning of collagen nanofiber scaffolds from benign solvents," *Macromol. Rapid Commun.*, vol. 30, no. 7, pp. 539–542, 2009, doi: 10.1002/marc.200800634.
- [150] A. Fiorani *et al.*, "Comparative performance of collagen nanofibers electrospun from different solvents and stabilized by different crosslinkers," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 25, no. 10, pp. 2313–2321, 2014, doi: 10.1007/s10856-014-5196-2.
- [151] R. R. A, J. P. A, P. K. A, S. B. A, M. B.-R. B, and J. Krist, "The role of rheology of polymer solutions in predicting nanofiberformation by electrospinning." .
- [152] R. M. Nezarati, M. B. Eifert, and E. Cosgriff-Hernandez, "Effects of humidity and solution viscosity on electrospun fiber morphology," *Tissue Eng. - Part C Methods*, vol. 19, no. 10, pp. 810–819, 2013, doi: 10.1089/ten.tec.2012.0671.
- [153] X. Ren *et al.*, "An aligned porous electrospun fibrous membrane with controlled drug

delivery – An efficient strategy to accelerate diabetic wound healing with improved angiogenesis,” *Acta Biomater.*, vol. 70, pp. 140–153, Apr. 2018, doi: 10.1016/J.ACTBIO.2018.02.010.

- [154] R. Anitha, D. Vaikkath, S. J. Shenoy, and P. D. Nair, “Tissue-engineered islet-like cell clusters generated from adipose tissue-derived stem cells on three-dimensional electrospun scaffolds can reverse diabetes in an experimental rat model and the role of porosity of scaffolds on cluster differentiation,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 108, no. 3, pp. 749–759, 2020, doi: 10.1002/jbm.a.36854.
- [155] K. Mubyana, R. A. Koppes, K. L. Lee, J. A. Cooper, and D. T. Corr, “The influence of specimen thickness and alignment on the material and failure properties of electrospun polycaprolactone nanofiber mats,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 104, no. 11, pp. 2794–2800, 2016, doi: 10.1002/jbm.a.35821.
- [156] L. E. Tracy, R. A. Minasian, and E. J. Caterson, “Extracellular Matrix and Dermal Fibroblast Function in the Healing Wound,” vol. 5, no. 3, pp. 119–136, 2016, doi: 10.1089/wound.2014.0561.
- [157] H. Nam, Y. Hong, M. Sung, S. Min, and K. Suh, “Biomaterials Effect of orientation and density of nanotopography in dermal wound healing,” *Biomaterials*, vol. 33, no. 34, pp. 8782–8792, 2012, doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.08.038.
- [158] X. Ren *et al.*, “An aligned porous electrospun fibrous membrane with controlled drug delivery – An efficient strategy to accelerate diabetic wound healing with improved angiogenesis,” vol. 70, pp. 140–153, 2018, doi: 10.1016/j.actbio.2018.02.010.
- [159] L. Arinze, “An Investigation of Common Cross-linking Agents on the Stability of Electrospun Collagen Scaffolds,” vol. 1982, no. 973, 1982.
- [160] P. Angele *et al.*, “Influence of different collagen species on physico-chemical properties of crosslinked collagen matrices,” *Biomaterials*, vol. 25, no. 14, pp. 2831–2841, 2004, doi: 10.1016/j.biomaterials.2003.09.066.
- [161] C. E. Campiglio, S. Ponzini, P. De Stefano, G. Ortoleva, L. Vignati, and L. Draghi, “Cross-linking optimization for electrospun gelatin: Challenge of preserving fiber topography,” *Polymers (Basel)*, vol. 12, no. 11, pp. 1–15, 2020, doi: 10.3390/polym12112472.
- [162] I. Negut, G. Dorcioman, and V. Grumezescu, “Scaffolds for Wound Healing Applications,” 2020.

