

6. Risultati e discussione

6.1 Purificazione e preparazione di scaffold e film di chitosano

L'intero processo di purificazione, ha dato luogo ad una resa pari al 96-97% rispetto alla quantità iniziale di chitosano utilizzato per la purificazione.

Le percentuali di acqua residua nel chitosano, dopo essiccamento, sono risultate essere comprese tra l'1 e il 3%.

Sia gli scaffold che i film presentano dimensioni riproducibili con un diametro di 19 ± 1 mm per entrambi, e uno spessore di $2\pm 0,3$ mm per gli scaffold e di $0,40\pm 0,05$ mm per i film (Figura 17 a-b).

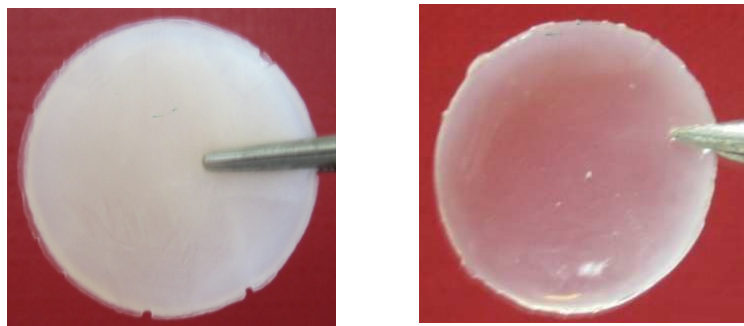


Figura 17. a) Scaffold circolare; b) film circolare

6.2 Caratterizzazione chimico-fisica degli scaffold

6.2.1 Porosità percentuale

In tabella 6 sono indicati i valori di porosità dei vari scaffold e le relative deviazioni standard.

Tabella 6. Valori di porosità percentuale e deviazioni standard degli scaffold preparati a partire da soluzioni contenenti diverse percentuali di chitosano.

Scaffold	Porosità %	DS
2%	76,8	4,1
3%	71,9	2,9
4.5%	70,1	1,8
4.5% senza raffinosio	60,5	3,4

Dalla tabella risulta evidente di come la porosità diminuisca all'aumentare della percentuale di chitosano utilizzato per la preparazione degli scaffold.

Il processo di formazione dei pori dipende dalla formazione di cristalli di ghiaccio durante la fase di congelamento e il loro successivo scioglimento durante la fase di gelificazione, lasciando in questo modo dei pori all'interno di una struttura a maglie.

Gli scaffold costruiti con soluzioni di chitosano più concentrate presentavano una minore quantità disponibile di acqua per la formazione di cristalli di ghiaccio durante le fasi di preparazione dello scaffold. Questo consente di spiegare la riduzione di porosità con l'aumento della concentrazione osservata in tabella 6.

Si nota inoltre, che a parità di concentrazione di soluzione di chitosano utilizzata per la costruzione degli scaffold, lo scaffold costruito con la soluzione in cui il raffinosio è assente presenta un valore di porosità diminuito di circa il 10% rispetto allo scaffold costruito con la soluzione in presenza di raffinosio.

6.2.2 Assorbimento di acqua in relazione al grado di disidratazione degli scaffold

Al fine di valutare se e in che misura gli scaffold parzialmente disidratati, riescono a riassorbire l'acqua persa durante l'essiccamento. Gli scaffold stessi sono stati essiccati (45°C per un tempo variabile) sino a raggiungere un peso pari al 90, 70 e 50% del peso allo stato idratato (iniziale).

In tal modo è stata valutata l'influenza di un grado di disidratazione pari al 10, 30 e 50%.

Gli scaffold così disidratati sono stati reidratati in acqua distillata a 25°C per 24 ore.

La percentuale di recupero d'acqua è stata calcolata dividendo il peso dopo reidratazione per il peso prima dell'essiccamento e tale rapporto è stato moltiplicato per 100.

In tabella 7 sono riportati i dati relativi al recupero di acqua percentuale.

Tabella 7. Percentuali di riassorbimento d'acqua in funzione del grado di essiccamento (DS).

% disidratazione	Scaffold 2%	Scaffold 3%	Scaffold 4.5%	Scaffold 4.5% SR*
5	102,6 (4,4)	100,1 (8,0)	103,0 (1,9)	98,0 (4,8)
10	90,3 (2,2)	91,6 (3,1)	91,8 (1,6)	95,8 (0,9)
30	90,9 (3,0)	91,1 (2,1)	93,4 (0,9)	90,9 (4,6)
50	82,1 (1,7)	87,4 (6,2)	88,3 (2,7)	88,3 (2,3)

* SR = senza raffinosisio

Dai dati riportati in tabella si osserva che si ottiene un totale recupero dopo 5% di disidratazione per tutti gli scaffold studiati.

Dopo 10% o 30% di disidratazione il recupero non risulta essere completo e gli

scaffold si reidratano per un valore pari a circa il 90% del peso iniziale. Infine, a seguito di essiccamento al 50% si ottiene una reidratazione compresa fra 82 e 88%. Si può quindi affermare che la disidratazione più marcata (50%) porta ad una modificazione degli scaffold che non ritornano nello stato iniziale.

