

## 4. Risultati e discussione

### 4.1 Matrici tridimensionali tubulari

Le matrici ottenute possono essere osservate, a livello macroscopico, in figura 4; le strutture erano di colore bianco opaco, lisce e flessibili, aveva una lunghezza di circa 6-7 cm, un diametro interno di 0,5 mm ed una differenza tra il diametro esterno ed il diametro interno di 0,3 mm per il tubo monostrato, 0,7 mm per il bistrato e 1 mm per il tristrato.



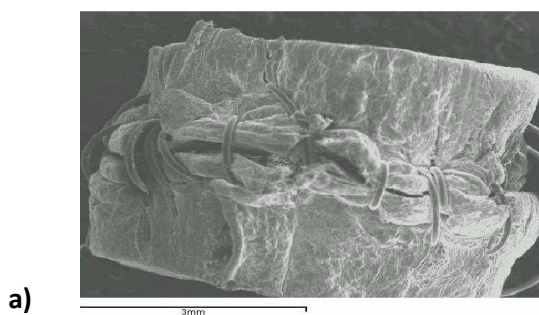
a)



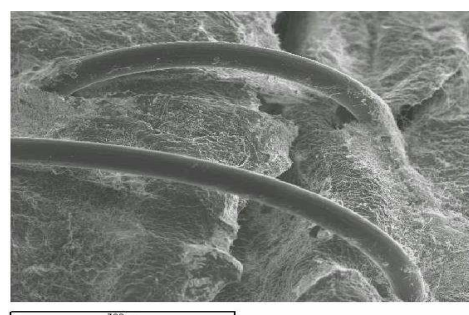
b)

**Figura 4.** Tubo mono-strato: a) visione longitudinale; b) visione frontale.

Gli stessi scaffold, parzialmente disidratati (45°C per 30 minuti), resistono invece bene alla sutura (Figura 5), senza lacerazioni o punti di ridotta resistenza.



a)



b)

**Figura 5.** Immagini al SEM di una sezione di scaffold tubulare bistrato suturata con filo PDS 0,06 mm; a) 10X, b) 400X.

Allo stato completamente idratato, che si ottiene al termine del processo di preparazione, gli scaffold tubulari sono risultati facilmente lacerabili durante la sutura con filo chirurgico (PDS 0,06 mm).

#### 4.2 Determinazione del peso molecolare del chitosano

Il viscosimetro di Ostwald è un dispositivo che consente la misurazione della viscosità relativa e da questa, il calcolo della viscosità specifica. Dividendo la viscosità specifica per la concentrazione della soluzione si ottiene la viscosità ridotta. Ponendo su un grafico, i valori di viscosità ridotta (in ordinata), e i valori di concentrazione della soluzione polimerica (in ascisse), si ottengono una serie di punti che possono essere interpolate per regressione lineare ottenendo così una retta (Figura 6) la cui intercetta per  $C \rightarrow 0$  risulta essere la viscosità intrinseca ( $\eta$ ).

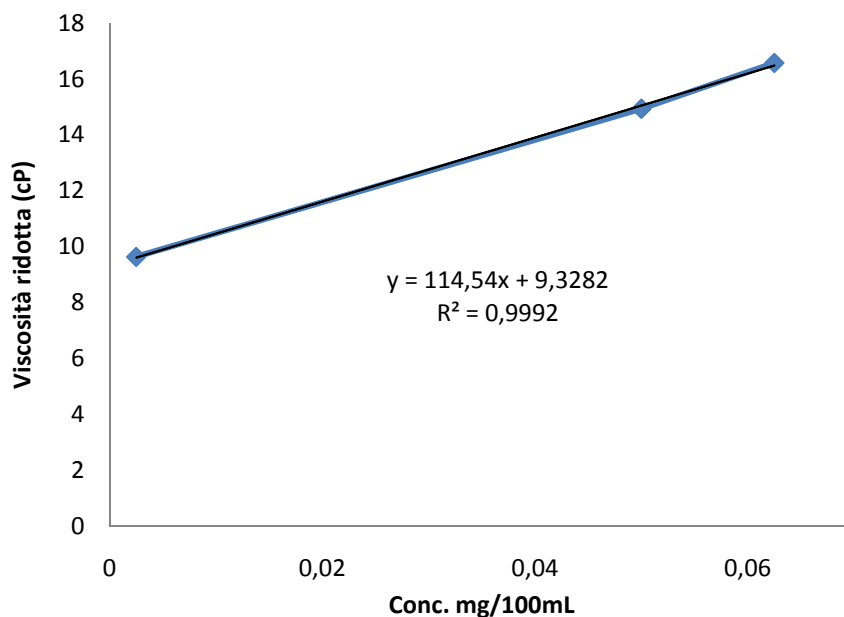


Figura 6. Viscosità ridotta in funzione della concentrazione di soluzioni di chitosano.

