

Ingegneria dei Tessuti

Materiali e tecnologie per la
realizzazione di *scaffold*

Pt. 1

Lezione del 04/10/2017

Ingegneria Tessutale

Problematiche connesse all'utilizzo di protesi artificiali e trapianto di organi

PROTESI ARTIFICIALI: Ipotesi di base

TRAPIANTO DI ORGANI: nonostante consenta di recuperare integralmente le funzionalità dell'organo da sostituire, presenta due grossi problemi:

- 1) Rigetto;
- 2) Scarsa disponibilità di organi.

Esempi di organi artificiali e protesi

Protesi valvolari
cardiache

Protesi vascolari

Protesi d'anca

Rene artificiale

Cuore artificiale

Maggiori problematiche

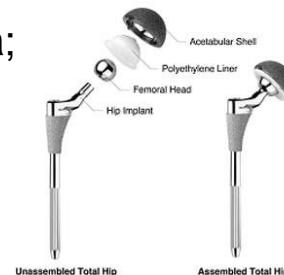
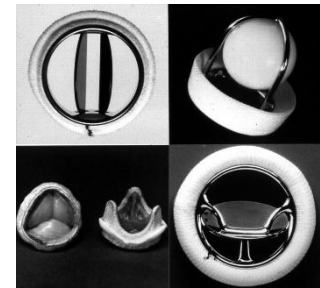
Affidabilità, anomalie, emocompatibilità (meccaniche),
Affidabilità, durata limitata (biologiche);

Diametro minimo 5 mm, anomalie emodinamiche, emocompatibilità;

Recupero lento e incompleto della mobilità, durata limitata;

Infezioni, trombosi venose;

Dispositivi inaffidabili e utilizzati solo in breve periodo.



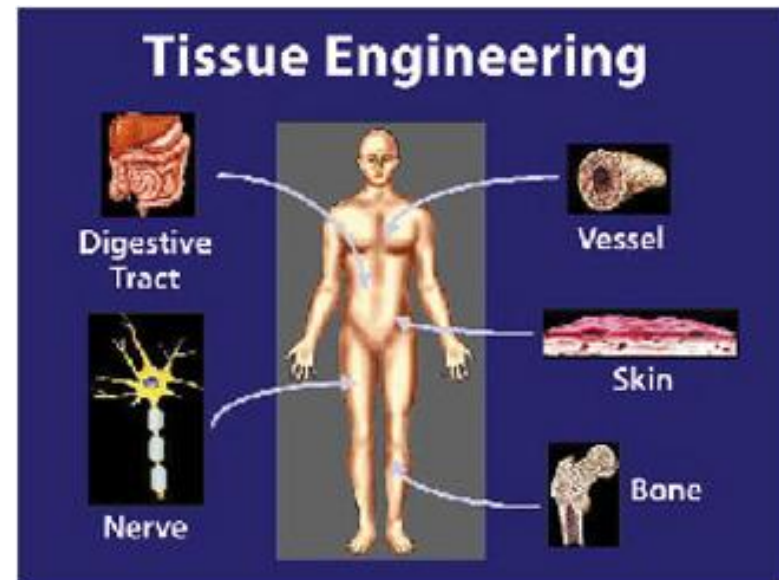
Ingegneria Tessutale

La Tissue Engineering è quel settore interdisciplinare che applica i principi dell'ingegneria e delle scienze che studiano la vita per lo sviluppo di sistemi in grado di restituire, conservare e migliorare le funzioni del tessuto" (Vacanti 1995);

L'Ingegneria Tessutale si pone principalmente il compito di offrire nel campo del recupero d'organi e tessuti danneggiati, un'alternativa all'utilizzo di protesi artificiali ed al trapianto di organi.

Tale scienza combina le conoscenze di 4 discipline:

- Biologia;
- Chimica;
- Medicina;
- Ingegneria.

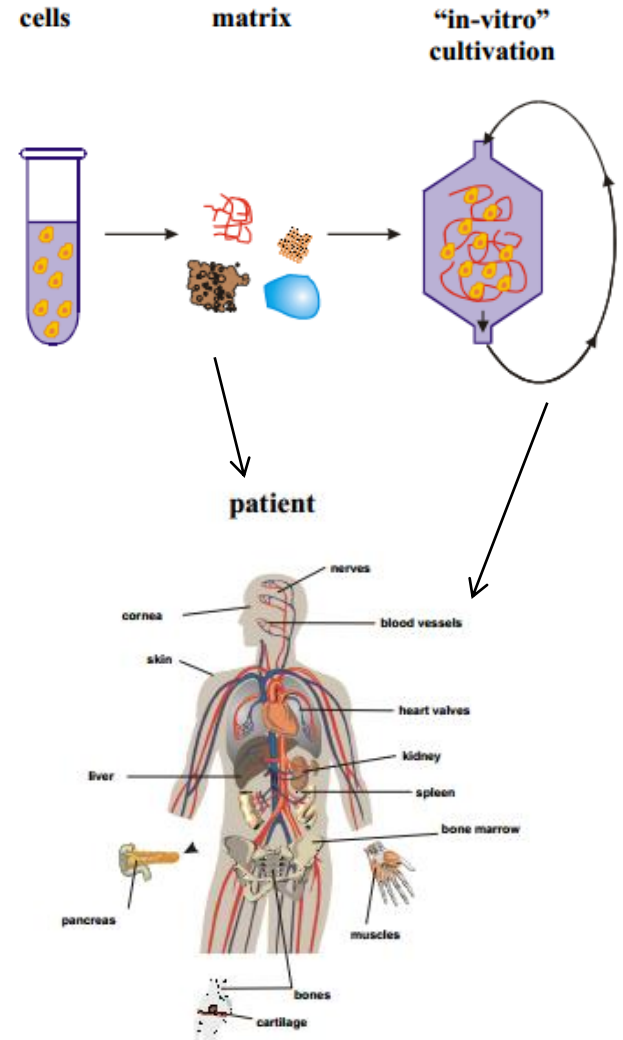


La Tissue Regeneration è quella area dell'ingegneria dei tessuti che è orientata alla ricostruzione dei tessuti mediante l'impiego di strutture di supporto ingegnerizzate costituite da materiali di nuova concezione.

Ingegneria Tessutale

Le strategie seguite dalla *tissue regeneration* sono caratterizzate dalle seguenti fasi di sperimentazione:

- 1. Scelta delle cellule da impiantare:** esse devono essere identificate, isolate e moltiplicate in maniera sufficiente per la proliferazione in vivo;
- 2. Realizzazione di substrati** (sistemi aperti, sistemi chiusi) su cui depositare le colonie cellulari: progettazione dei materiali, della struttura e della geometria;
- 3. Coltivazione in vitro:** le cellule sono uniformemente distribuite sul substrato e lasciate crescere in ambiente fisiologico simulato all'interno di un bioreattore;
- 4. Impianto in vivo:** la struttura ingegnerizzata, carica con le cellule, viene collocata nel sito di interesse al fine di ottenere un'integrazione ottimale con i tessuti circostanti.



Schema rappresentativo delle fasi di sperimentazione che caratterizzano la tissue regeneration

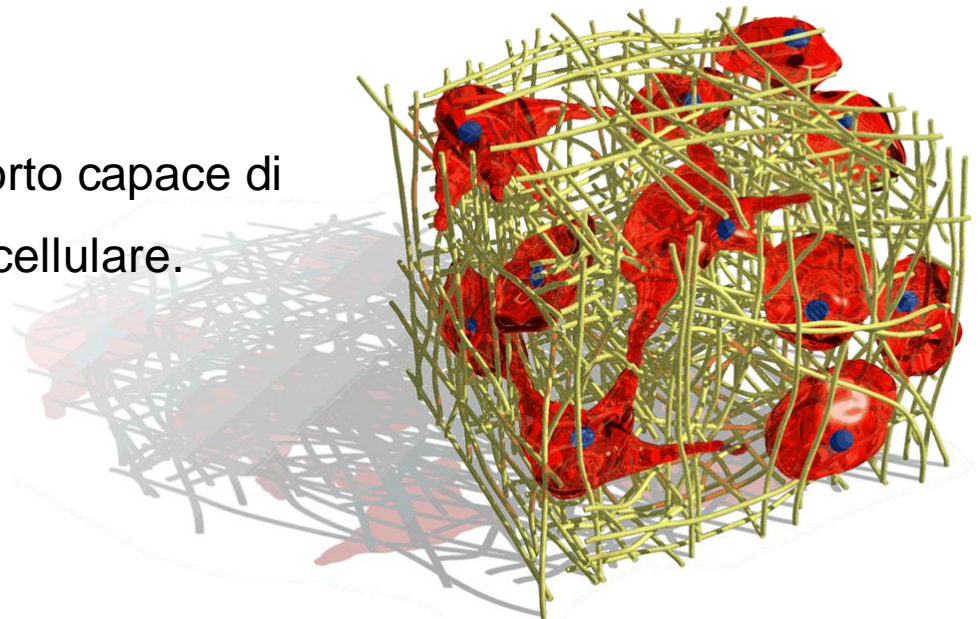
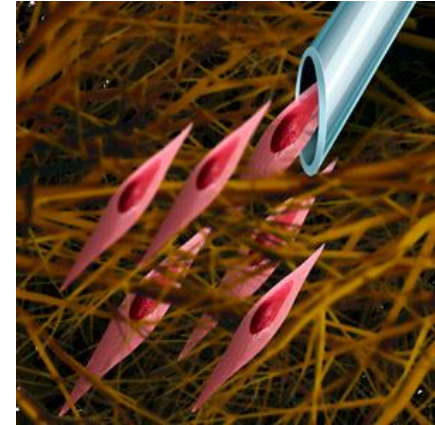
Ingegneria Tessutale

Realizzazione di substrati

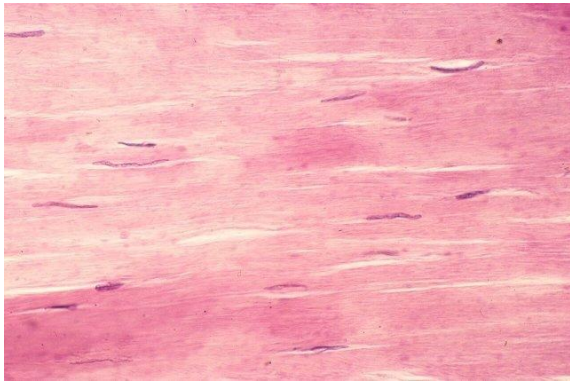
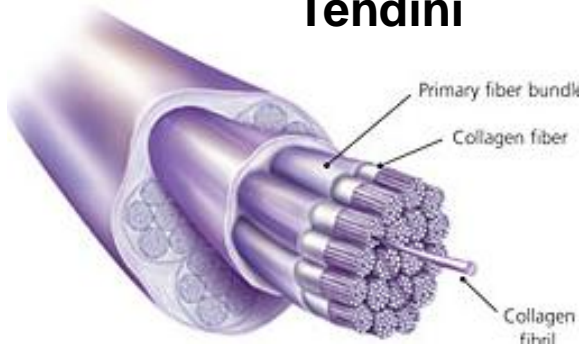
La costruzione di un tessuto ingegnerizzato comincia con la progettazione e la realizzazione di una struttura che supporti la crescita delle cellule che daranno origine al nuovo tessuto.

Scaffold sono caratterizzati da una rete di pori interconnessi in cui si vuole che le cellule impiantate interagiscono direttamente e formino un nuovo tessuto che, una volta degradato il supporto artificiale, risulti strutturalmente ben integrato.

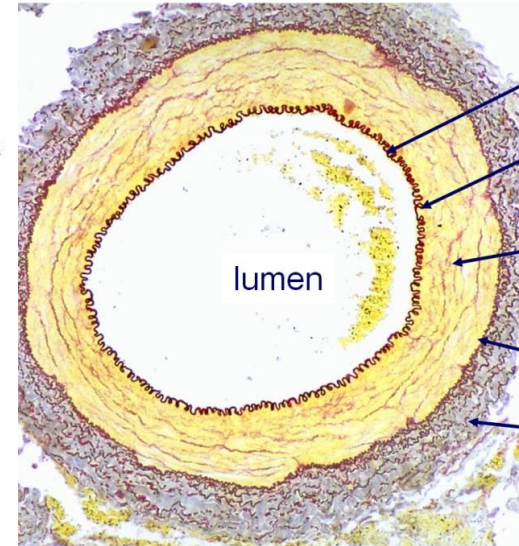
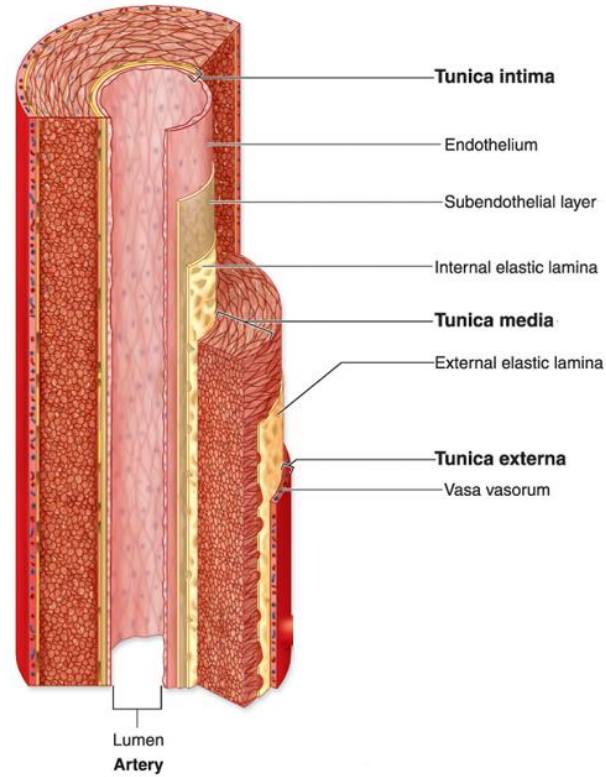
Scaffold è quindi una struttura di supporto capace di guidare la riorganizzazione e la crescita cellulare.



Tendini

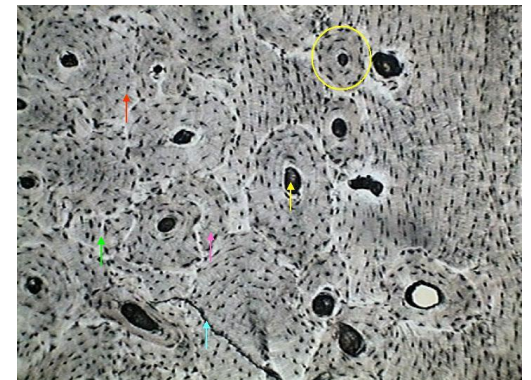
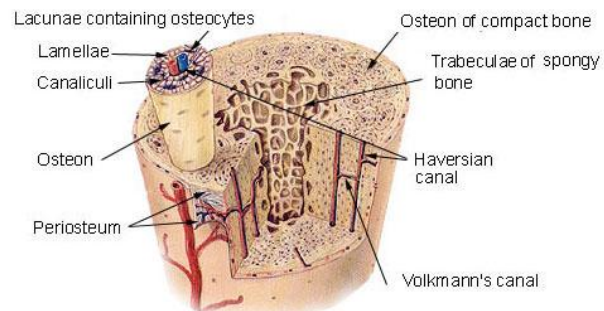


Arterie



Osso

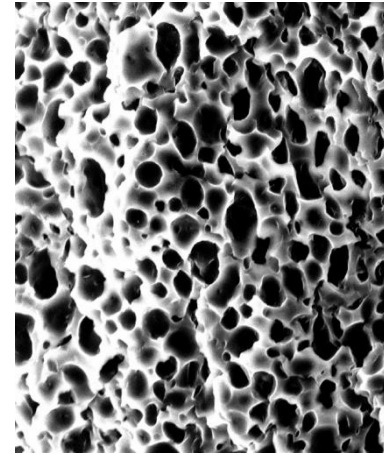
Compact Bone & Spongy (Cancellous Bone)



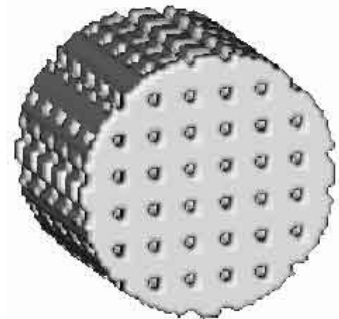
Ingegneria Tessutale

PRINCIPALI FUNZIONI DELLO SCAFFOLD

- Definire e mantenere uno **spazio tridimensionale** adeguato che sostiene il tessuto in via di rigenerazione;
- Incoraggiare la **crescita, migrazione e organizzazione** cellulare
- Facilitare la crescita del tessuto e possibilmente l'inclusione delle cellule e l'inglobamento delle altre sostanze biologiche in esso inglobate;
- Supplire **temporaneamente** alle caratteristiche funzionali di cui il tessuto in formazione risulta deficitario;



Salt-leaching



Solid freeform

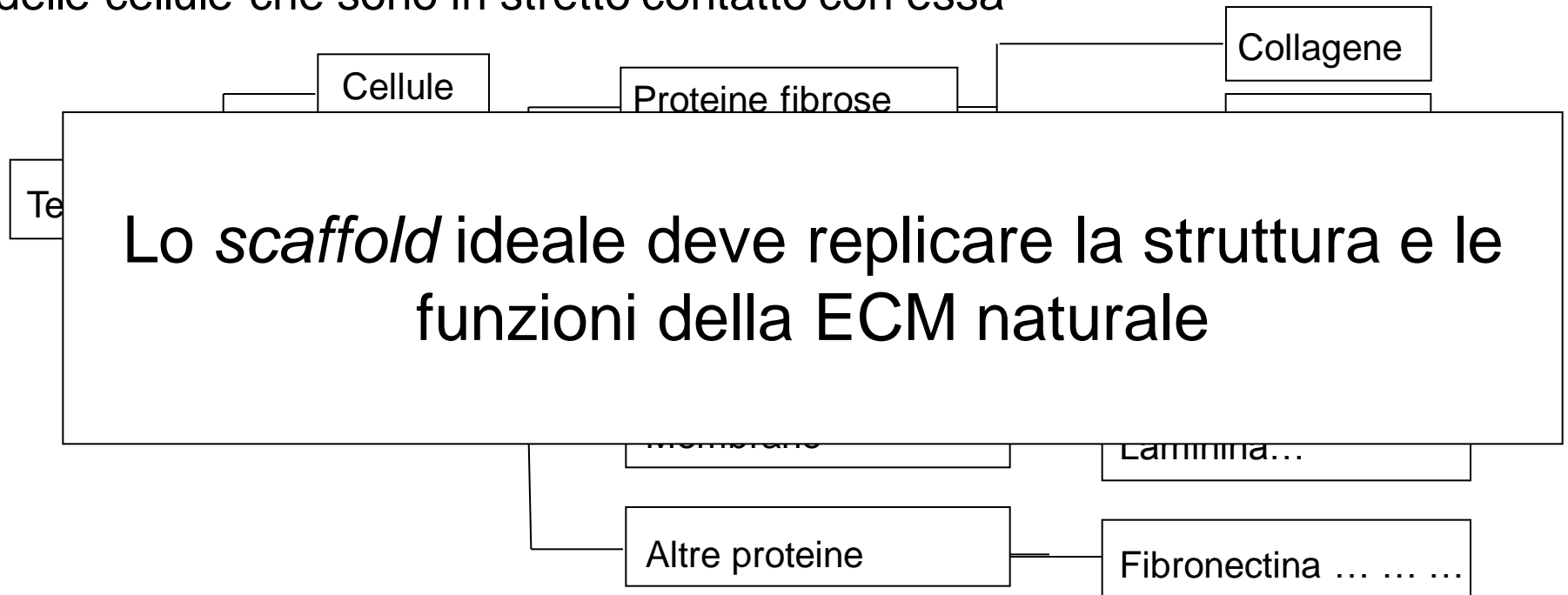
Matrice extracellulare

Che cos'è?

