



Università degli Studi di Siena
Dottorato di Ricerca in
Scienze Chimiche e Farmaceutiche - XXIX Ciclo
Dipartimento di Biotecnologie, Chimica e Farmacia

**“Sviluppo di materiali biocompositi per la
realizzazione di sostituti tissutali per impianti
a breve e lungo termine”**

Tesi di Dottorato di
Nicola Nelli

Tutor: Prof.ssa Agnese Magnani

Co-tutor: Prof.ssa Gemma Leone

Coordinatore del Dottorato: Prof. Stefano Mangani

Anno Accademico 2015/2016

Questa pagina è stata lasciata
intenzionalmente vuota

*Alla mia famiglia,
cercando in ogni momento di renderla
orgogliosa di me.*

Questa pagina è stata lasciata
intenzionalmente vuota

Ringraziamenti

Ringrazio la mia relatrice, la Prof.ssa Agnese Magnani, per avermi concesso questa bellissima opportunità di lavorare con lei nel suo gruppo di ricerca. Inoltre la ringrazio per tutta la sua disponibilità, pazienza e cordialità che ha mostrato ogni giorno in cui ho lavorato con lei.

Ringrazio la mia co-relatrice, la Prof.ssa Gemma Leone, per tutta la pazienza che ha dovuto mostrare in questi anni ogni volta che testardamente decidevo di intraprendere una via, nonostante lei già sapesse dove portava.

Ringrazio la Prof.ssa Stefania Lamponi, senza la quale il mio lavoro sarebbe finito solo per metà.

Ringrazio il Prof. Claudio Rossi, la Prof.ssa Claudia Bonechi, il Dr. Marco Consumi e la Dr.ssa Gabriella Tamasi per tutto l'aiuto che mi hanno dato in questi anni.

Ringrazio tutti i docenti, assistenti o colleghi che hanno dimostrato curiosità o interesse scientifico per il mio lavoro svolto anche con semplici domande e curiosità.

Ringrazio la mia Famiglia per avermi sempre supportato moralmente e spiritualmente, dandomi il loro supporto e pazientando durante questa fase impegnativa della vita.

Ringrazio tutti gli amici del dipartimento, scusandomi per non aver mai fatto pranzo con loro, ma mi capirete, stando a tre passi da casa, la cucina di mamma, vince su quella della mensa.

Ringrazio Eleonora, Simone, Giulia miei amici e colleghi di vita. Ringrazio il mio caro Amico Mattia, per avermi fatto compagnia durante i momenti di lavoro più intenso.

Grazie a te Chiara

Questa pagina è stata lasciata
intenzionalmente vuota

Indice

Riassunto.....pag. 9

Summary.....pag. 15

Capitolo 1

INTRODUZIONE GENERALE..... pag. 21

Introduzione generale.....pag. 23

1.1 Biomateriali.....pag. 23

1.2 Tipologie di biomateriali.....pag. 24

1.2.1 Materiali di origine biologica.....pag. 24

1.2.2 Produzione per via sintetica di materiali identici
ai materiali biologici.....pag. 26

1.2.3 Materiali artificiali.....pag. 26

1.2.4 Rigenerazione di tessuti biologici.....pag. 28

1.3 Idrogel.....pag. 30

1.3.1 Il polivinil alcool.....pag. 32

1.3.1.1 Struttura e proprietà del PVA.....pag. 33

1.3.1.2 Sintesi e proprietà degli idrogel di PVA.....pag. 34

1.3.2 Il polivinil pirrolidone.....pag. 36

1.3.3 La Gomma-Xantano.....pag. 37

CARTILAGINE ARTICOLARE.....	pag. 39
-----------------------------	---------

<i>Introduzione</i>	pag. 41
---------------------------	---------

2.1 <u>Cartilagine articolare</u>	pag. 41
---	---------

2.1.1 <u>Degenerazione del tessuto cartilagineo</u>	pag. 43
---	---------

2.1.2 <u>Scopo</u>	pag. 44
--------------------------	---------

<i>Risultati e discussioni</i>	pag. 47
--------------------------------------	---------

2.2 <u>Pubblicazioni</u>	pag. 47
--------------------------------	---------

2.3 <u>Realizzazione degli idrogel</u>	pag. 72
--	---------

2.4 <u>Caratterizzazione Chimica</u>	pag. 75
--	---------

2.4.1 <u>Analisi infrarossa</u>	pag. 75
---------------------------------------	---------

2.4.2 <u>Spettrometria di Massa di Ioni Secondari (ToF-SIMS)</u>	pag. 79
--	---------

2.4.3 <u>Determinazione colorimetrica degli ioni orto fosfato</u> <u>e Analisi Elementare</u>	pag. 82
--	---------

2.5 <u>Caratterizzazione fisica</u>	pag. 82
---	---------

2.5.1 <u>Analisi termogravimetrica TGA</u>	pag. 82
--	---------

2.5.2 <u>Contenuto d'acqua(WC)</u>	pag. 84
--	---------

2.6 <u>Caratterizzazione Morfologica</u>	pag. 85
--	---------

2.6.1 <u>Microscopia Elettronica a Scansione (SEM)</u>	pag.85
--	--------

2.6.2 <u>Calorimetria differenziale a scansione (DSC)</u>	pag. 89
---	---------

2.7 <u>Caratterizzazione reologica (AR)</u>	pag. 89
---	---------

2.7.1 <u>Frequency sweep test</u>	pag. 90
---	---------

2.7.2	<u>Stress Relaxation test</u>	pag. 95
2.8	<u>Analisi dinamo-meccanica (DMA)</u>	pag. 97
2.8.1	<u>Frequency sweep Test</u>	pag. 97
2.9	<u>Valutazione della stabilità dei materiali</u>	pag. 99
2.9.1	<u>Test Degradativo Accelerato</u>	pag. 99
2.9.2	<u>Test degradativo in tempo reale</u>	pag. 100
2.10	<u>Test di citiotossicità</u>	pag. 101
 Conclusioni		pag. 103

Capitolo 3

NUCLEO POLPOSO		pag. 105
----------------	-------	----------

Introduzione	pag. 107
---------------------------	----------

3.1	<u>Anatomia del Disco intervertebrale</u>	pag. 107
3.1.1	<u>Il nucleo polposso</u>	pag. 108
3.1.2	<u>Anulo fibroso</u>	pag. 108
3.1.3	<u>Il Piatto cartilagineo</u>	pag. 108
3.1.4	<u>Invecchiamento e degenerazione del disco intervertebrale</u> ..	pag. 109
3.1.5	<u>Scopo</u>	pag. 110

Risultati e discussioni	pag. 113
--------------------------------------	----------

3.2	<u>Realizzazione degli idrogel</u>	pag. 113
-----	---	----------

4.1 <u>Realizzazione degli idrogel per sostituti tissutali a lungo termine</u>	pag. 135
4.2 <u>Caratterizzazione Chimica</u>	pag. 136
4.2.1 <u>Determinazione colorimetrica degli ioni orto fosfato</u>	pag.136
4.3 <u>Caratterizzazione fisica</u>	pag. 136
4.3.1 <u>Contenuto d'acqua WC</u>	pag. 136
4.4 <u>Caratterizzazione Morfologica</u>	pag. 137
4.4 <u>Caratterizzazione reologica (AR)</u>	pag. 137
4.4.1 <u>Frequency sweep test</u>	pag. 137
4.4.2 <u>Stress Relaxation test</u>	pag. 139
4.5 <u>Citotossicità degli idrogel</u>	pag. 140
4.6 <u>Realizzazione degli idrogel come scaffold cellulari per la rigenerazione tissutale</u>	pag. 140
4.7 <u>Caratterizzazione Chimica</u>	pag. 141
4.7.1 <u>Analisi infrarossa</u>	pag. 141
4.8 <u>Caratterizzazione fisica</u>	pag. 143
4.8.1 <u>Contenuto d'acqua WC/WU</u>	pag. 143
4.8.2 <u>Analisi termogravimetrica (TGA)</u>	pag. 144
4.9 <u>Caratterizzazione Morfologica</u>	pag. 145
4.10 <u>Caratterizzazione reologica (AR)</u>	pag. 145
4.10.1 <u>Frequency sweep test</u>	pag. 146
4.10.2 <u>Stress Relaxation test</u>	pag. 147
4.11 <u>Citotossicità degli idrogel</u>	pag. 148
Conclusioni	pag.149

MATERIALI E METODI.....	pag. 151
--------------------------------	-----------------

<i>Materiali e Metodi.....</i>	<i>pag. 153</i>
---------------------------------------	------------------------

5.1 <u>Materiali</u>.....	pag. 153
----------------------------------	-----------------

5.2 <u>Metodi</u>.....	pag. 153
-------------------------------	-----------------

5.2.1 <u>Realizzazione Idrogel</u>	pag. 153
--	----------

5.3 <u>Caratterizzazione Chimica</u>.....	pag. 155
--	-----------------

5.3.1 <u>Analisi Infrarossa (IR)</u>	pag. 155
--	----------

5.3.2 <u>Time of Flight Secondary Ion Mass Spectrometry (ToF-SIMS)</u>	pag. 156
--	----------

5.3.3 <u>Determinazione colorimetrica degli ioni orto fosfato</u>	pag. 156
---	----------

5.3.4 <u>Analisi elementare (EA)</u>	pag. 157
--	----------

5.4 <u>Caratterizzazione fisica</u>	pag. 157
--	-----------------

5.4.1 <u>Analisi termogravimetrica (TGA)</u>	pag. 157
--	----------

5.4.2 <u>Contenuto di acqua (WC)</u>	pag. 157
--	----------

5.5 <u>Caratterizzazione morfologica</u>.....	pag. 157
--	-----------------

5.5.1 <u>Microscopia elettronica a scansione (SEM)</u>	pag. 157
--	----------

5.5.2 <u>Calorimetria differenziale a scansione (DSC)</u>	pag. 157
---	----------

5.6 <u>Caratterizzazione reologica e meccanica</u>.....	pag. 158
--	-----------------

5.6.1 <u>Caratterizzazione reologica (AR)</u>	pag. 158
---	----------

5.6.2 <u>Analisi dinamo meccanica (DMA)</u>	pag. 159
---	----------

5.7 <u>Stabilità ISO/FDIS 10993-13</u>.....	pag. 159
--	-----------------

5.8 <u>Test di citotossicità in vitro ISO/FIDS 10993-5</u>.....	pag. 160
--	-----------------

Bibliografia.....pag. 163

Appendici.....pag. 171

Questa pagina è stata lasciata
intenzionalmente vuota

Tutti i tessuti presenti nel corpo umano sono prevalentemente costituiti da network fibrosi (collagene ed elastina) fortemente interpenetrati con una matrice polisaccaridica amorfa di proteoglicani e glicoproteine non collagenose, formando un solido insolubile permeato da un fluido ionico, la cosiddetta matrice extracellulare (ECM)¹, all'interno della quale è inoltre presente una componente cellulare, con funzione di apporto nutrienti a tutti i componenti tissutali.

Le proprietà macroscopiche del tessuto vengono determinate dalla particolare composizione e dall'assemblamento dei componenti fibrillari e della matrice. La struttura gerarchica dei tessuti a livello dimensionale [scala molecolare (1-100 nm), scala ultramolecolare (0.1-100 μ m) e scala tissutale (0.1-100 mm)] assume un ruolo significativo nel determinarne le proprietà fisiche e fisiologiche. La ECM, in seguito ad una specializzazione del tessuto, riesce ad adempiere alle particolari funzioni richieste, come, ad esempio, la resistenza meccanica nei tendini e legamenti, l'estrema durezza tramite calcificazione nelle ossa e nei denti, la filtrazione nel glomerulo renale, l'adesione nelle membrane basali ecc., rendendosi responsabile di tutte le funzioni di supporto meccanico, elasticità, ancoraggio cellulare, determinazione dell'orientazione cellulare e scambio di molecole e fluidi dei tessuti umani. Le differenti funzioni, grazie ai loro specifici ruoli, rendono questi tessuti estremamente distinguibili a livello micro e macroscopici, permettendo di suddividerli facilmente in due tipologie: tessuti soft o molli (muscoli, cuore, nervi, tendini, legamenti, cartilagini, pelle, cristallino, ecc.) e tessuti hard (prevalentemente ossa e denti).

Sulla base della natura e struttura della ECM, la scelta dei materiali per la simulazione delle caratteristiche chimico-fisiche della matrice extracellulare è ricaduta sugli idrogel, polimeri idrofili reticolati che in acqua o in fluidi biologici rigonfiano assorbendo elevate percentuali di liquido, pur rimanendo insolubili. Gli idrogeli sono degli ottimi materiali biomimetici grazie alla possibilità di modulare le loro proprietà strutturali, morfologiche e meccaniche sulla base dell'applicazione richiesta, semplicemente variando la loro composizione e il loro grado di reticolazione (come ad esempio gli idrogeli a base di polivinil alcool²⁻⁴). Essi rappresentano pertanto dei candidati ideali per l'ingegneria tissutale e per la medicina rigenerativa.

L'attività del progetto di ricerca ha avuto come oggetto principale la sintesi e caratterizzazione di materiali biocompositi a matrice idrogelica da utilizzare come

sostituti tissutali. Durante il lavoro svolto sono state identificate alcune tra le patologie articolari maggiormente invalidanti e onerose, da un punto di vista socio-economico, tra cui:

- *L'osteoartrosi (OA) del ginocchio, patologia di tipo degenerativo, caratterizzata dall'assottigliamento della cartilagine, che conduce, nei casi più avanzati, allo sfregamento delle unità ossee con conseguente formazione di osteosclerosi, eburneazione ossea, cisti ossee, sinoviti, versamento e tumefazione del ginocchio e, in larga scala, rigidità e dolore articolare che compromettono le normali funzioni di deambulazione⁵.*
- *La degenerazione del disco intervertebrale (IDD) (caratterizzata da una netta diminuzione della vitalità cellulare, una riduzione del contenuto d'acqua del tessuto e conseguente apporto di nutrienti, una graduale sostituzione del nucleo con tessuto fibrocartilagineo e la formazione di fessure e fratture nella porzione esterna dell'anulo fibroso) che può condurre al fallimento strutturale dell'IVD comportando disordini spinali più gravi tra i quali l'erniazione del disco intervertebrale, altra patologia estremamente invalidante⁶.*
- *Le lesioni meniscali da usura prodotte da lavori usuranti o di tipo traumatico in seguito a stress sportivo, che rappresentano una tipologia di infortunio molto comune, caratterizzata da dolore e invalidità temporanea, che costringe il lavoratore o l'atleta a brevi-medi periodi di prognosi nei casi più lievi, e al blocco dell'articolazione nei casi più gravi. Tramite chirurgia è possibile asportare la parte di menisco danneggiata ripristinando la funzionalità dell'articolazione, tuttavia l'asportazione chirurgica comporta una modificazione permanente nell'applicazione dei carichi sulla cartilagine articolare e provoca spesso un'insorgenza precoce dell'OA⁷.*

Per far fronte agli inconvenienti prodotti dall'OA, patologia altamente invalidante, è stato progettato e sintetizzato un materiale biomimetico che potesse essere utilizzato come sostituto della cartilagine tibiale, scegliendo come materiale sostitutivo un idrogel di polivinil alcool (PVA), reticolato per via chimica mediante trisodio trimetafosfato (STMP) (entrambi materiali notoriamente atossici e impiegati come additivi alimentari)^{3,8}. Al fine di realizzare un materiale biomimetico in grado di mimare al meglio le proprietà della cartilagine, e quindi scegliere le condizioni migliori di sintesi, sono stati sintetizzati e valutati cinque campioni di idrogel con differenti rapporti molari PVA:STMP (1:0.1; 1:0.25; 1:0.5; 1:1; 1:2), ed è stato monitorato l'effetto della variazione di parametri quali pH (11, 12, 13), concentrazione della soluzione di agente reticolante (10%/20% p/v), tempi di reazione (24, 48, 72 o 96 ore) e modalità di agitazione della soluzione (meccanica/magnetica), nonché metodologia di essiccamento [tramite liofilizzazione (_L) o tramite riscaldamento in stufa a 60°C (_E)], valutandoli in funzione della resa di reazione, solidità e continuità della struttura dei materiali. I materiali sintetizzati sono stati in seguito

caratterizzati da un punto di vista chimico [mediante Spettrometria Infrarossa (IR), Spettrometria di Massa di Ioni Secondari (ToF-SIMS), Analisi Colorimetria e Analisi Elementare (AE)] per determinare qualitativamente e quantitativamente l'avvenuta reticolazione; da un punto di vista fisico [mediante Analisi Termogravimetrica (TGA) e valutazione del Contenuto d'acqua (WC)] per valutare l'effetto della reticolazione sulla stabilità termica nella matrice di PVA e per valutare la capacità di rigonfiamento degli idrogel; da un punto di vista morfologico [tramite Microscopia Elettronica a Scansione (SEM) e Calorimetria Differenziale a Scansione (DSC)] per valutare rispettivamente la micro e la mesostruttura delle matrici polimeriche; da un punto di vista reologico e meccanico [mediante Analisi Reologica (AR) e Dinamomeccanica (DMA)] per determinare se le proprietà viscoelastiche dei materiali sono confrontabili con quelle del tessuto cartilagineo del piatto tibiale. Infine, sono stati effettuati test degradativi e citotossicologici secondo le norme internazionali vigenti (ISO/FDIS 10993-5 e 10993-13 Biological evaluation of medical device) per valutare la stabilità chimica e la citotossicità dei materiali sintetizzati.

Dalle analisi condotte il campione PVA-H 0.5_E mostra caratteristiche simili a quelle della cartilagine del piatto tibiale in termini di idratazione, stabilità, proprietà meccaniche e citotossicità e può essere potenzialmente impiegato nella realizzazione di impianti biomedici volti alla terapia dell'osteoartrosi^{9,10}.

Per far fronte ad uno dei disordini spinali più gravi, l'erniazione del disco intervertebrale, dove una fuoriuscita di materiale normalmente contenuto nel disco intervertebrale (nucleo polposo (NP)) entra in contatto con le strutture nervose contenute nel canale spinale, provocando intenso dolore, è stato proposto un idrogel di PVA, sintetizzato per via chimica mediante reticolazione tramite STMP e arricchito con PVP. Il PVP è un polimero altamente idrofilo che, interagendo mediante legami ad idrogeno con le catene di PVA¹¹, ha permesso di diminuirne il grado di reticolazione, producendo matrici con proprietà meccaniche più simili al NP, e allo stesso tempo di incrementare il contenuto acquoso dei campioni fino ai valori del tessuto da sostituire. Per determinare le migliori condizioni di sintesi, sono stati sintetizzati tre idrogel con uguale rapporto molare PVA:STMP(1:0.5), ma con crescenti contenuti % p/v di PVP (1%, 2.5% e 5% p/v). I materiali sintetizzati sono stati in seguito caratterizzati da un punto di vista chimico (mediante spettrometria infrarossa (IR) e analisi colorimetria) per determinare qualitativamente e quantitativamente l'avvenuta reticolazione e per valutare se l'introduzione del PVP producesse o meno effetti di disturbo all'interno della matrice dell'idrogel. Da un punto di vista fisico (mediante analisi termogravimetrica (TGA) e valutazione del contenuto d'acqua (WC)) per valutare l'effetto della reticolazione sulla stabilità termica della matrice di PVA e per valutare la capacità di rigonfiamento degli idrogel. Da un punto di vista morfologico (tramite calorimetria a scansione differenziale (DSC)) per valutare la

mesostruttura delle matrici sintetizzate. Da un punto di vista reologico (mediante analisi reologica (AR)) per determinare se le proprietà viscoelastiche dei materiali sono confrontabili con quelle del nucleo polposo spinale. Infine, sono stati effettuati test citotossicologici e di proliferazione cellulare secondo le norme internazionali vigenti (ISO/FDIS 10993-5 Biological evaluation of medical device) per valutarne la citotossicità e la citocompatibilità dei materiali sintetizzati.

Dai risultati ottenuti il materiale che meglio mima le caratteristiche del NP è il campione 5.0%, con proprietà di idratazione e meccaniche in linea con quelle del NP. Pertanto, il campione 5.0% può essere considerato un valido candidato per la realizzazione di impianti biomedici per la cura delle degenerazioni spinali¹².

Il lavoro svolto alla ricerca di materiali biomimetici per la cura delle lesioni meniscali è stato affrontato proponendo due tipologie di idrogel differenti, a base di PVA, per la sostituzione/rigenerazione del menisco a seconda della tipologia di lesione subita. Per casi in cui il paziente sia stato sottoposto a meniscectomia totale in seguito ad una grave frattura del menisco, è stato proposto un idrogel di PVA, reticolato mediante STMP con un rapporto PVA:STMP 1:0.25, sottoposto a tre reticolazioni consecutive allo scopo di incrementarne le proprietà meccaniche fino al raggiungimento di valori paragonabili a quelli del menisco (c.a. 120 kPa). Tale idrogel è quindi inteso come sostituto permanente¹³. Per i casi in cui le lesioni del menisco siano di minor entità, è stato proposto uno scaffold cellulare, costituito da un idrogel misto a base di PVA e Gomma-Xantano (XG), reticolati contemporaneamente mediante STMP, come sostituto temporaneo in grado di indurre e favorire la rigenerazione del tessuto meniscale. La XG è stata scelta poichè in grado di favorire e supportare l'adesione, la proliferazione e la differenziazione cellulare¹⁴. La ricerca del miglior sostituto ha coinvolto la sintesi di tre campioni con differenti contenuti % p/v di XG-PVA (60-40; 30-70; 15-85). Una volta sintetizzate, entrambe le tipologie di materiali sono state sottoposte a caratterizzazione chimica, fisica e meccanica. Inoltre, i materiali sono stati sottoposti a test di citotossicità in vitro per valutarne l'idoneità come sostituti meniscali temporanei e/o permanenti.

Nel caso dei sostituti a lungo termine il campione 3R PVA-H 0.25 può essere considerato come un potenziale sostituto biomimetico del menisco. Da un punto di vista di rilassamento degli sforzi, esso è, infatti, in grado di dissipare istantaneamente la deformazione applicata, toccando mediamente una riduzione percentuale > dell'95% dopo 1 secondo allo stesso modo del tessuto cartilagineo umano¹⁵ e possiede valori di G' paragonabili a quelli del menisco¹³. Mentre nel caso degli scaffold cellulari il materiale che si comporta maggiormente come materiale biomimetico è il campione XG15 con caratteristiche, in termini di idratazione e proprietà meccaniche, idonee alla colonizzazione cellulare. Pertanto, il campione XG15 risulta un potenziale candidato per la realizzazione di impianti

biomedici per la cura delle lesioni meniscali e viene abilitato alla successiva fase di valutazione della citotossicità in vitro secondo le norme ISO/FDIS 10993-5.

Bibliografia

- (1) Ambrosio L.; Netti P.A.; Nicolais L.; Soft Tissue, In *Integrated Biomaterials Science*. Barbucci R., Eds.; Kluwer Accademic/Plenum Publishers: New York, NY 2002; 10:347-363.
- (2) Baker M.I.; Walsh S.P.; Schwartz Z.; Boyan B.D. A review of polyvinyl alcohol and its uses in cartilage and orthopedic applications. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2012; 100: 1451-1457.
- (3) DeMerlis C.C.; Schoneker D.R. Review of the oral toxicity of polyvinyl alcohol (PVA). *Food and Chemical Toxicology* 2003; 41: 319–326.
- (4) Hassan C.M.; Peppas N.A. Structure and applications of poly(vinyl alcohol) Hydrogels produced by conventional crosslinking of by freezing/thawing metods. *Adv in Polymer Sci* 2000; 153: 37-65.
- (5) Brooks P.M. Impact of osteoarthritis on individuals and society: how much disability? Social consequences and health economic implications. *Curr Opin Rheumatol* 2002; 14: 573-577
- (6) Alkalay R. The mechanical and material Properties of the healthy and degenerated Intervertebral Disc. In *Integrated Biomaterials Science*. Barbucci R., Eds; Kluwer Accademic/Plenum Publishers: New York, NY 2002, 403-420.
- (7) Gillquist J.; Hamberg P.; Lysholm J. Endoscopic partial and total meniscectomy. A comparative study with a short term follow up. *Acta Orthop Scand* 1982; 53: 975-979.
- (8) Leone G.; Consumi M.; Aggravi M.; Donati A.; Lamponi S.; Magnani A. PVA/STMP based hydrogels as potential substitutes of human vitreous. *J of Mater Sci: Mater Med* 2010; 21: 2491–2500.
- (9) Wong B.L.; Sah R.L. Mechanical asymmetry during articulation of tibial and femoral cartilages: local and overall compressive and shear deformation and properties. *J Biomech* 2010; 43:1689-1695.
- (10) Yan L.; Oliveira J.M.; Oliveira A.L.; Caridade S.G.; Mano J.F. Macro/microporous silk fibroin scaffolds with potential for articular cartilage and meniscus tissue engineering applications. *Acta Biomaterialia* 2012; 8: 289-301.
- (11) Chirila T.V.; Hong Y.; “Poly(1-vinyl-2-pyrrolidinone) Hydrogels as Vitreous Substitutes: a Rheological Study. *Polym Int* 1998; 46: 183-195.
- (12) Silva-Correia J.; Correia S.I.; Oliveira J.M.; Reis R.L. Tissue engineering strategies applied in the regeneration of the human intervertebral disk. *Biotech. Adv.* 2013; 31: 1514-1531.
- (13) Cameron H.U; Macnab I. The structure of the meniscus of the human knee joint. *Clin Orthop Relat Res* 1972;89:215 9.
- (14) Bejenariu A.; Popa M.; Dulong V.; Picton L.; Le Cerf D. Trisodium trimetaphosphate crosslinked xanthan networks: synthesis, swelling, loading and releasing behaviour. *Polym Bull* 2008. 8: 8-33.

- (15) Netti P.A.; Ambrosio L. Articular Cartilage. In Integrated Biomaterials Science. Barbucci R., Eds; Kluwer Accademic/Plenum Publishers: New York, NY 2002, 381-402.

All human tissues are mainly made by fibrous networks (collagens and elastin) deeply interpenetrated by an amorphous polysaccharide matrix of proteoglycans and non-collagenous glycoproteins, forming an insoluble solid permeated by a ionic fluid, which is the extracellular matrix (ECM)¹, in which there is also a cellular component which supplies nutrients for all the tissue components.

The macroscopic properties of the tissue are determined by the peculiar composition and assemblage of the fibrillary components and of the matrix. The hierarchical structure of the tissues at a dimensional level [molecular scale (1-100 nm), ultramolecular scale (0.1-100 μ m) and tissue scale (0.1-100 mm)] acquire a significant role in the determination of the physical and physiological features. The ECM, as a consequence of the specialization of the tissue, is able to meet expectations for the specific functions required, such as the mechanical resistance in the tendons and ligaments, the extreme hardness through calcification in bones and teeth, the glomerular filtration rate, the adherence to basal membranes, etc., so to be responsible for the mechanical support functions of elasticity, cellular anchoring, the determination of cell orientation and the exchange of molecules and fluids in human tissues. The different functions, thanks to their specific roles, allow us to distinguish the tissues at a micro and macro level, so to divide them easily in two categories: soft tissues (muscles, heart, nerves, tendons, ligaments, cartilage, skin, crystalline lens, etc.) and hard tissues (mainly bones and teeth).

On the basis of the nature and the structure of the ECM, hydrogels seemed to be the best choice for the simulation of the chemical-physical features. Hydrogels are renowned for their hydrophilic reticulum, which inflate in water or in biological fluids, absorbing a high percentage of liquids, although remains insoluble. Moreover, they are excellent biomimetic materials for the capability of modulating their structural, morphologic and mechanical features on the basis of the specific need, by varying their composition and their grade of reticulation (such as for hydrogels with a polyvinyl alcohol basis²⁻⁴). Therefore, hydrogels were ideal candidates for tissue engineering and for regenerative medicine.

The aim of the PhD research was the synthesis and characterization of bio composite materials with a hydrogel matrix to be used as tissue replacement.

During this study, some of the most invalidating and high cost articular pathologies have been taken into consideration; among these:

- *Osteoarthritis (OA) of the knee cartilage, degenerative illness, which leads to the friction between the bones, with consequent atherosclerosis formations, eburnation of the bones, bone cists, synovitis, effusion and swelling of the knee and in large scale stiffness and pain which compromise the regular walking functions⁵.*
- *The degeneration of the intervertebral disc (IDD), featured by a clear drop in cellular liveliness, a reduction of the water content and the consequent nourishment supply, a gradual substitution of the core with a fibrocartilage tissue and the formation of cracks and fractures in the external fibroses annul, which may lead to a structural fail of the IVD, causing also serious spine disorders, another invalidating syndrome⁶.*
- *Meniscus injuries subject to wear, caused by demanding work, or by trauma or stress, especially for athletes. This last case is very common and it is characterized by pain and a period of impediment, with short or medium term prognosis or with the total block of the articulation. As a result, surgery includes a permanent change in the amount of load and stress on the articular cartilage, which often causes a premature onset of OA⁷.*

In order to face inconveniences produced by OA, a biomimetic material was projected and synthesized, so to use it as a substitute of the tibia cartilage. This material was the PVA hydrogel, reticulated chemically through STMP (both materials are notoriously atoxic and used as food additives)^{3,8}. To determine the best conditions, five hydrogel samples with different molar ratios PVA:STMP (1:0.1; 1:0.25; 1:0.5; 1:1; 1:2) were synthesized and valued. While monitoring the effect of the variation of the parameters such as, pH (11, 12, 13), the concentration of the reticulated solution (10%/20% p/v), the reaction time (24, 48, 72 o 96 ore) and the different modalities of solution agitation (mechanical and magnetic), the desiccation methodology (through Lyophilisation (_L) or through heater (_E) 60°C) evaluating the results on the base of the reaction feedback, the solidity and continuity of the materials' structure. The synthesized materials were later chemically characterized through an IR spectrometry, mass spectrometry of secondary ions (ToF-SIMS), colorimetric test and element analysis (AE), in order to determine the quality and quantity of the reticulum. From a physical point of view, the materials were characterized thanks to the thermogravimetric analysis (TGA) and the evaluation of the water content (WC), it was possible to value if the entrance of the reticulum changed the thermic stability of the PVA matrix and, moreover, the inflation capability of the hydrogel. Then, the material was characterized morphologically, through scanning electron microscope (SEM) and differential scanning calorimeter (DSC) to analyse respectively the micro and the meso-structure. Finally, a rheological and mechanical characterization was made, thanks to a rheological analysis and a

dynamo mechanical analysis(DMA) to determine if the viscoelastic properties of the materials are comparable to those of the tibia cartilage tissue. In conclusion, degradation and cytotoxic tests were made, following international procedures (ISO/FDIS 10993-5 e 10993-13 Biological evaluation of medical device), to evaluate the chemical stability and the cytocompatibility of the synthesized materials.

From the analysis made on the sample PVA-H 0.5_E, it is possible to identify similar characteristics to the cartilage of the tibial plafond, in terms of hydration, stability, mechanical properties, and cytotoxicity and, therefore, it may be used in the realization of biomedical implants for the osteoarthritis therapy^{9,10}.

In order to face one of the most serious spinal disorders, the herniation of the intervertebral disc, in which a leak of material of the nucleus pulposus (NP) touches the nervous structures of the spine and causes intense pain, it was possible to propose a PVA hydrogel, synthesized chemically through STMP and enriched by PVP. The PVP is a highly hydrophilic polymer, which interacts through hydrogen bonds with the PVA chains¹¹, and has allowed to decrease the degree of reticulation, producing a matrix with similar mechanical properties to the NP, and, at the same time, it has increased the water content of the samples, reaching the measures of the tissue that is being replaced. To determine the best conditions, three hydrogels were synthesized with the same molar ratio PVA:STMP (1:0.5), but with growing contents of PVP % p/v (1%, 2.5% e 5% p/v). The materials were later characterized through a chemical analysis, by IR spectrometry and colorimetric tests to determine the quality and quantity of the reticulum and to appraise if the introduction of PVP produced disturbing effects in the hydrogel's matrix. More tests were made, by a physical viewpoint, thanks to thermogravimetric analysis(TGA) and evaluation of the water content(WC) to estimate the inflation capacities of the hydrogels. Morphological tests, through differential scanning calorimeter (DSC) were made to determine the mesostructure. Rheological analyses (AR) were made to determine if the viscoelastic properties of the materials were comparable with those of the spinal nucleus pulposus, and finally cytotoxic tests were made, following international procedures (ISO/FDIS 10993-5 e 10993-13 Biological evaluation of medical device), to evaluate the chemical stability and the cytocompatibility of the synthesized materials.

In conclusion, from the results obtained in this study, the best material which mimics best the NP features is the 5.0% sample, with hydration and mechanical properties similar to the NP. Therefore, the 5.0% sample may be considered an excellent possibility for the realization of biomedical implants for the therapy of spinal degenerations¹².

The research of biomimetic materials for the therapy of meniscal injuries was made by proposing two different samples of PVA based hydrogels for the substitution of regeneration of the meniscus, depending on the type of lesion:

For those cases in which the patient had undergone Meniscectomy for a serious fracture, a PVA hydrogel reticulum obtained through STMP with ratio PVA:STMP 1:0.25, after three reticulations with the aim of incrementing the mechanical properties, so to reach similar features to those of the meniscus (approximately 120 kPa) was proposed as a possible substitute¹³. For those cases in which the meniscal lesions were of a minor entity, a cellular scaffold was proposed. This scaffold was made by a hydrogel mix of PVA and Xanthan Gum, reticulated simultaneously through STMP for the regeneration of the meniscal tissue¹⁴. The research of the best substitute involved the synthesis of three samples with different content % p/v di XG-PVA (60-40; 30-70; 15-85). Once synthesized, both typologies of materials were cross-examined by a chemical, physical and mechanical characterization. Moreover, the materials undergone citotoxicological tests in vitro to evaluate the suitability for temporary or permanent meniscal substitutes.

In the case of long-term substitutes, the sample 3R PVA-H 0.25 may be considered as a potential biomimetic substitute of the meniscus. To what may concern the stress relaxation tests, it is capable of instant dissipation of the deformation performed, by touching a decrease percentage > than 95% after 1 second, similarly to the human cartilage tissue¹⁵ and with the same G value¹³. In the case of cellular scaffolds, the sample with improved skills such as biomimetic material is XG15.X15 possesses good properties in terms of hydration, mechanical properties apt for cellular colonization. Therefore, the sample XG15 is a potential candidate for the realization of biomedical implants for the therapy of meniscal lesions and it is qualified for the following evaluation phase of citotoxicology in vitro, in accordance with the law ISO/FDIS 10993-5.

Bibliography

- (1) Ambrosio L.; Netti P.A.; Nicolais L.; Soft Tissue, In Integrated Biomaterials Science. Barbucci R., Eds.; Kluwer Academic/Plenum Publishers: New York, NY 2002; 10:347-363.
- (2) Baker M.I.; Walsh S.P.; Schwartz Z.; Boyan B.D. A review of polyvinyl alcohol and its uses in cartilage and orthopedic applications. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2012; 100: 1451-1457.
- (3) DeMerlis C.C.; Schoneker D.R. Review of the oral toxicity of polyvinyl alcohol (PVA). *Food and Chemical Toxicology* 2003; 41: 319-326.

- (4) Hassan C.M.; Peppas N.A. Structure and applications of poly(vinyl alcohol) Hydrogels produced by conventional crosslinking of by freezing/thawing methods. *Adv in Polymer Sci* 2000; 153: 37-65.
- (5) Brooks P.M. Impact of osteoarthritis on individuals and society: how much disability? Social consequences and health economic implications. *Curr Opin Rheumatol* 2002; 14: 573-577
- (6) Alkalay R. The mechanical and material Properties of the healthy and degenerated Intervertebral Disc. In *Integrated Biomaterials Science*. Barbucci R., Eds; Kluwer Accademic/Plenum Publishers: New York, NY 2002, 403-420.
- (7) Gillquist J.; Hamberg P.; Lysholm J. Endoscopic partial and total meniscectomy. A comparative study with a short term follow up. *Acta Orthop Scand* 1982; 53: 975-979.
- (8) Leone G.; Consumi M.; Aggravi M.; Donati A.; Lamponi S.; Magnani A. PVA/STMP based hydrogels as potential substitutes of human vitreous. *J of Mater Sci: Mater Med* 2010; 21: 2491-2500.
- (9) Wong B.L.; Sah R.L. Mechanical asymmetry during articulation of tibial and femoral cartilages: local and overall compressive and shear deformation and properties. *J Biomech* 2010; 43:1689-1695.
- (10) Yan L.; Oliveira J.M.; Oliveira A.L.; Caridade S.G.; Mano J.F. Macro/microporous silk fibroin scaffolds with potential for articular cartilage and meniscus tissue engineering applications. *Acta Biomaterialia* 2012; 8: 289-301.
- (11) Chirila T.V.; Hong Y.; "Poly(1-vinyl-2-pyrrolidinone) Hydrogels as Vitreous Substitutes: a Rheological Study. *Polym Int* 1998; 46: 183-195.
- (12) Silva-Correia J.; Correia S.I.; Oliveira J.M.; Reis R.L. Tissue engineering strategies applied in the regeneration of the human intervertebral disk. *Biotech. Adv.* 2013; 31: 1514-1531.
- (13) Cameron H.U; Macnab I. The structure of the meniscus of the human knee joint. *Clin Orthop Relat Res* 1972;89:215 9.
- (14) Bejenariu A.; Popa M.; Dulong V.; Picton L.; Le Cerf D. Trisodium trimetaphosphate crosslinked xanthan networks: synthesis, swelling, loading and releasing behaviour. *Polym Bull* 2008. 8: 8-33.
- (15) Netti P.A.; Ambrosio L. Articular Cartilage. In *Integrated Biomaterials Science*. Barbucci R., Eds; Kluwer Accademic/Plenum Publishers: New York, NY 2002, 381-402.

Questa pagina è stata lasciata
intenzionalmente vuota

INTRODUZIONE GENERALE

Questa pagina è stata lasciata
intenzionalmente vuota

1.1 Biomateriali

“Con il termine biomateriali vengono generalmente definite sostanze o combinazioni di sostanze di origine naturale o sintetica, diversamente dai farmaci, che si interfacciano con sistemi biologici e possono essere impiegate per applicazioni a breve e lungo termine, sia da sole sia come parte di un sistema, al fine di trattare, potenziare, sostituire qualsiasi tessuto, organo o funzione dell’organismo”

La scienza dei biomateriali si interessa della produzione di nuovi materiali e della loro caratterizzazione fisico-chimica e meccanica. Dopo aver determinato che il materiale possiede già tutte le proprietà chimico-fisiche e meccaniche desiderate è necessaria una caratterizzazione biologica, da effettuarsi in vitro e in vivo in modo da verificare se un dato materiale possa essere impiegato senza pericolo in applicazioni biomediche¹. Tale proprietà, nota come biocompatibilità, è la principale e peculiare caratteristica che devono presentare i materiali utilizzati in ambito medico-biologico e consiste nel fatto che un biomateriale deve poter sostituire, in parte o in tutto, un tessuto vivente senza che l'organismo in cui è inserito debba “accorgersi” della sua presenza. Un materiale biocompatibile è quindi quello che possiede proprietà meccaniche, chimiche ed elettriche tali da non danneggiare i sistemi biologici e da non essere a sua volta danneggiato dopo la sua inserzione all'interno di un organismo vivente o il suo contatto con esso.

Da un punto di vista tecnologico, un biomateriale ideale a seconda dell'applicazione deve possedere dei requisiti fondamentali, tra cui:

- Buona **stabilità chimica**, in quanto variazioni delle sue proprietà chimiche possono provocare variazioni indesiderate di altre sue caratteristiche;
- Assenza di **fenomeni tossici e cancerogeni**, in quanto l'organismo, normalmente, tende a espellere un corpo estraneo attraverso processi infiammatori o ad assorbirlo con produzione di sostanze tossiche e/o cancerogene;
- Assenza di **fenomeni di rigetto**, che sono comunque molto minori, nel caso di materiali artificiali, rispetto a quelli che si verificano nei trapianti di organo;

- Assenza di effetti che possano provocare la **coagulazione del sangue**, quando il biomateriale è in contatto con il flusso sanguigno;
- Opportune **proprietà di resistenza meccanica**, qualora venga sottoposto a sollecitazioni non trascurabili e di **densità** tale da consentire il mantenimento del peso delle apparecchiature entro limiti accettabili;
- **Proprietà anticorrosive**, necessarie per non avere un deterioramento rapido del materiale e, contemporaneamente, per non porre in circolazione sostanze che possano essere nocive;
- Possibilità di essere ripetutamente **sterilizzato senza degrado**.

1.2 Tipologie di biomateriali

Tralasciando l'utilizzazione di materiali di origine biologica allo stato vivente (trapianto di tessuti od organi), le vie che vengono seguite nello sviluppo di nuovi biomateriali sono sostanzialmente quattro:

- a) *Impiego di materiali di origine biologica trattati opportunamente e usati per protesi;*
- b) *Produzione per via sintetica di materiali identici a quelli naturali;*
- c) *Impiego di materiali artificiali, appositamente sintetizzati per renderli più idonei alle condizioni in cui debbono operare;*
- d) *Rigenerazione per via naturale su supporto artificiale (scaffold) di materiali identici a quelli naturali.*

1.2.1 Materiali di origine biologica

Accanto ai trapianti, attualmente si sta sviluppando con successo l'utilizzazione di materiali di origine sia animale sia umana, in strutture già organizzate o allo stadio molecolare². L'utilizzazione di questo tipo di materiali si inserisce nell'ambito di una sempre maggiore ricerca di materiali di alta sofisticazione e di migliore biocompatibilità³. A ciò si deve aggiungere il fatto che i materiali biologici, in generale, non necessitano di tecnologie di ottenimento e fornitura particolarmente complesse e costose; per questo motivo essi sono alla portata anche della piccola industria e del piccolo gruppo di ricerca. I materiali compresi in questo ambito, di varia provenienza e utilizzazione, possono essere suddivisi in materiali costituiti da tessuti molli (*Soft Tissue*^a), materiali costituiti

^a La locuzione tessuti molli (*Soft Tissue*) è una definizione usata in medicina derivante dalla radiologia per definire tutti i tessuti umani che non possiedono la stessa densità dell'osso. I tessuti soft comprendono tendini, legamenti, pelle, tessuti fibrosi, grassi, membrane sinoviali (che sono tessuti connettivi), muscoli, nervi e vasi sanguigni (che non sono tessuti connettivi).

da tessuti duri (*Hard Tissue*^b) e materiali per sutura. È necessario tuttavia ricordare che l'impiego di materiali biologici rimane comunque circoscritto a un ambito relativamente ristretto di applicazioni, sia per i limiti che i materiali stessi presentano relativamente ad alcune loro proprietà sia per le difficoltà di approvvigionamento.

Per i primi, l'utilizzazione principale si ha in campo cardiovascolare e in particolare nelle protesi valvolari⁴. Inizialmente sono state utilizzate valvole di maiale, ma i problemi di selezione comportati da tale soluzione hanno fatto preferire altri tipi di tessuti, quali pericardio o dura madre bovini, che, opportunamente trattati, formati e assemblati, consentono di realizzare la protesi nelle dimensioni e forme volute. Sempre in campo cardiovascolare, si sono realizzate protesi di vasi sanguigni e dotti di piccolo diametro utilizzando vene ombelicali umane. Infine, è attualmente molto utilizzata la pelle di maiale e quella ovina. Tale materiale può essere impiegato in svariate applicazioni, quali la ricopertura di lesioni e scottature, la ricostruzione del timpano ecc.

I materiali di origine biologica costituiti da tessuti duri vengono prevalentemente utilizzati per riempimenti nel caso di difetti ossei o asportazione di tumori, per sostituzioni diafisarie⁵. I principali requisiti richiesti riguardano le caratteristiche meccaniche, che devono essere simili a quelle dell'osso, e un'alta compatibilità con l'osso stesso. Il primo materiale a essere utilizzato è stato lo stesso osso umano, prelevato da cadaveri, che mostra caratteristiche ottime dal punto di vista della compatibilità. Successivamente sono state usate ossa di provenienza animale, opportunamente trattate. Più recentemente sono stati utilizzati materiali diversi, come frammenti di corallo e madrepore, ed è stata sperimentata anche la possibilità di utilizzare il legno⁶. Quest'ultimo materiale sembra offrire dei vantaggi sia perché presenta struttura e prestazioni affini a quelle dell'osso, sia perché risulta facilmente adattabile anche durante l'intervento chirurgico.

Un altro campo in cui i materiali biologici sembrano imporsi decisamente è quello degli adesivi, poiché i collanti artificiali si sono rivelati scarsamente biocompatibili. Fra gli adesivi di origine biologica, il più significativo è la colla di fibrina, che viene usata correntemente sull'uomo con ottime caratteristiche di compatibilità, facilità di preparazione e utilizzo⁷.

Naturalmente tutti i biomateriali che possiedono un'origine biologica, prima di poter essere utilizzati, debbono essere sottoposti a una serie di trattamenti, quali pulitura, fissazione, formatura, assemblaggio, sterilizzazione e conservazione. L'operazione più significativa è quella di fissazione: essa viene effettuata con un agente chimico che distrugge la componente deteriorabile del materiale rendendolo immune all'attacco dei batteri.

^b I tessuti duri (*Hard Tissue*), chiamati anche tessuti calcificati, comprendo tutti i tessuti mineralizzati con una solida matrice intercellulare. I tessuti Hard degli esseri umani comprendono ossa, denti e smalto dentale, dentina e cemento dentale.

1.2.2 Produzione per via sintetica di materiali identici ai materiali biologici

La produzione di materiali di sintesi che siano “*identici*” a materiali biologici è ancora in gran parte in una fase di ricerca e sperimentazione. Allo stato attuale sono stati realizzati dei materiali in grado di sostituire egregiamente quelli naturali, a meno che non sia loro richiesto di svolgere una qualche funzione biologica o di non modificare gli equilibri naturali. Ciò risulta particolarmente evidente quando si tratta di materiali che vengono a contatto con il sangue; infatti, mentre allo stato attuale è possibile realizzare arterie e vene artificiali che eguagliano o superino quelle naturali per quanto concerne le proprietà elastiche e di contenimento, è molto più difficile riprodurre con un materiale sintetico tutte le funzioni esplicate dall'endotelio nel suo contatto con il sangue. Un altro interessante esempio è quello relativo alla pelle artificiale. Infatti, mentre le caratteristiche puramente passive della pelle sono state adeguatamente riprodotte, per altre funzioni, come la capacità di rilevare variazioni di pressione o di temperatura, si è ancora molto lontani dalle caratteristiche naturali.

