



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA

DIPARTIMENTO DI FARMACIA

Dottorato di ricerca in BIOFARMACEUTICA-FARMACOCINETICA

CICLO XXV (2010-2013)

SISTEMI TERAPEUTICI INNOVATIVI PER IL TRATTAMENTO
DELLE LESIONI CUTANEE

Coordinatore: Chiar.mo Prof. PAOLO COLOMBO

Tutor: Chiar.ma Prof.ssa CARLA M. CAMELLA

Dottoranda: Dott.ssa MICHELA MORI

Premessa	1
Introduzione	5
1. Le ferite cutanee	6
1.1 Classificazione delle ferite	6
2. Le ulcere cutanee	11
2.1 Ulcere da pressione	11
2.2 Le ulcere degli arti inferiori	12
2.2.1 Le ulcere arteriose	13
2.2.2 Le ulcere venose	13
2.2.3 Le ulcere neuropatiche: il piede diabetico	14
3. Wound healing	16
3.1 Fase I: Emostasi	16
3.2 Fase II: Infiammazione	18
3.3 Fase III: Proliferazione	20
3.3.1 Ri-epitelializzazione	20
3.3.2 Neovascolarizzazione	21
3.3.3 Granulazione	23
3.4 Fase IV: Rimodellamento	24
3.5 Risoluzione del danno	25
3.5.1 Essudato	25
3.5.2 Contaminazione batterica	26
4. Trattamento delle ferite croniche	27
4.1 Debridement	27
4.2 Carica batterica	27
4.2.1 Trattamento dell'infezione	28
4.3 Controllo dell'essudato	32
5. Medicazioni	33
5.1 Medicazioni tradizionali	33

5.2	Medicazioni moderne	34
5.2.1	Idrocolloidi	34
5.2.2	Alginati	34
5.2.3	Idrogeli	35
5.2.4	Film adesivi semipermeabili	36
5.2.5	Schiume	36
5.2.6	Medicazioni bioattive	36
5.3	Tecniche avanzate	37
5.3.1	Sostituti ingegnerizzati della pelle	37
5.4	Medicazioni medicate per il rilascio di farmaci	38
5.4.1	Fattori di crescita	38
6.	Biopolimeri	40
6.1	Alginato	40
6.2	Acido Ialuronico	43
6.3	Chitina e Chitosano	44
6.3.1	Chitina e chitosano come agenti di wound healing	46
7.	Emoderivati nel wound healing	47
7.1	Piastrine: struttura e fisiologia	47
7.2	Ruolo delle piastrine nel wound-healing	48
7.3	Ruolo degli emoderivati in campo medico-chirurgico	50
7.3.1	Plasma ricco in piastrine (PRP): studi in vitro e in vivo	52
7.3.2	Gel piastrinico: studi in vitro e in vivo	55
7.3.3	Lisato piastrinico: studi in vitro e in vivo	56
7.4	Associazione di biopolimeri ed emoderivati: sviluppi formulativi	58
8.	La seta	60
8.1	Fibroina	60
8.2	Sericina	61
8.2.1	La sericina come agente di wound healing	62

I. Capitolo	64
I.1 SCOPO DEL LAVORO	65
I.2 MATERIALI E METODI	66
I.2.1 Materiali	66
I.2.2 Mantenimento della linea cellulare	66
I.2.3 Metodo di proliferazione cellulare: bNDHF vs aNDHF	67
I.2.3.1 Saggio WST-1	67
I.2.4 Proliferazione cellulare del LP fresco e liofilizzato, in stabilità	68
I.2.5 Analisi dei fattori di crescita (test ELISA)	68
I.2.6 Analisi statistica	69
I.3 RISULTATI E DISCUSSIONE	70
I.3.1 Messa a punto della proliferazione cellulare: bNDHF vs aNDHF	70
I.3.2 Proliferazione cellulare di LP liquido e liofilizzato, fresco e in stabilità	72
I.3.3 Analisi dei fattori di crescita (test ELISA)	73
I.4 Conclusioni	74
II. Capitolo	75
II.1 SCOPO DEL LAVORO	76
II.2 MATERIALI E METODI	77
II.2.1 Materiali	77
II.2.2 Preparazione dei “beads” liofilizzati non carichi (particelle di calcio alginato)	77
II.2.3 Caratterizzazione delle particelle di calcio alginato	78
II.2.3.1 Valutazione delle dimensioni	78
II.2.3.2 Valutazione delle proprietà di idratazione	78
II.2.3.3 Valutazione delle proprietà di proliferazione cellulare	78
II.2.4 Preparazione delle particelle di calcio alginato caricate con lisato piastrinico (LP) e vancomicina cloridrato (VCM)	79
II.2.5 Caratterizzazione delle particelle di calcio alginato caricate con LP e VCM	79
II.2.5.1 Valutazione delle dimensioni	79

II.2.5.2	Valutazione del contenuto di PDGF AB e VCM	80
II.2.5.3	Valutazione in vitro delle proprietà di rilascio	80
II.2.5.4	Valutazione delle proprietà di proliferazione	81
II.2.5.5	Valutazione della sintesi di DNA tramite incorporazione Bromo-deossiuridina (BrdU)	82
II.2.5.6	Test di “wound healing”	83
II.2.6	Analisi statistica	84
II.3	RISULTATI E DISCUSSIONE	84
II.3.1	Caratterizzazione delle particelle di calcio alginato non caricate (bianche)	84
II.3.1.1	Dimensioni	84
II.3.1.2	Proprietà di idratazione	86
II.3.1.3	Proprietà di proliferazione cellulare	87
II.3.2	Caratterizzazione delle particelle di calcio alginato caricate con LP	89
II.3.2.1	Dimensioni	89
II.3.2.2	Proprietà di proliferazione e di “wound healing”	90
II.3.2.3	Valutazione della quantità di PDGF AB caricata	96
II.3.2.4	Rilascio di PDGF AB	97
II.3.3	Caratterizzazione delle particelle di calcio alginato caricate con VCM	98
II.3.3.1	Dimensioni	98
II.3.3.2	Quantità di VCM caricata	98
II.3.3.3	Proprietà di rilascio	98
II.4	Conclusioni	99
III.	Capitolo	101
III.1	SCOPO DEL LAVORO	102
III.2	MATERIALI E METODI	103
III.2.1	Materiali	103
III.2.2	Preparazione delle medicazioni a base di SA MV contenenti capsule di HA	103
III.2.3	Caratterizzazione delle medicazioni a base di SA MV contenenti capsule di HA	104

III.2.3.1	Valutazione delle proprietà meccaniche	104
III.2.3.2	Valutazione delle proprietà di idratazione	104
III.2.3.3	Proprietà reologiche	105
III.2.4	Preparazione delle medicazioni caricate con VCM	105
III.2.4.1	Titolo e Rilascio di Vancomicina Cloridrato (VCM)	105
III.2.5	Valutazione delle proprietà di proliferazione cellulare di LP	106
III.2.6	Preparazione e caratterizzazione delle medicazioni caricate con LP	106
III.2.6.1	Valutazione delle proprietà di proliferazione cellulare	107
III.2.6.2	Valutazione della sintesi di DNA tramite incorporazione di Bromo-deossiuridina (BrdU)	107
III.2.6.3	Valutazione del titolo e rilascio di PDGF AB	108
III.2.7	Analisi statistica	108
III.3	RISULTATI E DISCUSSIONE	109
III.3.1	Caratterizzazione delle medicazioni non cariche (bianche)	109
III.3.1.1	Dimensione delle capsule e delle medicazioni	109
III.3.1.2	Proprietà meccaniche	109
III.3.1.3	Proprietà di idratazione	110
III.3.1.4	Proprietà reologiche	111
III.3.2	Titolo e rilascio di Vancomicina Cloridrato (VCM) dalle medicazioni caricate con antibiotico	116
III.3.3	Proprietà di proliferazione cellulare di LP	117
III.3.4	Caratterizzazione delle medicazioni caricate con LP	119
III.3.4.1	Proprietà di proliferazione cellulare	119
III.3.4.2	Quantità di PDGF AB caricata e rilasciata dalle medicazioni	122
III.4	Conclusioni	124
IV.	Capitolo	126
IV.1	SCOPO DEL LAVORO	127
IV.2	MATERIALI E METODI	129

IV.2.1	Materiali	129
IV.2.2	Disegno sperimentale (DoE)	130
IV.2.2.1	Preparazione delle medicazioni a base di CS hMW e SER	131
IV.2.2.2	Caratterizzazione delle medicazioni	131
IV.2.2.3	Procedura di ottimizzazione	132
IV.2.3	Valutazione delle citotossicità della SER	132
IV.2.4	Valutazione delle proprietà antiossidanti della SER	133
IV.2.5	Preparazione e caratterizzazione della medicazione ottimizzata con aggiunta di CS basso PM (CS LMW) (medicazione CS hMW-CS LMW/SER/Gly)	133
IV.2.5.1	Misure di trazione	133
IV.2.5.2	Misure di penetrometria	134
IV.2.6	Proprietà di proliferazione cellulare della medicazione CS hMW - LMW /SER/Gly	134
IV.2.7	Stabilità fisica della medicazione CS hMW - LMW /SER/Gly	134
IV.2.8	Analisi statistica	135
IV.3	RISULTATI E DISCUSSIONE	136
IV.3.1	Disegno sperimentale	136
IV.3.2	Citotossicità della SER	140
IV.3.3	Proprietà antiossidanti della SER	141
IV.3.4	Caratterizzazione della medicazione ottimizzata con aggiunta di CS LMW (medicazione CS hMW - LMW/SER/Gly)	142
IV.3.4.1	Misure di trazione	142
IV.3.4.2	Misure di penetrometria	143
IV.3.5	Proprietà di proliferazione cellulare della medicazione CS hMW-LMW/SER/Gly	144
IV.3.6	Stabilità fisica della medicazione CS hMW-LMW/Ser/Gly	145
IV.4	CONCLUSIONI	146
V.	Capitolo	148
V.1	SCOPO DEL LAVORO	149

V.2	MATERIALI E METODI	150
V.2.1	Materiali	150
V.2.2	Associazione LP e SER	150
V.2.3	Preparazione e caratterizzazione della medicazione caricata con LP prima della liofilizzazione	150
V.2.3.1	Valutazione della proprietà di proliferazione cellulare	151
V.2.3.2	Valutazione della sintesi di DNA tramite incorporazione di Bromo-deossiuridina (BrdU)	151
V.2.3.3	Valutazione del titolo e delle proprietà di rilascio di PDGF AB	152
V.2.4	Preparazione e caratterizzazione della medicazione caricata con LP estemporaneamente	152
V.2.4.1	Valutazione delle proprietà di proliferazione cellulare	152
V.2.5	Analisi statistica	152
V.3	RISULTATI E DISCUSSIONE	153
V.3.1	Associazione di LP e SER	153
V.3.2	Caratterizzazione della medicazione caricata con LP prima della liofilizzazione	154
V.3.2.1	Proprietà meccaniche	154
V.3.2.2	Proprietà di idratazione	155
V.3.2.3	Proprietà reologiche	156
V.3.2.4	Proprietà di proliferazione cellulare	159
V.3.2.5	Titolo e rilascio di PDGF AB	161
V.3.3	Caratterizzazione della medicazione caricata estemporaneamente con LP	161
V.3.3.1	Proprietà meccaniche	161
V.3.3.2	Misure reologiche	162
V.3.3.3	Proprietà di proliferazione cellulare	164
V.4	Conclusioni	166
VI.	Capitolo	167
VI.1	SCOPO DEL LAVORO	168

VI.2	MATERIALI E METODI	169
VI.2.1	Materiali	169
VI.2.2	Citotossicità di SCR	169
VI.2.3	Valutazione del potere antiossidante di SCR	169
VI.2.4	Associazione di SCR e LP	170
VI.2.4.1	Valutazione della proliferazione cellulare	170
VI.2.4.2	Valutazione della compatibilità SCR e LP	170
VI.2.5	Valutazione dell'associazione di SCR con HA	171
VI.2.6	Analisi statistica	171
VI.3	RISULTATI E DISCUSSIONE	172
VI.3.1	Citotossicità di SCR	172
VI.3.2	Valutazione del potere antiossidante di SCR	172
VI.3.3	Associazione di SCR e LP	173
VI.3.4	Valutazione dell'associazione di SCR con HA	175
VI.4	Conclusioni	177
	Conclusione	178
	Bibliografia	180

Premessa

L'attenzione crescente da parte degli operatori della salute non solo al trattamento delle patologie ma anche alla qualità della vita del malato ha stimolato l'interesse per gli esiti a volte molto debilitanti di malattie quali tumori, diabete, vasculopatie, infezioni persistenti e/o gli effetti collaterali dei relativi trattamenti. Appartengono a questa tipologia le lesioni tissutali croniche, l'interesse per le quali sta registrando una continua crescita stimolata anche dall'assenza di trattamenti efficaci e di protocolli terapeutici condivisi.

Le ulcere cutanee rientrano nella categoria delle lesioni croniche, trovando risoluzione completa non prima di sei settimane e mostrandosi particolarmente dolorose e debilitanti per il paziente [Boateng et al., 2008]. L'aspetto principale che caratterizza uno stato ulceroso è la perdita di sostanza dermo-epidermica, nonché l'assenza, nel centro della lesione, di punti di partenza per la ri-epitelializzazione [Vannini V., 2007; Virgili A. et al., 2004]. Tali lesioni impattano sulla qualità della vita del paziente, necessitando di cure mediche quotidiane, talvolta difficili da gestire e costose da sostenere.

Negli ultimi decenni la ricerca ha indagato la complessità del processo di riparazione tissutale, cosiddetto "wound healing" che è mediato da eventi cellulari interdipendenti tra loro, atti a ristabilire l'integrità del tessuto danneggiato con la promozione della proliferazione cellulare e della matrice extracellulare [Crovetti et al., 2004]. Situazioni complicanti la guarigione sono rappresentate da un eccesso di essudato che può ritardare la risoluzione del danno e l'insorgenza di processi infettivi [Guo S. and DiPietro L.A., 2010].

Grazie alla miglior comprensione dei meccanismi di riparazione tissutale, negli ultimi anni si è assistito ad un progressivo cambiamento nell'approccio terapeutico impiegato per il trattamento delle lesioni croniche: medicazioni "inerti", aventi l'unico scopo di isolare il letto della ferita, sono stati sostituiti da sistemi "bioattivi", capaci loro stessi di promuovere la riparazione dei tessuti. Il razionale di tali medicazioni bioattive si basa sull'utilizzo di biopolimeri capaci di interagire con i componenti del tessuto promuovendo la proliferazione cellulare.

Recentemente è stato inoltre proposto l'impiego di emoderivati, in particolare piastrinici, ricchi in fattori di crescita e in sostanze biologicamente attive, in grado di rilasciare nel sito della ferita tali sostanze promuovendo la guarigione del tessuto leso (Borzini and Mazzucco, 2005; Crovetti et al., 2004; Dohan Ehrenfest and Rasmusson, 2009; Mazzucco et al., 2004; Ogino et al., 2006).

Fra gli emoderivati il lisato piastrinico (LP), ottenuto per lisi di concentrati piastrinici ottenuti tramite aferesi, rappresenta un *pool* di fattori di crescita in grado di accelerare la rigenerazione e la riparazione dei tessuti danneggiati [D'agostino E. et al., 2002; Vecchio S. et al., 2006].

In precedenti lavori del gruppo di ricerca dove è stato svolto il lavoro di tesi, il LP è stato caricato in sistemi gel o in medicazioni “sponge-like” per il trattamento di lesioni mucosali, corneali e cutanee [Caramella et al., 2013; Sandri et al., 2011; Sandri et al., 2012]

Date queste premesse, lo scopo di questo lavoro di tesi è stato lo sviluppo di sistemi terapeutici basati sull'utilizzo di biopolimeri naturali associati a lisato piastrinico (LP) per il trattamento delle ulcere cutanee

La tesi comprende una **introduzione** e sei capitoli. Nel **Capitolo I**, è stato messo a punto un metodo di proliferazione cellulare basato sull'impiego di fibroblasti umani, che risultasse sensibile ed idoneo a valutare l'attività biologica di LP e delle formulazioni da sviluppare. Inoltre è stata valutata la stabilità di LP come tale e dopo liofilizzazione.

Nel **Capitolo II** è stata studiata l'associazione di LP con un farmaco antimicrobico modello, la vancomicina cloridrato (VCM). Per evitare problemi di incompatibilità fra l'emoderivato e l'antibiotico, è stata sviluppata una polvere aspersoria costituita da una miscela di particelle di alginato di calcio incapsulanti vancomicina o lisato piastrinico, ottenuti separatamente per estrusione, gelificazione ionica e liofilizzazione.

Nel **Capitolo III** è stata sviluppata una medicazione assorbente che permettesse il caricamento combinato di entrambi i farmaci (LP e VCM), costituita da capsule di acido ialuronico (HA) veicolanti LP inglobate in medicazione di sodio alginato (SA) contenente l'antibiotico in soluzione (VCM).

Nei **Capitoli IV e V** è stata studiata la possibilità di sfruttare le peculiari proprietà del polimero bioattivo chitosano e della proteina sericina. Il chitosano, di derivazione animale o vegetale, è noto per le proprietà di biocompatibilità, biodegradabilità, antimicrobiche, antiossidanti, di mucoadesione e di promozione della riparazione tissutale ed è già ampiamente utilizzato in campo biomedicale [Francesko A. and Tzanov T., 2011].

La sericina, proteina costituzionale della seta che avvolge e protegge la fibroina, vanta idrofilia, compatibilità e biodegradabilità, proprietà antiossidanti ed ha dimostrato di svolgere un importante ruolo nel processo di *wound healing* [Padamwar M.N. and Pawar A.P., 2004; Dash R. et al., 2008].

In particolare, nel **Capitolo IV** lo scopo è stato quello di ottimizzare la composizione di una medicazione assorbente “sponge-like” a tre componenti (chitosano glutammato (CS), glicina (Gly) e sericina (SER)) ottenuta per liofilizzazione ed in grado di veicolare LP. L'individuazione della composizione ottimale della medicazione è stata ottenuta mediante un disegno sperimentale (simplex centroid design). La glicina è stata aggiunta come crioprotettore in vista della fase di

liofilizzazione. Le variabili ottimizzate sono state la resistenza meccanica, le proprietà di idratazione e reologiche (viscosità e viscoelasticità) della medicazione. L'attività antiossidante e la capacità di promuovere la proliferazione cellulare della medicazione ottimizzata è stata studiata in vitro su fibroblasti umani.

Nel **Capitolo V** è stato effettuato il caricamento di LP nella medicazione ottimizzata. In particolare sono state considerate due tecniche di caricamento: la prima ha previsto la miscelazione del LP con gli altri componenti della medicazione e la successiva liofilizzazione, la seconda ha previsto, invece, il caricamento estemporaneo di LP sulla medicazione già liofilizzata. E' stata valutata l'influenza del caricamento di LP sulle proprietà meccaniche, reologiche e di proliferazione cellulare della medicazione.

Il **Capitolo VI** infine ha una valenza prospettica ai fini della prosecuzione del lavoro e contiene studi preliminari intesi alla valutazione della compatibilità e dell'insorgenza di un effetto sinergico nella riparazione tissutale del sucralfato con LP e biopolimeri. Il sucralfato è noto per le proprietà riparative nei confronti di vari tessuti. In particolare è utilizzato sia in forma di polvere che di crema per il trattamento di ulcere cutanee (Masuelli L. et al., 2009; Olascoaga A. et al., 2008; Burch RM. et al., 1991) ed è noto avere un effetto protettivo sui tessuti contro lo stress ossidativo (Hoshito T. et al., 2003; Shindo K. et al., 2006). Il sucralfato è una sostanza metallorganica e, all'inizio di questo studio, non esistevano dati di compatibilità fra LP e sostanze di natura inorganica o metallorganica.

Introduzione

1. Le ferite cutanee

Una ferita può essere descritta come un'interruzione o una rottura dello strato cutaneo, in seguito ad un trauma fisico o termico oppure come risultato di concomitanti condizioni mediche o fisiopatologiche. Una ferita determina la distruzione della normale struttura anatomica della pelle, ed eventualmente dei tessuti sottostanti, oltre che la relativa perdita della sua funzione [Lazarus GS. et al., 1994].

In base alla profondità, le ferite cutanee si distinguono in superficiali, quando si presentano come semplici interruzioni cutanee a livello epiteliale oppure profonde, quando il danno si estende alle strutture sottostanti quali tendini, muscoli, vasi sanguigni, nervi, organi parenchimali e, talvolta, tessuto osseo. Quando una lesione raggiunge una cavità, con eventuale interessamento degli organi interni, si parla, invece, di ferita penetrante [Alonso JE. et al., 1996].

Dal momento che le ferite possono generare delle aperture cutanee è possibile che agenti patogeni penetrino nell'organismo, generando un'infezione locale o sistemica; affinché l'omeostasi corporea venga mantenuta costante, risulta necessario ristabilire prontamente l'integrità della pelle.

1.1 Classificazione delle ferite

Tra i criteri usati per la classificazione delle ferite troviamo: il tempo di guarigione, l'eziologia, il grado di contaminazione, le caratteristiche morfologiche ed, infine, l'eventuale comunicazione con organi interni [Robson MC. et al., 2001].

In base al tempo di guarigione, le ferite vengono classificate in acute e croniche

- **.Ferite acute**

Le ferite acute sono lesioni tissutali che si risolvono completamente entro un breve periodo di tempo (Figura 2), riottenendo la normale struttura anatomica e le caratteristiche funzioni; la guarigione avviene, solitamente, in un intervallo di tempo compreso tra i 5 e i 10 giorni, oppure entro un mese, nei casi più critici [Robson MC. et al., 2001]. Tali ferite possono essere di origine traumatica o chirurgica e, nella maggior parte dei casi, trattasi di escoriazioni, ossia lesioni meccaniche causate dall'attrito della pelle con superfici dure. Le cause primarie di tali ferite comprendono lesioni meccaniche dovute a fattori esterni, come le escoriazioni che sono causate da attrito tra la pelle e superfici dure; le lesioni meccaniche includono anche le ferite penetranti causate da oggetti contundenti e le ferite chirurgiche causate da incisioni chirurgiche. Nella categoria delle

ferite acute rientrano anche le ustioni e le lesioni chimiche, inflitte da fonti di varia natura, quali radiazioni, elettricità, calore e sostanze chimiche corrosive [Boateng JS. et al., 2008; Naradzay FX. and Alson R., 2005].

- **Ferite croniche**

Le ferite croniche sono lesioni caratterizzate da un processo di guarigione rallentato (Figura 1), per le quali non è possibile garantire una riparazione completa in tempistiche prestabilite [Robson MC. et al., 2001]. Il processo di cicatrizzazione può risultare rallentato o alterato da svariati fattori: infezioni, condizioni di ipossia tissutale, processi necrotici ed, infine, presenza di essudato e/o di alte concentrazioni di citochine infiammatorie nell'area danneggiata [Vanwijck R. 2001]. Il processo di guarigione di queste ferite risulta bloccato alla fase infiammatoria, generando una serie di risposte tissutali che impediscono il recupero delle normali funzioni e caratteristiche anatomiche: tali lesioni, in uno stato perenne di incompleta o alterata guarigione tendono a ripresentarsi [Degreef H., 1998]. Il fallimento nella guarigione può essere dovuto a ripetuti attacchi sulla pelle o a condizioni fisiologiche del paziente come diabete, tumori, infezioni persistenti o trattamenti primari di guarigione incompleti. Tra le ferite croniche si ricordano le ulcere da pressione e le ulcere agli arti inferiori, le quali a loro volta si distinguono in ulcere venose, ulcere arteriose, ulcere ischemiche, ulcere diabetiche e ulcere di origine traumatica [Moore K. et al., 2006].

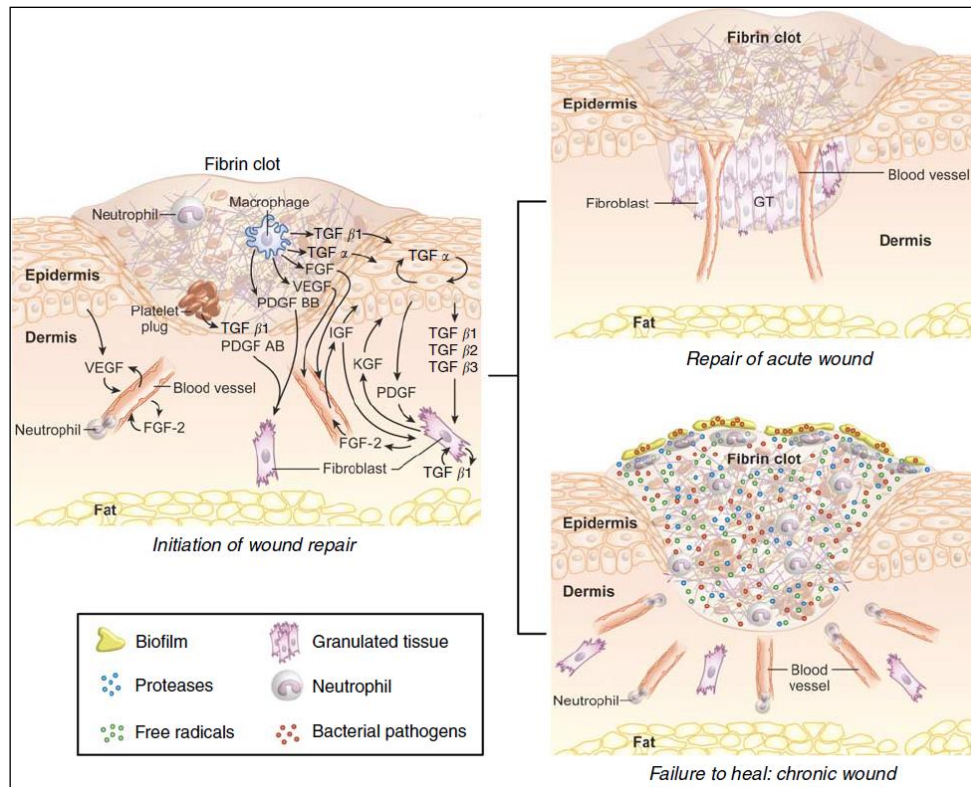


Figura 1: Rappresentazione schematica del processo di guarigione per una ferita acuta e una cronica a confronto [Clark R.A et al.,2007].

Le ferite croniche in certi casi possono evolvere in ferite complesse, definite come la combinazione di un'infezione e di una rottura tissutale. [Velnar T. et al., 2009]. La rottura tissutale può essere di origine traumatica o post-infettiva oppure dovuta ad ampia resezione tissutale come nel caso di un tumore. L'infezione che si sviluppa in una ferita, evidente o meno, dipende dalla virulenza, numero e tipo di microrganismi, come anche dalle cellule del sangue presenti e dalle difese immunitarie del paziente [Attinger CE. et al., 2006].



Figura 2 Rappresentazione di ferite croniche comuni: A ulcera arteriosa B ulcera venosa C ulcera al piede diabetico D ulcera da pressione [Fonder MA. et al., 2008]

Esistono altri criteri per la classificazione delle ferite, includono: l'eziologia, il grado di contaminazione, caratteristiche morfologiche e comunicazione con organi interni [Robson MC. et al., 2001].

Brevemente: l'eziologia distingue le ferite, in base al fattore forza, in contusioni, abrasioni, lacerazioni, tagli, strappi, ferite da taglio, ferite lacero-contuse, ferite d'arma da fuoco e bruciature [Lazarus GS. et al., 1994].

In base al grado di contaminazione le ferite sono classificate in: asettiche (pulite), contaminate, settiche (sporche) [Vanwijck R., 2001]. Le ferite vengono anche distinte in chiuse, quando il tessuto sottostante ha subito un trauma, ma la pelle non è stata lesionata, aperte, quando la pelle è stata

lesionata con il tessuto sottostante esposto [Attinger CE. et al., 2006]. In base alla morfologia, relativa al processo di cicatrizzazione di una ferita, si distinguono: ferite necrotiche, ferite con materiale fibrinoso, ferite granulose, ferite epitelializzate, ferite infette [Boateng JS. et al., 2008].

Le **ferite necrotiche** si presentano di color nero per la presenza di tessuto morto che risulta essere secco, spesso e duro al tatto. In condizioni favorevoli, il tessuto morto in una ferita, come nelle ulcere pressorie, si allontana spontaneamente dal tessuto sano; questo si verifica in seguito ad un processo di autolisi, che coinvolge macrofagi ed enzimi proteolitici, che agiscono all'interfaccia tra tessuto necrotico e tessuto sano. Un ambiente secco impedisce le attività autolitiche e proteolitiche di macrofagi ed enzimi.

Le **ferite con materiale fibrinoso** sono caratterizzate da tessuto necrotico reidrato, tipicamente di colore giallo. Queste ferite sono caratterizzate da un elevato contenuto di fibrina associata all'eccesso di essudato durante la fase infiammatoria; si ritiene importante la sua rimozione onde evitare ritardo del processo cicatrizziale.

Le **ferite granulose** presentano una notevole quantità di tessuto granuloso, generalmente rosso e fragile, perché presenta capillari appena formati, aspetto tipico di una ferita durante la fase proliferativa del processo cicatrizziale.

Le **ferite epitelializzate** si presentano di colore rosa per la formazione di nuova epidermide; questo è l'aspetto tipico di una ferita alla fine del processo di guarigione.

Le **ferite infette** e maleodoranti si distinguono per l'elevata quantità di tessuto infiammato; infatti l'infezione è responsabile dell'odore sgradevole.

2. Le ulcere cutanee

Le ulcere cutanee rientrano nella categoria delle lesioni croniche e sono caratterizzate dalla perdita di sostanza dermo-epidermica: quando il danno risulta confinato alla mucosa si parla di erosione, quando, invece, la lesione è più profonda si parla di escavazione. Le ulcere appaiono come conseguenza di un'inflammazione necrotizzante o di un'ischemia e non dimostrano alcuna tendenza alla riparazione spontanea a causa dell'alterazione dell'omeostasi vascolare sostenuta da processi endogeni ed esogeni. Essendo di natura cronica, gli stati ulcerosi non si risolvono prima di sei settimane, risultando particolarmente dolorosi e debilitanti per il paziente.

L'insorgenza di ulcere è quasi sempre sostenuta da una patologia sottostante, ad esempio insufficienza venosa cronica, diabete, stati infettivi e malattie vascolari periferiche [Vannini V., 2007]. L'elevata proliferazione capillare e l'alta concentrazione di cellule pro-infiammatorie sono la principale conseguenza che si realizza a livello dell'ulcera cutanea, dove notevoli alterazioni anatomo-funzionali si rivedono sul microcircolo cutaneo.

L'aspetto principale che caratterizza un'ulcera riguarda l'assenza di punti di partenza per la ri-epitelizzazione nel centro della lesione e la guarigione avviene sempre con esito cicatriziale [Virgili A. et al., 2004].

2.1 Ulcere da pressione

Dalla National Pressure Ulcer Advisory Panel (NPUAP), le ulcere da pressione sono definite come “un'area di lesione localizzata alla pelle e al tessuto sottostante causata da pressioni, sforzi di taglio o una combinazione di questi”. Le ulcere da pressione, dette anche piaghe da decubito, sono causate da alterazioni nella circolazione sanguigna e da stati di malnutrizione tissutale, dovuti ad una prolungata pressione sulla pelle, muscoli ed ossa. Una prolungata pressione tissutale può portare ad occlusione del letto capillare e locale ischemia; senza un appropriato flusso sanguigno i metaboliti tossici si accumulano localmente, inducendo ulcerazione e necrosi della pelle e del tessuto sottostante [Shea J.D., 1975].

Ulcere di questo tipo sono un problema molto comune nelle persone di età avanzata o costrette a letto per lunghi periodi di tempo; le zone maggiormente colpite da questo tipo di ulcera sono il sacro, il grande trocantere, il calcagno, la tuberosità ischiatica, il malleolo laterale, l'osso occipitale, il mento, le orecchie, i gomiti, le scapole e la cresta iliaca [Peterson N.C. et al., 1976 – Bansal C. et al., 2005]. La predisposizione alle ulcere da pressione proviene da una combinazione di fattori

estremi (pressione, frizione, umidità) e fattori interni (febbre, anemia, malnutrizione e disfunzione endoteliale) [Van Marum R.J. et al., 2002].

Le ulcere da pressione vengono classificate in diversi stadi sulla base della profondità della lesione visibile al momento dell'esame [Parish LC., Witkowski JA., 2004]:

- Stadio 1: è riscontrata un'iperemia della cute integra che non scompare alla digitopressione; la lesione mostra la fuoriuscita di plasma e globuli rossi dai capillari ed è caratterizzata da decolorazione, calore, edema, indurimento anche nei soggetti con cute naturalmente colorata. È importante riconoscere e trattare le ulcere in questo stadio, perché possano guarire in un intervallo di tempo compreso tra i 5 e i 10 giorni.
- Stadio 2: è evidente una perdita parziale dello spessore cutaneo che va a coinvolgere l'epidermide, il derma od entrambi; l'ulcera è superficiale ed ha l'aspetto di un'abrasione o di una vescica contenete siero; la base della ferita è rosea o rossa e può essere dolorosa.
- Stadio 3: è evidente una perdita completa dello spessore della cute con estensione della necrosi al tessuto sottocutaneo o anche più in profondità, senza però coinvolgere la fascia muscolare.
- Stadio 4: è evidente una perdita totale di spessore cutaneo con distruzione estesa e necrosi tissutale; il danno si estende al muscolo e, in alcuni casi, erode l'osso, i tendini, le cartilagini e le altre strutture di supporto; possono essere presenti escare.

2.2 Le ulcere degli arti inferiori

La patologia ulcerativa si identifica essenzialmente con le ulcere degli arti inferiori, le cui cause più comuni sono l'insufficienza venosa (nel 45-60% dei casi), l'insufficienza arteriosa (nel 10-20% dei casi), isolata od associata ad insufficienza venosa, il diabete (nel 15-25% dei casi) od una combinazione di queste (nel 10-20% dei casi).

Ulcere di questo tipo interessano circa l' 1% della popolazione adulta e circa il 5% dei soggetti sopra i 65 anni, colpendo maggiormente le donne rispetto agli uomini. La scarsa tendenza alla guarigione costituisce un ulteriore aggravamento del problema per le implicazioni sia cliniche che sociali: il 20% delle ulcere, infatti, sono ancora aperte dopo due anni e l'8% delle stesse non risulta ancora guarito dopo 5. La tendenza alla recidiva è un ulteriore elemento caratteristico che incide sulla persistenza della patologia: il 67% delle ulcere cutanee degli arti inferiori sono recidivanti [Virgili A. et al., 2004].

2.2.1 Le ulcere arteriose

Le ulcere arteriose derivano da una restrizione o da un'occlusione del flusso sanguigno di un'arteria; il flusso ematico dell'arto a riposo è inferiore a quello necessario per mantenere la vitalità dei tessuti e questo risulta sovente nell'amputazione dell'arto interessato.

Le ulcere arteriose sono principalmente causate dall'aterosclerosi ed interessano il 5% degli individui con età superiore ai 50 anni. L'aterosclerosi è una lesione arteriosa degenerativa che si mostra a livello dei grandi vasi, nei quali l'accumulo di colesterolo, cellule e detriti tissutali porta ad un restringimento progressivo del lume vasale; l'ostruzione del flusso sanguigno che ne consegue porta allo sviluppo di vasi collaterali. Tra i fattori di rischio alla base di tale disturbo si ritrovano: fumo, patologie, quali diabete, ipertensione ed iperlipidemie, ma, semplicemente, anche una vita sedentaria [Zarins C.K. and Glagov S., 1989].

Le ulcere arteriose, generalmente, portano a dolore a riposo, con ferite caratterizzate da essudazione minima e gangrena o tessuto necrotico; in sede perilesionale è possibile apprezzare un eritema paradossale dovuto al rilascio locale di sostanze vasodilatanti in risposta al danno ipossico. Sono lesioni, solitamente, molto difficili da guarire e le aree maggiormente interessate da questo disturbo sono la zona antero-laterale della gamba e le dita dei piedi, spesso in corrispondenza di prominenze ossee.

Il paziente potrebbe presentare claudicatio intermittens, caratterizzata da un dolore ai polpacci o glutei, che si presenta mentre si cammina e si riduce stando fermi.

Se si sospetta un'ulcera arteriosa, bisogna valutare il flusso sanguigno in situ; i valori pressori sistolici minimi considerati sono di 80 mmHg a livello dell'anca e di 100 mmHg a livello del braccio: questi valori sono generalmente indicativi perché ci sia sufficiente pressione per permettere l'adeguata guarigione della ferita [Sibbald R.G. et al, 2000].

Sulla base dei valori sopra riportati, è stato definito l' ABI, o Ankle Brachial Index, per definire la qualità del flusso sanguigno e determinare se una ferita possa essere considerata guaribile o meno. L' ABI viene calcolato dividendo la pressione sistolica dorsale del piede per la pressione sistolica dell'arteria brachiale; un valore inferiore a 0.5 (ischemia severa-moderata) rivela che il flusso a livello della ferita non è sufficiente per permetterne la guarigione [Gist S. et al, 2009].

2.2.2 Le ulcere venose

Le ulcere venose croniche sono considerate il più comune disordine di origine vascolare [Abbade L.P and Lastoria S., 2005]; sono lesioni provocate da un aumento di pressione nel sistema venoso,

generalmente causato da un'insufficienza valvolare cronica a livello degli arti inferiori [White J.V. and Ryjewski C., 2005].

I muscoli del polpaccio permettono il ritorno del sangue dalle gambe al cuore, mentre le valvole presenti nelle vene permettono un flusso unidirezionale dalla superficie in profondità e dalla parte distale a quella prossimale. Disfunzioni circolatorie a livello del polpaccio possono derivare da un'insufficienza venosa profonda (primaria o post-trombotica) o superficiale, da un'ostruzione venosa profonda, da disfunzione neuromuscolare o da una combinazione di questi fattori; questi disturbi sfociano in una condizione nota come ipertensione venosa ambulante. Quest'ultima è associata a delle anomalie micro circolatorie: fuoriuscita di macromolecole, come fibrinogeno ed albumina, e, a livello capillare, formazione di filamenti di fibrina e anomalie nella rete vasale [Falanga V. and Eaglstein W.H., 1993].

Tali lesioni si presentano normalmente come ferite di forma irregolare, poco spesse, con bordi ben definiti e circondate da pelle indurita eritematosa o iperpigmentata. La cute si presenta di colore rosso violaceo a causa di un'eccessiva fuoriuscita vascolare di globuli rossi nel derma e comune è la presenza di essudato bianco-giallastro, vene varicose e una condizione edematosa in corrispondenza della caviglia [Bass A. et al., 1997].

Ulcere di questo tipo insorgono nel derma fino a raggiungere il tessuto sottocutaneo e presentano margini irregolari con area perilesionale cianotica ed edematosa [Ferreira M. C. et al., 2006]. Tra i fattori di rischio nell'insorgenza di questi disordini si considerano: l'età avanzata, l'obesità e la presenza di altre condizioni patologiche riguardanti gli arti inferiori, quali flebiti e vene varicose [Scott T.E. et al., 1995].

2.2.3 Le ulcere neuropatiche: il piede diabetico

Il diabete è una patologia ricca di complicazioni, tra cui l'insorgenza di ulcere al piede, ovvero lesioni in cui risulta evidente la rottura dello strato cutaneo, con successiva perdita dell'epitelio. Queste possono estendersi al derma e ai livelli più profondi, coinvolgendo, talvolta, ossa e muscoli e, nei casi più gravi, può anche rendersi necessaria l'amputazione della parte terminale, non vivente dell'arto [Reiber G.E. and Ledoux W.R., 2002].

Si parla, pertanto, di ulcere diabetiche: la neuropatia, cioè la progressiva degenerazione dei neuroni sensoriali a livello del piede, e l'alterazione vascolare periferica sono i principali fattori coinvolti nell'insorgenza di queste lesioni [Singh N. et al., 2005].

Le cause dello sviluppo di questo tipo di ulcera sono lo sbilanciamento del carico con un suo aumento in alcuni punti della pianta del piede e la ridotta sensibilità dolorifica: sono infatti le

neuropatie sensitive senza sintomatologia dolorosa quelle che favoriscono l'instaurarsi di ulcere [Mayfield J.A. et al, 2004]. I pazienti, perdendo gradualmente la sensibilità degli arti inferiori, non percepiscono anche piccoli traumi ai piedi, che degenerano poi in ulcere croniche che difficilmente guariscono spontaneamente a causa dei disordini del microcircolo [Ferreira M.C. et al., 2006].

L'infezione, in particolare, è una complicanza molto frequente nelle ulcere diabetiche [Senneville E., 2008]. Nonostante non ci siano dati certi riguardanti la maggiore suscettibilità dei pazienti diabetici a sviluppare infezioni, è generalmente accettato che le conseguenze di un'infezione sono più gravi in un piede diabetico. Secondo uno studio di Torri et al, dell'unità operativa complessa di diabetologia, malattie metaboliche e nutrizione clinica, Presidio Ospedaliero di Scandiano (RE), sembra che le conseguenze più gravi di un'infezione su un piede diabetico siano “[...] dovute principalmente alla struttura anatomica del piede con compartimenti che permettono all'infezione di procedere prossimalmente con estrema facilità [...]”. Sempre secondo gli stessi autori, inoltre, è assai probabile che specie batteriche, in genere non patogene, possano causare una vera e propria infezione in un piede diabetico.

Un'infezione superficiale è tipicamente dovuta a cocchi aerobi Gram +, in particolare allo *Staphylococcus aureus* e/o agli streptococchi. Un'infezione profonda è in genere polimicrobica, dovuta a cocchi Gram + o anche ad anaerobi e a bacilli Gram – [Torri C. et al., 2007].

3. Wound healing

Il processo di wound healing prende il via non appena la barriera cutanea viene danneggiata ed è strettamente correlato ad un più generale fenomeno di crescita e rigenerazione tissutale: è un processo fisiologico dinamico che consiste in una serie di eventi tra loro concatenati che si susseguono e, talvolta, sovrappongono (Figura 2). Una volta avviato, il wound healing procede attraverso quattro step successivi, in cui i componenti cellulari e matriciali coinvolti comunicano e collaborano in modo armonico al fine di ripristinare l'integrità del tessuto danneggiato e rigenerarne di nuovo [Boateng J.S., 2008].

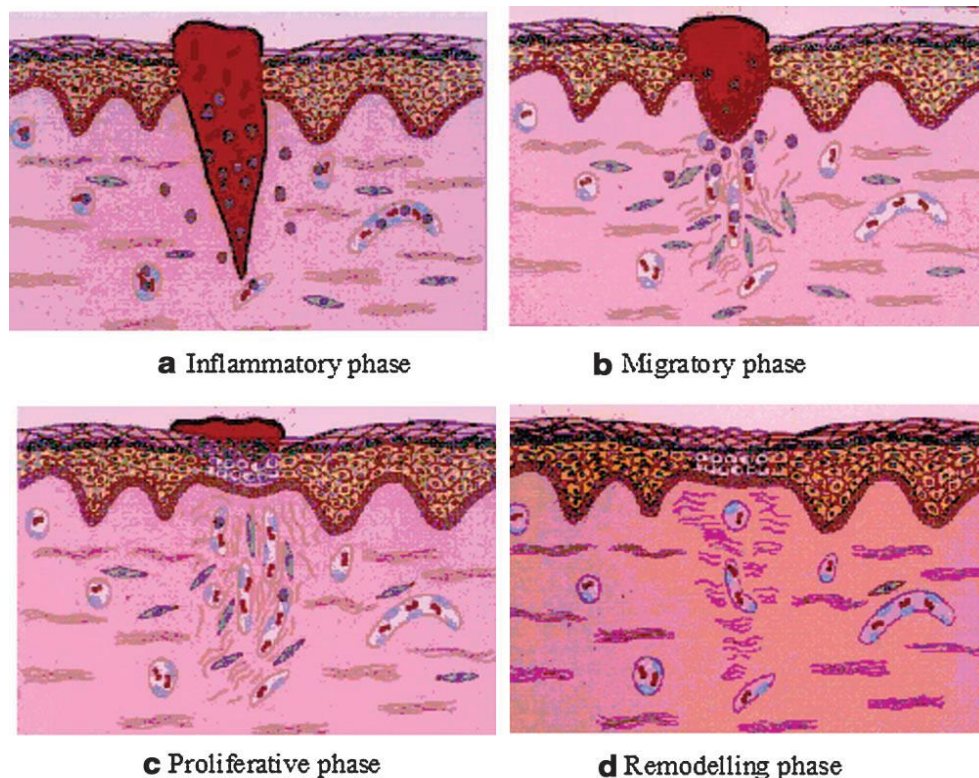


Figura 2 Rappresentazione schematica delle fasi di wound healing: A infiltrazione di neutrofili nell'area della ferita; B invasione di cellule epiteliali nell'area della ferita; C rivestimento completo di epitelio al di sopra della ferita; D scomparsa di molti capillari e fibroblasti formati nei primi stadi [Boateng JS. et al., 2008]

3.1 Fase I: Emostasi

Il sangue inizia a fuoriuscire, non appena la barriera cutanea, quindi la parete di un vaso, viene lesionata. Ciò è importante, non solo perché il flusso di sangue allontana dalla ferita eventuali

microrganismi e antigeni, ma anche perché l'organismo si attiva nel tentare di impedire o arrestare la perdita sanguigna. Il processo emostatico prende così il via, giocando un ruolo critico nella risoluzione del danno tissutale in atto, in quanto primo stadio di wound healing. [Strodtbeck F., 2001].

Quando un vaso sanguigno si danneggia, gli eventi che concorrono a fermare il flusso di sangue dal vaso sono rappresentati da vasocostrizione della parete vascolare, formazione del tappo piastrinico e coagulazione. A pochi secondi dal danno tissutale, una contrazione muscolare della parete vasale determina la chiusura immediata, ma provvisoria, del vaso: una serie di sostanze rilasciate dall'endotelio vascolare, tra cui l'endotelina, inducono l'insorgenza dello spasmo. Come immediata conseguenza alla vasocostrizione, si osserva una riduzione del flusso e della pressione vasale, funzionale al passaggio successivo di formazione del tappo piastrinico. La perdita ematica viene arrestata, nel giro di pochi minuti, dalle piastrine, che, fuoriuscendo dal letto vasale, aderiscono al collagene del tessuto connettivo sub-endoteliale localizzato ai bordi della ferita. Una volta attivate, le piastrine provvedono al mantenimento dell'emostasi primaria: senza modificare la propria integrità strutturale all'interno dell'aggregato, liberano, per esocitosi, il contenuto dei loro granuli citoplasmatici. Tra le sostanze rilasciate vi sono la serotonina, l'adenosindifosfato (ADP) e il fattore attivante le piastrine (PAF), il quale, oltre a promuovere l'attivazione di altre piastrine mediante un meccanismo di feedback positivo, coordina la conversione dei fosfolipidi di membrana in trombassano A₂, una citochina. L'insieme di queste sostanze rinforza la vasocostrizione locale in atto e induce la formazione di un aggregato piastrinico, che blocca meccanicamente la lesione, fungendo da sigillo a livello della parete vasale danneggiata.

Il tappo piastrinico e lo spasmo vascolare non sono di per sé sufficienti a impedire l'emorragia: segue, pertanto, il più complesso meccanismo coagulativo, o di emostasi secondaria, che, mediante una serie di tappe in cascata, determina la trasformazione di due proteine del plasma, la protrombina e il fibrinogeno, rispettivamente in trombina e fibrina insolubile. Le fibre di quest'ultima, intrappolando cellule del sangue, piastrine e fluido, danno vita ad un coagulo gelatinoso, che via via sostituendosi completamente al tappo piastrinico [D'Angelo E. and Peres A., 2007]. Fungendo da barriera contro l'ingresso di eventuali microrganismi esterni, il suddetto tappo di fibrina sigilla temporaneamente la ferita, supportando anche l'afflusso di fibroblasti e cheratinociti. In questa fase, interviene anche un'altra importante proteina, la fibronectina, la quale, date le sue ottime proprietà adesive, aiuta le piastrine ad aderire alle pareti vasali danneggiate, prendendo poi parte alla struttura del tappo provvisorio di fibrina, alla quale risulta particolarmente affine. La fibronectina partecipa attivamente al processo di wound healing, sia facilitando la migrazione delle cellule immunitarie

verso la parte lesa sia presentandosi come supporto alla deposizione di fibre collagene. Partecipa anche al wound debridement degradando i residui di matrice extracellulare (ECM) e attivando le proprietà fagocitiche dei macrofagi.

Una volta attivate, le piastrine, aderendo alle fibre di collagene esposte nella ferita, inducono la produzione di sostanze che rientrano poi nella costituzione della nuova ECM. Tra i fattori rilasciati in seguito all'attivazione e alla degranulazione piastrinica si ritrovano anche potenti citochine che intervengono in modo specifico nel processo di riparazione tissutale, oltre che di stimolazione del sistema immunitario. Queste richiamano al sito di lesione le cellule leucocitarie coinvolte nell'innescò della risposta infiammatoria e, allo stesso tempo, promuovono in situ fenomeni di epitelializzazione e angiogenesi. Tra le citochine, da evidenziare è il gruppo dei fattori di crescita piastrinici, impegnati su diversi fronti nel processo di wound healing: essi regolano la confluenza di fibroblasti e cheratinociti, la sintesi di collagene e altre proteine dell'ECM, il movimento cellulare nel microambiente rappresentato dalla lesione tissutale, la crescita di nuovi capillari e letti vasali ed, infine, la sintesi di enzimi promotori della rigenerazione di nuovo tessuto connettivo [Strodtbeck F., 2001].

I cheratinociti sopraggiunti a livello della lesione tissutale rilasciano dai propri serbatoi l'interleuchina 1- α (IL-1 α) e il tumor necrosis factor- α (TNF- α), in modo che le cellule circostanti la barriera danneggiata vengano allertate [Kondo T. and Ishida Y., 2010]. Il TNF e l'IL-1 sono tra le principali citochine pro infiammatorie, espresse nei cheratinociti: sono implicate in diverse funzioni immunologiche, nonché coinvolte nell'interazione con molteplici target cellulari. Stimolano il citoscheletro delle cellule endoteliali, determinandone la concentrazione, con conseguente dilatazione degli spazi inter-endoteliali, attraverso cui le cellule ematiche migrano dal compartimento vascolare a quello interstiziale [Pontieri G.M., 2007].

3.2 Fase II: Infiammazione

La risposta infiammatoria è scatenata da una varietà di mediatori, tra cui si annoverano le sostanze rilasciate dalle cellule tissutali danneggiate e dai capillari, le piastrine attivate, le loro citochine e i sub-prodotti del processo emostatico (Figura 3).

A pochi minuti dal danno tissutale, i neutrofili sopraggiungono con l'intento di pulire la ferita dalla presenza di eventuali microrganismi e di attivare i fibroblasti e le cellule endoteliali presenti in loco, coordinando così le prime fasi del fenomeno di riparazione tissutale. Nonostante anche i monociti, i leucociti e la componente cellulare plasmatica inizino a mobilitarsi, sono i neutrofili a dominare la scena per i primi giorni dal danno; solo nel momento in cui nella ferita sembra non ci sia alcuna

infezione da tenere sotto controllo, i neutrofili vengono estrusi con la crosta (escara) o fagocitati dai macrofagi.

I macrofagi, differenziatisi dai monociti presenti in situ, predominano nel restante processo di wound healing, sia nella fase infiammatoria che in quella di riparazione tissutale, rivelandosi indispensabili nella risoluzione del danno tissutale. Essi, oltre a ingerire e processare i microrganismi sopravvissuti, i neutrofili morti, il tappo di fibrina e gli altri eventuali residui cellulari, secernono diverse citochine e sintetizzano ossido nitrico, che sembrerebbe implicato nella regolazione dei cheratinociti: basse concentrazioni stimolano un incremento nella proliferazione cellulare, mentre alte concentrazioni inducono maggiormente un fenomeno di differenziazione [Strodtbeck F., 2001].

Con i macrofagi prende il via lo sviluppo del tessuto di granulazione, nonché il rilascio di citochine (IL-1 e IL-6) e di fattori di crescita (FBF, EGF, TGF- β e PDGF). [Kondo T. and Ishida Y., 2010]

A differenza delle piastrine, che rilasciano le citochine immagazzinate nei loro granuli, i macrofagi sono in grado di rilasciarle e secernerle in continuo, assicurando così che il processo di rigenerazione tissutale abbia seguito.

Un altro importante passaggio della fase infiammatoria è rappresentato dall'attivazione di sostanze vasoattive, quali istamina, bradichinina, prostaglandine e serotonina. All'aumento della permeabilità endoteliale e del grado di perfusione indotto dalle suddette molecole, segue l'arrivo al sito danneggiato di un numero sempre maggiore di cellule immunitarie, oltre che una migliore ossigenazione per i tessuti coinvolti nel danno. La temperatura in prossimità del tessuto lesionato inizia a salire e l'essudato comincia a riversarsi nella ferita.

Benché clinicamente ciò conduca ad un eritema cutaneo ed ad una condizione edematosa, il microambiente caldo e umido formatosi all'interno della ferita è importante perché il wound healing si risolva con successo. Al termine dello stadio infiammatorio, il flusso di sangue è controllato e il letto della ferita pulito; l'ambiente creatosi è perfetto perché il processo continui con lo stadio successivo di proliferazione e rigenerazione cellulare [Strodtbeck F., 2001].

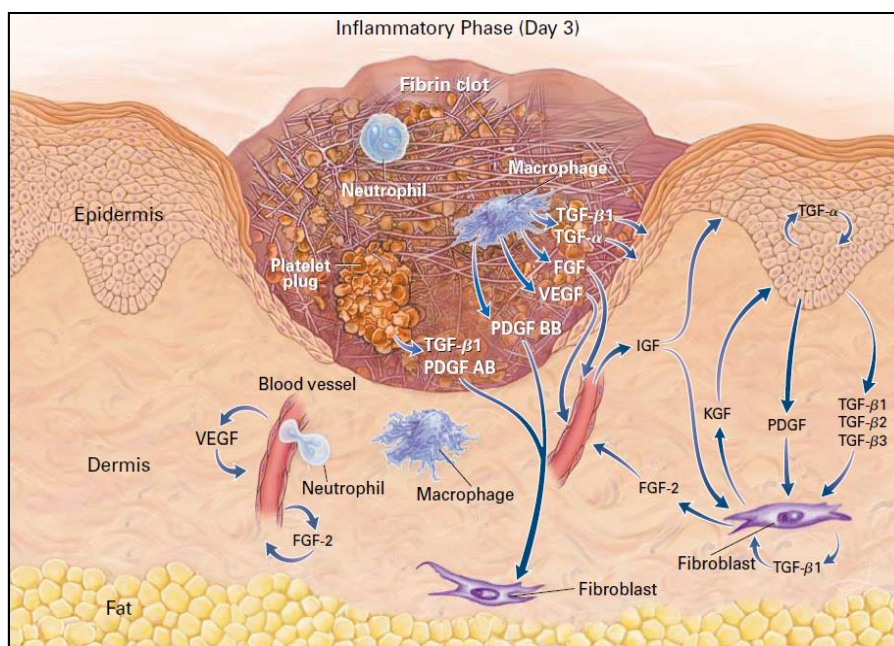


Figura 3. Riproduzione di una ferita cutanea al 3°giorno di guarigione.[Singer A.J. and Clark R.A., 1999]

3.3 Fase III: Proliferazione

In questa fase del processo di wound healing hanno luogo tre importanti eventi: la ri-epitelializzazione, in cui la superficie della ferita viene coperta da nuovo tessuto cutaneo, la neovascolarizzazione, durante la quale viene ripristinata la parete vasale danneggiata (Figura 6) e la granulazione, con cui viene recuperata l'integrità strutturale della cute. I fibroblasti e i cheratinociti intensificano la loro presenza nella zona danneggiata, mentre l'essudato, riversatosi nella ferita e ricco di citochine, promuove la crescita tissutale. Nei minuti che seguono la lesione, la pressione parziale dell'ossigeno decresce, raggiungendo i 10 mmHg, quella dell'anidride carbonica aumenta fino agli 80 mm Hg e il pH raggiunge un valore di 6,8. Condizioni di ipossia e acidosi stimolano l'angiogenesi e la sintesi di collagene, anche se, a prima vista, sembrerebbero controproducenti al processo di guarigione.

3.3.1 Ri-epitelializzazione

A poche ore dal danno tissutale prende il via il processo di ri-epitelializzazione, durante il quale i cheratinociti provvedono a ricoprire la superficie della porzione di cute lesa. Tra le marcate alterazioni fenotipiche a cui le cellule epidermiche vanno incontro in questa fase, sono da evidenziare: la retrazione dei tenofilamenti intracellulari, la dissoluzione dei desmosomi, garanti

della connessione fisica tra le diverse entità cellulari e la formazione periferica di filamenti di actina, funzionali al movimento delle cellule stesse. In aggiunta, la dissoluzione dei legami emidesmosomiali tra l'epidermide e la membrana basale rende possibile il distacco tra le cellule dell'epidermide e del derma, facilitandone così il movimento laterale. Grazie ai loro recettori di membrana, le cellule epidermiche possono interagire anche con le molteplici componenti proteiche della matrice extracellulare, intervallate a collagene di tipo I, al bordo della lesione, e intrecciate col tappo di fibrina al centro. Osservando la ferita in questa fase, ci si trova di fronte ad un ambiente separato in due porzioni, rappresentate, rispettivamente, dall'escara essiccata e dal tessuto vitale. La migrazione delle cellule epidermiche attraverso il derma e il tappo fibrinico è resa possibile solo dalla degradazione della matrice extracellulare. Perché questa avvenga, l'attivatore tissutale del plasminogeno induce le cellule epidermiche a secernere le collagenasi (metallo proteinasi di matrice), in grado di distruggere non solo il collagene, ma anche le proteine matriciali [Singer A.J. and Clark R.A., 1999].

Presentandosi come il più vasto gruppo di cellule all'interno dell'epidermide, i cheratinociti danno, inoltre, il via ad un'intensa attività mitotica lungo i bordi della ferita. Uno o due giorni dopo la lesione, gli stessi cheratinociti, stimolati dal rilascio locale di fattori di crescita, proliferano e migrano all'interno della ferita. La migrazione cellulare è un passaggio che richiede la presenza di un ambiente fluido e consta di diversi stadi controllati da un gradiente chemiotattico generato dai fattori di crescita. In assenza di una superficie idratata, i cheratinociti secernono degli enzimi proteolitici che scavano a fondo nel letto della ferita, nel tentativo di raggiungere un livello di umidità adatto al processo migratorio. Per prima cosa, i cheratinociti si separano gli uni dagli altri e aderiscono alle cellule della membrana basale, subendo, durante la migrazione, una trasformazione che vede l'allungamento degli stessi nella direzione in cui la crescita tissutale risulta necessaria. Soltanto nel momento in cui le cellule si toccano tra loro da una parte all'altra della ferita, il processo di migrazione viene interrotto per quel meccanismo noto come "inibizione da contatto". Quando la superficie cutanea è completamente ricoperta da nuove cellule endoteliali, la ferita si può considerare chiusa [Strodtbeck F., 2001].

Subito dopo aver raggiunto la completa chiusura della ferita, i cheratinociti vanno incontro a stratificazione e differenziazione per ripristinare la barriera cutanea [Kondo T. and Ishida Y., 2010].

3.3.2 Neovascolarizzazione

Il ripristino di una rete vascolare a livello della porzione cutanea danneggiata è essenziale affinché il processo di rigenerazione tissutale termini con successo; questa fase prende il nome di

neovascolarizzazione o angiogenesi. È un processo complesso che comporta la formazione di nuova ECM, ma soprattutto, la migrazione e la stimolazione mitogenica delle cellule endoteliali. Diversi sono i fattori di crescita che inducono questo fenomeno, insieme alla bassa concentrazione di ossigeno e agli incrementati livelli di acido lattico che caratterizzano il sito lesionato.

È evidente, già nei primi stadi di wound healing, che gli strati cutanei ai bordi della ferita o a contatto con il derma sottostante, si mantengono vitali proprio perché supportati da un sistema vasale integro. Dal momento che l'ossigenazione tissutale dipende strettamente dal grado di perfusione, non sorprende che la concentrazione di ossigeno nel cuore della lesione sia inferiore a quella delle zone limitrofe al danno. L'aumentata permeabilità endoteliale rende possibile la fuoriuscita dal letto vasale di una serie di nutrienti nello spazio interstiziale, quindi nella ferita. Questo crea un microambiente ricco di sostanze utili a sostenere il processo di riparazione, nonché lo stadio di neovascolarizzazione. Il tappo di fibrina, formatosi durante l'emostasi, garantisce alla ferita una copertura temporanea, poi, sostituita da nuove cellule epidermiche. Si crea, pertanto, un sistema chiuso in cui l'angiogenesi può procedere: condizioni di ipossia e acidosi (presenza di acido lattico) sembrano stimolare il rilascio di fattori di crescita, come ad esempio FGFβ e VEGF, da parte dei macrofagi [Strodtbeck F., 2001].

L'FGFβ sostiene la neovascolarizzazione nei primi tre giorni dal danno tissutale, mentre il VEGF induce, dal quarto al settimo giorno di wound healing, la formazione del tessuto di granulazione. Il primo viene rilasciato in seguito alla distruzione tissutale indotta dalla ferita, mentre la secrezione del secondo fattore sembra strettamente correlata alla creazione di un ambiente ipossico. L'FGFβ stimola l'endotelio vasale a rilasciare procollagenasi e PAF, in grado di attivare il plasminogeno in plasmina e le stesse procollagenasi in collagenasi. Queste proteinasi avviano, così, la degradazione della membrana basale, che consente alle cellule endoteliali di migrare e formare nuovi vasi sanguigni presso i tessuti lesionati

I nuovi vasi si presentano come una ramificazione dei vasi intatti, presenti nel sottostante tessuto dermico, e, unendosi tra loro, danno vita ad un sistema in grado di garantire un adeguato apporto di sangue ai tessuti lesionati. Una volta formati, i suddetti capillari si protendono verso il letto della ferita, aumentando la loro estensione. Durante la fase di neovascolarizzazione è importante, infatti, che la formazione di una nuova matrice extracellulare sia supportata da un giusto apporto di ossigeno. Solo quando la ferita viene adeguatamente riempita con tessuto di granulazione, ha termine il processo di angiogenesi [Singer A.J. and Clark R.A., 1999].

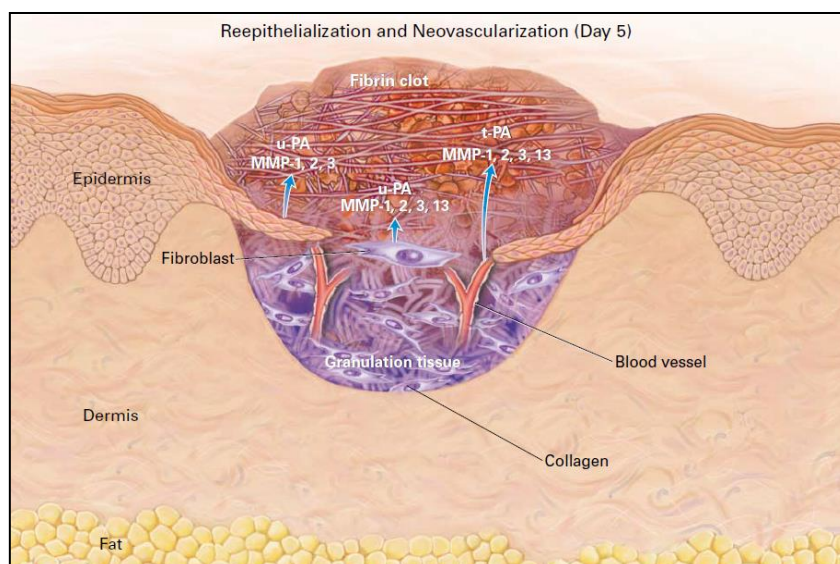


Figura 4. Rappresentazione di una ferita cutanea al 5°giorno di guarigione.
[Singer A.J. and Clark R.A., 1999]

3.3.3 Granulazione

A quattro giorni circa dal danno tissutale, ha luogo il terzo e ultimo meccanismo di proliferazione e rigenerazione: la granulazione prevede la sostituzione dell'impalcatura rappresentata dal tappo di fibrina con un nuovo tessuto ricco di acido ialuronico, fibronectina e altri composti della matrice extracellulare [Strodtbeck F., 2001]. Se, durante questa fase l'escara viene allontanata, si nota che il fondo della ferita è occupato da uno strato roseo, il tessuto di granulazione, così chiamato perché costellato da tanti granuli, che emergono con la forma di una punta di spillo. Questi granuli rappresentano i capillari neoformati, ancora molto fragili, ma in grado di dare vita ad una fitta rete vasale, funzionale a supportare l'attività metabolica del tessuto di granulazione, impegnato nel processo di proliferazione cellulare e proteica.