Conoscendo la viscosità intrinseca è possibile calcolare il peso molecolare,  $M$ , del polimero in base all'equazione  $\eta = K \cdot M^a$  (3)

dove  $K$  ed  $a$  sono costanti del fluido oggetto della misurazione, per il chitosano tali valori sono  $1,81 \cdot 10^{-3}$  e  $0,93$ , rispettivamente. Il valore della viscosità intrinseca, per il chitosano utilizzato per la preparazione delle soluzioni, è risultato pari a  $9,3$  cP; applicando la formula 3 si ottiene un PM pari a circa  $10$  kDa.

### 4.3 Caratterizzazione chimico-fisica degli scaffold tubulari

La caratterizzazione degli scaffold è stata effettuata su tubi mono-o multi-strato prodotti a partire da soluzioni di chitosano a diversa concentrazione:

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

Tutti i tubi sono stati parzialmente disidratati ( $45^{\circ}\text{C}$  per 30 minuti).

I risultati ottenuti, per quanto riguarda il modulo elastico e l'allungamento fino a rottura, sono riportati in figura 7.

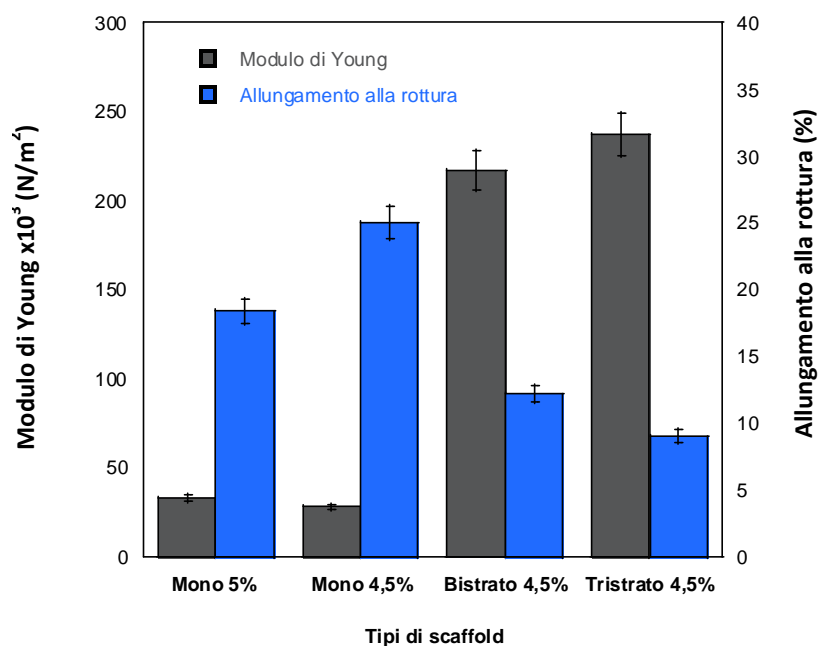


Figura 7. Modulo di Young ed allungamento alla rottura.

Si osserva, che il modulo elastico non risulta essere particolarmente influenzato dalla concentrazione delle soluzioni di chitosano con la quale venivano preparati gli scaffold monostrato. Questa scarsa influenza è da attribuire alle piccole differenze di concentrazione nelle soluzioni utilizzate. Tuttavia si deve precisare che 5% p/v rappresentava il valore massimo utilizzabile per l'ottenimento di una soluzione di viscosità adeguata alle successive fasi di lavorazione.

Per quanto concerne l'effetto del numero di strati che costituivano lo scaffold, si osserva che, il modulo di Young aumentava significativamente (circa 9 volte) passando da un tubo monostrato a quello bistrato. Un ulteriore aumento (meno marcato del precedente) si otteneva passando dal tubo bistrato a quello tristrato.

L'allungamento alla rottura mostrava, invece, una dipendenza inversa dal numero di strati, diminuendo all'aumentare di quest'ultimo.