1.2.3 Materiali artificiali.

Un differente tipo di approccio è di utilizzare, per applicazioni di tipo biologico, materiali che sono stati sviluppati per altri tipi di applicazioni, dopo averne verificate le caratteristiche di biocompatibilità. Fino a qualche anno fa, la scelta di un materiale per un organo artificiale veniva effettuata caratterizzando il materiale biologico dal punto di vista delle sue proprietà principali e relativamente alle varie utilizzazioni, e successivamente scegliendo il materiale tradizionale con proprietà simili o migliori. In tale contesto si sono identificati un certo numero di polimeri tradizionali e alcuni metalli con caratteristiche di elevata biocompatibilità e proprietà meccaniche addirittura superiori a quelle dei materiali biologici che dovevano sostituire. I biomateriali artificiali attualmente più utilizzati sono normalmente costituiti da:

- *Materiali polimerici*
- *Materiali metallici*
- *Materiali ceramici*

I materiali polimerici, che formano un'importante e variegata classe di biomateriali, sono sostanze macromolecolari, composte da numerose unità ripetitive. Se il procedimento di sintesi viene eseguito in modo tale che le unità costituenti la macromolecola siano di più di un tipo chimico, si parla più propriamente di copolimeri. Tali materiali variano grandemente nella loro struttura e proprietà, dando origine a un numero praticamente infinito di possibili polimeri, per ciascuno dei quali le caratteristiche specifiche, come la resistenza, la reattività chimica, la degradazione e la biocompatibilità, possono essere influenzate da un grande numero di variabili. Fra queste, le principali riguardano

il tipo di struttura (la più comune, è quella a catena di carbonio), la lunghezza della catena, il grado di crosslinking e di idratazione ecc.

In corrispondenza a questa grande varietà di materiali, si ha un altrettanto vasto campo di applicazioni. Tra queste, particolarmente estese sono le applicazioni in oftalmologia e ortopedia⁸⁻⁹, campi in cui vengono richieste ai materiali proprietà notevolmente diverse a testimonianza della grande versatilità di impiego dei polimeri¹⁰. In particolare, in oftalmologia, l'applicazione di gran lunga più rilevante è quella relativa alla realizzazione di lenti a contatto, anche se polimeri trovano largo uso anche nella realizzazione di cornee artificiali e nella chirurgia del distacco della retina. In ortopedia, in cui le prime utilizzazioni di tali materiali risalgono al 1946, le maggiori applicazioni si hanno nella realizzazione di cementi ossei, utilizzati per la fissazione di protesi articolari, nonché per protesi di tendini o legamenti.

Più complesso è stato l'impiego di tali materiali nella realizzazione di protesi vascolari e, in generale, di apparati o sistemi che vengano a contatto con il sangue¹¹. In tal caso, infatti, particolare attenzione deve essere posta al moto relativo del sangue rispetto al materiale e alle caratteristiche dell'interfaccia polimero-sangue. Di particolare gravità risulta essere, in tale contesto, la possibilità che si verifichino dei trombi dovuti a effetti anomali di coagulazione del sangue.

Un'ultima interessante applicazione biomedica dei materiali polimerici si ha in farmacologia e, in particolare, nella realizzazione di sistemi macromolecolari per il rilascio controllato di farmaci¹². I principali vantaggi di tale tipo di somministrazione consistono nella possibilità di mantenere concentrazioni ottimali di farmaco nel plasma senza apprezzabili fluttuazioni ed eliminando la necessità di somministrazioni ripetute. La scelta del materiale polimerico deve rispondere a esigenze di non tossicità, non cancerogenicità, incapacità di scatenare reazioni immunologiche, assenza di contaminanti. Nel caso di sistemi biodegradabili, i prodotti di degradazione debbono essere metabolizzati senza dar luogo a fenomeni tossici e ad accumulo di materiali esogeni in tessuti e organi.

L'impiego di materiali metallici in campo biomedico è legato alle prestazioni tipiche degli stessi in ingegneria¹³. Nell'applicazione più tradizionale, che è quella ortopedica, il materiale ha il compito di sostituire o integrare in modo permanente o temporaneo le funzioni di una struttura ossea. Deve quindi essere modellato nella forma prevista e posto nella posizione di lavoro in cui si troverà a interagire sia meccanicamente, sia dal punto di vista biologico con l'ambiente circostante. Sono quindi richieste buone caratteristiche meccaniche, facilità di lavorazione e biocompatibilità. Negli anni passati si è fatto ricorso, anche in questo campo, a materiali tradizionali già sviluppati industrialmente, rispondenti ai primi due requisiti e dotati di una buona resistenza alla corrosione, come gli acciai inossidabili e leghe a base di cobalto e di titanio. Successivamente, lo sviluppo delle ricerche sui biomateriali ha favorito la progettazione di nuove leghe e il

perfezionamento di quelle esistenti, focalizzando l'interesse sulle leghe di titanio, sui materiali a memoria di forma e sulle tecnologie di trattamento superficiale.

Un'altra classe di materiali tradizionali largamente utilizzati in medicina è quella dei materiali ceramici, che include un vasto numero di materiali solidi non metallici con caratteristiche di alta resistenza alla compressione e relativa inerzia chimica¹⁴. Fra questi, possiedono particolare interesse i carboni, che vengono usati nella costruzione di valvole cardiache e di connettori percutanei per le loro ottime proprietà antitrombogeniche. L'ossido d'alluminio (Al_2O_3) trova utilizzazione nelle protesi dentarie e, nella sua forma cristallina, nelle protesi d'anca. I bioglass sono ceramiche attive capaci di formare legami chimici diretti fra l'impianto e il tessuto circostante. I vari fosfati di calcio hanno eccellente compatibilità con l'osso e vengono rimodellati dal corpo quando sono utilizzati per il riempimento di difetti ossei.

In conclusione, è opportuno mettere in evidenza come non sia difficile trovare o progettare materiali artificiali con proprietà confrontabili, se non superiori, a quelle dei materiali naturali. Tuttavia, va tenuto presente che, in taluni casi, tale superiorità può giocare un ruolo addirittura negativo: per es., la bassa deformabilità dei metalli rispetto a quella delle ossa può provocare una serie di inconvenienti, come il rallentare o addirittura impedire la formazione del callo osseo nella realizzazione di giunzioni osso-metallo. In molti altri casi, però, tali complicazioni non esistono e i materiali artificiali convivono con quelli naturali e anzi sopravvivono a questi ultimi.

1.2.4 Rigenerazione di tessuti biologici

Nonostante le cellule isolate non possano formare tessuti, in quanto richiedono degli ambienti specifici per la corretta crescita, impiegando materiali specifici di supporto che svolgono il ruolo di “impalcature” prendendo appunto il nome di “*scaffold*”, è possibile permettere la crescita dei tessuti su tali supporti. Infatti, grazie alle tecniche di coltura, sono necessarie poche cellule provenienti da un donatore per creare gli impianti. Numerose strategie usate in ingegneria tissutale^c dipendono dall'impiego di un materiale scaffold¹⁵.

^c L'ingegneria tissutale è una scienza multidisciplinare che permette la progettazione e la formazione di nuovi tessuti al fine di creare sostituti biologici che consentono di migliorare, di riparare o di curare i tessuti biologici presenti all'interno dell'organismo umano, consentendo di rigenerare gli organi e i tessuti malati invece di limitarsi semplicemente a ripararli. Lo sviluppo di questa biotecnologia innovativa apre la strada a nuove possibilità di cura, ad una migliore qualità della vita dei pazienti e, soprattutto, alla prospettiva di superare gradualmente il problema della cronica carenza di organi da trapiantare, ed ovviare allo stesso tempo i rischi di rigetto connesse alla donazione degli stessi.

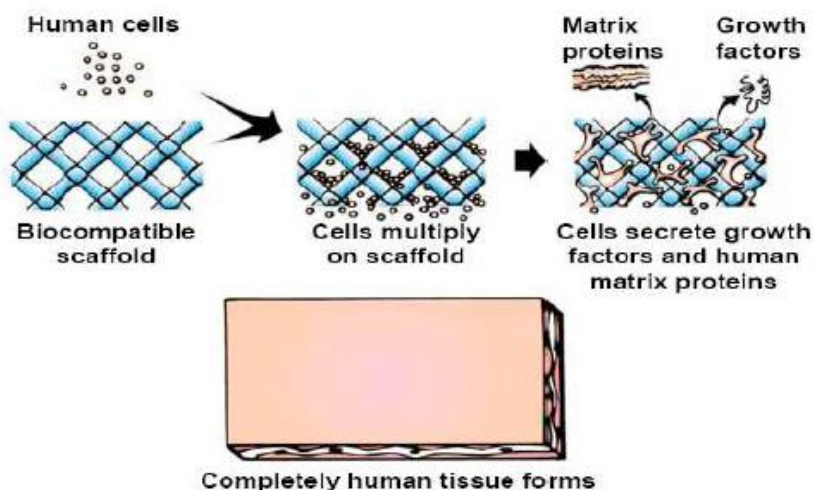


Figura 1 – Schema di funzionamento di uno scaffold

Questi scaffold (**Figura 1**) fungono da matrice extracellulare sintetica (ECM), organizzano le cellule in una architettura tridimensionale e rilasciano sostanze stimolanti, che dirigono la crescita e la formazione del tessuto desiderato. Lo scaffold oltre a fornire un supporto deve essere in grado di far accrescere e diversificare le cellule che vengono fatte attecchire e deve inoltre rispondere a delle caratteristiche meccaniche specifiche a seconda del tessuto che si vuole rigenerare. Durante la progettazione di uno scaffold in ingegneria tissutale bisogna tener conto di diversi requisiti: lo scaffold deve possedere le proprietà meccaniche appropriate, in modo da poter fornire le giuste sollecitazioni meccaniche al tessuto in formazione; la porosità e permeabilità deve permettere il rilascio delle sostanze nutritive e di altri composti in grado di fornire opportuni stimoli alle cellule; la struttura superficiale deve avere una morfologia adeguata a permettere l'adesione cellulare; biocompatibilità, in modo da non provocare una risposta indesiderata dell'organismo all'impianto, e la biodegradabilità, in modo da essere riassorbiti simultaneamente alla crescita cellulare per essere quindi gradualmente sostituiti dai nuovi tessuti, in un tempo di degradazione ragionevole, senza rilasciare prodotti tossici per l'organismo.

Gli scaffold offrono una possibile soluzione alla ricostruzione di parti od organi del corpo impiegando un opportuno biomateriale, sul quale l'organismo stesso sia in grado di ricostruire la parte mancante e, se il biomateriale è un materiale biodegradabile, è possibile ottenere la parte ricostruita identica all'originale senza più alcuna traccia del biomateriale stesso.

Lo sviluppo dei biomateriali nelle quattro grandi aree descritte ha dato un importante contributo alla medicina moderna nel corso degli ultimi venticinque anni. Da essi infatti è largamente dipeso il successo di apparecchiature di

assistenza, eso- ed endoprotesi che attualmente vengono usate in quantità molto elevate (si pensi ai milioni di apparecchiature per dialisi utilizzate ogni anno, alle protesi dentarie, alle lenti a contatto ecc.). In molte di queste applicazioni i biomateriali hanno raggiunto livelli molto elevati di sofisticazione, anche se è ancora lontana una riproduzione perfetta di tessuti e organi naturali.

1.3 Idrogel

“Un idrogel può essere descritto come un polimero idrofilo reticolato che in acqua o in fluidi biologici rigonfia assorbendo una gran parte del liquido, pur rimanendo insolubile”

Molti materiali sia di origine naturale che sintetica corrispondono alla definizione di idrogel e vengono spesso utilizzati in campo biomedico e farmaceutico. La quantità di acqua presente in un idrogel costituisce una fra le più importanti caratteristiche di questi materiali e può variare dal 10% fino a migliaia di volte il peso secco (**Figura 2**). In generale, maggiore è il numero di gruppi idrofili, più alta sarà la capacità di immagazzinare acqua e allo stesso tempo più è alta la densità di reticolazioni minore sarà la capacità di stiramento del network polimerico, con conseguente diminuzione della capacità di immagazzinamento e dissoluzione.

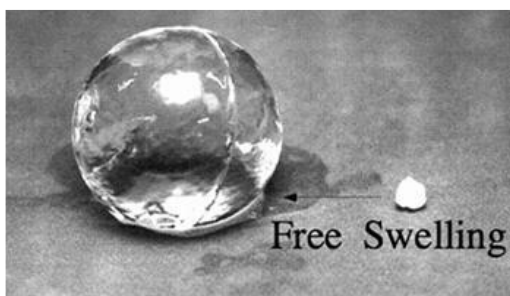


Figura 2 - Idrogel di PVA in differenti condizioni di rigonfiamento

Durante il processo di rigonfiamento di un idrogel, i gruppi polari idrofili delle catene polimeriche sono i primi ad essere idratati in seguito al contatto con l'acqua. Questa interazione conduce alla formazione della “*primary bound water*”. Come risultato il network polimerico rigonfia ed espone i gruppi idrofobi che sono anch'essi capaci di interagire con le molecole d'acqua, con conseguente formazione della “*secondary bound water*”. Acqua primaria e secondaria sono spesso combinate e per semplicità chiamate “*total bound water*”. Dopo che l'acqua ha interagito sia con i gruppi idrofili che con i gruppi idrofobi, la forza osmotica delle catene polimeriche permette al network di assorbire ancora più acqua raggiungendo un “*infinito livello di diluizione*”. A questo rigonfiamento

addizionale si oppongono però i punti di reticolazione (fisici o chimici) che generano una forza elastica di richiamo sul network. Il materiale quindi si rigonfierà fino al raggiungimento di un livello di rigonfiamento di equilibrio. Quest'acqua assorbita addizionalmente viene chiamata “*acqua libera o bulk water*”.

Una delle principali metodologie di classificazione degli idrogel è in base alla natura dei punti di reticolazione che garantisce l'integrità strutturale del materiale. In questo campo gli idrogel possono essere suddivisi in: *Fisici e Chimici*¹⁶.

Negli idrogel fisici le catene polimeriche interagiscono tra loro attraverso interazioni reversibili di varia natura ed entità, quali legami idrogeno, legami ionici, forze di Van der Waals, interazioni idrofobiche, entanglements di tipo fisico e formazione di regioni cristalline. A seconda dell'intensità e della reversibilità delle forze che tengono unita la struttura gli idrogel fisici possono avere un'alta capacità di scorrimento fino a possedere proprietà tissotropiche o avere una bassa capacità di scorrimento presentando elevati moduli elastici. La natura fisica delle reticolazioni tuttavia può essere disturbata da cambiamenti di pH, forza ionica, temperatura, stress e addizione di altri agenti con conseguente perdita della struttura tridimensionale. Negli idrogel chimici le matrici vengono ottenute in seguito a formazione di legami covalenti tra i gruppi funzionali delle catene polimeriche, generalmente ad opera di un agente reticolante. Una caratteristica che accomuna molti idrogel chimici è la formazione di punti di discontinuità all'interno della matrice durante la fase di sintesi con formazione di clusters, spazi vuoti e/o macropori, catene libere, aggregazioni e ripiegamenti di catene. La natura covalente del legame tuttavia permette la formazione di idrogel molto stabili con basse capacità di scorrimento. In questa classe di idrogel le variazioni di temperatura, pH e forza ionica della soluzione non distruggono la loro struttura tridimensionale.

I materiali che possono essere impiegati per la creazione di un idrogel possono essere sia di origine naturale che sintetica. Gli idrogel sintetici sono molto utilizzati nell'ingegneria tissutale in quanto le loro proprietà chimiche sono facilmente controllabili e riproducibili, permettendo di tenere sotto controllo le dinamiche di formazione del gel, la densità delle reticolazioni, le proprietà meccaniche e la degradabilità del materiale. Un esempio dei materiali più comuni che possono essere usati per formare idrogel sintetici sono: il polietilen ossido (PEO), polivinil alcol (PVA), l'acido poliacrilico (PAA) e i polipeptidi. Gli idrogel di origine naturale invece, sono spesso utilizzati in applicazioni di ingegneria tissutale in quanto possiedono componenti o proprietà macromolecolari simili all'ECM. Il collagene ad esempio è la proteina più presente nei tessuti delle ECM dei mammiferi. È dunque un materiale molto interessante per le applicazioni biomediche, si possono creare fibre di collagene e scaffold con delle proprietà meccaniche migliorate dall'introduzione di vari reticolanti chimici (glutaraldeide, formaldeide) o da trattamenti fisici e dal legame con altri polimeri.

Gli idrogel hanno differenti applicazioni nell'ambito dell'ingegneria tissutale tra i quali scaffold più o meno complessi e trasportatori di molecole bioattive; inoltre vengono applicati alle cellule da trapiantare e in pratica possono venire utilizzati per la formazione di praticamente ogni tessuto corporeo inclusi cartilagine, ossa e muscoli lisci¹⁷.

1.3.1 Il polivinil alcool

Il poli(vinil alcol) o PVA viene comunemente utilizzato nell'industria tessile, per prodotti manifatturieri cartacei, nel confezionamento di cibo e come componente per molti dispositivi medici grazie anche al suo basso impatto ambientale, la sua resistenza chimica, solubilità in acqua e biodegradabilità¹⁸. Il PVA mostra efficienti proprietà di barriera, non a caso l'FDA (United States Food and Drug Administration) lo ha approvato per il suo utilizzo in stretto contatto con prodotti alimentari. Nei dispositivi medici il PVA viene utilizzato come biomateriale grazie alla sua biocompatibilità, atossicità, non cancerogenicità, rigonfiabilità e alla sua caratteristica bioadesiva¹⁹. Idrogel e membrane di PVA sono state sviluppate ed utilizzate per un vasto range di applicazioni biomediche, sia impiantate che non, come lenti a contatto, pancreas artificiale, emodialisi, umori vitrei sintetici, e come materiale sostitutivo tessuti come cartilagini artificiali ed menischi danneggiati^{18,20} (**Tabella 1**).

Tabella 1 - Utilizzo del PVA in dispositivi impiantabili e non impiantabili

Tipologia	Prodotto	Stato PVA	Contatto con il Paziente
Dispositivi non impiantabili	Spugne ad uso chirurgico ed imballaggio	Schiuma polimerica a celle aperte	Breve temine, contatto diretto con le ferite
	Collirio	Soluzione polimerica	Brevi tempi di contatto, applicazione diretta nel tessuto oculare
	Lenti a contatto	Idrogel polimerico modellato	Brevi tempi di contatto, applicazione diretta nel tessuto oculare
Dispositivi impiantabili	Rivestimenti idrofili (cateteri, fili, ecc.)	Soluzione polimerica	Impianti a lungo termine, contatto con il sangue
	Agenti vascolari embolici	Lamine di idrogel	Impianti permanenti, contatto con il sangue

Guide per nervi	Tubi di idrogel	Impianti permanenti, tessuto nervoso
Protesi Cartilaginee	Idrogel polimerico modellato	Impianti permanenti, contatto con tessuto osseo

1.3.1.1 Struttura e proprietà del PVA

Il poli(vinil alcol) PVA è un polimero lineare sintetico prodotto per idrolisi parziale o completa del poli(vinil acetato) PVAc. Il poli(vinil alcol) è un polimero dalla semplice struttura chimica caratterizzato dalla presenza di un gruppo idrossilico in ciascun monomero (**Figura 3**).

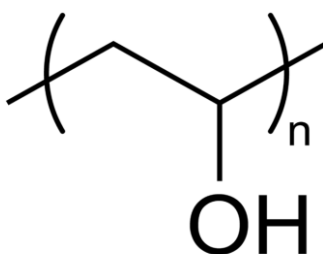


Figura 3 - Unità monomerica del PVA

Il suo monomero, il vinil alcol, non è stabile in natura e tautomerizza ad acetaldeide. Pertanto il PVA viene prodotto dalla polimerizzazione del vinil acetato a poli(vinil acetato) (PVAc), seguita dall'idrolisi del PVAc a PVA. L'idrolisi generalmente non raggiunge mai la completezza; per questo motivo il PVA commerciale non si trova mai in una forma pura ma sempre sottoforma di copolimero (in genere il grado di idrolisi è al di sopra del 98,5%). Il grado di idrolisi od il contenuto dei gruppi acetati nel polimero agiscono sulle proprietà chimiche di quest'ultimo, in particolare agendo sulla sua solubilità in acqua, sulla sua cristallizzabilità e determina le caratteristiche fisiche, chimiche e meccaniche del polimero. Il prodotto risultante è altamente solubile in acqua e resistente alla maggior parte dei solventi organici. Tali proprietà lo rendono adatto a molte applicazioni compresa la formazione di idrogel (quest'ultima funzione necessita una reticolazione per bloccare la sua solubilità in acqua). Varie tecniche di reticolazione hanno evidenziato la capacità del PVA di formare idrogel stabili con differenti pesi molecolari e concentrazioni. Nel particolare, la capacità di ottenere idrogel "soft" con un 10% di polimero o idrogel "stiff" contenenti il 50-60% di polimero, ne permette l'applicazione come sostitutivo di molti tessuti, in particolare quelli molli umani (soft tissue). Il fitto network di legami covalenti che si instaura durante la reticolazione provvede alla stabilità strutturale una volta rigonfiato con acqua o fluidi biologici. Il grado di reticolazione (GDR) è il *diretto*

responsabile del fluid uptake, e quindi delle proprietà fisiche, chimiche, biologiche e diffusive del polimero.

1.3.1.2 Sintesi e proprietà degli idrogel di PVA

Il PVA può essere reticolato in modo da essere utilizzato per una grande varietà di applicazioni²⁰, in particolare nel campo delle scienze medico/farmaceutiche come idrogel. Il processo di reticolazione si suddivide in:

- **Reticolazione fisica;**
 - *Freeze/Thawing*
 - *Interazioni secondarie*
- **Reticolazione chimica:**
 - *Mediante agenti reticolanti*
 - *Mediante irradiazione*

Le soluzioni acquose di PVA possiedono l'inusuale caratteristica di formare cristalli in seguito a cicli ripetuti di congelamento e riscaldamento (*freeze/thawing*). Il numero e la stabilità di questi cristalli aumenta con il numero di cicli di congelamento/scongelamento a cui è soggetto il materiale. La reticolazione fisica si conduce mediante la formazione di cristalliti (**Figura 4**). Tra i vantaggi di questo metodo vi è l'assenza di problemi di tossicità poiché non richiede l'utilizzo di agenti reticolanti. Le proprietà di questi gel dipendono, allo stesso modo del numero di cristalliti, dal peso molecolare del polimero, dalla concentrazione delle soluzioni acquose di PVA, dalla temperatura, dal tempo, e dal numero di cicli di *freeze/thawing*. Questo materiale reticolato fisicamente esibisce proprietà meccaniche maggiori rispetto agli idrogel sintetizzati con tecniche chimiche e irradiative poiché i carichi meccanici a cui viene soggetto il materiale vengono assorbiti dalla struttura tridimensionale dei cristalliti. Alcune caratteristiche di questi idrogel di PVA reticolati fisicamente includono un alto grado di assorbimento di acqua ed una natura elastico/gommosa con alta resistenza meccanica.

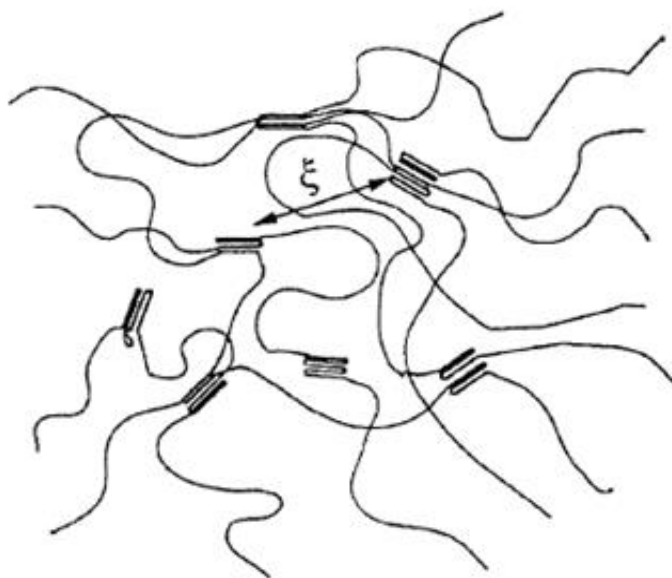


Figura 4 - Rappresentazione 3D del network che si instaura in un idrogel di PVA reticolato per freeze/thawing. ξ rappresenta la distanza tra due cristalliti di PVA formatisi durante la fase di congelamento

Tuttavia la reticolazione con questa tecnica è reversibile e tramite la variazione di parametri quali pH, temperatura, forza ionica della soluzione di rigonfiamento può avvenire la rottura dei cristalliti con conseguente allontanamento delle catene.

Il PVA può essere reticolato attraverso l'uso di numerosi agenti reticolanti. Alcuni tra i più comuni agenti reticolanti, impiegati per la preparazione di idrogel di PVA sono: glutaraldeide, acetaldeide, formaldeide ed altre monoaldeidi. Quando questi agenti reticolanti vengono utilizzati in presenza di acido solforico, acido acetico o metanolo, ponti di tipo acetalico si formano tra i pendenti gruppi idrossilici delle catene di PVA. L'utilizzo di agenti reticolanti tuttavia comporta a prodotto finito la presenza di residui di reazione all'interno del materiale e la rimozione di tali eccessi, spesso tossici, comporta il dispendio di numerose energie e se il residuo non viene rimosso il gel non può essere utilizzato per applicazioni biomediche o farmaceutiche poiché potrebbe comportare il rilascio di agenti tossici con effetti indesiderati. Ad esempio il PVA viene spesso utilizzato come agente di rilascio controllato di farmaci, la presenza di sostanze terze all'interno della matrice di PVA potrebbero alterare l'attività biologica o degradare l'agente attivo volutamente presente nella matrice oltre ad avere effetti tossici per l'organismo. In questo lavoro di tesi è stato proposto di utilizzare come agente reticolante il trisodio-trimetatofosfato (STMP), un comune gelificante alimentare atossico.

Altri metodi di reticolazione chimica coinvolgono l'utilizzo di fasci elettronici o irradiazione con raggi- γ . Questa tipologia di metodi possiedono il vantaggio rispetto ai normali agenti reticolanti chimici di non rilasciare agenti tossici²¹. Oggigiorno sono stati studiati e sintetizzati idrogel di PVA da soluzioni acquose mediante l'utilizzo di raggi- γ (da sorgenti di ^{60}Co). Dai risultati è risultato che la dose di gelificazione minima è funzione del grado di polimerizzazione e della concentrazione del polimero in soluzione. Ulteriori studi mostrano che gel sintetizzati per irradiazione non contengono impurità e che la viscosità intrinseca ed il peso molecolare medio delle soluzioni acquose di PVA incrementa con la dose di irradiazione²². Un problema osservato con questa tecnica tuttavia è la formazione di bolle all'interno del campione. Problema riscontrato da molti ricercatori²⁰⁻²³ e malamente risolvibile.

1.3.2 Il polivinilpirrolidone

Il Polivinilpirrolidone (PVP), **Figura 3**, è un polimero costituito da monomeri di 1-vinil-2-pirrolidone, è solubile in acqua, alcool ed altri solventi polari. Inizialmente è stato utilizzato come succedaneo del plasma umano e successivamente per numerose applicazioni farmacologiche, mediche, cosmetiche ed industriali. Viene utilizzato anche come additivo alimentare, come stabilizzante ed anche per lo sbiancamento del vino bianco^{24,25}.

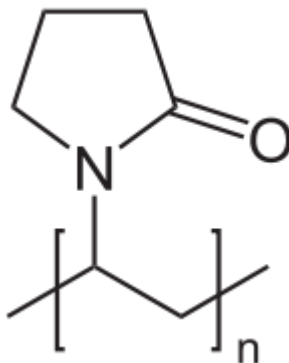


Figura 5 - Unità monomerica del PVP

Negli ultimi decenni la miscibilità di miscele di poli(vinil alcol) (PVA) e di poli(vinilpirrolidone) (PVP), è stata oggetto di approfondite indagini; è stato dimostrato mediante studi di risonanza magnetica nucleare di ^{13}C allo stato solido, l'esistenza di legami ad idrogeno tra le catene polimeriche dei due componenti, inoltre sono state studiate miscele di PVA/PVP mediante spettroscopia a raggi infrarossi ed è stato trovato che questo sistema contiene regioni organizzate, che sono state attribuite alla presenza dei legami ad idrogeno tra le catene di PVA-

PVA e PVA-PVP. La presenza di regioni organizzate o di microambienti è stato ipotizzato dipendere sia dalle diverse composizioni, che dalla densità delle interazioni dei legami ad idrogeno, che è definita come il numero di interazioni fra le catene di PVA e PVP per volume di campione. I diversi microambienti presentano rilassamenti che si verificano in tempi di rilassamento caratteristici, che sono collegati alla transizione vetrosa ed ai rilassamenti secondari. I rilassamenti secondari comportano movimenti rotazionali e vibrazionali da parte dei gruppi laterali delle catene o di piccoli segmenti della catena stessa. Basse energie e bassi cambiamenti di capacità termica sono associati a queste attenuazioni che si verificano a temperature inferiori alla Tg. Come conseguenza di queste caratteristiche, devono essere utilizzate tecniche particolarmente sensibili per questo scopo, come la risonanza magnetica, l'analisi dinamica meccanica (DMA), l'analisi dinamica dielettrica (DEA), ecc²⁶.

Viste le proprietà di elevata trasparenza ed elasticità dei polimeri PVA e PVP, è ipotizzabile un loro uso nell'ambito biomedico, come sostituenti del cristallino naturale.

1.3.3 La Gomma-Xantano

La gomma-Xantano (XG), è un polisaccaride extracellulare ad elevato peso molecolare (circa 3 MD) ottenuto dalla fermentazione di un carboidrato (glucosio o saccarosio) da parte di ceppi di batteri del gruppo *Xanthomonas*²⁷. Una delle fonti più comuni è la parete cellulare del lievito di birra (*Saccharomyces cerevisiae*); può essere estratta dalla crusca di alcuni cereali (avena e orzo), e, in misura molto minore dalla segale e dal frumento. Si presenta come polvere color crema solubile in acqua ed insolubile in etanolo.

La gomma-Xantano riconosce numerose applicazioni in campo alimentare, dove viene utilizzata come additivo addensante e stabilizzante, contrassegnato dalla sigla E415. Un'aggiunta minima di questo additivo (0.5-1% o meno) consente di aumentare moltissimo la viscosità di una bevanda o la consistenza di un alimento. La gomma-Xantano viene ad esempio utilizzata per la formulazione di salse, sughi e dessert, poiché grazie alle proprietà tixotropiche^d delle sue dispersioni questi prodotti possono essere riscaldati o refrigerati senza perdere la propria consistenza. Da un punto di vista reologico, la gomma-Xantano presenta quindi proprietà intermedie tra quelle di una soluzione e quelle di un gel a riposo.

La gomma-Xantano viene utilizzata anche nel campo dietetico e dell'integrazione alimentare, ad esempio per aumentare appetibilità, potere saziante e consistenza di alimenti "light" (poveri di grassi e calorie), dei prodotti da forno senza glutine e dei pasti sostitutivi in polvere.

^d La tixotropia o tixotropia è la proprietà di alcuni fluidi pseudo-plastici di variare la loro aeriformità quando sottoposti a sollecitazioni di taglio oppure nel caso di lunghi periodi di quiete o sottoposti a movimenti peristaltici. In queste condizioni il fluido può passare dallo stato di grasso pastoso quasi solido a quello di liquido o, più in generale, da quello di gel a quello di liquido.

In campo cosmetico e farmaceutico la gomma-Xantano si rivela un ottimo stabilizzante per sospensioni ed emulsioni (in sostanza impedisce la separazione dei vari ingredienti).

In campo farmaceutico, invece, la gomma-Xantano ad alto peso molecolare, viene spesso utilizzata come mezzo di trasporto e rilascio controllato di farmaci e come impalcatura (scaffold) per le cellule, grazie alla sua capacità di creare network sia chimici che fisici. In combinazione con altri polimeri, la gomma-Xantano è stata spesso utilizzata come eccipiente in compresse o come idrogel di supporto per sistemi di rilascio farmaci, grazie alla sua resistenza agli acidi gastrici^{28,29}.

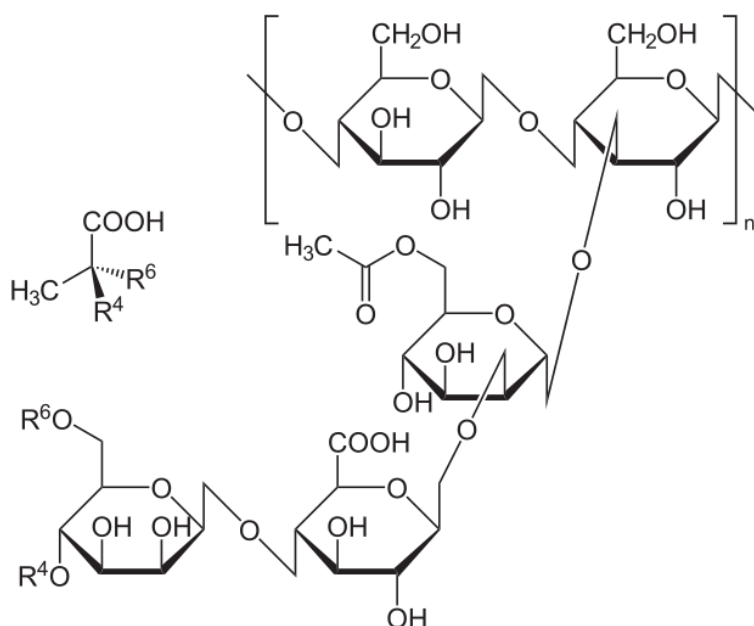


Figura 6 - Unità monomerica della gomma-Xantano

CARTILAGINE ARTICOLARE

Questa pagina è stata lasciata
intenzionalmente vuota

2.1 Cartilagine articolare

La cartilagine articolare è un tessuto sottile, stratiforme (**Figura 7**), di spessore compreso tra 0.5 e 5 mm, che ricopre le estremità articolari nelle *unità diartrodiali*^e.

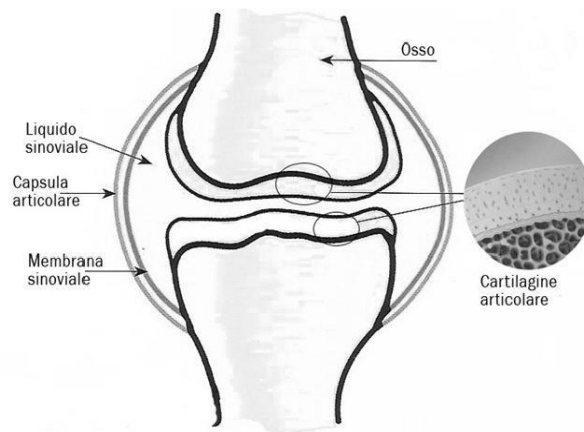


Figura 7 - Rappresentazione schematica di un'articolazione

La sua principale funzione biomeccanica è quella di sostenere e trasmettere il carico tra le ossa, permettendo, così, all'articolazione di avere un moto relativo lungo i diversi assi. È in grado di adempiere a tale funzione in virtù della sua composizione e struttura. La cartilagine è, infatti, un cosiddetto materiale “bifasico”, ovvero, costituito da una fase solida (condrociti, collagene, proteoglicani ed acido ialuronico) ed una fase liquida (fluidi ed elettroliti). Il principale componente della fase organica è il collagene di tipo II che costituisce mediamente il 50-80% del tessuto secco. I proteoglicani ad alto peso molecolare ($1 \cdot 10^6$ - $4 \cdot 10^6$ kDa) rappresentano l'altra grande porzione della fase organica.

La cartilagine articolare presenta una struttura gerarchica a varie scale di lunghezza: **scala molecolare** (1-100 nm), **scala ultra molecolare** (0.1-100 μ m) e **scala tissutale** (0.1-10 mm). A livello molecolare, il collagene è presente

^eUnità cartilaginee, soggette ad osteoartrosi, poste ai capi ossei delle articolazioni sinoviali.

sottoforma di tropocollagene, una molecola di circa 1.4nm di diametro e 300 nm di lunghezza. E' prodotto intracellularmente ed in seguito secreto nello spazio extracellulare, dove le unità base si assemblano a formare fibrille aventi un diametro da 20 a 200nm ed una lunghezza che può raggiungere alcuni millimetri. Le fibre di collagene reticolate tra loro formano un network stabile che gioca un ruolo principale per la resistenza del tessuto (**Figura 8**).

I proteoglicani (PG), composti da un cuore proteico dove le unità di glicosamminoglicani (GAG), principalmente condroitinsolfati e cheratensolfati, sono legati in maniera covalente (**Figura 8**), hanno una struttura ordinata con dimensioni che variano da 10 a 100 nm, e formano aggregati legandosi a lunghi filamenti di acido ialuronico. La dimensione di questi aggregati è variabile e può raggiungere 350 nm; essi contribuiscono alle proprietà meccaniche del tessuto.

A livello tissutale, il reticolo di collagene e i PG costituiscono un'unica fase in cui i componenti sono interpenetrati fra loro grazie all'instaurarsi di interazioni elettrostatiche e meccaniche. Il rapporto collagene/proteoglicani varia al variare della profondità del tessuto. In particolare, il contenuto di collagene è più elevato nelle zone superficiali e diminuisce di circa il 15% nella parte centrale e nelle zone più interne. Al contrario, il contenuto di PG è più basso in superficie e incrementa di circa il 15% nella zona più profonda. Interdispersa nel reticolo di collagene e PG, vi è la fase cellulare costituita dai condrociti. I condrociti hanno dimensioni dell'ordine delle decine di micron e sono ancorati sia al collagene sia ai proteoglicani. In un tessuto sano il contenuto cellulare è molto modesto (<5% del volume) e non contribuisce significativamente alle proprietà meccaniche della cartilagine ma gioca un ruolo fondamentale nella biosintesi dei componenti e nel rimodellamento del tessuto. Lo spazio interstiziale di questo tessuto complesso è riempito dalla fase liquida (fluidi ed elettroliti), il cui contenuto varia dal 60 all'85% del peso riflettendo, essenzialmente, le variazioni di collagene tra superficie e zona interna. Il movimento dei fluidi interstiziali, che percolano attraverso lo spazio interfibrillare (2-6 nm) della matrice, è guidato da differenze di pressione e controlla il trasporto dei nutrienti e dei cataboliti da e alle cellule e la conseguente funzionalità della cartilagine. Il risultato è un materiale auto adattativo capace di mantenere le sue funzioni biologiche per lungo tempo. La cartilagine articolare, da un punto di vista ingegneristico, viene definita un materiale straordinario, capace di funzionare per più di ottanta anni, praticamente senza attrito e resistendo all'usura mantenendosi perfettamente lubrificata³⁰.

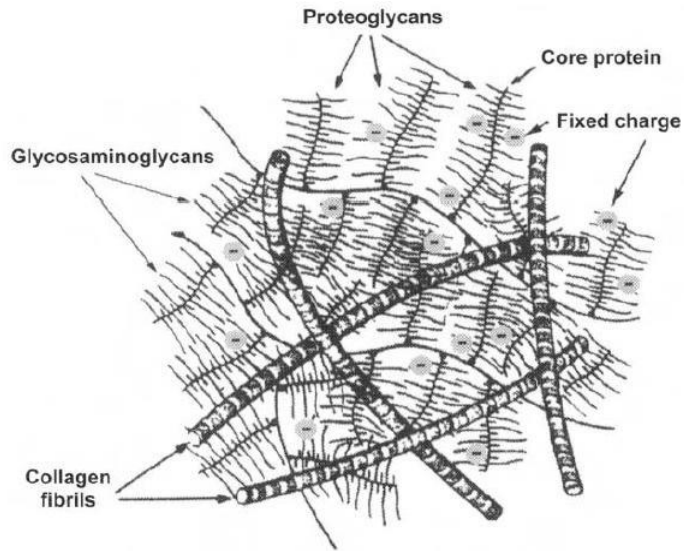


Figura 8 - Rappresentazione schematica della struttura della matrice extracellulare, in scala microscopica. I componenti fibrillari sono principalmente costituiti da fibrille di collagene del diametro di 20-200 nm con una lunghezza che raggiunge anche alcuni millimetri. Le catene idrofiliche dei proteoglicani sono ancorate al network di collagene ed aiutano a stabilizzarlo. I gruppi idrofobi delle catene dei proteoglicani sono parzialmente idrolizzati e parzialmente caricati negativamente; le cariche sono bilanciate da contro-ioni presenti nel fluido interstiziale¹

2.1.1 Degenerazione del tessuto cartilagineo

Le alterazioni cartilaginee prendono avvio dalla distruzione enzimatica della matrice extracellulare associata ad una diminuzione della sintesi dei proteoglicani e del collagene rendendo la cartilagine meno resistente alle forze compressive²⁵. Questa diminuzione della resistenza cartilaginea alla compressione, sommata alle alterazioni del collagene di tipo II, provoca importanti alterazioni strutturali delle fibre di collagene sovraccaricando le fibre di collagene rimanenti fino a determinare il loro collasso. La diminuzione della capacità elastica e la riduzione dell'area di contatto articolare favoriscono un'ulteriore regressione strutturale della cartilagine. La risposta biologica dell'osso subcondrale all'aumento del carico, provoca un aumento localizzato della vascolarizzazione e della densità cellulare e crea le condizioni ideali per l'insorgere dell'osteosclerosi^f, eburneazione ossea^g e cisti ossee, ovvero nell'insorgenza delle diverse forme di osteoartrosi o

^f Alterazione patologica del tessuto osseo che consiste in un addensamento della sua trama strutturale. Gli spazi midollari ne risultano ridotti e possono anche scomparire del tutto.

^g Processo fisiopatologico di superproduzione di osso compatto (di aspetto simile ad avorio), che porta a un ispessimento e, radiologicamente, a un addensamento o maggiore opacità dell'osso: si verifica in varie malattie (rachitismo, morbo di Paget, tumori).

osteoartrite (OA) che rappresentano una delle principali patologie dell'età adulta. Questa classe di patologie provocano dolore, infiammazione e rigidità articolari che sfociano in una notevole disabilità. Tra le artrosi delle articolazioni periferiche, quella che interessa il ginocchio, comunemente chiamata *gonartrosi*^{31,32}, è la più frequente. I sintomi inizialmente consistono in un leggero dolore al momento di effettuare un movimento in seguito a brevi tempi di riposo o dopo attività fisica; progressivamente si può sviluppare una *gonartrosi in varismo*, (interessamento del compartimento mediale) oppure una *gonartrosi in valgismo* (interessamento del compartimento laterale) e, successivamente, una *panartrosi* (interessamento l'intera articolazione). I pazienti che mostrano segni di gonartrosi lamentano dolori nel salire le scale, nello stare seduto con il ginocchio flesso o nel sollevarsi dalla posizione accucciata³³. In certi casi si può presentare una *sinovite*^h con versamento e tumefazione del ginocchio, in parte reversibile. Nell'artrosi avanzata, il dolore cronico del ginocchio con disfunzione articolare grave si accompagna ad ipotrofia muscolare, debolezza, decondizionamento e contrattura in flessione³²⁻³⁴. Pertanto, i pazienti soggetti ad OA richiedono aiuto ed assistenza nello svolgere la maggior parte delle normali azioni quotidiane, come salire le scale, percorrere lunghe distanze, occuparsi delle faccende domestiche e trasportare pesi, avendo, così, un enorme impatto sui costi della sanità³³.

Attualmente il trattamento dell'OA è puramente sintomatico e viene generalmente effettuato a base di FANS (Farmaci anti-infiammatori non steroidei), soprattutto in ragione della loro attività antiinfiammatoria e analgesica. I numerosi effetti collaterali provocati da questi farmaci, in particolare a carico delle mucose gastriche, sommati al loro effetto puramente palliativo, in quanto una volta innescato il processo degenerativo della cartilagine questo procederà fino alla sua completa degenerazione, hanno però indotto a sviluppare trattamenti alternativi, tra cui la realizzazione di materiali in grado di sostituire i tessuti.

2.1.2 Scopo

Lo scopo di questo lavoro è sintetizzare un nuovo materiale capace di mimare il tessuto cartilagineo che ricopre il piatto tibiale al fine di ottenere un potenziale sostituto a lungo termine.

Il poli(vinil alcool) (PVA), un polimero di natura sintetica notoriamente atossico e già impiegato in molte altre applicazioni biomediche, è stato utilizzato per la realizzazione del materiale. In questo lavoro il PVA è stato modificato tramite reticolazione chimica, allo scopo di ottenere un idrogel con proprietà simili, in termini di contenuto d'acqua e di proprietà meccaniche, al tessuto

^h La sinovite è l'infiammazione di una membrana (membrana sinoviale) che tappezza la faccia interna delle capsule articolari nelle articolazioni mobili. È caratterizzata da dolore, gonfiore e limitazione o impossibilità di compiere movimenti dell'articolazione interessata.

cartilagineo del piatto tibiale. Gli idrogel sono strutture tridimensionali a base di polimeri idrofili capaci di assorbire un gran quantitativo d'acqua pur rimanendo insolubili. L'utilizzo di questa categoria di materiali si presta facilmente alla sostituzione dei tessuti molli caratterizzati da elevati livelli di idratazione

Studi precedenti hanno dimostrato che utilizzando come agente reticolante il sodiotrimetafosfato, un agente completamente atossico e già ampiamente impiegato nell'industria alimentare, possono essere ottenuti idrogel a base di PVA le cui proprietà meccaniche dipendono strettamente dalla quantità di agente reticolante utilizzato³⁵. Variando il rapporto stechiometrico tra agente reticolante e polimero è possibile modulare le proprietà meccaniche e reologiche del materiale e conseguentemente il suo campo di applicazione³⁵⁻³⁷. Inoltre la reticolazione del PVA tramite STMP non produce sottoprodotti di reazione tossici o che possano produrre un effetto di mortalità cellulare nei tessuti circostanti e gli eccessi di reagente o sottoprodotti di reazione possono essere facilmente eliminati tramite lavaggio con acqua.

Il materiale ottenuto è stato sottoposto a caratterizzazione chimica tramite spettroscopia infrarossa e spettrometria di massa (TOF-SIMS) per verificare l'avvenuta reticolazione. L'analisi elementare e colorimetrica hanno fornito il grado di reticolazione. È stato inoltre determinato il grado di rigonfiamento, la stabilità termica (TGA) e la morfologia tramite microscopia elettronica a scansione (SEM) e calorimetria differenziale a scansione (DSC) .

Le proprietà reologiche e meccaniche dell'idrogel sono state determinate tramite test in regime statico e dinamico valutando la risposta delle matrici ai diversi carichi a cui potranno essere sottoposte in base all'applicazione prevista.

Infine la biocompatibilità del materiale è stata valutata tramite test di citotossicità cellulare *in vitro*.

Questa pagina è stata lasciata
intenzionalmente vuota

2.2 Pubblicazioni

Leone G, Volpato MD, Nelli N, Lamponi S, Boanini E, Bigi A, Magnani A. 2015. Continuous multilayered composite hydrogel as osteochondral substitute. J Biomed Mater Res Part A 2015;103A:2521–2530.

