

1. Introduzione

1.1 Ingegneria tissutale

L'ingegneria tissutale rappresenta un'importante strategia terapeutica per il presente e il futuro della medicina rigenerativa. Essa è una **scienza interdisciplinare** che applica i principi e i metodi **dell'ingegneria** e delle **scienze biologiche** con l'obiettivo di sviluppare, da componenti sia sintetici che naturali, sostituti biologici in grado di ripristinare, mantenere o migliorare le funzioni di tessuti e/o organi danneggiati, spesso combinando biomateriali, cellule e molecole bioattive [1, 2].

Langer e Vacanti [3] hanno riportato che il più comune approccio per i sostituti biologici ingegnerizzati è basato sull'interazione di cellule, segnali molecolari e scaffold polimerici. Le cellule sintetizzano le matrici del nuovo tessuto, mentre lo scaffold provvede a creare un ambiente ideale per le cellule, all'interno del quale possono compiere le loro funzioni di adesione, proliferazione e differenziazione. Infine, i segnali molecolari facilitano e inducono le cellule a rigenerare il nuovo tessuto.

In questo programma rigenerativo, gli scaffold provvedono non solo a fornire delle strutture tridimensionali per la formazione dei nuovi tessuti ma fungono da elemento di controllo per il rilascio dei segnali molecolari.

Per eseguire tutte queste funzioni, gli scaffold dovrebbero possedere i seguenti requisiti: (1) biocompatibilità con i tessuti, (2) biodegradabilità ad una velocità di degradazione ideale che dovrebbe corrispondere alla velocità di formazione del nuovo tessuto, (3) assenza di tossicità e immunogenicità, (4) ottime proprietà meccaniche, (5) e un'adeguata porosità e morfologia per il trasporto di cellule, gas, metaboliti, nutrienti e segnali molecolari sia all'interno dello scaffold che fra lo scaffold e l'ambiente circostante.

1.2 Biomateriali

Si definiscono biomateriali i “materiali concepiti per interfacciarsi con i sistemi biologici per valutare, dare supporto o sostituire un qualsiasi tessuto, organo o funzione del corpo”[4].

I biomateriali usati nell'ingegneria tissutale per la fabbricazione di scaffold si possono dividere, a seconda della provenienza, in naturali, sintetici o semisintetici. Comunque, quelli sintetici o semisintetici sono i materiali più utilizzati per la fabbricazione di scaffold nelle varie applicazioni dell'ingegneria tissutale, questo perché offrono dei vantaggi rispetto a quelli naturali, come la possibilità di essere costruiti su misura per offrire un ampio range di proprietà, delle quali la maggior parte sono controllabili e prevedibili. La maggior parte dei materiali comunemente usati nell'ingegneria tissutale provengono da materiali già utilizzati per altri usi chirurgici quali suture, agenti emostatici e vari tipi di protesi. In particolare, molte ricerche sono concentrate su polimeri sintetici biodegradabili che sono stati già approvati dalla Food and Drug Administration (FDA), tra i quali poliesteri alifatici (acido polilattico PLA e acido poliglicolico PGA e i loro copolimeri), idrossiapatite e materiali naturali come collagene e chitosano.

I biomateriali hanno risposto al bisogno dell'uomo di sostituire od integrare tessuti ed organi, non più attivi dal punto di vista funzionale o metabolico, danneggiati da eventi patologici o traumatici. Il numero delle loro applicazioni è cresciuto negli ultimi anni (Tabella 1) e la portata delle loro innovazioni terapeutiche ha consentito ad un numero elevatissimo di pazienti la sopravvivenza o la restituzione di funzionalità a parti compromesse dell'organismo.

Tabella 1. Biomateriali e loro applicazioni.

Polimero	Sigla	Principali applicazioni
Acido poliglicolico	PGA	Suture biodegradabili, placche e chiodi intramidollari, placche di frattura degradabili
Acido polilattico	PLA	Placche e chiodi intramidollari, legamenti artificiali, placche di frattura degradabili, somministrazione controllata di farmaci
Copolimeri Butadiene Stirene	BS	Articoli monouso, imballaggi
Copolimeri Butadiene	SAN	Aspiratori per sangue, componenti di emodializzatori
Poliacrilonitrile	PAN	Membrane per emodialisi
Poliammidi		Suture
Policarbonato	PC	Membrane per ossigenatori, ed emodialisi, linee ematiche
Poliidrossimetacrilato	PHEMA	Lenti a contatto, legamenti artificiali
Polietilene	PE; LDPE	Film, imballaggi, cateteri, somministrazione controllata di farmaci
Polietilene (PM > 2000000)	UHMWPE	Superfici articolari, placche ortopediche, rivestimenti steli femorali
Polietertereftalato	PET	Protesi vascolari, anelli di sutura, passaggi transcutanei, componenti di protesi valvolari, componenti di assistenza cardiaca
Polimetilmetacrilato	PMMA	Cemento osseo, lenti a contatto, lenti intraoculari, membrane per emodialisi, materiali dentari
Polipropilene	PP	Siringhe, membrane per ossigenatori, fili di sutura
Politetrafluoroetilene	PTFE	Protesi vascolari, componenti di protesi valvolari, legamenti artificiali, rivestimenti
Poliuretani	PURs	Cateteri, tubi tracheali, protesi valvolari, sacche ventricolari, rivestimenti emocompatibili, somministrazione controllata di farmaci
Polivinilcloruro	PVC	Sacche per sangue, guanti monouso, tubi endotracheali, cateteri
Siliconi		Pelle artificiale, impianti per chirurgia plastica, protesi vascolari, cateteri

Le prestazioni dei biomateriali impiegati in campo medico sono valutate in base alla loro **biofunzionalità** e **biocompatibilità**.

Per *biofunzionalità* si intende la “proprietà di riprodurre una determinata funzione dal punto di vista fisico e meccanico”, mentre per biocompatibilità si intende la “capacità di un biomateriale di determinare, nei tessuti circostanti e più in generale nell’organismo, una risposta favorevole alla sua presenza”.

La *biocompatibilità* dei materiali deve essere acquisita con certezza e poi approvata dagli organismi deputati prima della commercializzazione e dell’utilizzo in ambito clinico.

Due sono le caratteristiche principali che vanno considerate nella valutazione della biocompatibilità di un materiale: la resistenza del materiale ai processi di degradazione e gli effetti che i prodotti di tali processi hanno sui tessuti.

La biocompatibilità di un materiale non va intesa comunque solo in riferimento alla sua sicurezza biologica, ma è relativa anche alle caratteristiche chimico-fisiche ed alle proprietà meccaniche del materiale e deve pertanto essere controllata durante l'intero ciclo produttivo, dalla fase di progettazione a quella di sterilizzazione, dall'approvvigionamento delle materie prime al confezionamento finale del prodotto. I fallimenti dei dispositivi impiantati possono essere ricondotti nella maggior parte dei casi a progetti e processi di lavorazione non adeguati, a tecniche chirurgiche improprie o ad un uso non appropriato dei materiali.