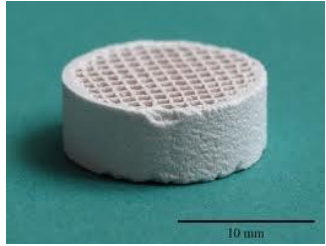
Entità strutturale complessa, formata da un intreccio di *eteropolisaccaridi* e di *proteine fibrose*, che costituisce lo spazio intercellulare.

Funzioni:

- Stabilizzazione strutturale dei tessuti, grazie alla relativa rigidità della sua struttura reticolare a maglie larghe;
- Regola lo sviluppo, la migrazione, la proliferazione, la forma e la funzione delle cellule che sono in stretto contatto con essa



Materiali impiegati



Ceramici

Bioinerti

Bioattivi

[generalmente come additivi (*filler*)]

Polimeri

Sintetici

Naturali

Non degradabili

Degradabili



Materiali impiegati

Differenze tra materiali naturali e sintetici:

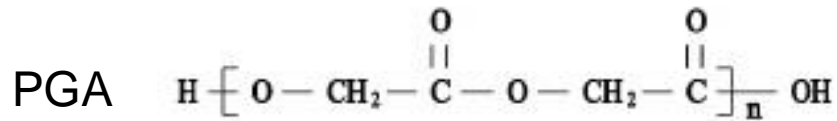
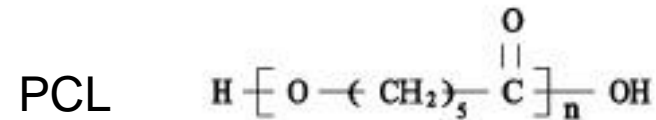
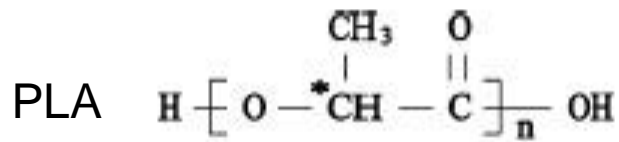
- I **materiali naturali** sono in genere ben tollerati dall'organismo. Alcuni di essi hanno il vantaggio di possedere sequenze per specifiche interazioni cellulari (adesione, proliferazione,...). Sono prelevati da tessuti umani o animali, non sono disponibili in grandi quantità. Inoltre, differiscono notevolmente tra loro dipendentemente dell'organismo da cui sono prelevati (**scarsa riproducibilità**). Infine, i materiali naturali hanno una limitata versatilità nella costruzione di una matrice extracellulare con specifiche proprietà (**bassa lavorabilità**).



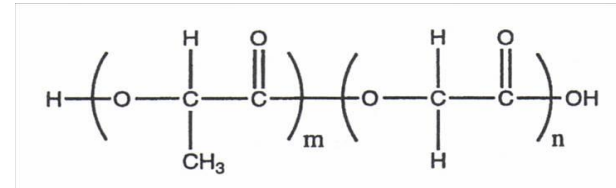
- I **materiali sintetici** possono essere riproducibili su grande scala e possono essere trasformati in una matrice tridimensionale nella quale la struttura principale, le proprietà meccaniche e la velocità di degradazione possono essere controllate e manipolate. Il maggiore svantaggio dei materiali sintetici consiste nella mancanza di segnali specifici per il riconoscimento cellulare.

Materiali impiegati

Materiali degradabili, perdono gradualmente la loro integrità strutturale, con una dinamica che varia da qualche settimana a qualche anno, a seconda dell'interazione fra la loro struttura chimica e l'ambiente che li ospita.



PLGA

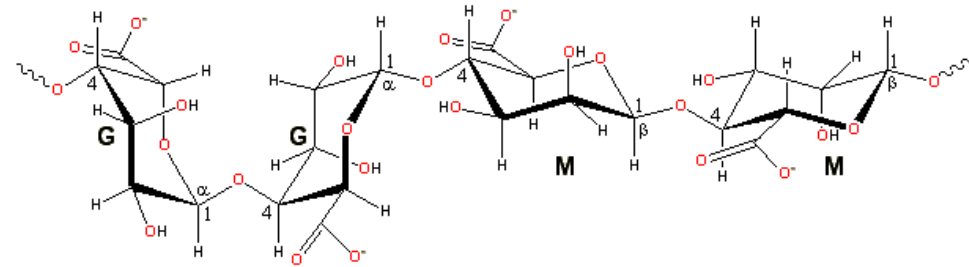
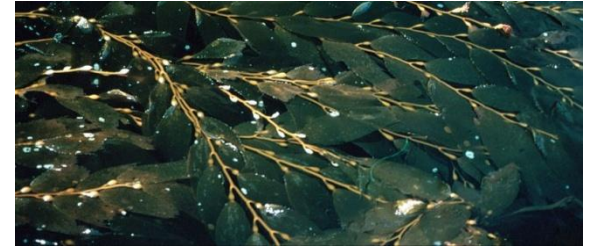


Il **PLA**, il **PGA** ed il **PLGA** sono α -idrossiesteri, ossia poliesteri ottenuti dalla polimerizzazione di α -idrossiacidi. Sono composti biocompatibili e biodegradabili i cui prodotti di degradazione (dovuti ad idrolisi non enzimatica dei legami esteri in ambiente fisiologico) sono composti a basso peso molecolare, quali acido lattico e acido glicolico, che rientrano nei normali percorsi metabolici, infatti vengono normalmente espulsi dall'organismo sotto forma di biossido di carbonio ed acqua. Inoltre, il PLGA presenta un ampio range di velocità di degradazione, da giorni ad anni, a seconda del rapporto dei due monomeri e/o del peso molecolare.

Materiali impiegati

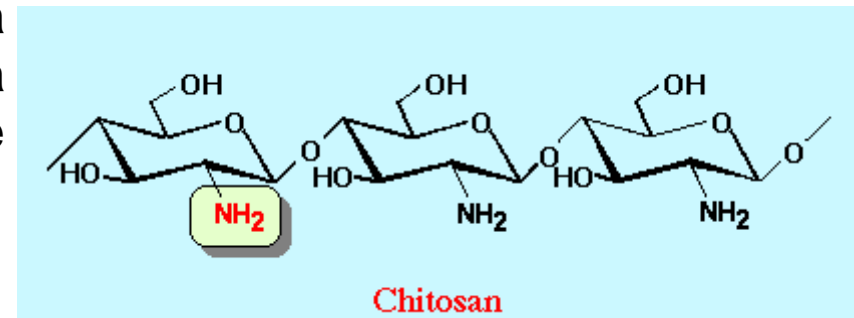
Infine, nell'ambito dei materiali polimerici bioassorbibili sono da includere alcuni polimeri di origine biologica, quali gli alginati, il chitosano, l'acido ialuronico, il collagene.

- Gli **alginati**, sali dell'acido alginico, sono copolimeri a blocchi composti da due unità monosaccaridi: l'acido L-guluronico (G) e l'acido D-mannuronico (M). Le regioni costituite da blocchi di tipo G formano idrogeli in soluzioni acquose di cationi bivalenti (tipicamente calcio) a temperatura ambiente.



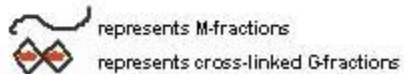
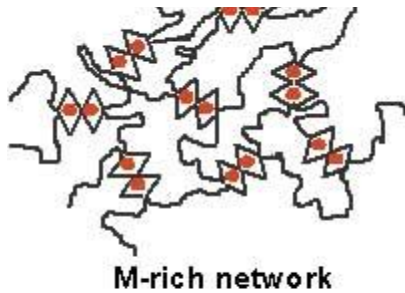
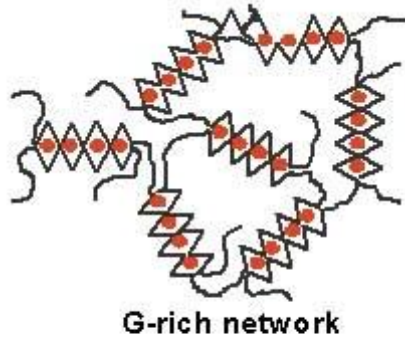
Questa caratteristica è, in genere, sfruttata per incapsulare farmaci, fattori di crescita e/o cellule.

- Il **chitosano** è un polisaccaride derivato dalla chitina e consiste in una unità monometrica costituita da una glucosammina relativamente semplice. E' biocompatibile e biodegradabile.



Materiali impiegati

Alginati



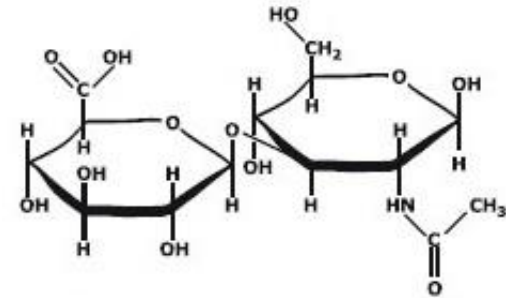
● Cationi divalenti



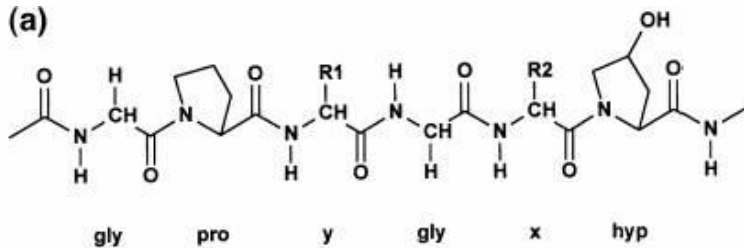
Materiali impiegati



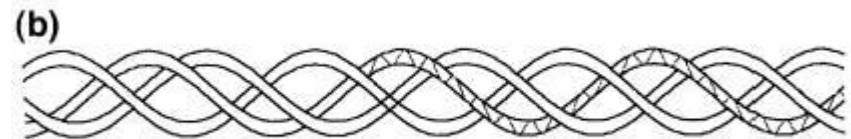
• **L'acido ialuronico** è un polisaccaride lineare composto da unità ripetitive di acido glucuronico e N-acetil glucosammina. E' presente nella matrice extracellulare di tutti i tessuti molli e svolge un ruolo molto importante in parecchi processi biologici, come ad esempio l'interazione cellula-cellula. Tramite una reazione di esterificazione si può ottenere un biopolimero semisintetico con proprietà fisico-chimiche differenti, senza però alterarne la struttura.



• Il **collagene** è un componente naturale della matrice extracellulare di molti tessuti connettivi, quali le ossa, la pelle, i tendini ed i legamenti. Da un punto di vista morfologico consiste in una intricata rete di fibrille dal diametro compreso tra i 50 ed i 500 nm. Da un punto di vista strutturale/molecolare è costituito da sequenze di amminoacidi (principalmente glicina, prolina ed idrossiprolina). Se utilizzato come supporto per la rigenerazione dei tessuti, agevola l'adesione, la proliferazione ed il metabolismo cellulare.

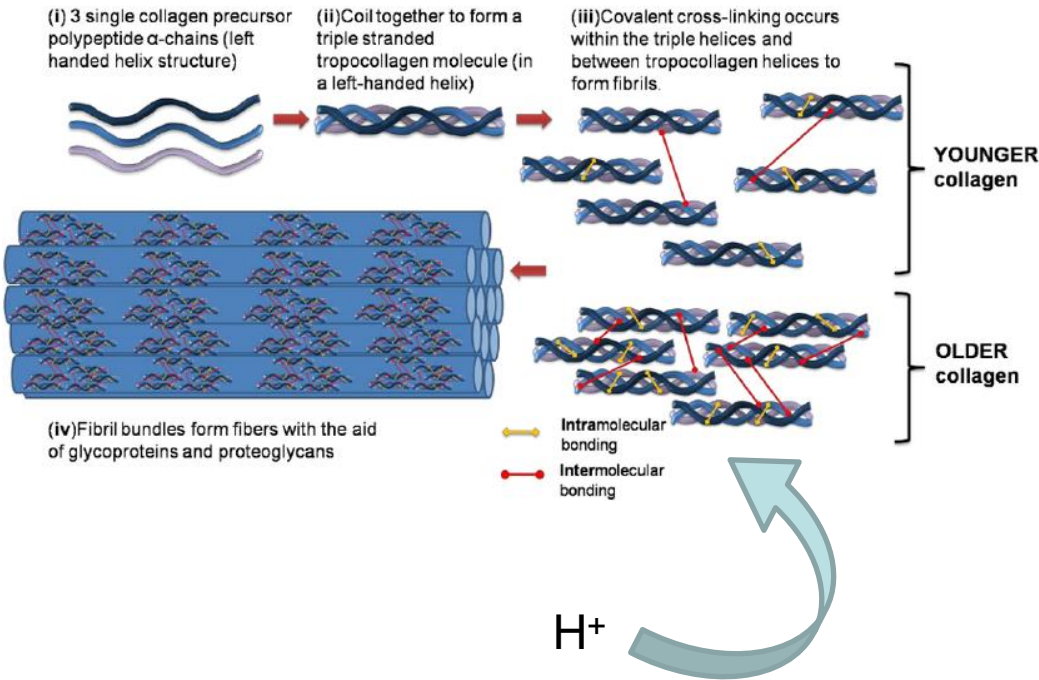


Sequenza primaria degli amminoacidi

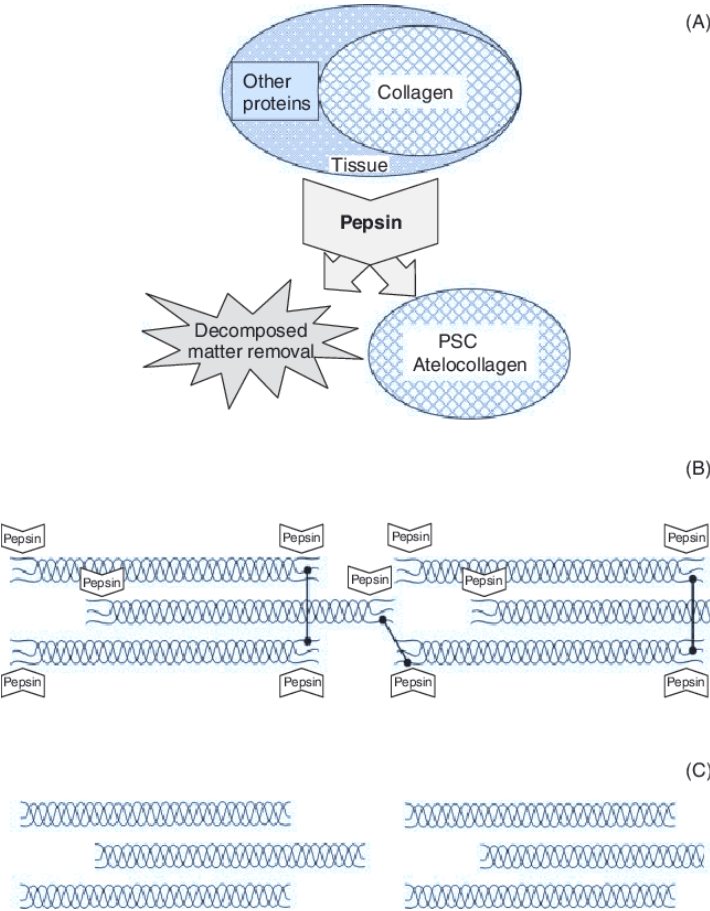


Struttura a tripla elica del collagene

Collagene soluble in acido (acido acetico 0.5M)



Collagene soluble in pepsina



Formazione di scaffold

Struttura

Scaffold fungono da supporto alla crescita cellulare

Proprietà e caratteristiche

- Forma
- Biocompatibilità;
- Biodegradabilità;
- Porosità (geometria e dimensione)
- Proprietà meccaniche;
- Estensione e chimica della superficie;
- Processabilità
- Sterilizzabilità.



- Fiber Bonding;
- Elettrospinning;
- Sinterizzazione microsfeere;
- Gas Foaming;
- Solvent casting - particulate leaching;
- Phase separation;
- Solid Freeform;

Ingegneria Tessutale

Requisiti scaffold

Uno scaffold deve possedere alcune caratteristiche irrinunciabili per essere impiegabile in applicazioni dell'ingegneria tissutale:

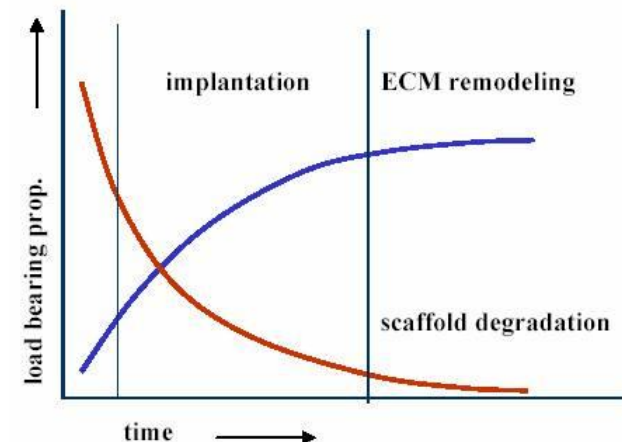
1) BIOCOMPATIBILITA':

Non tossicità unita alla capacità di interagire con la risposta immunitaria dell'organismo prevenendo il rigetto, mitigare la reazione infiammatoria o l'incapsulamento. Essa è determinata da due tipi di compatibilità: quella superficiale e quella strutturale.

