

Politecnico di Torino

Tesi magistrale di Ingegneria Biomedica



**Politecnico
di Torino**

**Sviluppo e stampa 3D di una formulazione a base di
collagene, chitosano e fibroina della seta per potenziali
applicazioni nel settore della rigenerazione di lesioni
cutanee**

Relatrice

Prof.ssa Chiara Vitale Brovarone

Co-relatrici

Prof.ssa Sonia Fiorilli

Dott.ssa Giorgia Montalbano

Candidata

Laura Coviello

INDICE

INDICE	II
LISTA DELLE FIGURE	V
LISTA DELLE TABELLE	VII
ABSTRACT.....	1
1. INTRODUZIONE.....	3
1.1 Ingegneria tissutale	3
1.2 Rigenerazione di ferite cutanee: Wound Healing	7
1.3 Struttura dell'apparato tegumentario	10
1.3.1 Matrice extracellulare	13
1.4 Ingegnerizzazione di scaffold per rigenerazione cutanea	16
1.5 Biomateriali per rigenerazione del tessuto cutaneo	20
1.5.1 Materiali polimerici.....	22
1.5.2 Polimeri sintetici	22
1.5.3 Polimeri naturali.....	23
1.5.4 Collagene	24
1.5.5 Chitosano	26
1.5.6 Fibroina della seta	27
1.6 Fabbricazione di scaffold tramite tecnica di stampa 3D	28
1.6.1 La tecnica	29
1.6.2 Scaffold stampati per rigenerazione cutanea	33
2. MATERIALI E METODI.....	36
2.1 Preparazione delle formulazioni	36
2.1.1 Protocollo di preparazione della formulazione a base collagene, chitosano e fibroina della seta (Col/Chi/Fib).....	36

2.1.2	Protocollo di preparazione della formulazione polimerica fotoreticolabile (ColMA/Chi/Fib)	37
2.2	Strategie di reticolazione.....	38
2.2.1	Reticolazione tramite idrossido di sodio (NaOH).....	39
2.2.2	Fotoreticolazione tramite radiazione ultravioletta (UV).....	39
2.2.3	Reticolazione con genipina	40
2.3	Metodi di caratterizzazione	41
2.3.1	Analisi reologiche	41
2.3.2	Analisi morfologiche tramite microscopia a scansione elettronica (SEM).....	46
2.3.3	Analisi chimica mediante spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier in riflettanza totale attenuata (FTIR-ATR).....	47
2.4	Processo di stampa 3D	48
2.5	Test di degradazione in vitro.....	52
3.	RISULTATI E DISCUSSIONE.....	53
3.1	Sviluppo e stampa della formulazione a base collagene, chitosano e fibroina della seta (Col/Chi/Fib).....	53
3.1.1	Soluzioni di Collagene	55
3.1.2	Soluzioni di Chitosano	57
3.1.3	Miscela 4% Collagene e 5% Chitosano	58
3.1.4	Introduzione delle polveri di Fibroina della Seta.....	58
3.1.5	Stampa 3D della formulazione Col/Chi/Fib.....	60
3.1.6	Valutazione della soluzione reticolante a base di idrossido di sodio (NaOH).....	62
3.2	Sviluppo e stampa della formulazione fotoreticolabile a base collagene metacrilato, chitosano e fibroina della seta (ColMA/Chi/Fib).....	63
3.2.1	Introduzione del Collagene Metacrilato (ColMA).....	64
3.2.2	Introduzione del fotoiniziatore Irgacure 2959	64
3.2.3	Valutazione delle proprietà reologiche della formulazione ColMA/Chi/Fib.....	66

3.2.4 Analisi chimica mediante spettroscopia a infrarossi in riflettanza totale attenuata (FTIR-ATR)	67
3.2.5 Ottimizzazione del processo di stampa 3D	69
3.3 Reticolazione degli scaffold mediante trattamento in genipina	71
3.3.1 Valutazione proprietà viscoelastiche della formulazione ColMA/Chi/Fib.....	72
3.3.2 Analisi chimica mediante spettroscopia a infrarossi in riflettanza totale attenuata (FTIR-ATR)	73
3.3.3 Valutazione della fedeltà di stampa	74
3.3.4 Caratterizzazione morfologica degli scaffold mediante microscopia a scansione elettronica	75
3.3.5 Test di degradazione in vitro.....	77
3.3.6 Prove preliminari di stampa 3D di strutture complesse	78
4. CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI	80
BIBLIOGRAFIA	83

LISTA DELLE FIGURE

Figura 1: Schematizzazione degli elementi cardine dell'ingegneria tissutale [9].....	4
Figura 2: Schematizzazione della sequenza di passaggi dell'approccio ex vivo di ingegneria dei tessuti [12].....	6
Figura 3: Fattori che possono influenzare la complessità della ferita e la guarigione [5]	8
Figura 4: Rappresentazione delle fasi del processo di wound healing, con indicazione delle molecole implicate e la relativa linea temporale [19].....	9
Figura 5: Rappresentazione della struttura stratificata dell'apparato tegumentario [27].....	11
Figura 6: Rappresentazione schematica dei principali costituenti della matrice extracellulare [29].	13
Figura 7: Linea temporale dei sostituti cutanei usati in medicina [31].....	16
Figura 8: Evoluzione dei biomateriali [45].....	20
Figura 9: Struttura della molecola di collagene [52].....	25
Figura 10: Struttura chimica della chitina e del chitosano [54]	26
Figura 11: Diagramma schematico della struttura della fibroina della seta [55]	27
Figura 12: Rappresentazione schematica mediante la tecnica di 3D bioprinting di pelle ingegnerizzata [6].....	29
Figura 13: Rappresentazione schematica dei tre macro processi del 3D bioprinting, fino allo stadio finale di applicazione dei costrutti in vitro o in vivo [10].....	30
Figura 14: Diagrammi schematici degli approcci top-down e bottom-up [49].....	31
Figura 15: Rappresentazione schematica delle comuni tecnologie di bioprinting [62]	31
Figura 16: Schema di preparazione della formulazione Col/Chi/Fib	37
Figura 17: Schema di preparazione della formulazione ColMA/Chi/Fib.....	38
Figura 18: Struttura chimica dell'Irgacure 2959 [71].....	40
Figura 19: Diagramma schematico dell'azione della genipina [64].....	41
Figura 20: Geometrie dei reometri disponibili [76].....	42
Figura 21: Reometro rotazionale DHR-2.....	42
Figura 22: Equazione della viscosità [76].....	43
Figura 23: Equazione del modulo viscoelastico [76].....	43
Figura 24: Reometro rotazionale DHR-2 con montato l'accessorio per il trasferimento della radiazione UV	45
Figura 25: Schema generale di funzionamento di un SEM [77].....	47
Figura 26: Principio di funzionamento della tecnica ATR [78].....	48

Figura 27: BIOX (Cellink) con montata la testina a temperatura controllata per l'estrusione del materiale.....	49
Figura 28: BIOX (Cellink) con montata la testina a temperatura controllata per l'estrusione, la testina per fotopolimerizzazione per la reticolazione con UV	50
Figura 29: Immagine dei punti di riferimento della misura considerati per tutti gli scaffold valutati al termine della stampa e della fotopolimerizzazione, e dopo la reticolazione chimica.....	52
Figura 30: Rampa di flusso per le soluzioni al 2% e 4% di Col alla temperatura di 10°C	56
Figura 31: Rampa di flusso per le soluzioni al 4% e 5% di Chi alla temperatura di 10°C	57
Figura 32: Rampa di flusso per le miscele Col/Chi (1:1) e Col/Chi (2:1) alla temperatura di 10°C	58
Figura 33: Rampa di flusso per il mix Chi/Fib e la soluzione 5% Chi alla temperatura di 10°C	59
Figura 34: Confronto rampe di flusso per il Col/Chi/Fib, Col/Chi (2:1), Chi/Fib alla temperatura di 10°C	60
Figura 35: Prova di stampa preliminare della formulazione Col/Chi/Fib.....	61
Figura 36: (A) griglia al termine del processo di stampa sulla quale è stata spruzzata la soluzione 12% NaOH alla deposizione di ogni strato; (B) griglia dopo 5min dall'ulteriore spruzzo della soluzione 12% NaOH al termine della stampa.....	62
Figura 37: Immagine SEM dello scaffold reticolato mediante 12% NaOH	63
Figura 38: Rampa di flusso per le soluzioni al 4% di Col 4% di ColMA alla temperatura di 10°C	64
Figura 39: (A) Cinetiche di UV curing per ColMA/Chi/Fib, per un tempo di esposizione pari a 120s; (B) Cinetiche di UV curing per ColMA/Chi/Fib, per un tempo di esposizione pari a 420s.....	66
Figura 40: Rampa di flusso per le formulazioni Col/Chi/Fib e ColMA/Chi/Fib alla temperatura di 10°C	66
Figura 41: Peak Hold test a 10°C per ColMA/Chi/Fib	67
Figura 42: Spettri FTIR-ATR: ColMA, Chi, Fib e miscela ColMA/Chi/Fib	68
Figura 43: A) Modello CAD; Scaffold stampati e reticolati con torcia UV (B; C; D) reticolati con testina UV della BIOX (E)	70
Figura 44: Amplitude sweep test per campioni bulk di ColMA/Chi/Fib: A) Fotoreticolati per 420s con raggi UV; B) Fotoreticolati per 420s con raggi UV e incubati per 24h a 37°C in genipina	72
Figura 45: Temperature ramp test: A) campioni fotoreticolati; B) campioni fotoreticolati e incubati in genipina per 24h.....	73
Figura 46: Spettri FTIR-ATR: della formulazione ColMA/Chi/Fib pura, dopo il trattamento di fotopolimerizzazione con UV, e dopo il trattamento con UV e incubazione in genipina	74

Figura 47: Scaffold stampati, fotopolimerizzati con torcia (A; B; C) o con testina (D) e poi incubati in genipina.....	74
Figura 48: Immagini SEM: A) Struttura fotopolimerizzata con torcia UV e incubazione in GEN 500x; B) Struttura fotopolimerizzata con testina UV e incubazione in GEN 500x; C) Struttura B 1000x; D) Struttura A 2500x; E) Polveri di Fib 5000x; F) Struttura B 2500x.....	76
Figura 49: Immagini SEM della morfologia: A) superficie interna B) superficie esterna	77
Figura 50: Degradazione idrolitica degli scaffold stampati di ColMA/Chi/Fib reticolati mediante l'azione dei raggi UV e della genipina	77
Figura 51: Foto post liofilizzazione dei campioni sottoposti al test degradativo a diversi step temporali	78
Figura 52: Strutture complesse: A) Modello CAD; B) stampata, reticolata con torcia e genipina; C) stampata e reticolata con testina e genipina	79

LISTA DELLE TABELLE

Tabella 1: Principali molecole costituenti la matrice extracellulare della cute.....	14
Tabella 2: Prospetto sui materiali naturali, la loro sorgente e le principali caratteristiche [45]	24
Tabella 3: Confronto delle metodologie di stampa e dei loro parametri di lavoro [10], [62].....	32
Tabella 4: Indice delle prove reologiche.....	45
Tabella 5: Parametri di stampa ottimizzati	50
Tabella 6: Parametri di UV curing ottimizzati.....	51
Tabella 7: Valori di viscosità, per shear rate pari a $0,1s^{-1}$ e $1000s^{-1}$, delle soluzioni 2% e 4% di Col	56
Tabella 8: Valori di viscosità, per shear rate pari a $0,1s^{-1}$ e $1000s^{-1}$, delle soluzioni 4% e 5% di Chi	57
Tabella 9: Valori di viscosità, per shear rate pari a $0,1s^{-1}$ e $1000s^{-1}$, delle miscele Col/Chi (1:1) e Col/Chi (2:1)	58
Tabella 10: Valori di viscosità, per shear rate pari a $0,1s^{-1}$ e $1000s^{-1}$, del mix Chi/Fib e della soluzione 5% Chi.....	59
Tabella 11: Valori di viscosità, per shear rate pari a $0,1s^{-1}$ e $1000s^{-1}$, della formulazione Col/Chi/Fib; della miscela Col/Chi (2:1) e Chi/Fib	60
Tabella 12: Valori di viscosità, per shear rate pari a $0,1s^{-1}$ e $1000s^{-1}$, delle soluzioni al 4% di Col e 4% ColMA	64

Tabella 13: Valori di viscosità, per shear rate pari a $0,1s^{-1}$ e $1000s^{-1}$, delle formulazioni Col/Chi/Fib e ColMA/Chi/Fib	66
Tabella 14: Insieme di misure ottenute dalle analisi ImageJ per gli scaffold prodotti e reticolati con UV	71
Tabella 15: Insieme di misure ottenute dalle analisi ImageJ per gli scaffold prodotti, reticolati con UV e incubati in genipina	75
Tabella 16: Perdita di peso (%) degli scaffold incubati a 3 e 7 giorni.....	77

ABSTRACT

Ad oggi, il trattamento di lesioni tissutali prevede principalmente cure farmacologiche o interventi chirurgici, che tuttavia spesso falliscono nel ripristinare le normali funzioni del tessuto leso [1]. In questo scenario, l'ingegneria tissutale si propone di rigenerare i tessuti danneggiati, sfruttando la combinazione di elementi cardine quali cellule, scaffolds, e segnali biochimici [2]. In particolare, lo scaffold ha il ruolo di mimare la matrice extracellulare e guidare l'attività cellulare, riproducendo il più fedelmente possibile struttura, chimica e stimoli presenti nel tessuto nativo [1],[3]. Fondamentale risulta quindi lo sviluppo di materiali biocompatibili, bioattivi, biodegradabili e con proprietà meccaniche simili al tessuto nativo, in grado di rispondere alle esigenze biologiche e stimolare la rigenerazione [4]. Tra i vari settori, l'ingegneria tissutale trova ampia applicazione nel ripristino delle ferite cutanee, le quali rappresentano una condizione invalidante per il paziente oltre che ad un grande costo per il settore sanitario [5]. In questo ambito, l'obiettivo è quello di realizzare medicazioni e tessuti in grado di proteggere il letto della ferita da infezioni, assorbire gli essudati, ma soprattutto stimolare la rigenerazione di tessuto funzionale [6]. A questo scopo, il progetto di tesi presentato si propone di sviluppare un materiale innovativo, a base di polimeri naturali quali collagene, chitosano e fibroina della seta, processabile mediante tecniche di stampa 3D, al fine di realizzare delle strutture da impiegare durante il processo di rigenerazione delle ferite cutanee. Nella fase iniziale si sono studiate le caratteristiche dei singoli polimeri, al fine di definirne le opportune concentrazioni, e stabilire i rapporti volumetrici adatti ad ottenere un materiale composito processabile tramite stampa 3D ad estrusione. Sulla base degli studi reologici effettuati, è stata sviluppata una miscela (Col/Chi/Fib) successivamente processata tramite stampa 3D, valutando set-up e parametri di processo. In parallelo all'ottimizzazione del processo di stampa, si è lavorato allo sviluppo di strategie di reticolazione del materiale, al fine di ottenere uno scaffold caratterizzato da buona stabilità meccanica e termica, preservando la buona fedeltà di stampa ottenuta. Una prima strategia ha valutato l'azione di una soluzione di idrossido di sodio per stabilizzare gli strati stampati del materiale polimerico. A causa della scarsa fedeltà di stampa ottenuta e al parziale collasso della struttura, una seconda strategia ha investigato invece un processo di fotoreticolazione tramite radiazione UV. Per raggiungere tale obiettivo, la formulazione è stata modificata usando collagene metacrilato (ColMA) e aggiungendo un fotoiniziatore citocompatibile (Irgacure 2959). Questa seconda miscela (ColMA/Chi/Fib) è stata quindi studiata per realizzare degli scaffold tramite stampa 3D in combinazione alla fotoreticolazione strato per strato. Per garantire una maggiore rigidità e stabilità degli scaffolds, un bagno di genipina in etanolo è stato infine valutato come ulteriore strategia di

reticolazione a seguito della stampa. Ogni fase del processo ha previsto lo studio delle proprietà dei materiali e degli scaffolds sviluppati in termini di caratteristiche fisico-chimiche, proprietà reologiche, caratteristiche morfologiche e cinetiche degradative.

1. INTRODUZIONE

1.1 Ingegneria tissutale

È noto che organi e tessuti siano soggetti a danneggiamenti normalmente provocati da, lesioni traumatiche o patologie congenite di varia natura. Pertanto, uno degli obiettivi delle scienze mediche è quello di ricercare strategie per la loro sostituzione. Nel corso dei secoli la medicina, e più nello specifico la chirurgia, ha conseguito notevoli traguardi, come lo sviluppo di trattamenti farmaceutici mirati e la messa a punto di tecniche di trapianto, con lo scopo di ripristinare le funzionalità dei tessuti danneggiati [1]. In particolare, la procedura del trapianto, adoperata fin dalla seconda metà del secolo scorso, è stata rivoluzionaria ed ha introdotto notevoli miglioramenti nella vita dei pazienti. È possibile distinguere due tipologie di trapianto: *autograft* e *allograft*. La prima opzione, nota anche come autotrapianto e considerata un gold standard, consiste nel trapiantare in una zona lesa il tessuto prelevato, tramite biopsia dal paziente stesso, evitando problemi immunologici. Questa pratica tuttavia risulta essere costosa e dolorosa in quanto si danneggia una zona sana, oltre a considerare la limitata disponibilità di tessuto e la non perfetta rigenerazione date le differenze a livello anatomico e strutturale. La seconda opzione consiste invece nell'adoperare tessuto proveniente da donatore. Pur essendoci maggiore disponibilità di tessuto, si presenta il rischio di introdurre malattie ed infezioni, oltre all'obbligo da parte del paziente di seguire una terapia immunosoppressiva per il resto della vita. Ad oggi, la domanda di trapianti supera di gran lunga il numero di donatori disponibili. L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha stimato che solo il 10% di coloro che necessitano di un trapianto di organo ne riceve uno [1]. Sulla base delle osservazioni precedenti, risulta quindi necessario sviluppare tecniche innovative in grado di colmare il divario tra fabbisogno clinico e disponibilità di tessuti sani.

In questo scenario nasce la medicina rigenerativa, il cui obiettivo è quello di superare le sopracitate limitazioni tramite l'impiego e la combinazione di fattori quali il trapianto di cellule, la genetica, la scienza dei materiali e l'ingegneria, per lo sviluppo di sostituti biologici che possano sostituire o rigenerare le cellule, i tessuti e gli organi, in modo da ripristinare e mantenere le normali funzioni [2]. È conveniente distinguere due branche della medicina rigenerativa: la terapia cellulare e l'ingegneria tissutale [7].

Nel 1993, la comunità scientifica, ha definito l'ingegneria tissutale come “un campo interdisciplinare che applica i principi dell'ingegneria e delle scienze della vita per lo sviluppo di sostituti biologici per ripristinare, mantenere o migliorare le funzioni dei tessuti” [8]. Nonostante questa branca sia

relativamente recente, l'idea di sostituire i tessuti danneggiati risale già al XVI secolo, quando il professore Gasparo Tagliacozzi descrisse nel suo lavoro “*De Custorum Chirurgia per Isitionem*” la sostituzione di naso realizzata da un lembo dell'avambraccio [9]. Il fulcro di questa disciplina è quello di comprendere le relazioni strutturali e funzionali alla base della fisiologia dei tessuti sani e patologici per sviluppare dei sostituti. Per realizzare questi sostituti biologici gli elementi chiave sono principalmente tre (Figura 1): cellule, segnali regolatori e scaffold [1].

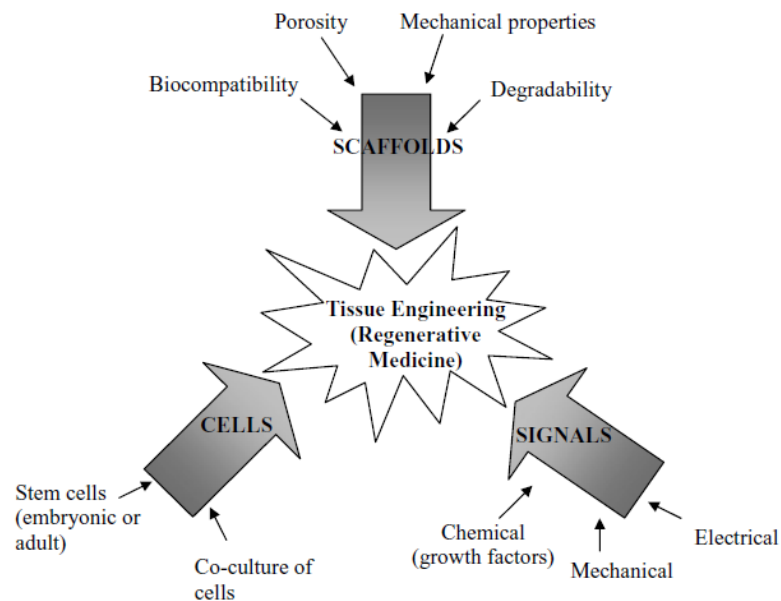


Figura 1: Schematizzazione degli elementi cardine dell'ingegneria tissutale [9]

Le cellule possono essere di differente tipologia a seconda dell'applicazione del costruito finale. Tra i numerosi tipi sono ampiamente adoperate le cellule staminali, data la capacità proliferativa pressoché illimitata e l'abilità a differenziarsi. Inoltre, le cellule si distinguono a seconda della sorgente, che può essere autologa, allogenica o eterologa. I segnali regolatori rivestono un importante impatto sull'attività cellulare e sulla risposta rigenerativa, ed includono fattori di crescita, molecole segnale, proteine strutturali, fattori angiogenici, citochine, ormoni, DNA, RNA e stimoli ambientali [10]. Lo scaffold ha il compito di mimare la matrice extracellulare (ECM) per fornire alle cellule supporto strutturale, morfologico e chimico [1]. Affinché possa svolgere al meglio il suo ruolo deve possedere una serie di caratteristiche quali:

- Tridimensionalità della struttura con porosità interconnesse, per favorire la crescita cellulare e lo scambio di nutrienti e sostanze di scarto;
- Biocompatibilità;
- Biodegradabilità;
- La superficie deve stimolare l'adesione, la proliferazione e il differenziamento cellulare;

- Proprietà meccaniche simili a quelle del tessuto nativo;
- Riproducibilità;
- Economicità;
- Scalabilità [1] [3].

Nello specifico, la scelta del biomateriale con il quale realizzare questa “impalcatura” rappresenta un aspetto critico poiché esso guida la formazione strutturale del tessuto ingegnerizzato, grazie anche alla possibilità di caricare segnali bioattivi per regolare le funzioni cellulari. I biomateriali a disposizione per la costruzione dello scaffold possono essere di origine naturale, sintetica oppure matrici decellularizzate. Mentre gli scaffold di origine naturale e le matrici decellularizzate sono maggiormente biocompatibili, gli scaffold sintetici risultano vantaggiosi in quanto consentono di avere maggior controllo sulle proprietà meccaniche, la microstruttura e la cinetica di degradazione [8].

L'ingegneria tissutale sfrutta principalmente due approcci per ottenere il sistema cellule-scaffold finale. La prima strategia, nota come pratica *ex vivo*, considera l'uso di un bioreattore, all'interno del quale viene inserito il costrutto per ottenere il tessuto ingegnerizzato *in vitro*. Questa pratica rappresenta un'opportunità commerciale poiché rende possibile la produzione in serie dei tessuti ingegnerizzati. Importante è ricordare che la fonte cellulare impiegata è di tipo allogeneico, quindi l'impiego di questi prodotti è limitato a casi speciali come la cura di ferite o malattie potenzialmente letali. La seconda strategia consiste nell'impiantare il costrutto tal quale per supportare una rigenerazione totalmente *in vivo*. A differenza della precedente, questa metodologia può essere sfruttata da un unico paziente, nonostante ciò la produzione in serie degli scaffold, da parte dell'industria biomedica, rappresenta una grande occasione di espansione commerciale [7].

I tessuti nativi differiscono per tipologia, contenuto ed organizzazione, in quanto formati da diversi tipi di cellule e componenti della matrice extracellulare. L'ingegneria tissutale ha come obiettivo la realizzazione di sostituti biologici in grado di mimare il tessuto nativo, perciò è necessaria una profonda comprensione degli effetti dei numerosi fattori che influenzano lo sviluppo dei tessuti. La sfida che si presenta è quella di ricreare la complessità dei tessuti, e per farlo è importante scegliere in modo oculato le cellule, il biomateriale, la struttura dello scaffold e il metodo di realizzazione. Considerando l'approccio *ex vivo*, dopo aver studiato il tessuto di interesse dal punto di vista anatomico e fisiologico, i passaggi da compiere comprendono (Figura 2):

- Scelta, isolamento e coltura delle cellule da impiegare;

- Scelta del biomateriale e realizzazione dello scaffold;
- Semina delle cellule sullo scaffold e coltura *in vitro*;
- Impianto *in vivo* del costruito cellule-scaffold [11] [12].

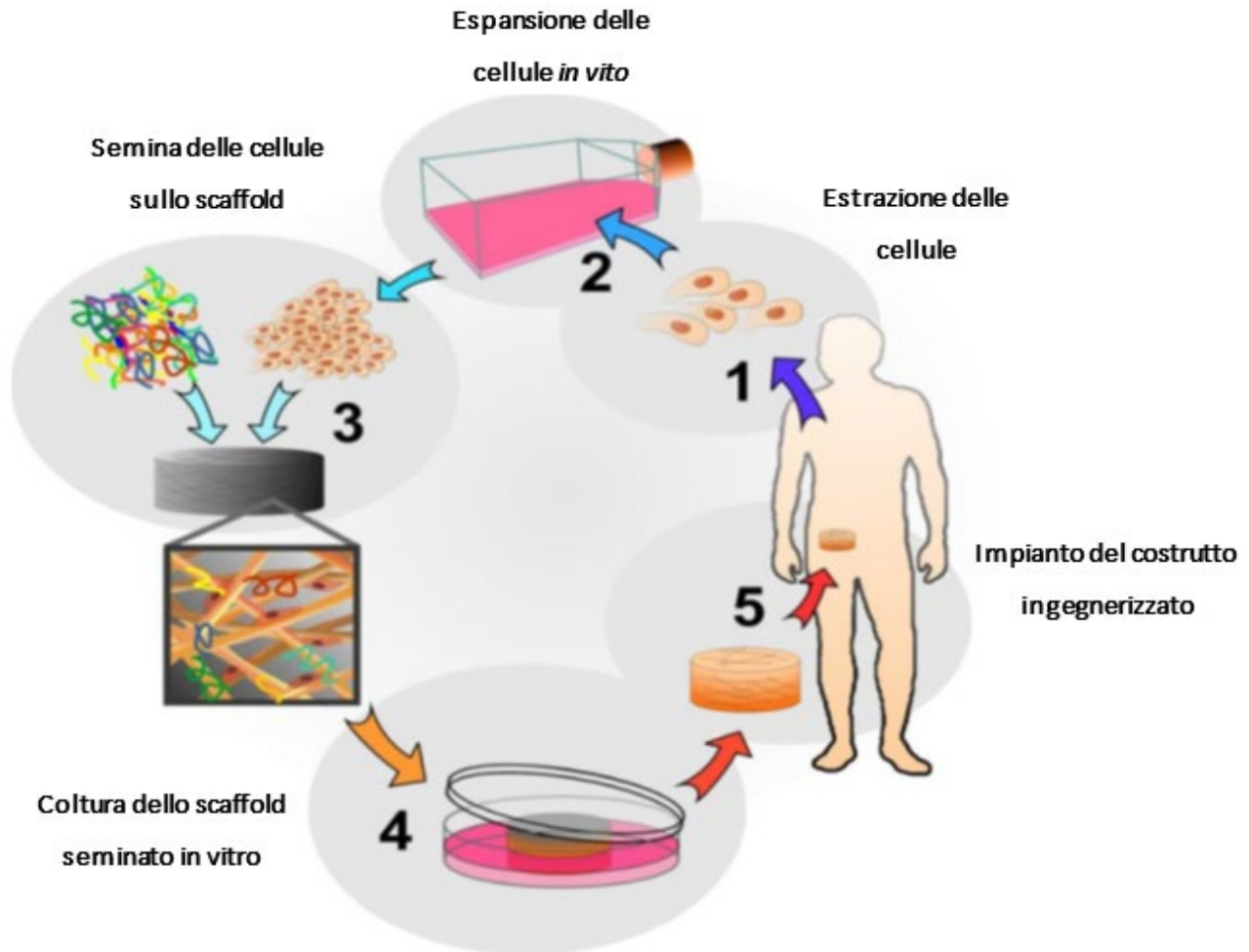


Figura 2: Schematizzazione della sequenza di passaggi dell'approccio *ex vivo* di ingegneria dei tessuti [12]

I requisiti che è indispensabile soddisfare, per garantire la sicurezza del costruito finale, sono:

- Controllo rigoroso sui materiali di partenza e sul protocollo di produzione;
- Scalabilità ad una dimensione clinicamente rilevante;
- Capacità di facilitare il processo di integrazione nell'ospite [13].

E' importante inoltre considerare il fatto che, affinché l'ingegneria dei tessuti soddisfi adeguatamente le richieste cliniche è fondamentale una stretta collaborazione con il personale sanitario [7].

Mentre la rigenerazione *in vitro* di organi come il fegato, il pancreas, l'intestino e il cuore richiede ancora molto studio, un più alto tasso di successo è stato ottenuto nella rigenerazione dei tessuti connettivi ed epiteliali. Ad oggi infatti, i costrutti che replicano la pelle, la vescica e l'osso hanno

riportato alcuni successi in diversi studi clinici [9]. Tuttavia, rigenerare significa ripristinare la normale struttura e funzione del tessuto, e gli attuali prodotti in commercio non soddisfano appieno tale definizione.

1.2 Rigenerazione di ferite cutanee: Wound Healing

Una ferita consiste nella distruzione dell'integrità anatomica e funzionale del tessuto interessato. Nelle ferite cutanee questo coinvolge l'epidermide e/o il derma, a seconda della profondità. Le cause possono essere esterne, come nel caso delle ustioni, oppure interne, come ad esempio le ulcere dovute al diabete [14]. È possibile distinguere due categorie di ferita:

- *Acuta*: segue il naturale processo riparativo, ripristinando l'anatomia e le funzionalità;
- *Cronica*: caratterizzata dalla combinazione di numerosi fattori deleteri che ostacolano il processo riparativo determinandone il fallimento [15].

Le ferite croniche o ulcere sono lesioni della pelle di durata superiore a 6 settimane o con frequenti recidive. Le eziologie più comuni delle ferite croniche comprendono le ulcere venose delle gambe, le ulcere da pressione, le ulcere del piede neuropatico diabetico e le ulcere delle gambe da insufficienza arteriosa [16]. Identificare e classificare le ferite permette di gestire in modo specifico i pazienti, inoltre grazie alla comprensione dei meccanismi alla base della guarigione delle lesioni della pelle è possibile prevedere la sequenza di eventi e stimare il tempo necessario [5]. Tuttavia, pur potendo categorizzare le ferite, queste sono caratterizzate da una combinazione di fattori che influisce sulla patogenesi e le aggrava [15]. Tali fattori possono essere raggruppati in quattro categorie (Figura 3):

- Fattori relativi al paziente;
- Fattori relativi alla ferita;
- Abilità e conoscenza dell'operatore sanitario;
- Risorse e fattori relativi al trattamento.

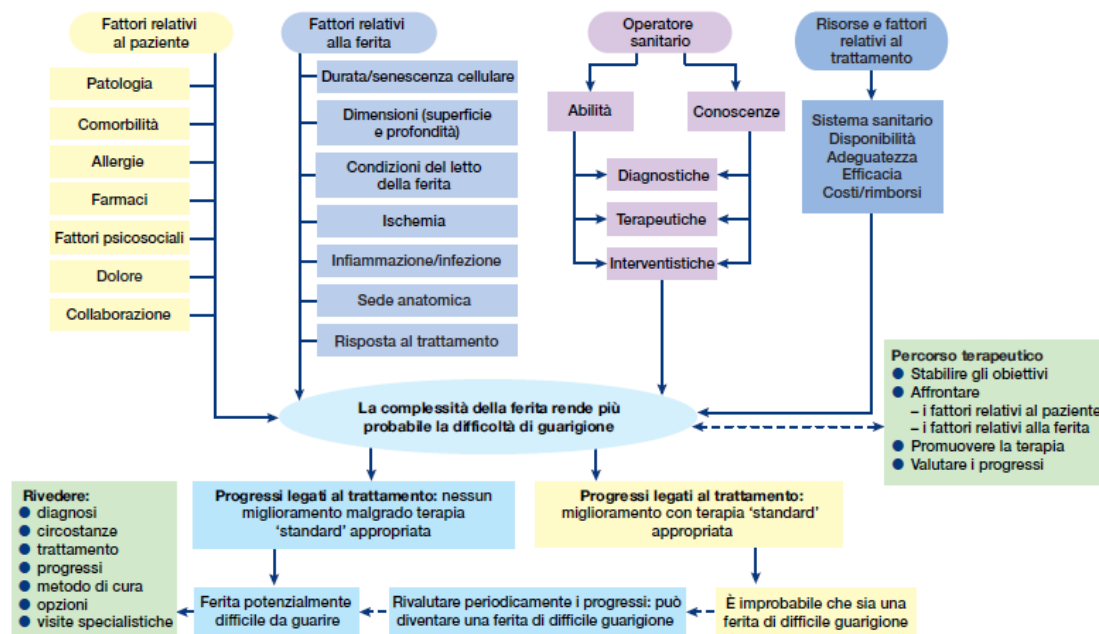


Figura 3: Fattori che possono influenzare la complessità della ferita e la guarigione [5]

Nonostante le conoscenze acquisite e l'avanzamento tecnologico nell'ambito della prevenzione e delle cure, le ferite croniche rappresentano una sfida per il personale sanitario e un'importante spesa nel bilancio dei sistemi sanitari nazionali [5]. Negli Stati Uniti, tenendo conto che i pazienti non sempre riescono ad accedere al sistema sanitario, è stato stimato che ogni anno l'assistenza sanitaria spende tra i 6 e 15 miliardi di dollari [16]. Nel Regno Unito, l'analisi del 2012/2013 basata su *The Health Improvement Network (THIN) Database*, ha stimato che i pazienti con lesione erano 2,2 milioni e che i costi ad essi associati erano di circa 5 miliardi di sterline. Inoltre, è stato messo in luce che il 61% delle ferite è andata incontro a guarigione spontanea, mentre il 39% non si è rimarginato correttamente, richiedendo una spesa di gestione pari a 3,3 miliardi di sterline, stimando una spesa del 135% superiore rispetto ai pazienti con rigenerazione spontanea [17]. In Europa circa 1,5% della popolazione è affetto da ulcere cutanee e questo richiede tra il 2% e il 4% del budget europeo [18]. In Italia, il Sistema Sanitario Nazionale è fortemente decentralizzato, e le decisioni in merito alle spese di gestione vengono prese a livello regionale. In dettaglio si stima che quasi 2 milioni di persone siano affette da lesioni cutanee e che i costi di gestione richiedano quasi il 4% del budget, circa 1 miliardo di euro all'anno per paziente [5]. La stima di questi costi è comunque al ribasso dato che vanno sommati i costi indiretti che comprendono: le spese sostenute dal paziente, la perdita di produttività e la riduzione della qualità della vita. Tuttavia, il crescente interesse della ricerca nei confronti di tali lesioni è dovuto soprattutto al fatto che esse sono di natura invalidante, dove il paziente si ritrova costretto a letto e spesso sono necessari ricoveri in ospedale prolungati. Nei casi più gravi invece si può arrivare fino all'amputazione della parte malata o addirittura al decesso [15].

