

ALMA MATER STUDIORUM – UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

CAMPUS DI CESENA

SCUOLA DI INGEGNERIA E ARCHITETTURA

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN INGEGNERIA BIOMEDICA

**SVILUPPO E CARATTERIZZAZIONE DI
MATERIALI BIOMIMETICI E BIOATTIVI
PER LA RIGENERAZIONE
CARTILAGINEA**

Tesi in

MECCANICA DEI TESSUTI BIOLOGICI LM

Relatore

Prof. Luca Cristofolini

Presentata da

Alessandra Femiano

Correlatore

Ing. Elisa Figallo, Ph. D.

Sessione Seconda

Anno Accademico 2014 – 2015

Alla mia famiglia,
perché ha sempre creduto in me.

INDICE

MOTIVAZIONE DEL LAVORO DI RICERCA	9
CAPITOLO 1: INTRODUZIONE.....	11
1.1 IL COMPARTIMENTO OSTEOCONDRALE.....	11
1.1.1 LA CARTILAGINE ARTICOLARE	12
1.1.1.1 Il collagene	15
1.1.2 L'OSSO SUBCONDRALE.....	15
1.1.3 INTERAZIONE TRA CARTILAGINE ARTICOLARE E OSSO SUBCONDRALE.....	17
1.1.4 PROPRIETÀ DEL SISTEMA OSTEOCONDRALE.....	17
1.2 L'OSTEOARTROSI	18
1.2.1 ALTERAZIONI DELLA CARTILAGINE E DELL'OSSO SUBCONDRALE NELL'OSTEOARTROSI.....	21
1.2.2 PROCESSI MOLECOLARI	23
1.3 OPZIONI TERAPEUTICHE	23
1.3.1 DEBRIDMENT	25
1.3.2 TECNICHE DI STIMOLAZIONE DEL MIDOLLO OSSEO	25
1.3.3 TECNICHE DI SOSTITUZIONE DELLA CARTILAGINE	26
1.3.3.1 Autotrapianto di condrociti e mosaicoplastica	26
1.3.3.2 Allograft	27
1.3.4 TECNICHE DI RIGENERAZIONE DELLA CARTILAGINE.....	28
1.3.4.1 Impianto di condrociti	28
1.3.4.2 Biomateriali biomimetici.....	30
1.4 MAIOREGEN®	33
1.4.1 LO STRATO COLLAGENICO.....	33
1.4.1.1 Il processo di biomineralizzazione	34
1.4.1.2 Efficacia nella rigenerazione di difetti osteocondrali.....	35
1.5 SCOPO DEL LAVORO DI TESI.....	36

CAPITOLO 2: MATERIALI E METODI	39
2.1 SPECIFICA DI PRODOTTO.....	39
2.2 PROCESSO DI REALIZZAZIONE DELLO SCAFFOLD	40
2.2.1 SINTESI	41
2.2.2 LAVAGGI.....	42
2.2.3 RETICOLAZIONE	43
2.2.4 STESURA	44
2.2.4.1 Piastre in acciaio o piastre teflonate	46
2.2.5 LIOFILIZZAZIONE	47
2.3 VALUTAZIONE DELLE CARATTERISTICHE DEL PRODOTTO	50
2.3.1 BIOMIMESI.....	50
2.3.1.1 Microscopio elettronico a scansione (SEM)	50
2.3.1.2 Analisi termogravimetrica (TGA)	52
2.3.1.3 Test di swelling.....	54
2.3.2 RISCHIO DI DELAMINAZIONE	55
2.3.3 SPESSORE DELLO SCAFFOLD	55
2.3.4 TEMPI DI DEGRADAZIONE	57
2.3.4.1 Degradazione enzimatica.....	57
2.3.4.2 Valutazione del grado di reticolazione	58
2.3.5 SHELF LIFE (CONTENUTO D'ACQUA).....	60
2.3.6 IMPIANTABILITÀ	61
2.3.6.1 Test d'impiantabilità.....	61
2.3.7 POSSIBILITÀ DI TAGLIO	65
2.3.7.1 Test con pressa idraulica e fustella.....	65
2.3.7.2 Test con forbici.....	66
 CAPITOLO 3: RISULTATI OTTENUTI	 67
3.1 BIOMIMESI.....	67
3.1.1 RISULTATI ANALISI SEM	67
3.1.2 RISULTATI TGA	69

3.1.3 RISULTATI TEST DI SWELLING	69
3.2 RISCHIO DI DELAMINAZIONE.....	70
3.2.1 RISULTATI TEST DI SWELLING	71
3.3 TEMPI DI DEGRADAZIONE	73
3.3.1 RISULTATI DEGRADAZIONE ENZIMATICA	73
3.3.2 RISULTATI VALUTAZIONE DEL GRADO DI RETICOLAZIONE	74
3.5 SHELF LIFE (CONTENUTO D'ACQUA).....	76
3.6 IMPIANTABILITÀ	77
3.6.1 RISULTATI TEST D'IMPIANTABILITÀ.....	77
3.7 POSSIBILITÀ DI TAGLIO	81
3.7.1 RISULTATI TEST CON PRESSA IDRAULICA E FUSTELLA ..	81
3.7.2 RISULTATI TEST CON FORBICI.....	82
CAPITOLO 4: CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI.....	85
BIBLIOGRAFIA	89
SITOGRAFIA	97
RINGRAZIAMENTI	99

MOTIVAZIONE DEL LAVORO DI RICERCA

Lo scopo di questo lavoro di tesi, svolto presso Fin-Ceramica Faenza S.R.L., è lo sviluppo e la caratterizzazione di materiali biomimetici e bioattivi per la rigenerazione cartilaginea in grado di coordinare in vivo il processo di rigenerazione.

Questo scaffold costituito da due strati, assolutamente innovativo e assente dal mercato, è stato progettato per essere utilizzato nel caso di lesioni condrali. Le lesioni condrali possono essere dovute a traumi, osteoartrosi o osteoartriti dissecanti; queste possono manifestarsi con diversi gradi di severità fino al coinvolgimento di tutta l'articolazione. La numerosità di pazienti affetti da queste patologie (oltre 20 milioni in USA), e quindi i grandi costi legati alla sanità, spinge la ricerca in questo settore.

L'attività si è basata sulla sintesi e caratterizzazione dei materiali e sulla determinazione delle relazioni tra parametri di processo e proprietà finali quali la biomimesi, il minimo rischio di delaminazione, i tempi di degradazione maggiori di 6 mesi in vivo, la shelf life del prodotto, la possibilità d'impianto e di taglio.

Caratteristiche fondamentali degli scaffold realizzati sono la biocompatibilità, la bioattività e il biomimetismo: in particolare il materiale dovrà essere metabolizzato senza arrecare effetti tossici o dannosi sul sistema biologico, dovrà essere in grado di interagire con il tessuto vivente e stimolare i processi di rigenerazione e dovrà riprodurre le caratteristiche chimico-fisiche e morfologiche del tessuto che va a sostituire.

CAPITOLO 1:

INTRODUZIONE

In questo primo capitolo verranno introdotti alcuni concetti fondamentali per poter inquadrare il progetto di tesi svolto, saranno presentate le caratteristiche del compartimento osteocondrale, la complessa interazione tra lo strato cartilagineo e l'osso subcondrale e le opzioni terapeutiche utilizzate per ristabilire la funzionalità dell'articolazione in seguito ad una lesione. Verrà quindi presentato il prodotto Maioregen[®], sviluppato presso Fin-Ceramica Faenza, ed esposto lo scopo del lavoro di tesi.

1.1 IL COMPARTIMENTO OSTEOCONDRALE

Il compartimento osteocondrale del giunto articolare è una struttura altamente organizzata^[1] che comprende la cartilagine articolare, il tidemark, la cartilagine calcificata, la 'cement line' e l'osso subcondrale^[2].

Il confine tra cartilagine non-calcificata e cartilagine calcificata appare come uno strato molto sottile e prende il nome di tidemark^[1] mentre il confine tra cartilagine calcificata e osso subcondrale prende il nome di 'cement line' (Figura 1.1).

Sia la cartilagine che l'osso subcondrale sono tessuti connettivi; questi tessuti sono caratterizzati dalla presenza di cellule disperse in una sostanza intercellulare o matrice extracellulare (ECM – Extra Cellular Matrix).

La giunzione osteocondrale è, quindi, una struttura molto complessa e ancora non completamente nota^[1].

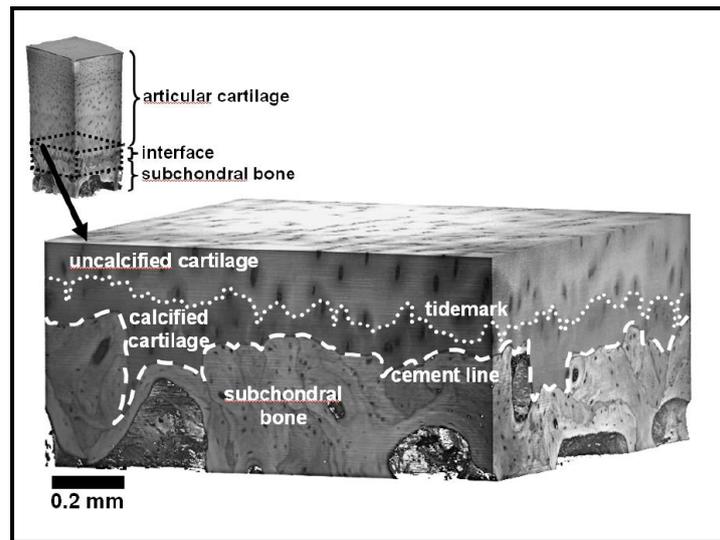


Figura 1.1: Struttura del complesso osteocondrale^[3].

1.1.1. LA CARTILAGINE ARTICOLARE

La cartilagine articolare è un tessuto connettivo specializzato nel fornire supporto strutturale, ammortizzare gli urti e offrire il minor attrito possibile^[4]. Questa è una struttura bifasica, strutturalmente disomogenea, costituita da una fase solida (15-32%) e una fase liquida (68-85%). La fase solida è costituita per lo più da collagene e proteoglicani mentre la fase liquida è composta principalmente da acqua^[5].

La cartilagine articolare deve essere in grado di garantire proprietà meccaniche adeguate allo svolgimento della funzione di interfaccia articolare; il mantenimento di questo equilibrio è affidato ai condrociti, le uniche cellule che popolano la cartilagine. La densità dei condrociti nella cartilagine articolare è di circa 10.000 cellule/mm³, che equivale all'1,7% del volume del tessuto; il resto è occupato da matrice extracellulare^[6].

La cartilagine articolare è in grado di assorbire e rilasciare il liquido sinoviale durante i cicli di compressione ai quali è sottoposta giocando un ruolo chiave nella distribuzione delle forze e nella dissipazione^[1]. È un tessuto con proprietà visco-elastiche ed è in grado, nonostante la scarsa rigidità, di trasmettere grandi carichi (fino ad otto volte il peso corporeo) grazie all'essudazione dei fluidi e il

movimento dei fluidi stessi attraverso la struttura porosa della cartilagine^[5,6].

La cartilagine articolare, quindi, protegge l'osso subcondrale da grandi stress, incrementa la congruenza articolare riducendo la pressione di contatto nominale e permette movimenti a bassa frizione nell'articolazione^[5].

La risposta della cartilagine ad un danno non segue il processo di guarigione tipico, caratterizzato da formazione del coagulo di sangue, infiammazione, riparazione con tessuto fibroso e rimodellamento, a causa della natura avascolare del tessuto. Il tessuto possiede quindi un limitato potenziale rigenerativo^[7, 8].

La cartilagine articolare si può dividere in:

- cartilagine ialina: ha uno spessore che varia da 1 a 4 mm in base alla posizione e all'età del soggetto^[6];
- zona calcificata: ha uno spessore che varia da 100 ai 300 μm . Ha la funzione meccanica di ancorare la cartilagine articolare all'osso subcondrale, fornendo uno strato caratterizzato da una rigidità intermedia, e facilitare il trasferimento di carico tra la cartilagine e l'osso^[3].

Nella cartilagine ialina, dalla zona superficiale alla zona profonda, si possono distinguere tre zone^[5, 9] (Figura 1.2):

- strato superficiale (lamina splendens): i condrociti sono appiattiti e le fibre di piccolo diametro corrono parallele alla superficie articolare. Lo strato ha uno spessore di circa 200 μm ;
- strato intermedio (middle zone): le fibre sono disposte in modo casuale e hanno diametro maggiore, i condrociti sono più attivi e morfologicamente più grandi e tondeggianti, lo strato ha uno spessore maggiore (circa 600 μm);
- strato profondo (deep zone): le fibre di collagene sono disposte in modo perpendicolare rispetto alla superficie articolare e lo strato ha uno spessore di circa 500 μm ^[4, 9, 10].

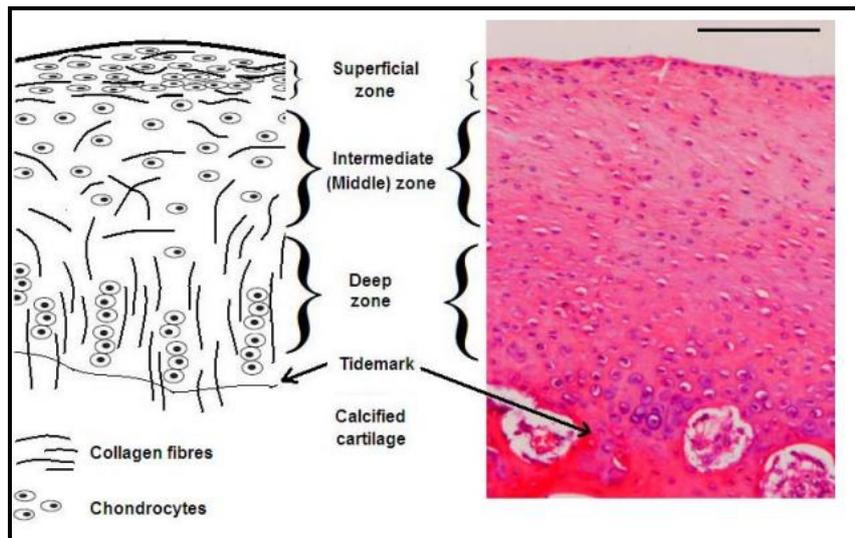


Figura 1.2: Struttura della cartilagine^[6].

Le fibre di collagene dello strato profondo penetrano attraverso il tidemark nella cartilagine calcificata in modo da garantire stabilità strutturale della cartilagine articolare sull'osso subcondrale^[6].

La cartilagine articolare è costituita prevalentemente da collagene di tipo II (95%) ma è comunque presente collagene dei tipi VI, IX, X, e XI per lo più nello strato calcificato^[9]. La struttura e la composizione della cartilagine articolare, dalle quali dipendono le proprietà meccaniche delle diverse zone, sono riassunte in Figura 1.3.

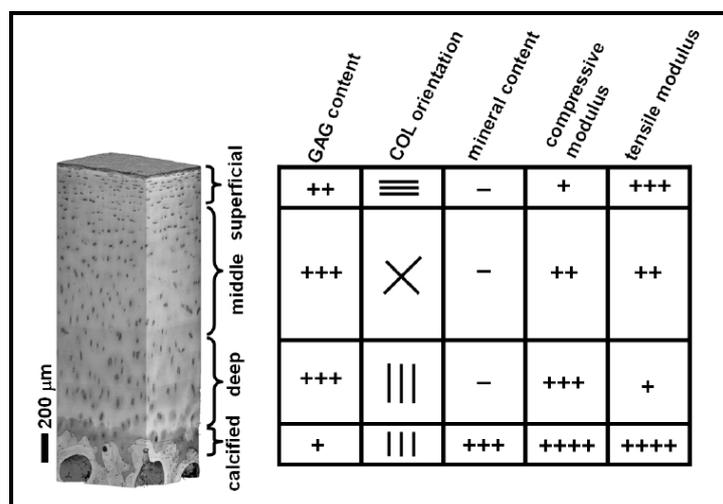


Figura 1.3: Struttura e composizione della cartilagine articolare^[3].

Il modulo a compressione dello strato superficiale, intermedio e profondo è pari a 0,079, 2,1 e 320 MPa, rispettivamente; ciò indica la notevole differenza di rigidità di questo tessuto^[11].

1.1.1.1 Il collagene

Il collagene è la principale proteina strutturale extracellulare presente nel tessuto connettivale e nel tessuto osseo, per questo è considerato il biomateriale ideale per sostituti ossei e cartilaginei. Nel tessuto connettivo, nella pelle e nelle cartilagini le fibre di collagene formano una struttura reticolata e irregolare mentre assumono conformazione ordinata nei tessuti calcificati o nei tendini. La sua funzione primaria è quella di fornire e mantenere l'integrità strutturale della matrice extracellulare. Il collagene, inoltre, gioca un ruolo importante nella riparazione dei tessuti e nel processo di riparazione delle ferite^[12].

La catena polipeptidica del collagene contiene 20 differenti amminoacidi e la precisa composizione del collagene varia nei diversi tessuti. La variazione di specifiche sequenze negli amminoacidi porta alla formazione di diversi tipi di collagene noti come tipo I, tipo II fino al tipo XIX. I più comuni tipi di collagene sono il tipo I e il tipo III che formano caratteristici fasci di fibre che si trovano in molti tessuti. Il collagene di tipo I si trova principalmente nella pelle, nei tendini e nelle ossa mentre il tipo III nei vasi sanguigni^[13].

Le fibre di collagene hanno origine dai fibroblasti del tessuto connettivo, dai condroblasti della cartilagine e dagli osteoblasti, dove avviene la sintesi del tropocollagene.

1.1.2. L'OSSO SUBCONDRALE

L'osso subcondrale è un sottile strato di osso denso e rigido collegato con la cartilagine articolare e l'osso trabecolare. È costituito da un'abbondante matrice di fibre di collagene e minerale, in particolare calcio fosfati. L'osso subcondrale ha il compito di trasmettere i carichi dalla cartilagine articolare all'osso trabecolare e corticale^[5]. È formato dalla placca ossea e da un tratto di osso

trabecolare, la cui rete vascolare fornisce il 50% del fabbisogno di nutrienti della cartilagine^[4] (Figura 1.4).

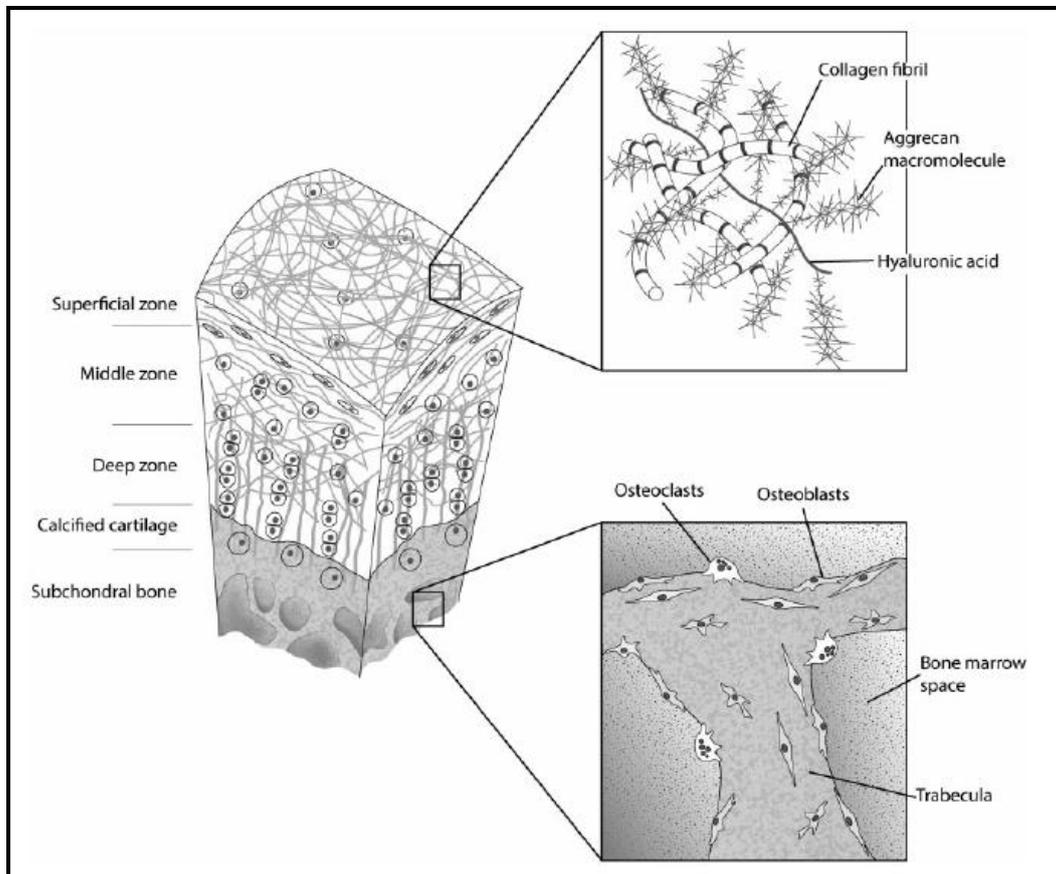


Figura 1.4: Struttura della cartilagine e dell'osso subcondrale^[1].

L'osso subcondrale, essendo un materiale 'vivo', è in grado di adattare la propria struttura in base al carico agente e alla forma dell'articolazione^[3]. Nell'osso si ha un turnover continuo che permette il processo di rimodellamento; questo processo consiste nel riassorbimento e nella formazione di nuovo osso. La frequenza di rimodellamento osseo varia in base all'influenza ormonale e alla presenza di microfratture^[2].

L'osso subcondrale ha un comportamento circa elastico il cui modulo a compressione, calcolato sul tratto lineare, risulta essere compreso tra 1 e 15 GPa mentre la distribuzione della densità dipende dalla storia di carico e dalla congruenza dell'articolazione^[5, 11].

1.1.3 INTEGRAZIONE TRA CARTILAGINE ARTICOLARE E OSSO SUBCONDRALE

Nell'articolazione la cartilagine articolare e l'osso subcondrale formano un sistema in grado di sostenere il carico e di garantire una mobilità articolare caratterizzata da un'eccellente lubrificazione, stabilità e distribuzione uniforme dei carichi^[5].

La cartilagine calcificata realizza una zona di transizione tra la cartilagine non calcificata e l'osso subcondrale^[1]; questo strato è costituito da minerale, in particolare idrossiapatite, per il 65-75% in peso^[14]. L'integrazione tra cartilagine articolare e osso subcondrale risulta essere comunque molto complessa a causa delle differenti caratteristiche chimico-fisiche e meccaniche dei due materiali che determinano un mismatch fisico-meccanico^[3, 11, 15].

Inoltre, in letteratura è riportato che la più grande causa di fallimento di un impianto osteocondrale è la scarsa integrazione tra lo scaffold e il sito d'impianto, a causa dell'accumulo di tensioni all'interfaccia^[16].