I requisiti richiesti sono dettati sia dalle proprietà chimico-fisiche dei polimeri (Tabella 2) sia dall'ambiente fisiologico con il quale verranno in contatto.

Tabella 2. Proprietà dei biomateriali

Aspetti fisici/biologici	Aspetti meccanici
Non tossico e biocompatibile	Processabile in diverse conformazioni 3D
Immunologicamente inerte	Meccanicamente stabile
Porosità elevata e pori interconnessi	Proprietà meccaniche simili a quelle dei tessuti da riparare
Biodegradabilità controllata	Sterilizzabile
Riassorbibile	Di facile impiego nella pratica clinica

Tra le varie problematiche da risolvere connesse all'utilizzo di biomateriali, maggiori sforzi sono rivolti allo studio del fenomeno della coagulazione connesso alla risposta del sangue quando viene in contatto con una superficie

polimerica ed a sviluppare sistemi con caratteristiche non-trombogeniche a breve e lungo termine.

I biomateriali devono essere sterilizzabili, senza alcune alterazioni di forma e proprietà e senza assorbimento degli agenti sterilizzanti.

Le metodologie adottate per la preparazione dei materiali polimerici possono essere importanti al fine di ottenere impianti affidabili soprattutto nel caso siano utilizzati materiali compositi o con strutture a elevata porosità.

I materiali naturali (eubiotici) hanno spesso il vantaggio di contenere nella loro struttura, in particolari sequenze di segnale, informazioni atte a promuovere l'adesione delle cellule ed a mantenerne le funzioni; d'altra parte i materiali di sintesi (xenobiotici), nonostante permettano la riproducibilità delle procedure di produzione ed un preciso controllo di parametri come ad esempio peso molecolare, tempi di degradazione, idrofilicità o idrofobicità della superficie di contatto, possono talvolta interagire in modo indesiderato con le cellule.

I migliori sembrano essere quelli semisintetici, i quali presentano gli stessi vantaggi dei biomateriali naturali con la possibilità di controllare i tempi di degradazione, una migliore processabilità in tre dimensioni e un'interazione positiva cellula-biomateriale.

1.3 Polimeri biodegradabili

I **polimeri biodegradabili** sono utilizzati in applicazioni che prevedono riparazione o rimodellamento dei tessuti ma non in quelle in cui si richiede stabilità dell'impianto per lungo tempo [5] ; essi devono poter essere facilmente reperibili e lavorabili industrialmente, avere proprietà meccaniche adatte allo svolgimento delle loro funzioni a breve termine ma ininfluenti a lungo termine, bassa o assente tossicità dei prodotti di degradazione e devono poter essere compatibili al rilascio di farmaci o al legame con molecole bioattive.

Possiamo classificarli in *biomateriali biorassorbibili di derivazione biologica* e *biomateriali sintetici*.

1.3.1 Biomateriali sintetici

Poli(α -idrossiacidi)

Categoria comprendente l'acido polirossiglicolico, lattico e α -caproico. Sono polimeri utilizzati per sintesi, arrays e per varie applicazioni di tipo biomedico come ad esempio fili da sutura o dispositivi per le riparazioni ortopediche. Tali polimeri sono soggetti ad una degradazione per idrolisi che, nella prima fase dopo l'impianto, è mediata dalle cellule residenti, nella fase più tardiva, dalle cellule dell'infiammazione; presentano modeste proprietà meccaniche, sono termoplastici, vengono generalmente resi sotto forma di matrici, film o tubi e possono inoltre essere combinati facilmente con altri materiali [5].

Acido poliglicolico (PGA), polilattico (PLA) e i loro copolimeri

Sono una famiglia di poliesteri alifatici lineari e sono i polimeri sintetici degradabili più usati in medicina. Il PGA è il più semplice, ha un'alta cristallinità, bassa temperatura di fusione e bassa solubilità nei solventi organici, a causa della grande idrofilia che lo caratterizza tende a perdere la resistenza meccanica nelle prime tre-quattro settimane dopo l'impianto. Il PLA è meno idrofilo di PGA, più resistente all'idrolisi, si scioglie meglio in solventi organici, è perfetto per applicazioni che richiedono una certa durezza e rigidità ed esiste sia nella forma D che nella forma L (entrambe semicristalline); il polimero che si ottiene a partire dalla miscela racemica di PLA è amorfo e viene utilizzato per il rilascio controllato di farmaci. Recentemente PGA e PLA sono state combinate con ceramiche bioattive per stimolare la rigenerazione dell'osso. Il problema più grande associato all'utilizzo di questi polimeri in ingegneria tissutale è lo

sviluppo di una risposta infiammatoria legata al rilascio di prodotti di degradazione acidi [5].

Poliortoesteri

I dispositivi medici costituiti a partire da questa famiglia di polimeri, dopo l'impianto, si degradano solo sulla superficie andando incontro ad un processo di assottigliamento, questa loro caratteristica permette di utilizzarli come matrici per il rilascio controllato di molecole bioattive [5].

Poliuretani

Classe di polimeri con un ampio range di proprietà chimiche e meccaniche, alcuni di questi sono stati utilizzati in passato come materiale di rivestimento in dispositivi cardiovascolari ma con risultati deludenti. Nuovi studi hanno portato alla produzione di poliuretani biodegradabili che possono essere utilizzati per varie applicazioni d'ingegneria tissutale come la riparazione del miocardio o di tessuti vascolari [6].

Polianidridi

Polimeri considerati originariamente per applicazioni in campo tessile ma, a causa della loro scarsa stabilità all'idrolisi, sono stati successivamente testati per essere applicati come biomateriali. Vengono oggi utilizzati per il rilascio di farmaci [5].

Polifosfazeni

Molecole costituite da uno scheletro inorganico nitro-fosforoso, alcune particolari modificazioni delle catene laterali forniscono a questi biomateriali

velocità di degradazione, bagnabilità, resistenza alla tensione e modulo elastico ottimali per applicazioni mediche a fini ricostruttivi.

Poliamminoacidi e pseudo-poliamminoacidi

Polimeri sintetici derivanti dagli amminoacidi, presentano molti potenziali vantaggi come biomateriali. Dato l'elevato numero di amminoacidi esistenti, possono essere prodotti tanti diversi tipi di polimeri e copolimeri in grado di legare facilmente farmaci e piccoli peptidi. Molti sono altamente insolubili e non processabili, la loro degradazione è difficile da controllare in vivo in quanto vengono degradati enzimaticamente ed i livelli di attività enzimatica variano da persona a persona. Solo pochi tra questi possono essere utilizzati per applicazioni d'ingegneria tissutale (ad esempio derivati dell'acido poligluttammico). Gli pseudo-poliamminoacidi, grazie alla presenza di legami non ammidici tra gli amminoacidi, presentano migliori caratteristiche chimico-fisiche rispetto ai poliamminoacidi.