Continuous multi-layered composite hydrogel as osteochondral substitute

G Leone^a, MD Volpato^c, N Nelli^a, S Lamponi^a, E. Boanini^b, A. Bigi^b, A Magnani^a

Abstract

Cartilage is a highly organized avascular soft tissue that assembles from nano- to macro-scale to produce a complex structural network. To mimic cartilage tissue, we developed a stable multi-layered composite material, characterized by a tailored gradient of mechanical properties. The optimized procedure implies chemical crosslinking of each layer directly onto the previous one and ensures a drastic reduction of the material discontinuities and brittleness. The multi-layered composite was characterized by infrared spectroscopy, differential scanning calorimetry, thermogravimetry and scanning electron microscopy in order to compare its physico-chemical characteristics with those of cartilage tissue. The rheological behaviour of the multi-layered composite was similar to that of human cartilage. Finally its cytocompatibility towards chondrocytes and osteoblasts was evaluated.

Keywords: multi-layered hydrogel; PVA; STMP; nano-hydroxyapatite; cartilage

1. Introduction

Regenerative medicine is a thriving new area of multidisciplinary research that has the potential to revolutionize the treatment of diseased and damaged tissue. The ability to develop materials that can interface with tissues structurally, mechanically and bio-functionally is of importance to the success of regenerative

strategies [1]. Cartilage is a highly organized avascular soft tissue that assembles from nano- to macroscale to produce a complex structural network. It exhibits a disperse cell population, and a limited capacity for self-renewal. Even small chondral defects may necessitate surgical intervention and they would greatly benefit from the development of new materials able to fill the damaged area and integrate it with the surrounding tissue, preventing further degeneration and consequent osteoarthritis [2]. Suitable candidates should be versatile, implantable, biocompatible materials aimed to direct tissue regeneration, while providing adequate structural support. Increased understanding of tissue structure is leading to rational material design, targeted to mimic the underlying structure and specific chemistry of cartilage. Composite materials, obtained by the combination of polymeric hydrogels with inorganic phases, appear as a suitable solution to reproduce the complex structure and bio-functionality of cartilage tissue.

Polyvinyl alcohol (PVA)/calcium phosphate composites are among the most common biocompatible hydrogels proposed for cartilage tissue replacement [3-6]. PVA is a nontoxic, water soluble, biocompatible, and biodegradable polymer widely applied in the biomedical field. Thanks to their similarity to the mineral phase of bone, calcium phosphates, and in particular nano-crystalline hydroxyapatite (nHA), display excellent biocompatibility and bioactivity, which account for their widespread employment in the preparation of biomaterials for hard tissue substitution and repair [7]. However, several issues need to be still considered for cartilage application. First of all, a single composite material seems not to supply the best solution for mimicking the peculiar mechanical behaviour of cartilage tissue. A multi-layered multifunctional composite material with a gradient of mechanical properties can represent the most adequate approach. Generally multi-layered materials have been obtained by dipping, self-assembling procedures [8] or UV- radiation [9], but these techniques cannot guarantee a perfect control of crosslinking degree and, consequently, of mechanical properties. The foreseen application requires a stable material with suitable mechanical properties. The dipping strategy could be useful for obtaining structures devoted to the obtainment of time-dependent realising systems, or when strong rheological properties are not needed. On the contrary, materials with sufficient mechanical properties could be obtained by UV-irradiation. However, the modulation is not always achievable and these materials often present discontinuity zones between layers, which enhance stress and material brittleness.

In this paper we describe a procedure that enables control on the crosslinking degree gradient along the whole material thickness. Our strategy permits to chemically crosslink each layer directly onto the previous one, thanks to the maintenance of free functional groups on the polymeric surface. Thus, the multi-layered composite material can be obtained assembling and crosslinking consecutive polymeric layers. This procedure drastically reduces the material

discontinuities, and consequently its brittleness, and provides a stable multi-layered composite material characterized by a gradient of mechanical properties.

2. Materials and Methods

2.1 Materials

Polyvinyl alcohol (PVA: Mowiol® 20-98: Mw:125,000 Da), Tri-sodium tri-metaphosphate (STMP) and all the other reagents were purchased from Fluka Sigma Aldrich (Switzerland). All solvents used were of analytical or HPLC grade. Normal Human Articular Chondrocytes isolated from Knee (NHAC-Kn) as well as the NHAC-Kn bullet kit and all other reagents for cell cultures were supplied by Lonza. Normal Human Osteoblast (NHOst) as well as the NHOst bullet kit and all other reagents for cell cultures were supplied by Cambrex. Low Density Polyethylene (LDPE), negative control, and organo-tin stabilised polyurethane (ZDEC), positive control, were supplied from U.S. Pharmacopeia (Rockville-Maryland USA) and Gradko International Limited (UK), respectively.

2.2 Samples preparation

HA nanocrystals were synthesized through the reaction between 1.08 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ solution and an equal volume of 0.65 M $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ solution at 90 °C and pH 9, under Nitrogen flow [10] and then characterized by X-ray diffraction (PANalytical X'Pert PRO powder diffractometer, $\text{CuK}\alpha$ radiation, 40 mA, 40 kV) and transmission electron microscopy (TEM Philips CM 100 operating at 80 kV). The Ca/P molar ratio, determined by means of a Dionex DX100 chromatography system equipped with a Dionex CD20 conductivity detector, is 1.66, quite close to the stoichiometric value of 1.67. Surface area of nano-crystalline powder, measured by a Carlo Erba Sorpty 1750 BET analyzer, was 62 m²/g.

The multi-layered material (MSC) was obtained through a multistep procedure.

A 5% w/v solution of PVA was prepared in basified water (pH = 12, with NaOH 2 M; to guarantee alcoholate formation) at 120°C . The temperature was chosen to assure the rapid and complete dissolution of the polymer while preventing any decomposition. Then, the dispersed phase (nHA) was added. Three different amount of nHA were tested, in order to obtain nHA/PVA molar ratio of 0.020, 0.015 and 0.01. Finally, tri-sodium tri-metaphosphate (STMP), the crosslinking agent, was added in a molar ratio 1:1 with PVA (PS11HA). The reaction mixture was stirred for 2 h. The obtained hydrogel was then layered into a petri dish and the obtained soft film (first layer) was rinsed with large volumes of distilled water until no weight loss could be detected [11-12].

The best nHA/PVA molar ratio was identified through rheological analysis. The sample with the lowest ratio (nHA/PVA 0.010) showed poor rheological properties for the foreseen application. In fact, its complex modulus G^* was 1000 ± 25 Pa whereas both the other two samples, nHA/PVA 0.02 and nHA/PVA 0.015, showed a main G^* of about 22 ± 0.3 kPa, close to the human tibial cartilage G^* (G^* : 0.03 ± 0.003 MPa [13]). Thus, the sample containing the lower suitable amount of nHA (nHA/PVA molar ratio of 0.015) was chosen to realize the first layer of the multi-layered hydrogel.

The second and third layers were prepared without addition of the inorganic phase.

The second layer was obtained by crosslinking PVA directly on the surface of first layer, since the crosslinking procedure still maintains free functional groups on the polymeric surface. Firstly, the crosslinking agent solution was stratified, drop by drop, on the surface of the completely swollen first layer showing free alcoholate group; secondly, the polymer solution was deposited on it. The same PVA/STMP molar ratio of the first layer was maintained in order to obtain a second layer (PS11) with the same crosslinking degree of the first one. The same procedure was then applied to crosslink a third layer, which was produced with a greater PVA/STMP molar ratio (2:1). Each layer composition was chosen to obtain a multi-layered material with a gradient of water content and rheological properties similar to that of human cartilage [13;14]

2.3 Samples Characterization

For infrared absorption analysis in attenuated total reflection (ATR) mode, hydrogels were partially dried in the air and analysed using a Bruker ALPHA FT-IR spectrometer equipped with a diamond unit, to collect 64 scans in the range $4000-400$ cm^{-1} at a resolution of 4 cm^{-1} . Background correction was operated with OPUS software.

Thermogravimetric analysis (TGA) was performed on Q600 thermogravimetric analyzer (TA Instruments- Waters, USA). Samples (5-10mg) were put in a steel crucible and heated from room temperature to 650 $^{\circ}\text{C}$, with a rate of $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$, under air purge gas.

Differential scanning calorimeter (TA Q2000) was used to measure the crystallinity degree of dry hydrogels, the ice melting behaviour of the totally swollen hydrogels and their mesoporosity. For the crystallinity degree the following procedure was used: 5-10mg of PVA polymer, single layers (PS11HA, PS11, PS21) and MSC hydrogels were sealed in DSC aluminium pans and heated from room temperature to 270°C , with a rate of $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$. To measure the ice melting behaviour of the totally swollen hydrogels (both the single layers and MSC), the following procedure was used: 5-15 mg of swollen hydrogels, with

known degree of swelling and water content, were sealed in DSC aluminium pans cooled to -40°C and then heated to 40°C at a heating rate of 2°C/min [15].

To evaluate the hydrogels mesoporosity, 10–20 mg of each hydrogel were sealed in aluminium pans and one drop of the solvent was added to maintain the samples in an excess of solvent. They were first cooled to -60 °C and then heated up and kept isothermally at - 0.3°C for 10 min. Thereafter, the pans were cooled down to -60 °C at a rate of 0.2 °C/min, basing on the procedure reported by Iza et al. [16]. Based on DSC thermographs the pores radius was, then, calculated using the following equation (1):

$$R_p(\text{nm}) = -(64.67/\Delta T) + 0.57 \quad (1)$$

where ΔT is the shift in the triple point temperature.

The water content was determined by dipping a known amount of hydrogel (5 mg), in a thermostatic bath at 37 °C, in NaCl 0.9%. The weight of the sample was monitored until it reached the swelling equilibrium and the water content (WC) of the hydrogel was determined using the formula (2):

$$WC = 100 \times [(W_s - W_d) / W_s] \quad (2)$$

where the W_s and W_d are the weight of swollen and dried hydrogel, respectively.

The microporosity of hydrogels were analysed by scanning electron microscopy (SEM). For SEM analysis, the water swollen hydrogels (2.5 mg) were put in cryotubes, cooled by liquid nitrogen, lyophilised, mounted on SEM stubs and gold-sputtered by an automatic sputter coater (BAL-TEC SCD 050, Balzers, Germany). Samples were then observed by a XL20 SEM (Philips, The Netherlands) at 10kv accelerating voltage.

Rheological measurements (strain sweep analysis, oscillatory shear stress analysis and stress-relaxation analysis) were performed at 37 °C using a controlled strain rheometer (AR2000, TA Instruments, Leatherhead, United Kingdom). Completely swollen hydrogels (NaCl 0.9%) were analysed using two smooth and rigid flat circular plates, impermeable to fluid flow to reduce hydrogels dehydration during the analysis. Strain sweep tests, consisting in monitoring the viscoelastic properties while logarithmically varying the strain amplitude γ_0 , at a fixed oscillation frequency (0.001Hz, 1Hz and 20Hz), were performed on the hydrogels to determine the strain amplitude at which linear viscoelasticity is valid. The dynamic shear tests were performed subjecting the samples to a sinusoidal angular displacement. A dynamic frequency sweep test was performed with a shear amplitude of $\gamma_0=0.01$ rad over the physiological frequencies range (0.01-15Hz) with a 1% strain[17].

In addition to oscillatory tests, steady shear tests were conducted. In particular, stress-relaxation tests have been performed. 5, 20, 30 and 100% strains were imposed and the samples were permitted to relax for 600 s which is a complete stress-relaxation of the articular cartilage [18].

2.4 In vitro Human Osteoblasts and Chondrocytes viability and proliferation

The effect of hydrogels on Normal human chondrocytes (NHAC-Kn) and Normal human osteoblast (NHOst) viability was evaluated following the direct contact test. This test, proposed by “ISO 10993-5 Biological evaluation of medical devices – Part 5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods” [19], is suitable for samples with various shapes, sizes or physical states.

Normal human osteoblast (NHOst) were cultivated in Osteoblast Basal Medium (OBM) and incubated at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂.

Normal human chondrocytes (NHAC-Kn) were grown at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ in Chondrocytes Growth Medium (CGMTM) containing both Chondrocytes Basal Medium (CBM) and CGMTM SingleQuotsW Supplements and Growth Factors. Moreover, the following additional reagents were added to the medium: sodium alginate, ascorbic acid, CaCl₂, NaCl and sodium citrate solution. Once at confluence, the cells were washed with HEPES-BSS and detached with trypsin-EDTA solution. Trypsin neutralising solution was added to the cell suspension which was then centrifuged at 270 rcf for 5 min at room temperature. The pellet was re-suspended in complete specific medium (dilution 1:15).

The hydrogel samples were previously sterilized by incubation in 70% ethanol for 20 min and left to dry at room temperature. Then, 1mL of complete medium containing 1.5×10^4 cells was put on the bottom of each well of a 24-wells tissue culture plate and each hydrogel sample ($\Phi=15$ mm) was stratified onto the cell layer. In order to prevent unnecessary movement of the specimens, as this could cause physical trauma to the cells, each sample was covered and fixed by a co-culture insert having a PET membrane with pores of $\Phi = 0.4$ mm (Falcon, USA). Cell viability after 1, 3 and 7 days of contact with the sample was evaluated by NRU assay, following a procedure previously reported [20]. The samples were set up in triplicate for each time.

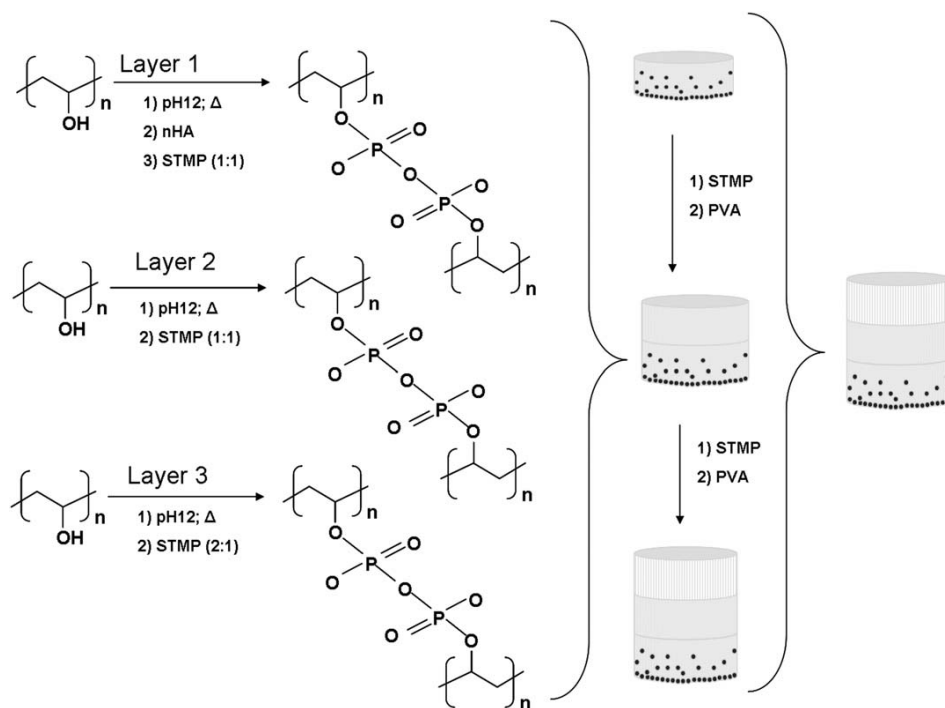
Bone Alkaline Phosphatase (BALP, Metra BAP EIA kit, Quidel, CA, USA) was tested on supernatants immediately after collection. The measured concentration was normalized by cell number.

Multiple comparisons were performed by one-way ANOVA and individual differences tested by Fisher's test after the demonstration of significant intergroup differences by ANOVA. Differences with $p < 0.05$ were considered significant.

3. Results

3.1 Sample preparation

The procedure developed in this study allows to obtain a multi-layered hydrogel by assembling the three layers directly one onto the other, thus avoiding discontinuity points (Scheme 1). The solution concentration, the pH and the temperature values are critical factors.



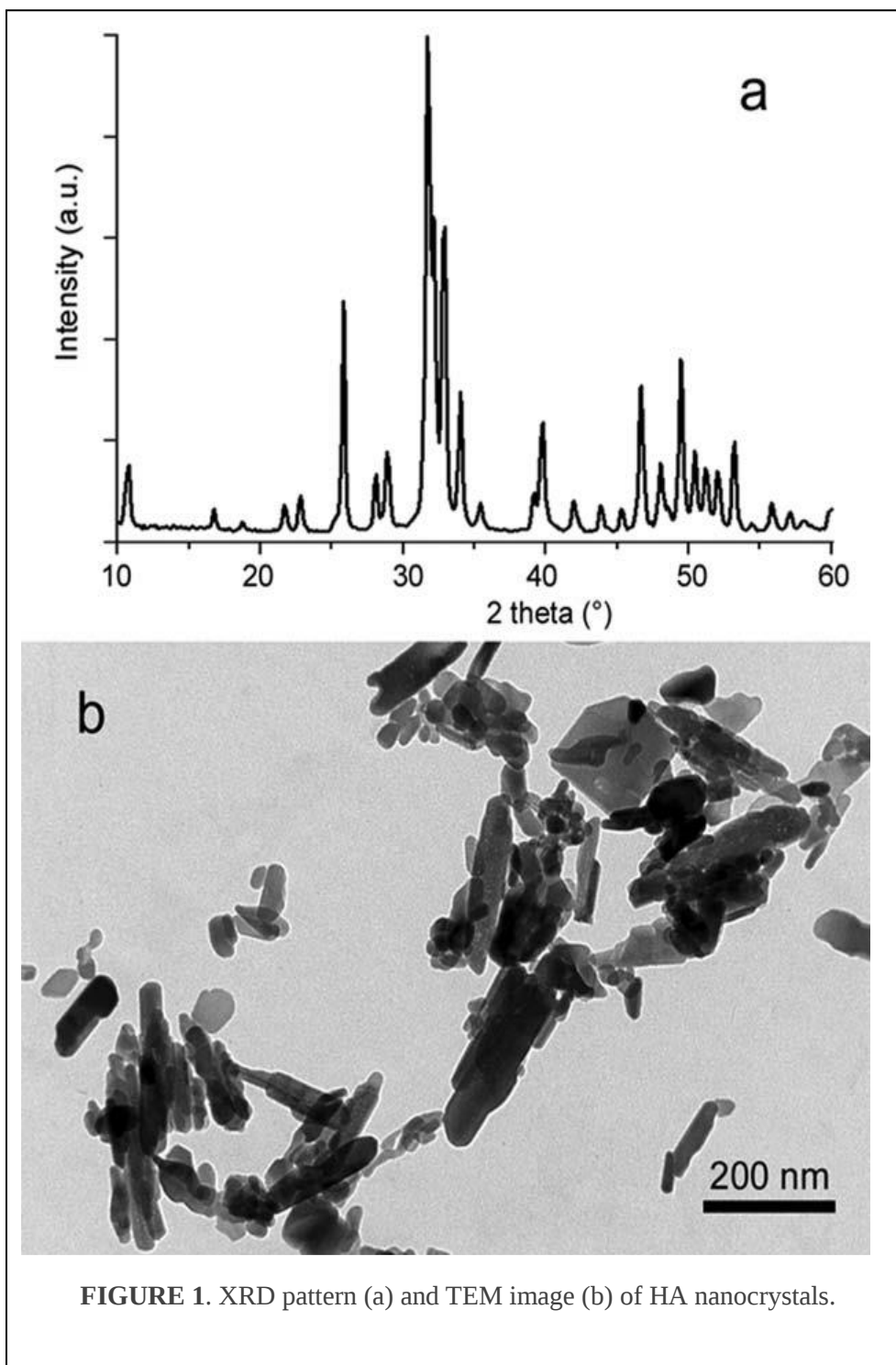
SCHEME 1. Realization of multi-layered material by three steps.

Previous studies pointed out that a phosphorylated polymer can be obtained starting from a 1% w/v polymer solution [21] whereas the use of a more concentrated solution guarantees the formation of a crosslinked network [22]. High pH (pH=12) and temperature (120°C) are necessary to get alcoholate groups along PVA chain and complete and fast dissolution of the native polymer, respectively. Lower pH values provoke a drastically decrease of both final crosslinking degree and material yield affecting also the reactivity of STMP [23]. Similarly, lower temperature did not permit to obtain a homogenous solution.

Once obtained, the first layer PS11HA was stratified on a glass petri dish; then the STMP solution was stratified onto its surface, which still contains some free alcoholate groups. The successive drop wise addition of the polymer solution provoked instantaneous crosslinking, and produced a bi-layered material. The same procedure was used to crosslink the third layer onto the second one.

The first layer (PS11HA) was synthesized with the highest stoichiometric crosslinking degree to obtain a rigid layer with a water content (W.C. $63\pm3\%$) similar to the deepest layer of cartilage tissue (i.e. water amount $\approx 60\%$ by weight [14]). The enrichment with hydroxyapatite was aimed to favour the interaction with the hard bone tissue. To this aim, we used hydroxyapatite nanocrystals, characterized by a high degree of crystallinity, as shown by the sharpness of the characteristic X-ray diffraction reflections (Figure 1a), and mean dimensions of about 200×40 nm (Figure 1b).

The nHA /PVA molar ratio of 0.015 was chosen to realize the multi-layered hydrogel since it contains the lowest amount of nHA which guarantees the required rheological properties, as reported in the experimental section. The uppermost layer (PS21), being softer and richer of fluid than the previous layers, appears to be the most compatible with the soft cartilage tissue showing a water content (W.C. $83\pm4\%$) comparable to the uppermost layer of cartilage (i.e. water amount $\approx 85\%$ by weight [14]). Finally, the intermediate layer (PS11) was introduced to create a suitable bridge between the softer and the more rigid external layers.



3.2 Sample characterization

ATR-IR spectra of nHA-free layers display the absorption bands characteristic of PVA [20], together with those due to STMP, as shown in Figure 2 for PS21. In particular, the bands centred at about 1092 cm^{-1} has been ascribed to the stretching vibration of the P-O-H whereas the bands centred at 1291 cm^{-1} and 916 cm^{-1} can be related to P-O-P and P-O-C systems, respectively [24-25]. The inorganic phase in the spectrum of PS11HA can be detected from the presence of the absorption bands in the $1100\text{--}500\text{ cm}^{-1}$ range. In fact, the ATR-IR spectrum of nHA (Figure 2) displays the characteristic bands corresponding to the vibrational modes of phosphate group at 1088 , 1023 , 962 , 600 , 561 cm^{-1} , together with the absorption bands at 3572 and 630 cm^{-1} due to OH stretching and out-of-plane bending mode, respectively [26-27]. With the exception of the OH band at 3572 cm^{-1} , most likely obscured by the superimposed broad band of PVA, all the other nHA absorption bands are clearly distinguishable in the spectrum of PS11HA (Figure 2). Enlargement of the spectra relevant region shows that the ν_3 phosphate stretching frequency at 1023 cm^{-1} shifts to 1031 cm^{-1} in the spectrum of PS11HA, which might be due to interaction of the inorganic phase with PVA.

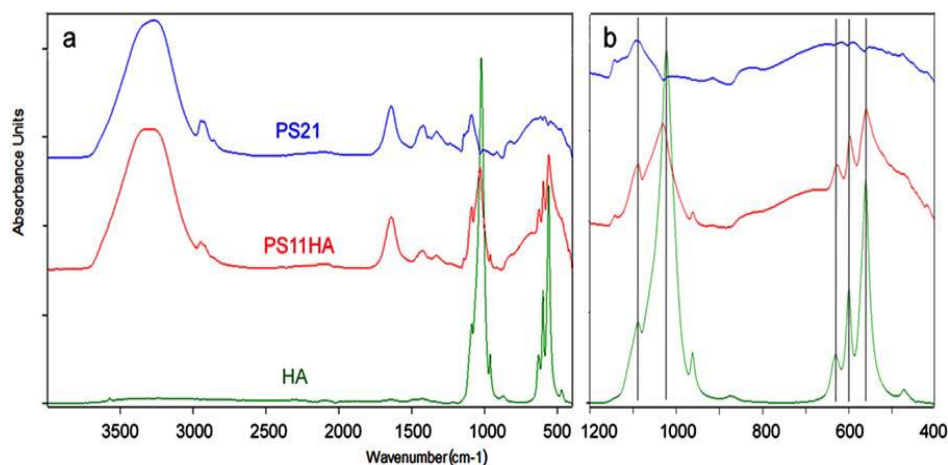


FIGURE 2. (a) ATR-IR spectra of PS21 and PS11HA layers compared with that of nHA. (b) magnification of the $1200\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ region of the spectra, where it is possible to appreciate the shift of the ν_3 phosphate stretching frequency from 1023 cm^{-1} in the spectrum of nHA to 1031 cm^{-1} in the spectrum of PS11HA. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

Thermal behaviour

The thermographs of the different hydrogel layers and of the multi-layered material are reported in Figure 3.

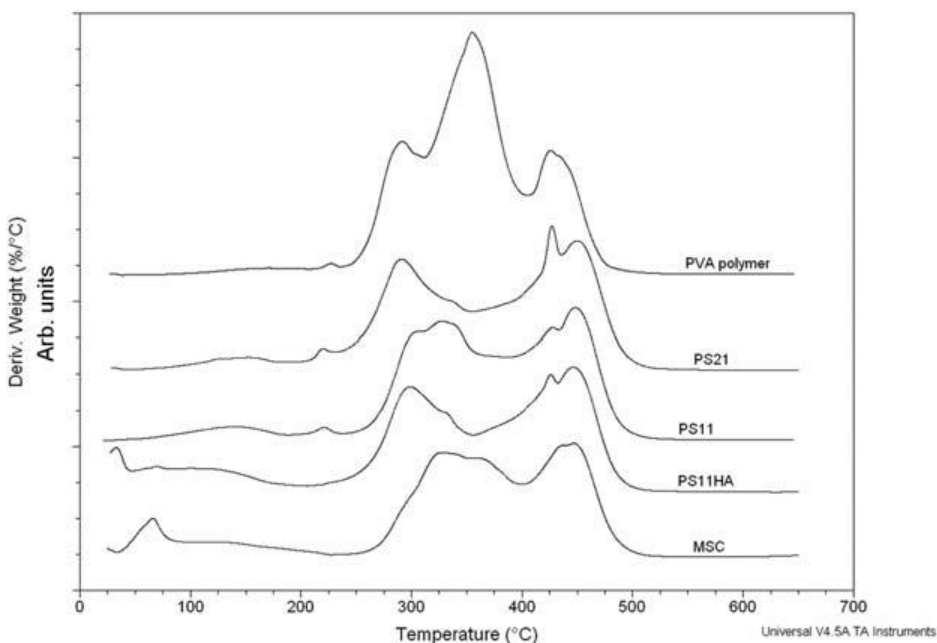


FIGURE 3. thermographs obtained plotting the derivative of weight versus temperature (temperature range: 30–650 °C) of PVA polymer, PS21, PS11, PS11HA, and MSC.

They show three regions of weight loss. The first region ranges from 30 °C to 200 °C and it is related to the evaporation of water strictly bound to the material. In the region 200–400 °C the degradation of aliphatic carbon chains is generally observed, whereas the third region (400–600 °C) can be related to the backbone cleavage (carbonation phase) [28]. The data indicate that the increase of crosslinking degree significantly increases the percentage of water bound to the matrix, due to the rise of hydrophilic arms. In fact, in the first range, the highest weight loss was observed for the MSC followed by the single layers in the following order: PS11HA, PS11 and PS21. Moreover, the effect of the crosslinking degree on the matrix thermal stability was evaluated from the ratio (R) between the weight losses in the 200–400 °C and in the 400–600 °C regions. R was about 3.2 for pristine PVA whereas it significantly decreases in PS21 (1.8) and in PS11 (1.5). The presence of nHA induces a further decrease of R down to 1.3 (PS11HA) or 1.4 (MSC). A decrease of the R value means that the polymeric material degradation occurs mostly in the 400–600 °C range, i.e. during the carbonation phase, thus suggesting an increased thermal stability of the aliphatic carbon chains as a consequence of crosslinking. Moreover, all the crosslinked

matrices showed a higher carbonation temperature (about 447 °C) than the native polymer (425 °C).

The DSC analysis permits to quantify the percentage of crystallinity by the enthalpy of melting, which is the third relaxation in the 200–250 °C temperature range [29]. The heat required to melt a 100% crystalline PVA is 138.6 J/g [30]. Obviously, in this analysis, the presence of nHA and crosslinking arms should be considered in order to correctly evaluate the information on the degree of crystallinity. The comparison of the thermographs of all the hydrogels, reported in Figure 4, highlights a general trend: all the crosslinked matrices showed a lower degree of crystallinity with respect to the native polymer.

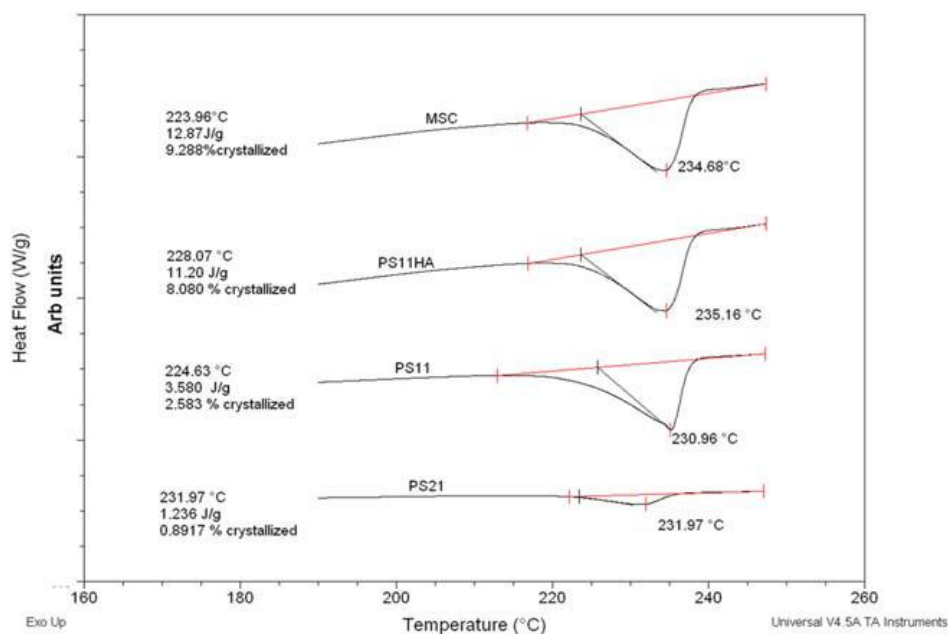


FIGURE 4. DSC thermographs melting profiles (up to down: MSC;PS11HA; PS11 and PS21). [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

The treatment to which the polymer is subjected during the crosslinking process, as already reported [12], drastically decreases the crystallinity due to the breakdown of the pre-established chains order. Accordingly, the PS21 layer shows a very low degree of crystallinity. On the other hand, the intermediate PS11 layer exhibits a slightly greater melting enthalpy than PS21, which might be due to the higher order of the chains induced by the greater crosslinking degree. The presence of nHA provokes an enhancement of the degree of crystallinity, as testified by the value of the melting enthalpy, which is significantly higher than

those of the HA-free layers, as well as by the melting temperature, which is close to that of MSC.

Water content

As previously described [12], the three regimes into which water can be distinguished, namely non-freezing water, bound-freezing water and freezing water (or bulk water) were quantified by DSC [15]. The weight of completely swollen hydrogels (WSG) and the total weight of water inside the network (WH) were detected by TGA. WH is the sum of freezing (WfH) and non-freezing (WnfH) water weights. The analysis of the DSC endothermic melting profiles of the frozen hydrogels together with that of bi-distilled water (from which the latent heat ΔH was derived), allowed to evaluate the enthalpy of melting of each single hydrogel (ΔH_m). The freezing water (WfH) was, then, obtained from the equation $WfH / WSG = \Delta H_m / \Delta H$, whereas the non-freezing water was calculated from $WnfH = WH - WfH$.

The presence of a double peak for totally swollen hydrogels permitted to subdivide the freezable water into bound- freezing water and free water, respectively. All the data are reported in Table 1.

On increasing the crosslinking degree, the amount of no- freezing water does not significantly increase. On the contrary, a major effect is played by the presence of hydroxyapatite, which provokes a rise in Wnf of about 3 times. No significant differences are observed between the MSC and PS11HA layer. Similarly, the percentage of bound-freezing water increased with the presence of nHA, which may act as a physical crosslinking agent.

Table 1: Non-freezing water, bound freezing water and freezing water (or bulk water) quantified by DSC for mono-layered ydrogels (PS21, PS11 and PS11HA) and multi-layered hydrogel (MSC) (n = 5)

	TGA		DSC		WfH/WSG= $\Delta H_m / \Delta H$
	WSG [#]	WH ^a	ΔH_m^b	WfH ^c	Wnf ^f
11HA	20.3±0.5	15.4±0.2	231.2±0.7	14.1± 0.3(92±2%); wff ^d :67±2%; Wfb ^e :33±2%	1.3±0.1 (8±2%)
11	11.9±0.7	9.7±0.1	260.5±0.9	9.4±0.1 (97±1%); wff ^d :75±1%; Wfb ^e :25±1%	0.3±0.1 (3±1%)
21	6.7±0.4	5.8±0.3	283.3±0.4	5.7±0.2 (98±1%); wff ^d :81±1%; Wfb ^e :19±1%	0.101±0.02 (2±1%)
MSC	9.3±0.2	6.1±0.1	175.3±0.2	4.9± 0.1(80±1%); wff ^d :64±1%; Wfb ^e :36±1%	1.2±0.8(20±1%)
water	/	/	332.4±0.1*	/	/

[#]: weight of total swollen hydrogel (mg); ^a: total water (mg) determined by heating each sample in the temperature range:30-120°C.; ^b: enthalpy of melting (J/g) ; ^{*}: latent heat (frozen water) (J/g); ^c: freezing water (mg); ^d: percentage of free freezing water; ^e: percentage of bound freezing water, obtained following the procedure reported by Li, et al.[13]. ;^f: not freezing water (mg)

Hydrogel morphology

The hydrogel structure plays a key role in its swelling behaviour, in other words its macroscopic behaviour depends on its complex microscopic structures. The structure of the hydrogels was analysed following a previously reported procedure, which combines SEM and DSC techniques. The former technique provides information on the microscale structure whereas the latter one allows to verify the presence of mesoscale porosity and to measure its mean size [16]. The results of SEM analysis are summarised in Figure 5, which reports the images of the cross section of each single monolayer and of MSC. In particular, sample PS11 showed a compact structure, with only few heterogenous micropores. Sample PS21 showed a more diffuse microporosity even if can be observed porous regions and compact regions. The presence of nHA (PS11HA and MSC) seems to favour the formation of a diffuse homogeneous microporosity along the sample.

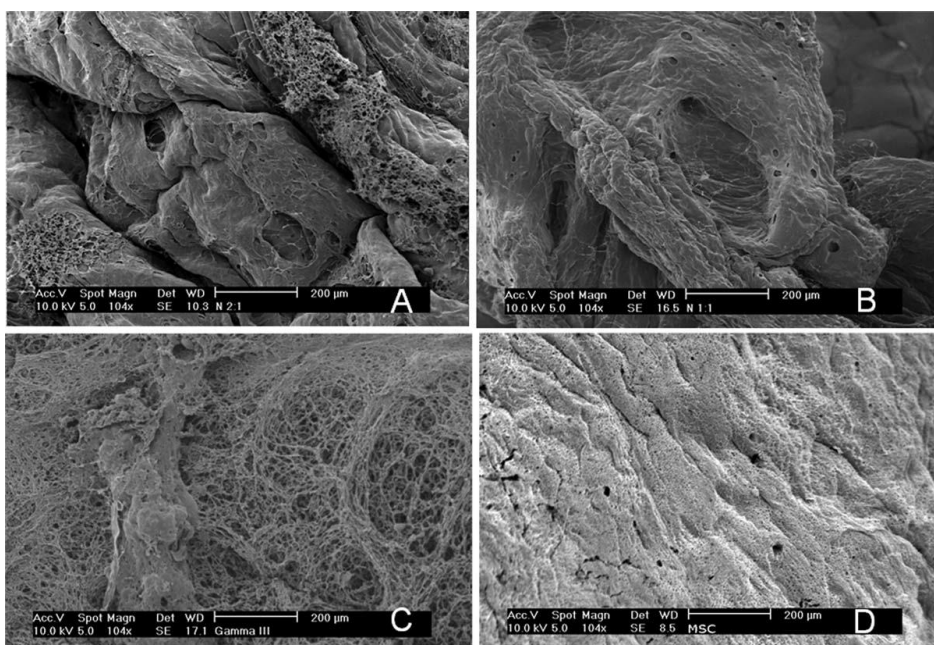


FIGURE 5. SEM micrographs: a: sample N 2:1 corresponding to PS21 mono-layer hydrogel; B: sample N 1:1 corresponding to PS11 mono-layer hydrogel; C: sample gamma III corresponding to PS11HA mono-layer hydrogel; D: sample MSC corresponding to multi-layered hydrogel.

The measured mesopore sizes of all the samples are reported in Table 2.

Table 2: Mesopore radius values for mono-layered hydrogels (PS21, PS11 and PS11HA) and multi-layered hydrogel (MSC) (n = 5)

	Rp (nm)
PS21	18.2±0.3
PS11	9.70±0.03
PS11HA	8.97±0.04
MSC	6.36±0.02

The pore radius significantly decreases on increasing the crosslinking degree. Thus, we can suppose a decrease of the specific surface area, according to the swelling behaviour of the analysed samples. The lowest value of R_p is observed for MSC in accordance with the increase of the crosslinking degree in the multi-layered material with respect to the single layered materials (PS11HA, PS and PS21). In fact, MSC contains additional crosslinking regions, due to the crosslinking of each subsequent layer onto the surface of the previous one during multilayer assembly. These additional crosslinks sum up to those present through the structure of each single layer. Thus, in the multi-layered composite material a “vertical” crosslinked structure is superimposed to the “horizontal” one .

Mechanical Properties

The most relevant loading mode in articular cartilage is dynamic. The viscoelastic properties of cartilage can be distinguished in two components, the intrinsic viscoelastic properties of the network and the flow-dependent viscoelastic properties. The former are due to the macromolecular rearrangement induced by shear stress whereas the latter is related to the fluid flow induced by the compression and guaranteed by the mesopores network. Oscillatory shear experiments and the resulting mechanical spectra, are currently used to demonstrates the gel character, and to discriminate between different classes of gels such as entanglements networks ($G'' > G'$) or covalently crosslinked gels ($G' > G''$) [31].

The frequency sweep tests confirmed the chemically crosslinked strong gel-like structure of all the samples. In fact, all of them showed a G' modulus greater of about one order of magnitude than the G'' modulus. Figure 6 reports the values of G^* modulus for all the samples.

The values obtained for PS21 are significantly different from those of PS11, whereas the presence of HA induces a negligible effect on the rheological performance of the material, suggesting a stronger effect of the crosslinking

degree (chemical crosslinking) with respect to the presence of inorganic component (physical crosslinking). Moreover, G^* drastically increases in MSC which can be justified, as already suggested, by the presence of crosslinking regions among the three differently crosslinked layers. As pointed by Wong et al [13] femoral and tibial cartilages are subjected to different shear deformations thus reflecting in different stiffness. In particular, the shear modulus of FC (femoral cartilage) was $0.22 \pm 0.11 \text{ MPa}$ which was 7-fold higher ($p < 0.05$) than that of TP (tibial plateau) cartilage ($0.03 \pm 0.003 \text{ MPa}$). MSC shear modulus reached a value close to the cartilage (G^* : $0.03 \pm 0.003 \text{ MPa}$ [13] in the tibial region).

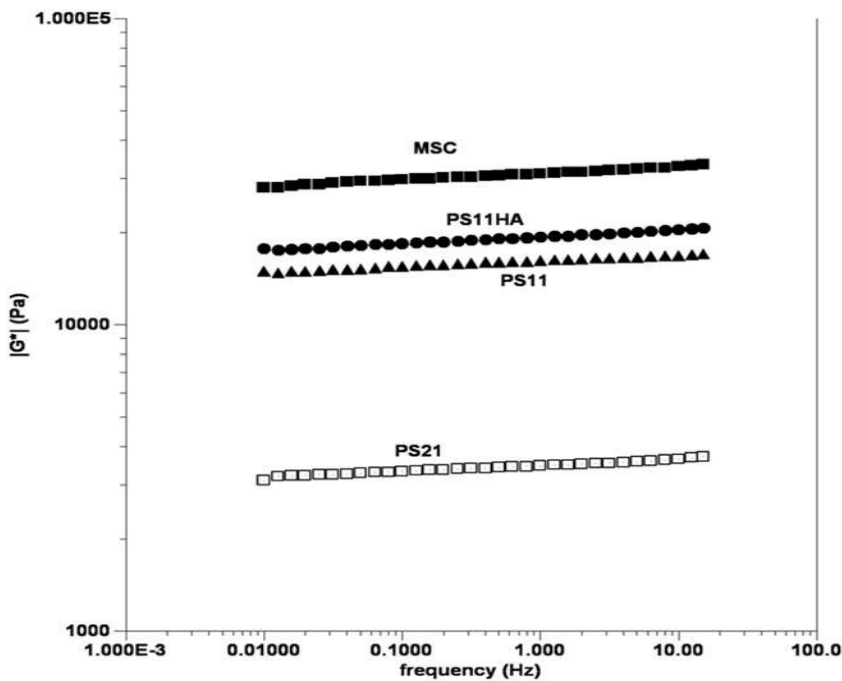


Figure 6: Complex modulus: G^* of PS21 (G' : $3350 \pm 170 \text{ Pa}$; G'' : $460 \pm 40 \text{ Pa}$); PS11 (G' : $18540 \pm 570 \text{ Pa}$; G'' : $1540 \pm 68 \text{ Pa}$); PS11HA (G' : $21964 \pm 647 \text{ Pa}$; G'' : $2579 \pm 367 \text{ Pa}$) and MSC (G' : $32350 \pm 321 \text{ Pa}$; G'' : $3650 \pm 80 \text{ Pa}$) determined at 37°C in the frequency range 0.01-15 Hz ($n = 5$).

The stress-relaxation behaviour was also analysed. Four different strain percentages were evaluated. Applying the highest strain percentage a complete recovery was obtained after 500s which is the time necessary for cartilage tissue to completely recover a deformation [18]. Moreover, a 70% recovery was obtained after just 0.1 second, as it occurs for the cartilage tissue, thus showing an optimal accommodative behaviour (Table3).

Table 3: Stress-relaxation values for mono-layered hydrogels (PS21, PS11 and PS11HA) and multi-layered hydrogel (MSC) at different strain percentage (n = 5)

	Strain%	Peak max (Pa)	Relaxation % after 0.1s	Relaxation % after 500s
PS21	5	1104±121	75±3	92±1
	20	4517±103	92±1	97±1
	30	6400±256	94±2	98±1
	100	11210±981	96±1	99±1
PS11	5	1149±99	52±7	75±2
	20	4626±369	69±3	90±4
	30	6537±542	72±1	93±1
	100	11490±1069	82±4	96±2
PS11HA	5	1639±341	48±5	73±5
	20	6246±352	63±2	90±1
	30	7931±996	65±4	91±1
	100	11530±1100	77±3	94±3
MSC	5	2929±301	50±2	73±6
	20	9177±145	64±3	90±1
	30	11250±860	69±2	91±2
	100	11700±1256	71±4	92±3

3.3 In vitro Human Chondrocytes and Osteoblasts viability and proliferation

MSC cytotoxicity and bioactivity on Normal Human Osteoblasts and Articular Chondrocytes was assessed. These cell lines were chosen according to the end-use of the developed material. In particular, the MSC material should be in strict contact with osteoblast on one side (layer PS11HA) and with chondrocytes

(cartilage) on the other side (PS21). The growth of cell lines as a function of incubation time (1, 3 and 7 days) is reported in Figure 7A and B. Data show a time dependent cell growth. In fact, the amount of viable cells increases by increasing the contact time with the sample. No toxic effect towards osteoblasts or chondrocytes was observed. A slightly statistically significant, difference among the percentage of cells in contact with negative control (LDPE) and MSC is observed after 24 hrs of incubation. Nevertheless, after 3 and 7 days of incubation, cell density in the presence of the samples is not statistically different ($p < 0.05$) in comparison with the negative control demonstrating that MSC did not hinder osteoblast and chondrocyte cells proliferation.

Moreover, the production of BALP, which is an established marker for osteoblast phenotype and activation, was evaluated for the MSC sample and compared with PS11 (nHA free). The increase of BALP in the osteoblast culture is considered an early expression of a more differentiated state of cells. An increased BALP production can be observed for MSC (layer PS11HA) in comparison with control and PS11 (nHA free) sample (Figure 7C), thus underlining the important role of nHA.

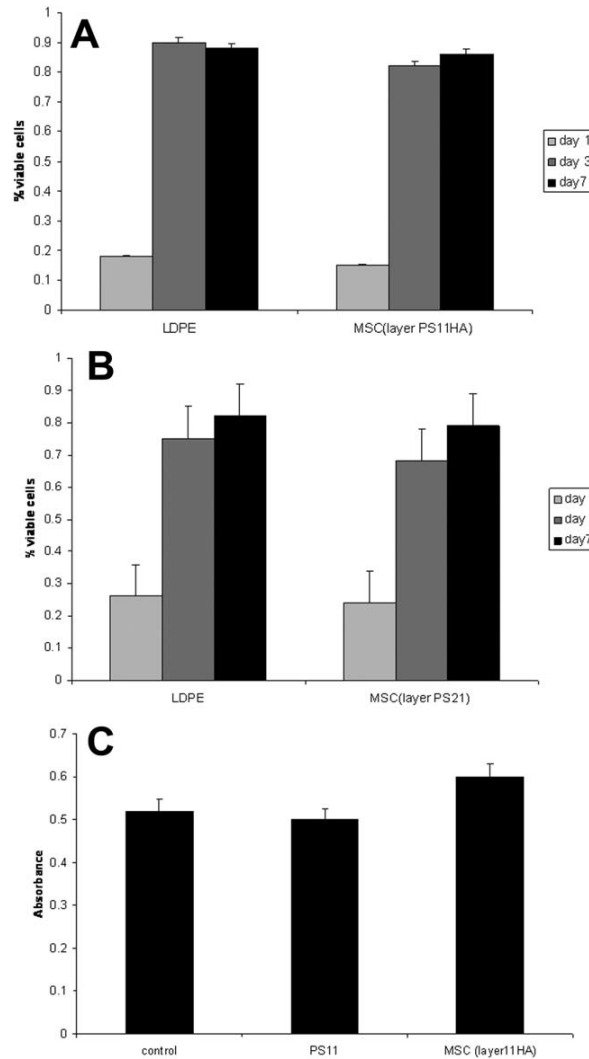


Figure 7: Percentage of viable cells as a function of incubation time evaluated by the Neutral Red Uptake assay: A: Normal Human Osteoblasts in contact with MSC (PS11HA layer) surface; B: Normal Human Articular Chondrocytes in contact with MSC (PS21 layer) surface as a function of incubation time evaluated by the Neutral Red Uptake assay. Data are means $\pm$ SD of three experiments run in triplicate, $p < 0.05$. Only, the negative control (low density polyethylene) is reported. The positive control (organo tin-stabilised polyurethane) has not been reported because the percentage of viable cells is 0%; C: BALP production in supernatants collected from MSC (PS11HA layer) and from PS11 (nHA free sample) hydrogels.

