

## **PRIMA PARTE**

La prima parte di questo lavoro di tesi ha riguardato l'individuazione delle soluzioni di chitosano migliori per la costruzione di scaffold cilindrici.

Sulla base dei dati relativi alle prove di permeazione e alle prove di sutura chirurgica si è provveduto a costruire delle strutture tubulari tali da garantire un'elevata resistenza alla sutura e dotata di bassa permeabilità alla bile.

Per la valutazione della citocompatibilità, la base di partenza è stata il lavoro pubblicato da Bettini et al.[51].

Per la valutazione degli altri parametri (elasticità, allungamento alla rottura, porosità ecc.), si è studiato l'influenza della concentrazione di chitosano nella soluzione di partenza, nonché la possibilità di costruire strutture multistrato, e in che modo tali proprietà hanno potuto incidere sulla struttura microscopica ed sull'architettura dello scaffold.

Inoltre, è stata messa a punto una procedura standardizzata con la quale poter costruire scaffold identici per quanto riguarda le caratteristiche chimico-fisiche e meccaniche.

### **3. Materiali e metodi**

#### **3.1 Materiali**

Chitosano in polvere, grado di deacetilazione minimo 95%, PM 10000Da (determinato con un viscosimetro di Ostwald), particle size 60–80, (A.C.E.F, Fiorenzuola, Italy).

Reagenti di grado analitico, bile bovina deidratata e raffinosiso pentaidrato (Sigma-Aldrich Chemical Co. St. Louis, MO, USA). Hydranal-Titrant 5 (Fluka, Sigma-Aldrich, Germany) e Hydranal-Solvent (Fluka, Sigma-Aldrich, Germany).

## **3.2 Metodi**

### **3.2.1 Purificazione del chitosano**

Il chitosano è stato sospeso in acqua bidistillata. La concentrazione della sospensione era 2% (p/v).

Per sciogliere il chitosano, è stata aggiunta alla sospensione una soluzione all'1% (v/v) di acido acetico; il sistema è stato tenuto sotto agitazione magnetica (50 rpm) fino a completa dissoluzione del chitosano.

Dopodiché, è stata preparata una soluzione di KOH al 3% (p/v) e successivamente aggiunta alla soluzione di chitosano attraverso una pompa peristaltica (60 gocce al minuto), tenendo sempre il sistema sotto agitazione.

La soluzione di KOH aggiunta era la metà, in volume, di quella di chitosano.

Essendo il chitosano insolubile a pH basico, con l'aggiunta di KOH si è ottenuta la sua precipitazione, in tale procedimento il pH è stato alzato lentamente per evitare che il chitosano si degradasse.

La poltiglia, così formata, è stata filtrata (0,45  $\mu\text{m}$ ) sottovuoto e successivamente lavata 3 volte con etanolo per allontanare l'acqua residua.

Dopo la fase di filtrazione il chitosano è stato posto in stufa a 45°C, in modo tale da ottenere un prodotto con ridotta percentuale d'acqua; la resa di tale processo era del 95% rispetto alla quantità iniziale di chitosano.

La percentuale d'acqua presente nel chitosano purificato è stata misurata mediante titolazione secondo il metodo Karl-Fischer.

### **3.2.2 Soluzioni di chitosano**

Il prodotto essiccato è stato sminuzzato finemente mediante un mulino a martelli.

Soluzioni di chitosano (4,5% o 5% p/v) sono state preparate disperdendo la polvere così ottenuta in un tampone fosfato (PBS) la cui composizione è

riportata in tabella 4 e successivamente disciogliendo il polimero con l'aggiunta di 1% (v/v) di acido acetico.

**Tabella 4.** Composizione della soluzione salina impiegata per sospendere il chitosano.

Sale	g/L
NaCl	800
KCl	20
NaHPO <sub>4</sub>	115
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	20
CaCl <sub>2</sub>	10
MgCl <sub>2</sub>	10

La soluzione così ottenuta è stata posta in agitazione (50 rpm) a temperatura ambiente per circa un'ora e successivamente degasata sottovuoto per permettere la fuoriuscita delle bolle d'aria.