Deve inoltre far fronte alla risposta immunitaria dell'organismo favorendo i meccanismi di crescita e sviluppo delle cellule tissutali; in questo senso si parla anche di **bioattività**.

2) BIODEGRADABILITA'-BIOASSORBIBILITA':

Il tempo di degradazione dei materiali che costituiscono l'impalcatura deve essere strettamente coordinato a quello della formazione del nuovo tessuto: la degradazione troppo rapida della matrice non permette la formazione di un tessuto completo e robusto. Tempi troppo lunghi, al contrario inducono invece la formazione di tessuto attorno allo scaffold in modo imperfetto o incompleto;



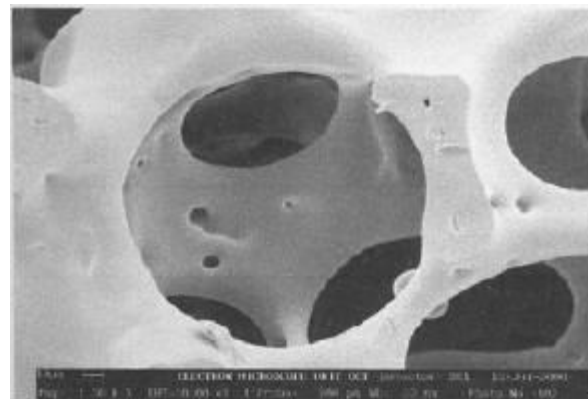
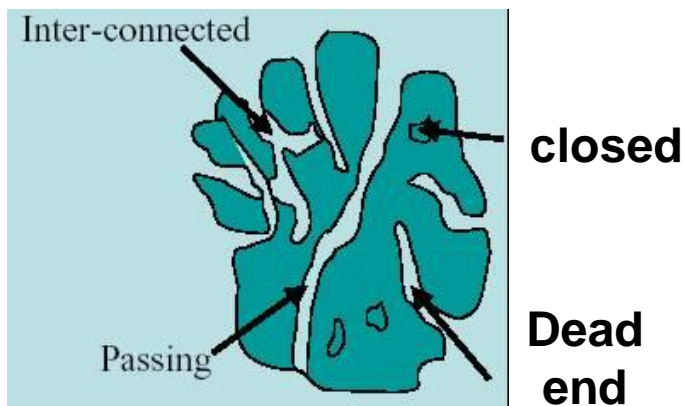
Ingegneria Tessutale

3) MACRO e MICRO STRUTTURA:

Uno scaffold tridimensionale temporaneo che imita le funzioni fisiologiche della matrice extracellulare (ECM) originaria è fondamentale per conservare la capacità delle cellule di rappresentare i loro fenotipi originari differenziati. Un modello di scaffold ottimale deve promuovere la proliferazione delle cellule e la produzione di una matrice, specifica per le cellule, che dovrebbe sostituire il ruolo di supporto dello scaffold dopo la degradazione di quest'ultimo;

4) POROSITA':

Lo scaffold deve essere altamente poroso, con pori aperti e interconnessi, in modo da consentire la diffusione, la penetrazione delle cellule, la loro adesione e proliferazione. Inoltre la porosità deve essere sufficiente alla diffusione delle sostanze nutrienti e alla eliminazione delle scorie.



Ingegneria Tessutale

5) DIMENSIONE DEI PORI:

La diversa natura dell'architettura dei tessuti richiede microambienti differenti per la loro rigenerazione; ciò richiede l'utilizzo di scaffold con una dimensione dei pori ottimale.

- tessuto osseo: 200-400 μm ;
- pelle: 20-150 μm ;
- fegato 45-150 μm .

6) PROPRIETA' MECCANICHE:

Resistenza e stabilità meccanica sufficienti da resistere all'impianto e alle condizioni di carico tipiche delle sollecitazioni presenti nei tessuti *in vivo*.

Proprietà meccaniche adeguate per offrire al tessuto “neo-rigenerato” un “ambiente” con il corretto livello di sollecitazione.

La degradazione degli scaffold deve essere regolata opportunamente in modo che conservi un'integrità strutturale sufficiente affinché il tessuto da poco formatosi possa sostituire la funzione portante che aveva lo scaffold.

Ingegneria Tessutale

7) AREA DI SUPERFICIE E CHIMICA DI SUPERFICIE:

Rapporti elevati tra l'area della superficie interna ed il volume degli scaffolds sono essenziali per ospitare l'elevato numero di cellule richiesto per sostituire o riparare tessuti o organi.

La morfologia e la funzionalità chimica della superficie (proprietà che dipende dal materiale) di quest'ultima sono due fattori importanti che influenzano sia l'attacco delle cellule, la loro migrazione e la segnalazione intracellulare *in vitro*, che il reclutamento cellulare e la cicatrizzazione dell'interfaccia tessuto-scaffold *in vivo*.

8) PROCESSABILITA' (LAVORABILITA'):

Il materiale deve essere facilmente lavorabile assumendo le caratteristiche morfo-dimensionali volute attraverso un processo riproducibile, in modo da garantire il necessario scale-up della tecnologia sviluppata;

9) STERILIZZAZIONE:

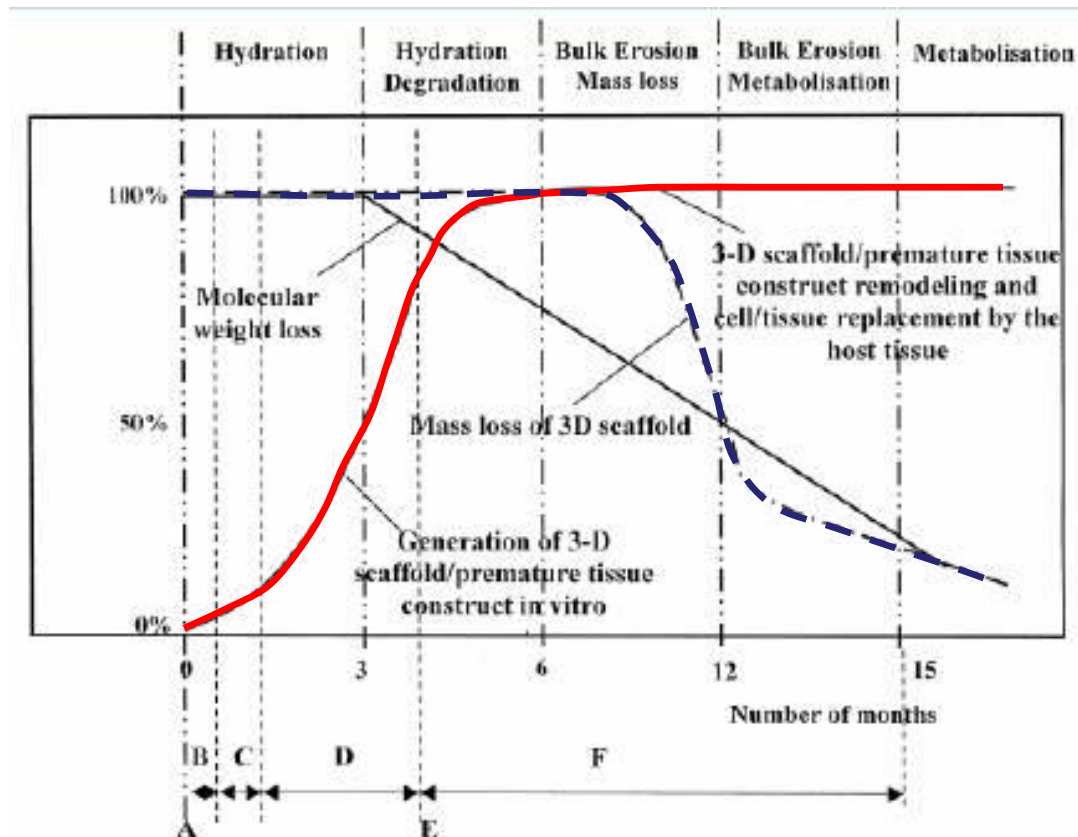
Il materiale deve essere sterilizzabile, ossia resistere senza degradarsi ai processi di sterilizzazione cui deve essere obbligatoriamente sottoposto ogni dispositivo da utilizzare in ambito clinico.

Progettazione di scaffold polimerici

Affinché le proprietà meccaniche dello scaffold risultino strettamente coordinate a quelle proprie del nuovo tessuto, è necessaria l'ottimizzazione del **tempo di degradazione**. Esso viene modulato secondo due principali strategie.

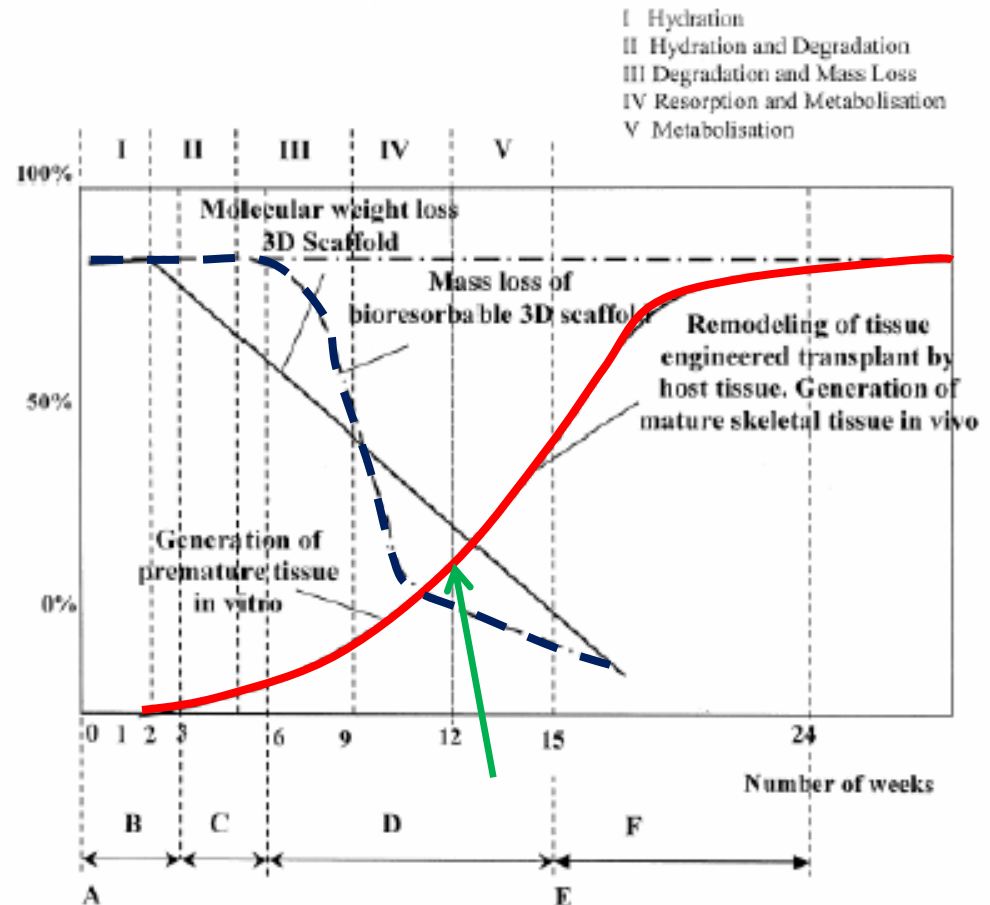
- La prima riguarda compositi polimero/cellule/tessuto nei quali lo scaffold fornisce un supporto dal momento dell'impianto delle cellule fino alla rimodellazione del tessuto da parte dell'organismo, in modo tale che la consistenza meccanica dello scaffold sia garantita finché il nuovo tessuto non sia in grado di autosostenersi, acquisendo il ruolo strutturale che gli compete.

Dal grafico dell'impianto del tessuto osseo con questa prima strategia, si nota come la curva, rappresentante la **degradazione** dello scaffold (diminuzione del peso) comincia a decrescere solo dopo l'impianto ossia a 6 mesi (circa 2 mesi dopo l'impianto chirurgico).



Progettazione di scaffold polimerici

- La seconda strategia, invece, si basa sul presupposto che le proprietà meccaniche intrinseche dello scaffold sostengano la proliferazione e la differenziazione cellulare solo nella fase di crescita *in vitro*. Il supporto è mantenuto fino alla piena maturazione di un tessuto; solo dopo aver raggiunto proprietà meccaniche sufficienti ad autosostenersi, il polimero si degrada e lo spazio lasciato libero viene riempito dalla crescita del tessuto. A sostegno di tali valutazioni dalla figura si può notare come al momento dell'impianto in vivo lo scaffold sia quasi completamente degradato.



Inoltre, esistono una svariata serie di fattori da considerare nella scelta di un materiale per l'applicazione in ambito medico, quali le caratteristiche chimiche e biologiche, l'adesione, la biofunzionalità, etc.

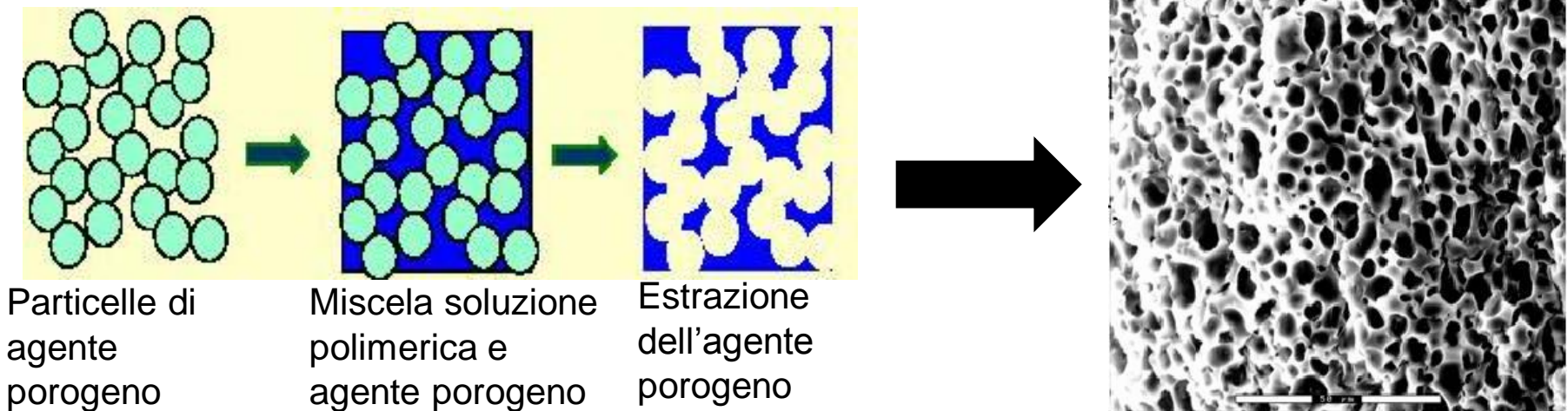
Solvent casting/Particulate leaching

1) Tale tecnologia consta di 2 fasi fondamentali:

1. ***Solvent casting***, la quale richiede la dissoluzione del polimero in un opportuno solvente;

2. ***Particulate leaching***, in cui l'impiego di un opportuno agente porogeno consente di ottenere una porosità tale da favorire i meccanismi di adesione e proliferazione cellulare (porogeno: SALE; ZUCCHERO, GELATINA).

La porosità della struttura e la dimensione dei pori può essere controllata attraverso l'ammontare, la distribuzione spaziale e la dimensione dei cristalli dell'agente porogeno utilizzato.



Solvent casting/Particulate leaching

MATERIALI IMPIEGATI:

- Polimeri biodegradabili quali policaprolattone (PCL), acido polilattico (PLA), acido poliglicolico (PGA) e loro copolimeri.
- Agenti porogeni: sale (NaCl), paraffina, gelatina, fibre solubili, polietileneglicolide (PEG) e zucchero.

VANTAGGI:

- Biocompatibilità;
- Biodegradabilità;
- Elevata porosità interconnessa...;
- Dimensione dei pori idonei alla crescita e proliferazione cellulare;
- Elevato rapporto superficie/volume;

Solvent casting/Particulate leaching

SVANTAGGI

Distribuzione non uniforme delle particelle di porogeno all'interno della soluzione polimerica

Differenza di densità tra la soluzione polimerica liquida e quella del porogeno solido.

Inoltre, la soluzione polimerica e le particelle di porogeno vengono miscelate allo stato liquido cosicché le particelle siano completamente avvolte dalla soluzione polimerica e, quindi, sarà più difficile rimuoverle mediante un semplice lavaggio in acqua.

In aggiunta, dopo la rimozione del solvente per evaporazione o per inversione di fase mediante aggiunta di un altro solvente, sulla superficie dello scaffold esposta all'aria si formerà uno strato, tipo una pellicola, che ostacola la rimozione delle particelle di porogeno e del solvente residuo.



VARIANTE

miscelare direttamente il polimero biodegradabile e le particelle di agente porogeno allo stato solido

Solvent casting/Particulate leaching

2) COMPRESSION MOLDING

differenze nella morfologia della superficie dello scaffold

Stampaggio per compressione della miscela polimero/agente porogeno a elevata temperatura in forme cilindriche. I cilindri così ottenuti vengono tagliati in dischi dello spessore desiderato prima della lisciviazione in acqua. In questo modo si ha un controllo più preciso dello spessore dello scaffold ed aumenta l'uniformità della superficie della schiuma.

3) COMPATTAZIONE POLVERI

Compattazione di particelle di dimensioni confrontabili di agente porogeno e polimero.