Infatti, all'interno del tessuto di granulazione, costituito dal tappo di fibrina e dai residui del coagulo, si muovono cellule infiammatorie ed endotelioцитi proliferanti che portano alla formazione di cordoni solidi, i quali, una volta sviluppatisi, consentono il passaggio del sangue, proveniente dai capillari da cui hanno preso origine. Allo stesso tempo, i leucociti e i macrofagi si fanno carico del processo digestivo e della successiva rimozione del coagulo [Pontieri G.M., 2007].

Nello stadio di granulazione, un ruolo molto importante è rivestito dai fibroblasti, cellule fisiologicamente presenti nel connettivo, che assumono un ruolo primario nel processo di risoluzione della flogosi ed in quello ripartivo, sia moltiplicandosi sia producendo le molecole che

andranno a costituire la nuova matrice extracellulare [Pontieri G.M., 2007]. Questa si caratterizza per la presenza di svariate sostanze: fibronectina, che promuove l'adesione e la migrazione cellulari; glicosamminoglicani, tra cui l'acido ialuronico, che favoriscono l'idratazione tissutale; proteoglicani e proteine di matrice, coinvolti nei processi di regolazione, migrazione, immagazzinamento ed espressione di fattori di crescita, enzimi e proteine della coagulazione (condroitinsolfato) ed, infine, glicoproteine, come il collagene e l'elastina, che contribuiscono a mantenere i tessuti forti ed elastici.

La migrazione e la proliferazione dei fibroblasti sono innescate da una serie di segnali inviati da PDGF, TGF, FGF e C5a, rilasciato dalle cellule endoteliali durante la risposta infiammatoria [Strodtbeck F., 2001]. Il movimento delle cellule nella ECM è reso possibile da un efficiente sistema proteolitico; a tal fine collaborano i diversi enzimi derivati dai fibroblasti, il PAF, le collagenasi, la gelatina A e la stromalisina, una metallo proteinasi [Singer A.J. and Clark R.A., 1999].

I composti secreti dai fibroblasti, quali collagene e altre proteine matriciali, sono importanti nel processo di rigenerazione, non solo per la loro funzione di sostegno e di collante, ma anche perché partecipano attivamente alla riparazione tissutale. Essi imbrigliano diversi fattori di crescita e trasducono segnali che, tramite le integrine, espresse dalle cellule protagoniste del processo riparativo, stimolano la sintesi di proteine del citoscheletro, responsabili del movimento cellulare [Pontieri G.M., 2007].

I fibroblasti, caratterizzati da speciali proprietà contrattili, conferite loro dalla presenza di actina, coordinano la saldatura dei margini della ferita, favorendo la retrazione del danno. La chiusura progressiva della lesione non solo diminuisce via via l'estensione della ferita, quindi anche la quantità di ECM necessaria a riparare il danno, ma accelera anche il fenomeno della ri-epitelializzazione, riducendo le distanze che i cheratinociti devono percorrere [Strodtbeck F., 2001].

Una volta che la matrice provvisoria è stata depositata nella ferita, i fibroblasti interrompono la sintesi di collagene, e il tessuto di granulazione viene sostituito da una cicatrice relativamente acellulare.

3.4 Fase IV: Rimodellamento

Lo stadio finale del wound healing consiste nel rimodellamento, ossia nello sviluppo del tessuto di granulazione in connettivo maturo e/o in cicatrice. Questa fase, durante la quale la ferita sviluppa una certa robustezza, si caratterizza per il ruolo predominante rivestito dai macrofagi e fibroblasti. La sintesi di collagene ha inizio cinque giorni dopo il danno, ma può continuare per settimane/mesi.

Durante questo periodo, il collagene e la nuova matrice continuano ad essere depositati nel letto della ferita, mentre lo sviluppo di nuovo connettivo viene garantito dalla maturazione cellulare e da fenomeni apoptotici.

Il processo di rimodellamento ha inizio, a seconda delle regioni, in tempi diversi: la degradazione della matrice e la differenziazione cellulare sono portate avanti dalle metallo proteinasi e dai fattori di crescita attivati dai fibroblasti e dai macrofagi. Gradualmente, il tessuto di granulazione viene convertito in ECM stabile: il collagene, inizialmente rilasciato come proteina a tripla elica, col nome di pro collagene, si presenta in forma di fibre, riarrangiate a dare cordoni più forti e robusti. La sintesi di nuovo collagene è perfettamente bilanciata con la degradazione di quello vecchio.

Sostanziali differenze esistono, ad ogni modo, tra i tessuti riparati e gli strati cutanei non implicati nel danno: il nuovo tessuto connettivo, ad esempio, non risulta ancorato al connettivo sottostante ed appare più spesso della pelle normale. In questa fase, la fibronectina e l'acido ialuronico vengono sostituiti, i fasci di collagene crescono in dimensioni e forza, il processo di neovascolarizzazione ha termine, l'attività metabolica all'interno dell'ECM diminuisce e la densità delle cellule, quali macrofagi, cheratinociti, fibroblasti e miofibroblasti, viene ridotta per apoptosi. I cheratinociti sono le prime cellule ad andare incontro ad una morte programmata, subito seguiti dai mio fibroblasti [Strodtbeck F., 2001].

La formazione della cicatrice rappresenta l'evento terminale del processo di wound healing. La ferita, inizialmente edematosa ed arrossata, viene stabilmente e definitivamente chiusa da una cicatrice di colorito pallido, liscia, anelastica, con irrorazione e innervazione ridotte. Essa ricostituisce la continuità tissutale, senza, però, mai ristabilire, al 100% il grado di resistenza ed elasticità della cute integra, associandosi anche alla mancata riformazione di annessi cutanei [Pontieri G.M., 2007].

3.5 Risoluzione del danno

3.5.1 Essudato

L'essudato di una ferita è stato definito da Thomas come “un termine generico per indicare il liquido prodotto dalle ferite croniche, dalle fistole e dalle lesioni tissutali acute una volta terminato il processo emostatico” [Thomas S., 1997].

L'essudato, fondamentalmente, è costituito da sangue, dal quale sono state rimosse la maggior parte delle cellule rosse e delle piastrine; esso gioca un ruolo chiave nel wound healing, irrorando continuamente la ferita, mantenendola opportunamente umida e creando un ambiente ideale perché il processo di guarigione abbia un esito positivo. L'essudato fornisce ai tessuti danneggiati le

sostanze nutritive necessarie alla sopravvivenza cellulare, oltre a creare una situazione favorevole per la crescita e la mitosi delle cellule epiteliali. Questo fluido garantisce, inoltre, un apporto costante di leucociti al letto della ferita, in modo tale da prevenire l'attacco batterico, quindi l'insorgenza di infezioni che potrebbero ulteriormente aggravare il danno tissutale. Nonostante l'essudato abbia dimostrato di essere importante per la naturale regressione di una lesione tissutale, un suo eccesso può generare delle complicazioni, portando anche alla cronicizzazione della ferita. In condizioni edematose, la risposta infiammatoria al danno si protrae più a lungo, la mobilità risulta ridotta e si possono manifestare quadri di insufficienza venosa o linfatica; l'eccessiva produzione di essudato può portare anche alla macerazione della cute integra ai margini della ferita, producendo un odore sgradevole, che può avere un certo impatto negativo sulla qualità di vita del paziente.

L'obiettivo principale dei moderni wound dressings è quello di riuscire ad assorbire la maggior parte dell'essudato presente nel letto della ferita, mantenendo, al contempo, un ambiente umido, nonché favorevole al wound healing [Boateng J.S., 2008].

3.5.2 Contaminazione batterica

La presenza negli strati cutanei sottostanti di corpi estranei, responsabili del danno tissutale, può indurre fenomeni infiammatori di natura cronica in grado di indurre un ritardo nella guarigione della ferita, oltre che la formazione di granulomi o ascessi. Una volta che i tessuti risultano danneggiati, i microrganismi presenti sulla superficie cutanea possono penetrare in profondità; il grado di infezione, quindi la velocità di replicazione dei microrganismi possono dipendere dalla presenza di una contaminazione, di una colonizzazione, di una locale infezione/contaminazione critica e/o di un'infezione invasiva diffusa all'organismo.

L'infiammazione, oltre ad essere una fase determinante nel processo di wound healing, è utile nella rimozione di microrganismi invasori. Quando la decontaminazione endogena risulta inefficace, la risposta infiammatoria si protrae maggiormente, portando alla cronicizzazione della ferita: sia i batteri che le endotossine possono incrementare i livelli di citochine pro-infiammatorie, quali, ad esempio, l'interleuchina 1 (IL-1) e il tumor necrosis factor (TNF).

I batteri nelle ferite infette tendono a presentarsi in forma di biofilms: complesse comunità di microrganismi tra loro aggregati si mostrano incorporate all'interno di una matrice extracellulare di natura polisaccaridica. Una volta maturi, questi microrganismi, protetti dal microambiente da loro stessi creato, appaiono estremamente resistenti ai convenzionali trattamenti antimicrobici. Tra le

specie batteriche che, solitamente, infettano le ferite ricordiamo *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* [Guo S. and DiPietro L.A., 2010].

4. Trattamento delle ferite croniche

Per il trattamento delle ferite croniche non guarite (tipicamente bloccate nella fase infiammatoria) Falanga ha proposto il concetto di “wound bed preparation”, ovvero preparazione del letto della ferita. Si tratta di un metodo che ottimizza gli interventi sulle ferite croniche, in quanto valuta le problematiche alla base della non guarigione della ferita e propone degli opportuni interventi clinici volti alla guarigione della ferita [Falanga V., 2000]; questa metodica enfatizza la rimozione delle barriere che impediscono la guarigione di una ferita utilizzando dei principi racchiusi nell’acronimo “TIME”; in base a questi principi, ogni ferita non guarita dovrebbe essere valutata sulla base di: Tessuto, non vivente o mancante; Infezione o Infiammazione; squilibrio di Umidità; Margini della ferita non aumentati o indeterminati. Questi rappresentano i tipici fattori che impediscono il processo di guarigione di una ferita; infatti le metodiche cliniche alla base della preparazione del letto della ferita sono: rimozione del Tessuto necrotico, trattamento dell’ Infezione, Macerazione, ovvero controllo dell’essudato, incremento dell’Epitelizzazione [Schultz GS. et al., 2003].

4.1 Debridement

Il debridement, letteralmente sbrigliamento, è una tecnica che promuove la chiusura della ferita e perciò l’epitelizzazione. Consiste nella rimozione di corpi estranei dalla ferita, di tessuto devascularizzato o necrotico, promuovendo in tal modo i meccanismi di difesa locale dell’ospite e riducendo le infezioni attive. Questa procedura favorisce anche il rilascio di citochine e fattori di crescita [Elek SD., 1956].

4.2 Carica batterica

La presenza di batteri in una ferita cronica non determina necessariamente un’infezione o un rallentamento nel processo di cicatrizzazione [Kerstein MD., 1997]. I microrganismi sono presenti in tutte le ferite croniche, ed è stato suggerito che una bassa carica batterica può facilitare la guarigione; infatti i batteri producono enzimi come ialuronidasi, che contribuisce allo sbrigliamento della ferita e stimola i neutrofili a rilasciare proteasi.

In base al coinvolgimento di batteri in una ferita, queste vengono classificate in: ferita contaminata, ferita colonizzata, colonizzazione critica e ferita infetta.

La ferita contaminata è caratterizzata dalla presenza di microrganismi non replicanti sul sito della ferita; di solito tali microrganismi sono incapaci di sviluppare infezioni per l'ambiente ostile del tessuto umano. La ferita colonizzata è caratterizzata dalla presenza di microrganismi replicanti che aderiscono alla ferita senza causare alcuna lesione; si tratta dei cosiddetti batteri commensali che in molti casi hanno dimostrato di favorire il processo di cicatrizzazione [Rodeheaver GT. et al., 1975]. La colonizzazione critica si verifica quando i batteri causano un ritardo nella guarigione della ferita tramite il rilascio di mediatori proinfiammatori [Sibbald RG. et al., 2001].

I batteri possono stimolare l'angiogenesi determinando la produzione di tessuto granuloso rosso intenso e la produzione di una matrice inadeguata; tali ferite sono caratterizzate anche da un'elevata quantità di essudato sieroso e da un odore non piacevole per la presenza di tessuto necrotico [Sibbald RG. et al. 2001]. I sintomi tipici di un'infezione superficiale sono: presenza di tessuto granuloso friabile di color rosso intenso, aumento della quantità di essudato, formazione di nuove aree di necrosi; nel caso in cui l'infezione riguardi un tessuto più profondo ai sintomi appena descritti si aggiungono: dolore, calore, aumento delle dimensioni della ferita, eritema e possibile esposizione delle ossa [Cutting KF., White RJ., 2005].

4.2.1 Trattamento dell'infezione

Non è sempre facile diagnosticare un'infezione in una ferita, peculiari potrebbero essere il fallimento nella guarigione ed il deterioramento tissutale. Lo sviluppo di un'infezione è strettamente legato alle difese immunitarie dell'ospite.

L'uso di antibiotici a livello sistemico non è necessariamente la via più appropriata per ridurre la carica batterica nelle ferite, soprattutto in quanto si potrebbe verificare resistenza agli antibiotici. Altri metodi più efficaci per il trattamento di infezioni includono:

- Promozione dei meccanismi di difesa dell'ospite
- Debridement
- Detersione della ferita
- Disinfezione della ferita
- Antibiotici topici

La detersione della ferita è un'importante procedura nella quale i microrganismi sono fisicamente rimossi dal letto della ferita, così come anche l'essudato riducendo la carica batterica. Solitamente si utilizza la soluzione fisiologica 0,9% sterile, applicata ad una pressione compresa tra 8 e 15 psi, in modo da rimuovere i microrganismi patogeni senza recare danno al tessuto; è anche usata per

disinfettare in loco le medicazioni in cui sono dispersi polimeri e per detergere la ferita quando viene cambiata la medicazione in modo da ridurre il dolore. Come detergenti vengono anche usati i surfattanti, che però potrebbero risultare tossici per il tessuto granuloso e non hanno più benefici della soluzione salina.

La disinfezione della ferita si basa sull'uso di disinfettanti quali, povidone a base di iodio, argento ionizzato, clorexidina, alcol, acido acetico, idrogeno di perossido, sodio ipoclorito (soluzione di Dakin). Il problema di questi disinfettanti è che alcuni di questi in vivo hanno dimostrato tossicità sui fibroblasti umani, il che non necessariamente si traduce in un ritardo della guarigione in vivo; comunque, la tossicità di un disinfettante è strettamente legata alla concentrazione usata [Gruber RP. et al., 1975]. La tossicità può essere modificata attraverso metodi di rilascio sofisticati. Un esempio è dato dalle medicazioni contenenti nanocristalli di argento; questa medicazione rilascia lentamente l'argento, ha un ampio spettro di attività antibatterica e contiene anche un tampone poliestere assorbente il quale diminuisce la quantità di essudato sulla superficie della ferita. L'argento è stato recentemente combinato con altre medicazioni interattive quali, schiume, calcio alginato, idrocolloidi e film. Diluizioni di soluzioni antisettiche (sodio ipoclorito 0,005%, acido acetico 0,0025%) dovrebbero essere usate solo se l'infezione riguarda la superficie della ferita e non è estesa in profondità. Questi agenti antimicrobici possono essere formulati come liquidi (soluzione, sospensione, emulsione) e semisolidi (unguenti, creme). Soluzioni, come iodio-povidone, sono più efficaci negli stadi iniziali della cicatrizzazione per ridurre la carica batterica e prevenire la macerazione del tessuto sano. Il problema delle soluzioni è il poco tempo di residenza al sito della ferita; invece preparazioni semisolide, come crema di sulfadiazina d'argento ed unguento di nitrato d'argento [Liao ZJ. et al., 2006], rimangono sulla ferita per un lungo periodo di tempo e sono usate per trattare infezioni batteriche. Nel caso di ferite con elevate quantità di essudato, le preparazioni semisolide non sono molto efficaci, in quanto possono essere assorbite dall'essudato, perdendo le loro caratteristiche reologiche .

L'uso di antibiotici topici risulta più appropriato in presenza di un'infezione localizzata, in modo da ridurre la carica batterica; non sono invece adatti nel caso in cui l'infezione sia estesa con coinvolgimento dei tessuti sottostanti ed è bene anche non usarli come sostituti del debridement. Certamente gli antimicrobici devono essere usati per un periodo di tempo limitato, per evitare l'insorgenza di resistenza e dovrebbero essere seguiti da un'appropriata medicazione una volta che la carica batterica è stata ridotta a livelli accettabili [Schultz GS. et al., 2003].

o **Antibiotici**

L'infezione delle ulcere è solitamente polimicrobica e quindi gli antibiotici costituiscono un trattamento maggiormente efficace sulle ulcere infette. Gli antimicrobici, utilizzati da soli o in associazione, possiedono un ampio spettro, ossia devono essere efficaci contro gram positivi, gram negativi ed anaerobi.

Nel caso, ad esempio, di ferite deterse che non danno segni di guarigione o che continuano a produrre essudato dopo 2-4 settimane di cura, si può effettuare un trattamento-prova con antibiotici per uso topico e, se il trattamento risulta inefficace, si procede con l'utilizzo di antibiotici sistemici [Rasero L. et al, 2002]. Gli antibiotici sistemici non sono invece necessari in caso di ulcere da pressione che presentano solo segni clinici d'infezione locale.

Gli antibiotici e le soluzioni antibatteriche più utilizzate sono gli antibiotici aminoglicosidici, l'argento sulfadiazina e la mupirocina [Monafo W.W., West M.A., 1990].

o **Vancomicina Cloridrato**

L'antibiotico su cui focalizzeremo l'attenzione, poichè rientrerà in una prima parte del lavoro, è la vancomicina cloridrato, la quale è stata scoperta negli anni cinquanta come primo antibiotico glicopeptidico (Figura 5).

La vancomicina ha un peso molecolare di 144,3 g/mol ed è molto solubile in acqua e in DMSO (dimetilsolfossido). È un antibiotico efficace a basse concentrazioni ed attivo sulla maggioranza dei gram positivi [Reynolds P.E., 1989]. È una delle ultime opzioni disponibili per curare infezioni che non hanno risposto ad altri antibiotici. Infatti negli ultimi anni sono aumentati i casi di infezione dovute allo *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente [Smith T. et al, 1999].

La vancomicina agisce inibendo la sintesi dei peptidoglicani, i quali sono necessari alla costruzione della parete cellulare. Essa lega il dipeptide terminale D-Ala-D-Ala dei precursori della parete batterica ed in questo modo impedisce l'utilizzo dei precursori per la sintesi dei peptidoglicani. Inoltre diminuisce la resistenza meccanica dello strato di peptidoglicani che rende i batteri suscettibili alla lisi cellulare alla minima variazione della pressione osmotica.

L'utilizzo della vancomicina per via topica evita l'insorgenza di effetti collaterali, che si verificherebbero ad alte dosi sistemiche come neurotossicità, ototossicità, neutropenia reversibile e la resistenza dei batteri alla stessa. Infatti il rilascio di antibiotici per via topica, utilizzato nei sistemi di rilascio controllato, permette di mantenere un'elevata concentrazione del farmaco in una determinata zona soggetta ad infezione, senza però avere effetti collaterali a livello sistemico [Reynolds P.E., 1989]. Si evince una vancomicina-resistenza quando i batteri riescono a sostituire il

bersaglio del farmaco da D-Ala-D-Ala a D-Ala-D-Lac. In questo modo la vancomicina perde l'affinità di legame per il suo bersaglio, perdendo anche l'attività biologica [Walsch C.T. et al, 1996].

Il farmaco, però, deve essere rilasciato in situ in quantità superiori alla Minima Concentrazione Inibente (MIC), che per la vancomicina è stata valutata tra 1-2 µg/mL [Soriano A. et al, 2008].

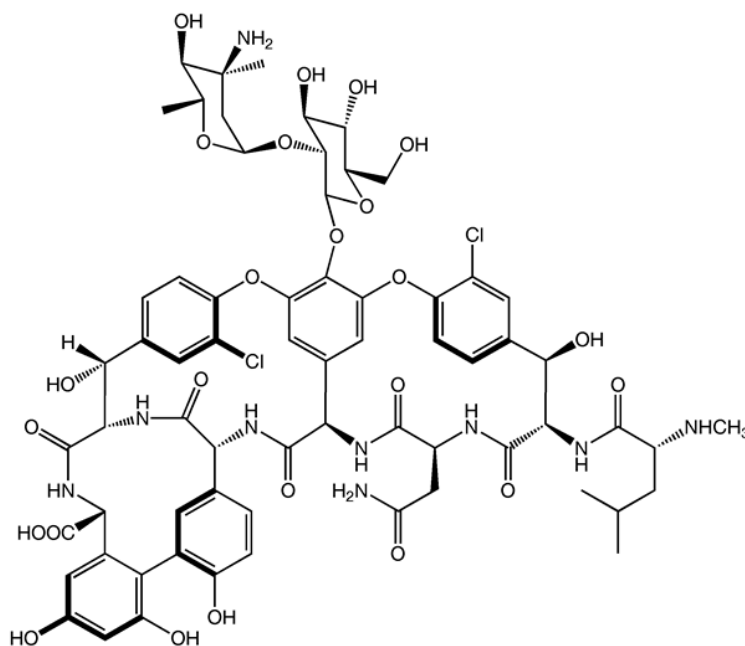


Figura 5: Struttura della Vancomicina cloridrato [Choi G.S. et al, 2009]

La vancomicina è stata caricata in microparticelle di alginato, le quali consentono, secondo test in vitro, un rilascio sostenuto per 14 giorni [Ueng S.W.N. et al, 2007]. Kim et al hanno formulato un sistema di idrossiapatite porosa rivestita con poli-ε-caprolactone ed idrossiapatite ibrida utilizzata nella rigenerazione dei tessuti. La vancomicina è stata caricata all'interno del sistema per promuovere la riparazione tissutale, permettendo un rilascio sostenuto e controllato nel tempo [Kim H.W. et al, 2005]. Chen et al hanno proposto lo sviluppo di un sistema composto da una membrana di nanofibre che prevede un rilascio sostenuto di vancomicina, gentamicina e lidocaina per la riparazione tissutale [Chen D.W.C. et al, 2012]. Nella formulazione della colla di fibrina è stato caricato l'antibiotico che, oltre ad assicurare proprietà emostatiche e sigillanti, previene e cura le infezioni in atto [Katrancioglu N. et al, 2012].

4.3 Controllo dell'essudato

La macerazione o controllo dell'essudato può essere svolto tramite delle apposite medicazioni per le ferite. Tali medicazioni è importante che mantengano un ambiente umido, il quale favorisce il processo di cicatrizzazione [Geronemus RG., Robins P., 1982].

È molto importante la scelta di una medicazione conforme al tipo di lesione, in quanto influenzerà le ultime fasi del processo di guarigione [Kerstein MD., 1997].

Per tale motivo, l'Agency for Health Care Policy and research ha pubblicato le linee guida per la scelta delle medicazioni:

1. Usare una medicazione che mantenga un ambiente umido al sito della ferita
2. Usare una medicazione che mantenga secca la pelle in corrispondenza dell'ulcera, ma nello stesso tempo umido l'interno della ferita
3. Usare una medicazione che controlli l'essudato della ferita senza provocare essiccamento al letto della ferita; infatti un essudato non controllato può provocare macerazione della pelle circostante e può portare ad un ulteriore deterioramento della ferita
4. Se possibile usare medicazioni facili da applicare e che non richiedano frequenti cambiamenti
5. Riempire qualsiasi cavità all'interno della ferita per evitare un aumento dell'infezione; però una copertura troppo eccessiva deve essere evitata per non recare danni al tessuto granuloso appena formato, determinando un ritardo nella guarigione e minore capacità assorbente della medicazione.

5. Medicazioni

Le medicazioni vengono classificate in modi diversi, sulla base della loro funzione nella ferita (debridement, antibatteriche, occlusive, assorbenti, aderenti) [Purna SK., Babu M., 2000]; tipo di materiale all'interno della medicazione (idrocolloidi, alginato, collagene) [Queen D. et al., 2004]; forma fisica della medicazione (unguento, film, schiuma, gel) [Falabella AF., 2006]. Sono ulteriormente classificate in primarie, secondarie e isolate. Le medicazioni primarie sono quelle a contatto con la superficie della ferita, quelle secondarie ricoprono le medicazioni primarie e quelle isolate hanno una regione centrale assorbente che è circondata da una porzione non adesiva. In base ad un altro criterio di classificazione le medicazioni sono classificate in tradizionali, moderne e avanzate, prodotti di sostituzione della pelle, promotori della cicatrizzazione [Boateng JS. et al., 2008].

5.1 Medicazioni tradizionali

Le medicazioni tradizionali includono cotone, bende e garze naturali o sintetiche; queste medicazioni sono secche e non favoriscono un ambiente umido al sito della ferita; possono essere usate come medicazioni primarie, secondarie o far parte di altre medicazioni con specifiche funzioni.

Le garze sono formate da fibre di tessuto e di cotone, poliestere o una combinazione di entrambi; le garze sterili sono usate per ricoprire le ferite aperte ed assorbire così l'essudato, dato che le fibre agiscono come filtro per rilasciare il fluido dalla ferita. Le garze devono essere quotidianamente cambiate per evitare macerazione del tessuto sano sottostante [Harding K. et al., 2000]. Anche se le garze favoriscono una protezione batterica, questa viene meno quando la superficie della medicazione è inumidita dall'essudato della ferita o da fluidi esterni; inoltre non appena diminuisce la produzione di fluido diventano più aderenti alla ferita e perciò sono molto dolorose da rimuovere [Chang KW. et al., 1998]. Le garze permettono una lieve occlusione con una conseguente evaporazione dell'umidità, risultante in una disidratazione del letto della ferita. Le garze contenenti paraffina sono più occlusive e più comode da rimuovere dalla pelle.

E' consigliato usare le medicazioni tradizionali solo per ferite pulite e secche o usarle come medicazioni secondarie per assorbire l'essudato o proteggere la ferita. Queste medicazioni tradizionali, nel caso di ferite croniche e bruciature, sono state sostituite da medicazioni moderne.

5.2 Medicazioni moderne

La peculiarità delle medicazioni moderne è quella di creare e mantenere un ambiente umido attorno alla ferita incrementando il processo di cicatrizzazione. Queste medicazioni sono classificate in base ai materiali dai quali sono prodotti in idrocolloidi, alginati, idrogeli e generalmente sono in forma di gel, sottili film e schiume.

5.2.1 Idrocolloidi

Gli idrocolloidi sono tra le medicazioni ampiamente utilizzate, in quanto aderiscono sia ai siti della ferita umidi sia a quelli secchi. Sono ottenuti da materiali colloidali (agenti formanti gel) combinati con altri materiali, elastomeri e adesivi; gli agenti tipicamente formanti gel includono carbossimetilcellulosa, gelatina e pectina. Gli idrocolloidi sono usati per ferite con essudato lieve o moderato, come piaghe da decubito, piccole bruciature o lesioni traumatiche; vengono anche usati per il trattamento di ulcere alle gambe nel caso in cui la sola compressione non sia efficace [Koksall C., Bozkurt AK., 2003]. Queste medicazioni, prima di essere utilizzate, sono impermeabili al vapore acqueo, ma assorbono l'essudato convertendosi in un gel che ricopre la ferita; nel momento in cui si forma il gel, diventano progressivamente più permeabili all'acqua e all'aria. Non causano dolore al momento della rimozione e sono particolarmente adatte alla cura delle ferite pediatriche sia acute sia croniche [Thomas S., 1992].

Gli idrocolloidi generalmente formano una copertura occlusiva che impedisce scambi di vapore acqueo tra la ferita e la parte circostante; questo può essere uno svantaggio per le ferite infette che richiedono una certa quantità di ossigeno per guarire rapidamente. Studi microscopici hanno confrontato gli idrocolloidi e gli alginati per la loro capacità di intrappolare batteri; è stato dimostrato che, gli idrocolloidi a base di carbossimetilcellulosa intrappolano un elevato numero di batteri all'interno delle fibre per la formazione di gel rispetto agli alginati [Walker M. et al., 2003].

5.2.2 Alginati

Gli alginati sono prodotti dai sali calcio e sodio dell'acido alginico, un polisaccaride contenente acido mannuronico e galatturonico uniti. Possono essere formulati in forma di foglietti porosi liofilizzati (schiume) o fibre flessibili, le quali sono indicate per ricoprire la cavità delle ferite. Il loro uso è legato alla notevole capacità di assorbire l'essudato, con conseguente formazione di gel idrofilo che limita le secrezioni della ferita e minimizza la contaminazione batterica. Gli alginati ricchi in acido mannuronico formano, in seguito ad idratazione, un soffice gel flessibile, invece quelli ricchi in acido guluronico, assorbendo essudato, formano un gel più solido. Quando applicati

alle ferite, gli ioni presenti nelle fibre di alginato sono scambiati con quelli presenti nell'essudato e nel sangue formando in tal modo un film protettivo di gel [Thomas S., 2000]. Questo gel aiuta a mantenere, a livello della lesione, umidità e temperatura ottimali per la cicatrizzazione. La proprietà gelificante dell'alginato è attribuita agli ioni calcio che permettono la formazione di un gel polimerico che degrada lentamente. Uno studio comparativo tra idrocolloidi e alginati ha dimostrato che il gel di alginato permane sulla ferita per un periodo più prolungato [Ichioka S. et al., 1998]. Le medicazioni a base di alginato hanno una funzione farmacologica dovuta all'azione degli ioni calcio, che, nel momento in cui vengono rilasciati, favoriscono il processo di coagulazione [Blair SD. et al., 1988]. Sono adatti ad essere usati con quantità di essudato moderate o alte. Alginati in forma di fibre, quando intrappolati in una ferita, sono biodegradabili e possono essere lavati con soluzione salina [Gilchrist T., Martin AM., 1983]. Data questa proprietà di biodegradazione, gli alginati in forma di fibre vengono usati nelle suture per la chiusura delle ferite chirurgiche; la successiva rimozione non altera il tessuto granuloso, rendendo il cambio di medicazione non doloroso.

Queste medicazioni richiedono umidità, perciò non possono essere usate sulle ferite secche o per ricoprire tessuto necrotico e questo rappresenta uno svantaggio.

5.2.3 Idrogeli

Gli idrogeli sono composti da polimeri sintetici come polimetacrilato e polivinil pirrolidone, sono insolubili ed hanno proprietà di rigonfiamento. Possono essere applicati come gel amorfi, foglietti solidi ed elastici o film. Gli idrogeli contengono rilevanti quantità di acqua (70-90%) e di conseguenza non possono assorbire molto essudato; perciò possono essere utilizzati su ferite con quantità basse o moderate di essudato. Inoltre hanno una bassa forza meccanica e questo crea difficoltà nella manipolazione [Martin L. et al., 2002]. Posseggono la maggior parte delle proprietà desiderabili per una ideale medicazione; infatti sono adatte alle ferite secche, necrotiche o fibrose, in quanto reidratando il tessuto morto promuovono il debridement autolitico, non hanno interazioni con tessuti biologici, sono permeabili ai metaboliti e non sono irritanti [Wichterle O., Lim D., 1960], mantengono un ambiente umido al sito della ferita promuovendo la guarigione, non aderiscono alla superficie della ferita, il che determina una riduzione del dolore e migliore compliance del paziente, non lasciano alcun residuo, sono malleabili e facilitano la riepitellizzazione della ferita.

5.2.4 Film adesivi semipermeabili

Inizialmente erano composti da derivati del nylon, presenti all'interno di una struttura adesiva di polietilene rendendoli occlusivi. Il nylon però limitava la capacità di assorbimento dell'essudato, il quale si accumulava provocando macerazione della pelle e proliferazione batterica; di conseguenza per evitare il rischio di infezione, occorreva cambiare tali film frequentemente e detergere la ferita con soluzione salina. Per far fronte a questi svantaggi sono stati realizzati dei sottili film semipermeabili a base di poliuretano ricoperto da derivati acrilici ipoallergenici; si sono così ottenuti film più porosi, permeabili all'acqua e gas, ma non all'essudato.

I film possono essere trasparenti, conformi ai contorni della ferita per la loro natura elastica e flessibile. Sono troppo sottili per essere posizionati all'interno di ferite profonde o cavità, ma sono più adatti a ferite superficiali [Thomas S., Loveless P., 1988].

5.2.5 Schiume

Queste medicazioni sono formate da una schiuma porosa di poliuretano, la quale può presentare bordi adesivi. Hanno un addizionale strato di contatto sulla ferita per evitare aderenza quando la ferita è secca ed uno strato occlusivo polimerico per prevenire perdita eccessiva di fluido e contaminazione batterica. Mantengono un ambiente umido attorno alla ferita e offrono isolamento termico (Wound care guidelines, 2005). Sono altamente assorbenti e tale proprietà può essere controllata in base allo spessore, dimensione dei pori e consistenza [Thomson T., 2006]. La struttura porosa rende queste medicazioni adatte a ferite profonde o superficiali o a ferite con elevati livelli di essudato data l'elevata capacità assorbente. Sono anche indicate per ferite granulose, in quanto aiutano nel trattamento di una granulazione eccessiva.

5.2.6 Medicazioni bioattive

Sono composte da biomateriali che giocano un ruolo chiave nel processo di cicatrizzazione. Comprendono prodotti tissutali ingegnerizzati, derivati da tessuti naturali o artificiali; in queste medicazioni vengono combinati polimeri come collagene, acido ialuronico [Doillon C.J., Silver F.H., 1986], chitosano [Ishihara M. et al., 2002], alginato ed elastina. Questi biomateriali hanno il vantaggio di formare parte della naturale matrice tissutale, sono biodegradabili e svolgono un ruolo attivo nella formazione di nuovo tessuto [Ueno H. et al., 1999]. In alcuni casi possono essere incorporati con componenti attivi quali, antimicrobici e fattori di crescita, che vengono poi rilasciati al sito della ferita.

Il collagene è un fattore chiave nel processo di coagulazione, in quanto induce il meccanismo di coagulazione e la formazione della cicatrice finale [Purna SK., Babu M., 2000]. Stimola la formazione di fibroblasti ed accelera la migrazione di cellule endoteliali al di sopra del tessuto danneggiato [Mian M. et al., 1992].

L'acido ialuronico è un glicosamminoglicano componente della matrice extracellulare, biocompatibile, biodegradabile e non immunogenico.

5.3 Tecniche avanzate

5.3.1 Sostituti ingegnerizzati della pelle

Le medicazioni tradizionali e moderne non sono in grado di sostituire il tessuto perso, soprattutto quando si tratta del derma, come nel caso di ustioni gravi. Progressi nella progettazione di biomateriali e di colture cellulari sulla pelle hanno portato allo sviluppo di una nuova generazione di sostituti ingegnerizzati della pelle [Horch RE. et al., 2005].

I biopolimeri si comportano come scaffold, una sorta di impalcatura, per i substrati tissutali ingegnerizzati i quali sostituiscono il tessuto perso, agevolando la guarigione della ferita. Questi polimeri, sia di origine naturale sia di origine sintetica, sono in grado di imitare le normali risposte fisiologiche del processo di cicatrizzazione [Supp DM., Boyce ST., 2005]; questo aiuta nella normale rigenerazione cellulare e tissutale.

Le medicazioni tissutali ingegnerizzate sono presenti in forma di matrici e ne distinguiamo due tipi, una acellulare, l'altra contenente cellule. Le matrici acellulari sono prodotte sia da collagene sintetico sia da componenti della matrice extracellulare, come ad esempio l'acido ialuronico [Burke JF. et al., 1981], o da derma nativo con componenti cellulari rimossi, ma mantenendo la propria struttura. Le matrici contenenti cellule comprendono film biodegradabili, formati ad esempio da collagene e glicosamminoglicani. Queste medicazioni formulate come scaffold possiedono proprietà anatomiche e meccaniche ideali per il contatto con il tessuto, solitamente derma, così da permetterne la replicazione [Sefton MV., Woodhouse KA., 1998]. Quando introdotti nel corpo si degradano gradualmente permettendo la formazione di una matrice di tessuto connettivo, il quale va a sostituire il derma del paziente danneggiato o distrutto e stimola le stesse cellule epiteliali del paziente. I fibroblasti umani provenienti dai neonati sono coltivati in questi scaffold; nel momento in cui queste cellule proliferano, producono il collagene del derma, fattori di crescita, proteine della matrice extracellulare, in modo da creare il derma vivente, che è impiantato nella ferita per facilitarne la guarigione.

5.4 Medicazioni medicate per il rilascio di farmaci

Questa nuova generazione di medicazioni usate per il rilascio al sito della ferita di sostanze con valore terapeutico, si basa sull'uso di polimeri, i quali svolgono una funzione di veicolo. Queste medicazioni polimeriche includono idrocolloidi, idrogeli, alginati, film o schiume di poliuretano, gel a base di silicone; altri tipi di medicazioni includono l'uso di biomateriali polimerici quali acido ialuronico, collagene, chitosano, formulati in forma di film e "sponge-like" porose come dischi liofilizzati o scaffold polimerici di tessuti ingegnerizzati.

Il rilascio del farmaco dalla formulazione polimerica comprende: idratazione del polimero, rigonfiamento nella forma di gel, diffusione del farmaco attraverso il gel, eventuale erosione del gel polimerico [Gimeno MJ. et al., 2003]. In particolar modo si è visto che l'idratazione della medicazione polimerica si verifica in seguito al contatto con la superficie umida della ferita, per la presenza dell'essudato che penetra nella matrice polimerica con conseguente rigonfiamento e formazione del gel [Aoyagi S. et al., 2007]. Il rigonfiamento dei polimeri è dovuto alla solvatazione delle catene polimeriche, il che determina un aumento della distanza delle singole catene. In alcune medicazioni il meccanismo di rilascio del farmaco è stato spiegato tramite attività idrolitica di enzimi presenti nell'essudato [DuBose JW. et al., 2005] o tramite batteri, nel caso di ferite infette [Suzuki Y. et al., 1998].

I farmaci incorporati svolgono un ruolo essenziale nel processo di cicatrizzazione sia direttamente sia indirettamente; possono essere coinvolti nella detergenza o disinfezione della ferita, nella rimozione del tessuto necrotico, possono avere attività antimicrobica, possono rilasciare fattori di crescita per ottenere la rigenerazione tissutale.

5.4.1 Fattori di crescita

I fattori di crescita sono coinvolti nella divisione cellulare, migrazione, proliferazione, espressione delle proteine e produzione di enzimi. Nel processo di guarigione di una ferita, i fattori di crescita sono coinvolti nella stimolazione di angiogenesi e proliferazione cellulare, il che coinvolge anche produzione e degradazione della matrice extracellulare e svolgono un importante ruolo nell'attività di cellule infiammatorie e fibroblasti e perciò nella formazione di nuovo tessuto [Komarcevic A., 2000].

Tra i fattori di crescita coinvolti in tali processi ricordiamo:

- Il fattore di crescita dell'epidermide (EGF), che sostiene la crescita dei cheratinociti e favorisce la migrazione di cheratinociti, fibroblasti e cellule endoteliali.

- Il fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF), che è chemotattico per le cellule polimorfonucleate e macrofagi.
- Il fattore di crescita dei fibroblasti (FGF), che stimola la proliferazione di cellule endoteliali e migrazione.
- Il fattore di crescita trasformante ($\text{TGF-}\beta 1$), che stimola la crescita di fibroblasti e cheratinociti e la produzione di matrice extracellulare, in particolar modo collagene.
- Il fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGF) che stimola l'angiogenesi
- Il fattore di crescita insulino simile (IGF-I) che stimola la deposizione ossea.

Le ulcere croniche o non guarite sono caratterizzate da anomalie nella fase di rimodellamento della matrice extracellulare, prolungata infiammazione e fallimento nella riepitelizzazione [Cook H. et al., 2000]. In particolar modo si verifica un'iperproliferazione a livello dei margini della ferita, interferendo con la normale migrazione di cellule al di sopra del letto della ferita, probabilmente a causa dell'inibizione dell'apoptosi a livello di fibroblasti e cheratinociti. Nelle ulcere croniche c'è una carenza di fattori di crescita, a causa di una metabolizzazione ad opera di proteasi di origine batterica o cellulare.

6. Biopolimeri

I “biomateriali” sono polimeri derivanti da fonti naturali come alghe o batteri e sono biocompatibili, ossia affini alla matrice tissutale vivente, evitando così reazioni allergiche più o meno gravi. I biopolimeri hanno un ruolo importante nel processo di riparazione dell’ulcera, nella ricostruzione del nuovo tessuto e possono essere associati anche ad altre sostanze come antimicrobici o fattori di crescita. Una volta a contatto con la ferita, verranno rilasciati e svolgeranno la loro azione nel processo ripartivo [Boateng J. et al, 2008].

Negli ultimi decenni, hanno acquisito sempre più importanza i polimeri di origine naturale che, in virtù delle loro proprietà, mostratesi positive nelle più svariate applicazioni, sono stati sfruttati come materiali di partenza in diversi settori, ad esempio nelle industrie alimentare e tessile, in campo medico e farmaceutico.

Il successo di questi composti in ambito biomedico è presto spiegato: sono biomateriali, biodegradabili e biocompatibili, in grado di agire, all’interno degli organismi viventi, in sinergia con i componenti tissutali, senza scatenare risposte immunitarie. Tali caratteristiche rendono possibile il contatto diretto tra i biopolimeri e i tessuti del corpo, nel caso in cui, ad esempio, si debba provvedere al trattamento di una lesione cutanea. Nel corso degli anni, si è passati dall’utilizzo di medicazioni “inerti”, utili esclusivamente nel prevenire l’infezione della ferita, previamente pulita con apposite soluzioni saline disinfettanti, a dressings con proprietà bioattive, capaci di promuovere il processo di wound healing.

I polisaccaridi, componenti naturali di tutte le strutture viventi, sono ottimali nella produzione di dressings e scaffolds, in quanto dalla loro degradazione nel sito della ferita non derivano prodotti tossici, immunogenici e carcinogenici.

La chitina e il suo derivato deacetilato, il chitosano, sono stati individuati come adatti bio-supporti nella riparazione e rigenerazione tissutale, sia per la loro struttura che per le proprietà antimicrobiche e funzionali al processo di wound healing [Francesko A. and Tzanov T., 2011].

6.1 Alginato

In campo farmaceutico l’alginato utilizzato è prodotto dall’alga bruna, la quale viene raccolta, essiccata, sottoposta a processi chimici per eliminare le impurità in essa contenute e trasformata in polvere sottoforma di sale (sodio alginato) [Goh C.H. et al, 2012].

La struttura chimica dell’alginato è composta da acido α -L-glucuronico e da acido β -D-mannuronico legati linearmente da un legame 1-4. Le unità zuccherine sono distribuite in blocchi

oppure sono alternate tra loro e la loro distribuzione dipende dal tipo di fonte da cui deriva il materiale (Figura 6). L'alginato prodotto dall'alga bruna ha un contenuto di residui di acido glutammico che può variare dal 20 all'80% in base alla specie di alga da cui proviene. Il peso molecolare del sodio alginato varia tra 32,000 e 400,000 g/mol [Lee K.Y., Mooney D.J., 2012] e la solubilità dipende dalla composizione chimica dell'alginato: se l'alginato è ricco di acido glucuronico sarà maggiormente solubile in acqua rispetto a quello ricco in acido mannuronico. Invece la viscosità dell'alginato dipende dalla sua concentrazione, dal peso molecolare e dalla lunghezza e numero di unità di monomeri nei segmenti di alginato: la viscosità sarà maggiore se la lunghezza dei segmenti sarà più lunga [Goh C.H. et al, 2012].

La presenza nell'acqua di ioni di- e trivalenti dà il via alla formazione di un gel con struttura ordinata e questa proprietà è alla base delle applicazioni biologiche ed industriali dell'alginato.

In campo farmaceutico l'alginato viene utilizzato nei processi riparativi delle ulcere perché l'alginato ha elevate proprietà assorbenti e può raggiungere fino a venti volte il suo peso [Fonder M. et al, 2008]. Questa caratteristica dipende dalla sua composizione: se il contenuto di acido mannuronico è elevato, la medicazione avrà un maggiore potere assorbente [Goh C.H. et al, 2012].

L'alginato interviene nei processi di assorbimento dell'essudato in modo da creare un microambiente dell'ulcera ottimale per promuovere una corretta epitelizzazione.

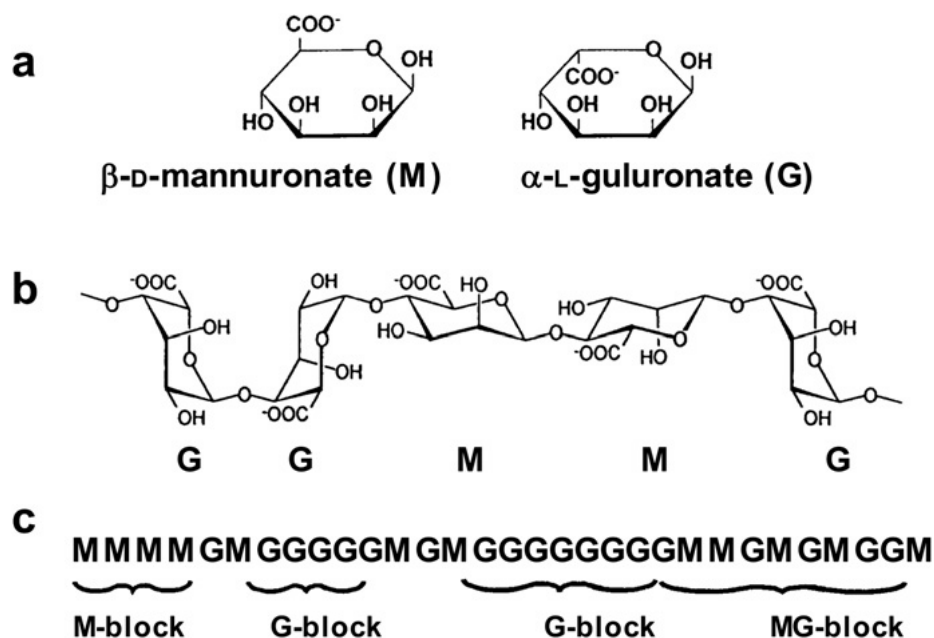


Figura 6: Struttura chimica dell'alginato: a. rappresentazione della struttura chimica dei monomeri acido mannuronico (M) e glucuronico (G); b. conformazione della catena; c. distribuzione dei blocchi [Draget K.I. et al, 2011]

L'alginato svolge la sua azione attraverso uno scambio di ioni sodio-calcio tra l'essudato della ferita e la medicazione stessa. Questo scambio provoca la produzione di un gel di alginato di sodio che è in grado di trattenere elevate quantità di acqua. Per queste caratteristiche le medicazioni a base di alginato sono adatte ad ulcere con elevata produzione di essudato [Fonder M. et al, 2008].

L'alginato possiede anche buone proprietà emostatiche [Goh C.H. et al, 2012]. Groves e Lawrence hanno dimostrato l'efficacia dell'alginato nel trattamento delle ulcere sanguinanti: se si applica calcio alginato sulla ferita e si lascia agire per 5 minuti si evince la sua attività emostatica [Groves A.R., Lawrence J.C., 1986].

L'alginato è biocompatibile e quindi non provoca reazioni sistemiche in seguito alla somministrazione ed è biodegradabile. Infatti, a contatto con i fluidi corporei, si scinde in residui monosaccaridici che vengono completamente assorbiti e la conversione a sale sodico facilita la rimozione dei residui rimasti a contatto con la ferita.

Le medicazioni a base di alginato non sono adesive ed hanno bisogno di un rivestimento secondario per l'adesione alla cute, la medicazione va cambiata quando è satura di essudato e questo avviene generalmente dopo sette giorni dall'applicazione [Lee K.Y., Mooney D.J., 2012].

L'alginato è un polimero che si adatta a diverse formulazioni:

Beads: sono microparticelle che vengono formulate sciogliendo l'alginato in acqua bidistillata ed unendolo al farmaco prescelto. A questo punto la soluzione viene estrusa da uno strumento automatico oppure viene gocciolata con l'utilizzo di una siringa. In questo modo si ha la formazione dei beads contenenti il farmaco. Un esempio è il lavoro di Gu F. et al, che propone la formulazione di beads di alginato per veicolare il VEGF (vascular endothelial growth factor) allo scopo di applicarli nel wound healing o nell'ingegneria dei tessuti vascolari [Gu F. et al, 2004].

Microcapsule: Blandino A. et al hanno formulato delle microcapsule di alginato contenenti glucosio ossidasi. Una soluzione contenente glucosio ossidasi viene fatta gocciolare attraverso uno strumento automatico in una soluzione di alginato. Appena la goccia tocca la superficie si forma una membrana attorno ad essa, dovuta al cross-linking causato dagli ioni calcio dell'alginato. In questo modo si avrà la formazione delle capsule ed il rilascio controllato di glucosio ossidasi [Blandino A. et al, 2001].

Sistemi "sponge-like": nell'articolo di Bilginya R. et al viene descritto il processo di formulazione di una spugna. Dal crosslinking tra gli ioni calcio, sodio carbossimetilcellulosa e sodio alginato si

forma un gel, il quale viene liofilizzato generando la spugna, che può contenere nanoparticelle, come descritto nell'articolo, [Bilgainya R. et al, 2010] oppure microcapsule.

6.2 Acido Ialuronico

L'acido Ialuronico è un comune componente della matrice extracellulare sintetizzata dai fibroblasti ed è un polisaccaride naturale lineare composto dall'alternanza di (1-4) β -D-glucuronato e (1-3) β -N-acetil-D-glucosammina (Figura 7) [Kogan G., 2007]. L'acido ialuronico è quindi una macromolecola derivante dalla ripetizione di circa 30.000 volte delle unità base [Price R.D., 2007] ed appartiene alla classe dei glucosaminoglicani (GAGs), ma è l'unico della classe a non essere legato ad una proteina interna ed ad avere una struttura semplice [Kogan G., 2007].

L'acido ialuronico possiede un alto peso molecolare, è solubile rapidamente in acqua producendo un gel che possiede proprietà lubrificanti, viscoelastiche, reologiche, igroscopiche, ma anche emostatiche che lo rendono utilizzabile per diverse applicazioni mediche [Price R.D., 2007].

Le fonti principali da cui si ricava l'acido ialuronico sono le capsule dei batteri, generalmente dagli Streptococchi, e la matrice connettivale extracellulare, ma esistono anche fonti secondarie come funghi, piante e insetti [Kogan G., 2007].

L'acido ialuronico è implicato in diversi meccanismi della riparazione delle ulcere, infatti il biopolimero ha elevate proprietà igroscopiche quando si trova nella forma polianionica e questo andrà a beneficio della modulazione dell'idratazione del tessuto e del bilancio osmotico. Inoltre ha la capacità di interagire con i recettori superficiali cellulari modulando la proliferazione, migrazione e differenziazione delle cellule.

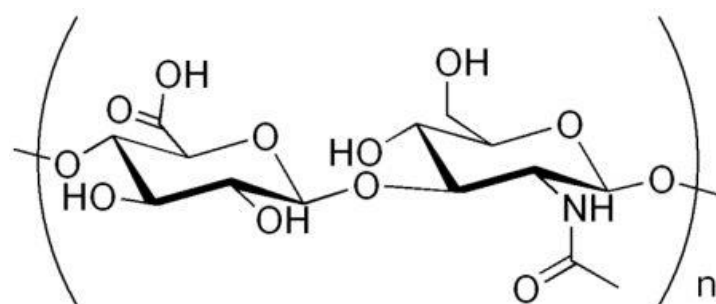


Figura 7: Struttura del disaccaride base dell'acido ialuronico, il quale sarà ripetuto n volte per costituire il polimero ad alto peso molecolare [Rweia S.P. et al, 2008]

L'acido ialuronico, durante la fase infiammatoria, promuove l'infiltrazione delle cellule come neutrofili e macrofagi, produce citochine proinfiammatorie e stimola la migrazione delle cellule. Interviene anche nella moderazione dell'infiammazione con le sue proprietà antiossidanti ed intervento sui radicali liberi. L'acido ialuronico interviene sul tessuto di granulazione, poichè promuove la migrazione e proliferazione dei fibroblasti, la sintesi di collagene, la proliferazione delle cellule endoteliali e l'angiogenesi.

Il biopolimero svolge la sua azione sulla riepitelizzazione e sulla contrazione dell'ulcera, riducendo la quantità di collagene depositato e quindi la cicatrice [Chen W.Y.J. et al, 1999].

L'acido ialuronico viene utilizzato inoltre per il rilascio di farmaci in diversi tipi di formulazioni [Kogan G. et al, 2007]. Sono state formulate delle microsfeere di acido ialuronico contenenti farmaci modello come metronidazolo e prednisolone per ottimizzare il rilascio dei farmaci [Esposito E. et al, 2005]. Il biopolimero è stato studiato anche per il rilascio di fattori di crescita, come la vitronectina, essendo nota la funzione reservoir dell'acido ialuronico per i fattori di crescita [Xie Y. et al, 2011].

6.3 Chitina e Chitosano

La chitina è un omopolimero costituito da residui $\beta(1-4)$ N-acetil-D-glucosammina, presente nell'esoscheletro e nelle cuticole di molti invertebrati, oltre che nella parete cellulare di alghe verdi, lieviti e funghi. Si tratta di un composto organico ottenuto mediante un processo biosintetico. In natura, è il secondo più abbondante polisaccaride dopo la cellulosa, dalla cui struttura differisce per la sola sostituzione dei resti idrossilici in C-2 con gruppi acetamidici (Figura 8); la chitina si scioglie in soluzioni acide concentrate, mentre risulta insolubile in acqua, in acidi/basi diluiti e in solventi organici.

A seconda della fonte polisaccaridica e delle condizioni di isolamento, può presentarsi in forma di macromolecole con diverso grado di acetilazione e peso molecolare [Francesko A. and Tzanov T., 2011; Sinha V.R. et al., 2004].

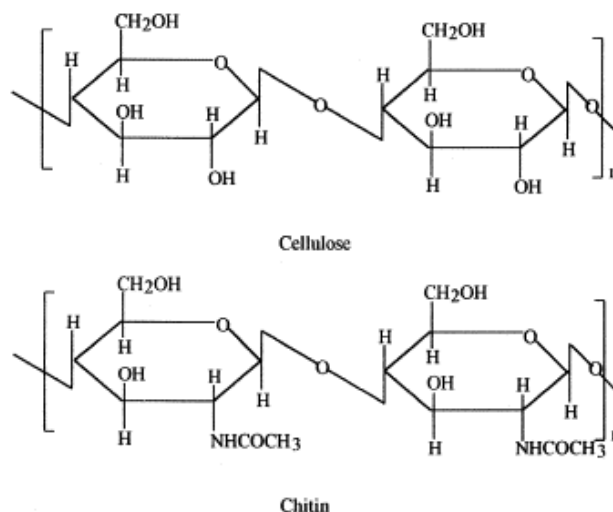


Figura 8- Struttura della cellulosa e della chitina [Ravi Kumar and Majeti N.V,2000].

Il chitosano è un biopoliaminosaccaride lineare, ottenuto dalla deacetilazione della chitina mediante soluzioni alcaline concentrate ad elevate temperature. Le unità monomeriche che costituiscono la sua struttura si caratterizzano per la presenza di un gruppo amminico primario e due resti idrossilici liberi (Figura 9).

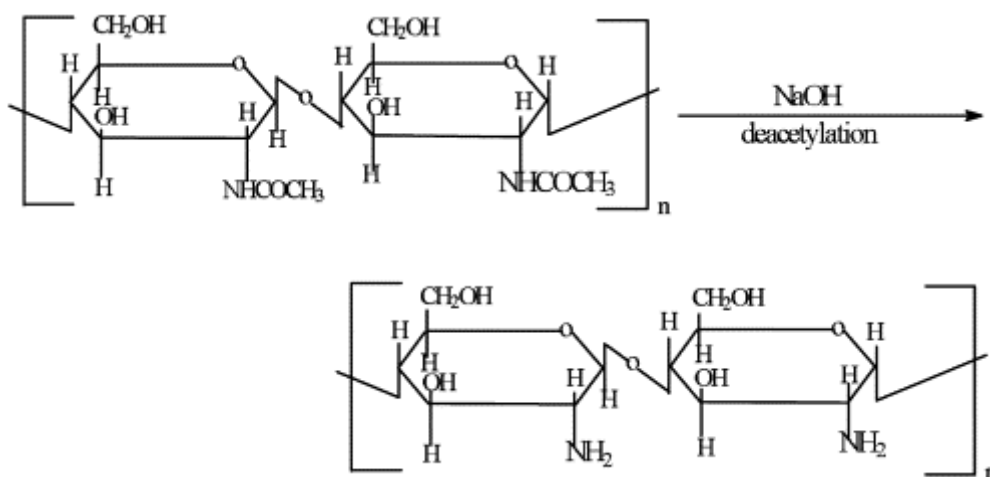


Figura 9- Struttura del chitosano [Ravi Kumar and Majeti N.V., 2000].

Il chitosano ha una carica positiva intrinseca ed è una base debole. Il carattere cristallino e la formazione di saldi legami idrogeno tra le macromolecole di chitosano, compromettono la sua

solubilizzazione in comuni solventi organici e lo rendono completamente insolubile in soluzioni acquose a $\text{pH} > 7$. Si presenta, al contrario, disciolto in soluzioni acquose a carattere acido ($\text{pH} < 6,5$), che permettono la conversione dell'unità glucosamminica nella forma R-NH_3^+ . Il chitosano precipita in ambiente alcalino o in presenza di polianioni e gelifica a bassi valori di pH .

Le proprietà farmacologiche delle formulazioni a base di chitosano sono strettamente correlate alle sue caratteristiche fisiche, quali particle size, densità, viscosità, PM e grado di deacetilazione.

Sul mercato il chitosano può presentarsi in forma di fiocchi, soluzione o polvere fine e, in qualità di biopolimero, può essere utilizzato per la realizzazione di diversi tipi di wound dressings, ad esempio sponges, films, scaffolds e hydrogels [Francesco A. and Tzanov T., 2011; Sinha V.R. et al., 2004].

6.3.1 Chitina e chitosano come agenti di wound healing

Recentemente, la ricerca medica e farmaceutica ha considerato la possibilità di sfruttare il chitosano, non solo per la sua biocompatibilità, biodegradabilità e bassa tossicità, ma anche per le caratteristiche antimicrobiche ed emostatiche, che gli consentono di partecipare attivamente al processo di wound healing.

Esso favorisce la rigenerazione dello strato dermico, stimolando la formazione del tessuto di granulazione, agisce come chemoattrattore per i neutrofili, possiede un effetto stimolante sui macrofagi ed inibisce le metalloproteasi [Muzzarelli R.A.A., 2009]. Gli oligomeri, prodotti dalla degradazione enzimatica della chitina e del chitosano nel letto della ferita, prendono parte alla sintesi dell'acido ialuronico, il quale, a sua volta, promuove la mobilità cellulare, l'adesione e la proliferazione, giocando, quindi, un ruolo importante nella riparazione tissutale.

Il chitosano dispone, inoltre, di proprietà antibatteriche ed antifungine tali da renderlo un potenziale conservante alimentare di origine naturale. La sua attività antimicrobica è funzionale anche al processo di wound healing, dal momento che previene eventuali infezioni che potrebbero ritardare la guarigione della ferita.

7. Emoderivati nel wound healing

La guarigione tissutale è un processo mediato da una serie di eventi intra ed extracellulari, regolati dalla presenza di proteine segnale. Anche se, ancor oggi, non tutti i meccanismi alla base di questo fenomeno sono stati spiegati da evidenze scientifiche, è chiaro che le piastrine giocano un ruolo importante.

L'attivazione delle piastrine in risposta al danno tissutale e all'esposizione vascolare si traduce nella formazione di un tappo piastrinico, quindi di un coagulo di sangue, che determina l'avvio della fase emostatica del processo di wound healing e il rilascio di sostanze proteiche biologicamente attive. A loro volta, queste proteine promuovono e coordinano diversi meccanismi necessari perché il danno tissutale venga ripristinato, quali la chemiotassi, la proliferazione e la differenziazione cellulare, la rimozione dei residui tissutali, l'angiogenesi, la deposizione della matrice extracellulare ed, infine, la ri-epitelializzazione e il rimodellamento.

In vitro è stata evidenziata una relazione dose-risposta tra la concentrazione piastrinica e la proliferazione di cellule staminali mesenchimali in un individuo adulto, la crescita di fibroblasti e la produzione di collagene di tipo I. Questo suggerisce, insieme ai risultati ottenuti in vivo su modelli animali, che l'applicazione di plasma ricco in piastrine autologo può favorire il processo di wound healing [Eppley B.L. et al., 2006].

7.1 Piastrine: struttura e fisiologia

Le piastrine sono componenti cellulari anucleate derivate dai megacariociti mediante un processo controllato di frammentazione, a livello del midollo osseo. Si tratta di cellule specializzate che, una volta attivate, secernono un vasto insieme di molecole proteiche, pre-sintetizzate nei globuli bianchi precursori e immagazzinate nei loro granuli intracellulari. Tra le sostanze rilasciate si annoverano: fattori di crescita (GF, growth factor), proteine coinvolte nella cascata coagulativa, molecole di adesione e di attivazione cellulare, citochine, integrine, proteine di membrana ed, infine, molecole coinvolte nei processi infiammatori. Morfologicamente, nelle piastrine esistono tre diversi tipi di granuli: gli α -granuli, i più importanti in termini di contenuto, i granuli densi e i granuli lisosomiali. Date le numerose funzioni, le piastrine presentano in superficie una serie di recettori che ne determinano la reattività, ovvero che consentono loro il contatto con altre piastrine o molecole presenti nell'ambiente circostante. La vita media delle piastrine varia tra i 7 e i 9 giorni. Durante il loro percorso nel sangue, possono aderire a strati epiteliali esposti o essere attivate da composti agonisti; ciò determina una riorganizzazione del citoscheletro, quindi un cambiamento conformazionale e il rilascio delle sostanze contenute nei granuli, tra cui, anche, ADP, fibrinogeno e

serotonina. A questi eventi segue il fenomeno di aggregazione piastrinica [Rožman P. and Bolta Z, 2007].

7.2 Ruolo delle piastrine nel wound-healing

Numerose sono le proteine, contenute negli α -granuli, che influenzano fortemente il processo di wound healing. Dal momento che molteplici sono i segnali richiesti per completare il fenomeno di rigenerazione tissutale, un ruolo molto importante è rivestito dai fattori di crescita, ciascuno con un ruolo preciso nel processo di guarigione. Questa è la ragione per cui un singolo fattore di crescita purificato non è efficace tanto quanto il pool di GFs direttamente derivati dalle piastrine

- Fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF, platelet-derived growth factor), incluse le isoforme A e B; rappresenta un potente mitogeno per i fibroblasti, le cellule muscolari lisce delle arterie, i condrociti, le cellule epiteliali ed endoteliali. Il PDGF favorisce una chemiotassi secondo gradiente per le cellule mesenchimali ed emopoietiche, per i fibroblasti e le cellule muscolari; attiva, inoltre, il TGF- β , stimola i neutrofili e i macrofagi, oltre a promuovere la sintesi di collagene, l'attività delle collagenasi e l'angiogenesi.
- Fattore di crescita trasformante β (TGF- β , transforming growth factor beta), incluse le isoforme $\beta 1$ e $\beta 2$; stimola la chemiotassi e la proliferazione dei fibroblasti, oltre alla sintesi di collagene, riduce la cicatrizzazione del derma, antagonizza l'attività biologica di EGF, PDGF, aFGF e bFGF, inibendo la crescita di fibroblasti, cellule epiteliali ed endoteliali, cheratinociti, cellule neuronali ed emopoietiche.
- Fattore piastrinico 4 (PF4, platelet factor 4).
- Interleuchina 1β (IL- 1β); Inibisce la crescita di cellule endoteliali ed epatociti, promuove la risposta infiammatoria e l'attività delle collagenasi, attiva gli osteoclasti e, ad alte concentrazioni, inibisce lo sviluppo di nuovo tessuto osseo.
- Fattore angiogenico derivato dalle piastrine (PDAF, platelet-derived angiogenesis factor).
- Fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF, vascular endothelial growth factor). Stimola la crescita di cellule endoteliali micro vascolari, induce il processo di neovascolarizzazione, in quanto potente proteina angiogenica ed, infine, favorisce la sintesi di metalloproteasi che, a livello interstiziale, degradano il collagene di tipo I, II e III.