In tutte le soluzioni di chitosano al 4,5% è stato aggiunto raffinosiso pentaidrato (290 mM), come specificato nel lavoro di Bettini et al. [51].

### 3.2.3 Produzione di film e di scaffold tubulari monostrato

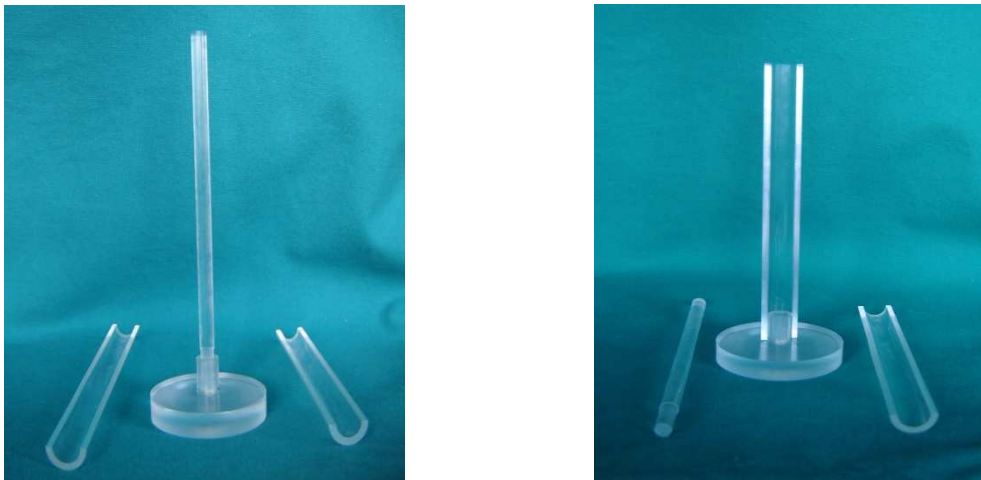
Gli stampi per la realizzazione dei film sono stati costruiti utilizzando lastrine di vetro sulle quali è stato tracciato, con una penna al silicone, un bordo rettangolare di circa 10 cm<sup>2</sup> di lato. La soluzione di chitosano è stata versata su queste superfici (4 mL di soluzione per 10 cm<sup>2</sup>) e posto in stufa a circolazione d'aria ad una temperatura di 45°C, fino a completo essiccamento (45 minuti circa).

I film ottenuti sono stati immersi, per 8-10 ore, in una soluzione acquosa di KOH al 5% p/v per eliminare i residui di acido acetico. Successivamente sono stati

lavati con acqua bi-distillata, per 15 minuti ed infine conservati in PBS fino al loro utilizzo.

La struttura cilindrica in plexiglass, riportata in figura 3, è stata utilizzata come stampo per la costruzione di scaffold tubulari a partire da soluzioni di chitosano al 5 e 4,5% p/v.

Detta struttura era costituita da un perno cilindrico centrale (8 cm), inserito su una base di supporto. Lo stampo si completava con due emicilindri (valve) della lunghezza di 8 cm.



**Figura 3.** Stampo per la costruzione di matrici tridimensionali tubulari.

Una volta assemblato lo stampo si presentava come una cavità cilindrica con al centro un asse pieno, dentro la quale veniva colata la soluzione di chitosano (3 mL)

Per evitare che la soluzione di chitosano si incollasse alle pareti delle valve, durante la fase di congelamento, la superficie interna delle valve stesse è stata preventivamente rivestita per nebulizzazione con politetrafluoroetilene (PTFE spray; Corby, Northants, NN17 9RS, UK) in modo da renderle antiaderenti e facilitarne la successiva rimozione.

La perfetta tenuta dei due semicilindri, essenziale per evitare fuoriuscite di liquido, è stata garantita spalmando un sottile strato di grasso da vuoto (DOWN CORNING GMBH, 65201 WIESBADEN, USA) nei punti di contatto tra i due elementi.

Lo stampo così riempito è stato congelato a  $-80^{\circ}\text{C}$  per 24 ore.