1.3.2 Biomateriali biorisorbibili di derivazione biologica

Collagene di tipo I

E' il maggior componente del tessuto connettivo dei mammiferi e si trova maggiormente nei tessuti che richiedono elasticità e flessibilità. Sono stati individuati quattordici tipi diversi di collagene ma quello più abbondante è sicuramente il collagene di tipo I. La sua molecola è costituita da tre subunità peptidiche che si uniscono a formare una tripla elica, queste attraverso la formazione di legami crociati intra ed intermolecolari si organizzano in fibre e successivamente fibrille, fino alla formazione di strutture sempre più complesse. L'incremento del numero di legami intermolecolari aumenta il tempo di biodegradazione, diminuisce la capacità di assorbimento dell'acqua e la

solubilità, aumentandone inoltre la resistenza alla trazione. Nel 1981 Yannas e Burke [7] utilizzano per primi strutture a base di collagene per favorire la crescita della pelle e ridurre la formazione di cicatrici in pazienti con grosse ferite od ustioni. Dopo tantissime altre applicazioni finalizzate alla rigenerazione della cute, si sono realizzate recentemente innovative sperimentazioni che, unendo alle buone proprietà biologiche di questo polimero, quelle meccaniche dei polimeri sintetici, hanno permesso di costruire scaffold ibridi per l'osso e la cartilagine [8].

Polidrossialcanoato

Il polidrossialcanoato (PHA) è un polisaccaride biodegradabile, biocompatibile e termoplastico, è prodotto da molti microrganismi ai quali serve come riserva di carbonio e di energia. Il PHB (poli-3 idrossibutirrato) è quello più utilizzato, presenta una certa cristallinità ed idrofobicità che gli conferiscono un tempo di degradazione *in vivo* di anni [5], i suoi copolimeri vengono utilizzati per il rilascio controllato di farmaci, costruzione di pelle e valvole artificiali e varie applicazioni industriali [5].

Glicosamminoglicani

I glicosamminoglicani (GAGs) sono costituiti da unità disaccaridiche unite tra loro con un arrangiamento lineare, in natura si trovano spesso associati a core proteici per formare *proteoglicani* (condroitinsolfato, dermatansolfato ecc.). L'*acido ialuronico* è il GAG più abbondante, è un polisaccaride anionico costituito di unità disaccaridiche ripetute di N-acetilglucosamina e acido glucuronico e può essere isolato da fonti naturali o prodotto per fermentazione batterica. Come il collagene può essere chimicamente modificato per ridurre la solubilità ed aumentarne la viscosità. Questo glicosamminoglicano può formare

legami crociati con molecole di diverso peso molecolare fino alla formazione di veri e propri gel. Le caratteristiche che fanno dell'acido ialuronico un buon biomateriale sono la sua non antigenicità, l'incapacità di stimolare infiammazione o reazioni di rigetto e la sua facile reperibilità e modificabilità. Dal 1976 è usato come viscoelastico in oculistica [5], più recenti sono invece le sperimentazioni che lo vedono impiegato sotto forma di fili o di gel per prevenire le adesioni dopo interventi chirurgici [9].

Chitosano

Un biomateriale semisintetico, il chitosano, ha ricevuto recentemente una crescente attenzione come un materiale promettente [10] con un largo numero di applicazioni farmaceutiche e biomediche [11], è un biopolimero di natura cationica prodotto dalla N-deacetilazione alcalina della chitina (Figura 1), con una buona biocompatibilità, biodegradabilità, bassa tossicità e basso costo.

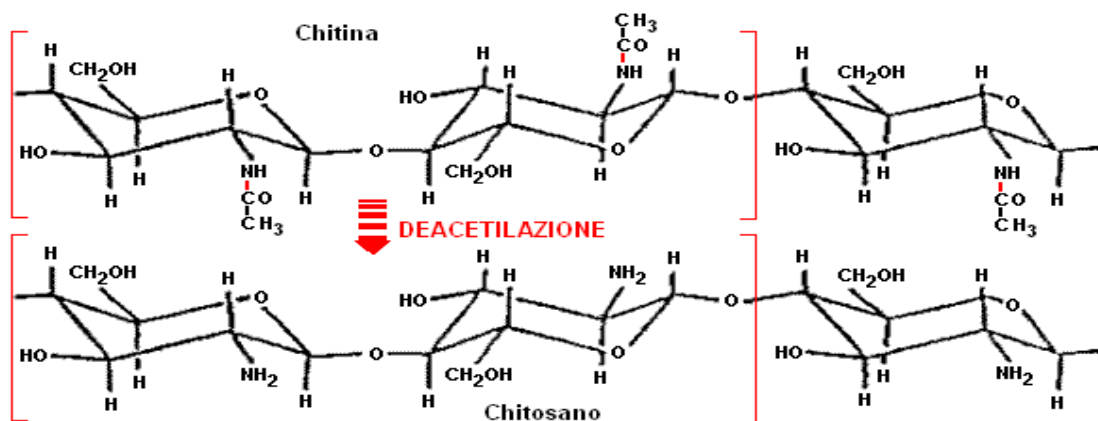


Figura 1. Struttura molecolare della chitina e del chitosano.

Il peso molecolare del chitosano commerciale è compreso fra 10 e 1000 kDa e il suo grado di deacetilazione va dal 66% al 95%.

Il chitosano ha una struttura cristallina rigida dovuta a legami idrogeno intra- ed inter-molecolari e ha la caratteristica di essere insolubile in ambiente neutro ed alcalino ma di essere solubile a pH acido, per la protonazione dei gruppi NH_2 .

Tale polimero presenta proprietà emostatiche ed osteoconduttive, inoltre è in grado di promuovere la guarigione delle ferite [11].

1.4 Il chitosano nel drug delivery e nell'ingegneria tissutale

Il rilascio controllato dei farmaci e le applicazioni nella tissue engineering per il supporto e la stimolazione dello sviluppo di tessuti ha avuto un crescente interesse nell'ultimo decennio [12-18].

In letteratura sono riportati numerosi esempi di sistemi micro/nanoparticellari di chitosano contenenti vari farmaci per differenti applicazioni terapeutiche [19] o di scaffold che veicolano molecole bioattive per lo sviluppo di strutture vascolari [20], oppure per rilasciare una serie di fattori di crescita in situ che favoriscono la rigenerazione di cartilagini ed ossa [21], o ancora per veicolare proteine bioattive e DNA per la riparazione di tessuti [22].