1.1.4 PROPRIETÀ DEL SISTEMA OSTEOCONDRALE

Il sistema osteocondrale, costituito da cartilagine ialina e osso subcondrale, è quindi in grado di:

- distribuire carichi statici e dinamici ripetitivi (oltre dieci volte il peso del corpo);
- proteggere l'osso spongioso da alti stress;
- migliorare le proprietà di usura sulle superfici portanti;
- garantire una superficie liscia e lubrificata con un film fluido;
- fornire un basso coefficiente di frizione;
- ridurre la pressione nominale di contatto;
- garantire la conformità dell'articolazione^[5].

1.2 L'OSTEOARTROSI

L'osteoartrosi (OA) è una malattia cronica e degenerativa dell'articolazione che coinvolge cartilagine, sinovio, legamenti, ossa, menisco (se presente), tendini e muscoli peri-articolari^[1,17,18]. L'OA può svilupparsi in ogni articolazione ma le più affette sono generalmente le articolazioni del ginocchio, dell'anca, della mano e del piede^[19] (Figura 1.5).

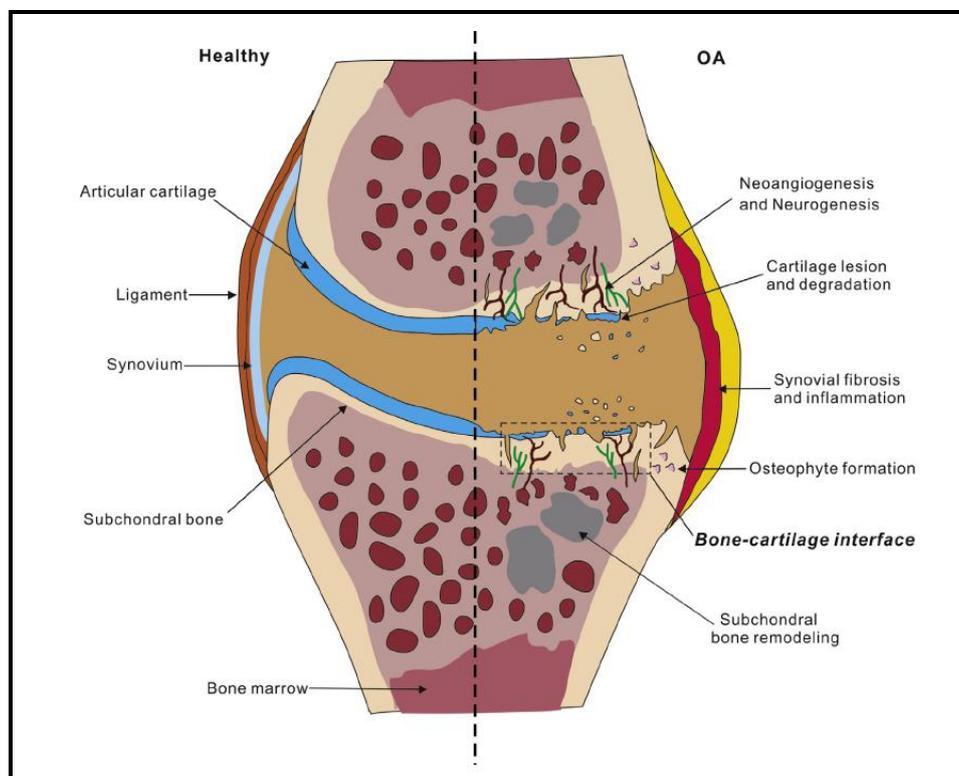


Figura 1.5: Differenza tra articolazione sana e articolazione osteoartrotica^[17].

Il numero di adulti, sopra i 60 anni, che soffre di OA equivale a circa il 10% della popolazione maschile e circa il 13% della popolazione femminile^[20]. I numeri delle persone affette sono in aumento a causa dell'invecchiamento della popolazione e dell'aumento dell'obesità e, per questo motivo ha, ed avrà, un grosso impatto sull'assistenza sanitaria e sul sistema di salute pubblica^[20, 21].

Questa patologia provoca forti dolori cronici, deformazione articolare e perdita

della mobilità articolare^[17]. L'Associazione Internazionale per lo Studio del Dolore definisce il dolore come 'una sensazione spiacevole associata con un attuale o potenziale danneggiamento tissutale'^[21]. Nel caso di OA è possibile identificare due tipi di dolore: uno intermittente e, in generale, intenso ed un altro persistente. I pazienti affetti da OA descrivono in modo differente il dolore: parlano di bruciore, formicolio e intorpidimento. Il dolore è un'esperienza soggettiva che può essere influenzata da un grande numero di fattori come la predisposizione genetica, l'aspettativa riguardo il trattamento analgesico, l'esperienza pregressa e l'ambiente socioculturale^[21].

Considerando lo scarso potenziale rigenerativo della cartilagine, dovuto all'assenza di circolazione sanguigna, il trattamento dell'osteoartrosi è uno dei più importanti problemi della chirurgia ortopedica.

Diversi fattori metabolici come l'obesità, l'abuso di alcool e il diabete ma anche fattori meccanici come l'instabilità, un trauma o il disallineamento dell'articolazione possono essere implicati nell'insorgere della patologia^[9]. Processi biologici e biomeccanici provocano l'alterazione della composizione, della struttura e delle proprietà funzionali dell'articolazione. Dato l'intimo contatto tra osso e cartilagine, l'alterazione di ognuno dei due può modulare le proprietà e le funzioni degli altri componenti (Figura 1.6).

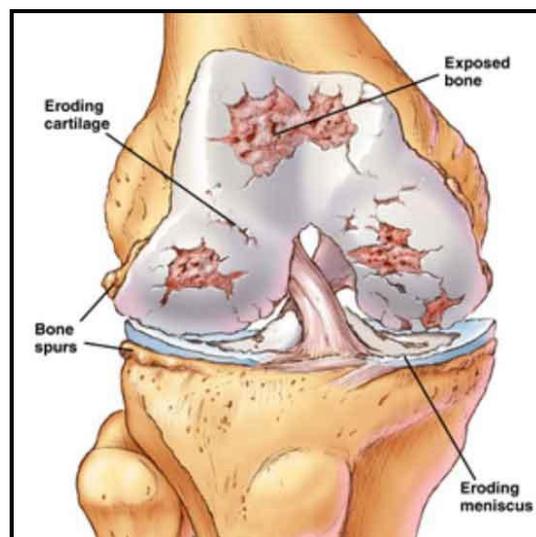


Figura 1.6: Difetti nel comparto osteocartilagineo.

Le lesioni condrali ‘iniziali’ spesso non vengono diagnosticate a causa dell’assenza di innervazione e di vascolarità^[9]. La risonanza magnetica (MRI – Magnetic Resonance Imaging) è un metodo non invasivo molto utilizzato per osservare la struttura articolare e dare risultati che possono essere comparati con metodi istologici^[2]. La MRI è in grado di rilevare le lesioni del midollo osseo (BMLs – Bone Marrow Lesions) tipicamente adiacenti alle regioni in cui è presente una sofferenza del tessuto cartilagineo (condropatia). Lesioni del midollo osseo ed infiammazioni della membrana sinoviale (sinoviti) sono comunemente associati ai sintomi legati all’osteoartrosi^[2].

Esistono diversi metodi di valutazione della severità della patologia. La classificazione di Kellgren Lawrence, ad esempio, è una scala di valutazione dell’osteoartrosi basata sulla valutazione delle radiografie standard in anteroposteriore e sotto carico bipodalico^[21]; questa scala identifica 5 gradi, in ordine crescente di gravità, considerando come parametri la riduzione dello spazio articolare, la presenza di osteofiti (escrescenze di tessuto osseo localizzate sulla superficie articolare di un osso), sclerosi e cisti^[19]:

- grado 0: non sono visibili modificazioni artrosiche;
- grado 1: dubbio restringimento dello spazio articolare e minuta formazione di osteofiti;
- grado 2: minime alterazioni del profilo marginale, formazione limitata di osteofiti e possibile restringimento dello spazio articolare;
- grado 3: moderate multiple formazioni osteofitosiche, restringimento visibile e limitato dello spazio articolare e sclerosi ossea iniziale non marcata;
- grado 4: severo restringimento dello spazio articolare con marcata sclerosi ossea, deformazione ossea visibile e ampia formazione di osteofiti.

Nella classificazione di Kellgren Lawrence viene data importanza ad alcuni dei segni radiografici presenti nel caso di osteoartrosi di ginocchio determinati dalla progressiva scomparsa della cartilagine articolare e dai tentativi naturali di

sopperire alla instabilità legamentosa ed ai movimenti incongrui relativi^[22].

Un altro metodo di valutazione della severità della patologia è la classificazione di Outerbridge^[23] che considera:

- grado 0: normale cartilagine;
- grado 1: cartilagine con rammollimento e rigonfiamento;
- grado 2: difetto caratterizzato da fessure sulla superficie che non raggiungono l'osso subcondrale o che non superano 1,5 cm di diametro;
- grado 3: fessurazione a livello dell'osso subcondrale in un'area di diametro maggiore di 1,5 cm;
- grado 4: osso subcondrale esposto.

1.2.1 ALTERAZIONI DELLA CARTILAGINE E DELL'OSSO SUBCONDRALE NELL'OSTEOARTROSI

Le variazioni osteocondrali includono la perdita di cartilagine, l'incremento dello spessore dell'osso subcondrale, la diminuzione della massa trabecolare nell'osso subcondrale, la formazione di osteofiti, il graduale sviluppo di cisti ossee e lesioni del midollo osseo (BMLs). Altre variazioni includono la duplicazione del tidemark, l'ispessimento dello strato di cartilagine calcificata, l'estensione di spaccature attraverso la cartilagine fino all'osso subcondrale, lo sviluppo di condrociti, di strutture vascolari connettive e di vasi sanguigni e sclerosi ossea negli stadi avanzati^[17, 24] (Figura 1.7).

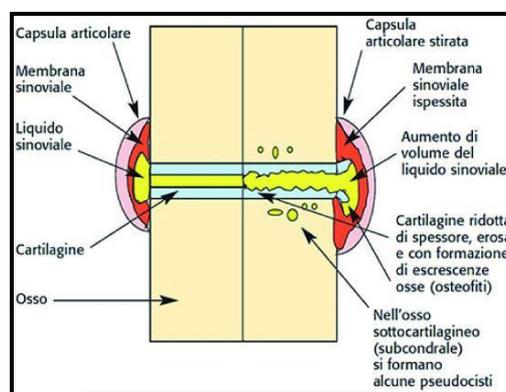


Figura 1.7: Alterazioni dovute ad osteoartrosi.

Durante la progressione della patologia la degenerazione delle proprietà del materiale e dell'integrità strutturale della cartilagine articolare possono essere causate da un'associazione di cambi nella composizione molecolare della matrice extracellulare^[17].

Il rimodellamento dell'osso subcondrale è l'inizio di un'anormale distribuzione dei carichi; ciò comporta la formazione e la degradazione di matrice ossea, da parte di osteoblasti e osteoclasti. Gli osteoblasti e gli osteoclasti sono, rispettivamente, le cellule responsabili dei processi anabolici e catabolici nell'osso; i condrociti, invece, hanno il compito di preservare l'omeostasi nella cartilagine. C'è una forte comunicazione biologica tra gli osteoblasti e gli osteoclasti dell'osso subcondrale e i condrociti della cartilagine^[24].

L'osteoartrosi è associata ad una precoce perdita ossea, dovuta all'incremento del rimodellamento osseo, seguita da una densificazione della placca subcondrale e alla completa perdita della cartilagine. L'elevato rimodellamento osseo e la stimolazione della vascolarità associata è indispensabile per la progressione dell'OA^[17]. Nei primi stadi dell'OA il rimodellamento osseo e la perdita di osso subcondrale sono elevati. L'incremento della frequenza del rimodellamento osseo può causare l'alterazione della forma dell'articolazione e della trasmissione dei carichi; ciò può portare alla progressiva perdita della cartilagine (Figura 1.8).

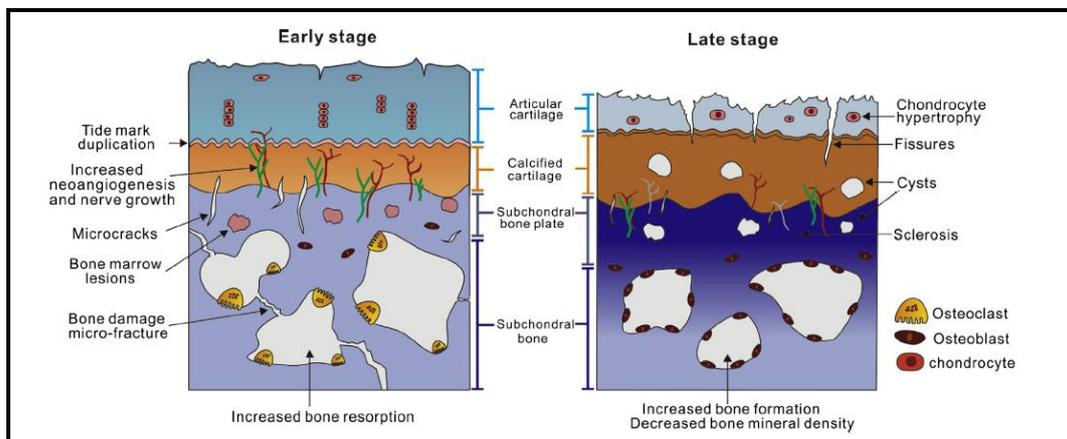


Figura 1.8: Differenze tra principio di osteoartrosi e osteoartrosi avanzata^[17].

Le lesioni osteocondrali, che coinvolgono sia la cartilagine che l'osso subcondrale, tipicamente portano alla formazione di fibrocartilagine che ha proprietà biomeccaniche differenti rispetto alla cartilagine nativa e non è in grado di proteggere l'osso subcondrale da ulteriori degenerazioni^[7].

1.2.2. PROCESSI MOLECOLARI

In caso di OA i condrociti articolari incrementano la sintesi delle molecole della matrice ma contribuiscono anche alla sua distruzione sintetizzando citochine proinfiammatorie, compresa l'interleuchina (IL-1), ed enzimi in grado di degradare localmente la matrice extracellulare come metalloproteasi (MMPs) e metalloproteasi con trombospondina (ADAMTS).

Vasti cambi cellulari sono accompagnati dall'incremento dell'espressione di molecole collegate all'ipertrofia dei condrociti e alla differenziazione terminale, come fattori di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF) e MMP13.

I BMLs sono indicatori della progressione dell'OA e sono considerati un importante fattore di rischio per il deterioramento strutturale. La localizzazione dei BMLs è associata ad aree in cui si ha un'importante perdita di cartilagine nella superficie articolare sovrastante e rilevano necrosi e fibrosi midollari associate con microfratture dell'osso trasecolare^[17].

1.3 OPZIONI TERAPEUTICHE

Per il trattamento dell'OA, e quindi di difetti della cartilagine articolare, possono essere impiegate sia tecniche non-operative che tecniche operative. Lo scopo primario di tutte le modalità di trattamento è quello di ridurre il dolore e ristabilire la funzionalità dell'articolazione.

Le tecniche non operative includono perdita di peso, fisioterapia muscolare, iniezione di steroidi, condroitin solfato per via orale^[25, 26], iniezione di acido ialuronico e somministrazione di FANS (farmaci anti-infiammatori non

steroidi). L'idea che la somministrazione di glucosammine o condroitin solfato potesse avere effetti terapeutici nel trattamento dell'osteoartrosi, fornendo un substrato per i processi riparativi della cartilagine, risale alla fine del 1960. Questi composti sono naturalmente presenti nel corpo e possono essere coinvolti nella riparazione e nel mantenimento della normale cartilagine. Alcuni studi indicano che questi sono assorbiti dal tratto gastrointestinale e pare siano in grado di incrementare la sintesi dei proteoglicani nella cartilagine articolare. Il condroitin solfato può incrementare la sintesi di mRNA dei condrociti e può ridurre la degradazione di collagene e di proteoglicani nella cartilagine. Sia le glucosammine che il condroitin solfato sono stati testati come trattamenti per l'osteoartrosi in numerosi casi, molti dei quali hanno dimostrato un effetto positivo^[27]. Tuttavia con questi trattamenti, che risultano essere conservativi e non invasivi, non viene restaurato il danno strutturale dell'articolazione: rappresentano solamente misure palliative per ridurre i sintomi della patologia prima di ricorrere a tecniche chirurgiche^[1, 28].

Nella grande maggioranza dei casi i trattamenti chirurgici per l'osteoartrosi vengono presi in considerazione solo dopo il fallimento dei trattamenti non chirurgici^[29].

Si possono considerare quattro categorie di procedure chirurgiche mini-invasive:

- debridement;
- tecniche di stimolazione del midollo osseo: micro e nanofratture;
- tecniche di sostituzione della cartilagine: OAT, mosaicoplastica e allograft;
- tecniche di rigenerazione della cartilagine: ACI, MACI e biomateriali biomimetici^[9, 30].

Quando l'articolazione è irreversibilmente danneggiata si sostituisce l'intera articolazione con una protesi (artroplastica). Questa chirurgia trova la massima applicazione nel caso di lesioni degenerative articolari^[27].

In ogni caso la riparazione di difetti condrali e osteocondrali rimane sotto intensa investigazione e la scelta della tecnica chirurgica va personalizzata in base al paziente.

1.3.1 DEBRIDMENT

Debridement/shaving della cartilagine è il più diffuso trattamento chirurgico di lesioni cartilaginee (67% di tutte le procedure) seguito dalle micro e nanofratture (33%) (BioMed GPS “Cartilage Replacement Market 2015”). Questa tecnica prevede la rimozione di tessuti morti, danneggiati o infetti al fine di migliorare il potenziale di guarigione del restante tessuto sano.

1.3.2 TECNICHE DI STIMOLAZIONE DEL MIDOLLO OSSEO

Le micro o nanofratture, che fanno parte delle tecniche di stimolazione del midollo osseo, comportano la penetrazione dello strumento nella cartilagine articolare fino all'osso subcondrale; ciò permette alle cellule staminali, alle piastrine e ad altri fattori di prender parte al processo di riparazione. Il sanguinamento dell'osso subcondrale permette la formazione di comunicazioni vascolari col midollo osseo dal quale vengono rilasciate cellule staminali mesenchimali pluripotenti (MSCs)^[12].

La tecnica delle microfratture viene adottata per lesioni condrali inferiori a 2-3 cm di diametro^[6]. Questa tecnica induce una risposta nella cartilagine articolare erosa inducendo un danno nell'osso subcondrale, fori di circa 0,5-1 mm di diametro che inducono la proliferazione delle cellule staminali mesenchimali^[6, 31]. La tecnica delle microfratture è ampiamente utilizzata nella clinica ed è dimostrato che permette un miglioramento funzionale nel breve periodo^[6]. Il tessuto di riparazione può essere in grado di riempire il difetto; tuttavia sarà caratterizzato da proprietà istologiche e biomeccaniche differenti rispetto a quelle della cartilagine ialina: si avrà, infatti, una minore stabilità nella compressione e nella distribuzione delle forze^[9]. Studi sul medio e lungo periodo hanno rilevato

una limitata formazione di tessuto cartilagineo in confronto ad altre tecniche come l'impianto di condrociti autologhi^[6].

L'utilizzo delle microfratture può essere utilizzato in combinazione con l'impianto di uno scaffold; ciò favorisce l'accesso del midollo osseo nelle cavità dello scaffold stesso^[6].

In Figura 1.9 è possibile vedere a sinistra la rimozione della cartilagine danneggiata, al centro lo strumento utilizzato per forare l'osso subcondrale e a destra la risposta del tessuto e la formazione di nuova cartilagine.

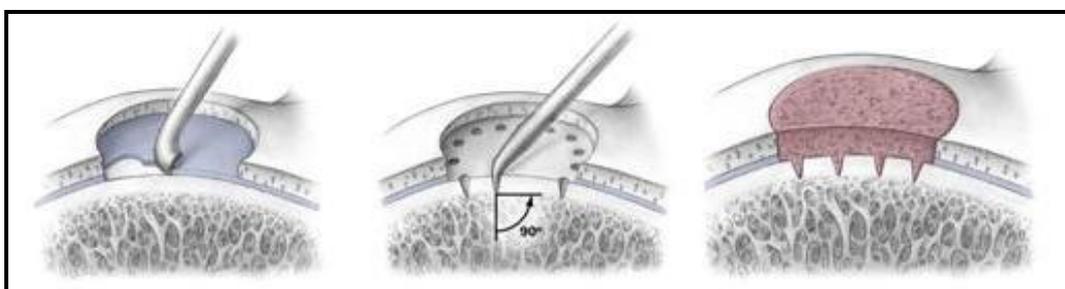


Figura 1.9: Tecniche di stimolazione del midollo osseo – microfratture^[32].

1.3.3 TECNICHE DI SOSTITUZIONE DELLA CARTILAGINE

Le tecniche di sostituzione della cartilagine includono l'autotrapianto di condrociti (OAT), la mosaicoplastica e l'impianto di allograft.

1.3.3.1 Autotrapianto di condrociti e mosaicoplastica

La tecnica che prevede l'autotrapianto di condrociti (OAT), introdotta dal 1990, viene generalmente utilizzata in pazienti con lesioni comprese tra i 2 e i 3 cm di diametro^[6, 7]. Gli osteociti vengono raccolti da una zona laterale dell'articolazione e posti nella regione in cui è presente il difetto. La limitazione all'impiego di questa tecnica è data dalla dimensione della superficie di raccolta; ciò ha portato allo sviluppo della mosaicoplastica: con questa tecnica è possibile raccogliere diversi piccoli innesti circolari da una zona periferica (che non è soggetta al carico) ed impiantarli, come in un mosaico, nel sito dove è presente il

difetto^[33]. A causa dei multipli impianti si ottiene una superficie articolare irregolare (Figura 1.10). Questa procedura non ha limiti definiti dalle dimensioni del difetto e dalla localizzazione ma, essendo una tecnica complessa, la mosaicoplastica risulta essere poco utilizzata^[9, 33].

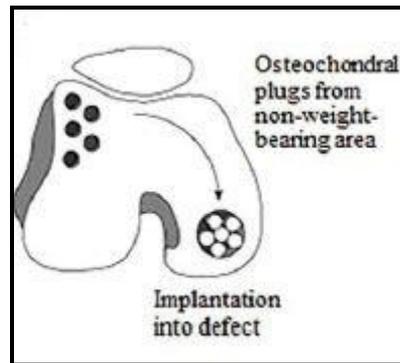


Figura 1.10: Mosaicoplastica^[12].

1.3.3.2 Allograft

Gli allograft osteocondrali sono spesso utilizzati in situazioni post-traumatiche a seguito di fratture periarticolari nei casi in cui ci sia un significativo deficit osseo o dopo il fallimento di altre tecniche^[7, 34]. Nel caso di ampie lesioni condrali trattamenti come le microfratture, l'impianto di condrociti autologhi (ACI) o il trasferimento di autograft possono essere inadeguati. Il maggior vantaggio nell'uso di allograft è la disponibilità sia della cartilagine articolare che dell'osso subcondrale^[34]. Sin dal primo tentativo di trapianto osteocondrale sia studi clinici che su animale hanno mostrato che il trapianto di cartilagine proveniente da cadavere è possibile^[35]. Storicamente gli innesti erano impiantati entro 24 ore dalla raccolta ma le preoccupazioni riguardo alla trasmissione di malattie hanno portato ad effettuare l'impianto dopo un minimo di 14 giorni per poter eseguire test aerobici, anaerobici, formazione di batteri e test virali. Sfortunatamente è noto che la vitalità dei condrociti diminuisce negli allograft mantenuti per più di 14 giorni. È inoltre noto che gli allograft congelati hanno proprietà biologiche e biomeccaniche inferiori se comparati con gli allograft freschi. La prassi, comunque, prevede l'impianto dai 24 giorni dopo la raccolta^[34].