La presenza o meno di raffinosisio nella soluzione di partenza, a parità di concentrazione di chitosano, non sembra avere un'influenza significativa sulla capacità di reidratazione degli scaffold studiati.

6.2.3 Microscopia elettronica a scansione (SEM) e misura della dimensione dei pori

A titolo di esempio in figura 18 sono state riportate alcune immagini degli scaffold preparati a partire da soluzioni contenenti diverse percentuali di chitosano registrati mediante microscopia elettronica a scansione (Figure 18-a, b, c).

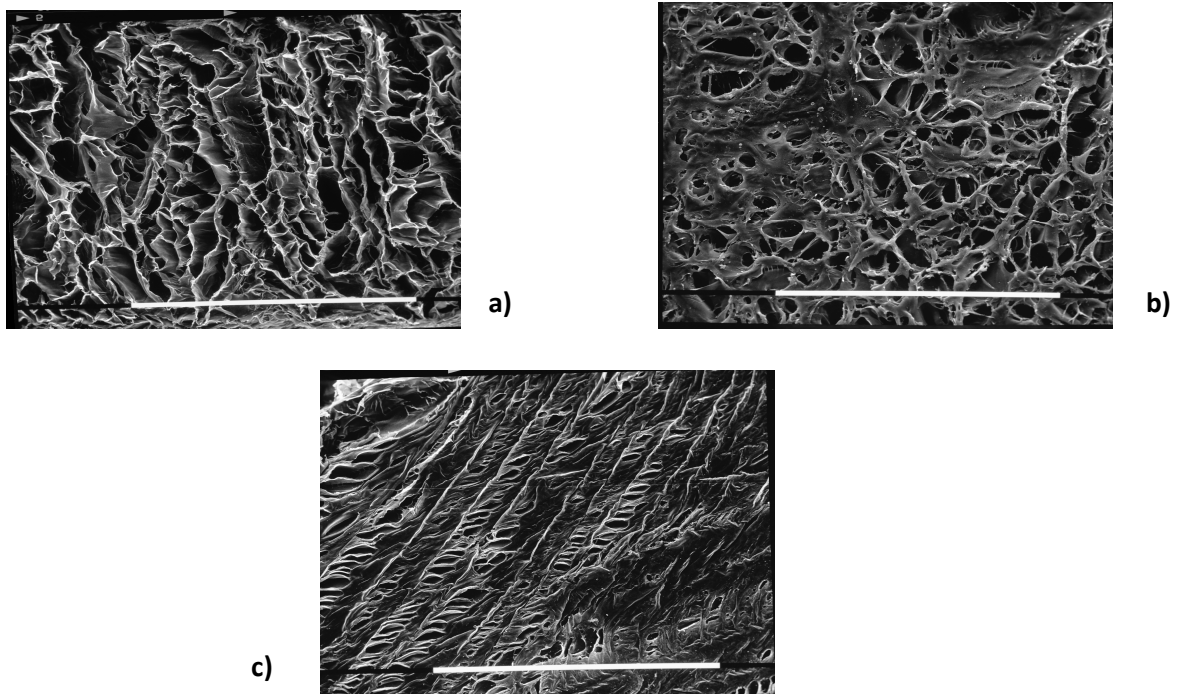


Figura 18. Foto al SEM di scaffold preparati da soluzioni di chitosano a diversa concentrazione: a) 2%; b) 3%; c) 4,5%

Si osserva che i pori più grandi sono presenti negli scaffold costruiti con una percentuale di chitosano più bassa.

Per comprendere meglio le differenze, i pori sono stati classificati in base al loro diametro di Feret (Tabella 8), sulla base del quale è stata calcolata la distribuzione cumulativa percentuale della dimensione dei pori (Figura 18).

Il diametro dei pori degli scaffold ottenuti a partire da soluzioni di chitosano al 2% cade in un range di 10-330 μm , per quelli al 3% cade in un range di 15-225 μm , e per quelli al 4.5% cade in un range di 10-125 μm .

Come è possibile osservare anche dalla distribuzione dei pori riportati in figura 19, gli scaffold preparati a partire dalla soluzione di chitosano al 4,5% presentano una distribuzione dei pori più ristretti.

Così come per la porosità, la differenza evidenziata è attribuibile alla formazione di cristalli di ghiaccio di dimensioni maggiori nell'hydrogel ad una più bassa concentrazione di chitosano.