Il rilascio di farmaci o agenti attivi in maniera controllata presenta notevoli vantaggi rispetto ai metodi tradizionali. Infatti, consente la somministrazione, ad un tessuto od organo bersaglio, della quantità di farmaco necessaria, aumentandone l'efficacia e riducendone gli effetti collaterali, oppure permette di mantenere la concentrazione del farmaco nell'organismo ad un livello predeterminato con variazioni minime della concentrazione.

Molto spesso l'infiammazione cronica di tessuti e organi si traduce in una sostituzione chirurgica dell'organo stesso, ciò si può tradurre in un aumento della spesa sanitaria.

Questi problemi possono essere causati da ferite o patologie e possono colpire vari tessuti e organi. I trattamenti comunemente utilizzati per curare queste patologie includono varie tecniche quali terapie farmacologiche, riparazione chirurgica, uso di “devices” o supporti meccanici, e trapianto d’organi. Tali terapie non solo sono estremamente costose, ma spesso non sono in grado di soddisfare pienamente gli scopi per le quali vengono applicate, così c’è la necessità di sviluppare approcci migliori che garantiscano di abbassare i costi e soddisfare a pieno le esigenze del paziente.

Ad esempio il trapianto di tessuti, anche nei casi più favorevoli, ossia quando riguarda l’innesto di materiale prelevato dallo stesso paziente (autotrapianto o trapianto autologo), deve spesso tenere conto dell’insufficienza della quantità di tessuto disponibile.

Inoltre l’asportazione chirurgica di tessuti sani da altre regioni richiede sempre procedure complesse e può essere causa dell’insorgenza di dolori cronici.

In alternativa, possono essere utilizzati: tessuti prelevati da organismi della medesima specie (allotrapianto); organi, cellule o tessuti provenienti da specie animali diverse (xenotrapianto).

In entrambi questi casi è necessario fronteggiare fenomeni acuti e iperacuti di rigetto, attraverso terapie a base di immunosoppressori e di altri farmaci che, oltre ad essere assai costose, debbono essere applicate per lunghissimi periodi e sono responsabili della comparsa, nel tempo, di assuefazione, di intolleranza e, nei casi più sfortunati, di forme tumorali.

Sebbene alcune strategie dell’ingegneria tissutale sono già applicate in campo clinico (ricostruzione di epidermide e cartilagine) e altre, tra le quali ricostruzione di ossa, tendini e pareti vascolari [23, 24] sono attualmente in fase di sviluppo, le patologie del tratto gastrointestinale (GI) sono in questa prospettiva ancora trascurate.

Da ciò nasce la necessità di sviluppare e ricreare varie parti del tratto GI, per guarire i danni causati da differenti patologie che sono difficili da trattare con le tecniche classiche.

Nell'ambito delle patologie del tratto GI, il trattamento delle lesioni, sia neoplastiche che iatrogene, del tratto extra-epatico delle vie biliari prevede la resezione della porzione coinvolta e la successiva anastomosi del moncone prossimale dell'intestino tenue. In molti casi il decorso operatorio è complicato da infezioni retrograde per via intestinale (colangiti) e stenosi delle anastomosi; la mortalità delle colangiti non trattate è vicina al 100%, con un trattamento adeguato si riduce al 20-25%.

I danni al coledoco sono stati associati con le operazioni nella regione addominale e le procedure al tratto biliare, ma soprattutto nella maggior parte dei casi sono causati da lesioni iatrogene durante interventi di colecistectomia in laparoscopia.

Tali patologie rappresentano un problema sanitario ed economico [25].

Secondo differenti lavori il tasso dei danni iatrogeni al dotto biliare si aggira intorno allo 0,5-0,6%. I dati provenienti da 56591 pazienti, sottoposti a colecistectomia in laparoscopia tra il 1 Gennaio 1998 e il 31 Dicembre 2000 in 184 ospedali in Italia, hanno riportato un'incidenza totale dello 0,42% [26].

Per quanto concerne il colangiocarcinoma extraepatico i dati dell'Istituto Nazionale dei Tumori di Bethesda hanno evidenziato un'incidenza costante intorno all'1% negli ultimi trenta anni. Un recente articolo [27] ha indicato che su 517 trapianti di fegato, le complicazioni biliari sono il 13,3%, il 6,6% stenosi delle anastomosi e il 10% peritoniti biliari.

La disponibilità di un dotto artificiale biocompatibile e biodegradabile per sostituire il coledoco umano e che nel contempo possa fungere da supporto di rilascio di molecole antimicrobiche potrebbe rappresentare un'ottima

opportunità nel campo della terapia chirurgica e della prevenzione di infezioni post-operatorie (colangiti).

Il chitosano presenta un'azione antimicrobica contro un largo spettro di batteri [11]; infatti l'interazione tra le cariche positive del chitosano e quelle negative della parete cellulare dei microbi provoca la perdita dei costituenti cellulari.

1.5 Applicazioni del chitosano

Il chitosano presenta caratteristiche proprie che hanno fatto sì che ricerche e studi sulle possibili applicazioni di questo biomateriale si siano moltiplicate negli ultimi anni.

Esso presenta un ampio range di applicazione: carrier di farmaci [28], agente chelante, filtro per il trattamento dell'acqua[29] e rivestimento biodegradabile per il confezionamento di cibo [30]. Inoltre, promuove la cicatrizzazione ed ha effetti batteriostatici [28].

Tale versatilità permette al chitosano di essere un polimero utilizzabile in vari campi e non solo nell'ingegneria tissutale.

1.6 Scaffold tridimensionali per l'ingegneria tissutale

Gli scaffold sono substrati tridimensionali che fungono da supporto alla rigenerazione tissutale. Essi infatti provvedono a supportare l'iniziale attecchimento, proliferazione e differenziazione delle cellule e alla formazione di una matrice extracellulare (ECM). È proprio questa ECM che provvede all'integrità strutturale del tessuto. Inoltre, gli scaffold fungono da carrier per le cellule, per fattori di crescita o altri segnali biomolecolari. Le caratteristiche dello scaffold di mimare la struttura e le proprietà dei tessuti umani risulta essere di vitale importanza per dirigere il processo di formazione del tessuto.

Quindi uno scaffold ideale dovrebbe possedere una microstruttura tridimensionale ben definita con una rete interconnessa di pori, in modo tale che le cellule possano migrare, moltiplicarsi e attaccarsi all'interno dello scaffold, con dei canali attraverso i quali l'ossigeno e nutrienti possano arrivare alle cellule che si trovano in fondo allo scaffold; inoltre lo scaffold dovrebbe possedere delle proprietà meccaniche simili a quelle dei tessuti naturali, essere biocompatibile e biorassorbibile con una velocità di degradazione e riassorbimento controllabile così come la capacità di controllare l'uptake e il direzionamento di molecole bioattive per aumentare e guidare il processo di rigenerazione tissutale.

