

## **Seconda parte**

La seconda parte del progetto di dottorato ha riguardato l'approfondimento della caratterizzazione chimico-fisica e meccanica di hydrogel di chitosano, in particolare per quanto riguarda l'influenza della concentrazione della soluzione di chitosano impiegata per la produzione degli scaffold, la presenza di raffinoso in questi e il suo grado di idratazione degli scaffold stessi, sulla morfologia, l'elasticità e la resistenza alla rottura.

Inoltre, sono stati effettuati dei test *in-vivo* su conigli per valutare la biocompatibilità degli scaffold.

Per semplicità di utilizzo e di preparazione questi studi sono stati condotti su hydrogel circolari in forma di film, scaffold cilindrici e di assemblati di questi.

## **5. Materiali e metodi**

### **5.1 Materiali**

I materiali utilizzati per questa seconda parte sono stati già descritti nel paragrafo 4.1.

### **5.2 Metodi**

#### **5.2.1 Purificazione del chitosano**

La metodica di purificazione del chitosano è stata precedentemente descritta nel paragrafo 4.2.1.

#### **5.2.2 Soluzioni di chitosano**

La metodica di produzione delle soluzioni di chitosano a diversa concentrazione è stata descritta nel paragrafo 4.2.2.

### 5.2.3 Scaffold circolari di chitosano

Per la preparazione degli scaffold è stata utilizzata la tecnica della freeze-gelation.

Inizialmente è stata versata la soluzione di chitosano (1 mL) all'interno di uno stampo circolare, come mostrato in figura 16, e congelata a  $-60^{\circ}\text{C}$ . Tale fase permette la formazione della struttura tridimensionale.



**Figura 16.** Fase iniziale della preparazione degli scaffold circolari

Dopo 24 ore, gli scaffold congelati sono stati immersi nella della soluzione gelificante (composta da 60% etanolo e 40% KOH 3M), e posti a  $-20^{\circ}\text{C}$  per 24 ore.

Dopodiché sono stati reidratati in acqua bidistillata, effettuando 2-3 lavaggi della durata di un'ora ciascuno per eliminare qualsiasi residuo della soluzione gelificante.

### 5.2.4 Film circolari di chitosano

La soluzione di chitosano (circa 1 mL) è stata versata in uno stampo circolare.

Il tutto è stato essiccato in stufa a 45°C per circa 3 ore. Per non alterare la struttura superficiale del film, l'asciugatura deve avvenire in modo omogeneo ed in tempi tali da permettere una corretta organizzazione delle molecole.

Dopo l'essiccamento, il film è stato posto per 6 ore in una soluzione di KOH 5% p/v per eliminare i residui dell'acido acetico.

Successivamente sono stati eseguiti 2-3 lavaggi con acqua bidistillata di 15 minuti ciascuno, per eliminare i residui di KOH.

### **5.2.5 Bistrato (scaffold + film)**

Le strutture multistrato sono state preparate a partire dai singoli film e scaffold, preparati secondo la metodica precedentemente descritta.

Dopo aver parzialmente disidratato lo scaffold su carta da filtro, il film è stato collocato sullo scaffold, per favorire l'adesione tra le due superfici è stata utilizzata della soluzione di chitosano al 4,5% (p/v).

La soluzione di chitosano 4,5%, presentando un pH leggermente acido, scioglie parzialmente le due superfici in contatto, rendendo così possibile l'adesione tra il film e lo scaffold.

Il tutto è stato messo a congelare a -60°C e dopo 24 ore, quindi i bistrato sono stati immersi nella soluzione gelificante a -20°C per altre 24 ore.

Dopodiché sono stati reidratati con acqua bidistillata, e lavati come descritto in 5.2.3 3 5.2.4.

### **5.3 Caratterizzazione chimico-fisica e microstrutturale**

Le metodiche seguite per la caratterizzazione chimico-fisica (modulo elastico ed allungamento alla rottura) e microstrutturale (porosità percentuale, analisi al SEM e misura della dimensione dei pori) sono descritte nei paragrafi 4.3.1, 4.4.1 e 4.4.2.