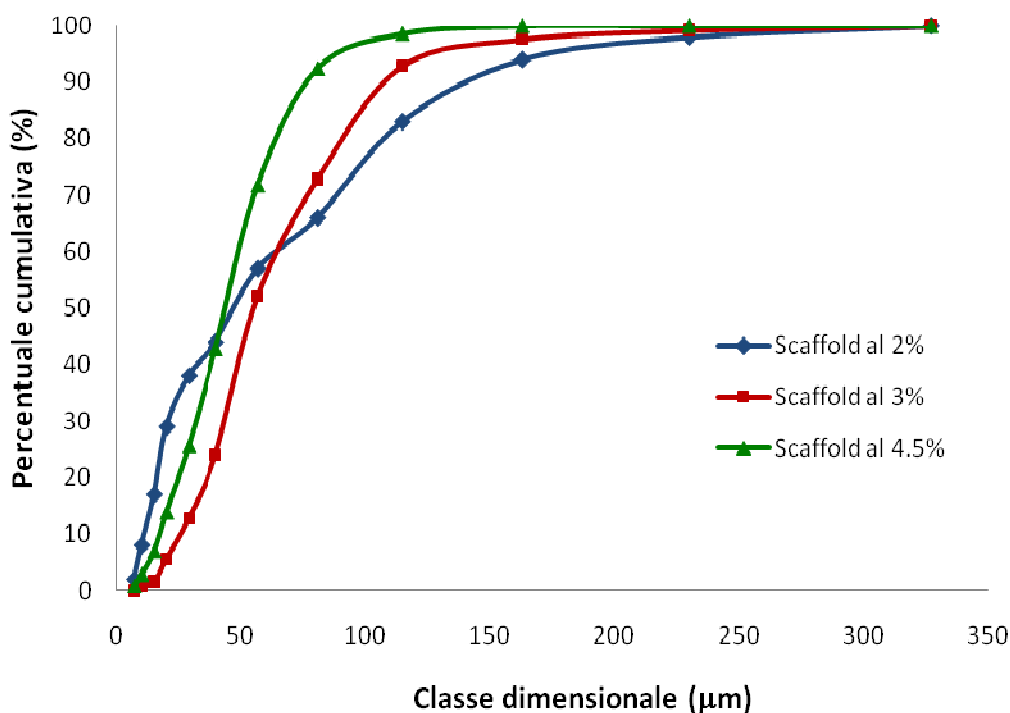


Figura 19. Distribuzione cumulativa della dimensione dei pori.

In tabella 8 sono riportati i risultati espressi come diametro medio di Feret.

Tabella 8. Diametro medio di Feret (DS) dei pori di scaffold preparati a partire da soluzioni contenenti diverse percentuali di chitosano.

Scaffold	Diametro medio di Feret (μm)
2%	76,7 (71,7)
3%	76,3 (44,4)
4,5%	55,2 (28,8)

I risultati riportati in tabella confermano che il valore medio del diametro di Feret decresce con l'aumento della concentrazione del chitosano utilizzato. Dal 2% al 3% di chitosano c'è un abbassamento, anche se residuale, del diametro medio di Feret di 0,4 μm ; mentre al 4,5% si vede già un abbassamento più significativo.

L'elevato valore dell'errore (SD) associato a queste misure indica la grande variabilità esistente nella dimensione dei pori.

6.3 Caratterizzazione meccanica degli scaffold

6.3.1 Modulo di Young e allungamento alla rottura

In tabella 9 sono riportati i valori di modulo elastico e allungamento alla rottura dei vari scaffold preparati.

Tabella 9. Modulo elastico ed allungamento alla rottura di scaffold preparati a partire da diverse % di chitosano (DS).

Scaffold	Modulo di Young x 10^3N/m^2	Allungamento alla rottura
2%	41,0 (3,1)	24,2 (3,3)
3%	96,6 (17,3)	25,8 (7,0)
4.5%	119,5 (25,2)	25,7 (6,0)
4.5% senza raffinosisio	213,6 (57,2)	19,6 (4,8)

Il valore del modulo elastico aumenta significativamente all'aumentare della percentuale di chitosano con cui sono costruiti gli scaffold, si passa da $41,0 \times 10^3\text{N/m}^2$ per lo scaffold al 2%, fino a $213,6 \times 10^3\text{N/m}^2$ per lo scaffold al 4,5% senza raffinosisio. Questi dati sono strettamente correlati ai valori di porosità, dove per scaffold preparati con soluzioni di chitosano più concentrate, tale valore risulta essere maggiore rispetto a scaffold preparati con soluzioni meno concentrate.

Tale relazione risulta essere particolarmente significativa come riportato in figura 19 nella quale il modulo elastico dei vari scaffold è riportato in funzione della porosità degli stessi. Si osserva una relazione lineare con valore di $R^2 = 0,997$.