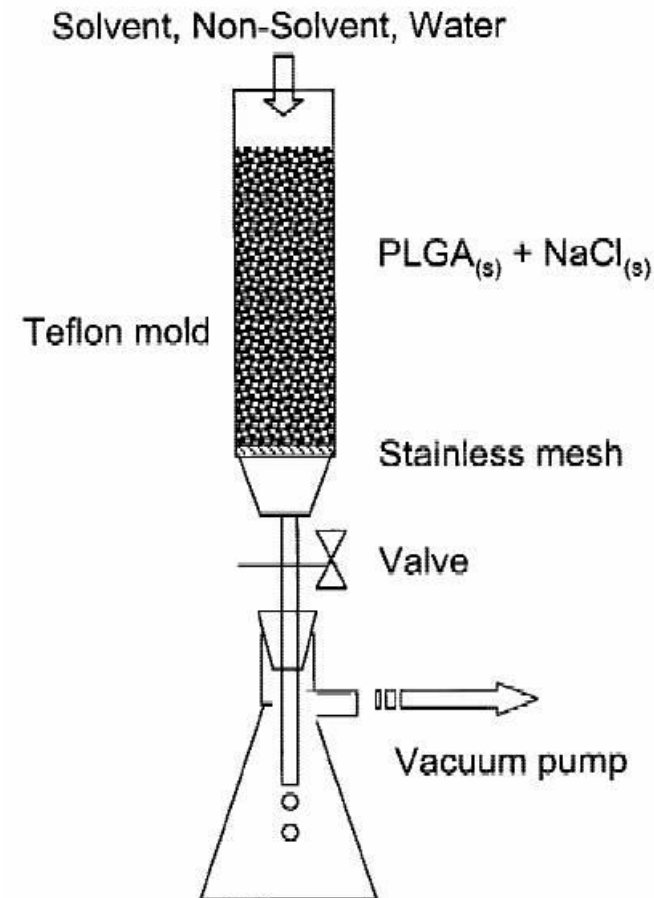
Applicazione del solvente organico per dissolvere le particelle di polimero

Rimozione solvente con pompa da vuoto

Solvent casting/Particulate leaching

ESEMPIO:

- Pellets di PLGA di dimensioni 250-470 μm vengono miscelate a particelle di sale (NaCl) della stessa dimensione a temperatura ambiente all'interno di uno stampo cilindrico in Teflon;
- Lo stampo è collegato ad una pompa da vuoto che deve provvedere alla differenza di pressione necessaria a far fluire il solvente attraverso lo stampo in modo tale da dissolvere la superficie delle particelle di PLGA;
- La pompa, poi, viene accesa in modo da produrre la differenza di pressione tale da assorbire il solvente in eccesso e far coagulare le particelle di PLGA parzialmente dissolte;



- In seguito, viene introdotto nello stampo un non solvente per il composito PLGA/sale in modo tale da far precipitare e solidificare la matrice di PLGA.

Solvent casting/Particulate leaching

- Infine, una grande quantità di acqua distillata viene fatta fluire attraverso la matrice per eliminare le particelle di cloruro di sodio presenti all'interno di essa, il solvente residuo ed il non solvente.
- Il risultante scaffold polimerico poroso viene, infine, tolto dallo stampo ed essiccato sotto vuoto a temperatura ambiente per almeno 12 h.

VANTAGGI:

- Maggiore controllo dello spessore dello scaffold;
- Maggiore uniformità della superficie dello scaffold.

N.B.

La solubilità delle particelle di polimero nel solvente scelto gioca un ruolo fondamentale in questo processo:

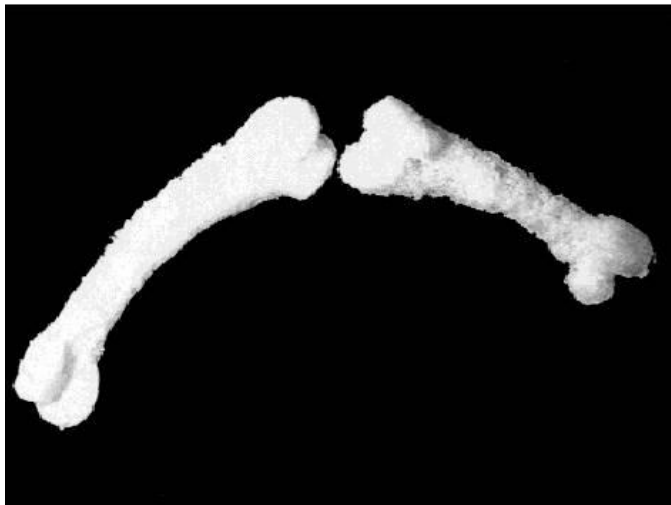
- se le particelle di polimero vengono dissolte troppo velocemente, vi è il rischio che siano estratte dallo stampo a causa della pressione negativa applicata;
- se esse vengono dissolte troppo lentamente, potrebbero non riuscire a fondere totalmente.

Solvent casting/Particulate leaching

In genere, lo spessore degli scaffold ottenuti con la tecnica del solvent casting sono al massimo di 4 mm, invece, con le ultime 2 tecniche è possibile realizzare scaffold di dimensione maggiore.

Infatti, utilizzando uno stampo più grande è possibile ottenere scaffold di diametro di circa 70 mm e spessore di circa 40 mm, continuando ad esibire al contempo una struttura porosa uniformemente distribuita all'interno di tutta la struttura. La porosità totale di tali scaffold è stata misurata essere circa 88% e la dimensione media dei pori di circa 343 μm .

Queste matrici porose così grandi potrebbero essere utilizzate per ritagliare scaffold di forma geometrica più complessa per le varie applicazioni dell'ingegneria tissutale, come ad esempio un modello di orecchio o ossa.



Solvent casting/Particulate leaching

SVANTAGGI:

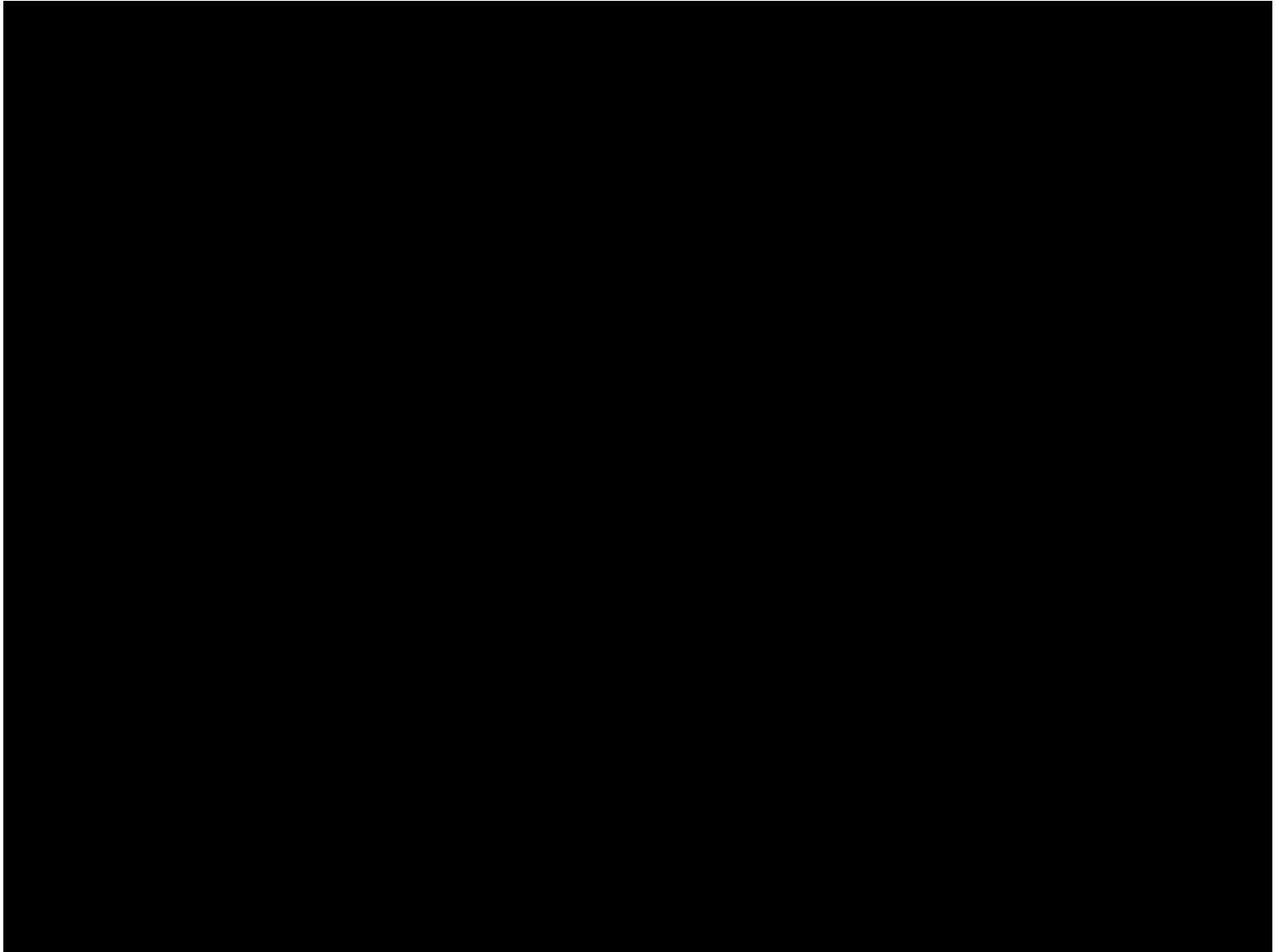
- Utilizzo di solventi organici tossici;
- Tempi lunghi richiesti per la rimozione dell'agente porogeno (giorni o settimane);
- Limitazione a strutture con spessore ridotto per assicurare la rimozione dell'agente porogeno dall'interno della matrice;
- Irregolarità della dimensione dei pori;
- Residui di porogeno solido all'interno dello scaffold;
- Differenze morfologiche tra la superficie dello scaffold esposta all'aria e quella a contatto con lo stampo in cui viene colata la soluzione.

Solvent casting/Particulate leaching

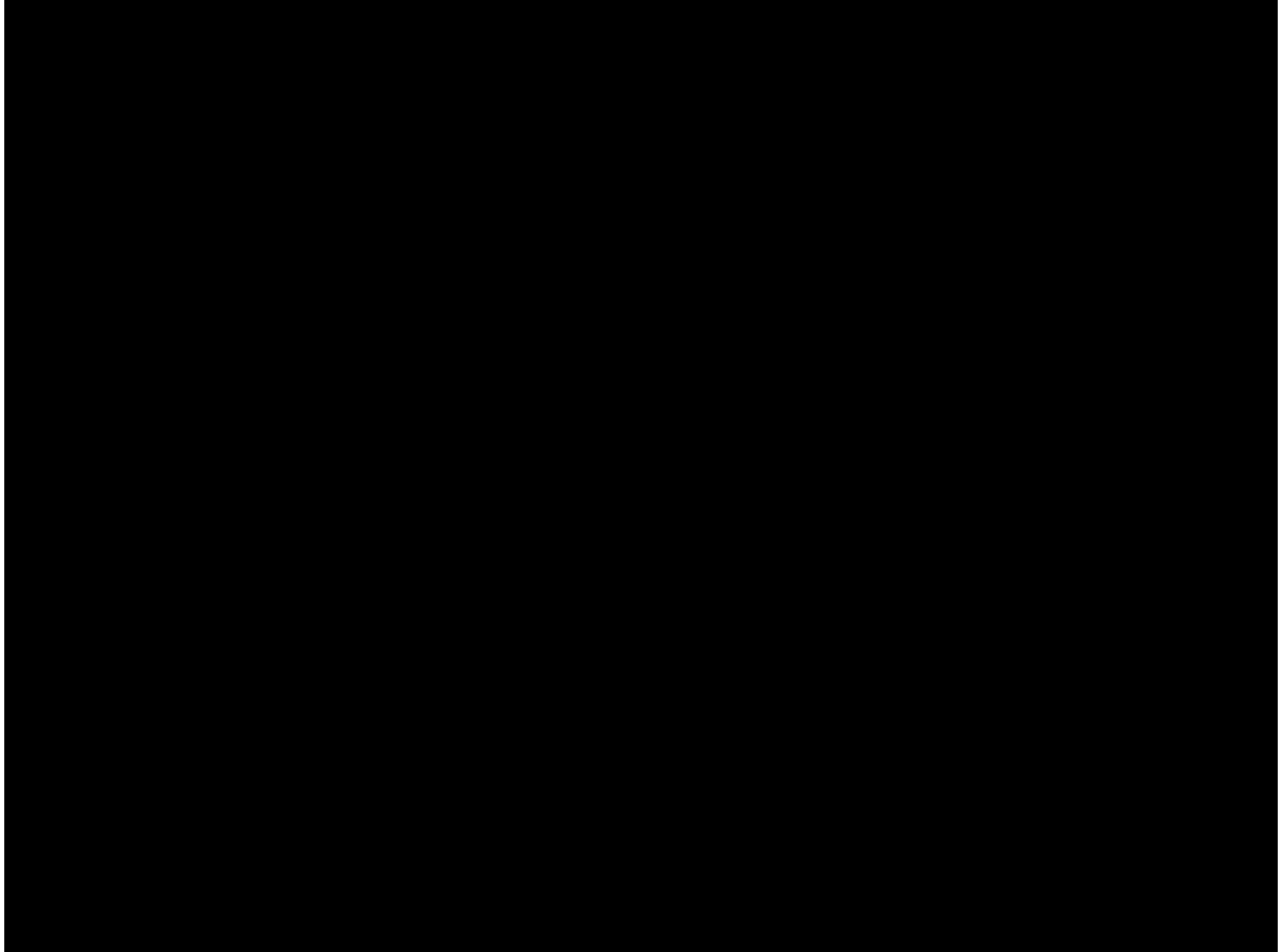
FATTORI IMPORTANTI:

- Cristallinità del materiale;
- Forma;
- Proprietà meccaniche: rinforzi o crosslink;
- Interconnessione dei pori: crystal fusion.
- Bioattivazione: microparticelle o coating

Gas Foaming

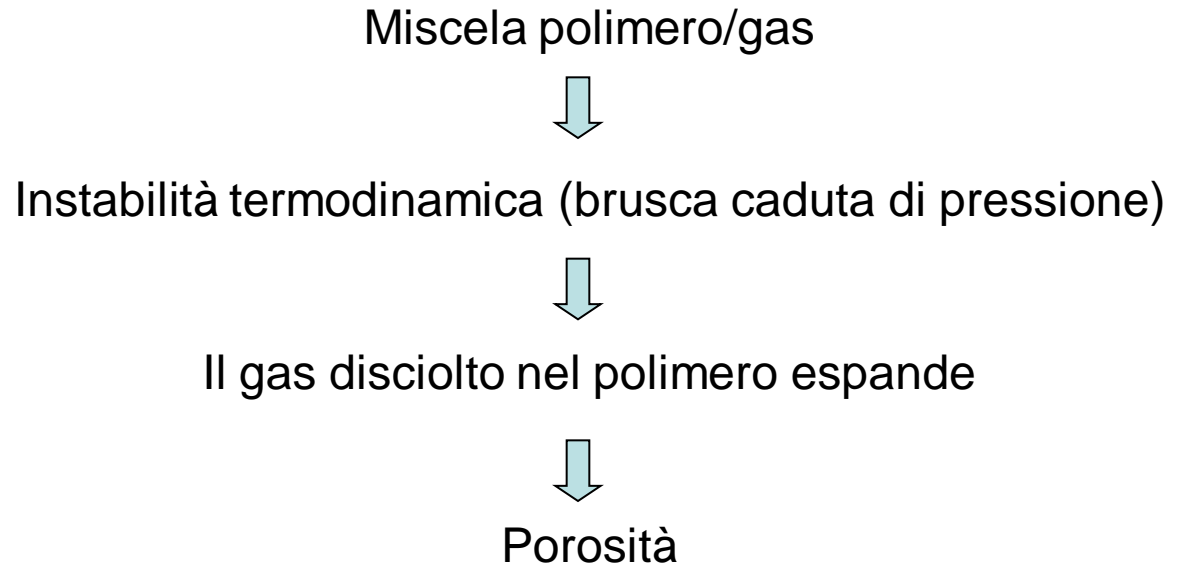
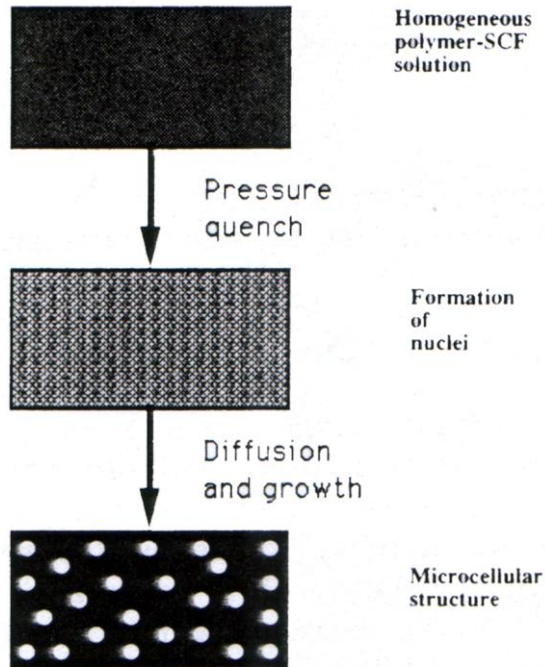


Gas foaming



Gas Foaming

Tecnica che permette di realizzare schiume termoplastiche a celle aperte o chiuse mediante l'utilizzo di gas ad alte pressioni.



Vantaggi:

- Non si utilizzano solventi organici, i cui residui possono risultare tossici;
- Possibilità di operare a T ambiente (fattori di crescita)

Svantaggi:

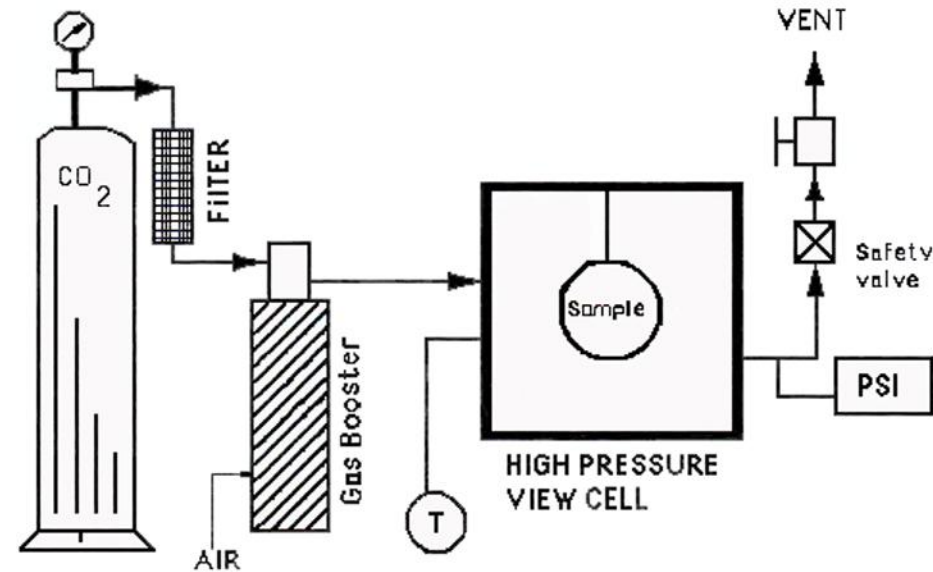
- Possibilità di struttura a porosità chiusa;
- Si può ottenere una struttura a pori aperti dalla combinazione della tecnica del gas foaming con quella del particulate leaching.