- Fattore di crescita epidermico (EGF, epidermal growth factor). Stimola la proliferazione di cellule epidermiche ed epiteliali, fibroblasti e cellule embrionali, è un potente chemoattrattore per i fibroblasti e le cellule epiteliali, promuove la ri-epitelializzazione, aumenta l'angiogenesi, oltre a influire sulla sintesi e il turn-over della matrice extracellulare.
- Fattore di crescita endoteliale derivato dalle piastrine (PDEGF, platelet-derived endothelial growth factor).
- Fattore di crescita epiteliale (ECGF, epithelial cell growth factor).
- Fattore di crescita insulino-simile (IGF, insulin-like growth factor); si presenta come fattore di crescita per i fibroblasti normali e come mitogeno, in vitro, per diversi tipi di cellule mesodermiche. Promuove la sintesi di collagenasi e della prostaglandina E2 nei fibroblasti.
- Fattore di necrosi tumorale α (TNF- α , tumor necrosis factor alpha); promuove l'angiogenesi e stimola la crescita dei fibroblasti.
- Interleuchina 8 (IL-8); sostiene l'angiogenesi e svolge un'attività mitogenica verso le cellule epidermiche.

È evidente, come, durante il processo di wound healing, i fattori di crescita derivati dalle piastrine si comportino da messaggeri in grado di controllare e regolare in modo armonico una serie complessa di eventi basata su interazioni cellula-cellula e cellula-matrice[Rožman P. and Bolta Z, 2007].

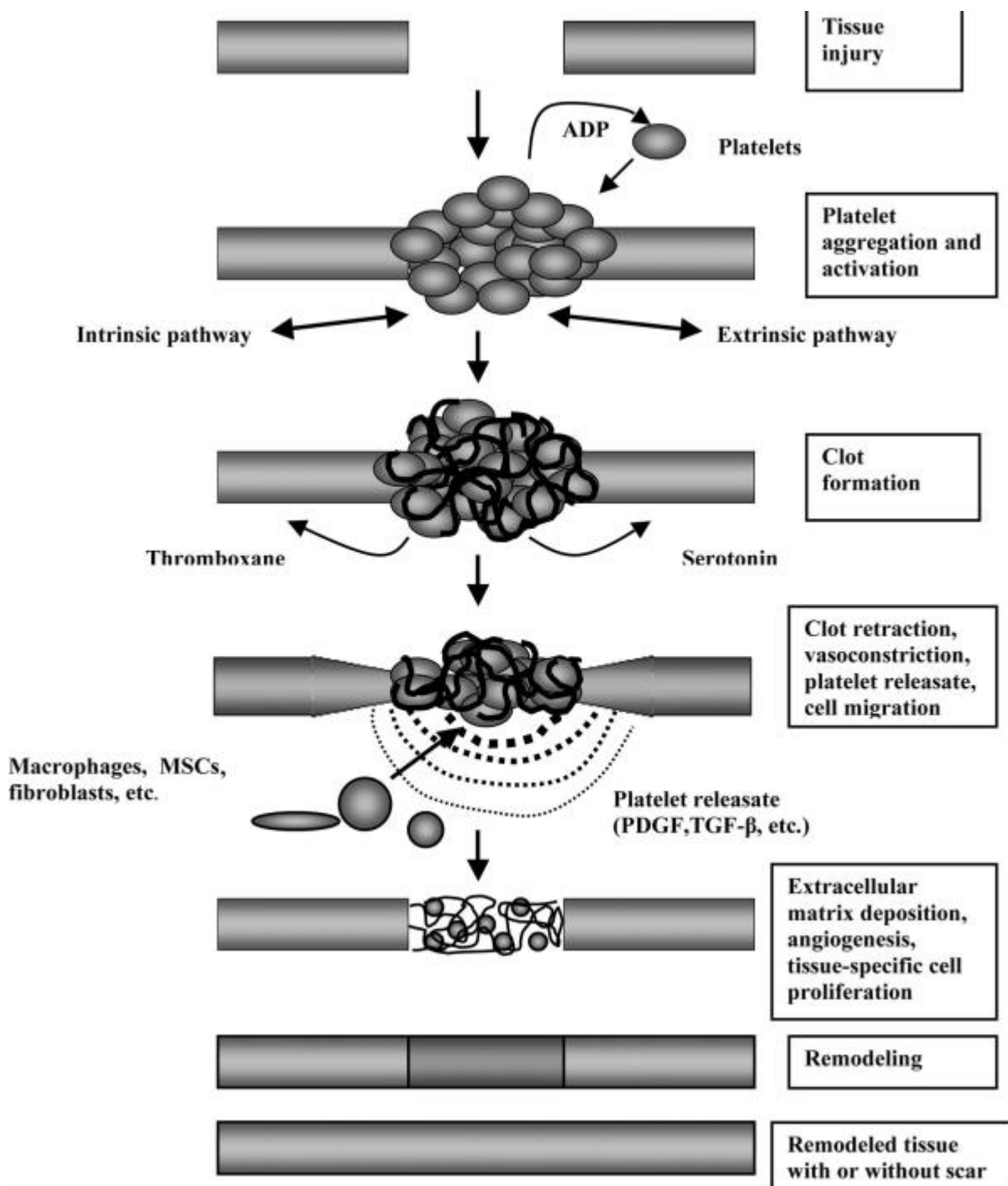


Figura 10- Diagramma schematico del ruolo delle piastrine nel wound healing.
[Eppley B.L. et al., 2006]

7.3 Ruolo degli emoderivati in campo medico-chirurgico

Data la possibilità di sfruttare cellule ematiche e/o fattori di derivazione plasmatica per ottenere buoni effetti terapeutici in varie patologie, sempre più diffuso risulta l'utilizzo di emocomponenti

per fini non trasfusionali. Queste sostanze sono state, perciò, oggetto di numerosi studi in campo medico-chirurgico che hanno evidenziato, talvolta, risvolti terapeutici ottimali, mentre, per certe applicazioni, la riduzione di effetti collaterali fastidiosi.

Da qualche decennio, è ampiamente diffuso in tutto il mondo l'utilizzo dei fattori di crescita di origine piastrinica per accelerare la rigenerazione e la riparazione dei tessuti danneggiati. Concentrando le piastrine o il lisato leucopiastrinico in sede di lesione, si ottiene la liberazione in loco di una grande quantità di fattori di crescita e di altri mediatori chimici. Questi composti sono normalmente presenti nell'organismo, ma trovandosi concentrati in quantità considerevoli, hanno modo di vedere amplificata la loro azione, con conseguente accelerazione del processo di guarigione del danno tissutale [D'agostino E. et al., 2002; Vecchio S. et al., 2006].

Tra gli emoderivati hanno mostrato una certa efficacia nel processo di wound healing, nella riparazione di lesioni ortopediche e periodontali e nel trattamento oculare il **plasma ricco in piastrine (PRP)**, il **gel piastrinico (GP)** e il **lisato piastrinico (LP)**.

Il plasma ricco in piastrine consiste in un limitato volume di plasma, caratterizzato da un'alta concentrazione piastrinica; esso può essere definito "autologo", se ottenuto dal paziente medesimo o "allogenico" se ricevuto da un donatore sano. Il PRP, preparato a partire dal sangue per centrifugazione o mediante procedure di aferesi, viene sfruttato tradizionalmente come ricca fonte di fattori di crescita e fibrina.

Le piastrine concentrate nel PRP possono essere attivate dall'aggiunta di trombina o di calcio in eccesso; quest'operazione non porta solo all'attivazione piastrinica, ma anche all'innescare della cascata coagulativa che si traduce, infine, nella formazione di una sostanza gelatinosa, il gel piastrinico. Tale emoderivato risulta costituito da una rete tridimensionale e biocompatibile di fibrina, nella quale le piastrine, intrappolate e attivate, continuano a rilasciare sostanze bioattive che lentamente diffondono nell'ambiente circostante.

Il termine lisato piastrinico indica, invece, una soluzione di sostanze bioattive ottenuta dalla distruzione delle piastrine mediante ripetuti cicli di congelamento-scongelo, a partire da un campione di PRP in presenza di un agente anticoagulante [Sandri G. et al., 2011].

Recenti lavori hanno, pertanto, voluto testare il ruolo delle piastrine e dei loro derivati nei processi di rigenerazione tissutale, valutandone l'efficacia mediante studi in vitro e in vivo, sia sugli animali che sull'uomo. I risultati ottenuti in vivo spesso si presentano contraddistinti da evidenze disomogenee se confrontate con quelle ottenute mediante test in vitro. Tali discrepanze possono essere spiegate non solo considerando le differenze nei protocolli di lavoro, ma anche la notevole

complessità dei meccanismi di guarigione a livello dei tessuti vitali piuttosto che sull'ambiente cellulare circoscritto ricreato in vitro [Rožman P. and Bolta Z, 2007].

7.3.1 Plasma ricco in piastrine (PRP): studi in vitro e in vivo

Recenti lavori hanno voluto focalizzare la loro attenzione sull'utilizzo di PRP come agente promotore della guarigione di lesioni cutanee e corneali.

La proliferazione dei fibroblasti dermici è un passaggio essenziale nel processo di wound healing, così come la contrazione della ferita, che avviene successivamente alla formazione del tessuto di granulazione e che porta ad una riduzione delle dimensioni del danno, fino alla completa chiusura. Durante le prime fasi di guarigione, i fibroblasti dermici proliferano dai margini della ferita e migrano attraverso il tappo di fibrina. Dopo circa una settimana la matrice provvisoria viene sostituita da nuovo connettivo, ossia dal tessuto di granulazione, costituito da piccoli vasi, da componenti della ECM e da miofibroblasti, ovvero fibroblasti in forma attivata. Ciò che contraddistingue i miofibroblasti è un apparato contrattile simile a quello del muscolo liscio e, in particolare, l'espressione della α -SMA (alpha smooth muscle actin), un'isoforma dell'actina, tipica delle cellule della muscolatura liscia vasale. Ne deriva che i miofibroblasti, in virtù della loro forza contrattile, giocano un ruolo centrale nel fenomeno di chiusura del danno tissutale [Hinz B. et al., 2001].

Kushida, Kakudo et al. hanno confrontato in vitro l'effetto del plasma ricco in piastrine e del plasma povero in piastrine sulla contrazione della ferita e sulla proliferazione e differenziazione dei fibroblasti cutanei in miofibroblasti.

I livelli di α -SMA, presenti nei miofibroblasti e responsabili della contrazione della ferita, sono stati quantificati per mettere in evidenza il potere contrattile dei fibroblasti nel processo di wound healing.

Gli autori hanno sfruttato un modello in vitro, ossia un gel di collagene galleggiante all'interno del quale erano stati incorporati dei fibroblasti, di cui è poi stata valutata la riduzione dimensionale.

Gli autori hanno affermato che il PRP è in grado di promuovere la proliferazione dei fibroblasti del derma umano, favorendo l'espressione di α -SMA, come marker per i miofibroblasti. È stato dimostrato, quindi, che il PRP determina una più marcata contrazione a livello del modello di gel di collagene rispetto al plasma povero in piastrine. Questi risultati suggeriscono che il PRP promuove la proliferazione e la differenziazione dei fibroblasti in miofibroblasti e accelera la contrazione della ferita, oltre a presentarsi come potenziale agente terapeutico nel processo di guarigione delle lesioni cutanee [Kushida S. et al., 2012].

Nakajima, Kawase et al. hanno sviluppato un prodotto innovativo, Polyglactin 910, costituito da PRP liofilizzato, presente in forma adsorbita su una matrice polimerica biodegradabile. Tale sistema risponde alla necessità di avere campioni di PRP autologo caratterizzati da un'immediata disponibilità. Esso si basa su una maglia di PRP a filamenti polimerici, preparata liofilizzando una rete polimerica rivestita con del PRP umano fresco: questo metodo di preparazione sembra consentire un'incorporazione ottimale delle piastrine, nonché la conservazione di alti livelli di fattori di crescita.

Un danno tissutale profondo in un topo diabetico dimostra che l'applicazione della maglia di PRP, benché preparata con sangue umano, promuove sostanzialmente l'angiogenesi, la formazione del tessuto di granulazione e la ri-epitelializzazione, senza indurre alcuna importante reazione infiammatoria in vivo.

Quanto all'effetto del PRP sulle lesioni corneali, Kim, Shin et al. hanno valutato l'utilizzo di colliri a base di PRP nel trattamento di persistenti difetti epiteliali (PEDs). PRP e siero autologhi (AS) sono stati preparati a partire da un campione di sangue completo. Le concentrazioni di TGF- β 1 e TGF- β 2, EGF, vitamina A e fibronectina nel PRP e nel siero autologo (AS) sono stati analizzati e comparati, al fine di valutare l'efficacia del PRP nella guarigione dell'epitelio corneale in pazienti con persistenti difetti epiteliali, indotti da processi infiammatori post-infettivi.

Le successive analisi non hanno riportato importanti differenze tra PRP e AS, eccezion fatta per le concentrazioni di EGF, significativamente maggiori nel primo. Durante gli studi in vivo, il siero autologo è stato applicato negli occhi di 17 pazienti, mentre i restanti 11 sono stati trattati con PRP. La velocità di guarigione dell'epitelio corneale negli occhi dei pazienti trattati con PRP è risultata significativamente più alta rispetto a quella ottenuta in seguito ad applicazione di AS.

Il PRP sembra, dunque, rappresentare un'efficace ed innovativa soluzione al trattamento delle malattie croniche che colpiscono la superficie oculare (PEDs), grazie alle alte concentrazioni di fattori di crescita, ma soprattutto agli elevati livelli di EGF che lo contraddistinguono.

Con questo studio non è però stato possibile determinare le quantità di piastrine e fattori di crescita realmente efficaci a livello del danno oculare superficiale. Questo rappresenta un aspetto negativo dal momento che l'impiego di livelli eccessivi di fattori di crescita nel trattamento delle malattie oculari, può, talvolta, indurre degli effetti dannosi: in particolare, è dimostrato che concentrazioni elevate di EGF siano in grado di promuovere la neovascolarizzazione oculare.

In questo studio di Kim, Shin et al. non è stata sottolineata alcuna evidenza di neovascolarizzazione corneale negli occhi trattati con PRP: questo dato suggerisce che la concentrazione media utilizzata non è sufficiente a dare un effetto angiogenico.

Nonostante queste limitazioni, lo studio ha provato che gli effetti clinici dati dall'applicazione di PRP nel trattamento di PEDs sono comparabili a quelli indotti dall'utilizzo di AS [Kim K.M. et al., 2012].

Khaksar, Aldawood et al. hanno, invece, esaminato l'effetto del plasma sub congiuntivale ricco in piastrine (sPRP), combinato all'impiego topico di acetilcisteina, a livello di ulcere corneali, indotte da bruciature alcaline, nei conigli. Gli esperimenti in vivo sono stati condotti utilizzando sPRP autologo, in quanto ottenuto dal plasma dei conigli testati.

Le ferite alcaline sono state inflitte agli animali presi a modello nella porzione centrale della cornea di un solo occhio, applicandovi un foglio di carta arrotolato, con diametro di 6.0mm, imbevuto di NaOH 1M per 60s.

Un numero totale di 20 conigli è stato diviso in quattro gruppi da 5 animali ciascuno. Il primo gruppo rappresenta il controllo. Il secondo è soggetto all'applicazione topica di N-acetilcisteina (NAC) al 3% tre volte al giorno per due settimane. Il terzo gruppo riceve solo plasma sub-congiuntivale ricco in piastrine (sPRP), mentre al quarto gruppo viene somministrato sPRP con NAC al 3% per via topica tre volte al giorno per due settimane [Khaksar E. et al., 2013].

I risultati clinici sono stati considerati valutando i difetti epiteliali, l'opacità corneale, la durata del blefarospasmo, la vascolarizzazione corneale, la durata dello scarico oculare e la misura del diametro dell'area danneggiata. Dopo tre settimane gli occhi dei conigli sono stati asportati e le cornee escisse per essere sottoposte ad analisi istologica. I campioni sono stati, quindi, valutati sulla base del numero di strati epiteliali, della vascolarizzazione dello stroma, del grado di infiammazione e dell'organizzazione del collagene stromale.

Il confronto tra i quattro gruppi ha mostrato che il terzo si caratterizzava per una durata del blefarospasmo significativamente più corta rispetto al controllo, oltre a presentare un'area di lesione mediamente ridotta e un migliore processo di guarigione in atto. Indagini istopatologiche hanno, inoltre, rilevato a livello corneale un'infiammazione e una vascolarizzazione significativamente inferiori nel gruppo 3, il quale, in aggiunta, vantava la miglior organizzazione di collagene stromale. Il plasma sub-congiuntivale ricco in piastrine sembra migliorare la guarigione delle bruciature epiteliali a livello della cornea. Ad ogni modo, la combinazione di acetilcisteina e sPRP potrebbe mostrare un effetto ritardante sul processo di guarigione, se comparata all'effetto del solo sPRP.

I risultati di questo studio vogliono dimostrare che l'applicazione sub congiuntivale di PRP autologo su ulcere da bruciatura alcalina a livello corneale rappresenta un trattamento per le bruciature superficiali oculari semplice, economico e senza effetti collaterali indesiderati.

7.3.2 Gel piastrinico: studi in vitro e in vivo

Alcuni autori hanno voluto indagare in vitro la composizione ottimale per un collante autologo ricco in piastrine, ovvero per una preparazione sigillante a base di fibrina [Wu X. et al., 2012].

Essi hanno confrontato le caratteristiche sigillanti di una serie di componenti autologhi con quelle di un comune collante commerciale per ferite (Bioseal Porcine Fibrin Sealent Kit). Le concentrazioni di piastrine e di fibronectina nei campioni autologhi di fibrina con proprietà collanti si sono rivelate significativamente più alte di quelle presenti nei prodotti commerciali. Nei campioni autologhi è stato, inoltre, possibile osservare una superficie densa di piastrine e strutture reticolari di fibrina, invece assenti nel Bioseal. La fibrina autologa e il Bioseal non hanno mostrato, quindi, grandi differenze nelle proprietà meccaniche e biochimiche, ragion per cui il gel autologo di PRP potrebbe trovare applicazione nel processo di wound healing.

Lo studio in vivo condotto su modelli animali da Marciel, DeRossi et al. pone l'attenzione sul processo di guarigione per scottature profonde di secondo grado, che solitamente coinvolgono tutti gli strati epidermici, lamina basale inclusa, e si risolvono con la cicatrizzazione di un'ampia area tissutale.

I risultati ottenuti hanno dimostrato che il gel PRP accelera la riparazione tissutale, inducendo fibrosi e manifestando, probabilmente, un'attività antibatterica nei cavalli con scottature profonde di secondo grado. In particolare, i modelli animali testati hanno provato che gli emoderivati aumentano la velocità di riparazione della matrice extracellulare e dei suoi componenti nelle suddette scottature, ma inducono anche uno stato di fibrosi, ossia un accrescimento abnorme del connettivo a danno del tessuto preesistente [Marciel F.B., et al., 2012].

Altri autori hanno, invece, suggerito l'impiego di gel piastrinico a livello topico nelle ulcere cutanee di varia eziopatogenesi. In particolare, Croveti, Martinelli et al. hanno valutato l'applicazione di PG, una volta la settimana, sulle ulcere cutanee di 24 pazienti affetti da una di queste patologie: diabete, insufficienza arteriosa e venosa, neuropatie e malattie post-traumatiche. La riduzione progressiva delle dimensioni della ferita, la formazione del tessuto di granulazione, la detersione del letto della ferita, la regressione e l'assenza di processi infettivi sono state considerate per la valutazione della risposta clinica all'emoterapia.

Gli autori hanno concluso che l'emoterapia topica con PG potrebbe essere considerata un trattamento adiuvante all'interno di un programma terapeutico multidisciplinare, utile ad intensificare la terapia delle ulcere cutanee [Croveti G. et al., 2004].

Mazzucco, Medici et al. hanno valutato il processo di guarigione di ferite sternali aperte e di ulcere necrotiche cutanee, condotto grazie alla somministrazione di gel piastrinico. I pazienti trattati con PG sono stati confrontati in modo retrospettivo con pazienti aventi lesioni simili ma sottoposti ad altre terapie. Tra i risultati clinici ottenuti gli autori hanno focalizzato la loro attenzione sulla velocità di guarigione, la permanenza in ospedale e il tempo richiesto per avere una rigenerazione tissutale adeguata, perché il paziente potesse essere sottoposto ad un intervento di chirurgia plastica ricostruttivo. Per i pazienti con ferite sternali aperte, trattate con gel piastrinico, la velocità di guarigione e la permanenza in ospedale sono diminuite significativamente, mentre i pazienti con ulcere necrotiche cutanee hanno richiesto l'intervento chirurgico in tempi brevi. In entrambi i casi né reazioni avverse né ricadute sono state osservate [Mazzucco L. et al., 2004].

L'impiego positivo del gel piastrinico è stato provato anche su pazienti pediatriche. Perotti, Stronati et al. hanno riportato in uno studio il caso di un paziente neonato le cui ulcere da decubito sono state trattate con successo. Il trattamento ha previsto l'impiego di PG contenete solo cellule bianche e pertanto denominato PGL, gel di piastrine e leucociti. I leucociti presenti nel PGL (monociti, linfociti e neutrofili ricchi in mieloperossidasi) con la loro attività antimicrobica hanno ridotto il rischio di infezioni, quindi il tempo di degenza. Il processo di guarigione nel neonato si è mostrato evidente prima del quinto giorno di trattamento [Perotti G. et al., 2012].

7.3.3 Lisato piastrinico: studi in vitro e in vivo

Uno studio in vitro condotto da Ranzato et al., ha dimostrato un significativo incremento della velocità di retrazione di una ferita per le cellule esposte 6 e 24h a lisato piastrinico al 20%. Il saggio di migrazione cellulare mostra il forte effetto chemiotattico esercitato sulle cellule dal lisato piastrinico. Gli autori hanno così concluso che il lisato piastrinico aumenta la velocità di guarigione di una ferita stimolando la migrazione dei cheratinociti attraverso un meccanismo dipendente dall'azione della proteinchinasi p38, attivata dai livelli di calcio e da un processo mitogenico. (Ranzato 2008)

Cipriani, Ranzato et al. hanno valutato l'effetto biologico del lisato piastrinico su una coltura primaria di fibroblasti cutanei. LP si è mostrato efficace nell'espressione di varie proteine, in maniera strettamente correlata alla risposta di stress, al metabolismo e al citoscheletro delle cellule testate [Cipriani V. et al., 2009].

Anche in un più recente lavoro El Backly, Ulivi et al. hanno riportato che a concentrazioni fisiologiche, il LP favorisce la velocità di chiusura della ferita ad opera dei cheratinociti umani

NCTC 2544. Gli autori hanno voluto evidenziare l'effetto indotto dall'emoderivato 6h dopo la ferita. In aggiunta, si è osservato che il LP provoca, a livello cellulare, una forte induzione sul processo di riorganizzazione del citoscheletro di actina che persiste fino a 24h. Questa accelerata contrazione della ferita promossa dal LP, sia in assenza che in presenza di siero, è da associare agli elevati livelli di espressione di una citochina infiammatoria, l'interleuchina 8 (IL-8). Dopo 24h dal trattamento con LP, i livelli di interleuchina-8 e del peptide antimicrobico lipocalina, associato alla gelatinasi neutrofila (NGAL, Siderocalina), risultano molto più bassi se confrontati alle concentrazioni in gioco nel corso di risposte infiammatorie.

Questi effetti sono stati associati all'attivazione della cascata infiammatoria, della proteinchinasi p38 per stimolazione mitogenica e del fattore trascrizionale NF-kB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells). In questo lavoro, gli autori hanno pertanto voluto evidenziare la capacità del lisato piastrinico nell'innescare la cascata infiammatoria ed esercitare un ruolo antimicrobico, funzionali entrambi ad una rapida risoluzione della ferita [El Backly R. et al., 2011].

Geremicca, Fonte et al. hanno studiato l'applicazione topica di LP, ottenuto da PRP, per il trattamento di ulcere corneali causate da cheratiti neurotrofiche e per la cura di perdite epiteliali e stromali, inseguito a traumi fisico-chimici. Il LP è stato somministrato in forma di collirio a pazienti che non hanno risposto alle terapie convenzionali e che presentavano il rischio di incorrere in una cicatrizzazione della cornea. I risultati si sono rivelati soddisfacenti sia in termini di rigenerazione tissutale che di tempi di guarigione. Il follow-up clinico ha mostrato una chiara diminuzione nel tempo di ri-epitelializzazione a livello del tessuto danneggiato e nella stabilizzazione del processo di riparazione. I difetti epiteliali sono spariti completamente in tutti gli occhi trattati in un periodo di tempo compreso tra i 6 e i 32 giorni, dipendentemente dal tipo di lesione e dalla gravità del danno. La cornea, in genere, reagisce al danno tissutale, rilasciando numerose sostanze, incluse citochine, fattori di crescita, proteasi e neuropeptidi in modo da recuperare la sua integrità anatomica. L'uso di PL si è mostrato efficace in tutti i casi caratterizzati da perdita epiteliale, ad esempio nelle ulcere corneali post-erpetiche o nelle ulcere insorte inseguito a traumi o a esposizione di sostanze caustiche [Geremicca W. et al., 2010].

Pezzota et al. hanno, invece, valutato l'impiego del LP nel trattamento della "Graft versus Host Disease" (GvDH), quando le terapie convenzionali (rappresentate da sistemici regimi immunosoppressivi e terapie locali, soprattutto lacrime artificiali e corticosteroidi) davano risultati insoddisfacenti. Gli autori hanno investigato la sicurezza e l'efficacia dell'autologo PL, ricco in

PDGFs, nel trattamento di GvDH oculari, non rispondenti alle medicazioni standard [Pezzotta et al., 2012].

In particolare, un totale di 23 pazienti con GvDH oculari refrattarie (grado II-IV), non responsive alle terapie convenzionali, sono stati trattati con lacrime oculari a base di LP 4 volte al giorno per 6 mesi.

Tra i parametri e i sintomi valutati nel corso di questo studio: migliore acuità visiva, Shimermer's test e tempo di rottura del film lacrimale (TBUT), colorazione delle aree di sofferenza e necrosi congiuntivale, oltre che delle discontinuità osservate nell'epitelio corneale, mediante fluoresceina e lissamina.

Dopo 30 giorni di trattamento, 17 pazienti (73,9%) sono stati classificati come "responders", ovvero come soggetti in cui il dolore percepito fosse diminuito più o meno significativamente. Nessuna reazione avversa importante è stata osservata nel corso dello studio. Le gocce di LP si sono mostrate sicure ed efficaci nel trattamento di GvDH oculari, mostrandosi come un valido strumento nel trattamento dei primi stadi della malattia e nell'evitare il rischio di un irreversibile danno oculare

7.4 Associazione di biopolimeri ed emoderivati: sviluppi formulativi

L'efficacia dei fattori di crescita piastrinici nel processo di wound healing è strettamente correlata al modo in cui questi sono resi disponibili al sito di lesione tissutale. Lo sviluppo di veicoli terapeutici adeguati rappresenta oggi un importante obiettivo da raggiungere per un ottimale rilascio di GFs a seconda delle richieste di riparazione.

Diversi sono i requisiti richiesti ad un wound dressing: deve essere in grado di mantenere un alto tasso di umidità all'interfaccia ferita-medicazione, consentendo lo scambio di gas, deve essere realizzato in forma sterile e deve essere preparato in modo tale da assorbire l'essudato della ferita, legando composti tossici e prevenendo la crescita e la proliferazione di microrganismi patogeni. I wound dressings sono stati definiti sulla base di caratteristiche fisiche ideali: devono essere biocompatibili, senza che un loro contatto con l'organismo scateni risposte allergiche o immunitarie indesiderate e devono mantenersi stabili a contatto con l'acqua e nel tempo.

I fattori di crescita possono essere veicolati in diversi sistemi di rilascio, ma pochi riferimenti in letteratura trattano la combinazione di emoderivati, in particolare di lisato piastrinico, e materiali mucoadesivi. L'associazione di LP e biopolimeri muco adesivi si è rivelata utile per l'applicazione a superfici mucose, nel caso, ad esempio, di mucositi orali, spesso indotte da cicli chemioterapici intensi, nonché in grado di aumentare il tempo di residenza della formulazione a livello dell'area corneale, nel caso di GvDH oculari. Diversi lavori hanno, infatti, dimostrato che l'associazione di

LP e polimeri, caratterizzati da proprietà bioattive intrinseche, determina un effetto sinergico nel processo di wound healing [Caramella C.M. et al., 2013].

Negli ultimi anni, un gruppo di ricerca dell'Università di Pavia, in collaborazione con il Policlinico San Matteo, ha promosso lo sviluppo di sistemi terapeutici basati sull'associazione di biopolimeri (chitosano, acido ialuronico e condroitin solfato) e lisato piastrinico per il trattamento di lesioni epiteliali, quindi a livello cutaneo, mucosale e corneale [Sandri G. et al., 2013; Caramella C. et al., 2011; Caramella C.M. et al., 2013; Rossi S. et al., 2013].

Il primo veicolo studiato era rappresentato da una formulazione semisolida pensata per il trattamento di mucositi orali e lesioni della cornea. Esso doveva essere in grado di garantire la conservazione delle molecole bioattive di PL veicolate, durante la preparazione, lo stoccaggio e l'utilizzo, assicurando, al contempo, un contatto prolungato di queste sostanze con l'epitelio danneggiato.

Il chitosano glutammato è stato utilizzato come biopolimero, in virtù delle sue qualità mucoadesive. Il veicolo è stato miscelato in rapporto 1:1 con il LP e conservato in frigo fino al momento dell'utilizzo. Il prodotto finale è stato presentato come una preparazione a dose singola, dispensabile in un numero di dosi adatto al tipo di trattamento richiesto. Il contenuto di PDGF AB nella formulazione, scelto come rappresentativo di quello presente nel LP, non sembrava significativamente differente dal valore teorico, a indicare che il veicolo sviluppato si mostrava in grado di sostenere l'attività del fattore di crescita.

La formulazione è stata oggetto di studi in vitro mediante test di proliferazione e wound healing su popolazioni di fibroblasti e cellule dell'epitelio corneale (RCE). La formulazione a base di chitosano sembra essere in grado di promuovere la crescita delle cellule epiteliali anche dopo un periodo di tempo di due settimane, in condizioni di utilizzo. È stato, poi, dimostrato il raggiungimento di un completo processo di wound healing dopo 48h.

Più recentemente, sono state sviluppate gocce oculari, termosensibili e mucoadesive, basate sull'utilizzo di condroitin solfato (CHOS) per mantenere e prolungare il contatto tra il lisato piastrinico e le ulcere corneali da trattare.

8. La seta

Fibra animale proteica, costituita per il 75% da fibroina e per il restante 25% da sericina, la seta è tra le poche fibre prodotte in natura sottoforma di filamento, dal bruco *Bombyx mori* o, comunemente, baco da seta.

Come altri lepidotteri setiferi, il baco, prima di trasformarsi in crisalide, costruisce un bozzolo. Il ciclo larvale dura 30 giorni e viene diviso in cinque “età”, periodi durante i quali la larva mangia, giorno e notte, foglie di gelso, e quattro “mute” o “dormite”, in cui resta immobile. Superata la quinta età, la larva è pronta per la filatura del bozzolo; per proteggersi, costruisce intorno al proprio corpo, un involucrio, emettendo una bava serica con cui forma anelli sovrapposti a forma di otto.

La bava è prodotta da due ghiandole setifere (seritteri), disposte ai lati dell'intestino, che si riempiono gradualmente di un liquido viscoso costituito da fibroina; una volta secreti, i due filamenti di fibroina si saldano per mezzo di una guaina gommosa e trasparente, la sericina. [Rigano L. et al., 2005].

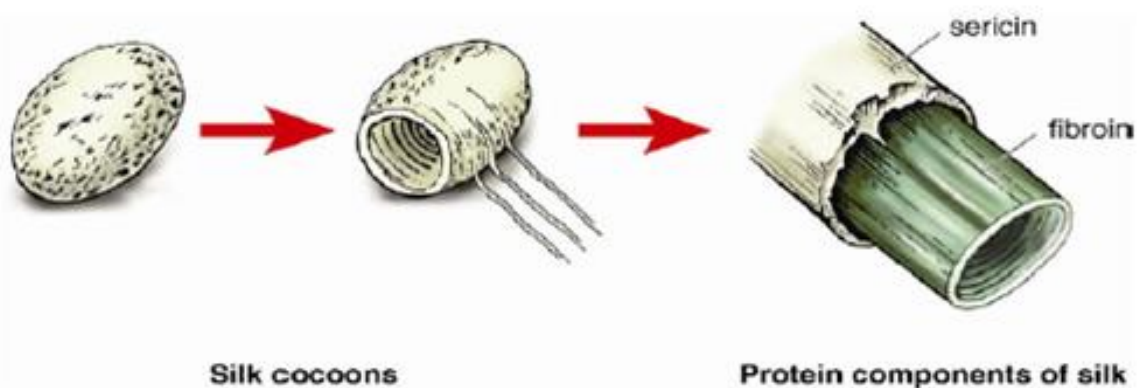


Figura 11- Rappresentazione del bozzolo del baco da seta e della disposizione, all'interno di ogni singolo filamento, delle due proteine costituenti, fibroina e sericina.

[Sobajo C. et al., 2008]

8.1 Fibroina

La fibroina è una glicoproteina costituita da due componenti distinti, una catena leggera da 25kDa e una pesante da 370kDa, legate tra loro mediante un ponte disolfuro. Le catene leggere sono idrofile e si contraddistinguono per una relativa elasticità, mentre i domini delle catene pesanti sono di natura idrofobica.

La struttura primaria è data dalla sequenza (Gly-Ser-Gly-Ala-Gly-Ala)_n caratterizzata dal 12% di serina, 30% di alanina e 44% di glicina.

Nella fibroina si distinguono regioni ordinate, di tipo cristallino, e regioni amorfe: nelle prime, le catene polipeptidiche si dispongono in una conformazione lamellare a foglietto β antiparallelo, sostenuta da numerosi legami idrogeno. Dalla disposizione strutturale della fibroina derivano le proprietà tipiche della seta, quali lucentezza, resistenza, leggerezza e coibenza.

La notevole resistenza meccanica, l'elasticità, la biocompatibilità e la controllata biodegradabilità sono proprietà che rendono la fibroina particolarmente utile nell'ambito dell'ingegneria tissutale [Rigano L. et al., 2005; Kundo B. et al., 2012].

8.2 Sericina

La sericina è una proteina globulare, contiene 18 amminoacidi, alcuni dei quali essenziali, e si caratterizza per la presenza di un 32% di serina. La quantità totale di amminoacidi idrossilici nella sericina è pari al 45.8%, mentre si distingue un 42.3% di amminoacidi polari e un 12.2% di residui non polari.

La sericina contribuisce al 20-30% del peso totale del bozzolo del baco da seta. Oltre a funzioni di rivestimento, di collante e di protezione per la fibroina, essa lubrifica e promuove il processo biologico di avvolgimento del filo nella costituzione del bozzolo. In presenza della sericina le fibre sono forti e resistenti, mentre diventano deboli e lucide dopo la sua rimozione.

La sericina si presenta sottoforma di una struttura amorfa random coil e, in misura minore, in una conformazione secondaria ricca di foglietti β . Inseguito ad un ripetuto assorbimento di umidità e ad uno stretching meccanico è facile che da una struttura random coil si passi ad una organizzata in β -sheet. Degne di nota sono le proprietà gelificanti della sericina: quando la temperatura si abbassa, la struttura random coil, solubile in acqua calda, si organizza a dare un'ordinata conformazione secondaria, con successiva gelificazione.

La sericina può dirsi costituita da tre diverse porzioni, dipendentemente dalla loro solubilità: sericina A, B e C. La sericina A costituisce lo strato più esterno ed è insolubile in acqua calda; contiene circa il 17.2% di azoto e amminoacidi come la serina, la treonina, la glicina e l'acido aspartico. La sericina B rappresenta la porzione centrale e su idrolisi acida cede gli stessi amminoacidi della sericina A, in aggiunta al triptofano; contiene il 16.8% di azoto. La sericina C costituisce lo strato più interno, adiacente alla fibroina, è insolubile in acqua calda e può essere rimossa dalla fibroina per trattamento con acidi/basi diluiti e caldi. Per idrolisi acida cede la prolina in aggiunta agli stessi amminoacidi della frazione B; contiene anche zolfo e un 16.6% di azoto. La sericina si caratterizza per un punto isoelettrico a pH 4,0.

La sericina può essere divisa in tipi diversi sulla base della solubilità relativa. La conformazione molecolare in cui la sericina si presenta più solubile è quella random coil, mentre la struttura a β -sheet dissolve con più difficoltà. Il ripetuto assorbimento di umidità rende l'aggregato molecolare più denso, caratterizzato da una struttura cristallina e una ridotta solubilità [Padamwar M.N. and Pawar A.P., 2004].

8.2.1 La sericina come agente di wound healing

La sericina è una proteina che recentemente ha dimostrato di avere un importante ruolo nel processo di wound healing, date l'idrofilia, la compatibilità e la biodegradazione che la contraddistinguono. Si presenta come componente ideale nelle formulazioni pensate per un contatto diretto con tessuti lesionati, in accordo con le sue proprietà gelificanti e bio-adesive, che possono essere spiegate dalla marcata affinità per le proteine idrofobe, come la cheratina dello strato corneo [Padamwar M.N. and Pawar A.P., 2004].

Diversi studi hanno voluto valutare l'effetto della stessa sui tempi di guarigione e sulla progressiva riduzione delle dimensioni di una ferita cutanea. Le lesioni trattate con sericina non sono state oggetto di reazioni infiammatorie importanti e la loro estensione ha avuto una regressione significativa nel tempo di indagine, se paragonata ai controlli. Esami istologici hanno dimostrato che un trattamento di 15 giorni con una crema di sericina all'8% porta alla completa guarigione della ferita, senza ulcerazioni visibili, mentre una cura di 15 giorni con una crema base lascia la cute in uno stato infiammatorio acuto, con presenza di essudato [Aramwit P. and Sangcakul A., 2007]

Anche la sintesi di collagene, essenziale nel processo di rigenerazione tissutale, è promossa dalla sericina, grazie alla presenza nella sua struttura dell'amminoacido metionina [Patel R.J. and Modasiya M.K., 2011].

Studi in vitro hanno dimostrato, inoltre, che la sericina è in grado di promuovere la guarigione di stati ulcerosi a livello corneale e di migliorare le proprietà adesive di colture di fibroblasti cutanei umani, incrementandone, conseguentemente, la proliferazione. La sericina si presenta, pertanto, come un ottimo ed efficace supporto per le colture cellulari di mammiferi, dal momento che, se aggiunta al mezzo nutritivo, è in grado di stimolarne la crescita, senza risultare citotossica [Patel R.J. and Modasiya M.K., 2011].

Diversi studi, inoltre, presentano la sericina come una molecola ideale nella prevenzione del danno ossidativo; essa, infatti, vanta un potere antiossidante, funzionale al processo di wound healing, andando ad inibire l'azione delle tirosinasi e la perossidazione lipidica. La sericina può essere utilizzata come agente coadiuvante nel trattamento di stati ulcerosi, anche in associazione con

antiossidanti convenzionali non enzimatici, come l'acido ascorbico, il tocoferolo, l'acido urico e il β -carotene. Essendo la sericina ricca di amminoacidi polari, quali serina e treonina, è stato supposto che i numerosi gruppi idrossilici presenti nella sua struttura fossero i responsabili dell'azione antiossidante per il loro effetto chelante su certi elementi, quali ferro e rame [Dash R. et al., 2008].

È stato provato che le ferite trattate con sericina, sia in polvere che in crema, vantano un rapido processo di guarigione. La natura significativamente idrofila di questa proteina appare funzionale al wound healing, sia perché la lesione viene mantenuta opportunamente idratata sia perché progressivamente l'essudato in eccesso viene assorbito. La sericina contiene circa il 30% di serina, il principale amminoacido costituente del fattore idratante naturale (NMF) della pelle umana. L'NMF è una miscela di svariate sostanze (amminoacidi, acido piroglutammico, lattato di sodio, urea, zuccheri liberi o legati, sali, etc.) che, mantenendo nello strato corneo il giusto tasso di umidità, impedisce un'eccessiva disidratazione delle lamelle cheratiniche, lasciando la superficie epidermica integra, elastica e flessibile. La presenza della serina rende, quindi, la sericina un ottimo agente idratante.

I gel film di sericina costituiscono un ottimo materiale di copertura per le ferite e sono in grado di assorbire acqua rapidamente, fino a raggiungere un incremento in peso dell'80%. Tale valore è significativamente più alto rispetto a quello indicato per i wound dressings a base di polimeri naturali. La flessibilità dei gel film di sericina, se usati per il trattamento delle ferite, appare come un grande vantaggio: possono essere facilmente maneggiati con pinze o a mani nude, tagliati in qualsiasi forma, usando forbici o coltelli; possono essere applicati, in virtù della loro elasticità, su superfici ricurve o parti mobili dell'organismo, garantendo così che il contatto tra la ferita e la formulazione sia il più intimo e delicato possibile.

La flessibilità e le proprietà di assorbimento della sericina promuovono il ripristino di difetti cutanei, senza causare alcun fenomeno di desquamazione della pelle in fase di rigenerazione. In accordo con la sua struttura proteica, essa viene attaccata dagli enzimi proteasici che, determinandone l'idrolisi, la rendono biodegradabile. Essendo, per natura, biocompatibile e resistente alle infezioni, la sericina è considerata un materiale innovativo, capace di favorire il processo di coagulazione nelle ferite [Aramwit P. and Sangcakul A., 2007; Teramoto H. et al., 2008].

I. Capitolo

Messa a punto del metodo di proliferazione cellulare e valutazione della stabilità del lisato piastrinico (LP)

I.1 SCOPO DEL LAVORO

Nel presente lavoro viene descritto l'impiego del lisato piastrinico (LP) per la riparazione delle lesioni cutanee. Lo scopo di questo capitolo è di mettere a punto e validare un metodo *in vitro* (basato sull'impiego di linee cellulari) per valutare l'effetto proliferativo indotto dal LP sul tessuto lesso, considerato il marker della sua attività biologica. Sono state utilizzate e confrontate varie linee cellulari di fibroblasti e sono state definite le condizioni ottimali (di sensibilità del test) per valutare la proliferazione.

Brevemente, sono stati confrontati fibroblasti del derma umano di adulto (aNHDF) e fibroblasti del prepuzio di bambino (bNHDF), entrambi a differenti passaggi, per valutare se l'invecchiamento della linea cellulare potesse influenzare il metodo *in vitro* scelto e se ci fosse una sensibilità differente al metodo di proliferazione per le due linee cellulari.

Inoltre, allo scopo di evitare errori sistemici nella valutazione dell'efficacia biologica del LP, noto per la sua instabilità chimica e chimico-fisica, il medesimo è stato liofilizzato e ne è stata valutata, in confronto al LP fresco ed utilizzando il test di proliferazione cellulare ottimizzato, la stabilità alla temperatura di refrigerazione e a condizioni normali per la durata di 15 giorni. I dati di proliferazione cellulare sono stati poi confrontati con i risultati di quantificazione dei fattori di crescita tramite test Elisa.

I.2 MATERIALI E METODI

I.2.1 Materiali

DMSO (Dimetil Solfoossido) (Sigma Aldrich, Milano, I); Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM, Lonza, BioWhittaker, B); Dulbecco's Phosphate Buffer Solution (Sigma Aldrich, Milano, I); Hank's Balance Salt Solution (HBSS) (Sigma Aldrich, Milano, I); Inactivated foetal calf bovine serum (Euroclone, Pero, I); Penicillin streptomycin 100x (pen/strep)/amphoteric 100x (Sigma Aldrich, Milano, I); Trypsin-EDTA solution (Sigma Aldrich, Milano, I); Trypan Blue solution (Biological Industries, Beit-Haemek, IL); WST (Water Soluble Tetrazolium), (Roche diagnostic, Italy).

Lisato piastrinico: fornito dal reparto di Immunoematologia ed Aferesi del IRCCS Policlinico S.Matteo, Pavia. Il campione è stato preparato a partire da plasma ricco in piastrine di 8 donatori sani, congelato a -80°C per almeno 5 ore ed in seguito scongelato in un bagno a 37°C , diluito 1:1 con una soluzione salina al fine di ottenere una concentrazione di piastrine pari a circa $500\text{-}600 \times 10^3/\mu\text{l}$. Il lisato piastrinico così ottenuto viene caratterizzato per conta piastrinica e controllato per il test di contaminazione da aerobi, anaerobi e funghi.

I.2.2 Mantenimento della linea cellulare

Per la messa a punto del metodo di proliferazione cellulare sono state prese in considerazione due linee cellulari: fibroblasti del derma umano, provenienti dalla pelle del prepuzio di bambino (bNHDF) (Promocell GmbH, Heidelberg, G) e fibroblasti del derma umano di adulto (aNHDF) (Promocell GmbH, Heidelberg, G). Le cellule sono state mantenute in coltura in flask di polistirene (Greiner bio-one, PBI International, Milano, I) con 13-15 ml di mezzo di coltura completo (MC), composto da DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) contenente 4.5 g/l di glucosio e 1% (v/v) di L-glutammmina, addizionato con 1% (v/v) di una soluzione 100x di antibiotici e antimicotico (penicillina/streptomicina/anfotericina B) e il 10% (v/v) di siero bovino fetale inattivato. Le cellule sono state mantenute in incubatore (Shellab® Sheldon® Manufacturing Inc., Oregon, USA) a 37°C in atmosfera di 95% di aria e 5% CO_2 . Tutte le operazioni sono state condotte sotto cappa a flusso laminare (Ergosafe Space 2, PBI International, Milano, I). Quando le cellule hanno raggiunto l'80-90 % di confluenza in flask (circa una settimana), è stata effettuata la tripsinizzazione, permettendo così il loro distacco. In particolare, il monostrato cellulare è stato lavato con una soluzione di D-PBS (Dulbecco's Phosphate Buffer Solution), al fine di rimuovere gli ioni bivalenti che possono inattivare la tripsina stessa, ed in seguito 3 ml di una soluzione di tripsina-EDTA 0.25 % (v/v) sono

stati lasciati a contatto con il monostrato cellulare per 5 minuti. Al termine, lo strato cellulare è stato prelevato con 7 ml di MC, al fine di terminare l'azione proteolitica della tripsina e per facilitare il distacco delle cellule.

In seguito, la sospensione cellulare è stata centrifugata (TC6, Sorvall Products, Newtown, USA) a 112 g per 10 minuti. Il surnatante è stato eliminato e le cellule sono state risospese in 6 ml di mezzo senza siero (M s/s). La concentrazione di cellule nella sospensione è stata determinata attraverso una camera contaglobuli (Hycor Biomedical, Garden Grove, California, USA) utilizzando una soluzione 0.5 % (p/v) di Trypan Blue per distinguere le cellule vive dalle morte.

I.2.3 Metodo di proliferazione cellulare: bNDHF vs aNDHF

La messa a punto del test di proliferazione cellulare è stata condotta sulle due linee cellulari considerate (bNDHF e aNDHF) a due passaggi differenti: 5 e 12th per bNDHF e 6 e 17th per aNDHF. A tale scopo, le cellule sono state seminate in una piastra da 96 pozzetti (Cellstar 96 W, Greiner Bio-One, G), aventi area di 0.35 cm², a differenti concentrazioni: 7500, 10000 e 20000 cellule/pozzetto in presenza di mezzo di coltura completo (MC) e mezzo senza siero (Ms/s) e sono state lasciate crescere per 24h successive alla semina.

Trascorse 24 h dalla semina, è stato effettuato il saggio WST-1.

I.2.3.1 Saggio WST-1

Al momento dell'analisi è stato rimosso il mezzo presente nei pozzetti e in ciascuno pozzetto sono stati dispensati 100 µl di una soluzione di reagente WST-1 (Roche diagnostic, Italy) al 10% p/p, diluito in HBSS (Hank's Balanced Salt Solution).

Il test WST-1 è un saggio colorimetrico basato sull'attività ossidativa della deidrogenasi mitocondriale, che è in grado di aprire l'anello del WST-1 convertendolo a formazan. Solo le cellule vitali, con una deidrogenasi mitocondriale attiva, possono effettuare questa reazione; pertanto l'assorbanza alla quale si rivela il formazan rappresenta una misura della vitalità cellulare.

Il reattivo WST-1 è stato posto a contatto con le cellule per 3 h, in modo da lasciare il tempo al reagente di penetrare nelle cellule ed essere metabolizzato a formazan.

L'assorbanza di ciascun pozzetto è stata saggiata con "iMARK Microplate Absorbance Reader" (BioRad, Milano, Italia), ed una lunghezza d'onda di 450 nm con riferimento a 655 nm, dopo agitazione di 60 secondi. La proliferazione cellulare è stata calcolata come il rapporto percentuale fra l'assorbanza in presenza di ciascun campione e l'assorbanza in presenza di MC.

I.2.4 Proliferazione cellulare del LP fresco e liofilizzato, in stabilit 

Il test di proliferazione cellulare   stato condotto utilizzando fibroblasti di bambino al passaggio 10th, seminati in una piastra da 96 pozzetti (Cellstar 96 W, Greiner Bio-One, G), aventi area di 0.35 cm².

  stata valutata la stabilit  dell'attivit  biologica di LP a differenti condizioni. LP fresco   stato lasciato a 4 C per 15 giorni; un campione del medesimo   stato liofilizzato al fine di valutare la stabilit  di LP al trattamento della liofilizzazione; inoltre, LP una volta liofilizzato   stato mantenuto a 4 C e a 25 C per 15 giorni. Al termine   stato condotto un test di proliferazione cellulare su bNHDF.

Ogni campione di LP alle differenti condizioni di trattamento e stabilit    stato diluito a 1:40 in M s/s e 200  l di ciascuna diluizione sono stati posti a contatto per 24h con fibroblasti, alla concentrazione di semina pari a 2x10⁴ cellule/pozzetto. Al termine di tale tempistica i campioni sono stati rimossi e la % di proliferazione cellulare   stata valutata attraverso WST-1 test. I risultati sono stati espressi come % di proliferazione ottenuta normalizzando le misure di assorbanza delle cellule poste a contatto con i campioni con le misure di assorbanza delle cellule poste a contatto con M s/s. Il MC e il M s/s sono stati utilizzati come controlli. Sono stati analizzati otto repliche per campione.

I.2.5 Analisi dei fattori di crescita (test ELISA)

Il contenuto di un fattore di crescita PDGF AB (platelet derived growth factor), rappresentativo del pool di fattori di crescita presenti nel LP,   stato valutato tramite test ELISA (Human PDGF AB Quantikine PharmPak, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA; assay range: 31.2–2000 pg/ml) [Rossi et al., 2013].

La concentrazione di PDGF AB in LP liofilizzato e posto in differenti condizioni di stabilit    stato confrontato alla concentrazione di PDGF AB in LP fresco utilizzato per la loro preparazione e il parametro “% PDGF AB”   stato calcolato come rapporto tra le due concentrazioni di PDGF AB.

Il test ELISA   stato condotto analizzando gli stessi campioni sottoposti al test di proliferazione cellulare (paragrafo I.2.3) ad una diluizione 1:40 in soluzione fisiologica.

Nello specifico,   stata valutata la quantit  di PDGF AB presente nel LP fresco ed   stata calcolata la % di PDGF AB secondo la seguente equazione:

$$\%PDGF\ AB = (quantit \ PDGF\ AB\ nel\ campione / quantit \ PDGF\ AB\ nel\ LP\ fresco) \times 100$$

(Eq. 1)

Sono state analizzate tre repliche per campione.

I.2.6 Analisi statistica

I dati sperimentali ottenuti dalle differenti misure sono stati, quando possibile, sottoposti ad analisi statistica grazie al software Statgraphics 5.0 (Statistical Graphics Corporation, Rockville, MD, USA). In particolare è stato utilizzato il test Anova una via e Multiple range.

I.3 RISULTATI E DISCUSSIONE

I.3.1 Messa a punto della proliferazione cellulare: bNDHF vs aNDHF

La sensibilità del substrato cellulare alla presenza dei fattori di crescita è stata valutata mediante determinazione della proliferazione cellulare in assenza e in presenza di siero fetale (ricco in fattori di crescita), utilizzando anche passaggi diversi per entrambe le linee allo scopo di mettere in evidenza una diversa sensibilità dipendente dall'invecchiamento della linea cellulare.

In Figura I.1 sono riportati i risultati ottenuti dai test di proliferazione cellulare condotti su bNHDF al passaggio 5 e 17 e in Figura I.2 sono riportati i risultati ottenuti utilizzando aNHDF al passaggio 5 e 12.

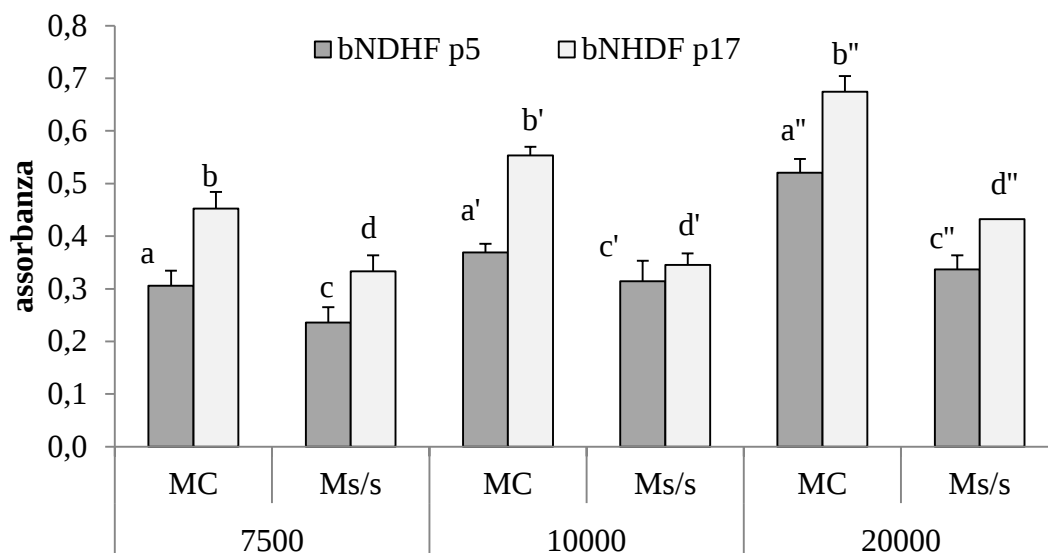


Figura I.1: Valori di assorbanza ottenuti per il test di proliferazione cellulare condotto su bNHDF (fibroblasti normali umani di bambino) ai passaggi 5 e 17 in presenza di MC e Ms/s, seminando 7500, 10000 e 20000 cellule/pozzetto (valori medi $\pm$ es; n=8)
significatività statistica ($p < 0.05$): a vs c; b vs d; a' vs c'; b' vs d' a'' vs c''; b'' vs d'';
a vs a'/a''; b vs b'/b''

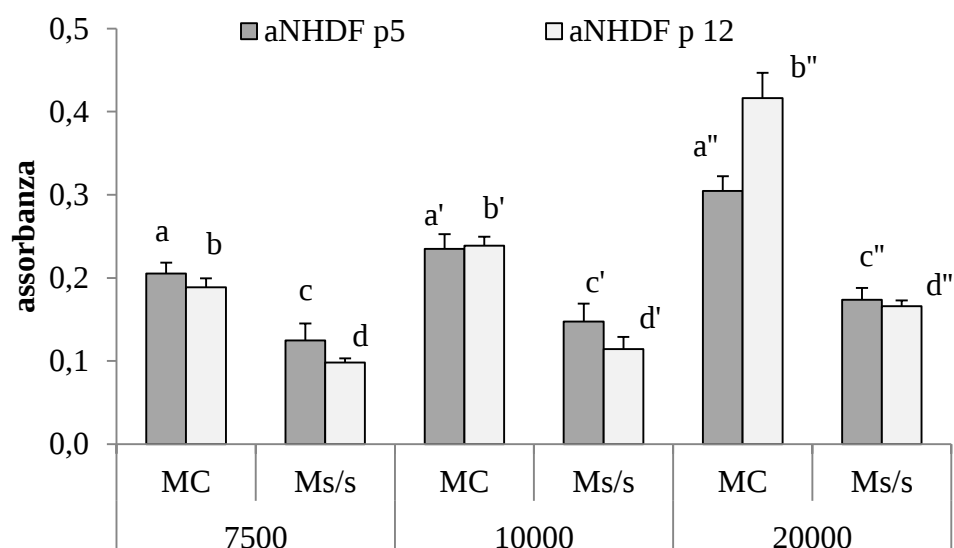


Figura I.2: Valori di assorbanza ottenuti per il test di proliferazione cellulare condotto su aNHDF (fibroblasti normali umani di adulto) ai passaggi 5 e 12 in presenza di MC e M s/s, seminando 7500, 10000 e 20000 cellule/pozzetto (valori medi $\pm$ es; n=8)
significatività statistica ($p < 0.05$): a vs c; b vs d; a' vs c'; b' vs d' a'' vs c''; b'' vs d'';
a vs a'/a''; b vs b'/b''

I valori di assorbanza risultano sempre maggiori ($p < 0.05$) quando le cellule sono poste a contatto con MC rispetto ai valori ottenuti per i substrati posti a contatto con M s/s: tale risultato è confermato per tutte le concentrazioni di cellule seminate e per entrambe le linee di fibroblasti (adulto e bambino) indipendentemente dal passaggio utilizzato. Ciò sta ad indicare che entrambe le linee cellulari sono sensibili alla presenza dei fattori di crescita presenti nel MC. Entrambe le linee cellulari possono essere utilizzate per questa tipologia di esperimenti sino al passaggio 17 per i fibroblasti di bambino e fino al passaggio 12 per i fibroblasti di adulto. All'aumentare della concentrazione di cellule seminate aumenta anche il valore di assorbanza e quindi la proliferazione delle cellule quando poste a contatto con MC, mentre i valori di assorbanza restano paragonabili indipendentemente dal numero di cellule seminate se poste a contatto con il M s/s.

Come si può notare, i valori di assorbanza ottenuti per la linea bNHDF sono sempre maggiori di quelli ottenuti per la linea aNHDF. Pertanto, la linea cellulare bNHDF quando seminata alla concentrazione di 20000 cellule/pozzetto consente di ottenere una migliore proliferazione cellulare e la massima differenza di crescita in presenza di MC rispetto al M s/s, il che indica una maggiore sensibilità alla presenza dei fattori di crescita presenti nel MC.

I.3.2 Proliferazione cellulare di LP liquido e liofilizzato, fresco e in stabilità

Il test di proliferazione cellulare è stato utilizzato per valutare l'attività del LP fresco, del LP sottoposto a processo di liofilizzazione (f.d.) ed a differenti condizioni di stabilità (4°C e 25°C) per 15 giorni.

In Figura I.3 sono riportati i risultati ottenuti per il test di proliferazione condotto su LP fresco, LP fresco conservato a 4°C per 15 giorni (LP/4°C stab), LP liofilizzato (LP f.d.), LP liofilizzato e mantenuto in stabilità per 15 giorni a 4°C (LP f.d./4°C stab) e a 25°C (LP f.d./25°C stab), diluiti in M s/s ad ottenere una diluizione 1:40. La diluizione 1:40 è stata scelta sulla base di lavori sperimentali svolti in precedenza [Sandri et al., 2011; Sandri et al., 2012; Rossi et al., 2013a], dove questa diluizione era risultata quella che produceva i migliori risultati quando il LP veniva posto a contatto con il substrato cellulare.

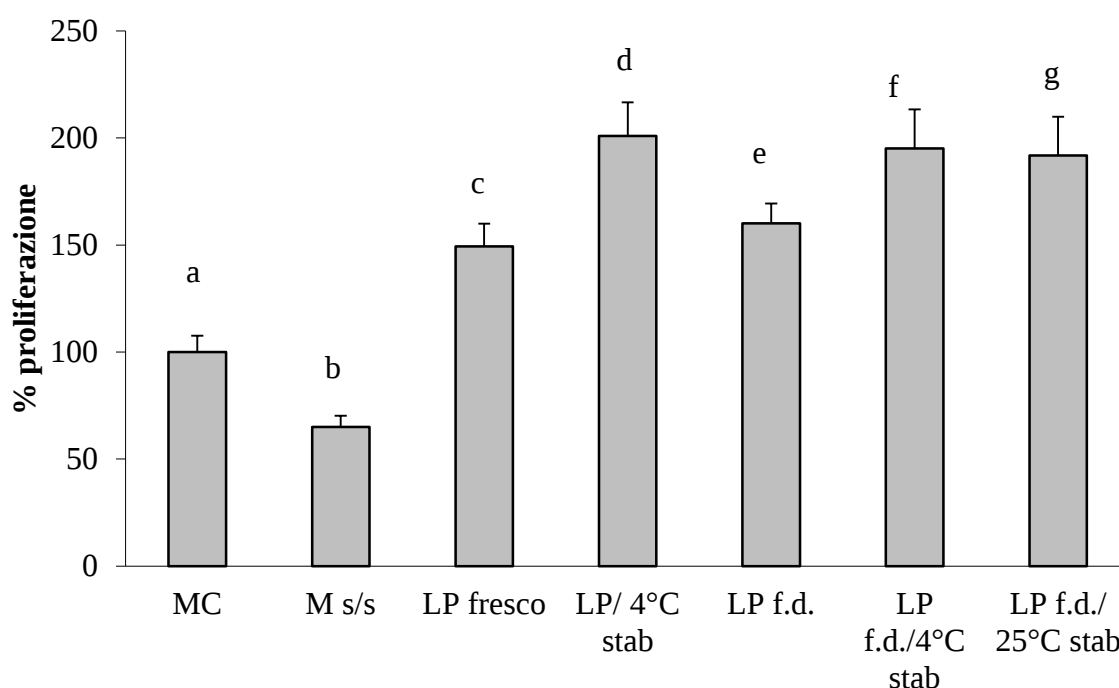


Figura I.3: Valori di proliferazione cellulare % valutati per LP tale quale (LP fresco), LP fresco conservato a 4°C per 15 giorni (LP/4°C stab), LP liofilizzato (LP f.d.), LP liofilizzato e mantenuto in stabilità per 15 giorni a 4°C (LP f.d./4°C stab) e a 25°C (LP f.d./25°C stab) a seguito di diluizione in M s/s (1:40) (valori medi ± es; n=8) significatività statistica ($p < 0.05$): c vs a/b; a vs b

Il LP è caratterizzato da un valore di proliferazione % significativamente ($p < 0.05$) superiore al Ms/s e al MC, a dimostrare l'azione del pool di fattori di crescita presenti nel LP. Inoltre, si può osservare che il processo di liofilizzazione non modifica in modo significativo le proprietà di proliferazione

cellulare del LP, a seguito di conservazione del fresco e del liofilo a 4°C, e dopo conservazione del liofilo a 25°C.

I.3.3 Analisi dei fattori di crescita (test ELISA)

In Figura I.4 sono riportati i risultati del dosaggio del fattore di crescita PDGF AB, rappresentativo del pool di fattori di crescita contenuti nel LP. In particolare sono espresse le % di PDGF AB presenti nei campioni LP fresco in stabilità per 15 giorni a 4°C, LP liofilizzato, LP liofilizzato e mantenuto in stabilità per 15 giorni sia a 4°C che a 25°C, per confronto al LP fresco.