1.3.4 TECNICHE DI RIGENERAZIONE DELLA CARTILAGINE

Per lesioni osteocondrali maggiori di 2.5 cm di diametro vengono utilizzate cellule con potenziale condrogenico o impianti osteocondrali^[7].

1.3.4.1 Impianto di condrociti

La pratica più usata per la rigenerazione cartilaginea prende il nome di ‘impianto di condrociti autologhi’ (ACI – Autologous Chondrocyte Implantation), introdotta clinicamente nel 1987^[6]. L’ACI comporta la raccolta di cartilagine normale da una zona laterale dell’articolazione. I condrociti vengono, poi, espansi in vitro e successivamente impiantati nel difetto condrale^[8]. Lo scopo è quello di impiantare condrociti nel difetto cartilagineo in modo tale da favorire la produzione di cartilagine articolare. È preferibile adottare questa tecnica su pazienti giovani che non abbiano instabilità dei legamenti o altre patologie nel distretto. L’ACI è una tecnica che prevede due step, richiede più tempo e costi maggiori rispetto l’OAT. Nel caso di ACI, inizialmente è necessario effettuare un’artroscopia per valutare la lesione. Vengono così effettuate diverse biopsie condrali della cartilagine articolare del sito di raccolta e il campione viene portato in laboratorio dove i condrociti vengono isolati mediante processo enzimatico. I condrociti sono mantenuti in coltura per tre o quattro settimane, finché il loro volume non aumenta di 30 volte. Tipicamente dopo sei settimane dalla prima chirurgia viene messo in atto il secondo step della tecnica: la coltura di condrociti viene iniettata sotto il flap (raccolto tipicamente dalla tibia) che viene stabilizzato con colla di fibrina^[8, 36] (Figura 1.11).

Un anno dopo l’impianto il nuovo tessuto, simile alla cartilagine, copre tipicamente circa il 70% del difetto. Questa tecnica può essere usata per riparare difetti riguardanti la cartilagine articolare ed è in grado di ripristinare la funzione dell’articolazione formando, in modo predominante, tessuto contenente collagene di tipo II^[36].

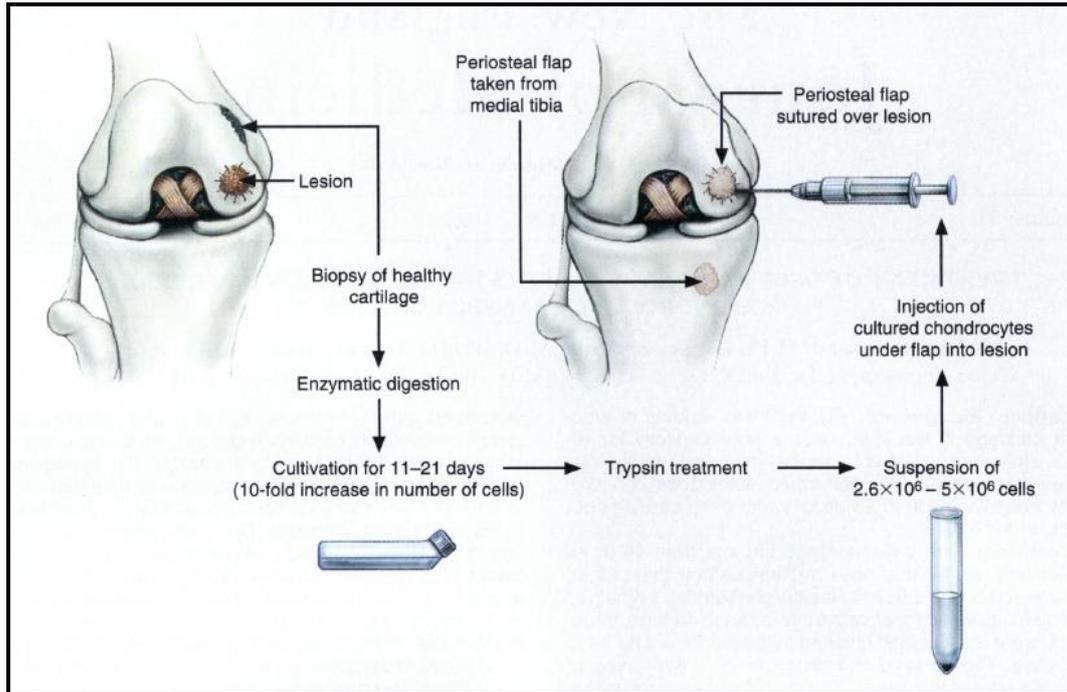


Figura 1.11: Tecnica ACI^[36].

Un'altra tecnica di rigenerazione cartilaginea prende il nome di MACI (Matrix Autologous Chondrocyte Implantation) cioè 'impianto di matrice con condrociti autologhi'. Questa tecnica prevede la coltura dei condrociti in uno scaffold tridimensionale biocompatibile che verrà impiantato nel difetto cartilagineo. Lo scaffold è tipicamente costituito da biomateriali sintetici e deve essere poroso in modo tale da permettere la migrazione delle cellule e dei nutrienti^[5]. Anche il MACI richiede la raccolta dei condrociti dall'articolazione nativa. Lo scaffold caricato di condrociti viene direttamente applicato al difetto e stabilizzato con colla di fibrina ed eventualmente punti di sutura, se il difetto è esteso (Figura 1.12). Questa procedura può essere effettuata con miniartrotomia o artroscopia. I maggiori svantaggi, rispetto all'utilizzo di allograft o di biomateriali biomimetici, sono legati al costo e al fatto che questo tipo di impianto permette la sostituzione solamente dello strato cartilagineo e non dello strato mineralizzato.

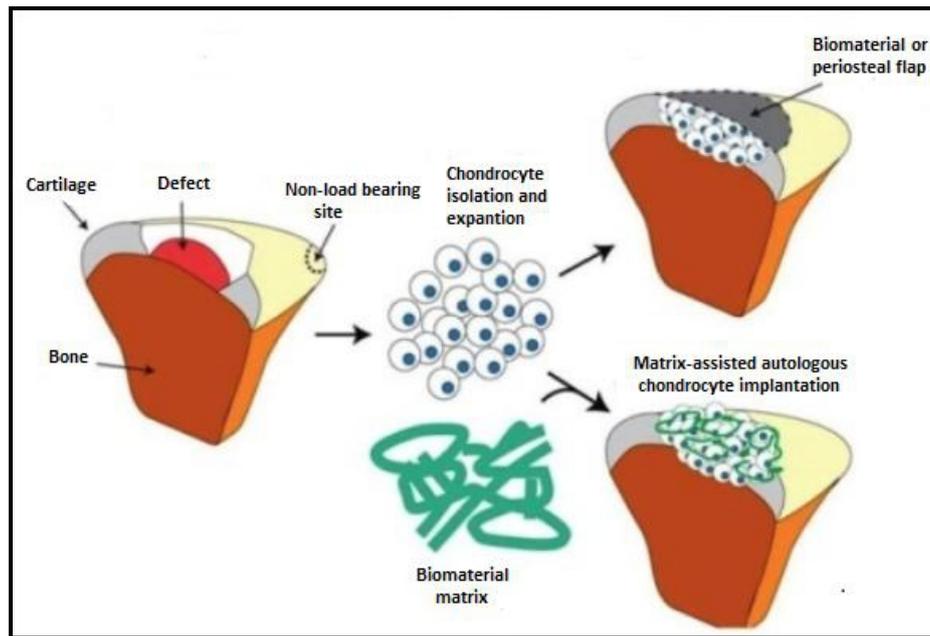


Figura 1.12: Tecnica MACI.

1.3.4.2 Biomateriali biomimetici

Il processo rigenerativo di una lesione osteocondrale è favorito dalla presenza di biomateriali che presentano caratteristiche chimiche e strutturali simili al tessuto naturale^[37]. Il materiale deve mimare l'ambiente 3D della matrice extracellulare (ECM), fornire supporto strutturale, essere biocompatibile e offrire un incremento del rapporto tra area superficiale e volume per permettere la migrazione cellulare, l'adesione e guidare la differenziazione di cellule in senso condrogenico e osteogenico^[7, 29, 12]. L'osso e la cartilagine hanno tuttavia proprietà chimico-fisiche completamente differenti, come descritto nel paragrafo 1.1. La differente composizione di osso e cartilagine porta ad ottenere un'interfaccia complessa tra i due tessuti e rende difficile il design e la fabbricazione di scaffold osteocondrali^[11]. Date le evidenti differenze tra la struttura gerarchica della cartilagine e dell'osso sono stati introdotti scaffold multilayer con proprietà controllate in ogni layer affinché ognuno riproducesse il microambiente del tessuto osteocondrale. Sono stati utilizzati approcci bifasici e trifasici che presentano due o tre differenti architetture e materiali^[12]. Uno scaffold bilayer permette la creazione di un ambiente biologico in entrambi i

layer con diverse proprietà meccaniche, strutturali e chimiche; in ogni layer può mimare la matrice extracellulare del tessuto da sostituire in modo indipendente^[11].

La crescita cellulare e la successiva rigenerazione tissutale dipendono in parte dalle caratteristiche e dalla porosità dello scaffold^[7]. Risultati di diversi studi illustrano che il controllo della dimensione dei pori, il cui diametro deve risultare maggiore di 100 μm , e della loro interconnessione è un modo efficace per migliorare la rigenerazione del difetto osteocondrale^[30]; in particolare la presenza di una rete interconnessa di pori è una caratteristica importante per la migrazione cellulare e l'ancoraggio dello scaffold nel sito d'impianto^[30].

Le proprietà dello scaffold dipendono prima di tutto dalla natura del biomateriale e dal processo di fabbricazione. I materiali utilizzati possono essere costituenti della matrice extracellulare, come collagene e acido ialuronico, proteine e polimeri naturali, come la fibrina, l'agarosio, l'alginato e il chitosano, o polimeri sintetici, come l'acido polilattico, il policaprolattone e l'acido poliglicolico^[29].

I materiali naturali, spesso di origine animale, forniscono un ambiente fisiologico per l'adesione cellulare e la proliferazione. Sono biocompatibili, biodegradabili e hanno la capacità di mimare la chimica della matrice extracellulare originaria facilitando l'adesione cellulare, la migrazione, la differenziazione e la deposizione di ECM. Questi materiali hanno tuttavia diversi svantaggi quali la variabilità tra lotto e lotto, il costo e la difficile lavorabilità. Sono, inoltre, meccanicamente deboli appena impiantati e subiscono una rapida degradazione se non sono cross-linkati con gli appropriati reagenti chimici^[7, 12, 38, 39]. Tra i materiali citati assume particolare importanza in questo lavoro di tesi il collagene; questo può essere utilizzato come biomateriale per la riparazione tissutale permettendo una migliore interazione con il tessuto ospite^[11] ma è caratterizzato da una scarsa resistenza meccanica e una rapida degradazione. È comunque possibile aumentare i tempi di degradazione del materiale utilizzando metodi di crosslinking chimico; diversi agenti chimici sono stati studiati a questo scopo:

- gluteraldeide (GA): reagente bifunzionale che si lega ai gruppi amminici. È il reagente maggiormente utilizzato per il crosslink del collagene ma è associato a citotossicità, in vitro e in vivo, dovuta alla presenza di gruppi funzionali che non hanno reagito o al rilascio di questi gruppi durante la degradazione enzimatica del biomateriale crosslinkato;
- 1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide (ECD): viene utilizzato per creare legami peptidici nel biomateriale. L'utilizzo di ECD, associato ad N-hydroxysuccinimide (NHS), per crosslinkare il collagene porta ad una buona biocompatibilità, ad un alto potenziale di differenziazione cellulare e ad una buona resistenza alla degradazione enzimatica^[39];
- 1,4-butanediol diglycidyl ether BDDGE: è in grado di reagire con gruppi acidi e amminici a seconda del valore di pH della soluzione; in particolare avendo un gruppo funzionale epossido reagisce con i gruppi amminici delle lisine presenti nel collagene^[13].

I materiali sintetici sono largamente utilizzati nel campo dell'ingegneria dei tessuti grazie alla loro semplicità di produzione e modellazione e alla possibilità di controllo delle proprietà chimiche, meccaniche e strutturali^[7, 11]. La problematica relativa all'utilizzo di materiali sintetici riguarda il processo di degradazione in vivo: la reazione di idrolisi causa una riduzione del pH e una possibile risposta infiammatoria^[7]. La maggior parte dei polimeri sintetici è idrofobica e quindi possiede una bassa bioattività in confronto ai polimeri naturali. Per superare questo problema sono spesso utilizzate miscele di polimeri idrofobici e idrofilici per aumentare l'idrofilicità^[12].

Classici metodi utilizzati per il fissaggio dello scaffold includono suture, perni biodegradabili e colla^[29, 30]. Recenti studi hanno portato ad una nuova tecnica di fissaggio che sfrutta la forza magnetica prevenendo dislocazioni macroscopiche dello scaffold e micromovimenti tra lo scaffold e il tessuto^[30].

1.4 MAIOREGEN[®]

Lo scaffold Maioregen[®] (Fin-Ceramica Faenza S.p.A.) è un materiale poroso, nanostrutturato e biomimetico costituito da 3 layer, che mimano l'anatomia del comparto osteocondrale^[40] (Figura 1.11).

Lo scaffold, composto da collagene di tipo I e idrossiapatite sostituita con magnesio (Mg-HA), ha lo scopo di riprodurre la morfologia della cartilagine e dell'osso subcondrale^[41]. Lo strato cartilagineo, che forma una superficie liscia ma porosa, è composto al 100% da collagene di tipo I; lo strato intermedio (tidemark) è costituito dal 60% in peso di collagene e dal 40% in peso di idrossiapatite; lo strato inferiore, invece, è costituito dal 30% in peso da collagene e dal 70% in peso di idrossiapatite per ricreare uno strato simile alla cartilagine calcificata^[40, 42, 43] (Figura 1.13).

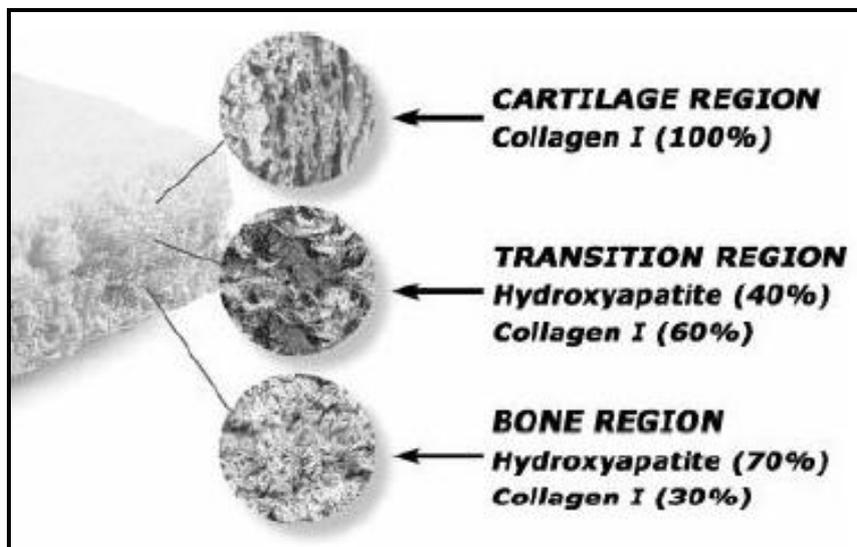


Figura 1.13: Composizione dello scaffold Maioregen[®]^[11].

1.4.1 LO STRATO COLLAGENICO

Il collagene di tipo I utilizzato in questo lavoro di tesi è collagene equino estratto dal tendine d'Achille, purificato mediante idrolisi acida e basica e controllato con trattamenti enzimatici. L'utilizzo di collagene equino non comporta rischi di

infezione, tipici del collagene di tipo bovino^[39]. Grazie ai processi di preparazione e purificazione nessun componente non-collagenico resta a far parte del materiale altamente purificato^[39].

1.4.1.1 Il processo di biomineralizzazione

L'idrossiapatite è un minerale che fa parte del gruppo delle apatiti. Nel singolo cristallo di idrossiapatite gli ioni Ca^{2+} e $(\text{PO}_4)^{3-}$ sono disposti in struttura a simmetria esagonale, attorno a colonne di OH^- (Figura 1.14). La formula dell'idrossiapatite risulta pertanto:

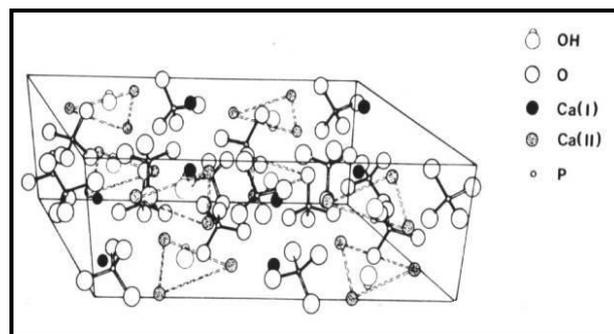


Figura 1.14: Struttura chimica dell'idrossiapatite.

L'idrossiapatite stechiometrica (HA) ha una struttura piuttosto stabile. Riuscendo a creare legami chimici direttamente con l'osso, risulta essere un materiale biocompatibile, non tossico e con proprietà molto simili a quelle del tessuto osseo. Nei tessuti biologici la composizione chimica è molto più complessa in quanto si osservano sostituzioni cationiche e anioniche che ne modificano la struttura cristallina, conferendo maggiore solubilità e bioattività al materiale. Ne consegue che l'apatite biologica non è un materiale stabile ma è soggetta a continui cambiamenti; quest'ultima caratteristica facilita il rimodellamento e la crescita ossea. Tra le sostituzioni più importanti da un punto di vista biologico, gli ioni Ca^{2+} possono essere sostituiti da altri cationi bivalenti come Mg^{2+} e Sr^{2+} .

In particolare il magnesio è associato al primo stato della formazione ossea e decresce con incremento della calcificazione e con l'invecchiamento dell'individuo.

In questo lavoro di tesi è stata utilizzata la magnesio apatite (Mg-HA) nella realizzazione dello strato mineralizzato. La nucleazione dei cristalli di idrossiapatite avviene sulle fibre nella fase di precipitazione del collagene. La presenza del magnesio incrementa la cinetica di nucleazione dell'HA sulle fibre del collagene ma ritarda la sua cristallizzazione: si vengono così a creare piccoli granuli (< 20 nm) e si ha un incremento della biodisponibilità della fase minerale. Per questa ragione la concentrazione del magnesio è più alta nella cartilagine e nell'osso giovane piuttosto che nei tessuti maturi^[44].

1.4.1.2 Efficacia nella rigenerazione di difetti osteocondrali

La capacità dello scaffold di supportare la rigenerazione ordinata del tessuto osteocondrale senza alcuna semina cellulare porta il prodotto ad essere una buona alternativa come procedura chirurgica one-step^[45, 41]. Test in vivo in modello ovino, mostrano la crescita di osso trabecolare e la formazione di tessuto fibrocartilagineo nel sito d'impianto^[7]. La procedura rigenerativa, infatti, è in grado di ripristinare la superficie del danno articolare ottenendo un tessuto integrato con buoni risultati clinici^[43].

Nella procedura chirurgica attuale, che interessa unicamente l'articolazione del ginocchio, l'impianto viene effettuato con il paziente sotto anestesia in posizione supina. Durante l'operazione viene rimosso l'osso subcondrale sclerotico e viene creata una cavità di circa 8 mm con una sporgenza stabile nel sito d'impianto. La lesione viene modellata con un foglio d'alluminio in modo da ottenere le dimensioni esatte dell'impianto che poi sarà fissato con la tecnica del press-fit^[43] (Figura 1.15).

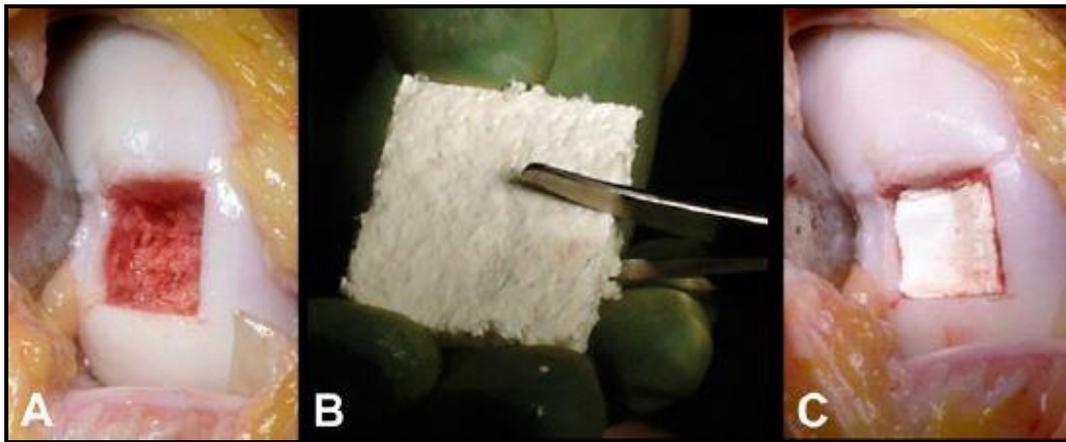


Figura 1.15: Impianto di uno scaffold osteocondrale. A) la preparazione del difetto, B) il taglio dello scaffold, C) l'impianto con tecnica press-fit^[45].

La stabilizzazione dell'impianto viene testata mediante flessioni ed estensioni del ginocchio e già dal secondo giorno postoperatorio inizia la mobilitazione del ginocchio stesso^[43].

1.5 SCOPO DEL LAVORO DI TESI

Lo scopo di questo lavoro di tesi è quello di realizzare un biomateriale bilayer che favorisca la rigenerazione della cartilagine articolare nel trattamento dei difetti condrali focali, principalmente di grado III (full thickness) della classificazione Outerbridge, in assenza quindi di danno o lesione del tessuto osseo sub condrale (Figura 1.16).

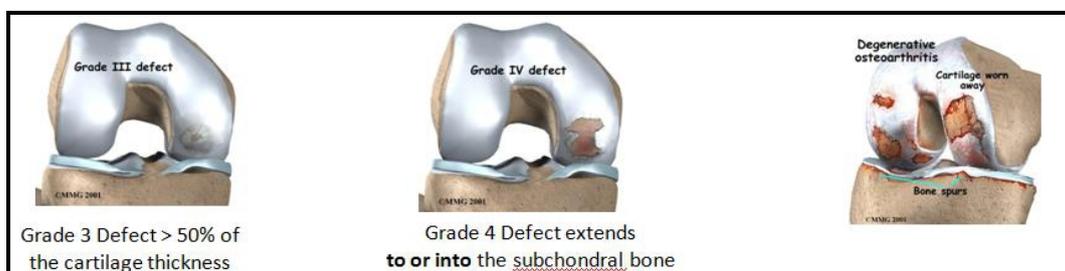


Figura 1.16: Difetti interessati dal nuovo scaffold.