Gas Foaming

Impianto batch

I principali elementi di un impianto batch da laboratorio, evidenziati nello schema sopra riportato, sono:

- cella ad alta pressione;
- sistema di pressurizzazione del gas;
- valvola di espansione;
- controllo di temperatura;
- controllo di pressione.



Schema dell'impianto batch da laboratorio

Fasi di processo:

- 1) Fusione del polimero;
- 2) Solubilizzazione del gas nel fuso ad alte temperature e pressioni;
- 3) Realizzazione dell'instabilità termodinamica;
- 4) Nucleazione delle bolle;
- 5) Crescita delle bolle;
- 6) Raffreddamento e conseguente stabilizzazione della struttura.

Gas Foaming

Processo di tipo batch

- Il polimero, dopo essere stato posizionato in un reattore, viene pressurizzato ad alta temperatura con un opportuno gas e per un tempo sufficientemente lungo, dipendente dalla diffusività del gas nel fuso, da permetterne la totale solubilizzazione.
- Si induce un'instabilità termodinamica nel sistema per effetto della rapida caduta di pressione che provoca la smiscelazione del gas e la crescita dell'espanso.

Per un **controllo di un processo** di gas foaming risulta di fondamentale importanza la conoscenza delle seguenti proprietà dei materiali che si vuole utilizzare:

- I. Proprietà termiche del polimero T_m e T_g
- II. Proprietà di trasporto del sistema polimero-gas
- III. Proprietà dell'interfaccia polimero-gas
- IV. Viscoelasticità della soluzione

- Analizzando i processi chimico-fisici connessi al processo di formazione delle schiume termoplastiche a celle aperte è possibile individuare i parametri di processo che permetteranno poi di controllare la microporosità degli scaffold.

Gas Foaming

Conformazione dei pori

Nucleazione e crescita

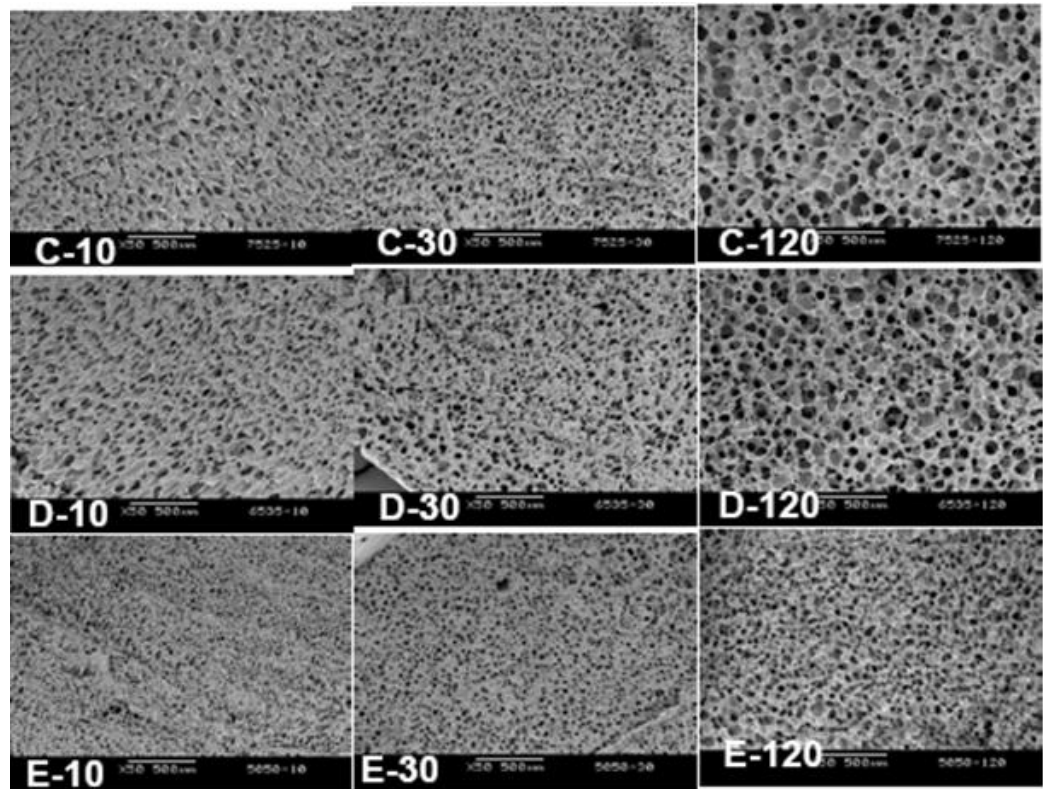
Nucleazione: alte instabilità
(depress. Veloci)

Crescita: coalescenza delle
bolle (depress. Lente, diffusione
del gas, fluidità della matrice)

Il gas solubilizza maggiormente
a basse temperature, ma la sua
diffusione è più bassa



Range di temperature
ottimali per la
solubilizzazione e diffusione
del gas



Tempo di depressurizzazione

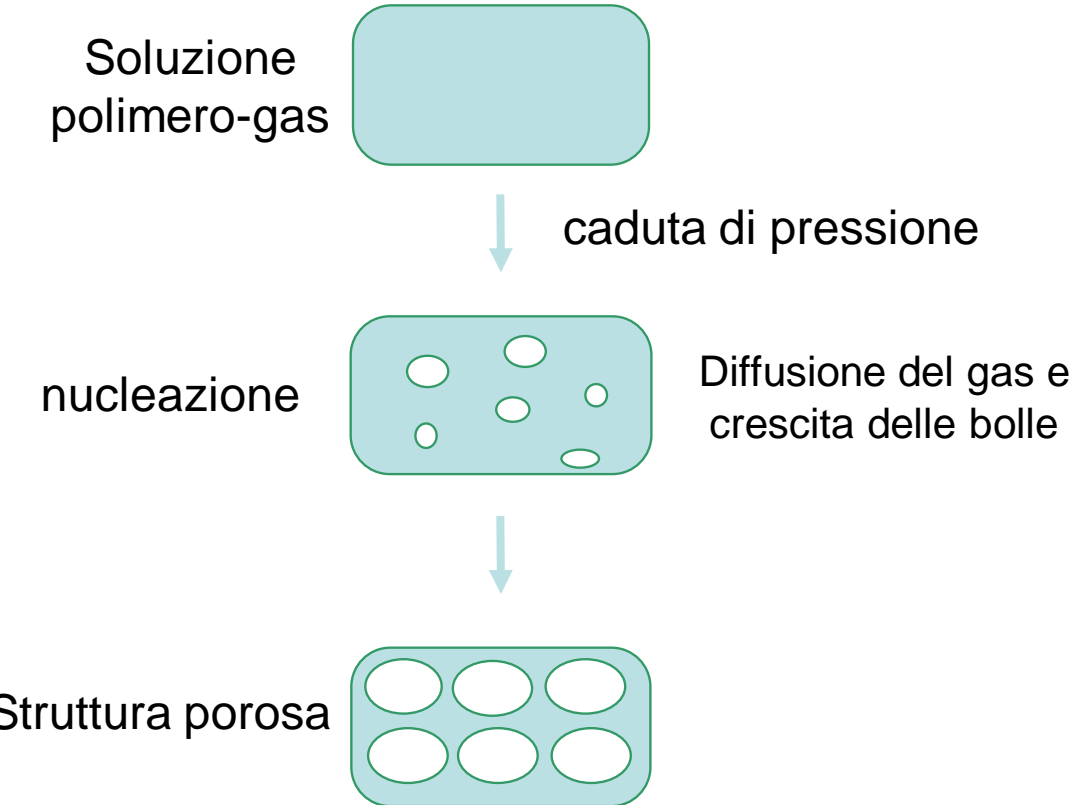
Gas Foaming-Salt Leaching

Principale svantaggio → Struttura a porosità chiusa;

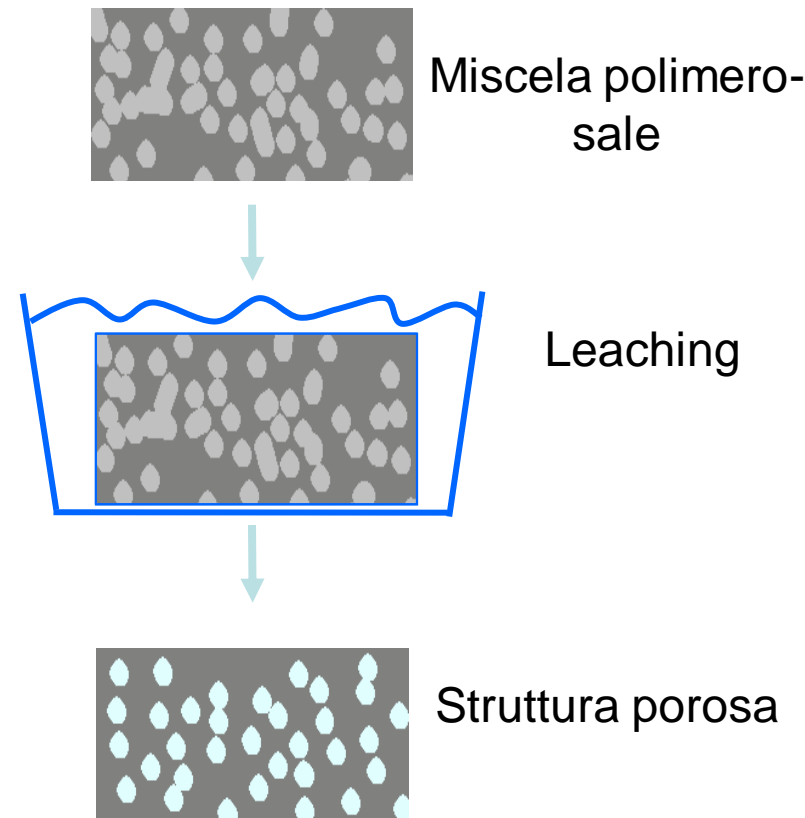
COMBINAZIONE TECNICA DEL GAS FOAMING-PARTICULATE LEACHING

Si può ottenere una struttura a pori aperti dalla combinazione della tecnica del gas foaming con quella del particulate leaching.

GAS FOAMING



SALT LEACHING



Gas Foaming-Salt Leaching: Applicazioni

Realizzazione di scaffold a porosità aperta e controllata senza l'uso di solventi organici tossici.

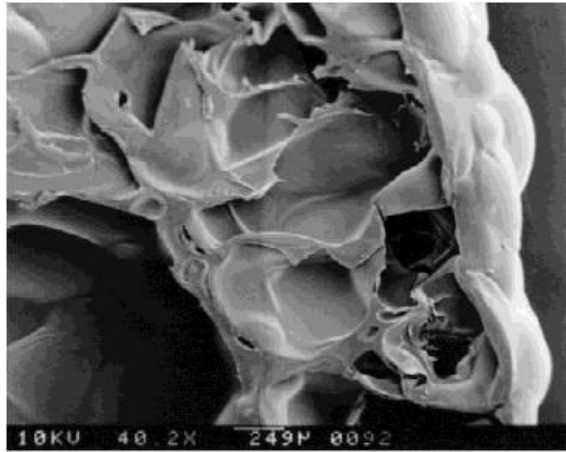
Realizzazione

- I pellets di PLGA vengono miscelati con particelle di NaCl (PLGA/NaCl (wt/wt) 0÷50);
- La miscela di PLGA e NaCl viene caricata in un die fusa e compressa a 1500 psi per 1 min per ottenere un disco solido;
- Il campione viene poi esposto a gas (CO₂) ad alta pressione (800 psi) per 48 h fino a saturare il polimero con il gas;
- Viene creata un'instabilità termodinamica con un decremento di pressione fino a quella atmosferica. Questo porta alla nucleazione e crescita delle bolle di CO₂ all'interno della matrice polimerica;
- Le particelle di NaCl vengono successivamente rimosse lasciando la matrice in acqua per 48 h.

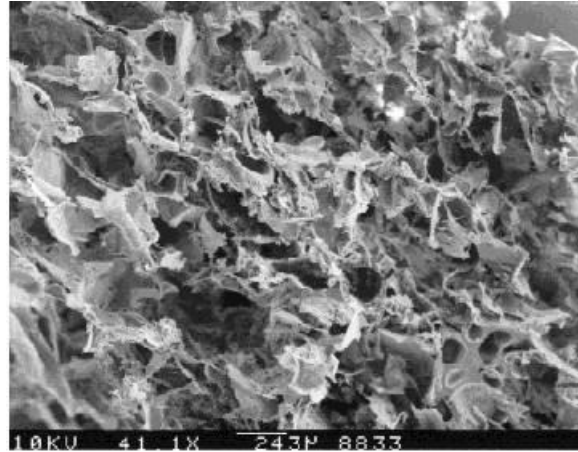
Inoltre vengono realizzate matrici con la tecnica del Solvent Casting-Particulate Leaching e Gas Foaming singolarmente, per confrontarne la morfologia.

Gas Foaming-Salt Leaching: Applicazioni

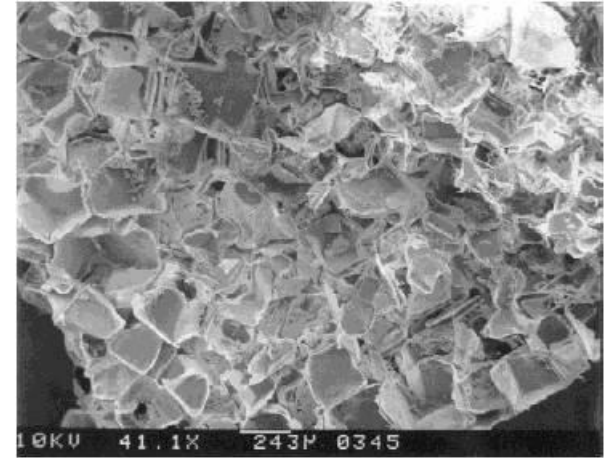
Caratterizzazione Morfologica: SEM



(a) GF



(b) GF-PL



(c) SC-PL

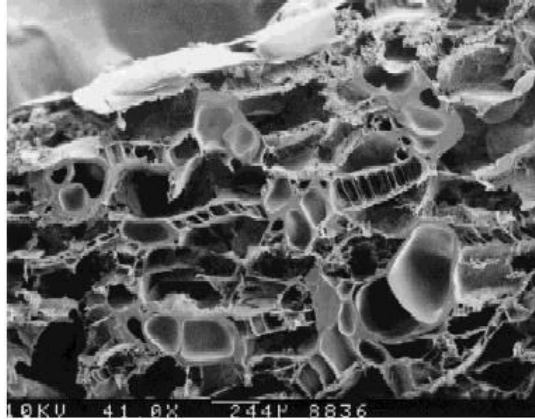
La matrice porosa in fig.(a) ottenuta con la tecnica del gas foaming mostra una porosità elevata ma non interconnessa e la formazione di uno skin esterno chiuso.

La matrice in fig. (b) ottenuta dalla combinazione delle tecniche gas foaming-particulate leaching con un'alta percentuale di sale (95%) con $250 < d < 425 \mu\text{m}$ è caratterizzata da un'elevata porosità interconnessa, senza la presenza evidente di uno skin superficiale non poroso.

La micrografia in fig. (b) risulta molto simile a quella in fig. (c) che riporta una matrice ottenuta con la tecnica del Solvent casting- Particulate leaching, con la stessa percentuale di sale e lo stesso range dimensionale delle particelle di NaCl. Anche in questo caso si osserva una porosità elevata e altamente interconnessa.

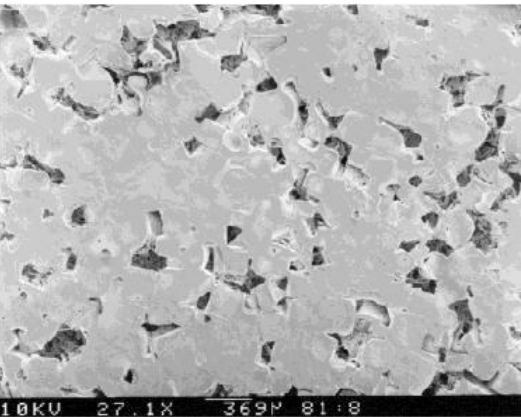
Gas Foaming-Salt Leaching: Applicazioni

Caratterizzazione Morfologica: SEM

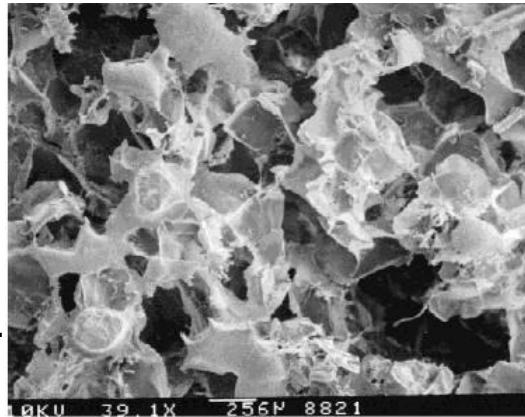


Con la tecnologia combinata del gas foaming particulate leaching si ottengono matrici con un doppio livello di porosità: una macroporosità ottenuta dalla rimozione del sale (PL) e una microporosità ottenuta dalla nucleazione e crescita del gas all'interno del polimero (GF).

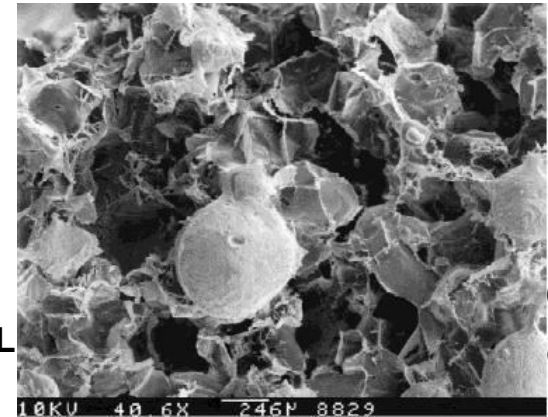
(a) GF-PL



(b)
SC/PL



(c)
GF/PL



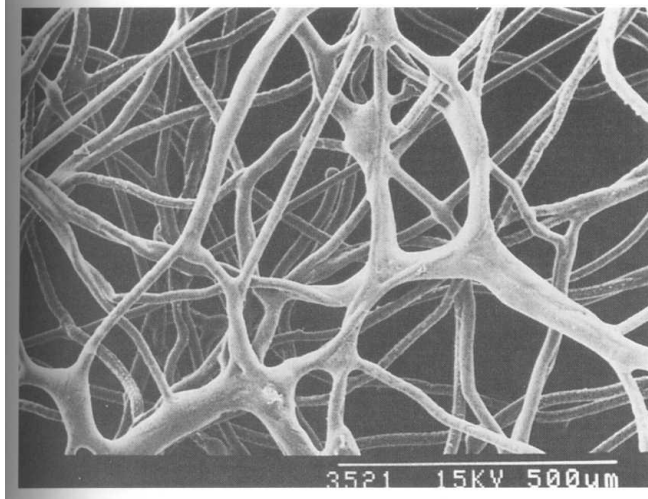
(d)
GF/PL

Le matrici ottenute con la tecnica del SC-PL presentano spesso una struttura non uniforme dovuta all'eventuale intrappolamento del sale all'interno della struttura e alla minore porosità presente ad una delle due interfacce (fig. (b)).