4. Discussion

The procedure described in this work was aimed to obtain a material which mimicked the variability of the cartilage tissue. To fulfil this target a multi-layered hydrogel characterized by a gradient of chemical, physical and mechanical properties was designed. In fact, as reported in the previous sections, the composition of each single layer was chosen in order to fulfil a specific role. The first layer (PS11HA), the one with the highest stoichiometric crosslinking degree and enriched with nHA, was thought to be a rigid layer with a water content similar to the deepest layer of cartilage tissue and a chemical composition close to the bone tissue with which it has to interact. The uppermost layer (PS21), the one with the lowest stoichiometric crosslinking degree, on the contrary, was thought to be a soft layer, thus more compatible, in terms of water content and structure, with the uppermost layer of cartilage. As pointed out by the data reported in previous sections, the first layer (PS11HA) showed a water content similar to the deepest layer of cartilage tissue ($63\pm3\%$ vs 60% by weight for the cartilage tissue [14]), whereas the uppermost layer (PS21) showed a water content comparable to the uppermost layer of cartilage ($83\pm4\%$ vs $\approx 85\%$ by weight for cartilage [14]).

The increasing crosslinking degree, verified by thermogravimetric analysis, was reflected in an increase of the crystallinity degree. In particular, the PS21 layer, which should display a lubricant role, shows a very low degree of crystallinity, as detected by DSC measurements, thus guaranteeing the required elasticity and accommodative action. On the other hand, the presence of nHA (PS11HA) provokes an enhancement of the degree of crystallinity which should imply an increase of the brittleness and stiffness of the matrix. This would be appropriate for the layer that should be in contact and interact with subchondral bone.

It is well known that hydrogel macroscopic behaviour depends on its complex microscopic structures. Thus the hydrogel morphology, analysed by a combination of SEM and DSC techniques, was also affected by the crosslinking degree gradient along the multi-layered hydrogel. It is interesting to note that MSC shows a mesoporous structure which strictly resembles that of articular cartilage, where interstitial fluid percolates through the interfibrillar space (2-6 nm) of the matrix, and its movement and distribution controls not only the transport of nutrients and metabolic waste to and from the cells and tissue homeostasis, but also regulates the mechanical response of the articular cartilage [14].

The obtained multi-layered material showed a rheological behaviour close to the cartilage tissue both in terms of shear modulus (G^* : 0.03 ± 0.003 MPa [13] in the

tibial region) and stress-relaxation capability reaching a 70% recovery after just 0.1 second, as it occurs for the cartilage tissue.

Furthermore, the developed procedure, using an approved polymer, i.e. PVA, a food additive as crosslinking agent, i.e. STMP, and aqueous solvents permits to obtain a material which has no toxic effect towards osteoblasts or chondrocytes. As pointed out in the 3.4 paragraph, after 3 and 7 days of incubation, cell density in the presence of the sample is not statistically different ($p < 0.05$) in comparison with the negative control demonstrating that MSC did not hinder osteoblast and chondrocyte cells proliferation.

5. Conclusion

The developed multi-layered composite hydrogel can be considered a promising potential substitute for damaged cartilage tissue, since it mimics the gradient of water content and mechanical properties typical of cartilage tissue. In fact, the lower and the uppermost layers of MSC showed a water content comparable to that of the deepest and the highest cartilage layers, respectively (PS11HA: $63 \pm 3\%$ vs cartilage: $\approx 60\%$; PS21: $83 \pm 3\%$ vs cartilage $\approx 85\%$). Furthermore, the multi-layered material displays rheological properties strictly comparable with those of cartilage in terms of complex modulus (MSC: G^* : 0.032 ± 0.003 MPa; cartilage: G^* : 0.03 ± 0.003 MPa [13]) and recovery. In fact, MSC showed a 70% recovery after just 0.1 second, as it occurs for the cartilage tissue.

The presence of nano-hydroxyapatite in its bottom layer should stimulate the adhesion to bone, whereas the uppermost soft layer should represent an ideal environment for interaction with cartilage guaranteeing a lubricant action. This hypothesis is supported by the good cytocompatibility shown by MSC (layer PS21) and MSC (layer PS11HA) towards chondrocytes and osteoblasts, respectively, and by the increased BALP production in samples containing nHA in comparison with samples without nHA.

References

1. Griffith LG, Naughton G. Tissue engineering: current challenges and expanding opportunities. *Science* 2002; 95:1009-1014.
2. Poole AR, Kojima T, Yasuda T, Mwale F, Kobayashi M, Lavery S. Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair. *Clin Orthop Relat Res* 2001; S26-S33
3. Zhang D, Duan J, Wang D, Ge S. Effect of Preparation Methods on Mechanical Properties of PVA/HA Composite Hydrogel. *J Bionic Eng* 2010; 7: 235-243.
4. Zhang D, Chen K, Wu L, D Wang D, Ge S. Synthesis and Characterization of PVA-HA-Silk Composite Hydrogel by Orthogonal Experiment. *J Bionic Eng* 2012; 9: 234-242.
5. Ibrahim NS, Krishnamurthy G, Raghavendran HRB, Puvaneswary S, Min NW, Kamarul T. Novel HA-PVA/NOCC bilayered scaffold for osteochondral tissue-engineering applications – Fabrication, characterization, in vitro and in vivo biocompatibility study. *Mater Lett* 2013; 113: 25-29.
6. Wu G, Su B, Zhang W, Wang C. In vitro behaviors of hydroxyapatite reinforced polyvinyl alcohol hydrogel composite. *Mater Chem Phys* 2008; 107: 364-369.
7. Boanini E, Gazzano M, Bigi A. Ionic substitutions in calcium phosphates synthesized at low temperature. *Acta Biomater* 2010; 6:1882-1894.
8. Choi J, Konno T, Takai M, Ishihara K. Smart controlled preparation of multilayered hydrogel for releasing bioactive molecules. *Curr Applied Physics* 2009; 9: e259-e262.
9. Nguyen LH , Kudva AK, Saxena NS, Roy K. Engineering articular cartilage with spatially-varying matrix composition and mechanical properties from a single stem cell population using a multi-layered hydrogel. *Biomaterials* 2011; 32: 6946-6952.
10. Bigi A, Boanini E, Gazzano M, Kojdecki MA, Rubini K. Microstructural investigation of hydroxyapatite-polyelectrolyte composites. *J Mater Chem* 2004;14: 274-279.
11. Leone G, Consumi M, Aggravi M, Donati A, Lamponi S, Magnani A. PVA/STMP based hydrogels as potential substitutes of human vitreous. *J Mater Sci Mater Med* 2010; 2: 2491–2500.
12. Leone G, Bidini A, Lamponi S, Magnani A. States of water, surface and rheological characterisation of a new biohydrogel as articular cartilage substitute. *Polym Adv Technol* 2013; 24: 824–833.

13. Wong BL, Sah RL. Mechanical asymmetry during articulation of tibial and femoral cartilages: local and overall compression and shear deformation and properties. *J Biomech* 2010; 43: 1689-1695.
14. Netti PA, Ambrosio L. Articular Cartilage, in Barbucci R, *Integrated Biomaterials Science*, New York, Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2002, 381-402.
15. Li W, Xue F, Cheng R. States of water in partially swollen poly(vinyl alcohol) hydrogels. *Polymer* 2005; 46: 12026–12031.
16. Iza M, Woerly S, Danumah C, Kaliaguine S, Bousmina M. Determination of pore size distribution for mesoporous materials and polymeric gels by means of DSC measurements: thermoporometry. *Polymer* 2000; 41: 5885–5893.
17. Leone G, Delfini M, Di Cocco ME, Borioni A, Barbucci R. The applicability of an amidated polysaccharide hydrogel as a cartilage substitute: structural and rheological characterization. *Carbohydrate Res* 2008; 343 (2): 317-327.
18. Mow VC, Kuei SC, Lai WM, Armstrong CG. Biphasic creep and stress relaxation of articular cartilage in compression: theory and experiment. *J Biomech Eng* 1980; 102: 73–84.
19. International standard. ISO 10993-5-2009. Biological evaluation of medical devices Part 5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods.
20. Leone G, Consumi M, Greco G, Bonechi C, Lamponi S, Rossi C, Magnani A. A PVA/PVP hydrogel for human lens substitution: synthesis, rheological characterisation and in vitro biocompatibility. *J Biomed Mater Res: Part B: Applied Biomater* 2011; 97B: 278-288.
21. Leone G, Consumi M, Lamponi S, Magnani A. New hyaluronan derivative with prolonged half life for ophthalmological formulation. *Carbohydr Polym* 2012; 88: 799-808.
22. Leone G, Torricelli P, Giardino R, Barbucci R. New phosphorylated derivatives of carboxymethylcellulose with osteogenic activity. *Polym Adv Technol* 2008; 19:824-830
23. Lack S, Dulong V, Picton L, Le Cerf D, Condamine E. High-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy studies of polysaccharides crosslinked by sodium trimetaphosphate: a proposal for the reaction mechanism. *Carbohydrate Res* 2007; 342: 943–953.
24. Gupta B, Anjum S, Ikram S. Physicochemical studies of crosslinked thiolated polyvinyl alcohol hydrogels. *Polym. Bull* 2013; 70: 2437–2450.
25. Bellamy LJ. *The Infrared Spectra of Complex Molecules*, 2nd ed. London: Chapman and Hall Ltd; 1980.

26. Fowler BO. "Infrared studies of apatites. I. Vibrational assignments for calcium, strontium, and barium hydroxyapatites utilizing isotopic substitution," *Inorg Chem* 1974; 13: 194–207.
27. Lin G, Cosimbescu L, Karin NJ, Tarasevich BJ. Injectable and thermosensitive PLGA-g-PEG hydrogels containing hydroxyapatite: preparation, characterization and in vitro release behavior. *Biomed Mater* 2012; 7: 024107-024117.
28. Yang CC, Lin CT, Chiu SJ. Preparation of the PVA/HAP composite polymer membrane for alkaline DMFC application. *Desalination* 2008; 233: 137–146.
29. Liu Y, Geever LM, Kennedy JE, Higginbotham CL, Cahill PA, McGuinness GB. Thermal behavior and mechanical properties of physically crosslinked PVA/Gelatin hydrogels. *J Mech Behav Biomed* 2010; 3: 203-209.
30. Mallapragada SK, Peppas NA. Dissolution mechanism of semicrystalline poly (vinyl alcohol) in water. *J Polym Sci Pol Phys* 1996; 34: 1339-1346.
31. Ross-Murphy SB. Rheological characterization of polymeric gels and networks. *Polym Gel Netw* 1994; 2: 229–237.

2.3 Realizzazione degli idrogel

Il precedente lavoro, pubblicato sulla rivista *J Biomed Mater Res* (vedi par. 2.2), in cui sono stati sviluppati materiali idrogelici compositi a base di PVA e STMP a differenti rapporti molari costituisce la base di partenza del lavoro svolto in questo capitolo. Partendo da questo studio si è proceduto alla sperimentazione di nuove condizioni di reazione allo scopo di ottenere campioni maggiormente reticolati, più compatti e con proprietà meccaniche tali da vagliare la possibilità di eliminare la componente minerale. Il fine di tale sperimentazione è stato quello di ridurre i costi del materiale sviluppato e gli inconvenienti in termini di discontinuità delle proprietà meccaniche tipiche dei materiali compositi.

A tale scopo la procedura di sintesi degli idrogel è stata modificata e sono state valutate le seguenti nuove variabili:

- **pH:** la reazione è stata condotta a valori di pH crescente al fine di incrementare la formazione di alcolati lungo le catene polimeriche, strutture che si formano durante il primo step di reazione di reticolazione;
- **Durata:** La reazione è stata protratta per 24h, 48h e 72h al fine di valutare l'influenza del tempo sul grado di reticolazione tramite valutazione delle proprietà meccaniche idrogel dei materiali così ottenuti
- **Concentrazione della soluzione:** la reazione è stata condotta utilizzando soluzioni di PVA al 5% e al 10% al fine di valutare l'effetto della concentrazione sul grado di reticolazione tramite valutazione delle proprietà meccaniche rinforzanti dei materiali così ottenuti
- **Omogeneizzazione:** È stato inoltre monitorato l'effetto dell'omogeneizzazione della soluzione al momento della reticolazione. Nonostante possa sembrare un problema marginale, l'ottenimento di materiali con proprietà continue risulta un problema ricorrente nella sintesi di idrogel chimici che spesso presentano bolle e zone a maggiore o minore densità di reticolazione. È stata pertanto valutato l'effetto dell'utilizzo di piastre magnetiche e piastre oscillanti meccaniche sull'omogeneità del materiale ottenuto

Tutti i campioni sintetizzati sono stati preparati utilizzando diversi rapporti molari tra le unità monomeriche di PVA e le molecole di STMP (**Tabella 2**) ed analizzando l'effetto della variazione dei parametri sopraelencati (pH, concentrazione della soluzione, tempi di reazione e modalità di agitazione della soluzione). In

Tabella 3 sono riportati i diversi parametri valutati con i relativi risultati.

Tabella 2 -Rapporti molari e volumi delle soluzioni utilizzati nella sintesi degli idrogel

Nome campione	Rapporti molari PVA:STMP	PVA 10% (cm ³)	STMP 20% (cm ³)
PVA-H 0.1	1:0.1	10	3.5
PVA-H 0.25	1:0.25	10	8.7
PVA-H 0.5	1:0.5	10	17.4
PVA-H 1	1:1	10	34.8
PVA-H 2	1:2	10	69.6

Tabella 3 – Elenco delle variabili valutate durante la fase di sintesi degli idrogel. In rosso le condizioni selezionate per la sintesi dei materiali.

Variabile in Esame	Condizioni	Descrizione
pH	pH 11	Nessuna reazione di reticolazione
	pH 12	Lenta reazione di reticolazione
	pH 13	Reazione di reticolazione Istantanea
Tempo di reazione	24 ore	Materiale non compatto
	48 ore	Materiale compatto con bassa consistenza
	72 ore	Materiale compatto con buona consistenza
	96 ore	Materiale solido con buona consistenza
Concentrazione (%)	5%	Reticolazione lenta, formazione di film trasparente per lenta precipitazione sul fondo del contenitore
	10%	Reazione di reticolazione veloce, con formazione di materiali 3D
Agitazione magnetica	5% No	Formazione di un gel sul fondo del contenitore
	5% Si	Formazione di materiale disomogeneo, inutilizzabile
Agitazione meccanica	10%No	Difficoltà di omogeneizzazione della soluzione. Materiale con zone a differente densità
	10% Si	Prodotto macroscopicamente omogeneo

Tra tutti i parametri quello maggiormente limitante è rappresentato dal pH. Test condotti a differenti valori di pH (11, 12 e 13) hanno dimostrato che la resa

della reazione varia significativamente al crescere del pH. L'azione reticolante dell'STMP, già ampiamente studiata³⁸, è infatti strettamente dipendente dal valore di pH della soluzione alla quale viene aggiunto. In particolare, pH=13 risulta essere la condizione sperimentale migliore in termini di ottenimento di idrogel compatti e omogenei. Inoltre, a queste condizioni la formazione dell'idrogel avviene in pochi minuti.

Un altro parametro di notevole importanza è risultato il tempo di reazione. Sono stati condotti test preliminari su campioni a rapporto molare 1:0,25 e ne sono state monitorate le proprietà reologiche in termini di G' ogni 24 ore. Dai test condotti è risultato che il modulo elastico (parametro strettamente legato al grado di reticolazione), continua ad aumentare gradualmente nel tempo fino a raggiungimento di un valore costante dopo 96 ore di reazione. Per questo motivo è stato scelto un tempo per la formazione degli idrogel non inferiore a 96 ore a partire dall'aggiunta dell'agente reticolante.

La maggiore o minore concentrazione della soluzione iniziale di PVA influenza sia la velocità di reazione sia la compattezza degli idrogel. Infatti gli idrogel ottenuti a partire da soluzioni al 5% si formano in tempi più lunghi, sono semitrasparenti e meno compatti (**Figura 9a**) rispetto ai materiali formati con gli stessi rapporti molari, ma utilizzando soluzioni al 10%, i quali si presentano compatti e di colorazione bianca (**Figura 9b**). Il fattore diluizione nelle soluzioni al 5% non permette un sufficiente avvicinamento delle catene di PVA e quindi la formazione dell'idrogel ne risulta rallentata. Al contrario, per le soluzioni al 10% le catene sono molto più ravvicinate e disponibili alla formazione di punti di reticolazioni.

La scelta di condurre la reazione di reticolazione sotto agitazione, tramite piastra oscillante, è dovuta alla difficoltà di miscelamento dell'agente reticolante nella soluzione madre di PVA. Le soluzioni di PVA, soprattutto alla concentrazione del 10%, possiedono un'elevata viscosità e sono soggette se non correttamente mescolate a formare idrogel fisici con forme irregolari. È stato verificato che aggiungendo goccia a goccia la soluzione di STMP mantenendo il polimero PVA sotto vigorosa agitazione tramite piastra oscillante è possibile ottenere idrogel uniformi e compatti.

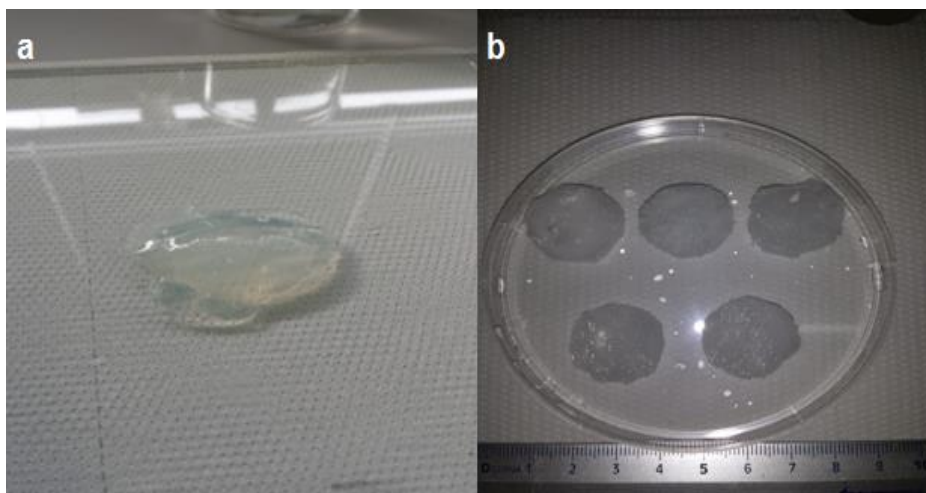


Figura 9 - (a) Idrogel di PVA ottenuti a partire da soluzioni al 5%, (b) Idrogel di PVA ottenuti a partire da soluzioni al 10%

2.4 Caratterizzazione Chimica

2.4.1 Analisi infrarossa

Gli spettri IR del PVA nativo sia allo stato solido sia in soluzione (10%) sono riportati in **Figura 10**. I due spettri risultano sovrapponibili e caratterizzati dagli assorbimenti tipici del polimero PVA. Sono infatti, presenti, in entrambi gli spettri, le bande relative allo stretching del gruppo ossidrilico coinvolto in legami a idrogeno intra ed intermolecolari ($3600\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$), le bande di stiramento simmetrico e asimmetrico ($2850\text{--}2910\text{ cm}^{-1}$) e di piegamento (1465 cm^{-1}) dei gruppi metilenici dello scheletro del PVA. La banda di assorbimento centrata a 1710 cm^{-1} è caratteristica del C=O dei gruppi acetato residui derivanti dal processo di produzione del PVA^{35,36}. Infine, la banda centrata a 1137 cm^{-1} rappresenta lo stiramento dei legami C-C e C-O in presenza di legame ad idrogeno intramolecolare tra due gruppi OH della stessa catena carboniosa³⁹. Nello spettro relativo al PVA in soluzione in seguito al processo di solubilizzazione e alla rottura dei legami ad idrogeno intra ed inter molecolari tale banda scompare mentre è presente nello spettro del PVA allo stato solido (**Figura 11**).

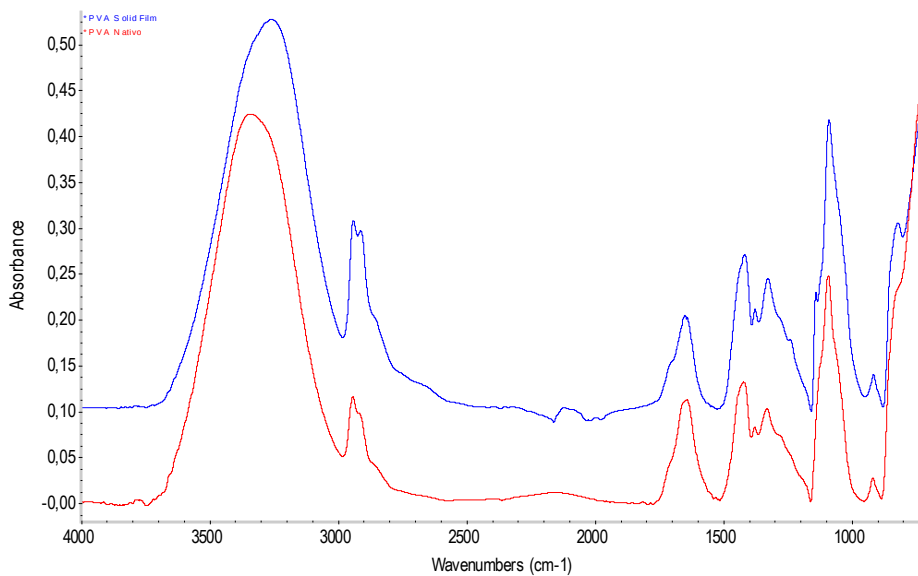


Figura 10 - Spettri IR (4000-750 cm^{-1}) del PVA in soluzione (rosso) e allo stato di film solido ottenuto per essiccamento (blu)

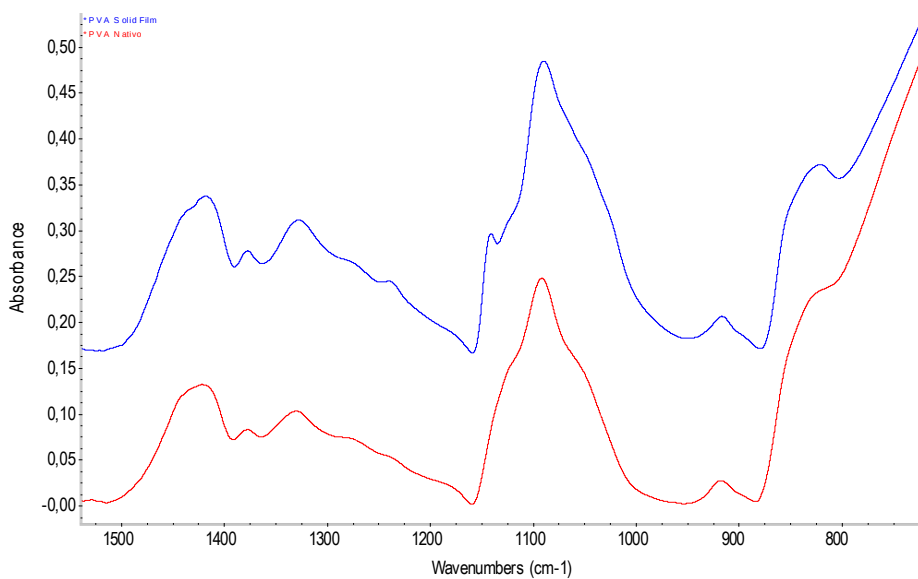


Figura 11 - Particolare dello spettro IR (1500-750 cm^{-1}) del PVA in soluzione (rosso) e allo stato di film solido ottenuto per essiccamento (blu)

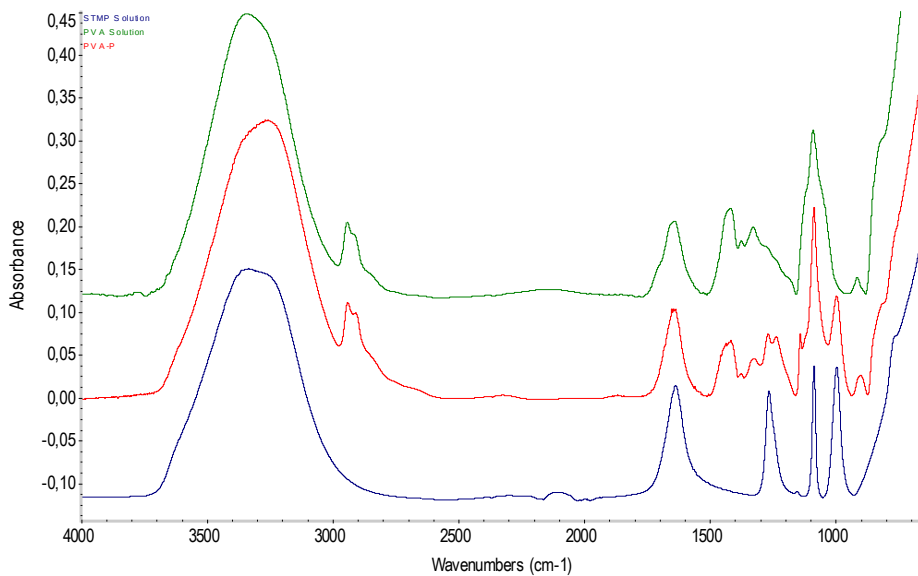


Figura 12 – Confronto tra gli spettri IR (4000-750 cm^{-1}) di: PVA nativo in soluzione (verde); PVA reticolato tramite STMP (rosso); agente reticolante in soluzione acquosa (blu)

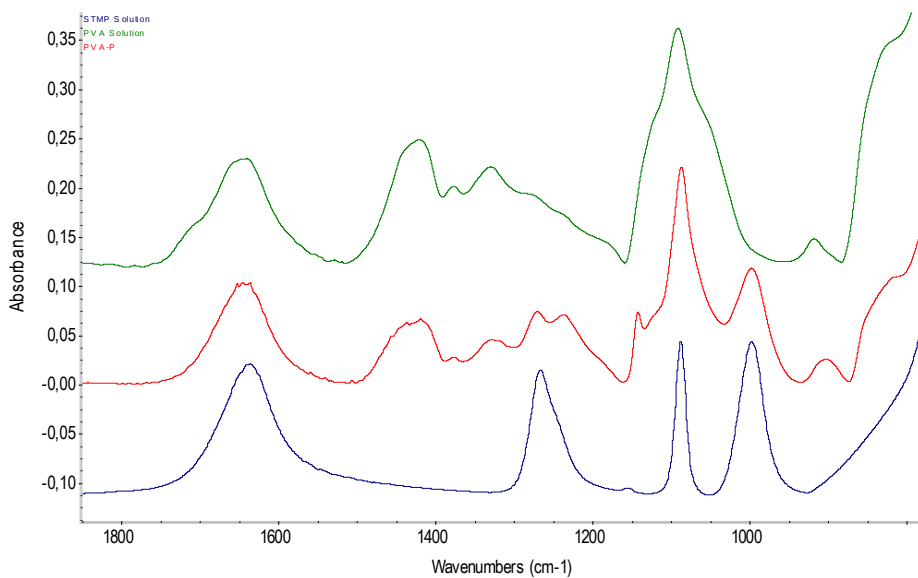


Figura 13– Particolare degli spettri di Figura 10 nella regione 1800-750 cm^{-1} di: PVA nativo in soluzione (verde); PVA reticolato tramite STMP (rosso); agente reticolante in soluzione acquosa (blu)

Tabella 4 –Principali numeri d’onda osservati negli spettri IR dei materiali impiegati per la sintesi degli idrogel e relative attribuzioni

Campioni	Numeri d’onda (cm ⁻¹)	Assegnazioni
PVA	3342	Stiramento OH coinvolto in legami ad idrogeno (intra ed inter-molecolari)
	2944, 2913	stiramento simmetrico ed asimmetrico CH ₂
	1710	stiramento COOR
	1640	Piegamento OH
	1137	Stiramento dei legami C-C, C-O adiacente ad un gruppo OH coinvolto in un legame ad idrogeno
STMP	1267	Stiramento P=O
	1086	Stiramento P-O-H
	997	Stiramento P-O-P
PVA-H 1	3342	Stiramento OH coinvolto in legami a idrogeno intra ed molecolari
	2944, 2913	Stiramento simmetrico e asimmetrico CH ₂
	1640	Piegamento OH
	1270	Stiramento P=O
	1237	Stiramento P-O-C
	1137	Stiramento dei legami C-C, C-O adiacente ad un gruppo OH coinvolto in un legame ad idrogeno
	997	Stiramento P-O-P

Gli spettri relativi agli idrogel, ottenuti utilizzando la nuova procedura di sintesi a diversi rapporti molari risultano completamente sovrapponibili. In **Figura 12** sono riportati gli spettri relativi alla soluzione di STMP, al polimero nativo e all'idrogel ottenuto utilizzando un rapporto molare PVA:STMP 1:1 (PVA-H 1). In **Tabella 4** sono riassunti i principali numero d’onda osservati negli spettri IR e le relative attribuzioni. L’analisi infrarossa ha confermato l’avvenuta reticolazione. Confrontando gli spettri del polimero nativo con quello dell'idrogel è stato possibile individuare le bande relative alla presenza dell’agente reticolante. In particolare, si registrano, nello spettro IR del PVA-P, tre nuove bande centrate rispettivamente a 1270 cm⁻¹, relativa allo stiramento dei legami P=O, a 1237 cm⁻¹

, relativa allo stiramento dei legami P-O-C e a 997 cm^{-1} , relativa allo stiramento dei legami P-O-P. Lo spettro IR del PVA-H 1 è caratterizzato dalla presenza della banda a 1137 cm^{-1} , dovuta alla formazione di regioni cristalline all'interno del PVA durante la transizione da PVA nativo a PVA-H, come già osservato nella spettro del PVA solido. La banda di assorbimento centrata a 1710 cm^{-1} non è più presente nello spettro del PVA-H 1 dimostrando che la procedura di reticolazione permette di rimuovere i gruppi acetati residui ancora presenti all'interno del PVA nativo (grado di idrolisi 98%) (**Figura 13**).

Gli idrogel sono stati analizzati tramite TOF-SIMS per ottenere sia una conferma della reazione di reticolazione sia una valutazione dell'omogeneità della stessa.

2.4.2 *Spettrometria di Massa di Ioni Secondari (ToF-SIMS)*

Attraverso l'analisi ToF-SIMS è possibile ottenere lo spettro di massa e la mappa chimica della superficie dei campioni di interesse. Al fine di analizzare il bulk di un materiale, occorrerà eseguire una sezione trasversale dello stesso.

Per ogni sezione del campione, sono stati registrati spettri ToF-SIMS sia in modalità positiva che negativa, **Figura 14**. Prima di elaborare gli spettri ottenuti l'intensità di ogni picco è stata normalizzata rispetto all'intensità totale dello spettro.

Durante l'elaborazione degli spettri, solamente i picchi con intensità almeno tre volte superiore al background sono stati presi in considerazione.

Gli spettri registrati in modalità negativa presentano una serie di frammenti molto utili per la caratterizzazioni del materiale in esame, ed è per questo che la discussione si concentrerà principalmente su questi.

Lo spettro del PVA reticolato con STMP presenta picchi legati alla presenza di gruppi fosfato (**Tabella 5**) $m/z = 31$, 63 e 64 relativi a P^- , PO_2^- e HPO_2^- e quelli a $m/z = 79$, 80 , relativi a PO_3^- e HPO_3^- e frammenti a massa $m/z = 107$ e 108 attribuiti ai gruppi CPO_4^- e CHPO_4^- , che confermano l'avvenuto legame covalente tra il gruppo fosfato e la catena carboniosa del polimero. La presenza inoltre dei frammenti a massa $m/z = 135$, 147 e 149 attribuiti a $\text{C}_3\text{H}_4\text{PO}_4^-$, $\text{C}_4\text{H}_4\text{PO}_4^-$ e $\text{C}_4\text{H}_6\text{PO}_4^-$ rispettivamente, dimostrano che il gruppo fosfato è a ponte tra due catene carboniose (**Tabella 5**) e quindi agisce da reticolante. L'Attivazione delle catene di PVA, nella fase precedente alla reticolazione, ad un valore di pH maggiore rispetto a quello utilizzato nel lavoro pubblicato sul J. Biomed Mater Res Part A ha portato all'ottenimento di un differente braccio reticolante. I frammenti non citati sono tutti attribuibili allo scheletro del PVA.

I risultati dell'analisi ToF-SIMS confermano i dati già riportati in letteratura secondo cui a $\text{pH}=13$ l'STMP agisce da reticolante mediante catene ortofosfatate³⁸.

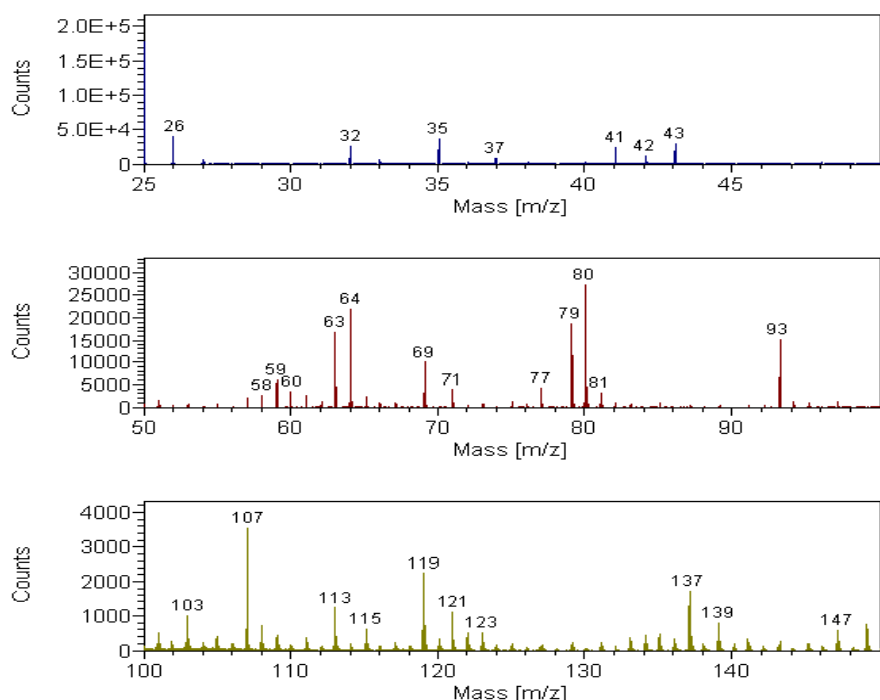


Figura 14 – Regioni caratteristiche dello spettro ToF-SIMS (ioni negativi) del PVA reticolato con STMP

Tabella 5 – Attribuzione dei principali frammenti rilevati nello spettro ToF-SIMS di ioni negativi. In nero i frammenti attribuibili alla matrice di PVA, in verde i frammenti attribuibili alla presenza dei gruppi fosfato all'interno del materiale, in azzurro i frammenti relativi alla formazione di legami C-PO₄ (fosfatazione del polimero) e in rosso i frammenti relativi a punti di reticolazione.

Picco (m/z)	Frammento	Picco (m/z)	Frammento
31	P ⁻	80	HPO ₃ ⁻
41	C ₂ HO ⁻	93	C ₂ H ₆ PO ₂ ⁻
43	C ₂ H ₃ O ⁻	107	CPO ₄ ⁻
48	HOP ⁻	108	CHPO ₄ ⁻
59	CH ₂ CHO ₂ ⁻	119	C ₂ PO ₄ ⁻
63	PO ₂ ⁻	121	C ₂ H ₂ PO ₄ ⁻
64	HPO ₂ ⁻	135	C ₃ H ₄ PO ₄ ⁻
69	C ₄ H ₅ O ⁻	147	C ₄ H ₄ PO ₄ ⁻
71	C ₃ H ₃ O ₂ ⁻	149	C ₄ H ₆ PO ₄ ⁻
79	PO ₃ ⁻		

La tecnica ToF-SIMS permette di conoscere anche la distribuzione spaziale di un determinato frammento sulla superficie del campione. **Figura 15** riporta la

distribuzione chimica dei frammenti a massa $m/z = 31$, 107 e 147 relativi a P^- , CPO_4^- e $C_4H_4PO_4^-$, confermando l'omogeneità della reticolazione del materiale.

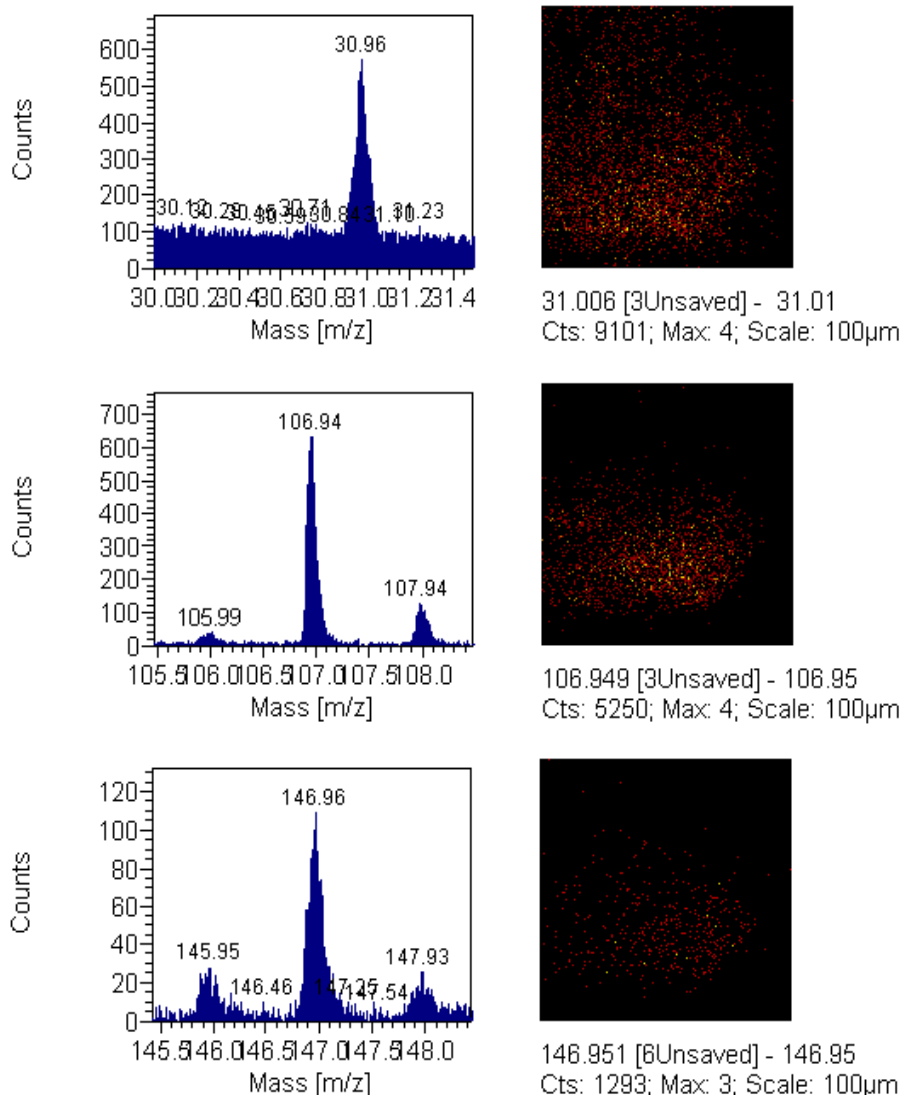


Figura 15 – mappa chimica dei frammenti a $m/z = 31$, 107 e 147 relativi alla distribuzione del reticolante fosfato all'interno del materiale.

2.4.3 Determinazione colorimetrica degli ioni orto fosfato e Analisi Elementare

Al fine di ottenere una valutazione quantitativa del grado di reticolazione è stata effettuata una analisi colorimetrica ed elementare sui vari materiali ottenuti.

Attraverso l'analisi colorimetrica è stata determinata la quantità di fosforo espressa come (mol P / g_{idrogel}) nei campioni al variare dei rapporti molari PVA:STMP. I risultati delle analisi sono riportati in **Tabella 6**.

Tabella 6 – Rapporti molari e relative concentrazioni di P espresse in mol P / g di Idrogel dei campioni a differenti rapporti molari

Rapporto molare U-PVA:STMP	mol P / g_{idrogel}
1:0,1	$2 \cdot 10^{-4} \pm 1 \cdot 10^{-4}$
1:0,25	$2 \cdot 10^{-3} \pm 8 \cdot 10^{-4}$
1:0,5	$5 \cdot 10^{-3} \pm 5 \cdot 10^{-4}$
1:1	$6 \cdot 10^{-3} \pm 3 \cdot 10^{-4}$
1:2	$5 \cdot 10^{-3} \pm 3 \cdot 10^{-4}$

Dai risultati ottenuti è stato possibile determinare il valore soglia del rapporto PVA/STMP (1:0,5) al di sopra del quale non si osservano variazioni nella quantità di fosforo nel campione.

Tale risultato è stato verificato sottoponendo i materiali con rapporti molari PVA/STMP 1:0,5, 1:1 e 1: 2 ad analisi elementare (AE). Tale analisi ha fornito valori della quantità di P leggermente inferiori rispetto a quelli ottenuti per via spettrofotometrica. In particolare, la più alta percentuale di fosforo è stata rilevata nel campione con rapporto molare 1:0,5 ($8 \cdot 10^{-4}$ moli di P / g Idrogel). Nei campioni a più basso rapporto molare PVA:STMP la quantità di P è $1 \cdot 10^{-4}$ moli di P/g Idrogel.

La caratterizzazione chimica conferma la reticolazione delle catene di PVA attraverso l'STMP come reticolante e tale reticolazione risulta parzialmente modulabile agendo sui rapporti molari tra PVA e STMP.

L'analisi ToF-SIMS ha confermato la natura monofosfatata dei bracci reticolanti tra le catene polimeriche della matrice.

2.5 Caratterizzazione fisica

2.5.1 Analisi termogravimetrica TGA

L'analisi termogravimetrica permette di monitorare, sotto atmosfera controllata (N₂), le variazioni di massa dei campioni in funzione della temperatura.

Tutti gli idrogel presentano un comportamento termico simile, indipendentemente dal diverso grado di reticolazione. In **Figura 16** sono riportate le curve della derivata della perdita in peso in funzione della temperatura (DTG) del PVA nativo e dell'idrogel PVA-H 0.5. Come possiamo notare dalla figura, i termogrammi, mostrano tre principali regioni in cui si registra una perdita in peso. La prima regione si estende da 30 a 200°C ed è relativa all'evaporazione dell'acqua di bulk e di idratazione. La seconda regione si estende da 200 a 400°C ed è relativa alla degradazione delle catene alifatiche. La terza regione, 400-600°C, è correlabile alla rottura delle componenti più strutturate del polimero/idrogel (fase di carbonatazione).

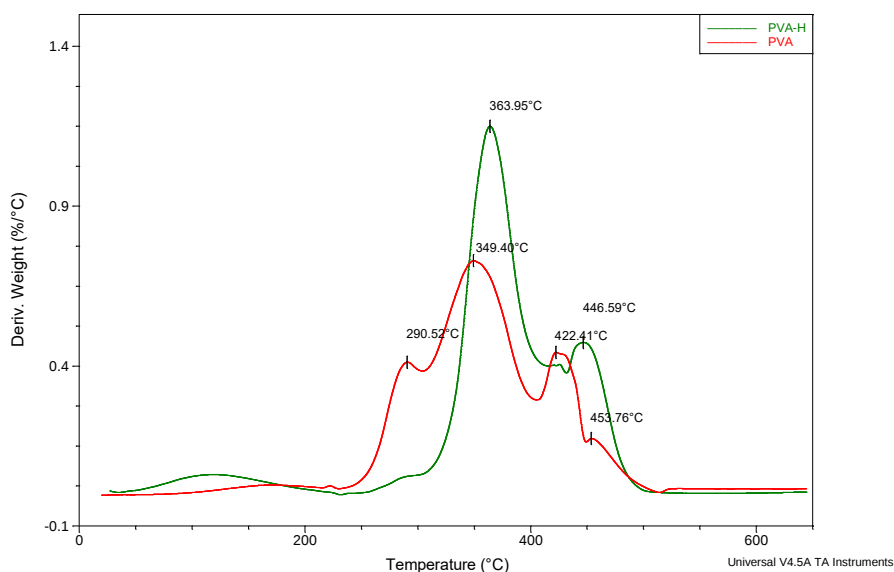


Figura 16 – Curve DTG del PVA (rosso) e dell'idrogel PVA-H 0.5 (verde)

Nel primo intervallo di temperatura, 30-200°C, gli idrogel perdono $\approx 5\%$ del loro peso, a causa dell'evaporazione dell'acqua strettamente legata alla struttura, circa il 3-4% di peso in più rispetto al PVA nativo (**Tabella 7**) a conferma della presenza dei bracci idrofili del reticolante.

Nel secondo e terzo intervallo di temperatura, si evidenzia l'aumento della resistenza termica degli idrogel rispetto al PVA nativo; gli idrogel infatti, mostrano una perdita percentuale in peso minore nella regione 200-400°C e maggiore nella regione 400-600°C rispetto al polimero non reticolato. I dati termogravimetrici suggeriscono, pertanto, una stabilizzazione termica della matrice polimerica attraverso la sua reticolazione.

Inoltre, è possibile notare che gli idrogel si decompongono in intervallo di temperatura più piccolo e a temperature più elevate rispetto al polimero non reticolato. Infatti, la decomposizione del polimero nativo si registra nell'intervallo di temperatura 200-500°C, mentre per gli idrogel l'intervallo utile per la

decomposizione è 300-500°C. Nel termogramma dell'idrogel PVA-H 0.5, riportato in **Figura 16**, risulta quasi del tutto assente il picco a 290°C che indica l'inizio del processo degradativo delle catene di PVA. Analogamente la temperatura alla quale si registra la massima perdita in peso subisce uno spostamento verso valori più alti di circa 15°C in seguito al processo di reticolazione (polimero nativo: 350°C ; idrogel: 364°C).