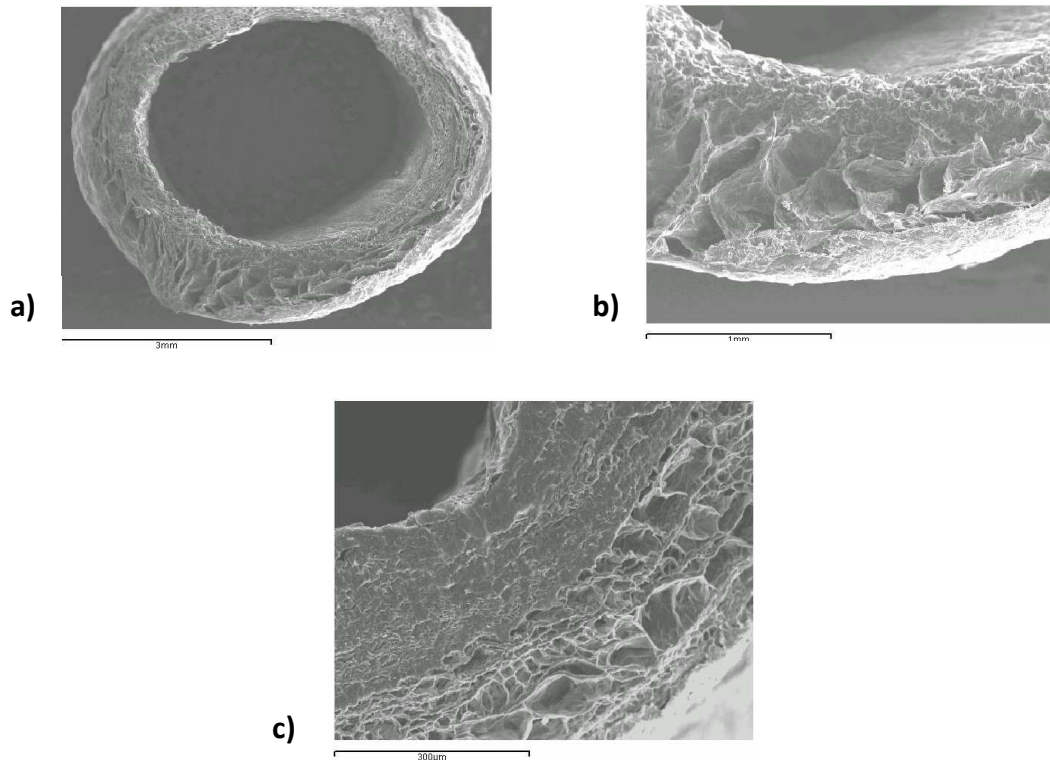
Questo parametro era anche significativamente influenzato dalla concentrazione della soluzione utilizzata nella preparazione del tubo monostrato; la soluzione più diluita dava luogo ad un tubo che mostrava un maggior allungamento alla rottura.

Da questi dati si evince, pertanto che l'aumento del numero di strati dava luogo a scaffold più rigidi (modulo di Young più elevato) ma maggiormente resistenti all'allungamento.

#### **4.4 Analisi al SEM e misura della porosità**

Al fine di determinare le dimensioni dei pori e avere indicazioni sull'organizzazione delle maglie nei diversi scaffold sono state scattate delle foto con il microscopio elettronico a scansione (SEM). Queste, in formato digitale, sono state analizzate con il software per analisi di immagini *NIH ImageJ*<sup>®</sup>.

Tale analisi consisteva nella determinazione del perimetro e del diametro di Feret di ciascun poro; per ogni analisi sono stati misurati almeno 100 pori. Le foto sono state eseguite su sezioni trasversali delle strutture tubulari (Figura 8).



**Figura 8.** Foto al SEM: a) Monostrato 5%; b) Monostrato 4,5%; c) Bistrato 4,5%.

La semplice osservazione delle immagini non permette di individuare differenze rilevanti nell'organizzazione microstrutturale dei diversi tubi monostrato, mostra però una consistente diversità tra le strutture monostrato e quelle bistrato. La figura 8c, permette di osservare il diverso grado di compattezza esistente tra lo strato interno e quello esterno del bistrato; il primo tubo a causa del processo di essiccazione a cui è stato sottoposto per permetterne

l'inserimento nel secondo tubo, mostra una struttura compatta, con pori di dimensioni ridotte.

La distribuzione cumulativa percentuale della dimensione dei pori (Figura 9) conferma quanto osservato dalle immagini al SEM. La media dei valori sottomisura (UM50) per gli scaffolds monostrato è intorno a 90  $\mu\text{m}$  mentre per gli scaffold bistrato è 38  $\mu\text{m}$ . La riduzione significativa può essere attribuita alla presenza di due strati così come al differente processo di produzione adottato rispetto agli scaffold monostrato.

L'ampiezza dei pori degli scaffold monostrato ottenuti a partire da soluzioni di chitosano al 5% ed al 4,5% cadono, rispettivamente, in un range di 12-270  $\mu\text{m}$  e 36-292  $\mu\text{m}$ . La differenza evidenziata è attribuibile alla formazione di cristalli di ghiaccio di dimensioni superiori nell'idrogel ad una più bassa concentrazione di chitosano [55].

