



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

Corso di Laurea in Ingegneria Biomedica

Polimeri biodegradabili in ingegneria biomedica

Biodegradable polymers in biomedical engineering

laureando:

Daniele Paolucci

relatore:

Prof. Alida Mazzoli

Anno accademico 2020/2021

Per chi mi vuole bene:

“it was all a dream”

INDICE

INTRODUZIONE pag 4

1.TESSUTI BIOLOGICI pag 5

1.2 ECM pag 5

1.3 TESSUTI EPITELIALI pag 7

1.4 TESSUTO CARTILAGINEO pag 7

1.4.1 Cartilagine ialina pag 7

1.4.2 cartilagine elastica pag 8

1.4.3 cartilagine fibrosa pag 8

1.5 TESSUTO OSSEO pag 8

1.6 TESSUTO MUSCOLARE pag 10

1.6.1 tessuto muscolare scheletrico pag 10

1.6.2 tessuto muscolare cardiaco pag 10

1.6.3 tessuto muscolare liscio pag 11

1.7 TESSUTO NERVOSO pag 11

2.0 METODI DI ANALISI DEI POLIMERI pag 12

2.1 diffrazione pag 12

2.2 DSC pag 12

2.3 TGA pag 13

2.4 SEM pag 13

2.5 prova a trazione pag 14

2.6 IR-FT pag 15

2.7 IR-FT pag 15

3 METODI DI PRODUZIONE pag 17

3.1 stampaggio a iniezione pag 17

3.2 estrusione pag 17

3.3 bioprinting pag 18

3.4 elettrospinning pag 20

3.5 solvent casting pag 20

3.6 gas foaming pag 21

3.7 plasma pag 22

4 COLTIVAZIONE CELLULARE IN VITRO pag 23

5 INTRODUZIONE AI POLIMERI pag 23

5.1	diffusione	pag 23
5.2	danno da idrolisi	pag 24
5.3	tipi di erosione e conseguenze	pag 26
6	POLIESTERI	pag 28
6.1	PLA-PCL	pag 29
6.2	PGA	pag 30
6.3	PHA	pag 32
6.4	HYAFF-11	pag 33
7	MATERIALI E METODI	pag 34
7.1	PLA+PCL	pag 36
7.2	HYAFF-11	pag 41
7.2.1	coltura ECM	pag 42
7.2.2	HYAFF+PCL	pag 44
7.3	PGA SCAFFOLD	pag 47
7.3.1	PGA-PLA scaffold	pag 51
7.4	SCAFFOLD IN PHB	pag 51
7.5.0	POLIESTERI+(HA E CD)	pag 57
7.5.1	NFM	pag 58
7.5.2	SCAFFOLD IN PCL-PLA	pag 60
8	STUDI CLINICI	pag 63
8.1.1	O'Driscoll score	pag 63
8.1.2	TEGNER ACTIVITY SCORE	pag 65
8.2	cartilagine del ginocchio	pag 65
9	TECNOLOGIE POLIMERICHE	
9.1	ACL	pag 67
9.2	TENDINE DI ACHILLE	pag 67
9.3	CORDE FOCALI	pag 69
9.4	FEGATO	pag 70
9.5	BTE	pag 71
9.6	PELLE ARTIFICIALE	pag 72
10	CONCLUSIONI	pag 73
	RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI	pag 74

INTRODUZIONE

Le proprietà fondamentali dei materiali polimerici atti all'uso biomedico sono:

-biocompatibilità.

-biodegradabilità.

Senza queste proprietà non avrebbe senso parlare di: durevolezza, tenacità, resilienza o adesione e proliferazione cellulare. Il loro compito fondamentale, a differenza delle protesi, è quello di sì sorreggere, in un primo momento, la parte anatomica, ma il fine del materiale è quello di permettere al corpo di "rigenerarsi autonomamente" e di essere sostituito con tessuto biologico (ossa, cartilagine, epidermide...)

Obiettivo di questo lavoro non sarà quello di catalogare gli effetti e le proprietà di ogni combinazione tra polimeri o con altri tipi di fibre, ma di evidenziare come queste intervengano nella vita del materiale. Descrivere il comportamento di ogni polimero, o di ogni combinazione di polimeri, sarebbe comunque non esaustivo, in quanto sia le quantità che la disposizione sono caratterizzanti. Anche indicando il comportamento preciso ad ogni variazione delle caratteristiche sopracitate, non avremmo ancora il quadro completo (ES. metodo di produzione, tempo di coltura in vitro, locazione anatomica dell'impianto, forma dell'impianto...). Dunque analizzeremo i materiali e i metodi di produzione al fine di descrivere i rapporti di questi con: proprietà meccaniche, biocompatibilità, proliferazione e adesione cellulare.

Data la situazione pandemica ho dovuto approfittare, quasi esclusivamente, dei lavori di altri ricercatori, che ringrazio sia perché i loro testi mi hanno consentito la stesura della tesi sia per la loro scelta di rendere il loro lavoro fruibile senza applicazione di formule di acquisto.

1.TESSUTI BIOLOGICI

COLLAGENE

Il collagene è la proteina più abbondante nel corpo umano, dove rappresenta il principale componente strutturale del tessuto connettivo.

Il collagene di Tipo 1 Rappresenta il 90% del collagene dell'organismo ed è costituito da fibre densamente ammassate. Fornisce struttura a pelle, ossa, tendini, cartilagine fibrosa, tessuto connettivo e denti. È inoltre presente nel tessuto cicatriziale, a livello muscolare (nell'endomysio delle miofibrille) e nelle capsule degli organi.

Il collagene di tipo 2 è costituito da fibre più larghe e si trova nella cartilagine ialina. Flessibile e di colore bianco-bluastro, la ialina è il tipo di cartilagine più diffuso nel corpo umano. La ritroviamo ad esempio a livello di costole, naso, trachea, bronchi e laringe. Inoltre, la cartilagine ialina riveste le superfici articolari. La matrice extracellulare della cartilagine articolare ha un'architettura altamente specializzata: la zona superficiale è costituita principalmente da fibre di collagene di tipo 2 allineate parallelamente alla superficie articolare, per resistere alle forze di taglio; la zona profonda è costituita dalle stesse fibre di collagene, allineate però in maniera perpendicolare all'interfaccia ossea per assorbire i carichi di compressione.

Il collagene di tipo II differisce dal collagene di tipo I in alcuni dettagli relativi la sua composizione: l'ordine degli amminoacidi nelle catene differisce leggermente tra il tipo I e il tipo II, poiché il tipo II è costituito da tre catene di collagene identiche, mentre l'elica di tipo I contiene due catene identiche e una terza, diversa.

Il collagene di tipo III si trova spesso con il tipo I. Ad esempio, quando la nostra pelle si riprende da una ferita, il collagene di tipo III opera come tessuto cicatriziale. Si trova anche nelle pareti dei nostri vasi sanguigni, che svolgono un ruolo chiave nel sostenere l'elasticità.

1.2 ECM

La matrice extracellulare (MEC) o ECM (Extracellular matrix), come più comunemente viene definita nell'ambito scientifico internazionale, rappresenta la più complessa unità di organizzazione strutturale dei tessuti degli organismi viventi. I tessuti, infatti, non sono costituiti solo da cellule: una parte rilevante del loro volume è formata dallo spazio extracellulare,

occupato da un'intricata rete di macromolecole, la cui organizzazione tridimensionale rappresenta appunto l'ECM. L'analisi biochimica dell'ECM rivela che essa è composta da una pletera di proteine e polisaccaridi, che si aggregano in un reticolo organizzato in maniera compatta e connesso alla superficie delle cellule che l'hanno prodotto e di quelle circostanti. Se fino a qualche tempo fa si pensava che l'ECM servisse principalmente da impalcatura relativamente inerte in grado di stabilizzare la struttura fisica dei tessuti, è ormai ampiamente dimostrato che l'ECM rappresenta il substrato su cui tutte le cellule dei tessuti possono aderire, migrare, proliferare e differenziare, e che ne influenza inoltre la sopravvivenza, la forma e la funzione. Infatti, le macromolecole dell'ECM sequestrano fattori di crescita, molecole come l'acqua o i minerali, e controllano fenomeni fisiologici, quali la morfogenesi, fisiopatologici, quali la guarigione delle ferite, e patologici, quali l'invasione e la metastatizzazione tumorale. Sebbene l'ECM sia presente strutturalmente e funzionalmente in tutte le componenti tissutali che costituiscono un organo, quali epitelii, vasi, muscoli, nervi e connettivo, è proprio in quest'ultimo, dove è anche definita 'sostanza fondamentale', che essa è più abbondante delle cellule, tanto da determinare le proprietà dell'organo stesso. Se pensiamo che i tessuti connettivi, costituenti primari della cute e delle ossa, formano l'impalcatura degli organi, comprendiamo come sia proprio l'organizzazione quantitativa e qualitativa delle macromolecole della loro ECM a determinare la tipologia di tessuto connettivo più adatto ai requisiti funzionali dei vari organi: l'ECM può calcificare, come nei tessuti ossei, dove forma strutture solide come la roccia, o costituire la struttura trasparente della cornea, o assumere l'organizzazione che conferisce ai tendini la loro enorme resistenza alla trazione. L'ECM non solo si presenta come sostanza extracellulare, ma è anche organizzata in strutture specializzate come le lamine basali (LB). Esse si trovano alla base di tutti gli epitelii e gli endoteli e circondano anche singole cellule muscolari, gli adipociti e le cellule di Schwann, che avvolgono gli assoni neuronali formando la mielina. Le LB giocano anche un ruolo importante nella rigenerazione dei tessuti dopo un danno. Quando tessuti come il muscolo, il nervo e l'epitelio vengono danneggiati, le LB sopravvivono e forniscono un'impalcatura lungo la quale le cellule in rigenerazione possono migrare. (1)