Recentemente sono stati messi a punto impianti tubulari costituiti di policaprolattone ed acido polilattico, rinforzati con fibre di acido poliglicolico [31]. Questi scaffold, impiantati in suini di piccola taglia (circa 25 kg), hanno permesso la sopravvivenza della maggior parte degli animali operati, le indagini istologiche effettuate dopo sei mesi dall'impianto hanno dimostrato un buon livello di epitelizzazione dello scaffold. La colonizzazione cellulare dell'impianto è prevalentemente attribuita all'azione delle cellule staminali del midollo osseo che, attraverso il circolo sistemico, migrano nella sede dell'impianto differenziandosi successivamente in colangiociti [31].

1.6.1 Scaffold di chitosano impiegati nell'ingegneria tissutale

Gli scaffold di chitosano possiedono alcune proprietà speciali per l'uso in ingegneria tissutale. Primo, possono essere formati da strutture interconnesse di pori; proprietà molto importante, che consente alle cellule di essere seminate con facilità con la possibilità di migrare e crescere all'interno della struttura tridimensionale. Una seconda caratteristica è la natura cationica del chitosano che può dare luogo ad interazioni elettrostatiche pH dipendenti con

glicosaminoglicani (GAG) anionici e proteoglicani ampiamente distribuiti all'interno dell'organismo.

Questa proprietà è una delle più importanti per le applicazioni in ingegneria tissutale perché numerose citochine e fattori di crescita sono legati e modulati alle GAG, inclusa l'eparina e l'eparinasolfato [32].

Le proprietà meccaniche degli scaffold di chitosano sono dipendenti dalla dimensione e dall'orientazione dei pori. I valori di resistenza tensile di campioni idratati dimostrano che le membrane porose presentano un valore di modulo elastico ridotto (0,1-0,5 MPa) rispetto a membrane di chitosano non porose [32].

Una terza proprietà è la dimostrazione della biodegradabilità *in-vivo* del chitosano soprattutto attraverso una idrolisi enzimatica. La degradabilità degli scaffold gioca un ruolo importante sulla performance a lungo termine del materiale, infatti essa influisce sui processi cellulari quali, crescita cellulare, rigenerazione tissutale e risposta dell'organismo ospite. Il lisozima è il principale enzima responsabile per la degradazione *in-vivo* del chitosano. I prodotti di degradazione sono oligosaccaridi, biocompatibili, di chitosano di varia lunghezza. La velocità di degradazione risulta essere inversamente correlata al grado di cristallinità il quale è controllato dal grado di deacetilazione (DD). Forme altamente deacetilate (DD>85%) presentano, *in-vivo*, una bassa velocità di degradazione dell'ordine di alcuni mesi, mentre forme con un basso DD vengono degradate rapidamente [33, 34].

1.6.2 Applicazioni del chitosano e suoi derivati nella ricostruzione o riparazione di organi

Alcuni esempi dell'applicazione di scaffold di chitosano nell'ingegneria tissutale si trovano principalmente in dermatologia per la rigenerazione della pelle, in campo ortopedico per la ricostruzione di ossa e cartilagini, in campo epatico,

nella ricostruzione di vasi sanguigni ed in campo neurologico per la rigenerazione di nervi.

La skin regeneration è un ramo importante dell'ingegneria tissutale soprattutto nel caso di ustioni di terzo grado dove le cure attuali sono ancora scarse nel promuovere una rigenerazione soddisfacente. Un obiettivo recente della skin tissue engineering è quello di produrre un tessuto artificiale che possa garantire una completa rigenerazione funzionale della pelle, il quale permetterebbe alla pelle di riacquistare le sue normali funzioni: di barriera, pigmentoria, di difesa contro l'irradiazione UV, termoregolatoria e funzioni meccaniche ed estetiche [35]. E' stato sviluppato e testato un nuovo biomateriale di chitosano, per la cura di ustioni di terzo grado [36]. Dalle osservazioni fatte è stato verificato che un bistrato di chitosano è in grado di indurre una buona ricostruzione della pelle in seguito a ustioni di terzo grado in un'area limitata (Figura 2). Il chitosano rappresenta quindi un materiale ideale per l'ingegneria tissutale. Esso è ben tollerato dall'organismo e induce una migrazione di cellule infiammatorie e attività angiogenetica favorendo una vascolarizzazione del tessuto neo-formato [36].

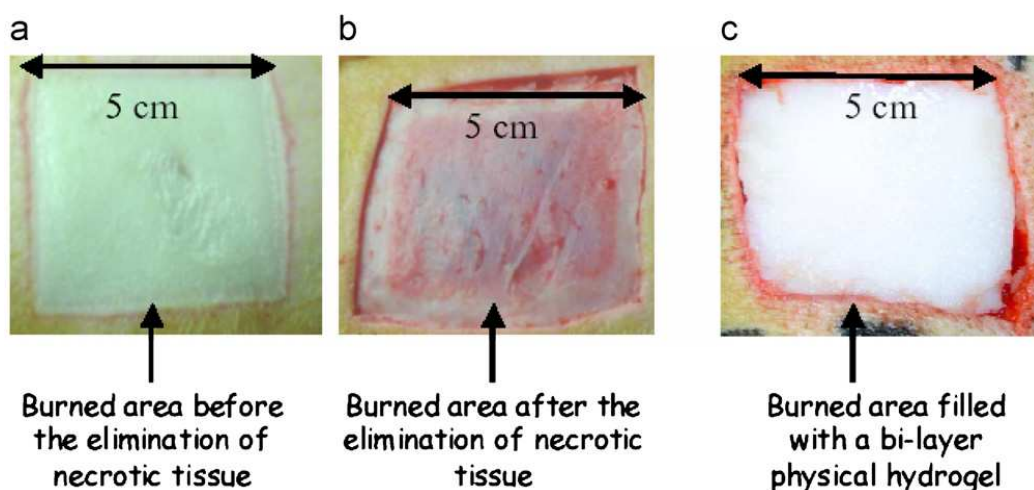


Figura 2. Ricostruzione della pelle, con hydrogel di chitosano, in seguito a ustioni di terzo grado.

Inoltre il chitosano è anche un cicatrizzante delle ferite. E' stato dimostrato che esso accelera la cicatrizzazione di ferite attivando e promuovendo l'infiltrazione di cellule polimorfonucleate a livello della ferita. L'incorporazione di fattori di crescita dei fibroblasti nel chitosano accelera la guarigione delle ferite [36].