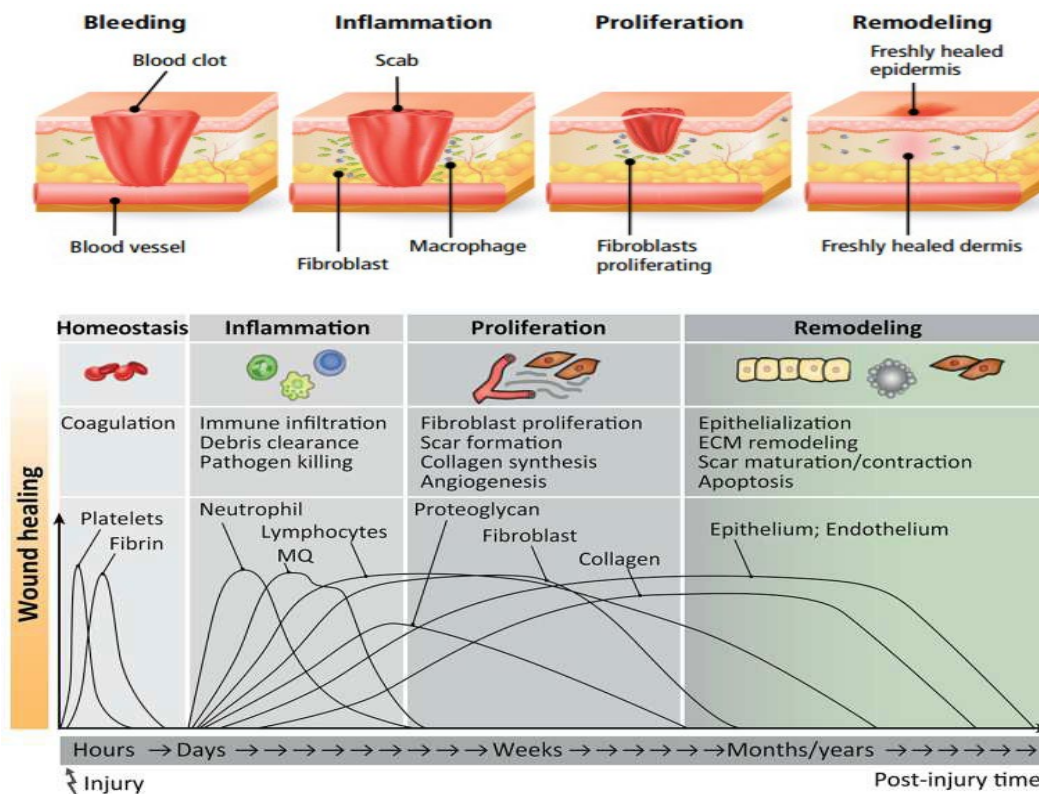


Figura 4: Rappresentazione delle fasi del processo di wound healing, con indicazione delle molecole implicate e la relativa linea temporale [19]

La rigenerazione dell'apparato tegumentario, comunemente detta *wound healing*, è descritta come un processo complesso e delicato costituito da quattro fasi sovrapposte e coordinate (Figura 4): emostasi, infiammazione, proliferazione e rimodellamento. Immediatamente dopo il danneggiamento della cute (secondi-minuti), al fine di fermare la perdita di sangue e impedire la colonizzazione batterica, l'endotelio attiva la vasocostrizione e la cascata coagulativa provocando l'emostasi. Intanto, le piastrine determinano la secrezione dei fattori di crescita e delle citochine pro-infiammatorie in modo da dare il via alla fase infiammatoria (ore-giorni). In questa fase i neutrofili e i monociti, differenziatisi in macrofagi grazie all'azione del fattore di crescita trasformante (TGF)- β , si occupano della rimozione del materiale necrotico, processo noto come *debridement*, e della produzione di citochine e fattori di crescita che stimolano la migrazione dei fibroblasti e cellule epiteliali nel sito di interesse. Inizia così la fase proliferativa (giorni-settimane) che comprende i molteplici processi di angiogenesi, epitelizzazione, deposizione di tessuto di granulazione e collagene. Queste operazioni sono regolate dall'azione del fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF) e del fattore di crescita dei fibroblasti (FGF). I fibroblasti hanno il compito di secernere i componenti dell'ECM. Parte di questi si trasformano poi in miofibroblasti permettendo la contrazione della ferita. La fase di riepitelizzazione consiste nella proliferazione e migrazione delle cellule epiteliali, mentre i fibroblasti depongono collagene di tipo III, che progressivamente viene sostituito dal collagene di tipo I. Durante

la successiva fase di rimodellamento (settimane-anni), il collagene viene prodotto a velocità elevate, senza aumento netto complessivo, giacché la produzione è bilanciata dalla degradazione. Inoltre, la gran parte delle cellule endoteliali, dei macrofagi e dei miofibroblasti va incontro ad apoptosi con conseguente formazione di tessuto cicatriziale acellulare [19], [20].

Affinché la guarigione avvenga correttamente e le funzioni della pelle siano ripristinate è indispensabile che gli eventi biologici e molecolari siano ben integrati e perfettamente coordinati. Quando questo non accade si verifica una riduzione dei fattori di crescita e un incremento delle interleuchine infiammatorie e del fattore di necrosi tumorale (TNF). Di conseguenza l'ECM funziona in modo anomalo ed ostacola il processo di proliferazione e rimodellamento, cosicché le ferite diventano croniche [19], [20]. Nella maggior parte dei casi si applicano medicazioni, si esegue il *debridement*, si ripristina un'adeguata perfusione, si limita la pressione nella zona colpita e si cerca di limitare la possibilità di infezione [21]. Tuttavia, i pazienti afflitti da questa patologia necessitano di trattamenti ripetitivi e per questo dispendiosi, i quali permettono di ottenere soltanto una guarigione del 50% e molto spesso momentanea. [22]. Pertanto la ricerca si sta focalizzando sullo sviluppo di sostituti cutanei biologicamente compatibili e funzionalmente efficienti. Per fare questo, è fondamentale approfondire le conoscenze possedute riguardo l'apparato tegumentario, organo complesso e stratificato che svolge numerose attività.

1.3 Struttura dell'apparato tegumentario

L'apparato tegumentario è il più esteso del corpo umano, infatti corrisponde a circa 15% del peso totale di un adulto [23]. Questo è costituito da 2 subunità, la pelle e gli annessi cutanei (peli, unghie, ghiandole, vasi sanguigni e terminazioni nervose), che lavorano in sintonia per assolvere a funzioni complesse e diversificate. Questo sistema svolge principalmente la funzione di barriera protettiva contro i fattori fisici, chimici e biologici provenienti dall'ambiente esterno, grazie anche alla presenza di numerosi elementi del sistema immunitario [24], [25]. Una ulteriore funzione di questo organo sensitivo è quella di mantenere l'omeostasi, regolando la temperatura, l'idratazione dei tessuti e il metabolismo della vitamina D fungendo inoltre da riserva energetica [26].

La pelle è composta da 3 strati distinti che si distinguono in epidermide, derma e ipoderma (Figura 5), il cui spessore varia considerevolmente a seconda della localizzazione anatomica. Ad esempio, la palpebra presenta lo strato più sottile dell'epidermide, misurando meno di 0,1 mm. Di contro i palmi e le piante dei piedi presentano lo spessore maggiore, misurando circa 1,5 mm. Per quanto riguarda il derma, lo spessore maggiore lo si trova sul dorso, raggiungendo tra le 30 e 40 volte lo spessore dell'epidermide [23].

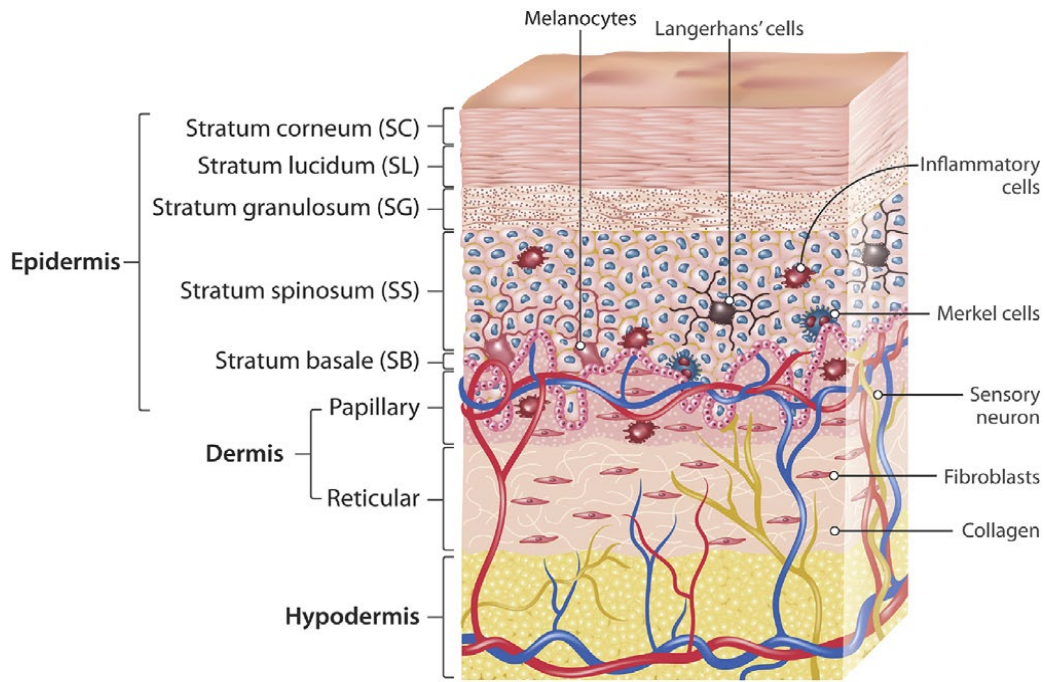


Figura 5: Rappresentazione della struttura stratificata dell'apparato tegumentario [27]

L'epidermide è lo strato più esterno, dove la popolazione cellulare predominante è quella dei cheratinociti. In base alla loro morfologia e posizione è possibile suddividere tale struttura in 5 sottostrati: basale, spinoso, granuloso, lucido e corneo. L'epidermide accoglie anche altre cellule come i melanociti (produttori di melatonina, schermo contro le radiazioni solari nocive) e le cellule di Langerhans e di Merkel (recettori sensoriali). Lo strato basale è quello più profondo e contiene i cheratinociti proliferanti che servono a rimpiazzare l'epidermide sovrastante. Nello strato spinoso i cheratinociti presentano delle piccole estroflessioni che permettono di realizzare le connessioni intercellulari. Lo strato granuloso è riconoscibile data la presenza di granuli basofili cheratoniali all'interno dei cheratinociti, fondamentali per la produzione della cheratina, proteina essenziale per l'integrità dell'epidermide. Lo strato lucido, costituito da cheratinociti appiattiti, è presente unicamente in corrispondenza dei palmi e delle piante. Infine, lo strato corneo, il più esterno, è formato da cheratinociti anucleati e cornificati, ovvero le lamelle cornee, che si distaccano nel processo di desquamazione. L'epidermide si connette al derma tramite la giunzione dermo-epidermica situata al di sotto dello strato basale, formata da polisaccaridi e fibre, filtra il passaggio di cellule e fluidi [24], [26].

Il derma è costituito principalmente da collagene, proteina fibrosa, alla quale si aggiungono molecole di elastina e polisaccaridi, interconnesse e orientate formano un tessuto connettivo denso, compatto, elastico, flessibile e in grado di resistere alle tensioni meccaniche. È una regione altamente vascolarizzata e comprende gli annessi cutanei, quali i follicoli piliferi e le terminazioni dei neuroni

sensoriali, che collegandosi ai meccanocettori raccolgono gli stimoli meccanici, come variazioni di pressione, stiramenti, vibrazioni, stimoli termici e dolorifici. La popolazione cellulare predominante è quella dei fibroblasti, responsabile della sintesi delle componenti della matrice. Ad essi si aggiungono anche mastociti, macrofagi e linfociti [23], [24].

Lo strato più profondo è l'ipoderma, composto prevalentemente da adipociti, che svolge le funzioni di riserva energetica, isolamento termico e protezione meccanica. La distribuzione dell'ipoderma e la quantità di tessuto adiposo variano con l'età, il sesso e l'etnia [26].

La pelle è quindi costituita da due tipi di tessuto, quello epiteliale e quello connettivo. Questi tessuti possono essere danneggiati e la lesione che ne scaturisce può essere classificata a seconda della profondità. Le categorie principali sono:

- Cutanee epidermiche
- Spessore parziale superficiale
- Spessore parziale profondo
- Tutto spessore

Le prime due categorie sono in grado di autoripararsi, grazie all'innescarsi del processo di guarigione delle ferite, attivato da percorsi che includono interazioni tra i componenti dell'ECM. Questo meccanismo non interessa le altre categorie di lesione in quanto le componenti rigenerative dell'epitelio risultano distrutte. È importante che il processo di guarigione, costituito dalle quattro fasi sovrapposte, avvenga secondo tempistiche opportune. Nella fase di rimodellamento, la mancata apoptosi dei miofibroblasti può ostacolare la guarigione delle ferite acute. Invece, le lesioni croniche permangono a causa di un eccessivo stato infiammatorio, dovuto all'attività prolungata dei fattori pro-infiammatori che degradano l'ECM [27].

In conclusione, è possibile affermare che le capacità di autorigenerazione dell'apparato tegumentario sono dovute alla presenza, in corrispondenza dello strato basale, di nicchie contenenti cellule non differenziate. Quindi le nicchie fungono da riserva di cellule staminali, che in condizioni di normale funzionamento della pelle, garantiscono il continuo turnover. Invece in caso di lesioni, grazie all'elevato potenziale replicativo, conferiscono al tessuto epiteliale proprietà rigenerative.

Laddove l'organismo non è in grado di risanare le ferite l'ingegneria tissutale può rappresentare una valida strategia alternativa a quelle chirurgiche e farmacologiche, sviluppando dei sostituti biologici in grado di ripristinare struttura e funzionalità del tessuto danneggiato. In questo approccio, l'elemento chiave è lo scaffold, con il compito di mimare la matrice extracellulare, mezzo nel quale

le cellule proliferano, si differenziano e migrano, stimulate da opportune molecole segnale. In conclusione, per lo sviluppo di nuovi tessuti bioingegnerizzati, è di vitale importanza approfondire la conoscenza dell'ECM naturale.

1.3.1 Matrice extracellulare

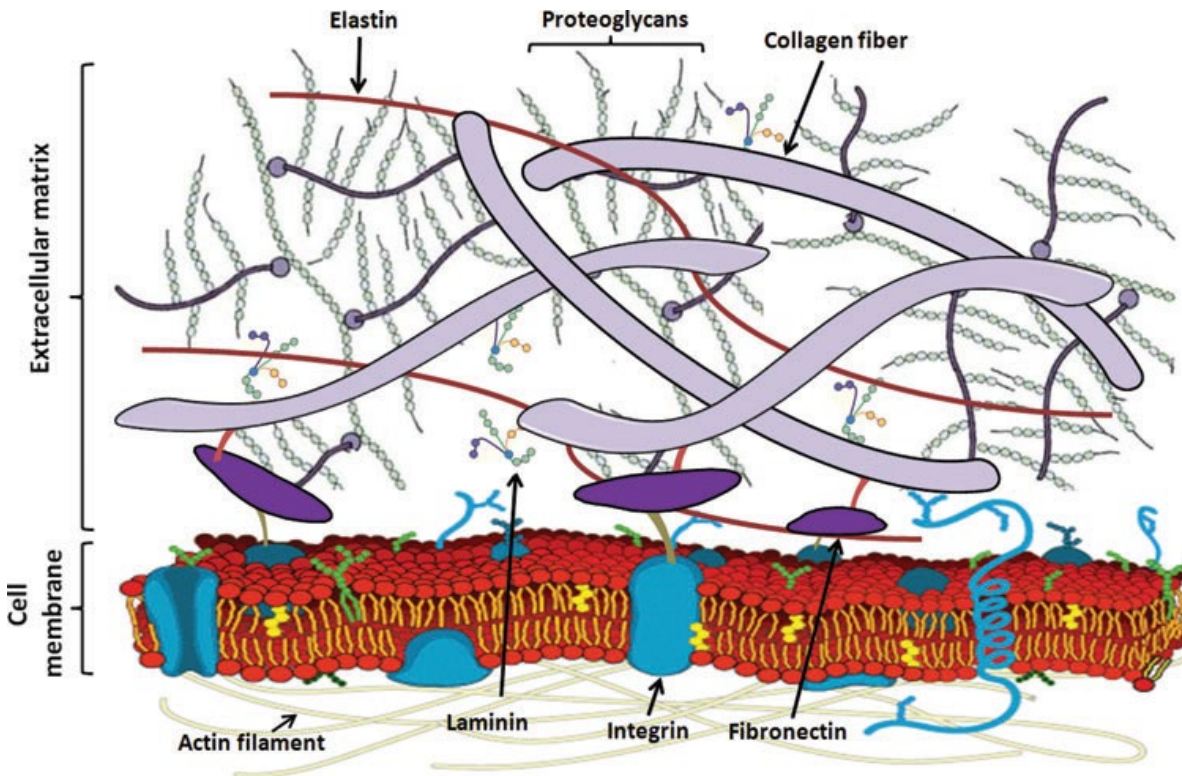


Figura 6: Rappresentazione schematica dei principali costituenti della matrice extracellulare [29]

La pelle, come tutti i tessuti, è formata da una componente cellulare che si dispone all'interno della matrice, reticolo tridimensionale altamente organizzato. La matrice fornisce supporto fisico e influenza i processi cellulari, quali la crescita, il differenziamento e la migrazione, regola l'omeostasi e la morfogenesi [28]. La matrice extracellulare (Figura 6) è di base costituita da eteropolisaccaridi, proteine fibrose, e liquido interstiziale, ma la percentuale di questi elementi e l'organizzazione variano in base al tessuto di appartenenza.

Gli eteropolisaccaridi si dividono in glicosaminoglicani (GAGs) e proteoglicani. I glicosaminoglicani sono una famiglia di polimeri lineari, composti da unità disaccaridiche ripetenti. Presentano un'elevata densità di cariche negative, data dalla combinazione dei gruppi solfato e dei gruppi carbossilici, che fa sì che in soluzione assumano una conformazione estesa, quello maggiormente presente è l'acido ialuronico. I GAGs si legano alle proteine per formare i proteoglicani, enormi aggregati di natura covalente e non covalente. I proteoglicani sono da considerare diversificati di glicoproteine altamente glicosilate, le cui funzioni sono mediate dal nucleo

proteico e dalle catene di GAGs. Questi provvedono al mantenimento di un ambiente idratato, svolgono la funzione di setacci selettivi per regolare il traffico di molecole e cellule, e hanno un ruolo nella segnalazione chimica dato che possono aumentare o inibire l'attività delle molecole che legano.

Le proteine fibrose si suddividono in proteine strutturali (collagene ed elastina) e proteine adesive (laminina e fibronectina).

Inframmezzate dai proteoglicani si trovano le proteine strutturali che formano un reticolo di legami trasversali conferendo consistenza e resistenza alla matrice. Il collagene è la più abbondante proteina fibrosa, sintetizzata principalmente dai fibroblasti. Questa proteina svolge numerose funzioni: stimola l'adesione e la migrazione cellulare, influenza la morfogenesi dei tessuti ed agisce come impalcatura per i tessuti. Il collagene è presente nel derma sottoforma di fibrille, dove influenza i processi cellulari, tra cui quelli infiammatori.

L'elastina è una proteina insolubile costituita principalmente da amminoacidi idrofobici che conferisce elasticità ai tessuti, ed è infatti particolarmente abbondante in quelli sottoposti a sforzi di allungamento ripetuti. Sintetizzata anch'essa dai fibroblasti, l'elastina è abbondante nella pelle a cui conferisce integrità strutturale. Le fibre sono organizzate in reticoli, e non in fasci come invece accade nel collagene.

Sia la fibronectina che la laminina sono glicoproteine e promuovono l'ancoraggio delle cellule alla matrice. La fibronectina, presente nel derma e nella regione della membrana basale dermo-epidermica, nel processo di guarigione delle ferite è fondamentale nella regolazione della neovascolarizzazione. La laminina, nella cute, supporta l'adesione dei cheratinociti ed è importante nella genesi delle appendici cutanee [29].

Nella realizzazione di un tessuto ingegnerizzato la principale sfida è quella di replicare l'organizzazione e la composizione dei tessuti, che si differenziano per tipologia, contenuto e strutturazione delle cellule e della matrice. Ciascuna differenza deve essere analizzata in modo da poter scegliere in modo oculato i biomateriali, la struttura e i metodi di realizzazione dello scaffold. Nel caso della pelle, i costituenti chiave della matrice e le loro funzioni sono riassunti in Tabella 1.

Tabella 1: Principali molecole costituenti la matrice extracellulare della cute

MOLECOLA	FUNZIONE BIOLOGICA
Acido Ialuronico	Trasporto di metaboliti e cataboliti, conferisce resistenza alla compressione, favorisce migrazione e proliferazione cellulare
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
Collagene	Impalcatura del tessuto, conferisce resistenza a trazione, favorisce le interazioni cellula-ECM e cellula-cellula,
Fibronectina	Favorisce l'adesione, la migrazione e la proliferazione cellulare
Laminina	Favorisce la differenziazione e la migrazione cellulare

Per il corretto funzionamento dell'apparato tegumentario sono fondamentali le interazioni tra ECM, fattori di crescita e cellule. Questi tre elementi interagiscono di continuo mediante una serie di eventi reciprocamente influenti, che garantiscono il mantenimento dell'omeostasi, la rigenerazione tissutale e la guarigione delle ferite. Le interazioni sono bidirezionali, in alcuni casi possono essere dirette, come la formazione del legame tra le componenti dell'ECM e un fattore di crescita, oppure indirette, come quando è necessaria l'adesione delle cellule alla matrice affinché si abbia la risposta ai segnali dei fattori di crescita [30]. Tra i numerosi fattori di crescita con cui la matrice può interagire ci sono: TGF- β , VEGF, il fattore di crescita dell'endotelio vascolare (EGF) e le proteine morfogeniche ossee (BMP). Questi sono solitamente rilasciati a seguito della degradazione dell'ECM da parte degli enzimi proteolitici, come ad esempio le metallo proteasi (MMPs) [29]. Nelle ferite acute si ottiene la rimarginazione grazie alla progressione delle interazioni che consente di passare da una fase alla successiva senza impedimenti. Diversa è la situazione che si presenta nelle ferite croniche, nelle quali lo scambio bidirezionale è ostacolato da anomalie sistemiche, come ad esempio il diabete o l'insufficienza venosa, che possono provocare l'aumento dei livelli delle MMPs con conseguente degradazione eccessiva dell'ECM, oppure la sovraespressione di determinati fattori di crescita senza un aumento dei risultati funzionali [30].

1.4 Ingegnerizzazione di scaffold per rigenerazione cutanea

Come indicato nel Paragrafo 1.3, l'apparato tegumentario è cruciale per proteggere il corpo umano dall'ambiente circostante, e la presenza di ulcere croniche, ferite acute, ustioni o disturbi come la necrosi epidermica tossica (TEN) rende evidente l'impossibilità della pelle di svolgere le sue funzioni. Per sopperire a queste mancanze è necessario adoperare dei sostituti in grado di ripristinare l'architettura della pelle. La medicina è da lungo tempo alla ricerca di trattamenti clinici capaci di ristabilire completamente le funzionalità dell'apparato in questione (Figura 7) [31].

I primi trattamenti, risalenti agli antichi sumeri ed egizi, consistevano nell'utilizzo di prodotti naturali come miele, latte, piante e grasso di animali. Ovviamente gli approcci e i materiali usati sono drasticamente cambiati, ma gli obiettivi sono pressoché rimasti immutati e consistono nel proteggere il letto della lesione dalla deidratazione e dal sopraggiungere delle infezioni [25]. Nell'ambito clinico, per proteggere il sito di lesione da agenti esterni, si utilizzano garze, bende o cotone idrofilo. Queste medicazioni sono economiche e facili da reperire. Tuttavia, pur agendo come barriere protettive, promuovono la formazione di tessuto cicatriziale, e possono causare nuove lesioni al momento della sostituzione [32]. Un'altra categoria disponibile è quella costituita da film, spugne, idrocolloidi e idrogeli, che proteggono dalla disidratazione e dalle infezioni, facilitando il processo di guarigione. Infine, sono stati sviluppati sostituti di pelle ingegnerizzata in grado di stimolare la

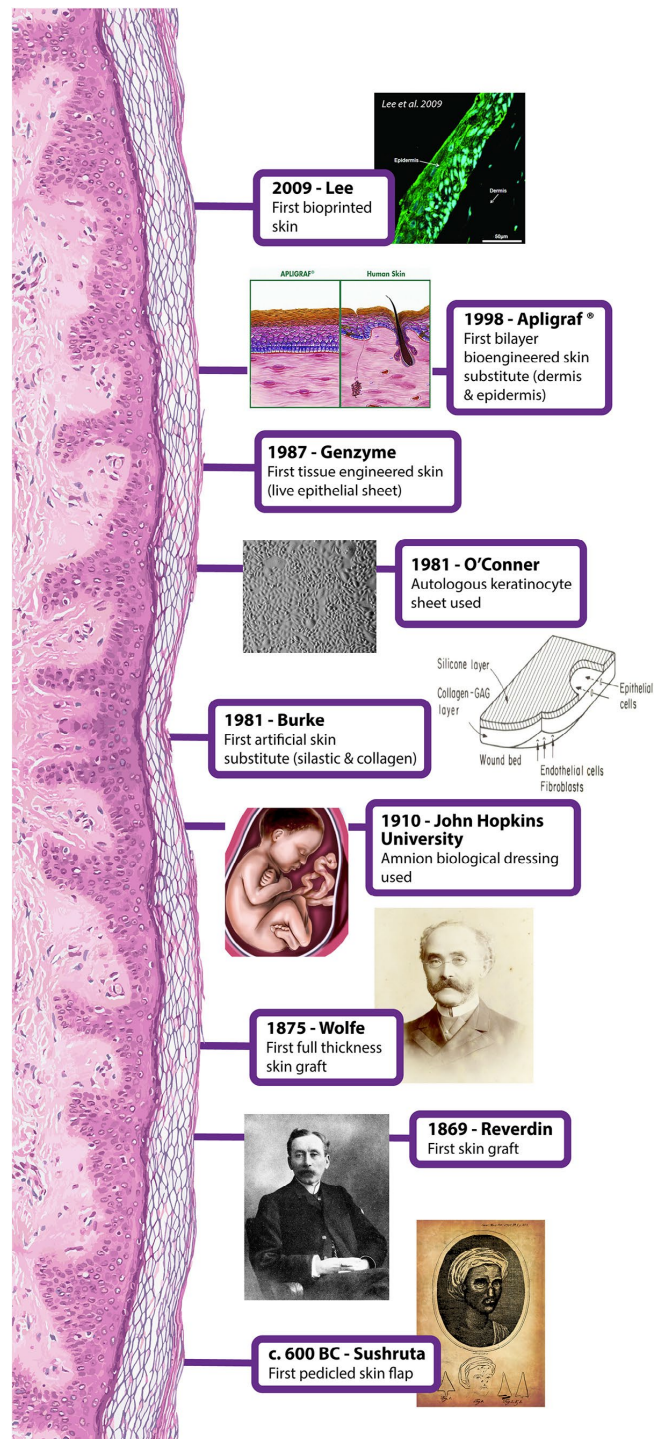


Figura 7: Linea temporale dei sostituti cutanei usati in medicina [31]

guarigione. Infine, sono stati sviluppati sostituti di pelle ingegnerizzata in grado di stimolare la

rigenerazione del tessuto danneggiato, utile specialmente nel caso di ferite croniche nelle quali il processo di rigenerazione cutanea è compromesso [33]. Tra i primi, il lavoro di Jacques-Louis Reverdin del 1870 indicò gli innesti cutanei allogenici come un valido mezzo per l'accelerazione della guarigione delle ferite. Successivamente l'utilizzo degli innesti cutanei autologhi iniziò a diffondersi, risultando ad oggi ancora il trattamento maggiormente adoperato per far fronte ai difetti della pelle. Tuttavia, il trattamento in questione presenta una serie di svantaggi quali, la limitata disponibilità, la necessità di creare una ferita secondaria, il rischio di infezioni e l'incapacità di ripristinare in toto le funzioni dell'organo. Per tutte queste ragioni è sempre più urgente la necessità di sviluppare terapie alternative.

Un rivestimento ideale dovrebbe isolare la lesione da fattori esterni, come i batteri, assorbire gli essudati, mantenendo al contempo un ambiente locale umido. In aggiunta, il rivestimento dovrebbe possedere caratteristiche antiinfiammatorie, stimolare la proliferazione cellulare allo scopo di migliorare il processo di guarigione, e consentire la rigenerazione tissutale. Altre caratteristiche aggiuntive sono l'elasticità, per evitare la compressione, la morbidezza, la biocompatibilità e la non tossicità, il tutto per preservare da ulteriori danni [25]. Negli anni sono state ideate medicazioni differenti, che si distinguono a seconda della profondità della ferita alla quale vengono applicate e per il materiale di realizzazione. Nel caso di ferite a spessore parziale sono adoperate specialmente medicazioni biocomposite, ossia dei rivestimenti costituiti dall'accoppiamento di materiali naturali che svolgono temporaneamente le funzioni del tessuto lesionato, un esempio è Biobrane™ [34]. Nel caso invece di lesioni a tutto spessore si utilizzano sostituti biologici basati su scaffold principalmente collagene, che stimolano l'infiltrazione da parte delle cellule autologhe e la successiva rigenerazione dei tessuti, di cui un esempio commerciale è rappresentato dal prodotto Integra®. È possibile inoltre impiegare anche matrici acellulari inerti, come il prodotto commerciale Alloderm™, oppure matrici cellulari nelle quali sono integrati fibroblasti e cheratinociti (Apligraf®)[31]. Gli elementi chiave, presenti singolarmente o in combinazione, che compongono queste pelli ingegnerizzate sono i biomateriali, le cellule e i fattori di crescita. Il sostituto va a ricoprire la lesione, accelerando la guarigione, riducendo la formazione della cicatrice e promuovendo la vascolarizzazione [6]. Pertanto, questi nuovi trattamenti risultano vantaggiosi perché, stimolano la rapida adesione e proliferazione cellulare, forniscono un ambiente umido prevenendo la disidratazione. Inoltre, sono biodegradabili, non tossici, in grado di assorbire gli essudati della ferita e in alcuni casi sono trasparenti, caratteristica che permette di monitorare il letto della ferita [32], [35].

Nonostante i notevoli traguardi raggiunti la ricerca continua ad impegnarsi nel realizzare soluzioni in grado di migliorare la guarigione delle ferite. Benché i sostituti risultino differenti per le loro caratteristiche intrinseche, come idrofobicità, permeabilità e capacità di assorbimento, centrale è il ruolo dello scaffold, che funge da impalcatura tridimensionale per supportare le cellule e stabilire la forma finale del tessuto di neoformazione. Fondamentali sono caratteristiche quali: dimensione, geometria, porosità, proprietà superficiali, per creare il microambiente adatto a stimolare l'adesione, la proliferazione e il differenziamento cellulare [36]. Affinché il tessuto bioingegnerizzato stimoli la rigenerazione, questo deve presentare caratteristiche morfologiche, strutturali e chimico-fisiche simili alla matrice del tessuto nativo. Pertanto nella progettazione dello scaffold bisogna considerare il campo di applicazione e il tipo di tessuto che si intende sostituire. In ogni caso, nel campo dell'ingegneria tissutale, esistono importanti proprietà che qualsiasi costrutto dovrebbe possedere:

- *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 ricevente o beneficiario di tale terapia, ma generando la risposta cellulare o tissutale benefica più appropriata in quella specifica situazione e ottimizzando le prestazioni clinicamente rilevanti di tale terapia” [37]. Pertanto lo scaffold deve essere in grado di supportare l'attività cellulare per favorire la rigenerazione senza scatenare una risposta indesiderata, come può essere il rigetto, l'infiammazione o l'attivazione del sistema immunitario dell'ospite [1].
- *Biodegradazione controllata*: la cinetica di degradazione del biomateriale dovrebbe eguagliare la velocità di crescita del tessuto, poiché se troppo rapida ostacolerebbe il processo rigenerativo, se troppo lenta impedirebbe il rimodellamento. Il tempo di degradazione è regolato dalle proprietà chimiche del materiale, dall'architettura dello scaffold (dimensione, forma, porosità) e dal sito di impianto [38].
- *Architettura*: un impalcatura che mimi la topografia del tessuto nativo ha la capacità di influenzare le attività cellulari, quali migrazione, adesione e proliferazione, favorendo la formazione di nuovo tessuto [39]. Per questo non solo l'architettura, ma anche la morfologia ha un ruolo centrale nell'ingegneria tissutale, infatti si è passati dal realizzare scaffold isotropici a scaffold eterogenei e anisotropi, detti “biomimetici” [40]. Inoltre, grazie alle moderne tecniche di imaging è possibile ricavare immagini precise del difetto che vengono poi impiegate nella progettazione della forma in modo che si adatti perfettamente al sito di impianto.
- *Porosità*: nell'ambito dell'ingegneria tissutale la dimensione dei pori, il grado di porosità e il grado di interconnessione sono parametri essenziali per consentire la crescita del tessuto, il

trasporto dei nutrienti e dei rifiuti metabolici, e l'angiogenesi. Il requisito di porosità è altamente tessuto-specifico/dipendente, poiché i diversi tipi cellulari prediligono dimensioni dei pori differenti [41]. Dimensioni comprese tra i 100 μ m e i 1000 μ m favoriscono la diffusione di nutrienti, metaboliti e cataboliti, la crescita cellulare, la corretta formazione di una rete angiogenica, determinando l'incremento del livello di vascolarizzazione. Porosità intorno ai 50 μ m consentono la colonizzazione dello scaffold e la migrazione cellulare [42]. Nel caso della rigenerazione di cute di mammifero adulto il range ottimale va da 20 μ m a 125 μ m. Generalmente un'elevata porosità (superiore al 70%) consente una migliore diffusione di metaboliti e cataboliti, ed inoltre promuove l'adesione delle cellule [42]. Ultimo elemento da tenere in considerazione è l'interconnessione dei pori, in quanto un'elevata percentuale favorisce l'infiltrazione, non solo delle cellule, ma soprattutto della matrice di neoformazione. Tuttavia, eccedere nelle dimensioni dei pori e nel grado di porosità può causare l'indebolimento della struttura, dovuta a una ridotta rigidità. Se da un lato una rete di pori altamente interconnessi consente di aumentare la superficie di adesione disponibile, riducendo al minimo lo spazio inutilizzato, di contro l'eccessiva tortuosità potrebbe rendere difficoltoso la circolazione del liquido interstiziale e lo scambio di massa [43].

- *Composizione chimica*: che siano sintetici o naturali i materiali adoperati nella realizzazione dello scaffold è opportuno che siano il più possibile simili all'ECM che si intende imitare. In particolare, la composizione chimica superficiale ha un ruolo cardine dovendo la struttura interagire e stimolare l'ordinaria attività cellulare. Per questa ragione, si possono scegliere i polimeri naturali che favoriscono le interazioni dirette con il tessuto biologico, oppure i polimeri sintetici a seguito di un'opportuna funzionalizzazione superficiale con proteine o sequenze peptidiche adesive così da favorire l'adesione, la colonizzazione e la proliferazione cellulare.
- *Proprietà meccaniche*: dovrebbero essere simili a quelle del sito di impianto, e per ottenere tali caratteristiche si agisce scegliendo opportunamente il materiale, la struttura, la porosità, e la tecnica di produzione. La struttura funge da supporto meccanico e tramite la sua rigidità sollecita le cellule. In letteratura è spesso indicata la necessità di realizzare impalcature aventi il valore del modulo di elasticità all'interno del range del tessuto da sostituire. Se si considera la cute, gli scaffold dovrebbero avere modulo di Young compreso tra i 10kPa ai 50MPa [44]. La rigidità dipende dal materiale, dall'architettura e dalla cinetica di degradazione, è quindi importante che sia sufficiente da resistere alla frammentazione e alle forze di compressione e

da fornire gli opportuni segnali, come farebbe l'ECM nativa, al contempo non dovrebbe essere eccessiva da scatenare una risposta infiammatoria.

In aggiunta a queste proprietà, affinché le soluzioni sviluppate siano commercializzate ed applicate in clinica, è necessario che lo scaffold sia riproducibile, scalabile ed economico.

1.5 Biomateriali per rigenerazione del tessuto cutaneo

Nella realizzazione dello scaffold, che consiste nella replica fisica dell'ECM nativa, il biomateriale adoperato ha un ruolo cardine. Nello specifico, si definisce biomateriale “un materiale destinato ad interfacciarsi con i sistemi biologici per valutare, trattare, aumentare o sostituire qualsiasi tessuto, organo o funzione del corpo” [10]. I biomateriali per applicazioni mediche si sono evoluti attraverso tre generazioni, ognuna delle quali presenta un distinto obiettivo, ma che in qualche modo risultano temporalmente sovrapposte (Figura 8).