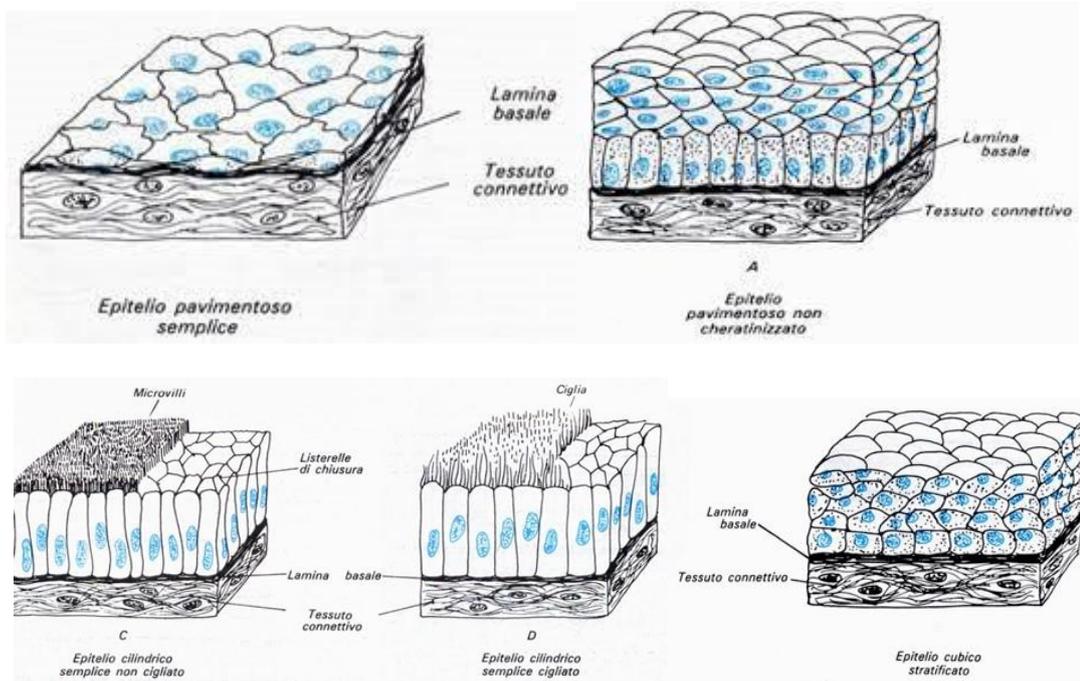
Al loro interno troviamo: glicosamminoglicani (acido ialuronico) e proteine fibrose (collagene ed elastina).

1.3 TESSUTI EPITELIALI

Si dividono in tessuti di rivestimento e ghiandolari.

Quelli di rivestimento si differenziano in monostratificati (composti di un solo strato cellulare) e pluristratificati (composti da più strati di cellule.)

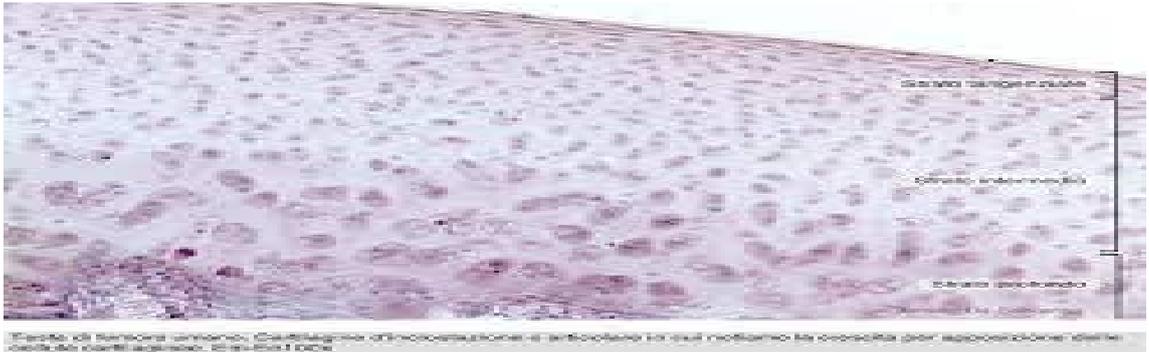
Gli epiteli possono distinguersi in: pavimentosi, isoprismatici(cubici) e batiprismatici(cilindrici).



1.4 TESSUTO CARTILAGINEO

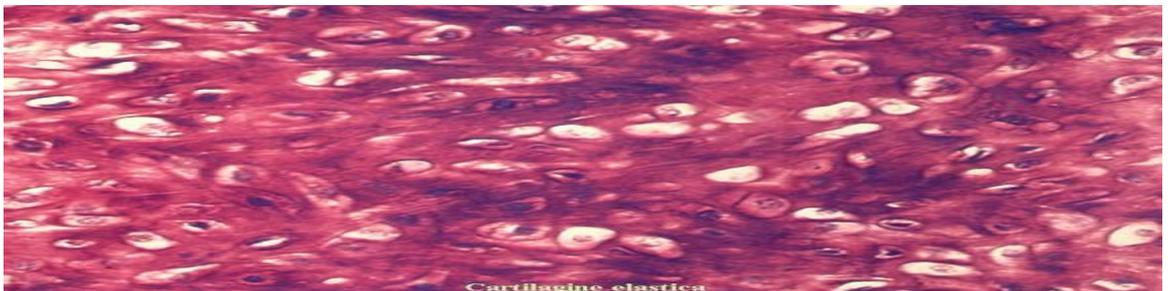
1.4.1 Cartilagine ialina

La cartilagine ialina è di colore bianco, ed è formata da: 65% di acqua, 15% di collagene di tipo 2, 15% da proteoglicani e 5% di condrociti. Non è vascolarizzata quindi tutti processi di nutrizione avvengono attraverso processi diffusivi. La cartilagine ialina viene rivestita da tessuto connettivo vascolarizzato detto pericondrio.



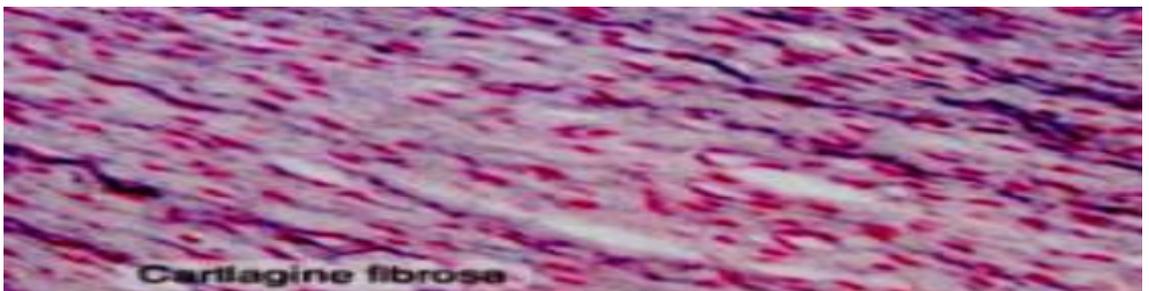
1.4.2 Cartilagine elastica

Di colore giallastro e flessibile a causa della presenza di fibre.



1.4.3 Cartilagine fibrosa

Presente in tutte le articolazioni, i condrociti sono appiattiti e sparsi tra le fibre le abbondanti fibre di collagene, ha proprietà intermedie tra ialina ed elastica. È priva di pericondrio e trae nutrienti per diffusione.



1.5 TESSUTO OSSEO

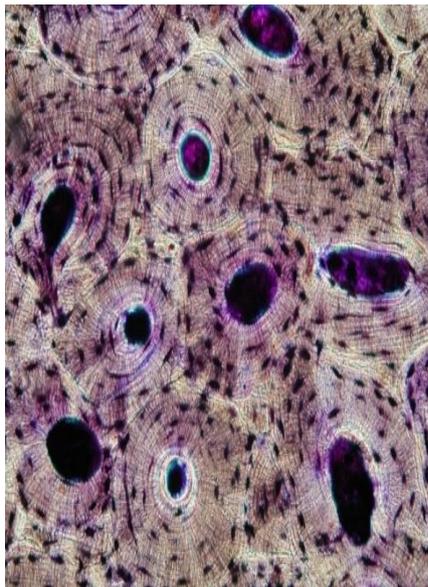
La sua matrice extracellulare è composta dal 60% di materiale inorganico (fosfato di calcio (90%), carbonato di calcio, magnesio, potassio, fluoro...) mentre la parte organica è composta prevalentemente da collagene di tipo 1.

4 sono le tipologie di cellule al suo interno:

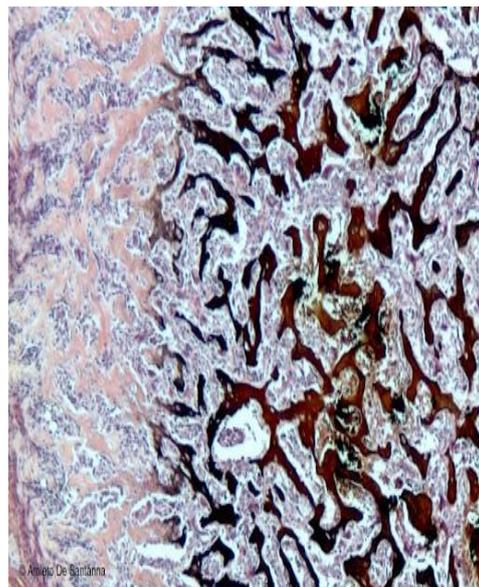
- osteoprogenitrici che si trasformeranno in osteoblasti nella neoformazione di osso
- osteoblasti che producono la matrice cellulare ossea e diventano osteociti
- osteociti risiedono nelle lacune e sono in comunicazione tra di loro attraverso prolungamenti citoplasmatici.
- osteoclasti che hanno capacità fagocitaria.