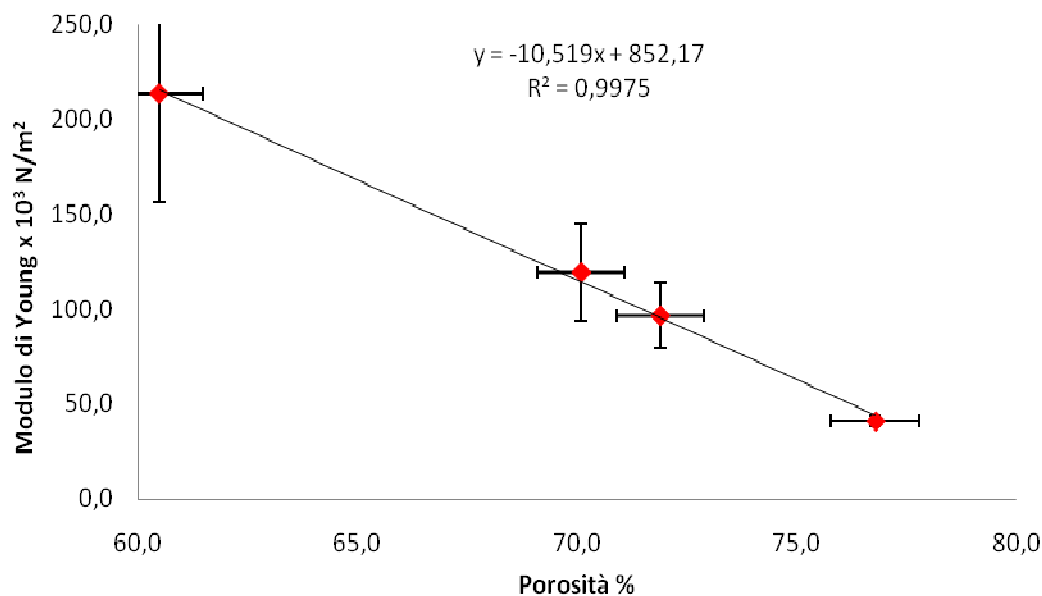


Figura 20. Modulo di Young in funzione della porosità % di scaffold preparati a partire da diverse percentuali di chitosano. Le barre rappresentano le deviazioni standard. I dati di porosità sono tratti dalla tabella 6, i dati di modulo elastico sono tratti dalla tabella 9

Inoltre, confrontando il valore del modulo elastico dello scaffold al 4.5% con raffinosio con quello senza raffinosio si osserva un aumento di resistenza meccanica, di circa due volte. Questo, ancora una volta, sembra correlare alla minore porosità, dovuta all'assenza del raffinosio, il che si traduce in una maggiore resistenza.

Per quanto riguarda invece l'allungamento alla rottura, esso presenta un andamento simile per tutti gli scaffold, circa il 25%, tranne che per quello al 4,5% senza raffinosio dove vi è una leggera diminuzione, peraltro non statisticamente significativa.

Per valutare l'influenza della quantità di acqua sulle proprietà elastiche degli scaffold sono state effettuate delle prove di trazione su scaffold parzialmente essiccati al 10% (Tabella 10), al 30% (Tabella 11) ed al 50% (Tabella 12).

In tabella 10 sono riportati i valori del modulo elastico e dell'allungamento alla rottura degli scaffold al 10% di deidratazione.

Tabella 10. Valori di modulo elastico ed allungamento alla rottura per gli scaffold essiccati al 10% (DS).

Scaffold	Modulo di Young x 10^3N/m^2	Allungamento alla rottura
2%	60,4 (17,8)	9,1 (3,1)
3%	70,5 (40,0)	9,9 (1,8)
4.5%	150,2 (42,3)	28,1 (0,0)
4.5% senza raffinosio	372,6 (229,0)	25,3 (7,8)

Anche dopo essiccamento l'andamento del modulo di Young resta simile, ossia aumenta all'aumentare della concentrazione di chitosano usata per la produzione degli scaffold.

Si osserva, in tutti gli scaffold, che la deidratazione al 10% ha prodotto un incremento generale del modulo di Young rispetto ai valori degli scaffold totalmente idratati. Si nota l'incremento notevole della resistenza nello scaffold, privo di raffinosio rispetto a quello con lo zucchero si passa da un valore di modulo di Young di $150,2 \times 10^3 \text{N/m}^2$ a $372,6 \times 10^3 \text{N/m}^2$. Per quanto riguarda l'allungamento alla rottura, essa presenta un andamento peculiare con una diminuzione notevole per gli scaffold al 2 e al 3%, mentre sembra che l'essiccamento non abbia provocato alcun cambiamento negli scaffold al 4,5%. Procedendo con l'essiccamento (Tabella 11 e 12), i valori del modulo elastico dei vari scaffold presentano lo stesso andamento osservato nella tabella 9 e nella tabella 10, ossia un andamento crescente all'aumentare della percentuale di chitosano con cui sono stati costruiti gli scaffold.

Tabella 11. Valori di modulo elastico ed allungamento alla rottura per gli scaffold essiccati al 30% (DS).

Scaffold	Modulo di Young x 10 ³ N/m ²	Allungamento alla rottura
2%	76,0 (33,3)	23,1 (24,7)
3%	148,4 (33,8)	12,7 (3,0)
4.5%	259,6 (185,8)	28,9 (20,0)
4.5% senza raffinosisio	268,2 (36,6)	21,0 (0,9)

Inoltre, si osserva un aumento del modulo elastico, per ogni tipologia di scaffold, all'aumentare della percentuale di deidratazione; fino a raggiungere i valori più elevati al 50% di essiccamento.

Da notare come lo scaffold al 4,5% senza raffinosisio abbia il valore di modulo elastico più alto, sia allo stato di completa idratazione che alle varie percentuali di deidratazione.

Tabella 12. Valori di modulo elastico ed allungamento alla rottura per gli scaffold essiccati al 50% (DS).

Scaffold	Modulo di Young x 10 ³ N/m ²	Allungamento alla rottura
2%	73,9 (20,5)	33,7 (0,6)
3%	84,7 (8,8)	33,9 (11,9)
4.5%	302,0 (111,2)	23,1 (11,9)
4.5% senza raffinosisio	460,4 (111,7)	18,0 (7,9)

Tale aumento della resistenza è ragionevolmente attribuibile ad un restringimento delle maglie del polimero, dovuto alla progressiva perdita di acqua, che porta ad una diminuzione della porosità creando così una struttura più compatta.