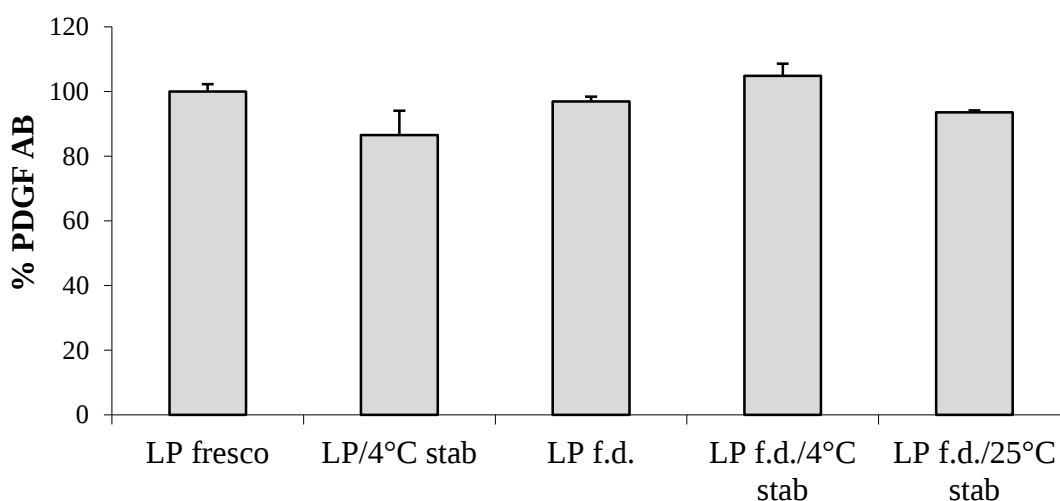


Figura I.4: % di PDGF AB presenti nei campioni LP fresco in stabilità per 15 giorni a 4°C, LP liofilizzato, LP liofilizzato e mantenuto in stabilità per 15 giorni sia a 4°C che a 25°C, per confronto al LP fresco (valori medi $\pm$ es; n=3)

Dai risultati ottenuti si è potuto notare come l'attività del fattore di crescita non è influenzata dalle condizioni di conservazione o dal processo di liofilizzazione.

Tale risultato risulta essere in accordo con la valutazione dell'attività biologica del LP tramite il test di proliferazione cellulare. Il processo di liofilizzazione e la conservazione del liofilo non determinano l'inattivazione del LP.

I.4 Conclusioni

I fibroblasti umani normali di bambino (bNHDF) seminati con concentrazione pari a 20000 cellule/pozzetto sono caratterizzati dalla maggiore sensibilità alla presenza di fattori di crescita nel mezzo. La sensibilità si è dimostrata conservata sino al passaggio 17. Il test risulta così validato per l'uso che si propone.

L'applicazione del test di proliferazione cellulare ha permesso di determinare che la liofilizzazione del LP e la sua conservazione come liofilo a 2-8°C e a 25°C per 15 giorni non ne alterano le proprietà ed inoltre non comportano perdite nel titolo di PDGF AB e quindi la sua inattivazione.

Il test di proliferazione ha consentito di ottenere risultati che possono essere correlati con la concentrazione del fattore di crescita PDGF AB.

Tenendo conto della complessità degli eventi biologici che determinano la guarigione di una lesione e la numerosità di fattori coinvolti, il dosaggio di uno o più fattori di crescita, anche con metodo ELISA, risulta non del tutto sufficiente a caratterizzare l'attività biologica del lisato piastrinico nella sua completezza. Al contrario il test di proliferazione cellulare consente una valutazione complessiva delle proprietà di promozione della crescita del lisato piastrinico e quindi può essere considerato uno strumento maggiormente sensibile e completo.

Se a questo test si affianca anche il test in vitro di "wound healing", che verrà descritto nel capitolo successivo, si possono ottenere anche informazioni sull'evoluzione e sulla cinetica del processo di proliferazione cellulare.

II. Capitolo

**Rilascio combinato di lisato piastrinico e vancomicina
cloridrato: polvere a base di calcio alginato**

II.1 SCOPO DEL LAVORO

Scopo di questo lavoro è stato lo sviluppo di una polvere aspersoria in grado di veicolare LP ed un antibiotico “modello”, vancomicina cloridrato (VCM), da utilizzare nel trattamento delle ulcere cutanee. Tale polvere è stata ottenuta per liofilizzazione di “beads” preparati per estrusione di una soluzione di sodio alginato in una soluzione di calcio cloruro.

I “beads” liofilizzati (particelle di calcio alginato), una volta applicati sulla ferita, dovevano essere in grado di assorbirne l’essudato formando un gel e di rilasciare le sostanze biologicamente attive contenute.

Il lavoro si è articolato in due fasi: la prima fase ha avuto come obiettivo l’individuazione delle condizioni sperimentali ottimali per la preparazione delle particelle di calcio alginato. Le condizioni sperimentali considerate sono state: grado viscosimetrico del sodio alginato, concentrazione della soluzione di sodio alginato, concentrazione della soluzione di calcio cloruro, tempo di riposo dei “beads” nella soluzione di calcio cloruro e dimensione degli aghi. Le particelle di calcio alginato ottenute sono state caratterizzate per dimensione e capacità di idratarsi a contatto con PBS (Phosphate Buffered Saline), mezzo utilizzato per mimare l’essudato delle ulcere.

Una volta stabilite le condizioni più appropriate, si è proceduto, in una seconda fase, al caricamento delle particelle di calcio alginato con LP e con VCM. Esse sono state caratterizzate per efficienza di incapsulazione e/o capacità di caricamento e per le proprietà di rilascio *in vitro*. Le particelle caricate con LP sono stati quindi sottoposti a test *in vitro* di proliferazione cellulare e di “wound healing” su fibroblasti umani per valutare l’influenza degli eccipienti e delle condizioni di preparazione sull’attività del LP.

II.2 MATERIALI E METODI

II.2.1 Materiali

Acetonitrile (Carlo Erba, Milano, I); Anti-mouse IgG-FITC antibody (Sigma Aldrich, Milano, I); 5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) (Sigma Aldrich, Milano, I); Calcio cloruro: (Carlo Erba Reagenti, Milano, I); DMSO (Dimetil Solfo) (Sigma Aldrich, Milano, I); Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM, Lonza, BioWhittaker, B); Dulbecco's Phosphate Buffer Solution (Sigma Aldrich, Milano, I); Hank's Balance Salt Solution (HBSS) (Sigma Aldrich, Milano, I); Hoechst 33258 (Sigma Aldrich, Milano, I); Inactivated foetal calf bovine serum (Euroclone, Pero, I); Mouse anti- Bromo-deoxyuridine antibody (anti-BrdU antibody) (Amersham Bioscience, USA); Mowiol (Sigma Aldrich, Milano, I); $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Carlo Erba, Milano, I); MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma Aldrich, Milano, I); $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Carlo Erba, Milano, I); NaCl (Carlo Erba, Milano, I); Vancomicina: cloridrato (USP) (Pharmatex Italia S.R.L., Milano, I); Penicillin streptomycin 100x (pen/strep)/amphoteric 100x (Sigma Aldrich, Milano, I); Trypsin-EDTA solution (Sigma Aldrich, Milano, I); Trypan Blue solution (Biological Industries, Beit-Haemek, IL); PTA-blocking solution (PBS/Tween20/Albumin) (Sigma Aldrich, Milano, I); Sodio alginato Media Viscosità: da alghe brune, viscosità di una soluzione al 2% a 25 °C ~ 3500 cps, (Sigma-Aldrich, Milano, I); Sodio alginato Bassa Viscosità: da alghe brune, viscosità di una soluzione al 2% a 25 °C ~ 250 cps, (Sigma-Aldrich, Milano, I).

Lisato piastrinico: fornito dal reparto di Immunoematologia ed Aferesi del IRCCS Policlinico S.Matteo, Pavia. (vedi paragrafo I.2.1)

II.2.2 Preparazione dei “beads” liofilizzati non carichi (particelle di calcio alginato)

Le particelle di calcio alginato sono state preparate per interazione ionica, utilizzando differenti condizioni sperimentali: viscosità di sodio alginato, concentrazione di CaCl_2 , tempo di permanenza dei “beads” nella soluzione di CaCl_2 e dimensione dell'ago. In particolare, 1 ml di una soluzione acquosa di sodio alginato (SA), bassa (LV) e media (MV) viscosità, preparata a diverse concentrazioni (0.5, 0.75, 1, 2% p/p) è stata gocciolata attraverso due tipi di ago (30G: 0.30 Ø x 12.7 mm - 32G: 0.26 Ø x 4mm) in 30 ml di una soluzione acquosa di CaCl_2 (0.5 - 1% p/p). I “beads” così formati sono stati mantenuti per tempi differenti (10 e 30 minuti) nella soluzione di CaCl_2 . I “beads” sono stati filtrati sotto vuoto, congelati a -40 °C e successivamente liofilizzate

(Heto DRY WINNER® , Analticia De Mori, Milano, I) per ottenere una polvere di particelle di calcio alginato.

II.2.3 Caratterizzazione delle particelle di calcio alginato

II.2.3.1 Valutazione delle dimensioni

Le dimensioni delle particelle di calcio alginato sono state valutate tramite microscopio ottico (Leica DMI 3000B), fornito di una fotocamera interna e programma PC Leica Application Suite EZ V1.8.1 (Leica Microequipments, Milan, Italy). Sono state analizzate sei particelle per campione.

II.2.3.2 Valutazione delle proprietà di idratazione

Le proprietà di idratazione delle particelle sono state valutate mediante il sistema di Enslin modificato, utilizzando PBS (Phosphate Buffered Saline, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.036% p/p, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.137% p/p, NaCl 0.85% p/p) come mezzo mimante l'essudato della ferita. Sono state analizzate tre repliche per campione. Come esempio in Figura II.1 sono riportate le fotografie delle particelle di SA MV/ 1% (p/p) CaCl_2 poste a contatto per differenti tempi (0, 2 e 4h) con PBS.



Figura II.1: Fotografie delle particelle di SA MV/ 1% (p/p) CaCl_2 a contatto per differenti tempi (0, 2 e 4h) con PBS, mezzo mimante l'essudato.

II.2.3.3 Valutazione delle proprietà di proliferazione cellulare

Fibroblasti NHDF (umani normali di derma da prepuzio di bambino) (Promocell GmbH, Heidelberg, G) sono stati utilizzati come linea cellulare tra il passaggio 6 e 16.

Le cellule sono state mantenute in coltura come descritto nel paragrafo I.2.2.

Per il test di proliferazione cellulare, sono state seminate 2×10^4 cellule/pozzetto (0.35 cm^2 area) in una piastra da 96 pozzetti con i campioni test e sono state lasciate crescere per 24 h dopo la semina.

Le particelle di calcio alginato sono state ottenute da 1 ml di una soluzione 0.75% di SA LV e MV come descritto nel paragrafo II.2.2. Le particelle sono state dissolte in 1.5 ml di una soluzione di sodio citrato 55 mM (pH 6.8) e la soluzione ottenuta è stata diluita 1:20, 1:40 e 1:80 in M s/s. MC e M s/s sono stati utilizzati come controlli.

Dopo diluizione, 200 µl di ogni campione sono stati messi a contatto con le cellule per 24 h. Al termine di tale tempistica, i campioni sono stati rimossi e 50 µl di MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 8 µM in 100 µl di HBSS (pH 7.4) sono stati posti in ogni pozzetto e la piastra è stata lasciata in incubatore per 4h. Al termine, la soluzione contenente MTT è stata rimossa ed i cristalli insolubili di Formazan formati nelle cellule vive sono stati solubilizzati con DMSO. È seguita una lettura spettro-fotometrica alla lunghezza d'onda di 570 nm, con lunghezza d'onda di riferimento di 690 nm, attraverso IMark® Microplate reader (Bio-Rad Laboratories S.r.l., Segrate, Milan, I) dopo 60 secondi di agitazione. I risultati sono stati espressi come % di proliferazione, normalizzando le assorbanze ottenute dalle cellule a contatto con i campioni con la media di quelle ottenute per le cellule a contatto con M s/s. Per ogni campione sono state effettuate otto repliche.

II.2.4 Preparazione delle particelle di calcio alginato caricate con lisato piastrinico (LP) e vancomicina cloridrato (VCM)

Le particelle caricate con LP sono state preparate per gelificazione ionica come descritto nel paragrafo I.2.2. In particolare, 1 ml di miscela SA/LP è stata gocciolata (ago 32G) in 30 ml di una soluzione di CaCl₂ 1% p/p e lasciata nella soluzione per 10 minuti. Sono state considerate diverse quantità di LP per ml di miscela SA/LP: 0.25, 0.5 e 0.75 ml; mantenendo costante la concentrazione di SA allo 0.75% p/p.

Le particelle caricate con VCM sono state preparate per gelificazione ionica come descritto nel paragrafo I.2.2: l'antibiotico è stato aggiunto alla soluzione di SA 0.75% p/p ad una concentrazione di 0.03 mg/ml e il tempo di permanenza delle particelle nella soluzione di CaCl₂ è stato di 10 minuti.

II.2.5 Caratterizzazione delle particelle di calcio alginato caricate con LP e VCM

II.2.5.1 Valutazione delle dimensioni

Le dimensioni delle particelle di calcio alginato caricate con LP e VCM sono state valutate tramite microscopio ottico (Leica DMI 3000B), come descritto nel paragrafo II.2.3.1.

II.2.5.2 Valutazione del contenuto di PDGF AB e VCM

Le particelle di calcio alginate cariche ottenute da 1 ml di soluzione di SA contenente LP o VCM sono state dissolte in 1.5 ml di sodio citrato 55 mM (pH 6.8). Il contenuto di PDGF AB e VCM è stato determinato, rispettivamente, tramite test ELISA e idonea metodica HPLC, come di seguito descritto.

II.2.5.2.1 *Dosaggio di PDGF AB*

Il contenuto del fattore di crescita PDGF AB (platelet derived growth factor) rappresentativo del pool di fattori di crescita presenti nel LP è stato valutato tramite test ELISA (Human PDGF AB Quantikine PharmPak, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA; assay range: 31.2–2000 pg/ml) [Rossi et al., 2013a]. Nello specifico, è stata valutata la quantità di PDGF AB presente nel LP fresco (alla stessa concentrazione impiegata nella preparazione delle particelle) e nelle formulazioni, ed è stata calcolata la % di PDGF AB secondo la seguente equazione:

$$\%PDGF\ AB = (\text{quantità PDGF AB nel campione} / \text{quantità PDGF AB nel LP fresco}) \times 100$$

Sono state analizzate tre repliche per campione.

II.2.5.2.2 *Dosaggio di VCM*

La quantità di VCM caricata nella particelle è stata valutata attraverso opportuna metodica HPLC (Perkin Elmer® series 200; Perkin Elmer® Instruments, Sheldon, USA) con le seguenti condizioni sperimentali: colonna: Hypersil BDS C18: 4.6 x 150 mm (Ø= 5 µm, Sheldon HPLC, Cheshire, UK) termostata a 30°C; fase mobile: 90/10 pH 2.8 tampone fosfato (USP35)/acetonitrile (Carlo Erba, Milan, I); loop: 20 µl; flusso: 1 ml/min; λ: 230 nm.

La capacità di caricamento delle particelle è stata calcolata secondo la seguente equazione:

$$\text{Capacità di caricamento} = (\text{quantità VCM (mg) nelle particelle ottenute da 1 ml di miscela SA-VCM} / \text{peso (mg) particelle caricate}) \times 100$$

II.2.5.3 Valutazione in vitro delle proprietà di rilascio

La capacità delle particelle di calcio alginate di rilasciare PDGF AB e VCM è stata valutata utilizzando un bagno basculante termostato a 32°C. Le particelle di calcio alginate ottenute da 1

ml di miscela SA/VCM o SA/LP sono state messe a contatto con 10 ml di PBS per 3h nel bagno basculante (Falc WB-MBF, Falc Instruments, Bergamo, I) a 20 rpm. A tempi prefissati (2, 4 e 6 h) sono stati prelevati 500 μ l di mezzo e analizzati tramite dosaggio con test ELISA e HPLC per valutare, rispettivamente, il contenuto di PDGF AB e VCM come descritto nei paragrafi II.2.5.2.1 e II.2.5.2.2. Sono state considerate tre repliche per campione.

I profili di rilascio di VCM dalle particelle di calcio alginato sono stati valutati anche tramite cella di diffusione di Franz (Permeager, Bethlehem, PA, USA) con orifizio di diametro 20 mm (3.14 cm^2) (Figura II.2). Le camere donor e ricevente erano separate da una membrana (HA $0.45 \text{ }\mu\text{m}$; Millipore, Milano, I).

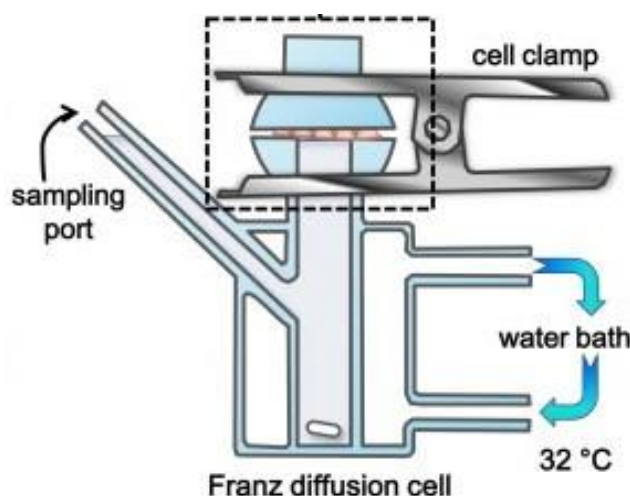


Figura II.2: Schema della cella di diffusione di Franz

La camera ricevente è stata riempita con una soluzione di PBS (mezzo mimante l'essudato) e mantenuta a temperatura costante di $32\text{ }^{\circ}\text{C}$ (temperatura della pelle) attraverso l'ausilio di una camicia esterna di termostatazione. Le particelle caricate con VCM e ottenute da 1 ml di miscela SA/VCM sono state posizionate su di un'area circolare (2 cm^2) di un filtro di carta posto nella camera donor, ed in seguito sono stati aggiunti 500 μ l di PBS. A tempi prestabiliti (2, 4 e 6 h), sono stati prelevati 500 μ l di mezzo dalla camera ricevente. Il rilascio di VCM è stato quantificato tramite opportuna analisi HPLC come descritto nel paragrafo I.2.5.2.2.

II.2.5.4 Valutazione delle proprietà di proliferazione

Le proprietà di proliferazione delle particelle di alginato caricate con LP sono state valutate come descritto nel paragrafo II.2.3.3. In particolare, le particelle caricate con LP sono state ottenute da 1 ml di una miscela di SA 0.75% e LP (0.25, 0.5 e 0.75 ml) (vedi paragrafo II.2.3). Le particelle sono state dissolte in 1.5 ml di sodio citrato 55 mM e diluite 1:40 in M s/s. CM e M s/s sono stati usati

come controlli. Il test di proliferazione è stato inoltre condotto con LP fresco e con le particelle di alginato non caricate (bianche), sottoposte allo stesso trattamento delle particelle caricate con LP (dissoluzione in sodio citrato 55 mM e diluizione in M s/s).

II.2.5.5 Valutazione della sintesi di DNA tramite incorporazione Bromo-deossiuridina (BrdU)

La valutazione della sintesi di DNA è stata effettuata tramite l'analisi morfologica immunofluorescente dell'incorporazione nucleare di BrdU per la valutazione delle cellule in fase di sintesi del DNA e quindi per l'analisi dell'attività proliferativa dell'intera popolazione cellulare trattata con i campioni d'interesse.

Per verificare l'attività proliferativa delle cellule dopo trattamento con i campioni (particelle di calcio alginato caricate e non con LP, LP fresco, M w/s e CM), è stata analizzata la sintesi del DNA valutando, l'incorporazione della Bromodesossiuridina (5-Bromo-2'deoxyuridine, BrdU) in tutte le cellule cresciute su vetrino [Dean et al., 1984; Hall and Levison,1990]. La BrdU, essendo un analogo della timidina, se aggiunto al mezzo di coltura, viene facilmente incorporato dalla molecola di DNA nelle cellule in fase S del ciclo cellulare.

A tale scopo, 5×10^4 cellule/cm² sono state seminate su un vetrino coprioggetto (20x20 mm) e lasciate crescere a contatto con i campioni per 24h in incubatore. Ad un'ora dal termine dell'esperimento, le cellule sono state marcate aggiungendo 30 µM di BrdU al mezzo di coltura. Successivamente, i campioni sono stati rimossi e le cellule sono state lavate con PBS, fissate in etanolo 70% e i vetrini conservati a -20°C. L'incorporazione della BrdU è stata valutata attraverso la reazione di immunomarcatura mediante anticorpo anti-BrdU (Amersham). A tale scopo, i vetrini sono stati scongelati, lavati con PBS e sottoposti ad idrolisi del DNA attraverso incubazione in HCl 2N per 30 minuti a temperatura ambiente. Dopo un rapido lavaggio con PBS, le cellule sono state neutralizzate con tetraborato di sodio 0.1 M (pH 8.5) per 15 minuti, lavate due volte con PBS e incubate per 20 min con una soluzione bloccante PTA (1% (p/v) BSA, 0.02% (p/v) Tween20 in PBS). Le cellule sono state poste in incubazione per 1 h con l'anticorpo anti-BrdU, diluito 1:100 in PTA, lavate tre volte con PTA ed incubate per altri 30 minuti con l'anticorpo anti- IgG FITC coniugato, diluito 1:100 in PTA. Infine, i vetrini sono stati ulteriormente lavati in PBS ed incubati per 5 min in PBS contenente il colorante fluorescente Hoechst 33258 [0.5 µg/ml], che legandosi al solco minore del DNA controcolora in blu i nuclei delle cellule. Infine, i vetrini sono stati montati con Mowiol (Sigma-Aldrich). L'osservazione e l'analisi delle cellule immunomarcate sono state effettuate mediante microscopio a fluorescenza Zeiss Axiophot (Carl Zeiss, Oberkochen, G) e le immagini acquisite con camera digitale Coolpix 950 (Nikon).

L'analisi dell'attività proliferativa delle cellule in seguito a trattamento con i campioni è stata così valutata effettuando un conteggio delle cellule in fase S, positive all'immunomarcatura anti-BrdU, aventi una caratteristica puntinatura nucleare verde fluorescente, sul totale delle cellule con nucleo blu fluorescente. Sono state contate almeno 500 cellule per ogni campione e gli esperimenti sono stati replicati per almeno tre volte.

II.2.5.6 Test di “wound healing”

Questo test è stato eseguito sugli stessi campioni sottoposti al test di proliferazione cellulare. La diluizione considerata in M s/s è stata 1:40. Tale test, a differenza del test di proliferazione, è qualitativo e prevede l'impiego di piastre di petri (μ -Dish 35 mm, low Culture-Insert, ibidi GmbH, München, Germany); si basa sulla capacità dei fibroblasti di migrare in zone prive di cellule a formare un monostrato, caratteristica questa che si riscontra anche nel processo di rigenerazione tissutale vero e proprio. Sulla piastra di petri è posizionato un inserto in silicone, che crea due pozzetti con area di 0.22 cm^2 ciascuno e separati da uno spazio di circa $500 \mu\text{m}$ (Figura II.3). I fibroblasti sono stati seminati ad una concentrazione di circa 10^5 cellule/ cm^2 in MC; successivamente, le piastre contenenti le cellule all'interno degli inserti sono state poste in incubatore per 24h, per permettere alle cellule di aderire in monostrato sul fondo delle piastre. Una volta che le cellule avevano aderito al fondo (24h), è stato aspirato il mezzo di coltura e l'inserto è stato tolto: si sono quindi notate due zone dove i fibroblasti sono cresciuti, separate da uno spazio (detto gap) di circa $500 \mu\text{m} \pm 50 \mu\text{m}$. Il campione ($500 \mu\text{l}$) è stato quindi messo a contatto con le cellule; le petri sono state poi poste in incubatore e fotografate a vari periodi di tempo ($T=0, 24, 48, 72 \text{ h}$), fino ad osservare la chiusura dello spazio tra i due “tappeti” di cellule; le fotografie sono state effettuate mediante microscopio ad ottica inversa Leica DMI 3000B dotato di fotocamera interna con programma informatico per PC Leica Application Suite EZ V 1.8.0 e V 1.8.1 per Windows (Leica Microequipments, Milano, I).

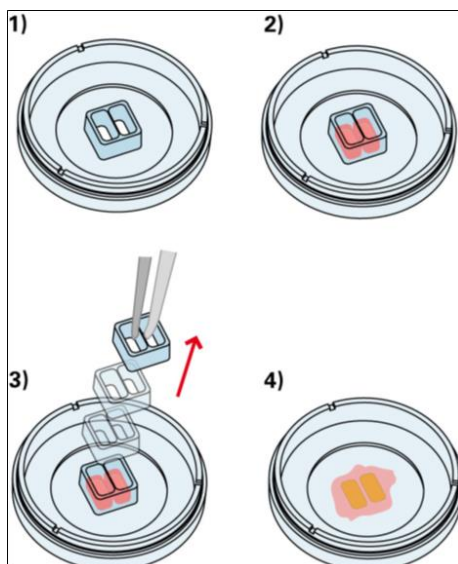


Figura II.3: Schema esplicativo del test di “Wound Healing”

II.2.6 Analisi statistica

I dati sperimentali ottenuti dalle differenti misure sono stati, quando possibile, sottoposti ad analisi statistica grazie al software Statgraphics 5.0 (Statistical Graphics Corporation, Rockville, MD, USA). In particolare è stato utilizzato il test Anova una via e Multiple range.

II.3 RISULTATI E DISCUSSIONE

II.3.1 Caratterizzazione delle particelle di calcio alginato non caricate (bianche)

II.3.1.1 Dimensioni

In Figura II.4 (a,b,c) sono riportate le dimensioni delle particelle di calcio alginato ottenute utilizzando diverse condizioni sperimentali: concentrazioni differenti di SA LV (0.5, 0.75, 1 e 2% p/p) e CaCl_2 (0.5 e 1% p/p), dimensioni dell'ago (30 e 32G), tempo di permanenza nella soluzione di CaCl_2 (10 e 30 minuti).

Si può osservare come una diminuzione della concentrazione di SA fino ad un valore di 0.75% (p/p) produca una diminuzione statisticamente significativa ($p < 0.05$) delle dimensioni delle particelle. Una ulteriore diminuzione della concentrazione di SA (0.5% p/p) non ha causato alcuna variazione nelle dimensioni. La concentrazione di CaCl_2 influenza in modo significativo la dimensione delle particelle, solo per le concentrazioni di SA pari a 2 % (p/p) (Figura II.4a). Come ci si aspettava, l'utilizzo di un ago a dimensioni inferiori è in grado di produrre una significativa ($p < 0.05$) diminuzione nelle dimensioni delle particelle (Figura II.4b). Inoltre, paragonando i risultati ottenuti per le particelle preparate con due differenti gradi viscosimetrici di SA (LV e MV) alla stessa

concentrazione 0.75% p/p (Figure II.4b e c) si può notare come il peso molecolare del polimero sia in grado di influenzare in modo significativo ($p < 0.05$) le dimensioni delle particelle: aumentando il peso molecolare (MV) si osserva un aumento delle dimensioni. Diversamente, il tempo di permanenza delle particelle nella soluzione di CaCl_2 non produce alcuna significativa variazione nelle dimensioni delle particelle (Figure II.4c).

Sulla base di tali risultati, sono state scelte le seguenti condizioni sperimentali come ottimali per ottenere particelle di dimensioni inferiori: SA 0.75% p/p (LV e MV) e ago 32G.

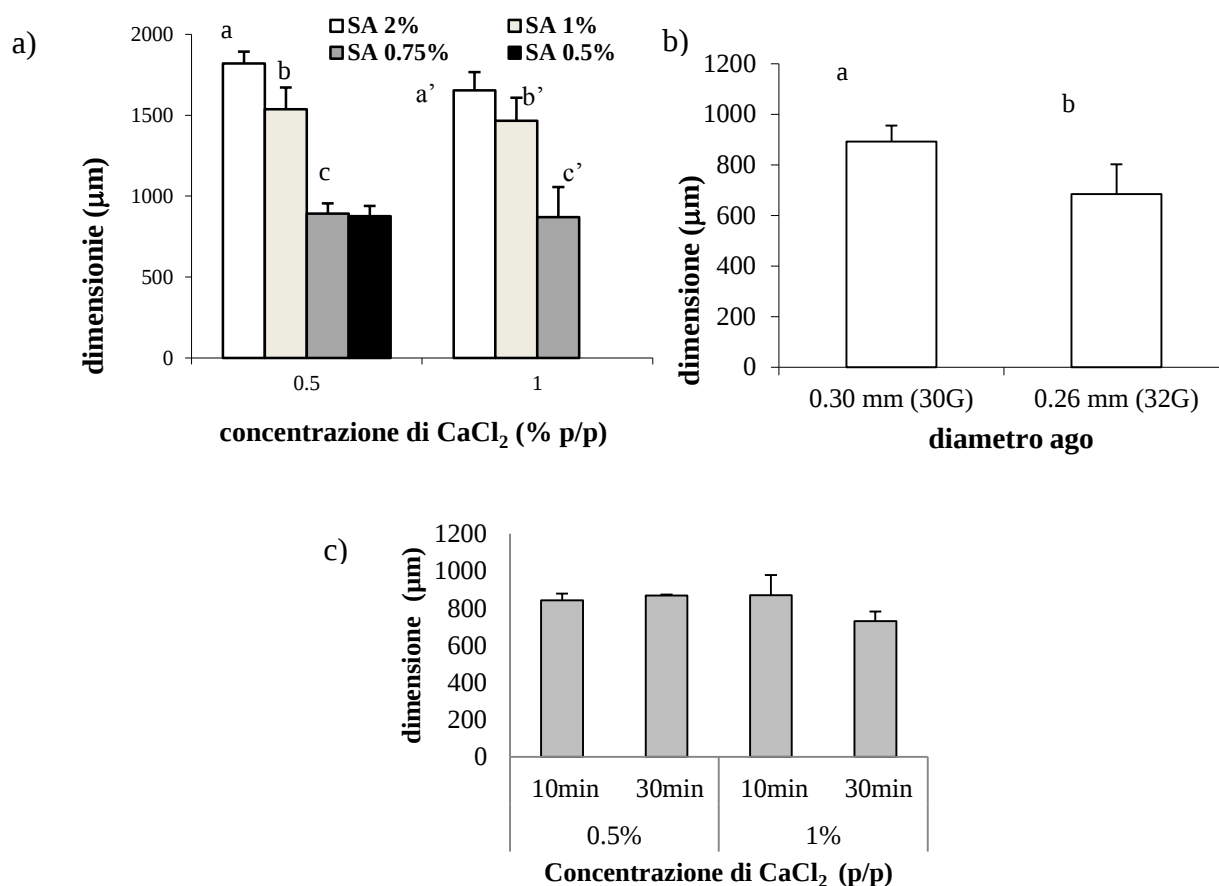


Figura II.4 (a,b,c): Influenza delle condizioni sperimentali sulle dimensioni delle particelle (valore medio $\pm$ s.d.; n=3):

- a) dimensioni delle particelle in funzione delle concentrazioni di SA LV e CaCl₂ (ago 30G; tempo permanenza 10 minuti) – significatività statistica ($p < 0.05$): a vs b; b vs c; a vs a'; a' vs c'; b' vs c';
- b) dimensioni delle particelle in funzione del diametro dell'ago (0.75% p/p SA LV; 0.5% p/p CaCl₂; tempo di permanenza: 10 min) - significatività statistica ($p < 0.05$): a vs b;
- c) dimensioni delle particelle in funzione del tempo di permanenza e della concentrazione in CaCl₂ (0.75% p/p SA MV, 0.5% p/p CaCl₂, ago 32G).

II.3.1.2 Proprietà di idratazione

Le particelle di calcio alginato ottenute con SA 0.75% p/p a due differenti pesi molecolari (LV e MV) e con CaCl₂ 0.5% e 1% p/p sono state sottoposte a misure di idratazione dinamica. Tutte le particelle sono in grado di idratarsi e gelificare in PBS. L'assorbimento del tampone provoca un rigonfiamento delle particelle, seguito da una loro lenta dissoluzione. Questo fenomeno è dovuto allo scambio tra gli ioni Ca⁺⁺ presenti nelle particelle e gli ioni Na⁺ presenti nel tampone.

In Figura II.5 sono riportati i profili della quantità di PBS assorbito per unità di peso vs tempo delle particelle di calcio alginato. Dopo 4h tutte le formulazioni sono in grado di assorbire una quantità di

tampone superiore a 100 volte il loro peso. Questo comportamento è in grado di favorire il processo di riparazione tissutale, poiché, nel caso di lesioni croniche, l'essudato della ferita è ricco in metalloproteinasi ed elastasi polimorfonucleate, proteasi che distruggono il tessuto. Per questo motivo una caratteristica delle moderne medicazioni è quella di essere in grado di assorbire l'eccesso di essudato mantenendo un'umidità adeguata e funzionale al processo di guarigione [Boateng et al., 2008].

Il grado viscosimetrico del polimero non sembra influenzare la capacità delle particelle di calcio alginato di assorbire il tampone, le particelle preparate a partire da SA LV e MV presentano infatti profili paragonabili di PBS assorbito. Si può osservare invece un abbassamento dei profili a parità di grado viscosimetrico all'aumentare della concentrazione di CaCl_2 . Un aumento di tale concentrazione è infatti responsabile di una più lenta idratazione/dissoluzione delle particelle dovuta ad una maggior concentrazione di ioni Ca^{++} . Infatti un aumento delle concentrazioni di ioni Ca^{++} è responsabile di un più elevato grado di "cross-linking" del gel di alginato, che è causa di una più lenta idratazione e quindi dissoluzione delle particelle.

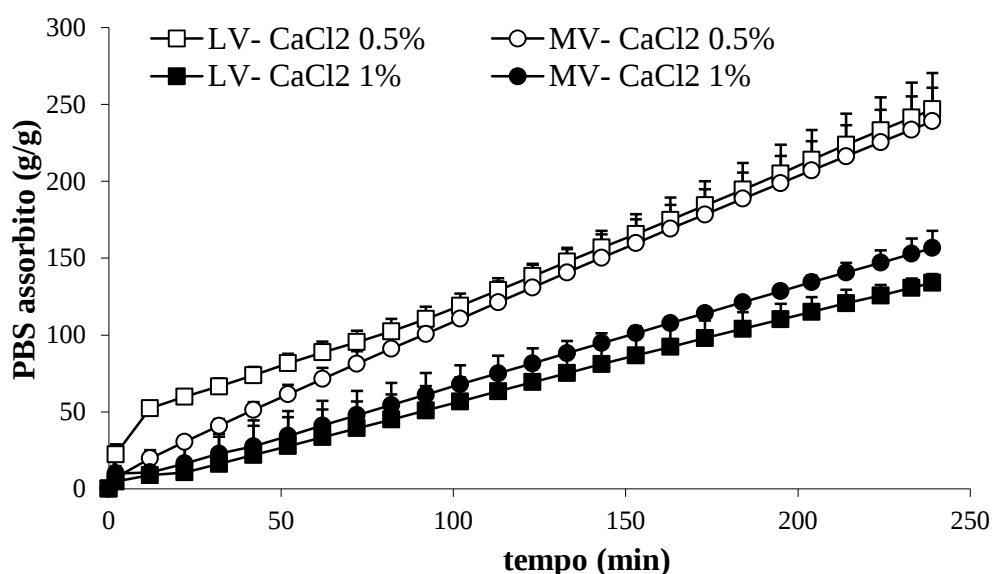


Figura II.5: Profili di tampone assorbito per unità di peso vs tempo delle particelle a base di SA LV e MV, preparate con due diverse concentrazioni di CaCl_2 (valori medi $\pm$ d.s.; $n=3$)

II.3.1.3 Proprietà di proliferazione cellulare

In Figura II.6 sono riportati i valori di % di proliferazione osservati per le particelle di alginato (MV) bianche dissolte in sodio citrato 55 mM e diluite in M s/s ad ottenere le seguenti diluizioni: 1:20, 1:40 e 1:80 v/v. Il MC e M s/s sono stati usati come controlli. Si può osservare come il mezzo

senza siero sia caratterizzato da un valore di proliferazione % significativamente minore ($p < 0.05$) rispetto al mezzo completo, ad indicare la capacità discriminante del test.

Le particelle a base di SA MV a tutte le diluizioni utilizzate (1:20, 1:40 e 1:80) ed indipendentemente dalla concentrazione di CaCl_2 sono caratterizzate da proprietà di proliferazione cellulare maggiori rispetto a quelle del Mw/s. E' riportato in letteratura che i sali di alginato sono in grado di promuovere la proliferazione cellulare [Thomas et al., 2000]. I risultati ottenuti per le particelle bianche dimostrano che tali proprietà si mantengono anche a seguito di liofilizzazione.

Per diluizioni superiori a 1:40 si osservano valori di proliferazione % maggiori (diluizione 1:80) al valore osservato per il MC. L'aumento delle proprietà di proliferazione cellulare osservate al crescere della diluizione (i.e. al diminuire della concentrazione del polimero) è probabilmente da ascrivere alla viscosità dei campioni che impedirebbe un corretto scambio di nutrienti tra il mezzo e le cellule. Lo stesso andamento si è osservato per le particelle a base di SA LV (dati non mostrati).

Nonostante la diluizione 1:40 sia penalizzante sulla "performance" delle particelle bianche, si è deciso di utilizzarla nei successivi esperimenti per non compromettere la capacità del test di evidenziare le proprietà di proliferazione cellulare del LP.

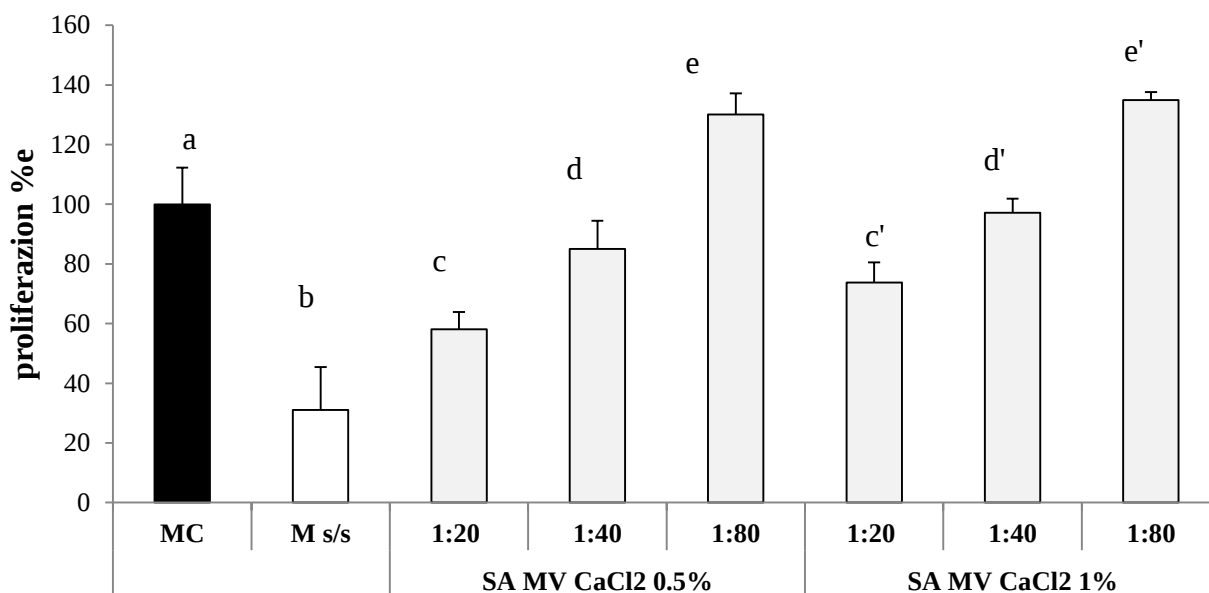


Figura II.6: valori di proliferazione% ottenuti per le particelle SA MV dissolte in sodio citrate 55 mM e diluite in Ms/s. Il mezzo completo (MC) e il mezzo senza siero (M s/s) sono stati utilizzati come controlli positivi (valori medi $\pm$ s.e.; $n=8$) – significatività statistica ($p < 0.05$): a vs b/c/e/c'/e'; b vs c/d/ e/c'/d'/e'

II.3.2 Caratterizzazione delle particelle di calcio alginato caricate con LP

II.3.2.1 Dimensioni

In Figura II.7 sono riportate le dimensioni delle particelle a base dei due diversi gradi viscosimetrici di SA, caricate con diverse quantità di LP (0.25- 0.5 – 0.75 ml per ml di miscela LP/soluzione polimerica). La concentrazione di CaCl_2 è stata mantenuta costante e pari a 1% p/p.

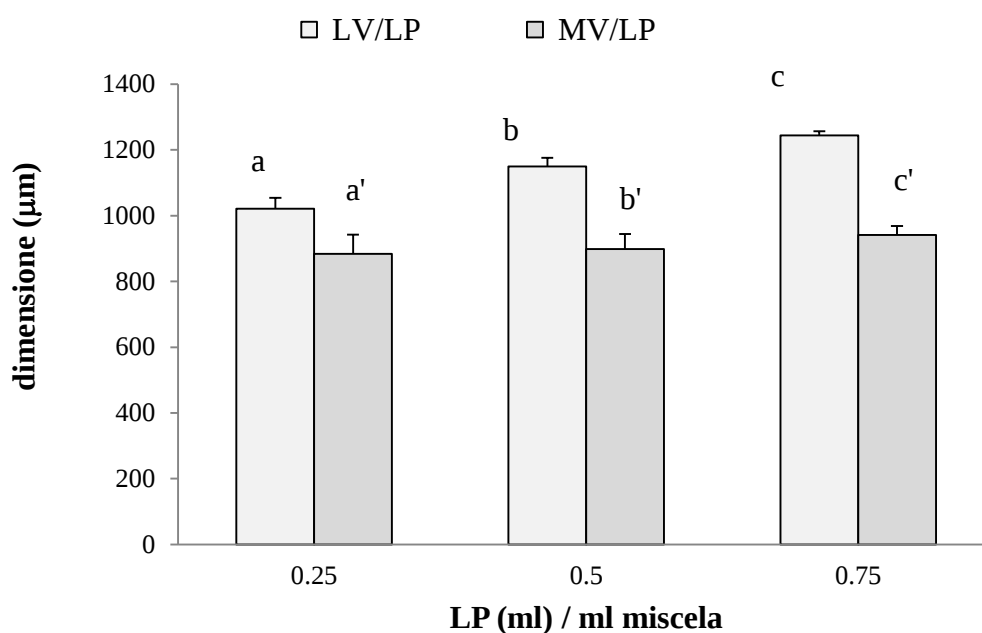


Figure II.7: Dimensioni delle particelle di calcio alginato preparate con i due diversi gradi viscosimetrici di SA e caricate con diverse quantità di LP (valori medi $\pm$ d.s.; $n=3$) – significatività statistica ($p < 0.05$): a vs b/c/a'; b vs c/b'; c vs c'

Il confronto tra i dati riportati in Figure II.7 evidenzia un aumento statisticamente significativo ($p < 0.05$) nelle dimensioni delle particelle a base di SA LV in seguito al caricamento con LP. Al contrario le particelle a base di SA MV non cambiano le loro dimensioni per l'aggiunta di LP. Solo nel caso delle particelle a base di SA LV si osserva un aumento delle dimensioni al crescere della quantità di LP caricato. Per tutte le quantità di LP caricato le particelle a base di SA LV risultano caratterizzate da dimensioni maggiori rispetto a quelle a base di SA MV.

Questo comportamento può essere attribuito a due differenti fattori: 1) un effetto maggiore del LP sulla viscosità della soluzione di SA LV rispetto alla soluzione SA MV: l'aggiunta di LP produce un maggiore aumento della viscosità per il grado viscosimetrico più basso di SA (SA LV), responsabile della formazione di gocce di dimensioni maggiori e, di conseguenza, anche di

particelle più grandi; 2) una struttura più compatta per il grado viscosimetrico più alto (MV) in presenza di ioni Ca^{++} : aumentando la concentrazione di LP, questo viene intrappolato nella struttura polimerica senza cambiare il volume occupato dalle catene del polimero.

II.3.2.2 Proprietà di proliferazione e di “wound healing”

In Figura II.8 sono riportati i valori di proliferazione % osservati per differenti diluizioni di LP fresco (1 :10, 1: 20, 1: 40 and 1: 80) in M s/s. MC e M s/s sono utilizzati come controlli. Tutte le diluizioni di LP, ad eccezione della diluizione 1:80, risultano caratterizzate da valori di proliferazione % statisticamente ($p < 0.05$) maggiori rispetto al MC. Questo comportamento è dovuto ai fattori di crescita presenti nel LP che favoriscono la proliferazione cellulare. Come previsto, si osserva un aumento nei valori di proliferazione % diminuendo la diluizione del campione.

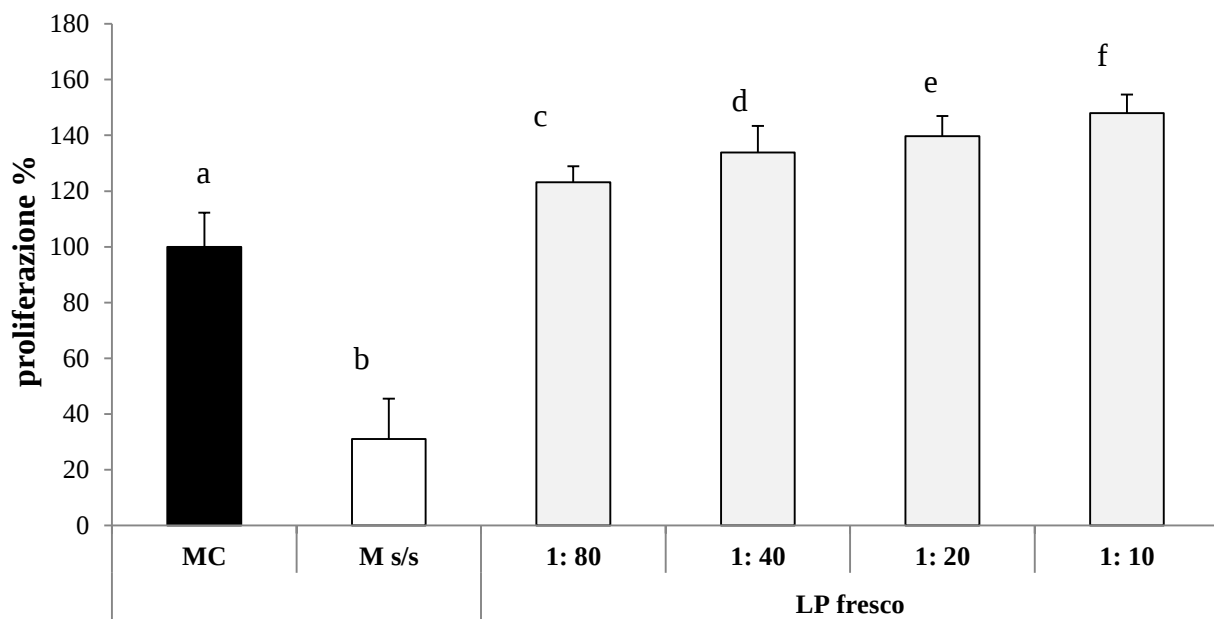


Figura II.8: valori di proliferazione% ottenuti per il LP fresco diluito in mezzo senza siero (M s/s). Il mezzo completo (MC) ed il mezzo senza siero (M s/s) sono stati utilizzati come controlli positivi (valori medi $\pm$ s.e.; $n=8$) – significatività statistica ($p < 0.05$): a vs b/d/e/f; b vs c/d/e/f; c vs e/f

Sulla base dei risultati di proliferazione ottenuti per le differenti diluizioni delle particelle di alginato bianche (Figura II.6) e delle differenti diluizioni del LP fresco (Figura II.8), 1:40 è stata scelta come diluizione appropriata per gli esperimenti condotti con le particelle di alginato caricate con LP. Tale diluizione dovrebbe permettere di mettere in evidenza sia le proprietà di proliferazione del LP che dell'alginato.

In Figura II.9 sono riportati i valori di proliferazione % osservati per LP fresco e per le particelle bianche e caricate con diverse concentrazioni di LP (0.25, 0.5 and 0.75 ml/ 1ml di miscela PL/alginato) in CaCl₂ 1% p/p, previa dissoluzione in una soluzione di sodio citrato. Il LP fresco è stato trattato con sodio citrato come le particelle. CM e M s/s sono stati usati come controlli.

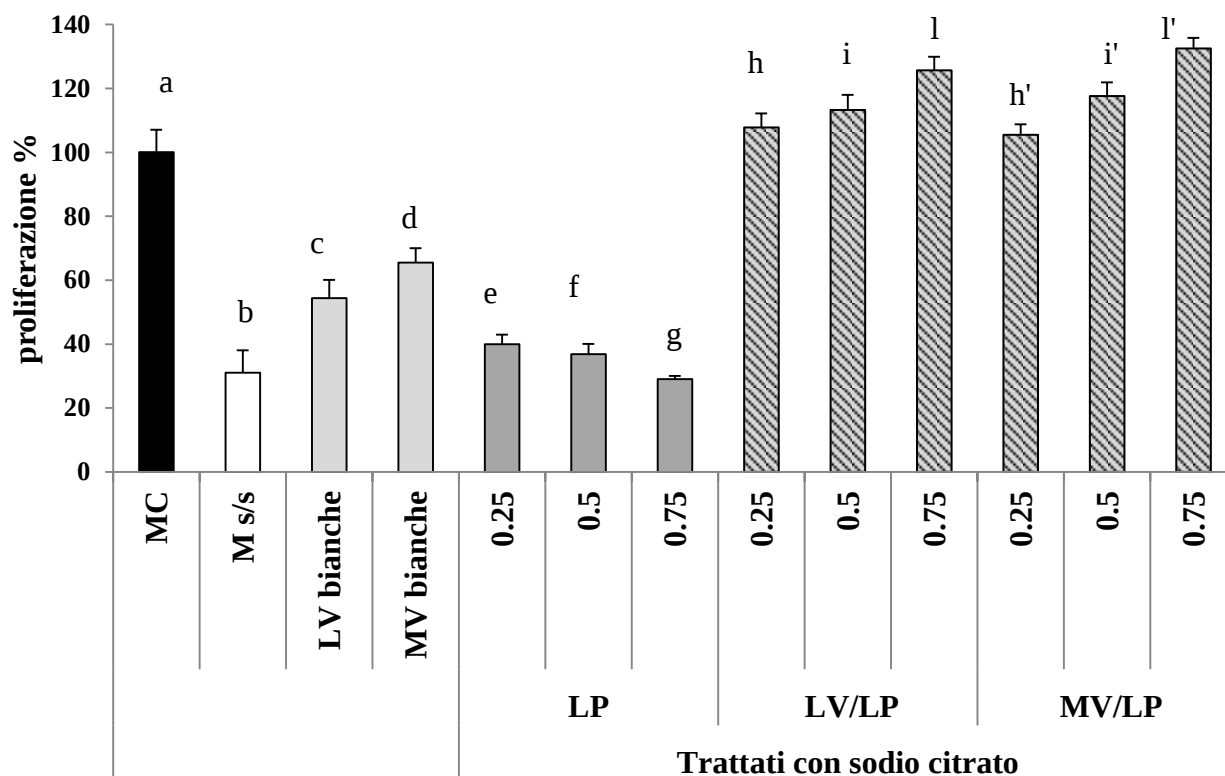


Figura II.9: Valori di proliferazione % osservati per le particelle a base di SA LV e MV caricate con diverse quantità di LP (valori medi $\pm$ e.s.; n=8). Le particelle erano dissolte in sodio citrato e diluite in Mw/s (1: 40 v/v). LP (sottoposto allo stesso trattamento delle particelle), MC, Mw/s e le particelle bianche sono state utilizzate come riferimento – significatività statistica ($p < 0.05$): a vs b/c/d/e/f/g/l/l'; b vs c/d/h/i/l/h'/i'/l'; c vs e/f/g/h/i/l; d vs e/f/g/h'/i'/l'; h vs l; h' vs l'.

Contrariamente a quanto osservato per il LP fresco (Figura II.8), il LP trattato con sodio citrato risulta caratterizzato da valori di proliferazione % decisamente inferiori a quelli osservati per il mezzo completo (MC) e per le particelle bianche. La ragione di questo comportamento è da ricercare o in un'azione di "disturbo" del sodio citrato nei confronti dei fattori di crescita contenuti nel LP. Inoltre, si può osservare come le particelle caricate con LP presentino valori di proliferazione % maggiori rispetto alle particelle bianche. Ciò sta ad indicare che le formulazioni sono in grado di caricare LP senza inficiarne le proprietà. La veicolazione del LP nelle particelle sembra esercitare un effetto di protezione dell'emoderivato nei confronti del sodio citrato, probabilmente dovuto alla presenza degli ioni Ca⁺⁺ capaci di interagire con il citrato.

In Figura II.10a sono riportate le percentuali delle cellule in fase proliferativa S del ciclo cellulare, osservate per le cellule messe a contatto con i diversi campioni: particelle bianche e caricate con LP trattate con sodio citrato, LP trattato con sodio citrato, per confronto ai controlli MC e M s/s.

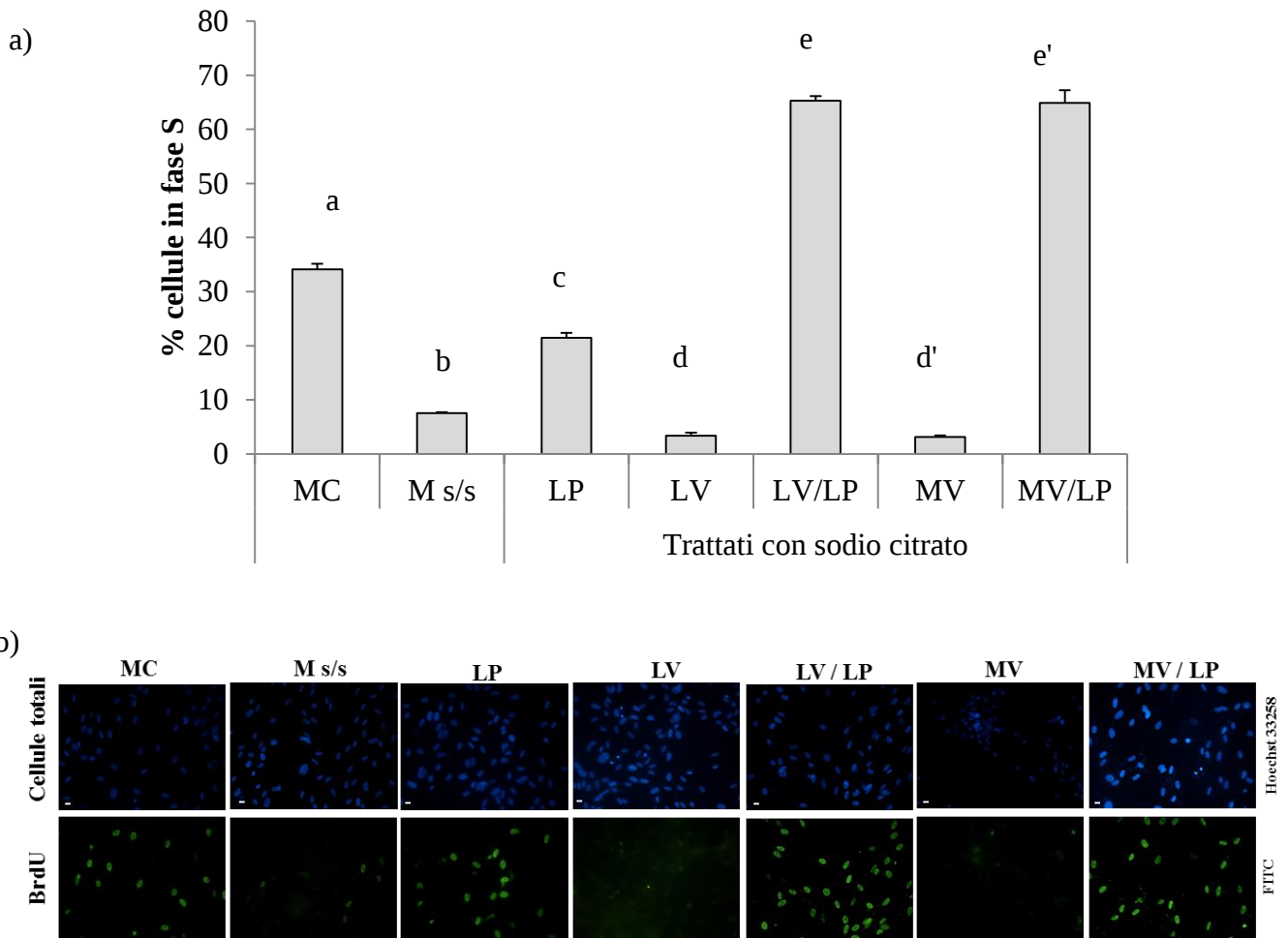


Figura II.10 (a,b): Risultati dell'incorporazione della BrdU : a) % del numero di cellule in fase S poste a contatto con le particelle caricate e non con LP (valori medi $\pm$ s.e.; $n=3$). Le particelle sono state dissolte in sodio citrato e diluite in M s/s (1:40 v/v). LP è stato trattato come le particelle, MC e M s/s sono stati usati come controlli; significatività statistica ($p<0.05$): a vs b/c; e vs a/b/c/d; e' vs a/b/c/d';

b) fotografie dell'attività proliferativa cellulare: i nuclei delle cellule sono stati colorati con Hoechst33258 (fluorescenza blu) e le cellule in fase proliferativa S sono state immunomarcate con anticorpo primario anti-BrdU e anticorpo secondario coniugato FITC (fluorescenza nucleo verde).
Scala: 10 μ m.

I valori più alti osservati sono stati ottenuti per le particelle caricate con LP. Il LP trattato con sodio citrato è caratterizzato da valori % di cellule significativamente minori rispetto a quelli osservati per il MC. Mentre differenze non significative sono state rilevabili per il M s/s, e le particelle di alginato LV e MV bianche. Dai risultati ottenuti si evince che il LP, quando caricato nelle particelle

di alginato, è in grado non solo di aumentare il numero di cellule vive (valori di proliferazione % osservati in Figura II.9), ma anche di aumentare in modo significativo il numero di cellule in fase S. I valori inferiori osservati per il LP fresco trattato con sodio citrato confermano l'azione di disturbo di questo sale su LP.

In Figura II.10b sono riportate, come esempio, alcune fotografie delle cellule in fase S (evidenziate dalla colorazione verde data dall'incorporazione della BrdU per tutti i campioni sopra citati.

In Figura II.11 è riportata, a titolo d'esempio, la fotografia del "gap" tra i due foglietti di cellule osservato nel test del "wound healing" immediatamente dopo contatto (T=0) con il MC.

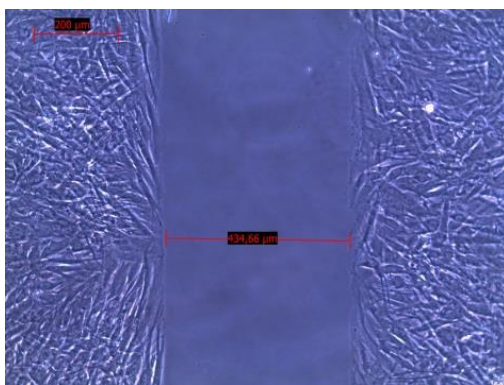


Figura II.11: Fotografia del "gap" tra i due foglietti di cellule osservato immediatamente dopo contatto (T=0) con il MC

In Figura II.12 (a, b) sono riportate le fotografie dei gap scattate dopo 24, 48 e 72 ore di contatto con i diversi campioni. Si può osservare che, sebbene dopo 24 h nessun campione produca una chiusura totale del "gap", la densità delle cellule nel "gap" risulta maggiore per il MC e per i campioni in presenza di LP ad eccezione del solo LP trattato con sodio citrato.

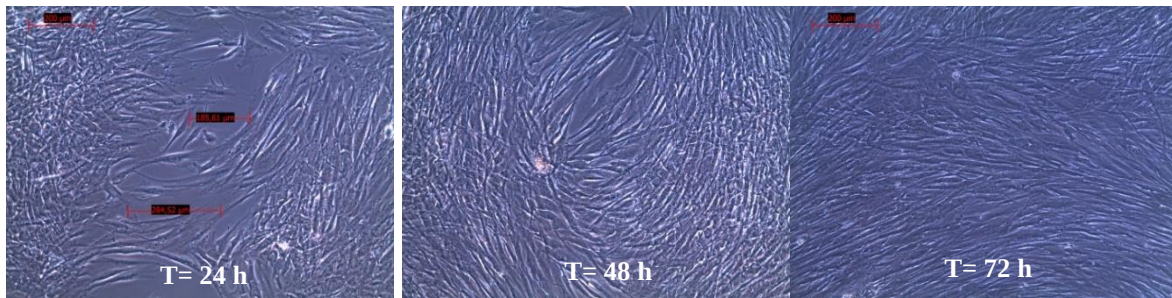
Dopo 48 h, si osserva una subconfluenza tra i due foglietti di cellule nel caso del MC, del LP in fisiologica e delle particelle caricate con LP. E' evidente una differenza nella densità cellulare nel caso dei due diversi gradi viscosimetrici del SA a favore del grado medio. Il "gap" risulta ancora aperto nel caso di LP in sodio citrato.

Dopo 72 h, si osserva la completa chiusura del "gap" per il MC, per il LP in fisiologica e per le particelle contenenti LP. Anche per il mezzo senza siero e per le particelle bianche si osserva la chiusura del "gap" con però una minor densità cellulare. Permane invece la presenza di un "gap" tra i foglietti cellulari nel caso del LP trattato con sodio citrato.

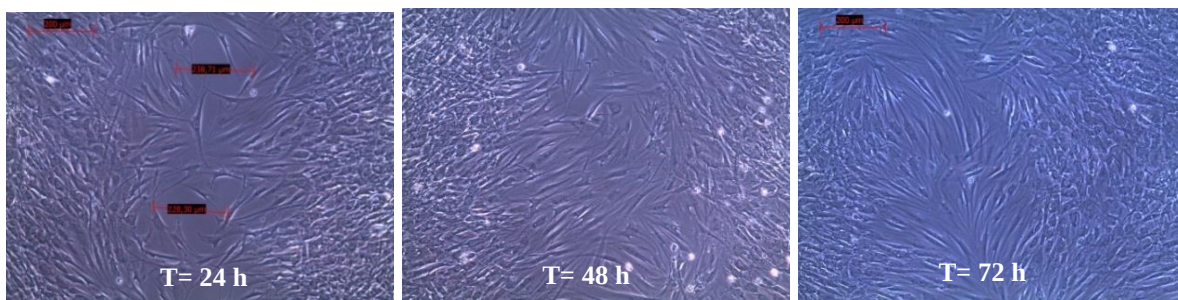
E' necessario sottolineare che tutti le particelle sono state dissolti in sodio citrato prima del test e in seguito diluite in M/s (1:40).

Il test del “wound healing” ha evidenziato che, anche a seguito di un prolungato contatto dei campioni con il substrato cellulare, le particelle caricate con LP presentano proprietà di riparazione tissutale migliori rispetto al loro controllo (LP in sodio citrato) e paragonabili a quelle del LP in fisiologica. Come già osservato nel test di proliferazione cellulare, il sodio citrato quando miscelato con LP interferisce con il processo di riparazione cellulare.