La maggior parte delle ossa presenta un tessuto lamellare: la matrice cellulare viene organizzata dagli osteoblasti sotto forma di sottilissime lamine che si intrecciano fra loro e gli osteoblasti stessi. Le lamine sono poste parallelamente tra di loro e obliquamente con le fibre di collagene; questa conformazione permette di sopportare meglio le sollecitazioni meccaniche dovute ai carichi.

Se le lamelle si organizzano in strati concentrici intorno al canale centrale, detto di Havers, abbiamo il tessuto osseo compatto. Invece se abbiamo strutture ramificate formate da lamelle sovrapposte (trabecole) si dice osso spugnoso.



Osso compatto



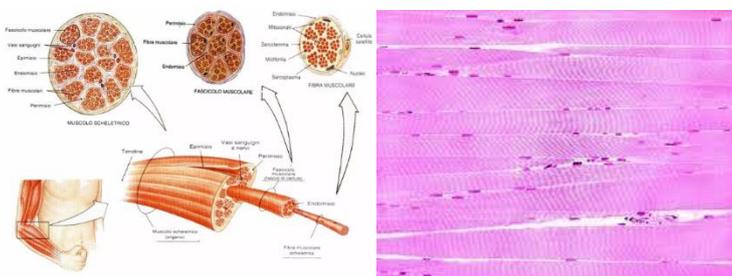
Osso spugnoso

1.6 TESSUTO MUSCOLARE

Il tessuto muscolare presenta tre proprietà: eccitabilità, contrattilità ed elasticità, che permettono la contrazione volontaria o involontaria e la capacità di tornare nel loro stato iniziale.

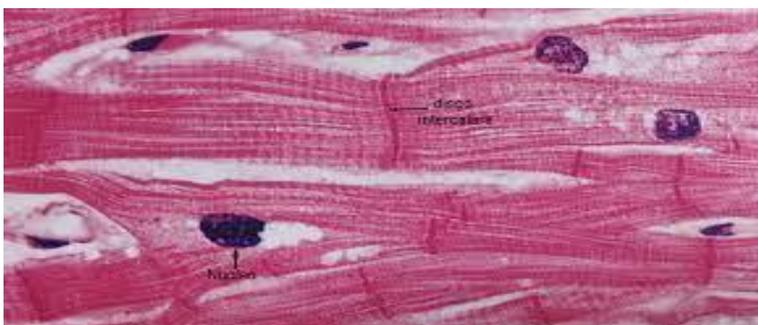
1.6.1 Tessuto muscolare scheletrico

E' ricco di mitocondri, ed è presente per lo più nell'apparato locomotore nei muscoli volontari. Presenta una struttura striata e composta da fibre muscolari. Usualmente lontano da queste sono posizionati diversi nuclei. Unità funzionale del muscolo è il sarcomero.



1.6.2 Tessuto muscolare cardiaco

Permette la sistole e la diastole e le fibre muscolari sono disposte in un reticolo. La cellula cardiaca presenta una forma a "Y" con il nucleo posto nel centro. Si tratta di muscolatura striata simile a quella scheletrica, ma governata autonomamente attraverso gli stimoli elettrici che partono dal nodo senoatriale.



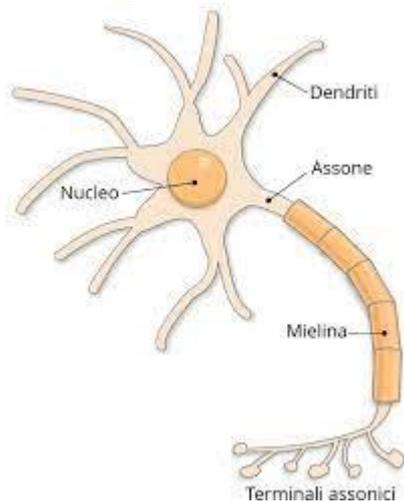
1.6.3 Muscolatura liscia

E' la muscolatura involontaria presente negli organi interni e nelle viscere. Si presenta con lunghi fasci muscolari lisci con un solo nucleo per cellula. I muscoli lisci sono prettamente involontari e innervati dal sistema nervoso simpatico e parasimpatico.



1.7 TESSUTO NERVOSO

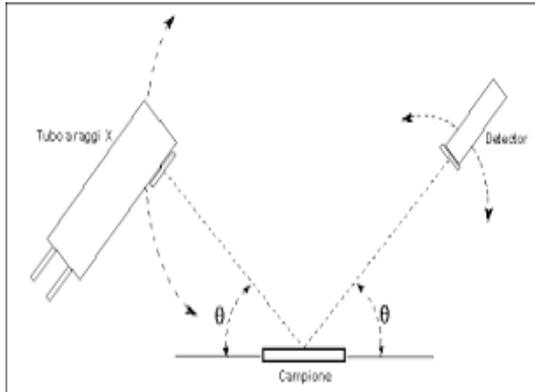
Il tessuto nervoso è composto da neuroni e cellule di sostegno. I neuroni trasmettono e ricevono segnali mediante stimoli elettrici mentre le cellule di sostegno hanno funzione trofica e protettiva.



I neuroni si presentano in varie forme, ma tutti presentano: soma, dendriti, assone e terminazioni. Il soma contiene il nucleo, in cui troviamo la cromatina. L'assone, di forma cilindrica, mantiene il suo calibro per tutta la sua estensione (può arrivare anche ad un metro) ed è rivestito dalla guaina mielinica. I dendriti sono i recettori del segnale e hanno forma ramificata. I neuroni, a differenza delle altre cellule, sono privi di capacità di dividersi e formare nuove cellule. (2)

2.0 Metodi di analisi dei polimeri

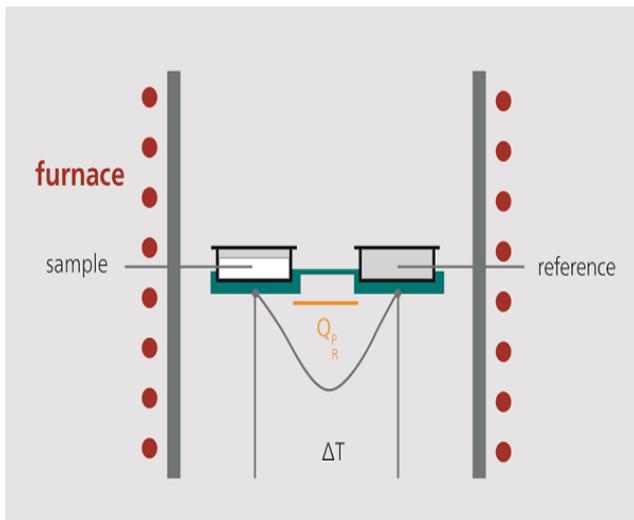
2.1 Diffrazione



La Diffrazione dei Raggi X avviene perché le radiazioni elettromagnetiche hanno una lunghezza d'onda paragonabile alla distanza interplanare degli atomi nei solidi cristallini. Quando un fascio di Raggi X colpisce un solido cristallino, sono prodotti dei picchi di diffrazione

rinforzati di radiazioni di varie intensità. Questa tecnica è adatta solo per analizzare i polimeri semicristallini.

2.2 DSC (calometria differenziale a scansione)

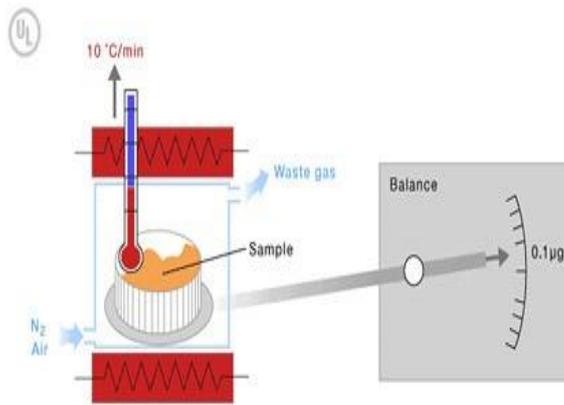


Il campione e un riferimento vengono posti in 2 alloggiamenti separati ed isolati dall'ambiente. Aumentando la temperatura dei provini ne si ricava il flusso di calore secondo la seguente equazione: $\Phi_{FS} = -\lambda A (T_F - T_S / \Delta l)$

dove A è la superficie di scambio, Δl è la distanza dei provini dalla parete isolante, λ

conduttività termica dello strumento.

2.3 TGA (analisi termogravimetrica)

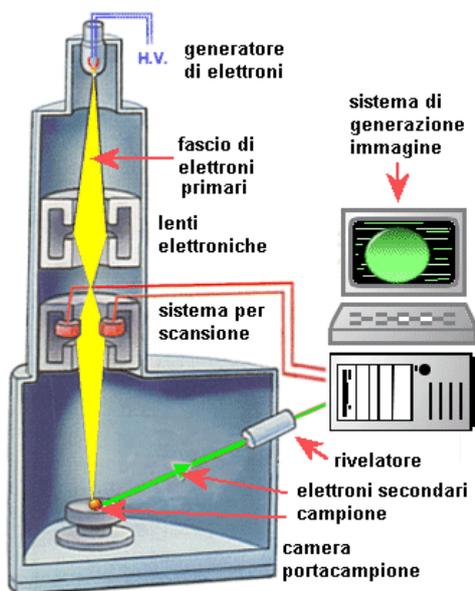


Il campione viene posto su una bilancia di precisione adatta alla registrazione di cambiamenti minimi di peso. Viene innalzata la temperatura gradualmente fino alla degradazione del campione, registrando le temperature alle quali si verificano le perdite di

massa.

Viene utilizzata per verificare le concentrazioni o la purezza dei polimeri.