Tabella 7 – Variazioni in peso percentuale osservata per i campioni nei tre intervalli di temperatura caratteristici ($SD \pm 0.5\%$)

PVA:STMP	$\Delta\%$ 20-200	$\Delta\%$ 200-400	$\Delta\%$ 400-600
PVA	2	69	26
SC	5	61	33
1:0.1	5	60	33
1:0.25	6	60	32
1:0.5	5	62	28
1:1	5	63	28
1:2	5	66	27

2.5.2 Contenuto d'acqua(WC)

La capacità di un idrogel di simulare un tessuto molle è strettamente correlata alle sue capacità di rigonfiamento. Il valore di WC del tessuto cartilagineo non è omogeneo per tutto il tessuto, ma varia a seconda della profondità. Nella regione superficiale, ovvero quella a contatto con la cartilagine femorale il WC è di $\approx 80\%$, mentre nelle regioni interne, ovvero quelle poste a contatto con il tessuto osseo, esso assume valori di $\approx 65\%$.

Il grado di rigonfiamento e il conseguente contenuto di acqua è strettamente dipendente sia dall'idrofilia del materiale e dal processo di essiccamento al quale il materiale viene sottoposto. Pertanto, l'effetto della modalità di essiccamento sul contenuto di acqua dell'idrogel è stato valutato confrontando i valori ottenuti per i materiali essiccati in stufa ($T:60^\circ\text{C}$) e per i materiali liofilizzati. I valori sono riportati in **Tabella 8**. A seconda del metodo di essiccamento utilizzato i campioni mostrano differenti capacità di rigonfiamento differenti. I dati ottenuti rivelano come i campioni liofilizzati siano caratterizzati da valori di WC più elevati, compatibili con il fatto che il processo di liofilizzazione garantisca il mantenimento di una struttura aperta, mentre durante il processo di essiccamento in stufa le catene polimeriche possano riorganizzarsi conducendo ad una struttura più compatta. In accordo con i dati di fosfatazione i campioni con rapporto molare PVA/STMP 1:2, 1:1 e 1:0.5 non mostrano differenze significative in termini di WC. Gli idrogel che presentano un minore grado di fosfatazione assumono, invece, un minore valore di WC. Ciò è sicuramente legato alla presenza di un numero minore di bracci idrofili che contribuiscono all'idratazione totale del

campione. Tutti gli idrogel ad eccezione del campione 1:0.1, sottoposti ad essiccamento, assumono valori di contenuto di acqua paragonabili a quelli della zona profonda della cartilagine articolare umana. L'effetto del processo di essiccamento sulla struttura microscopica del materiale è stato verificato analizzando i campioni tramite microscopia elettronica a scansione (vedi par. 2.6.2).

Tabella 8 – Confronto tra il Water Content (WC) in soluzione di NaCl 0,9% degli idrogel sottoposti ad Essiccamento (E) e Liofilizzazione (L)

Campione	Water Content (WC)		
PVA-H 0.1_E	56	±	2
PVA-H 0.25_E	65	±	1
PVA-H 0.5_E	69	±	1
PVA-H 1_E	71	±	5
PVA-H 2_E	69	±	3
PVA-H 0.1_L	69	±	3
PVA-H 0.25_L	81	±	2
PVA-H 0.5_L	86	±	1
PVA-H 1_L	88	±	3
PVA-H 2_L	86	±	3

2.6 Caratterizzazione Morfologica

La capacità di rigonfiamento e la distribuzione dei fluidi all'interno di un materiale, così come di un tessuto, dipende strettamente dalla morfologia interna del materiale stesso. Una combinazione di microscopia elettronica a scansione (SEM) e calorimetria differenziale a scansione (DSC) è stata utilizzata per valutare rispettivamente la micro- e la meso-struttura degli idrogel.

2.6.1 Microscopia Elettronica a Scansione (SEM)

L'indagine morfologica degli idrogel sintetizzati conferma i risultati ottenuti in termini di grado di rigonfiamento. Il campione a più basso grado di fosfatazione PVA-H 0.1_E (**Figure 17 e 18**) presenta una struttura estremamente compatta (come già suggerito dal valore di WC) caratterizzata da pori di diametro inferiore a 1 µm. Tale struttura è dovuta ad una bassa percentuale di ponti di reticolazione che, a causa del loro carattere altamente idrofilo avrebbero incrementato l'assorbimento di fluidi da parte del materiale. I campioni con grado di fosfatazione maggiore (PVA-H 0.25_E, PVA-H 0.5_E, PVA-H 1_E e PVA-H 2_E) possiedono una morfologia simile tra loro e caratterizzata da una struttura più

aperta e con porosità più elevata. Nelle **Figure 19** e **20** sono riportate le micrografie del campione PVA-H 0.25_E che evidenziano come l'aumento del grado di fosfatazione produca una struttura maggiormente aperta in grado quindi di assorbire maggiori quantitativi di acqua.

Il processo di liofilizzazione garantisce una struttura ancora più aperta rispetto al trattamento di essiccamento in stufa, in quanto il congelamento rapido dell'idrogel permette al materiale di mantenere inalterata la sua struttura iniziale, come evidenziato dal confronto delle immagini relative ai campioni PVA-H 0.25_E e PVA-H 0.25_L riportate nelle **Figure 19** e **21**. Ciò è in perfetto accordo con il maggiore contenuto di acqua registrato per i materiali sottoposti a liofilizzazione, rispetto a quelli essiccati in stufa.

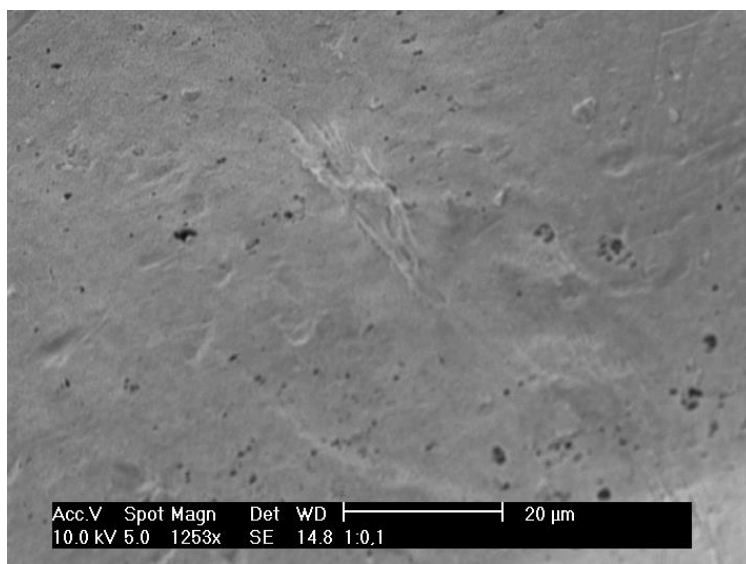


Figura 17 – Immagine SEM del campione PVA-H 0.1_E (Essiccato) con ingrandimento a 1253x

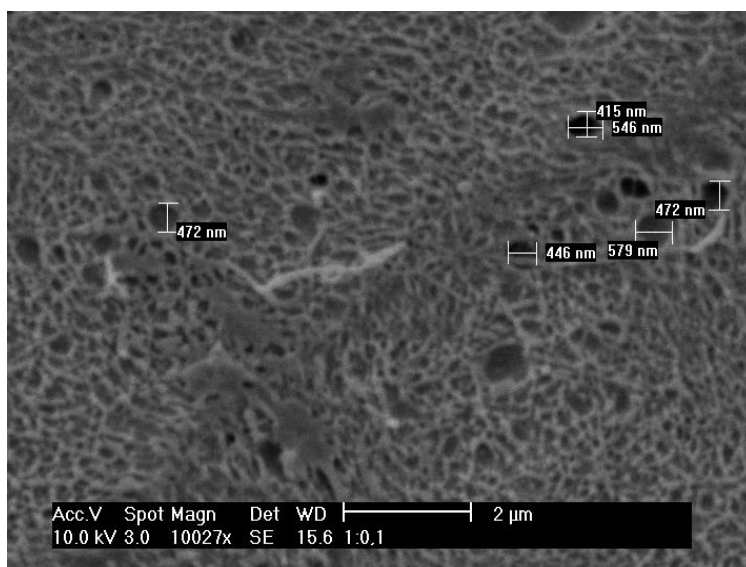


Figura 18 – Immagine SEM del campione PVA-H0.1_E (Essiccato) con ingrandimento a 10027x

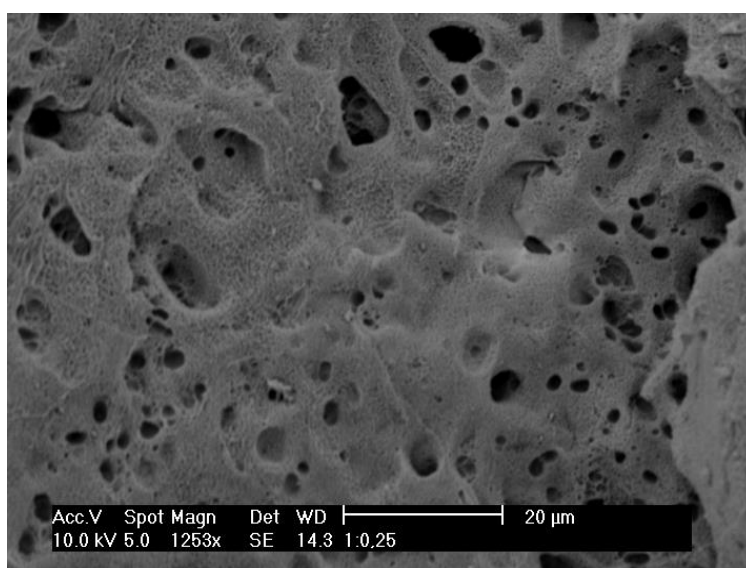


Figura 19 – Immagine SEM del campione PVA-H 0.25_E (Essiccato) con ingrandimento a 1253x

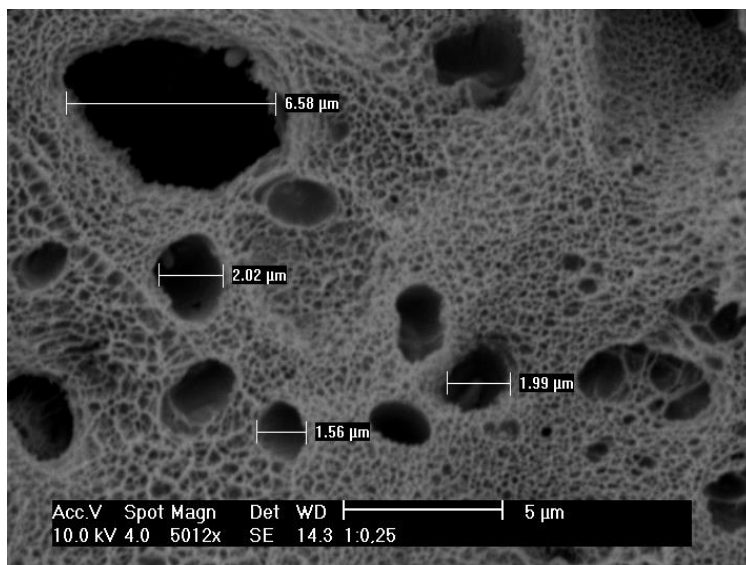


Figura 20 - Immagine SEM del campione PVA-H0.25_E (Essiccato) con ingrandimento a 5012x

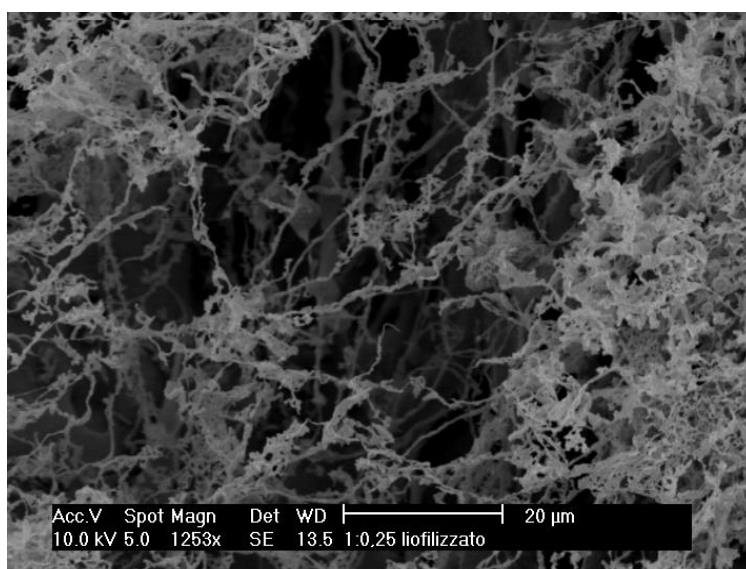


Figura 21 - Immagine SEM del campione PVA-H0.25_L (Liofilizzato) con ingrandimento a 1253x

2.6.2 Calorimetria differenziale a scansione (DSC)

Il tessuto cartilagineo umano è composto da un network di fibrille di collagene interpenetrate da una fase macromolecolare altamente idrofila, dove la dimensione dei pori controlla il trasporto convettivo/diffusivo di fluidi e macromolecole (fluido interstiziale) all'interno del tessuto. Questo fluido che adempie a numerose funzioni tra cui il trasporto di nutrienti e metaboliti, la regolazione termica e le proprietà meccaniche, percola attraverso gli spazi interfibrillari della matrice (2- 6 nm) guidato da gradienti di pressione osmotica³⁰.

A tale scopo, basandosi sui termogrammi ottenuti attraverso l'analisi DSC, è stato possibile calcolare il raggio dei mesopori dei materiali sintetizzati⁴⁰. I loro valori medi sono riportati in **Tabella 9**. Dall'analisi dei dati riportati non si evincono significative differenze significative tra i diversi materiali. Il raggio medio dei mesopori nelle diverse matrici è di ≈ 5 nm, ed è paragonabile a quello del tessuto cartilagineo³⁰.

Tabella 9 – Raggio dei mesopori dei campioni di idrogel con differente rapporto molare PVA/STMP e relative SD

Sample	r mesopori (nm)
PVA-H0.1_E	5 ± 1
PVA-H0.25_E	6 ± 2
PVA-H0.5_E	5 ± 1
PVA-H1_E	7 ± 3
PVA-H2_E	5 ± 1

La struttura porosa tridimensionale dei materiali sintetizzati, composta da una combinazione di meso e micropori, risulta essere simile alla struttura 3D presente all'interno del tessuto cartilagineo e, pertanto, è in grado di mimare il comportamento in termini di trasporto e contenuto di fluidi e macromolecole, del tessuto umano.

2.7 Caratterizzazione reologica (AR)

Affinché un materiale sintetico sia in grado di mimare le caratteristiche della cartilagine tibiale non è sufficiente che mostri caratteristiche morfologiche e di WC simili a quelle del tessuto cartilagineo, ma è necessario che anche la sua capacità di resistenza a sforzi e deformazioni sia adeguata. Infatti, la principale funzione biomeccanica della cartilagine è quella di sostenere e trasmettere il carico tra le ossa, permettendo, così, all'articolazione di avere un moto relativo

lungo i diversi assi. Ciò la rende continuamente sottoposta a sollecitazioni di taglio e compressione.

Da un punto di vista prettamente meccanico la cartilagine è un cosiddetto materiale visco-elastico con una netta predominanza della componente elastica su quella viscosa ma dotato di ottima capacità dissipativa.

L'analisi reologica, che consente di valutare le proprietà viscoelastiche dei materiali sottoposti a sollecitazioni di taglio, è stata effettuata sugli idrogel sintetizzati al fine di determinare le loro componenti elastiche e viscosi. Sono state, pertanto, effettuate misure viscosimetriche al fine di ottenere informazioni relative alle proprietà di scorrimento del materiale nel tempo al variare delle condizioni di moto. Le misure in regime oscillatorio di piccola ampiezza sono state eseguite allo scopo di caratterizzare il materiale dal punto di vista strutturale. I valori di modulo elastico (G') e di modulo viscoso (G'') sono stati determinati in funzione della frequenza di oscillazione (spettri meccanici) in condizioni di viscoelasticità lineare (LVER)ⁱ.

2.7.1 *Frequency sweep test*

La variazione del modulo elastico e del modulo viscoso è stata monitorata nell'intervallo di frequenze 0.01-20 Hz, applicando ai materiali una deformazione dello 0.2%. Tale intervallo di frequenze è stato scelto in modo da contenere le frequenze di sollecitazione fisiologiche del ginocchio, che vanno dagli 0.5 Hz della camminata ai 3.0 Hz della corsa^{41,42}. La scelta di un intervallo di frequenze più ampio rispetto al normale range di frequenze nel quale risiedono le sollecitazioni del ginocchio (0.01-20 Hz) è utile per non perdere informazioni sul comportamento del materiale in seguito a sollecitazioni superiori a quelle della corsa ed inferiori a quelle di una normale camminata.

Al fine di selezionare il materiale con proprietà viscoelastiche più simili a quelle del tessuto cartilagineo, le capacità viscoelastiche dei materiali con stesso grado di reticolazione ma sottoposti ad un diverso processo di essiccamento (stufa e liofilizzazione) sono state confrontate tramite analisi frequency sweep (**Figura 22**).

I risultati riportati in **Tabella 10** mostrano come i materiali sottoposti a liofilizzazione siano caratterizzati da valori di G' e G'' nettamente inferiori rispetto ai corrispettivi materiali sottoposti ad essiccamento in stanza. Poiché i

ⁱ I modelli lineari sono in grado di descrivere svariati tipi di comportamento reologico e sono quindi di grandissima utilità nel determinare le proprietà di molti prodotti industriali. Essi, però, solitamente, possono essere considerati validi solo per variazioni limitate di γ e $\dot{\gamma}$, in un regime che viene appunto denominato lineare. In questo regime G e η sono funzioni solo del t della frequenza e della temperatura di esercizio e dipendono esclusivamente dalla natura del materiale e non dalle particolari condizioni in cui il test viene condotto.

valori di G' dei campioni liofilizzati si discostano maggiormente dai valori della cartilagine tibiale ($\approx 30 \pm 3$ kPa)⁴³, sono stati valutati e caratterizzati successivamente solamente i campioni sottoposti ad essiccamento.

Gli spettri meccanici degli idrogel sintetizzati, sottoposti ad essiccamento in stufa sono riportati nelle **Figure 23, 24, 25, 26 e 27**. Tutti i campioni mostrano una predominanza della componente elastica (G') rispetto alla componente viscosa (G'') di almeno un ordine di grandezza (**Tabella 11**), caratteristica degli idrogel di natura chimica. Il valore di G' inoltre, si mantiene pressoché costante per tutti gli intervalli di frequenza analizzati. La dissipazione dello stress avviene, pertanto in modalità prevalentemente elastica, con uno sfasamento ($\tan \delta$) di circa 3° (**Tabella 12**).

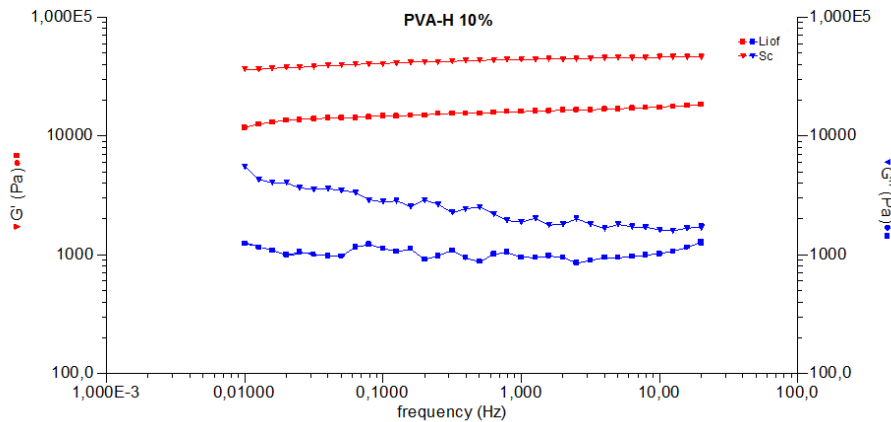


Figura 22 – Confronto degli spettri meccanici in scala logaritmica dei campioni PVA-H 1_L e PVA-H 1_E. In rosso il modulo elastico (G'), in blu il modulo viscoso (G'')

Tabella 10 - Valori del modulo elastico (G') e modulo viscoso (G'') dei campioni essiccati, misurati alle frequenze di oscillazione caratteristiche della camminata e della corsa (rispettivamente 0.5 e 3.0 Hz)

Campione	0.5 Hz		3.0 Hz	
	G' (kPa)	G'' (kPa)	G' (kPa)	G'' (kPa)
PVA-H 1_L	15 $\pm$ 5	1.1 $\pm$ 0.1	17 $\pm$ 5	1.1 $\pm$ 0.1
PVA-H 1_E	31 $\pm$ 8	2.1 $\pm$ 0.1	33 $\pm$ 8	2.1 $\pm$ 0.1

Tabella 11 – Valori di modulo elastico (G') e modulo viscoso (G'') dei campioni a differenti rapporti molari alle frequenze di oscillazione caratteristiche 0.5 e 3.0 Hz

Campione	0.5Hz		3.0Hz	
	G' (kPa)	G'' (kPa)	G' (kPa)	G'' (kPa)
PVA-H 0.1_E	50 ± 12	4 ± 1	52 ± 13	3 ± 1
PVA-H 0.25_E	72 ± 8	5 ± 1	76 ± 9	5 ± 1
PVA-H 0.5_E	30 ± 9	2 ± 1	31 ± 10	2.2 ± 0.1
PVA-H 1_E	31 ± 8	2 ± 1	33 ± 8	2.1 ± 0.1
PVA-H 2_E	35 ± 11	3 ± 1	39 ± 12	3.0 ± 0.1

Tabella 12 – Valori di sfasamento ($\tan \delta$) dei campioni essiccati, misurati alle frequenze di oscillazione caratteristiche della camminata e della corsa (rispettivamente 0.5 e 3.0 Hz)

Campione	$\tan \delta$ (°)	
	0,5 Hz	3,0 Hz
PVA-H 0.1_E	4.3 ± 0.4	3.1 ± 0.2
PVA-H 0.25_E	4.3 ± 0.6	3.5 ± 0.6
PVA-H 0.5_E	5.4 ± 0.2	4.4 ± 0.2
PVA-H 1_E	4.5 ± 0.5	4.0 ± 0.3
PVA-H 2_E	3.9 ± 0.6	3.2 ± 0.6

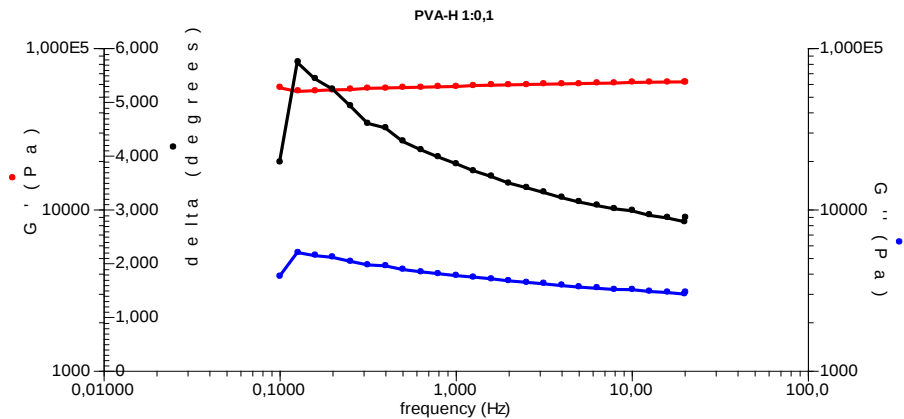


Figura 23 - Spettro meccanico in scala logaritmica del campione PVA-H 0.1_E, in rosso il modulo elastico (G'), in blu il modulo viscoso (G'') e in nero lo sfasamento ($\tan \delta$)

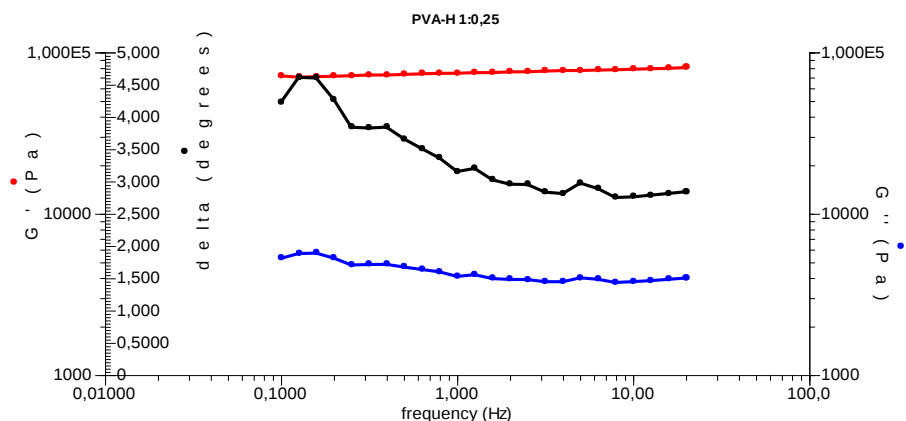


Figura 24 - Spettro meccanico in scala logaritmica del campione PVA-H 0.25_E, in rosso il modulo elastico (G'), in blu il modulo viscoso (G'') e in nero lo sfasamento (δ)

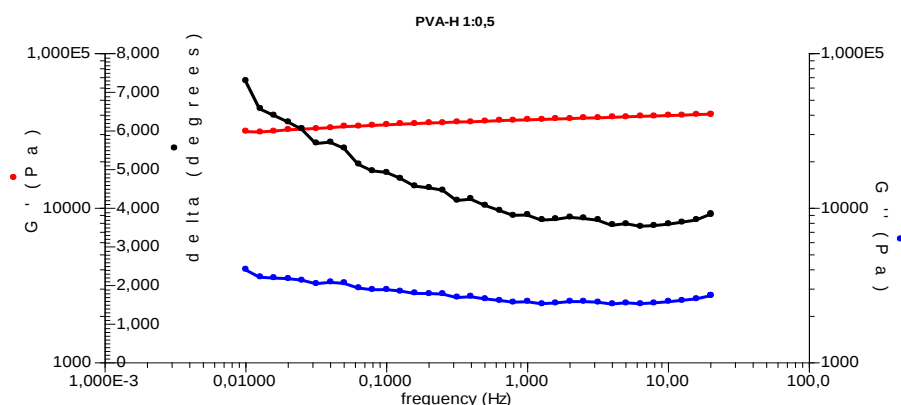


Figura 25 - Spettro meccanico in scala logaritmica del campione PVA-H 0.5_E, in rosso il modulo elastico (G'), in blu il modulo viscoso (G'') e in nero lo sfasamento (δ)

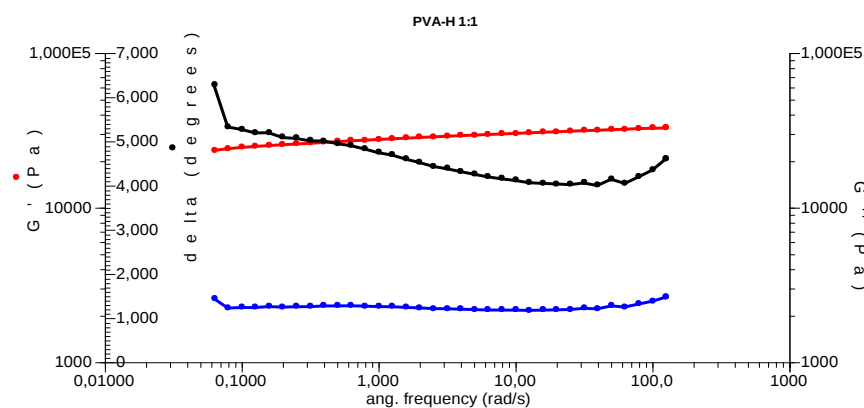


Figura 26 - Spettro meccanico in scala logaritmica del campione PVA-H 1_E, in rosso il modulo elastico (G'), in blu il modulo viscoso (G'') e in nero lo sfasamento (δ)

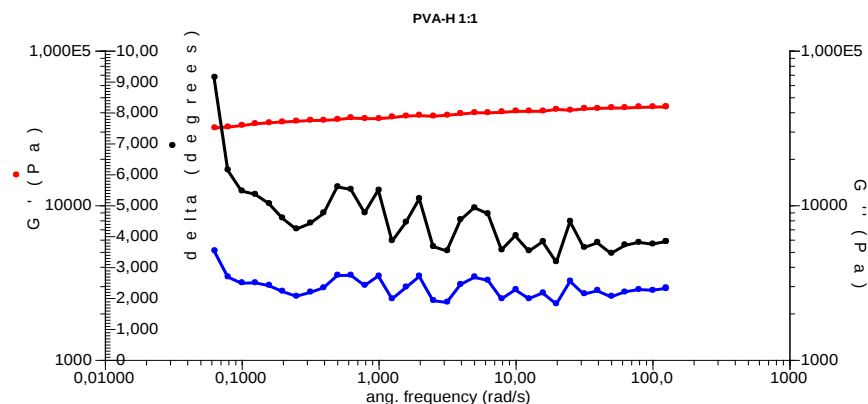


Figura 27 - Spettro meccanico in scala logaritmica del campione PVA-H 2_E, in rosso il modulo elastico (G'), in blu il modulo viscoso (G'') e in nero lo sfasamento ($\tan \delta$)

Gli idrogel sintetizzati con rapporti molari PVA/STMP 1:2, 1:1 e 1:0.5 essiccati in stufa mostrano proprietà meccaniche simili, con valori di $G^* \approx 30$ kPa (**Tabella 13**). Nonostante i tre differenti rapporti molari tra polimero e reticolante, questi tre campioni risultano identici, anche da un punto di vista del grado di fosfatazione (vedi paragrafo 2.4.3) e del contenuto d'acqua (vedi paragrafo 2.5.2). Evidentemente già il rapporto teorico di 1:0.5 risulta essere una condizione di forte eccesso di agente reticolante che fa sì che l'incremento di agente reticolante non comporti un incremento del grado di reticolazione del materiale e quindi più elevate proprietà meccaniche. I valori di G^* per questi tre campioni corrispondono ai valori della cartilagine tibiale (30 ± 3 kPa), mentre i campioni 1:0.1 e 1:0.25 mostrano valori troppo elevati per l'applicazione prevista.

Tabella 13 - Valori del modulo complesso (G^*) dei campioni essiccati, misurati alle frequenze di oscillazione caratteristiche della camminata e della corsa (rispettivamente ,5 e 3,0 Hz)

Campione	G^* (kPa) 0.5 Hz	G^* (kPa) 3.0 Hz
PVA-H 0.1_E	50 $\pm$ 12	52 $\pm$ 13
PVA-H 0.25_E	73 $\pm$ 9	76 $\pm$ 9
PVA-H 0.5_E	30 $\pm$ 10	31 $\pm$ 10
PVA-H 1_E	31 $\pm$ 8	33 $\pm$ 8
PVA-H 2_E	36 $\pm$ 11	39 $\pm$ 12

I valori ottenuti per i campioni sintetizzati con rapporto molare PVA:STMP 1:0.1 e 1:0.25 sono in accordo con i dati di contenuto di acqua e compattezza della matrice evidenziata dall'analisi morfologica. La presenza di un numero maggiore di punti di reticolazione comporta non solo l'aumento di forze di richiamo

elastiche, ma anche l'aumento di discontinuità all'interno della struttura tridimensionale dell'idrogel. Queste discontinuità vanno ad interferire con le normali forze di richiamo generate dalle interazioni secondarie (legami ad idrogeno). Il miglior bilanciamento tra queste due forze vengono espresse dai campioni PVA-H 0.25_E con valori di $G^* \approx 75$ kPa.

2.7.2 *Stress Relaxation test*

Una delle proprietà fondamentali del tessuto cartilagineo è la capacità di rilassarsi velocemente in seguito all'applicazione di uno sforzo. Il rilassamento dello sforzo applicato è dovuto alla redistribuzione delle catene del materiale senza però indurre variazioni macroscopiche di volume. Un materiale che presenta un comportamento viscoelastico reagisce ad una deformazione imposta fornendo uno stress di risposta. Dopo aver raggiunto un massimo stress di risposta, se il materiale è in grado di rilassare, la sua deformazione diminuirà sensibilmente nel tempo fino al raggiungimento di un plateau. I materiali realizzati sono stati analizzati applicando loro una deformazione pari al 5%, 20%, 30% e 100%. Il grado di rilassamento dei campioni è stato valutato come riduzione percentuale dello shear stress dopo 1 secondo e dopo 10 minuti, ovvero il tempo che impiega il tessuto cartilagineo per compiere il completo rilassamento [23]).

Il test di stress-relaxation ha permesso di verificare l'elevata capacità di rilassamento dei materiali sintetizzati.

I risultati sono riportati nella **Tabella 14**, raggruppati secondo il grado di deformazione a cui è stato sottoposto il campione. Dopo 1 secondo dall'applicazione della sollecitazione tutti i materiali dissipano circa il 90% dello stress. La dissipazione raggiunge valori superiori al 95% dopo 10 minuti. Questa elevata capacità di rilassamento è dovuta alla possibilità delle catene polimeriche, che costituiscono le matrici, di scorrere le une sulle altre vincendo le interazioni che le tengono coese. Tale flusso viscoso conferisce ai campioni una capacità pressoché istantanea ($\approx 90\%$ dopo 1 secondo) di risposta alle sollecitazioni esterne. L'aumento della capacità di rilassamento all'aumentare della deformazione applicata è attribuibile al superamento della resistenza meccanica delle matrici, resistenza che non viene superata nel caso di deformazioni applicate inferiori al 10%. Le forze di taglio in gioco, in questo caso, non sono sufficienti ad attivare i meccanismi di scorrimento per dissipare gli sforzi instauratisi sul materiale. All'aumentare della percentuale di deformazione imposta al materiale, si registrano riduzioni percentuali progressivamente maggiori che raggiungono il valore massimo del 99% per deformazioni del 100%⁴⁴.

Tabella 14 – Valori di riduzione percentuale dello stress dei vari campioni dopo 1 secondo e 10 minuti

Campione	$\sigma\%$	Rid%(1 sec)	Rid% (10 min)
PVA-H 0.1	5	72 $\pm$ 4	96 $\pm$ 1
	20	93 $\pm$ 3	95 $\pm$ 1
	30	95 $\pm$ 1	97 $\pm$ 1
	100	98 $\pm$ 1	98 $\pm$ 1
PVA-H 0.25	5	90 $\pm$ 2	97 $\pm$ 1
	20	97 $\pm$ 1	97 $\pm$ 1
	30	98 $\pm$ 1	99 $\pm$ 1
	100	98 $\pm$ 1	99 $\pm$ 1
PVA-H 0.5	5	95 $\pm$ 1	98 $\pm$ 1
	20	97 $\pm$ 2	98 $\pm$ 1
	30	98 $\pm$ 1	99 $\pm$ 1
	100	98 $\pm$ 1	99 $\pm$ 1
PVA-H 1	5	95 $\pm$ 2	97 $\pm$ 1
	20	98 $\pm$ 1	99 $\pm$ 1
	30	99 $\pm$ 1	99 $\pm$ 1
	100	99 $\pm$ 1	99 $\pm$ 1
PVA-H 2	5	93 $\pm$ 3	95 $\pm$ 2
	20	97 $\pm$ 1	98 $\pm$ 1
	30	98 $\pm$ 1	99 $\pm$ 1
	100	98 $\pm$ 1	99 $\pm$ 1

In conclusione, in tutti i campioni, si raggiunge la situazione di plateau in tempi molto brevi. Questo evidenzia per tali materiali le caratteristiche viscoelastiche richieste per la dissipazione degli sforzi articolari,

Sulla base dei risultati reologici i materiali più idonei, per l'applicazione come sostituto della cartilagine tibiale, risultano essere i campioni PVA-H 0.5, PVA-H 1 e PVA-H 2.

2.8 Analisi dinamo-meccanica (DMA)

L'analisi dinamo-meccanica permette di valutare le proprietà viscoelastiche (E' : modulo elastico; E'' : modulo viscoso) di un materiale sottoposto a sollecitazioni in compressione. Tramite DMA sono state condotte analisi in regime oscillatorio di frequency sweep e analisi in regime stazionario di sforzo/deformazione sui vari campioni.

2.8.1 Frequency sweep Test

La cartilagine tibiale non è un materiale isotropico, infatti ed è caratterizzata da un gradiente di proprietà meccaniche, in termini di E' in compressione, che varia in modo crescente dalla superficie verso il bulk del materiale¹⁵. Nella zona più superficiale, all'incirca nei primi 125 μm del tessuto, il valore di E' risulta essere di $0.24 \pm 0.08 \text{ MPa}$. Mentre le proprietà compressive del tessuto assumono valori di $0.47 \pm 0.08 \text{ MPa}$ ⁴⁵.

Gli spettri meccanici in compressione dei campioni PVA-H 0.5_E, PVA-H 1_E e PVA-H 2_E sono riportati nelle **Figure 28, 29 e 30**. Tutti i materiali mostrano valori di E dello stesso ordine di grandezza del valore della cartilagine tibiale.

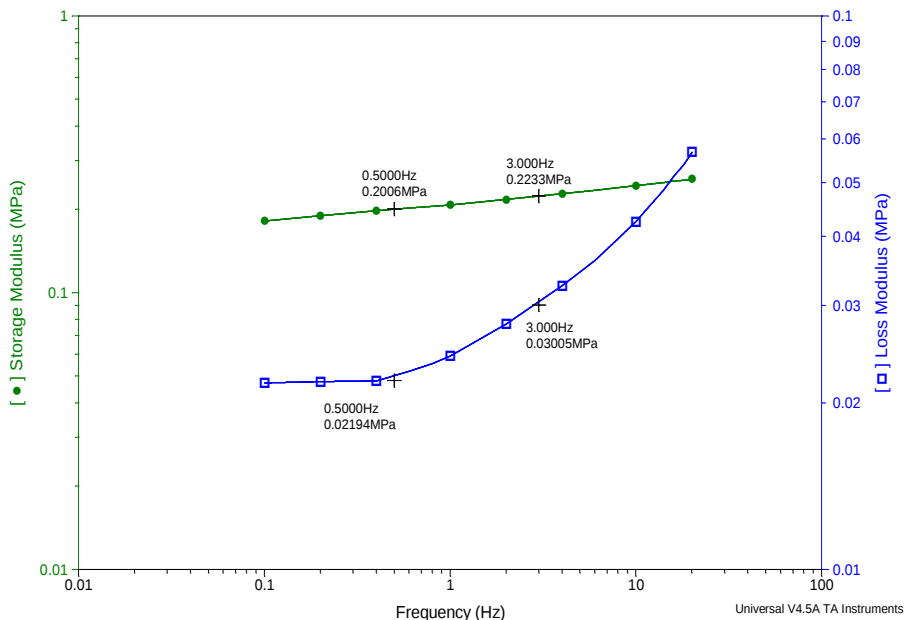


Figura 28 - Spettro meccanico in scala logaritmica del campione PVA-H 0.5_E, in verde il modulo elastico (E'), in blu il modulo viscoso (E'')

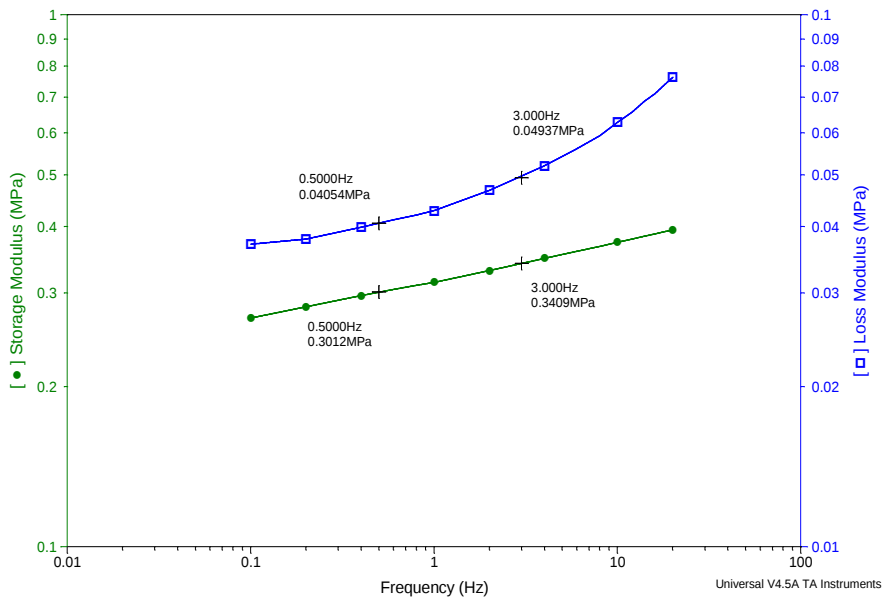


Figura 29 - Spettro meccanico in scala logaritmica del campione PVA-H 0.5_E, in verde il modulo elastico (E'), in blu il modulo viscoso (E'')

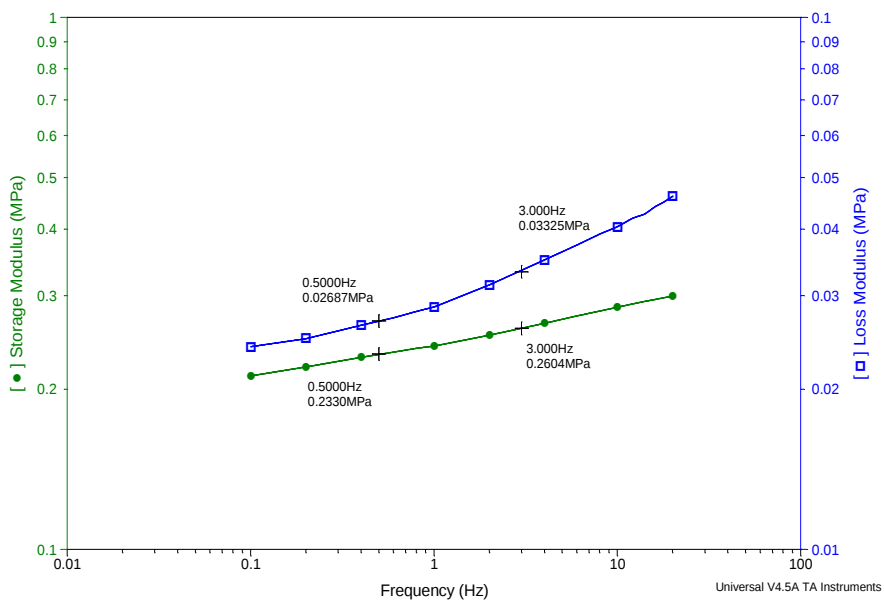


Figura 30 - Spettro meccanico in scala logaritmica del campione PVA-H 0.5_E, in verde il modulo elastico (E'), in blu il modulo viscoso (E'')

Tabella 15 - Valori di modulo elastico (E') e modulo viscoso (E'') dei campioni PVA-H 0.5_E, PVA-H 1_E e PVA-H 2_E alle frequenze di oscillazione caratteristiche della camminata e della corsa (5 e 3.0 Hz)

Campione	0.5 Hz		3.0 Hz	
	E' (kPa)	E'' (kPa)	E' (kPa)	E'' (kPa)
PVA-H 0.5_E	0.20	0.02	0.22	0.03
PVA-H 1_E	0.30	0.04	0.34	0.05
PVA-H 2_E	0.23	0.03	0.26	0.03

2.9 Valutazione della stabilità dei materiali

2.9.1 Test Degradativo Accelerato

La stabilità dei materiali è stata valutata secondo le norme ISO/FDIS 10993-13 Biological evaluation of medical devices – Part 13: Identification and quantification of degradation products from polymeric medical devices.

Seguendo la procedura sono state scelte le seguenti soluzioni test:

- PBS pH 7.4 in accordo con ISO 13781 per la **degradazione idrolitica**;
- H₂O₂ 3% in soluzione acquosa (Pharmacopoea grade) per la **degradazione ossidativa**.

I test degradativi accelerati (70°C per 60 giorni) vengono generalmente utilizzati come metodi di screening per valutare un'eventuale necessità di un test degradativo in tempo reale (37 ± 1°C per 180 giorni).

Tutti i materiali analizzati rivelano un comportamento simile in entrambe le tipologie di soluzioni test utilizzate (**Tabella 16**). In particolare, nelle soluzioni idrolitiche in condizioni accelerate i campioni perdono mediamente il 6±1% del loro peso. Tale perdita è attribuibile alla solubilizzazione di piccole porzioni di PVA rimasto intrappolato all'interno del materiale attraverso reticolazioni di tipo fisico. I campioni in soluzioni ossidative, invece, subiscono una completa dissoluzione del materiale; in questo caso la soluzione assume infatti una colorazione gialla attribuibile ai prodotti di degradazione del PVA^{46,47}. È da considerare che l'H₂O₂ è un reagente utilizzato durante la mineralizzazione dei materiali e che le condizioni utilizzate nel test, seppur più blande rispetto alle condizioni di mineralizzazione, risultino eccessivamente ossidanti per i materiali in esame.

Tabella 16 -Variazione % peso dei campioni 0,5_E, 1_E e 2_E nelle soluzioni test PBS pH 7.4 e H₂O₂ 3% nei test degradativi accelerati.

Campione	PBS	H ₂ O ₂
0,5_E	0%	100%
1_E	0%	100%
2_E	0%	100%

2.9.2 Test degradativo in tempo reale

In seguito ai risultati ottenuti dai test degradativi accelerati, dove i campioni hanno mostrato una degradazione del 100% in condizioni di stress ossidativo e di circa il 6-7% in condizioni di degradazione idrolitica, sono stati eseguiti test di degradazione in tempo reale per la durata di 6 mesi al fine di confermare l'idoneità dei materiali per l'applicazione consigliata.

Seguendo la procedura sono state scelte le seguenti soluzioni test:

- PBS pH 7.4 in accordo con ISO 13781 per la **degradazione idrolitica**;
- H₂O₂ 3% in soluzione acquosa (Pharmacopoea grade) per la **degradazione ossidativa**.
- Soluzione di pseudo liquido sinoviale (PLS)⁴⁸simulante pH e forza ionica del liquido sinoviale contenuto all'interno dell'articolazione del ginocchio.

I campioni sono stati mantenuti nelle varie soluzioni test per un tempo di 180 giorni alla temperatura di $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

I risultati dei test degradativi (**Tabella 17**) non mostrano nessuna perdita di peso percentuale nel caso dei campioni sottoposti alle soluzioni di PBS e PLS, mentre vengono confermati i dati delle degradazioni in tempo accelerato per i campioni in H₂O₂. Le differenze delle perdite di peso dei campioni nelle soluzioni di PBS e PLS sono da ricercare nell'elevata temperatura di esercizio dei test degradativi accelerati, questo perché gli idrogel sintetizzati con il metodo proposto in questo lavoro contengono (vedi par. 2.4.1) alcuni elementi di reticolazione fisica all'interno della loro struttura e molto probabilmente la temperatura di 70°C, proposta per il test, risulta sufficiente a causare la rottura delle forze intermolecolari deboli che tengono unite le catene polimeriche, con conseguente perdita di peso dell'idrogel.