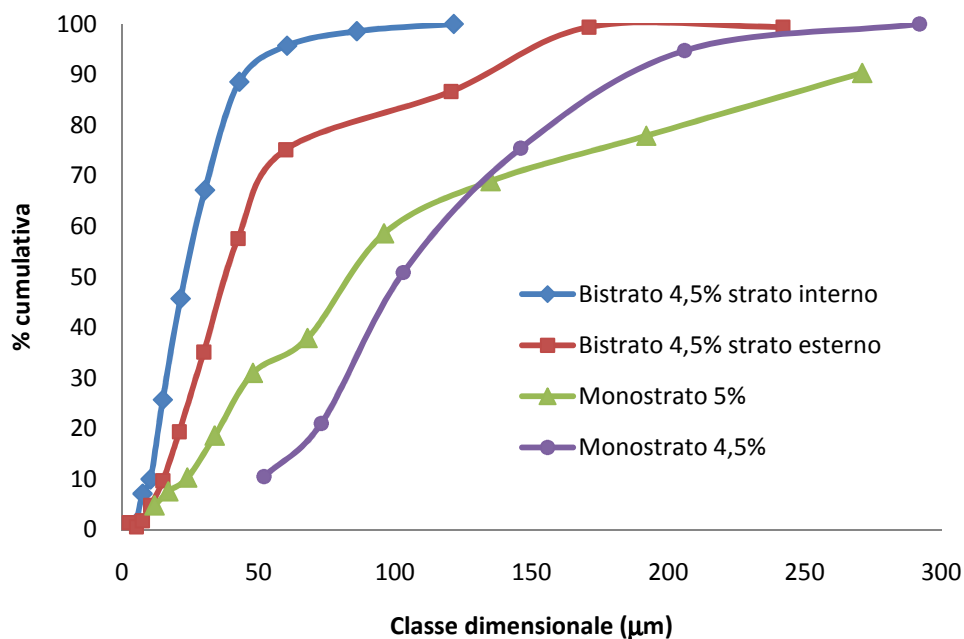


Figura 9. Distribuzione cumulativa della dimensione dei pori.

I risultati riportati in tabella 5 mostrano che il valore medio del diametro di Feret decresce all'aumentare della concentrazione della soluzione di chitosano utilizzato.

Un dato rilevante da evidenziare è la notevole ampiezza dell'errore (SD), associato a queste misure, indice di grande variabilità esistente nella dimensione dei pori.

**Tabella 5.** Diametro di Feret medio dei pori di diversi scaffold. Deviazione standard in parentesi.

Scaffold	Diametro di Feret medio ( $\mu\text{m}$ )
Monostrato 5%	84,0 (85,9)
Monostrato 4,5%	129,7 (92,5)
Bistrato 4,5% strato interno	31,8 (22,3)
Bistrato 4,5% strato esterno	39,93 (82,2)

Per quanto concerne la porosità degli scaffold, i dati riportati in figura 10 indicano che i tubi monostrato mostrano una porosità al di sopra del 70%, il bistrato, di circa il 50% e il tristrato di poco superiore al 40%

Monostrato 5%  
Monostrato 4,5%  
Bistrato 4,5%  
Tristrato 4,5%

**Figura 10.** Porosità percentuale.

Tale riduzione di porosità, si spiega considerando che il processo di fabbricazione dei tubi multistrato richiede uno o più passaggi di parziale essiccazione e l'aggiunta di soluzione di chitosano con funzione di agente collante fra i vari strati che può riempire in parte i pori dello scaffold sul quale viene spalmata.

Una diversa concentrazione di chitosano nella soluzione di partenza non ha influenzato in modo rilevante la porosità degli scaffold, questo parametro sembra invece essere maggiormente condizionato dalla natura dei trattamenti termici applicati nelle diverse fasi di costruzione di tubo.

#### 4.5 Studi di permeazione della bile

In figura 11 è mostrato il profilo di permeazione degli acidi colici misurato per i diversi tipi di tubo, in tutti i casi si osserva un andamento sigmoide della curva con un significativo aumento della percentuale di permeazione dopo le 24 ore.