Il nuovo prodotto, Maioregen Ultraslim, sarà impiegato quindi per il trattamento di lesioni meno severe rispetto a quelle che interessano il prodotto Maioregen[®].

Lo scaffold dovrebbe essere in grado di coordinare il processo rigenerazione di difetti condrali, promuovendo la formazione di cartilagine ialina o ‘hyaline like’, ben integrata con l’osso subcondrale. Per questo motivo, il biomateriale sarà costituito da due strati:

- strato di collagene di spessore pari a 2 mm;
- strato di collagene biomineralizzato con idrossiapatite (60% in peso di collagene, 40% in peso di idrossiapatite) con spessore di circa 0,5 mm.

Lo spessore massimo dello scaffold dovrà essere di 2,5 mm e deve essere garantita una buona adesione tra gli strati tale da non permettere delaminazione né durante la fase d’impianto né nel post-operatorio.

Per quanto riguarda la degradazione deve essere assicurata permanenza in situ di almeno sei mesi dopo l’impianto.

Il prodotto, inoltre, dovrà essere impiantabile in chirurgia aperta o mini-invasiva (artroscopia e/o ‘mini arthrotomy arthroscopically assisted’). La procedura chirurgica dovrà garantire la stabilità dello scaffold nel sito d’impianto e prevederà, inoltre, l’utilizzo di tecniche di stimolazione midollare che promuoveranno la rigenerazione tissutale.

Questo lavoro di tesi mi ha vista impegnata nel processo di sviluppo e caratterizzazione del prodotto Maioregen Ultraslim. In particolare, l’attenzione è stata rivolta all’ottimizzazione del processo di reticolazione e di stesura degli strati, al fine di realizzare un prodotto con caratteristiche adeguate all’impianto in caso di lesioni cartilaginee.

CAPITOLO 2:

MATERIALI E METODI

In questo capitolo verranno illustrate le criticità e le strategie utilizzate nella realizzazione dello scaffold ultraslim. Verranno descritte con maggior dettaglio le fasi oggetto di ottimizzazione (reticolazione e stesura) e i metodi impiegati nella caratterizzazione.

2.1 SPECIFICA DI PRODOTTO

Il processo di sviluppo del nuovo prodotto è partito dalla definizione delle specifiche, ossia delle caratteristiche essenziali alla funzionalità per l'uso clinico previsto: trattamento di lesioni condrali focali (principalmente di grado III secondo la classificazione di Outerbridge) di origine traumatica o microtraumatica.

Il prodotto deve fornire supporto, agendo come scaffold temporaneo, per la rigenerazione del tessuto cartilagineo. La procedura chirurgica deve garantire la stabilità dello scaffold nel sito d'impianto e prevede l'utilizzo di tecniche di stimolazione midollare (microfratture, nanofratture, drilling) per assicurare sufficiente apporto di cellule midollari (bone marrow stem cells) allo scopo di promuovere la rigenerazione tissutale. Il prodotto è composto da due strati che mimano la chimica e la microstruttura della cartilagine articolare e calcificata. Lo spessore massimo dello scaffold idratato dovrà essere di 2,5 mm.

Il prodotto deve garantire una buona integrazione e coesione tra gli strati, tale da non permettere delaminazione né durante la fase di impianto né nel post-operatorio.

Per il prodotto Maioregen Ultraslim sono state valutate, quindi, le diverse specifiche; in Tabella 2.1 sono riassunti i metodi impiegati per il controllo della specifica in fase di ottimizzazione del prodotto.

Specifiche valutate	Metodo di controllo utilizzato
Biomimesi	<ul style="list-style-type: none"> • Microscopio elettronico a scansione; • Analisi termogravimetrica; • Test di swelling.
Rischio di delaminazione	<ul style="list-style-type: none"> • Analisi visiva.
Spessore dello scaffold	<ul style="list-style-type: none"> • Test di swelling con DMEM; • Test di swelling con sangue.
Tempi di degradazione	<ul style="list-style-type: none"> • Degradazione enzimatica; • Grado di reticolazione.
Shelf life (contenuto d'acqua)	<ul style="list-style-type: none"> • Analisi termo gravimetrica.
Impiantabilità	<ul style="list-style-type: none"> • Test d'impiantabilità.
Possibilità di taglio	<ul style="list-style-type: none"> • Test con pressa idraulica e fustella; • Test con forbici.

Tabella 2.1: Specifiche richieste e metodi di controllo utilizzati.

2.2 PROCESSO DI REALIZZAZIONE DELLO SCAFFOLD

Il processo di produzione si basa sulla tecnologia sviluppata per il prodotto Maioregen[®] attualmente in commercio. La sintesi prevede la sovrapposizione e la liofilizzazione di due strati, costituiti da collagene e collagene biomineralizzato, di opportune dimensioni. Le fasi principali sono riassunte in Figura 2.1.

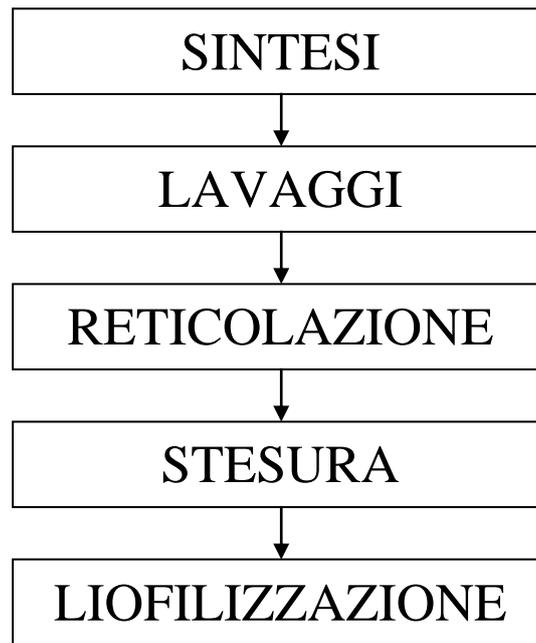


Figura 2.1: Principali fasi per la realizzazione dello scaffold.

2.2.1 SINTESI

Il collagene utilizzato nella sintesi è estratto da tendine equino (Opocrin Spa, Modena). Nella preparazione del primo strato, il gel di collagene viene precipitato del punto isoelettrico del collagene, cioè ad un pH compreso tra 5,5 e 6. Per quanto riguarda il secondo strato, la formazione dei cristalli di idrossiapatite avviene dalla reazione tra acido fosforico e calcio idrossido^[46] durante la precipitazione delle fibre di collagene (Figura 2.2). Il processo descritto, che prende il nome di nucleazione, permette al cristallo di idrossiapatite di coordinarsi con i gruppi funzionali presenti nella fibra di collagene. La crescita del cristallo avviene all'interno e sulla superficie delle fibre di collagene.



Figura 2.2: Reazione acido-base.

2.2.2 LAVAGGI

Le fasi di lavaggio previste per entrambi gli strati sono necessarie per rimuovere i reagenti che non hanno preso parte alla reazione e i prodotti in eccesso, quindi per eliminare il materiale di scarto. Il metodo di lavaggio utilizzato è il risultato di un processo di validazione sviluppato all'interno dell'Azienda.

In Figura 2.3 è possibile vedere un'immagine del lavaggio e del filtraggio dello strato collagenico (primo strato).



Figura 2.3: Lavaggio e filtraggio dello strato cartilagineo.

In Figura 2.4 è, invece, possibile vedere il lavaggio e il filtraggio del secondo strato, cioè lo strato mineralizzato.



Figura 2.4: Lavaggio e filtraggio dello strato mineralizzato.

2.2.3 RETICOLAZIONE

La reticolazione è un processo mediante il quale le catene polimeriche vanno incontro ad una reazione che crea dei legami fra diverse catene a livello di gruppi funzionali reattivi. Con la formazione di legami covalenti tra i gruppi amminici della lisina le proprietà chimico-fisiche del polimero subiscono delle variazioni: si ha la stabilizzazione del polimero e un aumento dei tempi di degradazione.

Come agente reticolante, in questo lavoro di tesi, è stato utilizzato il BDDGE (1,4-Butanediol diglycidyl ether). I gruppi epossidi di questo reagente sono in grado di reagire sia con i gruppi amminici che carbossilici^[13]. La reazione che si ha tra i gruppi amminici presenti nel collagene e il crosslinkante è rappresentata in Figura 2.5.

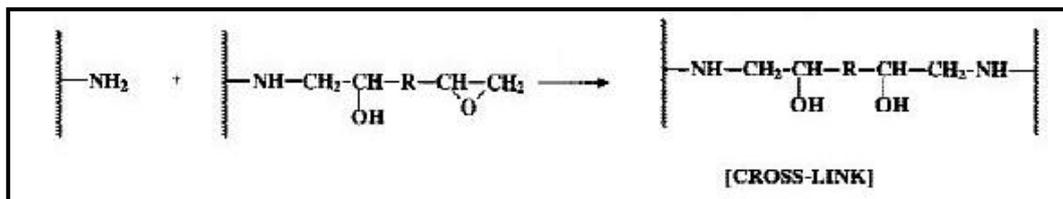


Figura 2.5: Cross-link mediante BDDGE^[47].

2.2.4 STESURA

Il processo di stesura è stato modificato rispetto a quello utilizzato per la realizzazione del prodotto Maioregen[®] in modo da poter ottenere uno strato mineralizzato molto sottile (circa 500 μm).

La stesura dello strato cartilagineo rimane invariata: questo viene steso manualmente nei pozzetti predisposti all'interno della griglia. Per quanto riguarda il secondo strato questo viene pesato e diluito in acqua (circa 20 volte il peso del collagene mineralizzato), per favorire l'apertura delle fibre di collagene. La soluzione così ottenuta viene inserita in un filtro a vuoto, realizzando un sistema per il filtraggio dello strato mineralizzato (Figura 2.6).

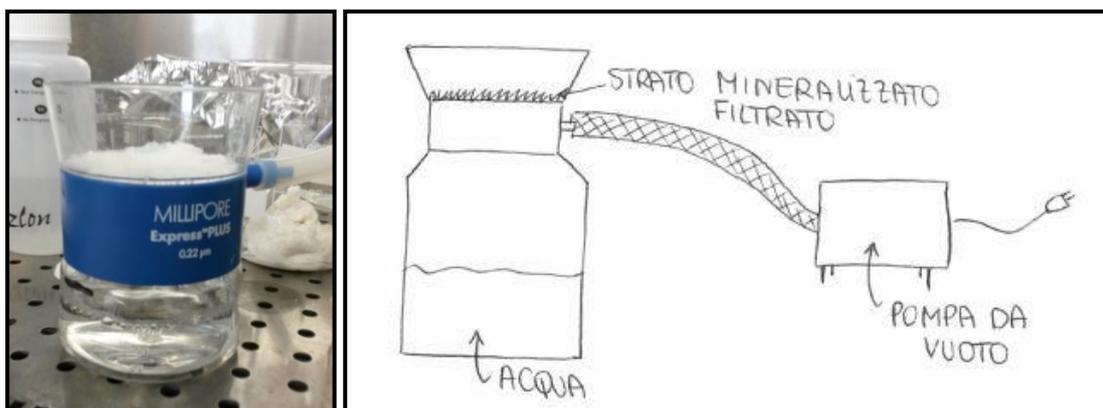


Figura 2.6: Filtraggio a vuoto (a sinistra), sistema utilizzato per il filtraggio dello strato mineralizzato (a destra).

Il filtraggio a vuoto permette di ottenere uno strato compatto e omogeneo (Figura 2.7).



Figura 2.7: Strato mineralizzato filtrato con filtro a vuoto.

Per ridurre ulteriormente lo spessore ed avere un maggiore controllo dell'altezza il materiale così ottenuto viene sottoposto a rullaggio (Figura 2.8). Lo strato mineralizzato viene inserito tra due fogli di mylar, materiale che impedisce l'adesione del campione al rullo e il trasferimento di impurezze, e fatto passare sotto il rullo.

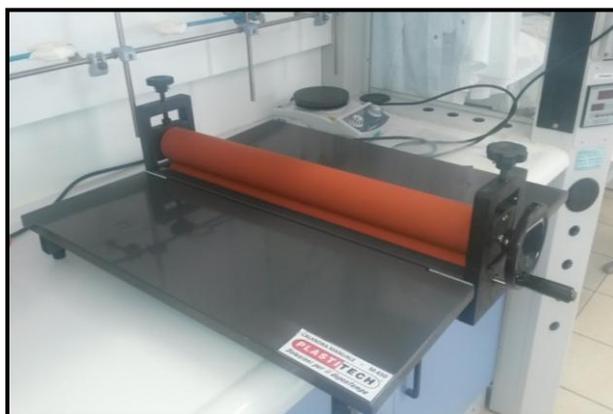


Figura 2.8: Metodo di rullaggio per lo strato mineralizzato.

La stesura avviene stendendo prima lo strato cartilagineo, in modo manuale, ed effettuando poi una sovrapposizione su quest'ultimo dello strato mineralizzato.

Dopo aver riempito tutti i pozzetti della piastra, come in Figura 2.9, questa può essere inserita nel liofilizzatore.

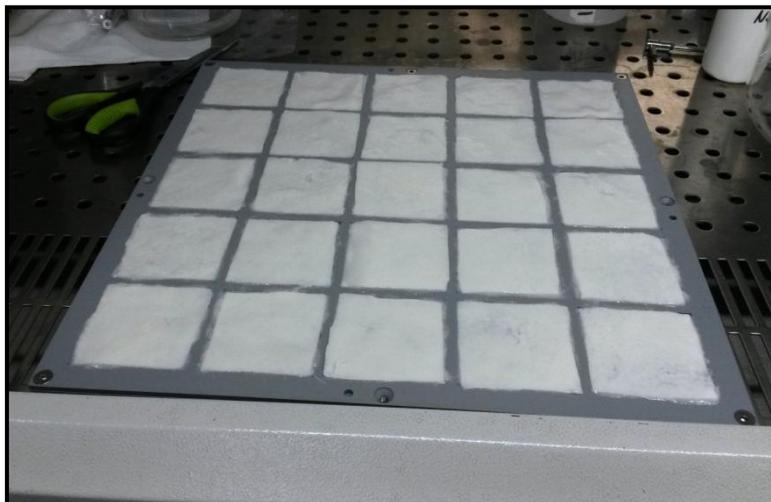


Figura 2.9: Piastra teflonata con campioni.

2.2.4.1 Piastre in acciaio o piastre teflonate

Per quanto riguarda la stesura sono state utilizzate sia piastre in acciaio, già utilizzate in produzione, che teflonate, cioè rivestite con un sottile film di teflon (spessore compreso tra i 10 e i 20 μm). Le piastre teflonate sono state introdotte al fine di ridurre l'adesione tra il campione e la piastra; il politetrafluoroetilene (PTFE), commercialmente noto come teflon, è un materiale plastico che presenta un insieme di caratteristiche chimico-fisiche che lo rendono potenzialmente idoneo allo scopo:

- ottima resistenza all'invecchiamento;
- minimo coefficiente d'attrito;

Lo strato cartilagineo dello scaffold deve avere una bassa densità di pori e quindi apparire liscio ad occhio nudo. Questa specifica è richiesta al fine di ridurre il rischio di delaminazione dello scaffold. Per poter soddisfare questa specifica sono state studiate e confrontate, con le piastre precedentemente utilizzate, piastre in teflon che, sperimentalmente, portano ad ottenere una superficie più

liscia sui campioni. In Tabella 2.2 sono riportati i principali vantaggi dell'utilizzo delle due differenti piastre.

PIASTRA IN ACCIAIO	PIASTRA TEFLONATA
<ul style="list-style-type: none"> • Migliore conducibilità termica; • Già utilizzata nella linea produttiva; • Facile da sanitizzare. 	<ul style="list-style-type: none"> • Elevata idrofobicità; • Facilità di realizzazione del film di teflon; • Stabile alle temperature di liofilizzazione.

Tabella 2.2: Vantaggi nell'utilizzo di piastre in acciaio e piastre teflonate.

La conducibilità termica del teflon è pari a $0.2-0.4 \text{ kCal}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{°C}^{-1}$ mentre quella dell'acciaio, materiale di cui erano costituite le piastre precedentemente adottate, ha una conducibilità termica molto maggiore ($30-50 \text{ kCal}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{°C}^{-1}$). È stato quindi necessario verificare l'efficacia del ciclo di liofilizzazione in uso in termini di parametri impostati.

2.2.5 LIOFILIZZAZIONE

A seguito del processo di stesura le piastre vengono inserite nel liofilizzatore (Figura 2.10).

Il processo di liofilizzazione è un processo tecnologico in grado di eliminare acqua da una sostanza organica con il minimo deterioramento della struttura e dei componenti della sostanza stessa.



Figura 2.10: Liofilizzatore.

Il diagramma di fase dell'acqua è riportato in Figura 2.11. Nel diagramma di fase, che riporta in ascissa la temperatura e in ordinata la pressione, sono riportate le linee che indicano il cambiamento di stato; nei cambi individuati all'interno di queste linee si individuano i campi di esistenza del solido, del liquido e del vapore. La congiunzione delle tre linee avviene nel punto triplo, nel quale coesistono le tre fasi.

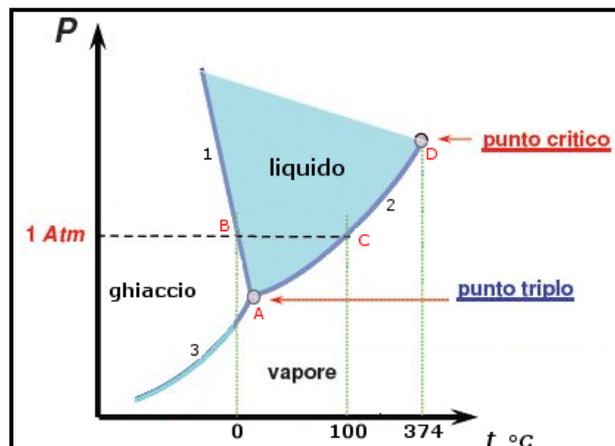


Figura 2.11: Diagramma di fase dell'acqua.

Il ciclo di liofilizzazione (o crioesiccamento) è in grado di definire la macro e la micro-struttura del prodotto. Il processo adottato nella produzione di Maioregen[®] può essere descritto in 5 fasi principali (Figura 2.12):

- condizionamento delle piastre (pre-freezing): da temperatura ambiente fino al raggiungimento di $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- congelamento (freezing): finché il campione non raggiunge $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- generazione del vuoto (vacuuming): 0.2929 mbar ;
- essiccamento primario (primary drying): $1\text{ }^{\circ}\text{C/h}$ fino a $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- essiccamento secondario (secondary drying): $25\text{ }^{\circ}\text{C/h}$ per un'ora.

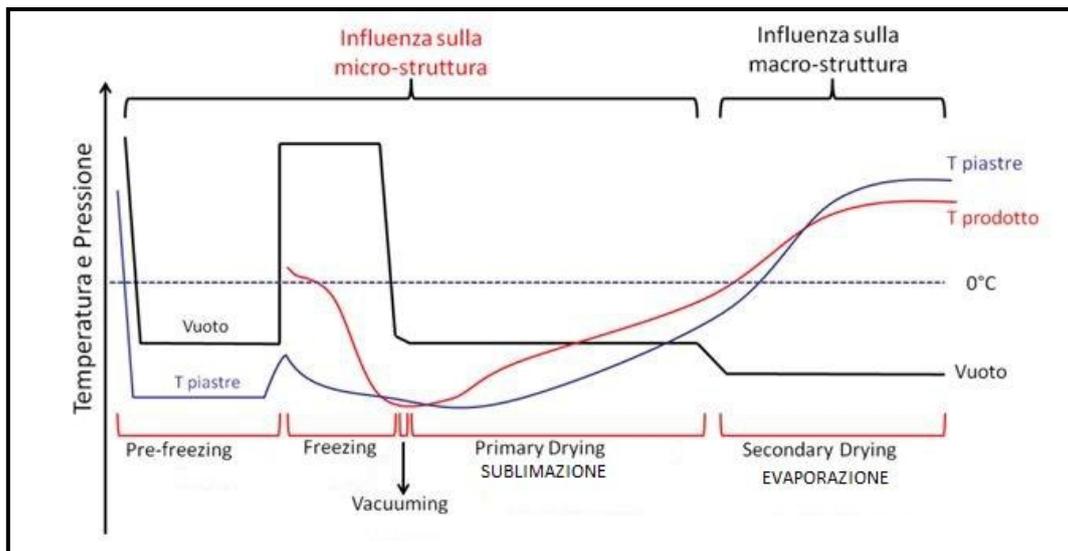


Figura 2.12: Ciclo di liofilizzazione.

Grandezza, morfologia e distribuzione dei cristalli di ghiaccio che si formano nella fase di congelamento influenzano la micro-organizzazione tridimensionale della fibre di collagene e, quindi, la micro-struttura del prodotto. Se opportunamente controllate le fasi di vacuuming e di essiccamento primario, invece, permettono la sublimazione dei cristalli di ghiaccio, mantenendo sostanzialmente inalterato il micro-arrangiamento del prodotto finito. Infine, durante l'essiccamento secondario si favorisce l'evaporazione dell'acqua residua coordinata dalle fibre, modulando caratteristiche meccaniche e morfologiche macroscopiche quali flessibilità e resistenza alla trazione.

In questo lavoro di tesi, partendo dal ciclo di liofilizzazione già validato per il prodotto Maioregen[®], è stata ridotta la durata dell'essiccamento primario (circa 10 ore).

2.3 VALUTAZIONE DELLE CARATTERISTICHE DEL PRODOTTO

In questo paragrafo si riassumeranno i metodi utilizzati per valutare se il prodotto realizzato soddisfa le diverse specifiche descritte nel paragrafo 2.1.

2.3.1 BIOMIMESI

La biomimesi è un parametro fondamentale per lo scaffold, sia per quanto riguarda la microstruttura che per quanto riguarda la chimica. In questo lavoro è stata valutata la microstruttura, cioè la porosità e lo spessore di ciascuno strato, mediante un'analisi di microscopia elettronica a scansione (SEM). Per valutare la porosità del campione è stato effettuato un test di swelling. È stata inoltre eseguita un'analisi termogravimetrica (TGA) al fine di valutare la percentuale in peso della componente minerale nello strato mineralizzato liofilizzato.

2.3.1.1 Microscopio elettronico a scansione (SEM)

Il microscopio elettronico a scansione è un tipo di microscopio che sfrutta un fascio di elettroni come sorgente di radiazioni permettendo così di osservare i campioni con ingrandimenti e risoluzioni 1000 volte superiori alla microscopia ottica. Quando una superficie è investita da elettroni ad elevata energia produce diversi tipi di segnali; per quanto riguarda la microscopia elettronica a scansione sono principalmente due i segnali che interessano: gli elettroni secondari e quelli retrodiffusi (back-scattered) (Figura 2.13).