Tabella 17 - Variazione % peso dei campioni 0,5_E, 1_E e 2_E nelle soluzioni test PBS pH 7.4, H₂O₂ 3% e PLS nei test degradativi in tempo reale.

Campione	PBS	H ₂ O ₂	PLS
0,5_E	0%	100%	0%
1_E	0%	100%	0%
2_E	0%	100%	0%

2.10 Test di citotossicità

La citotossicità dei materiali è stata valutata, secondo le norme ISO/FDIS 10993-5 dopo 24 ore di contatto con un monostrato di fibroblasti immortalizzati di topo della linea NIH3T3. L'obiettivo di questo test è quello di valutare, in vitro, sia l'effetto tossico diretto del materiale che quello indiretto, dovuto al possibile rilascio di agenti tossici che possono interferire con la vitalità cellulare. L'eventuale diminuzione del numero di cellule dopo contatto con i campioni può essere dovuto sia all'inibizione della proliferazione sia all'induzione di morte cellulare. La vitalità cellulare è un parametro utile per la misura di un danno anche parziale al complesso assetto enzimatico di cui la cellula necessita per replicarsi e la sua valutazione è particolarmente idonea a delineare una risposta ad elevata sensibilità. I risultati dei test di citotossicità sono mostrati in **Figura 31**.

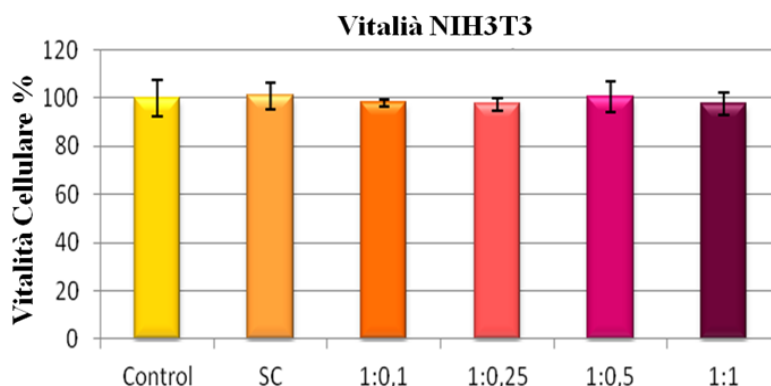


Figura 31 – Vitalità cellulare dei fibroblasti NIH3T3 dopo 24 ore di contatto con i campioni in esame. I dati non sono significativamente differenti rispetto al controllo

I risultati sperimentali, mostrano come non ci siano differenze statisticamente significative tra campioni in esame e il controllo (HDPE: polietilene ad alta densità). Questo dato permette di affermare che i campioni sono privi di attività citotossica in vitro. Essi né rilasciano componenti di sintesi o prodotti di reazione

tossici, né provocano sofferenza cellulare per effetto meccanico, non interferendo con il metabolismo cellulare.

I tessuti cartilaginei del ginocchio incorrono spesso in numerose patologie come l'osteoartrite, un processo degenerativo irreversibile. Pertanto, è stato progettato e sintetizzato un materiale biomimetico che potesse essere utilizzato come sostituto della cartilagine tibiale, cartilagine situata all'interno dell'articolazione del ginocchio che impedisce lo sfregamento dell'unità femorale con la tibia. Allo scopo di mimare il tessuto cartilagineo è stato scelto come materiale sostitutivo un idrogel di PVA, reticolato per via chimica mediante STMP. Per determinare le migliori condizioni sono stati sintetizzati cinque campioni di idrogel con differenti rapporti molari PVA:STMP.

La spettrometria infrarossa, la spettrometria di massa ioni secondari, l'analisi colorimetrica e l'analisi elementare hanno permesso di verificare l'avvenuta reticolazione chimica sia da un punto di vista qualitativo che quantitativo. In particolare, è stato verificato che l'agente reticolante è rappresentato da gruppi monofosfato e che il massimo grado di fosfatazione (e quindi di reticolazione) si raggiunge ad un rapporto molare PVA:STMP pari a 1:0.5.

La capacità di un idrogel di svolgere adeguatamente le sue funzioni quale sostituto di un tessuto molle è strettamente correlata alla sua capacità di rigonfiamento. Il contenuto d'acqua degli idrogel è risultato dipendere dal metodo di disidratazione utilizzato. I dati hanno mostrato infatti che tramite liofilizzazione è possibile ottenere idrogel con caratteristiche assorbenti più pronunciate rispetto a idrogel ottenuti per essiccamento in stufa. Questo perché il processo di liofilizzazione garantisce il mantenimento di una struttura aperta, mentre l'essiccamento in stufa ne produce una relativa compattazione, come mostra l'analisi di microscopia elettronica (SEM), che ha permesso di rilevare gli effetti del metodo di essiccamento sull'organizzazione micro strutturale dei campioni.

Tutti gli idrogel sottoposti ad essiccamento in stufa ad eccezione del campione PVA-H 0.1 rientrano nel range di WC mostrato dalla cartilagine articolare umana ($60\% < WC_{\text{cart}} < 80\%$). I migliori risultati tuttavia sono stati ottenuti con i campioni PVA-H 0.5, PVA-H 1 e PVA-H2 essiccati, con valori che si collocano esattamente sul punto medio del range di WC della cartilagine umana ($\approx 70\%$), mentre il WC degli stessi campioni sottoposti a liofilizzazione supera mediamente di $\approx 5\text{-}8\%$ il limite superiore del range.

Da un punto di vista meccanico, tutti gli idrogel sintetizzati sono risultati di tipo solido, mostrando valori di G' (modulo elastico) superiori di un ordine di grandezza rispetto ai valori di G'' (modulo viscoso). Gli idrogel sottoposti ad

essiccamento hanno mostrato capacità elastiche superiori rispetto a quelle degli idrogel sottoposti a liofilizzazione, che ha dato luogo a materiali con proprietà meccaniche insufficienti per la simulazione del tessuto cartilagineo. I materiali più idonei a simulare il tessuto cartilagineo sono risultati gli idrogel PVA-H 0,5_E, PVA-H 1_E e PVA-H 2_E che possiedono moduli elastici simili a quello della cartilagine del piatto tibiale ($\approx 30 \pm 3$ kPa).

Tutti i materiali sono in grado di dissipare istantaneamente la deformazione applicata, toccando mediamente una riduzione percentuale $>$ dell'80% dopo 1 solo secondo, allo stesso modo del tessuto cartilagineo umano.

I test degradativi hanno mostrato, eccezion fatta per le soluzioni ossidative, un'ottima stabilità chimica con blande perdite di peso per i campioni sottoposti a test accelerati e nessuna perdita di peso nel caso dei campioni sottoposti ai test in tempo reale. Le perdite riscontrate nei test accelerati sono principalmente attribuibili ad un effetto termico non riproducibile nel corpo umano (37°C vs 70°C). In ambiente ossidativo tutti i materiali, sia nei test accelerati sia in tempo reale, hanno mostrato una completa perdita di peso dei campioni. Va ricordato tuttavia che il PVA è un materiale già ampiamente utilizzato⁴⁹ in campo biomedico in numerose applicazioni a breve e a lungo termine, sia allo stato di idrogel fisico meno resistente a variazioni di pH forza ionica e temperatura, che nello stato di idrogel chimico maggiormente resistente. Da questa breve riflessione è stato dedotto che le soluzioni proposte per la simulazione delle condizioni ossidative utilizzate in questo lavoro sono risultate eccessivamente aggressive per la conduzione dei test, e quindi dovranno essere considerate ulteriori conferme al riguardo.

I campioni non sono citotossici in vitro, requisito fondamentale per materiali progettati per applicazioni in campo biomedico.

Tra tutti i materiali, il campione PVA-H 0.5_E mostra le migliori caratteristiche in termini di idratazione, proprietà meccaniche e citotossicità per essere potenzialmente impiegato nella realizzazione di impianti biomedici volti alla terapia dell'osteoartrite.

NUCLEO POLPOSO

Questa pagina è stata lasciata
intenzionalmente vuota

3.1 Anatomia del Disco intervertebrale

Il disco intervertebrale è una parte importante dell'unità funzionale spinale (FSU), costituita dal disco, le due vertebre circostanti e dalla struttura legamentosa circostante. Le proprietà biomeccaniche della colonna vertebrale sono il risultato della somma di ciascuna FSU. La principale funzione del disco intervertebrale è quella di permettere il moto tra le vertebre adiacenti resistendo a carichi in compressione e flessione e in modo minore a carichi in torsione e taglio. Il disco intervertebrale garantisce un'attenuazione dinamica dei carichi grazie alle sue capacità viscoelastiche e grazie alle interazioni meccaniche con il corpo vertebrale.

Il disco intervertebrale è composto da tre elementi istologicamente, funzionalmente e fisicamente interdipendenti (**Figura 32**): Il nucleo polposi (NP), l'anulo fibroso (AF) e il piatto cartilagineo (CEP).

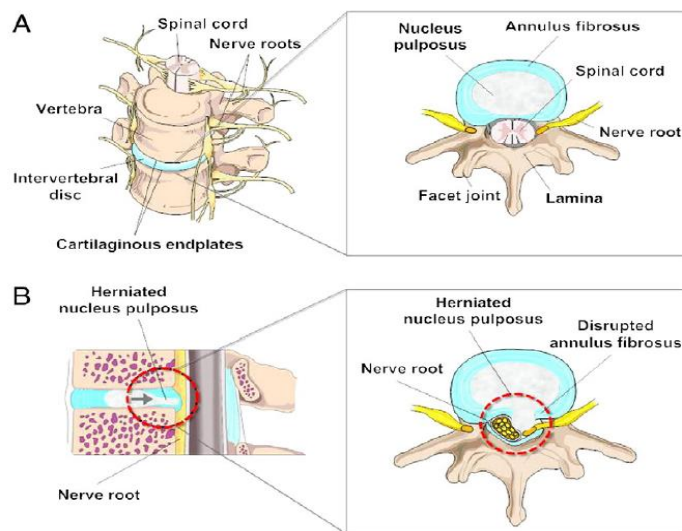


Figura 32 -Disco intervertebrale sano e disco intervertebrale erniato. (A) Rappresentazione grafica (vista superiore) di un segmento vertebrale con IVD sano posizionato tra le due vertebre adiacenti; (B) Rappresentazione grafica (vista sagittale e superiore) di un IVD erniato. Il cerchio a trattini rossi indica la fuoriuscita dell'ernia

3.1.1 Il nucleo polposo

Il nucleo polposo (NP) è situato al centro del disco intervertebrale ed occupa mediamente il 30-50% dell'area del disco. È composto da un network di fibrille di collagene (0.10-0.15 mm di diametro) disperse in un gel granulare costituito da filamenti di ialuronato legati a molecole di aggregano e stabilizzato da proteine. Le cellule presenti nel tessuto, principalmente condrociti possiedono generalmente grandi dimensioni e forma sferica ed hanno lo scopo di produrre collagene di Tipo II⁵⁰.

Il network di proteoglicani è responsabile del grande potenziale di rigonfiamento del nucleo polposo, che risulta essere di circa 200% del suo volume iniziale. Numerosi lavori hanno dimostrato che il network di proteoglicani attraverso l'interazione con le fibrille di collagene e l'acqua interstiziale gioca un ruolo fondamentale nelle proprietà meccaniche statiche e dinamiche del disco intervertebrale. Le proprietà meccaniche del NP sono simili a quelle di un fluido incomprimibile, è cioè incapace di sostenere gli stress applicati se non in condizioni di confinamento. Il nucleo polposo è caratterizzato da un modulo di Young di 20-60 kPa che corrisponde ad un modulo di taglio, determinato tramite reometro, di 7-20 kPa e possiede la capacità di rilassarsi molto velocemente, rilassando nell'arco di 1 secondo fino al 50% dello stress iniziale applicato. Questo rapido rilassamento iniziale è poi seguito da un rilassamento graduale che tende a zero nell'arco di 600 secondi, comportamento del tutto simile a quello di un fluido⁵⁰⁻⁵².

3.1.2 Anulo fibroso

L'anulo fibroso (AF), che racchiude il nucleo polposo è formato da una serie concentrica di lamine di collagene immerse in una matrice che funge da collante. In contrasto con il nucleo polposo, la popolazione cellulare dell'AF è costituita da fibroblasti di forma stretta e allungata e da collagene di Tipo I e II. La struttura delle lamelle dell'AF è essenzialmente irregolare, con uno spessore medio compreso tra 0.14 e 0.52 mm. Lo spessore risulta crescente dalla regione esterna a quella interna. Le fibre di ciascuna lamina possiedono generalmente un'inclinazione di $\pm 30^\circ$ rispetto al piano vertebrale. L'AF è il principale responsabile delle proprietà meccaniche del disco intervertebrale⁵⁰.

3.1.3 Il Piatto cartilagineo

Il piatto cartilagineo (CEP), che separa il disco dall'adiacente vertebra, gioca un ruolo fondamentale nel metabolismo del disco intervertebrale, nella crescita della vertebra e nel trasferimento degli stress dalla vertebra all'osso. Nei bambini (sotto i 10 anni), il piatto è composto da una regione interna cartilaginea e da una sottile zona calcificata adiacente alla zona diafisiale dell'osso. Gradualmente, passando in età adulta, avviene un incremento della regione calcificata dello strato

cartilagineo. Il piatto cartilagineo possiede un basso contenuto d'acqua (58%), e un alto contenuto di collagene (fino al 78% del peso del tessuto secco)⁵⁰.

3.1.4 Invecchiamento e degenerazione del disco intervertebrale

La spina dorsale è una delle articolazioni maggiormente soggetta ai carichi che si sviluppano durante la normale deambulazione, carichi che possono notevolmente incrementare se vengono compiute particolari azioni di torsione, o sollevamento di pesi. Questi stress biomeccanici, con la maturazione dei tessuti spinali, sono spesso causa di dolori vertebrali lombari ("*low back pain*", LBP). È stato stimato che i LBP colpiscono circa il 50-80% degli individui nei paesi industrializzati con un picco di incidenza in età comprese tra i 45 e i 64 anni. Il manifestarsi di queste condizioni dolorose si ripercuote con un notevole impatto sociale, economico e medico, sulla società. A seconda della ricorrenza del dolore, i LBP si suddividono in "*acuti*" se perdurano per un periodo inferiore alle sei settimane, "*sub-acuti*" se perdurano per un periodo compreso tra le sei settimane e i tre mesi e "*cronici*" se perdurano per periodo superiori a tre mesi. I LBP, inoltre, possono essere classificati in "*specifici*" quando sono associati a cause patologiche (es. spondilolistesi congenita, anchilosi, spondilosi, neoplasma, infezioni, fratture vertebrali e malattie del disco) o in "*non specifici*" (circa il 90% dei casi). L'usuale pratica di recupero da LBP coinvolge riposo a letto, fisioterapia e/o somministrazione di farmaci antinfiammatori e antidolorifici. Nei casi più acuti vengono spesso effettuati interventi chirurgici⁵¹.

Durante il processo di invecchiamento avviene una graduale sostituzione del nucleo con tessuto fibrocartilagineo attraverso l'espansione dell'anulo verso l'interno e la formazione di fessure e fratture nella porzione esterna. Questi cambiamenti strutturali sono spesso accompagnati da una netta diminuzione della vitalità cellulare localizzata in maggior modo nelle regioni centrali del disco e da una riduzione del contenuto d'acqua e della concentrazione dei proteoglicani. Allo stesso tempo avviene un aumento della concentrazione delle proteine non collagenose con un accumulo di materiale granuloso derivante dalla degenerazione delle molecole della matrice. Il risultato di questo processo, in congiunzione con la riduzione della vascolarizzazione dell'anulo esterno e l'ossificazione del piatto cartilagineo, produce una riduzione della velocità di diffusione dei soluti attraverso il disco, compromettendo l'apporto di nutrienti alla componente cellulare. In seguito a queste variazioni, il disco intervertebrale va incontro a cambiamenti della sua forma, struttura e composizione, causando una variazione delle proprie caratteristiche funzionali e del proprio comportamento meccanico. Come avviene spesso in questi casi la variazione delle proprietà di base dei tessuti comporta il fallimento strutturale dell'IVD^{50,51}.

La maggioranza dei casi di LBP sono dovuti a effetti degenerativi dell'invecchiamento dei tessuti, attività fisiche intense, fumo, elevata densità ossea e scarsa elasticità dei muscoli addominali e lombari. Tuttavia nella maggior

parte dei pazienti che mostrano sintomi di LBP è possibile riscontrare una degenerazione del disco intervertebrale (IDD); infatti i LBP costituiscono il primo segno della IDD, degenerazione che può trasformarsi in vari disordini spinali più gravi tra i quali l'erniazione del disco intervertebrale **Figura 33**.

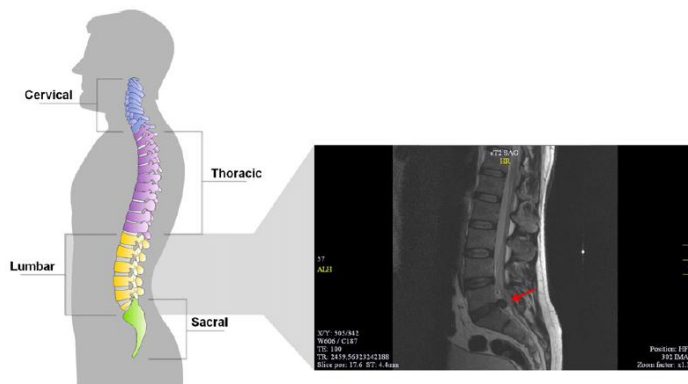


Figura 33 – Rappresentazione grafica della struttura spinale e immagine MR sagittale del tratto lombare mostrante ernia del disco a L5-S1 (segmento lombare 5 e segmento lombare 1). La colonna vertebrale è composta da 24 vertebre separate da IVD e 9 vertebre fuse (5 delle quali formano il segmento sacrale e 4 il coccigee). La spina dorsale è suddivisa in quattro regioni in accordo con la loro locazione: cervicale (7 vertebre), toraciche (12 vertebre), lombari (5 vertebre) e sacrali. Come risultato di un trauma o di una patologia spinale l'anello esterno del disco (anulo fibroso, AF) si può rompere e la parte interna del disco (il nucleo polposo, NP) può fuoriuscire (ernia) causando una pressione sui nervi circostanti, come si può vedere dall'immagine MRI

3.1.5 Scopo

Un'alternativa alle classiche procedure cliniche, che prevedono l'asportazione chirurgica della lesione liberando il paziente dal dolore e stabilizzando la sezione spinale danneggiata, è rappresentata dalla riparazione del disco intervertebrale degenerato. Molti biomateriali sono stati proposti e testati in ingegneria tissutale e in medicina rigenerativa per sostituire e/o favorire la crescita dei tessuti coinvolti nel IVD, ma sfortunatamente il materiale perfetto e la giusta strategia di rigenerazione non è stato ancora trovato.

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di realizzare un materiale capace di simulare le proprietà fisiche del nucleo polposo, tessuto direttamente coinvolto nella formazione di un'ernia. Essendo il nucleo polposo un tessuto altamente idratato con un contenuto d'acqua che raggiunge fino il 90% del suo peso secco gli idrogel rappresentano ancora i candidati più idonei alla sua sostituzione. In questo lavoro è stato impiegato un idrogel a base di PVA reticolato chimicamente tramite STMP ed arricchito con polivinilpirrolidone (PVP). Il PVP, polimero altamente idrofilo notoriamente utilizzato anche come additivo alimentare, è stato disperso insieme al PVA formando un blend polimerico prima della fase di reticolazione chimica. Lo scopo del PVP è stato quello di incrementare la capacità di assorbimento d'acqua dell'idrogel finale, rendendo il materiale ancora più

idrofilo, con valori di contenuto d'acqua simili a quelli del NP⁵². Basandosi su precedenti studi (vedi par. 2.3), per la realizzazione dei materiali è stato selezionato il grado di fosfatazione più idoneo, in termini di proprietà meccaniche e sono stati quindi realizzati tre campioni di idrogel a contenuto crescente di PVP. I materiali ottenuti sono stati sottoposti a caratterizzazione chimico/fisica e la capacità di supportare la crescita cellulare è stata valutata tramite test di citotossicità cellulare in vitro.

Questa pagina è stata lasciata
intenzionalmente vuota

3.2 Realizzazione degli idrogel

I gel misti PVA-PVP con diverse percentuali di PVP (**Tabella 18**) sono stati ottenuti utilizzando la procedura messa a punto per la realizzazione di idrogel a base di PVA reticolati con STMP (vedi par. 5.2.1).

Tabella 18 -Rapporti molari e volumi delle soluzioni utilizzati nella sintesi degli idrogel

Nome campione	Blend PVA-PVP (cm ³)	% PVA nel Blend	% PVP nel Blend	Rapporto molare PVA:STMP	STMP 20% (cm ³)
1,0%	10	10,0%	1,0%	1:0.5	17.4
2,5%	10	10,0%	2,5%	1:0.5	17.4
5,0%	10	10,0%	5,0%	1:0.5	17.4

3.3 Caratterizzazione Chimica

3.3.1 Analisi infrarossa

Gli spettri IR dell'idrogel PVA-STMP e dell'idrogel misto PVA-PVP, sono riportati in **Figura 34**. I numeri d'onda relativi alle principali bande osservate negli spettri IR e le loro relative attribuzioni sono riportati in **Tabella 19**. Non essendo presente nel PVP nessun gruppo funzionale soggetto a reticolazione con STMP, la sua presenza all'interno della matrice è confermata dalla comparsa nello spettro relativo al gel misto della banda centrata a 1654cm⁻¹ relativa allo stiramento del gruppo carbonilico del polimero PVP.

L'analisi infrarossa ha inoltre permesso di verificare che la presenza del PVP non ostacola il processo di reticolazione del PVA ad opera dell'agente reticolante STMP.

Tabella 19 - Principali numeri d'onda e relative assegnazioni degli spettri IR dei materiali impiegati per la sintesi degli idrogel

Campioni	Numeri d'onda (cm ⁻¹)	Assegnazioni
PVA	3300-3380	Stiramento legame -OH coinvolto in legame ad idrogeno inter ed intra molecolari
	2945-2950	Stiramento simmetrico ed asimmetrico gruppo CH ₂
	1720	Stiramento legame COOR dei gruppi acetato
	1660	Piegamento OH
	1331-1425	Piegamento CH ₂
	1098-1290	Stiramento gruppo alcolico della catena molecolare -C-O-H
PVP	1654	Stiramento C=O
	1429-1450	Piegamento CH ₂
	1282	
STMP	1298	Stiramento P=O
	1164	Stiramento PO ₃
	1106	Stiramento PO ₃
PVA-PVP-P	3300-3380	Stiramento legame -OH coinvolto in legame ad idrogeno inter ed intra molecolari
	2945, 2950	Stiramento simmetrico ed asimmetrico gruppo CH ₂
	1654	Stiramento C=O del PVP
	1331-1425	Piegamento CH ₂
	1290	Stiramento gruppo -C=O e stiramento gruppo -P=O
	914	Stiramento PO ₃

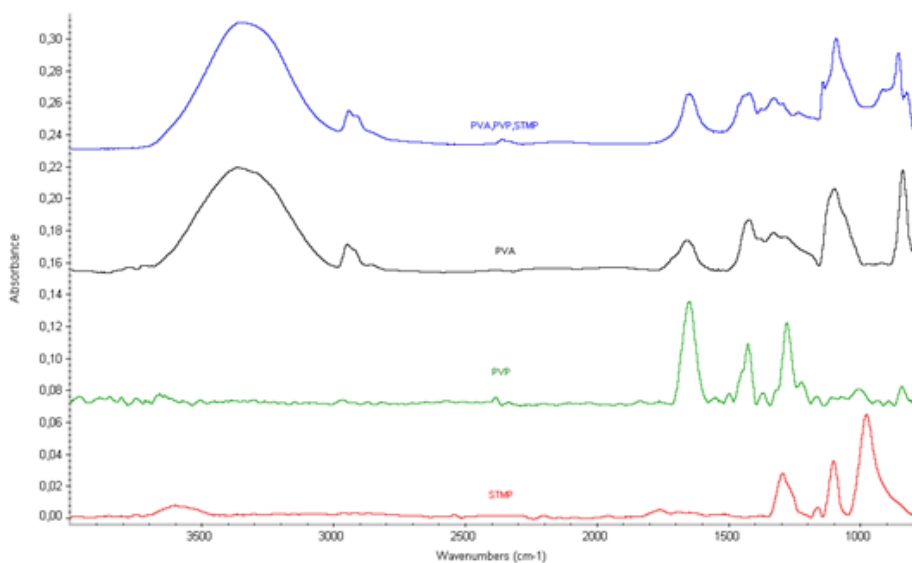


Figura 34 -Spettri IR (4000-750 cm⁻¹) dell'idrogel PVA-PVP-STMP (blu) del PVA nativo (nero), del PVP nativo (verde) e dell'STMP(rosso)

3.3.2 Determinazione colorimetrica degli ioni orto fosfato

L'analisi colorimetrica dei fosfati è stata condotta allo scopo di valutare l'effetto del PVP sulla reticolazione del PVA da un punto di vista quantitativo. I risultati delle analisi espressi in moli di P/ g idrogel sono riportati in **Tabella 20**.

Tabella 20 – Rapporti molari e relative concentrazioni di P espresse in mol P / g_{idrogel} dei campioni

Molar Ratio U-PVA:STMP	mol P / g idrogel
Riferimento (0,5_E)	$5 \cdot 10^{-3} \pm 5 \cdot 10^{-4}$
1,0%	$2 \cdot 10^{-3} \pm 8 \cdot 10^{-4}$
2,5%	$3 \cdot 10^{-3} \pm 3 \cdot 10^{-4}$
5,0%	$3 \cdot 10^{-3} \pm 4 \cdot 10^{-4}$

Rispetto al campione di riferimento costituito dall'idrogel PVA-H 0,5_E con lo stesso rapporto molare PVA/STMP, ma senza arricchimento di PVP (vedi par. 2.4.3) gli idrogel misti mostrano quantità di fosforo inferiori. Questo perché durante la miscelazione tra le catene di PVP e di PVA avviene la formazione di

legami ad idrogeno intermolecolari, favorendo la formazione di regioni organizzate che riducono il libero movimento delle catene di PVA interferendo così con il processo di reticolazione. Questa variazione del grado di fosfatazione è tuttavia di lieve entità. Dalle analisi non si registrano inoltre cambiamenti significativi nella quantità di fosforo presente nei tre campioni a differenti percentuali di PVP.

3.4 Caratterizzazione fisica

3.4.1 Analisi termogravimetrica TGA

Tutti i materiali presentano un simile comportamento termico. In **Figura 35** sono riportate le curve della derivata della perdita di peso in funzione della temperatura (DTG) degli idrogel 1,0%, 2,5% e 5,0%.

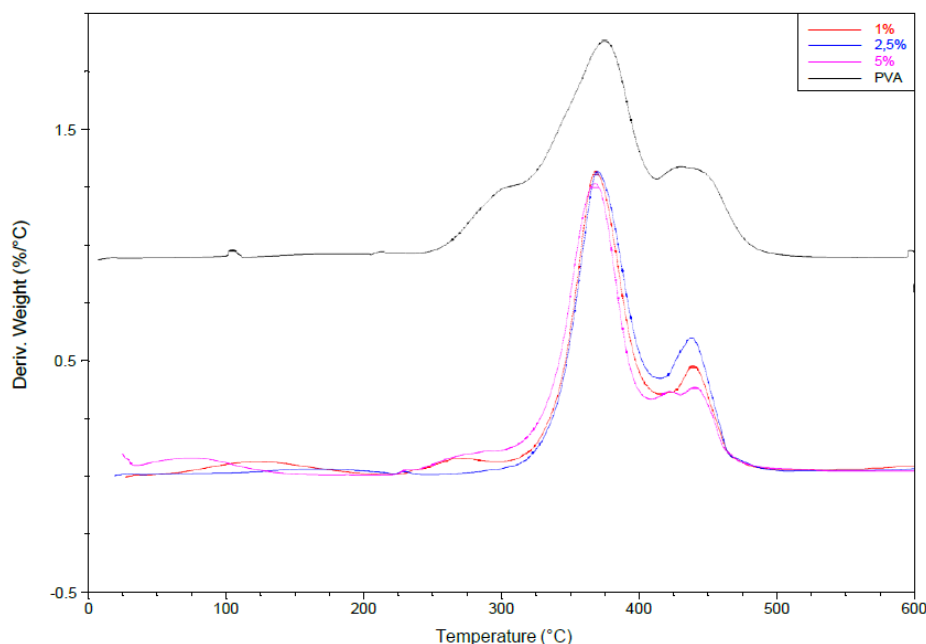


Figura 35 – Curve DTG del PVA (nero), dell'idrogel 1,0% (verde), dell'idrogel 2,5% (blu) e dell'idrogel 5,0% (fucsia)

Gli idrogel misti mostrano un profilo di degradazione simile a quello degli stessi idrogel privi di PVP, sia in termini di perdite percentuali di peso nei diversi intervalli di riscaldamento, sia in termini di temperature alle quali si registrano le principali di perdite in peso, come dimostrato dai valori riportati in **Tabella 21**.

Ciò conferma ulteriormente l'assenza di interazioni significative tra i componenti della matrice mista.

Tabella 21 – Variazioni di peso percentuali dei campioni nelle tre differenti finestre di temperature caratteristiche ($SD \pm 0.5\%$)

PVA:STMP	$\Delta\%$ 20-200	$\Delta\%$ 200-400	$\Delta\%$ 400-600
PVA	2	69	26
1:0.5_E (RIF)	5	62	28
1,0%	6	66	24
2,5%	6	66	25
5,0%	6	66	24

3.4.2 Contenuto d'acqua (WC)

Il valore di contenuto d'acqua del nucleo polposo è compreso tra il 70-90% del suo peso¹. Essendo confinato all'interno del disco intervertebrale dall'anulo fibroso il NP deve le sue proprietà meccaniche alle pressioni idrostatiche che si sviluppano quando viene sottoposto a sollecitazioni in condizioni di confinamento. Non a caso le proprietà del NP vengono spesso descritte come quelle di un fluido incomprimibile⁵⁰. Per questo motivo il WC gioca un ruolo fondamentale nel mimare le proprietà del tessuto. I valori di WC dei materiali sintetizzati e del materiale di riferimento (PVA-H 0.5_E) in soluzione di NaCl 0.9% sono riportati in **Tabella 22**.

A seconda del metodo di essiccamento utilizzato i campioni mostrano differenti capacità di rigonfiamento differenti. I dati ottenuti rivelano come i campioni liofilizzati siano caratterizzati da valori di WC più elevati, compatibili con il fatto che il processo di liofilizzazione garantisca il mantenimento di una struttura aperta, mentre durante il processo di essiccamento in stufa le catene polimeriche possano riorganizzarsi conducendo ad una struttura più compatta. In accordo con i dati di fosfatazione i campioni con rapporto molare PVA/STMP 1:2, 1:1 e 1:0.5 non mostrano differenze significative in termini di WC. Gli idrogel che presentano un minore grado di fosfatazione assumono, invece, un minore valore di WC. Ciò è sicuramente legato alla presenza di un numero minore di bracci idrofili che contribuiscono all'idratazione totale del campione. Tutti gli idrogel ad eccezione del campione 1:0.1, sottoposti ad essiccamento, assumono valori di contenuto di acqua paragonabili a quelli della zona profonda della cartilagine articolare umana. L'effetto del processo di essiccamento sulla struttura microscopica del materiale è stato verificato analizzando i campioni tramite microscopia elettronica a scansione (vedi par. 2.6.2).

Tabella 22 – Confronto tra il Water Content (WC) in soluzione di NaCl 0.9% dell'idrogel utilizzato come riferimento e degli idrogel con differenti contenuti di PVP

Campione	Water Content		
PVA-H 0,5_E	69	±	1
1,0%	67	±	2
2,5%	75	±	3
5,0%	82	±	3

I materiali mostrano un aumento del WC con l'aumentare del contenuto percentuale di PVP. L'incremento di WC dei materiali è in linea con la maggiore idrofilità dei gruppi ammidici presenti nella catena laterale del PVP che incrementano le capacità assorbenti dal 67% al 82%. Il campione 5% con WC 82±3%, in termini di idrofilità, costituisce il miglior candidato per la simulazione del NP umano.

3.5 Caratterizzazione Morfologica

3.5.1 Calorimetria a scansione differenziale (DSC)

Basandosi sui termogrammi DSC è stato possibile ottenere il raggio dei mesopori dei materiali sintetizzati. I loro valori medi sono riportati in **Tabella 23**. Dall'analisi dei dati riportati non si evincono differenze significative tra i materiali. Il raggio medio delle varie matrici è di circa 5 nm, ed è paragonabile a quello della matrice extracellulare^{30,52}.

Tabella 23 – Raggio dei mesopori dei vari campioni con differenti contenuti di PVP e relative SD

Sample	r mesopori (nm)		
0.5_E (RIF)	5	±	1
1,0%	6	±	1
2,5%	5	±	1
5,0%	6	±	1

La struttura porosa tridimensionale dei materiali, composta da una combinazione di meso e micropori, risultando simile alla struttura 3D presente all'interno della matrice extracellulare è in grado di mimare il comportamento delle capacità di trasporto e contenuto di fluidi e macromolecole del tessuto umano.

3.6 Caratterizzazione reologica (AR)

Al fine di valutare le proprietà biomimetiche dei materiali sintetizzati nei confronti del nucleo polposo, sono state valutate le loro proprietà viscoelastiche.

3.6.1 *Frequency sweep test*

Il modulo di taglio G^* del NP si colloca nel range di 7-20 kPa con un comportamento di dissipazione degli sforzi di tipo solid-like ($\tan \delta < 45^\circ$) che conferma la sua natura prevalentemente solida⁴⁴. Gli spettri meccanici degli idrogel a differenti dosaggi di PVP sono riportati in **Figura 36**. Tutti i campioni presentano una predominanza della componente elastica G' rispetto alla componente viscosa G'' di almeno un ordine di grandezza (**Tabella 24**). La dissipazione degli stress avviene in modalità prevalentemente elastica, similmente al nucleo polposo, con uno sfasamento ($\tan \delta$) di circa $3-4^\circ$ (**Tabella 25**), confermandone il comportamento solid-like.

Tabella 24 – Valori di modulo elastico (G') e modulo viscoso (G'') del campione utilizzato come riferimento e dei campioni con differenti percentuali di PVP

Campione	G' (kPa)	G'' (kPa)
PVA-H 0,5_E	31 $\pm$ 8	2 $\pm$ 1
1,0%	32 $\pm$ 5	2 $\pm$ 1
2,5%	25 $\pm$ 4	2 $\pm$ 1
5,0%	16 $\pm$ 3	1 $\pm$ 1

Tabella 25 – Valori di sfasamento ($\tan \delta$) dei campioni con differenti contenuti di PVPe del campione utilizzato come riferimento

Campione	$\tan \delta$ ($^\circ$)
PVA-H 0,5_E	5.4 $\pm$ 0.2
1,0%	4.5 $\pm$ 0.2
2,5%	3.6 $\pm$ 0.4
5,0%	4.5 $\pm$ 0.3

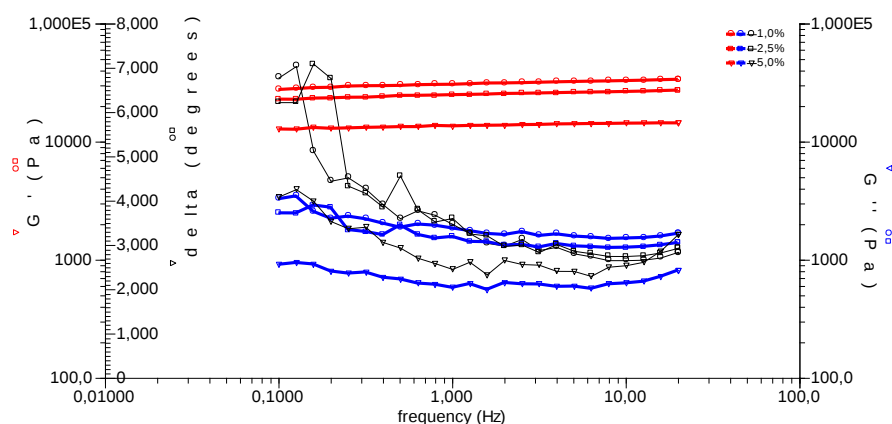


Figura 36 - Spettro meccanico in scala logaritmica dei campioni con differenti contenuti di PVP, in rosso il modulo elastico (G'), in blu il modulo viscoso (G'') e in nero lo sfasamento ($\tan \delta$)

L'idrogel che ha mostrato le caratteristiche meccaniche più idonee alla sostituzione del NP umano è il campione 5,0% con un valore di $G' = 16 \pm 3$ kPa, cadendo all'interno del range del NP (7-20 kPa)⁵¹. Gli idrogel con contenuti di PVP inferiori, risentono in modo minore degli effetti del PVP sulla matrice di PVA, presentando valori di G' superiori. Il campione 1,0% possiede caratteristiche simili allo stesso materiale privo di PVP, in questo caso la presenza di una così scarsa quantità di PVP; non va ad interferire sulle proprietà meccaniche compressive del materiale.

3.6.2 Stress Relaxation test

È stato riscontrato sperimentalmente che il NP possiede una rapida capacità di rilassamento agli stress. Queste alte proprietà dissipative sono dovute alla capacità di comportarsi come un materiale viscoelastico, o come un fluido viscoso a seconda del carico e della velocità di applicazione degli stress. Il NP, infatti, è capace di dissipare circa il 50% del carico iniziale nell'arco di un secondo e circa il 100% dello stress nell'arco di 600 secondi⁵⁰.

I test effettuati sono stati condotti in condizioni di deformazione del 5%, 20%, 30% e 100%. Il grado di rilassamento dei campioni è stato valutato come riduzione percentuale dello shear stress dopo 1 secondo e dopo 600 secondi per poterlo confrontare con il nucleo polposo. I risultati sono riportati nella **Tabella 26**, raggruppati secondo il grado di deformazione a cui è sottoposto il campione.

Il test di stress relaxation ha evidenziato un'elevata capacità di rilassamento per tutti i materiali sintetizzati, in valore percentuale superiore a quelle del nucleo polposo. Tutti i materiali mostrano, infatti, una buona riduzione percentuale della

deformazione che mediamente è >95% ad 1 secondo dall'applicazione dello shear stress ed è >97% dopo 600 secondi. Inoltre, in tutti i campioni, si raggiunge la situazione di plateau in tempi molto brevi. Questo evidenzia per tali materiali le caratteristiche viscoelastiche richieste per la dissipazione delle sollecitazioni. Per quanto riguarda le capacità dissipative, tutti gli idrogel sviluppati raggiungono i valori caratteristici come sostituti del NP.

Tabella 26 – Valori di riduzione percentuale dei campioni dopo 1 secondo e dopo 600secondi

Campione	$\sigma\%$	Rid%(1 sec)	Rid% (10 min)
1:0.5	5	95 $\pm$ 1	98 $\pm$ 1
	20	97 $\pm$ 2	98 $\pm$ 1
	30	98 $\pm$ 1	99 $\pm$ 1
	100	98 $\pm$ 1	99 $\pm$ 1
1,0%	5	90 $\pm$ 5	95 $\pm$ 2
	20	97 $\pm$ 1	98 $\pm$ 1
	30	98 $\pm$ 1	99 $\pm$ 1
	100	99 $\pm$ 1	99 $\pm$ 1
2,5%	5	95 $\pm$ 1	97 $\pm$ 1
	20	98 $\pm$ 1	99 $\pm$ 1
	30	99 $\pm$ 1	99 $\pm$ 1
	100	99 $\pm$ 1	99 $\pm$ 1
5,0%	5	94 $\pm$ 2	97 $\pm$ 1
	20	98 $\pm$ 1	99 $\pm$ 1
	30	99 $\pm$ 1	99 $\pm$ 1
	100	99 $\pm$ 1	99 $\pm$ 1

3.7 Citotossicità degli idrogel

La citotossicità dei materiali è stata valutata, in accordo alle norme ISO/FDIS 10993-5, dopo 24 ore di contatto con un monostrato di fibroblasti immortalizzati di topo della linea NIH3T3. L'obiettivo di questo test è quello di valutare, in vitro, sia l'effetto tossico diretto del materiale che quello indiretto, dovuto al possibile rilascio di agenti tossici che possono interferire con la vitalità cellulare. I risultati dei test di citotossicità sono mostrati in **Figura 37**. I risultati ottenuti, non mostrano differenze significative tra la vitalità cellulare sui campioni in esame rispetto al controllo (HDPE). Questo dato permette di affermare che i campioni sono privi di attività citotossica in vitro. Essi né rilasciano componenti di sintesi o prodotti di reazione tossici, né provocano sofferenza cellulare per effetto meccanico, non interferendo con il metabolismo cellulare.

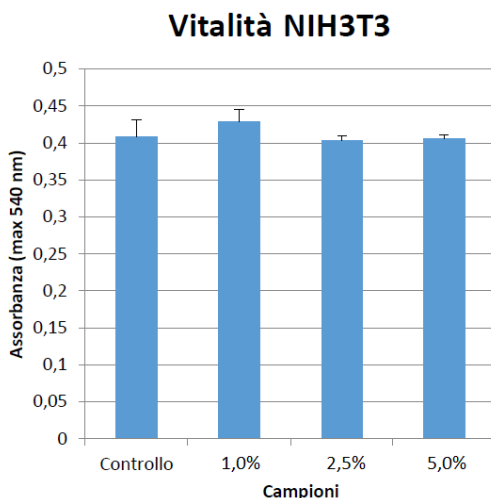


Figura 37 – Vitalità cellulare dei fibroblasti NIH3T3 dopo 24 ore di contatto con i campioni in esame. I dati non sono significativamente differenti rispetto al controllo

Sono stati inoltre eseguiti test di proliferazione cellulare (**Figure 36 e 37**) e confrontato il n° di cellule/mm² dei materiali sintetizzati con quello sul materiale di controllo nell'arco delle 24, 48 e 72 ore, allo scopo di determinare se i materiali, oltre a non presentare effetti citotossici, permettano alle componenti cellulari di espletare le loro funzioni biologiche. I test di proliferazione cellulare sono risultati positivi, in quanto i vari campioni hanno mostrato un graduale aumento del numero di cellule per mm² nell'arco temporale investigato (72 ore). I risultati dimostrano, quindi, che tutti i materiali favoriscono e supportano la crescita cellulare.

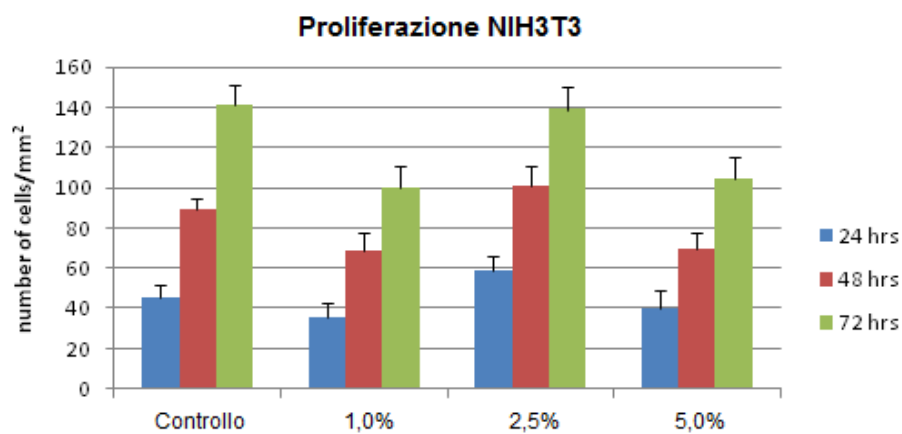


Figura 38 – Proliferazione cellulare dei fibroblasti NIH3T3 dopo 24, 48 e 72 ore di contatto con i campioni in esame

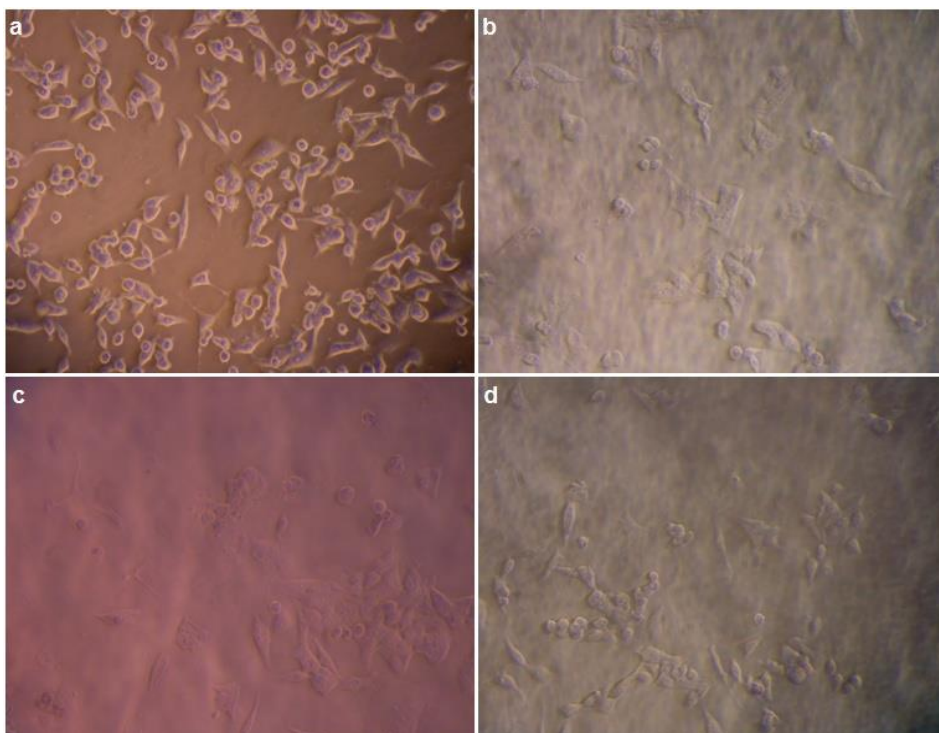


Figura 39 - Immagini ottiche dopo 72 ore di contatto a ingrandimento 20x dei campioni: (a), controllo, (b) 1,0%, (c) 2,5%, (d) 5,0%

Questa pagina è stata lasciata
intenzionalmente vuota

Il nucleo polposo, insieme all'anulo fibroso, è uno dei componenti maggiormente coinvolti nei disordini spinali più gravi tra i quali l'erniazione del disco intervertebrale, dove, a fronte di una rottura dell'anulo fibroso, può avvenire una fuoriuscita di materiale normalmente contenuto nel disco intervertebrale (nucleo polposo) che, facendosi spazio tra le fibre lesionate dell'anulo, viene a contatto con le strutture nervose contenute nel canale spinale provocando intenso dolore. Una volta formatasi una fuoriuscita del materiale contenuto all'interno del disco intervertebrale non è più possibile trattare il paziente mediante interventi conservativi e risultano necessarie pratiche chirurgiche di asportazione della lesione, liberando il paziente dal dolore e stabilizzando la sezione spinale danneggiata.