Nel campo della rigenerazione ossea, gli scaffold agiscono come sostituti biodegradabili dello scheletro inseriti nei siti in cui vi sono dei difetti, per supportare o stimolare la rigenerazione ossea mentre essi gradualmente vengono degradati e rimpiazzati da nuovo tessuto osseo.

La rigenerazione ossea e cartilaginea può essere accelerata mediante un rilascio localizzato di appropriati fattori di crescita incorporati nei biomateriali che fungono da carrier. Il carrier permette essenzialmente un rilascio di questi fattori di crescita a una velocità e concentrazione desiderata. In questo modo questi fattori di crescita avranno un tempo sufficiente per restare nel sito in cui devono agire stimolando il processo di rigenerazione tissutale. Il chitosano è uno dei polimeri naturali utilizzato nella rigenerazione tissutale cartilaginea. Questo polimero forma un complesso ionico con i fattori di crescita e in questo modo il rilascio di questi fattori può essere ritardato e controllato. Questo tipo di rilascio dipende dalla forza di legame ionico tra il polimero e il fattore di crescita [37].

Il successo nell'ingegneria tissutale ortopedica dipende dalla formulazione di questi polimeri. Il chitosano viene formulato in scaffold porosi e combinato con fattori di crescita per promuovere la rigenerazione ossea. E' importante che questi scaffold siano strutturalmente ottimizzati in quanto non solo fungono da carrier per il rilascio controllato di fattori di crescita, ma permettono anche un'iniziale infiltrazione cellulare e successiva integrazione con il tessuto nativo [37].

Le attuali strategie dell'ingegneria tissutale sono focalizzate nella ricostruzione di tessuti patologicamente alterati mediante un trapianto di cellule combinate

con scaffold di polimeri che fungono da carrier. Negli anni recenti è stata posta considerevole attenzione al chitosano e alle sue applicazioni nel campo dell'ingegneria tissutale ortopedica. Le caratteristiche che rendono il chitosano adatto per l'ingegneria tissutale ossea e cartilaginea nella pratica clinica sono la sua biocompatibilità, la resistenza agli stress meccanici, l'attività antibatterica e la possibilità di essere modellato in varie formulazioni come scaffold porosi adatti per la crescita cellulare e osteoconduzione [38].

La carenza di donatori d'organi per il trapianto del fegato ha incrementato la richiesta di nuove terapie per il trattamento di patologie acute e croniche che colpiscono il fegato. Il fegato bioartificiale è una applicazione promettente dell'ingegneria tissutale per il trattamento dell'insufficienza epatica. Gli epatociti *in vivo* riescono a sopravvivere in un sistema tridimensionale formato da diverse tipologie di matrice extracellulare come collagene, proteoglicano, fibronectina e laminina. Gli scaffold porosi con un grande rapporto superficie/volume sono importanti per l'attecchimento cellulare. Il chitosano come biomateriale promettente può essere applicato nell'ingegneria tissutale del fegato grazie alle sue proprietà. Una delle ragioni per scegliere il chitosano come scaffold per la coltura degli epatociti è che la propria struttura è molto simile a quella dei GAG che sono i componenti della matrice extracellulare del fegato.

Rispetto alle altre forme di traumi, i danni ai nervi complicano la successiva riabilitazione in quanto i neuroni maturi presentano una ridotta capacità di replicazione.

La riparazione delle lesioni nervose è stata eseguita con metodi differenti, i quali presentano un obiettivo comune, ossia quello di direzionare le fibre nervose rigenerate all'interno dei tubi endoneuroni. Negli ultimi anni una varietà di tubi artificiali sono stati sviluppati per riparare i difetti dei nervi, ma i tubi artificiali non hanno una sufficiente area superficiale interna tale da permettere

un'adesione delle fibre nervose e delle cellule di Schwann. In più, i tubi biodegradabili collassano quando impiantati in vivo, questo è dovuto alla presenza di pareti sottili, alla mancanza di un supporto interno, al peso corporeo ed alla contrazione muscolare.

Il chitosano è stato studiato come materiale candidato per la rigenerazione dei nervi, questo grazie alle sue proprietà antitumorali, antibatteriche, alla sua biocompatibilità e biodegradabilità.

Jianchun et al.[39] hanno riportato che i neuroni coltivati sulle membrane di chitosano possono crescere senza problemi e i tubi di chitosano possono promuovere la riparazione del sistema nervoso periferico.

Le malattie vascolari sono la principale causa di morte nella società occidentale [40]. Le patologie che colpiscono le arterie coronariche ed i vasi periferici necessitano di interventi chirurgici che includono piccoli bypass con vene o arterie autologhe. Per più di cinquanta anni si sono cercati materiali che potessero essere usati nel trapianto dei vasi. L'ingegneria tissutale ha fornito delle nuove opportunità nella chirurgia vascolare ricostruttiva. Gli scaffold costruiti da materiali differenti, come polimeri sintetici, materiali naturali e tessuti decellularizzati sono stati utilizzati come vasi sanguigni nell'ingegneria tissutale. In questo campo il chitosano è stato ampiamente studiato, ciò è dovuto alla propria struttura simile ai GAG che sono, come già detto, i componenti della ECM. Inoltre, lo stesso chitosano sembra promuovere la migrazione di cellule endoteliali e fibroblasti, accelerando così la guarigione della ferita.

Infine, il chitosano, a causa della natura della molecola, permette la variazione delle proprie proprietà meccaniche e biologiche attraverso reazioni ioniche e covalenti.

Attualmente non sono disponibili dati in letteratura circa l'utilizzo di protesi a base di chitosano nella chirurgia delle vie biliari. Diversi studi hanno esaminato

la risposta tissutale agli impianti a base di chitosano [41, 42]. In generale sembra che questo materiale evochi una minima reazione da corpo estraneo ed è considerato biocompatibile. E' stato dimostrato che gli impianti sono prevalentemente degradati dall'azione del lisozima, l'andamento della degradazione è inversamente proporzionale al grado di cristallinità [43, 44].

Nella tabella 3 sono riassunti i risultati ottenuti in campo clinico attraverso l'utilizzo di tessuti ingegnerizzati.