- [163] P. P. Bonvallet, B. K. Culpepper, J. L. Bain, M. J. Schultz, S. J. Thomas, and S. L. Bellis, “Microporous dermal-like electrospun scaffolds promote accelerated skin regeneration,” *Tissue Eng. - Part A*, vol. 20, no. 17–18, pp. 2434–2444, 2014, doi: 10.1089/ten.tea.2013.0645.
- [164] L. Salvatore *et al.*, “Potential of electrospun poly(3-hydroxybutyrate)/collagen blends for tissue engineering applications,” *J. Healthc. Eng.*, vol. 2018, 2018, doi: 10.1155/2018/6573947.
- [165] S. Lohrasbi, E. Mirzaei, A. Karimizade, S. Takallu, and A. Rezaei, “Collagen/cellulose nanofiber hydrogel scaffold: physical, mechanical and cell biocompatibility properties,” *Cellulose*, vol. 27, no. 2, pp. 927–940, 2020, doi: 10.1007/s10570-019-02841-y.
- [166] M. V. Jose, V. Thomas, D. R. Dean, and E. Nyairo, “Fabrication and characterization of aligned nanofibrous PLGA/Collagen blends as bone tissue scaffolds,” *Polymer (Guildf)*, vol. 50, no. 15, pp. 3778–3785, 2009, doi: 10.1016/j.polymer.2009.05.035.
- [167] N. O. Metreveli *et al.*, “UV-vis and FT-IR spectra of ultraviolet irradiated collagen in the presence of antioxidant ascorbic acid,” *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 73, no. 3, pp. 448–455, 2010, doi: 10.1016/j.ecoenv.2009.12.005.
- [168] B. De Campos Vidal and M. L. S. Mello, “Collagen type I amide I band infrared spectroscopy,” *Micron*, vol. 42, no. 3, pp. 283–289, 2011, doi: 10.1016/j.micron.2010.09.010.
- [169] M. Ahmad, S. Benjakul, and S. Nalinanon, “Compositional and physicochemical characteristics of acid solubilized collagen extracted from the skin of unicorn leatherjacket (*Aluterus monoceros*),” *Food Hydrocoll.*, vol. 24, no. 6–7, pp. 588–594, 2010, doi: 10.1016/j.foodhyd.2010.03.001.
- [170] D. V. Bax *et al.*, “Fundamental insight into the effect of carbodiimide crosslinking on cellular recognition of collagen-based scaffolds,” *Acta Biomater.*, vol. 49, pp. 218–234, 2017, doi: 10.1016/j.actbio.2016.11.059.
- [171] Y. Li, “Electrospun collagen fibers for tissue regeneration applications,” *Tissue Eng Regen Med.*, no. October, pp. 699–718., 2018, [Online]. Available: <https://ir.lib.uwo.ca/etd/5721>.
- [172] E. I. Alarcon, H. Poblete, H. G. Roh, J. F. Couture, J. Comer, and I. E. Kochevar, “Rose Bengal binding to collagen and tissue photobonding,” *ACS Omega*, vol. 2, no. 10, pp. 6646–6657, 2017, doi: 10.1021/acsomega.7b00675.

- [173] G. Montalbano *et al.*, “Development and biocompatibility of collagen-based composites enriched with nanoparticles of strontium containing mesoporous glass,” *Materials (Basel)*., vol. 12, no. 22, pp. 1–17, 2019, doi: 10.3390/ma12223719.
- [174] S. De Vrieze, P. Westbroek, T. Van Camp, and L. Van Langenhove, “Electrospinning of chitosan nanofibrous structures: Feasibility study,” *J. Mater. Sci.*, vol. 42, no. 19, pp. 8029–8034, 2007, doi: 10.1007/s10853-006-1485-6.
- [175] Y. Ye *et al.*, “Miscibility studies on the blends of collagen/chitosan by dilute solution viscometry,” *Eur. Polym. J.*, vol. 43, no. 5, pp. 2066–2071, 2007, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2006.10.024.
- [176] S. A. Sell, M. J. McClure, K. Garg, P. S. Wolfe, and G. L. Bowlin, “Electrospinning of collagen/biopolymers for regenerative medicine and cardiovascular tissue engineering,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 61, no. 12, pp. 1007–1019, 2009, doi: 10.1016/j.addr.2009.07.012.