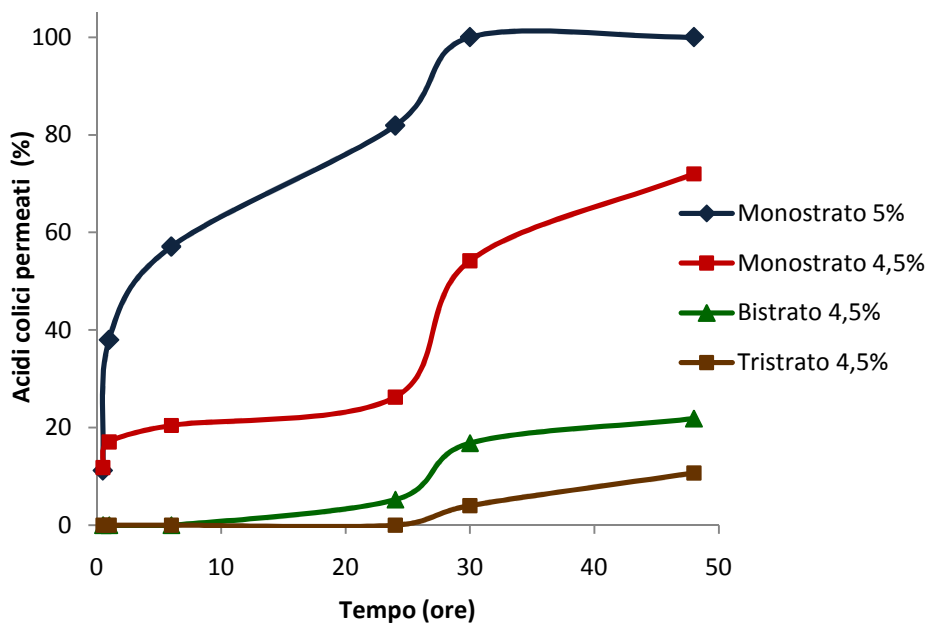


Figura 11. Percentuale degli acidi colici permeati attraverso i vari scaffolds.

Poiché è ben nota la capacità degli acid colici di formare legami con il chitosano [54], l'incremento di velocità di permeazione assunto alle 24 ore potrebbe essere spiegato considerando che questo tempo sia necessario per saturare i siti di legame tra gli acidi colici e il chitosano dello scaffold, dopodiché la permeazione procede più velocemente.

Lo scaffold monostrato, preparato con la soluzione di chitosano al 5% p/v, è risultato il più permeabile, infatti dopo sole 6 ore dall'inizio della prova più del 50% degli acidi colici è permeato; alle 24 ore si raggiunge l'80% fino ad arrivare alla permeazione totale attorno alla trentesima ora.

Lo scaffold monostrato preparato con la soluzione di chitosano al 4,5% p/v riportava una permeabilità agli acidi colici, dopo 24 ore, di circa il 25%; tale percentuale saliva al 70% dopo le 48 ore.

Nello scaffold bistrato, preparato a partire da una soluzione di chitosano al 4,5% p/v, dopo un'iniziale latenza, dopo le 24 ore si ha un incremento della velocità di permeazione agli acidi colici, circa il 6%, tale percentuale era del 22% dopo le 48 ore. La ridotta permeabilità del doppio tubo è determinata dalle piccole dimensioni dei suoi pori e dalla compattezza del suo strato interno, come indicato dalle misure di porosità. Il tubo tristrato si dimostra molto più impermeabile dei precedenti, infatti, dopo una latenza nelle prime 24 ore, la percentuale di permeazione agli acidi colici raggiungeva l'11% dopo le 48 ore.

Tale riduzione della permeazione agli acidi colici, per il tubo tristrato, probabilmente è dovuta all'aggiunta di un film privo di pori, nello strato più interno dell'intera struttura.

## 4.6 Test di citocompatibilità

### 4.6.1 Colture cellulari

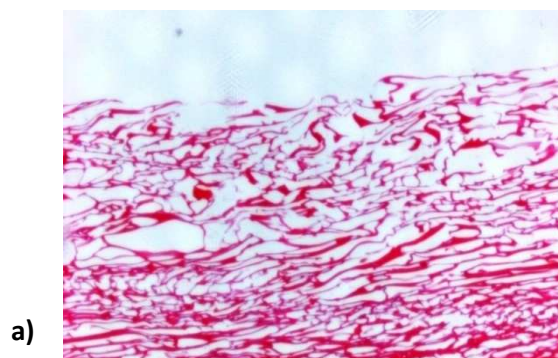
La semina delle cellule sulle sezioni degli scaffold tubulari è stata effettuata seguendo procedure di semina standard ma, data la difficoltà nell'adattare queste tecniche alle nostre matrici, non tutte le cellule utilizzate riuscivano a depositarsi sullo scaffold ed una quota cadeva sulla piastra. Non è stato quindi, possibile realizzare analisi di tipo quantitativo.

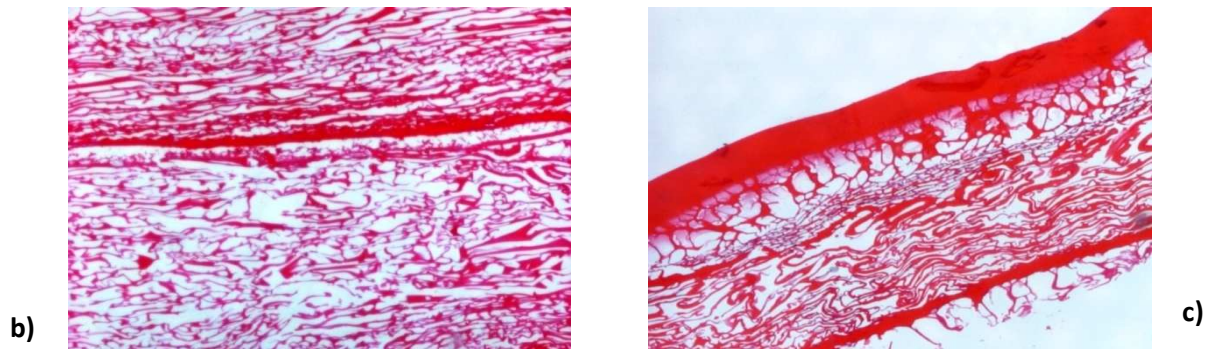
L'osservazione al microscopio ottico invertito non ha consentito una chiara individuazione delle cellule in quanto la struttura tridimensionale era opaca e ostacolava la visualizzazione del contenuto dei pori. Tuttavia, quando le cellule sono state seminate su porzioni di scaffold preparati a partire da soluzioni di chitosano al 4,5% o 5% non comparivano nel medium di coltura, a 10 giorni dalla semina, detriti o particolato derivante da deposito cellulare.