Per quanto riguarda l'allungamento alla rottura, sembrerebbe che le differenti percentuali di deidratazione non provochino alcun cambiamento di resistenza meccanica del materiale.

6.4 Caratterizzazione chimico-fisica dei film

Come detto nella parte di materiali e metodi, i film sono stati preparati con una metodica diversa di quella impiegata per la preparazione degli scaffold.

A titolo di esempio, di seguito è riportata una foto scattata al SEM di una sezione del film preparato a partire da una soluzione di chitosano al 4,5% (Figura 20).

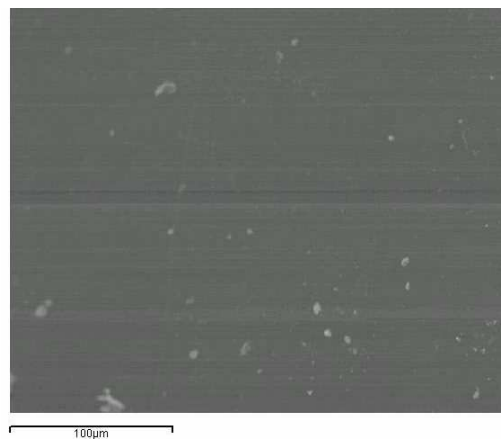


Figura 21. Foto al SEM del film al 4,5%

Come si vede dalla figura non si osserva alcuna presenza di pori. Tale caratteristica è dovuta al differente processo di produzione del film rispetto allo scaffold.

6.5 Caratterizzazione meccanica dei film

6.5.1 Modulo di Young e allungamento alla rottura

La tabella 13 mostra i valori medi di modulo elastico ed allungamento alle rottura per i film preparati a partire da soluzioni contenenti diverse percentuali di chitosano.

Tabella 13. Valori medi di modulo elastico ed allungamento alla rottura di film preparati a partire da soluzioni contenenti diverse percentuali di chitosano (DS). n=3

Film	Modulo di Young x 10^3N/m^2	Allungamento alla rottura
2%	656,3 (19,8)	14,8 (0,9)
3%	996,5 (69,9)	15,6 (1,8)
4.5%	1107,3 (199,2)	17,1 (0,6)

Ancora una volta il modulo di Young aumenta all'aumentare della percentuale di chitosano utilizzata per la costruzione dei film. Questi valori risultano essere di gran lunga superiori rispetto a quelli ottenuti dalle prove di trazione degli scaffold preparati a partire da una soluzione contenente la stessa percentuale di chitosano. Tale dato dimostra una maggiore resistenza dei film rispetto agli scaffold. L'incremento così elevato del modulo di Young, rispetto allo scaffold, è da imputarsi alla struttura compatta del film, dovuto al processo di essiccazione che il film subisce e che porta alla completa assenza di macro pori.

Inoltre, si osserva un progressivo aumento dell'allungamento alla rottura con l'aumento delle concentrazioni delle soluzioni di chitosano utilizzate.

6.6 Caratterizzazione chimico-fisica e meccanica del bilayer di chitosano

La tabella 14 riporta i valori medi dei parametri chimico-fisici e meccanici dello scaffold singolo e dello scaffold associato al film (entrambi preparati a partire da una soluzione di chitosano al 4,5%).

Tabella 14. Parametri chimico-fisici e meccanici dello scaffold singolo e dello scaffold associato al film (entrambi preparati a partire da una soluzione di chitosano al 4,5%) (DS).

	Scaffold	Scaffold+Film
Modulo di Young (N/m²)	119,5x10 ³ (25,2)	464,4x10 ³ (63,1)
Allungamento alla rottura (%)	25,7 (6,0)	25,1 (2,3)
Porosità (%)	70,1 (1,8)	58,3 (0,9)
Riassorbimento d'acqua* (%)	15,6 (0,4)	40,5 (2,1)

* a seguito di reidratazione dopo completo essiccamento

Confrontando i dati di porosità percentuale risulta che il bistrato presenta una porosità minore rispetto allo scaffold singolo, 58,3% contro 70,1% rispettivamente. Tale diminuzione è dovuta alla presenza del film su una delle due superficie dello scaffold.

Per quanto concerne il modulo elastico, i dati , sopra riportati, mostrano un valore per il bistrato di 464x10³ N/m² che risulta maggiore rispetto allo scaffold singolo, 119,5x10³ N/m² e comunque sempre minore rispetto al film singolo, (1100x10³ N/m²). Quindi il bistrato risulta essere più resistente dello scaffold, ma meno rispetto al film. Nonostante tale andamento del modulo di Young, il bistrato risulta essere, anche se di poco, più elastico rispetto allo scaffold singolo, infatti le percentuali di allungamento sono circa il 25 e il 20%

rispettivamente.