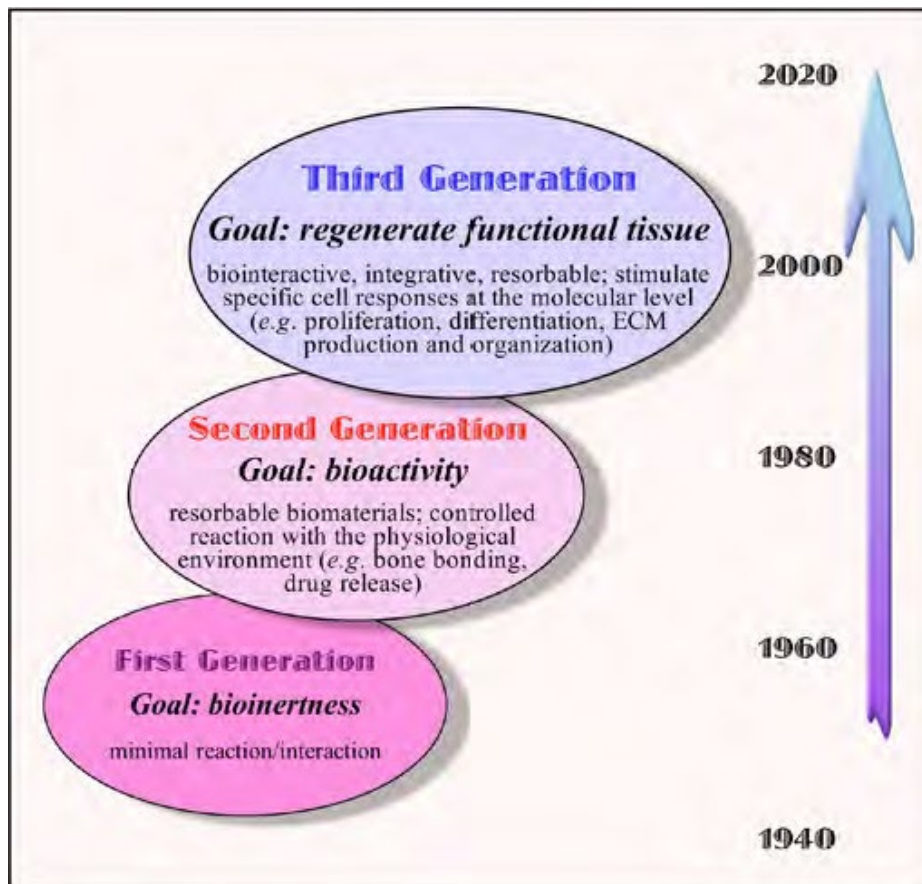


Figura 8: Evoluzione dei biomateriali [45]

L'obiettivo dei materiali di prima generazione è quello di combinare una serie di proprietà funzionali congruenti a quelle del tessuto senza scatenare una risposta dannosa da parte dell'ospite, e per questo sono noti come bioinerti. Questa categoria comprende materiali industriali standard, ampiamente disponibili sul mercato, ma non sviluppati in modo specifico per applicazioni mediche. I materiali di

seconda generazione hanno invece l'intento di provocare una reazione controllata con fine terapeutico nei tessuti nei quali sono impiantati, e pertanto sono conosciuti come bioattivi. Infine, la terza generazione, quella in fase di sviluppo ed espansione, prevede di supportare e stimolare la rigenerazione dei tessuti funzionali [45]. I biomateriali di seconda e terza generazione sono specificatamente sviluppati per essere adoperati in ambito biomedicale, pertanto devono essere:

- *Biocompatibili*: non scatenare alcuna risposta immunitaria a seguito dell'impianto;
- *Bioattivi*: stimolare l'attività cellulare;
- *Biorisorbibili*: degradarsi per lasciare spazio alla matrice secreta dalle cellule [4].

Dal momento che gli scaffold vengono posti a diretto contatto con l'area danneggiata, diventa basilare un'attenta selezione dei materiali. Negli ultimi anni i ricercatori hanno condotto numerosi studi con l'obiettivo di sviluppare delle medicazioni multifunzionali, che potessero avere un effetto benefico nella guarigione delle ferite. I materiali adoperati nella realizzazione di questi scaffold multifunzionali sono una combinazione di vari polimeri naturali e sintetici, in cui possono essere inclusi farmaci, nanoparticelle o agenti bioattivi [25]. Il fine ultimo è quello di imitare e rimpiazzare temporaneamente l'ECM naturale, e per questo i costrutti fabbricati devono presentare un elevato livello di biomimetività, a cui si aggiungono eventualmente proprietà antiinfiammatorie, antimicrobiche ed emostatiche [46]. In aggiunta, la tipologia del materiale impiegato consente di modulare le caratteristiche del costrutto in funzione del tessuto da ripristinare e dell'entità del danno. I biomateriali che maggiormente soddisfano i requisiti indicati sono i polimeri, generalmente suddivisi in due categorie: naturali e sintetici. A loro volta i polimeri naturali vengono distinti in base all'origine: animale o vegetale. Ad esempio, sono di origine animale le sostanze presenti nella matrice extracellulare di alcuni tessuti come collagene, fibrina ed acido ialuronico, oppure sostanze di origine animale come il chitosano e la fibroina della seta. Invece, sono di origine vegetale polimeri come l'agarosio e l'alginato. I polimeri naturali sono spesso adoperati perché altamente biocompatibili, tuttavia hanno scarse proprietà meccaniche e lunghi tempi di gelificazione. Al contrario, la classe dei polimeri sintetici permette di controllare le proprietà meccaniche e chimiche, ma presentano peggiori caratteristiche di biocompatibilità e biodegradabilità [6]. È quindi spesso opportuno combinare le due classi in modo da ottenere un materiale ibrido, che combini l'elevata biocompatibilità con la stabilità meccanica [10]. Talvolta si ottiene un materiale ibrido andando ad aggiungere al polimero una fase inorganica. Infatti, diversi studi hanno dimostrato che i vetri bioattivi possiedono un grande potenziale nell'accelerare la rigenerazione. Tradizionalmente sono adoperati nella rigenerazione ossea tuttavia, sono in grado di legarsi anche ai tessuti molli e sostenere il processo di guarigione. Conseguenza della

degradazione è il rilascio di ioni biologicamente attivi (es. Si, P, Zn, Ca, Cu) che hanno le capacità di ridurre l'infiammazione, svolgere un'azione antibatterica e migliorare l'angiogenesi andando a stimolare espressione e rilascio del VEGF e del fattore di crescita dei fibroblasti β -FGF [47].

Nei paragrafi che seguono si andrà a focalizzare l'attenzione su queste classi di materiali, con un approfondimento sui polimeri selezionati per lo scaffold sviluppato nell'ambito di questo progetto di tesi.

1.5.1 Materiali polimerici

I polimeri, dal greco *polymerés* letteralmente “molte parti”, sono sostanze formate da un gran numero di unità ripetitive di identica natura chimica, dette monomeri, unite tra loro da legami chimici in modo da formare strutture lineari, ramificate o reticolate. Sono ampiamente adoperati nell'ambito della rigenerazione tissutale per via delle interessanti caratteristiche che li contraddistinguono, infatti presentano numerose e variegate proprietà chimico-fisiche e meccaniche, sono facilmente processabili, ed inoltre possono essere modificati superficialmente tramite metodi fisici o chimici. Altra importante caratteristica di questi materiali, soprattutto nel loro uso nell'ingegneria tissutale è la degradabilità. Sulla base delle proprietà di degradazione, i polimeri vengono distinti in: biostabili, bioinerti, biodegradabili e biorisorbibili. I polimeri biostabili e bioinerti non subiscono sostanziali trasformazioni chimico-fisiche nel tempo ed interagiscono limitatamente con l'ambiente circostante, risultando quindi meno interessanti nel campo rigenerativo. Al contrario, quelli biodegradabili e biorisorbibili sono ampiamente sfruttati per la creazione di scaffold, perché fungono da supporto temporaneo alla rigenerazione e non necessitano di un intervento di espianto. Specialmente per quanto concerne i polimeri biorisorbibili, la degradazione avviene senza scatenare alcuna risposta infiammatoria, principalmente causata dai prodotti di scarto, che in questo caso non sono tossici e vengono eliminati dall'attività cellulare.

È possibile distinguere due categorie di polimeri, quelli sintetici, e quelli naturali, come descritto di seguito.

1.5.2 Polimeri sintetici

I polimeri sintetici vengono sintetizzati industrialmente, e sono interessanti per la medicina rigenerativa in quanto presentano numerosi vantaggi come la facilità di sintesi, la riproducibilità e la ripetibilità. In base all'applicazione medica ed al tessuto che si intende ripristinare è possibile ottenere strutture aventi le desiderate caratteristiche chimiche, fisiche, morfologiche meccaniche e degradative. Tuttavia, questa classe di polimeri non contiene i gruppi funzionali necessari per

consentire l'adesione cellulare, determinando una scarsa biocompatibilità e bioattività [6]. Per migliorare la loro biocompatibilità, questi polimeri possono essere funzionalizzati con opportune biomolecole quali peptidi, proteine o polisaccaridi, conferendo le caratteristiche di bioattività necessarie a stimolare la formazione di legami con il tessuto circostante ed innescare reazioni cellulari in grado di determinare la formazione del neo tessuto.

Tra i polimeri sintetici che generalmente si adottano nell'ingegneria tissutale troviamo l'acido polilattico (PLA), il policaprolattone (PCL), l'acido poliglicolico (PGA), e i loro copolimeri come il PLGA. Nel trattamento delle ferite cutanee questi materiali sono adottati principalmente per realizzare delle barriere che impediscano la perdita di fluidi e la contaminazione batterica. A questo scopo sono state realizzate delle membrane con microfibre di poliuretano, oppure delle membrane nanofibrose a base di PLGA [48]. Tuttavia, alcuni polimeri sintetici sono in grado di rilasciare prodotti di degradazione che determinano alterazioni dell'ambiente circostante, ad esempio agendo sul pH, facendo insorgere reazioni avverse e infiammatorie che influenzano negativamente l'attività cellulare. Inoltre, per quanto sia possibile modificare i polimeri, questi mancano dell'affinità con i segnali biologici, come fattori di crescita, ostacolando il corretto svolgimento delle attività cellulari.

1.5.3 Polimeri naturali

Al contrario dei polimeri sintetici, i polimeri naturali sono maggiormente biocompatibili, bioattivi e biodegradabili, e per questo sono largamente impiegati nella costruzione di scaffold. Grazie alla loro origine animale o vegetale esprimono proprietà biologiche simili a quelle delle molecole che compongono l'ECM naturale, e pertanto sono in grado di supportare le attività cellulari quali migrazione, proliferazione e differenziamento [49]. Il vantaggio nel loro uso risiede nella biocompatibilità e biodegradabilità. In dettaglio, l'organismo è in grado di riconoscerli e processarli grazie a specifici percorsi metabolici, e i prodotti rilasciati non sono citotossici. Sebbene siano simili ai componenti della matrice possono presentare degli antigeni, specialmente le proteine, che innescano la risposta del sistema immunitario. Inoltre, le cinetiche di degradazione sono veloci, e questo fa venir meno la capacità di svolgere il ruolo di supporto. Per di più essendo prodotti da specie differenti vi è un'elevata variabilità da lotto a lotto, varianza talvolta presente anche se ottenuti dallo stesso animale ma da tessuti differenti. Altro problema è legato alle inadeguate proprietà meccaniche, diventa quindi necessario sottoporre il costrutto finale a trattamenti di reticolazione oppure combinare questi polimeri con materiali di diversa natura [45]. Nella Tabella 2 sono indicati i materiali, tipicamente impiegati nell'ingegneria tissutale, con le proprietà principali e la fonte.

Tabella 2: Prospetto sui materiali naturali, la loro sorgente e le principali caratteristiche [45]

Alginato	Alghe	Polisaccaride anionico, a degradazione limitata, forma idrogel
Chitosano	Esoscheletro crostacei	Carica positiva, degradazione enzimatica, può formare idrogel
Fibroina della seta	Sintetizzato da artropodi (ragno o baco da seta)	Fisiologicamente funge da bozzolo protettivo, forte, può essere intrecciata, degradazione lenta, presenta problemi di biocompatibilità
Elastina	Tessuti animali	Proteina strutturale dell'ECM strutturale, bassa solubilità, deformazione reversibile
Peptide di elastina	Prodotta sinteticamente	Imitazione sintetica dell'elastina, transizione di fase termica reversibile
Collagene	Tessuti animali/ culture cellulari/ fermentazione batterica	Abbondantemente presente nell'ECM, fornisce siti di attacco cellulare
Gelatina	Denaturazione collagene	Forma economica di collagene, utilizzata per l'attaccamento cellulare in coltura
Fibrina/Fibrinogeno	Tessuti animali/ plasma	La fibrina risulta dalla polimerizzazione del fibrinogeno con la trombina, componente cruciale per la formazione di coaguli
Acido ialuronico	Tessuti animali/ fermentazione batterica	Polimero lubrificante, caricato negativamente, può formare idrogel
Eparina	Tessuti animali/ plasma	GAG fortemente caricato negativamente, si lega a numerosi GF, attività anticoagulante
Condroitin solfato	Tessuti animali	GAG a carica negativa, componente principale della cartilagine
Tessuto decellularizzato	Tessuti animali	Miscela complessa di proteine/GAG che conserva la composizione e la struttura dell'ECM del tessuto

Tra i materiali elencati, nell'ambito della rigenerazione cutanea è ampiamente utilizzato il collagene, specialmente nella realizzazione di sostituti del derma in caso di ferite profonde dovute a ulcere o ustioni. Le motivazioni sono da ricercare nell'elevata biodegradabilità, biocompatibilità, non immunogenicità. Inoltre, grazie alla capacità di attrarre i fibroblasti, stimola la deposizione di ulteriore collagene e la conseguente formazione di nuovo tessuto [4]. Dal punto di vista commerciale sono state sviluppate soluzioni come MatriDerm[®], dove è coniugato all'elastina, o Biobrane[®], una rete in nylon bilaminare riempita da collagene e rivestita da una lamina in silicone [50].

1.5.4 Collagene

Il collagene è la proteina strutturale più abbondante nei mammiferi, incluso l'uomo, soprattutto è il principale componente del derma, dove viene sintetizzato dai fibroblasti [49], [51]. Il collagene presenta una complessa conformazione gerarchica, che può essere suddivisa in quattro strutture, come mostrato in Figura 9 [52].

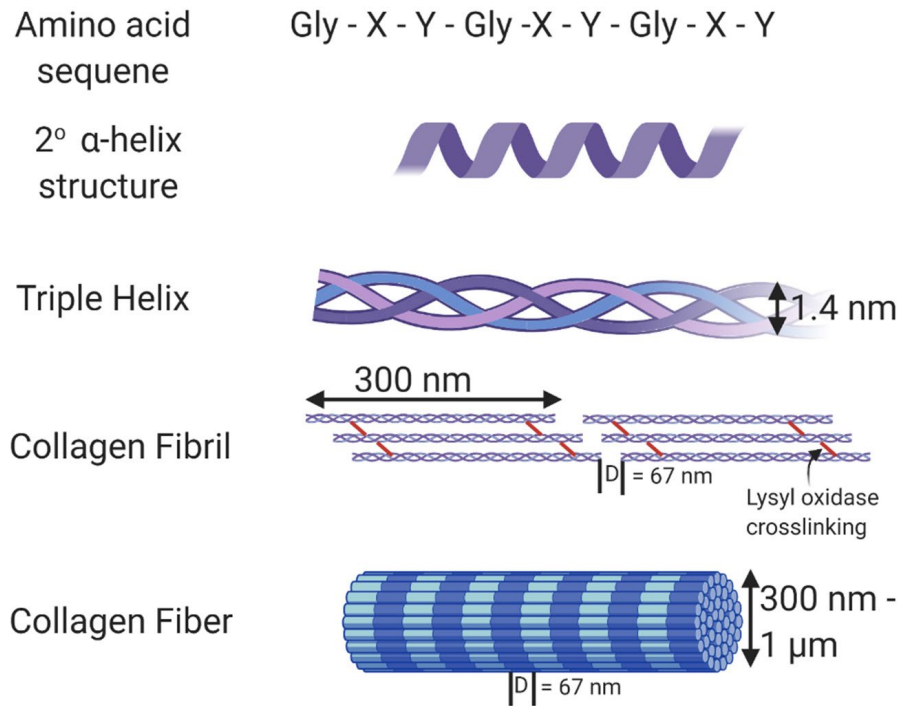


Figura 9: Struttura della molecola di collagene [52]

La *struttura primaria* è costituita da una tripletta di amminoacidi, Gly-X-Y, dove con Gly si indica la glicina, mentre con X e Y tipicamente si indica rispettivamente la prolina e l'idrossiprolina. Questi amminoacidi sono legati da un legame peptidico, lungo la catena costituita da circa mille amminoacidi in cui la glicina si ripete ogni tre residui. Ruolo della prolina è stabilizzare la conformazione ad elica di ogni catena α . La *struttura secondaria* è data dalla ripetizione regolare della struttura primaria, che consente di formare un filamento elicoidale sinistrorso. Questi filamenti noti come catene pro- α presentano alle estremità un propeptide amminoterminale (N) e uno carbossitermianle (C). Quando tre catene α si uniscono in una conformazione a super-elica destrorsa si ha la costituzione di una struttura a tripla elica nota come procollagene. I propeptidi terminali svolgono principalmente due funzioni: guidare la formazione intracellulare di molecole di procollagene e impedire la formazione intracellulare di fibrille di collagene di dimensione elevata, che potrebbero determinare effetti negativi per la cellula stessa. Esternamente alla membrana plasmatica gli enzimi procollagene peptidasi asportano i propeptidi delle estremità N e C, in questo modo si ottiene il tropocollagene, stabilizzato dalla formazione di legami idrogeno, che si instaurano tra i gruppi *N-H* della glicina e i gruppi *O-H* dell'idrossiprolina di una catena adiacente. Il tropocollagene rappresenta la *struttura terziaria*, nonché l'unità di base del collagene. Le molecole di tropocollagene si dispongono in file parallele sfalsate per formare le fibrille, che a loro volta si auto-assemblano per formare le fibre di collagene, ovvero la *struttura quaternaria*. Le fibre di collagene sono saldate grazie alla formazione di legami crociati covalenti fra i residui di lisina, ciò rende la struttura resistente a trazione [52], [53].

In natura esistono 28 tipi di collagene, la struttura fibrillare appena descritta è propria del collagene di tipo I, II, III, V, XI, XXIV e XXVII, mentre gli altri hanno un'organizzazione alternativa.

La maggior parte del collagene per uso medico è ottenuto da tessuti bovini e suini strettamente regolamentati [45]. Viene usato in clinica in quanto altamente biocompatibile, infatti stimola la migrazione, l'adesione e la proliferazione cellulare, e non provoca reazioni avverse come infiammazione e risposta immunitaria. Inoltre, è biodegradabile grazie all'azione enzimatica. Affinché sia stampato la temperatura deve essere bassa, mentre a temperatura corporea gelifica. Tuttavia questo materiale presenta una bassa forza meccanica e delle tempistiche di gelificazione lente, per questo motivo le sue applicazioni sono limitate [6]. Numerosi sono i prodotti commerciali a base di collagene, ad esempio i filler dermici, o le spugne utilizzate per la compressione, che in combinazione con la trombina umana fungono da emostatico [45].

1.5.5 Chitosano

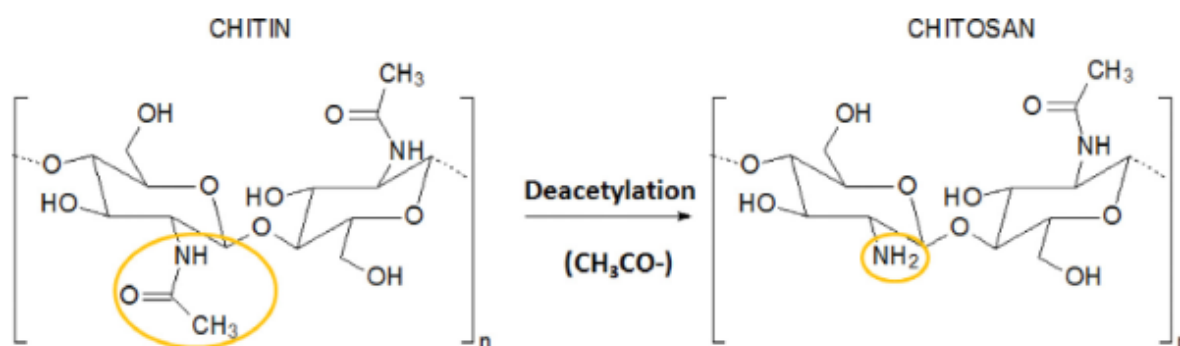


Figura 10: Struttura chimica della chitina e del chitosano [54]

Derivato per deacetilazione alcalina della chitina, componente principale dell'esoscheletro dei crostacei, il chitosano è un copolimero cationico di N-acetil-glucosamina e N-glucosamina (Figura 10) [54]. Questo polisaccaride è solubile in soluzioni acide diluite, come l'acido acetico o l'acido cloridrico, pertanto i gruppi amminici si protonano. È possibile formare idrogeli costituiti da reti *entangled*, reticolazioni ioniche/complessi polielettrolitici o da reticolazioni covalenti. La gelificazione del chitosano avviene aumentando il pH oppure adoperando un non solvente, ad esempio è possibile sfruttare come agente reticolante l'idrossido di sodio (NaOH). Questo polimero è biocompatibile, inoltre numerosi studi hanno evidenziato la possibilità di migliorare la bioattività tramite modifiche ioniche, covalenti o adsorbimento. Altra caratteristica è la biodegradabilità, è stato dimostrato che può essere metabolizzato da enzimi umani come il lisozima. La cinetica di degradazione dipende dal tipo di rete che costituisce l'idrogelo, nel caso delle reti covalenti bisogna tenere in considerazione non solo il tipo ma anche la densità del reticolante. Se la cinetica di degradazione è rapida, quella di gelificazione è lenta e questo unitamente alla ridotta resistenza

meccanica, fanno sì che il chitosano sia limitatamente impiegato. Tuttavia, grazie alle proprietà antibatteriche ed emostatiche, la *Food and Drug Administration* (FDA) ha approvato dei biomateriali a base di chitosano per uso topico nella guarigione delle ferite e come emostatici [6], [45], [49].

1.5.6 Fibroina della seta

Le proteine della seta sono prodotte da vari insetti come i bachi da seta, i ragni, le crisope, le lucciole. Nelle applicazioni biologiche si utilizzano principalmente le sete prodotte dai bachi da seta e dai ragni tessitori. In particolare le fibre della seta generata dai *Bombyx mori*, bachi che si nutrono di gelso, hanno proprietà superiori rispetto a quelle degli altri insetti [55]. Questa seta è costituita dalla combinazione di due componenti: la fibroina (70-80%) e la sericina (20-30%). La sericina funge da colla idrosolubile che avvolge e tiene insieme le fibre di fibroina, essendo generalmente solubile in acqua viene rimossa durante il processo di *degumming* [55], [56].

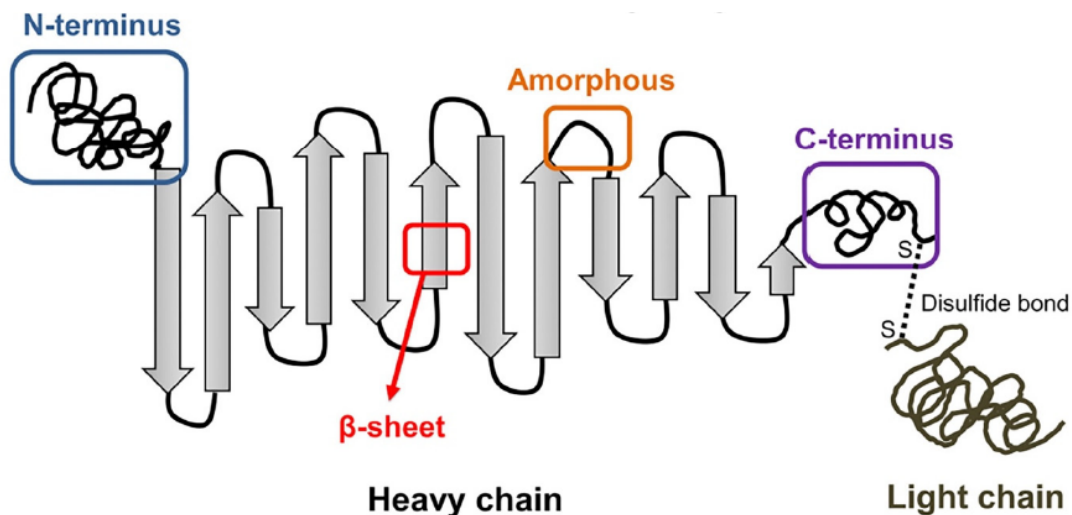


Figura 11: Diagramma schematico della struttura della fibroina della seta [55]

In Figura 11 è schematizzata la struttura della fibroina della seta, costituita da una catena pesante (350-390kDa), e una catena leggera (~26kDa), collegate tra loro da legami disolfuro, al complesso così formato si lega idrofobicamente la glicoproteina P25 (~25kDa) [55]. La principale sequenza amminoacidica è formata da glicina (Gly~43%), alanina (Ala~30%) e serina (Ser~12%). La catena pesante idrofobica è costituita dalle sequenze esapeptidiche di Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Ser, e dipeptidiche di Gly-X, dove la X può essere Ala, Ser, oppure tirosina (Tyr), che possono formare dei cristalli [55]. Mentre la catena pesante assume la conformazione a β -foglietto, la catena leggera non mostrando alcuna ripetizione della sequenza amminoacidica ha una struttura amorfa, e per questo è maggiormente idrofila e relativamente elastica [55], [57]. Grazie all'alternanza di grandi domini idrofobici e di piccoli domini idrofilici le fibre di seta presentano proprietà meccaniche eccezionali come l'elevata deformazione a rottura (4-26%), resistenza alla trazione (300-740MPa) e tenacità (70-

78MJ·m⁻³) [55]. Soprattutto la fibroina della seta è biocompatibile e biodegradabile, infatti da decenni è impiegata come materiale di sutura delle ferite [57]. Inoltre, grazie alla possibilità di essere modificata chimicamente trova impiego in un'ampia gamma di applicazioni biomediche [4], [56].

1.6 Fabbricazione di scaffold tramite tecnica di stampa 3D

I rivestimenti da applicare sulle ferite della cute possono essere realizzati con numerose metodologie differenti, come *spray coating*, *solvent casting*, *freeze-drying* ed *electrospinning*. Questi metodi di produzione sono detti “convenzionali”, in quanto non permettono di controllare le caratteristiche morfologiche impattanti sulle performance funzionali, quali la dimensione e la percentuale dei pori presenti. Recentemente hanno preso piede i metodi “non convenzionali”, ovvero di prototipazione rapida (RP), che hanno evidenziato un grande potenziale nella produzione controllata degli scaffold, dal punto di vista strutturale e geometrico [58]. La prototipazione rapida è una classe di tecnologie che permette di realizzare automaticamente un costrutto a partire da un modello di *computer-aided design* (CAD). Spesso sono indicate con il termine di *additive manufacturing* (AM), in quanto la filosofia del metodo consiste nella fabbricazione di oggetti aggiungendo materiale uno strato dopo l'altro [58]. Le tecniche di prototipazione adoperate in ambito medicale sono numerose, quella sulla quale viene focalizzata l'attenzione è il 3D printing, dato che è la tecnica impiegata in questo progetto di tesi. In ingegneria tissutale il 3D printing è preferibile alle tecniche convenzionali per via dei diversi vantaggi che presenta. Le tecniche di scansione permettono di ottenere innesti perfettamente corrispondenti al letto della ferita per forma e profondità. I numerosi materiali a disposizione, nei quali possono essere inglobati agenti biologici consentono di ricostruire strutture con morfologia e fisiologia simile alla pelle naturale. L'approccio della deposizione strato per strato può essere sfruttato per stampare direttamente *in situ*. Infine, la realizzazione di strutture porose interconnesse migliora lo scambio di nutrienti e gas e quindi supporta le attività cellulari [6]. Oggigiorno la stampa 3D è adoperata per creare diversi tessuti biologici, di interesse è la ricostruzione della cute, il processo di sviluppo della pelle ingegnerizzata può essere rappresentato dalla Figura 12.

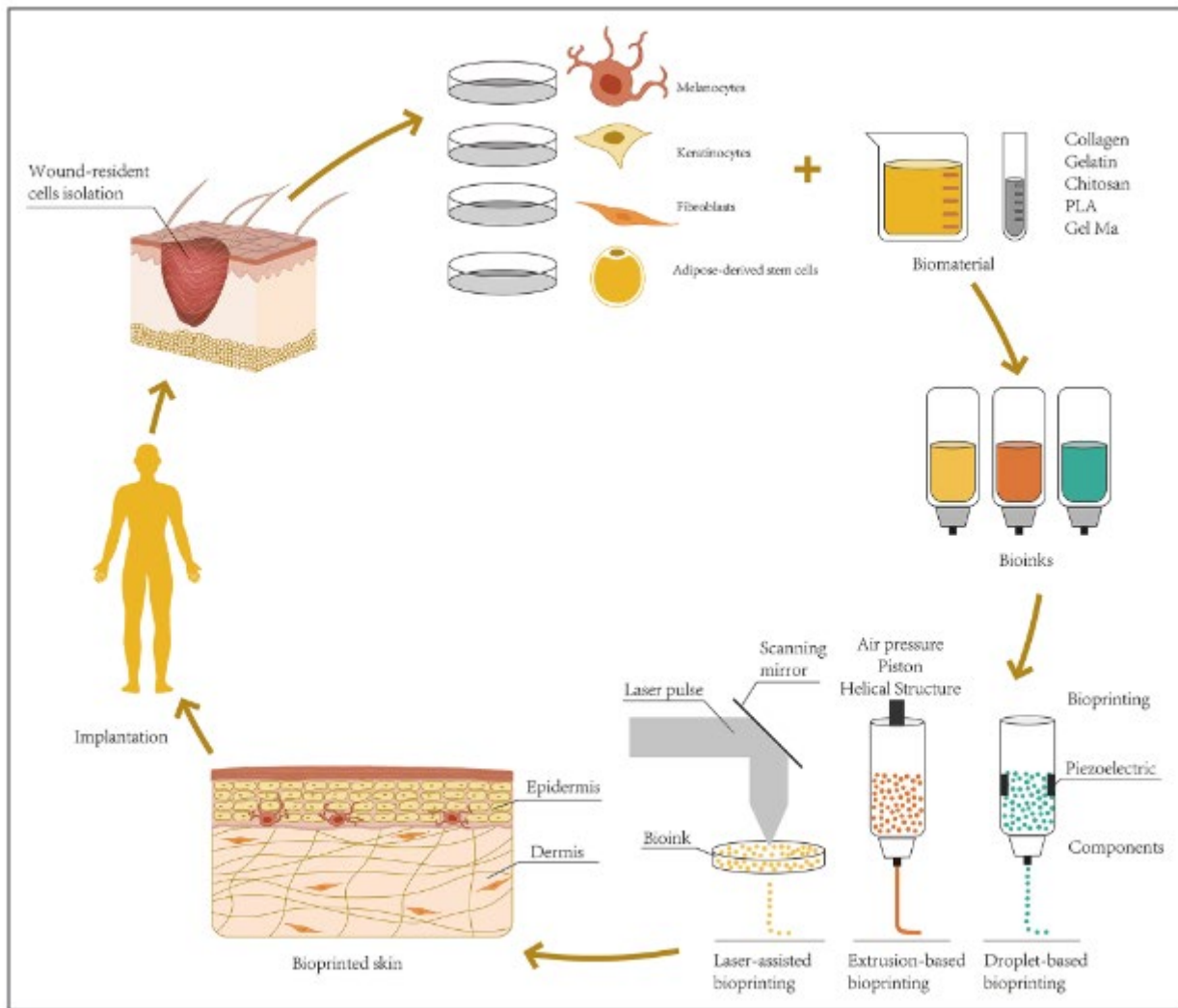


Figura 12: Rappresentazione schematica mediante la tecnica di 3D bioprinting di pelle ingegnerizzata [6]

1.6.1 La tecnica

La stampa 3D, definita come tecnologia di prototipazione rapida, permette di realizzare un costrutto 3D tramite deposizione sequenziale di strati di materiale, a partire da un modello CAD iniziale [6]. Per la realizzazione di scaffold 3D per la rigenerazione tissutale, la stampa 3D consente la combinazione del materiale con biomolecole, fattori di crescita e cellule, con lo scopo di mimare al meglio le caratteristiche composizionali e funzionali del tessuto da riprodurre [10]. Questa tecnica prevede la successione di tre fasi fondamentali (Figura 13): (1) *pre-processing*; (2) *processing*; (3) *post-processing*.

- (1) *Pre-processing*: in questa fase è importante pianificare nel dettaglio i passaggi successivi, in particolare gli step cardinali sono l'acquisizione delle immagini e la creazione del modello tridimensionale. Per procedere all'acquisizione delle immagini del sito di interesse è possibile usare i convenzionali metodi di imaging, come la risonanza magnetica (MRI), la tomografia

computerizzata (CT), o gli ultrasuoni. Successivamente si esegue la modellizzazione tramite opportuni software CAD e infine la conversione in file STL, formato tipico accettato dalla maggior parte delle stampanti.

- (2) *Processing*: questa fase si articola in due importanti passaggi. Il primo è la selezione e la conseguente preparazione del materiale da usare; il secondo consiste nello scegliere la tecnologia più adatta e procedere con la stampa.
- (3) *Post-processing*: l'ultima fase ingloba tutti gli step che vengono eseguiti al completamento del processo di stampa e prima dell'impianto del costruito realizzato [10].

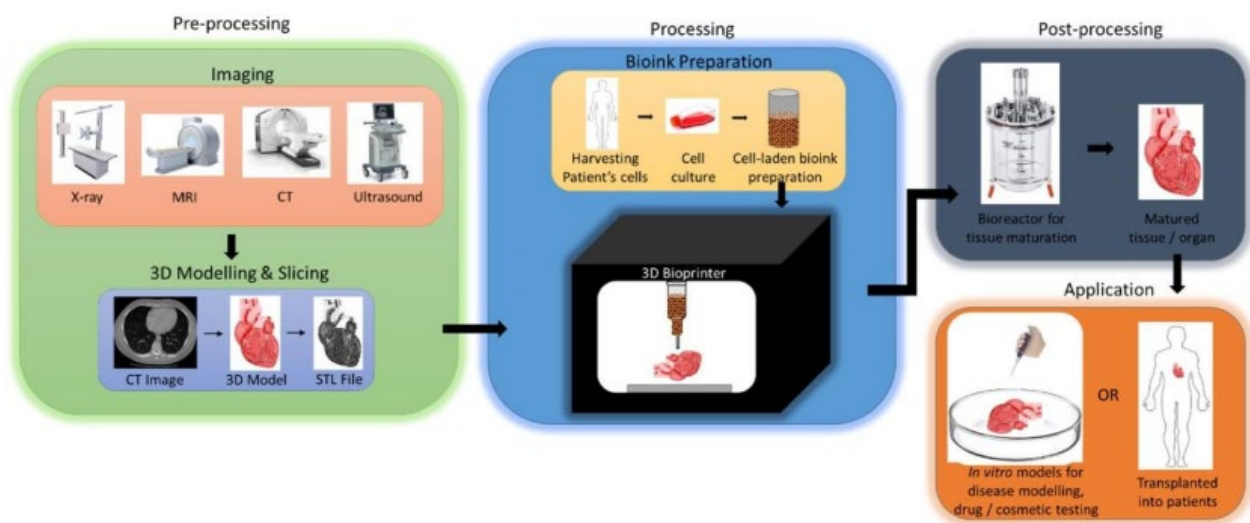


Figura 13: Rappresentazione schematica dei tre macro processi del 3D bioprinting, fino allo stadio finale di applicazione dei costrutti *in vitro* o *in vivo* [10]

Nella realizzazione dei tessuti ingegnerizzati è possibile distinguere due approcci di costruzione: *top-down* e *bottom-up* (Figura 14). L'approccio *top-down* consiste nella realizzazione dello scaffold sul quale saranno seminate e coltivate le cellule in modo da formare un tessuto. L'approccio *bottom-up* prevede di assemblare dei moduli già carichi di cellule in modo da creare il tessuto [49]. La distinzione tra i due approcci precedentemente descritti viene fatta sulla base dell'elemento chiave del processo di stampa, ovvero il materiale stampato. Per questo è innanzitutto necessario distinguere tra le due tipologie di inchiostro che è possibile adoperare: *biomaterial inks* e *bioinks*. I *biomaterial inks* sono stati definiti come “sostanze ingegnerizzate per assumere una forma che, da sola o come componente di una parte di un sistema complesso, vengono utilizzate per dirigere, controllare le interazioni con i componenti complessi dei sistemi viventi, il corso di qualsiasi procedura terapeutica o diagnostica, nell'uomo o in medicina veterinaria” [59]. In poche parole sono materiali biocompatibili che non contengono cellule, a differenza dei *bioinks* dove il termine “*bio*” sta proprio ad indicare la presenza di cellule all'interno della formulazione [60]. Più precisamente il *bioink* è “una formulazione di

cellule idonee al trattamento mediante una tecnologia di biofabbricazione automatizzata che può contenere anche componenti biologicamente attivi e biomateriali” [61]. Nel seguente progetto di tesi si è fatto uso di un *biomaterial ink* opportunamente sviluppato.