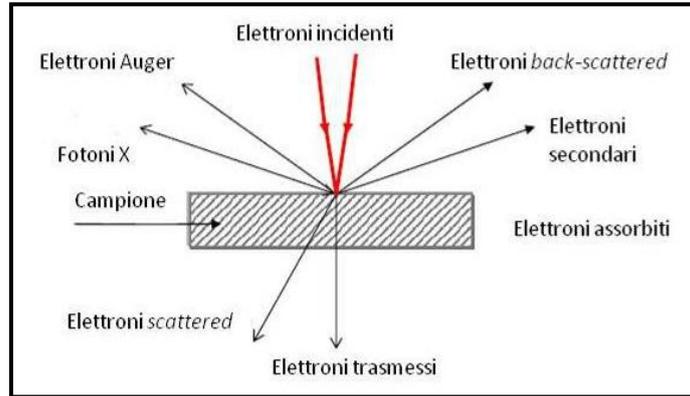


Figura 2.13: Segnali prodotti dall'interazione del fascio con il campione.

Sono stati analizzati al microscopio elettronico a scansione tre provini per ogni campione. Il singolo provino è ottenuto dallo scaffold mediante l'utilizzo di una lama molto affilata in acciaio che permette il taglio perpendicolare senza compressione tra gli strati. I provini rettangolari analizzati (lunghezza di circa 5 mm e larghezza di circa 2 mm) sono stati incollati su un apposito supporto circolare (taab).

La tecnica più diffusa per ottenere immagini SEM da campioni non conduttori, come quelli analizzati in questo lavoro di tesi, consiste nel rivestire la superficie del campione di un sottile film metallico, nel nostro caso oro, prodotto per sputtering o per evaporazione sotto vuoto (Figura 2.14).



Figura 2.14: Campioni analizzati rivestiti d'oro.

Le analisi sono state effettuate utilizzando il microscopio a scansione Leo Electron Microscopy ltf – ISIS 300, Oxford Link (Figura 2.15).



Figura 2.15: SEM-EDS (Leo 438 VP).

Dalle immagini di microscopia elettronica è possibile valutare la porosità dello scaffold: in particolare ho analizzato le dimensioni di 20 pori dello strato cartilagineo e di 20 pori dello strato mineralizzato, scelti in modo casuale su tutta la lunghezza del campione.

2.3.1.2 Analisi termogravimetrica (TGA)

L'analisi termogravimetrica (TGA) permette la registrazione continua delle variazioni di massa di un campione in funzione della temperatura e del tempo. Il risultato dell'analisi è un termogravigramma che riporta in ascissa la temperatura e sulle ordinate la variazione di massa percentuale. In Figura 2.16 è riportato il termogravigramma di tre campioni appartenenti allo stesso lotto.

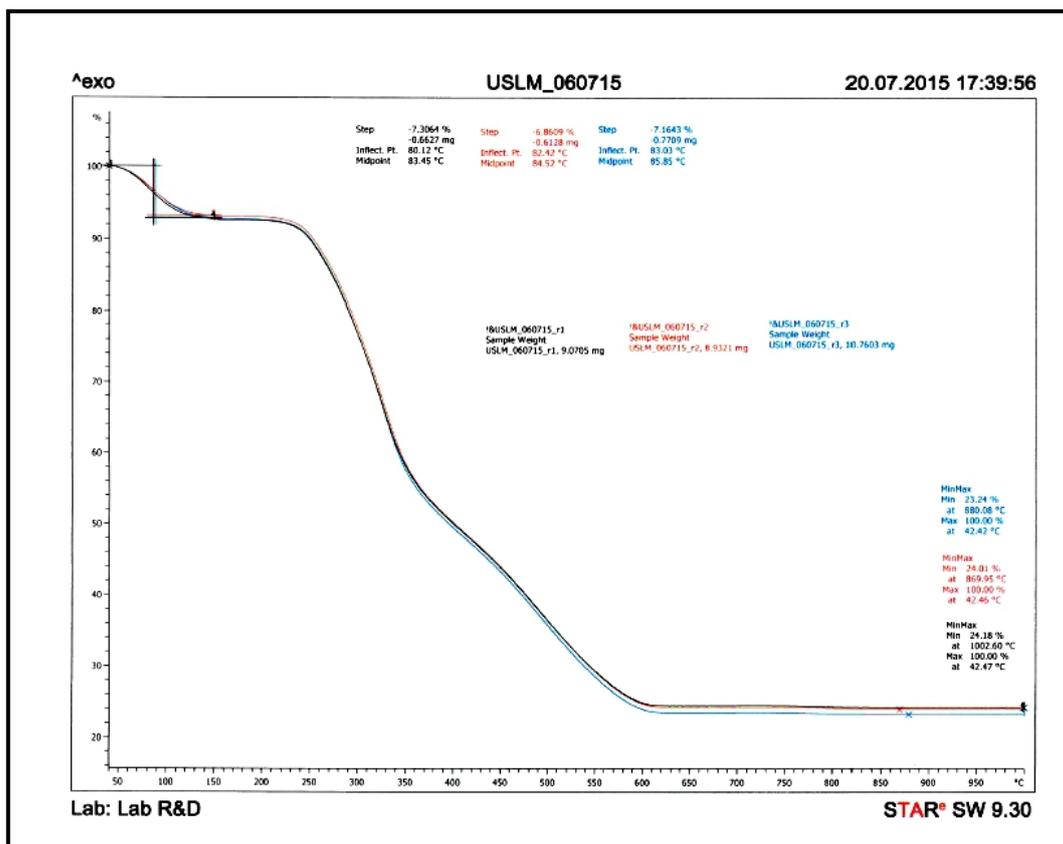


Figura 2.16: Termogravigramma.

Mediante la TGA, oltre a risalire alla percentuale di acqua residua nel campione come perdita in peso tra i 100 °C e i 150 °C, è anche possibile rilevare la percentuale di residuo minerale, come residuo finale a 1000 °C.

I campioni sono stati pesati (circa 10 mg), inseriti nei crogioli in allumina e chiusi con l'apposito tappino in alluminio (Figura 2.17). Sono stati analizzati con questo metodo tre campioni per ogni lotto realizzato (15 lotti), considerando il campione costituito da strato cartilagineo e strato mineralizzato. È stata poi ripetuta l'analisi sul solo strato mineralizzato per poter definire con precisione la percentuale di minerale nella struttura.



Figura 2.17: Crogioli TGA (TGA/DSC 1 STAR System – METTLER TOLEDO).

L'analisi è stata eseguita impostando la seguente rampa di calore:

- da 40 °C a 150 °C con velocità pari a 20 °C/min;
- da 150 °C a 700 °C con velocità pari a 5 °C/min;
- da 700 °C a 1000 °C con velocità pari a 20 °C/min.

2.3.1.3 Test di swelling

Mediante il processo di swelling è possibile valutare le modifiche dello scaffold sia per quanto riguarda il peso che per quanto riguarda la geometria del campione. Questo processo avviene in quanto le molecole del liquido penetrano all'interno della matrice organica dando così luogo al processo di rigonfiamento.

Per effettuare questo test ho realizzato 6 provini circolari, con diametro di circa 10 mm, di due differenti campioni. In particolare i campioni analizzati sono relativi a due lotti sottoposti allo stesso ciclo di liofilizzazione ma uno realizzato su piastra d'acciaio e uno su piastra teflonata. Di ogni campione è stata misurata l'altezza e lo spessore, con calibro, ed è stato pesato su bilancia analitica. Successivamente il campione è stato inserito in una petri contenente soluzione salina (DMEM) caratterizzata dal colore rosso. È stato valutato, utilizzando un

cronometro, il tempo di swelling e successivamente il campione è stato misurato, in altezza e diametro, e pesato.

La percentuale di swelling, espresso in funzione del peso acquisito, viene calcolato usando la seguente equazione:

$$S = \frac{W_t - W_0}{W_t} * 100$$

dove S è lo swelling mentre W_0 e W_t sono il peso dello scaffold allo stato secco e allo stato umido, cioè dopo lo swelling^[48]. Lo swelling del campione dà informazioni riguardo la porosità del campione stesso, poiché dipende da quanta soluzione è in grado di inglobare nella struttura.

2.3.2 RISCHIO DI DELAMINAZIONE

Per minimizzare il rischio di delaminazione lo strato cartilagineo deve apparire liscio ad occhio nudo, indice di una bassa porosità superficiale che porta ad una riduzione delle forze di taglio che agiscono sullo scaffold.

Sono stati valutati due lotti, ogni lotto costituito da 25 campioni, realizzati con lo stesso processo di liofilizzazione su piastre differenti: piastra in acciaio e piastra teflonata. L'analisi è stata di tipo visivo; in particolare è stato valutato se vi erano differenze macroscopiche dovute alla posizione del campione nella piastra, disomogeneità nel campione, superficie rugosa o liscia.

2.3.3 SPESSORE DELLO SCAFFOLD

Lo spessore dello scaffold, da specifica, non deve essere superiore a 2,5 mm. È importante definire lo spessore esatto dello scaffold poiché la variabilità potrebbe influire in fase d'impianto: se lo swelling non risulta essere ripetibile il sito d'impianto realizzato potrebbe essere troppo poco profondo per ospitare lo

scaffold e si potrebbe incorrere in delaminazione. Per valutare lo spessore effettivo dello scaffold idratato è stato effettuato un test di swelling.

È possibile considerare la variazione dello spessore percentuale, rispetto alle misure iniziali, per analizzare quella che è la variazione della geometria del campione e quindi valutare l'effettivo spessore del campione. La misura prima e dopo lo swelling è stata effettuata con calibro, facendo attenzione a non comprimere il prodotto durante l'operazione. L'analisi è stata effettuata con DMEM e con sangue. Nel caso di DMEM sono stati analizzati due campioni differenti e per ogni campione sono stati valutati sei provini, seguendo la procedura descritta nel paragrafo 2.3.1.3.. Sui lotti testati è stata effettuata un'analisi statistica (ANOVA) per valutare se i diversi lotti differiscono significativamente tra loro nello swelling.

Inoltre è stato possibile valutare il comportamento dello scaffold a contatto col sangue; in questo caso il sangue umano è stato fatto gocciolare sullo scaffold con l'aiuto di una siringa (Figura 2.18).

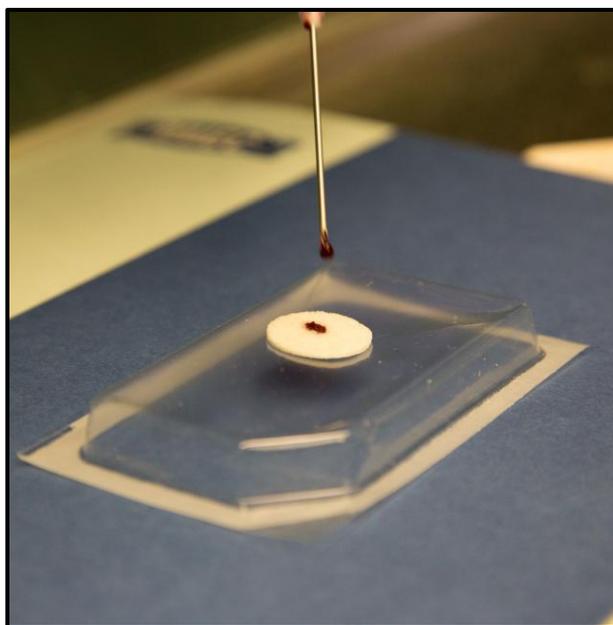


Figura 2.18: Swelling dello scaffold con sangue.

2.3.4 TEMPI DI DEGRADAZIONE

Al fine di valutare la permanenza in situ dello scaffold dopo l'impianto sono stati effettuati dei test per valutare la degradazione enzimatica e il grado di reticolazione del campione reticolato a diverse temperature e per un diverso tempo di permanenza a temperatura. È necessario assicurare la permanenza del campione in situ almeno per sei mesi dopo l'impianto. Da analisi precedentemente svolte è stato valutato che i campioni di strato singolo cartilagineo, reticolati per 48 ore a 4 °C, permangono in situ almeno sei mesi. Per questo motivo è necessario che i campioni realizzati siano stabili almeno quanto i campioni presi come riferimento (reticolazione di 48 ore a 4 °C).

2.3.4.1 Degradazione enzimatica

È stato effettuato un test di degradazione enzimatica, secondo la metodica utilizzata dall'Azienda, sui campioni reticolati nelle diverse condizioni. In particolare sono stati preparati 5 campioni di circa 10 mg per ogni condizione di reticolazione.

La biodegradazione è influenzata dalle proprietà del campione quali il tipo di legami chimici, la cristallinità, il peso molecolare e la capacità di assorbire acqua oltre che da fattori ambientali come il pH^[49]. La degradazione del collagene richiede la presenza di acqua, la penetrazione dell'enzima e la digestione dei legami^[46]. È stata scelta la collagenasi come enzima in grado di promuovere la degradazione dei campioni poiché questo enzima è l'unico in grado di scindere il collagene a partire dalle regioni elicoidali denaturate in condizioni di temperatura e pH fisiologiche^[49, 50].

È stata realizzata una soluzione tampone 0,1 M di Tris-HCl con una concentrazione di 100 U/ml di collagenasi (Figura 2.19).

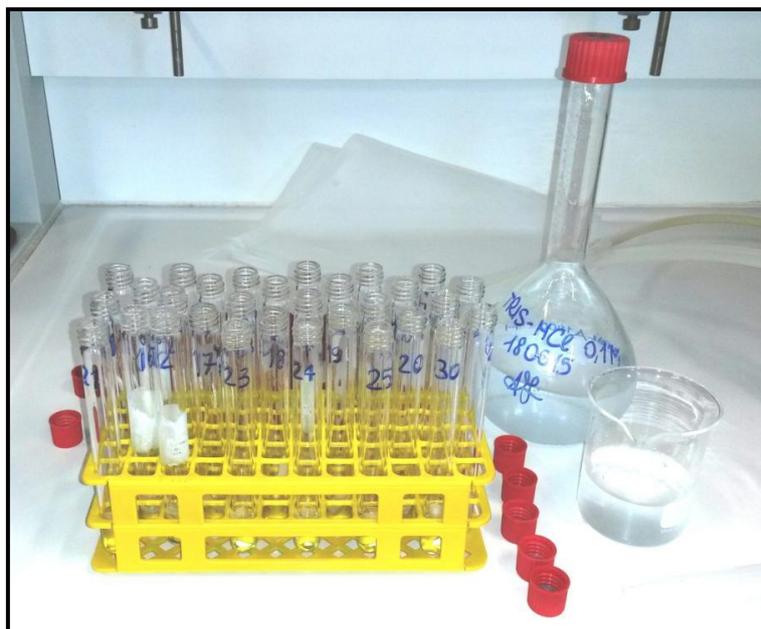


Figura 2.19: Campioni per degradazione enzimatica.

Dopo aver inserito 7 ml di soluzione in ogni provetta, ho posizionato i campioni in un incubatore a 37 °C.

L'analisi è stata eseguita limitando i fattori di disturbo: è stato utilizzato lo stesso lotto di collagene per la realizzazione dei provini e i questi ultimi sono stati sottoposti allo stesso ciclo di liofilizzazione. I campioni sono stati controllati ogni 30 minuti circa fino alla completa degradazione di tutti i campioni.

2.3.4.2 Valutazione del grado di reticolazione

È stato possibile valutare il grado di reticolazione nei campioni mediante un test che sfrutta l'azione cromofora del TNBS (Trinitrobenzenesulfonic acid). Il TNBS si lega ai gruppi amminici liberi, cioè quelli che non sono stati interessati dalla reticolazione con BDDGE (Figura 2.20).

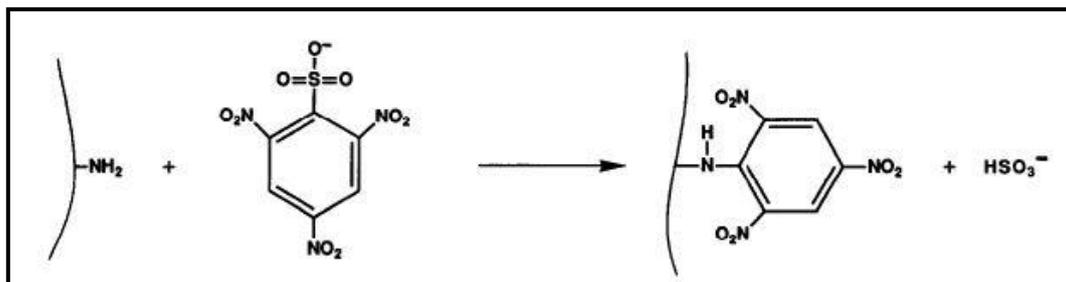


Figura 2.20: Reazione tra TNBS e gruppi amminici.

La presenza di TNBS nella struttura può essere rilevata mediante tecnica spettrofotometrica che quantifica, sfruttando l'informazione luminosa, la quantità di TNBS legata al campione^[51]. Lo spettrofotometro è, infatti, un dispositivo in grado di misurare l'intensità luminosa ed è in grado di determinare l'intensità come funzione della lunghezza d'onda della radiazione luminosa (Figura 2.21).



Figura 2.21: Spettrofotometro (Evolution 300 UV-VIS, Thermo scientific).

Essendo noti i gruppi amminici totali presenti nel campione è possibile risalire alla percentuale dei gruppi amminici che hanno reticolato nella reazione con il BDDGE (Figura 2.22).



Figura 2.22: Processo di valutazione del grado di reticolazione.

Ho effettuato questo test di reticolazione su campioni di strato cartilagineo singolo, in particolare tre provini di circa 10 mg per ogni campione. Le condizioni analizzate sono a due differenti temperature a cui è stato conservato il campione in fase di reticolazione (30 °C e 37 °C) e il tempo di reticolazione (12, 14, 16, 18, 20 e 24 ore). Questi campioni sono confrontati con il campione reticolato a 4 °C per 48 ore, condizione attuale di reticolazione. La lunghezza d'onda utilizzata dallo spettrofotometro in questa analisi è di 346 nm, frequenza di assorbimento del cromoforo^[51].

Sono state effettuate analisi statistiche (ANOVA) per valutare se le differenze tra le varie condizioni di reticolazione fossero significative.

2.3.5 SHELF LIFE (CONTENUTO D'ACQUA)

Il quantitativo di acqua residua nel prodotto è un parametro col quale si identifica la shelf life del prodotto, letteralmente la vita del prodotto sullo scaffale, cioè

quel periodo di tempo durante il quale il prodotto mantiene le sue caratteristiche qualitative nelle normali condizioni di conservazione e utilizzo. Questo quantitativo di acqua residua percentuale permette di mantenere limitata la crescita dei microorganismi all'interno del prodotto.

Per valutare la percentuale di acqua residua nel campione è stata effettuata un'analisi termogravimetrica (TGA – ThermoGravimetric Analysis) su tre provini di circa 10 mg per ogni lotto (15 lotti analizzati).

2.3.6 IMPIANTABILITÀ

Sui campioni realizzati è stato effettuato un test d'impianto su cadavere umano per valutare il metodo più idoneo di fissaggio dello scaffold in sede d'impianto.

2.3.6.1 Test d'impiantabilità

Sono stati effettuati da un chirurgo diversi impianti in 6 zone del ginocchio (Figura 2.23):

- condilo femorale mediale anteriore (MFC-A);
- condilo femorale mediale posteriore (MFC-P);
- condilo femorale laterale anteriore (LFC-A);
- condilo femorale laterale posteriore (LFC-P);
- troclea femorale laterale (THRO/LF);
- patella femorale mediale (PAT/MF).

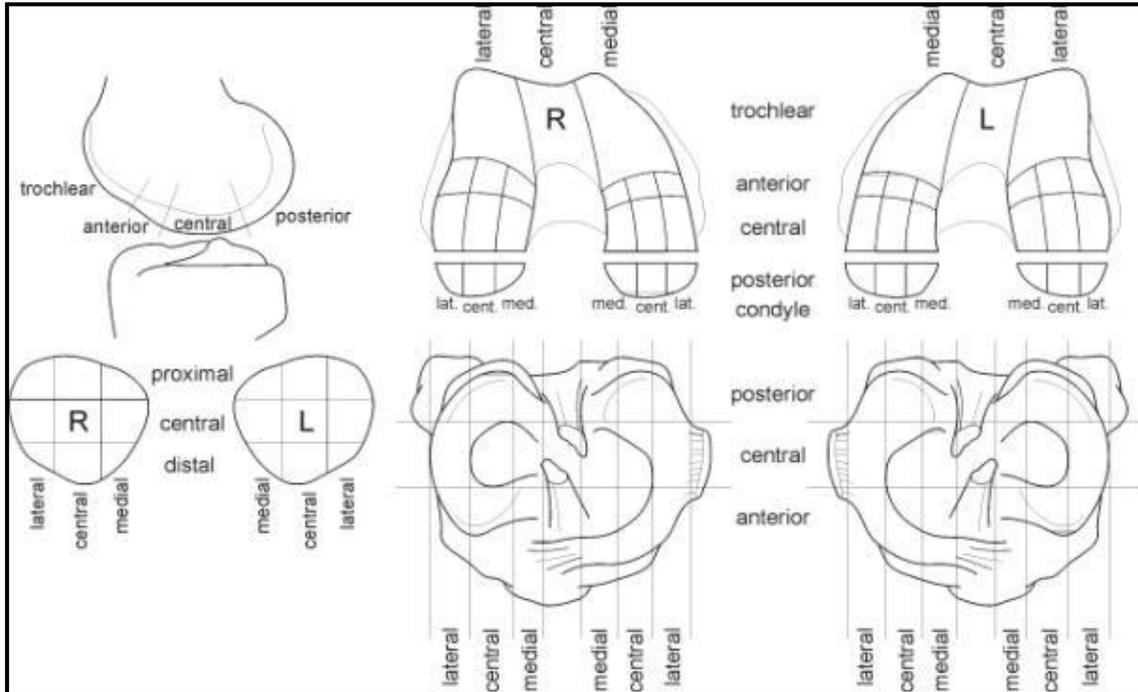


Figura 2.23: Siti d'impianto.

In ogni punto d'impianto è stato preparato uno scasso di circa 2,5 mm di profondità nel quale è stato posizionato lo scaffold (Figura 2.24).



Figura 2.24: Scasso realizzato per l'impianto dello scaffold.

Sono state valutate le dimensioni critiche per il sito d'impianto; in particolare la dimensione pari a 18 mm (in diametro o in lunghezza) risulta essere la massima impiantabile e quindi la più critica. Per questo motivo gli scaffold impiantati sono stati caratterizzati da due diverse forme (Figura 2.25):

- tondi, con diametro di 18 mm;
- quadrati, con lato di 18 mm.



Figura 2.25: Scaffold tondi (a sinistra) e quadrati (a destra) impiantati.

Sono stati valutati 4 diversi tipi di fissaggio per lo scaffold:

- press-fit;
- colla di fibrina;
- suture;
- pins (Figura 2.26).



Figura 2.26: Pins utilizzate per il fissaggio.

La valutazione della riuscita dell'impianto avviene mediante l'utilizzo di due scale semiquantitative: la scala di Drobnic e la scala di Bekkers.