A congelamento completato, sia le valve che la base sono state rimosse con una semplice azione meccanica.

Il tubo congelato attorno al perno centrale è stato infine tenuto per circa 24 ore in una soluzione gelificante di potassa alcolica (60% etanolo + 40% soluzione acquosa 3M di KOH) a  $-20^{\circ}\text{C}$  [52].

L'etanolo era funzionale sia all'estrazione dall'acqua congelata che all'abbassamento del punto di congelamento della soluzione gelificante; la presenza di alcool infatti, permetteva alla soluzione alcalina di non congelare a  $-20^{\circ}\text{C}$  e di sostituirsi all'acqua congelata e neutralizzare l'eccesso di acido acetico. Terminata la fase di gelificazione, gli scaffold sono stati gradualmente reidratati sostituendo la soluzione di potassa alcolica con piccole porzioni di acqua distillata mediante una pompa peristaltica (250 microlitri/min) e mantenendo il sistema in agitazione fino a completa eliminazione della soluzione di KOH ed etanolo.

Gli scaffold ottenuti con le procedure sopra descritte sono stati conservati in acqua bidistillata fino al loro utilizzo.

### **3.2.4 Preparazione di scaffold tubulari bi e tristrato**

Per la preparazione del tubo bistrato è stato costruito un primo scaffold tubulare (4,5% p/v) seguendo la tecnica precedentemente descritta. Dopo essere stato opportunamente reidratato e lavato, lo scaffold è stato fatto disidratare parzialmente con un flusso d'aria a  $45^{\circ}\text{C}$  per 30 minuti. La fase di asciugatura avveniva quando lo scaffold era ancora inserito sul perno cilindrico

centrale, permettendo di ridurre il diametro esterno e di mantenere il diametro interno inalterato.

Il primo scaffold (*tubo 1*), utilizzando un dispositivo rotante (10 rpm), è stato ricoperto da uno strato sottile ed uniforme di soluzione di chitosano al 4,5% e, successivamente, inserito in un'altra matrice tubulare identica alla prima (*tubo 2*). Il complesso tubulare così ottenuto è stato immediatamente immerso in soluzione gelificante e successivamente trattato come già descritto.

Per la costruzione di uno scaffold tristrato è stato prodotto un film a partire da una soluzione di chitosano al 4,5% p/v con area di 10 cm<sup>2</sup>, ed è stato in seguito arrotolato, 3 volte, attorno al perno centrale del dispositivo per la realizzazione dei tubi (Figura 1); avendo cura di posizionare un sottile strato di soluzione di chitosano (4,5% p/v) tra un avvolgimento e il successivo. Il film così preparato è stato poi sottoposto ad una fase di essiccazione con un flusso continuo d'aria a 45°C per 40 minuti, completata la quale è stato rivestito con un sottile strato di soluzione e poi inserito in un tubo bistrato, precedentemente preparato come sopra descritto. Questa struttura tristrato è stata immediatamente immersa in soluzione gelificante, secondo quanto precedentemente descritto per i tubi bistrato.

### 3.3. Caratterizzazione chimico-fisica

#### 3.3.1 Prove di stress meccanico

Le prove di stress meccanico sono state effettuate su tubi parzialmente disidratati a 45°C per 30 minuti.

Lo sforzo esercitato e l'allungamento del campione fino alla rottura vengono registrati in continuo. Lo sforzo ( $\sigma$ ) è il rapporto tra la forza esercitata e la superficie di applicazione (area della corona circolare), la deformazione ( $\epsilon$ ) è invece definita come il rapporto percentuale tra la variazione di lunghezza ( $L-L_0$ ) e la lunghezza iniziale, dove  $L$  è la lunghezza finale e  $L_0$  quella iniziale. Il modulo di Young  $E$  è stato calcolato dalla pendenza della parte lineare della curva forza/allungamento secondo l'equazione:

$$E = \frac{\sigma}{\epsilon} \quad (1)$$

E' stato utilizzato un dinamometro *Acquati AG MC1* applicando una velocità di trazione di 15 mm/min; i segnali di forza e di tempo sono stati digitalizzati attraverso *PowerLab400* e registrati con il software *Scope 3.5*.