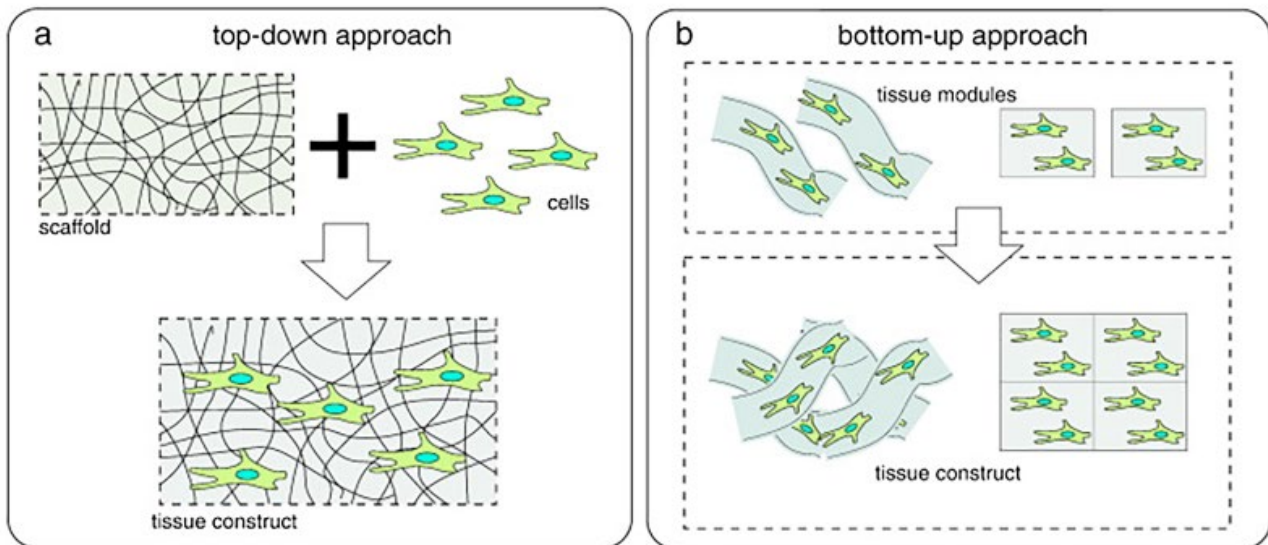


Figura 14: Diagrammi schematici degli approcci top-down e bottom-up [49]

Il secondo componente fondamentale è la tecnica di stampa, è possibile distinguere tre differenti metodologie: (1) le tecniche di stampa indotte da laser, (2) le tecniche drop-based e (3) le tecniche di robotic dispensing (Figura 15).

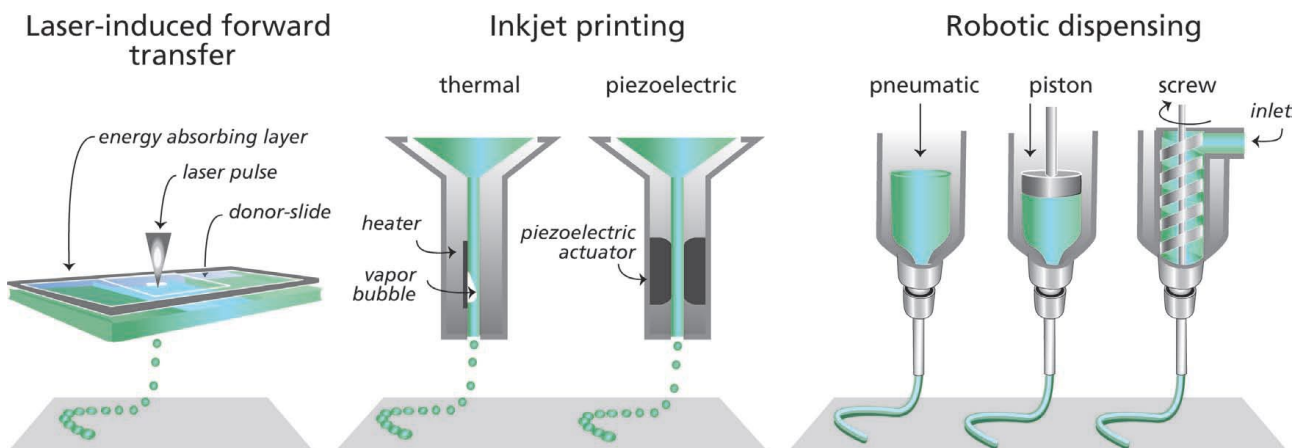


Figura 15: Rappresentazione schematica delle comuni tecnologie di bioprinting [62]

- (1) Le tecniche di stampa indotte da laser utilizzano l'energia laser monocromatica, pulsata o continua, che colpisce uno strato assorbente che evaporando genera un'elevata pressione di gas che spinge il materiale a depositarsi sul collettore. È una tecnica di non-contatto che non prevede l'uso di aghi, pertanto consente la deposizione precisa del materiale e senza problemi di intasamento dell'ugello. Con tale approccio possono essere stampati materiali la cui viscosità è bassa ($1-300 \text{ mPa}\cdot\text{s}^{-1}$), tuttavia pur garantendo un'elevata risoluzione sono richieste

elevate cinetiche di gelificazione necessarie a garantire la fedeltà di stampa. Inoltre il processo risulta lento, e le strutture che si possono realizzare hanno dimensioni limitate.

- (2) La tecnica *drop-based*, nota anche come stampa inkjet consiste nell'espulsione del materiale, attraverso l'ugello, sotto forma di gocce, per mezzo di un meccanismo termico oppure piezoelettrico. Il primo meccanismo prevede che un piccolo volume sia vaporizzato da un micro riscaldatore, in modo da creare una bolla di vapore che spinga il materiale a fuoriuscire. Il secondo consiste in un attuatore piezoelettrico che genera un impulso meccanico, che a sua volta provoca l'erogazione della goccia. Questa tecnica può essere usata con materiali con basse viscosità ($\max 0,1\text{Pa}\cdot\text{s}^{-1}$), inoltre essendo erogati piccoli volumi (1-100 picolitri) possono essere stampate soltanto strutture di piccole dimensioni. È possibile depositare il materiale con elevata precisione ma bisogna fare attenzione all'eventuale ostruzione dell'ugello.
- (3) La tecnica di *robotic dispensing* è quella più comunemente usata, e può sfruttare tre differenti sistemi di estrusione. L'estrusione pneumatica prevede di applicare la pressione sul materiale tramite un compressore. L'estrusione meccanica consiste in un pistone azionato da un motore. Infine, l'estrusione a vite consiste in una vite senza fine che girando su sé stessa regola la fuoriuscita del materiale. Tra i tre meccanismi quello meccanico consente di avere un controllo maggiore sul flusso del materiale, mentre quello a vite è adatto all'estrusione di materiali termoplastici o altamente viscosi che non contengano cellule, in quanto potrebbero essere danneggiate dagli stress di taglio elevati. È possibile utilizzare materiali e *bioinks* con un più ampio range di viscosità inoltre, le velocità di processo e le dimensioni dei costrutti che si realizzano sono notevolmente maggiori se confrontate con le metodologie precedenti. Lo svantaggio principale è che le risoluzioni di stampa si aggirano attorno ai 100-200 μm , inferiori a quelle *laser-based* e di inkjet [10], [62].

Tabella 3: Confronto delle metodologie di stampa e dei loro parametri di lavoro [10], [62]

Tipo di Bioprinting	Laser-Assisted	Inkjet	Extrusion-Based
Principio di lavoro	Il laser viene attivato per spingere il materiale sul collettore	Meccanismo che genera pressione sul materiale che è espulso in gocce	Deposizione di materiale mediante estrusore motorizzato
Viscosità del materiale	1 - 300 $\text{mPa}\cdot\text{s}^{-1}$	3,5 - 12 $\text{mPa}\cdot\text{s}^{-1}$	30 - $6\cdot 10^7$ $\text{mPa}\cdot\text{s}^{-1}$
Risoluzione	Elevata	Elevata	Bassa
Velocità di fabbricazione	Media	Rapida	Lenta
Costo di stampa	Elevato	Basso	Medio

Scalabilità	Limitata	Si	Si
Vantaggi	Nozzle-free	Ampiamente accessibile	Dimensione dei costrutti maggiori
Svantaggi	Dimensione limitata dei costrutti	Ostruzione dell'ago	Bassa vitalità cellulare

È possibile combinare due o più tecnologie di stampa, ad esempio la tecnica dell'inkjet con quella ad estrusione, per realizzare delle strutture complesse ma maggiormente versatili [58].

1.6.2 Scaffold stampati per rigenerazione cutanea

Le tecniche di stampa 3D si sono evolute notevolmente nel corso degli ultimi dieci anni, dimostrando la loro grande potenzialità nell'essere adottate nella ricostruzione di costrutti per la rigenerazione dei principali sistemi dell'organismo. La maggior parte della ricerca che ha coinvolto la stampa 3D riguardava soprattutto le ossa e la cartilagine, ma recentemente sono state sviluppate numerose tecniche per la realizzazione di pelle ingegnerizzata [58]. La stampa di pelle ingegnerizzata può essere di grande aiuto per il trattamento delle lesioni dovute a traumi, ustioni o patologie pregresse [10]. Data l'elevata complessità dell'apparato tegumentario ad oggi, non è stato ancora realizzato un sostituto ingegnerizzato che lo replichi nella sua interezza sia morfologica che funzionale. Sono tuttavia presenti numerosi studi, che sfruttando questa tecnica, hanno ricostruito strati della pelle o in cui sono stati implementate alcune caratteristiche.

Lee et al. furono i primi a depositare cheratinociti e fibroblasti in una struttura stratificata realizzata tramite stampa 3D, impiegando come materiale un idrogelo costituito da un precursore del collagene, alternando uno strato di materiale a uno di cellule. I test hanno mostrato che le cellule mantenevano la loro morfologia, tuttavia la risoluzione di stampa (ottimale di 300µm) ha influito sulla proliferazione cellulare. A stampare la prima pelle *in vivo* sono stati *Binder et al.*, basandosi sulle informazioni di larghezza e profondità ottenute dalla scansione della ferita. Il sostituto cutaneo, stampato tramite il meccanismo di inkjet, era composto da collagene, fibrinogeno, cheratinociti, e fibroblasti. Le analisi eseguite hanno mostrato che dopo otto settimane dall'impianto era possibile ottenere una completa epitelizzazione, più rapida rispetto ai controlli formati da una matrice allogenica. A usare la tecnica basata sul laser furono *Koch et al.* per stampare le cellule su una matrice di collagene ed elastina. L'elevata risoluzione, associata alla tecnica, ha promosso la vitalità cellulare e le attività di proliferazione e differenziamento. I risultati sono sempre più promettenti grazie anche allo sviluppo di tecnologie sofisticate. Un esempio è il lavoro di *Cubo et al.* che ha portato allo sviluppo di una stampante per estrusione con quattro siringhe in modo da consentire la stampa di un sostituto di pelle in 35 minuti, dimostrando il grande potenziale delle applicazioni *in vivo* di questa tecnologia [31]. Invece, nel replicare il derma è importante riprodurre le caratteristiche di elasticità e

flessibilità. In questo ambito si inserisce il lavoro di *Ng et al.* che ha stampato un costrutto adoperando un idrogel polielettrolitico a base di gelatina e chitosano (PGC), che mostrava buona stampabilità, elevata fedeltà di stampa e una buona compatibilità con i fibroblasti [6]. In alcuni lavori l'obiettivo era quello di realizzare delle pelli a strati completi, ad esempio bistrato (epidermide-derma) o addirittura tristrato (epidermide-derma-ipoderma). In questi casi sono stati realizzati scaffold composti da materiali naturali o sintetici oppure da una loro combinazione. Spesso si utilizza il collagene, componente principale della matrice extracellulare, a cui può essere associato la fibrina, componente del sangue. Queste strutture sono state riempite di fibroblasti, mentre la superficie è stata colonizzata dai cheratinociti in modo da simulare il derma rivestito dall'epidermide. Nel caso si volesse mimare anche l'ipoderma, al di sotto del costrutto si andrebbe ad aggiungere un ulteriore scaffold in cui far proliferare adipociti e cellule mesenchimali [51]. Frequente è l'uso del *bioink* costituito da collagene, cheratinociti e fibroblasti, nel lavoro di *Lee et al.* particolare attenzione è stata fatta nell'ottimizzazione dei parametri di stampa per assicurare la massima vitalità e densità cellulare. I test eseguiti hanno mostrato che il tessuto stampato era morfologicamente simile a quello nativo [6]. Il lavoro citato e quelli successivi portati avanti dallo stesso gruppo utilizzavano la tecnica di stampa inkjet, che infatti è stata la prima tecnologia sfruttata per la creazione di pelle. Tuttavia questo meccanismo consente di stampare 1cm² di pelle per ora, questa velocità ridotta impedisce di considerare tale metodo per applicazioni cliniche e commerciali [51]. Il metodo di estrusione è più semplice e rapido, permette di produrre numerosi strati contenenti o meno cellule [51]. Numerosi sforzi si stanno compiendo anche nel campo della vascolarizzazione dei costrutti, caratteristica fondamentale per la sopravvivenza dell'innesto. I vasi sanguigni, non solo sono necessari per la sopravvivenza di quelle strutture che presentano uno spessore maggiore dei 100-200µm, ma anche alla rigenerazione dei nervi che costituiscono il sistema sensoriale. In questo settore si inserisce l'attività di ricerca condotta da *Xiong et al.*, i quali hanno stampato uno scaffold a base di gelatina e fibroina della seta, quest'ultima modificata per aumentare le proprietà idrofiliche, in cui è stato incorporato il fattore FGF-2. In questo modo è stato possibile migliorare il tasso di proliferazione, la formazione delle fibrille di collagene e dei vasi sanguigni, e di conseguenza la morfologia del tessuto [6]. La ricerca continua a progredire con l'obiettivo di migliorare i risultati ottenuti e implementare ulteriori caratteristiche quali la pigmentazione, per far sì che gli innesti siano dello stesso colore della pelle del paziente da trattare, e la ricostruzione dei follicoli piliferi e delle ghiandole sudoripare importanti per ripristinare le funzioni termoregolatrici.

Attraverso l'uso di diversi metodi di stampa e lo sviluppo di materiali ibridi è possibile creare dei sostituti di pelle che presentino una qualità strutturale e funzionale tale da aprire la strada ad

applicazioni cliniche ed industriali. Ovviamente gli innesti dovrebbero essere sempre più complessi per poter svolgere a pieno il loro ruolo. Per fare ciò è necessario ottimizzare i processi di stampa, combinare più tecniche e impiegare nuovi materiali, mentre ad oggi nella maggior degli esperimenti si impiega principalmente collagene [51].

La stampa 3D ha numerosi vantaggi come l'elevata risoluzione, la ripetibilità, la flessibilità, ed è ad alto rendimento. Tuttavia presenta ancora delle problematiche, legate specialmente al materiale di stampa. È stato ribadito che la pelle è un organo dalle caratteristiche fisiche e meccaniche uniche e per questo è importante selezionare accuratamente il biomateriale, che inoltre dovrà presentare attributi compatibili con il processo di stampa [6]. La rigenerazione della pelle tramite l'utilizzo delle tecnologie di stampa tridimensionale è ancora agli esordi, è innegabile il grande potenziale dei benefici che si possono ottenere grazie al controllo dell'architettura a livello micro/nano-metrico data la struttura stratificata e anisotropa della pelle [31].

È in questo ambito che si inserisce il presente progetto di tesi, il cui fine è stampare degli scaffold da applicare nella rigenerazione delle ferite cutanee. A questo scopo è stata sviluppata una miscela polimerica a base di collagene, chitosano e fibroina della seta. Questo nuovo materiale è stato perfezionato per essere impiegato nella stampa di strutture 3D tramite la tecnica dell'estrusione pneumatica, adeguatamente ottimizzata.

2. MATERIALI E METODI

Il seguente lavoro di tesi ha come obiettivo lo sviluppo di una nuova formulazione polimerica da impiegare nella produzione di scaffold tramite tecniche di stampa 3D, per possibili applicazioni nella rigenerazione delle ferite cutanee. Pertanto, nel seguente capitolo verranno riportati i materiali e i processi di produzione utilizzati, e le diverse caratterizzazioni effettuate sul materiale e sui costrutti finali.

2.1 Preparazione delle formulazioni

2.1.1 Protocollo di preparazione della formulazione a base collagene, chitosano e fibroina della seta (Col/Chi/Fib)

Per lo sviluppo della miscela polimerica, indicata con l'acronimo Col/Chi/Fib, sono stati adoperati i seguenti materiali: collagene di tipo I di origine murina (NOVAICOS S.r.l., Novara), chitosano a basso peso molecolare (Sigma-Aldrich), fibroina della seta (Xi'an Neo Biotech Co., LTD, China). Numerosi studi hanno utilizzato in combinazione collagene e chitosano, evidenziando la possibilità di adoperare come solvente comune l'acido acetico (AA) [63], [64]. Infatti, il collagene è una proteina che viene normalmente solubilizzata a pH acido, mentre il chitosano è un polisaccaride solubile in acidi diluiti con conseguente protonazione dei gruppi amminici [65]. Pertanto, per disciogliere i seguenti polimeri è stata impiegata una soluzione di acido acetico allo 0,5M (Sigma-Aldrich) in acqua (dH₂O).

Per la realizzazione della miscela Col/Chi/Fib, è stato necessario testare per ciascun polimero differenti concentrazioni, di cui qui di seguito sono riportati i range:

- Collagene: 2%-4% (w/v);
- Chitosano: 4%-8% (w/v);
- Fibroina della seta: 0,5%-10% (w/v).

Successivamente sono stati valutati i rapporti volumetrici 1:1 e 2:1, tra la soluzione di collagene e quella di chitosano. I risultati, discussi in seguito, hanno determinato la realizzazione della formulazione Col/Chi/Fib, con rapporto volumetrico 2:1 delle soluzioni 4% (w/v) collagene e 5% (w/v) chitosano, in quest'ultima sono disperse le polveri di fibroina della seta di modo che nella formulazione finale si abbia il 4% (w/v) della proteina. Il protocollo di realizzazione può essere

suddiviso in due fasi, la prima consiste nella preparazione in parallelo delle due soluzioni, mentre nella seconda fase si procede al loro miscelamento (Figura 16).

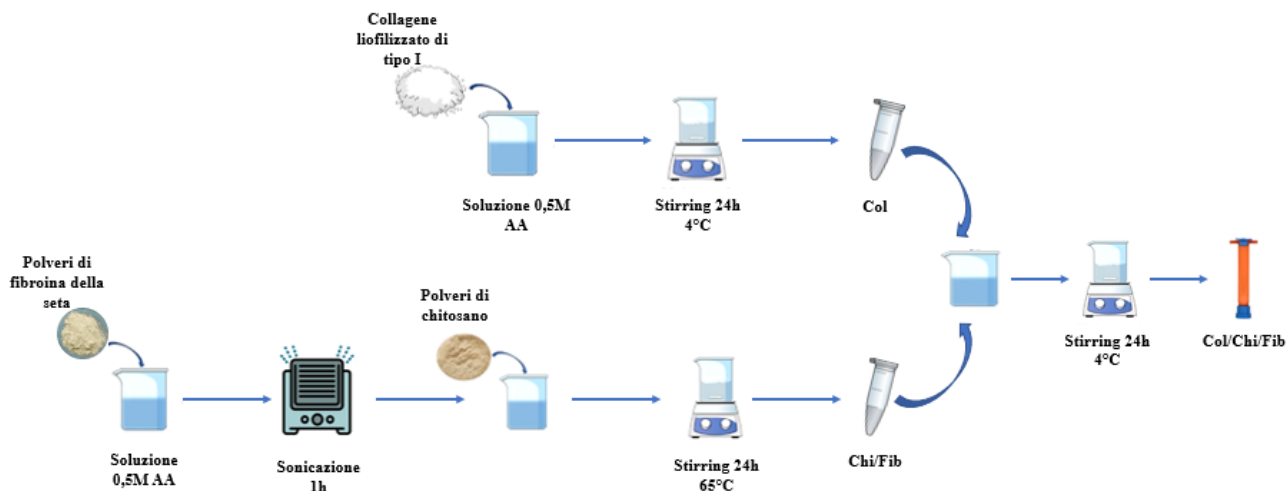


Figura 16: Schema di preparazione della formulazione Col/Chi/Fib

Il collagene è stato opportunamente pesato e successivamente solubilizzato all'interno di una soluzione 0,5M di AA, al fine di ottenere una concentrazione pari al 4% in peso. La completa dissoluzione è stata ottenuta tramite l'uso di un agitatore magnetico, impostato a 100rpm per tutta la notte. Per evitare la denaturazione della proteina è stata mantenuta una temperatura pari a 4°C. In parallelo è stata preparata la sospensione di polveri di fibroina della seta in 0,5M AA tramite sonicazione per 1 ora. Alla sospensione sono state aggiunte le polveri di chitosano, opportunamente pesate, la cui dissoluzione è stata favorita mediante l'uso di un agitatore magnetico per tutta la notte a 700rpm, mantenendo una di temperatura di 65°C. Infine la soluzione di chitosano e fibroina della seta (Chi/Fib) è stata lasciata raffreddare fino al raggiungimento dei 4°C. Le due soluzioni sono state unite e omogeneizzate tramite l'uso di una piastra magnetica a 300rpm per la notte, alla temperatura di 4°C.

2.1.2 Protocollo di preparazione della formulazione polimerica fotoreticolabile (ColMA/Chi/Fib)

La seconda formulazione preparata, indicata da qui in avanti con l'acronimo ColMA/Chi/Fib, si differenzia da quella precedentemente descritta nel Paragrafo 2.1.1 per la sostituzione del collagene con del collagene metacrilato (ColMA) di tipo I (Cellink) e l'aggiunta del fotoiniziatore Irgacure 2959 (I2959) (Advanced BioMatrix), per ottenere una formulazione finale reticolabile tramite radiazione UV.

Sulla base di precedenti lavori di letteratura, una soluzione stock del fotoiniziatore I2959 pari al 1% (w/v) è stata preparata disciogliendo le polveri, opportunamente pesate, all'interno di una soluzione 0,5M di AA [66]. La dissoluzione è stata favorita adoperando uno *stirrer*, impostando una velocità di

300rpm. Dato il successivo miscelamento con la soluzione di collagene, anche la soluzione stock è stata conservata alla temperatura di 4°C.

Il protocollo di preparazione della formulazione ColMA/Chi/Fib è analogo a quello indicato nel Paragrafo 2.1.1 per la Col/Chi/Fib. Nella prima fase si è proceduto alla preparazione in parallelo delle soluzioni polimeriche di collagene metacrilato al 4% (w/v) in 0,5M di AA, e della sospensione di polveri di fibroina della seta in 0,5M di AA all'interno della quale sono state solubilizzate le polveri di chitosano in modo da avere il 5% (w/v). Nella seconda fase si è proceduto al miscelamento delle soluzioni polimeriche e all'aggiunta della soluzione di I2959, in modo tale che la sua concentrazione finale nella formulazione sia pari allo 0,1% (w/v) (Figura 17). Data la presenza del collagene metacrilato e del fotoiniziatore per evitare che l'interazione accidentale con le radiazioni luminose causasse la polimerizzazione della miscela tutti i becher adoperati sono stati schermati tramite l'uso di fogli di alluminio.

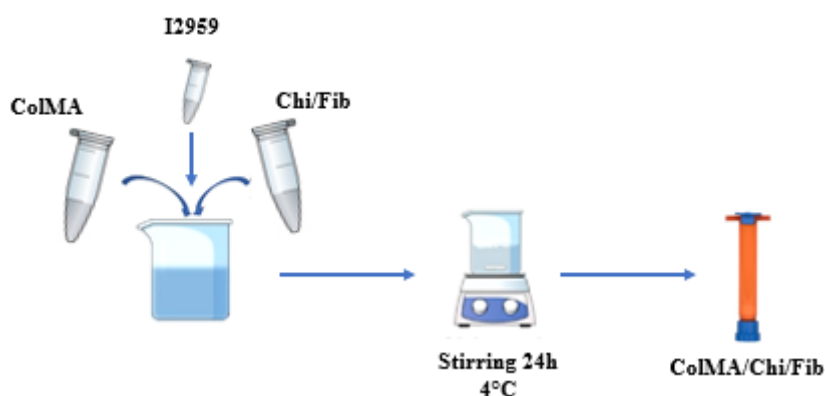


Figura 17: Schema di preparazione della formulazione ColMA/Chi/Fib

2.2 Strategie di reticolazione

Diverse strategie di reticolazione sono state valutate sia durante che dopo il processo di stampa con l'obiettivo di migliorare le proprietà meccaniche e la stabilità del materiale polimerico e quindi dello scaffold finale.

La reticolazione di un polimero consiste nella formazione di legami, fisici o chimici, tra le catene polimeriche. Questo processo causa la variazione di alcune delle proprietà fisiche del materiale, ad esempio si verifica l'incremento delle proprietà meccaniche e il rallentamento dei processi degradativi [67]. I metodi di reticolazione sono principalmente due:

- *Reticolazione fisica*: consiste nella regolazione di parametri quali pressione, temperatura, pH per innescare la formazione di interazioni intermolecolari reversibili.

- *Reticolazione chimica*: si adoperano agenti chimici, naturali o di sintesi, per innescare la formazione di legami permanenti [68].

In questo lavoro, due strategie sono state valutate per stabilizzare il materiale durante il processo di stampa: la prima ha considerato la reticolazione fisica mediante l'uso di una soluzione di idrossido di sodio (NaOH), mentre la seconda ha valutato un processo di fotoreticolazione tramite l'uso di un fotoiniziatore citocompatibile (I2959). In aggiunta, come ulteriore metodo di reticolazione a seguito del processo di stampa, un bagno di genipina in etanolo è stato usato per migliorare ulteriormente la stabilità e le proprietà meccaniche degli scaffold. I protocolli seguiti per effettuare la reticolazione delle strutture stampate sono descritti nei paragrafi successivi.

2.2.1 Reticolazione tramite idrossido di sodio (NaOH)

Data la presenza del chitosano nella miscela Col/Chi/Fib, è stato possibile sfruttare la neutralizzazione del pH per innescare il processo di gelificazione ionica, mediante l'uso di un mezzo basico come NaOH [69]. Il chitosano è dotato di gruppi NH₂ che in condizioni di pH acido si protonano, permettendo il discioglimento del polimero. Se il pH viene reso neutro o basico le cariche si perdono e si verifica la gelificazione della soluzione. Sulla base del protocollo riportato nel lavoro di *Zhang et al.*, le polveri di NaOH (Sigma-Aldrich) sono state disciolte all'interno di una soluzione al 30% (v/v) di etanolo (EtOH) (Sigma-Aldrich) in dH₂O, in modo da ottenere una concentrazione pari al 12% in peso [70]. La soluzione reticolante è stata spruzzata manualmente durante il processo di stampa, a seguito della deposizione di ciascuno strato. Al termine della stampa, per incrementare ulteriormente la reticolazione, la soluzione coagulante a base di NaOH è stata nuovamente spruzzata sulla superficie degli scaffold.

2.2.2 Fotoreticolazione tramite radiazione ultravioletta (UV)

La preparazione della formulazione ColMA/Chi/Fib ha permesso di sfruttare la radiazione ultravioletta per ottenere la reticolazione chimica degli scaffold. Questo meccanismo consiste nella rapida formazione di legami forti e permanenti a seguito dell'esposizione alla luce [68]. La fotopolimerizzazione è correlata alla presenza dei gruppi metacrilati, legami insaturi altamente reattivi, in grado di promuovere la crescita della catena dei radicali liberi quando irradiati. Questi gruppi presenti nel ColMA, permettono la fotoreticolazione lasciando invariate le caratteristiche del collagene [66]. Per promuovere il meccanismo di fotoreticolazione è stato quindi necessario introdurre un fotoiniziatore. In questo lavoro è stato selezionato l'uso di (2-idrossi-1-[4-(2-idrossietossi) fenil]-2-metil-1-il propanone (Irgacure 2959) (Figura 18). Questo è un fotoiniziatore

radicalico di tipo I, costituito da monomeri insaturi e/o prepolimeri, sensibile ad una lunghezza d'onda di 365nm, all'interno della banda della radiazione UV (270nm–370nm). Questo fotoiniziatore è ampiamente usato per la reticolazione di biomateriali in quanto risulta citocompatibile a basse concentrazioni [66], [71].

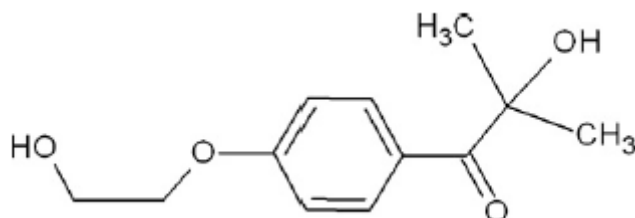


Figura 18: Struttura chimica dell'Irgacure 2959 [71]

L'applicazione della radiazione ultravioletta è stata effettuata confrontando due metodi: l'uso di una torcia UV a 365nm esterna e l'uso di una testina per fotoreticolazione UV (dotata di led a 365nm) montata direttamente sulla stampante utilizzata per le prove di stampa (BIOX, Cellink).

L'uso della torcia richiede l'azione dell'operatore, il quale durante l'intero processo e al termine della stampa deve irraggiare la struttura in costruzione. Invece, la testina per fotoreticolazione UV, fornita con la BIOX, viene montata parallelamente alla testina di estrusione come secondo tool. In questo modo il processo risulta automatizzato, dato che una volta impostati i parametri sarà la stampante a gestire l'attivazione del led. L'obiettivo è preservare la geometria e le dimensioni della struttura evitando il collasso durante e al termine della stampa, per questo è necessario massimizzare la fotoreticolazione. Pertanto, i parametri del processo di reticolazione sono stati ottimizzati a seguito di uno studio reologico delle cinetiche di reticolazione (come riportato in Sezione 2.3.1) valutando parametri come tempo di esposizione, posizione della testina di reticolazione e distanza dal materiale. I risultati di questo studio (discussi nel Capitolo 3), hanno stabilito che si procedesse all'esposizione luminosa per un tempo pari a 120 secondi, posizionando la testina centralmente e alla distanza di 1 cm a seguito della deposizione di ciascuno strato. Inoltre, una volta terminata la stampa si irraggia l'intera struttura per un ulteriore periodo della durata di 5 minuti.

2.2.3 Reticolazione con genipina

Le tecniche di reticolazione precedentemente descritte sono state implementate al fine di ottenere una reticolazione pressoché istantanea ed evitare il collasso del materiale depositato durante il processo di stampa.

Come ulteriore strategia di reticolazione, una soluzione di genipina (Challenge Bioproducts Co., Ltd) è stata impiegata per incrementare le proprietà meccaniche dello scaffold una volta stampato e ridurre le cinetiche di degradazione [64]. La genipina (GE) è un agente reticolante naturale, che promuove la formazione di legami covalenti tra le catene di chitosano e quelle di collagene (Figura 19).

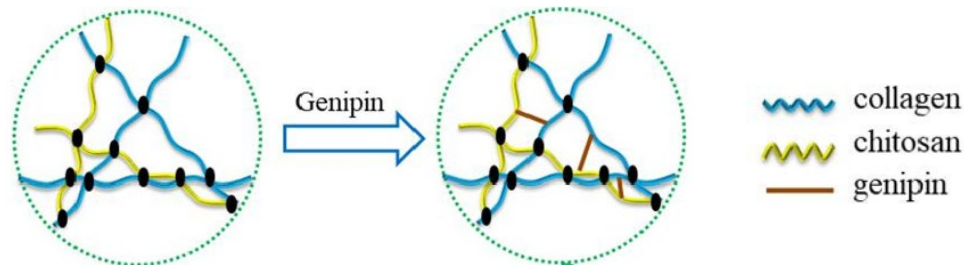


Figura 19: Diagramma schematico dell'azione della genipina [64]

Sulla base di un protocollo precedentemente ottimizzato dal gruppo di ricerca, la soluzione reticolante è stata preparata ottenendo una concentrazione di 0,5% (w/v) di polveri di genipina in 70% (v/v) etanolo [72]. Gli scaffold sono stati incubati a 37°C nella soluzione di genipina per 24 ore, al termine delle quali sono stati lavati per due volte con dH₂O per eliminare l'eventuale presenza di residui. Questo metodo è stato applicato sulle strutture realizzate per la caratterizzazione reologica e sugli scaffold stampati.

2.3 Metodi di caratterizzazione

2.3.1 Analisi reologiche

La reologia studia la deformazione e lo scorrimento dei materiali, siano essi solidi o fluidi, a seguito dell'applicazione di forze esterne in diverse condizioni ambientali. Di particolare interesse è il comportamento dei materiali viscoelastici, i quali presentano caratteristiche intermedie ai solidi elastici e ai fluidi viscosi. La risposta, ad uno sforzo o ad una deformazione istantanea e indipendente dal tempo, per i solidi e i fluidi viscosi non è funzione del tempo, al contrario la risposta dei materiali viscoelastici è tempo dipendente [73].

Per eseguire gli studi reologici è stato usato un reometro rotazionale, strumento ad alta precisione in grado di registrare la risposta di un campione soggetto ad uno specifico sforzo, esprimendola in termini di parametri reologici quali viscosità e modulo complesso [74]. Per l'analisi delle proprietà viscoelastiche di un materiale, possono essere utilizzate diverse geometrie di misura (Figura 20):

- *Reometri a cilindri coassiali*: costituiti da un recipiente esterno che contiene un cilindro, nell'intercapedine si inserisce il materiale da esaminare. Per misurare la viscosità il cilindro viene messo in rotazione, il materiale oppone una certa resistenza che di conseguenza impone

al recipiente esterno una certa rotazione. Dalla misura della velocità angolare del recipiente è possibile determinare la viscosità in quanto proporzionali. Si utilizza per materiali il cui valore di viscosità è basso.

- *Reometri piatto-cono*: il materiale da studiare è disposto tra una superficie piana e un cono dal vertice troncato, assemblati su un asse di simmetria comune. Uno dei due viene messo in rotazione. Si adopera per materiali che raggiungono valori di viscosità elevati.
- *Reometri piatto-piatto*: permettono un caricamento del campione più agevole, lavorano in un intervallo di velocità di taglio (*shear rate*) analogo a quello dei reometri piatto-cono, ma a differenza dei precedenti lo sforzo di taglio non rimane costante su tutto il campione. Si usa per materiali con un range di viscosità molto ampio, fino ai solidi morbidi [75], [76].

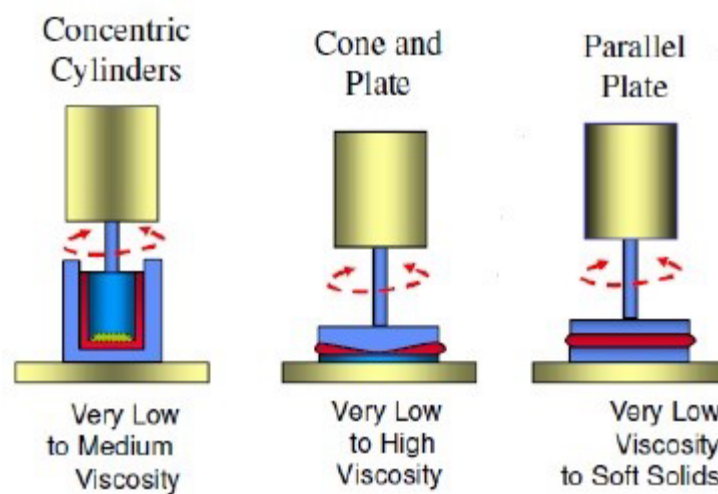


Figura 20: Geometrie dei reometri disponibili [76]

In questo lavoro di tesi, tutte le analisi sono state eseguite utilizzando il reometro rotazionale a sollecitazione controllata DHR-2 (TA Instruments, Waters), dotato di geometria a piatti paralleli del diametro di 20mm e di un sistema Peltier per il controllo della temperatura (Figura 21).



Figura 21: Reometro rotazionale DHR-2

I test che permettono di analizzare le proprietà dei materiali possono essere eseguiti in tre differenti condizioni:

- *Flusso*: (rotazione continua della geometria) consente di indagare le variazioni di viscosità all'applicazione di diversi stress o velocità di taglio (*shear rate*), ed in funzione del tempo e della temperatura. La viscosità η risultante del materiale è misurata considerando l'equazione in Figura 22, che dipende da fattori quali: coppia applicata M (Nm); costante geometrica K_σ ($2/\pi r^3$), dove r è il raggio della geometria; velocità angolare del motore Ω (rad/s); costante geometrica K_γ (r/h), con r raggio della geometria e h la distanza tra la geometria e il piatto di caricamento del campione.

$$\eta = \frac{\sigma}{\dot{\gamma}} = \frac{M \cdot K_\sigma}{\Omega \cdot K_\gamma}$$

The diagram shows the equation $\eta = \frac{\sigma}{\dot{\gamma}} = \frac{M \cdot K_\sigma}{\Omega \cdot K_\gamma}$. The variables are grouped into four categories, each in a colored box below the equation:

- Rheological Parameter**: η (green box)
- Constitutive Equation**: $\frac{\sigma}{\dot{\gamma}}$ (green box)
- Raw rheometer Specifications**: M and Ω (orange box)
- Geometric Shape Constants**: K_σ and K_γ (blue box)

Figura 22: Equazione della viscosità [76]

- *Sollecitazione oscillatoria*: rende possibile la determinazione di parametri viscoelastici, quali il modulo di conservazione (G') e il modulo di perdita (G''), e la loro dipendenza dal tempo, dalla frequenza e dall'ampiezza di oscillazione. Il modulo viscoelastico risultante (G^*) del materiale viene misurato tramite l'equazione costitutiva in Figura 23, che dipende da i seguenti fattori: coppia applicata M (Nm); costante geometrica K_σ ($2/\pi r^3$), con r raggio della geometria; deformazione angolare del motore Θ (rad); costante geometrica K_γ (r/h), con r raggio della geometria e h la distanza tra la geometria e il piatto di caricamento del campione.

$$G = \frac{\sigma}{\gamma} = \frac{M \cdot K_\sigma}{\Theta \cdot K_\gamma}$$

The diagram shows the equation $G = \frac{\sigma}{\gamma} = \frac{M \cdot K_\sigma}{\Theta \cdot K_\gamma}$. The variables are grouped into four categories, each in a colored box below the equation:

- Rheological Parameter**: G (green box)
- Constitutive Equation**: $\frac{\sigma}{\gamma}$ (green box)
- Raw rheometer Specifications**: M and Θ (orange box)
- Geometric Shape Constants**: K_σ and K_γ (blue box)

Figura 23: Equazione del modulo viscoelastico [76]

- *Transitorio*: permette di osservare la risposta di un materiale sottoposto a stress costanti e il recupero a stress nullo.