È stato sintetizzato un materiale capace di simulare le proprietà fisiche del nucleo polposo. Allo scopo di mimare il tessuto interessato, è stato scelto come materiale sostitutivo un idrogel di PVA, sintetizzato per via chimica mediante STMP e arricchendolo con PVP. Il PVP è un polimero altamente idrofilo che, interagendo mediante legami ad idrogeno con le catene di PVA, ha permesso di diminuire il grado di reticolazione, producendo matrici con proprietà meccaniche più simili al NP, e allo stesso tempo di incrementare il contenuto acquoso dei campioni fino ai valori del tessuto da sostituire. Per determinare le migliori condizioni sono stati sintetizzati tre idrogel con uguale rapporto molare PVA:STMP, ma con crescenti contenuti % di PVP.

Tramite analisi colorimetrica è stato verificato che la presenza del PVP non ostacola significativamente il processo di reticolazione del PVA ad opera dell'agente reticolante STMP, infatti il contenuto di fosforo per ogni campione è risultato solo lievemente inferiore rispetto al materiale utilizzato come riferimento (PVA-H 0,5_E).

Essendo il NP un tessuto altamente idratato, il WC è risultato un parametro di fondamentale importanza per le caratteristiche del materiale biomimetico. I dati sperimentali hanno mostrato che il WC degli idrogel sintetizzati è direttamente proporzionale al contenuto di PVP all'interno del campione. Il PVP è infatti un polimero altamente idrofilo e la sua presenza all'interno delle matrici reticolate di PVA ne ha garantito un'elevata idratazione. Il miglior materiale è risultato essere quello ottenuto utilizzando una percentuale di PVP pari al 5,0%. Il materiale infatti

presenta un valore di WC pari a 82%, perfettamente centrato all'interno del range del NP (70-90%).

Tutte le matrici possiedono una dimensione dei mesopori confrontabile con quella della matrice extracellulare.

Da un punto di vista meccanico, tutti gli idrogel sintetizzati sono risultati di tipo solido. I dati sperimentali hanno mostrato che, a differenza del WC, le proprietà viscoelastiche sono inversamente proporzionali al contenuto % di PVP. Infatti il PVP è responsabile di una struttura più aperta e quindi più idratata, ma con minori proprietà meccaniche in termini di modulo elastico. Il modulo G del NP è tuttavia compreso tra 7-20 kPa. L'idrogel che simula meglio queste caratteristiche è quindi il campione 5,0% con un $G = 16 \pm 3$ kPa. Tutti i materiali sono in grado di dissipare istantaneamente la deformazione applicata, toccando mediamente una riduzione percentuale $>$ dell'80% dopo 1 secondo in modo molto maggiore del NP ($\approx 50\%$ nell'arco del secondo⁵⁰).

I campioni non sono risultati citotossici in vitro, requisito fondamentale per materiali progettati per applicazioni in campo biomedico. I test di proliferazione cellulare evidenziano come i materiali sintetizzati non compromettano la normale funzione cellulare.

Il materiale che meglio mima le caratteristiche del NP è il campione 5,0% con proprietà di idratazione e meccaniche in linea con quelle del NP. Pertanto il campione 5,0% può essere considerato un valido candidato per la realizzazione di impianti biomedici per la cura delle degenerazioni spinali.

MENISCO UMANO

Questa pagina è stata lasciata
intenzionalmente vuota

4.1 Menisco umano

Il menisco è stato a lungo considerato un tessuto superfluo e, come tale, facilmente asportabile in caso di lesioni o traumi di media intensità. La successiva dimostrazione che la rimozione del menisco dall'articolazione del ginocchio come comune pratica di trattamento degli infortuni sportivi, poteva contribuire al precoce deterioramento della cartilagine articolare e al graduale sviluppo di osteoartrosi ha cambiato radicalmente il modo di interpretare le sue funzioni biologiche e biomeccaniche. Per la prima volta nel 1982 la pratica della meniscectomia parziale è stata suggerita come alternativa alla meniscectomia totale⁵³. Attualmente, il metodo prevalente di trattamento delle lesioni al menisco è quello di mantenere il tessuto intatto quando possibile⁵⁴⁻⁵⁶. Nei casi in cui sia necessaria la totale rimozione del tessuto diventa fondamentale sostituirlo con supporti che possano svolgere le sue funzioni biomeccaniche.

Un ampio numero di scaffold è stato proposto e prodotto, tuttavia alcune problematiche, tra le quali la generazione di sottoprodotti di degradazione, e l'insufficiente resistenza allo stress, non sono state ancora completamente risolte.

4.1.1 Anatomia del menisco

La struttura dei menischi, contenuta all'interno dell'articolazione del ginocchio, comprende il menisco mediale ed il menisco laterale. Sono situati tra il piatto tibiale ed il condilo femorale (**Figura 40**)⁵⁷ e mantenuti nella loro posizione dal legamento mediale collaterale (MCL), dal legamento trasverso (TL), dai legamenti menisco femorali e dai corni anteriori e posteriori (**Figura 41**)⁵⁸.

I menischi mediali e laterali umani possiedono dimensioni differenti: il menisco laterale ha una lunghezza di circa 32.4-35.7 mm e una larghezza di circa 26.6-29.3mm, mentre il menisco mediale possiede una lunghezza approssimativa di 40.5-45.5mm e una larghezza di 27mm^{59,60}.

Nonostante entrambi i menischi possiedano una forma a spicchio, il menisco laterale mostra una gran varietà di dimensioni, forma, spessore e mobilità rispetto al menisco mediale^{61,62}. Il menisco laterale, inoltre, copre una più vasta zona del piatto tibiale (75-93%) rispetto al menisco mediale (51-74%)⁶². La vascolarizzazione in questi due tessuti è di fondamentale importanza.

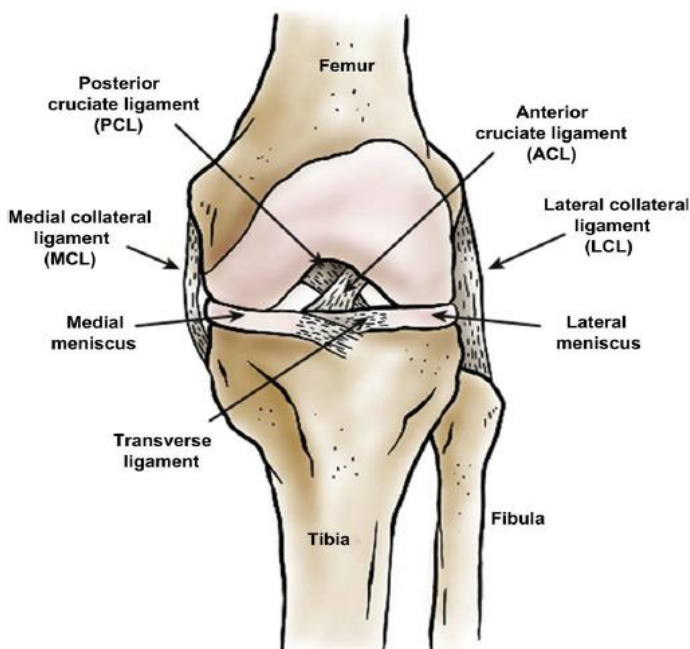


Figura 40 -Anatomia dell'articolazione del ginocchio: vista anteriore del ginocchio sinistro. I menischi sono situati nella zona compresa tra il femore e la tibia. I vari legamenti che attraversano i menischi aiutano la stabilizzazione dell'articolazione

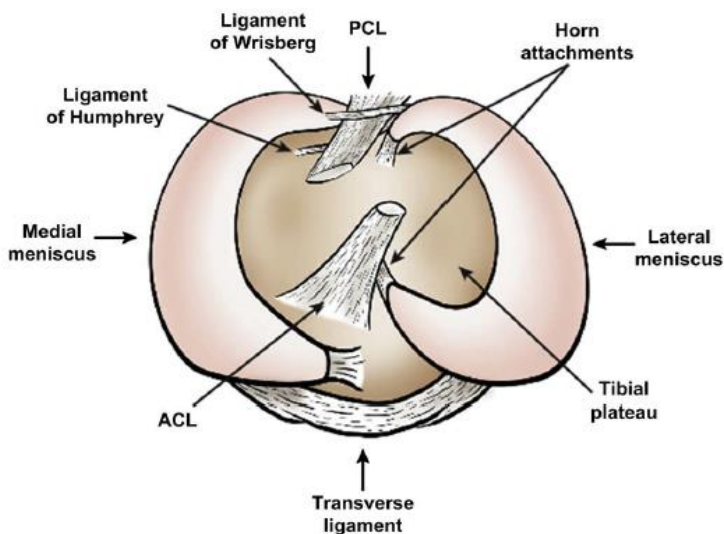


Figura 41 -Anatomia del menisco: vista superiore del piatto tibiale del ginocchio sinistro. Questa vista del piatto tibiale permette di visualizzare i legamenti di Humphrey e Wrisberg che stabilizzano il menisco al femore. I menischi sono connessi l'uno all'altro tramite il legamento trasverso, mentre i corni permettono di stabilizzare i menischi al piatto tibiale

Il menisco umano si presenta alla nascita completamente vascolarizzato, tuttavia la sua vascolarizzazione non è costante e si riduce costantemente con l'età. Già a 10 anni la vascolarizzazione del menisco si riduce al 10-30% del valore iniziale, mentre in età adulta il menisco risulta vascolarizzato per un 10-25% solo nelle zone periferiche del tessuto⁶² **Figura 42**.

Le capacità rigenerative del tessuto sono direttamente collegate alla circolazione sanguigna. Per questo motivo le lesioni traumatiche risultano permanenti e soggette a continua degenerazione⁶³.

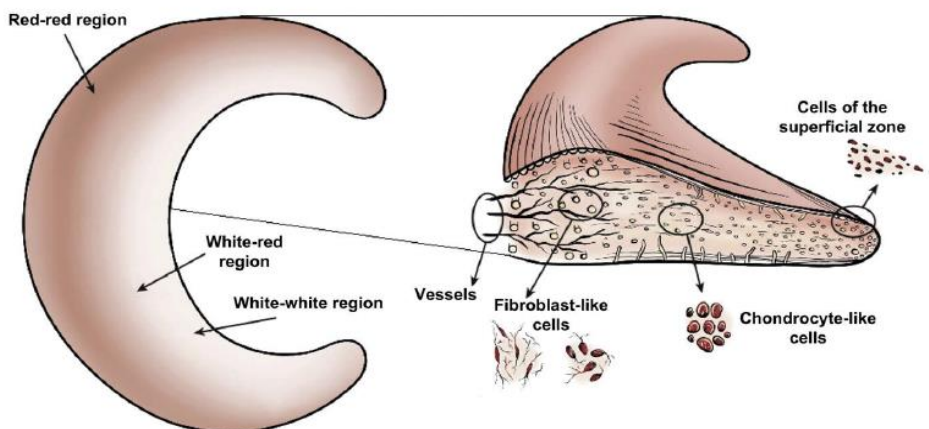


Figura 42 - Variazione della vascolarizzazione e popolazione cellulare del menisco. Sinistra: partendo da una struttura completamente vascolarizzata alla nascita la vascolarizzazione del menisco recede durante l'età adulta. Negli adulti, la regione rossa-rossa contiene la maggior parte della vascolarizzazione e innervazione del tessuto. Destra: le cellule che abitano la regione esterna (rossa-rossa) possiedono una forma fusiforme e sono prevalentemente del tipo fibroblasta, mentre le cellule che abitano la regione mediale (rossa-bianca) e interna (bianca-bianca) sono del tipo condrocita. Le cellule che abitano le regioni superficiali del menisco sono piccole e di forma circolare

Il menisco è un tessuto altamente idratato con un contenuto d'acqua del 72%, il rimanente 28% del peso è costituito da materia organica, principalmente ECM e componente cellulare⁶⁴. Il collagene è il componente principale della fase organica (circa 75%) presente in varie tipologie e quantità in tutto il tessuto, seguito dai GAGs (17%), DNA (2%) e proteine adesive (<1%)^{64,65}. A parte il collagene un altro componente fibrillare è l'elastina.

La principale funzione dei GAGs è quella di permettere al tessuto di assorbire acqua e di supportare, in condizioni di confinamento, il tessuto alle compressioni^{66,67}. Anche le glicoproteine di adesione sono un'altra componente indispensabile del menisco ed hanno lo scopo di legare le cellule alla ECM. La fibroconnectina, la trombospodina e il collagene di tipo VI sono le principali glicoproteine presenti nel menisco umano^{67,68}.

Il menisco ha la capacità di resistere a differenti tipi di sollecitazione (forze di trazione, di compressione e di taglio). Grazie a queste sue caratteristiche il menisco gioca un ruolo cruciale nell'attenuazione e trasmissione dei carichi, nell'assorbimento di shock, come lubrificante dell'articolazione del ginocchio e inoltre fornisce nutrimento alle cartilagini vicine^{65,69,70}.

Per svolgere tutte le sue funzioni il menisco necessita di una forma specializzata, infatti la sua forma non è piana ma è a cuneo per potersi adattare meglio alla geometria del condilo femorale durante il movimento dell'articolazione con la superficie piatta del piatto tibiale⁷⁰⁻⁷¹. Durante la comune attività giornaliera, le forze tibiofemorali assiali comprimono il menisco. La forma a cuneo del menisco e i suoi corni anteriori e posteriori servono a convertire le forze compressive assiali in forze radiali lungo il corpo del menisco (**Figura 43**). Allo stesso tempo, le forze di taglio si sviluppano tra le fibre di collagene all'interno del menisco mentre il menisco si deforma radialmente^{66,73,74}.

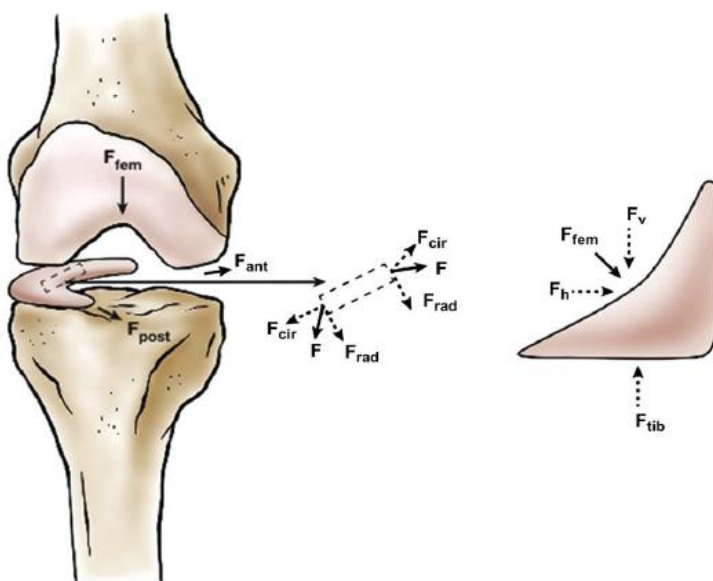


Figura 43 - Rappresentazione grafica di come le forze vengono trasmesse attraverso il menisco del ginocchio e diagramma delle forze agenti sul menisco durante la simulazione di un carico (per semplicità viene mostrato solamente il menisco laterale). Durante l'attività giornaliera i menischi sono sottoposti a compressione per via della forza agente dal femore. Grazie alla forma a cuneo del menisco, la forza viene applicata angolarmente; la componente verticale di questa forza viene contrastata verticalmente dalla forza proveniente dalla tibia. In più la componente orizzontale della forza femorale che agisce radialmente, esternamente ai menischi, viene contrastata dai corni anteriori e posteriori dei menischi. Inoltre, in contrasto a questa forza compressiva, sempre a causa della particolare forma del tessuto, i carichi vengono dissipati circonferenzialmente lungo tutto il menisco. In pratica, il menisco converte le forze compressive in forze di trazione circonferenziali. Contemporaneamente alla deformazione radiale si generano forze di taglio tra le fibrille di collagene

Sono stati condotti numerosi studi per quantificare le proprietà meccaniche del menisco. In accordo con questi studi, il menisco resiste a sforzi compressivi

grazie ad un modulo aggregato di 100-150 kPa⁷⁵, mentre il modulo di taglio del menisco è approssimativamente di 120 kPa⁷⁶.

4.1.2 *Scopo*

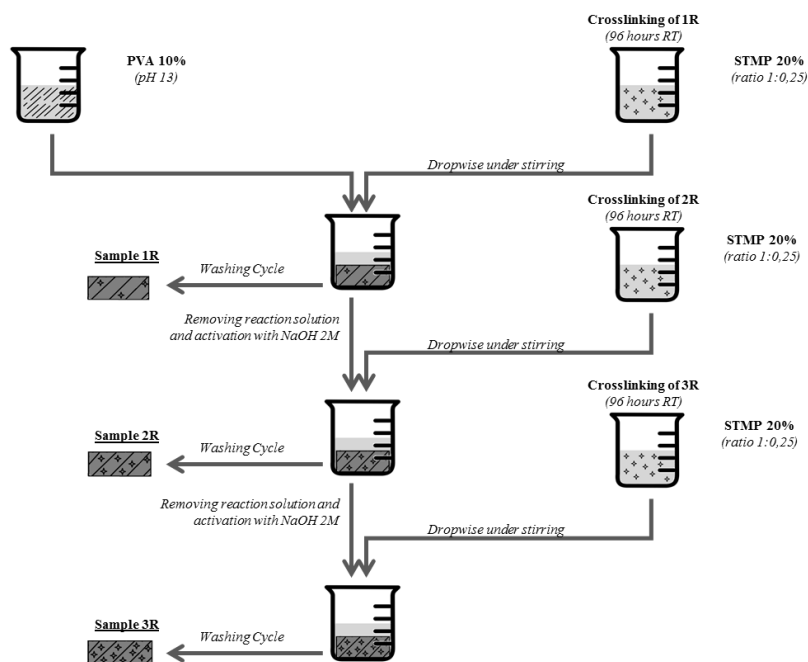
Lo scopo del lavoro svolto è quello di produrre un materiale capace di mimare le proprietà del menisco in modo da poter funzionare come suo sostituto in caso di infortuni e lesioni da usura o stress sportivo. L'impiego di idrogel permette non solo un utilizzo del materiale tal quale come sostituto a lungo termine in caso di meniscectomia totale, ma anche come scaffold per la rigenerazione del tessuto in caso di rimozioni parziali. Gli idrogel vengono spesso impiegati in ingegneria tissutale come impalcatura per le cellule, le quali trovandosi in un ambiente simile a quello dei tessuti molli umani, grazie alla capacità degli idrogel di assorbire un gran quantitativo di fluidi, possono espletare le loro funzioni biologiche riproducendo i tessuti danneggiati. Nel caso degli infortuni al menisco, se la parte del menisco maggiormente vascolarizzata ed innervata non risulta danneggiata è possibile, impiegando un opportuno scaffold, favorire la migrazione cellulare verso l'impianto e conseguentemente rigenerare il tessuto. Le proprietà del materiale devono ovviamente rispondere ai criteri di resistenza meccanica e contenuto d'acqua del tessuto nativo per non portare uno scompenso all'interno dell'articolazione ed inoltre devono risultare atossici. Allo scopo di sintetizzare un opportuno materiale biomimetico sono stati sviluppati due diverse tipologie di idrogel a base di PVA per la sostituzione/rigenerazione del menisco:

- Come potenziale sostituto permanente di menischi, in caso di meniscectomia totale, è stato sintetizzato un idrogel sottoponendo il PVA a tre reticolazioni consecutive allo scopo di incrementarne le proprietà meccaniche fino al raggiungimento di valori di G paragonabili a quelli del menisco (c.a. 120 kPa).
- Come scaffold per la rigenerazione tissutale del menisco, sono stati sintetizzati idrogel misti di PVA e gomma Xantano (XG). La gomma-Xantano, è infatti un biopolimero in grado di favorire e supportare l'adesione, la proliferazione e la differenziazione cellulare^{28,29}.

Questa pagina è stata lasciata
intenzionalmente vuota

4.1 Realizzazione degli idrogel per sostituti tissutali a lungo termine

I campioni a tripla reticolazione (PVA-H-3R) sono stati ottenuti utilizzando la procedura di sintesi riportata nel par. 5.2.1. Ad un'aliquota di PVA 10% è stato aggiunto l'agente reticolante in quantità tali da ottenere rapporti molari tra l'unità ripetitiva del PVA e le molecole di STMP di 1:0,25. La soluzione è stata mantenuta sotto vigorosa agitazione tramite piastra oscillante per 96 ore per permettere il completamento del processo di reticolazione. Gli idrogel ottenuti sono stati reticolati impiegando lo stesso rapporto molare precedentemente utilizzato (1:0,25) per due volte secondo la procedura riportata nello **Schema 1**.



Schema 1 - Procedura di sintesi degli idrogel a singola, doppia e tripla reticolazione

4.2 Caratterizzazione Chimica

4.2.1 Determinazione colorimetrica degli ioni orto fosfato

Una valutazione quantitativa del grado di fosfatazione è stata effettuata tramite la determinazione colorimetrica dei gruppi ortofosfato presenti nel materiale. I risultati, espressi in moli di P / g idrogel sono riportati in **Tabella 27**.

Tabella 27 – Rapporti molari e relative concentrazioni di P espresse in mol P / g_{Idrogel} dei campioni a differenti cicli di reticolazione

Campioni	mol P / g idrogel
1R (PVA-H 0.25)	$3 \cdot 10^{-3} \pm 7 \cdot 10^{-4}$
3R (PVA-H 0.25)	$6 \cdot 10^{-3} \pm 3 \cdot 10^{-4}$

I dati ottenuti mostrano come le reticolazioni consecutive si riflettano in un aumento della quantità di fosfati all'interno della matrice polimerica in accordo con l'aumento del numero di ponti di reticolazione

4.3 Caratterizzazione fisica

4.3.1 Contenuto d'acqua WC

La triplice reticolazione provoca un leggero abbassamento del contenuto di fluido del materiale in quanto i risultati hanno mostrato, infatti, un andamento decrescente di contenuto d'acqua all'aumentare dei cicli di reticolazione. (**Tabella 28**).

Tabella 28 – Confronto tra il Water Content (WC) in soluzione di NaCl 0,9% degli idrogel sottoposti a differenti cicli di reticolazione

Campione	Soluzione	Water Content
1R (PVA-H 0.25)	NaCl 0,9%	70 $\pm$ 3
3R (PVA-H 0.25)	NaCl 0,9%	63 $\pm$ 3

Dai dati sperimentali si osserva come, partendo da un valore in linea con quello del tessuto meniscale per il campione 1R (WC 70 $\pm$ 3 %), la tripla reticolazione provoca una diminuzione della capacità del materiale di contenere fluidi. La capacità di assorbire fluidi degli idrogel è direttamente collegata all'idrofilia della matrice polimerica e alla mobilità delle catene polimeriche. L'aumento dei punti di reticolazione da un punto di vista strutturale comporta un aumento delle forze di richiamo elastiche rispetto alle forze disperdenti del

solvente e quindi un maggior numero di reticolazioni danno luogo ad un minore capacità assorbente del materiale. Tuttavia, l'aumento dei punti di reticolazione si riflette anche in un incremento di idrofilia del network a causa dell'elevata idrofilia dei bracci reticolanti aggiunti, controbilanciando in larga misura la diminuzione della capacità assorbente del materiale e provocando, quindi, soltanto una leggera riduzione del contenuto di acqua.

4.4 Caratterizzazione Morfologica

La valutazione della mesostruttura dei materiali è stata condotta tramite calorimetria differenziale a scansione (DSC). Basandosi sui termogrammi DSC è stato possibile valutare l'effetto della triplice reticolazione sulle dimensioni dei mesopori, il cui ruolo risulta fondamentale per il corretto mantenimento delle funzionalità del tessuto stesso. I loro valori medi sono riportati in **Tabella 29**. Dall'analisi dei dati riportati non si evincono differenze significative nella mesostruttura dei diversi materiali. Il raggio medio delle diverse matrici è di circa 5 nm ed è paragonabile a quello del generale tessuto cartilagineo³⁰.

Tabella 29 – Raggio dei mesopori dei campioni a due differenti gradi di reticolazione e relative SD

Campione	r mesopori (nm)		
1R (PVA-H 0.25)	6	±	2
3R (PVA-H 0.25)	5	±	1

4.4 Caratterizzazione reologica (AR)

Il menisco ha lo scopo di assorbire i carichi del peso corporeo, che si trasmettono sul piatto tibiale direttamente dal femore. Durante il suo normale funzionamento, grazie alla sua forma inclinata, il menisco converte le forze compressive in forze di taglio trasmettendole longitudinalmente per tutta la sua estensione.

L'analisi reologica ha permesso di valutare l'effetto dell'ulteriore reticolazione, effettuate allo scopo di rinforzare la matrice per renderla idonea alla sostituzione del menisco, sulla proprietà meccaniche del materiale.

4.4.1 Frequency sweep test

Le analisi “frequency sweep” sui campioni sintetizzati sono state condotte all'interno di un intervallo di frequenze che va da 0.01 a 20 Hz, con una

deformazione dello 0.2%. Tale range di frequenze è stato scelto in modo da contenere le frequenze di sollecitazione fisiologiche del ginocchio, che vanno dagli 0.5 Hz della camminata ai 3.0 Hz della corsa^{41,42}.

Tutti i materiali possiedono una predominanza della componente elastica G' rispetto alla componente viscosa G'' di almeno un ordine di grandezza (**Figura 44**). Il G' si mantiene pressoché costante a tutti gli intervalli di frequenza (**Tabella 30**), dato caratteristico degli idrogel di natura chimica. La dissipazione degli stress avviene in modalità prevalentemente elastica con uno sfasamento ($\tan \delta$) di circa 3° (**Tabella 31**).

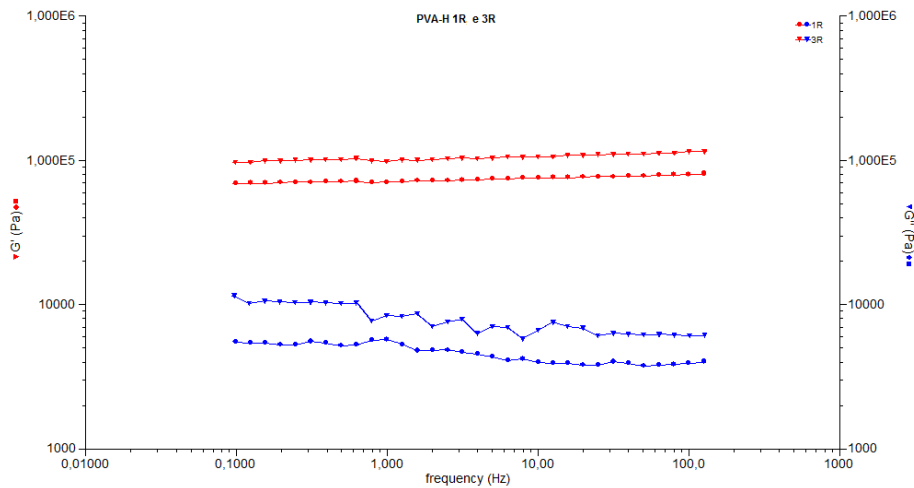


Figura 44 – Confronto degli spettri meccanici in scala logaritmica dei campioni 1R e 3R. In rosso il modulo elastico (G'), in blu il modulo viscoso (G'')

Tabella 30 - Valori di modulo elastico (G') e modulo viscoso (G'') dei campioni con diverso grado di reticolazione, alle frequenze di oscillazione caratteristiche della camminata e della corsa (0,5 e 3,0 Hz)

Campione	0,5Hz		3,0Hz	
	G' (kPa)	G'' (kPa)	G' (kPa)	G'' (kPa)
1R	73 ± 9	5 ± 1	76 ± 12	4 ± 1
3R	103 ± 5	8 ± 1	108 ± 9	7 ± 1
Menisco	≈ 120 kPa			

Tabella 31 – Valori di sfasamento ($\tan \delta$) dei campioni con diverso grado di reticolazione, alle frequenze di oscillazione caratteristiche della camminata e della corsa (0,5 e 3,0 Hz)

Campione	$\tan \delta (^{\circ})$	
	0.5 Hz	3.0 Hz
1R (PVA-H	3.6 ± 0.3	2.8 ± 0.2
3R (PVA-H	4.3 ± 0.3	3.6 ± 0.4

I materiali hanno mostrato un incremento crescente delle proprietà meccaniche all'aumentare dei cicli di reticolazione, raggiungendo, nel caso del campione 3R, un valore confrontabile con quello caratteristico del menisco umano (≈ 120 kPa) (**Tabella 30**).

4.4.2 *Stress Relaxation test*

I risultati del test di stress relaxation sono riportati nella **Tabella 32**, raggruppati secondo il grado di deformazione a cui è sottoposto il materiale. Il test di stress relaxation ha permesso di verificare che la triplice reticolazione, pur incrementando le proprietà meccaniche del materiale, non altera l'elevata capacità di rilassamento del materiale sintetizzato. Il materiale 3R (PVA-H 0.25) mostra, infatti, una buona riduzione percentuale della deformazione che mediamente è $>90\%$ ad 1 secondo dopo l'applicazione dello shear stress ed è $>95\%$ dopo 10 minuti. In tutti i campioni, inoltre, si raggiunge la situazione di plateau in tempi molto brevi.

Tabella 31 – Valori di riduzione percentuale dello stress dei campioni dopo 1 secondo e 10 minuti

Campione	$\sigma\%$	Rid $_{\%}$ (1 sec)	Rid $_{\%}$ (10 min)
1R(PVA-H 0.25)	5	90 ± 2	97 ± 1
	20	97 ± 1	97 ± 1
	30	98 ± 1	99 ± 1
	100	98 ± 1	99 ± 1
3R(PVA-H 0.25)	5	95 ± 1	98 ± 1
	20	97 ± 2	99 ± 1
	30	98 ± 1	99 ± 1
	100	99 ± 1	99 ± 1

4.5 Citotossicità degli idrogel

La citotossicità dei materiali è stata valutata, in accordo alle norme ISO/FDIS 10993-5, dopo 24 ore di contatto con un monostrato di fibroblasti immortalizzati di topo della linea NIH3T3. L'obiettivo di questo test è quello di valutare, in vitro, sia l'effetto tossico diretto del materiale che quello indiretto, dovuto al possibile rilascio di agenti tossici che possono interferire con la vitalità cellulare. I risultati dei test di citotossicità sono mostrati in **Figura 45**. I risultati ottenuti, non mostrano differenze significative tra la vitalità cellulare sui campioni in esame rispetto al controllo (HDPE). Questo dato permette di affermare che i campioni sono privi di attività citotossica in vitro. Essi né rilasciano componenti di sintesi o prodotti di reazione tossici, né provocano sofferenza cellulare per effetto meccanico, non interferendo con il metabolismo cellulare.

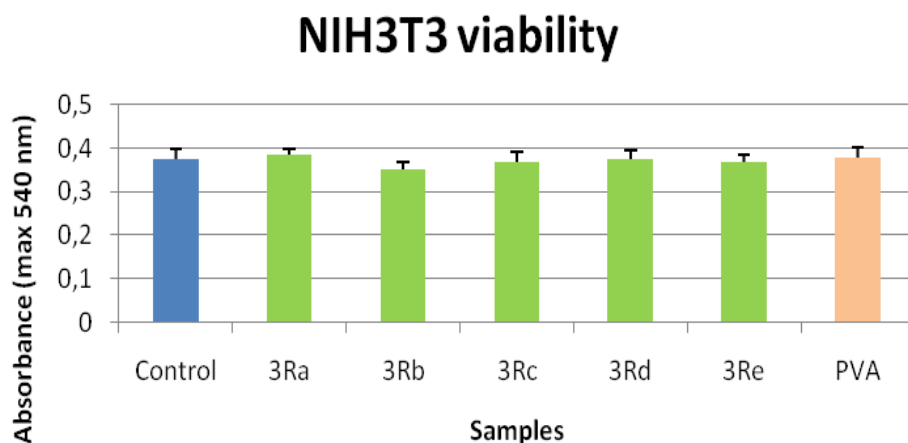


Figura 45 -Vitalità cellulare dei fibroblasti NIH3T3 dopo 24 ore di contatto con i campioni in esame. I dati non sono significativamente differenti rispetto al controllo

4.6 Realizzazione degli idrogel come scaffold cellulari per la rigenerazione tissutale

La possibilità di poter reticolare la gomma-Xantano (XG) e il PVA mediante lo stesso agente reticolante (STMP) ha permesso di generare idrogel che integrano le eccellenti proprietà di scaffold della XG con le elevate caratteristiche meccaniche del PVA. Allo scopo di ricercare il miglior candidato come scaffold per la rigenerazione tissutale del menisco, sono stati sintetizzati idrogel misti PVA-XG a differenti percentuali in peso.

4.7 Caratterizzazione Chimica

La caratterizzazione chimica degli idrogel ottenuti dalla reticolazione simultanea di PVA e XG è stata effettuata mediante spettrometria IR.

4.7.1 Analisi infrarossa

Gli spettri IR del PVA e della XG nativi e dell'idrogel risultante dalla loro reticolazione mediante STMP sono riportati in **Figura 46**.

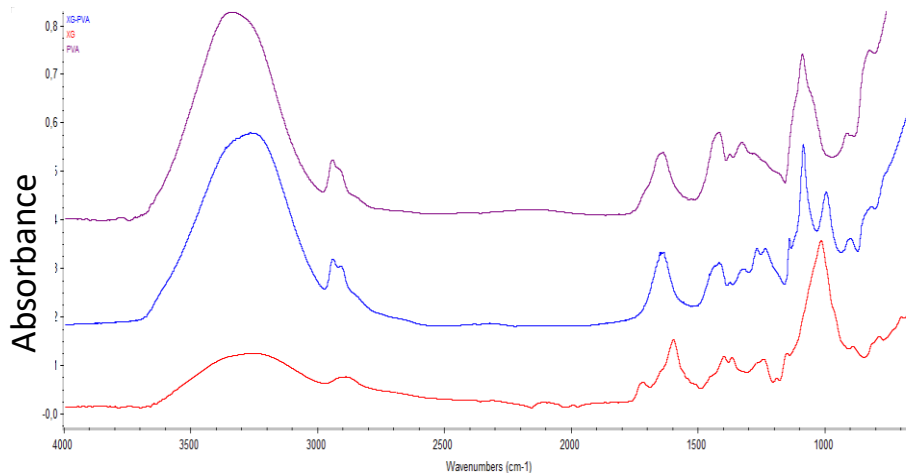


Figura 46 -Spettri IR (4000-750 cm^{-1}) del PVA (viola), della XG (rosso) e dell'idrogel risultante dalla reticolazione chimica mediante STMP (blu)

Lo spettro della XG è caratterizzato da un'ampia banda di assorbimento centrata a 3342 cm^{-1} , dovuta alle vibrazioni di stiramento dei gruppi ossidrilici delle catene polisaccaridiche dello Xantano. Le bande caratteristiche del composto, che lo differenziano dal PVA, sono relative ai gruppi carbossilici presenti nelle catene polisaccaridiche. Le bande centrate a 1598 e 1401 cm^{-1} sono attribuibili alle vibrazioni di stiramento asimmetrico e simmetrico del legame $\text{C}=\text{O}$ dell'anione carbossilato ($-\text{COO}^-$), mentre la banda a 1061 cm^{-1} è attribuibile allo stiramento dei legami $\text{C}-\text{O}$ degli alcol primari. Risulta inoltre presente la caratteristica banda di assorbimento dei gruppi $-\text{COOH}$ a 1721 cm^{-1} , che suggerisce che la struttura acida ($-\text{COOH}$) e quella ionizzata ($-\text{COO}^-$) coesistono contemporaneamente nelle catene di XG⁷⁷. Anche il PVA (vedi par. 2.4.1) è caratterizzato da una banda di assorbimento centrata a 1710 cm^{-1} caratteristica del $\text{C}=\text{O}$ dei gruppi acetato residui, derivanti dal processo di produzione del PVA^{35,36}.

Tabella 32 –Principali numeri d’onda e relative assegnazioni negli spettri IR dell'idrogel PVA-XG e dei materiali impiegati per la sua sintesi

Campioni	Numeri d’onda (cm ⁻¹)	Assegnazioni
PVA	3342	Stiramento dei gruppi OH legati ad idrogeno (intra ed inter-molecolari)
	2944, 2913	stiramento simmetrico ed asimmetrico dei gruppi CH ₂
	1710	Stiramento dei gruppi COOR
	1640	Piegamento dei gruppi OH
	1137	Stiramento dei legami C-C, C-O adiacenti ad un gruppo OH coinvolto in un legame ad idrogeno
PVA-XG	3342	Stiramento dei gruppi OH coinvolti in legami a idrogeno intra ed intermolecolari
	2944, 2913	Stiramento simmetrico e asimmetrico dei gruppiCH ₂
	1640	Piegamento del gruppo OH
	1270	Stiramento del gruppo P=O
	1237	Stiramento del gruppo P-O-C
	1137	Stiramento dei legami C-C, C-O adiacenti ad un gruppo OH coinvolto in un legame ad idrogeno
	997	Stiramento del gruppo P-O-P
XG	3342	Stiramento del gruppo OH coinvolto in legami a idrogeno intra ed molecolari
	2944, 2913	Stiramento simmetrico e asimmetrico dei gruppi CH ₂
	1721	Stiramento dei gruppi COOH
	1640	Piegamento dei gruppi OH
	1598	Stiramento asimmetrico dei gruppi C=O appartenenti all'anione carbossilato -COO ⁻
	1401	Stiramento simmetrico dei gruppi C=O appartenenti all'anione carbossilato -COO ⁻
	1061	Stiramento dei legami, C-O degli alcol primari

Dal confronto dello spettro del gel di PVA-XG e dei due materiali nativi, si evidenzia la scomparsa dei segnali attribuibili ai gruppi acetato presenti sia nel PVA di partenza che nella XG, questo a causa del fatto che la reticolazione dei polimeri avviene in condizioni fortemente alcaline per aggiunta di una soluzione di NaOH.

L'analisi infrarossa ha confermato l'avvenuta reticolazione, infatti confrontando gli spettri dei polimeri nativi con quelli dell'idrogel, è stato possibile individuare le bande relative alla presenza dell'agente reticolante. In particolare, si registrano, nello spettro IR dell'idrogel PVA-XG, tre nuove bande centrate a 1270 cm^{-1} , relativa allo stiramento dei legami $\text{P}=\text{O}$, a 1237 cm^{-1} , relativa allo stiramento dei legami $\text{P}-\text{O}-\text{C}$ e a 997 cm^{-1} , relativa allo stiramento dei legami $\text{P}-\text{O}-\text{P}$. In **Tabella 33** sono riportati i valori dei numeri d'onda di assorbimento e le relative assegnazioni. La presenza della XG non modifica il grado di reticolazione del PVA.

4.8 Caratterizzazione fisica

4.8.1 *Contenuto d'acqua WC/WU*

Un adeguata capacità di rigonfiamento può favorire o sfavorire la crescita cellulare e quindi la rigenerazione del tessuto danneggiato. I valori di WC dei materiali sintetizzati, riportati in **Tabella 34**, mostrano la loro elevata capacità di assorbimento di acqua, con un intervallo di valori compreso tra il 78% e il 96%. Il valore di equilibrio viene raggiunto rapidamente nell'arco delle 24 ore da tutti i materiali. Le capacità di rigonfiamento degli idrogel di PVA-XG incrementano all'aumentare del contenuto di XG, grazie all'elevata natura idrofilica della XG. Tutti i campioni, ad esclusione dell'idrogel XG15 mostrano una capacità di rigonfiamento superiore a quella del tessuto meniscale umano; l'idrogel XG15, a minor contenuto di XG, risulta l'unico a cadere nel range di interesse.

Tabella 33 – Confronto tra il Water Content (WC) in soluzione di NaCl 0;9% degli idrogel a differenti contenuti di XG

Sample	Solution	Water Content			Water Uptake		
XG100	NaCl 0.9%	96	±	1	2579	±	151
XG60	NaCl 0.9%	93	±	1	1328	±	53
XG30	NaCl 0.9%	83	±	1	493	±	37
XG15	NaCl 0.9%	78	±	1	393	±	28

$\text{WC}_{\text{menisco umano}} \approx 72\%$

4.8.2 *Analisi termogravimetrica (TGA)*

I termogrammi in derivata prima sono riportati nella **Figura 47**. Il campione di riferimento XG100, soggetto solamente a reticolazione tramite STMP e privo della componente di PVA, mostra una degradazione termica del tutto simile a quello della gomma-Xantano nativa. Il campione XG60, anch'esso con una notevole quantità di XG all'interno della sua struttura, evidenzia un comportamento termico simile a quello della XG, anche se l'influenza del PVA rende il picco di degradazione tipico della gomma-Xantano più ampio e meno intenso. L'idrogel XG30 risulta possedere caratteristiche intermedie ai due componenti costitutivi e nel termogramma iniziano ad essere sempre più evidenti i segnali di degradazione del PVA. Il campione XG15, prevalentemente a base di PVA, risulta avere un profilo di degradazione termica del tutto simile a quello del suo componente costitutivo principale. Tutti i materiali sono stabili alla temperatura fisiologica di utilizzo (37°C). Le perdite di peso a temperature <100°C sono attribuibili alla perdita di umidità e di acqua strettamente legata alla struttura della matrice.

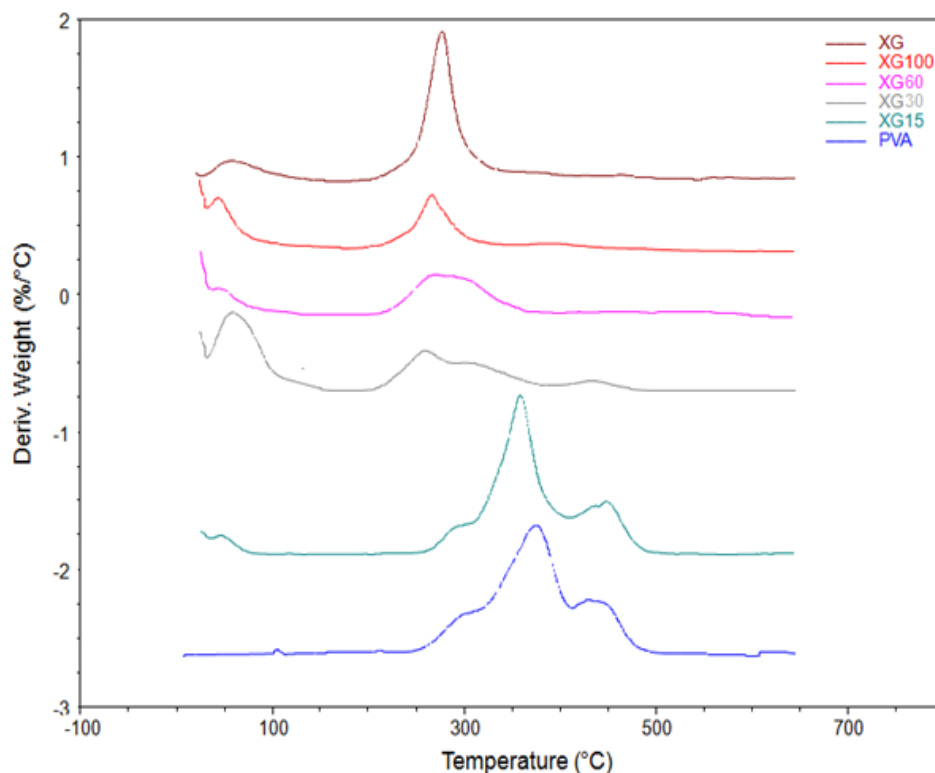


Figura 47 - Grafico DTG (derivata della variazione del peso del campione rispetto alla temperatura) dei campioni di idrogel e dei prodotti nativi (XG e PVA)

4.9 Caratterizzazione Morfologica

La valutazione della mesostruttura dei materiali è stata condotta tramite calorimetria differenziale a scansione (DSC). Basandosi sui termogrammi DSC è stato possibile ottenere il diametro dei mesopori dei materiali sintetizzati⁴⁰. I loro valori medi sono riportati in **Tabella 34**. I dati mostrati in tabella, rivelano per tutti i campioni un raggio medio dei mesopori <10 nm. Il raggio medio dei mesopori cresce lievemente all'aumentare del contenuto di XG all'interno della matrice, e questo dato è in linea con le capacità di rigonfiamento di ciascun idrogel.

Tabella 34 – Raggio medio dei mesopori dei campioni di idrogel

Sample	r mesopori (nm)		
XG100	10	±	2
XG60	8	±	1
XG30	7	±	1
XG15	7	±	1

4.10 Caratterizzazione reologica (AR)

Le proprietà meccaniche degli idrogel misti di PVA-XG sono state determinate tramite analisi reologica in regime oscillatorio. I test condotti hanno permesso di valutare l'effetto della presenza di XG sulle caratteristiche meccaniche dei materiali a base di PVA. Essendo materiali destinati all'ingegneria tissutale e non dovendo sostituire completamente e perennemente il tessuto danneggiato, non è necessario che le caratteristiche meccaniche dello scaffold siano strettamente uguali a quelle del tessuto nativo. Infatti, il paziente sottoposto a questa tipologia di operazione chirurgica deve affrontare un lungo periodo di convalescenza necessario alle cellule per riprodurre la membrana extracellulare (ECM) danneggiata e sostituirla. Le opportune caratteristiche del tessuto meniscale verranno quindi riprodotte gradualmente dalla componente cellulare stessa. Ovviamente le caratteristiche degli idrogel prodotti dovranno rispondere a stabilità di forma per garantire alle cellule una certa stabilità, supportandole nella loro azione rigenerativa. L'obiettivo primario è quindi quello di ottenere matrici a prevalente carattere elastico, con proprietà meccaniche idonee a supportare l'adesione, la proliferazione e l'organizzazione tridimensionale delle cellule nella rigenerazione tissutale.

4.10.1 *Frequency sweep test*

Le analisi “frequency sweep” sui campioni sono state condotte all'interno di un intervallo di frequenze che va da 0.01 a 20 Hz, con una deformazione dello 0.2%. Tale range di frequenze è stato scelto in modo da contenere le frequenze di sollecitazione fisiologiche del ginocchio, che vanno dagli 0.5 Hz della camminata ai 3.0 Hz della corsa^{41,42}.