Queste misurazioni sono state effettuate su scaffold tubulari mono o multistrato prodotti a partire soluzioni di chitosano a diverse concentrazioni:

1. tubi monostrato preparati a partire da soluzioni di chitosano al 5% p/v;
2. tubi monostrato preparati a partire da soluzioni di chitosano al 4,5% p/v;
3. tubi bistrato preparati a partire da soluzioni di chitosano al 4,5% p/v;
4. tubi tristrato preparati a partire da soluzioni di chitosano al 4,5% p/v.

### 3.4 Caratterizzazione microstrutturale

#### 3.4.1 Analisi al SEM e misura della dimensione dei pori

Al fine di determinare le dimensioni dei pori e avere indicazioni sull'organizzazione delle maglie nei diversi scaffold sono state scattate delle foto con il microscopio elettronico a scansione (SEM). Le foto sono state eseguite su sezioni trasversali delle strutture tubulari. I campioni sono stati rivestiti con carbonio (100-200 Å). Le fotografie digitali, sono state analizzate con il software per analisi di immagini *NIH ImageJ*<sup>®</sup> (NIH, Bethesda, USA).

#### 3.4.2 Porosità percentuale

La porosità percentuale è stata calcolata a partire dalla densità vera del chitosano ( $\rho = 1.342 \text{ g/cm}^3$ ) e della densità dei pori nello scaffold prodotto. La porosità è stata calcolata secondo la seguente formula:

$$\text{Porosity (\%)} = \frac{V_m - V_p}{V_m} \cdot 100 = \frac{V_m - (W_m / \rho)}{V_m} \cdot 100 \quad (2)$$

$V_m$  è il *volume apparente* dello scaffold espresso in  $\text{cm}^3$ , è stato misurato con un picnometro a liquido.  $V_p$  ( $\text{cm}^3$ ) è il *volume reale* dello scaffold, viene calcolato come il rapporto tra la massa dello scaffold misurata in grammi ( $W_m$ ) e la densità ( $\rho$ ) del chitosano.

### 3.5 Studi di permeazione della bile

Gli studi di permeazione della bile sono stati effettuati in un sistema statico, a  $37^\circ\text{C}$ , utilizzando il Resomat II Apparatus [53].

Lo strumento è stato montato interponendo, tra il compartimento donatore e quello ricevente, una porzione di una sezione longitudinale dello scaffold mono, bi e tristrato; in modo da formare un'area di permeazione pari a di  $0,57 \text{ cm}^2$ .



La camera donatrice è stata riempita con 200  $\mu$ L di bile bovina ricostituita (30 mg/mL) (Sigma, USA), quella ricevente con 100 mL di acqua bidistillata, entrambe le camere termostatate a 37°C. A tempi fissati, 1,5 ml di soluzione sono stati prelevati dalla camera ricevente, sostituiti con acqua distillata ed analizzati in spettroscopia UV visibile allo scopo di quantificare gli di acidi colici. Il metodo utilizzato per tale misurazione ha una sensibilità di 20  $\mu$ g/mL sfrutta la reazione tra l'acido solforico ed i gruppi ossidrilici acidi presenti nella struttura degli acidi colici. Questa reazione produce un carbocatione allilico ed uno dienilico che assorbono rispettivamente nell'intervallo di 300-320 e 370-390 nm. Le soluzioni di riferimento per la costruzione della retta di taratura sono state preparate sciogliendo 50 mg di acido desossicolico (DCA) in 100 ml di etanolo assoluto e diluendo tale soluzione (1:5, 1:10, 1:25) con una miscela di acqua/etanolo (50:50 v/v). Queste soluzioni sono state addizionate con 3 ml di H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (96%) ciascuna e successivamente sono state incubate in un bagno termostatato a 70°C per 30 minuti. Dopo un rapido raffreddamento in miscela frigorifera (ghiaccio/NaCl), è stato misurato l'assorbimento a 382 nm. Come bianco è stato utilizzato 1 ml di miscela idro-alcolica. A partire dalla retta di calibrazione sono stati calcolati i coefficienti d'estinzione ( $\epsilon$ ) dei prodotti della reazione tra DCA e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ottenuta a partire dai nostri campioni. La procedura è stata ripetuta anche utilizzando l'acido deidrocolico.