Tutti i test reologici sono stati eseguiti in triplicato, impostando una distanza compresa tra 300 μm e 1500 μm tra il piatto di deposizione del materiale e la geometria a seconda del volume del campione (definito come gap di misura). Di seguito sono elencate le analisi eseguite:

- Le prove di flusso (*flow ramp*) permettono di esaminare la viscosità e il suo andamento. Sono condotte a 10°C, variando la velocità di taglio nel range tra 0,1s⁻¹ e 1000s⁻¹.
- Le analisi *peak hold* sono eseguite per simulare il processo di stampa ed esaminare il recupero del materiale dopo la deposizione (rimozione della sollecitazione). Per questo test i valori di velocità di taglio sono stati settati a 100s⁻¹ (100s) e 0,1s⁻¹ (300s) in modo da simulare rispettivamente l'estrusione e la deposizione, mantenendo una temperatura costante di 10°C.

Le proprietà viscoelastiche dei sistemi sviluppati prima e dopo la reticolazione sono state investigate mediante analisi in oscillazione, che hanno permesso di monitorare i valori e i cambiamenti dei moduli di conservazione (G') e di perdita (G'') in diverse condizioni di stress e temperatura. Per le analisi eseguite in regime oscillatorio sono stati realizzati campioni *bulk* di 20mm di diametro, sulla base della geometria di misura utilizzati. Di seguito sono indicati i test eseguiti:

- L'*amplitude sweep* test ha consentito di verificare le variazioni dei moduli di conservazione (G') e perdita (G'') a seguito del trattamento di reticolazione in genipina. L'analisi è stata eseguita alla temperatura di 37°C, impostando una variazione della deformazione tra 0,01% e 10% e una frequenza costante di 1 Hz.
- La rampa di temperatura (*temperature ramp*) ha permesso di determinare la temperatura di denaturazione del materiale associata alla forte diminuzione del modulo viscoelastico complessivo (G*). La prova è stata eseguita tra 25°C e 80°C, applicando una deformazione pari a 0,1%, una frequenza di 1 Hz e con una velocità di salita di 3°C/min.

Dato lo sviluppo di un materiale fotoreticolabile, è stato necessario analizzare l'evoluzione delle proprietà viscoelastiche a seguito dell'esposizione alla radiazione UV. In particolare, si è andati a testare diversi tempi di esposizione. Per l'esecuzione di queste prove è stato impiegato un accessorio che tramite una fibra ottica e uno specchio riflettente trasferisce la radiazione ultravioletta prodotta da una sorgente a mercurio ad una piastra in quarzo di 20mm di diametro (Figura 24).

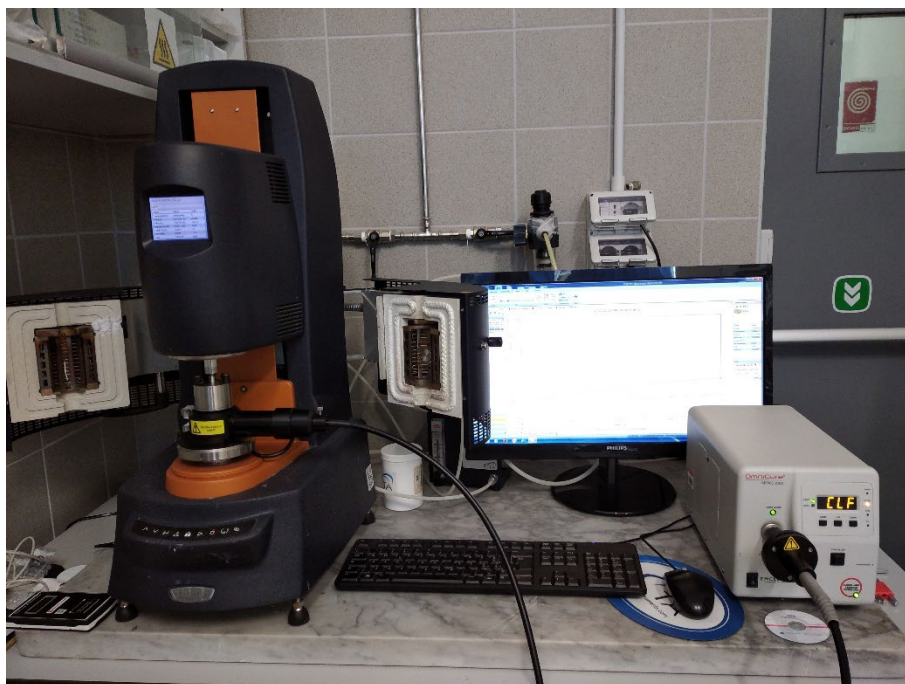


Figura 24: Reometro rotazionale DHR-2 con montato l'accessorio per il trasferimento della radiazione UV

I test di *UV curing* hanno consentito di ottenere le cinetiche di polimerizzazione tramite test in oscillazione, applicando una deformazione pari allo 0,5%, 1Hz, a temperatura ambiente. Le formulazioni poste sul cristallo di quarzo sono state irradiate mediante luce UV a 365nm, a 45mM/cm², sia per 120s che per 420s.

In Tabella 4 sono riassunti i sistemi testati e le proprietà investigate, per ciascun esperimento condotto.

Tabella 4: Indice delle prove reologiche

TEST REOLOGICO	SISTEMA TESTATO	PROPRIETA' REOLOGICA ESAMINATA
<i>Flow ramp test</i> (10°C)	2%-4%Col; 4%-5%Chi; Mix 1:1-2:1 ColChi; Mix ChiFib; Col/Chi/Fib; ColMA/Chi/Fib	Viscosità
<i>Peak hold test</i> (10°C)	ColMA/Chi/Fib	Recupero della viscosità a seguito della rimozione dello stress (<i>shear recovery</i>)
<i>Amplitude sweep test</i> (37°C)	ColMA/Chi/Fib	Rigidezza del materiale (G', G'');
<i>Temperature ramp test</i> (25°-80°C)	ColMA/Chi/Fib	Temperatura di denaturazione (G', G'')
<i>UV curing test</i> (25°C)	4% ColMA; ColMA/Chi/Fib	Cinetiche di fotoreticolazione e rigidezza del materiale (G', G'')

2.3.2 Analisi morfologiche tramite microscopia a scansione elettronica (SEM)

La microscopia a scansione elettronica è una tecnica non distruttiva che sfrutta le interazioni che si generano tra un fascio di elettroni incidenti e la superficie del campione per ottenere informazioni di tipo morfologico e composizionale. La Figura 25 mostra la struttura di un microscopio a scansione elettronica (SEM), costituito da una colonna di altezza variabile e dalla camera di alloggiamento dei campioni. All'interno della colonna è situata la sorgente, un filamento metallico (es. tungsteno, esaboruro di cerio, esaboruro di lantanio) portato ad alte temperature, che per effetto termoionico emette un fascio di elettroni. Questi elettroni, detti primari, vengono accelerati grazie all'applicazione di una differenza di potenziale tra 0,5kV e 30kV. Tramite un sistema di lenti elettromagnetiche il fascio è indirizzato verso la superficie del campione. Incidendo sulla superficie del campione, gli elettroni diffondono andando a generare i seguenti segnali:

- *Elettroni retrodiffusi*: generati dall'interazione elastica tra il fascio e i nuclei degli atomi del campione, vengono raccolti dal backscatter detector (BSD) che restituisce un'immagine composizionale.
- *Elettroni secondari*: generati a seguito dell'interazione anelastica tra il fascio e il campione. Tale interazione causa la perdita di parte dell'energia, pertanto soltanto gli elettroni secondari prodotti dall'incidenza degli elettroni primari sulla superficie sono in grado di emergere e raggiungere il detector, fornendo informazioni topografiche.
- *Raggi X*: vengono raccolti dal detector (EDS) ed essendo contraddistinti da un'energia caratteristica permettono di identificare gli elementi che costituiscono il campione [77].

Affinché si ottengano immagini di buona qualità all'interno della camera viene applicato il vuoto, in questo modo si evita l'interazione indesiderata tra il fascio di elettroni primari e le particelle dell'atmosfera. Inoltre, è necessario che i campioni presentino una superficie conduttiva.

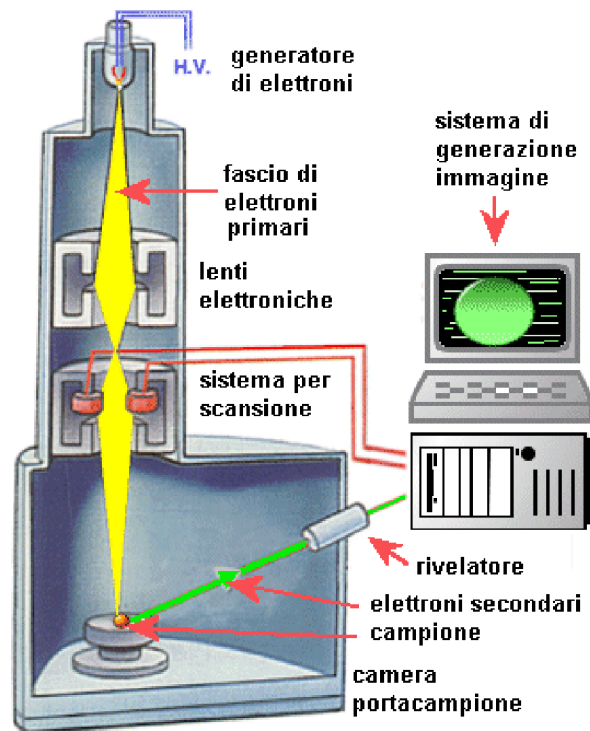


Figura 25: Schema generale di funzionamento di un SEM [77]

Nel seguente progetto di tesi, per la valutazione morfologica delle strutture stampate, sono state acquisite immagini SEM tramite l'uso di un microscopio elettronico a scansione Phenom XL (Phenom-World B.V., Paesi Bassi) a diversi ingrandimenti (300x, 500x, 1000x, 2500x, 5000x). Per consentire l'analisi, i campioni sono stati liofilizzati tramite un liofilizzatore Lyovapor L-200 (Büchi, Svizzera) e successivamente metallizzati creando un rivestimento in platino pari a 7 nm, usando una macchina Cressington Sputter Coater 180.

2.3.3 Analisi chimica mediante spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier in riflettanza totale attenuata (FTIR-ATR)

La spettroscopia ad infrarossi a trasformata di Fourier in riflettanza totale attenuata (FTIR-ATR) è una tecnica spettroscopica di assorbimento che permette di comprendere la struttura delle singole molecole e la composizione delle miscele. La regione dello spettro elettromagnetico che si adopera è quello corrispondente alla radiazione infrarossa (IR), compreso tra la regione del visibile e le microonde, ed in particolare la regione inclusa tra i 4000cm^{-1} e i 400cm^{-1} che consente la caratterizzazione chimico/fisica. Quando una radiazione infrarossa (tra i 10000cm^{-1} e i 100cm^{-1}) investe una molecola, l'energia ceduta viene convertita in energia vibrazionale. Le molecole possono vibrare fondamentalmente in due modi: moto di *stretching* e moto di *bending*. I moti di *stretching* sono dovuti allo stiramento ritmico lungo l'asse di legame, con conseguente aumento o diminuzione della distanza interatomica. I moti di *bending* sono dovuti alla variazione dell'angolo di legame

oppure al movimento di un gruppo di atomi rispetto alla restante parte della molecola. Lo spettro IR si presenta come una sequenza di bande di assorbimento (picchi) espresse in funzione della lunghezza d'onda. I picchi possono avere diversa intensità, esprimibile in termini di assorbanza o trasmittanza. Nella FTIR-ATR il campione da esaminare è disposto su di un prisma formato da un materiale ad elevato indice di rifrazione per le radiazioni infrarosse. Ad ogni riflessione il raggio penetra nel materiale ed in parte viene assorbito. Dopo alcune riflessioni il raggio ha intensità tale da poter essere rilevato dall'interferometro, che trasforma l'onda nella curva chiamata interferogramma, in cui l'assorbimento è espresso in funzione del tempo. Successivamente, il software associato allo strumento calcola la trasformata di Fourier trasformando l'interferogramma nello spettro IR in funzione del numero d'onda (Figura 26) [78], [79].

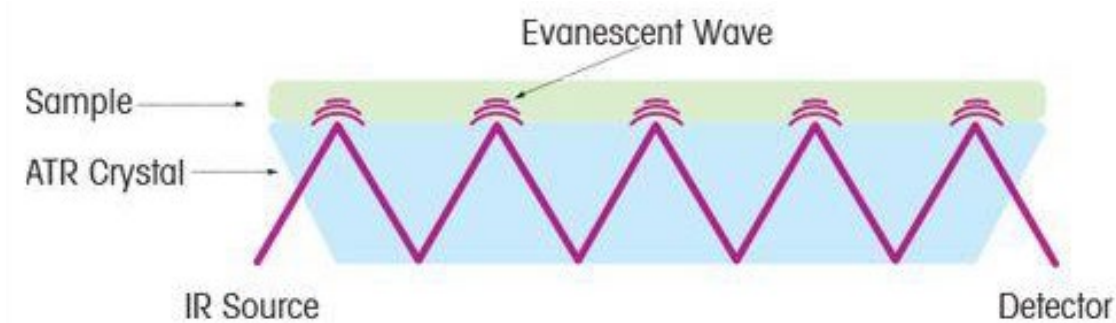


Figura 26: Principio di funzionamento della tecnica ATR [78]

In questo lavoro di tesi lo spettrometro Bruker Equinox 55 è stato utilizzato per ottenere gli spettri FTIR dei singoli polimeri e delle formulazioni Col/Chi/Fib e ColMA/Chi/Fib prima e dopo i trattamenti di fotoreticolazione UV e reticolazione tramite genipina.

2.4 Processo di stampa 3D

Il materiale sviluppato è stato adoperato per la realizzazione di strutture tridimensionali mediante l'uso di una biostampante commerciale, modello BIOX della CELLINK, sfruttando in particolare una testina a estrusione pneumatica. Tale stampante è dotata di tre tools per il collegamento di un massimo di tre testine da adoperare contemporaneamente. In Figura 27 è mostrato il setup utilizzato per la deposizione del materiale.

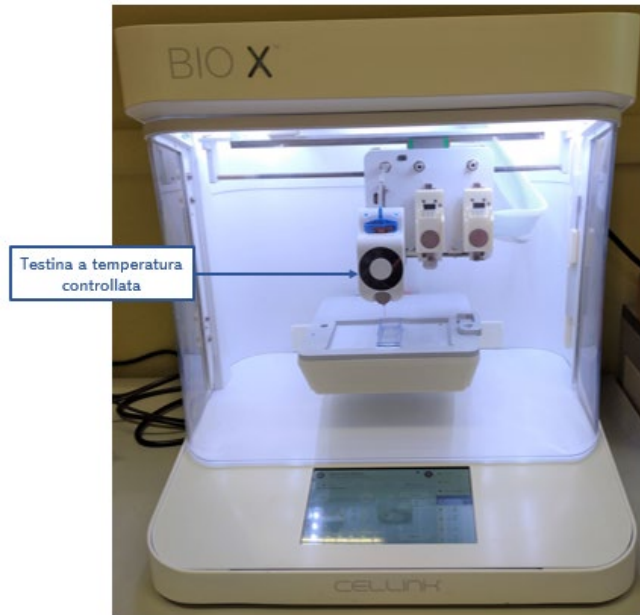


Figura 27: BIO X (Cellink) con montata la testina a temperatura controllata per l'estrusione del materiale

L'estrusione del materiale avviene per mezzo di una testina a temperatura controllata, impostando i seguenti parametri:

- *Pressione*: parametro che regola il flusso di materiale, impostato sulla base delle proprietà viscoelastiche del materiale e regolato in accordo alla velocità di movimento della testina. Sono state testate le pressioni nell'intervallo compreso tra 110kPa e 190kPa.
- *Velocità*: deve essere regolata in base al flusso di materiale in modo tale da ottenere dei filamenti delle dimensioni del diametro interno dell'ago selezionato. Il range testato è compreso tra 1mm/s e 5mm/s.
- *Diametro dell'ago*: regola la dimensione del filamento stampato. Per stampare strutture ad elevata risoluzione è opportuno selezionare diametri piccoli. Tuttavia va considerato che a diametri inferiori sono associati sforzi e velocità di taglio applicati al materiale maggiori. Sono stati adoperati aghi metallici delle dimensioni di 27G (diametro interno 200 μ m) e 25G (diametro interno 250 μ m).
- *Riempimento dello strato (infill)*: consiste nella percentuale di riempimento di ogni strato e permette di definire il percorso seguito dalla testina. Le strutture stampate presentano una densità di riempimento variabile tra il 10% e il 50%. Sono state valutate anche condizioni estreme pari allo 0% (stampa del perimetro) e 100% (stampa del campione *bulk*).
- *Spessore dello strato (z step)*: essenziale per l'adesione tra gli strati successivi e decisivo nella fedeltà di stampa. Tenzionalmente si impiega un valore dello z step tra il 60-70% del diametro interno dell'ago, in quanto determina una buona adesione.

- *Temperatura (testina e piatto di deposizione)*: selezionata in base al materiale usato, è possibile scegliere tra valori compresi tra 0°C e 65°C. La temperatura, sia per la testina che per il piatto, è stata impostata a 10°C.

Nella Tabella 5 sono indicati i valori impostati per la realizzazione delle strutture a base di Col/Chi/Fib e ColMA/Chi/Fib a seguito dell'ottimizzazione del processo.

Tabella 5: Parametri di stampa ottimizzati

Pressione	120 kPa
Velocità	2 mm/s
Diametro dell'ago	25 G
Infill	20%-40%; 100%
Z step	70%
Temperatura (testina e piatto)	10°C

Come introdotto nella Sezione 2.2.2, la fotopolimerizzazione del materiale tramite UV durante il processo di stampa è stato consentito e valutato tramite l'uso di due strumenti: la torcia UV a 365nm esterna e la testina fornita con la stampante BIOX (dotata di led a 365nm).

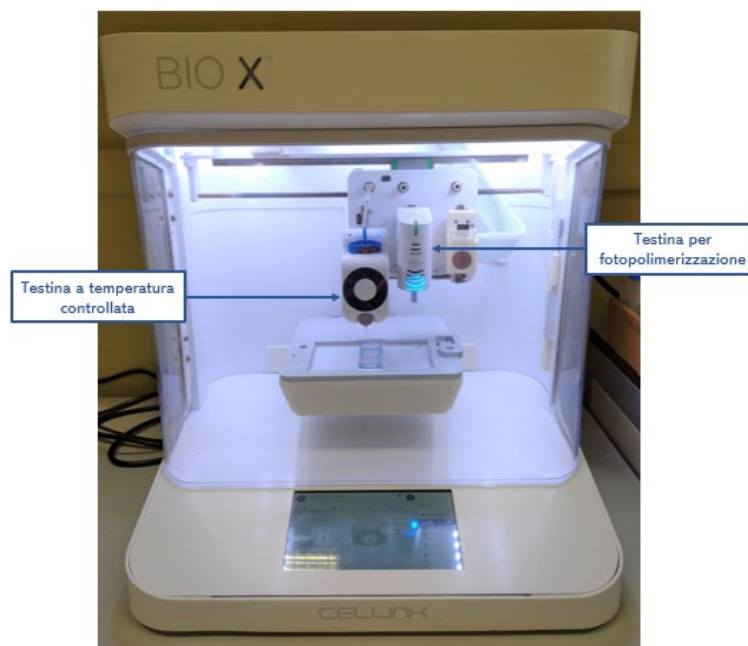


Figura 28: BIOX (Cellink) con montata la testina a temperatura controllata per l'estrusione, la testina per fotopolimerizzazione per la reticolazione con UV

Per quanto riguarda l'uso della testina fotoreticolante montata direttamente sulla stampante (Figura 28), si è valutata l'impostazione dei seguenti parametri:

- *Intensità*: è la quantità di energia irradiata dall'unità di superficie nell'unità di tempo. Nella BIOX questo parametro è espresso in percentuale. Sono state valutate percentuali di intensità tra il 20% e il 100%.

- *Distanza dal letto di deposizione*: strettamente legato alla percentuale di irraggiamento. La stampante utilizzata permette di settare una distanza compresa tra 1-6 cm, sono state valutate distanze non superiori ai 3cm.
- *Tempo di irraggiamento*: è il tempo di attivazione della sorgente ultravioletta. Durante il processo di stampa è stata valutata l'attivazione per periodo compreso tra 1 e 120 s.
- *Frequenza*: indica se irraggiare una volta soltanto oppure al termine della deposizione di ogni strato.
- *Localizzazione*: la testina può essere posizionata al centro della struttura, oppure può irraggiare spostandosi secondo delle linee parallele.

Nella Tabella 6 sono riportati parametri selezionati a seguito dell'ottimizzazione del processo.

Tabella 6: Parametri di UV curing ottimizzati

Intensità	100%
Distanza testina-piatto	1 cm
Tempo irraggiamento	120s
Frequenza	ogni strato
Localizzazione	centrale

Le strutture sono state stampate sulla base di un modello 3D digitale di scaffold quadrato (10x10mm), con dimensione variabile tra 0,3mm e 1mm. Il modello è stato selezionato dai file STL della libreria fornita dal produttore della biostampante. Lo schema interno a griglia è stato stampato con una densità di riempimento variabile tra il 10% e il 50%. Nelle prove preliminari si è adoperata una densità pari allo 0% in modo tale da stampare unicamente il perimetro invece, nella stampa dei campioni *bulk* si è utilizzata una densità di riempimento pari al 100%. Dopo l'ottimizzazione dei parametri di stampa, sono stati selezionati dei modelli giroidali con complessità superiore alle griglie, in modo da ottenere scaffold con morfologie adeguate alla realizzazione di supporti per la rigenerazione cutanea.

La valutazione della fedeltà di stampa sugli assi x, y e z è stata eseguita sottoponendo i costrutti tridimensionali ad ispezione visiva ed imaging, al termine del processo di stampa e fotoreticolazione ed a seguito della reticolazione chimica. Le immagini ottenute sono state analizzate tramite il software ImageJ. Per ogni scaffold sono state raccolte le misure dei lati della geometria e dei singoli filamenti (selezionando cinque misure per ogni scaffold) (Figura 29), i valori sono stati presentati come media e deviazione standard.

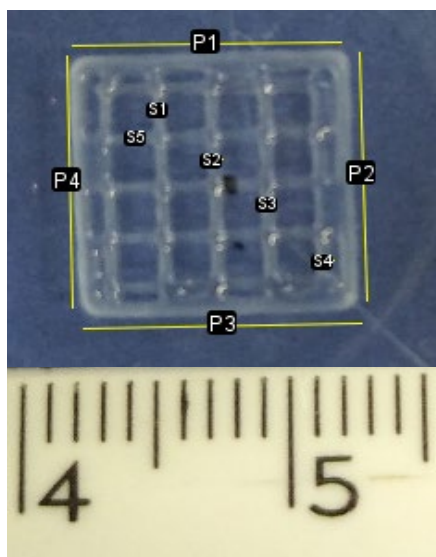


Figura 29: Immagine dei punti di riferimento della misura considerati per tutti gli scaffold valutati al termine della stampa e della fotopolimerizzazione, e dopo la reticolazione chimica

2.5 Test di degradazione *in vitro*

Per verificare l'efficacia dei metodi di reticolazione e quindi definire la stabilità degli scaffold finali è stato condotto un test di degradazione *in vitro*. Mediante il processo di stampa sono stati preparati 12 campioni, aventi struttura quadrata 10x10x1mm, con geometria giroidale e riempimento pari al 40%. La fotoreticolazione degli scaffold è stata ottenuta per mezzo della testina UV, impostando i parametri indicati nella Sezione 2.4 ed irraggiando per ulteriori 5 minuti al termine del processo. Successivamente gli scaffold sono stati incubati nella soluzione di genipina in EtOH, come riportato nella Sezione 2.2.3.

La degradazione degli scaffold è stata valutata a seguito dell'incubazione dei campioni in 3ml di D-PBS, a 37°C, in condizioni di agitazione blanda (50rpm), a differenti step temporali (3, 7 e 14 giorni). A ciascuno step temporale, i campioni sono stati risciacquati con dH₂O, congelati e liofilizzati. Infine, sono stati accuratamente pesati per rilevare il peso a seguito della degradazione idrolitica. La percentuale di peso perso è stata calcolata per mezzo della seguente formula:

$$W = [(W_0 - W_d)/W_0] \cdot 100$$

nella quale W_0 è la massa iniziale del campione, ottenuta pesando a seguito della liofilizzazione i campioni non trattati con D-PBS, W_d è la massa dopo il processo degradativo, e W è la percentuale di peso perso. Per ciascuno step temporale sono stati considerati 3 campioni, ed il risultato è stato riportato come media \pm la deviazione standard.

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

In questo capitolo verranno presentati e discussi i risultati delle analisi condotte per ottenere l'ottimizzazione delle formulazioni polimeriche e degli scaffold stampati. Tutte le prove condotte sono state fondamentali per lo sviluppo del materiale finale e per l'ottimizzazione del processo di produzione dello scaffold in modo da garantire caratteristiche adeguate alla potenziale futura applicazione nell'ambito della rigenerazione delle ferite cutanee.

In dettaglio, verranno presentati e discussi i dati relativi allo sviluppo della formulazione polimerica a base di collagene di tipo I, chitosano e fibroina, nota come Col/Chi/Fib. Saranno poi presentate le ragioni che hanno determinato la successiva modifica della formulazione in ColMA/Chi/Fib, con l'introduzione del collagene metacrilato e del fotoiniziatore Irgacure 2959.

Le formulazioni polimeriche sviluppate sono state ampiamente caratterizzate da analisi reologiche, in condizione di flusso e di oscillazione, e da analisi chimiche condotte mediante spettroscopia a infrarossi in riflettanza totale attenuata (FTIR-ATR). Le formulazioni sono state ottimizzate in modo da rendere possibile l'uso della tecnica di stampa 3D ad estrusione senza essere vincolati all'uso di bagni di supporto. Sulla base di queste considerazioni verranno quindi riportate le valutazioni sui diversi parametri di stampa e l'identificazione dei parametri di processo per ottenere alta precisione della struttura stampata.

In parallelo verranno discussi i diversi effetti ottenuti sul materiale polimerico sfruttando differenti strategie di reticolazione sia durante che al termine del processo di stampa, in modo da ottenere scaffold maneggiabili, con geometria e dimensioni corrispondenti a quelle del modello CAD selezionato. In ultimo verranno riportate le caratteristiche degli scaffold ottimizzati e opportunamente analizzati dal punto di vista morfologico tramite microscopia a scansione elettronica (SEM) e chimico-fisico tramite analisi FTIR-ATR. Saranno discussi infine i risultati relativi al test di degradazione idrolitica a cui sono stati sottoposti gli scaffold per la valutazione delle cinetiche degradative.

3.1 Sviluppo e stampa della formulazione a base collagene, chitosano e fibroina della seta (Col/Chi/Fib)

In questa sezione verrà descritto lo sviluppo, la caratterizzazione e la stampa della formulazione polimerica realizzata, nota come Col/Chi/Fib, il cui protocollo di preparazione è stato specificato nella Sezione 2.1.1.

I polimeri naturali sono ampiamente adoperati nella rigenerazione delle ferite cutanee grazie alla loro biocompatibilità, biodegradabilità e somiglianza con la matrice extracellulare nativa [46]. Per questa ragione sono ampiamente utilizzati nello sviluppo di sostituti cutanei i polimeri naturali quali collagene, chitosano e fibroina della seta. Il collagene è ampiamente utilizzato nell'ingegneria tissutale, data la sua cospicua presenza nell'ECM nativa e la capacità di fornire forza meccanica e segnali per l'adesione cellulare. Ad oggi, in ambito commerciale esistono medicazioni a base di collagene raccomandate per il trattamento di ferite parziali [46]. Tuttavia, questa proteina usata da sola presenta proprietà meccaniche relativamente deboli e una cinetica di degradazione particolarmente rapida. Al contrario, il chitosano rappresenta un materiale di supporto eccellente per la rigenerazione in quanto biocompatibile e biodegradabile, con ridotta immunogenicità, e caratterizzato da velocità di degradazione più lente rispetto al collagene. Alle caratteristiche elencate bisogna aggiungere le proprietà emostatiche, antibatteriche ed antinfiammatorie [46]. La combinazione dei due polimeri permette di inibire la rapida degradazione associata al collagene, e di migliorare la biocompatibilità del chitosano [64]. Per questa ragione la miscela ibrida di collagene e chitosano, con caratteristiche molto simili a quelle della matrice extracellulare è estensivamente studiata con l'intento di realizzare un *biomaterial ink*. Ad oggi, la principale problematica nel voler processare questa miscela con la tecnica della stampa 3D rimane quella di garantire accuratezza elevata nella deposizione del filamento [6]. Una volta che il materiale è stato depositato secondo la geometria impostata è fondamentale che mantenga tale forma. Tuttavia i due polimeri vengono estensivamente adoperati sotto forma di idrogeli, caratterizzati da un elevato contenuto di acqua che rende le strutture instabili. Una soluzione per ovviare a questo problema prevede l'uso di un bagno di supporto sacrificale. Il materiale con cui viene realizzato il bagno deve possedere proprietà reologiche tali da consentire la deposizione e il mantenimento delle caratteristiche del filamento depositato, oltre che il supporto di tutta la struttura stampata senza interferire con il movimento dell'ago [72]. Nonostante ciò questo metodo presenta delle limitazioni, bisogna considerare l'ingombro della testina, le dimensioni dell'ago e della struttura che si desidera realizzare in modo tale da selezionare il contenitore adeguato. Limitazione più importante è la selezione del materiale da impiegare come bagno sacrificale, il quale oltre alle proprietà reologiche adeguate, deve essere biocompatibile e facile da poter rimuovere senza danneggiare la struttura stampata al suo interno. Ad esempio quando si adopera il collagene il bagno di supporto viene realizzato in gelatina grazie all'opposto comportamento al variare della temperatura. Infatti, incubando a 37°C mentre si promuove la reticolazione fisica del collagene, la gelatina liquefa e può essere rimossa [72].

In questo progetto di tesi ci si è proposti di realizzare un materiale che potesse essere stampato evitando l'utilizzo di un bagno di supporto sacrificale. Dallo studio della letteratura è emersa la possibilità di incrementare le proprietà reologiche e la stampabilità della miscela combinata di collagene e chitosano grazie all'aggiunta di un ulteriore polimero naturale, ovvero la fibroina della seta. Infatti, alcuni studi hanno evidenziato la capacità di questa proteina di incrementare la viscosità, la biocompatibilità e la stabilità del materiale al quale aggiunte sottoforma di particelle o fibre [70]. Ad oggi questa proteina è ampiamente adoperata nella realizzazione di medicazioni per ferite cutanee grazie alle proprietà di biocompatibilità, biodegradabilità, flessibilità, adesione, assorbimento degli essudati e minima reazione infiammatoria [46].

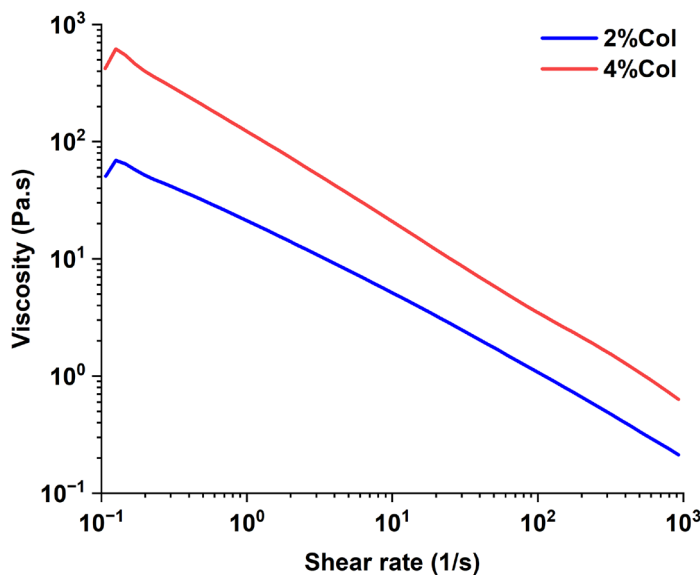
Dallo studio della letteratura è emerso l'utilizzo combinato di collagene e chitosano, mentre la fibroina della seta è solitamente accoppiata ad uno soltanto dei due polimeri citati. Si è quindi provato a sviluppare una miscela che li contenesse tutti e che di conseguenza potesse essere stampata senza l'ausilio di bagni di supporto. Per questa ragione, inizialmente sono stati valutati i singoli materiali al fine di stabilire le concentrazioni più adatte. Successivamente, i diversi polimeri sono stati combinati ottimizzando concentrazioni e rapporti tra le varie componenti con l'obiettivo di ottenere una formulazione polimerica adatta alla stampa 3D ad estrusione ed in grado di garantire una buona fedeltà di stampa senza l'uso di materiali o bagni di supporto. Per definire la formulazione finale, le proprietà reologiche di ogni soluzione polimerica e delle diverse miscele sono state studiate in modo da definire la variazione della viscosità del materiale in un ampio range di sollecitazioni. I diversi test sono stati condotti per esplorare l'estrudibilità e la stabilità del materiale, simulando le prestazioni durante le diverse fasi del processo di stampa.

3.1.1 Soluzioni di Collagene

Con l'obiettivo di ottenere la massima viscosità possibile da garantire la stabilità del filamento una volta stampato sono state valutate crescenti concentrazioni di collagene in un range compreso tra il 2% e il 4%. Le soluzioni di collagene sono state preparate disciogliendo le polveri in una soluzione di acido acetico 0,5M. Per il collagene sono state preparate due soluzioni in 0,5M di AA, rispettivamente al 2% e al 4% in peso. Le concentrazioni da analizzare sono state selezionate sulla base del lavoro di *Suo et al.*, il quale ha valutato le proprietà reologiche e la stampabilità di bioinchiostri costituiti da diverse proporzioni di collagene e chitosano [64]. Secondo tale studio, le soluzioni di collagene con concentrazioni comprese tra il 2-4% sono adatte ad essere miscelate con soluzioni di chitosano anch'esse con concentrazioni tra il 2-4% in modo da ottenere un filamento.

Concentrazioni minori causano la formazione di goccioline mentre, concentrazioni maggiori non sono estrudibili [64].

Dalla Figura 30 è possibile osservare che entrambe le soluzioni presentano un comportamento pseudo plastico, ossia una diminuzione del valore di viscosità del materiale all'aumentare dello stress e della velocità di deformazione. La viscosità diminuisce infatti da un valore di 69,24 Pa·s ad un valore di 0,21 Pa·s per la soluzione al 2% di collagene, mentre decresce da un valore di 619,18 Pa·s ad un valore di 0,63 Pa·s per la soluzione al 4% di collagene, come riportato in Tabella 7. Si può inoltre notare come l'aumento della concentrazione di collagene porti ad un evidente aumento della viscosità della soluzione di circa 69 Pa·s a 619 Pa·s, pur mantenendo il comportamento pseudo plastico. Il comportamento pseudo plastico e un valore di viscosità elevato sono parametri importanti per un materiale sviluppato per stampa 3D in quanto la pseudo plasticità permette l'estrusione delle soluzioni polimeriche attraverso aghi di piccolo diametro, diminuendo la resistenza al flusso invece, un valore elevato di viscosità è indice di un numero elevato di intrecci e legami all'interno del materiale, di conseguenza sarà minore la deformazione a cui sarà soggetto il materiale una volta depositato. Sulla base di queste considerazioni, la soluzione al 4% di collagene è risultata essere la più promettente per lo sviluppo della formulazione polimerica finale. Un ulteriore incremento della concentrazione di collagene non è stato valutato principalmente per due ragioni: la prima riguarda la difficoltà di solubilizzare il collagene in 0,5M di AA, in quanto concentrazioni maggiori avrebbero richiesto tempi di preparazione più lunghi; la seconda riguarda il costo elevato del materiale.