Infine, per quanto concerne il riassorbimento di acqua, dopo totale essiccamento, lo scaffold singolo recupera una quantità d'acqua pari al 15,6% del peso iniziale mentre il bilayer è in grado di recuperare una quantità di acqua pari a 40,5% del suo peso iniziale. Si può affermare che la disidratazione totale porta ad una modificazione più marcata rispetto a quanto osservato nel caso degli scaffold essiccati al 50%.

6.7 Studi di biocompatibilità

Dopo l'impianto intramuscolare degli scaffold, nei conigli non sono state osservate complicanze sistemiche o regionali.

Naturalmente, dopo l'impianto degli scaffold, il tessuto ospite è stato inevitabilmente traumatizzato dalla procedura chirurgica scatenando così una risposta infiammatoria.

Durante tutta la durata dello studio, periodicamente, il Veterinario ha valutato le condizioni degli animali misurando la temperatura corporea, il peso ed osservando il comportamento dei singoli conigli attraverso la valutazione delle abitudini dietetiche.

Nessun coniglio, durante la durata dello studio, ha presentato febbre o segno di malessere; questo è confermato dall'incremento del peso corporeo in ogni animale. Infatti il gruppo di conigli sacrificati dopo la prima settimana, dopo il primo mese e dopo tre mesi hanno presentato un incremento di $0,18 \pm 0,11$ kg, $0,53 \pm 0,09$ kg and $1 \pm 0,20$ kg, rispettivamente. L'incremento del peso negli animali di controllo era del tutto simile a quelli con l'impianto (Tabella 15).

Tabella 15. Temperatura pre-operatoria, temperatura pre-sacrificio, peso iniziale e peso prima del sacrificio dei conigli oggetto dello studio *in vivo*.

Coniglio	Temp. pre-operatoria (°C)	Temp. pre-sacrificio (°C)	Peso iniziale (Kg)	Peso finale (Kg)
#1	38,8	38,1	3,4	3,4
#2	37,6	37,0	3,1	3,3
#3	39,7	38,3	3,0	3,3
#4	38,6	36,2	3,0	3,2
Controllo	39,0	38,2	3,0	3,2
#6	37,9	36,9	3,4	4,1
#7	39,0	37,7	3,1	3,6
#8	38,4	37,9	3,1	3,5
#9	37,5	36,9	3,2	3,7
Controllo	38,6	37,4	3,0	3,6
#11	38,2	37,1	3,2	4,0
#12	38,4	37,5	3,5	4,5
#13	36,9	36,1	3,1	4,3
#14	38,8	37,5	3,0	4,1
Controllo	37,6	37,0	3,1	3,9

Dopo la prima settimana, l'osservazione macroscopica della zona operata e dei campioni di tessuti prelevati ha evidenziato un'inflammatione su entrambi i lati (Figura 22-b), molto più evidente sulla parte sinistra dov'era impiantato lo scaffold+film, con una tipica reazione infiammatoria da lamina; mentre il controllo ha mostrato, su entrambi i lati un'inflammatione meno marcata (Figura 22-a).

In tutti i conigli sacrificati, ai quali era stato impiantato lo scaffold di chitosano (con o senza film), dopo la prima settimana è stato possibile osservare un parziale riassorbimento degli scaffold con un'integrazione nel tessuto ospite (Figura 22-b).