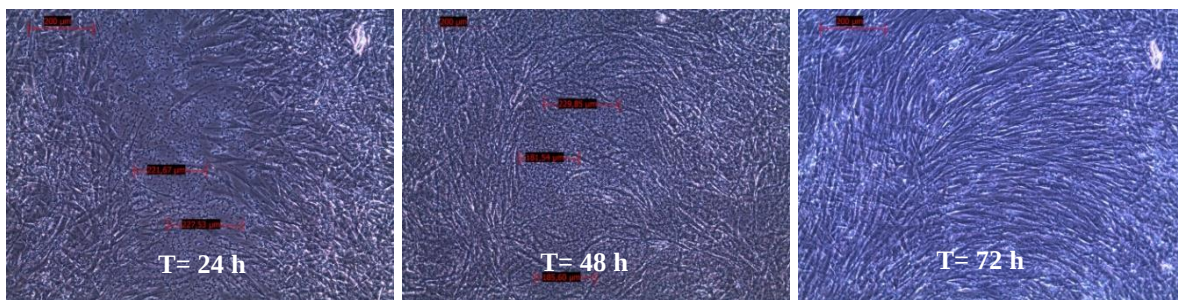
CM



M w/s



Fresh PL non trattato



Fresh PL trattato con Na citrato

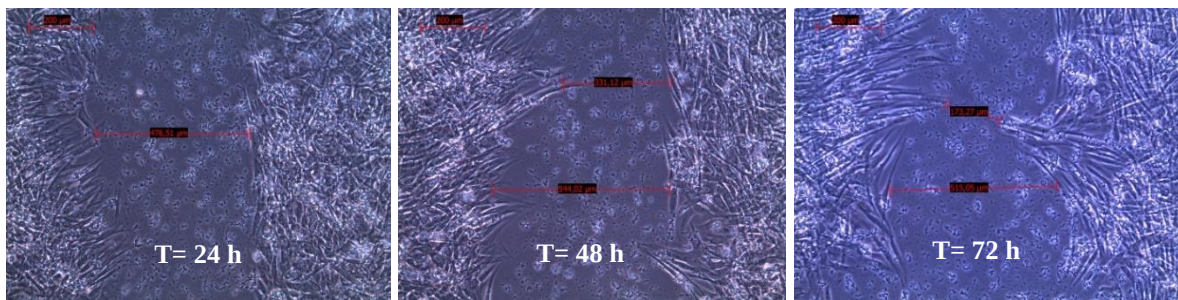
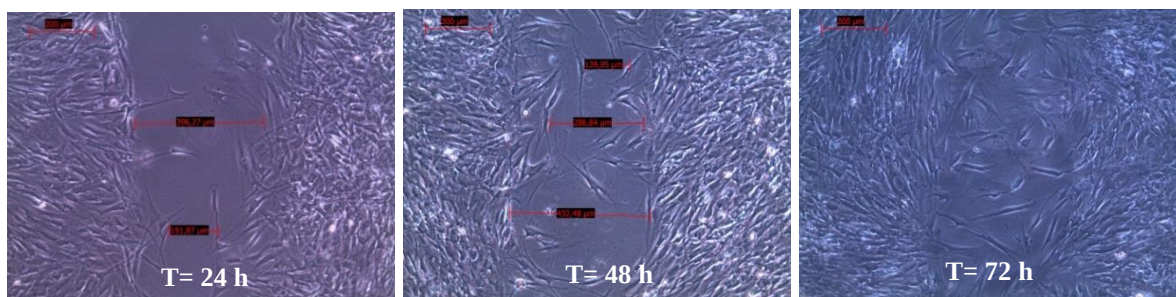
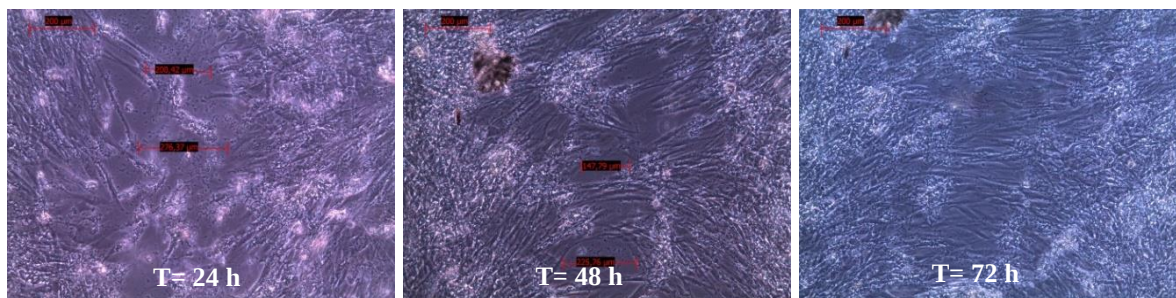


Figura II.12 a

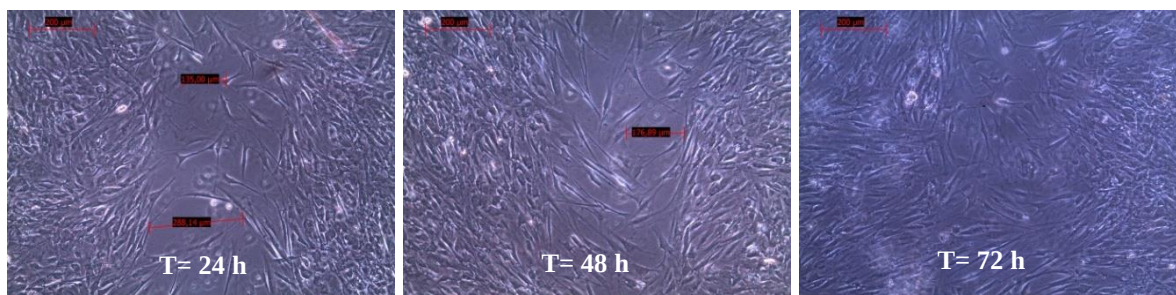
LV particelle trattate con Na citrato



PL/LV particelle trattate con Na citrato



MV particelle trattate con Na citrato



PL/MV particelle trattate con Na citrato

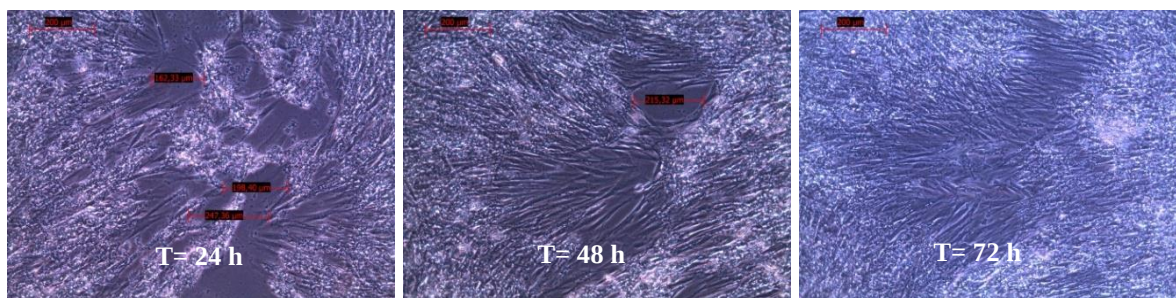


Figura II.12b

Figura II.12 (a,b): Fotografie dei “gap” tra i due foglietti di cellule scattate per i diversi campioni dopo 24, 48 e 72h di contatto

II.3.2.3 Valutazione della quantità di PDGF AB caricata

In Figura II.13 sono riportati i valori % di PDGF AB ottenuti per le particelle di alginato (LV e MV) caricate con LP (0.75 ml) e per LP fresco trattato con sodio citrato. LP fresco non trattato è stato usato come riferimento (100%).

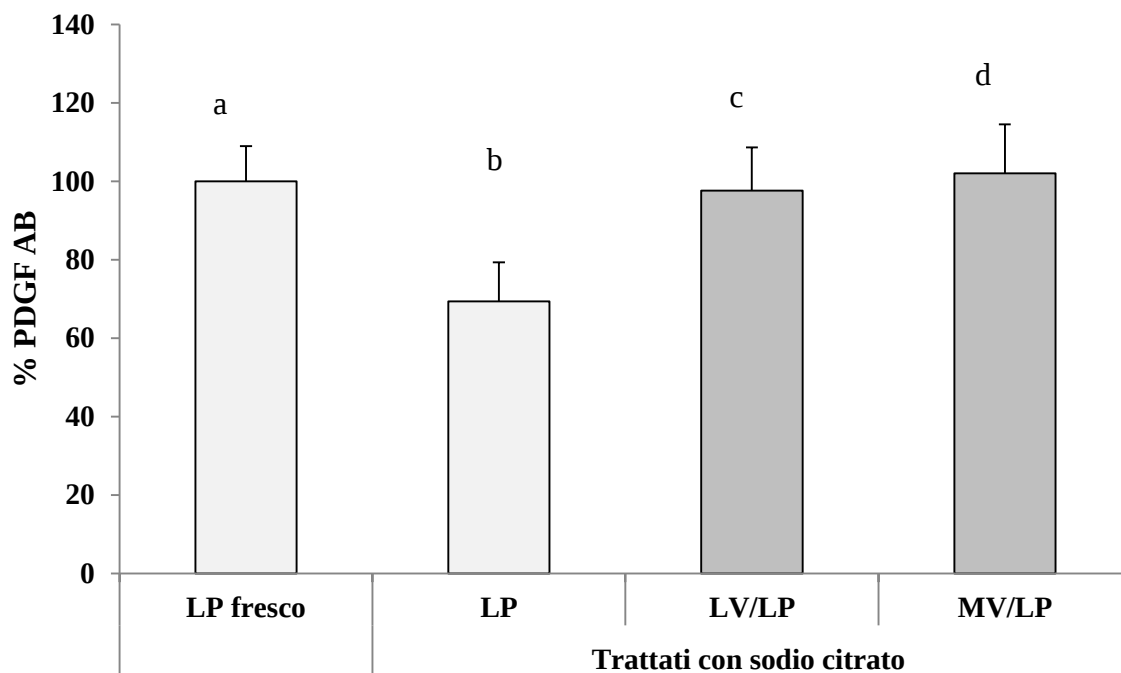


Figura II.13: Valori di PDGF AB% ottenuti per il LP caricato nelle particelle di SA (LV e MV) e per LP sottoposto allo stesso trattamento (Na citrato) delle particelle. Il LP fresco non trattato con Na citrato è stato usato come controllo (100%) (valori medi $\pm$ s.e.; n=3). significatività statistica ($p < 0.05$): b vs a/c/d

Come si può osservare non vi sono differenze statisticamente significative tra i valori di PDGF AB% ottenuto per le particelle caricate con LP ed LP fresco non trattato con sodio citrato.

LP, quando trattato con sodio citrato, è caratterizzato da valori di % di PDGF AB significativamente inferiori rispetto al valore osservato per LP fresco non trattato, tale risultato conferma i dati ottenuti nei test precedenti, per cui si può affermare che il sodio citrato provoca una diminuzione del fattore di crescita rispetto al LP fresco.

I risultati ottenuti rivelano che gli eccipienti e le condizioni sperimentali utilizzate per preparare le particelle di alginato non producono una diminuzione nella quantità di PDGF AB e proteggono il fattore di crescita dall'azione del sodio citrato. Questi risultati confermano quelli ottenuti nei test di

proliferazione cellulare e di “wound healing”, dove veniva evidenziata l’attività del fattore di crescita.

II.3.2.4 Rilascio di PDGF AB

In Figura II.14 sono riportate le quantità di PDGF AB rilasciate dalle particelle di SA MV caricate con differenti quantità di LP in funzione del tempo.

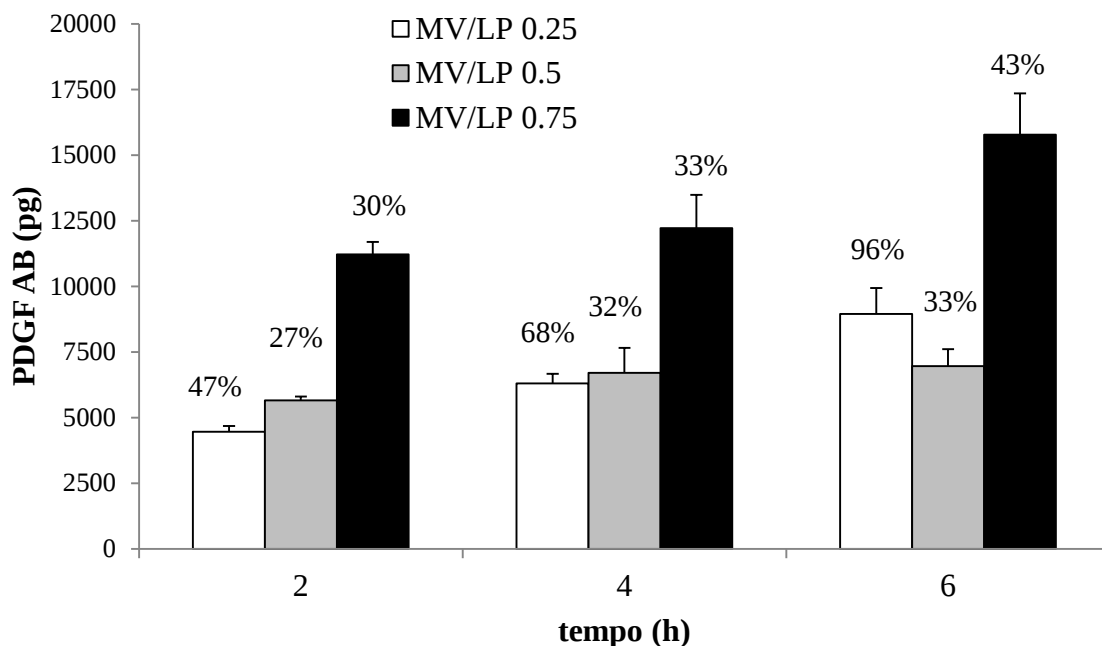


Figura II.14: Quantità di PDGF AB (pg) rilasciata dalle particelle di SA MV in funzione del tempo (valori medi $\pm$ s.e.; n=3). La % di PDGF AB rilasciata è riportata al di sopra di ogni colonna.

Le particelle, dopo idratazione, sono in grado di rilasciare il fattore di crescita in maniera dipendente dalla quantità caricata. In particolare, dopo 6h, le particelle caricate con 0.25 ml di LP sono in grado di rilasciare quasi totalmente la quantità di PDGF AB caricata, mentre le formulazioni caricate con quantità superiori di LP (0.5 and 0.75 ml) sono in grado di rilasciare circa il 40% del PDGF AB caricato. I risultati ottenuti evidenziano la capacità delle particelle di modulare il rilascio del fattore di crescita.

II.3.3 Caratterizzazione delle particelle di calcio alginato caricate con VCM

II.3.3.1 Dimensioni

Le particelle di calcio alginato caricate con VCM hanno dimensioni maggiori rispetto a quelle non caricate: $1084 \pm 44 \mu\text{m}$ per le particelle SA LV/VCM e $1033 \pm 39 \mu\text{m}$ per le particelle SA MV/VCM.

II.3.3.2 Quantità di VCM caricata

Le particelle caricate con VCM sono caratterizzate da una capacità di caricamento pari al 4%, corrispondente al valore teorico.

II.3.3.3 Proprietà di rilascio

La Tabella II.1 riporta le % di VCM rilasciata in funzione del tempo per le particelle di SA LV e MV caricate con VCM, quando sottoposte a due metodi di rilascio differenti: bagno basculante e cella di Franz. Utilizzando il bagno basculante non si sono riscontrate differenze significative tra la % di VCM rilasciata dalle particelle di alginato preparate con i due differenti gradi viscosimetrici. Infatti dopo 4h entrambe le formulazioni sono state in grado di rilasciare la quantità totale di VCM caricata. Al fine di valutare un possibile effetto del grado viscosimetrico del polimero sui profili di rilascio del farmaco, il test di rilascio è stato inoltre effettuato in cella di Franz, caratterizzata da minori proprietà idrodinamiche rispetto al bagno basculante.

Tabella II.1: Valori di % VCM rilasciata in funzione del tempo (2, 4 e 6 h) ottenuti per le particelle SA LV e SA MV caricate con VCM in bagno basculante e in cella di Franz (valori medi $\pm$ e.s.; n=3).

	Bagno basculante			Cella di Franz		
	2h	4h	6h	2h	4h	6h
LV	72.4 ± 4.9	89.2 ± 0.8	95.5 ± 3.9	63.3 ± 1.5	70.9 ± 0.5	81.2 ± 6.1
MV	74.8 ± 1.5	94.2 ± 1.2	99.8 ± 0.9	55.0 ± 1.4	60.8 ± 0.3	65.0 ± 5.6

Come previsto, utilizzando la cella di Franz, i valori di %VCM rilasciata sono risultati inferiori rispetto a quelli ottenuti in bagno basculante, a causa delle differenti proprietà idrodinamiche. Le particelle di SA MV sono caratterizzate da valori di %VCM rilasciata inferiori rispetto a quelli osservati per le particelle di SA LV.

II.4 Conclusioni

Lo studio condotto nella prima fase del lavoro ha permesso di individuare le condizioni operative ottimali per la preparazione delle particelle di calcio alginato da utilizzare, dopo liofilizzazione, come polvere aspersoria. Le dimensioni delle particelle risultavano influenzate dalla concentrazione di SA, dal grado viscosimetrico del polimero e dalle dimensioni dell'ago impiegato.

Le particelle liofilizzate si sono dimostrate in grado di idratarsi e gelificare quando poste a contatto con PBS, mezzo impiegato per mimare l'essudato delle ferite. È noto in letteratura [Boateng J., 2008] che tali proprietà sono in grado di favorire il processo di riparazione tissutale, evitando la macerazione del tessuto circostante la ferita. La velocità di idratazione è risultata dipendere non dal grado viscosimetrico del polimero, ma dalla concentrazione di CaCl_2 impiegata per la preparazione delle particelle.

I test di proliferazione cellulare condotti sulle particelle hanno evidenziato la capacità di tali formulazioni, anche in assenza di LP, di promuovere la proliferazione cellulare. Le particelle caricate con LP si sono dimostrati in grado di favorire la proliferazione cellulare in modo paragonabile o maggiore al LP fresco anche quando dissolte in una soluzione di sodio citrato. Quest'ultimo era, infatti, in grado di dissolvere completamente le particelle a beneficio della proliferazione cellulare, ma è risultato non biocompatibile con il LP fresco in assenza di alginato di calcio.

Il test di "wound healing" condotto sugli stessi campioni ha confermato i risultati ottenuti dal test di proliferazione cellulare.

Il dosaggio ELISA del fattore di crescita PDGF AB, rappresentativo del "pool" di fattori di crescita contenuti nel LP, ha evidenziato la capacità delle particelle di caricare il LP e di rilasciare il fattore di crescita quando idratati in PBS.

Le particelle sviluppate sono risultate in grado di caricare l'antibiotico vancomicina cloridrato e di rilasciarne quantità superiori alla MIC del farmaco, dopo contatto con PBS.

I risultati ottenuti permettono di concludere che le particelle di calcio alginato caricate con LP e VCM sono formulazioni promettenti per il trattamento delle ulcere cutanee. Applicate come polvere aspersoria permettono: una somministrazione meno dolorosa per il paziente rispetto alle garze e alle preparazioni semisolide, l'assorbimento dell'essudato in eccesso e la co-somministrazione di sostanze attive di natura diverse, come il LP e VCM, diminuendo i rischi di eventuali incompatibilità. Quest'ultimo aspetto richiede studi ulteriori volti a valutare la stabilità dei fattori di crescita del LP contenuti in polveri composte da miscele di particelle caricate con LP e antibiotici.

Il lavoro descritto è stato oggetto delle seguente pubblicazione:

M. Mori, S. Rossi, M.C. Bonferoni, F. Ferrari, G. Sandri, F. Riva, C. Del Fante, C. Perotti, C Caramella, Calcium alginate particles for the combined delivery of platelet lysate and vancomycin hydrochloride in chronic skin ulcers, International Journal of Pharmaceutics 461 (2014), 505-513

III. Capitolo

**Rilascio combinato di lisato piastrinico e vancomicina
cloridrato: medicazioni a base di acido ialuronico e sodio
alginato**

III.1 SCOPO DEL LAVORO

Scopo di questo lavoro è stato lo sviluppo di un sistema contenente capsule di acido ialuronico (HA) in grado di veicolare lisato piastrinico (LP) in una medicazione di sodio alginato (SA) contenente un antibiotico “modello” come la vancomicina cloridrato (VCM) da utilizzare nel trattamento delle ulcere cutanee.

La medicazione applicata sull'ulcera doveva assorbire l'essudato in eccesso e permettere il rilascio sia della VCM dalla matrice di alginato che dei fattori di crescita e delle sostanze biologicamente attive contenute nel LP dalle capsule, grazie ad uno scambio di ioni con l'essudato.

Il lavoro si è articolato in due fasi: durante la prima fase si è proceduto alla caratterizzazione della medicazione non caricata (bianca). In particolare sono state valutate le proprietà di resistenza meccanica, la capacità di idratazione a contatto con PBS (mezzo mimante l'essudato) e le proprietà reologiche del gel formatosi dopo idratazione.

La seconda fase del lavoro ha avuto come obiettivo il caricamento delle medicazioni con VCM (nella matrice) e con LP (nelle capsule). Le medicazioni cariche sono state caratterizzate per titolo di VCM e del fattore di crescita PDGF-AB, rappresentativo del pool di fattori di crescita contenuti nell'emoderivato. Sono state inoltre valutate le proprietà di rilascio *in vitro* delle medicazioni. Le proprietà di promozione della riparazione tissutale delle medicazioni sviluppate sono state studiate *in vitro* su fibroblasti di bambino (bNHDF), valutando la proliferazione % delle cellule dopo contatto con la formulazione e la percentuale di cellule in fase S (proliferativa), tramite il test specifico della bromodesossiuridina (BrDu).

III.2 MATERIALI E METODI

III.2.1 Materiali

Acetonitrile (ACN) (Carlo Erba, Milano, I); Anti- mouse IgG-FITC antibody (Sigma Aldrich, Milano, I); 5-Bromo-2'deoxyuridine (BrdU) (Sigma Aldrich, Milano, I); Calcio cloruro (Carlo Erba Reagenti, Milano, I); DMSO (Dimetil Solfossido) (Sigma Aldrich, Milano, I); Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM, Lonza, BioWhittaker, B); Dulbecco's Phosphate Buffer Solution (DPBS, Sigma Aldrich, Milano, I); Hank's Balance Salt Solution (HBSS) (Sigma Aldrich, Milano, I); Hoechst 33258 (Sigma Aldrich, Milano, I); Inactivated foetal calf bovine serum (FBS) (Euroclone, Pero, I); Mouse anti- Bromo-deoxyuridine antibody (anti-BrdU antibody) (Amersham Bioscience, USA); Mowiol (Sigma Aldrich, Milano, I);

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Carlo Erba, Milano, I); $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Carlo Erba, Milano, I); MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma Aldrich, Milano, I); Penicillin streptomycin 100x (pen/strep)/amphoteric 100x (Sigma Aldrich, Milano, I); PTA-blocking solution (PBS/Tween20/Albumin) (Sigma Aldrich, Milano, I); Sodio alginato media viscosità (SA MV): da alghe brune, viscosità di una soluzione al 2% a 25 °C ~ 3500 cps, (Sigma-Aldrich, Milano, I); Sodio cloruro (Carlo Erba, Milano, I); Trypsin-EDTA solution (Sigma Aldrich, Milano, I); Sodio ialuronato (HA) basso peso molecolare (Bioiberica, Barcelona, S); Trypan Blue solution (Biological Industries, Beit-Haemek, IL); Vancomicina: cloridrato (VCM) (USP) (Pharmatex Italia S.R.L., Milano, I)

Lisato piastrinico (LP): fornito dal reparto di Immunoematologia ed Aferesi del IRCCS Policlinico S.Matteo, Pavia (vedi paragrafo I.2.1).

III.2.2 Preparazione delle medicazioni a base di SA MV contenenti capsule di HA

Le medicazioni sono state preparate per liofilizzazione di una soluzione acquosa di alginato di sodio media viscosità (SA MV) all'1% p/p contenente capsule di acido ialuronico (HA) ottenute in presenza di due diverse concentrazioni di calcio cloruro (CaCl_2) 1 e 2% p/p. In particolare 1 ml di una soluzione contenente CaCl_2 (1 e 2% p/p) e HA (3% p/p) è stata gocciolata un ago 32G (0.26 Ø x 4 mm) (meso-relle[®], Aiesi Hospital Service, Napoli, I) in 50 ml di una soluzione di SA 1% p/p mantenuta sotto agitazione magnetica per 30 minuti. Successivamente è stato rimosso l'eccesso di soluzione di SA 1% p/p fino al raggiungimento di 8 g di formulazione totale. Quindi 8 g di soluzione di SA 1% p/p contenente le capsule di HA è stata congelata a -40°C e liofilizzata (Heto

DRY WINNER[®], Analticia De Mori, Milano, I) per ottenere medicazioni di diametro pari a 40 mm.

Le medicazioni in toto e le capsule sono state caratterizzate per le loro dimensioni mediante l'utilizzo di un calibro. In particolare, le capsule ottenute come descritto nel precedente paragrafo sono state filtrate sotto vuoto con carta da filtro, congelate a -40°C e liofilizzate. Le loro dimensioni sono state determinate attraverso l'utilizzo di un calibro, prendendo 4 campioni per ciascuna formulazione e di ogni capsula è stata misurata la lunghezza e la larghezza.

III.2.3 Caratterizzazione delle medicazioni a base di SA MV contenenti capsule di HA

III.2.3.1 Valutazione delle proprietà meccaniche

La resistenza meccanica delle medicazioni è stata misurata tramite apparecchiatura TA.XT plus (ENCO, Spinea, I) dotato di un sistema di misura A/TG e di una cella di carico da 1kg. Prima di essere sottoposte alle misure di trazione, le medicazioni, dopo essere state liofilizzate, sono state pesate e poste in un contenitore ad umidità controllata (75%) alla temperatura di 25°C, per un periodo di tempo necessario all'assorbimento del 10% d'acqua. L'acqua svolge la funzione di plasticizzante, migliorando le proprietà meccaniche della medicazione, come dimostrato in un lavoro precedente [Rossi S.et al., 2013]. Dopo aver valutato un aumento del 10% in peso, la formulazione è stata posta fra due morse (una inferiore immobile ed una superiore mobile) mantenendo la distanza di circa 1 cm. Nel momento in cui inizia l'analisi, la morsa superiore si sposta verso l'alto fino a provocare la rottura della medicazione in posizione centrale. Si ottiene così un grafico che riporta sulle ordinate la forza applicata alla medicazione (espressa in mN) e sulle ascisse la distanza, ovvero l'allungamento espresso in mm corrispondente alla completa rottura della medicazione. Sono state effettuate tre misure per ciascuna medicazione.

III.2.3.2 Valutazione delle proprietà di idratazione

Le misure di idratazione delle medicazioni sono state effettuate in cella di diffusione di Franz (FDC40020FF Permeager, PA, USA) con orifizio di diametro 20 mm (3.14 cm²). In particolare, una porzione della medicazione con dimensioni 20x20 mm è stata pesata, distesa su carta da filtro e poi posta su membrana da dialisi utilizzata per separare la camera donor dalla ricevente. Quest'ultima è stata riempita con PBS (Phosphate Buffered Solution: NaH₂PO₄·H₂O 0,036% p/p, Na₂HPO₄ ·H₂O 0,137% p/p, NaCl 0,850% p/p) pH 7.4, mezzo mimante l'essudato di una ferita. La camera ricevente era mantenuta ad una temperatura di 32°C, tramite una camicia esterna di termostatazione.

Dopo 6h e 18h di idratazione la formulazione è stata pesata ed è stata valutata la quantità d'acqua assorbita dalla medicazione.

III.2.3.3 Proprietà reologiche

Sul gel ottenuto a seguito di 6h e 18h di idratazione in PBS, come descritto al paragrafo precedente, sono state effettuate misure di viscosità e di viscoelasticità tramite reometro rotazionale (Rheostress 600, Haake, I), dotato di un sistema di misura piastra/cono (C20/4: Ø= 20 mm; angolo= 4°) mantenuto a 32°C, dopo un tempo di termostatazione di 3 minuti.

In particolare si sono effettuate misure di viscosità impostando gradienti di scorrimento crescenti compresi nell'intervallo 10 - 300s⁻¹.

Per la valutazione delle proprietà viscoelastiche, il gel è stato sottoposto a due diversi test, “stress sweep test” e “oscillation test”, condotti ad una temperatura di 32°C. Il primo test ha previsto di applicare al campione sforzi di taglio crescenti nell'intervallo 0.004mPa - 10Pa al fine di individuare la zona di viscoelasticità lineare, definita dall'intervallo di sforzi di taglio in cui il modulo elastico G' rimane costante. L'”oscillation test” ha previsto di applicare uno sforzo di taglio scelto nella zona di viscoelasticità lineare a frequenza crescente compresa nell'intervallo 0.1 – 10Hz e di registrare l'andamento dei moduli elastico conservativo (G') e viscoso dissipativo (G''). Gli esperimenti sono stati condotti in triplicato.

III.2.4 Preparazione delle medicazioni caricate con VCM

Le medicazioni contenenti vancomicina cloridrato (VCM) sono state ottenute come descritte nel paragrafo III.2.2., solubilizzando 3 mg/ml di farmaco nella soluzione di SA 1% p/p dopo la formazione delle capsule.

III.2.4.1 Titolo e Rilascio di Vancomicina Cloridrato (VCM)

La quantità di VCM caricata nella formulazioni è stata valutata previa dissoluzione della medicazione in PBS. Il farmaco è stato dosato mediante opportuna metodica HPLC come descritto nel paragrafo II.2.5.2.2.

La capacità di caricamento delle particelle è stata calcolata secondo la seguente equazione:

$$\text{Capacità di caricamento: (quantità VCM (mg) nelle particelle ottenute da 1 ml di miscela SA-VCM} \\ \text{/ peso (mg) particelle caricate) x 100}$$

Il rilascio della VCM, contenuta nelle formulazioni, è stato valutato tramite l'impiego di celle di diffusione di Franz (Permeager, Bethlehem, PA, USA) con orifizio di diametro 20 mm (3.14 cm²), utilizzando PBS (pH 7.4) a 32°C, come descritto nel paragrafo II.2.5.3.

In particolare, una porzione circolare della medicazione (peso 20 mg) è stata distesa su una filtro di carta posto nella camera donor. Il PBS presente nella camera ricevente è stato mantenuto a 32°C sotto agitazione magnetica (600 rpm). Ad intervalli di tempo fissati (1-2-4-6 h), 500 µl della fase ricevente sono stati prelevati e ripristinati con mezzo fresco. Il contenuto di VCM dei campioni è stato analizzato mediante metodica HPLC (paragrafo II.2.5.2.2).

III.2.5 Valutazione delle proprietà di proliferazione cellulare di LP

La capacità di proliferazione cellulare di LP è stata valutata attraverso diverse metodiche: piastra da 96 pozzetti (area 0.35 cm²) (Cellstar 96 W, Greiner Bio-One, G), piastra da 12 pozzetti (area 3.8 cm²) con inserti Transwell® (Cellstar permeable support, Greiner bio one®, Milano, I). Nella piastra da 96 pozzetti il LP, opportunamente diluito, è stato posto a contatto diretto con le cellule, mentre nella piastra con inserti transwell®, LP tal quale è stato posto nella camera apicale.

Gli esperimenti di proliferazione cellulare sono stati valutati su bNHDF mantenuti in coltura come precedentemente descritto (paragrafo II.2.3.3) e seminati ad una concentrazione pari a 50000 cell/cm². La proliferazione dei fibroblasti è stata valutata a differenti tempi, facendo un confronto con MC e M s/s, utilizzati come riferimento.

In particolare, la proliferazione cellulare in piastra da 96 pozzetti è stata valutata ponendo le cellule a contatto con diverse diluizioni di LP in Ms/s (1:5, 1:10, 1:20 e 1:40): 200µl di ciascuna diluizione è stata seminata nei pozzetti e lasciata a contatto per 24h. La proliferazione cellulare è stata valutata tramite MTT test, come descritto nel paragrafo II.2.3.3.

Nell'esperimento condotto con gli inserti Transwell® il LP è stato posto tale quale nella camera apicale delle piastre, nella basolaterale sono state seminate le cellule in 1.5ml di Ms/s. A tempi prefissati (24, 48 e 72h) l'inserto Transwell® ed il mezzo presente nella camera basolaterale venivano rimossi, le cellule venivano quindi poste a contatto per 3h con 1 ml di HBSS con aggiunta di 500 µl di una soluzione di MTT (8µM).

III.2.6 Preparazione e caratterizzazione delle medicazioni caricate con LP

Le medicazioni contenenti LP sono state ottenute miscelando 500 µl di LP a 500 µl della soluzione di HA 6% p/p in CaCl₂ 2 e 4% p/p, al fine di ottenere le seguenti concentrazioni finali: HA 3% p/p, CaCl₂ 1% o 2% p/p. Si è quindi proceduto come descritto nel paragrafo III.2.2. Tali medicazioni

sono state caratterizzate per le proprietà meccaniche, di idratazione e reologiche descritte per le medicazioni non cariche (bianche), come precedentemente descritto (paragrafi. III.2.3.1, III.2.3.2. e III.2.3.3) e sono state sottoposte a test di proliferazione cellulare.

III.2.6.1 Valutazione delle proprietà di proliferazione cellulare

Le proprietà di proliferazione cellulare sono state valutate sulla linea cellulare bNHDF, mantenuta in coltura come descritto nel paragrafo I.2.2. In particolare, la linea cellulare di fibroblasti bNHDF è stata seminata nella camera basolaterale di piastre (12 pozzetti) con inserti Transwell® alla concentrazione di 50.000 cellule/cm² in Ms/s. Sugli inserti Transwell® sono state caricate le medicazioni (20 mg di peso). Le medicazioni sono state idratate con 500 µl di HBSS e la piastra è stata lasciata in incubatore per 72h. Al termine di tale tempo è stato condotto l'MTT test come descritto nel paragrafo II.2.3.3.

III.2.6.2 Valutazione della sintesi di DNA tramite incorporazione di Bromo-deossiuridina (BrdU)

La valutazione della sintesi di DNA è stata effettuata tramite l'analisi morfologica immunofluorescente dell'incorporazione nucleare di BrdU per la valutazione delle cellule in fase di sintesi del DNA e quindi per l'analisi dell'attività proliferativa dell'intera popolazione cellulare trattata con i campioni d'interesse.

Le cellule, dopo tripsinizzazione, sono state seminate su vetrini di area 1.33 cm² (Prestige, Veni Srl, Milano, I) e poste all'interno di piastre da 12 pozzetti (area 3.8 cm²) con inserti Transwell® (Cellstar permeable support, Greiner bio one®, Milano, I) in quantità di 1.5x10⁵ cellule/vetrino (Dean et al., 1984; Hall and Levison,1990). Le piastre sono riposte per 30 minuti in incubatore in modo da permettere l'adesione dei fibroblasti sul vetrino.

In seguito si è proceduto come descritto nel paragrafo III.2.5, in particolare, sugli inserti Transwell® sono state caricate le medicazioni (20 mg di peso) e sono state idratate con 500 µl di HBSS e la piastra è stata lasciata in incubatore per 72h. Ad un'ora dal termine dell'esperimento, le cellule sono state marcate aggiungendo 30 µM di BrdU al mezzo di coltura. Successivamente, i campioni sono stati rimossi e le cellule sono state lavate con PBS, fissate in etanolo 70% e i vetrini conservati a - 20°C. Al momento del conteggio il vetrino è stato trattato come descritto nel paragrafo II.2.5.5.

III.2.6.3 Valutazione del titolo e rilascio di PDGF AB

Il titolo e rilascio di LP è stato valutato tramite bagno basculante come descritto nel paragrafo II.2.5.3, andando a dosare la quantità contenuta e rilasciata dalle formulazioni di PDGF AB, fattore di crescita rappresentativo del pool di fattori di crescita contenuti nel LP.

In particolare, per il titolo delle medicazioni sono state messe a contatto per 6h con 1.5 ml di sodio citrato (55mM, pH 6.8) e 8 mL di PBS, per favorire la rottura delle microcapsule ed il rilascio del loro contenuto.

Per il rilascio di LP, le medicazioni, caricate e liofilizzate, sono state messe a contatto con 9.5 mL di PBS in bagnetto basculante (20 rpm - 32°C, Falc WB-MBF, Falc Instruments, Bergamo, I) ed effettuati prelievi di 500 µl a 2h e 6h, ripristinando tale volume con PBS. I campioni analizzati sono state le medicazioni all'1 e 2% caricate con LP e i relativi controlli (LP trattato con fisiologica e LP trattato con sodio citrato).

Il contenuto del fattore di crescita PDGF AB (platelet derived growth factor) è stato valutato tramite test ELISA (Human PDGF AB Quantikine PharmPak, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA; assay range: 31.2–2000 pg/ml) [Rossi et al., 2013a]. Nello specifico, è stata valutata la quantità di PDGF AB presente nel LP fresco (alla stessa concentrazione impiegata nella preparazione delle medicazioni) per confronto della quantità di PDGF AB contenuta nelle formulazioni. Sono state analizzate tre repliche per campione.

III.2.7 Analisi statistica

I dati sperimentali ottenuti dalle differenti misure sono stati, quando possibile, sottoposti ad analisi statistica grazie al software Statgraphics 5.0 (Statistical Graphics Corporation, Rockville, MD, USA). In particolare è stato utilizzato il test Anova una via e Multiple range.

III.3 RISULTATI E DISCUSSIONE

III.3.1 Caratterizzazione delle medicazioni non cariche (bianche)

III.3.1.1 Dimensione delle capsule e delle medicazioni

A titolo d'esempio in Figura III.1 sono riportate le fotografie delle medicazioni secche e dopo idratazione in PBS. Si può osservare il rigonfiamento delle capsule a seguito di idratazione in tampone. Le medicazioni con capsule preparate con CaCl_2 1% possedevano uno spessore di 6.2 (± 0.59) mm, mentre lo spessore di quelle preparate con CaCl_2 2% era pari a 7.4 (± 0.67) mm. Sono inoltre riportate le immagini relative delle capsule da sole dopo liofilizzazione (2mm).



Figura III.1: Fotografie delle medicazioni in esame secche, sottoposte ad idratazione per 6 e 18h in PBS e delle capsule

III.3.1.2 Proprietà meccaniche

In Tabella III.1 sono riportati i risultati ottenuti per le medicazioni contenenti capsule preparate con due diverse concentrazioni di CaCl_2 (1% e 2% p/p), sottoposte a test di resistenza meccanica (trazione).

Tabella III.1: Risultati ottenuti per le medicazioni contenenti capsule preparate con due diverse concentrazioni di CaCl_2 (1% e 2% p/p), sottoposte a test di trazione (valori medi $\pm$ d.s; n=3)

Medicazioni	Forza di rottura (mN)	Distanza di rottura (mm)	Lavoro di rottura (mN*mm)
CaCl_2 1% p/p	594 ($\pm$ 75)	1.6 ($\pm$ 0.3)	924 ($\pm$ 138)
CaCl_2 2% p/p	1755 ($\pm$ 196)	2.1 ($\pm$ 0.23)	1217 ($\pm$ 69)

Si può osservare come le medicazioni contenenti capsule preparate con la maggiore concentrazione di CaCl_2 siano caratterizzate da valori maggiori di forza massima di rottura, distanza alla rottura e lavoro di rottura ($p < 0.05$) ad indicare migliori proprietà meccaniche.

III.3.1.3 Proprietà di idratazione

In Figura III.2 sono riportate le quantità di tampone assorbito (PBS) per unità di peso dalle due medicazioni in esame dopo idratazione in PBS per 6 e 18h.

La medicazione con capsule preparate con CaCl_2 1% (p/p) è in grado di assorbire dopo 6h una maggiore ($p < 0.05$) quantità di tampone per unità di peso rispetto alla medicazione con capsule preparate con la maggiore concentrazione di CaCl_2 , ad indicare una più rapida idratazione.

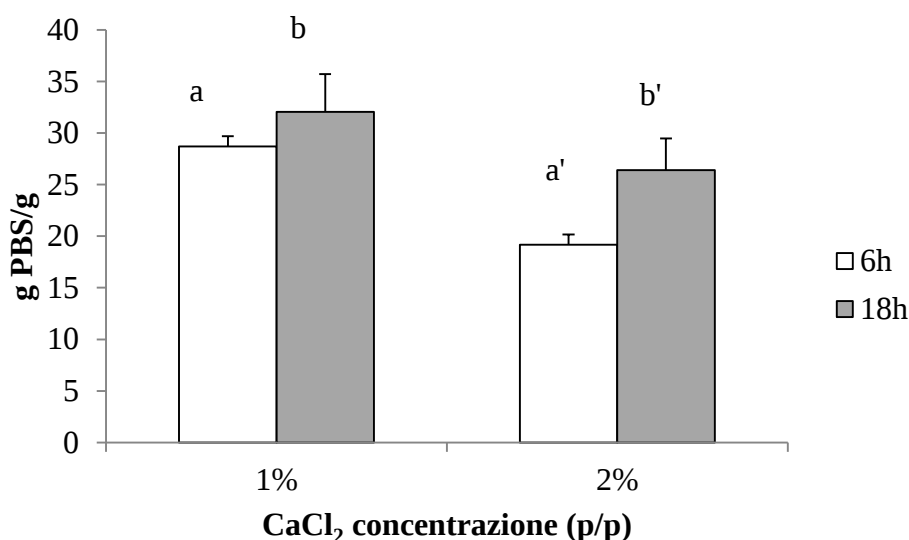


Figura III.2: Valori di quantità di PBS assorbito per unità di peso osservate per le medicazioni contenenti capsule preparate con due diverse concentrazioni di CaCl₂ (1% e 2% p/p) (valori medi $\pm$ es; n= 3) - significatività statistica ($p < 0.05$): a vs a'; a' vs b'

All'aumentare del tempo di idratazione si osserva, per la medicazione con capsule preparate con CaCl₂ 1% (p/p), un lieve aumento del valore di g PBS/g, anche se non statisticamente significativo. Un aumento significativo di tale parametro è invece osservato per la medicazione con capsule preparate con CaCl₂ 2% (p/p) dopo 18h di idratazione. La capacità di assorbire tampone (fluido mimante l'essudato della ferita) è una proprietà richiesta alle medicazioni; è noto infatti che un eccesso di essudato sfavorisce il processo di riparazione tissutale. Entrambe le formulazioni sono in grado di assorbire una notevole quantità di tampone, superiore a 25 volte il loro peso, dopo 18h di contatto, risultando pertanto idonee all'impiego a cui sono destinate.

III.3.1.4 Proprietà reologiche

In Figura III.3 (a e b) sono riportate le curve di viscosità delle medicazioni dopo 6 e 18h di idratazione.

Si può osservare come entrambe le medicazioni, ai tempi di idratazione considerati, siano caratterizzate da un comportamento pseudoplastico, ovvero da valori di viscosità che diminuiscono al crescere del gradiente di scorrimento. Tale comportamento è funzionale all'azione di protezione richiesta alla medicazione una volta applicata, che, per piccole sollecitazioni, è in grado di opporre una maggiore resistenza allo scorrimento, mentre quanto sottoposta ad alti valori di scorrimento presenta bassi valori di viscosità, che si traducono in buone proprietà lubrificanti.

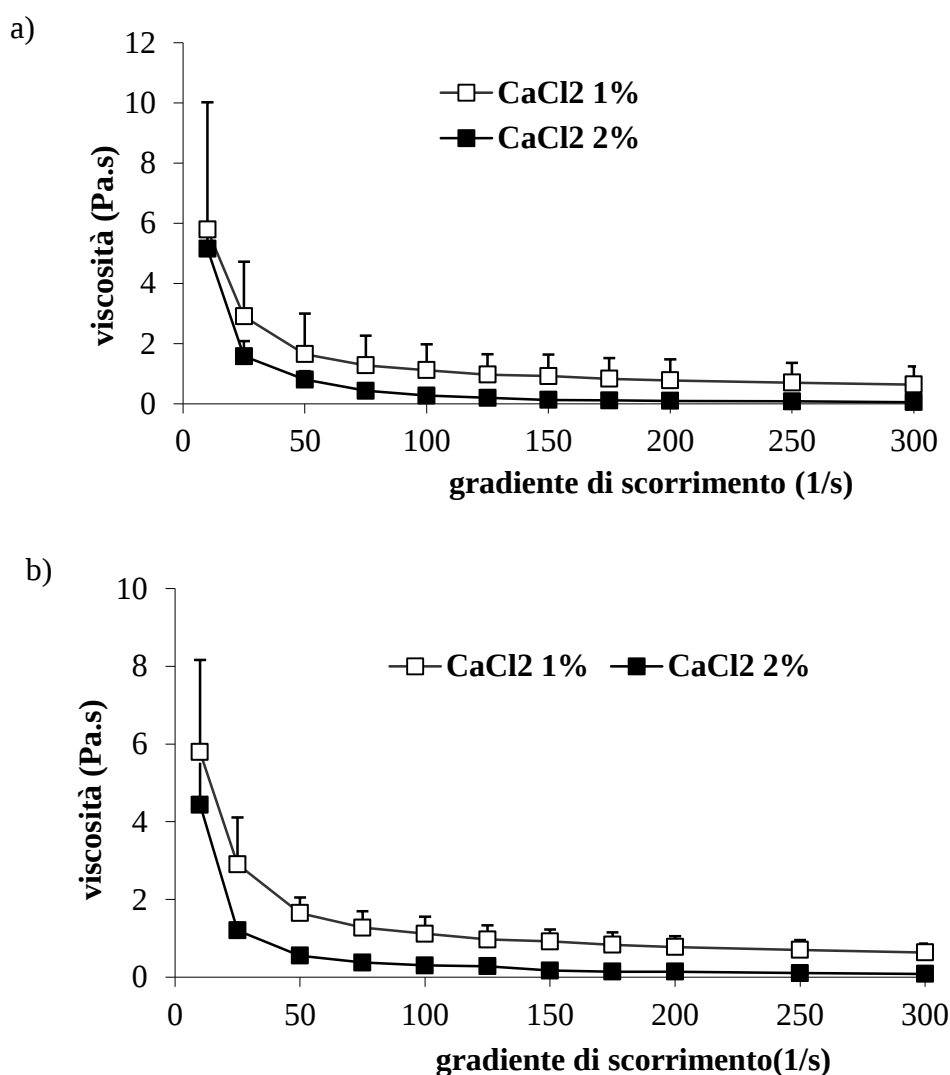


Figura III.3 (a e b): Curve di viscosità ottenute per le medicazioni contenenti capsule preparate con due diverse concentrazioni di CaCl_2 (1% e 2% p/p) dopo 6h (a) e 18h (b) di idratazione (valori medi $\pm$ es; n= 3)

In Figura III.4 (a e b) sono riportati gli andamenti dei moduli viscoelastici conservativo (G') e dissipativo (G'') delle due medicazioni dopo 6h di idratazione. In grafico è anche riportato il valore del parametro tangente dell'angolo di sfasamento ($\text{tg}\delta$) calcolato alla frequenza di 2 Hz. Entrambe le medicazioni dopo 6h di idratazione sono caratterizzate da una prevalenza delle caratteristiche elastiche sulle viscose, come evidenziato dai più alti valori di G' rispetto al G'' . La medicazione contenente capsule preparate con CaCl_2 2% presenta, a tutte le frequenze considerate, valori del modulo elastico conservativo (G') più alti rispetto a quelli dell'altra medicazione ad indicare maggiori proprietà elastiche. Elevate proprietà elastiche, a seguito di idratazione, risultano funzionali per medicazioni destinate al trattamento di lesioni cutanee: tali proprietà sono infatti

responsabili di una maggiore protezione dell'area lesa quando sollecitata a bassi valori di sforzo di taglio.

La medicazione con capsule preparate con CaCl_2 2% è anche caratterizzata da un valore di $\text{tg}\delta$ a 2 Hz inferiore a quello ottenuto per la medicazione contenente capsule preparate con CaCl_2 1%. Poiché tale parametro viene calcolato dal rapporto tra il modulo dissipativo ed il modulo conservativo, ciò sta ad indicare che la più alta concentrazione di CaCl_2 si accompagna ad una maggiore prevalenza della componente elastica sulla viscosa.

In Figura III.5 (a e b) sono riportati gli andamenti dei moduli viscoelastici conservativo (G') e dissipativo (G'') delle due medicazioni dopo 18h di idratazione. In grafico è anche riportato il valore del parametro tangente dell'angolo di sfasamento ($\text{tg}\delta$) calcolato alla frequenza di 2 Hz.

Anche dopo 18h di idratazione entrambe le medicazioni sono caratterizzate da valori di G' maggiori di G'' e la medicazione con capsule preparate con CaCl_2 2% presenta valori di G' superiori a quelli osservati per l'altra medicazione. Anche i valori di $\text{tg}\delta$ confermano quanto osservato dopo 6h di idratazione.

Per un più agevole confronto delle proprietà elastiche al variare della concentrazione di CaCl_2 e del tempo di idratazione, in Figura III.6 sono riportati i valori di G' delle due medicazioni alla frequenza di 2 Hz.

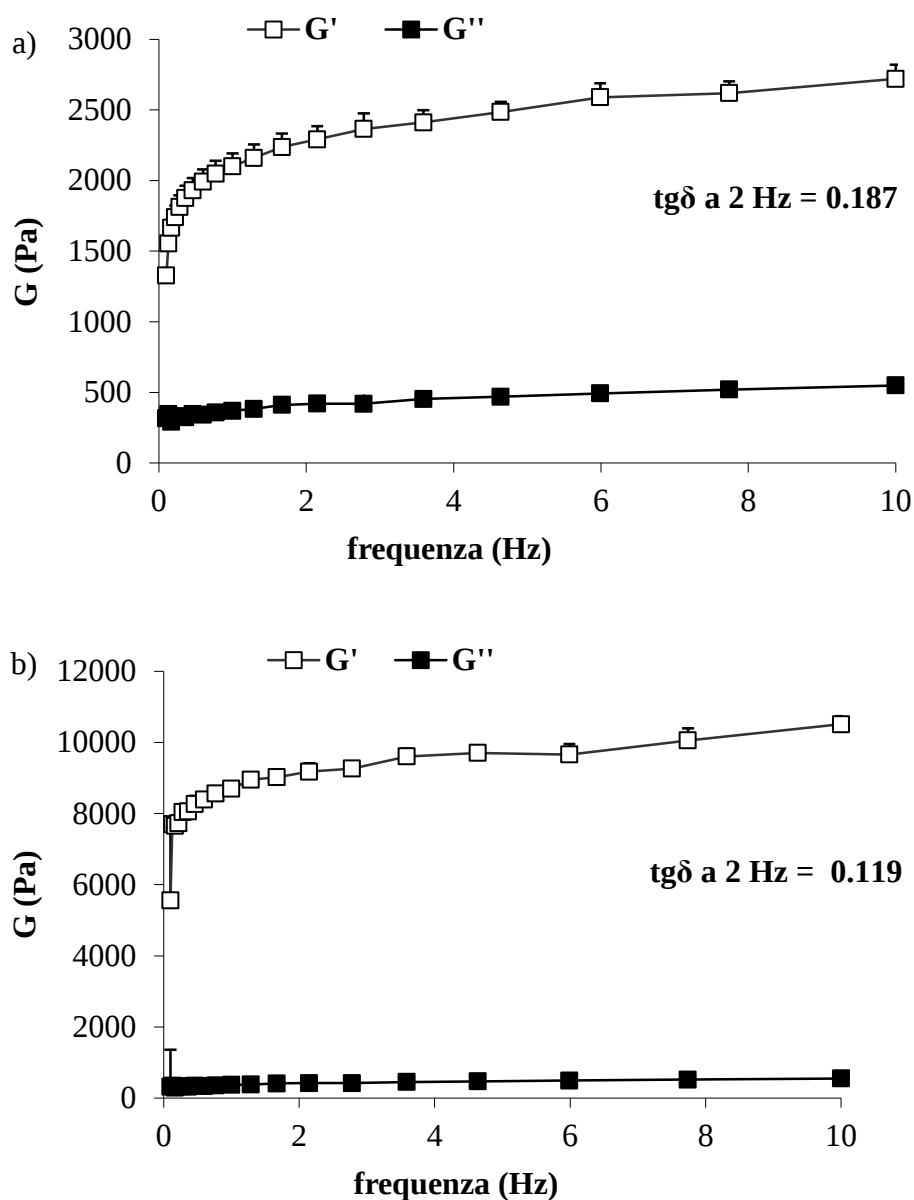


Figura III.4 (a e b): Valori del modulo conservativo (G') e dissipativo (G'') in funzione della frequenza di applicazione dello sforzo di taglio, osservati dopo 6h di idratazione per le due medicazioni in esame (valori medi $\pm$ es; $n=3$):

- a) medicazione contenente capsule preparate con CaCl_2 1% (p/p)
- b) medicazione contenente capsule preparate con CaCl_2 2% (p/p)

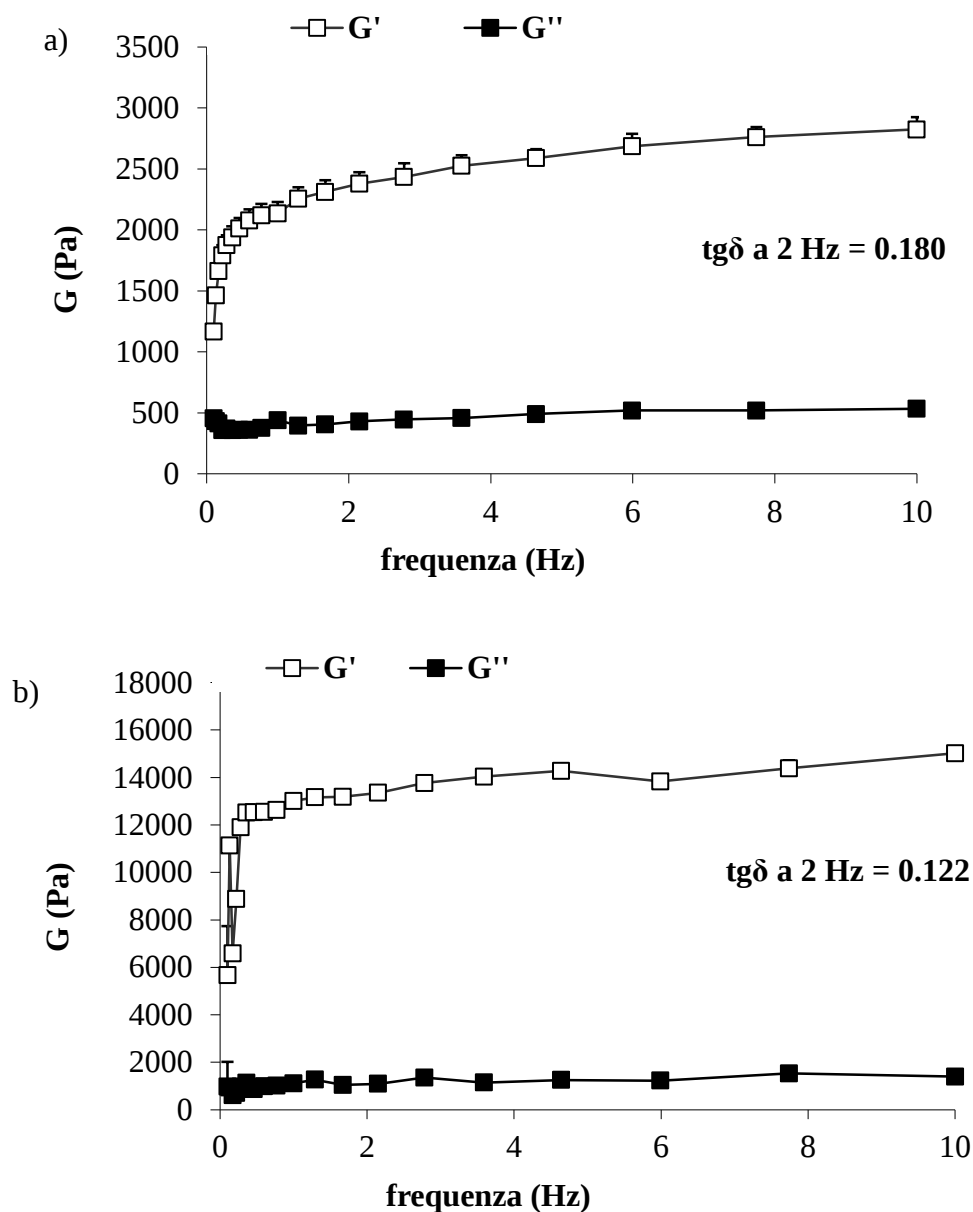


Figura III.5 (a e b): Valori del modulo conservativo (G') e dissipativo (G'') in funzione della frequenza di applicazione dello sforzo di taglio, osservati dopo 18h di idratazione per le due medicazioni in esame (valori medi $\pm$ es; $n=3$):

- a) medicazione contenente capsule preparate con CaCl_2 1% (p/p)
- b) medicazione contenente capsule preparate con CaCl_2 2% (p/p)

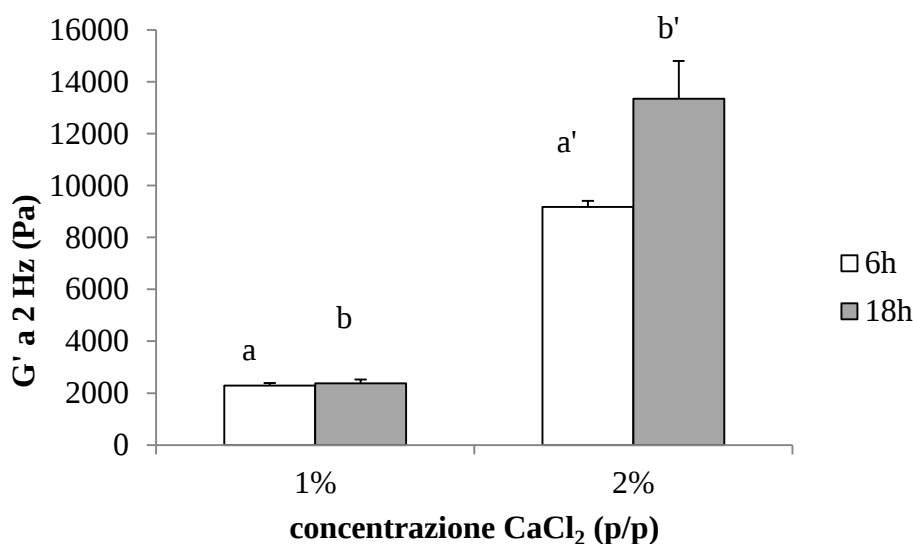


Figura III.6: Confronto dei valori di G' a 2Hz osservati per le due medicazioni al crescere del tempo di idratazione e della concentrazione di CaCl_2 (valori medi $\pm$ es; $n=3$) - significatività statistica ($p<0.05$): a vs a'; b vs b'; a' vs b'

Come già osservato l'aumento della concentrazione di CaCl_2 si accompagna ad un aumento delle proprietà elastiche della medicazione ad entrambi i tempi di idratazione considerati. Alla concentrazione di CaCl_2 pari al 2% si osserva un aumento dei valori di G' al crescere del tempo di idratazione.

III.3.2 Titolo e rilascio di Vancomicina Cloridrato (VCM) dalle medicazioni caricate con antibiotico

Entrambe le medicazioni sviluppate sono in grado di caricare una quantità di vancomivina cloridrato corrispondente al teorico. In Figura III.7 sono riportati i profili di rilascio dell'antibiotico VCM dalle due medicazioni. La concentrazione di CaCl_2 non influenza il rilascio di VCM: le due medicazioni sono caratterizzate da profili di rilascio sovrapponibili.

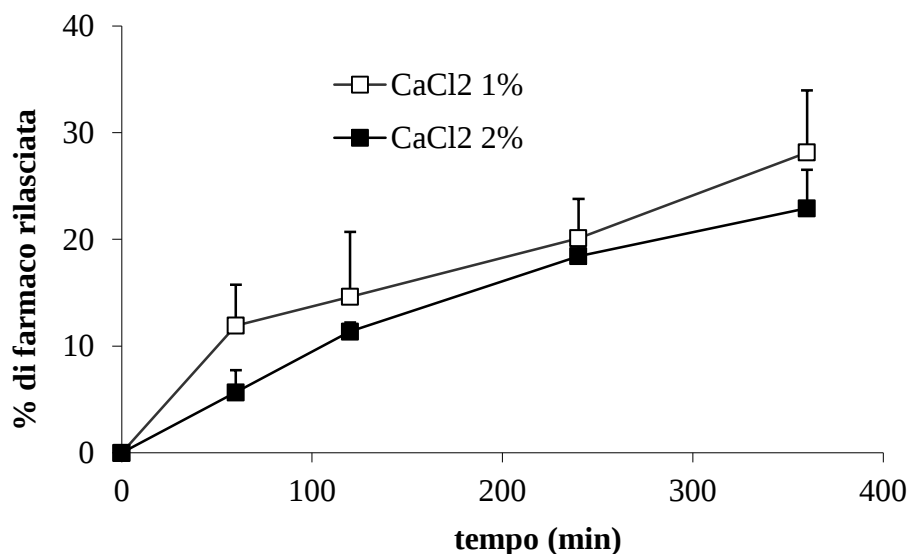


Figura III.7: % di farmaco rilasciato in funzione del tempo dalle due medicazioni (valori medi $\pm$ es; n= 3)

III.3.3 Proprietà di proliferazione cellulare di LP

Per valutare le proprietà di proliferazione cellulare di LP si sono adottati due diversi approcci sperimentali: il primo ha previsto di porre 200 μ l di LP opportunamente diluito direttamente a contatto con le cellule in piastre da 96 pozzetti per 24h, il secondo, invece, ha previsto di porre 500 μ l di LP tal quale nella camera apicale di piastre da 12 pozzetti con inserti Transwell® per tempi crescenti (24-48-72 e 96h).

In Figura III.8 sono riportati i valori di proliferazione % osservati per 200 μ l di diverse diluizioni di LP in M s/s (1/40, 1/20, 1/10, 1/5) posti a contatto con le cellule in piastre da 96 pozzetti.

Si può osservare come per tutte le diluizioni di LP i valori di proliferazione % siano significativamente superiori rispetto ai controlli ($p < 0.05$), MC e M s/s, ad indicare un incremento della proliferazione cellulare, che non sembra però essere sensibile all'aumento delle concentrazioni di LP a contatto con le cellule.

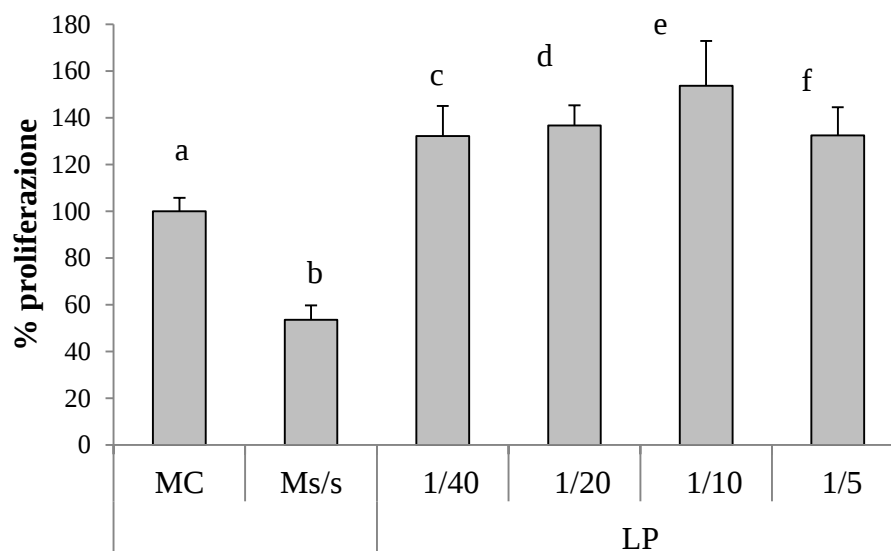


Figura III.8: Valori di proliferazione % osservati per le diverse diluizioni di LP in M s/s (1/40, 1/20, 1/10, 1/5) direttamente a contatto per 24h con le cellule in piastre “multiwell” da 96 pozzetti (valori medi ± es; n=8) - significatività statistica ($p < 0.05$): a vs b/c/d/e/f

Per potere effettuare una valutazione dell’attività di proliferazione cellulare di LP tal quale, non diluito, si è pensato di condurre il test ponendo 500 µl di LP nella camera apicale di piastre da 12 pozzetti provviste di inserti Transwell®. Le cellule sono state seminate nella camera basolaterale in presenza di M s/s (1.5ml). In Figura III.9 sono riportati i valori di proliferazione % osservati per LP e MC, normalizzati rispetto ai valori del M s/s. LP risulta caratterizzato per tutti i tempi considerati da valori di proliferazione % superiori ($p < 0.05$) al MC. Sia LP che MC presentano valori di proliferazione % che aumentano al crescere del tempo di contatto.