Tabella 3: Risultati ottenuti nel campo dell'ingegneria tissutale

Organo/tessuto	Tipo di cellule	Problema	Stato dell'arte
Pelle	Fibroblasti	Ustioni, Ulcere	Primo tessuto ingegnerizzato disponibile in commercio
Vasi sanguigni	Cellule endoteliali Cellule muscolari lisce	By-pass, Arteriosclerosi	Vasi impiantati sui cani
Fegato	Epatociti	Sistemi esterni con epatociti testati sui pazienti	
Osso	Osteoblasti	Osteoporosi, Tumori delle ossa, Infortuni	Test in vivo su animali
Tendini e Legamenti	Fibroblasti tendinei	Infortuni, Osteoartrite	Impianti in collagene, fibroblasti seminati su fibre biodegradabili impiantati su animali
Cartilagine	Condrociti	Infortuni	Cellule seminate su scaffold biodegradabili
Tessuto nervoso (periferico)		Infortuni, Malattie	Canali di guida del nervo utilizzando colla di fibrina, biopolimeri, testati su animali

1.7 Hydrogel

Gli hydrogel, grazie alla loro idrofilia ed alla loro potenziale biocompatibilità, hanno ricevuto recentemente particolare attenzione da parte degli studiosi di biomateriali. Essi sono delle reti polimeriche tridimensionali, idrofiliche, capaci di assorbire grandi quantità di acqua, da un minimo del 10-20% fino a centinaia di volte il loro peso secco.

Le maglie polimeriche sono costituite da omopolimeri o copolimeri insolubili a causa della presenza di legami crociati chimici o fisici. Gli hydrogel assomigliano a tessuti naturali più di qualsiasi altra classe di biomateriali sintetici e questo lo si deve al contenuto d'acqua e alla consistenza morbida che li rendono simili al tessuto biologico. Per di più l'alto contenuto d'acqua li rende abbastanza biocompatibili e di conseguenza utilizzabili come lenti a contatto, membrane per biosensori, rivestimento per organi artificiali, materiale per pelle artificiale e carrier nel drug delivery [45].

Gli hydrogel presentano una classificazione multipla, infatti possono essere classificati a seconda della natura dei gruppi sostituenti, in neutri o ionici; oppure possono essere classificati anche a seconda delle maglie omopolimeriche o copolimeriche e questo dipende dal metodo di preparazione; o ancora possono essere classificati, basandosi sulla struttura fisica delle maglie, come amorfe, semicristalline, strutture supermolecolari e aggregati idrocolloidali.

Gli hydrogel, come già menzionato, vengono utilizzati come carrier che possono interagire con il rivestimento mucosale nel tratto gastrointestinale, colon, vagina, naso e altri parti del corpo aumentando la loro capacità di prolungare la permanenza nel sito di rilascio.

La struttura chimica del polimero può anche influenzare il grado di rigonfiamento degli hydrogel, non a caso gli hydrogel con gruppi idrofilici si rigonfiano maggiormente rispetto a quelli con gruppi idrofobici.

Il grado di rigonfiamento degli hydrogel può essere sensibile alla temperatura dell'ambiente circostante; tali hydrogel, sensibili alla temperatura, hanno guadagnato una considerevole attenzione nel campo farmaceutico [45].

Altri fattori in grado di influenzare il rigonfiamento sono la forza ionica e il pH [42].

1.7.1 Hydrogel come drug delivery system

Molte strategie sono state proposte per ottenere un sistema per il drug delivery per una terapia efficiente. Essi trovano applicazioni per la somministrazione orale, rettale, oculare, epidermica e subcutanea.

Il drug delivery attraverso la via orale è stato il metodo più comune nelle applicazioni farmaceutiche degli hydrogel. Nel tratto orale, gli hydrogel possono rilasciare farmaci in quattro siti specifici che sono la bocca, lo stomaco, il piccolo intestino e il colon portando ad un incremento locale della concentrazione del farmaco e di conseguenza aumentando l'assorbimento del farmaco nel sito di rilascio [41].

La via rettale è usata per rilasciare tanti tipi di farmaci, anche se la compliance del paziente è variabile a causa della scomodità di applicazione. Questa via viene principalmente usata per il trattamento locale di malattie associate al retto come le emorroidi. Inoltre essendo i farmaci assorbiti nella parte bassa del retto, il principio attivo arriva direttamente nel circolo sistemico, evitando l'effetto di primo passaggio epatico; per cui tale via di somministrazione risulta vantaggiosa per farmaci soggetti al metabolismo di primo passaggio [41].

Gli hydrogel possono offrire un modo per risolvere i problemi causati dalle convenzionali forme farmaceutiche rettali, attraverso una formulazione che garantisca una buona bioadesività tale da far rimanere il più a lungo possibile il principio attivo nella zona d'interesse terapeutico.

Per quanto riguarda il rilascio del farmaco per via oculare, le limitazioni fisiologiche inibiscono il rilascio corretto nell'occhio a causa dei meccanismi protettivi come il drenaggio lacrimale, ammiccamento e bassa permeabilità della cornea. Pertanto, le gocce oculari convenzionali tendono ad essere eliminate rapidamente dall'occhio, l'assorbimento è limitato e ciò porta ad una bassa biodisponibilità oftalmica.

Queste limitazioni hanno motivato i ricercatori a sviluppare un sistema di rilascio che offre un tempo di permanenza prolungato dei farmaci a livello oculare. Sospensioni e pomate si trattengono nell'occhio, anche se a volte danno una sensazione sgradevole al paziente. Gli hydrogel, grazie alle loro proprietà elastiche, possono rappresentare un elemento resistente al drenaggio oculare, e inoltre offrono una sensazione migliore al paziente.

Attraverso la via transdermica i farmaci possono essere rilasciati in un tempo più prolungato ad una velocità costante. Un vantaggio riconosciuto alla via transdermica è quello di riuscire ad evitare il metabolismo di primo passaggio. Grazie all'alto contenuto di acqua, gli hydrogel offrono una sensazione migliore alla pelle rispetto alle pomate e ai cerotti.

Al fine di valutare la citotossicità degli hydrogel si effettuano test per valutare la tossicità dei vari monomeri, che costituiscono i polimeri, usati per costruire gli hydrogel in quanto tali subunità potrebbero dissolversi durante l'applicazione [45].

1.7.2 Classificazione degli hydrogel

Gli hydrogel vengono classificati come **geli reversibili o fisici**, **geli ionotropici** e **geli permanenti o chimici**.

Fra i vari hydrogel quelli di chitosano possono essere di due tipi:

-hydrogel chimici, formati da legami covalenti irreversibili;

-**hydrogel fisici**, formati da vari tipi di legame reversibile quale ad esempio interazioni ioniche e secondarie;

Al primo gruppo appartengono i geli con cross-link covalente, essi vengono formati utilizzando una molecola legante (crosslinker) in grado di instaurare legami covalenti con le catene del chitosano; il numero di crosslinks formati dipende dalla quantità di crosslinker utilizzato e dall'ampiezza delle molecole del bio-polimero (è necessario che si instauri un numero minimo di legami crociati perché si formi l'hydrogel). Questo tipo di substrato presenta buone proprietà meccaniche ma non buona biocompatibilità poiché i crosslinkers che rimangono intrappolati nella struttura del gel, nella maggior parte dei casi, si sono dimostrati tossici per le cellule [46].