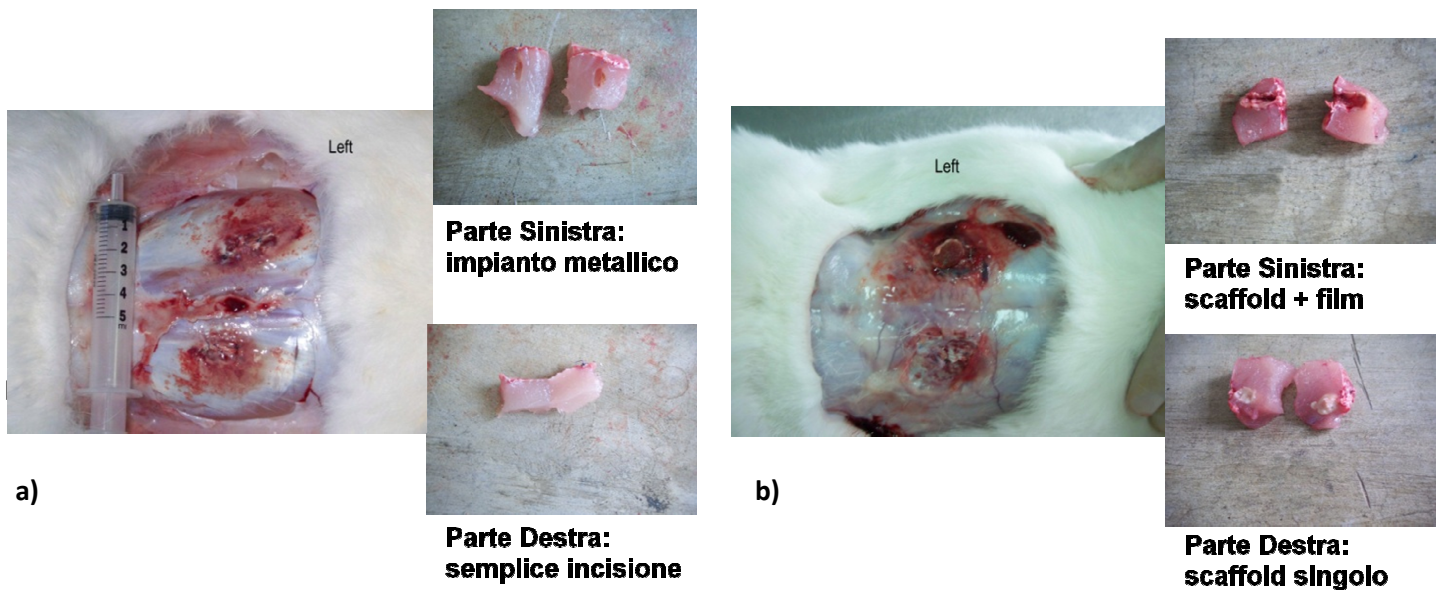


Figura 22. Zona operata e campioni di tessuti prelevati dopo 1 settimana dall'intervento chirurgico: a) animale di controllo; b) animale con impianti di chitosano

Dopo un mese, su entrambi i lati, si osserva come l'infiammazione sia di entità inferiore comparata con quella della prima settimana (Figura 22-b); inoltre è possibile notare come l'infiammazione da lamina sulla parte sinistra sia in gran parte risolta, anche se un minimo segno infiammatorio è ancora presente (Figura 22-b).

Da un punto di vista macroscopico gli impianti hanno provocato una risposta simile a quella del controllo (Figura 23-a), con una presenza di alcuni residui degli scaffold impiantati.

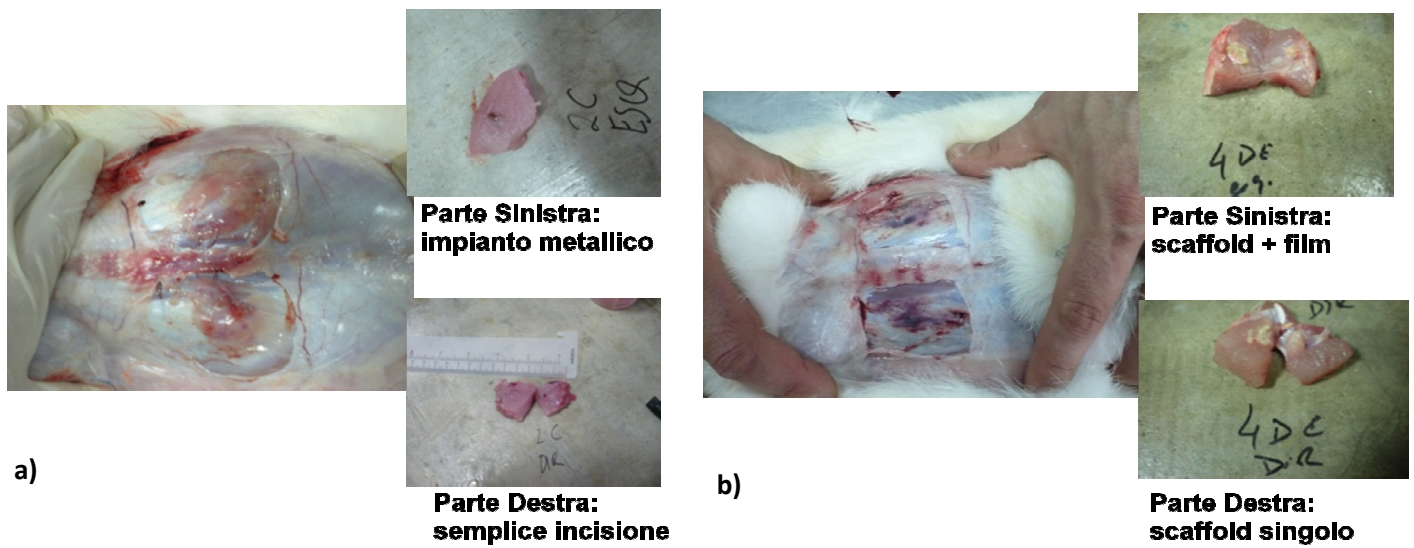


Figura 23. Zona operata e campioni di tessuti prelevati dopo 1 mese dall'intervento chirurgico: a) animale di controllo; b) animale con impianti di chitosano

Dopo tre mesi, l'osservazione macroscopica, degli animali con impianto, ha evidenziato la pressoché totale scomparsa di stato infiammatorio; nei conigli che avevano ricevuto le strutture di chitosano (Figura 24-b) così come nel coniglio di controllo (Figura 24-a).