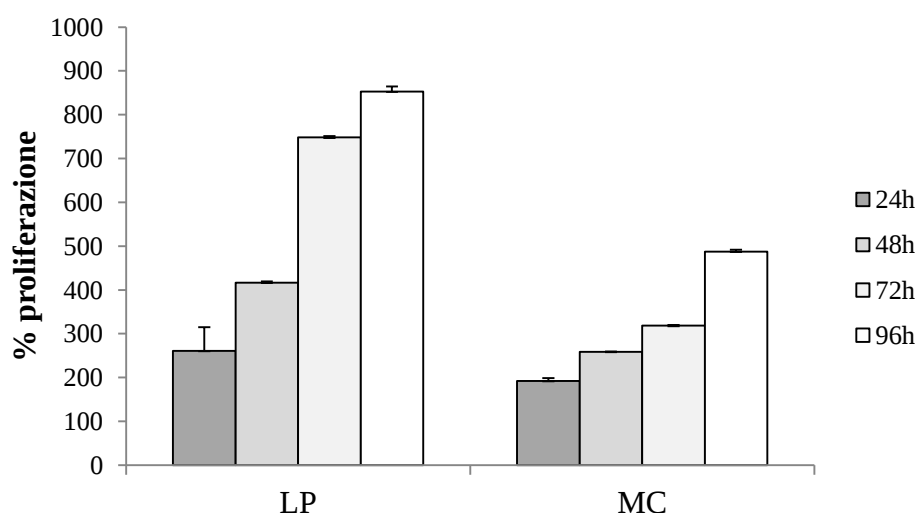


Figura III.9: Valori di proliferazione % osservati per 500 µl di LP a contatto per 24-48-72 e 96h con le cellule in piastre da 12 pozzetti provviste di inserti Transwell® (valori medi ± es; n=3).

Per verificare che tale andamento fosse dovuto ad una effettiva proliferazione cellulare e non all'effetto della normalizzazione, sono stati considerati i valori medi di assorbanza. Tali valori sono riportati in Figura III.10. Si può osservare come dopo 72 h il LP sia caratterizzato da una diminuzione del valore medio di assorbanza. Una diminuzione di tale valore è anche mostrato dal M s/s. Questa è la ragione dell'aumento del valore di proliferazione % osservata per il LP dopo le 72 h.

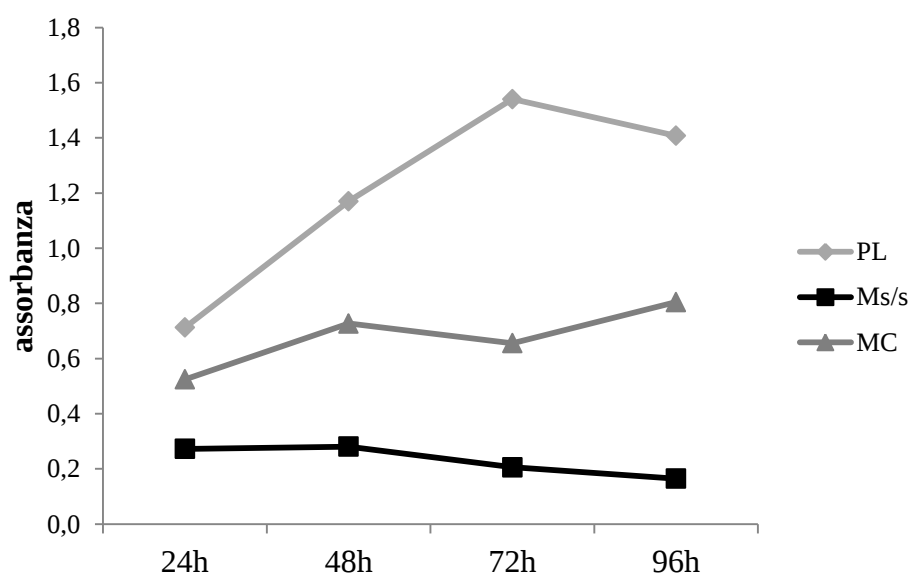


Figura III.10: Valori medi di assorbanza ottenuti per i diversi tempi di contatto (24, 48, 72 e 96h) per LP, MSS e in piastre da 12 pozzetti con inserti Transwell® (valori medi $\pm$ es; n=3).

72h è stato quindi scelto come tempo ottimale di contatto di LP con le cellule.

III.3.4 Caratterizzazione delle medicazioni caricate con LP

III.3.4.1 Proprietà di proliferazione cellulare

In Figura III.11 sono confrontati i valori di proliferazione % osservati per LP fresco, LP liofilizzato (LP f.d.) e per le medicazioni caricate e non con LP dopo 72h di contatto con fibroblasti umani. Come mezzo di controllo è stato usato M s/s.

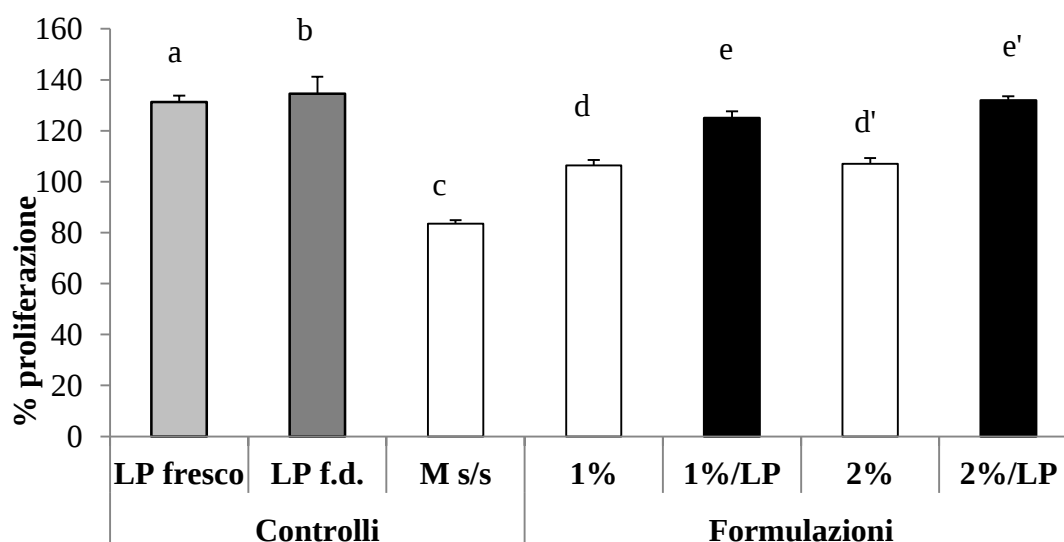


Figura III.11: Valori di proliferazione % osservati per LP fresco, LP liofilizzato e per le medicazioni caricate e non con LP dopo 72h di contatto con le cellule. Come mezzo di controllo è stato usato mezzo senza siero (valori medi $\pm$ es; n= 9) significatività statistica ($p < 0.05$): c vs a/b; d vs e; d' vs e'

I campioni di LP fresco e liofilizzato sono caratterizzati da valori confrontabili di proliferazione % ad indicare che il processo di liofilizzazione non influenza le proprietà di proliferazione cellulare dell'emoderivato. L'emoderivato presenta valori di proliferazione % superiori ($p < 0.05$) a quelli osservati per il controllo (M s/s), questo comportamento è dovuto alla presenza nel LP di sostanze biologicamente attive, come i fattori di crescita, che giocano un ruolo importante sulla proliferazione cellulare.

Mentre le medicazioni non caricate con LP presentano valori di proliferazione % non significativamente diverse da quelle del controllo, le medicazioni caricate con LP presentano valori significativamente superiori ($p < 0.05$) a quelli osservati per le bianche e confrontabili con i valori del LP fresco e liofilizzato.

A titolo d'esempio in Figura III.11 sono riportate le microfotografie dei substrati cellulari posti a contatto per 72h con le formulazioni (1% e 2%) sia bianche che cariche con LP, per confronto con M s/s.

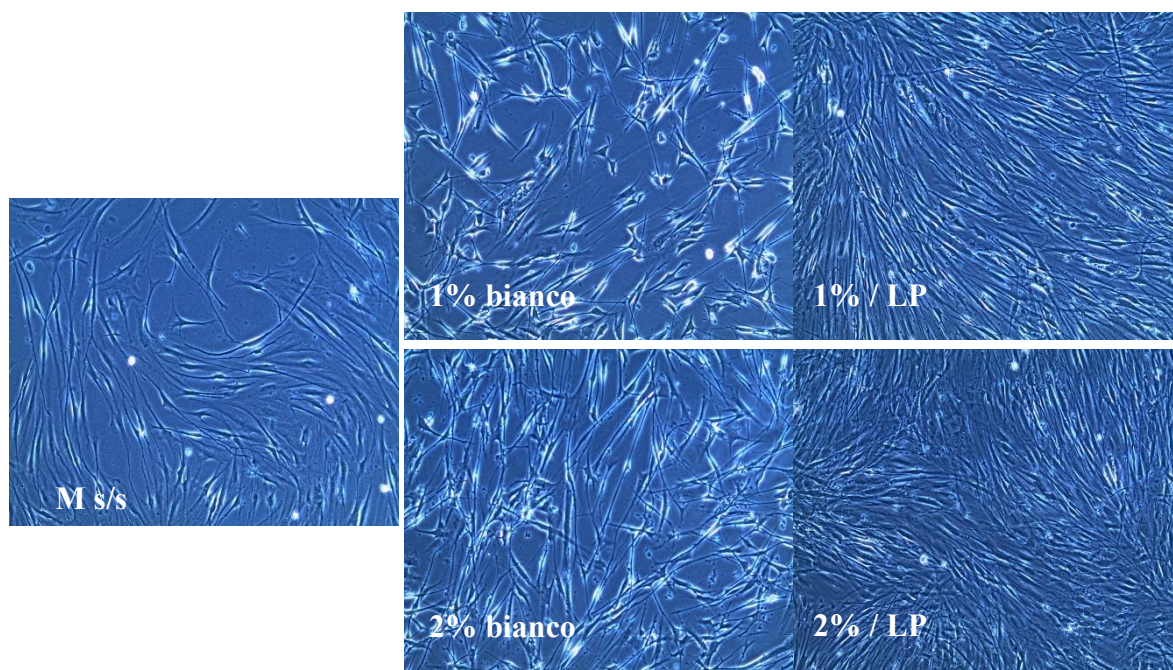


Figura III.11: Fotografie dei substrati cellulari dei fibroblasti posti a contatto per 72h con i seguenti campioni: mezzo senza siero (M s/s), formulazione 1% CaCl_2 priva di LP (1% bianca) e caricata con LP (1%/LP), formulazione 2% CaCl_2 priva di LP (2% bianca) e caricata con LP (2%/LP)

In Figura III.12a sono riportati i valori di % di fibroblasti in fase proliferativa S per i campioni in esame. Si può osservare come il LP fresco presenta valori significativamente ($p < 0.05$) maggiori rispetto al controllo (HBSS), questo conferma il potere discriminante del test utilizzato. Entrambe le medicazioni caricate sono caratterizzate da una maggior percentuale di cellule in fase S rispetto alle medicazioni bianche e paragonabili al valore osservato per il LP. Le medicazioni bianche sono caratterizzate da valori di % di fibroblasti in fase proliferativa S significativamente maggiori ($p < 0.05$) rispetto al controllo.

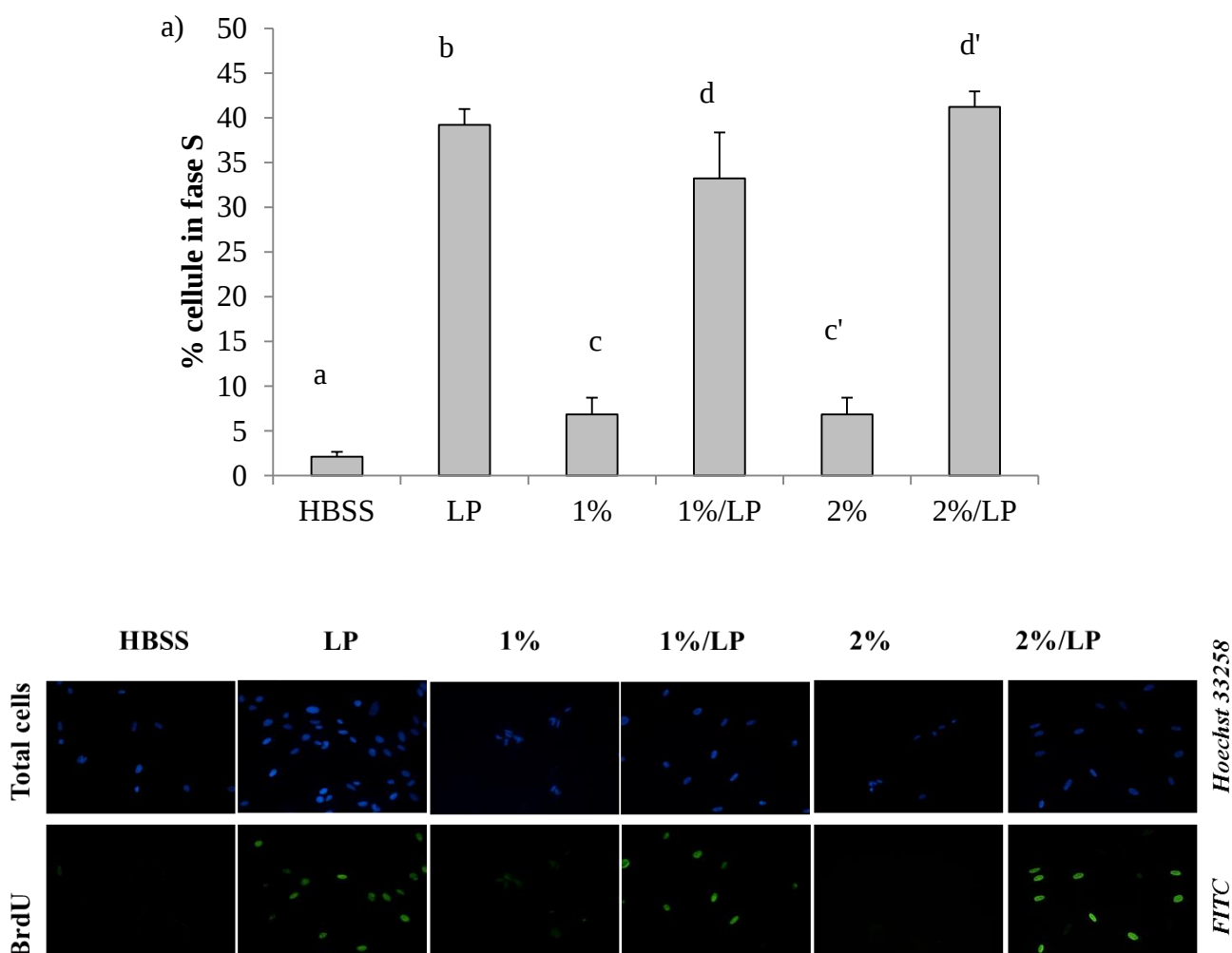


Figura III.12 (a,b): Risultati dell'incorporazione della BrdU: a) % di fibroblasti in fase proliferativa S per i campioni in esame (valori medi $\pm$ es; n= 3);
significatività statistica ($p < 0.05$): a vs b; c vs d; c' vs d'

b) fotografie dell'attività proliferativa cellulare: i nuclei delle cellule sono stati colorati con Hoechst33258 (fluorescenza blu) e le cellule in fase proliferativa S sono state immunomarcate con l' anticorpo primario anti-BrdU e l'anticorpo secondario coniugato FITC (fluorescenza nucleo verde). Scala: 10 μ m.

III.3.4.2 Quantità di PDGF AB caricata e rilasciata dalle medicazioni

In Figura III.13 sono riportate le quantità di PDGF AB (fattore di crescita rappresentativo delle sostanze biologicamente presenti nell'emoderivato) nelle medicazioni caricate con LP per confronto ad LP (stessa quantità utilizzata per la preparazione delle medicazioni) diluito in fisiologica ed in tampone citrato. Quest'ultimo tampone è stato utilizzato per dissolvere le capsule prima di eseguire il dosaggio del fattore di crescita.

Si può osservare come l'impiego del tampone citrato determini una diminuzione della quantità di PDGF AB. La medicazione con capsule preparate con CaCl_2 2% è risultata in grado di caricare una maggiore quantità di fattore di crescita, pari al 54% del teorico.

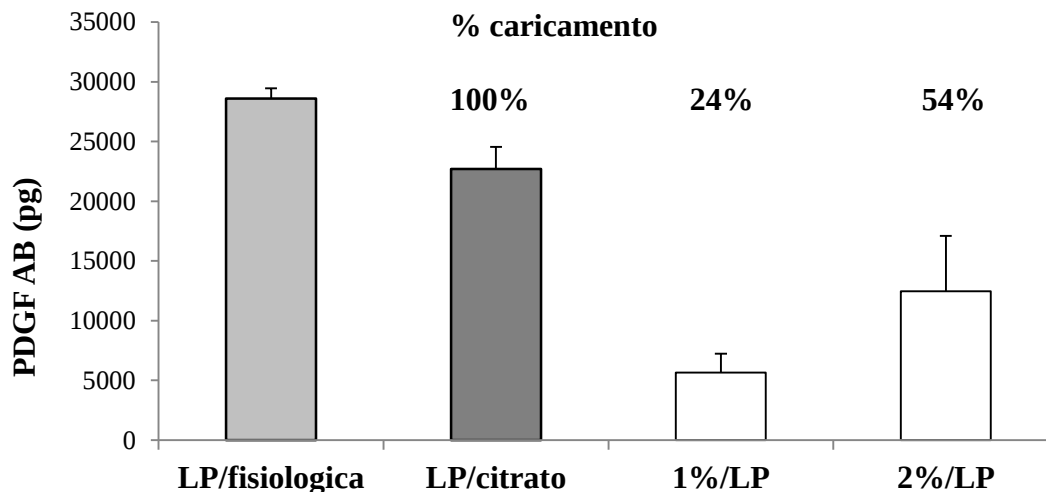


Figura III.13: Quantità di PDGF AB caricato nelle medicazioni per confronto a LP diluito in fisiologica e in tampone citrato (valori medi $\pm$ es; n= 3)

I test di rilascio di PDGF-AB condotti in bagno basculante hanno evidenziato la capacità delle medicazioni di rilasciare il fattore di crescita. Le percentuali di PDGF-AB rilasciate sono risultate pari, rispettivamente, al 50 ($\pm$ 8) % e al 22 ($\pm$ 2) % della quantità caricata per le medicazioni contenenti capsule preparate con CaCl_2 1% e per quelle contenenti capsule preparate con CaCl_2 2%. Tali risultati dimostrano che la formulazione a base di CaCl_2 2% p/p è in grado di caricare maggiori quantità di PDGF AB e di rilasciarle in tempi più lunghi rispetto alle medicazioni a base di CaCl_2 1% p/p.

III.4 Conclusioni

La prima fase del lavoro ha permesso di individuare le condizioni ottimali per la preparazione delle medicazioni a base di alginato (SA) 1% MV p/p contenente capsule di acido ialuronico (HA) al 3% p/p in calcio cloruro (CaCl_2) a diverse concentrazioni, 1 e 2%, da utilizzare, dopo liofilizzazione, come medicazioni su ulcere croniche.

Le medicazioni possiedono uno spessore diverso a seconda della concentrazione di CaCl_2 utilizzato: 6.2 (± 0.59) mm per CaCl_2 1% p/p e 7.4 (± 0.67) mm per CaCl_2 2% p/p.

Il confronto tra le due medicazioni ha evidenziato che le medicazioni contenenti capsule preparate con 2% p/p di CaCl_2 sono caratterizzate da migliori proprietà di resistenza meccanica.

Le medicazioni, quando sottoposte al test di idratazione a 6h e 18h, hanno dimostrato possedere una diversa velocità di idratazione, che è risultata superiore per la medicazione con capsule preparate con la concentrazione più bassa di CaCl_2 . Dopo 18h di idratazione non si sono evidenziate differenze statisticamente significative nelle quantità di tampone assorbito dalle due medicazioni. Entrambe le formulazioni sono in grado di assorbire tampone in quantità superiore a 25 volte il loro peso, risultando idonee all'impiego su ferite croniche.

A seguito di idratazione a 6h e 18h, le medicazione presentano un comportamento reologico pseudoplastico. La stessa medicazione presenta migliori proprietà elastiche essendo caratterizzata da valori più alti del modulo elastico conservativo G' e più bassi di loss tangent $\text{tg}\delta$.

Entrambe le medicazione sono in grado di rilasciare vancomicina cloridrato (VCM) in quantità superiori alla MIC del farmaco, dopo 6h di contatto con PBS.

I test di proliferazione cellulare condotti sulle medicazioni hanno evidenziato la capacità delle formulazioni caricate con LP di promuovere la proliferazione cellulare rispetto alle non cariche, con valori confrontabili ai controlli di LP fresco e liofilizzato. Il test della bromodesossipuridina (BrdU) ha evidenziato per le medicazioni caricate con LP una % di cellule in fase S superiore del doppio rispetto alle formulazioni non cariche.

Il dosaggio ELISA del fattore di crescita PDGF-AB, rappresentativo del "pool" di fattori di crescita contenuti nel LP, ha evidenziato la capacità delle capsule contenute all'interno delle medicazioni di caricare LP e di rilasciare il fattore di crescita, quando idratate in PBS.

I risultati ottenuti permettono di concludere che le medicazioni sviluppate sono idonee al "delivery" combinato di VCM e LP e sono in grado di promuovere la riparazione tissutale.

Il lavoro descritto è stato oggetto delle seguenti comunicazioni a congresso:

- M.Mori, S.Rossi, F.Ferrari, M.C.Bonferoni, G.Sandri, C.Del Fante, C.Caramella.
“Hyaluronic acid capsules in alginate dressings for the combined delivery of platelet lysate and vancomycin in skin ulcers” 7th AITUN Annual Meeting, “New frontiers in living cell encapsulation”, Perugia, 8-9 Marzo 2013.
Vincitore del premio “Best poster” al 7th AITUN Annual Meeting, “New frontiers in living cell encapsulation”, Perugia, 8-9 Marzo 2013
- M.Mori, S.Rossi, F.Ferrari, M.C.Bonferoni, G.Sandri, C.Del Fante, C.Caramella “Alginate “sponge-like” dressings for the combined delivery of platelet lysate and vancomycin in skin chronic wounds” 53° Simposio AFI, Rimini, 12-14 Giugno 2013
- M.Mori, S. Rossi, F.Ferrari, M.C.Bonferoni, G.Sandri, C. Del Fante, E. Dellerà, C.Caramella “Alginate dressings containing encapsulated platelet lysate and vancomycin for wound healing”, 3rd Conference on Innovation in Drug Delivery Advances in Local Drug Delivery, 22-25 September, 2013, Pisa, Italy

IV. Capitolo

Medicazioni a base di Chitosano glutammato e Sericina: ottimizzazione statistica di una formulazione base

IV.1 SCOPO DEL LAVORO

Negli ultimi anni è stato dimostrato che la sericina, proteina della seta estratta dal bozzolo del baco *Bombyx mori*, è in grado di svolgere un ruolo nel processo di riparazione tissutale [Padamwar et al., 2004] agendo come antiossidante. Infatti la sericina è ricca di amminoacidi polari, come la treonina e la serina, e alcuni autori hanno ipotizzato che il numero di gruppi idrossilici presenti nella struttura sia responsabile dell'azione antiossidante della molecola [Dash et al., 2008].

È stato inoltre dimostrato che la sericina è in grado di promuovere la guarigione di ulcere corneali e di migliorare le caratteristiche adesive di fibroblasti del derma umano, promuovendo di conseguenza la proliferazione [Patel et al., 2011]. In aggiunta, la sericina, quando addizionata al mezzo di coltura è in grado di promuovere la proliferazione di cellule, non risultando tossica.

Lo scopo di questo lavoro sperimentale è stato lo sviluppo di una medicazione “sponge-like” basata sull'associazione di chitosano glutammato (alto PM) (CS hMW) e sericina (SER) per il trattamento delle ulcere cutanee. Poiché la medicazione era preparata per liofilizzazione, si è reso necessario l'aggiunta di una agente crioprotettore come la Glicina (Gly). Lo sviluppo di tale medicazione è stato condotto tramite un disegno sperimentale (DoE)

Il lavoro si è articolato in due fasi. Nella prima fase del lavoro sono state preparate tre miscele a base acquosa di CS hMW. Ser e Gly a differenti concentrazioni. Tali miscele sono state usate tale quali o miscelate in determinati rapporti p/p al fine di ottenere i punti significativi di un *simplex centroid design*. Tali medicazioni dovevano essere caratterizzate da proprietà meccaniche che assicurassero una corretta maneggevolezza durante la fase di stoccaggio e di somministrazione e da capacità di assorbire l'essudato formando un gel. A tale scopo le variabili risposta del DoE considerate sono state: forza alla rottura, quantità di PBS (mezzo mimante l'essudato) assorbito dopo 6h di idratazione, proprietà reologiche come viscosità e viscoelasticità del gel formatosi dopo idratazione. I dati sperimentali sono stati in seguito analizzati tramite un programma statistico (Statgraphics 5.0, Statistical Graphics, Rocknille, MD), in accordo con il disegno sperimentale scelto. I dati sono stati sottoposti ad un'analisi di regressione al fine di individuare il modello di “best fitting” per ogni variabile risposta. La sovrapposizione di ogni “contour plot” ha permesso di definire la regione nella quale sono stati ottenuti i valori ottimali per ogni singola variabile risposta; all'interno di questa regione è stata individuata la composizione ottimale della medicazione. Il potere predittivo del modello utilizzato è stato confermato da una completa caratterizzazione della formulazione ottimizzata. Inoltre, è stata valutata la tossicità ed il potere antiossidante della SER su fibroblasti umani alla concentrazione di utilizzo nella formulazione.

Nella seconda fase del lavoro, al fine di migliorare le proprietà meccaniche della medicazione ottimizzata secondo DoE, è stata valutata l'aggiunta di chitosano a basso PM (CS IMW). La concentrazione di CS IMW è stata scelta sulla base delle proprietà meccaniche, di idratazione e reologiche. In seguito, sulla formulazione addizionata di CS IMW sono state valutate le proprietà di proliferazione cellulare, attraverso un'opportuna metodologia che non prevedesse alcuna diluizione della formulazione.

Infine, è stata valutata la stabilità fisica della formulazione dopo 30 giorni in essiccatore a 25°C. A tale scopo sono state valutate le proprietà meccaniche, reologiche e di idratazione della formulazione in stabilità, per confronto con la formulazione al tempo 0.

IV.2 MATERIALI E METODI

IV.2.1 Materiali

Acido glutammico (Sigma Chimica, Milano, I); Anti- mouse IgG-FITC antibody (Sigma Aldrich, Milano, I); 5-Bromo-2'deoxyuridine (BrdU) (Sigma Aldrich, Milano, I); Calcio cloruro (Carlo Erba Reagenti, Milano, I); Chitosano alto PM (CS hMW) (DD:91%) (1568, Giusto Faravelli, Milano, I); Chitosano basso PM (CS lMW) (DD:98%) (1504, Giusto Faravelli, Milano, I); DMSO (Dimetil Solfossido) (Sigma Aldrich, Milano, I); Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM, Lonza, BioWhittaker, B); Dulbecco's Phosphate Buffer Solution (DPBS, Sigma Aldrich, Milano, I); Glicina (Gly) (Sigma Chimica, Milano, I); Hank's Balance Salt Solution (HBSS) (Sigma Aldrich, Milano, I); Hydrogen peroxide (H_2O_2) (Carlo Erba, Milano, I); Hoechst 33258 (Sigma Aldrich, Milano, I); Inactivated foetal calf bovine serum (FBS) (Euroclone, Pero, I); Mouse anti-Bromo-deoxyuridine antibody (anti-BrdU antibody) (Amersham Bioscience, USA); Mowiol (Sigma Aldrich, Milano, I); $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ (Carlo Erba, Milano, I); $Na_2HPO_4 \cdot H_2O$ (Carlo Erba, Milano, I); MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma Aldrich, Milano, I); Penicillin streptomycin 100x (pen/strep)/amphoteric 100x (Sigma Aldrich, Milano, I); PTA-blocking solution (PBS/Tween20/Albumin) (Sigma Aldrich, Milano, I); Trypsin-EDTA solution (Sigma Aldrich, Milano, I); Trypan Blue solution (Biological Industries, Beit-Haemek, IL).

Lisato piastrinico (LP): fornito dal reparto di Immunoematologia ed Aferesi del IRCCS Policlinico S.Matteo, Pavia (vedi paragrafo I.2.1).

Sericina (SER) da bozzoli di *Bombyx mori*, In particolare i bozzoli di *Bombyx mori*, forniti da Divisione Stazione Sperimentale Seta, Milano. Sono stati degommati in autoclave a 120°C per 1 h (40 ml di acqua /g di bozzolo) per ottenere una soluzione di SER, da cui è stata ricavata la polvere per spray drying con Büchi Mini Spray Dryer B-290 (BÜCHI Labortechnik AG, Flawil, Switzerland) (flusso: 6 ml/min; temperatura d'ingresso: 120°C; temperatura di uscita: 80°C; pressione: 3 bar; flusso del fluido: 500-600 ml/h). L'analisi granulometrica della SER è stata effettuata per laser light scattering (Beckman Coulter LS230, Beckman Coulter, Inc., Brea, California, dotato di un piccolo volume pari a 120 ml e % di oscuramento : 5%); l'indice di rifrazione è stato settato a 1.359 per etanolo. La polvere sospesa in etanolo è stata sonicata per 4 minutie sottoposta ad analisi. Il particle size delle microsfele di SER è risultato di 3.69 ± 1.90 (s.d.) μm .

IV.2.2 Disegno sperimentale (DoE)

La scelta della composizione della medicazione è stata effettuata in base ad un idoneo disegno sperimentale (DoE), il *simplex centroid design* [Ferrari F. et al., 1996].

Sono stati considerati tre gruppi di soluzioni basati su differenti concentrazioni (%p/p) di chitosano glutammato (CS hMW), sericina (SER) e glicina (Gly): 1.5/0.5/0, 0.5/1/0 e 0.5/0.5/1. Queste soluzioni sono state usate come tali o miscelate in determinate concentrazioni p/p, corrispondenti ai punti caratteristici di un triangolo di Sheffè (Figura IV.1 e Tabella IV.1).

Le variabili considerate per il *simplex centroid design* sono state: la quantità d'acqua assorbita rispetto al peso dopo idratazione, le proprietà reologiche delle medicazioni idratate, ovvero viscosità ad una elevata forza di taglio (350s^{-1}) e il modulo elastico conservativo (G') ad una frequenza di 2Hz e la forza di frattura.

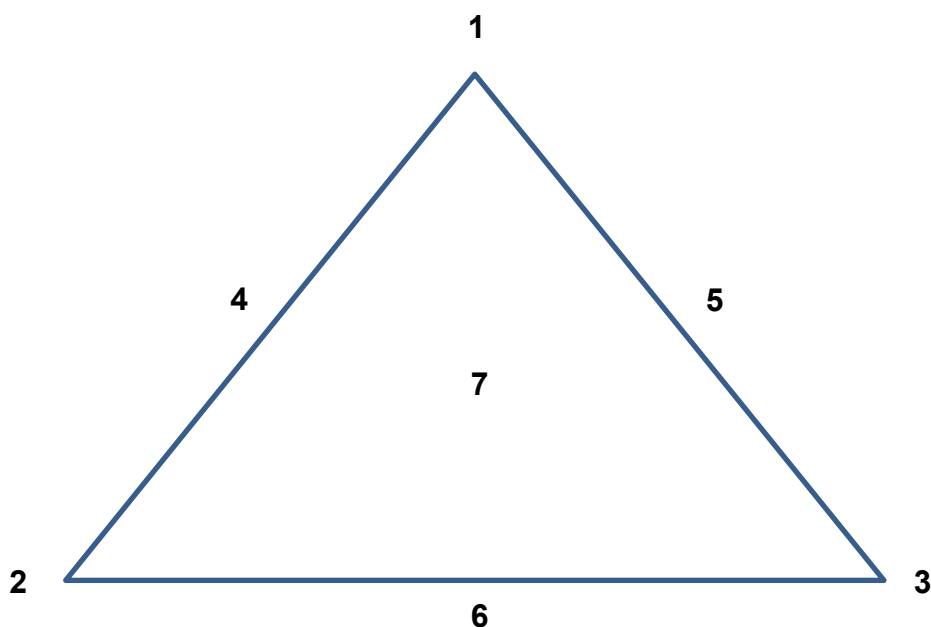


Figura IV.1: Triangolo di Sheffè

Tabella IV.1: Punti significativi del “simplex cetroid design”

	CS hMW	SER	Gly
1	1.5%	0.5%	-
2	0.5%	1%	-
3	0.5%	0.5%	1%
4	1%	0.75%	-
5	1%	0.5%	0.5%
6	0.5%	0.75%	0.5%
7	0.875%	0.66%	0.33%

IV.2.2.1 Preparazione delle medicazioni a base di CS hMW e SER

Le medicazioni sono state preparate per liofilizzazione di una soluzione acquosa di chitosano glutammato (CS hMW), glicina (Gly) e sericina (SER). Ad una dispersione acquosa di chitosano alto PM (CS hMW) è stata aggiunta una quantità di acido glutammico (G) tale da ottenere un rapporto 1:1 molare con i gruppi amminici del chitosano deacetilato. La glicina (Gly) è stata aggiunta alla soluzione di CS hMW come agente crioprotettore. Questa soluzione di CS hMW e Gly è stata diluita 1:1 con una soluzione acquosa di SER. 4g di questa soluzione è stata posta in un contenitore cilindrico di plastica ($\varnothing = 40\text{mm}$), congelata a -40°C e liofilizzata (Heto Dryer, Analitica De Mori, Milan, I) per 24 h. Si sono così ottenute medicazioni con diametro di 40mm e spessore 5mm.

IV.2.2.2 Caratterizzazione delle medicazioni

Le 7 medicazioni a base di CS hMW e SER sono state caratterizzate per le proprietà di resistenza meccanica, di idratazione e di viscosità e viscoelasticità dopo 6 h di idratazione come qui di seguito descritto.

IV.2.2.2.1 Valutazione delle proprietà meccaniche

La resistenza meccanica delle medicazioni è stata misurata tramite apparecchiatura TA.XT plus (ENCO, Spinea, I) dotato di un sistema di misura A/TG e di una cella di carico da 1kg come descritto nel paragrafo III.2.3.1.

IV.2.2.2.2 Valutazione delle proprietà di idratazione

Le misure di idratazione sono state condotte secondo quanto descritto nel paragrafo III.2.3.2. Dopo 6 h è stata pesata la formulazione, ormai trasformatasi in un gel ed è stata valutata la quantità d'acqua assorbita rispetto al peso iniziale.

IV.2.2.2.3 Valutazione delle proprietà reologiche

Sul gel ottenuto a seguito di idratazione in PBS per 6h, sono state effettuate misure di viscosità e di viscoelasticità tramite reometro rotazionale (Rheostress 600, Haake, I) come descritto nel paragrafo III.2.3.3.

IV.2.2.3 Procedura di ottimizzazione

I risultati sperimentali sono stati elaborati mediante pacchetto software Statgraphics Plus 5.0 (Statistical Graphics, Rockville, MD, USA), al fine di individuare tra i diversi modelli matematici (lineare, quadratico, cubico speciale) quello di *best fitting*, in grado cioè di meglio interpretare la relazione tra i parametri risposta del modello e la variabile indipendente (composizione frazionaria) e di calcolare sulla base di tale modello le curve di isorisposta di ciascun parametro, nell'ambito dello spazio sperimentale considerato.

I vari modelli matematici sono stati confrontati su base statistica utilizzando il coefficiente di correlazione per la bontà del fitting ed il valore di probabilità (p). La sovrapposizione delle curve di isorisposta calcolate dal modello di *best fitting* per ciascuna variabile risposta doveva permettere di individuare la composizione frazionaria dei tre campioni da utilizzare per la preparazione della medicazione di composizione ottimizzata.

IV.2.3 Valutazione delle citotossicità della SER

La citotossicità della SER è stata valutata su fibroblasti di bambino bNHDF (Promocell GmbH, Heidelberg, Germany) compresi tra il passaggio 6 e 16th. Tale linea cellulare è stata mantenuta in coltura come precedentemente descritto (paragrafo I.2.2).

Per il test di citotossicità sono state seminate 6×10^4 cellule/cm² in piastra da 96 pozzetti in presenza di mezzo completo (MC) e lasciate crescere per 24h al fine di ottenere un monostrato di cellule. Trascorso tale tempo, il MC è stato rimosso e le cellule sono state messe a contatto per 24h con una soluzione di SER preparata sia in MC che in mezzo senza siero (M s/s). Tre differenti concentrazioni sono state prese in esame: 0.01%, 0.05%, 0.1% (p/p). Dopo 24 ore di contatto è stata valutata la citotossicità dei campioni tramite MTT test (come descritto paragrafo II.2.3.3.). Una soluzione di Tryton al 10% p/p è stata utilizzata come controllo negativo. I risultati sono stati espressi come % di cellule vitali ottenuti normalizzando le misure di assorbanza delle cellule poste a contatto con i campioni con le misure di assorbanza delle cellule poste a contatto con M s/s. Sono stati analizzati otto repliche per campione.

IV.2.4 Valutazione delle proprietà antiossidanti della SER

Le proprietà antiossidanti della SER è stata valutata seminando 6×10^4 cell/cm² fibroblasti umani di bambino (bNHDF) in piastre da 96 pozzetti e lasciate crescere per 24h. 200µl di una soluzione sterile di SER (0.8% p/p) in MC è stata messa a contatto con il substrato cellulare per 24h. Dopo tale tempistica una soluzione 1 mM di H₂O₂ (Carlo Erba, Milano, I) è stata messa a contatto con le cellule. Dopo altrettante 24h è stato condotto un MTT test (paragrafo II.2.3.3.). I risultati sono stati espressi come % di cellule vitali ottenuta normalizzando l'assorbanza misurata in presenza di campioni per confronto con quella misurata con il MC. Sono state effettuate otto repliche per campione.

IV.2.5 Preparazione e caratterizzazione della medicazione ottimizzata con aggiunta di CS basso PM (CS IMW) (medicazione CS hMW-CS IMW/SER/Gly)

Al fine di migliorare le proprietà meccaniche della medicazione ottimizzata, CS IMW è stata addizionata alla formulazione CS hMW /SER/Gly. In particolare, sono state aggiunte due differenti percentuali di CS IMW: 0.2 e 0.5% p/p. Le medicazioni ottenute per liofilizzazione avevano le seguenti dimensioni: diametro 40 mm e spessore 5 mm. Tali medicazioni sono state sottoposte all'analisi delle proprietà meccaniche (test di trazione e di penetrometria), previo assorbimento del 10% di contenuto d'acqua, come descritto nel paragrafo III.2.3.1.

IV.2.5.1 Misure di trazione

Le medicazioni sono state sottoposte a misure di trazione come descritto nel paragrafo III.2.3.1.

IV.2.5.2 Misure di penetrometria

Come nel test di trazione, anche per la valutazione della resistenza alla penetrazione è stato utilizzato il TA.XT plus apparatus (ENCO, I), munito però di una sonda cilindrica (P/10, 10mm Cyl Delrin) con probe (P/30C) fissata al braccio meccanico, e di una cella di carico da 1kg.

La formulazione liofilizzata è stata posta orizzontalmente sulla base dello strumento, al di sotto della sonda. Una volta avviata l'analisi, il braccio meccanico si sposta verso il basso, e con esso la sonda, comprimendo la medicazione ad una velocità costante di 0.5mm/sec fino ad una distanza di penetrazione pari a 3mm, fissata sulla base dello spessore della medicazione.

Dalla misura si ottiene un grafico che riporta sull'asse delle ordinate la forza registrata dalla cella di carico, espressa in mN, e sull'asse delle ascisse la distanza di penetrazione espressa in mm. I parametri considerati sono stati: forza di massima penetrazione (mN) (corrispondente alla massima penetrazione della sonda nella formulazione) ed il lavoro di penetrazione (mN.mm) (area sottesa alla curva forza vs distanza). Sono state effettuate tre repliche per ciascun campione.

IV.2.6 Proprietà di proliferazione cellulare della medicazione CS hMW - IMW /SER/Gly

La medicazione avente caratteristiche meccaniche ottimali dopo l'aggiunta di CS IMW è stata sottoposta a misure di proliferazione cellulare con fibroblasti NHDF come descritto nel paragrafo III.2.6.1.

In particolare, 5×10^4 cellule/cm² sono state seminate nella camera basolaterale di sistemi Transwell® (Corning Costar, NY, USA) in presenza di M s/s e una porzione di medicazione di peso noto (20 mg) è stata posta sul filtro (0.4 µm) della camera apicale. La porzione di medicazione è stata idratata con 500 µl di MC e lasciata a contatto per 72h. Sono stati utilizzati inserti Transwell® al fine di evitare un contatto diretto della medicazione con le cellule, annullando in questo modo una possibile sofferenza cellulare dovuta alla formazione di un gel estremamente viscoso dopo idratazione della medicazione. Dopo 72h, l'inserto Transwell®, contenente la formulazione, è stato rimosso ed è stato effettuato un MTT test come descritto nel paragrafo II.2.3.3. I risultati sono stati espressi come % di proliferazione ottenuta normalizzando le assorbanze misurate per i campioni con quelle misurate per il controllo M s/s. Sono state effettuate tre repliche per campione.

IV.2.7 Stabilità fisica della medicazione CS hMW - IMW /SER/Gly

La stabilità della medicazione è stata valutata sulla base delle proprietà meccaniche (trazione e penetrometria), della predisposizione all'idratazione e delle proprietà di viscosità (sulla medicazione idratata 6h) dopo conservazione per 30 giorni a 25°C in essiccatore per confronto al

tempo 0. I test sono stati condotti come precedentemente descritto ai paragrafi III.2.3.1, , III.2.3.2 , III.2.3.3 e IV.2.5.2

IV.2.8 Analisi statistica

I dati sperimentali ottenuti dalle differenti misure sono stati, quando possibile, sottoposti ad analisi statistica grazie al software Statgraphics 5.0 (Statistical Graphics Corporation, Rockville, MD, USA). In particolare è stato utilizzato il test Anova una via Multiple range.

IV.3 RISULTATI E DISCUSSIONE

IV.3.1 Disegno sperimentale

In Tabella IV.2 sono riportati i valori sperimentali medi delle variabili risposta (forza di frattura, quantità di PBS assorbito per unità di peso di medicazione, viscosità a 300 s^{-1} , G' a 2 Hz) delle medicazioni preparate secondo il *simplex centroid design*.

Tabella IV.2: Valori delle variabili risposta ottenuti dalle 7 formulazioni del disegno sperimentale (valori medi $\pm$ d.s.; n=3)

Formulazione	Forza di rottura (mN)	Quantità di PBS (g/g)	Viscosità (Pa.s)	G' a 2 Hz (Pa)
1	852	5.17	2.34	784
	± 102	± 1.70	± 0.26	± 14
2	74	6.51	1.53	20940
	± 15	± 0.93	± 0.35	± 1810
3	990	3.56	2.05	1949
	± 148	± 0.85	± 0.35	± 461
4	1852	7.10	5.54	768
	± 95	± 0.75	± 0.96	± 27
5	738	0.56	2.44	899
	± 148	± 0.21	± 0.38	± 43
6	1590	8.12	0.89	418
	± 120	± 0.71	± 0.08	± 98
7	687	10.93	4.0	1157
	± 119	± 0.70	± 0.43	± 13

La forza di rottura è un parametro indice della resistenza alla rottura della medicazione durante le fasi di stoccaggio e applicazione sulla cute lesa. Tutte le medicazioni in esame presentano valori di tale parametro superiori a 600mN con l'eccezione della medicazione 2.

Per quanto concerne le proprietà di idratazione le formulazioni 6 e 7 sono caratterizzate da una maggiore capacità di assorbire tampone, seguite dalle formulazione 1,2 e 4, caratterizzate da valori paragonabili di PBS assorbito. Al contrario le formulazioni 3 e 5 presentano i valori più bassi del

parametro considerato. La capacità di assorbire tampone (fluido mimante l'essudato delle ferite) è una proprietà richiesta alle medicazioni, è noto, infatti, che un eccesso di essudato sfavorisce il processo di riparazione tissutale. In particolare, le ferite croniche sono generalmente caratterizzate da un eccesso di essudato che produce macerazione del tessuto circostante la ferita. Tale essudato differisce dall'essudato caratteristico delle ferite acute, perché è più ricco in metallo proteinasi (MMPs) e elastasi polimorfonucleate che sono proteasi enzimatiche distruttive per il tessuto. Per tale ragione, un'importante caratteristica delle medicazioni moderne è la capacità di assorbire l'eccesso di essudato mantenendo un'umidità adeguata e funzionale al processo di guarigione [Boateng J. et al., 2008].

Altre variabili risposta considerate sono state la viscosità ad elevati sforzi di taglio (300s^{-1}) ed il modulo elastico conservativo (G') alla frequenza di 2Hz del gel formatosi dopo idratazione a contatto con PBS per 6h. Si può osservare come le formulazioni 1, 2, 3 e 5 siano caratterizzate da valori di viscosità non significativamente diversi. Le formulazioni 4 e 7 sono caratterizzate da valori maggiori di viscosità ad indicare una maggiore resistenza allo scorrimento quando sottoposte a sforzi di taglio. La formulazione 6 presenta invece un valore di viscosità inferiore a 1Pa.s. Bassi valori di viscosità sono da preferire perché si accompagnano ad una facile rimozione della formulazione e ad un maggiore potere lubrificante della stessa quando, una volta idratata, è sottoposta ad alti valori di gradiente di scorrimento. Inoltre, tutti i campioni sono caratterizzati da buone proprietà elastiche indicate da valori di G' maggiori di 1000Pa. La formulazione 2, benchè caratterizzata da proprietà di idratazione e da una viscosità ad elevati valori di gradiente di scorrimento confrontabili a quelle di altre formulazioni, presenta valori di G' maggiori di un ordine di grandezza rispetto alle altre. Elevati valori di G' , a seguito di idratazione, risultano funzionali per medicazioni destinate al trattamento di lesioni cutanee: buone proprietà elastiche sono infatti responsabili di una maggiore protezione dell'area lesa quando sollecitata a bassi valori di sforzo di taglio.

L'elaborazione dei risultati su basi statistiche ha indicato che il modello di *best fitting* tra la composizione della formulazione e le diverse variabili risposta è quello cubico speciale [Ferrari F. et al., 1996].

Nelle Figure 3, 4, 5 e 6 sono riportate le curve di isorisposta (contour plot) in proiezione bi- e tri-dimensionale, calcolate dal modello di *best fitting* per ciascuna delle variabili risposta considerate. Ogni curva, identificata da un colore diverso, rappresenta le composizioni del veicolo per le quali si ottiene un valore identico del parametro considerato.

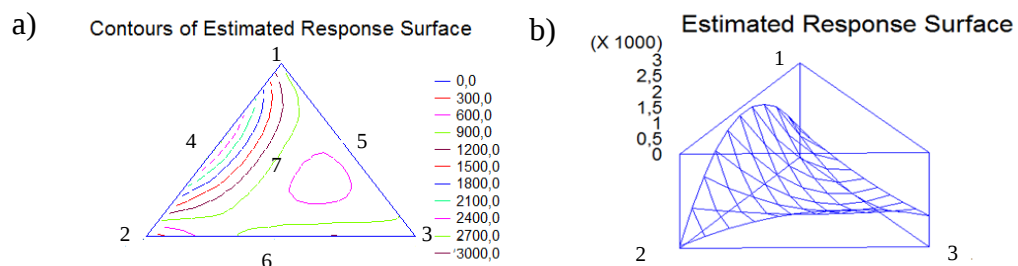


Figure IV.3: Curve di isorisposta (contour plot) calcolate dal modello speciale cubico per la variabile risposta forza di rottura in proiezione bi- (a) e tri-dimensionale (b).

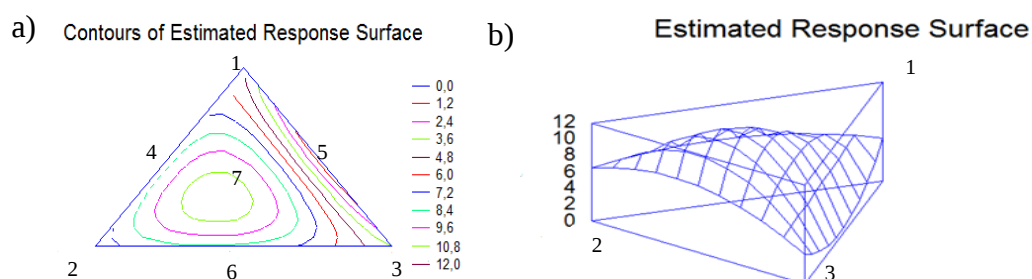


Figure IV.4: Curve di isorisposta (contour plot) calcolate dal modello speciale cubico per la variabile risposta g PBS assorbito/g in proiezione bi- (a) e tri-dimensionale (b)

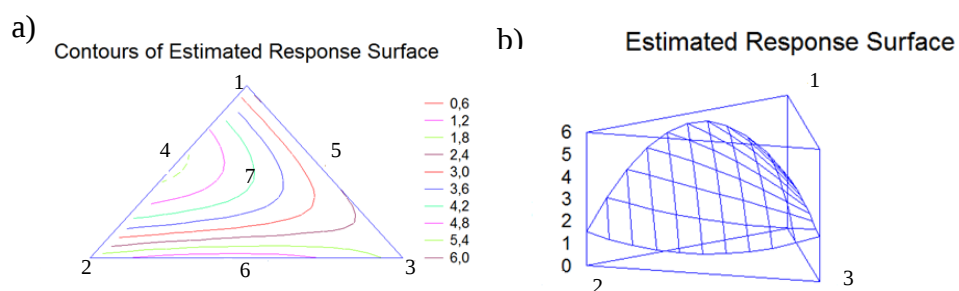


Figure IV.5: Curve di isorisposta (contour plot) calcolate dal modello speciale cubico per la variabile risposta viscosità a 300s⁻¹ in proiezione bi- (a) e tri-dimensionale (b)

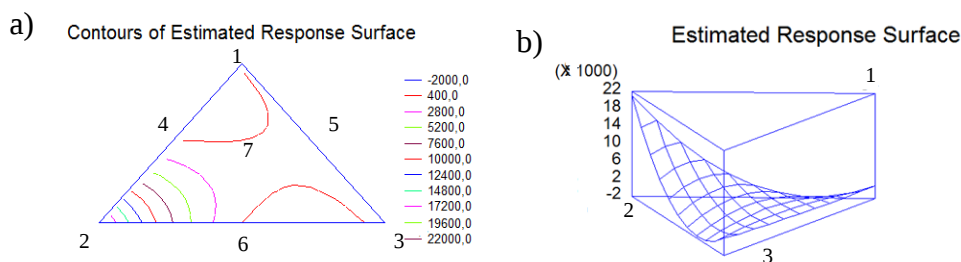


Figure IV.6: Curve di isorisposta (contour plot) calcolate dal modello speciale cubico per la variabile risposta modulo elastico conservativo(G') a 2Hz in proiezione bi- (a) e tri-dimensionale (b).

Dalla sovrapposizione dei contour plot è stata identificata la regione corrispondente alla composizione frazionaria dei tre campioni (vertici del triangolo) richiesta per l'ottenimento di medicazioni di formulazione ottimizzata, caratterizzate dalle seguenti variabili risposta: forza di rottura $> 900\text{mN}$; quantità di PBS assorbito per unità di peso (g PBS/g) > 7 , viscosità a $300\text{s}^{-1} < 3\text{Pa.s}$, modulo elastico (G') a $2\text{Hz} > 3000\text{Pa}$. Tale regione è rappresentata in Figura IV.7.

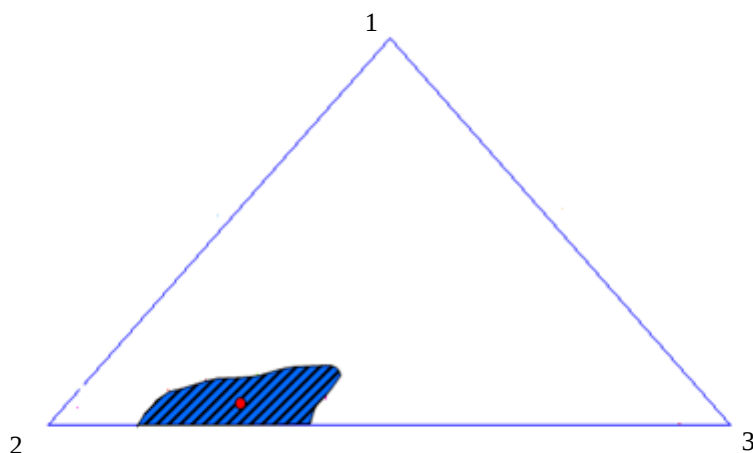


Figura IV.7: Regione, ottenuta dalla sovrapposizione dei contour plot, corrispondente alla composizione frazionaria dei 3 campioni (vertici del triangolo) richiesta per l'ottenimento di spugne di formulazione ottimizzata

E' stata quindi scelta in tale regione una formulazione di composizione ottimizzata. Precisamente la composizione della miscela da sottoporre a liofilizzazione, individuata come ottimale dall'elaborazione statistica, è stata: CSG 0.6% p/p, Ser 0.8% p/p e Gly 0.3% p/p.

Al fine di confermare la predittività del modello, la formulazione di composizione ottimizzata è stata sottoposta ad una caratterizzazione completa.

La formulazione ottimizzata è stata in grado di assorbire 9.0 ± 0.6 g/g of PBS, quando sottoposta a misure di idratazione. Tale valore è in accordo con quanto predetto dal modello. Inoltre, la formulazione ha dimostrato di avere buone caratteristiche meccaniche essendo caratterizzata da una forza di rottura pari a 2131 ± 620 mN, anch'essa in accordo con il modello. Anche le proprietà reologiche di tale formulazione hanno confermato la predittività del modello: tale formulazione era caratterizzata da valori di viscosità e G' a 2 Hz pari, rispettivamente, a 2.05 ± 0.49 (s.d.) Pa.s, and 3809 ± 241 Pa (s.d).

IV.3.2 Citotossicità della SER

In Figura IV.8 sono riportati i valori della vitalità cellulare% osservati per i fibroblasti lasciati a contatto con differenti diluizioni di SER (0.01, 0.05 e 0.1% p/p) per 72h. Le diluizioni sono state effettuate sia in MC che in M s/s. Il MC e il M s/s sono stati usati come controlli.

Si può osservare come i valori di vitalità % del Ms/s siano significativamente ($p < 0.05$) inferiori al MC, indicando il potere discriminante del metodo.

La SER quando diluita in MC presenta, a tutte le concentrazioni considerate, valori di vitalità % superiori al controllo (MC) ad indicare proprietà di promozione della proliferazione cellulare. I valori di proliferazione % ottenuti per le stesse concentrazioni di SER in Ms/s risultano marcatamente inferiori e non significativamente diversi ($p < 0.05$) rispetto al controllo (Ms/s). I risultati ottenuti evidenziano che la proteina della seta non solo non risulta tossica sui fibroblasti alle concentrazioni valutate, ma è anche in grado di promuovere la proliferazione cellulare quando in presenza dei componenti del siero.

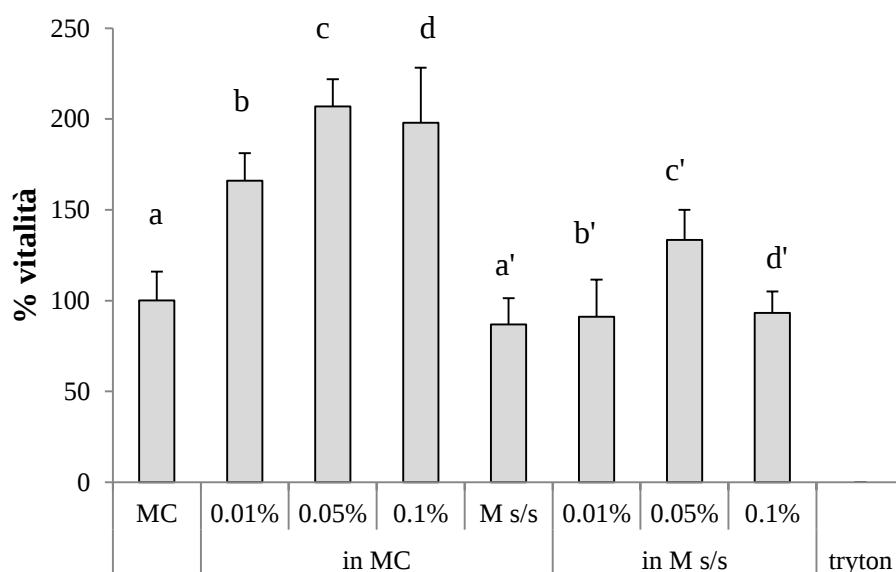
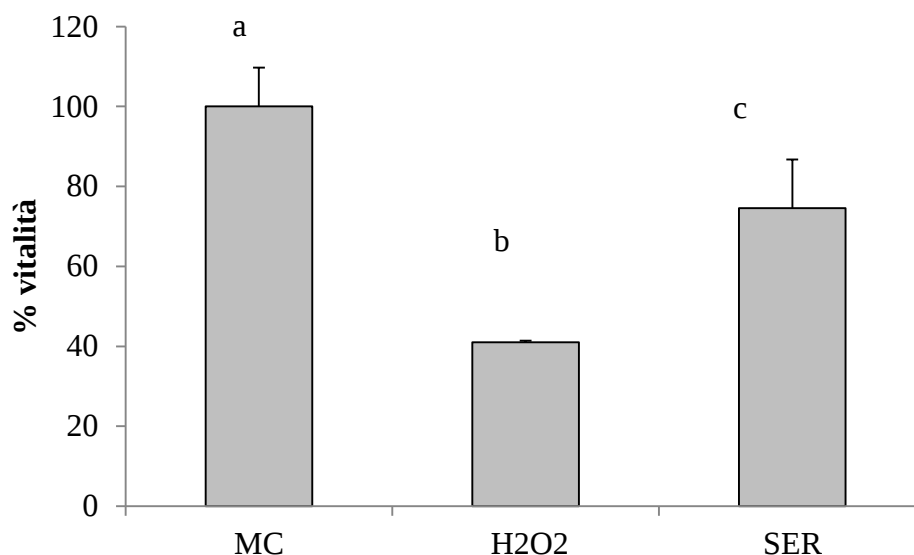


Figura IV.8: Valori di vitalità cellulare % osservati per una soluzione acquosa di SER 1% p/p diluita con mezzo completo (MC) o mezzo senza siero (Ms/s) a diverse concentrazioni. Il tryton è stato utilizzato come controllo negativo (valori medi $\pm$ es; n= 5)
significatività statistica ($p < 0.05$): a vs a'/b/c/d

IV.3.3 Proprietà antiossidanti della SER

In Figura IV.9 sono riportati i valori di vitalità % ottenuti per i fibroblasti quando sottoposti per 24h a stress ossidativo con H_2O_2 1 mM in assenza ed in presenza di Ser 0.8% (p/p), concentrazione impiegata nelle formulazioni (Il MC è stato considerato come riferimento).

Si può apprezzare un significativo aumento ($p < 0.05$) del valore di vitalità % per le cellule trattate con la soluzione di SER allo 0.8% p/p, rispetto al substrato cellulare a contatto con la sola acqua ossigenata (H_2O_2), ad indicare un effetto protettivo della proteina nei confronti del danno ossidativo.



FiguraIV. 9: Valori di vitalità % osservati in fibroblasti umani pretrattati con una soluzione di sericina (Ser) allo 0,8% p/p per 24h e successivamente esposti, per altrettante 24h, al danno ossidativo con H₂O₂ per confronto ai valori osservati in assenza di pretrattamento con Ser. I valori ottenuti in presenza di MC è stato utilizzato come riferimento (valori medi $\pm$ es; n=8).
significatività statistica ($p < 0.05$): b vs c; a vs b

IV.3.4 Caratterizzazione della medicazione ottimizzata con aggiunta di CS IMW (medicazione CS hMW - IMW/SER/Gly)

Allo scopo di migliorare le proprietà meccaniche della formulazione ottimizzata (DoE) (RIFERIMENTO), è stato aggiunto CS IMW: 0.2 e 0.5% p/p. Le miscele sono state poi liofilizzate ottenendo medicazioni con le seguenti composizioni: CS hMW (0.6% p/p), CS IMW (0.2 o 0.5% p/p), SER 0.8% p/p e Gly 0.3% p/p. Per scegliere la concentrazione ottimale di CS IMW è stata effettuata una completa caratterizzazione delle proprietà meccaniche delle medicazioni.

IV.3.4.1 Misure di trazione

In Figura IV.10 sono riportati i risultati ottenuti dal test di trazione per la medicazione di partenza (RIFERIMENTO) e per le medicazioni preparate con l'aggiunta di una percentuale crescente (0.2 e 0.5% p/p) di chitosano basso peso molecolare (CS IMW) al fine di migliorare le proprietà meccaniche della formulazione.

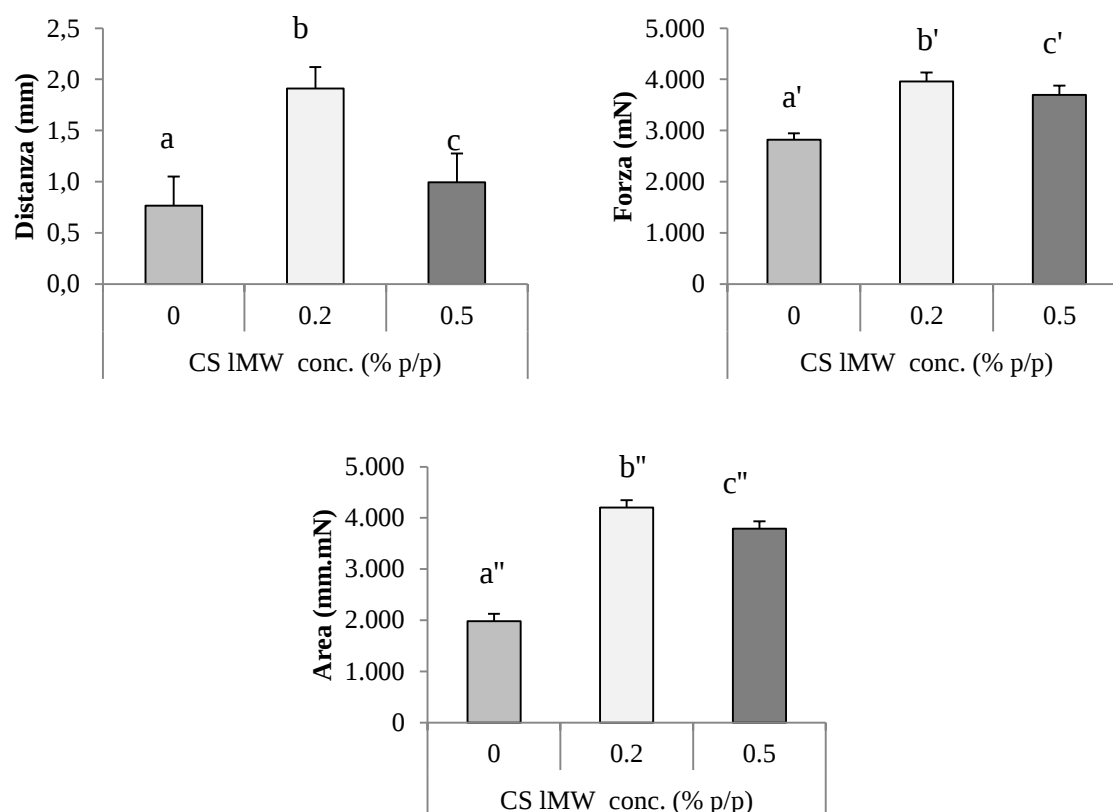


Figura IV 10- Valori dei parametri di trazione, distanza di rottura (mm), forza massima di rottura (mN) e area di rottura (mm.mN), ottenuti per la formulazione di confronto (RIFERIMENTO – CS IMW= 0%) e per le formulazioni ottenute aggiungendo nella soluzione di partenza 0.2% e 0.5% p/p di CS IMW (valori medi $\pm$ es; n=3) - significatività statistica ($p < 0.05$): a vs b; a' vs b'; a'' vs b''

L'aggiunta di CS IMW allo 0.2% p/p ha prodotto un aumento significativo ($p < 0.05$) di tutti e tre i parametri (distanza alla rottura, forza massima di rottura e area di rottura), ad indicare un incremento delle proprietà di resistenza meccanica della formulazione.