1.8 Tecniche di preparazione di scaffold polimerici

L'ingegneria tissutale è considerata una potenziale alternativa al trapianto di organi o tessuti. Scaffold biodegradabili, che servono come veicoli del trapianto per colture cellulari e come supporto per guidare la rigenerazione tissutale, giocano un ruolo importante nel trasformare colture cellulari in un nuovo tessuto.

Per permettere una alta densità di crescita cellulare e per promuovere neovascolarizzazione, gli scaffold devono possedere un elevato grado di porosità, un'ampia area superficiale e una struttura interconnessa di pori; in aggiunta alle proprietà di biocompatibilità e biodegradabilità.

Per questo motivo sono state condotte numerose ricerche, atte a sviluppare metodi per la preparazione di scaffold con le proprietà sopra descritte [47].

Varie tecniche sono state riportate per produrre scaffold polimerici porosi. Alcune tecniche di preparazione prevedono l'aggiunta di agenti porogeni solubili nel polimero i quali dopo la loro rimozione formano pori nella matrice polimerica. Una delle tecniche di estrazione dell'agente porogeno include il

versamento di una soluzione polimerica su un letto di porogeno. Il solvente viene fatto evaporare sotto vuoto, in modo tale da avere la solidificazione del polimero attorno le particelle di porogeno, il quale può essere estratto dallo scaffold mediante numerosi lavaggi in acqua distillata o solvente organico (paraffina), in modo tale da creare una struttura porosa ben definita.

Tale tecnica estrattiva ha trovato applicazioni nella produzione di scaffold porosi per l'accrescimento di cellule endoteliali. Comunque questo metodo presenta degli svantaggi legati al lungo tempo di immersione richiesto per estrarre le particelle di porogeno. Altri approcci comuni per la produzione di scaffold biocompatibili sono quelli che utilizzano la separazione di fase, dove il polimero viene fatto precipitare da un sistema liquido/liquido. Recentemente sono stati prodotti, attraverso l'elettrospinning, scaffold formati da fibre. L'elettrospinning produce fibre micro-nanometriche all'interno di un campo elettrico che si crea tra il polimero (in soluzione o fuso) contenuto nell'ago metallico di una siringa, e un collettore posizionato ad una determinata distanza dall'ago. Il processo ha inizio quando la forza del campo elettrico supera la le forze di tensione superficiale della goccia del polimero, generando un jet polimerico che si depone sul collettore. Controllando i parametri di processo (il campo elettrico, la portata della soluzione, la distanza tra il capillare e il collettore, il tipo di moto del capillare e del collettore), il sistema di elettrospinning regola il diametro e la direzione delle fibre depositate.

Nel campo biomedicale, l'elettrospinning consente di produrre strutture (scaffold) con un elevato rapporto dell'area sul volume, caratteristica che rende il substrato poroso un ottimo supporto tridimensionale per l'adesione cellulare rispetto ad altri substrati realizzati con altre soluzioni tecnologiche. Un altro metodo è il gas-foaming il quale crea bolle di gas in un polimero in fase di solidificazione. Un approccio alternativo per la formazione di pori è quello di usare la CO₂ in fase supercritica [48-50]

Tra le tecniche di fabbricazione più utilizzate vi sono: la **freeze-drying**, la **freeze-gelation** e la **freeze-fixation**.

Il metodo del **freeze-drying**, nonostante possa prevenire la disintegrazione di strutture porose, presenta un grandissimo svantaggio che è quello di consumare troppo tempo ed energia che l'intero processo di fabbricazione di scaffold diventa inefficiente e economicamente non concorrenziale. I metodi del **freeze-gelation** e del **freeze-fixation** possono essere utilizzati per preparare scaffold ad alta porosità abbassando consumo di tempo e energia. L'applicazione del freeze-drying presenta un problema, ossia che durante la fase di congelamento, se la temperatura non è sufficientemente bassa, la matrice di polimero non diventa rigida abbastanza da resistere la tensione interfacciale causata dalla evaporazione del solvente; in questo modo la struttura porosa crolla. Con il metodo della freeze-gelation la struttura porosa si forma senza bisogno della fase di essiccamento, dato che essa è generata durante la fase di congelamento della soluzione del polimero; questo risulta essere un vantaggio in quanto la struttura formata non viene distrutta dalla fase di riscaldamento [47].

1.9 Biocompatibilità e biodegradabilità

Per Biocompatibilità si intende la particolare proprietà di sostanze, organi o materiali, di essere ben tollerati da un organismo vivente e comprende l'idea dell'accettazione di un impianto artificiale da parte dei tessuti circostanti e da parte del corpo come un tutt'uno.

Una volta stabilito il fatto che la biocompatibilità coinvolge l'interazione fra materiali e sistema vivente, emergono due aspetti fondamentali che devono essere presi in considerazione e valutati:

1) la *risposta dell'ospite* che può essere locale o sistemica, a seconda che coinvolga, rispettivamente il solo sito interessato o anche altri distretti

dell'organismo; e/o immediata o tardiva, a seconda del tempo impiegato da tale risposta a manifestarsi; di solito una risposta immediata è legata a caratteristiche superficiali del materiale, mentre quella tardiva a proprietà di massa;

2) *la risposta del materiale*

La Biodegradabilità implica processi che comportano un progressivo deterioramento delle proprietà del materiale polimerico con formazione di frammenti a più basso peso molecolare.

Inoltre, è importante conoscere la *velocità di degradazione* dei polimeri affinché riescano ad espletare la loro funzione nel corpo umano prima di essere degradati.

Lo schema concettuale per effettuare queste valutazioni presuppone tre fasi:

1) *individuazione di un test standard; semplicemente una prova* sperimentale ben definita e ripetibile.

2) *scelta di un materiale di riferimento (controllo); un materiale* che induca una risposta (dell'ospite o del materiale stesso) riproducibile e quantificabile attraverso un test standard;

3) *misura del livello di risposta (dell'ospite o del materiale); la natura della* risposta del materiale/ospite misurata in un test standard in confronto alla risposta ottenuta con il materiale di riferimento;

Le procedure normalmente seguite per la valutazione della biocompatibilità di un materiale comprendono prove da effettuarsi in laboratorio (test *in-vitro*) e su cavie animali (test *in-vivo*) e da una monitorizzazione clinica.

I risultati dei test *in vivo* difficilmente provano la compatibilità sull'uomo. Come è noto, differenze nelle specie animali compromettono l'estrapolazione degli esiti delle prove *in vivo* fra modelli diversi. L'utilizzo di animali in laboratorio per la ricerca e per le prove di biocompatibilità implica una grande responsabilità e dovrebbe essere preso in considerazione solo dopo una completa

caratterizzazione preliminare dei materiali/dispositivi, dopo adeguate simulazioni al computer ed esauriente verifica *in vitro*.