Questo consente di affermare che gli scaffold non mostravano citotossicità.

### 4.6.2 Sezioni istologiche di scaffold seminati con linee cellulari differenti

Le sezioni osservate al microscopio ottico mostrano la natura altamente eosinofila degli scaffold e permettono di osservare con estrema chiarezza la struttura tridimensionale che le caratterizza (Figura 12).





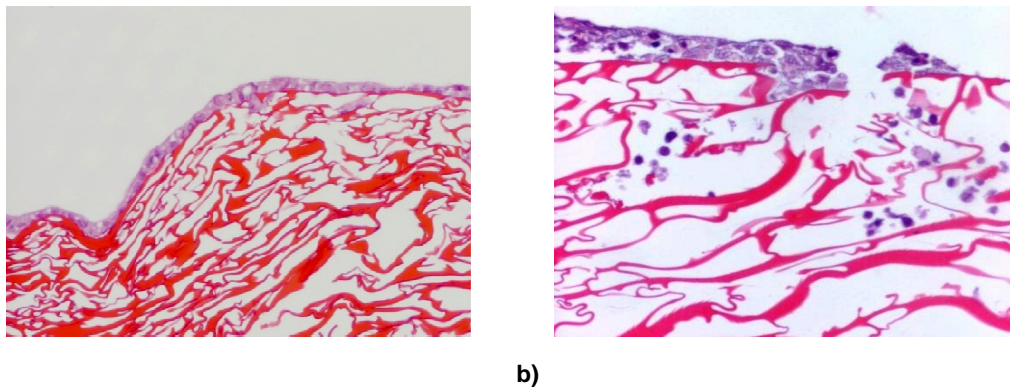
**Figura 12.** Sezione di 4  $\mu\text{m}$  del tubo non seminato in ematossilina-eosina; a) Monostrato, b) Bistrato, c) Tristrato.

In figura 12 sono riportate fotografie di sezioni trasversali di scaffold mono e multistrato preparati a partire da soluzioni di chitosano al 4,5%, colorate con ematossilina-eosina. Si osserva la natura fortemente eosinofila del materiale che permette di evidenziare la presenza di pori interconnessi.

In figura 13 e 14 sono riportate le fotografie ottenute dalle sezioni trasversali di scaffold (bi e tristrato) seminate con diverse linee cellulari.

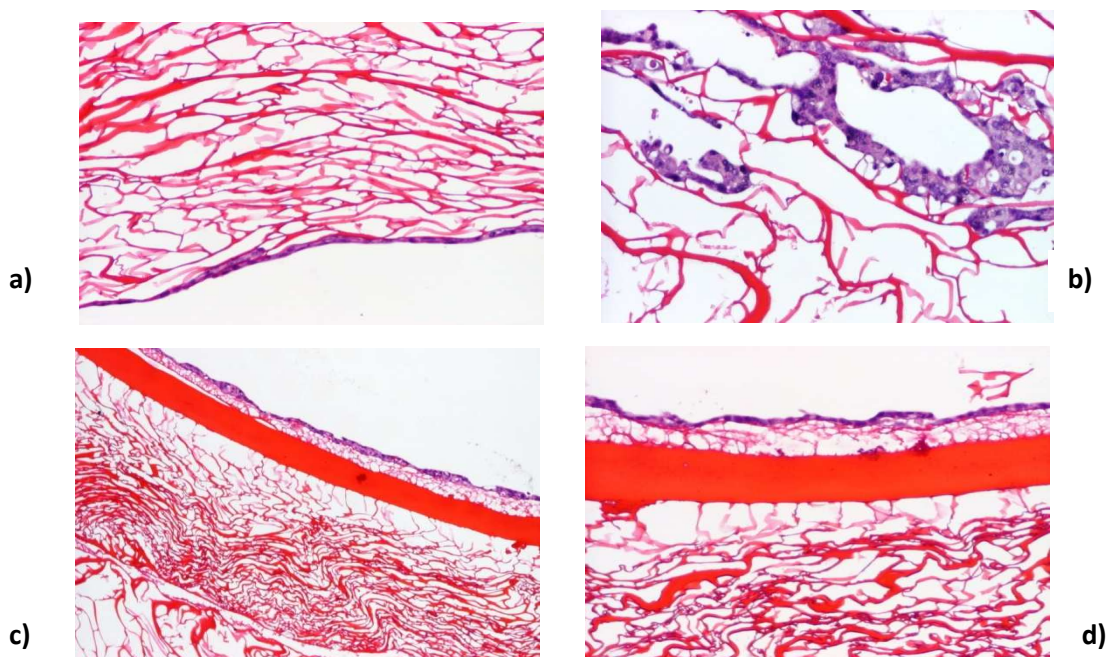
Questi esperimenti hanno rivelato che dopo 24 ore (Figura 13 a) dalla semina le cellule aderiscono alla matrice disponendosi in piccoli clusters, per entrambi i citotipi seminati è possibile osservare cellule in mitosi, indice importante della citocompatibilità del materiale.