2.4 SEM (microscopio elettronico a scansione)



Il microscopio non sfrutta la luce come sorgente di radiazioni. Il fascio viene generato da una sorgente elettronica, che emette un flusso di elettroni primari concentrato da una serie di lenti elettromagnetiche e deflesso da una lente obiettivo. Quest'ultima, oltre a rifocalizzare ulteriormente il fascio, impone allo stesso una deflessione controllata, in modo da permettere la scansione di aree del campione. L'interazione fra l'elettrone e la materia è rivelato e trasformato in segnale

elettrico che, trattato e amplificato, viene modulato in segnale televisivo: 1 pixel di un monitor monocromatico è associato ad 1 punto del campione ed è tanto più luminoso quanto più intenso è il segnale. Questi elettroni sono catturati da uno speciale rivelatore e convertiti in

impulsi elettrici che vengono inviati in tempo reale, ad uno schermo (un monitor). Il risultato è un'immagine in bianco e nero ad elevata risoluzione e grande profondità di campo, che ha caratteristiche simili a quelle di una normale immagine fotografica. Il principale vantaggio di questo strumento è associato ad un notevole potere di risoluzione: mentre la luce visibile ha una lunghezza d'onda il cui valore si aggira mediamente intorno ai 5000 Å, un fascio di elettroni accelerati a circa 100 kV può vantare una lunghezza d'onda di circa 0.05 Å. Ciò porta ad una risoluzione migliore.

2.5 Prova a trazione

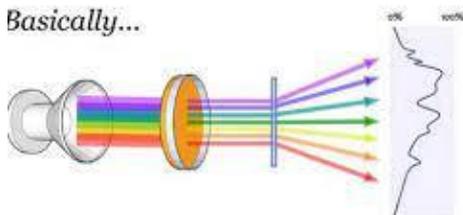


La prova a trazione è una prova di caratterizzazione meccanica del materiale, che in figura è ritagliato nella caratteristica forma a "osso di cane" e posizionato fra 2 morse. La prova consiste nello stiro del materiale fino a rottura o snervamento per analizzare il comportamento e i valori della forza in cui avvengono questi 2 eventi. È utile ricordare la legge di Hook: $\sigma = E\varepsilon$.

Dove σ indica la tensione, ε la deformazione longitudinale e E il modulo elastico.

2.6 Tecniche spettroscopiche IR-FT

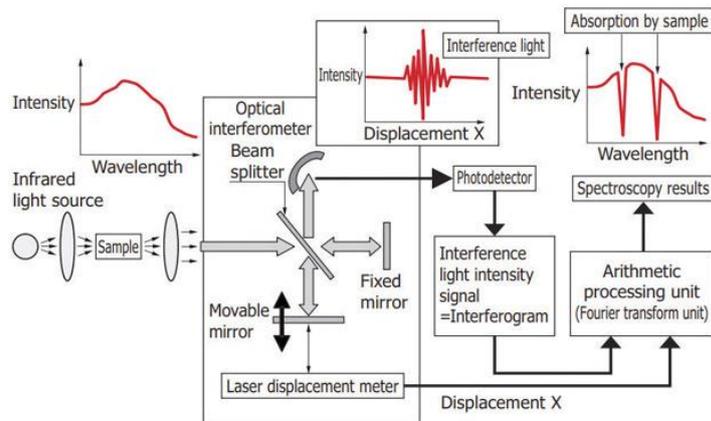
Basically...



La spettroscopia infrarossa o spettroscopia IR è una tecnica spettroscopica di assorbimento. Normalmente, quando un fotone infrarosso viene assorbito da una molecola, questa passa dal suo stato vibrazionale fondamentale ad

uno stato vibrazionale eccitato. In un tipico spettro infrarosso in ascissa troviamo una scala di frequenze espresse in numero d'onda, ovvero quantità di onde per centimetro, e in ordinata la percentuale di trasmittanza. Se un materiale è trasparente alla radiazione infrarossa il suo spettro si presenterà come una linea parallela all'asse delle ascisse. Se un materiale non è completamente trasparente si verificheranno degli assorbimenti e quindi delle transizioni tra livelli energetici vibrazionali. In questo secondo caso lo spettro registrato sarà caratterizzato da una serie di picchi di altezza variabile per ciascuna transizione.

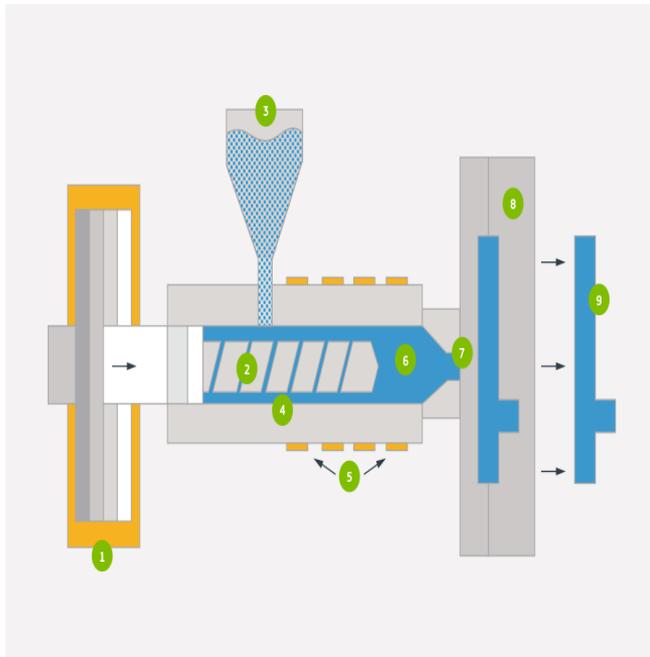
2.7 IR-FT (analisi a infrarossi in trasformata di Fourier)



La spettroscopia in trasformata di Fourier è una tecnica spettroscopica in cui si acquisisce il segnale nel dominio del tempo (o dello spazio), e quindi si ricava lo spettro nel dominio della frequenza tramite un'operazione di trasformata di Fourier. L'obiettivo della spettroscopia in trasformata di Fourier è la misurazione dello spettro di assorbimento di una particolare sostanza, cioè quanto quella sostanza assorba energia sotto forma di luce a diverse lunghezze d'onda. Dapprima viene misurato lo spettro senza alcun campione (la scansione del *background*): in questo modo si può misurare la quantità di luce trasmessa dall'apparato alle diverse frequenze, eseguendo una trasformata di Fourier dello spettro risultante. Successivamente si inserisce la sostanza da analizzare fra la sorgente e l'interferometro: la nuova misurazione, dopo la trasformata di Fourier e la sottrazione del *background*, corrisponderà allo spettro di assorbimento desiderato.

3 METODI DI PRODUZIONE

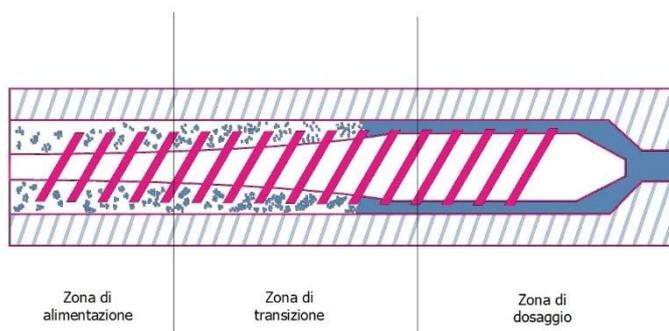
3.1 Stampaggio a iniezione



1. Motore
2. Vite
3. Tramoggia
4. Filettatura
5. Placche riscaldanti
6. Cilindro
7. ugello Stampo
8. oggetto stampato

Il polimero, in forma granulare, viene aggiunto all'interno del cilindro dove viene pressato e riscaldato fino a diventare un fluido plastico. Con l'avanzamento e rotazione della vite, il fluido viene spinto nello stampo dove raffreddandosi solidifica. In ultima istanza la vite viene retratta e il prodotto espulso dallo stampo.

3.2 Estrusione



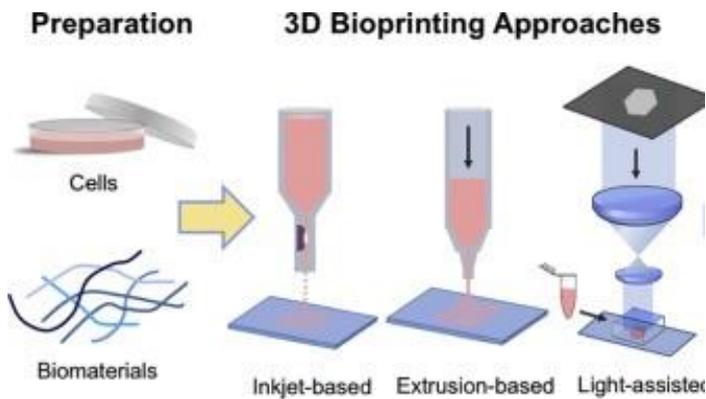
Molto simile all'iniezione, ma con alcune differenze fondamentali.

La vite non avanza ma compie solo moto rotatorio pressando i granuli durante la sua estensione. Difatti

anche la forma della vite varia lungo il canale, dividendolo grossolanamente in 3 parti: alimentazione, colata e dosaggio. Inoltre, il prodotto finale è tubulare.

Anche se iniezione ed estrusione sono metodi affermati nella realizzazione di materiali polimerici, data le alte temperature e pressioni usate, non sono adatti nella realizzazione di impianti che interessano questa tesi.

3.2 BIOPRINTING



Il processo di bio-printing usa come “inchiostro” il cosiddetto bio-ink, un liquido composto da cellule, matrici cellulari e nutrienti.