Invece, la struttura dello scaffold ottenuto con GF-PL è uniforme in tutta la struttura della matrice e sulla superficie.

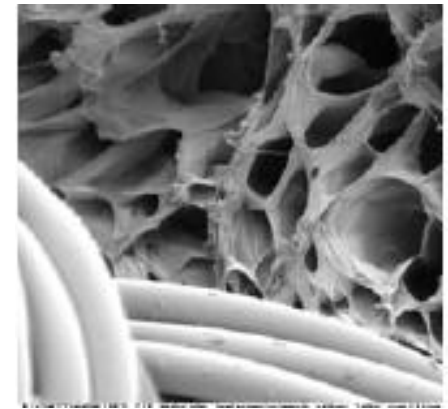
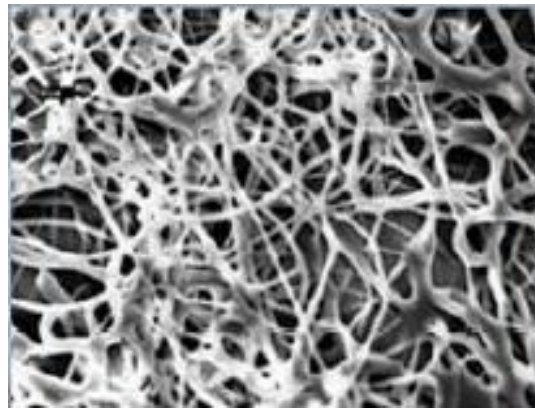
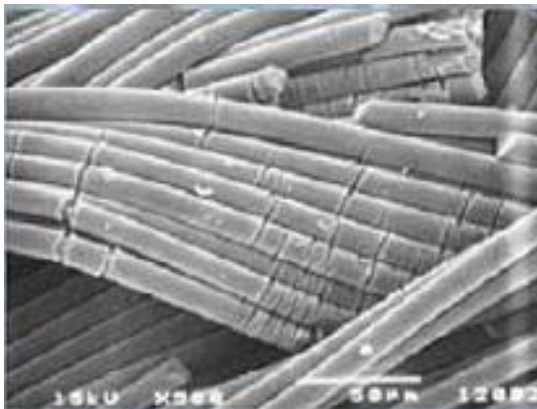
Fiber Bonding

Realizzazione di strutture tridimensionali porose ottenute legando fisicamente fibre adiacenti.



Tali strutture rientrano tra i primi costrutti proposti dalla Tissue Engineering.

Gli scaffold realizzati mediante l'unione di fibre polimeriche biodegradabili assicurano un'ampia area superficiale che favorisce l'adesione e la crescita delle cellule.

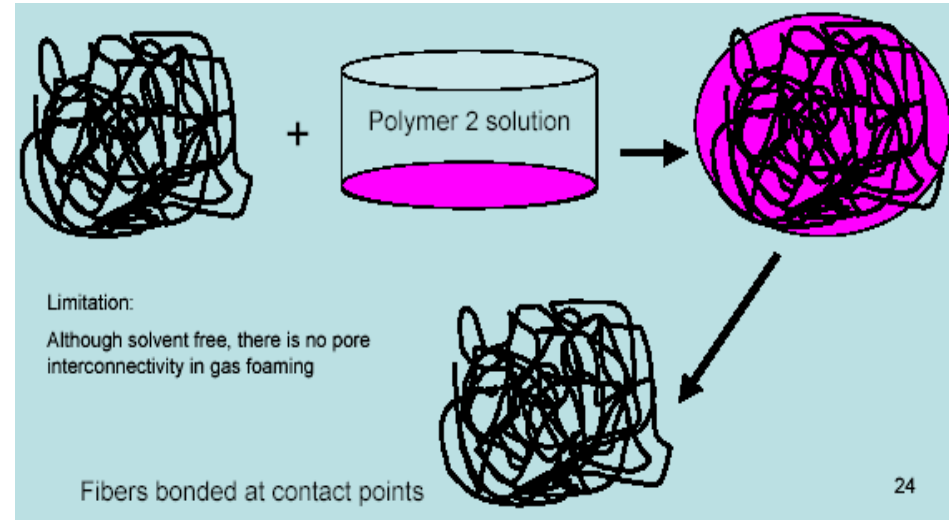


Fiber Bonding

Esistono due tecniche per realizzare il bonding:

1° Tecnica

- Le fibre di PGA vengono immerse in una soluzione di PLLA;
- Evaporazione del solvente;
- Il network di PLLA e PGA viene riscaldato al di sopra della T_m di entrambi i polimeri;
- Il PLLA fonde per primo riempiendo tutti i vuoti lasciati dalle fibre;



24

Sotto l'effetto della temperatura le fibre di PGA si uniscono nei punti di giunzione;

- Il PLLA viene rimosso per dissoluzione in un solvente (non solvente per il PGA) in modo da generare uno scaffold poroso di PGA;

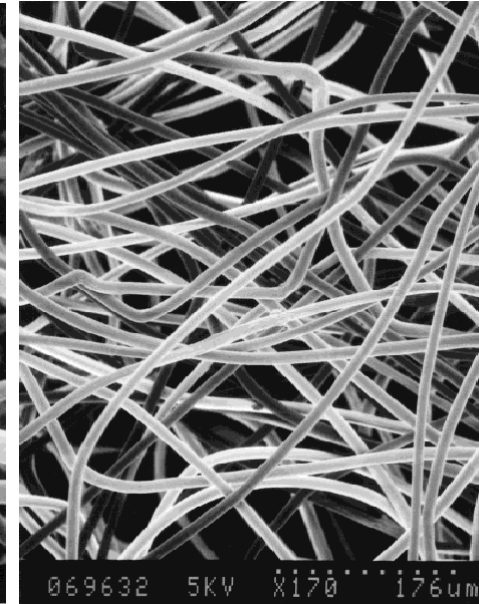
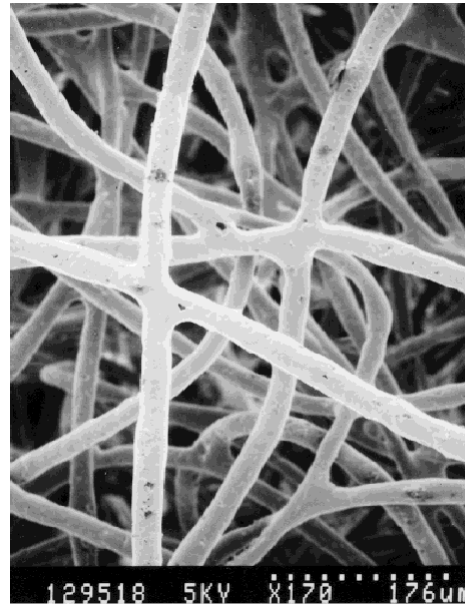
Con questa tecnica è possibile realizzare schiume con elevata porosità (81%) e diametro medio dei pori di 500 μm .

Fiber Bonding

2° Tecnica

Consiste nella nebulizzazione di un polimero (PLLA o PLGA) per rivestire le fibre.

- Il polimero (PLLA o PLGA) viene dissolto in un solvente opportuno (non solvente per il PGA);
- La soluzione polimero-solvente viene spruzzata su una mesh costituita da fibre adiacenti di PGA;
- Il solvente viene rimosso per liofilizzazione in modo da generare uno scaffold costituito da fibre di PGA rivestite di PLLA o PLGA.

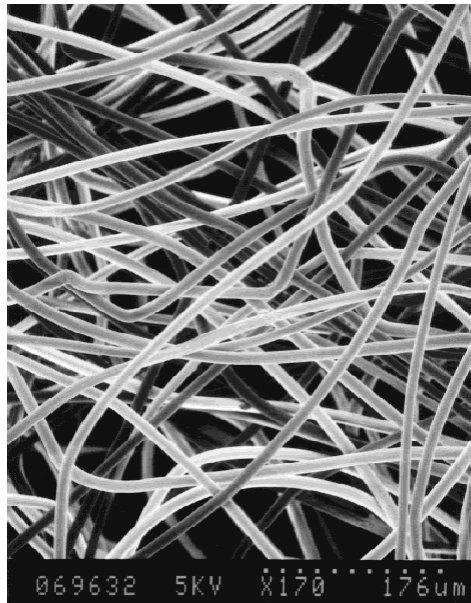


Lo spessore del rivestimento polimerico dipende dal tempo di nebulizzazione.

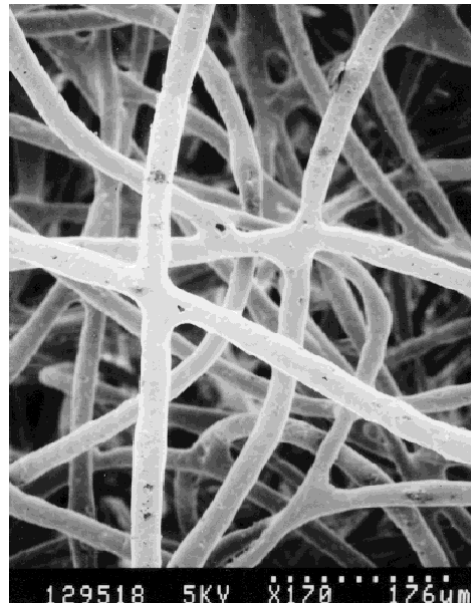
Materiale composito: proprietà meccaniche del core di PGA e le proprietà superficiali del rivestimento di PLLA o PLGA, essenziali per l'adesione e la crescita cellulare.

Fiber Bonding

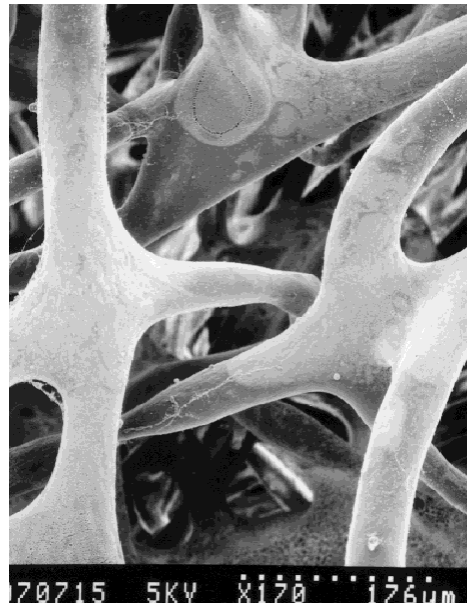
Matrici costituite di fibre di PGA di spessore 3mm e porosità del 97% sono state stabilizzate mediante nebulizzazione di una soluzione di PLLA e cloroformio (5% w/v).



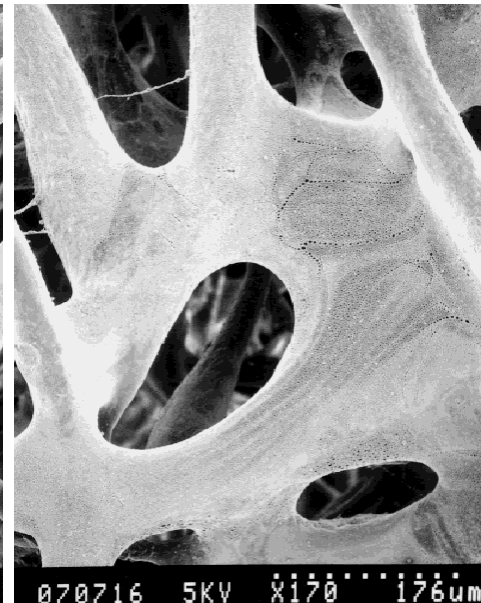
Matrice di PGA



Matrice di PGA nebulizzata
con soluzione
PLLA/cloroformio per 20
sec.



Matrice di PGA nebulizzata
con soluzione
PLLA/cloroformio per 60
sec.

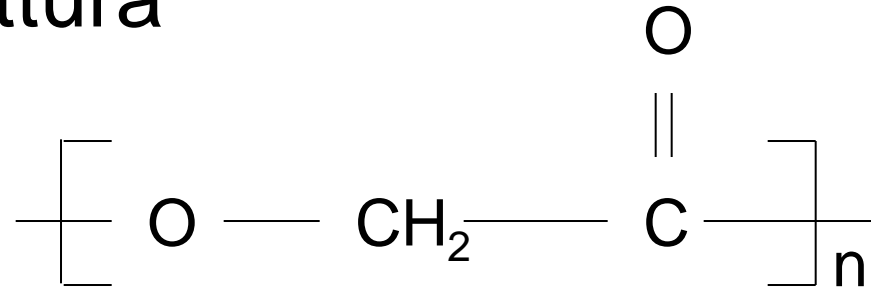


Matrice di PGA nebulizzata
con soluzione
PLLA/cloroformio per 90
sec.

Fiber Bonding: Materiali

Acido poliglicolico (PGA)

- Struttura

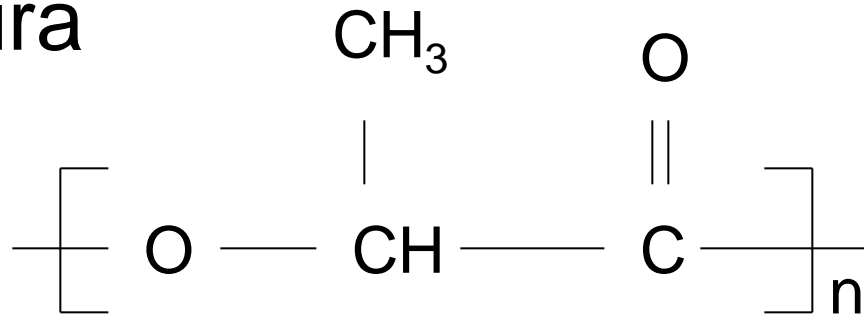


- Cristallinità (46-52%);
- Temperatura di fusione (185-225°C);
- Idrofilico;
- Rapida perdita delle proprietà meccaniche

Fiber Bonding: Materiali

Acido polilattico (PLA)

- **Struttura**



- Cristallinità circa 35%;
- Temperatura di fusione 173-178°C;
- La presenza di un gruppo metile in corrispondenza del carbonio rende il polimero idrofobico;
- Tempo di degradazione superiore a 24 mesi;
- Il PLA ha due forme semicristalline, l-PLA e d-PLA, e una forma amorfa, d,l-PLA

Fiber Bonding: Materiali

PGA, PLA e copolimeri

- PGA e PLA sono semicristallini, i loro copolimeri sono amorfi
- La copolimerizzazione determina variazioni morfologiche che aumentano la velocità di idrolisi e di idratazione;

TABLE 1. PROPERTIES OF BIODEGRADABLE POLYMERS^{27,29,31,32}

<i>Polymer type</i>	<i>Melting point (°C)</i>	<i>Glass trans. temp. (°C)</i>	<i>Degradation time (months)^a</i>	<i>Density (g/cm³)</i>	<i>Tensile strength (MPa)</i>	<i>Elongation, %</i>	<i>Modulus (GPa)</i>
PLGA	Amorphous	45–55	Adjustable	1.27–1.34	41.4–55.2	3–10	1.4–2.8
DL-PLA	Amorphous	55–60	12–16	1.25	27.6–41.4	3–10	1.4–2.8
L-PLA	173–178	60–65	>24	1.24	55.2–82.7	5–10	2.8–4.2
PGA	225–230	35–40	6–12	1.53	>68.9	15–20	>6.9

Fiber Bonding

VANTAGGI

- Elevato rapporto area superficiale/volume ➡ Elevata area superficiale per l'adesione cellulare e la rapida diffusione di nutrienti per la sopravvivenza e la crescita delle cellule.
- Realizzazione di scaffold ad elevata porosità interconnessa idonei alla rigenerazione di organi o tessuti;

SVANTAGGI

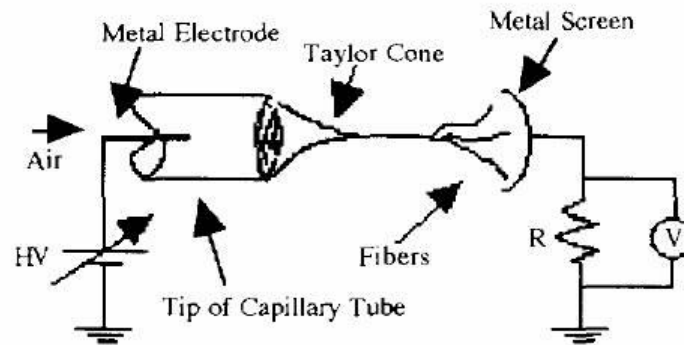
- Utilizzo di solventi tossici;
- La prima tecnica prevede un trattamento ad alte temperature che combinato con l'utilizzo di agenti chimici tossici può essere particolarmente aggressivo per biomolecole presenti nel polimero;
- Basso controllo della porosità e della dimensione dei pori;
- Limitazioni nella scelta dei polimeri utilizzabili.

Elettrospinning

L'elettrospinning è un processo di produzione di fibre polimeriche mediante l'utilizzo di una forza elettrostatica.

A differenza delle convenzionali tecniche di filatura delle fibre (wet spinning, dry spinning, melt spinning, gel spinning, etc.) capaci di realizzare fibre polimeriche con diametro dell'ordine dei micron, l'elettrospinning è in grado di produrre fibre nanometriche.

PRINCIPIO DI FUNZIONAMENTO



Nel processo di elettrospinning viene utilizzata una tensione elevata per creare un getto elettricamente carico di una soluzione o di un fuso polimerico, il quale si secca o si solidifica formando così una fibra polimerica.