	Viscosità η ($0,1 s^{-1}$)	Viscosità η ($1000 s^{-1}$)
2% Col	69,24 Pa.s	0,21 Pa.s
4% Col	619,18 Pa.s	0,63 Pa.s

Figura 30: Rampa di flusso per le soluzioni al 2% e 4% di Col alla temperatura di 10°C

Tabella 7: Valori di viscosità, per shear rate pari a $0,1s^{-1}$ e $1000s^{-1}$, delle soluzioni 2% e 4% di Col

3.1.2 Soluzioni di Chitosano

Per determinare la concentrazione adatta di chitosano da inserire all'interno della formulazione finale Col/Chi/Fib, si è proceduto in modo analogo a quanto fatto per il collagene. Le soluzioni di chitosano sono state preparate disciogliendo le polveri in 0,5M AA, solvente comune al collagene. In accordo con alcuni studi in letteratura che prevedevano la combinazione di chitosano con altri polimeri, si è partiti dalla valutazione di una concentrazione pari al 4% [64], [70], [80]. Dalla Figura 31 si osserva che la soluzione di chitosano al 4% presenta un comportamento pseudo plastico, ossia una diminuzione del valore di viscosità del materiale all'aumentare dello stress e della velocità di deformazione. Come riportato in Tabella 8 il valore di viscosità diminuisce passando da 9,21Pa·s ad un valore di 0,73Pa·s. Allo scopo di ottenere un valore di viscosità maggiore si è incrementata la concentrazione del polimero, testando una soluzione di chitosano al 5%. Anche in questo caso la soluzione mostra un comportamento pseudo plastico (Figura 31), infatti la viscosità diminuisce da un valore di 67,23Pa·s ad un valore di 1,69Pa·s. Si può inoltre osservare come l'incremento della concentrazione di chitosano determini un evidente aumento della viscosità della soluzione da circa 9Pa·s a 67Pa·s. Considerato il comportamento pseudo plastico e l'incremento del valore di viscosità, la soluzione di chitosano al 5% risulta essere più promettente per lo sviluppo della miscela finale da stampare. Nel caso del chitosano non è stato possibile incrementare ulteriormente la concentrazione giacché a partire da concentrazioni pari al 6% il polisaccaride non si solubilizza, nonostante sia stata valutata una dilatazione dei tempi di agitazione in temperatura.

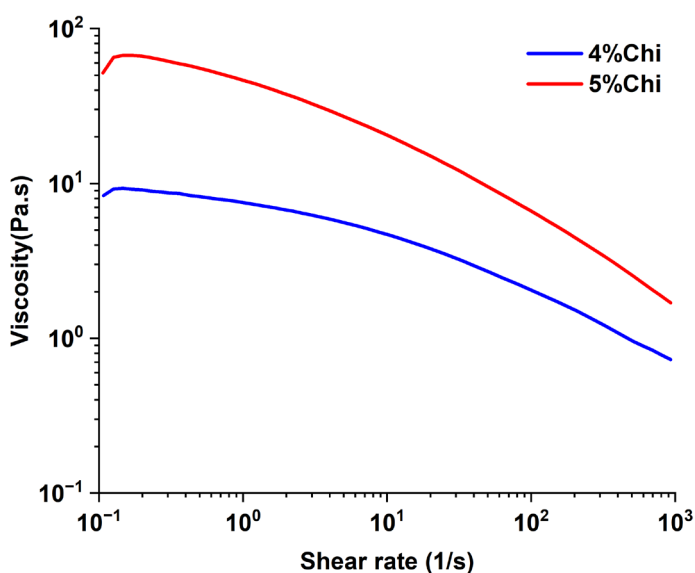


Figura 31: Rampa di flusso per le soluzioni al 4% e 5% di Chi alla temperatura di 10°C

	Viscosità η (0,1 s ⁻¹)	Viscosità η (1000 s ⁻¹)
4% Chi	9,21 Pa.s	0,73 Pa.s
5% Chi	67,23 Pa.s	1,69 Pa.s

Tabella 8: Valori di viscosità, per shear rate pari a 0,1s⁻¹ e 1000s⁻¹, delle soluzioni 4% e 5% di Chi

3.1.3 Miscela 4% Collagene e 5% Chitosano

Una volta stabilite le opportune concentrazioni dei singoli polimeri, si è andati a definire quale fosse il rapporto volumetrico tra le due soluzioni più adatto. Anche in questo caso sono state eseguite delle rampe di flusso al fine di verificare che le miscele presentassero un comportamento pseudo plastico, necessario per l'estrudibilità, ed un valore di viscosità sufficientemente elevato da promuovere una buona fedeltà di stampa. Le soluzioni di collagene e chitosano sono state quindi miscelate testando un rapporto di 1:1 e 2:1 tra le soluzioni di collagene e chitosano. Le curve riportate in Figura 32 dimostrano come entrambe le miscele continuano a possedere un comportamento pseudo plastico. La Tabella 9 evidenzia come un rapporto volumetrico maggiore, a favore del collagene, provochi un incremento pari ad un ordine di grandezza della viscosità del materiale in condizioni simil stazionarie (*shear rate* $0,1s^{-1}$) passando da un valore di $33,57Pa \cdot s$ a uno di $145,08Pa \cdot s$, garantendo una migliore stabilità del materiale una volta depositato. Invece, per valori alti di *shear rate* ($1000s^{-1}$) la viscosità presenta all'incirca lo stesso valore per le due miscele, decrescente rispetto ai rispettivi valori iniziali a sostegno della buona estrudibilità del materiale. Alla luce dei risultati ottenuti, per la preparazione della formulazione finale si è selezionato un rapporto di 2 a 1 tra le soluzioni di 4% collagene e 5% chitosano.

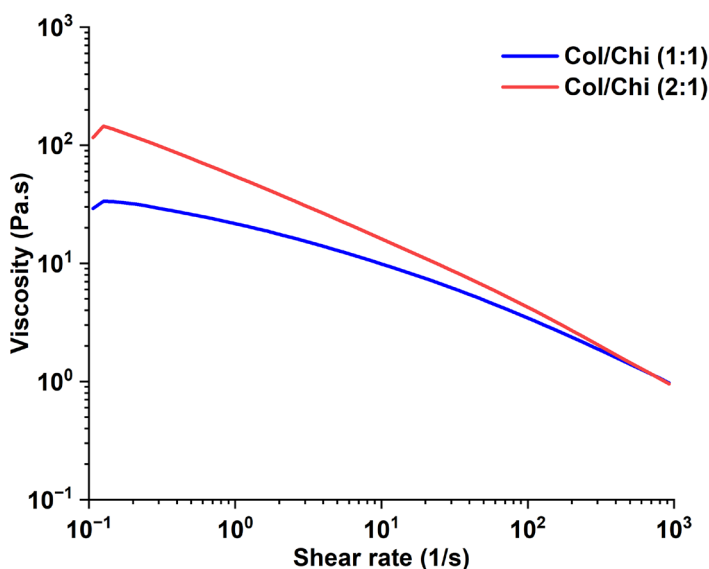


Figura 32: Rampa di flusso per le miscele Col/Chi (1:1) e Col/Chi (2:1) alla temperatura di $10^{\circ}C$

	Viscosità η ($0,1s^{-1}$)	Viscosità η ($1000s^{-1}$)
Col/Chi (1:1)	33,57 Pa.s	0,97 Pa.s
Col/Chi (2:1)	145,08 Pa.s	0,95 Pa.s

Tabella 9: Valori di viscosità, per *shear rate* pari a $0,1s^{-1}$ e $1000s^{-1}$, delle miscele Col/Chi (1:1) e Col/Chi (2:1)

3.1.4 Introduzione delle polveri di Fibroina della Seta

Allo scopo di incrementare le proprietà reologiche, l'estrudibilità, la stabilità della miscela Col/Chi (2:1) è stata inserita la fibroina della seta. Tuttavia, l'introduzione della proteina ha rappresentato la principale sfida nella messa a punto della formulazione finale, in quanto insolubile nella maggior parte dei solventi essendo composta da circa il 75% di amminoacidi non polari e idrofobici [81]. Da

letteratura è emerso che questo polimero può essere solubilizzato in solventi tra le cui componenti è presente un sale, come il solvente ternario costituito da cloruro di calcio, acqua ed etanolo ($\text{CaCl}_2/\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$) in rapporto 1:8:2 [80]. Tuttavia, volendo sfruttare come solvente l'acido acetico, comune al collagene e al chitosano, e considerando che in letteratura sono stati testati altri solventi organici, come l'acido formico, sono state condotte delle prove di solubilità della fibroina della seta in 0,5M di AA [81]. La prova di solubilità ha avuto esito negativo, per tale ragione sono stati eseguiti ulteriori tentativi variando i parametri che influiscono sulla solubilità nel seguente modo:

- Aumentare la percentuale di acido acetico, passando dal 3% al 40%;
- Incrementare il tempo di agitazione, raggiungendo le 24 ore;
- Innalzando la temperatura, da ambiente a 95°C [70], [80].

I risultati sono stati insoddisfacenti in quanto la proteina non risultava solubilizzata, per questa ragione ci si è basati sul lavoro di *Zhang et al.* nel quale la fibroina della seta è stata introdotta sotto forma di polveri all'interno della soluzione di chitosano in 0,5M di AA [70]. Come riportato nella Sezione 2.1.1 si è preparata una sospensione di polveri di fibroina della seta in 0,5M di AA all'interno della quale sono state solubilizzate le polveri di chitosano. Le proprietà reologiche della miscela Chi/Fib prodotta sono state testate mediante l'esecuzione di una rampa di flusso a 10°C . I risultati del test sono stati messi a confronto con quelli ottenuti sulla soluzione pura di chitosano al 5%. Dalla Figura 33 emerge che l'introduzione delle polveri di fibroina della seta non ha influito sul comportamento pseudo plastico, infatti il valore di viscosità diminuisce da $39,19\text{Pa}\cdot\text{s}$ fino a $1,43\text{Pa}\cdot\text{s}$ (Tabella 10). Tuttavia, si verifica approssimativamente un dimezzamento del valore di viscosità in condizioni simil stazionarie che da circa $67\text{Pa}\cdot\text{s}$ passa ad essere circa $39\text{Pa}\cdot\text{s}$, questo riduce la stabilità del filamento estruso.

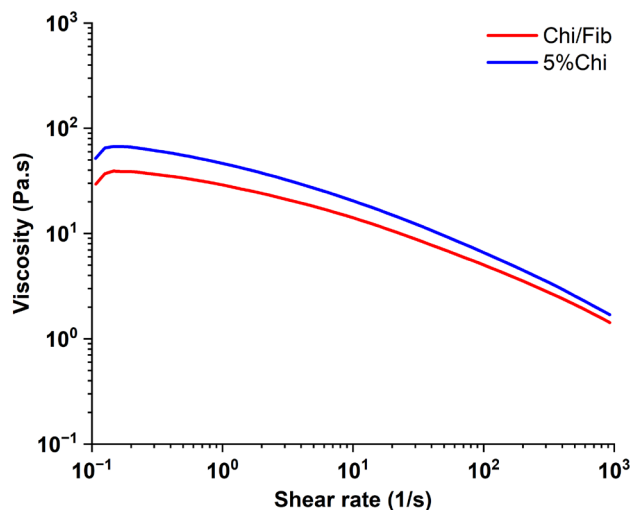


Figura 33: Rampa di flusso per il mix Chi/Fib e la soluzione 5% Chi alla temperatura di 10°C

	Viscosità η ($0,1\text{ s}^{-1}$)	Viscosità η (1000 s^{-1})
Chi/Fib	39,19 Pa.s	1,43 Pa.s
5% Chi	67,23 Pa.s	1,69 Pa.s

Tabella 10: Valori di viscosità, per shear rate pari a $0,1\text{s}^{-1}$ e 1000s^{-1} , del mix Chi/Fib e della soluzione 5% Chi

Nonostante il decremento delle proprietà reologiche a seguito dell'introduzione delle polveri di fibroina nella soluzione di chitosano, si è deciso di verificarne l'impatto sulla miscela complessiva Col/Chi/Fib, preparata secondo il protocollo riportato nella Sezione 2.1.1. In Figura 34 si evince che la formulazione finale Col/Chi/Fib presenta un comportamento pseudo plastico, ossia una diminuzione del valore di viscosità del materiale all'aumentare dello stress e della velocità di deformazione. Infatti la viscosità diminuisce da un valore pari a 204,48 Pa·s ad un valore pari a 0,82 Pa·s. Osservando la Tabella 11 si nota che dalla miscela Col/Chi (2:1) alla formulazione finale Col/Chi/Fib si verifica l'incremento della viscosità in condizioni simil stazionarie, il valore da circa 145 Pa·s diventa pari all'incirca a 204 Pa·s. Il comportamento pseudo plastico della formulazione complessiva garantisce la sua estrudibilità attraverso aghi di piccolo diametro, invece l'incremento del valore di viscosità a *shear rate* pari a $0,1\text{s}^{-1}$ stabilisce che il materiale sarà soggetto a una minore deformazione una volta depositato. I risultati ottenuti dimostrano che le polveri di fibroina introdotte nella miscela Col/Chi hanno la capacità di incrementare le proprietà reologiche e di conseguenza la stabilità del materiale una volta estruso.

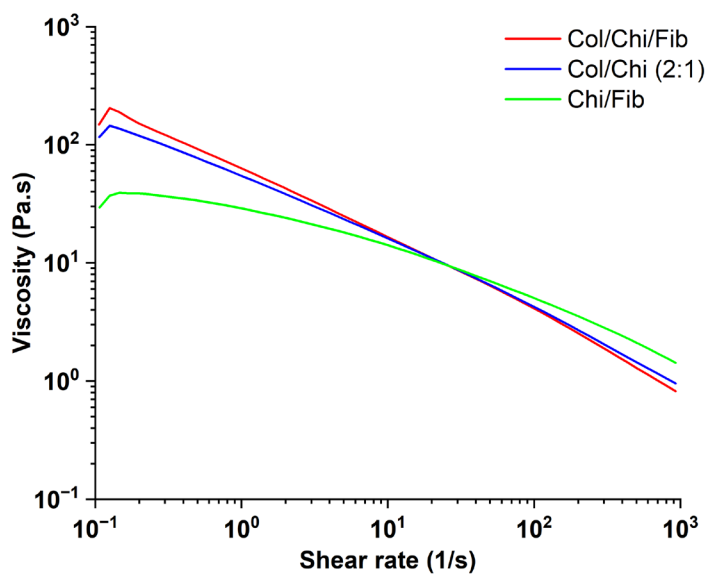


Figura 34: Confronto rampe di flusso per il Col/Chi/Fib, Col/Chi (2:1), Chi/Fib alla temperatura di 10°C

	Viscosità η ($0,1\text{s}^{-1}$)	Viscosità η (1000s^{-1})
Col/Chi/Fib	204,48 Pa.s	0,82 Pa.s
Col/Chi (2:1)	145,08 Pa.s	0,95 Pa.s
Chi/Fib	39,19 Pa.s	1,43 Pa.s

Tabella 11: Valori di viscosità, per *shear rate* pari a $0,1\text{s}^{-1}$ e 1000s^{-1} , della formulazione Col/Chi/Fib; della miscela Col/Chi (2:1) e Chi/Fib

3.1.5 Stampa 3D della formulazione Col/Chi/Fib

Come indicato in precedenza la formulazione Col/Chi/Fib mostra un andamento pseudo plastico nell'intervallo di misurazione della velocità di taglio ($0,1-1000\text{s}^{-1}$). Pertanto sono state eseguite delle prove di stampa con l'intento di verificare l'effettiva estrudibilità della miscela. I test sono stati eseguiti mediante l'uso di una biostampante commerciale (BIOX, Cellink), sulla quale è stata montata una testina di stampa pneumatica a temperatura controllata per consentire l'estrusione del materiale

regolando la pressione dell'aria sulla cartuccia e mantenendo la temperatura costante a 10°C al fine di preservare le proprietà viscoelastiche della miscela. La formulazione è stata estrusa attraverso aghi metallici rispettivamente da 27G (diametro interno 200µm) e 25G (diametro interno 200µm), applicando pressioni variabili all'interno dell'intervallo compreso tra 110kPa e 190kPa. Per l'esecuzione delle prove la formulazione centrifugata a 3000rpm per 5min per eliminare le bolle d'aria, è stata caricata in una cartuccia da 3mL, dopo aver avvitato l'ago selezionato, è stata montata sulla testina pre-condizionata a 10°C. Al fine di preservare le proprietà viscoelastiche della miscela il letto di stampa è stato mantenuto alla temperatura di 10°C. Per l'esecuzione dei test è stato selezionato come modello CAD una griglia quadrata (10x10x0,5mm) con densità di riempimento pari allo 0% ottenendo la deposizione unicamente del perimetro della griglia. Questa valutazione preliminare ha dimostrato che la Col/Chi/Fib viene estrusa con successo attraverso gli aghi selezionati, tuttavia sono necessarie pressioni più elevate quando si utilizzano aghi più piccoli. Questi risultati sono in linea con i valori significativamente più bassi di viscosità (0,82Pa·s) registrati al massimo valore di velocità di taglio (1000s⁻¹) durante l'analisi reologica della Col/Chi/Fib (Sezione 3.1.4). Nonostante ciò, a causa della frequente ostruzione dell'ago da 27G dovuta all'eventuale presenza di aria o ad una inadeguata dispersione delle polveri di fibroina, si è deciso di adoperare aghi dal diametro maggiore pari a 25G.

Verificata la stampabilità si è proceduto alla valutazione della fedeltà di stampa. Sulla base del modello CAD precedentemente selezionato sono state stampate delle griglie con densità di riempimento variabile tra il 10-15%, con z step pari a 180µm (circa il 70% del diametro interno dell'ago) per favorire l'adesione di uno strato al successivo evitando il collasso. Le pressioni testate variano nel range compreso tra 110kPa e 160kPa, a queste sono state combinate velocità della testina nell'intervallo tra 1mm/s e 5mm/s. L'esito di queste prove è visibile in Figura 35, nel quale è possibile osservare che la struttura al termine del processo di stampa è collassata su sé stessa.

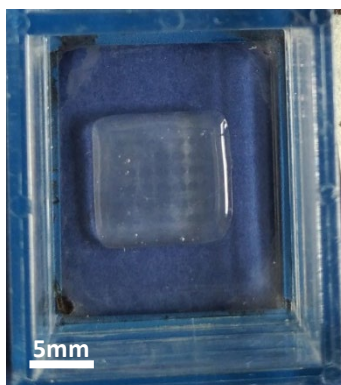


Figura 35: Prova di stampa preliminare della formulazione Col/Chi/Fib

3.1.6 Valutazione della soluzione reticolante a base di idrossido di sodio (NaOH)

Le prove preliminari di stampa hanno dimostrato l'inadeguatezza della formulazione a preservare la forma del filamento una volta deposto nonostante fossero state introdotte all'interno della formulazione le polveri di fibroina della seta con l'intento di migliorare le proprietà meccaniche e la stabilità. Per questa ragione è stato necessario valutare delle strategie che consentissero di incrementare la stabilità del materiale polimerico e di conseguenza dello scaffold finale. Ispirandosi al lavoro di *Zhang et al.* è stata vagliata come prima opzione l'uso della soluzione coagulante al 12% (w/v) di idrossido di sodio (NaOH) in 30% (v/v) di etanolo (EtOH) [70]. Questa strategia di reticolazione fisica è semplice ed immediata, la soluzione a base di idrossido di sodio viene spruzzata manualmente su ogni strato di materiale al termine della deposizione. La soluzione agisce inducendo la gelificazione del chitosano grazie al meccanismo di neutralizzazione del pH [69]. L'idrossido di sodio ha la capacità di causare la parziale deprotonazione dei gruppi amminici presenti nel chitosano così da evitare il collasso della struttura. Allo stesso tempo la presenza di gruppi protonati garantisce agli strati stampati di aderire l'un l'altro [69]. Per determinare l'efficacia di questa strategia sono state stampate delle griglie (10x10x0,5mm) con densità di riempimento pari al 10%. In Figura 36 è possibile osservare la griglia (A) al termine della stampa su cui la soluzione di NaOH è stata spruzzata dopo la deposizione di ogni strato, dall'ispezione visiva risulta evidente lo spanciamento del filamento. Inoltre, al completamento del processo di stampa sullo stesso scaffold è stata spruzzata un'ulteriore quantità di soluzione reticolante allo scopo di incrementare l'azione reticolante. La struttura è stata osservata a step temporali pari a 1min ciò ha stabilito la necessità di attendere almeno 5min per intravedere un primo effetto reticolante. Tuttavia, in questo lasso di tempo la griglia (B) collassa ulteriormente. Pertanto è possibile concludere che la soluzione 12% NaOH in 30% EtOH non è una valida opzione a garantire il mantenimento di forma e dimensione della struttura realizzata. Inoltre, questo procedimento è dipendente dall'operatore il quale deve far attenzione a direzionare il getto in modo che raggiunga ogni punto dello strato ed evitando di colpire la punta dell'ago dalla quale viene estruso il materiale, che coagulando in punta ne causa l'ostruzione.

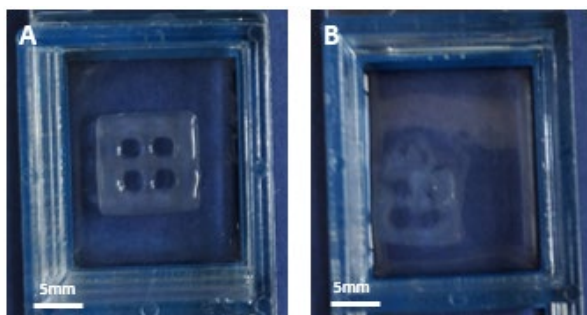


Figura 36: (A) griglia al termine del processo di stampa sulla quale è stata spruzzata la soluzione 12% NaOH alla deposizione di ogni strato; (B) griglia dopo 5min dall'ulteriore spruzzo della soluzione 12% NaOH al termine della stampa

È importante sottolineare che la formulazione Col/Chi/Fib è costituita da tre polimeri con caratteristiche differenti perciò l'inefficacia di questa strategia di reticolazione è da attribuire alla capacità dell'idrossido di sodio di agire come agente coagulante unicamente per il chitosano. La composizione della miscela e la successiva azione dell'idrossido di sodio influiscono anche sulla morfologia del materiale. Se gli scaffold fossero realizzati esclusivamente in chitosano la gelificazione per mezzo della soluzione 12% NaOH determinerebbe la formazione di una struttura porosa composta da nanofibre [82]. Invece, dall'analisi morfologica (Figura 37) condotta con il microscopio a scansione elettronica (SEM) è possibile notare la formazione di una rete superficiale, questo è legato a due aspetti: lo scaffold è costituito da una miscela di tre polimeri (Col/Chi/Fib), ma l'agente reticolante adoperato agisce unicamente sul chitosano; l'azione è solamente superficiale, dato che la soluzione viene spruzzata al termine della stampa di ciascun strato.

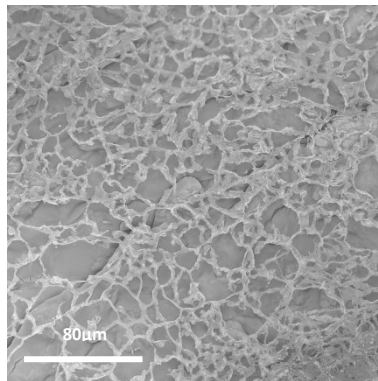


Figura 37: Immagine SEM dello scaffold reticolato mediante 12% NaOH

3.2 Sviluppo e stampa della formulazione fotoreticolabile a base collagene metacrilato, chitosano e fibroina della seta (ColMA/Chi/Fib)

Come evidenziato nelle Sezioni 3.1.5 e 3.1.6, l'esecuzione di prove preliminari di stampa ha messo in luce un lento recupero delle proprietà viscoelastiche della formulazione Col/Chi/Fib, insufficiente a garantire il mantenimento della forma della struttura. Inoltre, la strategia di reticolazione per mezzo dell'azione della soluzione 12% NaOH in 30% EtOH si è dimostrata fallimentare nell'ottenere una rapida gelificazione della struttura che preservasse le dimensioni dei filamenti depositi. Pertanto, si è deciso di modificare la formulazione cosicché fosse possibile adoperare la radiazione UV per reticolare il materiale durante il processo di stampa, aumentando la stabilità ed evitando il collasso della struttura. Per poter indurre la fotoreticolazione tramite esposizione alla radiazione ultravioletta, è stato necessario sostituire il Col con il ColMA, ed introdurre il fotoiniziatore I2959.

3.2.1 Introduzione del Collagene Metacrilato (ColMA)

Il collagene metacrilato mette a disposizione i legami metacrilici, insaturi ed altamente reattivi, in grado di promuovere la crescita della catena dei radicali liberi quando irradiati. Nella formulazione modificata ColMA/Chi/Fib si è adoperato la stessa concentrazione utilizzata per il collagene. L'opportuna quantità pesata di ColMA è stata disciolta in una soluzione 0,5M di AA al fine di ottenere una soluzione al 4% in peso. La soluzione così ottenuta è stata sottoposta ad una rampa di flusso a 10°C per valutare la viscosità. Dalla Figura 38 è possibile osservare che la soluzione presenta un comportamento pseudo plastico, ossia una diminuzione del valore di viscosità del materiale all'aumentare dello stress e della velocità di deformazione. Come riportato in Tabella 12, la viscosità diminuisce infatti da un valore di 923,3Pa·s ad un valore di 0,82Pa·s. Il comportamento della soluzione di ColMA è analogo a quello del Col, si evidenzia solo un leggero incremento dei valori di viscosità, per velocità di taglio pressoché nulla passa da circa 619Pa·s a 923Pa·s, mentre per velocità di taglio massima cresce da circa 0,63Pa·s a 0,82Pa·s.

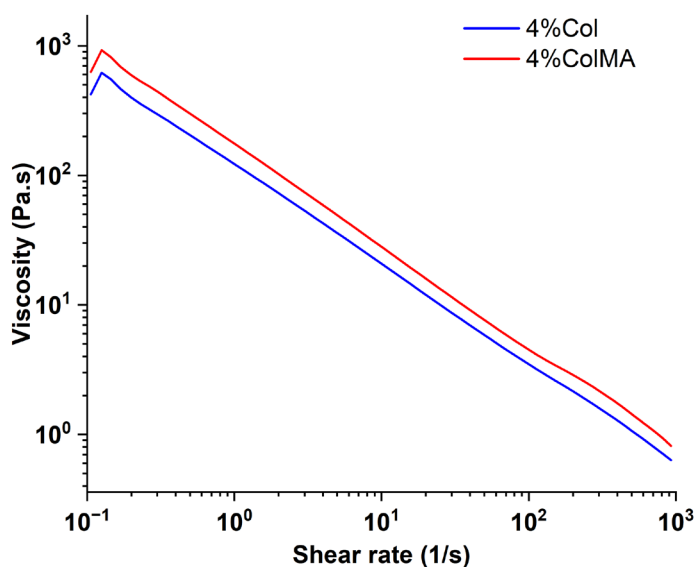


Figura 38: Rampa di flusso per le soluzioni al 4% di Col 4% di ColMA alla temperatura di 10°C

	Viscosità η (0,1 s ⁻¹)	Viscosità η (1000 s ⁻¹)
4% Col	619,18 Pa.s	0,63 Pa.s
4% ColMA	923,23 Pa.s	0,82 Pa.s

Tabella 12: Valori di viscosità, per shear rate pari a 0,1s⁻¹ e 1000s⁻¹, delle soluzioni al 4% di Col e 4% ColMA

3.2.2 Introduzione del fotoiniziatore Irgacure 2959

L'Irgacure 2959 è un fotoiniziatore radicalico altamente efficiente che consente la polimerizzazione dei sistemi mediante irraggiamento con radiazioni ultraviolette alla lunghezza d'onda di 365nm. È stato scelto in quanto adatto all'uso in sistemi a base acquosa, può essere solubilizzato nella soluzione 0,5M di AA, solvente comune per la dissoluzione dei polimeri impiegati in questo lavoro. Inoltre, dati i ridotti effetti citotossici può essere utilizzato come fotoreticolante di polimeri destinati all'ambito biomedicale [71]. La percentuale di fotoiniziatore presente nella formulazione

ColMA/Chi/Fib è stata stabilita sulla base di studi condotti all'interno del gruppo di ricerca, i quali hanno evidenziato che una concentrazione minima pari allo 0,1% fosse sufficiente a consentire la fotopolimerizzazione prolungando i tempi di esposizione alla radiazione UV [72]. Tuttavia essendo necessario stabilizzare la struttura durante il processo di stampa e immediatamente al termine sono stati eseguiti dei test di *UV curing* con il reometro, in modo da verificare che la concentrazione minima selezionata permettesse effettivamente di reticolare la struttura nei tempi di attivazione del led consentiti dalla testina fornita con la BIOX. Il led della testina fotopolimerizzante in dotazione con la biostampante consente di attivare il led per una durata massima di 120s a seguito della deposizione di ciascuno strato. Inoltre posizionandosi alla minima distanza possibile dallo strato stampato (1cm) nel manuale della BIOX è indicato che la potenza di irraggiamento ottenibile dal led è pari all'incirca a 45mW/cm^2 . Sulla base delle specifiche della testina di fotopolimerizzazione a disposizione sono stati eseguiti i test di *UV curing*. Queste sono prove in oscillazione eseguite a frequenza (1Hz) ed ampiezza (0,5% *strain*) dello stress applicato costanti, impostando un valore di potenza di irraggiamento pari a 45mW/cm^2 . In Figura 39A è possibile osservare l'esito del test di *UV curing* eseguito sulla formulazione ColMA/Chi/Fib impostando un tempo di esposizione pari a 120s (massimo tempo di attivazione del led durante la stampa). L'incremento registrato dai moduli di conservazione (G') e di dissipazione (G'') è esiguo, G' cresce da un valore di $2,20 \cdot 10^{-4}$ MPa a $2,75 \cdot 10^{-4}$ MPa, mentre G'' passa da un valore di $1,28 \cdot 10^{-4}$ MPa a $1,36 \cdot 10^{-4}$ MPa, al termine dell'irraggiamento questi valori rimangono costanti. Per evitare di incrementare la concentrazione di fotoiniziatore, che potrebbe causare problemi di citotossicità, si è valutata la possibilità di irraggiare per un tempo maggiore, pari a 5min. L'esito del test è visibile nella Figura 39B, dalla quale si evince un notevole incremento dei moduli di conservazione (G') e dissipazione (G''), in particolare G' cresce da un valore pari a $4,6 \cdot 10^{-4}$ MPa, all'inizio dell'esposizione, fino ad un valore pari a $2,6 \cdot 10^{-3}$ MPa, nel momento in cui la sorgente viene disattivata, mentre G'' passa da un valore di $1,7 \cdot 10^{-4}$ MPa fino a $3,36 \cdot 10^{-4}$ MPa. Questo notevole incremento rispetto alla Figura 39A evidenzia la presenza di gruppi metacrilici non del tutto saturi, che grazie all'ulteriore esposizione alla radiazione ultravioletta formano ulteriori legami chimici permanenti e irreversibili che fissano la struttura [83]. I valori delle due prove condotte si assestano ad un valore pressoché costante a dimostrazione del fatto che la fotoreticolazione cessa nel momento in cui termina l'esposizione alla radiazione luminosa. Alla luce dei risultati ottenuti si è deciso di non incrementare la concentrazione di I2959 all'interno della ColMA/Chi/Fib per evitare che nella futura applicazione biomedica si verificano problemi di citotossicità. Invece si è andati ad utilizzare le tempistiche testate per stabilizzare la struttura,

irraggiando per 120s a seguito della deposizione di ogni strato e completando la reticolazione con un'ulteriore esposizione alla radiazione luminosa per 5min al completamento della stampa.

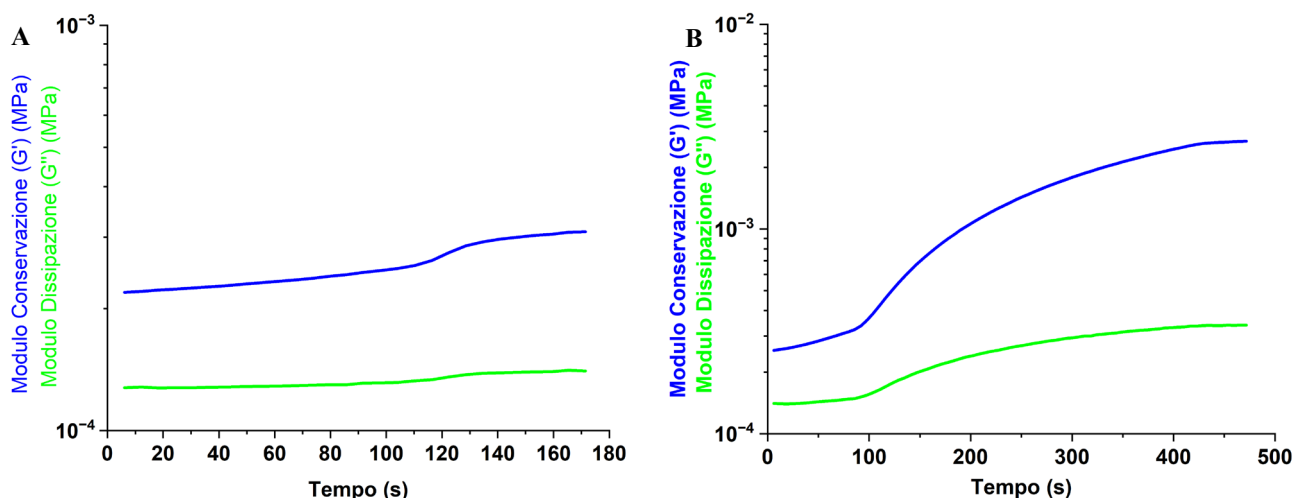


Figura 39: (A) Cinetiche di UV curing per ColMA/Chi/Fib, per un tempo di esposizione pari a 120s; (B) Cinetiche di UV curing per ColMA/Chi/Fib, per un tempo di esposizione pari a 420s

3.2.3 Valutazione delle proprietà reologiche della formulazione ColMA/Chi/Fib

La soluzione modificata con ColMA e I2959 è stata preparata secondo il protocollo esplicitato nella Sezione 2.1.2, su di essa sono state eseguite le analisi reologiche per un primo screening dell'effettiva stampabilità e fedeltà di stampa.

Dalla Figura 40 si evince che la formulazione presenta un comportamento pseudo plastico, ovvero si verifica il decremento della viscosità che decresce da un valore pari a 456,3Pa·s ad un valore pari a 0,9Pa·s, come riportato in Tabella 13. Questa proprietà permette l'estrusione della formulazione attraverso aghi di piccolo diametro, diminuendo la resistenza al flusso. Invece il valore elevato di viscosità è un'indicazione della capacità del materiale di deformarsi poco una volta deposto.

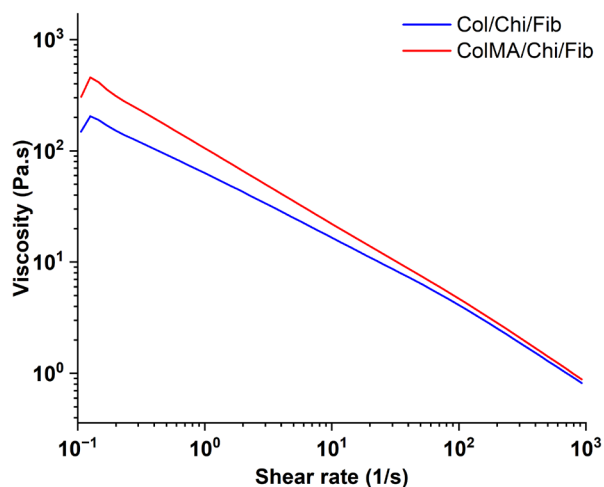


Figura 40: Rampa di flusso per le formulazioni Col/Chi/Fib e ColMA/Chi/Fib alla temperatura di 10°C

	Viscosità η ($0,1 \text{ s}^{-1}$)	Viscosità η (1000 s^{-1})
Col/Chi/Fib	204,5 Pa.s	0,8 Pa.s
ColMA/Chi/Fib	456,3 Pa.s	0,9 Pa.s

Tabella 13: Valori di viscosità, per shear rate pari a $0,1 \text{ s}^{-1}$ e 1000 s^{-1} , delle formulazioni Col/Chi/Fib e ColMA/Chi/Fib

Prima di passare alle prove di stampa, il processo di estrusione è stato simulato grazie al *peak hold test* in modo da valutare l'effettivo recupero del materiale a seguito della deposizione. In dettaglio, alla formulazione sono state applicate due diverse velocità di taglio.