Dopo 72 ore alla semina sia le SPAE che le EGI (Figura 13 a-b), presentano una densità cellulare maggiore ed un'omogenea distribuzione, sullo strato interno del bistrato si possono addirittura individuare cellule endoteliali disposte a formare strutture circolari, probabili sezioni di capillari in formazione.



**Figura 13.** Cellule SPAE ed EGI su tubo bistrato; a) dopo 24 ore dalla semina (40x), b) dopo 72 ore dalla semina (100 x).

Dopo 7 giorni dalla semina le cellule, soprattutto le EGI (Figura 14), penetrano negli strati più profondi degli scaffold occupandone da un terzo a metà dello spessore.



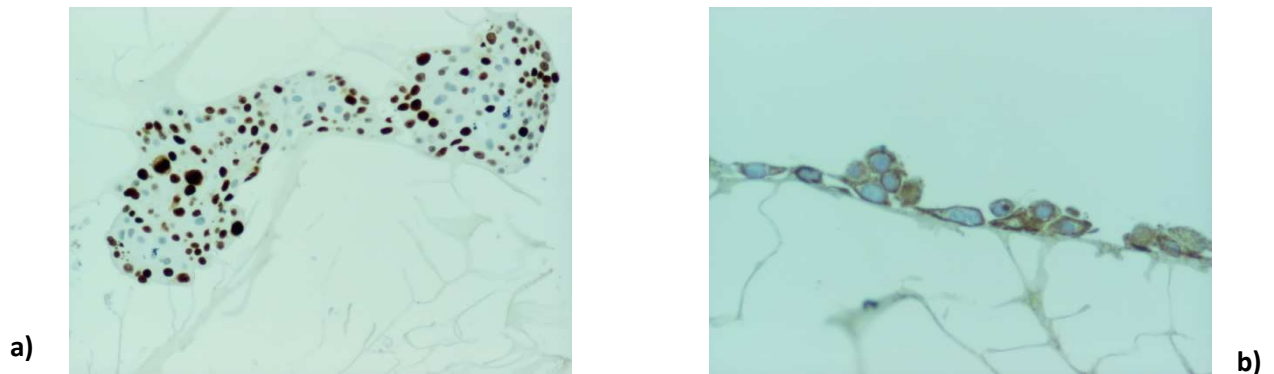
**Figura 14.** Cellule di colangiocarcinoma su tubo tristrato dopo 1 settimana dalla semina; a) e b) semina sul lato interno (luminale), 40x e 100x rispettivamente; c) e d) semina sul lato esterno, 100x e 200x rispettivamente.

## 4.7 Proliferazione e di mantenimento del differenziamento cellulare

### 4.7.1 Immunoistochimica

Le prove d'immunoistochimica sono state effettuate su tubi mono e bistrato preparati a partire da soluzioni di chitosano al 4,5%.

Le cellule di EGI, seminate sugli scaffold tubulari, mostrano una buona capacità di proliferare e di mantenere il differenziamento cellulare risultando positive sia per il marker di proliferazione Ki-67 sia per i markers di mantenimento del differenziamento CK19 e CK7 (Figura 15).



**Figura 15.** a) cellule EGI marcate per Ki-67 a 10 giorni dalla semina b) cellule EGI marcate per CK7 a 72 ore dalla semina.

## 4.8 Discussione

Il grande sviluppo della ricerca nell'ambito dell'ingegneria tissutale ha reso necessaria l'individuazione di una nuova classe di polimeri biodegradabili dotati di specifica bioattività. Nella prima parte di questo lavoro di tesi sono stati sviluppati e testati scaffold tubulari a base di chitosano (monostrato e multistrato) per la ricostruzione e la sostituzione del dotto biliare principale.