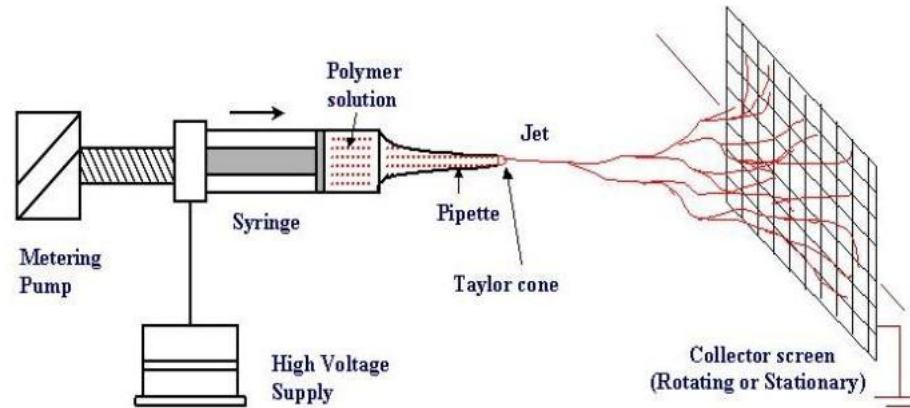
TENSIONE SUPERFICIALE

La repulsione reciproca tra le cariche determina una forza direttamente opposta alla tensione superficiale.

Elettrospinning

Basic Electrospinning Series

Elettrospinning – Strumentazione



- La soluzione polimerica è contenuta in un tubo di vetro, in genere una pipetta connessa con un apparato, per formare un dispositivo tipo una siringa. Al suo interno vi è un elettrodo;
- Vi è una pompa attaccata al pistone della siringa, che deve generare una pressione costante, regolata in modo tale da mantenere la soluzione alla punta del tubo capillare, ma non troppo elevata da far sgocciolare la soluzione scarica;
- La soluzione viene caricata connettendo l'elettrodo metallico ad un generatore di elevata tensione regolato in modo tale da poter funzionare per polarità sia positiva che negativa;
- Come collettore si utilizza uno schermo metallico, disponibile in diverse geometrie. Lo schermo viene montato su un sostegno isolante così che il suo potenziale può essere controllato.

Elettrospinning – Principio di funzionamento

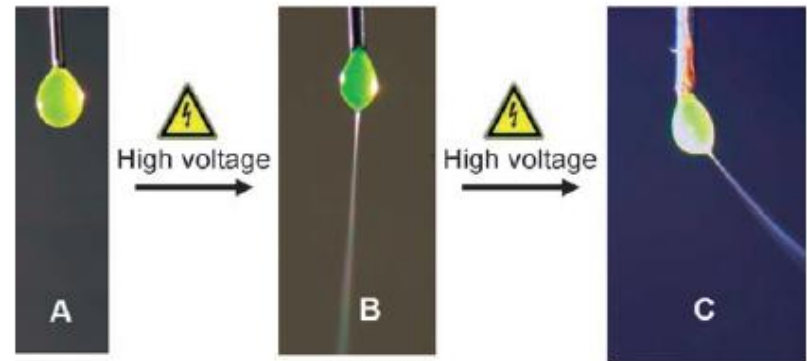
Quando l'intensità del campo elettrico aumenta, la superficie emisferica della soluzione alla punta del tubo capillare si allunga e diventa a forma di cono, noto come il cono di Taylor.

Valore critico INTENSITÀ DEL CAMPO ELETTRICO = la forza elettrica di repulsione supera la tensione superficiale,



un getto carico di soluzione polimerica viene emesso dalla punta del cono di Taylor.

La traiettoria disegnata dal getto, essendo carico elettricamente, può essere controllata dal campo elettrico.



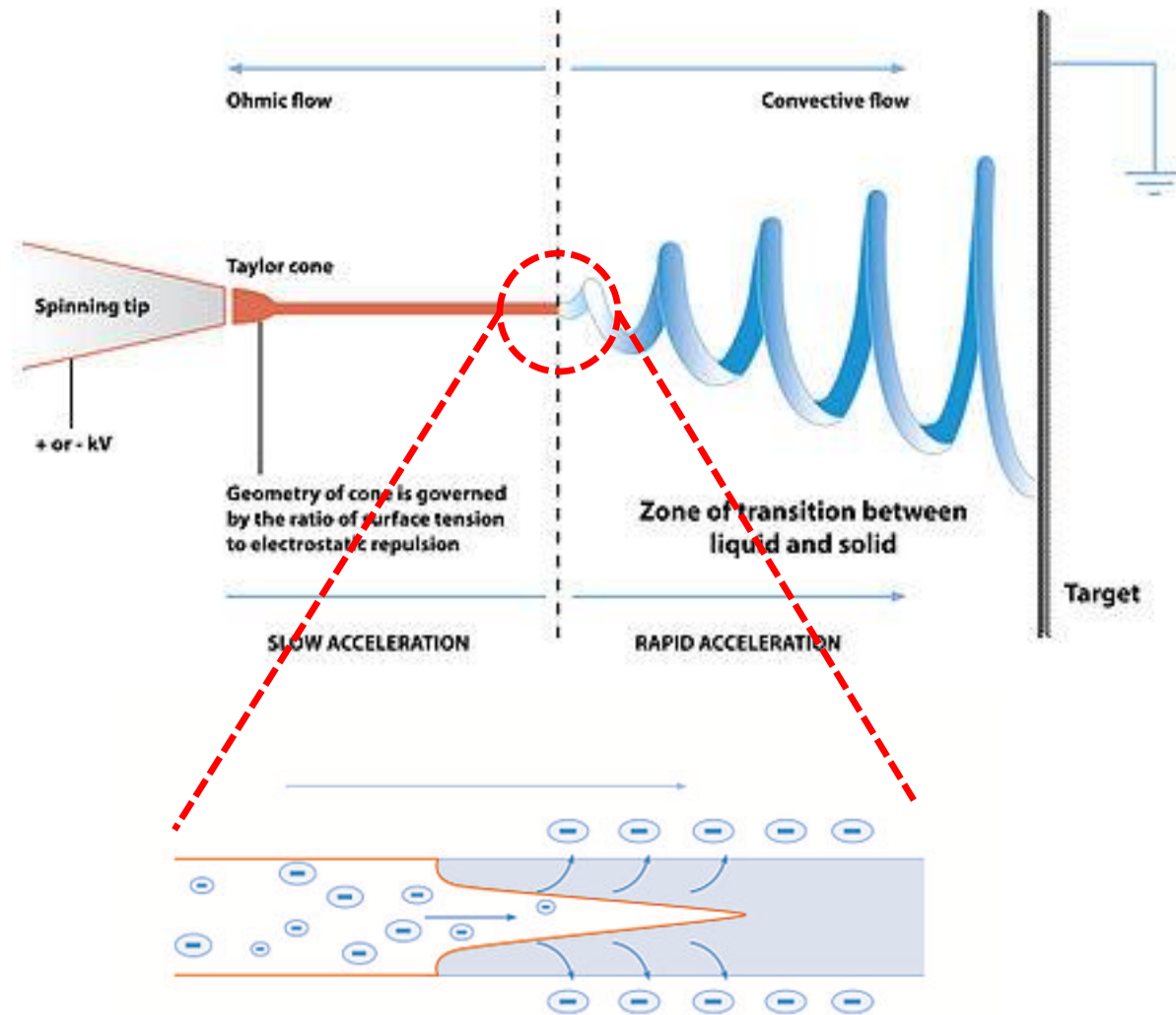
SOLUZIONE: Quando il getto viaggia attraverso l'aria il solvente evapora lasciando, così, una fibra polimerica che si andrà a collocare in modo random su uno schermo metallico collettore.

FUSO: il getto scarico si solidifica viaggiando in aria e si deposita sul collettore metallico sotto forma di fibra.

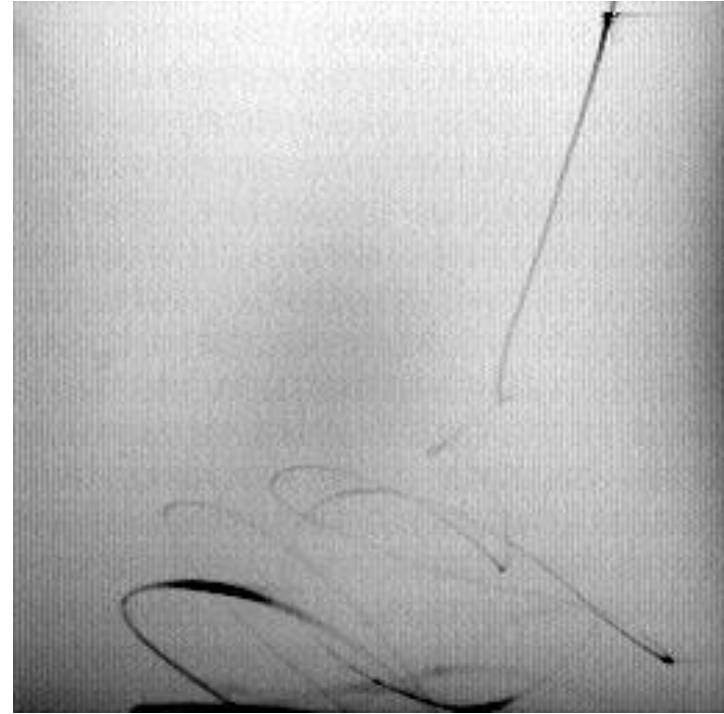
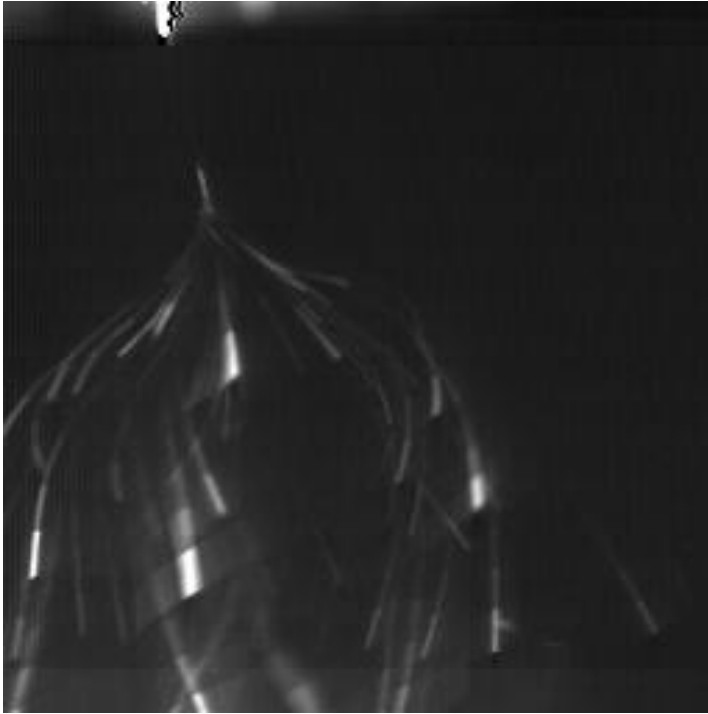
Elettrospinning – Principio di funzionamento



Elettrospinning – Principio di funzionamento



Elettrospinning – Principio di funzionamento



Nella prima animazione è possibile osservare il fenomeno di rottura del getto in getti di diametro inferiore dovuti ad una elevata densità di carica trasportata dal getto.

Nella seconda animazione, invece, è rappresentata la fuoriuscita del getto in modo continuo.

Elettrospinning – Principio di funzionamento

➤ Soluzione polimerica:

Polimero	Solvente	Concentrazione
Nylon6	Acido formico	10% (w/w)
Poliuretano (PU)	Dimetil-formammide(DMF)	10% (w/w)
Polivinilalcol (PVA)	Acqua distillata	4-16%(w/w)
Acido polilattico (PLA)	DMF e Diclorometano (MC)	5-14% (w/w)
Ossido di polietilene (PEO)	Acqua distillata pura o con etanolo,cloroformio,acetone	0,5-30% (w/w)
Collagene	Esafluoro-propanolo	n.d.
Collagene/PEO	Acido idroclorico	1-2 % (w/w)
Polietilentereftalato (PET)	Diclorometano e trifluoroacetico	4 % (w/w)
Polistirene (PS)	DMF,cloroformio,toluene	8-35% (w/w)
PLGA	Tetraidrofurano-DMF(1:1)	5% (w/v)
PCL	DMAc.,MC,metanolo	25% (w/v)

Elettrospinning – Proprietà

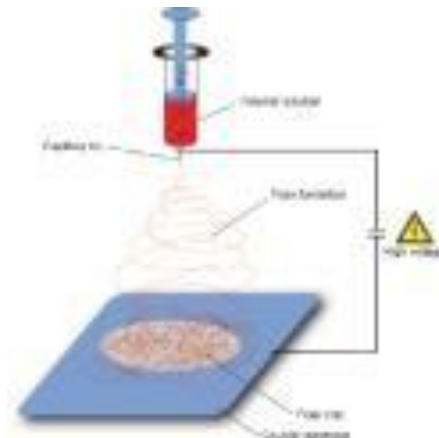
Diametro delle fibre molto piccolo (anche dimensioni nanometriche);

- Elevato rapporto superficie-volume;
- Elevata porosità del tessuto;
- Ampia distribuzione dimensionale dei pori;
- Possibilità di allineamento delle fibre;
- Possibilità di incapsulare piccole particelle insolubili (farmaci o fattori di crescita) all'interno delle nanofibre;
- Le cellule seminate su tali tessuti non-woven sono in grado di mantenere la loro forma e guidare la crescita in accordo con l'orientazione delle fibre;
- La struttura del tessuto presenta una morfologia simile alla matrice extracellulare del tessuto nativo.

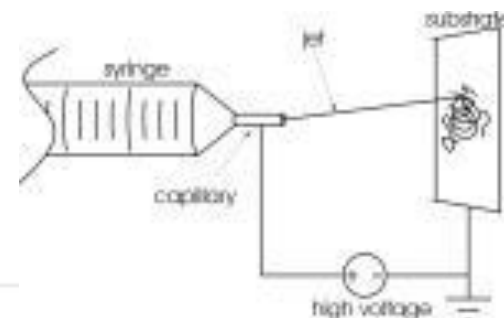
Elettrospinning – Setup strumentazione

Il tubo capillare può essere disposto secondo diverse configurazioni:

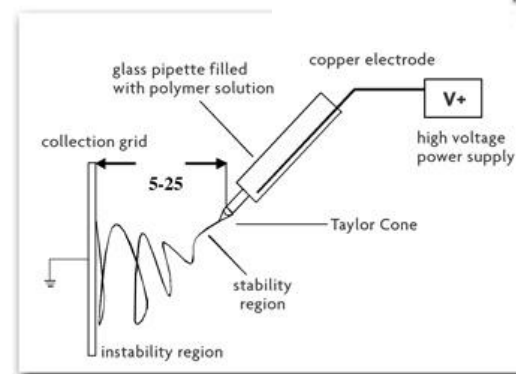
- **Perpendicolarmente**, in questo modo il fluido polimerico scende dal tubo con l'aiuto della forza gravitazionale e si colloca sul collettore sottostante;



- **Orizzontale**, in questo caso viene utilizzata una pompa per promuovere la fuoriuscita della soluzione polimerica;



- **Inclinato**, ossia il capillare definisce un angolo preciso per controllare il flusso.



Elettrospinning – Parametri

PARAMETRI DEL SISTEMA

- Peso molecolare del polimero e sua distribuzione;
- Architettura del polimero (lineare, reticolato, etc.);
- Proprietà della soluzione polimerica (viscosità, densità di carica e tensione superficiale). In particolare, la soluzione deve avere una tensione superficiale abbastanza bassa ed una densità di carica e viscosità abbastanza elevate da evitare che il getto collassi in goccioline prima dell'evaporazione del solvente;

PARAMETRI DI PROCESSO

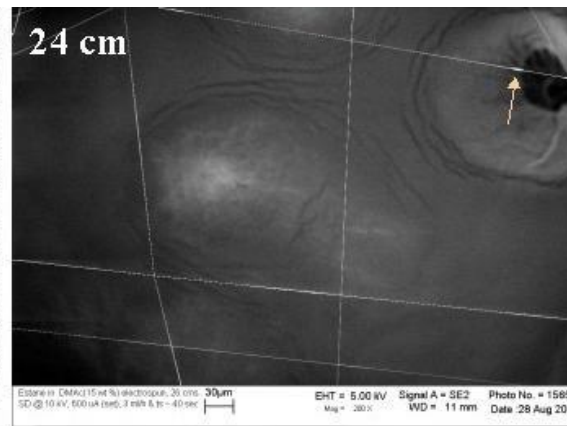
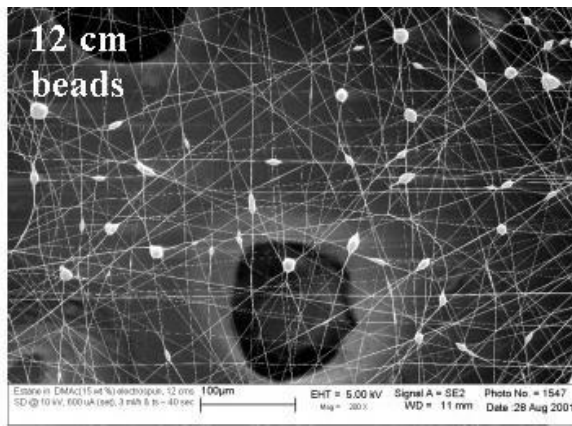
- Potenziale elettrico;
- Velocità e concentrazione del flusso;
- Distanza tra il capillare e lo schermo collettore;
- Parametri ambientali (temperatura, umidità e velocità dell'aria nella camera);
- Moto eventuale dello schermo collettore.

Elettrospinning – Parametri

ESEMPIO – effetto della distanza elettrodo collettore

- Soluzione polimerica a diverse concentrazioni: 15-25% (w/w);
- Tensione: 10-15 kV;
- Distanza tra il capillare e lo schermo: 12-27 cm;
- Velocità del flusso: 3-7 ml/h.

Aumentando la distanza tra il capillare e lo schermo (mantenendo tutti gli altri parametri costanti), diminuisce il diametro delle fibre.



Dalla micrografiasi può notare che, alla minore distanza, la presenza di **bead** (granelli), dovuti alla rottura del getto a causa della tensione superficiale della soluzione.

- Soluzione al 15%;
- Tensione di 10 kV;
- Velocità flusso 3 ml/h.

Elettrospinning – Parametri

BEADS

Sono dei granuli dovuti alla rottura del getto a causa della tensione superficiale della soluzione. Per questo motivo, la densità di carica trasportata dal getto, la tensione superficiale e le proprietà viscoelastiche della soluzione sono dei parametri fondamentali che vanno controllati per la buona riuscita del processo.