La scala di Drobnic (Tabella 2.3) combina tre diversi fattori: l'area di copertura, l'integrità dello scaffold e la forza di fissaggio (testata manualmente):

	Area coverage	Scaffold integrity	Endpoint fixation
5	Unchanged	Unchanged	Cannot be detached
4	Marginal gap - part of the circumference	Shape deformities without structural damage	Detached with intensive pull
3	Marginal gap - full circumference	Fissures or cracks without important substance loss	Detached with minor pull
2	<25% of area uncovered	<25 % of scaffold loss	Detached with slight touch
1	25-50% of area uncovered	25-50% of scaffold loss	Partial self-detachment
0	>50% of area uncovered	>50% of scaffold loss	Total self-detachment

Tabella 2.3: Scala di Drobnic.

Mediante la scala di Bekkers, invece, viene valutato lo scaffold una volta rimosso dal sito d'impianto; in particolare si valuta l'attaccamento al bordo, l'area di copertura e l'integrità dello scaffold (Tabella 2.4).

	Outline attachment	Area coverage	Scaffold integrity
5	Unchanged	Unchanged (100%)	Unchanged
4	<25%	75-100%	Shape deformities or minor fissures that are unrelated to fixation
3	25-50%	50-75%	Minor fissures or cracks close to the fixation site
2	50-75%	25-50%	Fissures or cracks that jeopardize the fixation of the scaffold

1	75-100%	<25%	Fissures or cracks that jeopardize the fixation with surrounding scaffold disorganization
0	100%	0%	Fissures or cracks jeopardizing the fixation with generalized scaffold disorganization

Tabella 2.4: Scala di Bekkers.

Sono state effettuate delle analisi statistiche per valutare se le differenze tra i metodi di fissaggio, il sito d’impianto e le dimensioni dello scaffold fossero significative, mediante test ANOVA.

2.3.7 POSSIBILITÀ DI TAGLIO

È stata valutata la possibilità di taglio del campione al fine di ottenere campioni di diverse dimensioni, adatte al sito d’impianto.

Sono stati analizzati due differenti metodi: uno prevede l’utilizzo di pressa idraulica e fustella mentre l’altro prevede l’utilizzo di forbici. Entrambi i metodi utilizzati presentano diverse problematiche che dovranno essere valutate singolarmente quali:

- impurezze rilasciate sul materiale;
- consumo del prodotto durante le attività di lavorazione;
- non omogeneità del taglio;
- resistenza della lama.

2.3.7.1 Test con pressa idraulica e fustella

Sono stati effettuati dei test preliminari di taglio sui provini ottenuti dopo la liofilizzazione, al fine di ottenere scaffold di diversi formati. Per fare ciò sono state utilizzate una pompa idraulica e una fustella (Figura 2.27). Successivamente, mediante un’analisi visiva è stato possibile valutare la qualità

del taglio su quattro campioni; essa viene valutata sulla base delle caratteristiche dei bordi in seguito al taglio.

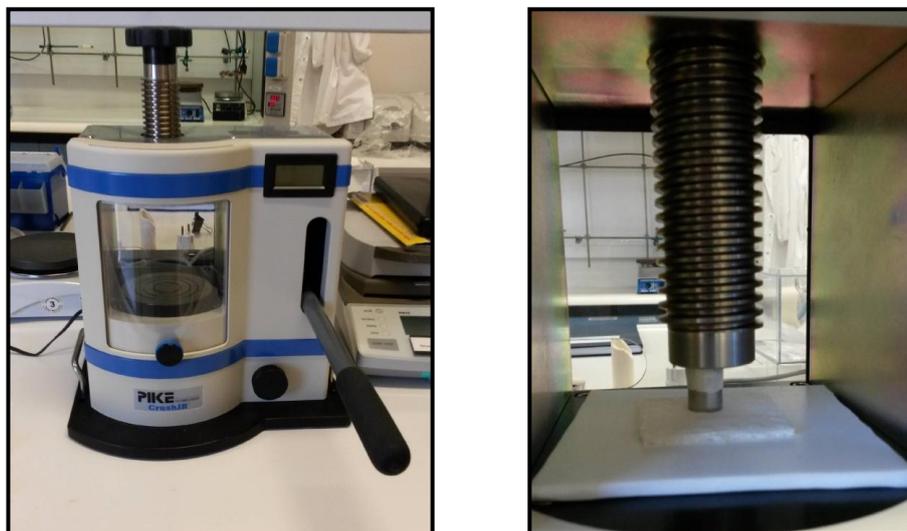


Figura 2.27: Pompa idraulica (a sinistra), pompa idraulica e fustella per il taglio dello scaffold (a destra).

2.3.7.2 Test con forbici

È stata inoltre effettuata, in via del tutto sperimentale, una prova di taglio con forbici (Figura 2.28). La valutazione del taglio è avvenuta mediante analisi visiva, come nel caso di test con pompa idraulica e fustella.



Figura 2.28: Prova di taglio con forbici.

CAPITOLO 3:

RISULTATI OTTENUTI

In questo capitolo saranno esposti i risultati ottenuti dai diversi test effettuati sul prodotto per valutarne le caratteristiche ottenute. In particolare saranno riportati i risultati acquisiti mediante microscopia elettronica a scansione e termogravimetria, saranno confrontate le superfici degli scaffold ottenuti con diverse piastre, saranno discussi i risultati ottenuti dalla valutazione dei tempi di degradazione enzimatica e del grado di reticolazione, saranno valutate le possibilità di taglio, riportati i dati ottenuti dal test d'impianto e i risultati del test di swelling.

3.1 BIOMIMESI

Al fine di valutare la biomimesi dello scaffold realizzato sono state effettuate diverse analisi: microscopia elettronica a scansione, per valutare la microstruttura del prodotto; analisi termogravimetriche, al fine di misurare il residuo minerale presente nello strato mineralizzato e quindi la biomimesi chimica del prodotto, e test di swelling per valutare la porosità dello scaffold.

3.1.1 RISULTATI ANALISI SEM

Dalle analisi effettuate con microscopia elettronica a scansione sullo scaffold realizzato è possibile notare che questo sembra essere ben integrato. Inoltre è possibile individuare uno strato cartilagineo più poroso e uno strato mineralizzato meno poroso.

Mediante questa analisi è possibile valutare le dimensioni dei due strati che risultano essere vicine a quelle riportate in specifica (circa 2,5 mm): lo strato mineralizzato ha uno spessore di circa 0,5 mm mentre lo strato cartilagineo di circa 2 mm (Figura 3.1).

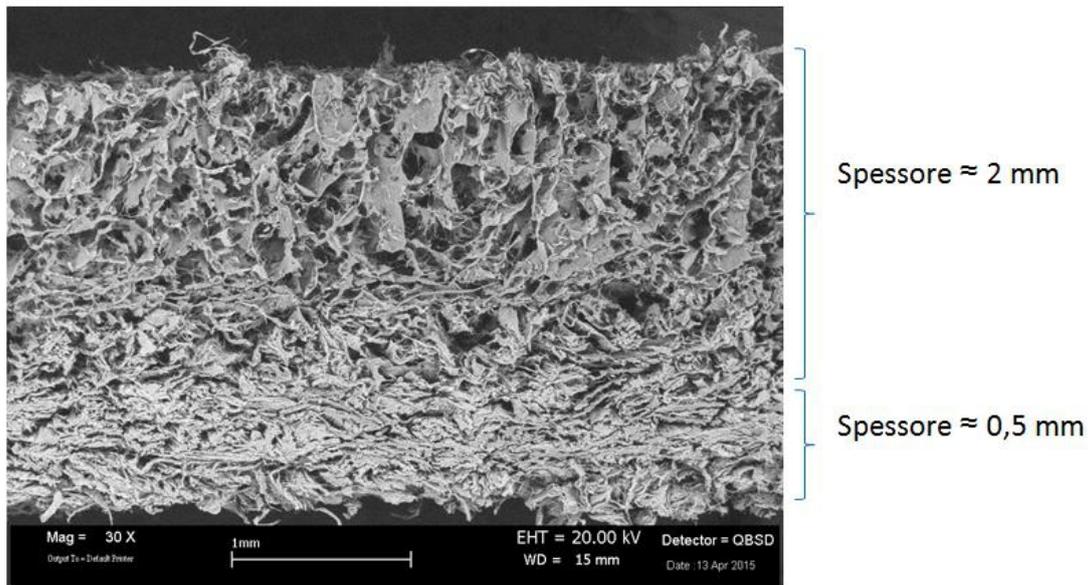


Figura 3.1: Analisi SEM.

In figura non è possibile notare un allineamento delle fibre marcato, se non in alcuni punti. Sarà necessario effettuare ulteriori prove di liofilizzazione per ottenere un allineamento preferenziale delle fibre in modo tale da mimare le caratteristiche strutturali della cartilagine.

Sono stati analizzati i pori presenti nella struttura per valutarne le dimensioni; in particolare sono stati considerati 20 pori nello strato cartilagineo e 20 pori nello strato mineralizzato. Si ha che, nella struttura secca, la dimensione media dei pori appartenenti allo strato mineralizzato è di $74 \pm 17 \mu\text{m}$ mentre quelli appartenenti allo strato cartilagineo hanno una dimensione maggiore, in media $300 \pm 50 \mu\text{m}$. Questa dimensione risulta essere compatibile con la penetrazione cellulare^[52].

3.1.2 RISULTATI TGA

Dall'analisi termogravimetrica effettuata sull'intero scaffold, quindi considerando sia lo strato collagenico che lo strato mineralizzato, è possibile rilevare la percentuale di residuo minerale che risulta essere pari al 22,56% con deviazione standard pari all'1%. È interessante valutare la percentuale di residuo minerale analizzando solamente lo strato minerale: i dati ottenuti dall'analisi effettuata su due lotti (3 provini per ogni campione) sono riportati in Figura 3.2.

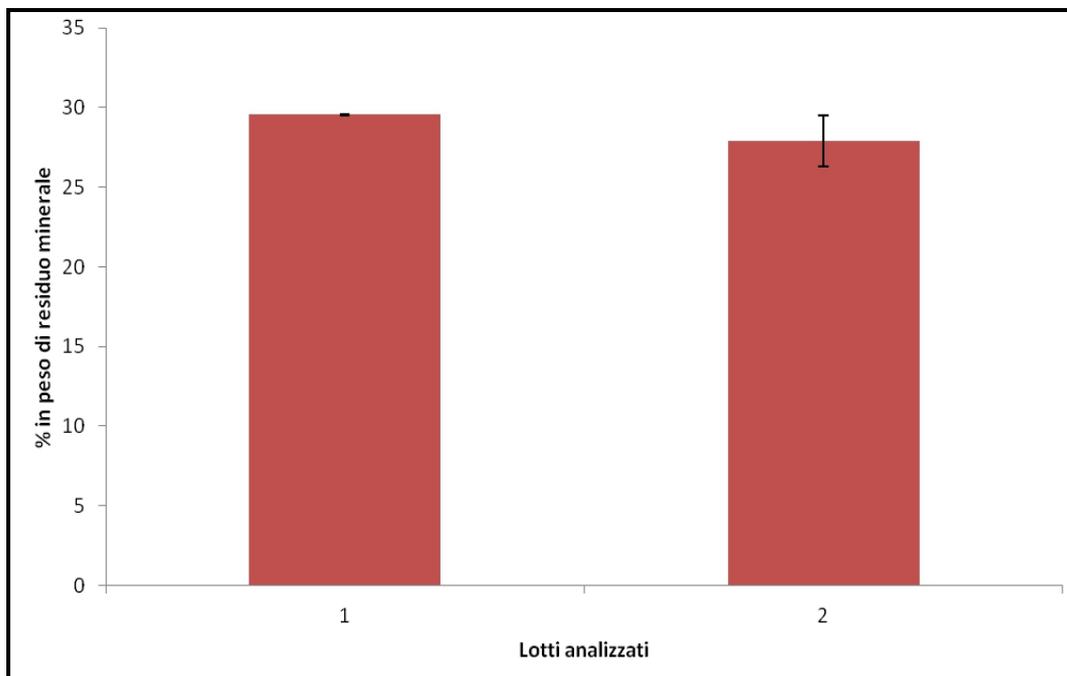


Figura 3.2: Percentuale in peso di residuo minerale nello strato mineralizzato.

Come atteso, la percentuale di residuo minerale nello strato mineralizzato risulta essere inferiore al 40%, cioè la percentuale teorica. Questo dato è attendibile se si tiene conto delle eventuali perdite che si possono verificare nelle fasi critiche di lavaggio.

3.1.3 RISULTATI TEST DI SWELLING

In Figura 3.3 è rappresentato il peso iniziale e finale dei 12 provini analizzati, 6 per ogni campione.

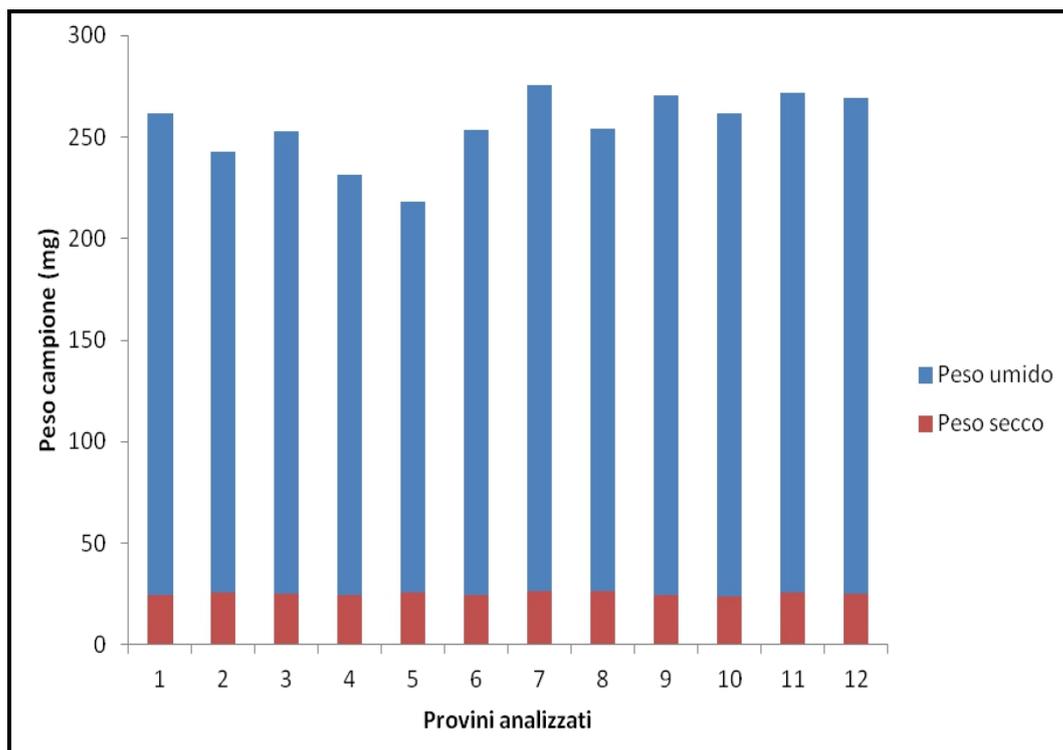


Figura 3.3: Peso secco e peso umido dei provini analizzati.

La percentuale d'acqua nel campione è pari all'88,9% con una deviazione standard dell'1% per tutti i campioni analizzati. I campioni sono idrofilici, perché swellano completamente entro un minuto, ed estremamente porosi, poiché sono in grado di contenere fino al 90% di acqua.

3.2 RISCHIO DI DELAMINAZIONE

Al fine di ottenere una superficie liscia nello scaffold, che è il risultato di una minore porosità superficiale, e minimizzare il rischio di delaminazione sono state testate piastre teflonate.

In Figura 3.4 sono riportate le superfici di due campioni: uno realizzato utilizzando piastre in acciaio e uno con piastre teflonate.



Figura 3.4: Scaffold realizzati su piastre di materiali differenti: acciaio (a sinistra) e teflon (a destra).

Dall'immagine è possibile notare una differenza consistente anche ad occhio nudo di quella che è la superficie dei due campioni, che hanno subito lo stesso ciclo di liofilizzazione.

Sono state, inoltre, valutate visivamente le caratteristiche dei diversi campioni appartenenti ai due lotti e non sono state riscontrate disomogeneità nei singoli campioni né differenze dovute alla posizione del campione nella piastra.

Questo risultato può essere legato all'idrofobicità del teflon e al basso coefficiente d'attrito che porta ad una minore adesione dello scaffold alla piastra.

3.2.1 RISULTATI TEST DI SWELLING

Effettuando questo test è possibile vedere i campioni assorbire la soluzione salina e variare la struttura geometrica e il peso del campione stesso (Figura 3.5).

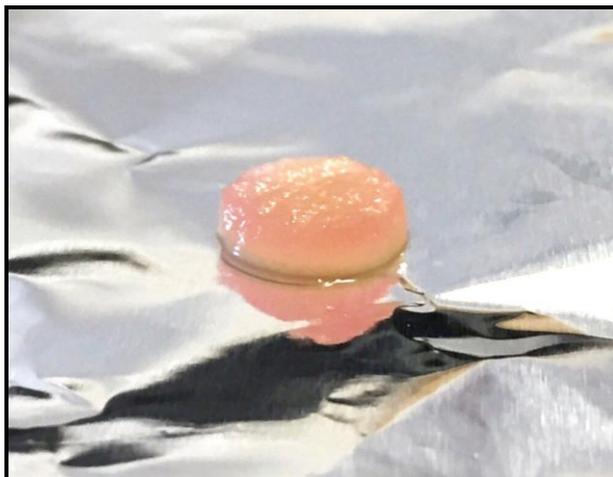


Figura 3.5: Campione dopo swelling.

Con i dati ottenuti da questo test è possibile valutare lo spessore del campione a seguito di swelling. I campioni testati hanno uno spessore medio di $2,69 \pm 0,18$ mm quindi risultano essere leggermente più spessi rispetto alle specifiche imposte per il prodotto (Tabella 3.1).

Lotto	n°	Spessore	
		secco (mm)	umido (mm)
160715	1	2,67	2,9
	2	2,49	2,36
	3	2,44	2,61
	4	2,45	2,41
	5	2,66	2,69
	6	2,69	2,72
200715	7	1,66	2,83
	8	1,42	2,57
	9	1,55	2,69
	10	1,65	2,78
	11	1,62	2,85
	12	1,52	2,91

Tabella 3.1: Spessore campioni prima e dopo swelling.

Dall'analisi statistica (ANOVA) risulta che non vi è differenza significativa tra i lotti analizzati, considerando lo spessore umido del campione.

In Figura 3.6 è possibile vedere il comportamento di un campione immerso in sangue umano.



Figura 3.6: Swelling dello scaffold con il sangue.

Effettuando una misura con il calibro dello scaffold dopo lo swelling con il sangue si ottengono spessori di circa 1,5 mm.

3.3 TEMPI DI DEGRADAZIONE

Nei successivi paragrafi sono riportate le analisi effettuate per la valutazione della permanenza in situ del campione. Saranno esposti i risultati relativi alla determinazione del grado di reticolazione ed alla degradazione enzimatica.

3.3.1 RISULTATI DEGRADAZIONE ENZIMATICA

I risultati ottenuti dalla valutazione del tempo di degradazione enzimatica sui campioni analizzati sono riportati in Figura 3.7; il tempo di degradazione considerato è il tempo che impiega il campione a degradarsi completamente.

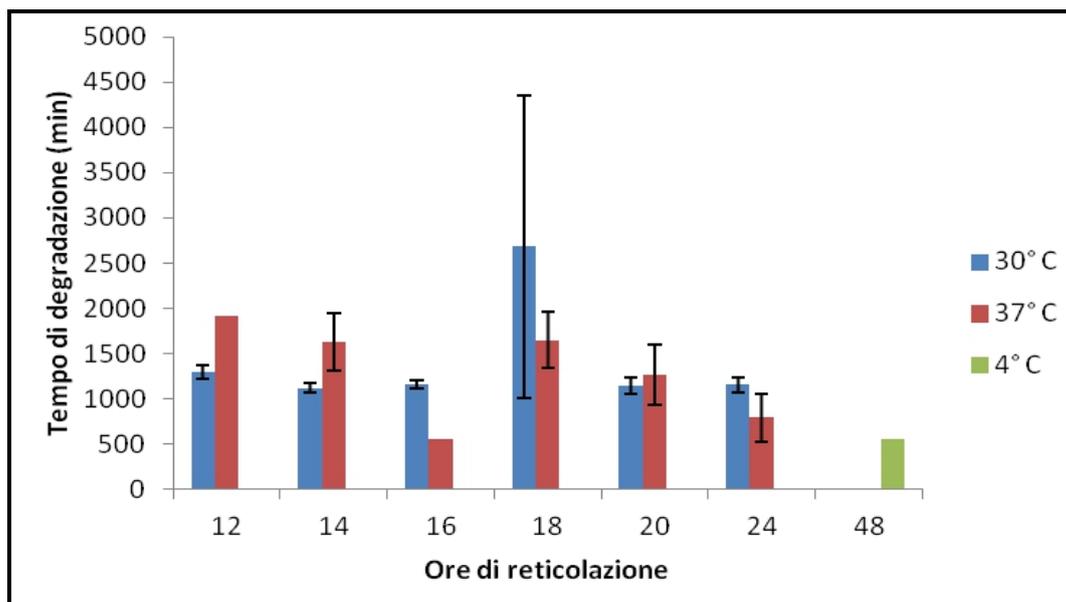


Figura 3.7: Degradazione enzimatica.

Dal grafico è possibile notare una grande dispersione nei valori della degradazione enzimatica; ciò è dovuto alle differenze strutturali presenti nei campioni (ad esempio la porosità). Risulta però evidente che tutti i campioni sono stabili almeno quanto il campione reticolato a 4 °C per 48 ore. Dati i risultati di questo test si può affermare che è possibile reticolare a 30 °C o 37 °C per un tempo pari a 16 ± 4 ore senza ottenere differenze significative sul prodotto finito.

3.3.2 RISULTATI VALUTAZIONE DEL GRADO DI RETICOLAZIONE

La valutazione del grado di reticolazione è un test a supporto dei risultati ottenuti nel test degradazione enzimatica. In particolare, maggiore è il grado di reticolazione maggiore dovrebbe essere la stabilità del prodotto, quindi maggiori dovrebbero essere i tempi di degradazione dello strato cartilagineo singolo testato.

Mediante il test di reticolazione è possibile quantificare i gruppi amminici liberi nella catena di collagene, che reagiscono con un cromoforo (TNBS) e possono essere rilevati mediante spettrofotometria. Noti i gruppi amminici liberi, che

quindi reagiscono con TNBS, e i gruppi amminici totali presenti nel collagene è possibile ricavare il numero di gruppi amminici che hanno reticolato in presenza del reticolante BDDGE.

La valutazione del grado di reticolazione è stata effettuata su tre provini per ogni campione. I campioni analizzati sono campioni di strato cartilagineo singolo reticolati per 12, 14, 16, 18, 20 e 24 ore in due condizioni di temperatura (30 °C e 37 °C) e confrontati col campione reticolato per 48 ore a 4 °C.

Questo test viene effettuato al fine valutare il grado di reticolazione dei campioni, reticolati a diverse temperature e per un diverso tempo, poiché il grado di reticolazione del campione risulta essere rilevante sulla stabilità del prodotto finito. Nel grafico in Figura 3.8 sono riportati i risultati del test relativo al grado di reticolazione.