Gli scaffold prodotti sono interamente costituiti da chitosano addizionato con sali mono e bibasici di fosfato e raffinosa. Secondo quanto riportato da Bettini et al. [51] questi eccipienti non vengono ritrovati nello scaffold gelificato ma sembrano interagire con il chitosano durante la formazione dell'hydrogel; il loro utilizzo si è dimostrato decisivo nell'ottenimento di scaffold tale da consentire l'adesione e la proliferazione cellulare. È stato utilizzato chitosano con un grado di deacetilazione del 95% poiché, rispetto ad altri chitosani con grado di deacetilazione inferiore, risulta essere meno soggetto all'azione di degradazione enzimatica mediata dal lisozima [56, 57].

Questa caratteristica lo rende più adatto alla costruzione di protesi biodegradabili che riescano a mantenersi integre per il tempo necessario a garantire una corretta rigenerazione tissutale[58].

La freeze gelation, rispetto alle altre tecniche adottate per la realizzazione di scaffold polimerici, si è dimostrata molto efficiente e vantaggiosa sia per il risparmio in termini di tempo, che in termini economici. A differenza di quanto avviene con la tecnica della freeze-drying, non rimangono nello scaffold residui di acido acetico che potrebbero determinare la dissoluzione della matrice quando immersa in acqua. La temperatura di congelamento, la concentrazione di acido nella soluzione di chitosano e quella di etanolo nella soluzione gelificante sono variabili che, se opportunamente modificate, permettono di ottenere scaffold di chitosano con proprietà di resistenza meccanica e di porosità differenti. I parametri di temperatura e di concentrazione da noi

utilizzati si sono dimostrati adatti all'ottenimento di scaffold con le proprietà cercate.

La morfologia dei pori dello scaffold è critica non solo per il controllo del passaggio della bile, ma anche per regolare il livello di colonizzazione cellulare e l'organizzazione del nuovo tessuto [58]. La struttura porosa si forma durante il congelamento per creazione di cristalli di ghiaccio tra le catene del chitosano, contemporaneamente alla fase di gelificazione del polimero, l'acqua legata alla matrice polimerica entra in soluzione e la struttura costituita di pori interconnessi viene mantenuta [52]. I residui di acido acetico, utilizzato come solvente del chitosano nelle fasi di preparazione dell'hydrogel, vengono neutralizzati dal KOH.

Il risultato ottenuto è stato la messa a punto di un tubo multistrato dove lo strato interno (superficie luminale) era caratterizzato da una porosità assente o comunque compresa in un range di pochi micron di grandezza, che gli conferiva un'adeguata densità ed impermeabilità.

Questa superficie deve, evitando la permeazione della bile, permettere l'adesione cellulare e la diffusione delle molecole segnale e dei nutrienti.

Lo strato intermedio, oltre a donare resistenza meccanica deve presentare un'ampiezza dei pori, compresa tra i 35 ed i 70  $\mu\text{m}$ , necessaria a promuovere la formazione di un network di microvascolarizzazione. La superficie esterna dello scaffold deve avere un'ampiezza dei pori compresa tra i 50 e i 200  $\mu\text{m}$  per facilitare l'insediamento dei fibroblasti, la deposizione della matrice e la formazione del nuovo tessuto [58]. Gli scaffold multistrato possiedono le caratteristiche di porosità richieste ed appena descritte, inoltre lo scaffold tristrato, grazie all'inserimento di uno strato interno non poroso, risulta di gran lunga meno permeabile alla bile rispetto al bistrato.

Tale strato interno era costituito da un film di chitosano, parzialmente essiccato, preparato a partire da una soluzione di chitosano al 4,5%.

Per non alterare la struttura superficiale del film, l'asciugatura doveva avvenire in modo omogeneo ed in tempi tali da permettere una corretta organizzazione delle molecole. La velocità di essiccamento può essere controllata mediante variazione della temperatura.

Temperature superiori ai 45°C determinano una rapida eliminazione delle molecole d'acqua e la formazione di film dotati di una struttura superficiale ordinata, non compatibile con la crescita e la proliferazione cellulare [4751]. Lavorando a temperature inferiori ai 40°C, la lenta solidificazione del gel permetterebbe alle molecole di organizzarsi assumendo un alto grado di cristallizzazione ed un'elevata rigidità che rende i substrati, una volta effettuati i processi di sterilizzazione, inutilizzabili per la semina cellulare [51].

Microscopicamente i film ottenuti presentano una colorazione opalescente, una superficie liscia, inoltre mostrano una buona resistenza ed una elevata capacità di assorbimento dell'acqua.

La struttura più compatta dello scaffold tristrato dipende dalla sua minore porosità; questa caratteristica influenza positivamente le proprietà meccaniche. Gli scaffold descritti offrono un importante punto di partenza per lo sviluppo e l'ottimizzazione di un'ampia varietà di matrici tridimensionali e di dispositivi per la rigenerazione. Infine gli scaffold costruiti possono essere utilizzati per sistemi tissutali che richiedono una geometria tubulare quali ad esempio vasi sanguigni, il tratto gastrointestinale e tessuti con dotti o una microstruttura multi-tubulare.