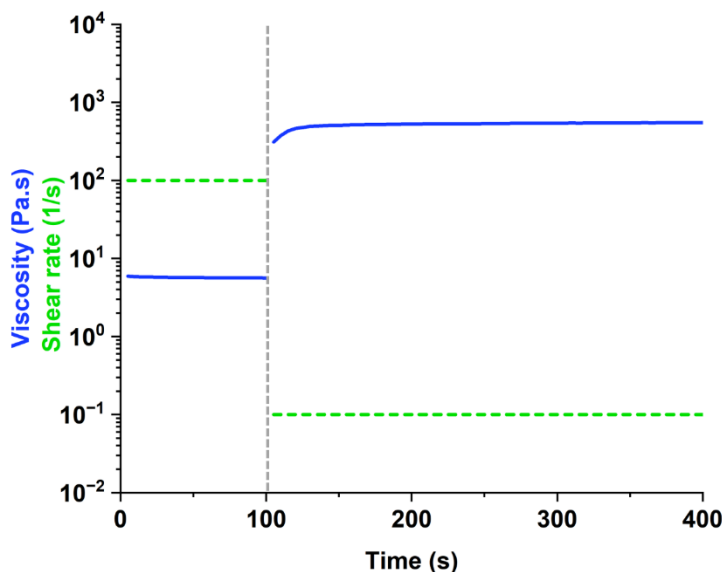


Figura 41: Peak Hold test a 10°C per ColMA/Chi/Fib

Questa analisi consiste nel misurare la viscosità all'applicazione di una velocità di taglio successive di 100s^{-1} (100s) e $0,1\text{s}^{-1}$ (300s), riproducendo rispettivamente la fase di estrusione e di deposizione. Come mostrato dalla Figura 41, la formulazione presenta viscosità di circa $5,7\text{Pa}\cdot\text{s}$ come risultato dell'applicazione di una velocità di taglio costante di 100s^{-1} . Una volta rimosso lo sforzo di taglio ($0,1\text{s}^{-1}$), la viscosità è aumentata immediatamente raggiungendo valori di plateau di circa $310\text{Pa}\cdot\text{s}$, che mostrano il recupero della struttura molecolare del materiale. Dopo 300 secondi in condizioni di bassa velocità di taglio, la miscela ColMA/Chi/Fib ha inoltre mostrato il recupero del valore di viscosità registrati a $0,1\text{s}^{-1}$ durante il test di rampa di flusso. Questi risultati hanno evidenziato una viscosità dipendente dalla velocità di taglio e dal tempo, ed in particolare la necessità di un certo tempo per raggiungere i valori di viscosità originali. Ciononostante, il recupero delle proprietà viscoelastiche è rapido pertanto i filamenti depositi hanno una buona stabilità quindi pertanto non sarà necessario utilizzare un bagno di supporto.

3.2.4 Analisi chimica mediante spettroscopia a infrarossi in riflettanza totale attenuata (FTIR-ATR)

Con l'obiettivo di valutare la conservazione delle proprietà chimico-fisiche dei tre polimeri naturali, impiegati nella miscela finale, sono state eseguite delle analisi in spettroscopia infrarossa in riflettanza totale attenuata (FTIR-ATR) sui singoli polimeri e sulla miscela ColMA/Chi/Fib. Nella Figura 42 sono rappresentati gli spettri ottenuti dall'analisi spettroscopica dei singoli polimeri (ColMA, Chi,

Fib), e ciò che risulta dal loro miscelamento (ColMA/Chi/Fib). L'esame è stato condotto sulla spugna di ColMA, prima della sua dissoluzione in acido acetico, lo spettro che si ottiene mostra i picchi caratteristici della proteina nell'intervallo compreso tra 1800cm^{-1} e 900cm^{-1} [84]. Ben visibili sono i picchi associati all'ammide primaria ($\sim 1640\text{cm}^{-1}$), a quella secondaria ($\sim 1545\text{cm}^{-1}$), e all'ammide terziaria ($\sim 1236\text{cm}^{-1}$) [72]. Il secondo polimero testato è stato il chitosano, le cui polveri sono state disciolte nella soluzione 0,5M di AA, congelata e infine liofilizzata per ottenere una spugnetta adatta all'analisi. Le bande che si osservano sono quelle a 3370cm^{-1} , 1659cm^{-1} , 1575cm^{-1} , 1390cm^{-1} attribuibili rispettivamente alla vibrazione di *stretching* -OH causata dalle molecole di acqua, dall'ammide di gruppo I (C=O), dall'ammide di gruppo II, e all'ammide di gruppo III [35], [85]. Inoltre sono visibili picchi nella banda tra i 1100cm^{-1} e 1000cm^{-1} caratteristici della struttura saccaridica [85]. Infine, sono state indagate le polveri della fibroina della seta data l'impossibilità del polimero di essere disciolto, lo spettro ha fornito informazioni molto importanti non solo sui legami chimici, ma anche sulla struttura che caratterizza la proteina. Il primo picco distinguibile è quello a 3282cm^{-1} che indica N-H *bending* ed è associato alla conformazione β -sheet. Sono poi visibili i picchi relativi all'ammide I, 1698cm^{-1} e 1622cm^{-1} , dovuti allo *stretching* C=O nella struttura β -sheet. A 1514cm^{-1} si trova il picco relativo all'ammide II (CN *stretching* e NH *bending*, β -sheet). Infine, i picchi relativi all'ammide III che sono quello a 1258cm^{-1} (α -elica, *random coil*) e 1229cm^{-1} (β -sheet) [86]. L'ultimo spettro nella Figura 42, è quello relativo alla miscela polimerica, congelata e liofilizzata, che non è nient'altro che una sovrapposizione di quelli relativi ai singoli polimeri. Si nota un picco nella banda compresa nel range $3350\text{-}3100\text{cm}^{-1}$, visibile anche nella fibroina della seta, che corrisponde al legame N-H nei legami idrogeno. Data la presenza delle ammidi primaria, secondaria e terziaria in tutti e tre i polimeri, è possibile visionare i picchi corrispondenti, seppur leggermente spostati o di ampiezza variabile, anche nella formulazione finale: $\sim 1650\text{cm}^{-1}$, $\sim 1547\text{cm}^{-1}$, $\sim 1240\text{cm}^{-1}$. Così come sono presenti i picchi, seppur ridotti relativi alla struttura saccaridica del chitosano.

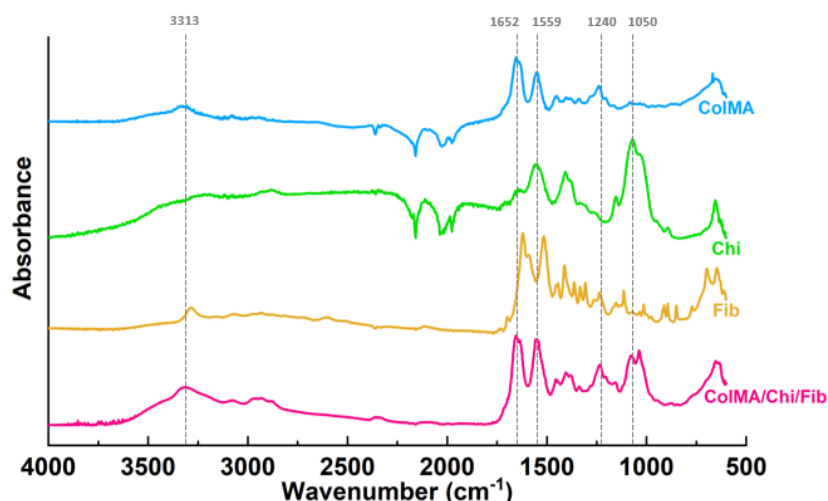


Figura 42: Spettri FTIR-ATR: ColMA, Chi, Fib e miscela ColMA/Chi/Fib

3.2.5 Ottimizzazione del processo di stampa 3D

La stampabilità della formulazione ColMA/Chi/Fib sviluppata è stata valutata utilizzando un sistema ad estrusione dotato di aghi da 25 G (diametro interno 250 μ m) per ottenere potenzialmente un'elevata risoluzione degli scaffold 3D finali. In dettaglio, è stata utilizzata una testina di stampa pneumatica a temperatura controllata per consentire l'estrusione del materiale regolando la pressione dell'aria. Le temperature della testina e del piatto sono mantenute a 10° per preservare le proprietà viscoelastiche della miscela. Per i test è stato selezionato un modello digitale 3D a struttura quadrata (10x10x0,3mm) con geometria interna a griglia e una densità di riempimento del 20% per consentire la facile valutazione della fedeltà della forma dei filamenti depositi. Sulla base delle prove eseguite in precedenza (Sezione 3.1.5), sono state combinate pressioni comprese tra 110kPa e 150kPa con velocità della testina di stampa nell'intervallo tra 2mm/s e 3mm/s, mentre lo z step è stato impostato a 180 μ m (circa il 70% del diametro interno dell'ago) per favorire l'adesione tra gli strati evitando il collasso. Inoltre, per garantire che l'estrusione del materiale iniziasse e si concludesse contestualmente al movimento della testina è stata valutata l'introduzione di un pre/post flusso rispettivamente di 200ms e 50ms. La valutazione sperimentale ha confermato la processabilità della formulazione sviluppata con sistemi basati sull'estrusione, il comportamento pseudo plastico del materiale consente la formazione di flussi continui senza evidenziare l'intasamento dell'ago, suggerendo una buona dispersione delle polveri di fibroina della seta.

Il processo di stampa è stato coniugato con il trattamento di fotoreticolazione mediante l'uso della testina di fotoreticolazione in dotazione con la biostampate (BIOX). Al fine di massimizzare la reticolazione ed ottenere un costrutto stabile si è imposta l'attivazione del led dopo la deposizione di ogni strato per 120s, alla distanza di 1cm, in posizione centrale. Inoltre alla luce dei risultati delle prove reologiche di *UV curing* (Sezione 3.2.2), al termine della stampa il costrutto è stato esposto alla radiazione luminosa per ulteriori 5min.

Per rendere il processo di reticolazione versatile e svincolato dall'uso di una specifica tipologia di stampante è stato valutato anche l'uso di una torcia UV (lunghezza d'onda 365nm) azionata dall'operatore. In questo caso la torcia è stata accesa per illuminare lo scaffold in costruzione durante l'intera durata del processo di estrusione e al completamento per ulteriori 5min.

Gli scaffold realizzati sono stati ispezionati e misurati con il supporto del software ImageJ, consentendo di confrontare le misurazioni dei costrutti stampati con quelle del modello digitale. Come indicato nella sezione metodologica, le prove di stampa sono state eseguite modificando

singolarmente ogni parametro per garantire la massima compressione dei risultati, ma a causa dell'elevato numero di test vengono riportati solo i risultati più significativi.

Le prove di stampa condotte sulla formulazione Col/Chi/Fib (Sezione 3.1.5) eseguite su di un ampio range di pressioni (110-190kPa) hanno consentito di ridurre il limite superiore dell'intervallo di esplorazione (110-150kPa), in quanto valori di pressione elevati determinavano l'estrusione di una quantità eccessiva di materiale. Anche il range relativo alle velocità di movimento della testina è stato ristretto. Velocità minime causavano la deposizione localizzata in uno stesso punto di un quantitativo eccessivo di materiale, al contrario un rapido movimento della testina ostacolava la corretta deposizione dei filamenti. Selezionando una velocità intermedia della testina pari a 3mm/s sono stati valutati gli estremi dell'intervallo di pressioni sopraindicato, ovvero 150kPa e 110kPa (Figura 43B-C). È possibile notare, da una prima ispezione visiva, lo spanciamento dei filamenti specialmente in corrispondenza dei nodi di intersezione. Le misurazioni, effettuate con l'ausilio del software ImageJ, confrontate con il modello CAD supportano le considerazioni emerse dalla semplice visualizzazione (Tabella 14). Lo scaffold in Figura 43B presenta una dimensione media dei filamenti pari a $0,93\pm 0,23\text{mm}$, ovvero quadruplicata se confrontata con le dimensioni del modello CAD. In modo analogo la struttura in Figura 43C ha una dimensione media dei filamenti di $1,10\pm 0,5\text{mm}$, valore quintuplicato. Come si nota dalla Tabella 14 riducendo la velocità della testina a 2mm/s e selezionando una pressione intermedia pari a 120kPa è possibile ottenere una congruenza tra le dimensioni esterne dello scaffold e il modello CAD. Per quanto riguarda la dimensione media del filamento risulta inferiore ai casi precedentemente descritti tuttavia, è all'incirca pari al doppio della dimensione che dovrebbe avere. Il materiale pur recuperando rapidamente le proprietà viscoelastiche tende a spanciarsi nel tempo che decorre tra il completamento della struttura e l'inizio del meccanismo di fotoreticolazione. Non essendo possibile ottenere una migliore fedeltà di stampa variando ulteriormente i parametri è stata selezionata una pressione di 120kPa ed una velocità di 2mm/s come parametri di processo.

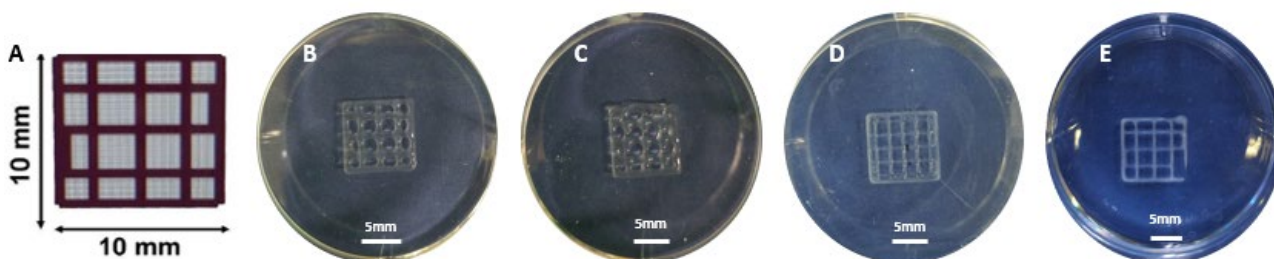


Figura 43: A) Modello CAD; Scaffold stampati e reticolati con torcia UV (B; C; D) reticolati con testina UV della BIOX (E)

Tabella 14: Insieme di misure ottenute dalle analisi ImageJ per gli scaffold prodotti e reticolati con UV

Campione	Punto di misura	150kPa; 3mm/s (TORCIA UV) Fig.43B	110kPa; 3mm/s; (TORCIA UV) Fig.43C	120kPa; 2mm/s; Pre/Post- Flusso (TORCIA UV) Fig.43D	120kPa; 2mm/s; Pre/Post- Flusso (TESTINA UV) Fig.43E
Lati (mm)	P1	10,01	11,77	9,55	10,22
	P2	9,63	11,60	9,63	8,22
	P3	9,90	11,76	9,44	9,51
	P4	10,01	11,45	9,88	9,47
	MEDIA ± DS	9,89±0,18	11,65±0,15	9,62±0,19	9,35±0,83
Spessore del filamento (mm)	S1	1,13	1,00	0,38	0,42
	S2	1,00	0,67	0,33	0,50
	S3	0,75	0,67	0,50	0,52
	S4	0,63	1,33	0,50	0,52
	S5	1,13	1,84	0,33	0,42
	MEDIA ± DS	0,93±0,23	1,10±0,50	0,41±0,09	0,47±0,05

3.3 Reticolazione degli scaffold mediante trattamento in genipina

Una strategia di reticolazione che permette di coniugare in modo equilibrato efficienza di reticolazione e citocompatibilità del processo prevede l'utilizzo della genipina, reticolante chimico naturale di origine vegetale. Come la maggior parte dei trattamenti chimici, l'entità della reticolazione può essere controllata ottimizzando parametri quali tempo, pH e concentrazione in base alle applicazioni finali. Questo trattamento induce un aumento della forza meccanica e della resistenza alla degradazione sia idrolitica che enzimatica. Tuttavia, la potenziale citotossicità dell'agente naturale e l'alterazione delle caratteristiche morfologiche degli scaffold osservate in alcuni studi, sono ancora oggetto di dibattito [87].

In questo progetto di tesi la soluzione reticolante 0,5% (w/v) di genipina in 70% (v/v) EtOH è stata preparata sulla base di un protocollo (Sezione 2.2.3) precedentemente ottimizzato dal gruppo di ricerca [72]. Per ottenere l'incremento della rigidità e della stabilità, gli scaffold sono stati incubati nella soluzione reticolante, a 37°C per 24h, parametri ottimizzati in precedenza dal gruppo di ricerca [72].

3.3.1 Valutazione proprietà viscoelastiche della formulazione ColMA/Chi/Fib

L'effetto della reticolazione chimica con genipina sulla formulazione ColMA/Chi/Fib è stato investigato mediante prove reologiche volte a valutare l'incremento della rigidità e della stabilità termica, come mostrato nella Figura 44 e Figura 45.

Come rappresentato nella Figura 44, gli *amplitude sweep* test eseguiti alla temperatura di 37°C, impostando una variazione della deformazione tra 0,01% e 10% e una frequenza costante di 1 Hz, prima e dopo il trattamento delle strutture con la soluzione di genipina hanno fornito i valori di G' e G'' . Si osserva che prima del trattamento G' decresce progressivamente all'aumentare della deformazione passando da un valore di circa $7,46 \cdot 10^{-4}$ MPa ad uno di circa $1,04 \cdot 10^{-4}$ MPa. Una cosa analoga si verifica per G'' , il cui valore decresce in modo graduale da $2,45 \cdot 10^{-4}$ MPa fino a $1,79 \cdot 10^{-4}$ MPa. La formulazione reticolata con la soluzione di genipina mostra una resistenza maggiore e costante all'aumentare della deformazione, infatti i valori medi registrati per G' e G'' sono di circa $2,15 \cdot 10^{-3}$ MPa e $1,02 \cdot 10^{-3}$ MPa. Il gap rilevante tra G' e G'' ottenuto dopo la reticolazione con genipina è indicativo di un comportamento elastico predominante.

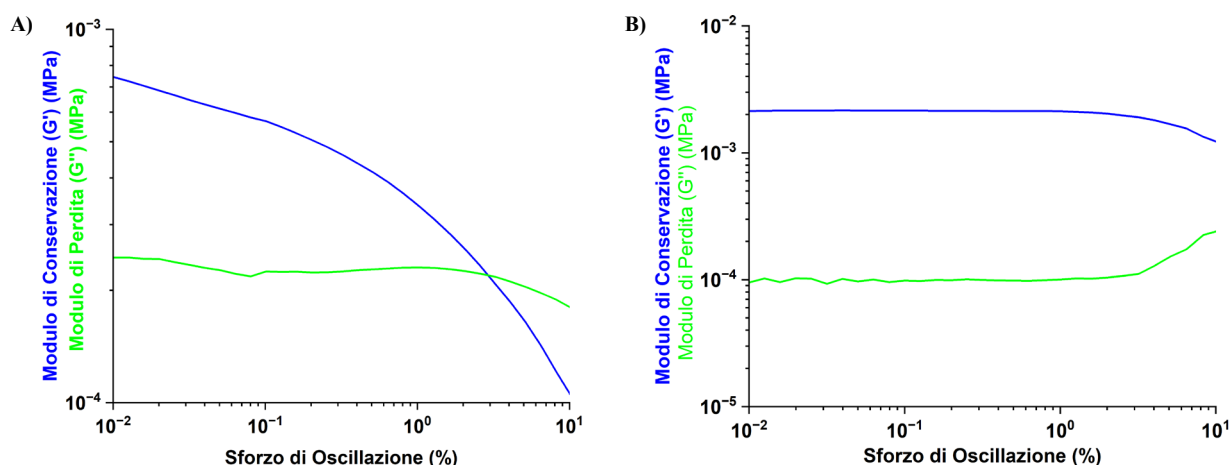


Figura 44: Amplitude sweep test per campioni bulk di ColMA/Chi/Fib: A) Fotoreticolati per 420s con raggi UV; B) Fotoreticolati per 420s con raggi UV e incubati per 24h a 37°C in genipina

Osservando i grafici in Figura 45 si evince che la reticolazione chimica ha indotto un significativo aumento della temperatura di denaturazione del materiale. La miscela ColMA/Chi/Fib prima e dopo il trattamento con genipina è stata sottoposta alla rampa di temperatura nell'intervallo 25-80 °C. Il materiale non reticolato ha subito una forte diminuzione dei moduli G' e G'' all'incirca a 33°C, indicativo del collasso strutturale. Invece il collasso della formulazione incubata nella soluzione di genipina si verifica a partire da circa 56°C, temperatura alla quale comincia il forte decremento dei moduli.

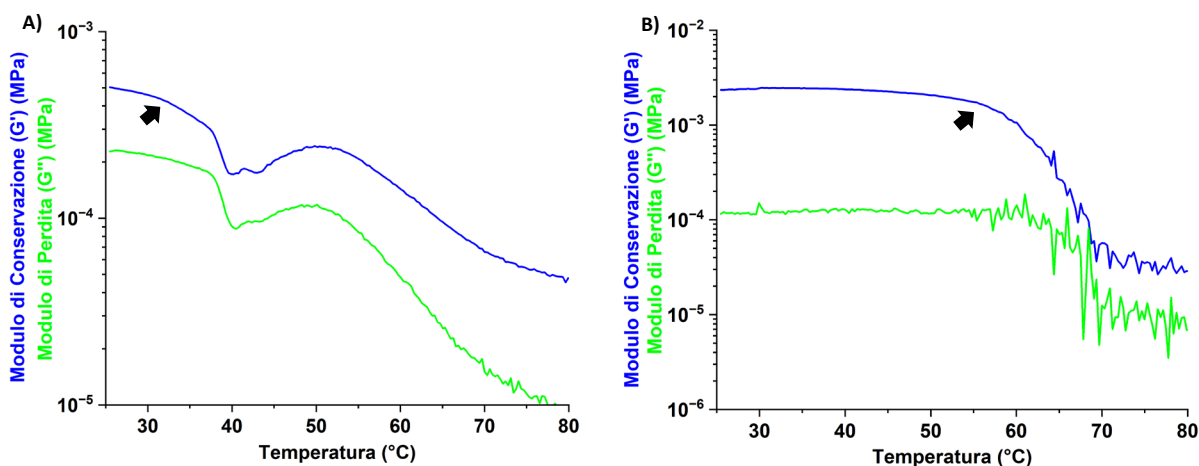


Figura 45: Temperature ramp test: A) campioni fotoreticolati; B) campioni fotoreticolati e incubati in genipina per 24h

3.3.2 Analisi chimica mediante spettroscopia a infrarossi in riflettanza totale attenuata (FTIR-ATR)

Mediante la tecnica di FTIR-ATR, eseguita sugli scaffold stampati e fotoreticolati, e su quelli fotoreticolati ed incubati in genipina, sono state valutate eventuali variazioni nella struttura chimica della formulazione considerato che il meccanismo di reticolazione chimico con genipina determina la formazione di legami covalenti tra le catene di chitosano e collagene. L'analisi è stata eseguita su delle sezioni di scaffold congelato e liofilizzato. Dallo studio della Figura 46 si nota che il materiale, dopo essere stato irraggiato con gli UV, presenta uno spettro pressoché invariato se confrontato con il materiale tal quale. Ciò che emerge è solamente una riduzione dell'ampiezza dei picchi caratteristici. Invece, nello spettro del materiale sottoposto alla reticolazione chimica con genipina le bande ammidiche A e B, rispettivamente a 3300cm^{-1} e 2950cm^{-1} , associate allo stretching dei gruppi N-H, diminuiscono marcatamente in quanto si formano legami intermolecolari e intramolecolari tra collagene e genipina. I picchi a 1630cm^{-1} e 1650cm^{-1} invece sono relativi alle bande ammidiche I e II anche questi ridotti per via della formazione di legami mediati dalla genipina [88]. La reazione tra l'estere di genipina e i gruppi idrossilici e amminici del chitosano determinano la formazione di ammidi secondarie, suggerita dal picco osservato a 1547cm^{-1} . Considerando che il campione è liofilizzato, e quindi l'acqua è stata rimossa si nota un abbassamento dell'intensità del picco a $\sim 3300\text{cm}^{-1}$. Contestualmente da letteratura ci si aspettava che i picchi a intorno a 1547cm^{-1} , 1415cm^{-1} e 1012cm^{-1} aumentassero d'intensità per via della maggiore quantità di genipina e chitosano reticolati a formare un sistema permanente, tuttavia questo non è visibile [89].

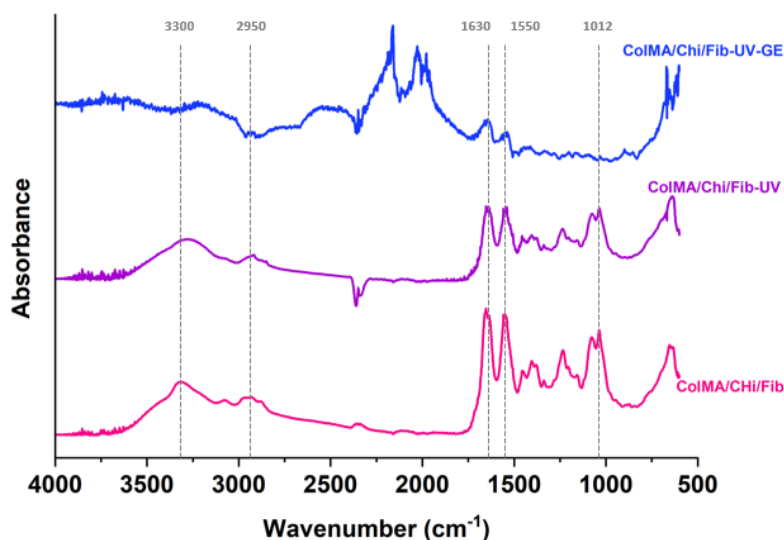


Figura 46: Spettri FTIR-ATR: della formulazione ColMA/Chi/Fib pura, dopo il trattamento di fotopolimerizzazione con UV, e dopo il trattamento con UV e incubazione in genipina

3.3.3 Valutazione della fedeltà di stampa

I costrutti finali, a seguito dell'incubazione a 37°C per 24h nella soluzione reticolante di genipina, sono stati lavati con dH₂O per eliminare la presenza di eventuali residui, e sono stati ispezionati visivamente e misurati con l'ausilio del software ImageJ. Il trattamento provoca un leggero restringimento degli scaffold (Figura 47), confermato dalle misure prese tramite software (Tabella 15). In particolare, gli scaffold stampati con i parametri ottimizzati (Figura 47C-D) presentano una lunghezza media dei lati di $8,58 \pm 0,06$ mm (con torcia UV) e $8,24 \pm 0,06$ mm (con testina UV), ovvero una riduzione di circa 1mm rispetto ai corrispettivi non trattati (Figura 43D-E). Lo stesso si verifica per lo spessore dei filamenti che presentano un valore di $0,24 \pm 0,06$ mm (con torcia UV) e $0,36 \pm 0,09$ mm (con testina UV), con una riduzione di circa 0,15mm in confronto ai non trattati.

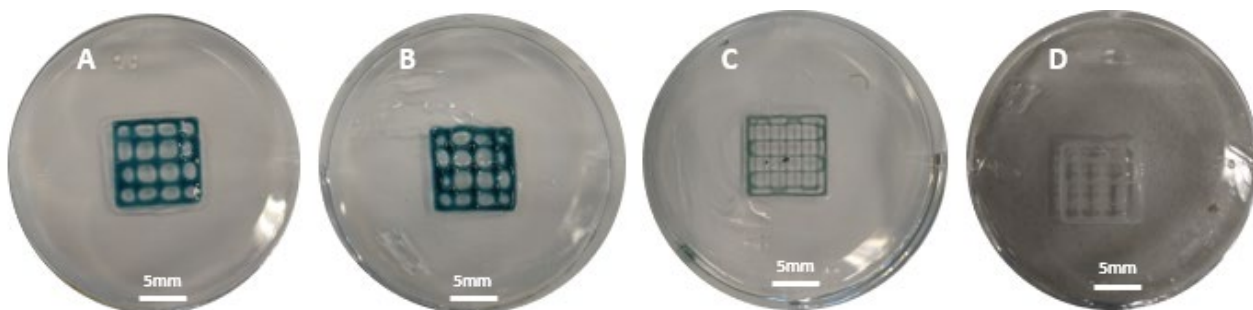


Figura 47: Scaffold stampati, fotopolimerizzati con torcia (A; B; C) o con testina (D) e poi incubati in genipina

Tabella 15: Insieme di misure ottenute dalle analisi ImageJ per gli scaffold prodotti, reticolati con UV e incubati in genipina

Campione	Punto di misura	150kPa; 3mm/s (TORCIA UV) Fig.47A	110kPa; 3mm/s; (TORCIA UV) Fig.47B	120kPa; 2mm/s; Pre/Post- Flusso (TORCIA UV) Fig.47C	120kPa; 2mm/s; Pre/Post- Flusso (TESTINA UV) Fig.19D
Lati (mm)	P1	9,38	10,57	8,55	8,47
	P2	9,30	10,73	8,67	8,13
	P3	9,20	10,26	8,55	8,13
	P4	9,55	10,79	8,55	8,22
	MEDIA ± DS	9,36±0,15	10,58±0,24	8,58±0,06	8,24±0,16
Spessore del filamento (mm)	S1	0,77	0,62	0,21	0,39
	S2	0,64	0,57	0,23	0,39
	S3	0,61	0,62	0,17	0,49
	S4	0,61	0,51	0,35	0,20
	S5	0,61	0,46	0,25	0,35
	MEDIA ± DS	0,65±0,06	0,55±0,06	0,24±0,06	0,36±0,09

3.3.4 Caratterizzazione morfologica degli scaffold mediante microscopia a scansione elettronica

A seguito del trattamento di reticolazione chimica con genipina, gli scaffold sono stati congelati, liofilizzati e rivestiti da uno strato di 7nm di platino (Sezione 2.3.2) per poter essere analizzati tramite microscopia a scansione elettronica. Questa tecnica di caratterizzazione ha permesso di analizzare la morfologia delle strutture stampate.

Come si evince dalla Figura 48A-C le strutture sono caratterizzate da porosità dovute al processo di liofilizzazione degli scaffold che precede l'analisi. I pori presentano dimensioni ridotte e non risultano particolarmente interconnessi (Figura 48C) [64]. È importante sottolineare che la liofilizzazione non è al momento prevista nel protocollo di preparazione degli scaffold per future applicazioni nella rigenerazione cutanea, in quanto si intende adoperare il materiale sottoforma di gel. Tuttavia, porosità micrometriche possono essere ottenute grazie alla tecnica di stampa 3D, selezionando un opportuno modello CAD. Le immagini mostrano una superficie non uniforme, caratterizzata da zone più lisce costellate da granelli (Figura 48D) e altre in cui si forma una fitta rete di fibre superficiali (Figura 48F). Le zone superficiali prive di pori, caratterizzate da una certa levigatezza e densità sono probabilmente indice della distribuzione uniforme della genipina, ed è proprio in queste aree che si concentra la deposizione di granellini di dimensione e forma variabile [35]. Considerando che nella formulazione estrusa sono disperse le polveri di fibroina, si è supposto che fossero queste l'origine

dei granelli in questione. Questo motivo ha portato all'analisi tramite SEM delle polveri di fibroina pura. La Figura 48E mostra le polveri di fibroina della seta ad un ingrandimento pari a 5000x, non è stato possibile raggiungere ingrandimenti maggiori a causa della rapida deteriorazione del campione. Si osserva che le polveri non hanno una forma ben definita e le dimensioni sono variabili a causa dell'agglomerazione, l'analisi è quindi inconcludente perché non permette di stabilire con certezza la natura dei granelli presenti sulla superficie dello scaffold. Infine, alcune aree sono caratterizzate da una fitta rete di fibrille dovute probabilmente all'azione della genipina sul collagene o sul chitosano.

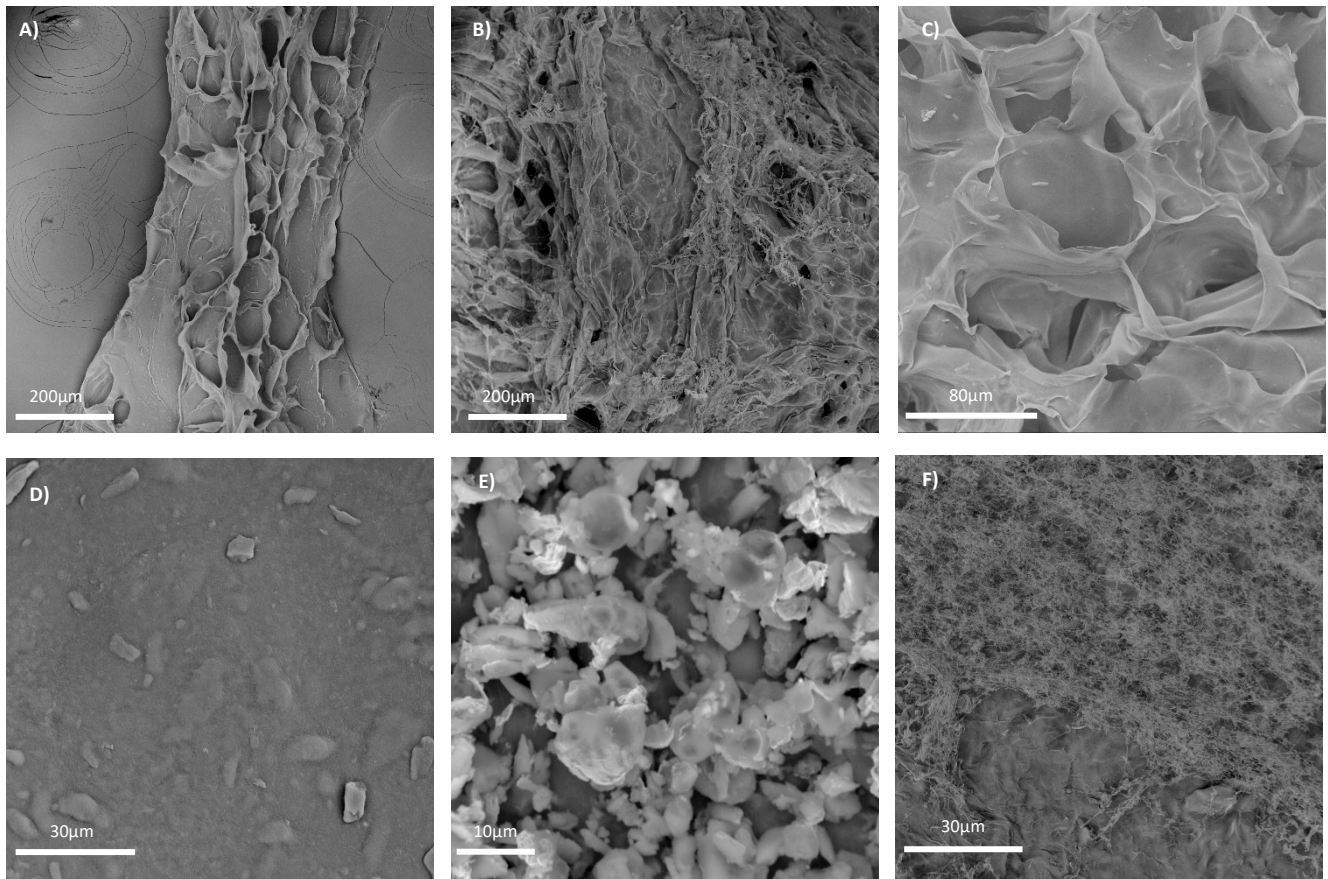


Figura 48: Immagini SEM: A) Struttura fotopolimerizzata con torcia UV e incubazione in GEN 500x; B) Struttura fotopolimerizzata con testina UV e incubazione in GEN 500x; C) Struttura B 1000x; D) Struttura A 2500x; E) Polveri di Fib 5000x; F) Struttura B 2500x

Una volta analizzata la morfologia superficiale del campione si è andati ad indagare la morfologia interna, per verificare che fossero simili. Per eseguire l'analisi sono state stampate dei campioni *bulk* reticolati secondo quanto previsto dal protocollo, successivamente congelati, liofilizzati. Queste strutture sono poi state sezionate con l'ausilio di un bisturi per esporre i piani interni, che sono stati resi conduttivi mediante la creazione di un rivestimento in platino di 7nm. La Figura 49A mostra l'esito dell'analisi al SEM, la morfologia è stata quindi confrontata con quella superficiale del campione (Figura 49B). Le morfologie delle superfici appaiono alquanto simili, si può evidenziare che internamente sono presenti numerose discontinuità, le porosità non sono particolarmente definite ma risultano maggiormente interconnesse a differenza di quelle presenti sulla superficie esteriore, ma

questo può anche essere dovuto al taglio che essendo eseguito manualmente non è netto. Inoltre a differenza della superficie esteriore, che come mostrato in Figura 48 era caratterizzata da aree con diversa morfologia, la superficie interna del campione esplorato era in ogni punto identico a se stessa.