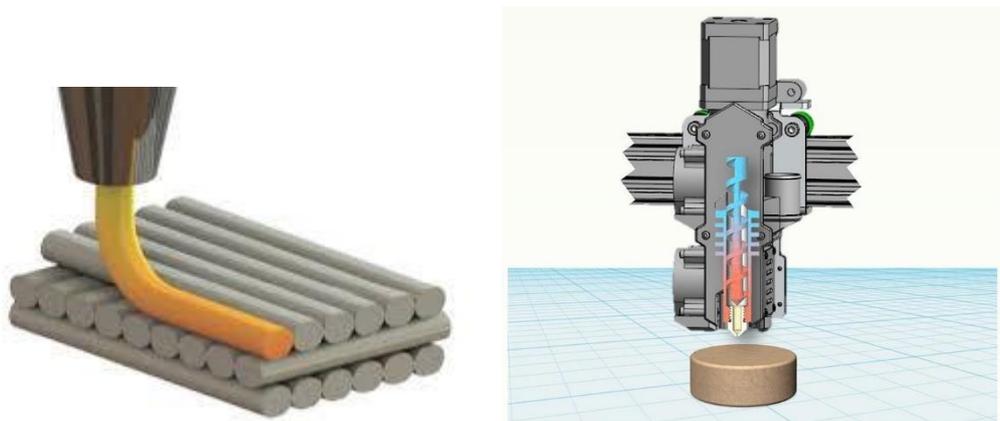
Esistono 3 tipi di stampaggio: inkjet, luce assistita e per mezzo di processi estrusivi.

Ci concentreremo sull'ultimo, visto che le prime 2 hanno bisogno di materiale non sintetico per essere attuate. (3)

Abbiamo 2 tipi di prodotto: una matrice dove materiale cellulare e polimerico sono uniti in un'unica struttura oppure, abbiamo un composto cellulare che viene aggiunto in una matrice polimerica già formata. I sistemi di bioprinting basati sull'estrusione depositano filamenti continui piuttosto che le individuali goccioline di bio-stampato a getto d'inchiostro. Questa tecnologia utilizza una serie di motori automatizzati per controllare la piattaforma e l'ugello della stampante al fine di avere un sistema di erogazione di bio-ink in un momento preciso e una posizione controllata digitalmente da un computer. Diversi approcci possono essere utilizzati per guidare il sistema di erogazione, compreso il controllo basato sulla pressione, il controllo meccanico o il controllo del solenoide. In questo caso, i bioinchiostri acellulari o carichi di cellule possono essere stampati su un substrato ricevente.

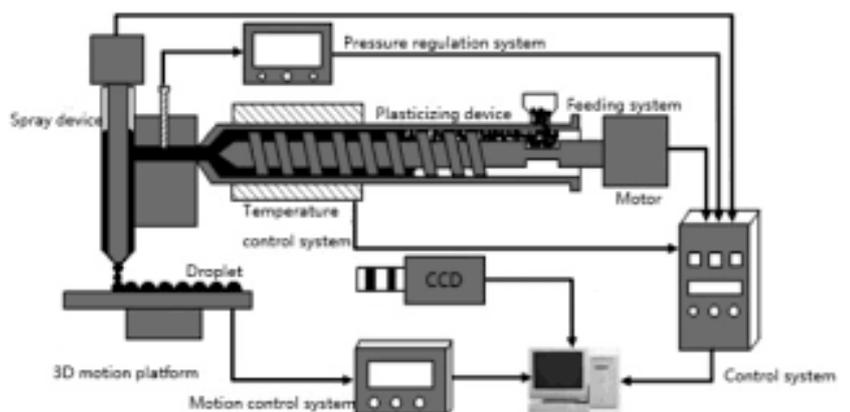
La stampa con ugelli in microscala è compatibile con più tipi di bioinkin. Questa permette: sospensione sferoide cellulare, matrice extracellulare decellularizzata (dECM) soluzioni e idrogel con una gamma più ampia di viscosità come il poli(etilenglicole) (PEG)- a base di idrogel, gelatina, acido ialuronico (HA) e alginato. La stampa di idrogeli viscosi può fornire un supporto meccanico maggiore nella struttura finale. In

particolare, anche la possibilità di utilizzare inchiostri più biocompatibili durante la stampa, basata sull'estrusione, lo rende più adatto per realizzare determinati modelli di tessuto. Il bioprinting basato sull'estrusione ha la più bassa velocità di stampa segnalata tra i tre tipi di approcci, nell'intervallo da 10 a 50 $\mu\text{m/s}$. Inoltre, la risoluzione dei costrutti stampati è generalmente compromessa per consentire strutture 3D con un ingombro maggiore. La risoluzione caratteristica minima dello stampato può essere 5 μm ma è generalmente superiore a 100 μm . Anche la stampa basata su estrusione porta alla morte cellulare indotta dal taglio. I modelli di tessuto privi di caratteristiche su micro-scala come ossa, cartilagine e organoidi possono essere ricavati tramite il metodo dell'estrusione. (4)

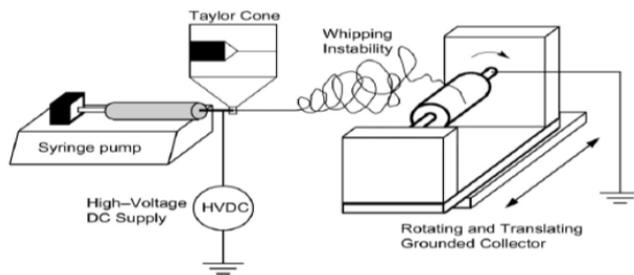


Nella figura di sinistra notiamo l'impacchettamento delle fibre dell'estruso; quella di destra è lo spaccato dell'estrusore montato su un carrello e la caratteristica vite filettata che spinge il composto.

In questa figura un estrusore collegato ad un sistema di controllo gestito da un computer dove lo spessore dell'estruso viene controllato da un dispositivo CCD.



3.4 ELETTROSPINNIG

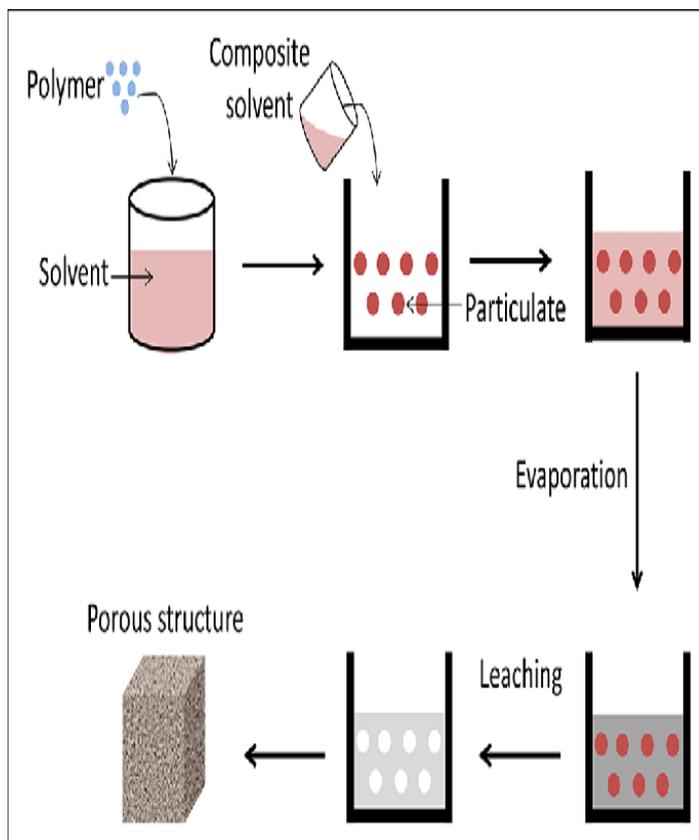


L' elettro-spinning consiste nella formazione di un filamento (nell'ordine di nanometri) prodotto da una siringa-pompa contenente un liquido sottoposto a una

forte tensione (5-50kV) da un generatore. La forma del getto dalla siringa è detto: "cono di Taylor". Il filamento è raccolto dopo un processo di stiratura su un collettore metallico. Il liquido è composto da polimero e solvente. Il secondo svolge due ruoli: in primo luogo scioglie le molecole di polimero per formare il getto elettrificato ed in secondo luogo le trasporta verso il collettore. Non possiamo sovrapporre molti filamenti fra loro poiché la loro carica elettrica residua favorisce una disposizione causale che influisce sulle proprietà meccaniche del materiale.

3.5 Solvent casting

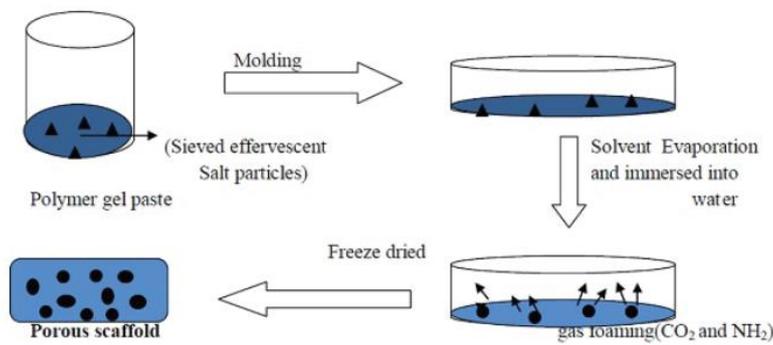
Un polimero viene sciolto in un solvente organico. Alla soluzione vengono



poi aggiunte particelle di dimensioni specifiche. La miscela viene modellata nella sua geometria finale. Ad esempio, può essere colato su una lastra di vetro per produrre una membrana o in uno stampo tridimensionale per produrre uno scaffold. Quando il solvente evapora, crea una struttura di materiale composito costituita dalle sue particelle e dal polimero. Il materiale composito viene quindi posto in un bagno che dissolve le particelle,

lasciando una struttura porosa.