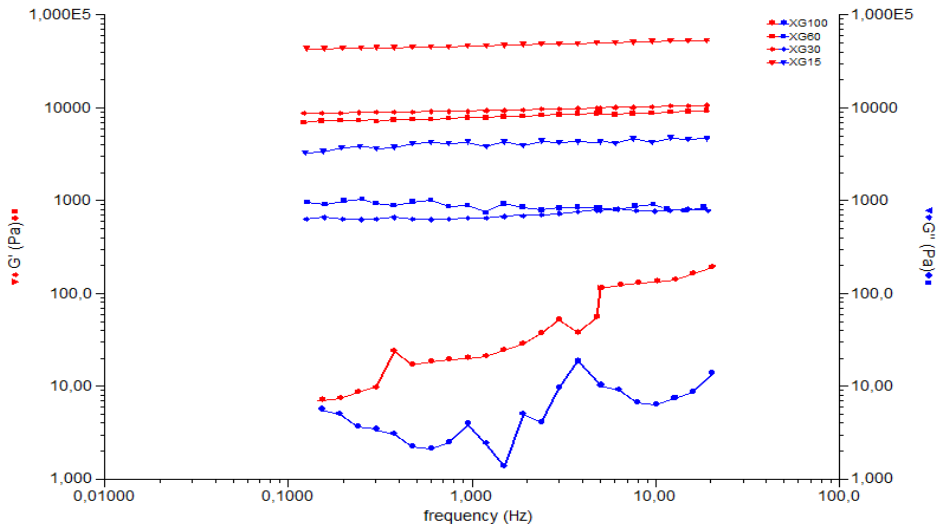


Figura 48 – Confronto degli spettri meccanici in scala logaritmica dei campioni XG100, XG60, XG30 e XG15. In rosso il modulo elastico (G'), in blu il modulo viscoso (G'')

Gli spettri meccanici dei campioni XG100, XG60, XG30 e XG15 sono riportati in **Figura 48**. Tutti i materiali mostrano una predominanza, seppur di diversa entità, della componente elastica G' rispetto alla componente viscosa G'' (Tabella 36); tale componente si mantiene pressoché costante a tutti gli intervalli di frequenza, dato caratteristico degli idrogel di natura chimica. Per il campione XG15, lo scarto tra il G' e il G'' è superiore ad un ordine di grandezza, permettendone la sua classificazione come idrogel forte. Anche gli idrogel XG30 e XG60 possiedono una netta prevalenza della componente elastica rispetto a quella viscosa, seppur di entità. L'idrogel di riferimento XG100, costituito da sola XG reticolata con STMP, rientra nella tipologia di idrogel di tipo liquido con valori di $G' \approx 0.7$ kPa e $G'' \approx 0.1$ kPa. Tale andamento si evidenzia anche nella risposta del materiale alle deformazioni imposte dalla testa del reometro. Andando a monitorare lo sfasamento, $\tan \delta$ (**Tabella 37**), è possibile notare come tutti i materiali possiedano una $\tan \delta < 45^\circ$, tipica degli idrogel di tipo solido.

Da un confronto degli spettri meccanici dei campioni a diversi contenuti di PVA e XG è possibile determinare che il componente responsabile delle elevate proprietà meccaniche della matrice è il PVA. Gli idrogel mostrano infatti proprietà elastiche crescenti all'aumentare del contenuto di PVA all'interno della matrice. Il più alto contenuto di XG, d'altra parte, garantisce una struttura a catene più aperte e quindi una maggiore esposizione dei gruppi idrofili all'ambiente circostante.

L'idrogel sintetizzato con il rapporto 15% XG e 85% PVA rappresenta il materiale che, con un $G' \approx 50$ kPa e $G'' \approx 4$ kPa, esprime le più pronunciate proprietà meccaniche.

Tabella 35 - Valori di modulo elastico (G') e modulo viscoso (G'') dei campioni in funzione della quantità crescente di XG alle frequenze di oscillazione caratteristiche della camminata e della corsa (0,5 e 3,0 Hz)

Campione	0,5Hz		3,0Hz	
	G' (kPa)	G'' (kPa)	G' (kPa)	G'' (kPa)
XG100	0.6 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.1 ± 0.1
XG60	7.5 ± 0.6	1.0 ± 0.2	8.4 ± 0.7	0.9 ± 0.6
XG30	8.9 ± 0.9	0.6 ± 0.1	9.7 ± 0.8	0.7 ± 0.1
XG15	49.2 ± 4.1	4.4 ± 0.3	53.7 ± 5.1	4.3 ± 0.2

Tabella 36 – Valori di sfasamento ($\tan \delta$) dei campioni sintetizzati alle frequenze di oscillazione caratteristiche della camminata e della corsa (0,5 e 3,0 Hz)

Campione	$\tan \delta$ (°)	
	0.5 Hz	3.0 Hz
XG100	7.4 ± 0.3	10.4 ± 0.2
XG60	4.6 ± 0.5	5.6 ± 0.5
XG30	4.1 ± 0.3	4.3 ± 0.4
XG15	4.0 ± 0.4	4.3 ± 0.2

4.10.2 Stress Relaxation test

I risultati del test di stress relaxation sono riportati nella **Tabella 37** raggruppati secondo il grado di deformazione a cui è stato sottoposto il campione. Il test di stress-relaxation ha permesso di verificare la capacità di rilassamento dei materiali sintetizzati. Dei tre materiali testati XG60, XG30 e XG15 solamente il campione XG15 mostra una buona capacità di rilassamento

idonea per la dissipazione dello stress a cui viene sottoposto il menisco nell'articolazione del ginocchio. La riduzione percentuale dello stress del campione XG15 risulta mediamente superiore al 95% ad 1 secondo dopo l'applicazione dello shear stress ed è pressoché totale nell'arco dei 10 minuti. Questo effetto è dovuto alla presenza di un'elevata quantità di PVA che possiede eccellenti capacità di rilassamento. Gli idrogel XG60 e XG30 mostrano caratteristiche di rilassamento inferiori al 50% dello stress applicato nell'arco del primo secondo e solo poco superiori al 50% nell'arco dei 10 min.

Tabella 37 – Valori di riduzione percentuale dello stress dei campioni sintetizzati dopo 1 secondo e 10 minuti dall'applicazione della deformazione iniziale

Sample	$\sigma\%$	Rid%(1 sec)	Rid% (10 min)
XG60	5	35 $\pm$ 2	40 $\pm$ 1
	20	38 $\pm$ 1	51 $\pm$ 1
	30	43 $\pm$ 2	52 $\pm$ 1
	100	51 $\pm$ 1	53 $\pm$ 1
XG30	5	36 $\pm$ 1	41 $\pm$ 1
	20	40 $\pm$ 2	58 $\pm$ 1
	30	44 $\pm$ 1	62 $\pm$ 1
	100	56 $\pm$ 1	69 $\pm$ 1
XG15	5	95 $\pm$ 1	98 $\pm$ 1
	20	97 $\pm$ 2	99 $\pm$ 1
	30	98 $\pm$ 1	99 $\pm$ 1
	100	99 $\pm$ 1	99 $\pm$ 1

4.11 Citotossicità degli idrogel

I dati di citotossicità, effettuati secondo le norme ISO/FDIS 10993-5, dopo 24 ore di contatto con un monostrato di fibroblasti immortalizzati di topo della linea NIH3T3, confermano che i campioni sono completamente atossici in vitro, né provocano sofferenza cellulare per effetto meccanico, non interferendo con il metabolismo cellulare. Essi né rilasciano componenti di sintesi o prodotti di reazione tossici.

Sono state sviluppate due tipologie di idrogel a base di PVA per la sostituzione/rigenerazione del menisco:

- In caso di meniscectomia totale, sono stati realizzati idrogel a base di PVA sottoponendo il polimero a reticolazioni consecutive allo scopo di incrementarne le proprietà meccaniche fino al raggiungimento di valori di G^* paragonabili a quelli del menisco (c.a. 120 kPa);
- In caso di lesioni meniscali, scaffold per la rigenerazione del tessuto meniscale sono stati realizzati attraverso la sintesi di idrogel misti di PVA e Gomma-Xantano.

Una volta sintetizzati, entrambe le tipologie di materiale sono state sottoposte a caratterizzazione chimica, fisica e meccanica. Inoltre i materiali sono stati sottoposti a test di citotossicità in vitro per valutarne l'idoneità come sostituti meniscali temporanei o permanenti.

Sostituti permanenti

Al fine di trovare le migliori condizioni di reticolazione un idrogel a base di PVA è stato sottoposto a tre reticolazioni consecutive (ognuna delle quali è avvenuta a rapporto molare PVA/STMP pari a 1:0.25).

La reticolazione è stata confermata tramite analisi colorimetrica. Il contenuto di fosfato raddoppia in seguito alla triplice reticolazione.

La triplice reticolazione non influenza significativamente il contenuto di acqua nel materiale, in quanto l'aumento dei punti di reticolazione, con conseguente riduzione della capacità assorbente, è controbilanciato dall'idrofilia dei bracci reticolanti.

Tutte le matrici possiedono dimensioni dei mesopori confrontabili con quelle della matrice extracellulare.

Grazie alle sue eccellenti proprietà meccaniche, il campione 3R PVA-H 0.25 può essere considerato come un potenziale sostituto biomimetico del menisco. Da

un punto di vista di rilassamento degli sforzi, esso è, infatti, in grado di dissipare istantaneamente la deformazione applicata, toccando mediamente una riduzione percentuale $> 95\%$ dopo 1 secondo allo stesso modo del tessuto cartilagineo umano.

Scaffold cellulari

Al fine di produrre uno scaffold per la rigenerazione dei tessuti, sono stati sintetizzati idrogel misti di PVA e gomma-Xantano (XG) con tre differenti rapporti percentuali in peso dei due componenti: XG:PVA = 60:40, 30:70 e 15:85.

Tramite spettrometria IR è stata verificata l'avvenuta reticolazione degli idrogel, identificando i segnali di reticolazione caratteristici dei legami C-P e P-O-P.

La capacità di un idrogel di svolgere adeguatamente le sue funzioni quale sostituto di un tessuto molle è strettamente correlata alla sua capacità di rigonfiamento. Le capacità di assorbire fluidi degli idrogel sono risultate elevate, con valori di WC crescenti fino ad un massimo di 93 ± 1 per il campione XG60. Tutti gli idrogel, grazie alle elevate caratteristiche idrofiliche della gomma-Xantano, possiedono WC superiori a quelle del tessuto cartilagineo ($WC \approx 72\%$). Il materiale che ha mostrato un comportamento più simile a quello del tessuto cartilagineo è l'idrogel XG15 con un WC di $78 \pm 1\%$.

Tutte le matrici possiedono dimensioni dei mesopori confrontabili con quelle della matrice extracellulare.

Tutti gli idrogel sono stabili termicamente alle temperature di esercizio (37°C).

Il materiale che mostra proprietà meccaniche più elevate per l'applicazione finale come scaffold per la rigenerazione tissutale è l'idrogel XG15 con un $G \approx 50\text{kPa}$. Il materiale XG15 è in grado di dissipare istantaneamente le deformazioni applicate, toccando mediamente una riduzione percentuale $> 90\%$ dopo 1 secondo e $> 95\%$ nell'arco dei 10 minuti. Gli altri idrogel, XG60 e XG30, non possiedono proprietà meccaniche sufficientemente elevate da garantire una dissipazione pressoché istantanea una volta rimosso lo sforzo applicato (dissipazione elastica) e quindi per funzionare come supporto stabile per l'organizzazione cellulare.

Il materiale che si presta maggiormente alla creazione di scaffold cellulare è il campione XG15 presenta caratteristiche, in termini di idratazione e proprietà meccaniche idonee al suo utilizzo come scaffold cellulare.

MATERIALI E METODI

Questa pagina è stata lasciata
intenzionalmente vuota

5.1 Materiali

Il Polivinil alcol (PVA) $M_w \approx 125000$ Da (grado di idrolisi 99%), il trisodio trimetafosfato (STMP), il povinilpirrolidone (PVP), la gomma-Xantano (XG) e tutti i reagenti e solventi sono stati acquistati da Fluka Sigma Aldrich srl (Svizzera). Tutti i composti sono stati usati senza ulteriori purificazioni.

5.2 Metodi

5.2.1 Realizzazione Idrogel

- Sostituti cartilaginei:

Una soluzione al 10% p/v di polivinil alcol (PVA) è stata ottenuta sciogliendo il polimero in acqua bi-distillata a 80°C per 24h. La soluzione, raffreddata a temperatura ambiente (RT), è stata basificata fino a pH 13 tramite aggiunta di NaOH 2M. Successivamente l'agente reticolante (STMP) è stato aggiunto goccia a goccia, utilizzando una soluzione al 20%, in quantità tali da ottenere idrogel a diversi rapporti molari tra l'unità ripetitiva di PVA e le molecole di STMP (**Tabella 38**).

Tabella 38 -Rapporti molari e volumi delle soluzioni utilizzati nella sintesi degli idrogel

Nome campione	Rapporti molari PVA:STMP	mL di soluzione PVA 10%	mL di soluzione STMP 20%
PVA-H 0,1	1:0.1	10	7,0
PVA-H 0,25	1:0.25	10	17,4
PVA-H 0,5	1:0.5	10	34,8
PVA-H 1	1:1	10	69,6
PVA-H 2	1:2	10	139,2

La reazione di reticolazione è stata fatta procedere per 96 ore. Gli idrogel così ottenuti sono stati lavati fino a completa rimozione dei reattivi in eccesso, verificata mediante misure conduttimetriche delle acque di lavaggio. Gli idrogel sono stati sottoposti a successivo essiccamento secondo due differenti metodologie:

- Evaporazione del solvente in stufa a 60°C (_E)
- Liofilizzazione(_L)

- **Sostituti del nucleo polposo**

Sono state ottenute miscele polimeriche a base di PVA e PVP a diverse composizioni % dei due polimeri:

- 10% PVA - 1% PVP
- 10% PVA - 2,5% PVP
- 10% PVA - 5% PVP

Le soluzioni sono state ottenute sciogliendo i polimeri in acqua bi-distillata a 80°C fino a completa solubilizzazione. In seguito alla completa dissoluzione dei polimeri, le soluzioni sono state raffreddate a temperatura ambiente (RT) e basificate fino a pH 13 tramite aggiunta di una soluzione di NaOH 2M. Successivamente l'agente reticolante (STMP) è stato aggiunto goccia a goccia, utilizzando una soluzione al 20% p/v, in quantità tali da ottenere un rapporto molare tra unità ripetitiva di PVA e molecole di STMP di 1:0,5.

La reazione di reticolazione è stata fatta procedere per 96 ore. Gli idrogel così ottenuti sono stati lavati fino a completa rimozione dei reattivi in eccesso, verificata mediante misure conduttimetriche delle acque di lavaggio, e quindi sottoposti ad essiccamento in stufa a 60°C.

- **Sostituti del menisco**

- **Sostituti a lungo termine**

Utilizzando la procedura di sintesi messa a punto per l'ottenimento dei sostituti cartilaginei sono stati realizzati idrogel a tripla reticolazione (3R).

Idrogel ottenuti utilizzando un rapporto molare PVA/STMP 1:0,25 sono stati attivati tramite aggiunta di NaOH 2M. I campioni 2R sono stati ottenuti aggiungendo una nuova aliquota di reticolante impiegando lo stesso rapporto molare

precedentemente utilizzato (1:0,25). I campioni 3R sono stati ottenuti ripetendo il procedimento utilizzato per i campioni 2R. Gli idrogel ottenuti sono stati lavati fino a completa rimozione dei reattivi in eccesso, verificata mediante misure conduttimetriche delle acque di lavaggio. Gli idrogel sono stati sottoposti a successivo essiccamento per evaporazione del solvente in stufa a 60°C (_E).

▪ **Scaffold cellulari per la rigenerazione del menisco**

Gli scaffold cellulari sono stati realizzati reticolando simultaneamente PVA e XG partendo da soluzioni al 10% p/v. Sono state ottenute miscele polimeriche a base di PVA e XG a diverse composizioni % dei due polimeri:

:

- XG 100% / PVA 0%
- XG 60% / PVA 40%
- XG 30% / PVA 70%
- XG 15% / PVA 85%

Le soluzioni prima dell'aggiunta dell'agente reticolante sono state attivate mediante l'aggiunta di NaOH fino al raggiungimento di pH 13 e mantenute sotto agitazione per 1 ora.

Successivamente l'agente reticolante (STMP) è stato aggiunto goccia a goccia, utilizzando una soluzione al 20% p/v, in quantità tali da ottenere un rapporto molare tra unità ripetitiva di XG e molecole di STMP di 3.66:1⁷⁶. Gli idrogel ottenuti sono stati lavati fino a completa rimozione dei reattivi in eccesso, verificata mediante misure conduttimetriche delle acque di lavaggio. Gli idrogel sono stati sottoposti a successivo essiccamento per evaporazione del solvente in stufa a 60°C (_E).

5.3 Caratterizzazione Chimica

5.3.1 Analisi Infrarossa (IR)

Gli spettri IR dei materiali allo stato secco sono stati registrati mediante uno spettrometro FTIR Nicolet 5700 (Thermo) equipaggiato con cella ATR (Riflettanza Totale Attenuata) dotata di cristallo di germanio a 45° e rivelatore MCT (Mercurio-Cadmio-Tellurio). Lo strumento è stato spurgato in flusso di azoto per ridurre al minimo l'interferenza della CO₂ e dell'umidità presente nell'aria.

Per ciascun campione sono state eseguite 64 scansioni nel range 4000-750 cm^{-1} con una risoluzione di 2.0 cm^{-1} . La scala interna è stata calibrata con laser elio-neon con una accuratezza di 0.01 cm^{-1} . Tutti gli spettri registrati sono stati elaborati attraverso il software OMINC®.

5.3.2 *Time of Flight Secondary Ion Mass Spectrometry (ToF-SIMS)*

Gli spettri ToF-SIMS sono stati ottenuti utilizzando uno spettrometro di massa a ioni secondari con analizzatore a tempo di volo TRIFT III (Physical Electronics, Chanhassen, MN, USA) equipaggiato con una sorgente di ioni primari a metallo liquido (Au^+ , 22 keV).

L'analisi è stata eseguita su sezioni ottenute dai campioni in esame al fine di ridurre l'effetto delle contaminazioni sempre presenti sulla superficie dei materiali. I campioni sono stati mantenuti nella camera di condizionamento ad un valore di vuoto di 10^{-4} Pa O/N prima di essere introdotti nella camera di analisi. L'analisi è stata eseguita ad un valore di vuoto pari a 10^{-8} Pa. Per ogni campione è stata selezionata un'area di analisi di 250 μm x 250 μm . Le analisi sono state eseguite in modalità statica limitando l'analisi al primo strato molecolare del campione. Essendo i campioni non conduttori è stato necessario utilizzare una compensazione di carica, ovvero la superficie è stata bombardata con fascio di elettroni in modo da disperdere le cariche accumulate su di essa che impediscono l'estrazione dei frammenti molecolari di interesse.

Gli spettri di ioni negativi sono stati calibrati con i frammenti CH^- (13.008 m/z), OH^- (17.003 m/z), C_2H^- (25.008 m/z), mentre gli spettri degli ioni positivi sono stati calibrati con i frammenti CH_3^+ (15.023 m/z), C_2H_3^+ (27.023 m/z) e C_3H_5^+ (41.039 m/z). Per tutti gli spettri la risoluzione di massa ($m/\Delta m$) si attesta a 4500 (determinata alla massa di 27 m/z).

5.3.3 *Determinazione colorimetrica degli ioni orto fosfato*

Ciascun campione è stato distrutto utilizzando un digestore Ethos D Microwave Labstation. In particolare, 100 mg di ciascun campione allo stato secco sono stati trattati con 6 cm^3 di una soluzione di HNO_3 67% e 2 cm^3 di H_2O_2 30%. Successivamente i campioni sono stati introdotti all'interno del digestore selezionando un programma a 3 stadi che prevede attivazione di una sorgente microonde per: 4 min. 250 W, 3 min. 500 W, 3 min. 300 W. Le soluzioni ottenute sono state quindi neutralizzate con NaOH.

Il grado di fosfatazione dei campioni ottenuti dalla digestione, è stato determinato spettrofotometricamente mediante un kit commerciale per test dei fosfati in soluzioni acquose (Test Spectroquant Merck KqaA – Darmstadt – Germany – ISO6878/1 e US-standard Methods 4500-P-E) seguendo le istruzioni del produttore. L'assorbanza è stata registrata e su uno spettrofotometro UV-Vis Lambda 25 (Perkin Elmer). La determinazione è stata eseguita utilizzando una retta di taratura ottenuta con l'impiego di soluzioni standard di fosfato. La retta di

taratura è risultata lineare nell'intervallo tra 0.1 e 3.0 mg/dm³ di PO₄³⁻. Il grado di fosfatazione è stato espresso in moli di P per g di idrogel secco.

5.3.4 Analisi elementare (EA)

La percentuale di carbonio, idrogeno e fosforo è stata determinata tramite analisi elementare. Il grado di fosfatazione è stato espresso come moli di fosforo per g di idrogel secco.

5.4 Caratterizzazione fisica

5.4.1 Analisi termogravimetrica (TGA)

L'analisi termogravimetrica è stata condotta per mezzo di una termobilancia SDT Q600 (TA Instruments - Waters, USA). 15-20 mg di campione secco sono stati sottoposti a riscaldamento da 30°C a 700°C con una velocità di 10 °C/min, sotto flusso di azoto.

5.4.2 Contenuto di acqua (WC)

15-20 mg di ciascun campione allo stato secco (W_d) sono stati immersi in una soluzione di NaCl 0.9%. I campioni sono stati pesati ogni 24 ore (W_s) fino a raggiungimento della costanza del peso. Il contenuto di acqua WC è stato calcolato mediante la seguente formula (1)

$$W_c = 100 \times \left[\frac{W_s - W_d}{W_s} \right] \quad (1)$$

5.5 Caratterizzazione morfologica

5.5.1 Microscopia elettronica a scansione (SEM)

Circa 20 mg di ciascun idrogel allo stato rigonfiato (in acqua mQ) sono stati congelati tramite azoto liquido e liofilizzati. I campioni disidratati sono stati metallizzati tramite metallizzatore Bal-Tec SDC 050 (Balzer, Germany). Le immagini SEM sono state acquisite con un microscopio elettronico a scansione modello XLS-20 (Philips, Netherlands). Le immagini ottenute sono state in seguito elaborate tramite il software Scion Image.

5.5.2 Calorimetria differenziale a scansione (DSC)

Il raggio medio dei mesopori delle varie matrici polimeriche è stato determinato tramite calorimetria a differenziale scansione (DSC) utilizzando un

calorimetro Q2000 (TA Instruments Leatherhead, United Kingdom). I campioni allo stato rigonfiato (10 mg) sono stati sottoposti alla seguente procedura:

- Raffreddamento a -60 °C;
- Riscaldamento di 5,0 °C/min fino a -0,3 °C;
- Isotherma a -0,3 °C per 10 min;
- Raffreddamento di 0,2 °C/min fino a -60 °C.

Basandosi sui termogrammi DSC e impiegando la seguente formula (2) è stato possibile ottenere il raggio dei mesopori:

$$R_p(nm) = (-64,67/\Delta T) + 0,57 \quad (2)$$

Dove ΔT è la variazione del punto triplo dell'acqua⁴⁰.

5.6 Caratterizzazione reologica e meccanica

5.6.1 Caratterizzazione reologica (AR)

Le proprietà viscoelastiche delle matrici polimeriche in condizioni di taglio, sono state condotte con un reometro AR-2000 (TA Instruments Leatherhead, United Kingdom); equipaggiato con una geometria piatto-piatto (diametro della testa mobile $\varnothing = 20$ mm cross hatched).

Le misure sono state condotte su provini cilindrici ($\varnothing 20$ mm, h 2 mm) allo stato rigonfiato in soluzione di NaCl 0,9%. Una forza normale di 1 N, relativa alla compressione della testa sul campione, è stata impostata in modo da garantire il completo contatto tra il campione e la testa del reometro. Tutti i campioni sono stati analizzati alla temperatura di 37°C, al fine di simulare la temperatura corporea. Di seguito vengono riportati i parametri impostati per ogni tipo di analisi reologica:

- *Oscillatory frequency sweep analysis (FS)*: I test dinamici in taglio sono stati condotti sottoponendo i campioni ad una deformazione sinusoidale fissa pari allo 0.2% strain e registrando la variazione del modulo elastico (G') e del modulo viscoso (G'') nell'intervallo di frequenze 0.01-20 Hz.
- *Steady Stress Relaxation test (SR)*: Test statici di stress relaxation sono stati eseguiti applicando ai campioni deformazioni del 5, 20, 30, e 100% seguiti da una fase di rilassamento di 600 secondi (periodo che corrisponde alla durata di un ciclo completo di rilassamento del tessuto cartilagineo³⁰).

5.6.2 Analisi dinamo meccanica (DMA)

Le proprietà viscoelastiche delle matrici polimeriche, in condizioni di compressione, sono state determinate con un analizzatore dinamico meccanico DMA Q-800 (TA Instruments Leatherhead, United Kingdom) equipaggiato con una geometria film/fiber tension e compression.

Le misure sono state condotte su provini cilindrici ($\varnothing$ 20 mm, h 2 mm) e rettangolari (l_1 10 mm, l_2 100 mm, h 2 mm) allo stato rigonfiato (NaCl 0.9%). Tutti i campioni sono stati analizzati alla temperatura di 37°C, al fine di simulare la temperatura corporea. Di seguito vengono riportati i parametri impostati per l'analisi:

- *Oscillatory frequency sweep analysis (FS)*: Il test dinamico in taglio è stato condotto sottoponendo i campioni ad una deformazione sinusoidale dello 0,2% strain con un range di frequenze crescente da 0,01-20 Hz. I test di frequency sweep sono sempre stati condotti mantenendo i campioni nelle condizioni di viscoelasticità lineare.

5.7 Stabilità ISO/FDIS 10993-13

La stabilità dei materiali è stata valutata secondo le norme ISO/FDIS 10993-13 Biological evaluation of medical devices – Part 13: Identification and quantification of degradation products from polymeric medical devices.

Seguendo la procedura sono state scelte le seguenti soluzioni test:

- PBS pH 7.4 in accordo con ISO 13781 per la **degradazione idrolitica**;
- H₂O₂ 3% in soluzione acquosa (Pharmacopoeia grade) per la **degradazione ossidativa**.

La degradazione dei materiali è stata valutata secondo due tipologie di test:

- **Accelerated degradation Test**: 70°C per 60 giorni;
- **Real-Time degradation Test**: 37 ± 1°C per 180 giorni.

I test degradativi sono stati condotti su campioni cilindrici di 10 mm di diametro e 5 mm. Ogni campione è stato valutato in quadruplicato.

Preliminarmente e post-degradazione i campioni sono stati essiccati in stufa a 40 °C e pesati fino a costanza di peso. La valutazione dell'eventuale perdita di peso dei campioni è espressa in variazione di peso %.

5.8 Test di citotossicità in vitro ISO/FIDS 10993-5

La citotossicità in vitro dei materiali è stata valutata secondo il test del contatto diretto, seguendo le direttive ISO 10993-5 ("Valutazione biologica dei dispositivi medici - Parte 5: Test per la citotossicità: metodi in vitro"), idoneo per campioni di forme, dimensioni e stati fisici diversi.

Le cellule impiegate nell'esperimento (fibroblasti tumorali di topo NIH3T3) sono state coltivate in un terreno di coltura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), arricchito con il 10% di siero fetale bovino, l'1% di L-glutammina-penicillina-streptomicina e l'1% di amminoacidi non essenziali (MEM). Le cellule sono state incubate ad una temperatura di 37°C in atmosfera al 5% di CO₂ e, una volta a confluenza, sono state lavate con PBS, staccate con una soluzione di tripsina-EDTA e centrifugate a 900 g per 10 minuti. Il pellet così ottenuto è stato nuovamente sospeso in una soluzione di DMEM (diluizione 1:15) e 500 µL di sospensione cellulare sono stati depositati in ciascun pozzetto di una multiwell da 24 pozzetti e lasciati incubare per 24 h, a 37°C, in atmosfera controllata al 5% di CO₂.

I campioni di idrogel in forma rigonfiata dal peso di 5 mg sono stati sterilizzati con etanolo al 70% per due ore a temperatura ambiente. In seguito l'etanolo è stato rimosso ed i campioni sono stati messi ad equilibrare a contatto con il terreno di coltura, per 24 ore a 37°C. Il controllo negativo utilizzato nell'esperimento è costituito da polietilene ad alta densità (HDPE).

Dopo essere stati equilibrati, i campioni di idrogel sono stati depositati sui monostrati cellulari; essi sono stati poi fissati tramite inserti da co-cultura in polietilentereftalato (PTFE), che immobilizza il campione, impedendone il galleggiamento. Successivamente, i campioni sono stati incubati per 24 h ad una temperatura di 37°C, in una atmosfera al 5% di CO₂.

La vitalità cellulare è stata valutata dopo 24 h di contatto con i campioni, utilizzando il metodo del Neutral Red Uptake. Questo consiste nel far assorbire alle cellule il colorante Neutral Red (la soluzione NR stock è composta da 0,33 g di polvere di Neutral Red disciolti in 100 cm³ di acqua sterile).

Il numero di cellule vive viene determinato dal valore di assorbanza del campione alla λ_{max} del colorante (540 nm), (le cellule morte non assorbono il Neutral Red). Dopo l'incubazione, il medium di coltura è stato rimosso da ogni pozzetto e le cellule sono state sottoposte a lavaggio con 1 cm³ di PBS preriscaldato. Successivamente, la soluzione di lavaggio è stata rimossa e sono stati aggiunti 1 cm³ di NR medium (1 cm³ di soluzione NR stock7, addizionato a 99 cm³ di medium completo, preriscaldato a 37°C) per ogni pozzetto, con conseguente incubazione ad una temperatura di 37°C in una atmosfera al 95% di O₂ e 5% di CO₂ per 3 ore. Durante questa fase è stato controllato che non si verificasse formazione di cristalli di Neutral Red. Dopo l'incubazione, il medium NR è stato rimosso e le cellule lavate nuovamente con 1 cm³ di PBS preriscaldato. Dopodiché il tampone è stato rimosso dai pozzetti, ai quali è stato aggiunto 1 cm³

di soluzione per l'estrazione del colorante. Per facilitare l'estrazione del Neutral Red, la multiwell è stata posta su un plater-shaker per 20-45 minuti, proteggendo i campioni dalla luce. La concentrazione di colorante estratto per ogni campione è stata misurata tramite lettura dell'assorbanza, analizzando le soluzioni con uno spettrofotometro UV-visibile (Lambda 7 Perkin-Elmer) alla lunghezza d'onda di 540 nm, utilizzando una retta di taratura precedentemente ottenuta con soluzioni a titolo noto.

Questa pagina è stata lasciata
intenzionalmente vuota

- (1) Gatti A.M.; Knowles J.C. Biocompatibility and Biological Tests. *In Integrated Biomaterials science*; Barbucci R., Eds.; Kluwer Accademic/Plenum Publishers: New York, NY 2002, 381-402.
- (2) Ikada Y. Biological materials. *In Integrated Biomaterials science*; Barbucci R., Eds.; Kluwer Accademic/Plenum Publishers: New York, NY 2002, 1-22.
- (3) Ioannis V. Natural materials. *In Biomaterials science*; Radner B.D., Hoffman A.S., Eds.; Academic Press: San Diego, CA 1996, 84-93.
- (4) Didisheim P.; Watson T.J. Cardiovascular applications. *In Biomaterials science*; Radner BD, Hoffman AS, Eds.; Academic Press: San Diego, CA 1996, 283-296.
- (5) Shoen F.J. Tumorigenesis and Biomaterials. *In Biomaterials science*; Radner B.D., Hoffman A.S., Eds.; Academic Press: San Diego, CA 1996, 200-204.
- (6) Hench L.L.; Jones J.R. Repair of skeletal tissues. *In Biomaterials: Artificial organs and tissue engineering*; Hench L.L., Eds.; Woodhead Publishing Limited: Cambridge, UK 2005, 119-128.
- (7) Smith D.C. Adhesive and Sealants. *In Biomaterials science*; Radner B.D., Hoffman A.S., Eds.; Academic Press: San Diego, CA 1996, 319-327.
- (8) Refojo M.F. Ophthalmologic application. *In Biomaterials science*; Radner B.D., Hoffman A.S., Eds.; Academic Press: San Diego, CA 1996, 328-334.
- (9) Katz J.L. Orthopedic application. *In Biomaterials science*; Radner B.D., Hoffman A.S., Eds.; Academic Press: San Diego, CA 1996, 335-345.
- (10) Santin M.; Ambrosio L.; Lloyd A.W.; Denyer S.P. Soft tissue replacement. *In Integrated Biomaterials science*; Barbucci R., Eds.; Kluwer Accademic/Plenum Publishers: New York, NY 2002, 425-450.

- (11) Hanson S.; Ratner B.D. Testing of blood - material interaction. *In Biomaterials science*; Radner B.D., Hoffman A.S., Eds.; Academic Press: San Diego, CA 1996, 228-237.
- (12) Veronese F.M.; Caliceti P. Drug delivery Systems. *In Integrated Biomaterials science*; Barbucci R., Eds; Kluwer Accademic/Plenum Publishers: New York, NY 2002, 833-872.
- (13) Cigada A.; Chiesa R.; Pinasco M.; Hisatsune K. Metallic materials. *In Integrated Biomaterials science*; Barbucci R., Eds; Kluwer Accademic/Plenum Publishers: New York, NY 2002, 225-294.
- (14) Krajewski A.; Ravaglioli A. Bioceramics and biological Glasses. *In Integrated Biomaterials science*; Barbucci R., Eds; Kluwer Accademic/Plenum Publishers: New York, NY 2002, 189-252.
- (15) Abatangelo G.; Brun P.; Radice M.; Cortito R; Auth M.K.H. Tissue engineering. *In Integrated Biomaterials science*; Barbucci R., Eds; Kluwer Accademic/Plenum Publishers: New York, NY 2002, 885-936.
- (16) Nikolaos A.P. Hydrogels. *In Biomaterials science*; Radner B.D., Hoffman A.S., Eds.; Academic Press: San Diego, CA 1996, 60-63.
- (17) Zhu J.; Marchant R.E. Design properties of hydrogel tissue-engineering scaffolds. *Expert review of medical devices* 2011; 8(5): 607-626.
- (18) Baker M.I.; Walsh S.P.; Schwartz Z.; Boyan B.D. A review of polyvinyl alcohol and its uses in cartilage and orthopedic applications. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2012; 100: 1451-1457.
- (19) DeMerlis C.C.; Schoneker D.R. Review of the oral toxicity of polyvinyl alcohol (PVA). *Food and Chemical Toxicology* 2003; 41: 319–326.
- (20) Hassan C.M; Peppas N.A. Structure and applications of Poly(vinyl alcohol) Hydrogels Produced by Conventional Crosslinking or by Freezing/thawing Methods. *Adv in Polymer Sci* 2000;153: 37-65.
- (21) Sakurada I.; Ikada Y.; Sakurada Y. Effects of Gamma Radiation on Polymers in Solutions. (VII) Effects of Degree of Polymerization on Crosslinking of Poly(Vinyl Alcohol) in Aqueous Solutions. *Bull Inst Chem Res, Kyoto Univ* 1964; 42: 32-41.
- (22) Dieu J.; Desreux V. Large Radiation Sources in Industry. *Proc Conf* 1959, 1: 341-350.

- (23) Bray J.C.; Merrill E.W. Poly(vinyl alcohol) hydrogels. Formation by electron beam irradiation of aqueous solutions and subsequent crystallization. *J Appl Polym Sci* 1973; 17: 3779–3794.
- (24) Xiong D.; Miao F.; Zhang J.; Peng Y. Novel PVP/PVA hydrogels for articular cartilage replacement. *Materials Science and Engineering* 2009. 20: 1979-1983.
- (25) Robinson B.V.; Sullivan F.M.; Borzellecca J.F.; Schwartz S.L. A critical review of kinetics and toxicology of polyvinylpyrrolidone. *C.A. Finch* 1990. 15: 1-56.
- (26) Navarro S.C.; Felisberti M.I. Poly(vinyl alcohol) and poly(vinylpyrrolidone) blends: Study of relaxations by dynamic mechanical analysis 2002.
- (27) Rosalam S.; England R. Review of xanthan gum production from unmodified starches by *Xanthomonas compestris*. *Enzyme Microb. Tech* 2006; 39: 197-207.
- (28) Fithian D.C.; Kelly M.A.; Mow V.C. Material properties and structure function relationships in the menisci. *Clin Orthop Relat Res* 1990;252: 19-31.
- (29) Yongzhen T.; Ruquan Z.; Weilin X.; Zikui B.; Yingshan Z.; Sanping Z.; Yan X.; Danqing Y. Rheological behavior and microstructure of release-controlled hydrogels based on Xanthan gum crosslinked with sodium trimetaphosphate. *Food Hydrocolloids* 2016; 52: 923-933.
- (30) Netti P.A.; Ambrosio L. Articular Cartilage. In *Integrated Biomaterials Science*. Barbucci R., Eds; Kluwer Academic/Plenum Publishers: New York, NY 2002, 381-402.
- (31) Altman R.D. The syndrome of osteoarthritis. *Rheumatol* 1997; 24:766-767.
- (32) Chitnavis J.; Sinsheimer J.S.; Suchard M.A.; Clipsham K.; Carr A.J. End-stage coxarthrosis and gonarthrosis. Aetiology, clinical patterns and radiological features of idiopathic osteoarthritis. *Rheumatology* 2000; 39: 612-619.
- (33) Brooks P.M. Impact of osteoarthritis on individuals and society: how much disability? Social consequences and health economic implications. *Curr Opin Rheumatol* 2002; 14: 573-577.

- (34) Loeser R.F; Shakoar N. Aging or osteoarthritis: which is the problem? *Rheum Dis Clin North Am* 2003; 29: 653-673.
- (35) Leone G.; Consumi M.; Aggravi M.; Donati A.; Lamponi S.; Magnani A. PVA/STMP based hydrogels as potential substitutes of human vitreous. *J of Mater Sci: Mater Med* 2010; 21: 2491–2500.
- (36) Leone G.; Consumi M.; Greco G.; Bonechi C.; Lamponi S.; Rossi C.; Magnani A. A PVA/PVP hydrogel for human lens substitution: synthesis, rheological characterisation and in vitro biocompatibility. *J Biomed Mater Res: Part B: Appl Biomater* 2011; 97B (2): 278-288.
- (37) Leone G.; Bidini A.; Lamponi S.; Magnani A. States of water, surface and rheological characterisation of a new biohydrogel as articular cartilage substitute. *Polym Adv Technol* 2013; 24: 824–833.
- (38) Lack S.; Dulong V.; Picton L.; Le Cerf D.; Condamine E. High-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy studies of polysaccharides crosslinked by sodium trimetaphosphate: a proposal for the reaction mechanism. *Carbohydrate Res* 2007; 342: 943–953.
- (39) Curley C.; Hayes J.C.; Rowan N.J.; Kennedy J.E. An evaluation of the thermal and mechanical properties of a salt-modified polyvinyl alcohol hydrogel for a knee meniscus application. *J of Mech Behav of Biomed Mat* 2014. 40: 13-22.
- (40) Iza M.; Woerly S.; Danumah C.; Kaliaguine S.; Bousmina M. Determination of pore size distribution for mesoporous materials and polymeric gels by means of DSC measurements: thermoporometry. *Polymer* 2000; 41: 5885-5893.
- (41) Accardi M.A.; Dini D.; Cann P.M. Experimental and numerical investigation of the behaviour of articular cartilage under shear loading—interstitial fluid pressurisation and lubrication mechanisms. *Tribol Int* 2011; 44: 565-578.
- (42) Leone G.; Delfini M.; Di Cocco M.E.; Borioni A.; Barbucci R. The applicability of an amidated polysaccharide hydrogel as a cartilage substitute: structural and rheological characterization. *Carbohydrate Res* 2008; 343: 317-327.
- (43) Wong B.L.; Sah R.L. Mechanical asymmetry during articulation of tibial and femoral cartilages: local and overall compressive and shear deformation and properties. *J Biomech* 2010; 43:1689-1695.

- (44) Macosko C.W. Rheology, Principles measurements and applications. WILEY-VCH: New york, NY 1994.
- (45) Yan L.; Oliveira J.M.; Oliveira A.L.; Caridade S.G.; Mano J.F. Macro/microporous silk fibroin scaffolds with potential for articular cartilage and meniscus tissue engineering applications. *Acta Biomaterialia* 2012; 8: 289-301.
- (46) Shehap A.M. Thermal and Spectroscopic Studies of Polyvinyl Alcohol/Sodium Carboxy Methyl Cellulose Blends. *Egypt. J. Solids* 2008; 1: 75-89.
- (47) Gilman J.W; VanderHart D.L.; Kashiwagi T. Thermal Decomposition Chemistry of Poly(vinyl alcohol). *Fire and Pol. II: Mater. and Test for Hazard Prev. A.C.S.* 1994; 599:161-184.
- (48) Homsy C.A. Pseudo-Synovial plastic body fluids and methods of preparing same. U.S. Patent 3,830,910, Aug 20, 1974.
- (49) Baker M.I.; Walsh S.P.; Schwartz Z.; Boyan B.D. A review of polyvinyl alcohol and its uses in cartilage and orthopedic applications. *Soc. for Biomat* 2012; 5: 1451-1457.
- (50) Alkalay R.The mechanical and material Properties of the healthy and degenerated Intervertebral Disc. *In Integrated Biomaterials Science*.Barbucci R., Eds; Kluwer Accademic/Plenum Publishers: New York, NY 2002, 403-420.
- (51) Silva-Correia J.; Correia S.I.; Oliveira J.M.; Reis R.L. Tissue engineering strategies applied in the regeneration of the human intervertebral disk. *Biotech. Adv.* 2013; 31: 1514-1531.
- (52) Chirila T.V.; Hong Y.; “Poly(1-vinyl-2-pyrrolidinone) Hydrogels as Vitreous Substitutes: a Rheological Study.*Polym Int* 1998; 46: 183-195.
- (53) Gillquist J.; Hamberg P.; Lysholm J. Endoscopic partial and total meniscectomy.A comparative study with a short term follow up. *Acta Orthop Scand* 1982;53:975-979.
- (54) Turman K.A.; Diduch D.R. Meniscal repair: indications and techniques. *J Knee Surg* 2008;21:154-162.
- (55) DeHaven K.E. Meniscus repair. *Am J Sports Med* 1999;27:242-250.

- (56) Noyes F.R.; Barber-Westin S.D. Repair of complex and avascular meniscal tears and meniscal transplantation. *J Bone Joint Surg Am* 2010;92:1012-1029.
- (57) Kohn D.; Moreno B. Meniscus insertion anatomy as a basis for meniscus replacement: a morphological cadaveric study. *Arthroscopy* 1995;11:96-103.
- (58) Kusayama T, Harner CD, Carlin GJ, Xerogeanes JW, Smith BA. Anatomical and biomechanical characteristics of human meniscofemoral ligaments. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 1994;2:234-7.
- (59) McDermott I.D.; Sharifi F.; Bull A.M.; Gupte C.M.; Thomas R.W.; Amis A.A. An anatomical study of meniscal allograft sizing. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2004;12: 130-135.
- (60) Shaffer B.; Kennedy S.; Klimkiewicz J.; Yao L. Preoperative sizing of meniscal allografts in meniscus transplantation. *Am J Sports Med* 2000;28:524-533.
- (61) Greis P.E.; Bardana D.D.; Holmstrom M.C.; Burks R.T. Meniscal injury: I. Basic science and evaluation. *J Am Acad Orthop Surg* 2002;10: 168-176.
- (62) Clark C.R.; Ogden J.A. Development of the menisci of the human knee joint. Morphological changes and their potential role in childhood meniscal injury. *J Bone Joint Surg Am* 1983;65:538-547.
- (63) Arnoczky S.P.; Warren R.F. Microvasculature of the human meniscus. *Am J Sports Med* 1982;10:90-95.
- (64) Herwig J.; Egner E.; Buddecke E. Chemical changes of human knee joint menisci in various stages of degeneration. *Ann Rheum Dis* 1984;43: 635-640.
- (65) Proctor C.S.; Schmidt M.B.; Whipple R.R.; Kelly M.A.; Mow V.C. Material properties of the normal medial bovine meniscus. *J Orthop Res* 1989;7:771-782.
- (66) Scott P.G.; Nakano T.; Dodd C.M. Isolation and characterization of small proteoglycans from different zones of the porcine knee meniscus. *Biochim Biophys Acta* 1997;1336: 254-262.
- (67) Adams M.E.; Muir H. The glycosaminoglycans of canine menisci. *Biochem J* 1981;197:385-389.

- (68) McDevitt C.A.; Webber R.J. The ultrastructure and biochemistry of meniscal cartilage. *Clin Orthop Relat Res* 1992;252: 8-18.
- (69) Cameron HU, Macnab I. The structure of the meniscus of the human knee joint. *Clin Orthop Relat Res* 1972;89:215-9.
- (70) Newman AP, Anderson DR, Daniels AU, Dales MC. Mechanics of the healed meniscus in a canine model. *Am J Sports Med* 1989;17:164-75.
- (71) Hoshino A, Wallace WA. Impact-absorbing properties of the human knee. *J Bone Joint Surg Br* 1987;69:807-11.
- (72) Radin E.L.; De Lamotte F.; Maquet P. Role of the menisci in the distribution of stress in the knee. *Clin Orthop Relat Res* 1984;185:290-294.
- (73) Zhu W.; Chern K.Y.; Mow V.C. Anisotropic viscoelastic shear properties of bovine meniscus. *Clin Orthop Relat Res* 1994;306: 34-45.
- (74) Walker P.S.; Erkman M.J. The role of the menisci in force transmission across the knee. *Clin Orthop Relat Res* 1975;109: 184-192.
- (75) Sweigart M.A.; Zhu C.F.; Burt D.M.; DeHoll P.D.; Agrawal C.M.; Clanton T.O. Intraspecies and interspecies comparison of the compressive properties of the medial meniscus. *Ann Biomed Eng* 2004;32: 1569-1579.
- (76) Bejenariu A.; Popa M.; Dulong V.; Picton L.; Le Cerf D. Trisodium trimetaphosphate crosslinked xanthan networks: synthesis, swelling, loading and releasing behaviour. *Polym Bull* 2008. 8: 8-33.

Questa pagina è stata lasciata
intenzionalmente vuota

Pubblicazioni

Leone G.; Volpato M.D.; Nelli N.; Lamponi S.; Boanini E.; Bigi A.; Magnani A. Continuous multilayered composite hydrogel as osteochondral substitute. J Biomed Mater Res Part A 2015: 103A: 2521–2530.

Comunicazioni a congresso

X INSTM CONFERENCE, Favignana (TP), 28th June – 1st July 2015
Continuous multilayered composite hydrogel as osteochondral substitute
Nicola Nelli, G. Leone, S. Lamponi, E. Boanini, A. Bigi, A. Magnania