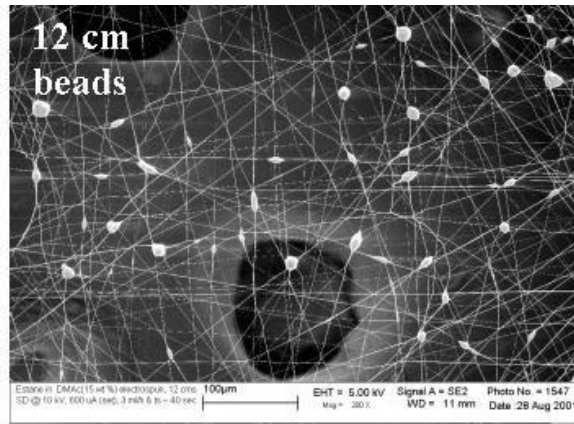


- ⬆ viscosità della soluzione ⬇ possibilità che si formino i beads.
- ⬆ la densità di carica netta della soluzione ⬇ la possibilità che si formino beads.
- ⬇ tensione superficiale della soluzione polimerica si possono ottenere fibre senza beads.

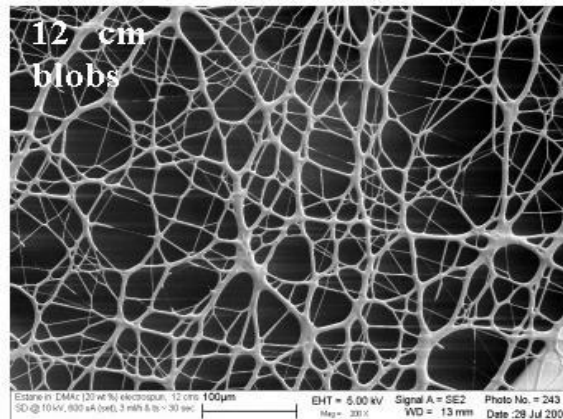
Un modo per evitare la formazione di beads è aggiungendo della particelle di sale (NaCl).

Elettrospinning – Parametri

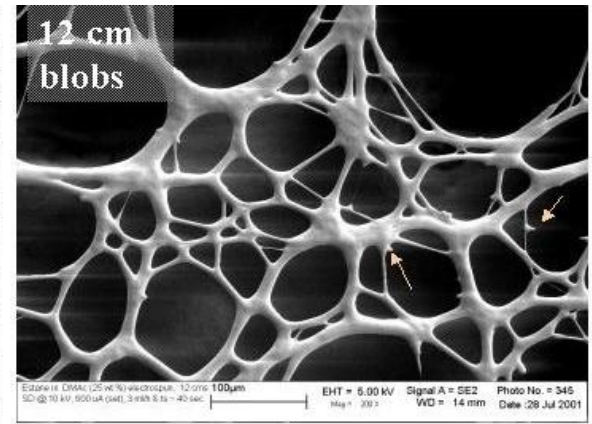
✓ All'aumentare della CONCENTRAZIONE DI POLIMERO, il diametro delle fibre aumenta (mantenendo inalterati tutti gli altri parametri).



15%



20%

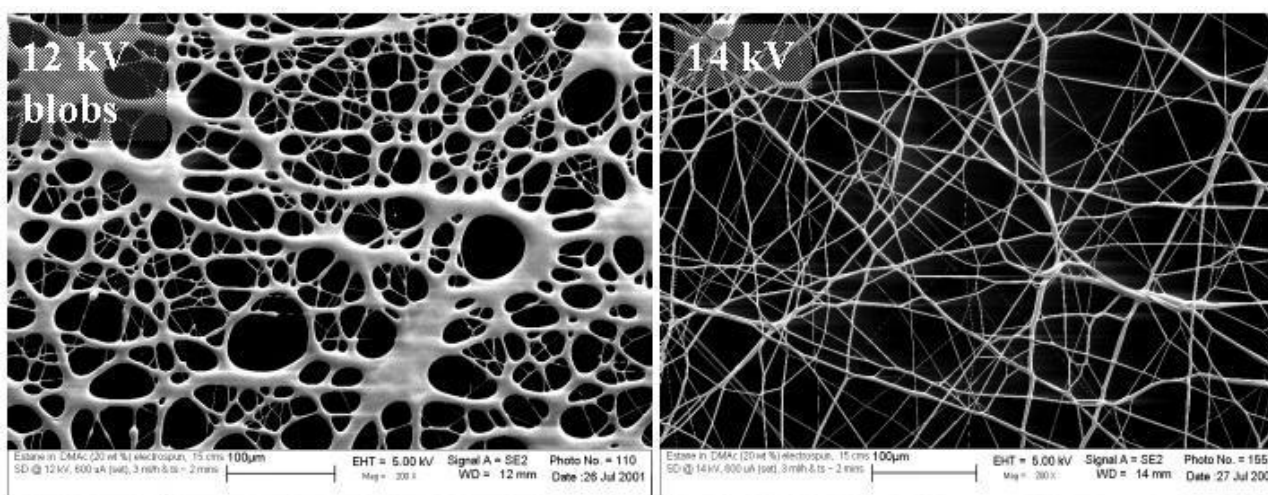


25%

- Come già detto, a concentrazioni più basse (15%), si riscontra la presenza di beads.
- A concentrazioni più elevate (20-25%) si riscontra, invece, la presenza di **blobs**, ossia degli ispessimenti disomogenei delle fibre.

Elettrospinning – Parametri

✓ All'aumentare del POTENZIALE ELETTRICO, il diametro delle fibre decresce (mantenendo inalterati tutti gli altri parametri).



*Soluzione al 20%;
Velocità del flusso: 3 ml/h.
Distanza capillare-schermo:
15 cm.*

Aumentando il potenziale elettrico, il getto polimerico viene scaricato con una repulsione elettrostatica maggiore. Per tale motivo, esso sarà sottoposto ad una sollecitazione di stiramento maggiore il che determina la realizzazione di fibre con diametro minore.

Per potenziali elettrici non molto elevati (12 kV), si può notare la presenza di blobs, cosa che invece non si riscontra per potenziali maggiori.

Elettrospinning – Parametri

Effetto dei parametri sul diametro delle fibre elettrofilate

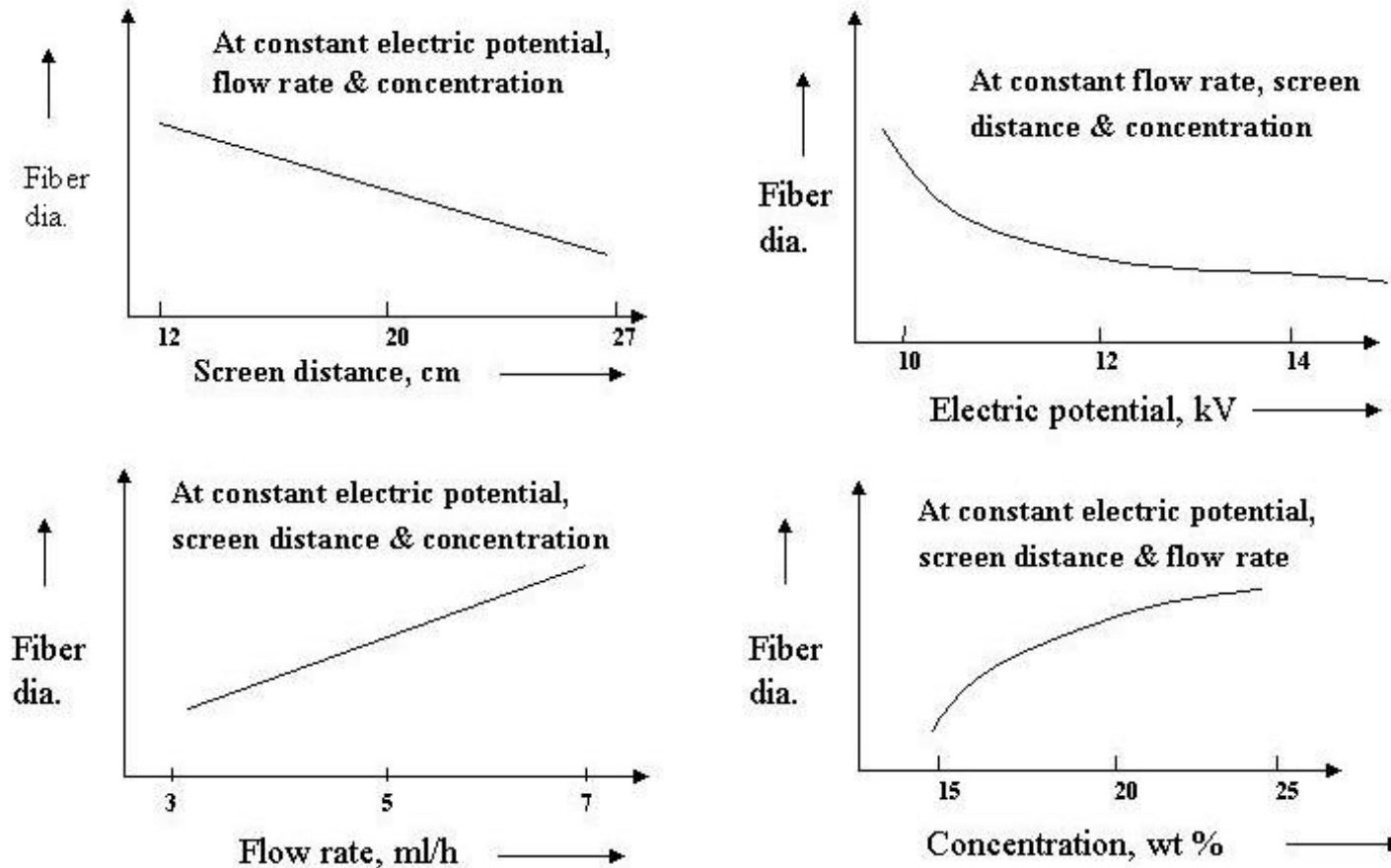


Figure 6. Effect of process parameters on fiber diameter, produced by Electrospinning

Elettrospinning – Parametri

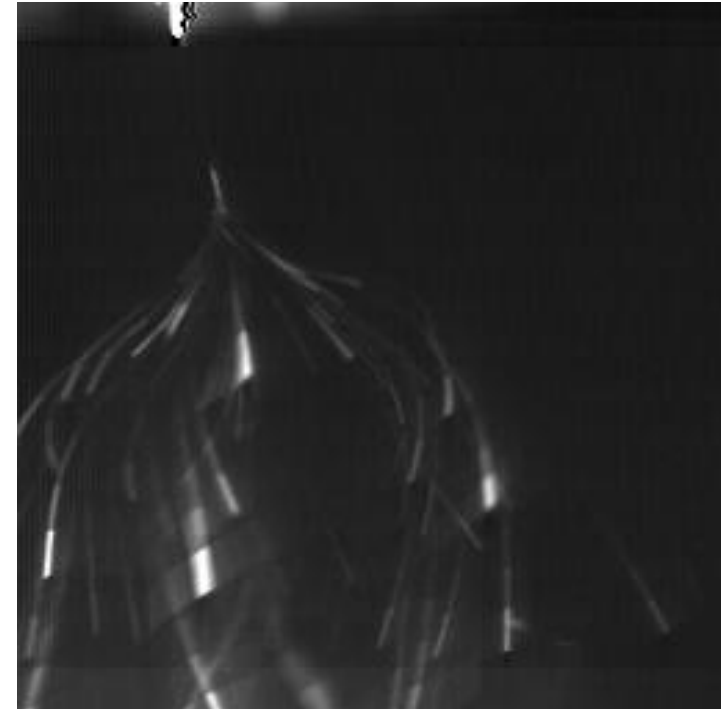
ESEMPIO

- Soluzione acquosa di ossido di polietilene (PEO): 1-7% in peso; Viscosità: 30-6500 centipoises;
- La soluzione nel capillare ha potenziale positivo tra 0-12 kV;
- Lo schermo collettore ha potenziale di terra.

Quando il getto carico viaggia nell'aria, il suo diametro decresce a causa dell'effetto simultaneo dell'allungamento del getto e dell'evaporazione del solvente.

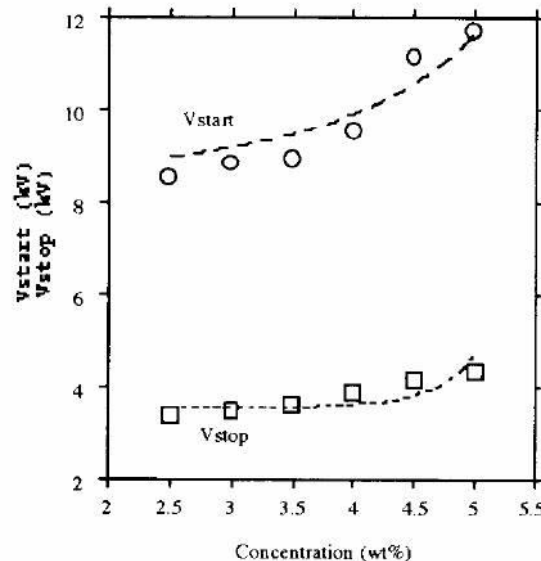
Al decrescere del diametro del getto la densità di carica sulla superficie aumenta e, quindi, si avrà un aumento della forza elettrica di repulsione. Quest'ultima determina una suddivisione del getto in getti più piccoli.

I getti più piccoli, poi, si suddividono a loro volta formando getti di diametro ancora più ridotto. Questo processo si ripete per diverse volte in modo da formare getti di diametro dell'ordine dei nanometri che si asciugano rapidamente e formano le nanofibre.



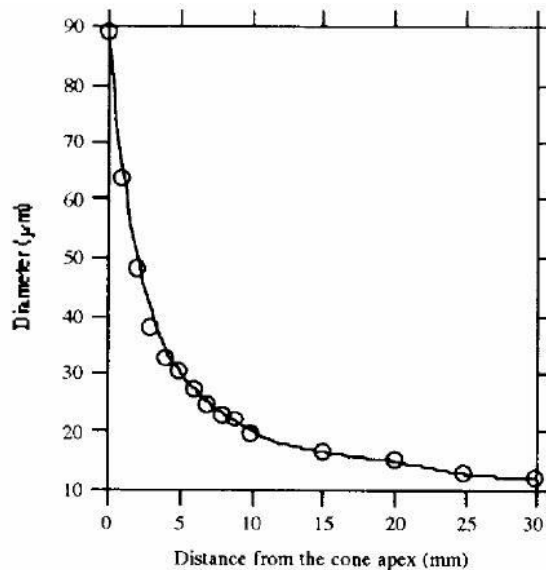
Elettrospinning – Parametri

- Per **VISCOSITÀ** inferiori a 800 centipoises, la soluzione è troppo diluita per formare un getto stabile e, quindi, si rompe in gocce. Per viscosità più elevate di 4000 centipoises, è difficile formare fibre in quanto la soluzione tende ad asciugarsi, e quindi ad indurirsi, alla punta del cono di Taylor risultando così difficile la sua fuoriuscita. Quindi, per ottenere le fibre mediante il processo dell'elettrospinning bisognerà avere una soluzione con viscosità compresa tra 800 e 4000 centipoises.
- **POTENZIALE ELETTRICO**: esistono due valori limite per avere spinning (filatura): V_{start} , potenziale in corrispondenza del quale inizia a formarsi il getto e V_{stop} , potenziale in corrispondenza del quale il getto si ferma. La regione compresa tra questi due valori è quella in corrispondenza della quale si ha un getto stabile.



Elettrospinning – Parametri

- Il **diametro** del getto viene misurato come funzione della DISTANZA TRA L'APICE DEL CONO E LA POSIZIONE DELLO SCHERMO COLLETTORE. Come già detto, il diametro decresce all'aumentare della distanza:



Soluzione al 4% in peso di PEO e potenziale di 10 kV.

Il diametro del getto non è stato misurato per distanze inferiori a 30 mm, in quanto esso diviene troppo piccolo ed instabile.

Elettrospinning – Parametri

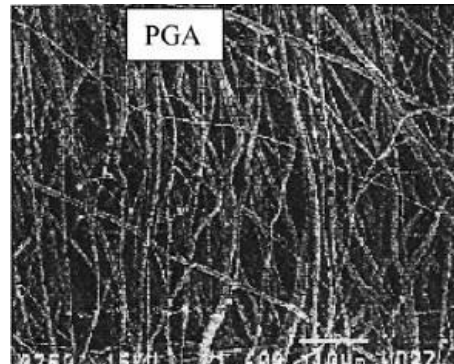
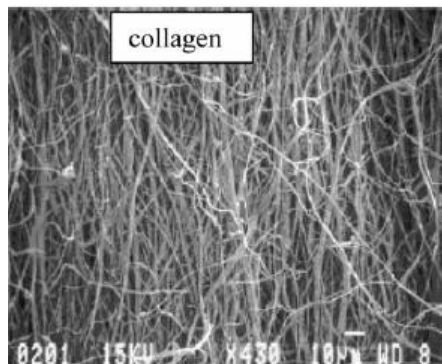
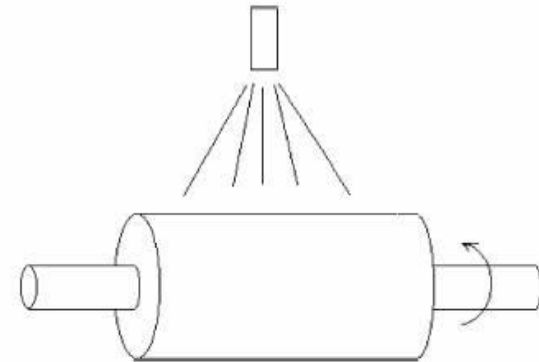
ALLINEAMENTO DELLE FIBRE. Il motivo per cui è difficile ottenere un allineamento perfetto probabilmente è dovuto al fatto che il moto del getto polimerico non è abbastanza consistente ed è poco controllabile.

Esistono 4 metodi possibili per determinare l'allineamento delle fibre:

1.Utilizzo di un collettore cilindrico con elevata velocità di rotazione. Facendo ruotare il cilindro collettore ad un'elevata velocità, superiore a 1000 rpm, le nanofibre possono essere orientate in modo circonferenziale.

Velocità troppo bassa = le fibre si depositeranno in modo random sul collettore.

Velocità troppo elevata = le fibre non riescono a depositarsi in modo continuo poiché la velocità eccessiva romperà il getto delle fibre.



Nanofibre in materiale naturale (collagene) e sintetico (PGA), allineate mediante l'utilizzo di un mandrino cilindrico rotante.