3.6 GAS FOAMING

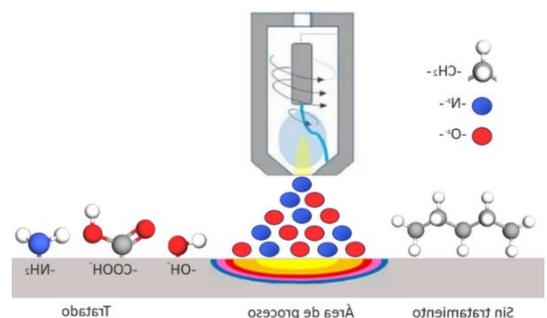


Si basa sull'utilizzo di un sale effervescente come agente schiumogeno gassoso, con le

sue particelle effervescenti setacciate sotto forma di una pasta gel polimerica viene colata in uno stampo e successivamente immersa in acqua calda. L'evoluzione del gas di ammoniaca e anidride carbonica, insieme alla lisciviazione di particelle di bicarbonato di ammonio dalla matrice polimerica solidificante, porta la formazione di pori con elevata interconnettività. Si utilizzano poro-geni gassosi prodotti da reazioni chimiche durante la polimerizzazione o vengono generati dalla fuoriuscita di gas durante un aumento di temperatura o diminuzione della pressione. Questo provoca una diminuzione della solubilità dell'anidride carbonica all'interno del polimero, mentre il gas di anidride carbonica, che cerca di fuoriuscire, provoca la nucleazione e la crescita di bolle, risultando in una microstruttura porosa. Il processo di gas foaming viene utilizzato per fabbricare prodotti altamente porosi senza l'uso di solventi organici, i quali residui possono avere effetti tossici in vitro e infiammatori in vivo. Inoltre il risultato di questo processo è una struttura altamente porosa (93%) con diametro dei micropori compresi tra 200 e 500 μm , ma con grado di cristallinità ridotto. (5)

3.7 PLASMA

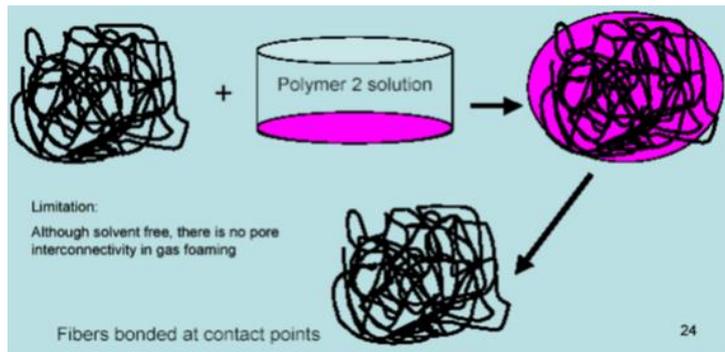
I trattamenti al plasma sono applicabili ad una grande varietà di polimeri e sono principalmente indirizzati ad ottenere un incremento della bagnabilità attraverso l'aggiunta di nuovi gruppi funzionali polari, senza alterare le caratteristiche di base del polimero. Il procedimento è rapido, non lascia residui sulla superficie del pezzo trattato, né comporta il rilascio di prodotti inquinanti nell'ambiente.



Effetto Plasma: Creazione di gruppi polari (come -OH, -C=O, COOH) che aumentano la bagnabilità e la ricettività del polimero. Il plasma può essere generato applicando abbastanza energia a un gas che porta al riarrangiamento della struttura elettronica di atomi o molecole e alla produzione di ioni eccitati. (6)

3.8 FIBER BONDING

Si utilizza un filamento di PLLA immerso in un secondo polimero e si procede a scaldare

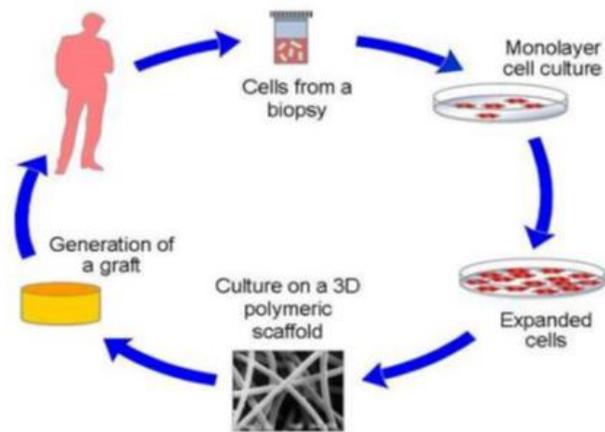


il tutto oltre la temperatura di fusione di entrambi i polimeri.

Il PLLA fonde per primo e si deposita all'interno della struttura dell'altro polimero formata dai punti di giunzione. Si utilizza un solvente che reagisce solo col PLLA in modo da rimuoverlo lasciando così una struttura porosa (81%), con rapporto superficie/volume elevato, i cui pori sono interconnessi, con diametro dell'ordine di 500 μm

L'utilizzo di alte temperature limita la scelta dei polimeri e in combinazione con solventi tossici, rende il prodotto altamente aggressivo sui tessuti in vivo. (7)

4 COLTIVAZIONE CELLULARE IN VITRO



Il procedimento parte con l'estrazione di alcune cellule (es: epiderma, tessuto connettivo...) dal paziente con una biopsia per poi

essere messe in coltura in vitro col supporto polimerico.

Il supporto polimerico deve soddisfare tre requisiti: biocompatibilità, biodegradabilità, porosità.

La porosità è fondamentale in vivo per la colonizzazione da parte delle cellule umane, l'eliminazione delle sostanze di scarto e la vascolarizzazione dell'area.

Ultimo passo è l'impianto del prodotto nel paziente, dove verrà riassorbito e sostituito con cellule proprie del corpo.

5 Introduzione ai polimeri

Prima di trattare i polimeri, è doveroso esporre i fenomeni a cui sono soggetti.

5.1 DIFFUSIONE

La velocità di diffusione dell'acqua nel materiale può essere descritta in maniera ideale tramite la seconda legge di Fick, resa monodimensionalmente valida per i polimeri isotropi.

$$Ddw/dt = D(\delta^2 w / \delta x^2).$$

w = concentrazione di acqua, x è la posizione. D coefficiente di diffusione può essere calcolato in maniera inversa, misurando l'aumento di peso dato dall'umidificazione durante l'incubazione, nei campioni con 2 diametri diversi.

La quantità di acqua si calcola con la formula:

$$m_w = 100(m_{ws} - m_{wr}) / m_{wr}, \text{ con } m_{ws} = \text{peso del campione dopo rigonfiamento,}$$

m_{wr} = peso prima rigonfiamento.

Nel caso di polimeri degradabili, la diffusione è molto più rapida rispetto all'idrolisi tramite H_2O .

Da qui si ha che spesso l'acqua si distribuisce internamente al polimero in maniera uniforme dal principio del processo di erosione, ovvero che l'idrolisi procura una erosione di massa. Ciò si può assumere in maniera ideale per dispositivi a bassa densità come fibre.

5.2 DANNO DA IDROLISI

I gruppi esteri del polimero sono sottoposti ad idrolisi, causando una scissione della catena. L'idrolisi degli esteri può essere a catalizzazione acida (più comune) o basica. Si può notare una perdita di scorrimento viscoso del polimero, quindi un aumento di fragilità.

L'idrolisi è comunemente descritta da una equazione cinetica di primo ordine, secondo lo schema di Michaelis-Menten. Ogni molecola del polimero, con i suoi gruppi terminali alcolici e carbossilici, è spezzato in 2, in maniera casuale nel citato gruppo estere. Il numero dei gruppi terminali carbossilici aumenterà durante la degradazione, mentre le molecole sono scisse dall'idrolisi. L'equazione di primo grado che descrive l'idrolisi, in condizione statica, in funzione della formazione dei gruppi carbossilici sarà:

$$dC/dt = kEwC = u_m C$$

E = gruppi esteri, C = g. Carbossilici, w = acqua nella matrice polimerica,

k = costante cinetica, u_m = velocità dell'idrolisi.

Dove E e w sono costanti nella fase iniziale della reazione.

K dipende da: termini probabilistici della scissione molecolare, dalla temperatura, carico applicato sul materiale e pH dell'acqua coinvolta.

Per ipotesi l'acqua si dispone uniformemente sul campione.

Dato che la concentrazione dei gruppi carbossilici è data da $C = 1/M_{nt}$

Dove M_n è la massa nominale del polimero, quindi si ha

$$M_{nt} = M_{n0} e^{-uMt}$$

Si è visto nel percorso accademico che la resistenza a rottura di un generico polimero termoplastico dipende dalla massa nominale:

$$\sigma = \sigma_{\infty} - B/Mnt = \sigma_{\infty} - B/(M_{n0}e^{-umt}) \quad (1)$$

σ =sforzo di trazione, σ_{∞} =sforzo a trazione a peso molecolare infinito

B= costante.

L'equazione ci mostra la relazione tra tenacità e tempo, dunque è di interesse ingegneristico.

La B deve essere verificata sperimentalmente.

Poi per calcolare il danno dato dall'idrolisi

$$d_h = 1 - \sigma / \sigma_0 \quad (2)$$

Per i poliesteri alifatici, la velocità di idrolisi dipende da: temperature, struttura molecolare, densità gruppi esteri, carico e mezzo di degradazione(solvente).

Il grado di cristallinità può essere un altro elemento determinante, dato che i domini cristallini sono impermeabili, ostacolano l'idrolisi. Dunque, la formazione e la conservazione del materiale hanno importanza nella considerazione di proprietà meccanica. Il pH medio del mezzo influisce sulla velocità di degradazione.

Il corpo umano ha l'abilità di mantenere il pH e la temperatura (in condizioni normali) costanti attraverso organi specializzati (es: reni, ipofisi) al mantenimento dell'omeostasi. Tuttavia, non tutti fattori determinanti nella degradazione del polimero possono essere considerati costanti.

L'influenza meccanica nella velocità di degradazione nell'ambiente circostante è stata studiata. Sembra che le fibre sottoposte a carico si degradino più velocemente rispetto a quelle prive, e la gravità del fenomeno dipende anche dall'entità del carico e dal periodo di assimilazione. Come nella temperatura lo sforzo può favorire la rottura dei legami.

Riprendendo k: dobbiamo ricordarci che il campione non era sottoposto a carico e per questo assume valore costante.