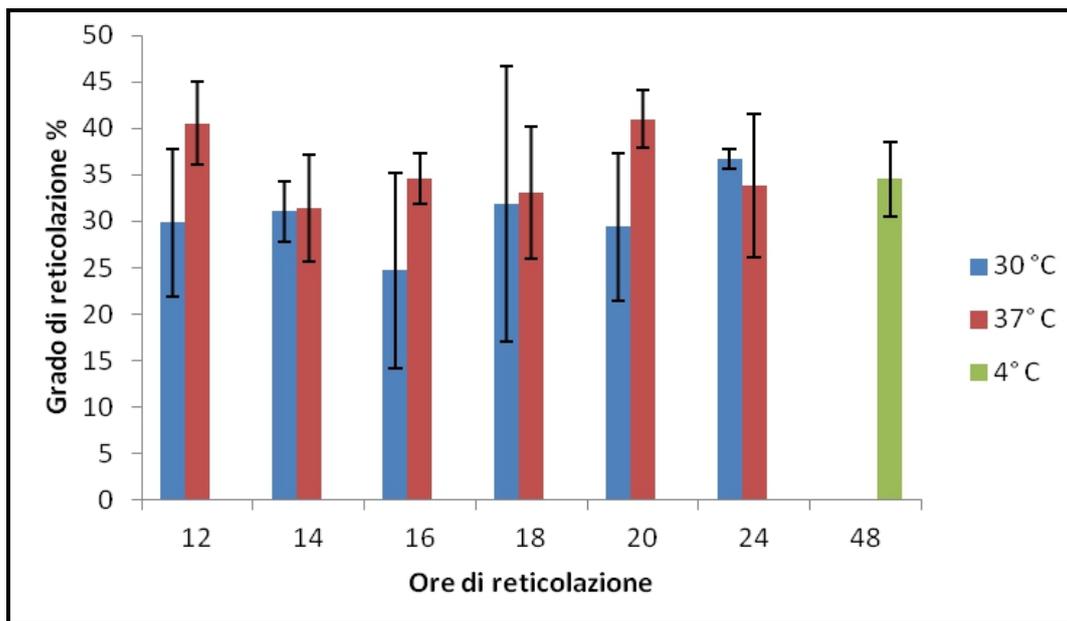


Figura 3.8: Grado di reticolazione.

È stato effettuato un test statistico di analisi della varianza (ANOVA) sui risultati ottenuti dal quale risulta che non vi è differenza significativa tra le popolazioni (alfa=0,05). Questo test ha fornito i risultati attesi: ha confermato che l'aumento della temperatura di reticolazione può accelerare il processo di reticolazione e

quindi è possibile ottenere lo stesso grado di reticolazione diminuendo il tempo della reazione stessa. Data questa evidenza sarà possibile reticolare i campioni anche in un range di 16 ± 4 ore, se la temperatura di reticolazione è di 30 °C o 37 °C (Tabella 3.2).

	reticolazione 30 °C	reticolazione 37 °C	reticolazione totale
F	0,5864	1,6882	1,1722
Fcrit	3,1059	3,2039	2,1649
H0/H1	H0	H0	H0

Tabella 3.2: Test ANOVA; analisi della varianza sulle popolazioni.

Lo stesso test di reticolazione è stato effettuato sul campione non reticolato mantenuto a 37 °C. Effettuando un confronto tra il grado di reticolazione di questo campione non reticolato e le popolazioni reticolate a 37 °C, con il test statistico ANOVA, si ottiene che tra questi campioni vi è una differenza significativa ($\alpha=0,05$): i campioni reticolati differiscono in modo significativo dal campione non reticolato. Anche questo è un risultato atteso che ci conferma l'azione reticolante del BDDGE sulla catena di collagene.

3.4 SHELF LIFE (CONTENUTO D'ACQUA)

Per tutti i 15 lotti analizzati, sottoposti a differenti cicli di liofilizzazione, è stata effettuata un'analisi termogravimetrica per valutare la percentuale di acqua residua nel campione. In tutti i casi questa risulta essere inferiore al 16% e quindi sempre entro la specifica del prodotto. Si può quindi ipotizzare che la shelf life del prodotto sia confrontabile con quella del prodotto Maioregen® (shelf life pari a 3 anni). In Figura 3.9 è riportata la percentuale in peso di acqua residua, ottenuta da TGA, sui lotti analizzati.

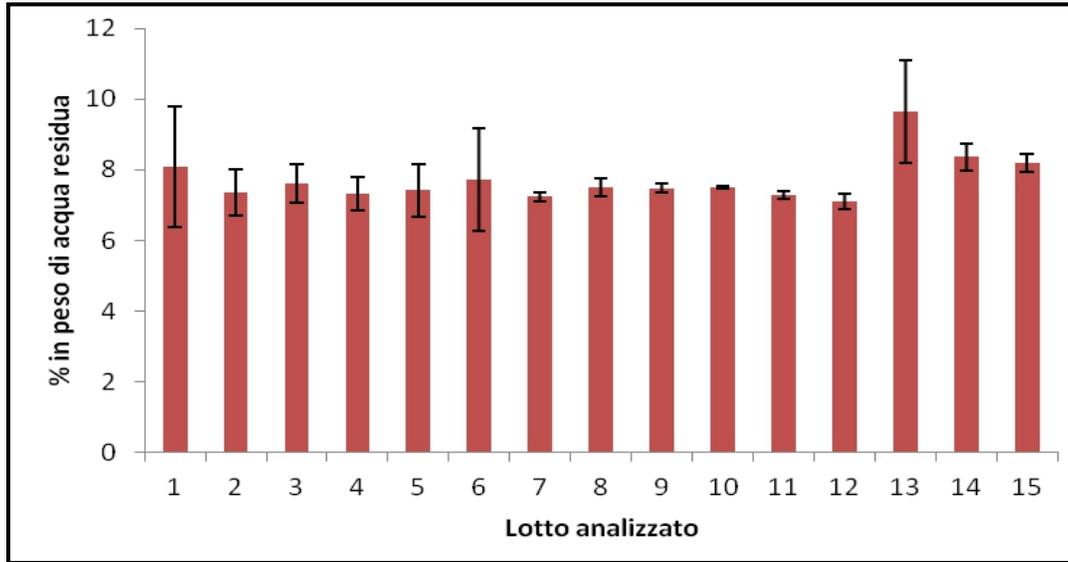


Figura 3.9: Percentuale in peso di acqua residua nei campioni.

3.5 IMPIANTABILITÀ DELLO SCAFFOLD

La stabilità dello scaffold nel sito dopo l'impianto è fondamentale per permettere l'integrazione dello scaffold nel sito ospite. Le diverse possibilità di fissaggio sono state valutate in un test su cadavere.

3.5.1 RISULTATI TEST D'IMPIANTABILITÀ

I metodi di fissaggio sono stati valutati utilizzando due scale: scala Drobnic e scala Bekkers. Per analizzare i dati sono state sommate tutte le valutazioni date ad ogni parametro e mediate. I risultati dati dall'applicazione della scala Drobnic sono riportati in Figura 3.10.

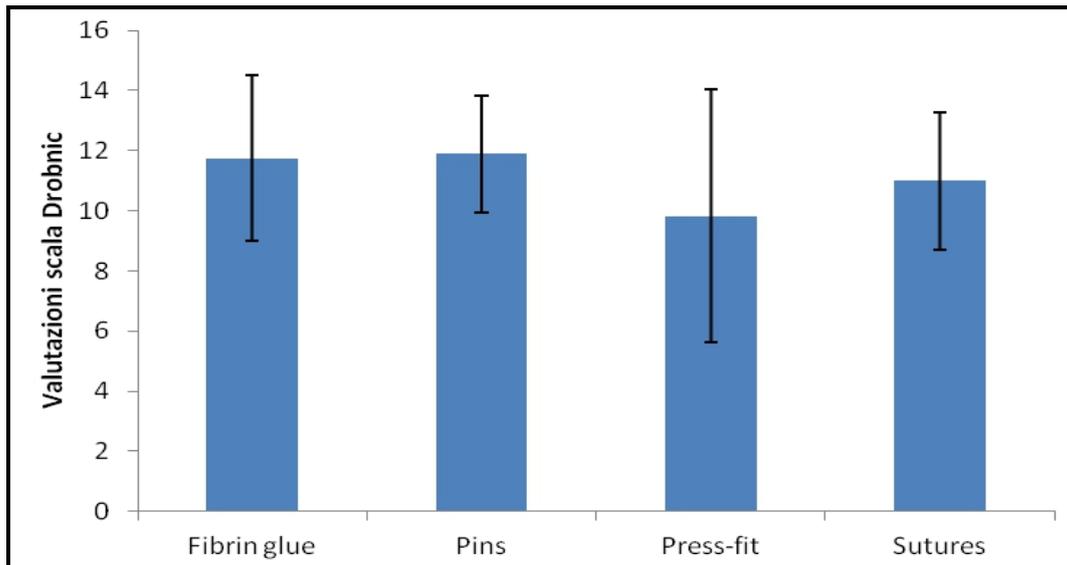


Figura 3.10: Valutazioni dei metodi di fissaggio con la scala Drobnic.

I risultati dati dall'applicazione della scala Bekkers sono, invece, riportati in Figura 3.11.

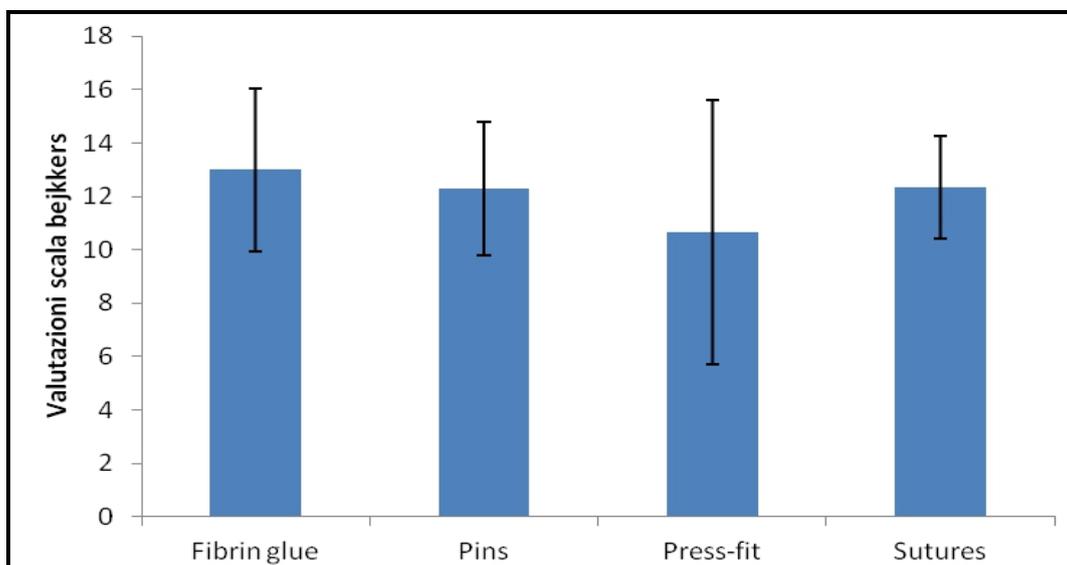


Figura 3.11: Valutazione dei metodi di fissaggio con la scala Bekkers.

Per quanto riguarda le dimensioni dello scaffold impiantato è stata effettuata la stessa analisi. I risultati dati dall'applicazione della scala Drobnic sono riportati in Figura 3.12.

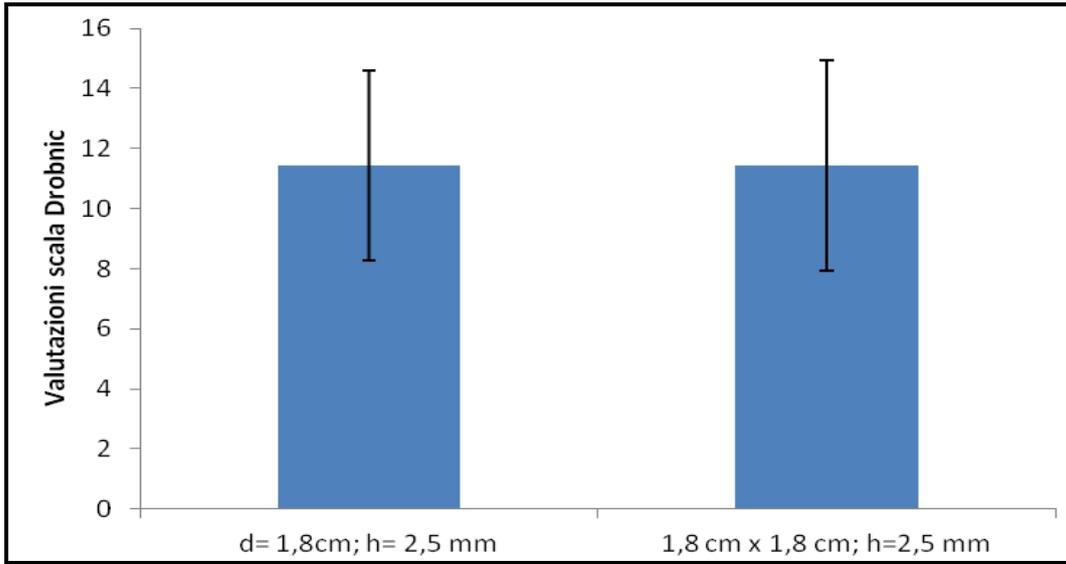


Figura 3.12: Valutazione delle dimensioni dello scaffold con la scala Drobnic.

I risultati ottenuti con la scala Bekkers sono, invece, riportati in Figura 3.13.

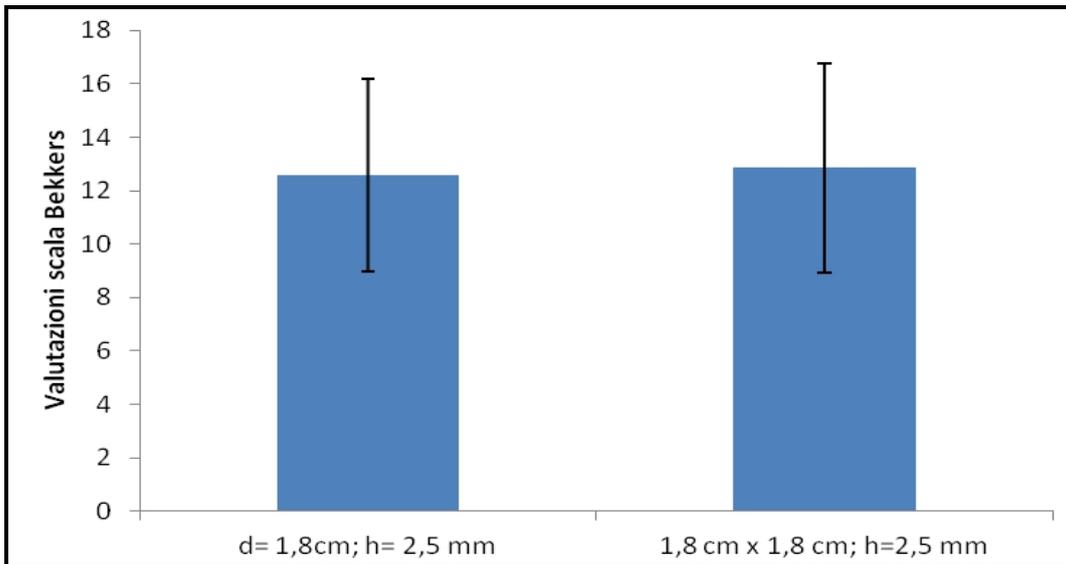


Figura 3.13: Valutazione delle dimensioni dello scaffold con la scala Bekkers.

È stato possibile analizzare anche l'influenza del sito d'impianto sulla riuscita dell'impianto. La valutazione è stata effettuata utilizzando le due scale. Per quanto riguarda la scala Drobnic i risultati sono riportati in Figura 3.14.

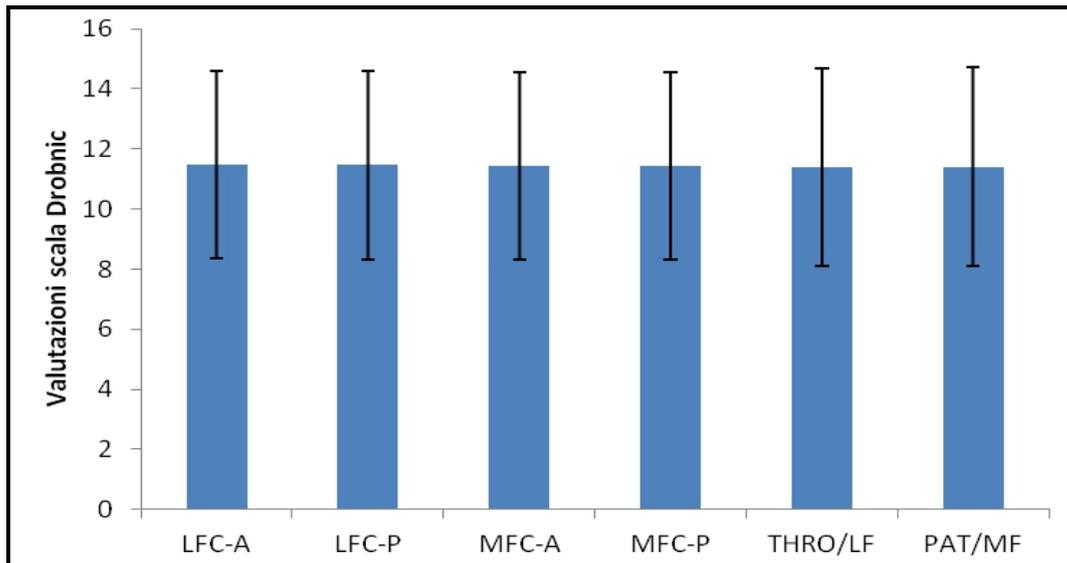


Figura 3.14: Valutazioni del sito d'impianto con la scala Drobnic.

Per quanto riguarda la scala Bekkers i risultati sono riportati in Figura 3.15.

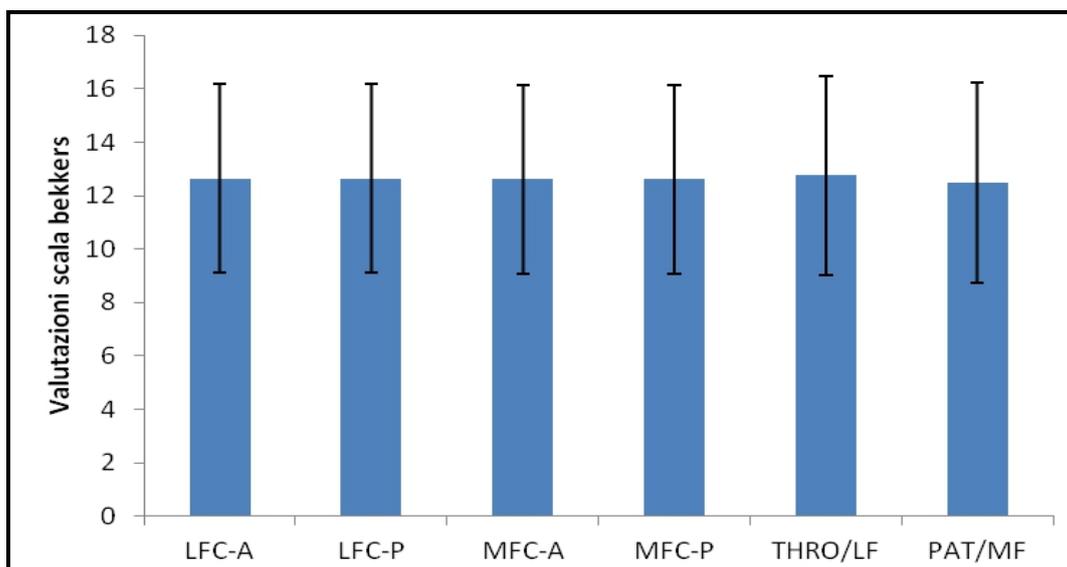


Figura 3.15: Valutazioni del sito d'impianto con la scala Bekkers.

Effettuando un'analisi statistica (ANOVA) dei dati ottenuti dalle valutazioni dell'impianto è possibile notare che i diversi metodi di fissaggio influiscono significativamente sull'esito della prova. In particolare la tecnica del press-fit dà risultati significativamente inferiori rispetto alle altre tecniche per quanto

riguarda la stabilizzazione dell'impianto. Si rileva, invece, che tra i diversi siti d'impianto e tra le diverse forme dello scaffold non vi è differenza significativa ($\alpha=0,05$) (Tabella 3.3).

	Fissaggio	Dimensione	Sito impianto
F (Drobnic)	3,3217	0,3541	1,4558
F_critico (Drobnic)	2,6657	3,9042	2,2762
H0/H1	H1	H0	H0
F (Bekkers)	4,2297	0,0002	1,6799
F_critico (Bekkers)	2,6657	3,9042	2,2762
H0/H1	H1	H0	H0

Tabella 3.3: ANOVA.

3.6 POSSIBILITÀ DI TAGLIO

Come già descritto nel precedente capitolo la possibilità di taglio dello scaffold è fondamentale poiché permette la realizzazione di campioni delle misure idonee al sito d'impianto.

3.6.1 RISULTATI TEST CON PRESSA IDRAULICA E FUSTELLA

Con il metodo di taglio descritto, utilizzando una pompa idraulica e una fustella, è possibile ottenere scaffold di ogni dimensione, adattabili perciò ai diversi siti d'impianto. In Figura 3.16 sono riportati degli scaffold con diametro 12 mm.



Figura 3.16: Campioni ottenuti dal test di taglio con pressa idraulica e fustella.

Effettuando un'analisi visiva è possibile osservare che superfici dello scaffold non risultano essere compromesse dal taglio. Questo metodo risulta essere veloce e praticabile sia in scala di laboratorio che in produzione, ottimizzando il sistema mediante l'utilizzo di più fustelle.

3.6.2 RISULTATI TEST CON FORBICI

È possibile effettuare il taglio dello scaffold mediante l'utilizzo di forbici. In Figura 3.17 è possibile vedere lo scaffold tagliato seguendo questa modalità.



Figura 1.17: Scaffold tagliato con forbice.

È possibile notare, mediante analisi visiva, che questo tipo di taglio non porta alla delaminazione dello scaffold e non rende i bordi frastagliati (Figura 3.18).



Figura 3.18: Bordi dello scaffold tagliato con forbici.

Questo metodo risulta essere molto veloce o utilizzabile dal chirurgo anche in sala operatoria per la realizzazione di scaffold rettangolari o quadrati in base alle esigenze del paziente.

CAPITOLO 4:

CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI

L'attività di ricerca condotta nel presente lavoro ha esplorato alcuni dei parametri critici nella realizzazione di materiali biomimetici e bioattivi per la rigenerazione cartilaginea.