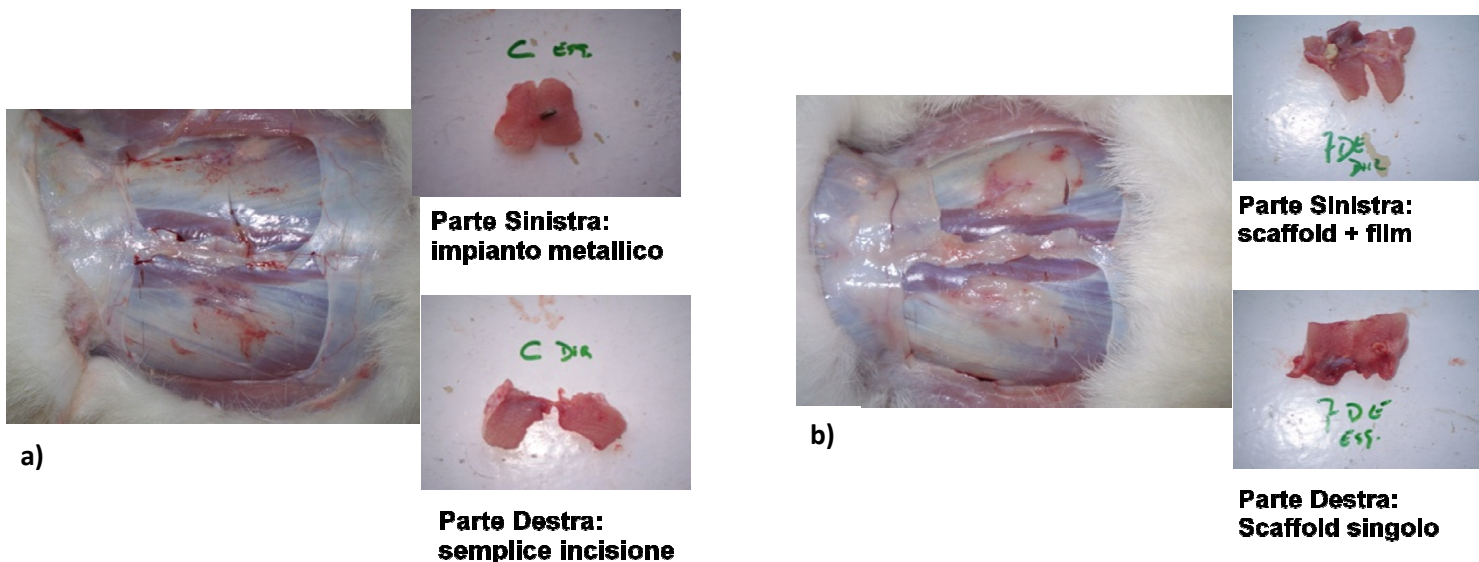


Figura 24. Zona operata e campioni di tessuti prelevati dopo 3 mesi dall'intervento chirurgico: a) animale di controllo; b) animale con impianti di chitosano

Inoltre, l'assenza di residui di scaffold mono e bistrato, indica la completa degradazione e riassorbimento delle strutture impiantate.

I risultati istologici hanno confermato quanto osservato all'esame macroscopico; durante la prima settimana si è avuta l'insorgenza una blanda infiammazione, la quale si è risolta nell'arco di un mese. Tale infiammazione è risultata essere non significativamente differente da quella provocata dall'impianto metallico o dalla semplice incisione cutanea.

6.8 Discussione

Nell'affrontare uno studio di biocompatibilità, non si può non approfondire l'aspetto chimico-fisico e quindi una caratterizzazione completa degli scaffold che sono stati sviluppati. In questa seconda parte della tesi sono stati sviluppati, caratterizzati e testati *in-vivo* degli scaffold cilindrici (monostrato e bistrato).

Gli scaffold preparati a partire da soluzioni di chitosano a diverse concentrazioni, mostrano una diversa porosità che diminuisce con l'aumentare della concentrazione del polimero.

A parità di concentrazione, l'aggiunta di raffinosisio determina un aumento della porosità.

La disidratazione degli hydrogel oltre il valore del 10% del peso idratato provoca una modificazione definitiva della struttura dell'hydrogel che, reidratato, non recupera completamente l'acqua perduta nella fase di essiccamento.

Per quanto concerne le caratteristiche meccaniche, il modulo elastico aumenta con la percentuale di chitosano nella soluzione di partenza; esiste una correlazione lineare tra modulo elastico e porosità dell'hydrogel.

Dagli studi sul modulo di Young è emerso che la resistenza alla rottura non sembra essere influenzata dal tipo di hydrogel studiato.

Confrontando i dati di caratterizzazione chimico-fisica tra monolayer e bilayer risulta che il bilayer presenta una porosità minore rispetto allo scaffold singolo, tale diminuzione è dovuta alla presenza del film su una delle due superficie dello scaffold.

I dati relativi al modulo di Young, mostrano un valore per il bistrato che risulta maggiore rispetto allo scaffold singolo e comunque sempre minore rispetto al film singolo questo perché l'hydrogel in forma di film risultano più rigidi rispetto a quelli con struttura tridimensionale (scaffold).

Nonostante tale andamento del modulo di Young, il bilayer risulta essere, anche se di poco, più elastico rispetto allo scaffold singolo.

Infine per quanto concerne il riassorbimento di acqua, si può affermare che la disidratazione totale porta ad una modificazione più marcata rispetto a quanto osservato nel caso degli scaffold essiccati al 10, 30 e 50%.

I risultati istologici hanno mostrato delle analogie, in termini di risposta infiammatoria, fra conigli con l'impianto di chitosano e conigli di controllo, ciò evidenzia una buona biocompatibilità per i materiali testati.

Inoltre dallo studio è emerso il completo riassorbimento degli impianti dopo tre mesi.