Ma nella maggior parte delle applicazioni il materiale è sottoposto a sforzo. Se il carico rimane costante durante la degradazione, la velocità deve essere calcolata per quel particolare valore.

Per ogni cambio di condizioni: carico, temperatura o ambiente, k non sarà più costante.

Il disfacimento arriva prima nei domini amorfi, quindi l'aumento percentuale della fase cristallina. Per ovviare a questo comportamento, conoscendo il grado di cristallinità, 2 velocità devono essere considerate per entrambe le fasi, 2 apporti di danno da idrolisi devono essere calcolati e considerati rispetto alla composizione del materiale.

5.3 TIPI DI EROSIONE E CONSEGUENZE

È detta omogenea o erosione di massa senza autocatalisi, quando l'idrolisi avviene contemporaneamente su tutto il campione. In questo caso la diffusione viene considerata istantanea. Quindi, la diminuzione del peso molecolare, la perdita delle proprietà meccaniche e la perdita di massa arrivano contemporaneamente su tutto il campione. In questi casi per indicare la variazione dello sforzo meccanico si può evitare di usare l'equazione della diffusione.

nella erosione superficiale, nella quale è interessata la parte vicina alla superficie e il "core" non è toccato in un primo momento dall'idrolisi. Essendo il fenomeno molto lento, è di interesse calcolare la presenza di acqua momento per momento all'interno del materiale, prima di risolvere le equazioni 1 e 2.

I polimeri che tendono ad una erosione superficiale hanno la caratteristica di rilasciare piccolissime particelle, rendendoli strumenti ideali per il rilascio di farmaci.

Altra possibile modalità di erosione è quella mediata da enzimi, dato che questi sono incapaci a diffondersi e presentano una elevata k (costante cinematica), per calcolare il coefficiente di danno d_h si prende una k molto alta e una D (diffusione) vicino allo 0. Questo tipo di erosione va considerato concomitante con l'azione dell'acqua, omogenea o eterogenea.

Erosioni superficiali e di massa sono casi ideali, quindi i loro comportamenti non descrivono quelli di molti polimeri.

Possiamo calcolare la nostra costante di tempo t_H e t_d

$$t_H = 1/kEw = 1/u_M \text{ e } t_d = L^2/D$$

L = densità campione, D = diffusione di H_2O nel polimero.

Se $t_H \gg t_d$ l'acqua raggiunge il centro del materiale prima di reagire, dunque si ha l'omogeneità.

$t_H \ll t_d$ si ha una reazione solo superficiale, ed eterogenea.

Si conclude che: un maggiore rapporto tra superficie e volume porta ad una degradazione più veloce del campione. Questa proprietà è **INDIPENDENTE** dalla dimensione del materiale. Tuttavia, abbiamo considerato una situazione priva di auto-catalizzatori: nel PLA un pezzo con una densità elevata tende ad erodersi prima, perché libera una quantità maggiore di oligomeri di acido carbossilico che vanno ad abbassare il pH locale velocizzando l'erosione. Questo meccanismo genera vuoti all'interno della struttura che complicano l'utilizzo di qualsiasi modello matematico. Fortunatamente questo processo si svolge almeno dopo 8 settimane dall'esposizione al tampone.

Un modello costitutivo è la relazione fra la risposta meccanica di un corpo allo sforzo a cui è sottoposto e la relativa reazione.

Data una relazione non lineare tra sforzo e deformazione, i modelli classici risultano non adatti. Quindi, nelle strutture di PCL-PLA, i modelli classici come neo-Hookean e Mooney-Rivlin possono essere usati per descrivere il comportamento fino a rottura.

Per questi materiali, la rigidità dipende dallo stiramento delle fibre, le proprietà meccaniche degli elastomeri sono comunemente rappresentate in funzione di densità di energia di deformazione (W).

W è uno scalare in funzione del gradiente di deformazione, può essere rappresentata anche con la proprietà del tensore di Cauchy-Green.

Generalmente, la densità di forza per un isotropo incomprimibile e realistico è determinata da 2 invarianti.

$$I_C = I^2 + 2/I$$

$$II_C = 1/I^2 + 2I \quad I = \text{deformazione assiale} \quad I \geq 1.$$

Dunque, per neo-Hookean la formula dell'energia è:

$$W = m_1/2 (I_C - 3)$$

Dove $m_{1,2,3} > 0$ modulo di taglio(modulo elastico tangenziale).

Alternativamente per Mooney-Rivlin

$$W = m_1/2 (I_c - 3) + m_2 (II_c - 3)$$

Altra formula si ottiene come combinazione delle precedenti ed entrambe le invarianti di Cauchy-Green, detta 2^{RID} (ridotta)

$$W = m_1/2(I_c - 3) + m_2/2(II_c - 3) + m_3/6(I_c - 3)(II_c - 3)$$

E gli sforzi assiale corrispondenti sono

$$s^{NH} = m_1 (I - 1/I^2) \text{ neo-hookean}$$

$$s^{MR} = m_1 (I - 1/I^2) + m_2(1 - 1/I^3) \text{ monney-rivilin}$$

$$s^{2rid} = (m_1 - m_3) (I - 1/I^2) + (m_2 - m_3)(1 - 1/I^3) + m_3(I^2 - 1/I^4) \text{ ridotta.}$$

Ricordiamo sempre che i valori delle variabili non sono costanti, ma appunto variano durante la “vita” del materiale. (10)

6 POLIESTERI

I poliesteri alifatici sono largamente usati in applicazioni biomedicali dato che sono propensi a scindersi tramite idrolisi e/o con catene enzimatiche in acido glicolico, poi assorbito dal corpo umano. Questo è funzionale per molte applicazioni biomediche, come i supporti nella medicina rigenerativa.

È auspicabile che la degradazione coincida con la rigenerazione del tessuto. La riduzione di resistenza a trazione di fibre di PLA-PCL segue lo stesso andamento della perdita di peso molecolare, tanto da poter essere descritta da un'equazione di primo grado. Per ogni stadio di degradazione i modelli di: neo-Hookean, Mooney-Rivlin, limitati al secondo ordine, permettono una approssimazione valida del comportamento del materiale. Detto questo, i modelli costitutivi che descrivono il comportamento meccanico durante la degradazione sono proposti e validati sperimentalmente. Questi sono consultabili e adattabili anche per altri materiali biomedici, inoltre sono strumenti fondamentali per la progettazione di presidi biomedici dove la resistenza a trazione è un elemento imprescindibile.

6.1 PLA-PCL

PLA e PCL sono elementi importanti nei poliesteri alifatici, tra i materiali biodegradabili. ($T_m=180^\circ\text{C}$, $E=3.5\text{ GPa}$)

Per quanto riguarda il PLA, è stato comunemente usato sin dagli anni 70.

Le sue 2 forme sono: poli-acido L (PLLA) e poli-acido D(PDLA).

Il PDLA presenta una maggiore velocità di degradazione rispetto al PLLA.

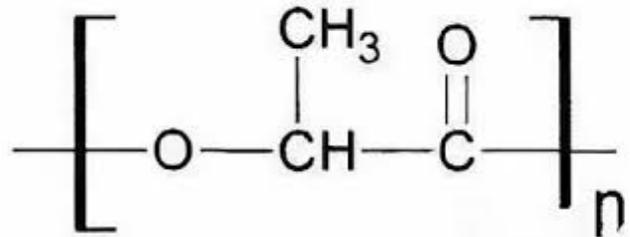
Difatti degrada in acido lattico nel periodo di 10 mesi/4 anni, a seconda del suo peso molecolare, grado di cristallinità, forma e posizione del dispositivo.

Il PLLA invece è molto più rigido e meno duttile e tende a degradarsi in più tempo.

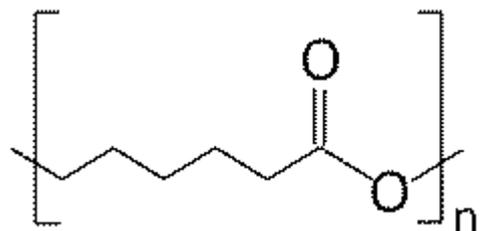
Dato che il PCL è particolarmente duttile e presenta poca rigidità, con modulo elastico intorno a $0,21-0,44\text{ GPa}$, migliora le proprietà meccaniche del PLA.

Il PLLA è vetroso a temperatura corporea ($T_g=-60^\circ\text{C}$). il modulo elastico e la resistenza a rottura del composito (PLA+PCL) sono migliorate rispetto al puro PLLA.

D'altro canto, i prodotti della degradazione sono noti per la diminuzione del pH locale, in situazioni di degradazione veloce si hanno rischi di infiammazione. (40)



Il policaprolattone (PCL o PLC) è un polimero semicristallino sintetico biodegradabile. Il policaprolattone si ottiene per polimerizzazione ad apertura di anello usando l'ottanoato stannoso come catalizzatore. Ha una temperatura di fusione di $59-64^\circ\text{C}$ e una temperatura di transizione vetrosa vicina ai -60°C : quest'ultima è particolarmente bassa rispetto ad altri polimeri biorassorbibili usati per applicazioni biomediche. La temperatura di decomposizione è pari a 360°C .



La combinazione con il PCL ha la qualità di ridurre al minimo l'acidificazione, scongiurando l'infiammazione.

Il grado di erosione associato alla biodegradazione è tipicamente correlato alla perdita di massa. La percentuale di perdita di massa, $W_L\%$, è calcolato con:

$$W_L\% = 100(W_0 - W_r) / W_0.$$

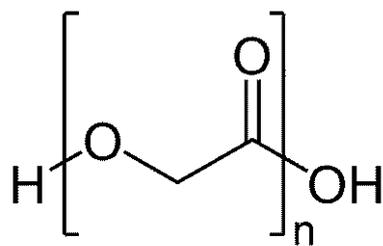
W_0 = peso iniziale, W_r = peso residuo del campione.