Alla luce dei risultati ottenuti si possono trarre alcune importanti conclusioni:

1. È stato sviluppato un processo che permette di realizzare un sostituto condrale composto da due strati: uno strato di collagene di spessore pari a 2 mm e uno strato di collagene mineralizzato (con magnesio-apatite) con spessore di circa 0,5 mm. Ciò è stato verificato mediante analisi SEM;
2. Il materiale realizzato risulta avere una grande porosità, compatibile con la penetrazione cellulare, e un'elevata idrofilicità. La struttura e la chimica dello scaffold riproducono le caratteristiche del comparto ostecondrale, rendendo il prodotto biomimetico;
3. Il tempo di degradazione del campione risulta equivalente, e in alcuni casi maggiore, rispetto a quello del prodotto in commercio. Si ipotizza quindi essere sempre superiore a 6 mesi in vivo, come richiesto da specifica;
4. È stata ottimizzata la reazione di reticolazione riducendo il tempo di reticolazione da 48 ore a 16 ± 4 ore. Ciò è stato possibile aumentando la temperatura di reticolazione da 4 °C a 37 °C. I campioni prodotti con i

due processi non hanno differenza significativa in termini di grado di reticolazione.

5. Il contenuto di acqua residua nel campione dopo la liofilizzazione dello scaffold bistrato, che permette di valutare la shelf life del prodotto, è sempre inferiore al 16%, limite riportato in specifica;
6. È possibile ottenere una buona integrazione tra gli strati tale da non permettere delaminazione in fase d'impianto. Questo parametro è stato verificato durante il test d'impianto (cadaver lab);
7. È possibile utilizzare diverse tecniche di fissaggio in grado di garantire la stabilità dello scaffold nel sito d'impianto, eventualmente accompagnate da tecniche di stimolazione del midollo osseo, quali press-fit, suture, colla di fibrina e pins;
8. È stata valutata la possibilità di impiantare lo scaffold in chirurgia aperta o mini-invasiva (artroscopia e/o 'mini arthrotomy arthroscopically assisted').

In Tabella 4.1 sono riassunte le specifiche valutate, gli obiettivi raggiunti e i punti ancora da verificare.

Specifica valutata	Risultati ottenuti
Biomimesi	<ul style="list-style-type: none"> • Lo spessore risulta essere in specifica; • La percentuale in peso di residuo minerale risulta essere vicina a quella teorica; • Elevata porosità.
Rischio di delaminazione	<ul style="list-style-type: none"> • Superficie liscia ottenuta mediante l'introduzione di piastre teflonate.
Spessore dello scaffold	<ul style="list-style-type: none"> • Spessore totale dello scaffold idratato $\approx 2,5$ mm.
Tempi di degradazione	<ul style="list-style-type: none"> • Tempo di degradazione in vivo maggiore di sei mesi.
Shelf life (contenuto d'acqua)	<ul style="list-style-type: none"> • Percentuale di acqua residua in specifica.
Impiantabilità	<ul style="list-style-type: none"> • Possibilità d'impianto dello scaffold con diverse tecniche di fissaggio.
Possibilità di taglio	<ul style="list-style-type: none"> • Possibilità di taglio con pressa idraulica e fustella o con forbice senza delaminazione del campione.

Tabella 4.1: Tabella riassuntiva specifiche scaffold ultraslim.

Il materiale risulta quindi promettente per le indicazioni cliniche.

Nonostante i numerosi aspetti valutati in questo lavoro sarà necessario approfondire l'attività di ricerca e sviluppo sul materiale ottenuto. In particolare si dovrà:

- valutare l'influenza del pH durante il processo di sintesi sulle caratteristiche del semilavorato, e quindi sul prodotto finito;

- rilevare la quantità di acqua residua dopo i lavaggi nel semilavorato e valutare la correlazione con l'acqua residua sul prodotto finito.

Il processo sarà ora trasferito in produzione e si dovrà:

- effettuare uno scale up del processo di stesura in modo da poter utilizzare piastre con uno o più pozzetti di dimensioni maggiori a quelli attualmente utilizzati ottimizzando quindi il numero di campioni prodotti;
- definire il processo di taglio dello scaffold a livello industriale, utilizzando macchine fustellatrici.

A seguito del presente lavoro e dei possibili futuri sviluppi, si renderà necessaria una caratterizzazione cellulare in vitro per valutare la citotossicità e la capacità proliferativa dello scaffold sviluppato. Saranno inoltre necessarie validazioni in vivo su animale che serviranno per valutare le capacità rigenerative in termini di tempo, di qualità della cartilagine neo-formata e di capacità di progressivo bio-riassorbimento.

Un'ulteriore attività che può essere considerata in futuro riguarda la possibilità di funzionalizzare lo scaffold con molecole bioattive che ne migliorino le proprietà in vivo.

BIBLIOGRAFIA

- ❖ [1] Peter G. Alexander, Riccardo Gottardi, Hang Lin, Thomas P. Lozito and Rocky S. Tuan, *Three-dimensional osteogenic and chondrogenic systems to model osteochondral physiology and degenerative joint diseases*, *Experimental Biology and Medicine* Vol. 239 (2014), pp. 1080–1095;
- ❖ [2] Sunita Suri and David A. Walsh, *Osteochondral alterations in osteoarthritis*, *Bone* Vol. 51 (2012), pp. 204–211;
- ❖ [3] Jennifer Hwang, *Integration of cartilage and bone through a calcified cartilage interface to form a functional osteochondral graft*, 2010;
- ❖ [4] M. Jaconi, G. Gridavilla, F. Pagni, D. Munegato and G. Zatti, *OSTEOARTROSI, FOCUS* Vol. 40 (2014), pp. 188-216;
- ❖ [5] Wojciech Swieszkowski, Barnabas Ho Saey Tuan, Krzysztof J. Kurzydowski and Dietmar W. Hutmacher, *Repair and regeneration of osteochondral defects in the articular joints*, *Biomolecular Engineering* Vol. 24 (2007), pp. 489–495;
- ❖ [6] Amos Matsiko, Tanya J. Levingstone and Fergal J. O'Brien, *Advanced Strategies for Articular Cartilage Defect Repair*, *Materials* Vol. 6 (2013), pp. 637-668;
- ❖ [7] Silvia Panseri, Alessandro Russo, Carla Cunha, Alice Bondi, Alessandro Di Martino, Silvia Patella and Elizaveta Kon, *Osteochondral tissue engineering approaches for articular cartilage and subchondral bone regeneration*, *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* Vol. 20 (2012), pp. 1182–

1191;

- ❖ [8] Zeng Li, Tianyi Zhu and Weimin Fan, *Osteochondral autograft transplantation or autologous chondrocyte implantation for large cartilage defects of the knee: a meta-analysis*, Springer (2015);
- ❖ [9] A. R. Memon and J. F. Quinlan, *Surgical Treatment of Articular Cartilage Defects in the Knee: Are We Winning?*, Advances in Orthopedics (2012);
- ❖ [10] Kivanc Atesok, M. Nedim Doral, Jon Karlsson, Kenneth A. Egol, Laith M. Jazrawi, Paulo G. Coelho, Amaury Martinez, Tomoyuki Matsumoto, Brett D. Owens, Mitsuo Ochi, Shepard R. Hurwitz, Anthony Atala, Freddie H. Fu, Helen H. Lu and Scott A. Rodeo, *Multilayer scaffolds in orthopaedic tissue engineering*, Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc (2014);
- ❖ [11] Patcharakamon Nooeaid, Vehid Salih, Justus P. Beier and Aldo R. Boccaccini, *Osteochondral tissue engineering scaffolds, stem cells and applications*, Journal of Cellular and Molecular Medicine Vol. 16 (2012);
- ❖ [12] Azizeh-Mitra Yousefi, Md Enamul Hoque, Rangabhatala G. S. V. Prasad and Nicholas Uth, *Current strategies in multiphasic scaffold design for osteochondral tissue engineering: A review*, Wiley Periodicals, Inc. (2014);
- ❖ [13] Raymond Zeeman, *Cross-linking of collagen-based materials*, 1970;
- ❖ [14] Ying Zhang, Fuyou Wang, Hongbo Tan, Guangxing Chen, Lin Guo and Liu Yang, *Analysis of the Mineral Composition of the Human Calcified Cartilage Zone*, International Journal of Medical Sciences Vol. 9 (2012);

- ❖ [15] P. Nooeaid, V. Salih, J. P. Beier and A. R. Boccaccini, *Osteochondral tissue engineering: scaffolds, stem cells and applications*, Journal of Cellular and Molecular Medicine Vol. 16 (2012), pp. 2247-2270;
- ❖ [16] H. K.Tam, A. Srivastava, C. W. Colwell and D. D. D’Lima, In Vitro Model of Full-Thickness Cartilage Defect Healing, Journal of Orthopaedic Research (2007), pp.1136-1144;
- ❖ [17] X.L. Yuan, H.Y. Meng, Y.C. Wang, J. Peng, Q.Y. Guo, A.Y. Wang and S.B. Lu, *Bone-cartilage interface crosstalk in osteoarthritis: potential pathways and future therapeutic strategies*, Osteoarthritis and Cartilage Vol. 22 (2014), pp. 1077-1089;
- ❖ [18] K. P. H. Pritzker, S. Gay, S. A. Jimenez, K. Ostergaard, J.-P. Pelletier, P. A. Revell, D. Salter, F.R.C. Path and W. B. van den Berg, *Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging*, OsteoArthritis and Cartilage Vol. 14 (2006), pp. 13-29;
- ❖ [19] Anna Litwic, Mark H. Edwards, Elaine M. Dennison, and Cyrus Cooper, *Epidemiology and burden of osteoarthritis*, British Medical Bulletin Vol. 105 (2013); pp. 185–199;
- ❖ [20] Yuqing Zhang and Joanne M. Jordan, *Epidemiology of Osteoarthritis*, Clin Geriatr Med Vol. 26 (2010), pp. 355–369;
- ❖ [21] T. Neogi, *The epidemiology and impact of pain in osteoarthritis*, Osteoarthritis and Cartilage Vol. 21 (2013), pp. 1145-1153;
- ❖ [22] Henry Knipe, Vivek Pai et al., *Kellgren and Lawrence system for classification of osteoarthritis of knee*, Radiopaedia;

- ❖ [23] E. Carlos Rodriguez-Merchaín and Primitivo Gomez-Cardero, *The Outerbridge Classification Predicts the Need for Patellar Resurfacing in TKA*, *Clinical Orthopaedics and Related Research* (2010), pp. 1254-1257;
- ❖ [24] Santos Castaneda, Jorge A. Roman-Blas, Raquel Largo and Gabriel Herrero-Beaumont, *Subchondral bone as a key target for osteoarthritis treatment*, *Biochemical Pharmacology* Vol. 83 (2012), pp. 315–323;
- ❖ [25] Yves Henrotin , Marc Marty and Ali Mobasheri, *What is the current status of chondroitin sulfate and glucosamine for the treatment of knee osteoarthritis?*, *Maturitas* Vol. 78 (2014), pp. 184-187;
- ❖ [26] Simon Wandel, Peter Ju'ni, Britta Tendal, Eveline Nuesch, PeterMVilliger, Nicky J Welton, Stephan Reichenbach and Sven Trelle, *Effects of glucosamine, chondroitin, or placebo in patients with osteoarthritis of hip or knee: network meta-analysis*, *BMJ* (2010);
- ❖ [27] David T. Felson, Reva C. Lawrence, Marc C. Hochberg, Timothy McAlindon, Paul A. Dieppe, Marian A. Minor, Steven N. Blair, Brian M. Berman, James F. Fries, Morris Weinberger, Kate R. Lorig, Joshua J. Jacobs and Victor Goldberg, *Osteoarthritis: New Insights. Part 2: Treatment Approaches*, *Annals of Internal Medicine* Vol. 133 (2000), pp. 726-737;
- ❖ [28] A. H. Gomoll, G. Filardo, F. K. Almqvist, W. D. Bugbee, M. Jelic, J. C. Monllau, G. Puddu, W. G. Rodkey, P. Verdonk, R. Verdonk, S. Zaffagnini and M. Marcacci, *Surgical treatment for early osteoarthritis. Part II: allografts and concurrent procedures*, *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* Vol. 20 (2012), pp. 468-486;
- ❖ [29] A. H. Gomoll, G. Filardo, L. de Girolamo, J. Esprequeira-Mendes, M.

Marcacci, W. G. Rodkey, R. J. Steadman, S. Zaffagnini and E. Kon, *Surgical treatment for early osteoarthritis. Part I: cartilage repair procedures*, *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* (2011);

- ❖ [30] Ming Liu, Xi Yu, Fuguo Huang, Shiqiang Cen, Gang Zhong and Zhou Xiang, *Tissue Engineering Stratified Scaffolds for Articular Cartilage and Subchondral Bone Defects Repair*, *Orthopedics* Vol. 36 (2013), pp. 868-873;
- ❖ [31] Dae Kyung Bae, Kyoung Ho Yoon and Sang Jun Song, *Cartilage Healing After Microfracture in Osteoarthritic Knee*, *The Journal of Arthroscopic and Related Surgery* Vol. 22, (2006), pp. 367-374;
- ❖ [32] Surgical Technique Kai Mithoefer, Riley J. Williams III, Russell F. Warren, Hollis G. Potter, Christopher R. Spock, Edward C. Jones, Thomas L. Wickiewicz and Robert G. Marx, *Chondral Resurfacing of Articular Cartilage Defects in the Knee with the Microfracture Technique*, *J Bone Joint Surg Am* Vol. 88 (2006), pp. 294 -304;
- ❖ [33] L. Hangody, G. Kish, Z.Kárpáti, I. Szerb and I. Udvarhelyi, *Arthroscopic autogenous osteochondral mosaicplasty for the treatment of femoral condylar articular defects. A preliminary report.*, *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* Vol. 5 (1997), pp. 262-267;
- ❖ [34] Jaskarndip Chahal, Allan E. Gross, Christopher Gross, Nathan Mall, Tim Dwyer, Amanjot Chahal, Daniel B. Whelan, and Brian J. Cole, *Outcomes of Osteochondral Allograft Transplantation in the Knee*, *The Journal of Arthroscopic and Related Surgery* Vol. 29 (2013), pp. 575-588;
- ❖ [35] M. T. Ghazavi, K. P. Pritzker, A. M. Davis and A. E. Gross, *Fresh Osteochondral Allografts For Post-Traumatic Osteochondral Defects Of The*

Knee, The Journal Of Bone And Joint Surgery Vol. 79 (1997), pp. 1008-1013;

- ❖ [36] M. Brittberg, A. Lindahl, A. Nilsson, C. Ohlsson, O. Isaksson and L. Peterson, *Treatment of deep cartilage defect in the knee with autologous chondrocyte transplantation*, New England Journal of Medicine Vol. 28 (1994), pp. 889-895;
- ❖ [37] Anna Tampieri, Simone Sprio, Monica Sandri and Federica Valentini, *Mimicking natural bio-mineralization processes: A new tool for osteochondral scaffold development*, Trends in Biotechnology Vol. 29 (2011), pp. 527-535;
- ❖ [38] Soo-Hong Lee and Heungsoo Shin, *Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering*, Advanced Drug Delivery Reviews Vol. 59 (2007), pp. 339–359;
- ❖ [39] Peter Angele, Jochen Abke, Richard Kujat, Hubert Faltermeier, Detlef Schumann, Michael Nerlich, Bernd Kinner, Carsten Englert, Zbigniew Ruzczak, Robert Mehrl and Rainer Mueller, *Influence of different collagen species on physico-chemical properties of crosslinked collagen matrices*, Biomaterials Vol. 25 (2004), pp. 2831-2841;
- ❖ [40] G. Filardo, A. Di Martino, E. Kon, M. Delcogliano and M. Marcacci, *Midterm Results of a Combined Biological and Mechanical Approach for the Treatment of a Complex Knee Lesion*, Cartilage Vol. 3 (2012), pp. 288-292;
- ❖ [41] E. Arcangeli, D. Pressato, E. Kon, A. Tampieri, B. Parma and M. Marcacci, *Novel nano-composite biomaterial for osteochondral tissue engineering: pilot clinical study*, Journal of Applied Biomaterials &

Biomechanics Vol. 8 (2010), pp. 103;

- ❖ [42] E. Arcangeli, E. Kon, M. Delcogliano, R. Giardino, M. Fini, A. Tampieri, D. Pressato and M. Marcacci, *Nanocomposite biomimetic scaffold in knee osteochondral defect regeneration: an animal study*, Journal of Applied Biomaterials & Biomechanics Vol. 7 (2009), pp. 52;
- ❖ [43] Giuseppe Filardo, Elizaveta Kon, Alessandro Di Martino, Maurizio Busacca, Giulio Altadonna and Maurilio Marcacci, *Treatment of Knee Osteochondritis Dissecans With a Cell-Free Biomimetic Osteochondral Scaffold. Clinical and Imaging Evaluation at 2-Year Follow-up.*, The American Journal of Sports Medicine Vol. XX (2013), pp. 1-8;
- ❖ [44] A. Tampeiri, S. Sprio, M. Sandri and F. Valentini, *Mimicking natural bio-mineralization processes: a new tool for osteochondral scaffold development*, Trends in Biotechnology Vol. 29 (2011), pp. 526-535;
- ❖ [45] Elizaveta Kon, Francesca Vannini, Roberto Buda, Giuseppe Filardo, Marco Cavallo, Alberto Ruffilli, Matteo Nanni, Alessandro Di Martino, Maurilio Marcacci and Sandro Giannini, *How to Treat Osteochondritis Dissecans of the Knee: Surgical Techniques and New Trends*, The Journal OF BONE AND JOINT SURGERY Vol. 9 (2012);
- ❖ [46] Federica Valentini, *Sviluppo Di Impianti Ceramici Biomimetici A Porosita' Controllata Per La Rigenerazione Del Tessuto Osseo*, 2010;
- ❖ [47] Raymond Zeeman, Pieter J. Dijkstra, Pauline B. van Wachem, Marja J. A. van Luyn, Marc Hendriks, Patrick T. Cahalan and Jan Feijen, *The kinetics of 1,4-butanediol diglycidyl ether crosslinking of dermal sheep collagen*, John Wiley & Sons (2000), pp. 541-548;

- ❖ [48] Diego G. Miranda, Sonia M. Malmonge, Doris M. Campos, Nina G. Attik, Brigitte Grosogeat and Kerstin Gritsch, *A chitosan-hyaluronic acid hydrogel scaffold for periodontal tissue engineering*, Society for Biomaterials (2015);

- ❖ [49] Iris Metzmacher, *Enzymatic degradation and drug release behavior of dense collagen implants*, 2005;

- ❖ [50] Dean J. Harrington, *Bacterial Collagenases and Collagen-Degrading Enzymes and Their Potential Role in Human Disease*, INFECTION AND IMMUNITY Vol. 64, pp. 1885-1891;

- ❖ [51] William A. Bubnis and Clyde M. Ofner III, *The Determination of ϵ -Amino Groups in Soluble and Poorly Soluble Proteinaceous Materials by a Spectrophotometric Method Using Trinitrobenzenesulfonic Acid*, ANALYTICAL BIOCHEMISTRY Vol. 207 (1992), pp. 129-133;

- ❖ [52] Ciara M. Murphy, Matthew G. Haugh and Fergal J. O'Brien, *The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen-glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering*, Biomaterials Vol. 31 (2010), pp. 461-466.

SITOGRAFIA

❖ www.wikipedia.org

❖ www.treccani.it

❖ www.orthoinfo.org

❖ www.diflon.it

❖ www.oppo.it

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio il Prof. Luca Cristofolini per i suoi consigli e per la sua presenza in questa attività di tesi.

Ringrazio l'Ing. Elisa Figallo per avermi dato la possibilità di svolgere questo lavoro di tesi, per avermi resa partecipe delle attività svolte all'interno dell'Azienda e per la sua disponibilità.

Ringrazio il Dott. Francesco Cefali per avermi seguita nelle attività in laboratorio con la sua esperienza e per avermi insegnato davvero molto.

Ringrazio la mia famiglia perché è fantastica, perché c'è sempre, perché riesce a sostenermi e a farmi ridere.

Ringrazio per prima mia mamma perché con la storia dei pulcini bianchi e dei pulcini neri mi ha sempre fatta sorridere anche prima degli esami più difficili. La ringrazio perché mi ha insegnato ad ottenere le cose da sola, con le mie forze, ma mai senza supporto morale.

Ringrazio mio papà perché è presente, perché è di poche parole ma quelle che dice me le ricordo sempre. Sono orgogliosa di lui almeno quando lui lo è di me.

Ringrazio mio fratello Federico perché senza di lui sarebbe tutto molto più triste, perché so che su di lui potrò contare e perché è il mio fratello perfetto.

Ringrazio Ferdinando, grazie davvero! Grazie per aver condiviso con me i momenti più belli, quelli pieni di euforia e voglia di fare, ma soprattutto grazie per non essertene andato nei momenti più difficili, quando tutto va storto. Te ne sono davvero grata. Spero saremo sempre in grado di supportarci a vicenda come in questi anni.

Ringrazio mia nonna perché c'è e già questo per me è tanto. La ringrazio per avermi cresciuta, per esserci sempre stata nelle tappe importanti della mia vita, per avermi sempre consigliata con proverbi di un tempo e per avermi insegnato a

non sprecare nulla; non sprecherò quindi questa occasione per dirle grazie, grazie di tutto.

Ringrazio la zia Manu e lo zio Ivan che hanno sempre fatto in modo di essere presenti, di aiutarmi ma soprattutto di volermi bene. Grazie zia per quell'affetto che sento nell'aria quando apri la porta di casa e dici 'a son mi', io lo sento.

Ringrazio mia cugina Francesca perché nei momenti più difficili c'è sempre. La ringrazio per i consigli, per i pranzi insieme e per avermi dato la gioia di due fantastici cuginetti: Alessandro e Annagiulia.

Ringrazio zia Giovanna, zio Mimmo, Francesco, Emiliana, Angelo e la piccola Noemi perché mi hanno insegnato che la distanza è solo una questione di geografia. Grazie per essere stati così presenti nonostante i chilometri che ci separano.

Ringrazio chi mi ha vista crescere e ha sempre avuto un ruolo nella mia vita, chi oggi c'è, e può festeggiare con me, e chi non c'è più. Nel mio cuore c'è un grazie anche per voi.

Ringrazio le mie Grazie: grazie Gabriella, grazie Luciana! Grazie per avermi fatta sentire a casa in ogni momento, per aver condiviso tutto con me, grazie per i momenti di sfogo, grazie per il supporto reciproco, grazie per avermi lasciato tanti ricordi bellissimi di questi anni e la voglia di condividere altre mille esperienze.

Ringrazio Sara perché siamo così simili e così diverse, grazie per le lunghissime chiacchierate, per darmi sempre un diverso approccio al problema, per esserci.

Ringrazio Cesena perché è bellissima. Grazie perché la passeggiata in centro riesce a calmarmi anche nei giorni più difficili, perché i tramonti che si vedono riescono ad incantarmi, grazie per avermi fatta crescere, per avermi vista piangere disperata, sorridere soddisfatta e ballare spensierata.

Ringrazio i miei ragazzi del Reparto perché hanno il potere di farmi scordare tutti i miei problemi, perché sanno farmi ridere di cose sciocche e perché grazie a loro non rischio di dimenticarmi come ero alla loro età.

E, alla fine, ringrazio me stessa per la costanza e la determinazione, per lo spirito di sacrificio e la passione, per la voglia di fare sempre meglio e l'amore per quello che studio.