## 3.6 Test di citocompatibilità

### 3.6.1 Colture cellulari

Le colture cellulari sono state fatte con le seguenti cellule:

- Cellule endoteliali: le cellule SPAE, linea cellulare proveniente da cellule endoteliali di arteria polmonare di maiale, (American Type Culture Collection, ATCC, USA) sono state coltivate in medium RPMI-1640, addizionato di antibiotici (penicillina 100UI/ml e streptomina 100µg/ml) e di 10% v/v di siero di vitello fetale (FCS). Al medium sono stati; inoltre, aggiunti il fattore di crescita endoteliale ECGF (50µg/ml) ed eparina (100µg/ml).
- Cellule di colangiocarcinoma: le cellule EGI, linea cellulare proveniente da colangiocarcinoma extraepatico umano, (DSMZ, Germany) sono state coltivate in Minimu Eagle Medium (MEM), addizionato di antibiotici (penicillina 100UI/mL e streptomina 100µg/mL) e di 10% v/v di siero di vitello fetale (FCS).

### 3.6.2 Colture cellulari di controllo

Le cellule sono state inoculate su piastre di Petri di materiale plastico ad una densità di  $10^4$  cellule per  $\text{cm}^2$  e fatte crescere fino a confluenza. Le colture sono state mantenute in termostato a 37°C in aria satura di vapore acqueo ed arricchita con il 5% di  $\text{CO}_2$ .

Le cellule sono state staccate dalle piastre utilizzando una soluzione di tripsina in PBS allo 0,2% p/v e contate al microscopio ottico mediante emocitometro di Burker. Il colorante Trypan Blue, che si accumula solo nelle cellule con alterata permeabilità della membrana, permette di escludere dal conteggio le cellule morte.

### **3.6.3 Semina cellulare su scaffold tubulare**

Lo scaffold tubulare è stato incubato in soluzioni di PBS sterile contenenti rispettivamente 3, 2 ed 1 volta la concentrazione di antibiotici precedentemente citata.

Le soluzioni sono state mantenute in contatto con lo scaffold tubulare per 24 ore ciascuna, passando da quella più concentrata a quella meno concentrata. Successivamente, il tubo è stato tagliato in porzioni di circa 1 cm<sup>2</sup>, posizionato in una piastra di Petri e sulla sua superficie interna sono state seminate le cellule ad una densità di 1·10<sup>6</sup> cellule·cm<sup>-2</sup>. Per mantenere un ambiente umido (camera umida), all'interno della capsula di Petri contenente lo scaffold, alcuni mL di medium sono stati depositati sul bordo della piastra. Dopo un'ora di incubazione in termostato è stata aggiunta alla piastra una quantità di medium tale da ricoprire opportunamente lo scaffold. Sono stati effettuati dei controlli periodici sulle cellule osservandole al microscopio ottico a contrasto di fase. Il medium di coltura è stato periodicamente sostituito (ogni 3 giorni) e, a tempi prestabiliti (dopo 24 ore, 72 ore, 10 giorni), lo scaffold è stato sottoposto a indagini istologiche ed immunohistochimiche.

### **3.7 Osservazione al microscopio ottico delle sezioni istologiche**

Le porzioni di tubo destinate all'analisi microscopica sono state fissate in formalina per 24 ore, successivamente incluse in paraffina e tagliate in sezioni di 4 µm secondo la procedura standard seguita presso il Dipartimento di Patologia e Medicina di Laboratorio, Sezione di Anatomia e Istologia Patologica dell'Università degli studi di Parma.

Per le analisi istologiche vengono normalmente utilizzate coppie di coloranti basici/acidi che colorano in modo differente le diverse parti cellulari. La colorazione ematossilina/eosina è una delle colorazioni più comunemente

utilizzate in laboratorio; l'ematossilina (basica) colora il nucleo in blu, e l'eosina (acida) colora il citoplasma in rosa.