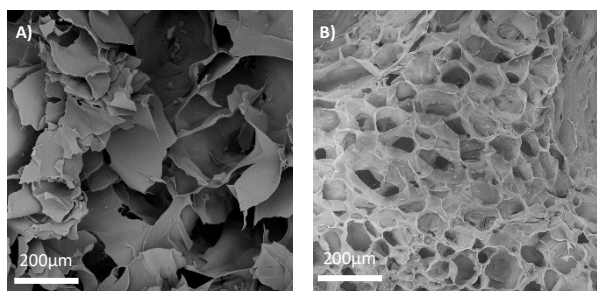


Figura 49: Immagini SEM della morfologia: A) superficie interna B) superficie esteriore

3.3.5 Test di degradazione in vitro

Le strutture stampate, reticolate tramite esposizione alla radiazione ultravioletta e incubazione in genipina sono state sottoposte al test di degradazione idrolitica. Questa prova consiste nell'incubare gli scaffold in PBS a 37°C, sottoponendoli ad oscillazione blanda (50rpm), per la durata di 3, 7, 14 giorni. Ad ogni step temporale i campioni vengono lavati con dH₂O, congelati, liofilizzati e pesati al fine di misurare la perdita di massa. Questa misurazione permette di valutare le cinetiche degradative, fondamentali per la futura applicazione biologica. Complessivamente gli scaffold presentano una buona stabilità in ambiente acquoso. A seguito dell'incubazione per 3 giorni è stata registrata una perdita di massa pari a circa 8%, la degradazione prosegue poi con una riduzione della massa di circa 6,5% dopo 7 giorni (Figura 50, Tabella 16). Nonostante l'esame sia stato condotto per una durata complessiva di 14 giorni, non è stato possibile pesare questi ultimi campioni a causa del deterioramento degli stessi che ne ha impedito il maneggiamento.

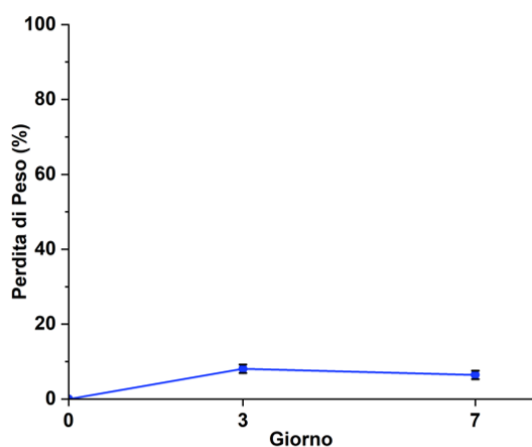


Figura 50: Degradazione idrolitica degli scaffold stampati di ColMA/Chi/Fib reticolati mediante l'azione dei raggi UV e della genipina

	3 giorni	7 giorni
Perdita di Peso (%)	8,06 ± 1,14	6,45 ± 1,14

Tabella 16: Perdita di peso (%) degli scaffold incubati a 3 e 7 giorni

In Figura 51 sono riportate le immagini degli scaffold ad ogni step temporale, ed è ben visibile che dopo 14 giorni si verifica un importante restringimento del campione a conferma della degradazione delle strutture stampate. Nonostante questo la presenza della struttura è un ottimo segnale per la futura applicazione clinica, considerando che sono richieste alcune settimane dal momento del possibile impianto alla conclusione della fase proliferativa del processo di rigenerazione, che necessita di un supporto.

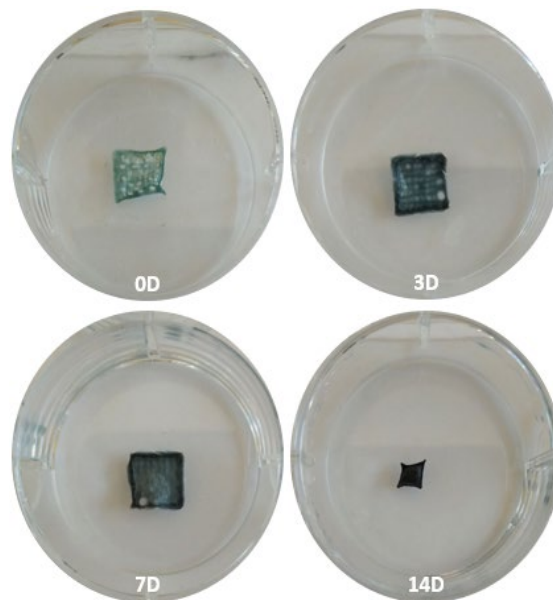


Figura 51: Foto post liofilizzazione dei campioni sottoposti al test degradativo a diversi step temporali

3.3.6 Prove preliminari di stampa 3D di strutture complesse

Gli scaffold da adoperare come strutture di sostegno per la crescita cellulare nell'ambito della rigenerazione delle ferite della cute, richiedono densità di riempimento delle griglie maggiori o geometrie più complesse. La densità influenza la dimensione dei pori interni, che devono essere tali da consentire l'ingresso delle cellule e la diffusione delle sostanze nutritive e di scarto. Invece, la geometria può fornire degli stimoli alle cellule influenzandone l'attività, così come accade nei tessuti nativi che possiedono proprietà geometriche specifiche tali da condizionare le funzioni fisiologiche [90]. Pertanto a conclusione del lavoro di tesi, dopo aver ottimizzato la formulazione, il processo di stampa e i trattamenti di reticolazione, sono stati realizzati dei costrutti dalla maggiore complessità. Dalla libreria dei file STL messi a disposizione dal produttore della biostampante BIOX è stata selezionata una struttura quadrata (10x10x0,3mm) con geometria interna giroidale e densità di riempimento tra il 25-30% (Figura 52A). In Figura 52B è possibile osservare la struttura stampata con densità del 30% al termine del trattamento genipina. Le porosità strutturali non sono ben visibili, specialmente in vicinanza al perimetro dove la struttura è collassata causando la chiusura dei pori. Invece la struttura con riempimento del 25% (Figura 52C) mostra dei filamenti ben definiti, ad ogni

modo le impostazioni di densità selezionata non prevedevano la stampa di filamenti che si andassero a intersecare, per questa ragione non è possibile condurre un valido confronto.

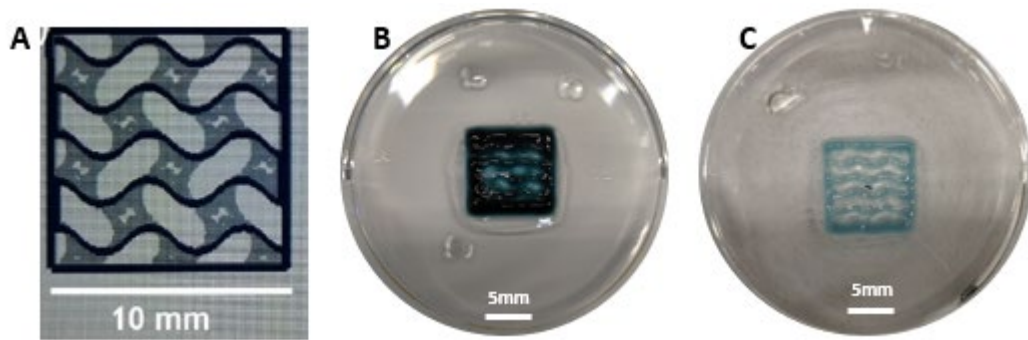


Figura 52: Strutture complesse: A) Modello CAD; B) stampata, reticolata con torcia e genipina; C) stampata e reticolata con testina e genipina

4. CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI

L'ingegneria tissutale è una branca della medicina rigenerativa che si propone di progettare e realizzare sostituti biologici in grado di replicare il tessuto nativo stimolando così la rigenerazione a seguito di eventi traumatici o condizioni patologiche. Lo sviluppo di materiali e tecniche di processamento innovativi rappresenta una valida alternativa o un approccio complementare ai tradizionali trattamenti farmacologici e chirurgici che ad oggi sono adoperati per ripristinare i tessuti danneggiati da lesioni o patologie, che tuttavia presentano numerose limitazioni. Data l'elevata incidenza di patologie che interessano il tessuto cutaneo, causa di ulcere e ferite croniche, l'ingegneria tissutale si sta focalizzando sullo studio di questo complesso sistema per supportarne la rigenerazione. Nonostante siano già stati ottenuti buoni risultati nella realizzazione di costrutti che replicano la pelle, i prodotti in commercio non sono in grado di ripristinare completamente la normale struttura e funzione del tessuto danneggiato. Pertanto, la ricerca prosegue nello studio e nella sintesi di nuovi biomateriali capaci di accelerare il fisiologico processo di guarigione. Per far ciò è importante che i biomateriali sviluppati siano biomimetici e bioattivi, ma anche capaci di proteggere il letto della ferita da possibili infezioni, assorbire gli essudati, mantenere la regione interessata adeguatamente umida, e degradarsi nel tempo per lasciare spazio al tessuto di neoformazione. Per soddisfare questi requisiti i materiali che andranno a comporre il tessuto ingegnerizzato devono essere accuratamente valutati.

In questo scenario, si sono dimostrati particolarmente promettenti i sistemi polimerici grazie all'ampia scelta di composizioni e la possibilità di modulare le loro proprietà fisico-chimiche e meccaniche in accordo con l'applicazione finale. In questa classe, i polimeri naturali risultano particolarmente promettenti nella realizzazione di costrutti ingegnerizzati in quanto maggiormente biocompatibili, bioattivi e biodegradabili rispetto ai polimeri sintetici. Tuttavia, questi presentano delle limitazioni quali ad esempio scarse proprietà meccaniche e rapide cinetiche di degradazione. Nonostante ciò, è possibile fronteggiare queste problematiche adottando opportune strategie di reticolazione oppure modificando opportunamente il materiale, miscelandolo con un polimero sintetico oppure aggiungendo una fase inorganica. Combinare polimeri naturali e sintetici permette di ottenere un materiale biocompatibile ma con un'elevata stabilità meccanica. Invece, aggiungere una fase inorganica come i vetri bioattivi consente di sostenere il processo di guarigione grazie al rilascio di ioni biologicamente attivi.

Le proprietà del materiale devono inoltre essere modulate in base alla tecnica selezionata per la realizzazione del costrutto finale. Ad oggi, grande interesse hanno suscitato le tecniche di prototipazione rapida, come la stampa 3D ad estrusione, che consentono di realizzare strutture

mediante la progressiva deposizione di materiale senza avere eccessivi vincoli sulla forma e sulla porosità finali. Inoltre, queste tecniche sono vantaggiose per la potenziale scalabilità, che consentirebbe di traslare un processo eseguito in laboratorio ad una produzione su larga scala.

In questo scenario si inserisce il presente lavoro di tesi, il cui obiettivo è stato quello di realizzare una nuova formulazione polimerica a base di collagene, chitosano e fibroina della seta, per lo sviluppo di scaffold in grado di mimare la matrice extracellulare naturale del tessuto, in modo tale da fornire un potenziale supporto nelle diverse fasi del processo rigenerativo della cute. Per lo sviluppo della formulazione, riportata nel lavoro come Col/Chi/Fib, sono state valutate le proprietà reologiche dei singoli polimeri al fine di stabilire le opportune concentrazioni di ciascuno nel sistema finale. Successivamente sono stati valutati i rapporti volumetrici secondo i quali miscelare le soluzioni polimeriche precedentemente preparate. Tutte le prove eseguite hanno permesso di ottimizzare il protocollo di preparazione e sviluppare la formulazione Col/Chi/Fib in modo tale che fosse processabile tramite la tecnica della stampa 3D ad estrusione senza l'ausilio di bagni di supporto. Per questa ragione, a seguito di prove preliminari di stampa che hanno evidenziato una scarsa capacità del materiale di mantenere la forma desiderata una volta depositato, sono state testate diverse strategie di reticolazione. Inizialmente si è valutato l'uso della soluzione 12% NaOH in 30% EtOH spruzzata durante la stampa a seguito della deposizione di ogni strato per indurre una gelificazione istantanea dello strato stampato. Tuttavia, poiché questa strategia è risultata poco efficace nella reticolazione del materiale, è stata valutata una strategia di fotoreticolazione mediante esposizione alla radiazione ultravioletta. Per poter adottare questo metodo è stato necessario modificare la formulazione sviluppata sostituendo il collagene con il collagene metacrilato e aggiungendo il fotoiniziatore Irgacure 2959, ottimizzando una nuova formulazione definita come ColMA/Chi/Fib. Le prove di stampa eseguite hanno consentito l'ottimizzazione dei parametri di stampa e fotoreticolazione. Questo ha permesso la realizzazione di scaffold dalla geometria quadrata (10x10x0,5mm), e riempimento interno a griglia, fotoreticolati tramite esposizione alla radiazione UV dopo la deposizione di ogni strato per 120 s e per ulteriori 5 min al termine del processo. Tuttavia, a causa delle scarse proprietà visco-elastiche e maneggiabilità delle strutture stampate si è deciso di sfruttare una ulteriore fase di reticolazione. La strategia adoperata è stata messa a punto dal gruppo di ricerca in studi precedenti e prevede la reticolazione chimica della struttura tramite la loro incubazione a 37°C in una soluzione 0,5% di genipina in un bagno al 70% EtOH. Le strutture così reticolate, non solo hanno dimostrato maggiore rigidità della matrice ma, sottoposte al di test di degradazione idrolitica, hanno dimostrato di essere stabili in ambiente acquoso fino a 7 giorni. Il test è stato eseguito per 14 giorni complessivi, al termine dei quali gli scaffold presentavano un restringimento importante

correlato ad una perdita di massa che non è stato possibile misurare a causa dell'impossibilità di maneggiare i campioni. Infine, l'ottimizzazione dei parametri di stampa e dei processi di reticolazione ha permesso la realizzazione di strutture complesse, necessarie per sostenere la rigenerazione dei tessuti. Si può concludere che il presente progetto di tesi ha consentito la realizzazione di strutture stampate, a base di un nuovo materiale (ColMA/Chi/Fib), stabili in ambiente acquoso e potenzialmente utilizzabili nell'ambito della rigenerazione delle lesioni della pelle.

Studi futuri potrebbero essere volti a migliorare la fedeltà di stampa del materiale, in modo da riuscire a realizzare dei costrutti geometricamente complessi, che riproducano fedelmente il modello di partenza selezionato.

Un'ulteriore strategia, volta a migliorare la stampabilità ed incrementare la bioattività dello scaffold finale, è l'integrazione nella matrice polimerica di una fase inorganica costituita ad esempio da nanoparticelle di vetri bioattivi. In accordo con diversi studi di letteratura, queste nanoparticelle, grazie alla capacità di incorporare e rilasciare ioni terapeutici, potrebbero stimolare e velocizzare il processo rigenerativo. In particolare, l'incorporazione di ioni con proprietà antibatteriche potrebbe ostacolare la proliferazione batterica all'interno del letto della ferita, migliorando la funzionalità dello scaffold. Le nanoparticelle potrebbero essere introdotte disperdendole all'interno della formulazione oppure interponendole tra uno strato e l'altro dello scaffold in costruzione, alternando e combinando il processo di stampa ad estrusione alla stampa inkjet di una sospensione di particelle. Questo processo potrebbe essere implementato sulla biostampante impiegata in questo studio (BIOX, Cellink) poiché questa presenta un terzo alloggiamento sul quale è possibile montare una testina di stampa inkjet, usata in parallelo alle altre due già adoperate durante il processo di stampa ottimizzato (testina pneumatica a temperatura controllata e testina UV per fotoreticolazione). Nonostante la citocompatibilità dei materiali adoperati nel lavoro di tesi sia ampiamente riportata in letteratura, sarà necessario verificare la biocompatibilità della formulazione ColMA/Chi/Fib sviluppata e degli scaffold finali, in quanto la tecnica di fabbricazione e le metodologie di reticolazione potrebbero introdurre degli elementi potenzialmente citotossici per le cellule. Inoltre, mediante l'esecuzione di test cellulari, si potrebbe valutare l'effetto dei costrutti realizzati sul comportamento cellulare, analizzando nello specifico vitalità, adesione e la proliferazione, così da stabilire se gli scaffold stampati possono essere un valido sostituto biologico atto a stimolare la rigenerazione cutanea.

BIBLIOGRAFIA

- [1] X. Zhang, M. R. Reagan, e D. L. Kaplan, «Electrospun silk biomaterial scaffolds for regenerative medicine», *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 61, fasc. 12, pp. 988–1006, ott. 2009, doi: 10.1016/j.addr.2009.07.005.
- [2] H. Wobma e G. Vunjak-Novakovic, «Tissue Engineering and Regenerative Medicine 2015: A Year in Review», *Tissue Engineering Part B: Reviews*, vol. 22, fasc. 2, pp. 101–113, apr. 2016, doi: 10.1089/ten.teb.2015.0535.
- [3] A. R. Boccaccini, I. Notingher, V. Maquet, e R. J. R. Me, «Bioresorbable and bioactive composite materials based on polylactide foams filled with and coated by Bioglass1 particles for tissue engineering applications», p. 8.
- [4] R. Naomi, J. Ratanavaraporn, e M. B. Fauzi, «Comprehensive Review of Hybrid Collagen and Silk Fibroin for Cutaneous Wound Healing», *Materials*, vol. 13, fasc. 14, p. 3097, lug. 2020, doi: 10.3390/ma13143097.
- [5] M. Augustin, A. Justiniano, C. Lindholm, D. Margolis, e A. Nelson, «CONSULENTI EDITORIALI», p. 19.
- [6] «3D bioprinting for skin tissue engineering: Current status and perspectives».
- [7] Y. Ikada, «Challenges in tissue engineering», *J. R. Soc. Interface.*, vol. 3, fasc. 10, pp. 589–601, ott. 2006, doi: 10.1098/rsif.2006.0124.
- [8] A. Atala, «Tissue engineering for the replacement of organ function in the genitourinary system: Tissue engineering for replacement organ function», *American Journal of Transplantation*, vol. 4, pp. 58–73, feb. 2004, doi: 10.1111/j.1600-6135.2004.0346.x.
- [9] F. J. O'Brien, «Biomaterials & scaffolds for tissue engineering», *Materials Today*, vol. 14, fasc. 3, pp. 88–95, mar. 2011, doi: 10.1016/S1369-7021(11)70058-X.
- [10] G. Saini, N. Segaran, J. Mayer, A. Saini, H. Albadawi, e R. Oklu, «Applications of 3D Bioprinting in Tissue Engineering and Regenerative Medicine», *JCM*, vol. 10, fasc. 21, p. 4966, ott. 2021, doi: 10.3390/jcm10214966.
- [11] J. Ringe, C. Kaps, G.-R. Burmester, e M. Sittinger, «Stem cells for regenerative medicine: advances in the engineering of tissues and organs», *Naturwissenschaften*, vol. 89, fasc. 8, pp. 338–351, ago. 2002, doi: 10.1007/s00114-002-0344-9.
- [12] «03_IntroBioreattori.pdf».
- [13] F. Berthiaume, T. J. Maguire, e M. L. Yarmush, «Tissue Engineering and Regenerative Medicine: History, Progress, and Challenges», *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.*, vol. 2, fasc. 1, pp. 403–430, lug. 2011, doi: 10.1146/annurev-chembioeng-061010-114257.
- [14] J. Margolis e G. Rodeheaver, «Definitions and Guidelines for Assessment of Wounds and Evaluation of Healing».
- [15] T. A. Mustoe, K. O'Shaughnessy, e O. Kloeters, «Chronic Wound Pathogenesis and Current Treatment Strategies: A Unifying Hypothesis», *Plastic and Reconstructive Surgery*, vol. 117, fasc. SUPPLEMENT, pp. 35S-41S, giu. 2006, doi: 10.1097/01.prs.0000225431.63010.1b.
- [16] A. Markova e E. N. Mostow, «US Skin Disease Assessment: Ulcer and Wound Care», *Dermatologic Clinics*, vol. 30, fasc. 1, pp. 107–111, gen. 2012, doi: 10.1016/j.det.2011.08.005.
- [17] J. F. Guest *et al.*, «Health economic burden that different wound types impose on the UK's National Health Service: Annual NHS cost of managing different wound types in the UK», *Int Wound J*, vol. 14, fasc. 2, pp. 322–330, apr. 2017, doi: 10.1111/iwj.12603.
- [18] M. Romanelli *et al.*, «INTERNATIONAL EDITORIAL BOARD», vol. 12, fasc. 3, p. 55.
- [19] E. Mele, «Electrospinning of natural polymers for advanced wound care: towards responsive and adaptive dressings», *J. Mater. Chem. B*, vol. 4, fasc. 28, pp. 4801–4812, 2016, doi: 10.1039/C6TB00804F.

- [20] J. Ho, C. Walsh, D. Yue, A. Dardik, e U. Cheema, «Current Advancements and Strategies in Tissue Engineering for Wound Healing: A Comprehensive Review», *Advances in Wound Care*, vol. 6, fasc. 6, pp. 191–209, giu. 2017, doi: 10.1089/wound.2016.0723.
- [21] A. J. Singer, «Cutaneous Wound Healing», *The New England Journal of Medicine*, p. 9, 1999.
- [22] Y. Wu, L. Chen, P. G. Scott, e E. E. Tredget, «Mesenchymal Stem Cells Enhance Wound Healing Through Differentiation and Angiogenesis», *Stem Cells*, vol. 25, fasc. 10, pp. 2648–2659, ott. 2007, doi: 10.1634/stemcells.2007-0226.
- [23] P. A. J. Kolarsick, M. A. Kolarsick, e C. Goodwin, «Anatomy and Physiology of the Skin», *SKIN CANCER*, p. 12.
- [24] B. E. Anderson, *Atlante di anatomia fisiopatologia e clinica: apparato tegumentario*, Seconda edizione. Elsevier Health Sciences, 2013.
- [25] B. Azimi *et al.*, «Bio-Based Electrospun Fibers for Wound Healing», *JFB*, vol. 11, fasc. 3, p. 67, set. 2020, doi: 10.3390/jfb11030067.
- [26] L. Alberghina, *Il corpo umano*, Prima edizione., vol. H, 10 voll. A. Mondadori Scuola, 2012.
- [27] M. Rahmati, J. J. Blaker, S. P. Lyngstadaas, J. F. Mano, e H. J. Haugen, «Designing multigradient biomaterials for skin regeneration», *Materials Today Advances*, vol. 5, p. 100051, mar. 2020, doi: 10.1016/j.mtadv.2019.100051.
- [28] A. D. Theocharis, S. S. Skandalis, C. Gialeli, e N. K. Karamanos, «Extracellular matrix structure», *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 97, pp. 4–27, feb. 2016, doi: 10.1016/j.addr.2015.11.001.
- [29] M. Xue e C. J. Jackson, «Extracellular Matrix Reorganization During Wound Healing and Its Impact on Abnormal Scarring», *Advances in Wound Care*, vol. 4, fasc. 3, pp. 119–136, mar. 2015, doi: 10.1089/wound.2013.0485.
- [30] G. S. Schultz e A. Wysocki, «Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing», *Wound Repair and Regeneration*, vol. 17, fasc. 2, pp. 153–162, mar. 2009, doi: 10.1111/j.1524-475X.2009.00466.x.
- [31] S. P. Tarassoli *et al.*, «Skin tissue engineering using 3D bioprinting: An evolving research field», *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*, vol. 71, fasc. 5, pp. 615–623, mag. 2018, doi: 10.1016/j.bjps.2017.12.006.
- [32] S. P. Miguel, «An overview of electrospun membranes loaded with bioactive molecules for improving the wound healing process», *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, p. 22, 2019.
- [33] J. S. Boateng, K. H. Matthews, H. N. E. Stevens, e G. M. Eccleston, «Wound Healing Dressings and Drug Delivery Systems: A Review», *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 97, fasc. 8, pp. 2892–2923, ago. 2008, doi: 10.1002/jps.21210.
- [34] J. E. Greenwood, M. ChB, J. Clausen, e S. Kavanagh, «Experience With Biobrane: Uses and Caveats for Success», vol. 9.
- [35] F. Hafezi, N. Scoutaris, D. Douroumis, e J. Boateng, «3D printed chitosan dressing crosslinked with genipin for potential healing of chronic wounds», *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 560, pp. 406–415, apr. 2019, doi: 10.1016/j.ijpharm.2019.02.020.
- [36] S.-W. Choi, Y. Zhang, e Y. Xia, «Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering: The Importance of Uniformity in Pore Size and Structure», *Langmuir*, vol. 26, fasc. 24, pp. 19001–19006, dic. 2010, doi: 10.1021/la104206h.
- [37] «Williams - 2008 - On the mechanisms of biocompatibility.pdf».
- [38] T. J. Sill e H. A. von Recum, «Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering», *Biomaterials*, vol. 29, fasc. 13, pp. 1989–2006, mag. 2008, doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.01.011.
- [39] P. Nitti *et al.*, «Influence of Nanofiber Orientation on Morphological and Mechanical Properties of Electrospun Chitosan Mats», *Journal of Healthcare Engineering*, vol. 2018, pp. 1–12, nov. 2018, doi: 10.1155/2018/3651480.

- [40] M. Singh, C. P. Morris, R. J. Ellis, M. S. Detamore, e C. Berkland, «Microsphere-Based Seamless Scaffolds Containing Macroscopic Gradients of Encapsulated Factors for Tissue Engineering», *Tissue Engineering Part C: Methods*, vol. 14, fasc. 4, pp. 299–309, dic. 2008, doi: 10.1089/ten.tec.2008.0167.
- [41] S. C. Owen e M. S. Shoichet, «Design of three-dimensional biomimetic scaffolds», *J. Biomed. Mater. Res.*, p. n/a-n/a, lug. 2010, doi: 10.1002/jbm.a.32834.
- [42] V. Karageorgiou e D. Kaplan, «Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis», *Biomaterials*, vol. 26, fasc. 27, pp. 5474–5491, set. 2005, doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.02.002.
- [43] J. Malda *et al.*, «The effect of PEGT/PBT scaffold architecture on oxygen gradients in tissue engineered cartilaginous constructs», *Biomaterials*, vol. 25, fasc. 26, pp. 5773–5780, nov. 2004, doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.01.028.
- [44] X. Zhu, W. Cui, X. Li, e Y. Jin, «Electrospun Fibrous Mats with High Porosity as Potential Scaffolds for Skin Tissue Engineering», *Biomacromolecules*, vol. 9, fasc. 7, pp. 1795–1801, lug. 2008, doi: 10.1021/bm800476u.
- [45] B. D. Ratner, «The Nature of Matter and Materials», in *Biomaterials Science*, Elsevier, 2013, pp. 6–9. doi: 10.1016/B978-0-08-087780-8.00002-4.
- [46] G. D. Mogoşanu e A. M. Grumezescu, «Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing», *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 463, fasc. 2, pp. 127–136, mar. 2014, doi: 10.1016/j.ijpharm.2013.12.015.
- [47] E. Norris *et al.*, «Electrospinning 3D bioactive glasses for wound healing», *Biomed. Mater.*, vol. 15, fasc. 1, p. 015014, feb. 2020, doi: 10.1088/1748-605X/ab591d.
- [48] K. Vig *et al.*, «Advances in Skin Regeneration Using Tissue Engineering», *IJMS*, vol. 18, fasc. 4, p. 789, apr. 2017, doi: 10.3390/ijms18040789.
- [49] C. Gao *et al.*, «3D bioprinting for fabricating artificial skin tissue», *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 208, p. 112041, dic. 2021, doi: 10.1016/j.colsurfb.2021.112041.
- [50] C. Dai, S. Shih, e A. Khachemoune, «Skin substitutes for acute and chronic wound healing: an updated review», *Journal of Dermatological Treatment*, vol. 31, fasc. 6, pp. 639–648, ago. 2020, doi: 10.1080/09546634.2018.1530443.
- [51] D. Velasco, C. Quílez, M. Garcia, J. F. del Cañizo, e J. L. Jorcano, «3D human skin bioprinting: a view from the bio side», *Journal of 3D Printing in Medicine*, vol. 2, fasc. 3, pp. 141–162, lug. 2018, doi: 10.2217/3dp-2018-0008.
- [52] «Walimbe e Panitch - 2020 - Best of Both Hydrogel Worlds Harnessing Bioactivi.pdf».
- [53] A. M. Ferreira, P. Gentile, V. Chiono, e G. Ciardelli, «Collagen for bone tissue regeneration», *Acta Biomaterialia*, vol. 8, fasc. 9, pp. 3191–3200, set. 2012, doi: 10.1016/j.actbio.2012.06.014.
- [54] A. Muxika, A. Etxabide, J. Uranga, P. Guerrero, e K. de la Caba, «Chitosan as a bioactive polymer: Processing, properties and applications», *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 105, pp. 1358–1368, dic. 2017, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.07.087.
- [55] G. Li e S. Sun, «Silk Fibroin-Based Biomaterials for Tissue Engineering Applications», *Molecules*, vol. 27, fasc. 9, p. 2757, apr. 2022, doi: 10.3390/molecules27092757.
- [56] C. Vepari e D. L. Kaplan, «Silk as a biomaterial», *Progress in Polymer Science*, vol. 32, fasc. 8–9, pp. 991–1007, ago. 2007, doi: 10.1016/j.progpolymsci.2007.05.013.
- [57] U.-J. Kim, J. Park, C. Li, H.-J. Jin, R. Valluzzi, e D. L. Kaplan, «Structure and Properties of Silk Hydrogels», *Biomacromolecules*, vol. 5, fasc. 3, pp. 786–792, mag. 2004, doi: 10.1021/bm0345460.
- [58] A. G. Tabriz, D. Douroumis, e J. Boateng, «3D Printed Scaffolds for Wound Healing and Tissue Regeneration», in *Therapeutic Dressings and Wound Healing Applications*, 1^a ed., J. Boateng, A c. di Wiley, 2020, pp. 385–398. doi: 10.1002/9781119433316.ch17.
- [59] D. F. Williams, «On the nature of biomaterials», *Biomaterials*, vol. 30, fasc. 30, pp. 5897–5909, ott. 2009, doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.07.027.

- [60] J. Groll *et al.*, «A definition of bioinks and their distinction from biomaterial inks», *Biofabrication*, vol. 11, fasc. 1, p. 013001, nov. 2018, doi: 10.1088/1758-5090/aaec52.
- [61] W. Sun *et al.*, «The bioprinting roadmap», *Biofabrication*, vol. 12, fasc. 2, p. 022002, apr. 2020, doi: 10.1088/1758-5090/ab5158.
- [62] J. Malda *et al.*, «25th Anniversary Article: Engineering Hydrogels for Biofabrication», *Adv. Mater.*, vol. 25, fasc. 36, pp. 5011–5028, set. 2013, doi: 10.1002/adma.201302042.
- [63] A. C. Heidenreich, M. Pérez-Recalde, A. González Wusener, e É. B. Hermida, «Collagen and chitosan blends for 3D bioprinting: A rheological and printability approach», *Polymer Testing*, vol. 82, p. 106297, feb. 2020, doi: 10.1016/j.polymertesting.2019.106297.
- [64] H. Suo, J. Zhang, M. Xu, e L. Wang, «Low-temperature 3D printing of collagen and chitosan composite for tissue engineering», *Materials Science and Engineering: C*, vol. 123, p. 111963, apr. 2021, doi: 10.1016/j.msec.2021.111963.
- [65] C. Laurencin, T. Jiang, S. Kumbar, e L. Nair, «Biologically Active Chitosan Systems for Tissue Engineering and Regenerative Medicine», *CTMC*, vol. 8, fasc. 4, pp. 354–364, mar. 2008, doi: 10.2174/156802608783790974.
- [66] T. Nguyen, K. E. Watkins, e V. Kishore, «Photochemically crosslinked cell-laden methacrylated collagen hydrogels with high cell viability and functionality», *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 107, fasc. 7, pp. 1541–1550, lug. 2019, doi: 10.1002/jbm.a.36668.
- [67] N. Sorkin e D. Varssano, «Corneal Collagen Crosslinking: A Systematic Review», *Ophthalmologica*, vol. 232, fasc. 1, pp. 10–27, 2014, doi: 10.1159/000357979.
- [68] W. Hu, Z. Wang, Y. Xiao, S. Zhang, e J. Wang, «Advances in crosslinking strategies of biomedical hydrogels», *Biomater. Sci.*, vol. 7, fasc. 3, pp. 843–855, 2019, doi: 10.1039/C8BM01246F.
- [69] M. Rajabi, M. McConnell, J. Cabral, e M. A. Ali, «Chitosan hydrogels in 3D printing for biomedical applications», *Carbohydrate Polymers*, vol. 260, p. 117768, mag. 2021, doi: 10.1016/j.carbpol.2021.117768.
- [70] J. Zhang *et al.*, «Silk particles, microfibrils and nanofibrils: A comparative study of their functions in 3D printing hydrogel scaffolds», *Materials Science and Engineering: C*, vol. 103, p. 109784, ott. 2019, doi: 10.1016/j.msec.2019.109784.
- [71] P. Coimbra, D. Fernandes, P. Ferreira, M. H. Gil, e H. C. de Sousa, «Solubility of Irgacure® 2959 photoinitiator in supercritical carbon dioxide: Experimental determination and correlation», *The Journal of Supercritical Fluids*, vol. 45, fasc. 3, pp. 272–281, lug. 2008, doi: 10.1016/j.supflu.2008.01.014.
- [72] G. Montalbano, «3D Collagen based biomimetic scaffolds».
- [73] C. Riedel, A. Alegria, J. Colmenero, e P. Tordjem, «Polymer Rheology by Dielectric Spectroscopy», in *Rheology*, J. De Vicente, A c. di InTech, 2012. doi: 10.5772/35145.
- [74] «Reologia». Consultato: 27 febbraio 2023. [Online]. Disponibile su: <https://www.tainstruments.com/products/rheology/discovery-hybrid-rheometers/>
- [75] D. R. Arrigo e R. Rolfini, «La reologia applicata al processo di estrusione».
- [76] G. Montalbano, «LABORATORIO INGEGNERIA DEI MATERIALI ANNO ACCADEMICO 2021 – 2022 REOLOGIA».
- [77] «Microscopia elettronica a scansione (SEM)». [Online]. Disponibile su: <https://www.alfatest.it/tecniche/sem-microscopia-elettronica-scansione>
- [78] «Riflettanza totale attenuata (ATR) La tecnica di campionamento ATR per applicazioni di FTIR». [Online]. Disponibile su: https://www.mt.com/it/it/home/products/L1_AutochemProducts/ReactIR/attenuated-total-reflectance-atr.html
- [79] I. Briguglio, «SPETTROSCOPIA INFRAROSSA», p. 31.
- [80] «the effects of PVA-chitosan-fibroin (PCF)-blended spongy on wound healing rats.pdf».

- [81] H.-Y. Wang, Y.-Q. Zhang, e Z.-G. Wei, «Dissolution and processing of silk fibroin for materials science», *Critical Reviews in Biotechnology*, vol. 41, fasc. 3, pp. 406–424, apr. 2021, doi: 10.1080/07388551.2020.1853030.
- [82] Y. Xu, S. Yuan, J. Han, H. Lin, e X. Zhang, «Design and fabrication of a chitosan hydrogel with gradient structures via a step-by-step cross-linking process», *Carbohydrate Polymers*, vol. 176, pp. 195–202, nov. 2017, doi: 10.1016/j.carbpol.2017.08.032.
- [83] F. P. W. Melchels, W. J. A. Dhert, D. W. Hutmacher, e J. Malda, «Development and characterisation of a new bioink for additive tissue manufacturing», *J. Mater. Chem. B*, vol. 2, fasc. 16, p. 2282, 2014, doi: 10.1039/c3tb21280g.
- [84] K. Belbachir, R. Noreen, G. Gouspillou, e C. Petibois, «Collagen types analysis and differentiation by FTIR spectroscopy», *Anal Bioanal Chem*, vol. 395, fasc. 3, pp. 829–837, ott. 2009, doi: 10.1007/s00216-009-3019-y.
- [85] N. Bhattarai, H. R. Ramay, J. Gunn, F. A. Matsen, e M. Zhang, «PEG-grafted chitosan as an injectable thermosensitive hydrogel for sustained protein release», *Journal of Controlled Release*, vol. 103, fasc. 3, pp. 609–624, apr. 2005, doi: 10.1016/j.jconrel.2004.12.019.
- [86] E. Kamalha, Y. S. Zheng, Y. C. Zeng, e M. N. Fredrick, «FTIR and WAXD Study of Regenerated Silk Fibroin», *AMR*, vol. 677, pp. 211–215, mar. 2013, doi: 10.4028/www.scientific.net/AMR.677.211.
- [87] B. D. Walters e J. P. Stegemann, «Strategies for directing the structure and function of three-dimensional collagen biomaterials across length scales», *Acta Biomaterialia*, vol. 10, fasc. 4, pp. 1488–1501, apr. 2014, doi: 10.1016/j.actbio.2013.08.038.
- [88] C. Mu, K. Zhang, W. Lin, e D. Li, «Ring-opening polymerization of genipin and its long-range crosslinking effect on collagen hydrogel», *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 101A, fasc. 2, pp. 385–393, feb. 2013, doi: 10.1002/jbm.a.34338.
- [89] F. A. Whitehead, S. A. Young, e S. Kasapis, «Swelling behaviour and glass transition in genipin-crosslinked chitosan systems», *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 164, pp. 3075–3083, dic. 2020, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.08.178.
- [90] M. Werner, N. A. Kurniawan, e C. V. C. Bouten, «Cellular Geometry Sensing at Different Length Scales and its Implications for Scaffold Design», *Materials*, vol. 13, fasc. 4, p. 963, feb. 2020, doi: 10.3390/ma13040963.