Un ulteriore aumento della concentrazione di CS IMW non ha comportato nessuna variazione significativa ($p < 0.05$) nei valori dei parametri forza e area di rottura; si è osservata, invece, una diminuzione della distanza alla rottura in presenza di 0.5% (p/p) CS IMW.

Per tali ragioni si è scelto di procedere con una concentrazione di CS IMW pari a 0.2% (p/p).

IV.3.4.2 Misure di penetrometria

In Figura IV.11 sono riportati i risultati ottenuti dal test di penetrometria per la medicazione di partenza (RIFERIMENTO) e per la medicazione preparata con l'aggiunta di CS IMW, 0.2 % p/p (TEST).

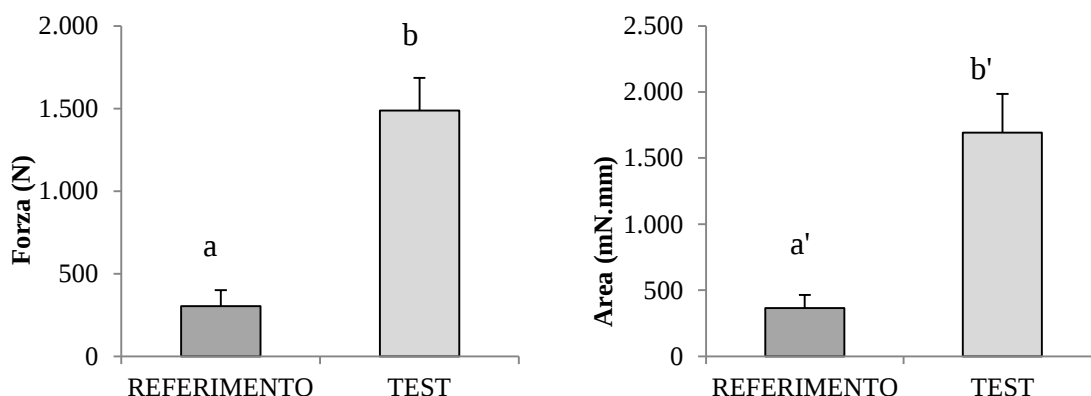


Figura IV.11- Valori di forza (N) e area di penetrazione (N.mm) ottenuti per la formulazione ottimizzata (DoE) (REFERIMENTO) e per la formulazione in esame (TEST) (valori medi $\pm$ es; n=3) significatività statistica ($p < 0.05$): a vs b; a' vs b'

Analogamente a quanto osservato per i risultati del test di trazione, la medicazione TEST presenta valori di forza e di area di penetrazione maggiori a quelli osservati per la formulazione di riferimento ad indicare una migliore resistenza meccanica.

La formulazione CS hMW- lMW/Ser/Gly è stata inoltre sottoposta a misure di idratazione e di viscosità dimostrando di mantenere la capacità di assorbire PBS (8.19 ± 0.46 g/g) e di possedere una viscosità a 300 s^{-1} (2.69 ± 0.13 Pa.s) confrontabile con quella ottenuta per la formulazione di riferimento.

IV.3.5 Proprietà di proliferazione cellulare della medicazione CS hMW-lMW/SER/Gly

Figura IV.12 riporta il valore di proliferazione % osservato per la medicazione.

Si può osservare come la medicazione sia caratterizzata da un valore di proliferazione % superiore ($p < 0.05$) al controllo (M s/s) ad indicare proprietà di promozione della proliferazione, comportamento da attribuire al CS ed alla SER presenti nella formulazione.

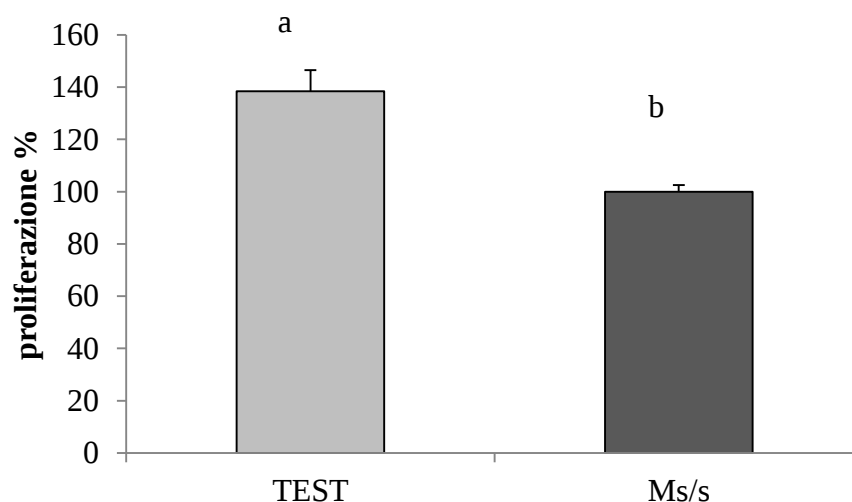


Figura IV 12: proliferazione % osservata per la medicazione TEST, ottenuta ponendo il campione nel comparto apicale delle piastre Transwell® in presenza di Ms/s (controllo) (valori medi $\pm$ es; n= 6) - significatività statistica ($p < 0.05$): a vs b

IV.3.6 Stabilità fisica della medicazione CS hMW-IMW/Ser/Gly

In Tabella IV.3 sono riportati i risultati dei test di trazione, penetrometria, idratazione e viscosità effettuati sulla formulazione CS hMW-IMW/SER/Gly dopo conservazione in essiccatore per 30 giorni a 25°C, per confronto con la medicazione al tempo 0.

Tabella IV.3: Proprietà meccaniche (misure di trazione, penetrometria), di idratazione e viscosità della formulazione CS hMW-IMW/SER/Gly dopo conservazione in essiccatore per 30 giorni a 25°C, per confronto con la medicazione al tempo 0 (valori medi $\pm$ d.s.; n=3)

	Misure di trazione			Misure di penetrometria		Misure di idratazione	Misure di viscosità
	Forza (mN)	Distanza (mm)	Area (mN.mm)	Forza (mN)	Area (mN.mm)	Quantità di PBS (g/g)	Viscosità (Pa.s)
T=0	3957 ± 179	1.91 ± 0.20	4201 ± 146	1940 ± 190	2126 ± 276	4.93 ± 0.64	3.21 ± 0.13
T=30 giorni	4016 ± 99	2.02 ± 0.01	4789 ± 1644	2230 ± 470	2270 ± 485	5.11 ± 0.70	3.31 ± 0.19

Non si osservano differenze statisticamente significative in tutti i parametri considerati dopo 30 giorni di conservazione.

IV.4 CONCLUSIONI

La prima fase del lavoro di ricerca ha permesso di individuare la composizione ottimizzata della medicazione “sponge-like” con caratteristiche ideali per la cura delle ulcere cutanee. Il disegno sperimentale si è rivelato predittivo: la medicazione di composizione ottimizzata possedeva proprietà meccaniche, di idratazione e reologiche in buon accordo con quanto predetto dal modello. In particolare la medicazione ottimizzata era caratterizzata da buone proprietà di assorbimento del tampone (fluido mimante l’essudato di una ferita), caratteristica importante in quanto l’eccesso di essudato ostacola la guarigione delle ferite.

Il gel ottenuto a seguito di idratazione possedeva un comportamento pseudoplastico e un basso valore di viscosità a 300s^{-1} ad indicare una maggiore resistenza allo scorrimento per piccole sollecitazioni ed un maggiore potere lubrificante ad alti valori di gradiente di scorrimento, proprietà funzionali ad un’azione protettiva sulla ferita. Anche le proprietà elastiche del gel formatosi dopo idratazione sono risultate ottimali per un’azione protettiva; esso era infatti caratterizzato da elevati valori del modulo elastico conservativo (G') e da una prevalenza del modulo elastico sul viscoso.

La medicazione ottimizzata presentava anche buone proprietà di resistenza meccanica, necessarie per il mantenimento dell’integrità della medicazione durante le fasi di stoccaggio e di applicazione sulla cute lesa.

Le medicazioni hanno dimostrato di possedere proprietà di proliferazione cellulare dovute alla presenza nella composizione del chitosano e della sericina.

Al fine di migliorare le proprietà di resistenza meccanica della formulazione sviluppata, la formulazione è stata modificata aggiungendo diverse concentrazioni di chitosano a basso peso molecolare (CS LMW).

La medicazione di composizione modificata (TEST) è stata sottoposta ad una completa caratterizzazione delle proprietà di resistenza meccanica: come dimostrato dai risultati ottenuti dal test di trazione e penetrometria, l’aggiunta di CS LMW allo 0.2% p/p ha prodotto un aumento significativo delle proprietà di resistenza meccanica della formulazione. Un ulteriore aumento della concentrazione del polimero non ha comportato nessuna variazione nei valori dei parametri forza e area di rottura. Analoghi risultati sono stati ottenuti per il test di penetrometria.

Il confronto delle proprietà di idratazione delle medicazioni di RIFERIMENTO e TEST ha evidenziato che entrambe le formulazioni sono caratterizzate da capacità paragonabili di assorbire tampone fosfato. Inoltre, dopo idratazione le due formulazioni presentano valori di viscosità e quindi proprietà lubrificanti confrontabili.

Infine, è stato dimostrato che la sericina non solo non è citotossica ma possiede anche proprietà di proliferazione cellulare quando diluita in mezzo completo. La sericina, alla concentrazione di utilizzo nelle formulazioni, presenta un effetto protettivo nei confronti del danno ossidativo operato dall'acqua ossigenata sui fibroblasti alla concentrazione utilizzata nella formulazione.

Il lavoro descritto è stato oggetto delle seguenti comunicazioni a congresso:

M.Mori, S.Rossi, M.C.Bonferoni, G.Sandri, F.Ferrari, C.Del Fante, S.Perteghella, M.Torre, C.Caramella. "Optimization of chitosan/sericin dressings for the delivery of platelet lysate in skin ulcers" 7th AITUN Annual Meeting, "New frontiers in living cell encapsulation", Perugia, 8-9 Marzo 2013

M.Mori, S.Rossi, M.C.Bonferoni, G.Sandri, F. Ferrari, C. Del Fante, T.Chlapanidas, S. Faragò , C. Caramella " Development Assisted By Simplex Centroid Design Of Chitosan Dressings For The Delivery Of Platelet Lysate In Skin Ulcers" 11th International Conference of the European Chitin Society, Porto, Portugal 5-8 May, 2013

V. Capitolo

**Medicazioni a base di Chitosano glutammato e sericina:
caricamento della formulazione base con lisato piastrinico**

V.1 SCOPO DEL LAVORO

Nel lavoro precedente (Cap. IV), è stata sviluppata una medicazione “sponge-like”, contenente chitosano glutammato (CS) e sericina (SER), ottimizzata mediante un disegno sperimentale (*simplex centroid design*). Sulla base delle variabili risposta considerate (forza di rottura della medicazione, quantità di PBS assorbito, proprietà reologiche dopo idratazione) si è giunti ad una medicazione finale, ottenuta mediante un processo di liofilizzazione a partire da una soluzione composta da: chitosano glutammato ad alto peso molecolare (CS hMW) 0.6% (p/p), sericina (SER) (0.8% p/p) e glicina 0.3% (p/p). Tale medicazione è stata in seguito migliorata nelle proprietà meccaniche aggiungendo chitosano glutammato a basso peso molecolare (CS lMW) alla concentrazione 0.2% p/p.

Scopo di questo lavoro è stato il caricamento della medicazione precedentemente sviluppata con lisato piastrinico (LP). Inizialmente è stato indagato il verificarsi di un eventuale effetto sinergico di stimolazione della proliferazione cellulare di fibroblasti umani tra LP e SER. In particolare è stato valutato *in vitro* l'effetto sulla proliferazione cellulare di una miscela LP e SER per confronto al solo LP e alla sola SER.

Il lavoro si è quindi articolato in due fasi. Nella prima fase del lavoro, è stata valutata l'influenza del caricamento con LP prima della liofilizzazione sulle proprietà di resistenza meccanica, idratazione, reologiche a seguito di idratazione.

Per valutare il “loading” di LP nella medicazione, la quantità del fattore di crescita PDGF-AB contenuto nella medicazione è stata determinata mediante test ELISA.

Mediante test *in vitro* su fibroblasti umani, è stata, quindi, valutata la capacità della medicazione caricata di promuovere la proliferazione cellulare.

Nella seconda fase del lavoro, è stata indagata la possibilità di caricare estemporaneamente LP sulla medicazione bianca liofilizzata. A tale scopo è stata valutata l'influenza della quantità di LP caricato sulle proprietà meccaniche e reologiche del gel formatosi dopo completo assorbimento di LP.

Trovata la quantità di LP ottimale per il caricamento estemporaneo, la medicazione caricata è stata sottoposta a test di proliferazione cellulare per confronto con la formulazione bianca.

V.2 MATERIALI E METODI

V.2.1 Materiali

Acido glutammico (G) (Sigma Chimica, Milano, I); Anti- mouse IgG-FITC antibody (Sigma Aldrich, Milano, I); 5-Bromo-2'deoxyuridine (BrdU) (Sigma Aldrich, Milano, I); Chitosano alto PM (CS hMW) (DD:91%) (1568, Giusto Faravelli, Milano, I); Chitosano basso PM (CS lMW) (DD:98%) (1504, Giusto Faravelli, Milano, I); DMSO (Dimetil Solfossido) (Sigma Aldrich, Milano, I); Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM, Lonza, BioWhittaker, B); Dulbecco's Phosphate Buffer Solution (DPBS, Sigma Aldrich, Milano, I); Glicina (Gly) (Sigma Chimica, Milano, I); Hank's Balance Salt Solution (HBSS) (Sigma Aldrich, Milano, I); Hoechst 33258 (Sigma Aldrich, Milano, I); Inactivated foetal calf bovine serum (FBS) (Euroclone, Pero, I); Mouse anti- Bromo-deoxyuridine antibody (anti-BrdU antibody) (Amersham Bioscience, USA); Mowiol (Sigma Aldrich, Milano, I); $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Carlo Erba, Milano, I); $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Carlo Erba, Milano, I); MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma Aldrich, Milano, I); Penicillin streptomycin 100x (pen/strep)/amphoteric 100x (Sigma Aldrich, Milano, I); PTA-blocking solution (PBS/Tween20/Albumin) (Sigma Aldrich, Milano, I); Trypsin-EDTA solution (Sigma Aldrich, Milano, I); Trypan Blue solution (Biological Industries, Beit-Haemek, IL). Lisato piastrinico (LP): fornito dal reparto di Immunoematologia ed Aferesi del IRCCS Policlinico S.Matteo, Pavia (vedi paragrafo I.2.1).

Sericina (SER) da bozzoli di *Bombyx mori*, (fornita da Divisione stazione sperimentale seta, Milano, I), come descritto nel paragrafo IV.2.1.

V.2.2 Associazione LP e SER

Per valutare la presenza di un eventuale effetto sinergico tra LP e SER è stato effettuato un test di proliferazione cellulare su fibroblasti bNHDF utilizzando piastre da 12 pozzetti con inserti Transwell® come descritto nel paragrafo III.2.6.1. In particolare, nella camera apicale sono stati posti 500 µl di SER 0.5 % p/p in MC da sola o in associazione con LP (1:1). Come controlli sono stati valutati il MC e LP.

V.2.3 Preparazione e caratterizzazione della medicazione caricata con LP prima della liofilizzazione

Le medicazioni caricate sono state realizzate con lo stesso metodo di preparazione utilizzato per le bianche (paragrafo IV.2.5.), in particolare, le medicazioni sono state preparate per liofilizzazione di

una soluzione acquosa di CS hMW 0.6% p/p, CS lMW 0.2% p/p, SER 0.8% p/p e Gly 0.3% p/p, a cui 500 µl di acqua sono stati sostituiti con 500 µl di LP. Sono state realizzate medicazioni con diametro di.. 22 mm e spessore di 3.4 mm.

Le medicazioni caricate con LP sono state sottoposte alla valutazione delle proprietà meccaniche , di idratazione e reologiche, utilizzando le stesse condizioni operative descritte nei paragrafi III.2.3.1, , III.2.3.2, III. 2.3.3 e IV.2.5.2 al fine di valutare se l'aggiunta di LP prima della liofilizzazione avesse modificato le proprietà della medicazione bianca.

Le stesse medicazioni sono state sottoposte inoltre a test di proliferazione cellulare e al test ELISA per il dosaggio del fattore di crescita PDGF-AB, rappresentativo del pool di fattori di crescita del lisato piastrinico. È stata anche valutata la capacità della formulazione di rilasciare il fattore di crescita PDGF-AB, quando posta a contatto con PBS, mezzo mimante l'essudato delle ferite.

V.2.3.1 Valutazione della proprietà di proliferazione cellulare

Le medicazioni caricate con LP sono state sottoposte a test di proliferazione cellulare, utilizzando una piastra da 12 pozzetti con inserti Transwell[®], come descritto nel paragrafo III.2.6.1: in particolare, 1.5ml di sospensione cellulare in Ms/s è stata seminata nel comparto basolaterale di ciascun pozzetto utilizzato. Nella camera apicale è stata posta una porzione di medicazione (circa 20 mg) idratata con 500µl di MC.

La proliferazione è stata valutata dopo 72h con MTT test (paragrafo II.2.3.3) MC e LP fresco, alla stessa concentrazione delle medicazioni, sono utilizzati come controlli.

V.2.3.2 Valutazione della sintesi di DNA tramite incorporazione di Bromo-deossiuridina (BrdU)

Il test della BrdU è stato condotto come precedentemente descritto (paragrafo III.2.6.2). In particolare, il test è stato condotto sia su medicazioni “sponge-like” bianche che caricate con LP, previamente tagliate e pesate (20 mg di peso), quindi riposte all'interno dei sistemi Transwell[®]. La porzione di medicazione è stata idratata 500 µl di MC e la piastra è stata lasciata in incubatore per 72h. Alla settantaduesima ora di contatto al mezzo è stato addizionato 20 µL della diluizione 1:20 di BrdU, lasciando in incubatore per l'ultima ora. Successivamente i campioni sono stati lavati con 1 mL di HBSS e fissati con 2 mL di etanolo al 70% e conservati a -20°C. Al momento del conteggio il vetrino è stato trattato come descritto nel paragrafo II.2.5.5.

V.2.3.3 Valutazione del titolo e delle proprietà di rilascio di PDGF AB

Le medicazioni caricate con LP sono state sottoposte, previa dissoluzione in 9.5ml di PBS per 6h, a test ELISA per valutare la capacità di caricamento del fattore di crescita PDGF AB, come descritto nel paragrafo II.2.5.3.

Le proprietà di rilascio delle medicazioni sono state studiate secondo quanto descritto nel paragrafo III.2.6.3.

V.2.4 Preparazione e caratterizzazione della medicazione caricata con LP estemporaneamente

Le medicazioni “sponge-like” bianche aventi 22 mm di diametro e 5 mm di spessore sono state caricate estemporaneamente con differenti quantità di LP (0.25, 0.35 e 0.5 ml), gocciolando tali quantità sulla medicazione liofilizzata. A completo assorbimento del LP (3h), le medicazioni sono state caratterizzate per le proprietà meccaniche (test di penetrometria) e reologiche come descritto precedentemente nei paragrafi IV.2.5.2 e III. 2.3.3.

V.2.4.1 Valutazione delle proprietà di proliferazione cellulare

La medicazione con le migliori proprietà meccaniche e reologiche dopo caricamento estemporaneo di LP è stata sottoposta a test di proliferazione cellulare e al test della BrdU, come descritto nei paragrafi V.2.3.1 e V.2.3.2, per confronto alla medicazione bianca, LP fresco e MC.

V.2.5 Analisi statistica

I dati sperimentali ottenuti dalle differenti misure sono stati, quando possibile, sottoposti ad analisi statistica grazie al software Statgraphics 5.0 (Statistical Graphics Corporation, Rockville, MD, USA). In particolare è stato utilizzato il test Anova una via e Multiple range.

V.3 RISULTATI E DISCUSSIONE

V.3.1 Associazione di LP e SER

In Figura V.1 sono riportati i valori di proliferazione % osservati dopo contatto con fibroblasti umani per tempi crescenti (24, 48 e 72h) di una soluzione di SER allo 0.5% p/p, di una sua miscela con LP (LP/SER) e di solo LP. Il mezzo completo (MC) è stato utilizzato come mezzo di controllo. Si può osservare come LP presenti valori di proliferazione % significativamente maggiori ($p < 0.05$) al MC ad indicare l'effetto di promozione della proliferazione cellulare delle sostanze biologicamente attive presenti nell'emoderivato. A tutti i tempi considerati, la miscela LP/SER è caratterizzata da valori di proliferazione % maggiori ($p < 0.05$) a quelli osservati per la soluzione di sola SER e per il solo LP ad indicare un effetto sinergico tra l'emoderivato e la proteina della seta.

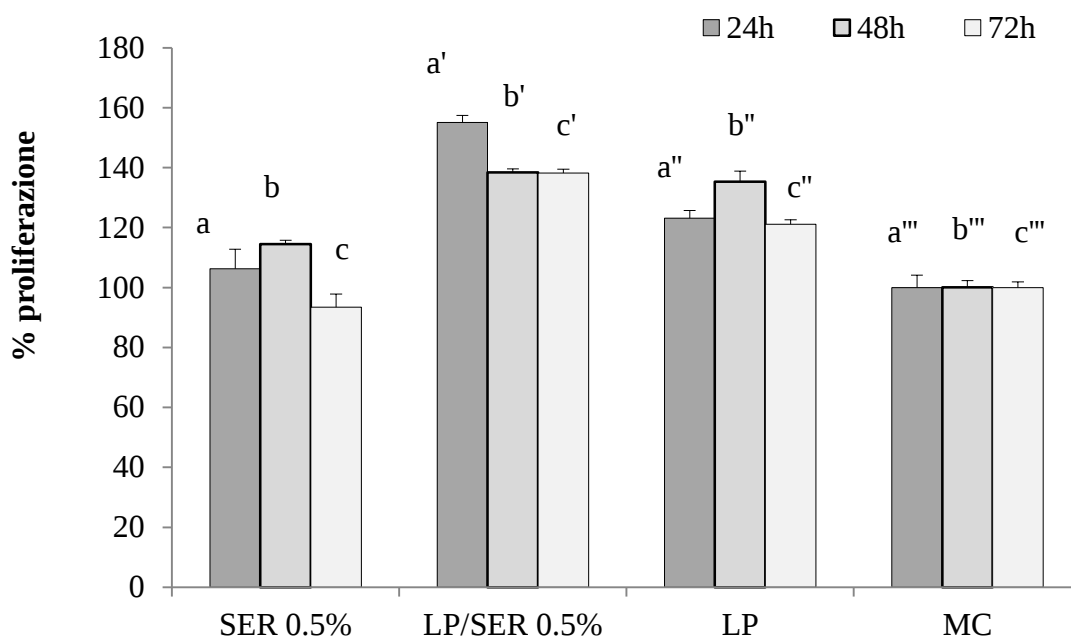


Figura V.1: Valori di proliferazione % osservati dopo contatto con fibroblasti umani per tempi crescenti (24, 48 e 72h) di una soluzione di sericina (SER) allo 0.5% p/p, di una sua miscela con LP (LP/SER) e di solo LP. Il mezzo completo (MC) è stato utilizzato come riferimento significatività statistica ($p < 0.05$): a' vs a''/a'''; a'' vs a'''; b' vs b''/b'''; b'' vs b'''; c' vs c''/c'''; c'' vs c'''

V.3.2 Caratterizzazione della medicazione caricata con LP prima della liofilizzazione

V.3.2.1 Proprietà meccaniche

In Figura V.2 sono riportati i risultati del test di trazione ottenuti per la medicazione non caricata (bianca) e caricata con 500 μ l di LP (carica) prima della liofilizzazione .

Si può osservare come il caricamento con LP non comporti nessuna variazione significativa dei parametri considerati.

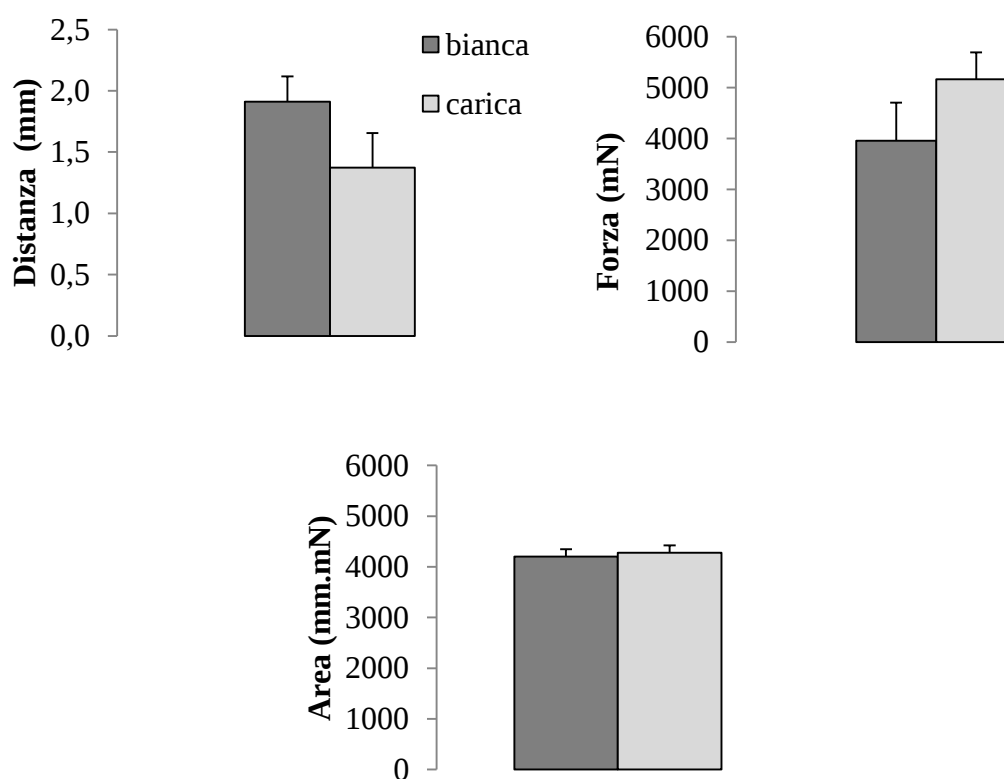


Figura V.2: Valori dei parametri di trazione, distanza di rottura (mm), forza massima di rottura (mN) e area di rottura (mm.mN) ottenuti per le formulazioni bianca e caricata con LP (carica) (valori medi $\pm$ es; n=3).

In Figura V.3 sono riportati i risultati del test di penetrometria condotto sulle formulazioni bianca e caricata con 500 μ l di LP prima della liofilizzazione.

Come si può osservare il caricamento con LP non comporta significative modificazioni dei parametri forza e area di penetrazione.

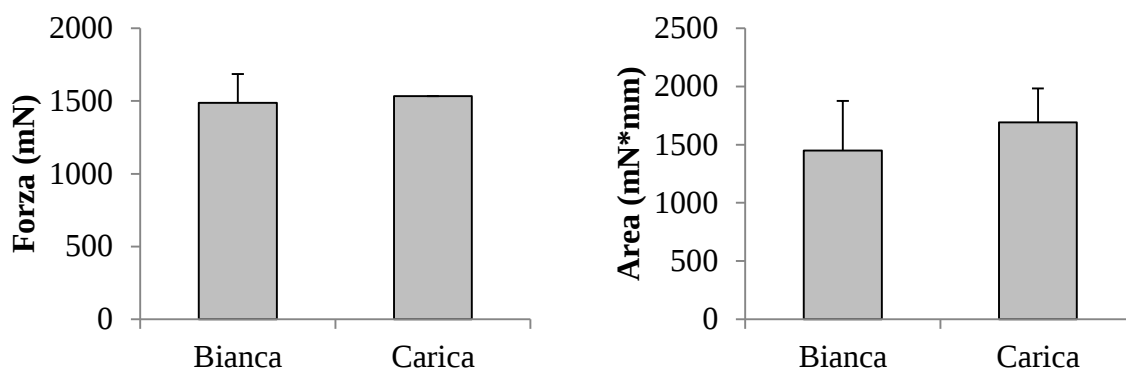


Figura V.3: Valori di forza e area di penetrazione (espressi in mN e mm.mN) ottenuti per le formulazioni bianca e caricata con 500 μ L di LP (valori medi $\pm$ es; n=3)

V.3.2.2 Proprietà di idratazione

In Figura V.4 sono riportate le quantità di tampone assorbito (PBS) per unità di peso dalle due medicazioni, bianca e caricata con 500 μ l di LP, dopo idratazione in PBS per 6 e 18h.

Come si può osservare a 6h la medicazione carica mostra una maggiore capacità di assorbire PBS, per confronto alla medicazione bianca. Tali differenze non sono, però, apprezzabili a 18h, dove non si osservano differenze significative ($p < 0.05$) nella quantità di PBS assorbito per unità di peso del campione. Mentre per la medicazione bianca un aumento del tempo di idratazione comporta un incremento della quantità di tampone assorbito, per la medicazione carica il tempo di idratazione non sembra influenzare la capacità della formulazione di assorbire tampone.

La quantità di PBS assorbito dalla formulazione carica risulta essere comunque superiore di quasi 8 volte il suo peso, caratteristica idonea all'impiego a cui questa medicazione risulta destinata.

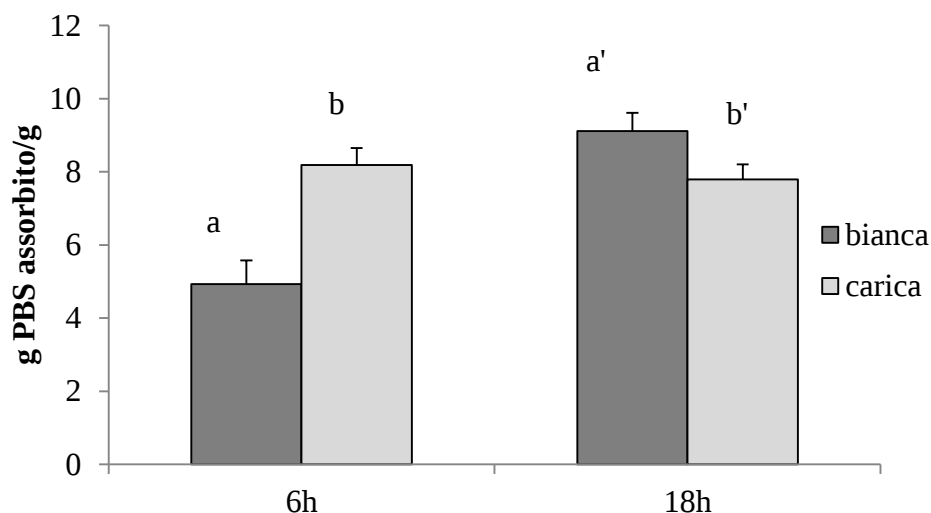


Figura V.4: Quantità di PBS assorbito per unità di peso delle formulazioni (g di PBS assorbito/g), ottenute per la formulazione bianca per confronto alla formulazione caricata con 500 μ l di LP (valori medi $\pm$ es; n=3) - significatività statistica ($p < 0.05$): a vs b

V.3.2.3 Proprietà reologiche

In Figura V.5 (a e b) sono riportate le curve medie di viscosità delle medicazioni in esame, dopo idratazione per 6h e 18h a 32°C in PBS. La medicazione, dopo caricamento con LP e inseguito ad idratazione, mantiene un comportamento pseudoplastico paragonabile alla formulazione bianca, indicato da valori di viscosità che diminuiscono all'aumentare del gradiente di scorrimento. Pertanto, è possibile apprezzare che, dopo caricamento, la formulazione mantiene, sull'area di applicazione, un'azione di protezione e proprietà lubrificanti, a seconda della sollecitazione applicata.

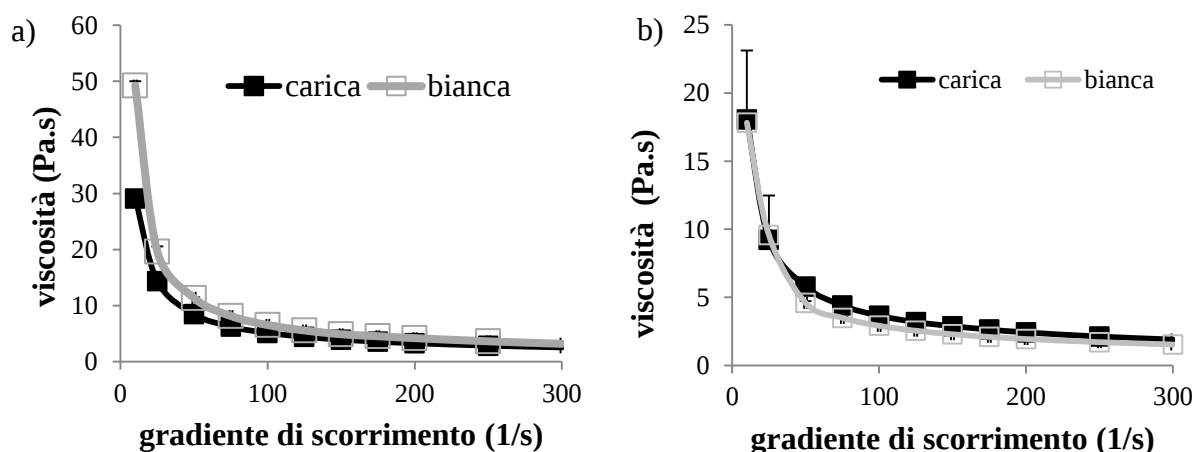


Figura V.5(a,b): Curve di viscosità ottenute per diversi tempi di idratazione (6h e 18h) a contatto con PBS delle formulazioni bianca e carica con 500 μ l di LP (valori medi $\pm$ es; n=3)

In Figura V.6 e V.7 sono riportati i valori dei moduli viscoelastici conservativo (G') e dissipativo (G'') in funzione della frequenza, ottenuti per la medicazione bianca e carica con 500 μ l di LP dopo 6h e 18h di idratazione a 32°C in PBS.

I più alti valori di G' rispetto a G'' evidenziano come la medicazione carica con LP, dopo 6h di idratazione, sia caratterizzata da una prevalenza delle caratteristiche elastiche sulle viscose. Tali valori risultano, inoltre, significativamente superiori se paragonati a quelli ottenuti per la formulazione bianca.

Elevate proprietà elastiche, a seguito di idratazione, appaiono funzionali per medicazioni destinate al trattamento di lesioni cutanee: tali caratteristiche sono, infatti, responsabili di una maggiore protezione dell'area lesa, quando la medicazione viene sollecitata a bassi valori di sforzo di taglio.

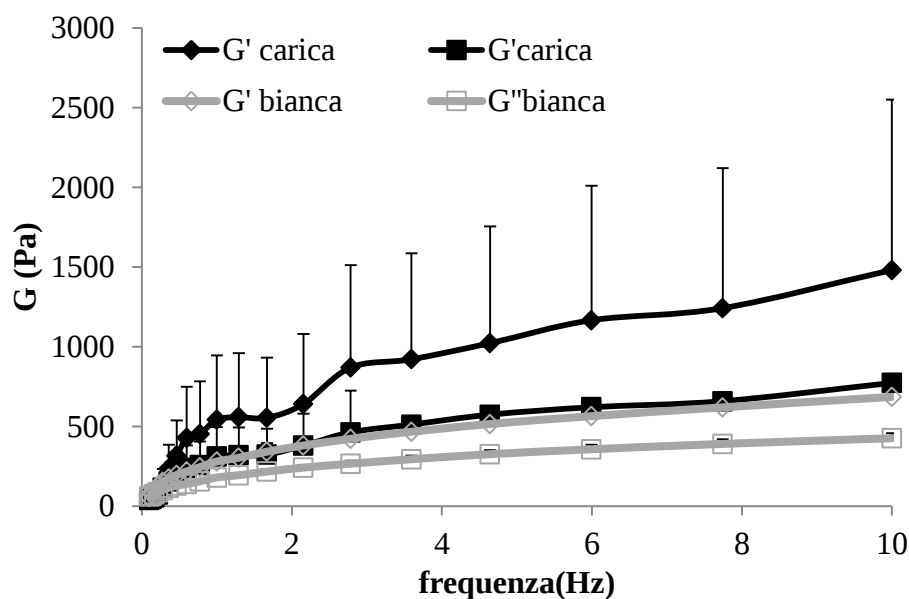


Figura V.6: Valori dei moduli elastici conservativo (G') e dissipativo (G'') ottenuti per le formulazioni bianca e carica con 500 μ l di LP dopo 6h di idratazione a contatto con PBS (valori medi $\pm$ es; n=3).

Dopo 18h di idratazione a contatto con PBS, la medicazione carica mostra valori dei moduli G' e G'' significativamente maggiori rispetto alla formulazione bianca, a dimostrare che, anche dopo 18h di idratazione, vengono mantenute migliori proprietà elastiche sulle viscose.

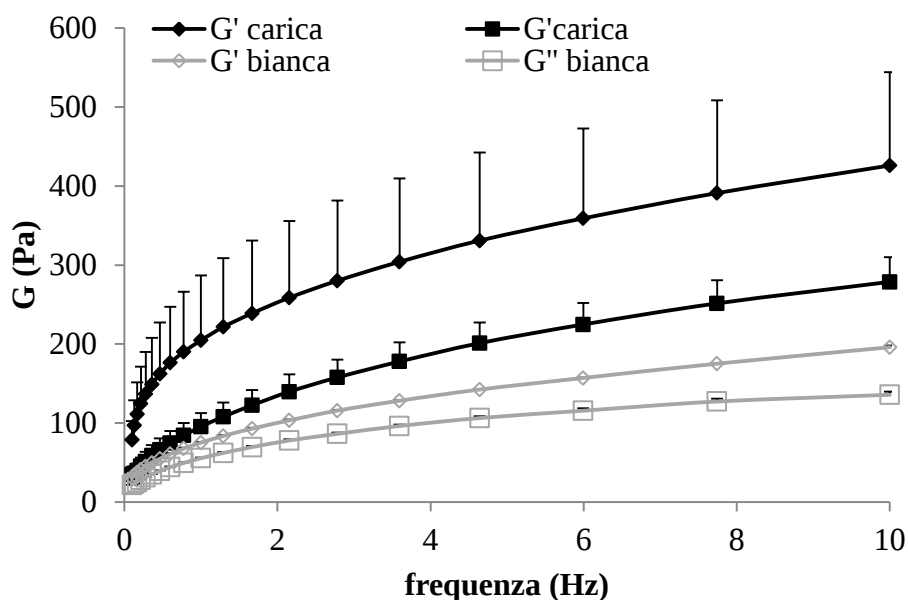


Figura V.7: Valori dei moduli elastici conservativo (G') e dissipativo (G'') ottenuti per le formulazioni bianca e carica con 500 μ l di LP dopo 18h di idratazione a contatto con PBS (valori medi $\pm$ es; n=3).

V.3.2.4 Proprietà di proliferazione cellulare

In Figura V.8 sono confrontati i valori di proliferazione % osservati per la medicazione caricata e non con LP, ottenuti ponendo i campioni nel comparto apicale delle piastre da 12 pozzetti con inserti Transwell® in presenza di MC, utilizzato per l'idratazione della medicazione; il MSS è stato posto, invece, nel comparto basolaterale a contatto con le cellule.

Si può osservare come la medicazione caricata con LP sia caratterizzata da un valore di proliferazione % paragonabile al controllo (MC) e significativamente superiore ($p < 0.05$) rispetto alla medicazione bianca ad indicare un incremento delle proprietà di promozione della proliferazione cellulare.

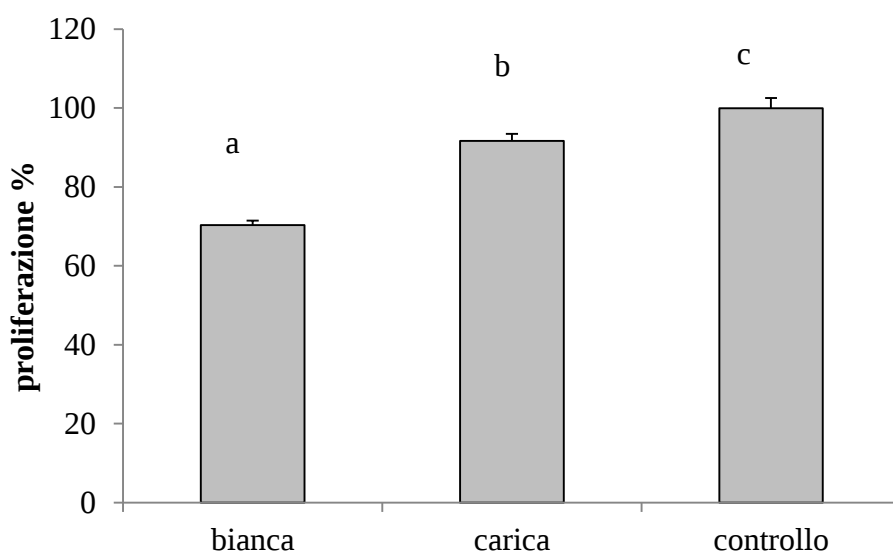


Figura V.8: Valori di proliferazione % osservati per la formulazione caricata e non con LP, ottenuti ponendo i campioni nella camera apicale di sistemi Transwell® in presenza di MC (valori medi $\pm$ es; $n=3$) - significatività statistica ($p < 0.05$): a vs b

In Figura V.9 sono riportati i valori % di fibroblasti in fase proliferativa S per i campioni in esame. Le medicazioni caricate sono caratterizzate da una maggior percentuale di cellule in fase S rispetto alle medicazioni bianche. Non si evidenziano differenze statisticamente significative nei valori osservati per la medicazione carica ed il LP.

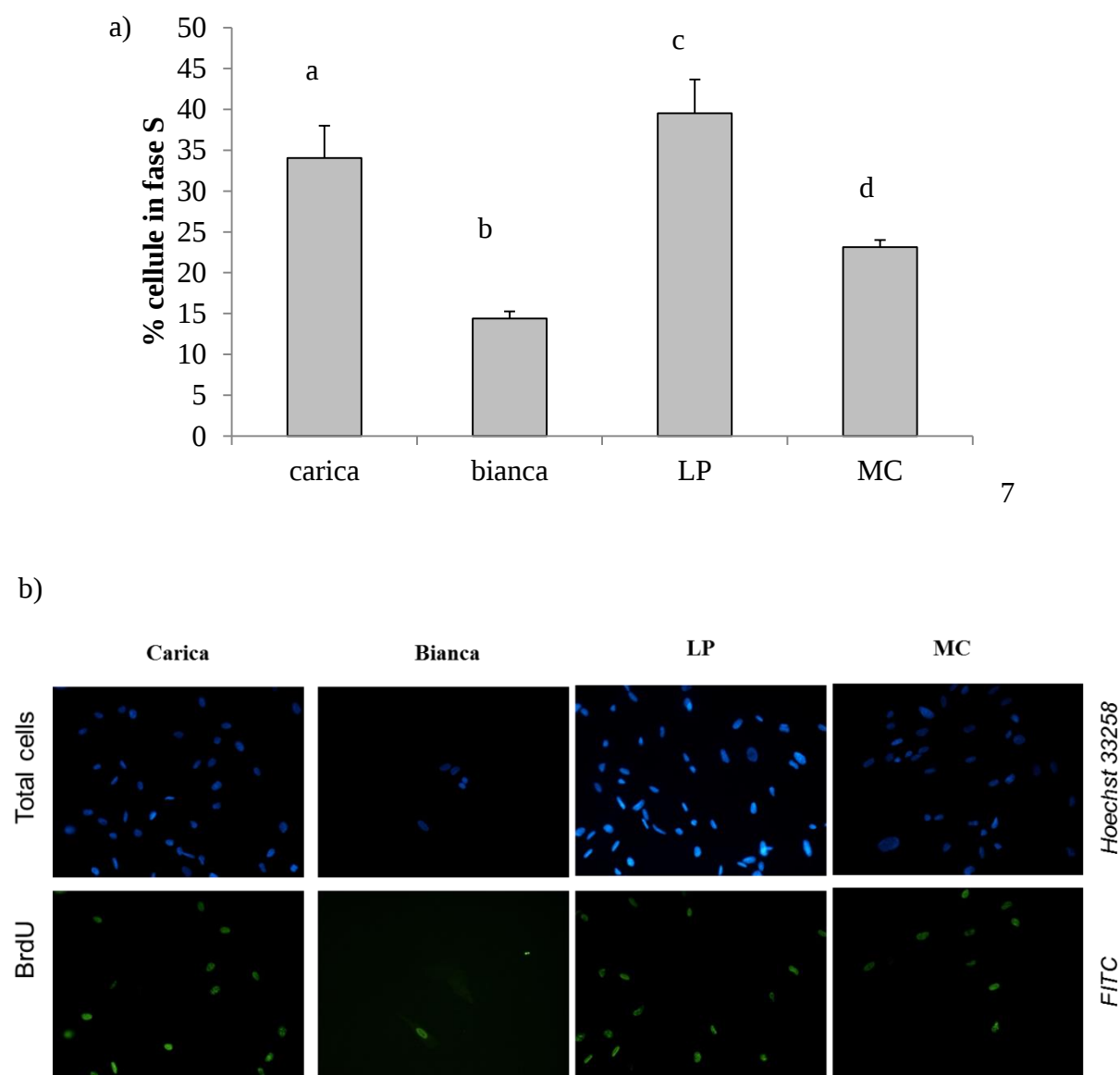


Figura V.9 (a,b): Risultati dell'incorporazione della BrdU : a) % del numero di cellule in fase S poste a contatto con le medicazioni caricate e non con 500 μ l LP prima della liofilizzazione ottenuti ponendo i campioni nella camera apicale di sistemi Transwell® in presenza di MC. LP fresco alla stessa quantità caricata nella medicazione e MC, utilizzato per l'idratazione della medicazione, sono stati utilizzati come controlli. (valori medi $\pm$ s.e.; n=3)

significatività statistica ($p < 0.05$): a vs b/d; c vs d;

b) fotografie dell'attività proliferativa cellulare: i nuclei delle cellule sono stati colorati con Hoechst33258 (fluorescenza blu) e le cellule in fase proliferativa S sono state immunomarcate con un anticorpo primario anti-BrdU e un anticorpo secondario coniugato FITC (fluorescenza nucleo verde). Scala: 10 μ m.

V.3.2.5 Titolo e rilascio di PDGF AB

I risultati ottenuti dal test ELISA condotto sulla medicazione caricata con LP e su LP fresco (usato come controllo) per il dosaggio del fattore di crescita PDGF-AB hanno evidenziato un caricamento del 100% di PDGF-AB rispetto al teorico (31033 ± 2960 pg in 500 μ l di LP fresco, 35875 ± 4254 pg nella medicazione caricata con la stessa quantità di LP).

Il test di rilascio di PDGF AB condotto in bagno basculante per 6h a 32°C ha evidenziato la capacità della medicazione carica di rilasciare il fattore di crescita con una percentuale pari a 10.33 (± 1.23) % della quantità caricata.

V.3.3 **Caratterizzazione della medicazione caricata estemporaneamente con LP**

V.3.3.1 Proprietà meccaniche

In Figura V.10 sono riportati i risultati del test di penetrometria condotto sulle formulazioni bianca e caricata estemporaneamente con differenti quantità di LP (0.25, 0.35 e 0.5 ml) dopo liofilizzazione e completo assorbimento di LP.

Come previsto, l'idratazione della medicazione da parte del LP provoca la formazione di un gel le cui caratteristiche meccaniche dipendono fortemente dalla quantità di LP caricato. 0.5 ml di LP è risultata una quantità eccessiva per la medicazione in esame, determinando la formazione di una soluzione polimerica con proprietà meccaniche non determinabili con il test di penetrometria.

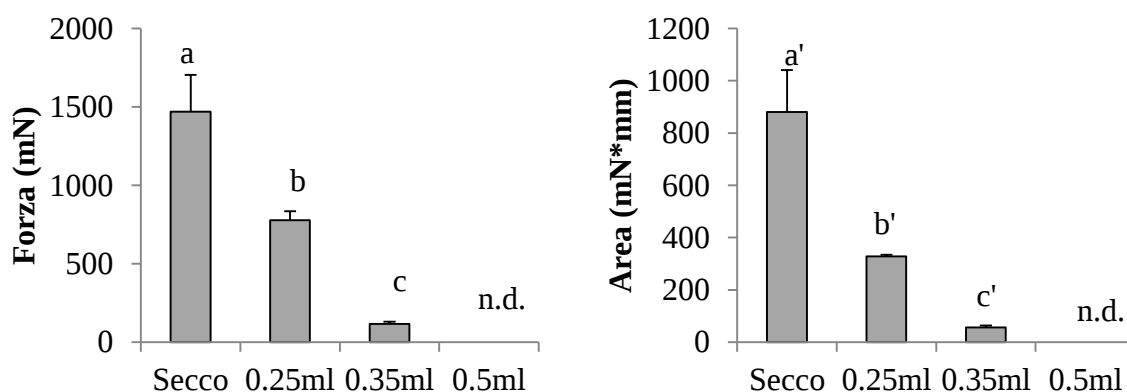


Figura V. 10: Valori di forza e area di penetrazione (espressi in mN e mm.mN) ottenuti per le formulazioni bianca e caricata con differenti quantità di LP: 0.25, 0.35 e 0.5 ml (valori medi $\pm$ es; n=3) - significatività statistica ($p < 0.05$): a vs b/c; b vs c; a' vs b'/c'; b vs c'

V.3.3.2 Misure reologiche

In Figura V.11 sono riportate le curve medie di viscosità delle medicazioni bianche caricate estemporaneamente con differenti quantità di LP (0.25, 0.35 e 0.5 ml) dopo liofilizzazione e a completo assorbimento delle quantità di LP.

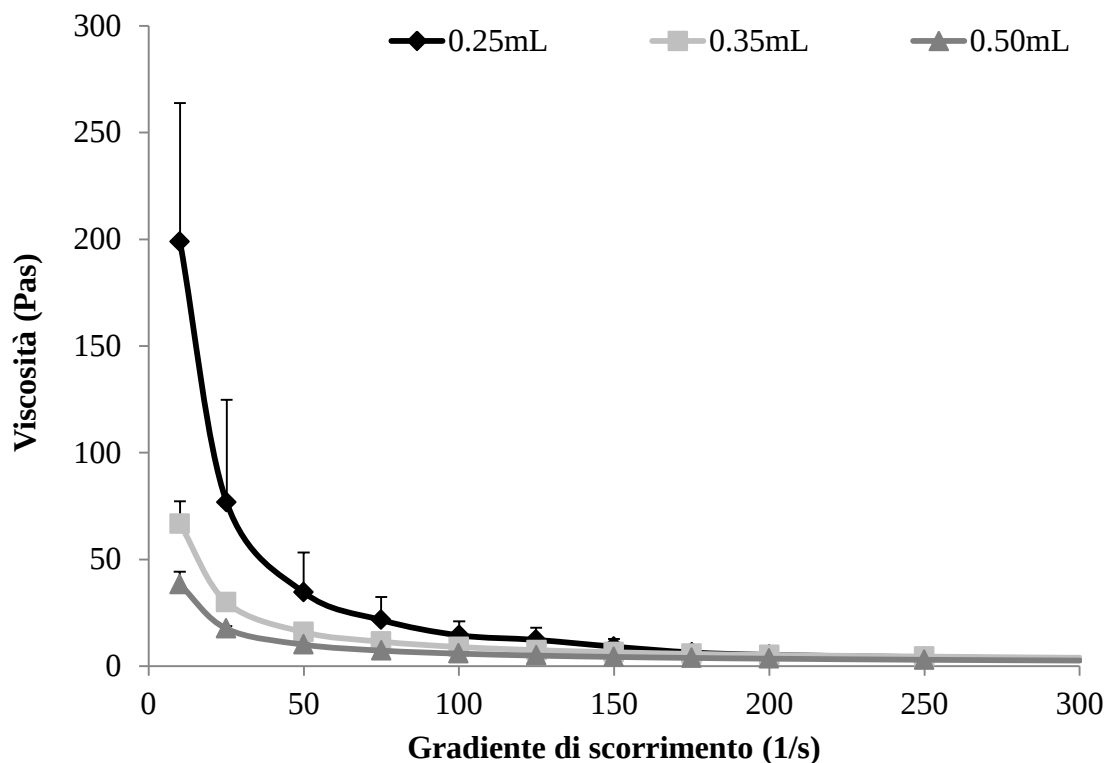


Figura V.11: Curve di viscosità ottenute per la formulazione bianca caricata estemporaneamente con differenti quantità di LP (0.25, 0.35 e 0.5 ml) (valori medi $\pm$ es; n=3)

Come prevedibile, un aumento della quantità di LP assorbita si accompagna ad una diminuzione dei valori di viscosità. I gel formati mantengono dopo caricamento un comportamento pseudoplastico, che, come già descritto nei capitoli precedenti (Cap III e IV), risulta funzionale all'attività di lubrificazione richiesta.

In Figura V.12 sono riportati i valori dei moduli viscoelastici conservativo (G') e dissipativo (G'') in funzione della frequenza, ottenuti per la medicazione bianca e caricata con differenti quantità di LP (0.25, 0.35 e 0.5 ml).

La medicazione caricata con LP, indipendentemente dalla quantità caricata, risulta caratterizzata da più alti valori di G' rispetto a G'' ad indicare una prevalenza delle caratteristiche elastiche sulle viscose. Come già descritto nei capitoli precedenti (Cap. III e V) elevate proprietà elastiche, a seguito di idratazione, appaiono funzionali per medicazioni destinate al trattamento di lesioni cutanee: tali caratteristiche sono, infatti, responsabili di una maggiore protezione dell'area lesa, quando la medicazione viene sollecitata a bassi valori di sforzo di taglio.

Come ci si aspetta, un aumento della quantità di LP si accompagna ad una diminuzione di entrambi i parametri viscoelastici

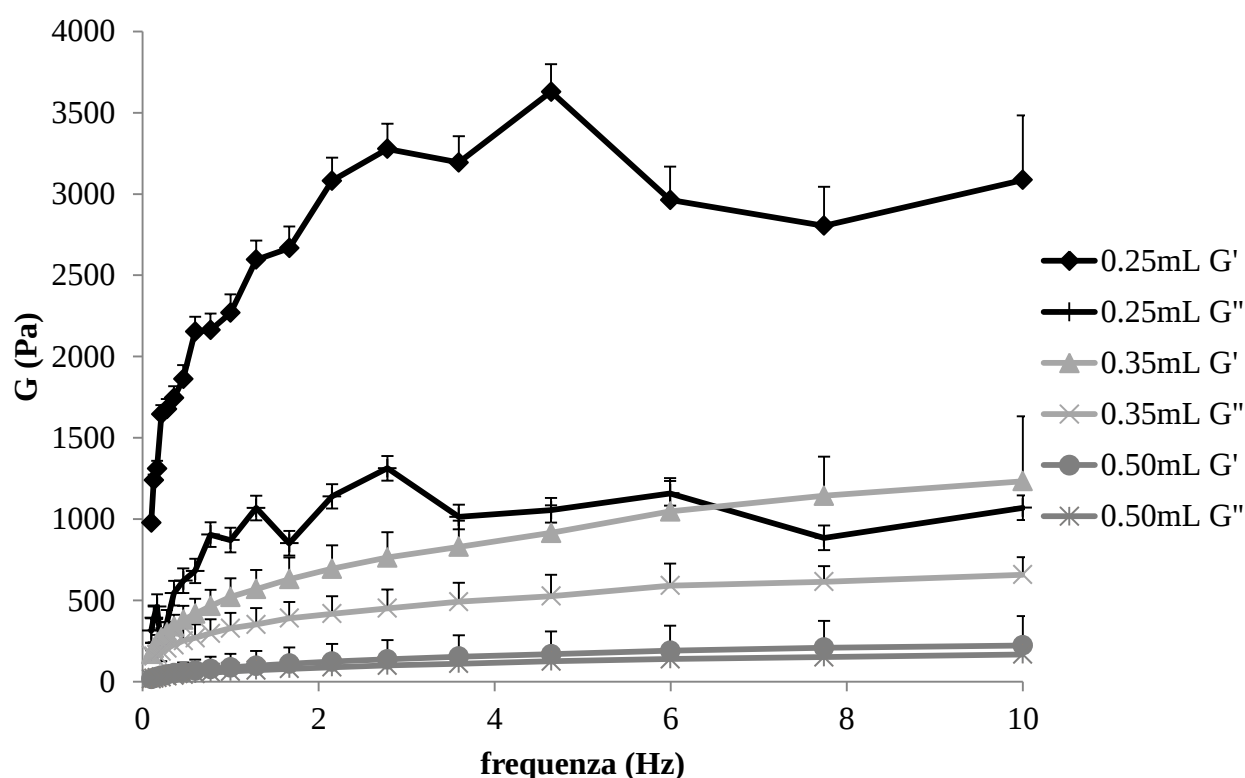


Figura V.12: Valori dei moduli elastici conservativo (G') e dissipativo (G'') ottenuti per le formulazioni caricate con differenti quantità di LP (0.25, 0.35 e 0.5 ml) (valori medi $\pm$ es; $n=3$).

Sulla base dei risultati ottenuti, la quantità ottimale di LP da caricare estemporaneamente sulle medicazioni è risultata essere 0.35 ml. Tale quantità è risultata il caricamento maggiore di LP che ha permesso il mantenimento di caratteristiche meccaniche e reologiche ottimali da parte della medicazione.

V.3.3.3 Proprietà di proliferazione cellulare

In Figura V.13 sono confrontati i valori di proliferazione % osservati per la medicazione caricata estemporaneamente con 0.35 ml di LP per confronto alla medicazione bianca. Il test è stato condotto come descritto nel paragrafo V.3.2.4, per il caricamento di LP prima della liofilizzazione. MC e LP, alla stessa quantità caricata nella medicazione, sono stati utilizzati come controlli.

Si può osservare come la medicazione caricata con LP sia caratterizzata da un valore di proliferazione % paragonabile a quella osservata per LP ad indicare che la formulazione non ostacola l'attività delle sostanze biologicamente attive contemute nell'emoderivato. Come prevedibile, il valore di proliferazione % ottenuto per la medicazione bianca risulta inferiore a quello osservato per la caricata.

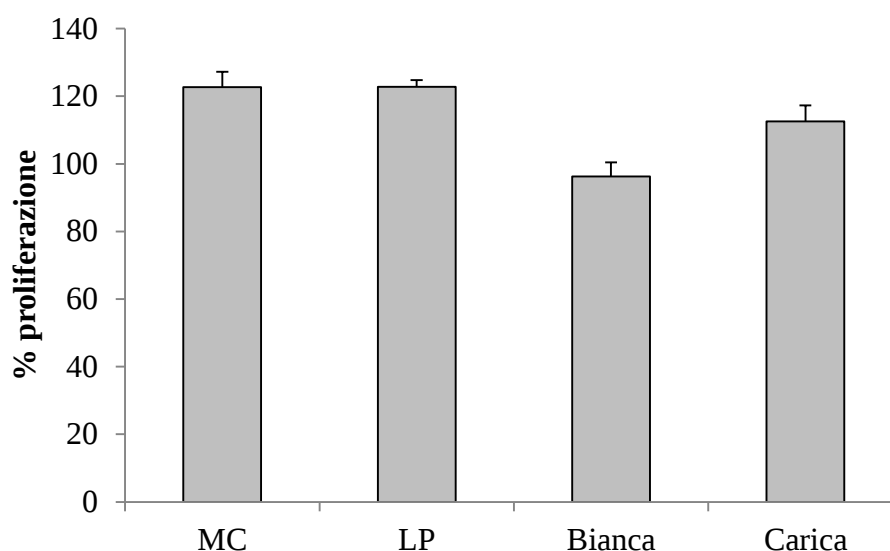


Figura V.13: Valori di proliferazione % osservati per la formulazione caricata con 0.35 ml di LP per confronto con la medicazione bianca. LP fresco alla stessa quantità caricata nella medicazione e MC, utilizzato per l'idratazione della medicazione, sono stati utilizzati come controlli.
(valori medi $\pm$ es; n=3).

In Figura V.14 sono riportati i valori % di fibroblasti in fase proliferativa S per la medicazione bianca e caricata estemporaneamente con 0.35 ml di LP.

Le medicazioni caricate sono caratterizzate da una maggior percentuale ($p < 0,05$) di cellule in fase S rispetto alle medicazioni bianche. Si può inoltre osservare che i valori % della medicazione

caricata sono significativamente maggiori ($p < 0.05$) rispetto al MC e paragonabili a quelli osservati per LP.

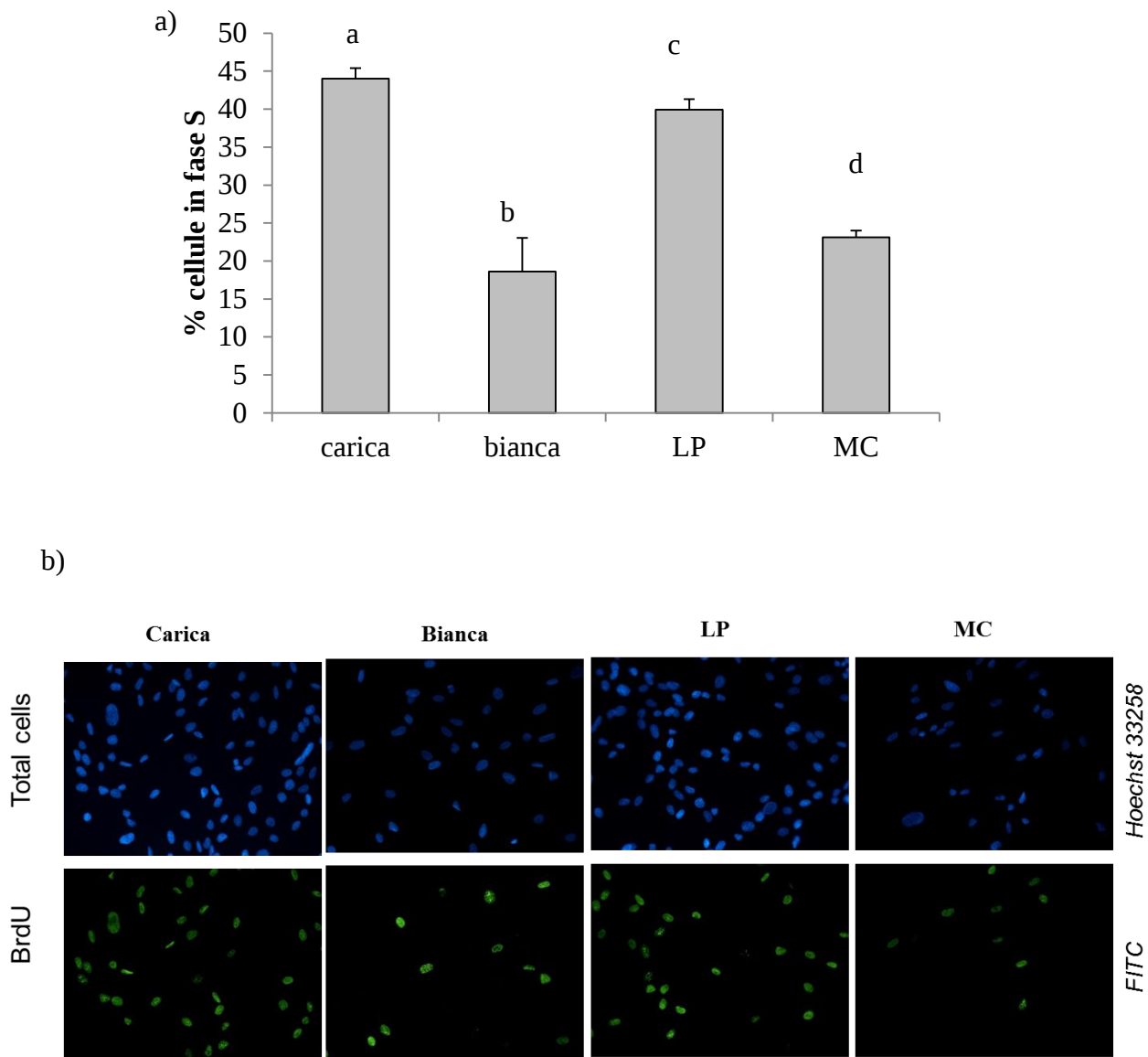


Figura V.14 (a,b): Risultati dell'incorporazione della BrdU : a) % del numero di cellule in fase S poste a contatto con le medicazioni caricate e non con LP ottenuti ponendo i campioni nella camera apicale di sistemi Transwell® in presenza di MC. LP fresco alla stessa quantità caricata nella medicazione e MC, utilizzato per l'idratazione della medicazione, sono stati utilizzati come controlli. (valori medi $\pm$ s.e.; $n=3$) significatività statistica ($p < 0.05$): a vs b/d; c vs d; b) fotografie dell'attività proliferativa cellulare: i nuclei delle cellule sono stati colorati con Hoechst33258 (fluorescenza blu) e le cellule in fase proliferativa S sono state immunomarcate con un anticorpo primario anti-BrdU e un anticorpo secondario coniugato FITC (fluorescenza nucleo verde). Scala: 10 μ m.