Gli scaffold preparati sono stati osservati e fotografati al microscopio ottico.

Questo tipo di indagine è stata svolta solo su matrici tubulari, mono, bi e tristrato, di chitosano preparato a partire da soluzioni di chitosano al 4,5%.

### **3.8 Proliferazione e mantenimento del differenziamento cellulare**

#### **3.8.1 Immunoistochimica**

L'immunoistochimica è una metodica che, sfruttando una reazione immunoenzimatica, permette di evidenziare la presenza di determinate sostanze su sezioni istologiche.

Le prove d'immunoistochimica sono state effettuate su tubi mono e bi-strato ottenuti da soluzioni di chitosano al 4,5% p/v.

Le sezioni degli scaffold tubulari sulle quali erano state seminate le cellule sono state deparaffinate in xilolo per alcuni minuti, successivamente reidratate attraverso il passaggio in soluzioni idroalcoliche con concentrazione di alcool via via decrescente e lavate con una soluzione salina Tris buffer (TBS) (150mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris, pH 7.4). I determinanti antigenici, mascherati a causa delle procedure di fissazione, sono stati smascherati con trattamento termico avvalendosi di un forno a micro-onde (10 minuti in una soluzione contenente 10 mM Tris Base, 1mM di soluzione di EDTA, 0,05 % Tween 20, pH 9.0).

Il sistema di rivelazione utilizzato sfrutta l'azione dell'enzima perossidasi, per questo motivo è stato necessario bloccare l'attività delle perossidasi endogene immergendo i campioni in una soluzione al 3% di perossido d'idrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) per 10 minuti. Per impedire eventuali legami aspecifici dell'anticorpo primario, le sezioni sono state incubate in TBS contenente 5% di albumina bovina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 5% di siero di topo (Dako Corp., Carpenteria, CA) in

cui è stato prodotto l'anticorpo primario utilizzato, e 0,1% di gelatina di suino tipo B (Sigma-Aldrich).

L'indagine immunohistochimica per le cellule SPAE è stata condotta utilizzando anticorpi contro la proteina Ki67, antigene di proliferazione espresso nelle fasi G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> ed M del ciclo cellulare ma non nella fase G<sub>0</sub> (Dako, clone MIB-1, diluizione 1:200). Per le cellule di colangiocarcinoma sono stati utilizzati anticorpi contro la citocheratina 19 (Dako, clone RCK 108, diluizione 1:500) e la citocheratina 7 (Dako, clone OV-TL12/30, diluizione 1:1000), queste molecole sono proteine a basso peso molecolare generalmente presenti negli epitelii e nelle loro neoplasie.

I campioni sono stati incubati con l'anticorpo primario per un ora in camera umida e le molecole di anticorpo non legate sono state eliminate con lavaggi in PBS (3x2 min). Successivamente le matrici sono state trattate con l'anticorpo secondario legato a biotina, diluito in una specifica soluzione tampone di diluizione (0,01M PBS, pH 7.2 e 0,05% sodio azide) per 1 ora. Eliminati i residui di anticorpo secondario non legato mediante lavaggi in PBS (3x2 min), le sezioni di tubo sono state trattate per 30 minuti con un complesso streptavidina-perossidasi che, sfruttando l'affinità per la biotina, si va a legare all'anticorpo primario. Per questa fase dell'immunohistochimica è stato utilizzato un kit di rilevazione anti-Mouse/Rabbit Poly HRP (Chemicon International, Temecula, CA).

Dopo adeguato lavaggio in PBS, le sezioni di tubo sono state incubate in una soluzione di 0,05% DAB e 0,015% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 0,01M PBS a pH 7.2 per 5-10 minuti; tale soluzione permette di individuare in corrispondenza della molecola di interesse una tipica colorazione marrone. Infine le sezioni sono state risciacquate in acqua bidistillata e colorate con ematossilina-eosina per permetterne l'osservazione al microscopio a luce diretta.