### **5.4 Assorbimento di acqua in relazione al grado di disidratazione degli scaffold**

Gli scaffold sono stati prima passati su carta da filtro e poi pesati.

Dopodiché lo scaffold è stato messo in stufa a 45°C e ad intervalli di 5 minuti è stato ripesato fino ad ottenere le seguenti percentuali di essiccamento: 5, 10, 30 e 50%.

Una volta disidratati gli scaffold sono stati reidratati in acqua bidistillata per 24 ore, al fine di valutare il grado di riassorbimento e se le differenti percentuali di essiccamento incidono sulla reidratazione completa degli scaffold.

### **5.5 Studi di biocompatibilità**

Gli studi di biocompatibilità sono stati effettuati in accordo con le guide linee ISO 10993-6 [59].

Gli effetti locali sono stati valutati comparando la risposta, da parte del tessuto, causata dal campione di chitosano testato (scaffold singolo o scaffold + film) con quella di un materiale di controllo clinicamente accettato (cilindro di titanio, con un diametro di 0,5 cm, e uno spessore di 0,2 cm) ed anche con quella del semplice taglio chirurgico.

Periodicamente, un Veterinario, ha valutato lo stato di benessere degli animali e sono stati registrati peso e temperatura.

L'anestesia è stata indotta con propofol (4 mg/kg o fino al raggiungimento della perdita di coscienza). Durante l'intervento è stato verificato lo stato di benessere dell'animale attraverso un monitoraggio costante dell'attività elettrica dell'encefalo.

5 minuti prima dell'operazione chirurgica, l'animale è stato trattato con fentanyl (5 µg/kg).

Gli scaffold (spessore di 2 mm x 10 mm di diametro) sono stati impiantati nel del dorso di 15 conigli (razza New Zealand del peso di circa 4 kg).

Dopo aver disinfettato la cute, in condizioni sterili si è proceduto ad effettuare una incisione di 5 cm sia sulla parte destra che sinistra del dorso. Dopo l'incisione, è stata esposta la fascia del muscolo *latissimus dorsi* e sono state create delle tasche muscolari in direzione cranio-laterale di 5 cm di lunghezza. Gli scaffold sono stati così inseriti all'interno di queste tasche e i tessuti ricostruiti secondo arte chirurgica utilizzando filo PDS.

Sono stati impiantati 24 campioni in 12 conigli (12 solo con scaffold singolo sulla destra del dorso e 12 scaffold+film sulla parte sinistra).

In aggiunta 3 conigli sono stati usati come controllo: in questi ultimi è stato inserito, nella parte sinistra, l'impianto di titanio, e sulla parte destra è stata effettuata una semplice incisione chirurgica di 5 cm di lunghezza.

Durante tutto lo studio sono stati monitorati eventuali segni di infezione delle ferite e lo stato cicatrizzazione delle stesse, lo stato di benessere dell'animale è stato valutato sulla base del controllo della dieta.

Ad intervalli di 7, 30 e 90 giorni dall'operazione, 5 animali (4+1 di controllo) sono stati sacrificati e l'area degli impianti, inclusi i tessuti circostanti, è stata recuperata.

Dopo il recupero, gli impianti con i tessuti circostanti sono stati fissati in una soluzione di formalina al 10%, disidratati in etanolo (da 70% al 99,8% v/v),

quindi marcati con eosina ed ematossilina per analizzare la degradazione degli scaffold, infiammazione ed angiogenesi.

Gli studi *in vivo* sono stati approvati dalla Commissione Etica dell'Università Fernando Pessoa, Porto, (Portogallo), Presidente Prof. Fleming Torrinha.

L'obiettivo finale di questa sperimentazione è stato quello di caratterizzare la storia e l'evoluzione della risposta tissutale dopo l'impianto dello scaffold, inoltre si è voluto studiare il riassorbimento o la degradazione dello stesso materiale, al fine di valutare la possibilità di usare gli scaffold di chitosano come dispositivi biomedicali nell'ingegneria tissutale.