V.4 Conclusioni

La sericina e LP presentano un effetto sinergico nel promuovere la proliferazione cellulare.

Il caricamento della medicazione con LP prima della liofilizzazione non ne modifica le proprietà meccaniche e di idratazione. Infatti, la medicazione caricata con LP è risultata possedere proprietà di resistenza meccanica, di idratazione e di lubrificazione confrontabili rispetto alla non caricata (bianca). La medicazione caricata con LP a seguito di idratazione con PBS, mezzo mimante l'edssudato della ferita, è caratterizzata da spiccate proprietà viscoelastiche, favorevoli all'azione di protezione della cute lesa richiesta alla formulazione.

La medicazione caricata con LP è risultata in grado di promuovere la proliferazione cellulare in maggior misura rispetto alla medicazione bianca. Tali risultati sono stati confermati dal test specifico della bromodesossituridina, che ha evidenziato per la medicazione carica una percentuale maggiore di cellule in fase proliferativa S rispetto alla bianca.

I risultati del test ELISA hanno confermato il completo caricamento di LP nella medicazione; gli eccipienti utilizzati ed il processo di preparazione non hanno prodotto alcuna variazione nel contenuto di PDGF-AB, fattore di crescita rappresentativo di quelli presenti nell'emoderivato. Il test ha permesso inoltre di valutare il rilascio di PDGF AB dopo 6h di idratazione, che è risultato pari a circa il 10% della quantità caricata, indicando proprietà di rilascio prolungato.

Per quanto riguarda il caricamento estemporaneo del LP sulla medicazione, 0.35 ml di LP è risultata la quantità ottimale di caricamento perchè in grado di essere assorbita dalla medicazione formando un gel in grado di mantenere un comportamento pseudoplastico e buone proprietà viscoelastiche.

La medicazione caricata ha dimostrato di promuovere la proliferazione cellulare in misura superiore rispetto alla medicazione bianca ed in % paragonabile al solo LP. Tali risultati sono stati confermati dal test della BrdU.

I risultati ottenuti hanno messo in evidenza che la medicazione "sponge-like" a base di chitosano, in associazione a sericina, è in grado di veicolare il LP mantenendone l'attività sia a seguito di caricamento prima della liofilizzazione che a seguito di caricamento estemporaneo.

VI. Capitolo

Proprietà di “wound healing” di lisato piastrinico in associazione con sucralfato: studi preliminari

VI.1 SCOPO DEL LAVORO

Il sucralfato (SCR) è noto per le proprietà riparative nei confronti di vari tessuti. In particolare è utilizzato anche per la terapia delle mucositi e, sia in forma di polvere che di crema, è proposto anche per il trattamento delle ulcere cutanee [Masuelli L. et al., 2009; Olascoaga A. et al., 2008; Burch RM. Et al., 1991]. Uno dei meccanismi d'azione proposti per spiegare l'efficacia del sucralfato è la capacità di stabilizzare alcuni fattori di crescita e potenziarne l'azione [Volkin DB. Et al., 1993; Candelli M., et al., 2000; Nicaeus TE. Et al., 1996]. Inoltre è noto avere un effetto protettivo sui tessuti contro lo stress ossidativo [Hoshito T. et al., 2003; Shindo K. Et al., 2006].

In questo lavoro sono stati effettuati studi preliminari volti ad indagare la compatibilità del SCR con il LP e con biopolimeri, in particolare l'acido ialuronico, comunemente utilizzati nelle medicazioni cutanee.

Il razionale dello studio sta nella particolare natura chimica del sucralfato, sostanza metallorganica contenente alluminio, nonché nelle sue caratteristiche chimico-fisiche particolari, tipicamente la capacità di legarsi alle proteine e di aderire tenacemente ai tessuti. Non esistevano all'inizio di questo studio dati di compatibilità fra il LP e sostanze di natura inorganica o metallorganica, pertanto occorreva valutare se i test basati sull'impiego di colture cellulari (quali quelli descritti nel capitolo I) e richiesti per la valutazione dell'attività biologica del LP fossero utilizzabili anche per SCR come tale e in associazione con LP, per poi procedere alla valutazione della compatibilità fra i due componenti e alla scelta delle concentrazioni del SCR da utilizzare.

In particolare, nella prima fase del lavoro è stata valutata la citotossicità del SCR nei confronti dei fibroblasti umani, al fine di ottenere la concentrazione opportuna da associare a LP. È stato inoltre condotto valutato il potere antiossidante di tali concentrazioni, sottoponendo le cellule ad un danno ossidativo.

Nella seconda parte del lavoro, sono state preparate miscele di SCR e LP. Tali miscele sono state sottoposte a test di proliferazione su fibroblasti umani e test Elisa per valutare l'eventuale interazione di SCR con LP sui fattori di crescita contenuti in LP.

Infine, è stato condotto un test di proliferazione cellulare per valutare l'associazione di SCR con polimeri noti in letteratura come promotori della proliferazione, come l'acido ialuronico.

VI.2 MATERIALI E METODI

VI.2.1 Materiali

Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM, Lonza, BioWhittaker, B); Dulbecco's Phosphate Buffer Solution (Sigma Aldrich, Milano, I); Hank's Balance Salt Solution (HBSS) (Sigma Aldrich, Milano, I); Hydrogen peroxide (H_2O_2) (Carlo Erba, Milano, I); Inactivated foetal calf bovine serum (Euroclone, Pero, I); Penicillin streptomycin 100x (pen/strep)/amphoteric 100x (Sigma Aldrich, Milano, I); Sodio ialuronato (HA) basso peso molecolare (Bioiberica, Barcelona, S); Sucralfato gel (SCR) (BK Giulini, Ludwigshafen, G); Trypsin-EDTA solution (Sigma Aldrich, Milano, I); Trypan Blue solution (Biological Industries, Beit-Haemek, IL); WST (Water Soluble Tetrazolium), (Roche diagnostic, Italy).

Lisato piastrinico: fornito dal reparto di Immunoematologia ed Aferesi del IRCCS Policlinico S.Matteo, Pavia. (vedi paragrafo I.2.1)

VI.2.2 Citotossicità di SCR

La citotossicità di SCR è stata valutata mediante l'utilizzo di fibroblasti umani bNHDF (Promocell GmbH, Heidelberg, Germany) compresi tra il passaggio 6 e 16. Tale linea cellulare è stata mantenuta in coltura come precedentemente descritto (paragrafo I.2.2).

Per il test di citotossicità sono state seminate 6×10^4 cellule/cm² in piastra da 96 pozzetti (Cellstar 96 W, Greiner Bio-One, G) in presenza di mezzo completo (MC) e lasciate crescere per 24h al fine di ottenere un monstrato di cellule. Trascorso tale tempo, il MC è stato rimosso e le cellule sono state messe a contatto per 24h con differenti concentrazioni di sucralfato (SCR) in M s/s (0.3, 0.6, 1.2, 2.5 e 5 mg/ml). Dopo 24 h di contatto è stata valutata la vitalità cellulare tramite WST-1 test (paragrafo I.2.3.1). La soluzione di Tryton al 10% p/p in M s/s è stata utilizzata come controllo negativo.

I risultati sono stati espressi come % di cellule vitali ottenuta normalizzando le misure di assorbanza delle cellule poste a contatto con i campioni con le misure di assorbanza delle cellule poste a contatto con M s/s. Sono stati analizzati otto repliche per campione.

VI.2.3 Valutazione del potere antiossidante di SCR

È stato condotto un test ossidativo [Hoshito T. et al.,2003] su fibroblasti bNHDF per valutare l'effetto protettivo esercitato dal SCR contro il danno ossidativo indotto dall'acqua ossigenata

(H₂O₂). L'acqua ossigenata è stata presa come modello di sostanza ossidante, in grado di indurre lo sviluppo di specie reattive (ROS) a livello cellulare.

La proprietà antiossidante del SCR è stata valutata seminando 6×10^4 cellule/cm² fibroblasti bNHDF in piastre da 96 pozzetti e lasciate crescere per 24h. 200µl di una soluzione di SCR a differenti concentrazioni (0.3, 0.6, 1.2, 2.5 e 5 mg/ml) in M s/s sono stati messi a contatto con il substrato cellulare per 3h. Dopo tale tempistica una soluzione 2 mM di H₂O₂ è stata aggiunta ai campioni e lasciata a contatto con le cellule per 24h. Al termine è stata valutata la vitalità cellulare tramite WST-1 (paragrafo I.2.3.1).

I risultati sono stati espressi come % di cellule vitali ottenuta normalizzando l'assorbanza misurata dai campioni per confronto con quella misurata con il M s/s. Sono state effettuate otto repliche per campione.

VI.2.4 Associazione di SCR e LP

VI.2.4.1 Valutazione della proliferazione cellulare

Per valutare l'associazione di SCR e LP è stato condotto un test di proliferazione cellulare come precedentemente descritto (paragrafo II.2.3.3). In particolare, 5×10^4 cellule/cm² di fibroblasti bNHDF sono stati seminati in una piastra da 96 pozzetti (Cellstar 96 W, Greiner Bio-One, G) in presenza SCR a differenti concentrazioni (0.3, 0.6, 1.2, 2.5 e 5 mg/ml) in associazione con LP alla diluizione 1:40 in M s/s. Il M s/s e il LP (1:40 in M s/s) sono stati utilizzati come riferimento. Le cellule sono state lasciate a contatto per 24h con i campioni e al termine è stata valutata la % di proliferazione tramite WST-1 come descritto nel paragrafo I.2.3.1.

VI.2.4.2 Valutazione della compatibilità SCR e LP

La valutazione della compatibilità dell'associazione di SCR e LP è stata studiata tramite dosaggio del fattore di crescita PDGF AB al fine di analizzare una possibile interazione, e quindi inattivazione, del SCR con i fattori di crescita presenti in LP. In particolare, il contenuto di un fattore di crescita PDGF AB (platelet derived growth factor) tramite test ELISA come precedentemente descritto (paragrafo I.2.5).

La concentrazione di PDGF AB nell'associazione SCR/LP è correlato alla concentrazione di PDGF AB nel LP utilizzato per la loro preparazione e il parametro “% PDGF AB” è stato calcolato come rapporto tra la concentrazione del PDGF AB in SCR/LP e la concentrazione del PDGF AB presente nel LP fresco, utilizzato come riferimento. Nello specifico, è stata valutata la quantità di PDGF AB

presente nel LP fresco (100%) ed è stata calcolata la % di PDGF AB secondo la seguente equazione:

$$\%PDGF\ AB = (\text{quantità PDGF AB nel campione} / \text{quantità PDGF AB nel LP fresco}) \times 100$$

(Eq. 1)

Sono state analizzate tre repliche per campione.

VI.2.5 Valutazione dell'associazione di SCR con HA

Il test di proliferazione cellulare è stato condotto utilizzando fibroblasti bNHDF al passaggio 7th seminati ad una concentrazione di 5×10^4 cellule/cm². Le concentrazioni di SCR scelte per essere messe a contatto con le cellule durante la semina sono state 0.3 e 0.6 mg/ml in M s/s ed in presenza di sodio ialuronato (HA) alla concentrazione 1.5% , da solo o in associazione a SCR ad una diluizione 1:20. I campioni sono stati lasciati a contatto con le cellule per 24h, al termine è stato effettuato WST-1 test (paragrafo I.2.3.1) per valutare la % di proliferazione. MC e M s/s sono stati utilizzati come controlli.

VI.2.6 Analisi statistica

I dati sperimentali ottenuti dalle differenti misure sono stati, quando è stato possibile, sottoposti ad analisi statistica grazie al software Statgraphics 5.0 (Statistical Graphics Corporation, Rockville, MD, USA). In particolare sono stati analizzati con Anova una via e Multiple range test.

VI.3 RISULTATI E DISCUSSIONE

VI.3.1 Citotossicità di SCR

In Figura VI.1 sono riportati i valori della vitalità cellulare % osservati per i fibroblasti lasciati a contatto con differenti concentrazioni di SCR (0.3, 0.6, 1.2, 2.5 e 5 mg/ml) in M s/s per 24h.. Il M s/s è stato usato come controllo.

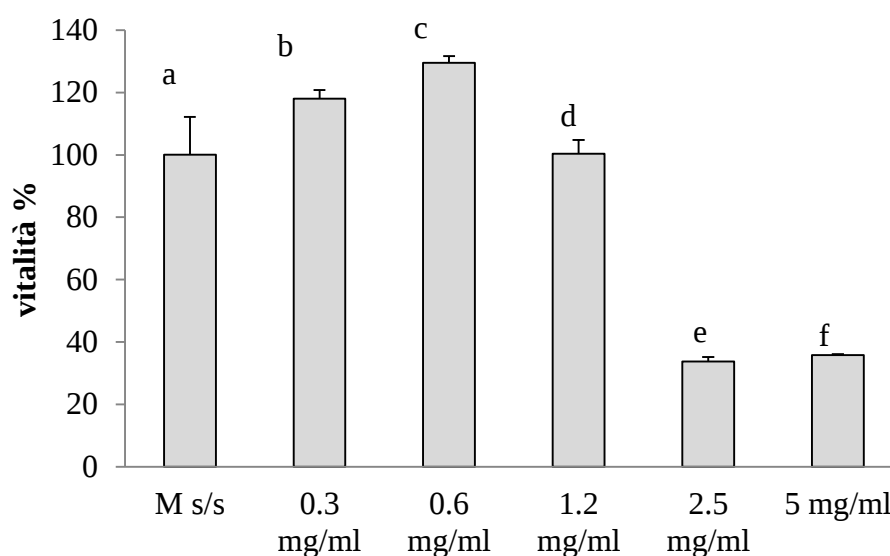


Figura VI.1: Valori di % vitalità cellulare osservati per differenti concentrazioni di SCR (0.3, 0.6, 1.2, 2.5 e 5 mg/ml) in mezzo senza siero (Ms/s) poste a contatto per 24h. Il M s/s è stato utilizzato come controllo (valori medi $\pm$ es; n= 8) significatività statistica ($p<0.05$): a vs e/f

Il SCR ha dimostrato di non essere tossico quando posto a contatto per 24h con il substrato cellulare in un range di concentrazioni compreso tra 0.3 e 1.2 mg/ml: infatti al di sopra di tali concentrazioni la vitalità cellulare diminuisce significativamente ($p<0.05$), come mostrato in Figura VI.1 .

VI.3.2 Valutazione del potere antiossidante di SCR

In Figura VI.2 sono riportati i valori di vitalità % ottenuti per i fibroblasti quando sottoposti per 24 h a danno ossidativo con 2 mM di H_2O_2 in assenza ed in presenza di SCR a differenti concentrazioni (0.3, 0.6 e 1.2 mg/ml) . Il M s/s è stato considerato come riferimento.

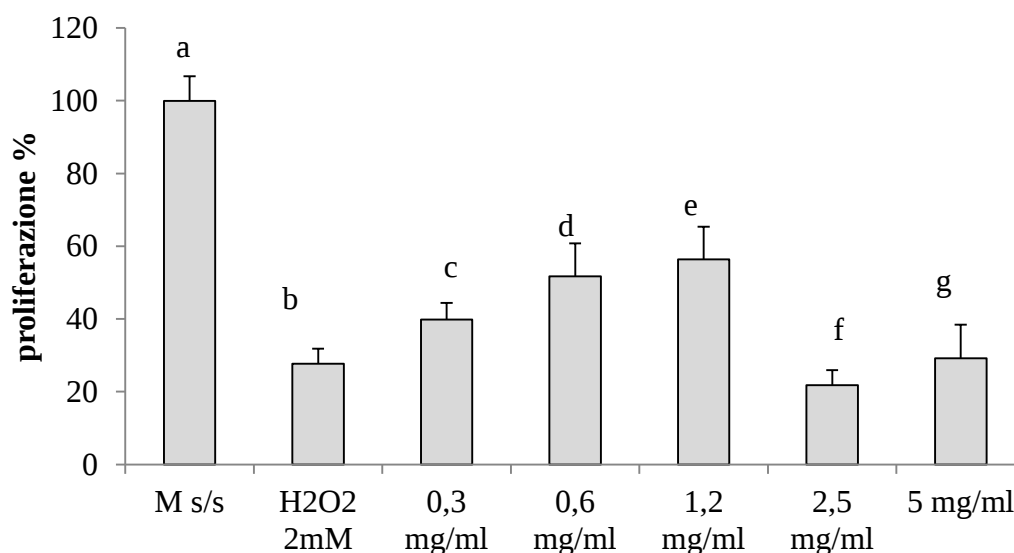


Figura VI.2: Valori di vitalità % osservati in fibroblasti pretrattati per 3h con differenti concentrazioni di SCR (0,3, 0,6 e 1,2 mg/ml) e successivamente esposti, per 24h, al danno ossidativo con 2 mM di H₂O₂ per confronto ai valori osservati in assenza di pretrattamento con SCR. M s/s è stato utilizzato come riferimento (valori medi ± es; n=8)
significatività statistica (p<0.05): b vs c/d/e

Si può apprezzare un significativo (p<0.05) aumento della % di cellule vitali per le cellule pretrattate con concentrazioni di SCR comprese tra 0.3 e 1.2 mg/ml, rispetto al substrato cellulare a contatto con la sola acqua ossigenata (H₂O₂), ad indicare un effetto protettivo del SCR nei confronti del danno ossidativo. Aumentando però la concentrazione di SCR (concentrazioni 2.5 e 5 mg/ml), tale effetto protettivo risulta mancare, probabilmente dovuto anche ad un effetto di tossicità del SCR stesso (vedi Figura VI.1).

VI.3.3 Associazione di SCR e LP

In Figura VI.3 sono riportati i valori di proliferazione cellulare % osservati per i fibroblasti lasciati a contatto per 24h con differenti concentrazioni di SCR (0.3, 0.6, 1.2, 2.5 e 5 mg/ml) in associazione a LP (1:40). Il MC, M s/s e LP alla stessa diluizione considerata nelle associazioni con SCR (1:40 in M s/s) sono stati utilizzati come controlli.

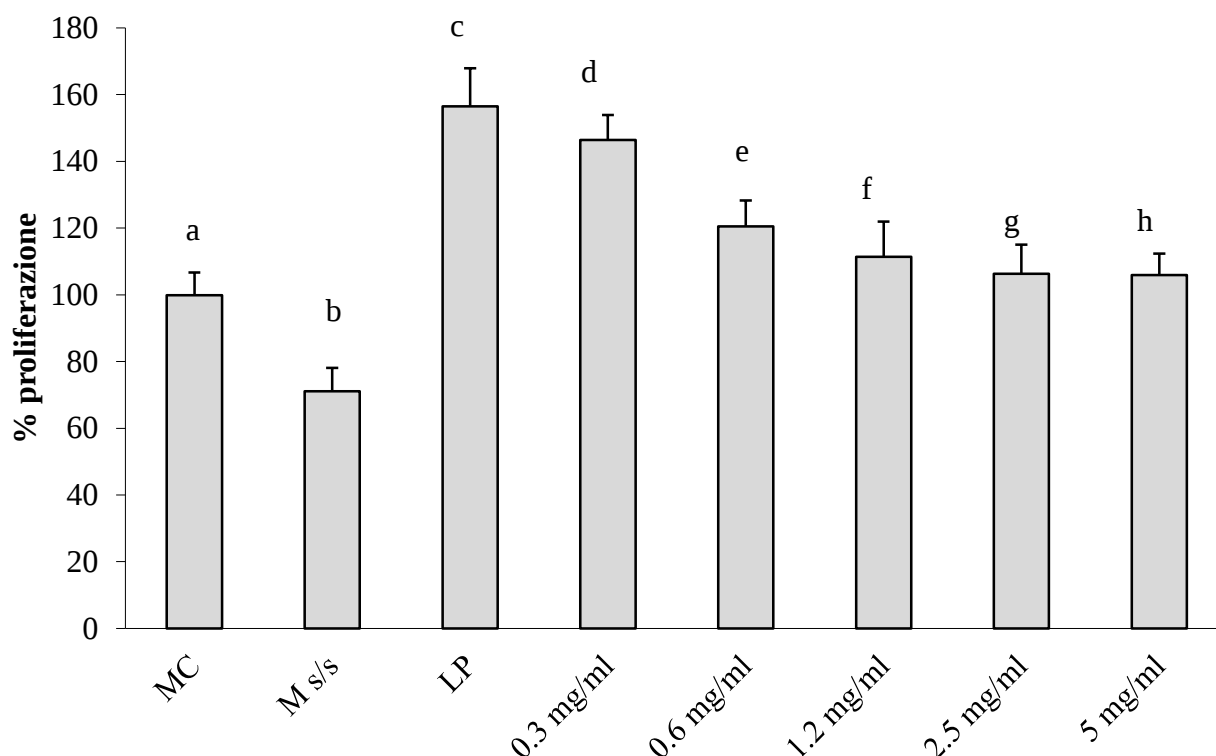


Figura VI.3: Valori di % proliferazione cellulare osservati per fibroblasti posti a contatto con differenti concentrazioni di SCR (0.3, 0.6 e 1.2 mg/ml) in associazione a LP (1:40), per confronto ai valori ottenuti per il solo LP alla stessa concentrazione presente nelle associazioni con SCR (1:40 in M s/s). Mezzo completo (MC) e mezzo senza siero (Ms/s) sono stati utilizzati come controlli.
(valori medi $\pm$ es; n= 8) significatività statistica ($p < 0.05$): c vs a/b/e/f/g/h

Si può osservare come tutte le concentrazioni di SCR considerate in associazione a LP (1:40) sono caratterizzate da valori di proliferazione % significativamente superiori ai controlli M s/s e MC.

Tutte le concentrazioni di SCR, ad esclusione di 0.3 mg/ml, in associazione a LP sono risultate significativamente ($p < 0.05$) inferiori al LP da solo, ad indicare una potenziale interazione del SCR con i fattori di crescita contenuti nel LP.

In Figura VI.4 sono riportati i valori di % PDGF AB presenti nel LP in associazione a due differenti concentrazioni di SCR: 5 e 1.2 mg/ml.

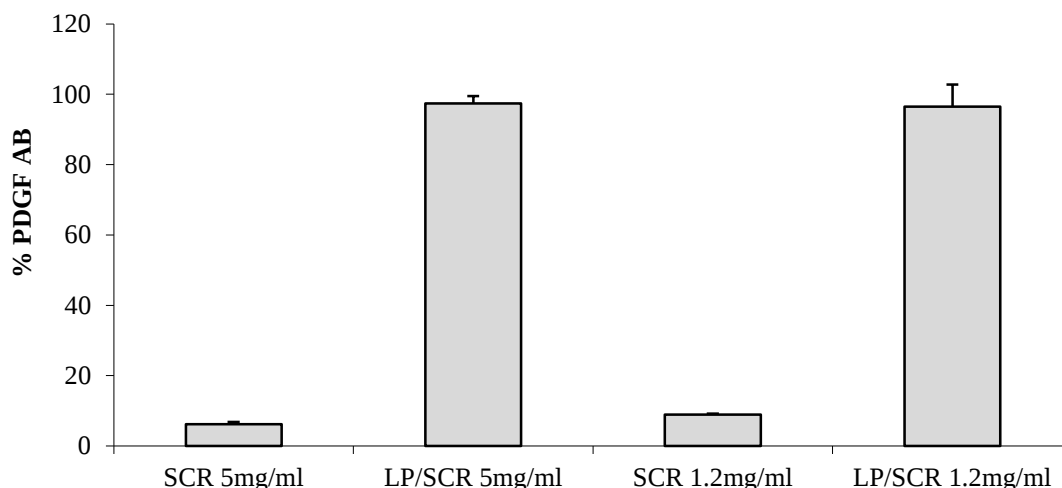


Figura VI.4: % di PDGF AB presenti nei campioni LP in associazione a SCR alle concentrazioni 1.2 e 5 mg/ml a confronto con SCR (1.2 e 5 mg/ml) da solo. I valori sono stati calcolati considerando il valore di PDGF AB 100% presente nel LP fresco (valori medi $\pm$ es; n=3)

Dal test ELISA si è potuto osservare che il SCR non provoca nessuna inattivazione parziale o totale del fattore di crescita PDGF AB ad entrambe le concentrazioni considerate (valori non significativamente diversi dal 100%).

VI.3.4 Valutazione dell'associazione di SCR con HA

In Figura VI.5 sono riportati i valori di proliferazione % osservati per i fibroblasti posti a contatto con SCR a due concentrazioni (0.3 e 0.6 mg/ml) in associazione a HA 1.5% p/p (1:20), per confronto ai valori ottenuti per HA da solo (1:20). MC e M s/s sono stati utilizzati come controlli.

Si è potuto stimare un effetto sinergico tra SCR 0.3 mg/ml e HA, la miscela SCR/HA ha prodotto valori di proliferazione % significativamente superiori rispetto al solo HA e al M s/s, con valori paragonabili al MC. HA alla concentrazione analizzata è caratterizzato da valori di proliferazione % maggiori rispetto al M s/s. Una concentrazioni superiore di SCR (0.6 mg/ml) in associazione ad HA ha prodotto una diminuzione significativa ($p < 0.05$) del valore di proliferazione %.

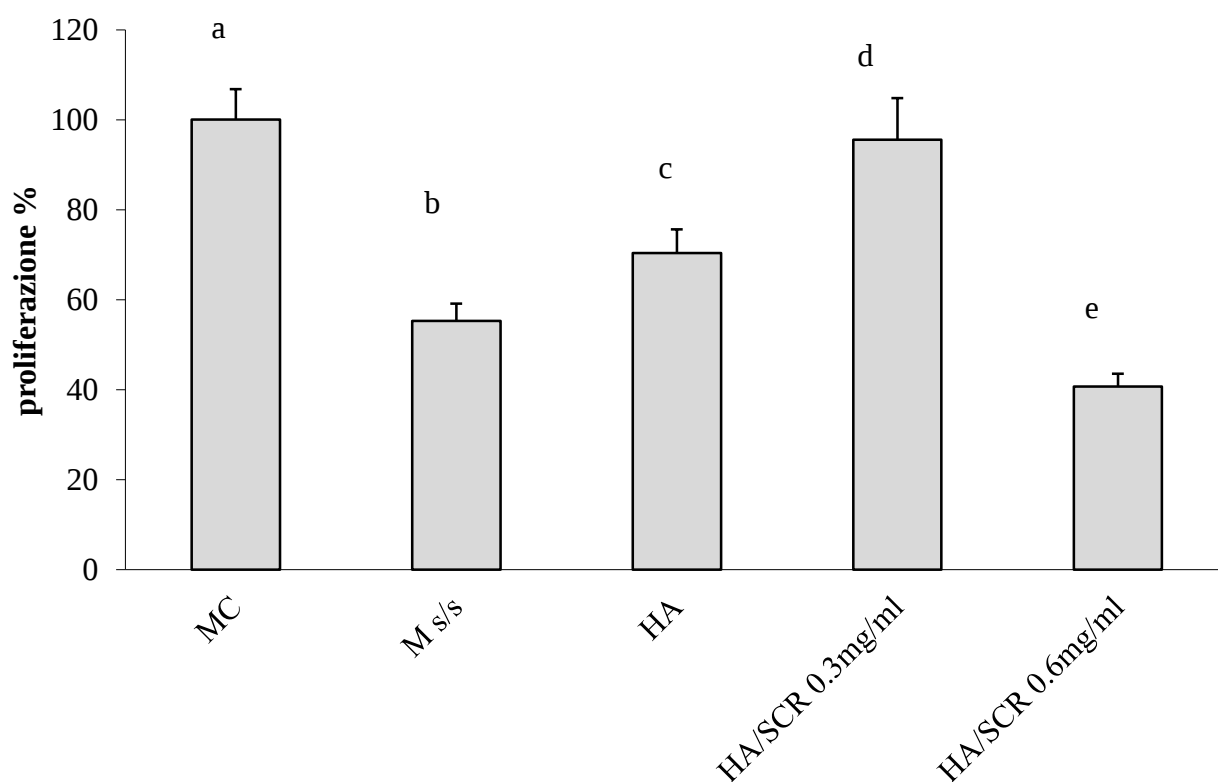


Figura VI.5: Valori di % proliferazione cellulare osservati per fibroblasti posti a contatto con SCR (0.3 e 0.6 mg/ml) in associazione a HA 1.5% p/p alla diluizione 1:20, per confronto a HA da solo alla stessa diluizione in M s/s. Mezzo completo (MC) e mezzo senza siero (Ms/s) sono stati utilizzati come controlli. (valori medi $\pm$ es; n= 8) significatività statistica ($p < 0.05$): d vs b/c; e vs c

VI.4 Conclusioni

L'analisi condotta su differenti concentrazioni di SCR ha potuto dimostrare una tossicità del SCR concentrazione dipendente, quando posto a contatto con fibroblasti bNHDF. Il SCR in concentrazione comprese tra 0.3 e 1.2 mg/ml non è risultato citotossico producendo % di cellule vitali non inferiori al controllo M s/s.

Il SCR è risultato inoltre possedere proprietà di protezione delle cellule nei confronti del danno ossidativo. Le concentrazioni di SCR che hanno dimostrato un significativo aumento della vitalità cellulare a seguito di danno ossidativo sono risultate comprese nel range 0.3 e 1.2 mg/ml.

Il SCR quando associato a LP ha dimostrato valori di proliferazione % superiori rispetto al M s/s. Per concentrazioni di SCR superiori a 0.3mg/ml, l'associazione con LP ha prodotto una diminuzione dell'attività proliferativa del LP. I risultati del test ELISA hanno dimostrato che SCR non è in grado di inattivare ed interferire con il fattore di crescita PDGF AB. Si può quindi ipotizzare che la ridotta attività proliferativa in presenza di sucralfato sia dovuta ad un fenomeno di barriera fisica esercitata dal parte del sucralfato nei confronti delle cellule, che quindi sarebbero raggiungibili meno facilmente dai fattori di crescita.

Infine, è stata valutata l'associazione di SCR con l'acido ialuronico, un biopolimero, noto in letteratura (vedi introduzione) per le proprietà di promozione della proliferazione cellulare e "wound healing". L'associazione ha dimostrato valori di proliferazione % significativamente superiori al controllo M s/s, ed allo stesso tempo ha dimostrato un'attività sinergica tra SH e SCR.

Sono necessari ulteriori indagini al fine di poter valutare la veicolazione di SCR in formulazioni idonee all'applicazione cutanea per la rigenerazione tissutale e/o l'associazione a biopolimeri. Inoltre, una valutazione più approfondita dell'associazione LP e SCR è necessaria al fine di chiarire la possibile interazione di SCR con i componenti biologicamente attivi presenti in LP responsabile dell'indebolimento dell'effetto proliferativo.

Conclusione

In questo lavoro di tesi sono state sviluppate formulazioni in grado di veicolare lisato piastrinico in associazione con agenti antibatterici (vancomicina cloridrato) e antiossidanti (sericina) da utilizzare nel trattamento delle lesioni cutanee. Tali formulazioni, oltre a possedere proprietà meccaniche idonee alla somministrazione, sono risultate in grado di assorbire l'essudato della ferita dando origine ad un gel in grado, a sua volta, di rilasciare nel letto della ferita gli agenti biologicamente attivi. Gli studi *in vitro* condotti su fibroblasti umani (test di proliferazione cellulare, test della bromodesossiuridina, test del "wound healing") hanno evidenziato la capacità di tali formulazioni di promuovere la proliferazione cellulare.

Le formulazioni sviluppate verranno sottoposte in un prossimo futuro a studi di efficacia *in vivo* su modello animale (ratto) secondo un protocollo appena approvato dal Ministero. Brevemente, il protocollo prevede di generare sul dorso di ciascun animale una lesione termica su entrambi i lati. Rimossa l'escara formata, verrà applicata la formulazione in esame su una delle lesione, mentre la lesione contro laterale verrà accuratamente detersa con soluzione salina e costituirà la lesione controllo. La valutazione della progressione della riparazione tissutale verrà eseguito mediante rilevazione fotografica e analisi istologica.

Bibliografia

- Abbade, L.P., Lastoria, S., 2005. Venous ulcer: epidemiology, physiopathology, diagnosis and treatment. *Int J Dermatol.* 44, 449-56.
- Alonso, J.E., Lee, J., Burgess, A.R., Browner, B.D., 1996. The management of complex orthopaedic injuries. *Surg Clin North Am.* 76, 879-903.
- Aoyagi, S., Onishi, H., Machida, Y., 2007. Novel chitosan wound dressing loaded with minocycline for the treatment of severe burn wounds. *Int J Pharm.* 330, 138–145.
- Aramwit, P., Sangcakul, A., 2007. The effect of sericin cream on wound healing in rats. *Biosci Biotechnol Biochem.* 71, 2473-2477.
- Attinger, C.E., Janis, J.E., Steinberg, J., Schwartz, J., Al-Attar, A., Couch, K., 2006. Clinical approach to wounds: debridement and wound bed preparation including the use of dressings and wound-healing adjuvants. *Plast Reconstr Surg.* 117, 72S-109S.
- Bansal, C., Scott, R., Stewart, D., Cockerell, C.J., 2005. Decubitus ulcers: a review of the literature. *Int J Dermatol.* 44, 805-810.
- Bass, A., Chayan, D., Weinmann, E.E., Ziss, M., 1997. Lateral venous ulcer and short saphenous vein insufficiency. *J Vasc Surg.* 25, 654-657.
- Bilgainya, R., Khan, F., Mann, S., 2010. Spontaneous patterning and nanoparticles encapsulation in carboxymethylcellulose/alginate/dextran hydrogels and sponges, *Materials science and engineering.* 30, 352-356
- Blair, S.D., Backhouse, C.M., Harper, R., Matthews, J., McCollum, C.N., 1988. Comparison of absorbable materials for surgical haemostasis. *Br J Surg.* 75, 969-971.
- Blandino, A., Macías, M., Cantero, D., 2001. Immobilization of glucose oxidase within calcium alginate gel capsules, *Process biochemistry.* 36, 601-606
- Boateng, J.S., Matthews, K.H., Howard, N.E.S., Eccleston, G.M., 2008. Wound healing dressing and drug delivery system: a review. *J. Pharm. Sci.* 97, 2892- 2923
- Borzini, P., Mazzucco, L., 2005. Platelet gels and releasates. *Curr. Opin. Hematol.* 12, 473–479

- Burch, R.M., McMillan, B.A., 1991. Sucralfate induces proliferation of dermal fibroblasts and keratinocytes in culture and granulation tissue formation in full-thickness skin wounds. *Agents Actions*. 34, 229-231.
- Burke, JF., Yannas, IV., Quinby, WC., Bondo,c CC., Jung, WK., 1981. Successful use of a physiologically acceptable artificial skin in the treatment of extensive burn injury. *Ann Surg* . 194, 413-428.
- Candelli, M., Carloni, E., Armuzzi, A., Cammarota, G., Ojetti, V., Pignataro, G., Santoliquido, A., Pola, R., Pola, E., Gasbarrini, G., Gasbarrini, A., 2000. Role of sucralfate in gastrointestinal diseases. *Panminerva Med*. 42, 55-9.
- Caramella, C.M., Bonferoni, M.C., Rossi, S., Sandri, G., Ferrari, F., Perotti, C.G., Del Fante, C., 2011. Platelet lysate and bioadhesive compositions thereof for the treatment of mucositis. Patent U.S.0280952 (A1); Biomed Device Srl (Reggello, Florence, I).
- Caramella, C.M., Sandri, G., Rossi, S., Mori, M., Bonferoni, M.C., Ferrari, F., Del Fante, C., Perotti, C., 2013. New therapeutic platforms for the treatment of epithelial and cutaneous lesions. *Curr Drug Deliv*. 10(1), 18- 31
- Chang, KW., Alsagoff, S., Ong, KT., Sim, PH., 1998. Pressure ulcers—randomised controlled trial comparing hydrocolloid and saline gauze dressings. *Med J Malaysia* . 53, 428–431.
- Chen, D.W.C., Liao, J.Y., Liu, S.J., Chan, E.C., 2012. Novel biodegradable sandwich-structured nanofibrous drug-eluting membranes for repair of infected wounds: an in vitro and in vivo study, *International journal of nanomedicine*. 7, 763-771.
- Chen, W.Y.J., Abatangelo, G., 1999. Function of hyaluronan in wound repair, *Wound repair and regeneration*. 7, 79-89.
- Choi, G.S., Sung, J.M., Ye, Y.M., Park, H.S., 2009. A case of occupational asthma caused by inhalation of vancomycin powder, *Allergy*. 64, 1391-1392.
- Cipriani ,V., Ranzato, E., Balbo, V., Mazzucco, L., Cavaletto, M., Patrone, M., 2009. Long-term effect of platelet lysate on primary fibroblasts highlighted with a proteomic approach. *J Tissue Eng Regen Med*. 3, 531–538.
- Clark, R.A., Ghosh, K., Tonnesen, M.G., 2007. Tissue engineering for cutaneous wounds. *J Invest Dermatol*. 127, 1018-1029.

- Cook, H., Davies, KJ., Harding, KG., Thomas, DW., 2000. Defective extracellular matrix reorganization by chronic wound fibroblasts is associated with alterations in TIMP-1, TIMP-2 and MMP-2 activity. *J Invest Dermatol* . 115, 225–233.
- Crovetti, G., Martinelli, G., Issi, M., Barone, M., Guizzardi, M., Campanati, B., Moroni, M., Carabelli, A., 2004. Platelet gel for healing cutaneous chronic wounds. *Transfus Apher Sci*. 30, 145-151.
- Cutting, KF., White, RJ., 2005. Criteria for identifying wound infection-revisited. *Ostomy Wound Manage* . 51, 28-34
- D’Agostino, E., Fratellanza, G., Caloprisco, G., Formisano, P., Giacco, F., Cavalcanti, M., Perna, E., Nigro, M., Formisano, S., 2002. Effetto del gel piastrinico sulla proliferazione cellulare in vitro. *La trasfusione del sangue*. 7, 429-433.
- D’Angelo, E., Peres, A., 2007. *Fisiologia*. Edi-Ermes.
- Dash, R., Acharya, C., Bindu, P.C., Kundu S.C., 2008. Antioxidant potential of silk protein sericin against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in skin fibroblasts. *BMB reports*. 236-241.
- Dean, P.N., Dolbeare, F., Gratzner, H., Rice, G.C., Gray, J.W., 1984. Cell-cycle analysis using a monoclonal antibody to BrdUrd. *Cell Tissue Kinet*. 17 (4), 427- 436
- Degreef, H., 1998. How to heal a wound fast. *Dermatol Clin*. 16, 365-375.
- Dohan Ehrenfest, D.M., Rasmusson, L.T., 2009. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to Albrektsson leucocyte- and platelet rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol*. 27, 158- 167
- Doillon, CJ., Silver, FH., 1986. Collagen-based wound dressing: effects of hyaluronic acid and fibronectin on wound healing. *Biomaterials* . 7, 3-8.
- Draget, K.I., Taylor, C., 2011. Chemical, physical and biological properties of alginates and their biomedical implications, *Food hydrocolloids*. 25, 251-256.
- DuBose, JW., Cutshall, C., Metters, AT, 2005. Controlled release of tethered molecules via engineered hydrogel degradation: Model development and validation. *J Biomed Mater Res A* . 74, 104–116.

- El Backly, R., Ulivi, V., Tonachini, L., Cancedda, R., Descalzi, F., Mastrogiacomo, M., 2011. Platelet lysate induces in vitro wound healing of human keratinocytes associated with a strong proinflammatory. *Response Tissue Eng. (Part A)*. 17, 13-14.
- Elek, SD., 1997. Experimental staphylococcal infections in the skin of man. *Ann N Y Acad Sci* 1956; 65: 85-90
- Eppley, B.L., Pietrzak, W.S., Blanton, M., 2006. Platelet-rich plasma: a review of biology and applications in plastic surgery. *Plast Reconstr Surg*. 118, 147e-159e.
- Esposito, E., Menegatti, E., Cortesi, R., 2005. Hyaluronan-based microspheres as tool for drug delivery: a comparative study, *International journal of pharmaceutics*. 288, 35-49.
- Falabella, AF., 2006. Debridement and wound bed preparation. *Derm Ther* . 19, 317-325.
- Falanga, V., Eaglstein, WH., 1993. The “trap” hypothesis of venous ulceration. *Lancet* . 341, 1006-1008.
- Falanga, V., 2000. Classifications for wound bed preparation and stimulation of chronic wounds. *Wound Repair Regen* . 8, 347–352.
- Ferrari, F., Bertoni, M., Bonferoni, MC., Rossi, S., Caramella, C., Bolhuis, GK., 1996. Dissolution enhancement of an insoluble drug by physical mixture with a superdisintegrant: optimization with a simplex lattice design. *Pharm Dev Technol*. 1, 159-164.
- Ferreira, M.C., Tuma, Jr. P., Carvalho, V.F., Kamamoto, F., 2006. Complex wounds. *Clinics*. 61, 571-578.
- Fonder MA., Lazarus GS., Cowan DA., Aronson-Cook B., Kohli AR., Mamelak AJ., 2008. Treating the chronic wound: A practical approach to the care of nonhealing wounds and wound care dressings. *J Am Acad Dermatol*. 58: 185-206.
- Francesko, A., Tzanov, T., 2011. Chitin, chitosan and derivatives for wound healing and tissue engineering. *Adv Biochem Eng Biotechnol* . 125, 1-27.
- Geremicca, W., Fonte, C., Sisto Vecchio, S., 2010. Blood components for topical use in tissue regeneration: evaluation of corneal lesions treated with platelet lysate and considerations on repair mechanisms. *Blood Transfus*. 8, 107–112.

- Geronemus, RG., Robins, P., 1982. The effect of two new dressings on epidermal wound healing. *J Derm Surg Oncol* . 8, 850-852.
- Gilchrist, T., Martin, AM., 1983. Wound treatment with Sorbsan—an alginate fibre dressing. *Biomaterials* . 4, 317-320.
- Gist, S., Tio-Matos, I., Falzgraf, S., Cameron, S., Beebe, M., 2009. Wound care in the geriatric client. *Clin Interv Aging*. 4, 269-287.
- Goh, C.H., Heng, P.W.S., Chan, L.W., 2012. Alginates as a useful natural polymer for microencapsulation and therapeutic applications, *Carb. Polym.* 88, 1-12
- Groves, A.R., Lawrence, J.C., 1986. Alginate dressing as a donor site haemostat. *Ann. R. Coll. Surg. Engl.* .68, 27-8.
- Gruber, RP., Vistnes, L., Pardoe, R., 1975. The effect of commonly used antiseptics on wound healing. *Plast Reconstr Surg* . 55, 472-476.
- Gu, F., Amsden, B., Neufeld, R., 2004. Sustained delivery of vascular endothelial growth factor with alginate beads, *Journal of controlled release*. 96, 463-472.
- Guo, S., DiPietro, L.A., 2010. Factor affecting wound healing. *J Dent Res*, 89, 219-229.
- Hall, P.A., Levison, D.A. 1990. Review: assessment of cell proliferation in histological material. *J Clin Pathol*. 43, 184-192
- Harding, K., Cutting, K., Price, P., 2000. The cost-effectiveness of wound management: protocols of care. *Br J Nurs* . 9, S6, S8, S10 passim.
- Horch, RE., Kopp, J., Kneser, U., Beier, J., Bach, AD., 2005. Tissue engineering of cultured skin substitutes. *J Cell Mol Med* . 9, 592-608.
- Hoshino, T., Takano, T., Tomisato, W., Tsutsumi, S., Hwang, H.J., Koura, Y., Nishimoto, K., Tsuchiya, T., Mizushima, T., 2003. Effects of sucralfate on gastric irritant-induced necrosis and apoptosis in cultured guinea pig gastric mucosal cells. *Biol Pharm Bull*. 26, 24-7.
- Ichioaka, S., Harii, K., Nakahara, M., Sato, Y., 1998. An experimental comparison of hydrocolloid and alginate dressings and the effect of calcium ions on the behaviour of alginate gel. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* . 32, 311-316.

- Ishihara, M., Nakanishi, K., Ono, K., Sato, M., Kikuchi, M., Saito, Y., Yura, H., Matsui, T., Hattori, H., Uenoyama, M., Kurita, A., 2002. Photocrosslinkable chitosan as a dressing for wound occlusion and accelerator in healing process. *Biomaterials* . 23, 833- 840.
- Katrancioglu, N., Karahan, O., Kilic, A.T., Katrancioglu, O., Celik, C., Bakici , M.Z., Atahan, E., 2012. Is sustained release of vancomycin from fibrin glue effective to prevent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* graft infection?, *African journal of microbiology research*. 6 (4), 798-801.
- Kerstein, MD., 1997. The scientific basis of healing. *Adv Wound Care* .10, 30-36.
- Khaksar, E., Aldavood, S.J., Abedi, G.R., Sedaghat, R., Nekoui, O., Zamani-ahmadmahmudi, M., 2013. The effect of sub-conjunctival platelet-rich plasma in combination with topical acetylcysteine on corneal alkali burn ulcer in rabbits. *Comp Clin Pathol*. 22, 107–112.
- Kim, H.W., Knowles, J.C., Kim, H.E., 2005. Hydroxyapatite porous scaffold engineered with biological polymer hybrid coating for antibiotic vancomycin release. *Journal of materials science: materials in medicine*. 16, 189-195.
- Kim, K.M., Shin, Y.T., Kim, H.Y., 2012. Effect of autologous platelet-rich plasma on persistent corneal epithelial defect after infectious keratitis. *Jpn J Ophthalmol*. 56, 544-550.
- Kogan, G, Soltés, L., Stern, R. Gemeiner, P., 2007. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnol Lett.* 29, 17-25.
- Koksal, C., Bozkurt, AK., 2003. Combination of hydrocolloid dressing and medical compression stockings versus Unna's boot for the treatment of venous leg ulcers. *Swiss Med Wkly*. 133, 364–368.
- Komarcevic, A., 2000. The modern approach to wound treatment. *Med Pregl*. 53, 363-368.
- Kondo, T., Ishida, Y., 2010. Molecular pathology of wound healing. *Forensic Sci Int*. 203, 93-98.
- Kundu B., Rajkhowa R., Kundu S.C., Wang X., 2013. Silk fibroin biomaterials for tissue regenerations. *Adv Drug Deliv Rev*. 65, 457-470.
- Kushida, S., Kakudo, N., Suzuki, K., Kusumoto, K., 2013. Effects of platelet-rich plasma on proliferation and myofibroblastic differentiation in human dermal fibroblasts. *Ann Plast Surgin*. 71, 219-224.

- Lazarus, G.S., Cooper, D.M., Knighton, D.R., Margolis, D.J., Percoraro, E.R., Rodeheaver, G., Robson, M.C., 1994. Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing. *Arch Dermatol.* 130, 489-493.
- Lee, K.Y., Mooney, D.J., 2012. Alginate: properties and biomedical applications, *Progress in polymer science.* 37, 106-126.
- Liao, ZJ., Huan, JN., Lv, GZ., Shou, YM., Wang, ZY., 2006. Multi-center clinical study of the effect of silver nitrate ointment on the partial-thickness burn wounds. *Zhonghua Shao Shang Za Zhi.* 22, 359-361.
- Marciel, F.B., DeRossi, R., Modolo, T.J.C., Pagliosa, R.C., Leal, C.R.J., Delben, A.A., 2012. Scanning electron microscopy and microbiological evaluation of equine burn wound repair after platelet-rich plasma gel treatment. *Burns.* 38, 1058-1065.
- Martin, L., Wilson, CG., Koosha, F., Tetley, L., Gray, AI., Senel, S., Uchegbu, IF., 2002. The release of model macromolecules may be controlled by the hydrophobicity of palmitoyl glycol chitosan hydrogels. *J Control Release .* 80, 87-100.
- Masuelli, L., Tumino, G., Turriziani, M., Modesti, A., Bei, R., 2010. Topical use of sucralfate in epithelial wound healing: clinical evidences and molecular mechanisms of action. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov.* 4, 25-36.
- Mayfield, J.A., Reiber, G.E., Sanders, L.J., Janisse, D., Pogach, L.M., 2004. American Diabetes Association: Preventive foot care in diabetes. *Diabetes Care.* 27, 63S-64S.
- Mazzucco, L., Medici, D., Serra, M., Panizza, R., Rivara, G., Orecchia, S., Libener, R., Cattana, E., Levis, A., Betta, P.G., Borzini, P., 2004. The use of autologous platelet gel to treat difficult-to-heal wounds: a pilot study. *Transfusion* 44, 1013- 1018
- Mian ,M., Beghè, F., Mian, E. , 1992. Collagen as a pharmacological approach in wound healing. *Int J Tissue React .* 14 Suppl: 1-9.
- Monafo, W.W., West, M.A., 1990. Current treatment recommendations for topical burn therapy. *Drugs.* 40(3), 364-373.
- Moore, K., McCallion, R., Searle, R.J., Stacey , M.C., Harding ,K.G., 2006. Prediction and monitoring the therapeutic response of chronic dermal wounds. *Int Wound J.* 3, 89–96.

- Muzzarelli, R.A.A., 2009. Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone. *Carbohydr Polym.* 76, 167-182.
- Nagyuvary, J.J., 1982. Method for treating hyperbilirubinemia. U.S. Patent No 4,363,801.
- Nicaeus, T.E., Tolentino, M.J., Adamis, A.P., Rubin, P.A., 1996. Sucralfate and basic fibroblast growth factor promote endothelial cell proliferation around porous alloplastic implants in vitro. *Ophthal Plast Reconstr Surg.* 12, 235-9.
- Ogino, Y., Ayukawa, Y., Kukita, T., 2006. The contribution of platelet-derived growth factor, transforming growth factor- β 1, and insulin-like growth factor-I in platelet-rich plasma to the proliferation of osteoblast-like cells. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 101, 724- 729
- Olascoaga, A., Vilar-Compte, D., Poitevin-Chacón, A., Contreras-Ruiz, J., 2008. Wound healing in radiated skin: pathophysiology and treatment options. *Int Wound J.* 5, 246-57.
- Padamwar, M.N., Pawar ,A.P., 2004. Silk sericin and its applications: a review. *J Sci Ind Res.* 63, 323-329.
- Parish, LC., Witkowski, JA., 2004. Controversies about the decubitus ulcer. *Dermatol Clin.* 22, 87-91.
- Patel R.J., Modasiya M.K.: Sericin: pharmaceutical applications. *Int J Res Pharm Biomed Sci*, 2011; 2: 913-917.
- Perotti, G., Stronati, M., Figar, T., Del Fante, C., Scudeller, L., Perotti, C., 2012. Allogeneic platelet leucocyte-gel to treat occipital decubitus ulcer in a neonate: a case report. *Blood Transfus.* 10, 387-389.
- Peterson, N.C., 1976. The development of pressure sores during hospitalization. In: Kenedi R.M., Cowden J.M., Scales J.T (eds): *Bedsore bio-mechanics*. London: Mcmillan. 219-224.
- Pezzotta, S., Del Fante, C., Scudeller, L., Cervio, M., Antoniazzi, E.R., Perotti, C., 2012. Autologous platelet lysate for treatment of refractory ocular GVHD. *Bone Marrow Transplant.* 47, 1558- 1563.
- Pontieri, G.M., 2007. *Elementi di patologia generale (Professioni sanitarie)*. Piccin.
- Price, R.D., Berry, M.G., Navsaria, H.A., 2007. Hyaluronic acid: the scientific and clinical evidence. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 60, 1110-9.

- Purna, SK., Babu, M., 2000. Collagen based dressings-a review. *Burns* . 26, 54-62.
- Queen, D., Orsted, H., Sanada, H. Sussman, G. A., 2004. dressing history. *Int Wound J* . 1, 59-77.
- Ranzato, E, Patrone, M., Mazzucco, L., Burlando, B., 2008. Platelet lysate stimulates wound repair of HaCaT keratinocytes. *Br J Dermatol*, 159, 537–545.
- Rasero, L., Bellino, L., Cantelli, G., Cappelli, S., Fabbri, C., Falciani, F., Gallorini, I., Lucchesi , G., Masini, M.L., Polignano, R., Romanelli, M., 2002. Linee guida sulle ulcere da pressione, prevenzione e trattamento, Consiglio sanitario regionale, regione Toscana.
- Ravi Kumar, Majeti N.V., 2000. A review of chitin and chitosan applications. *React Funct Polym*, . 46, 1–27.
- Reiber, G.E., Ledoux, W.R., 2002. Epidemiology of diabetic foot ulcers and amputations: evidence for prevention. In: William R., Herman W., Kinmonth A.L., Wareham N.J. (eds): *The evidence base for diabetes care*. Chichester: Wiley. 641-665.
- Reynolds, P.E., 1989. Structure, biochemistry and mechanism of action of glycopeptides antibiotics, *European journal of clinical microbiology & infectious*. 943-950.
- Rigano, L., Leporatti, R., Lionetti, N., 2005. Sericina integra: una molecola bio-adesiva dalla seta. *Cosm Technol*. 8, 15-22.
- Rodeheaver, GT., Smith, SL., Thacker, J., Edgerton, MT., Edlich, RF., 1975. Mechanical cleansing of contaminated wound with a surfactant. *Am J Surg* . 129, 241-245.
- Rossi, S., Faccendini, A., Bonferoni M.C, Ferrari, F., Sandri, G., Del Fante., C., Perotti, C., Caramella, C.M., 2013a. “Sponge-like” dressings based on biopolymers for the delivery of platelet lysate to skin chronic wounds. *Int. J. Pharm.* 440, 207- 215
- Rossi, S., Ferrari, F., Bonferoni, M.C., Sandri, G., Faccendini, A., Puccio, A., Caramella, C.M., 2013b. Comparison of poloxamer- and chitosan-based thermally sensitive gels for the treatment of vaginal mucositis. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, in press
- Rweia, S.P., Chena, S.W., Maob, C.F., Fangc, H.W., 2008. Viscoelasticity and wearability of hyaluronate solutions, *Biochemical engineering journal*. 40, 211-217.

- Sandri, G., Bonferoni, M.C., Ferrari, F., Rossi, S., Del Fante, C., Perotti, C., Gallanti, A., Caramella, C.M., 2011a. An in situ gelling buccal spray containing platelet lysate for the treatment of oral mucositis. *Curr Drug Discov Technol.* 8(3), 277- 285
- Sandri, G, Bonferoni, M.C., Rossi, S., Ferrari, F., Mori, M., Del Fante, C., Perotti, C., Scudeller, L., Caramella, C.M., 2011b. Platelet lysate formulations based on mucoadhesive polymers for the treatment of corneal lesions. *J Pharm Pharmacol.* 63(2),189- 198
- Sandri, G., Bonferoni, M.C., Rossi, S., Ferrari, F., Mori, M, Del Fante, C., Perotti, C., Caramella, C.M. 2012. Thermosensitive eyedrops containing platelet lysate for the treatment of corneal ulcers.
- Schultz, GS., Sibbald, RG., Falanga, V., Ayello, EA., Dowsett, C., Harding, K., Romanelli, M., Stacey, MC., Teot, L., Vanscheidt, W., 2003. Wound bed preparation: a systematic approach to wound management. *Wound Repair Regen.* 11, S1- S28.
- Sefton, MV., Woodhouse, KA., 1998. Tissue engineering. *J Cutan Med Surg.* 3, S1-S18-S23.
- Shea, J.D., 1975. Pressure sores: classification and management. *Clin Orthop.* 112, 89-100.
- Shindo, K., Iizuka, M., Sasaki, K., Konno, S., Itou, H., Horie, Y., Watanabe, S., 2006. Sucralfate prevents the delay of wound repair in intestinal epithelial cells by hydrogen peroxide through NF-kappaB pathway. *J Gastroenterol.* 41, 450-61.
- Sibbald, R.G., Williamson, D., Orsted, H.L., Campbell, K., Keast, D., Krasner, D., Sibbald, D., 2000. Preparing the wound bed--debridement, bacterial balance and moisture balance. *Ostomy Wound Manage.* 46,14-22.
- Sibbald, RG., Browne, AC., Coutts, P., Queen, D., 2001. Screening evaluation of an ionized nanocrystalline silver dressing in chronic wound care. *Ostomy Wound Manage .* 47, 38-43.
- Singer, A.J., Clark, R.A., 1999. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med.* 341, 738-746.
- Singh, N., Armstrong, D.G., Lipsky, B.A., 2005. Preventing foot ulcers in patients with diabetes. *J.A.M.A.* 293, 217-228.
- Sinha, V.R., Singla, A.K., Wadhawan, S., Kaushik, R., Kumria, R., Bansal, K., Dhawan, S., 2004. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. *Int J Pharm.* 274, 1–33.

- Smith, T.L., Pearson, M.L., Wilcox, K.R., Cruz, C., Lancasters, M.V., Robinson-Dunn, B., Tenover, F.C., Zervos, M.J., Band, J.D., White, E., Jarvis, W.R., 1999 . Emergence of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*, *The New England journal of medicine*. 340, 493-501.
- Sobajo, C., Behzad, F., Yuan, X.F., Bayat, A., 2008. Silk: a potential medium for tissue engineering. *Eplasty*. 8, 446-438.
- Soriano, A., Marco, F., Martínez, J.A., Pisos, E., Almela, M., Dimova, V.P., Alamo, D., Ortega, M., Lopez, J., Mensa, J., 2008. Influence of vancomycin Minimum Inhibitory Concentration on the treatment of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia, *Clinical infectious diseases*. 46, 193-200.
- Strodtbeck, F., 2001. Physiology of wound healing. *New Inf Nurs Rev*. 1, 43-52.
- Supp, DM., Boyce, ST., 2005. Engineered skin substitutes: practices and potentials. *Clin Dermatol*. 23, 403-412.
- Suzuki, Y., Tanihara, M., Nishimura, Y., Suzuki, K., Kakimaru, Y., Shimizu, Y., 1998. A new drug delivery system with controlled release of antibiotic only in the presence of infection. *J Biomed Mater Res* . 42, 112–116.
- Teramoto, H., Kameda, T., Tamada, Y., 2008. Preparation of gel film from *Bombyx mori* silk sericin and its characterization as a wound dressings. *Biosci Biotechnol Biochem*. 72, 3189-3196.
- Thomas, A., Harding, K.G., Moore, K.. 2000. Aginates from wound dressing activate human macrophages to secrete tumor necrosis factor- α . *Biomaterials* 21, 1797- 1802
- Thomas, S., 1997. Assessment and management of wound exudate. *J Wound Care* . 6, 327-330.
- Thomas, S., Loveless, P., 1988. Comparative review of the properties of six semipermeable film dressings. *Pharm J* . 240, 785–787.
- Thomas, S., 2000. Alginate dressings in surgery and wound management–Part 1. *J Wound Care*. 9, 56-60.
- Torri, C., Pagliani, U., Zappavigna, A., Miselli, V., 2007. Ragionevoli dubbi nell’evoluzione di un piede diabetico infetto. Unità operativa complessa di diabetologia, malattie metaboliche e nutrizione clinica, Presidio Ospedaliero di Scandiano, AUSL di Reggio Emilia, *G It Diabetol Metab*. 27, 35-39.

- Uend, S.W.N., Lee, M.S., Lin, S.S, Chan, E.C., Liu, S.J., 2007. Development of a biodegradable alginate carrier system for antibiotics and bone cells, *Journal of orthopeadic research*. 25, 62-72.
- Ueno, H., Yamada, H., Tanaka, I., Kaba, N., Matsuura, M., Okumura, M., Kadosawa, T., Fujinaga, T., 1999. Accelerating effects of chitosan for healing at early phase of experimental open wound in dogs. *Biomaterials* . 20, 1407-1414.
- van Marum, R.J., Meijer, J.H., Ribbe, M.W., 2002. The relationship between pressure ulcers and skin blood flow response after a local cold provocation. *Arch Phys Med Rehabil*. 83, 40-43.
- Vannini, V., 2007. Guida allo studio della patologia generale. La Goliardica Pavese.
- Vanwijck, R., 2001. Surgical biology of wound healing. *Bull Mem Acad R Med Belg*. 156, 175-184.
- Vecchio, S., Santilla, E., D'Ettoris, A.R., Musuraca, V., Leonardo, P., Maltese, P., Geremicca, W., Schipani, G., 2006. The use of platelet-rich plasma for the topical treatment of corneal lesions. *Blood Transfus*. 4, 133-140.
- Velnar, T., Bailey, T., Smrkolj, V., 2009. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *J Int Med Res* . 37, 1528-1542.
- Virgili, A., Colombo, E., Mantovani, L., 2004. Terapia compressiva e metodiche di riparazione tissutale. C.A.R.I.D.
- Volkin, D.B., Verticelli, A.M., Marfi,a K.E., Burke, C.J., Mach, H., Middaugh, C.R., 1993. Sucralfate and soluble sucrose octasulfate bind and stabilize acidic fibroblast growth factor. *Biochim Biophys Acta*. 1203, 18-26.
- Walker, M., Hobot, JA., Newman, GR., Bowler, PG., 2003. Scanning electron microscopic examination of bacterial immobilisation in a carboxymethyl cellulose (Aquacel[®]) and alginate dressings. *Biomaterials* . 24, 883-890.
- Walsh, C.T., Fisher, S.L., Park, I.S., Prahalad, M., Wu, Z., 1996. Bacterial resistance to vancomycin: five genes and one missing hydrogen bond tell the story, *Chemistry and biology*. 3, 21-28
- Werner, S., Grose, R. 2003. Regulation of wound healing by growth factors and cytochines. *Physiol. Rev*. 83, 835- 870

- White, J.V., Ryjewski, C., 2005. Chronic venous insufficiency. *Perspect Vasc Surg Endovasc Ther.* 17, 319-327.
- Wu, X., Ren, J., Luan, J., Yao, G., Li, J., 2012. Biochemical, mechanical, and morphological properties of a completely autologous platelet-rich wound sealant. *Blood Coagul. Fibrinolysis.* 23, 290–295.
- Xie, Y., Upton, Z., Richards, S., Rizzi, S.C., Leavesley, D.I., 2011. Hyaluronic acid: evaluation of a potential delivery vehicle for vitronectina: growth factor complexes in wound healing applications, *Journal of controller release.* 153, 225-232.
- Zarins, C.K., Glagov, S., 1989. Artery wall pathology in atherosclerosis. In: Rutherford RB (ed.) *Vascular Surgery*; 3rd edizione. Philadelphia: WB Saunders. 178-206.