Il processo di erosione può essere dovuto ad un processo di diffusione-reazione meccanica fenomenologica: una parte acquosa si diffonde nel materiale, mentre oligomeri si spostano altrove, all'interno della matrice polimerica avviene l'idrolisi attuata da acqua e/o enzimi.

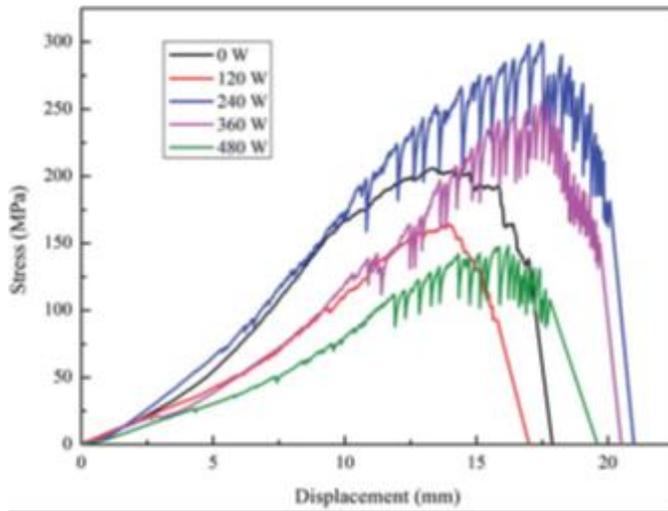
Williams ha scoperto che la velocità di degradazione è fortemente affetta dagli enzimi, come pronase, proteina k e bromelina. Gan et al. (1999) (40) ha riportato che la degradazione del PCL nella miscela PLA-PCL in presenza di lipasi *Pseudomonas*.

Gli enzimi sono grandi molecole incapaci di diffondersi in regioni cristalline; quindi, sono capaci solo di una corrosione superficiale. Un notevole incremento nella velocità di disfacimento è stato notato per il PLLA durante la sua degradazione in presenza di colture di vari organismi rispetto a quella abiotica. Tuttavia, per molti materiali, specialmente polimeri sintetici, l'idrolisi passiva è la principale forma di degradazione. Per constatare il processo erosivo in pieno, è necessario un modello matematico per ogni passo della reazione, per la struttura e la morfologia del campione.

6.2 PGA



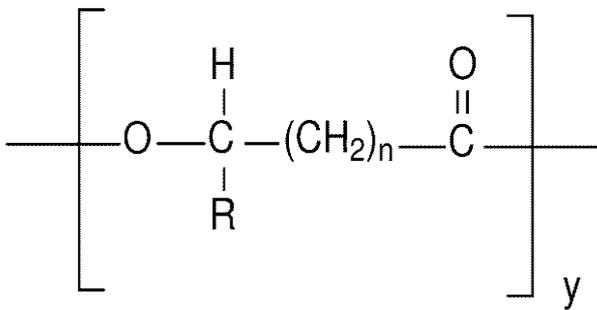
L'acido poliglicolico o poliglicolide (PGA) è un polimero biodegradabile, termoplastico ed il più semplice membro della famiglia di poliesteri lineari alifatici, presenta temperatura di transizione vetrosa compresa fra i 35-40 °C ed una temperatura di fusione individuabile fra i 225-230 °C e un valore elevato del modulo di Young pari a 7 GPa.



notiamo come anche in assenza del trattamento al plasma (0 W) il PGA sia un materiale particolarmente resistente.

Riscontriamo in una prova a trazione su campioni (1cm x 5cm) che la forza necessaria per la rottura è di 250 MPa.

6.3PHA

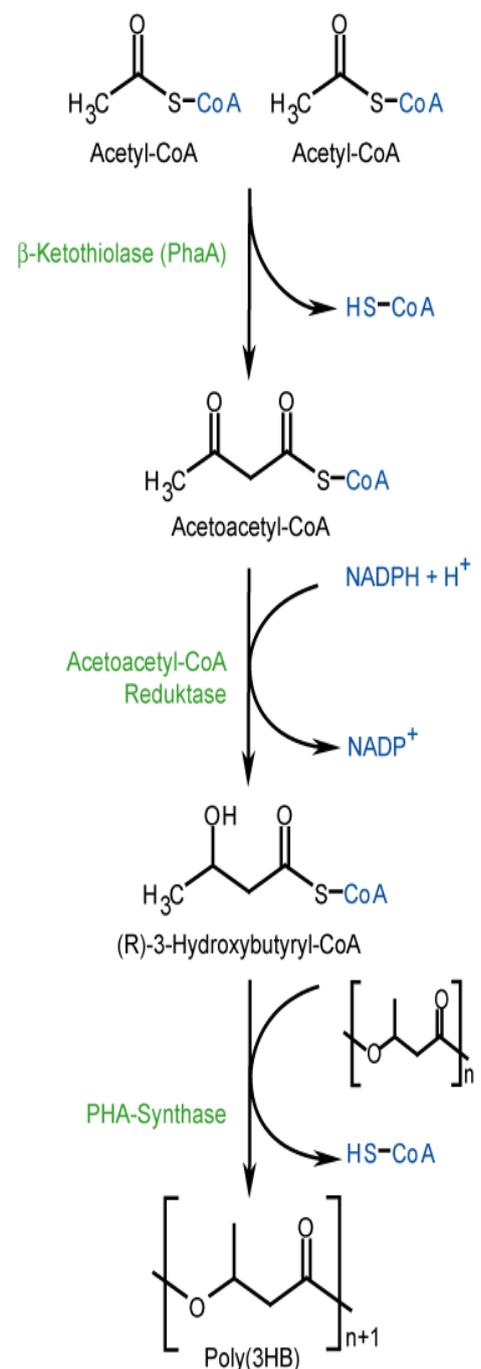


I poliidrossialcanoati (PHA) sono poliesteri termoplastici sintetizzati da vari generi di batteri, sono biodegradabili e sono usati nella produzione di bioplastiche, dato che il prodotto di degradazione corrisponde al 3HB (acido β-idrossibutirrico) presente normalmente nel sangue.

Presentano una bassa permeabilità all'acqua e grado di cristallinità pari al 70%. Il più conosciuto in questa classe di polimeri è PHB.

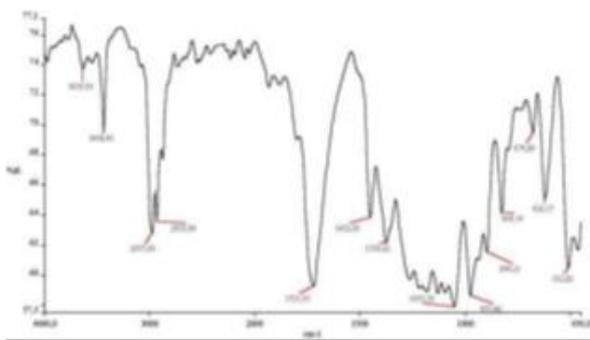
La biosintesi batterica del PHB inizia con la condensazione di due molecole di acetyl-CoA per dare acetoacetyl-CoA che è successivamente ridotto a idrossibutiril-CoA. Quest'ultimo composto è il monomero che polimerizza per dare PHB.

Il PHB è solubile con solventi organici comuni, può essere processato in fibre, membrane e microsfere, presenta le seguenti proprietà meccaniche: $T_g=4^\circ\text{C}$, $T_m=175^\circ\text{C}$, grado di cristallinità=fino al 60%, resistenza a trazione=40MPa, modulo YOUNG=3.5MPa.

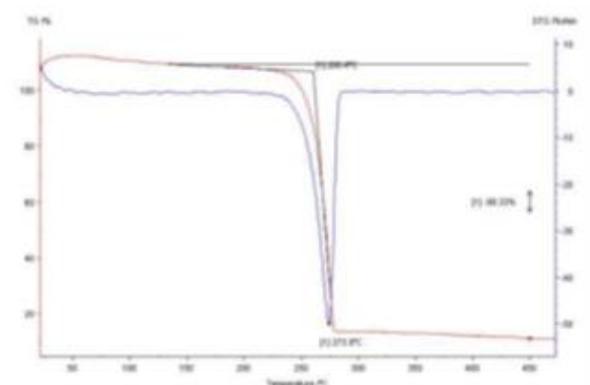


La sua degradazione è sia enzimatica che idrolitica. La enzimatica inizia sulla superficie dei materiali, preferenzialmente nelle regioni meno ordinate, poi procede fino al nucleo della fibra. Dopo quattro giorni di degradazione enzimatica, la fibra trafilata si è trasformata in aggregati di piccoli frammenti fibrosi con struttura spugnosa e il diametro dei pori ridotto. Ancora una volta, il PHB viene degradato per idrolisi all'interno del corpo. Il prodotto di degradazione è l'acido idrossibutirrico, che come l'acido glicolico e l'acido lattico, un normale metabolita presente nel corpo. Presenta anche proprietà piezoelettriche utili per la realizzazione di placche ossee. (8)

A causa della sua fragilità, accentuata nel corso della vita del polimero, viene spesso sintetizzato con altri materiali o riarrangiato.



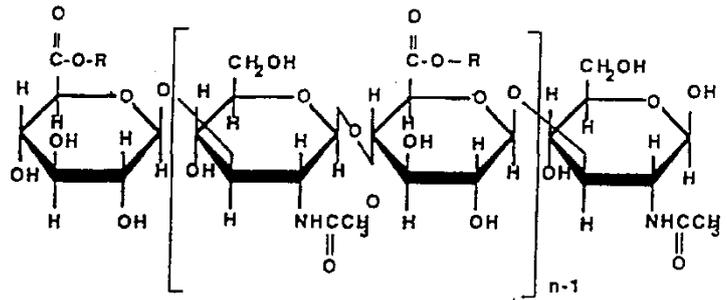
Infrarossi PHB(51% crist.)



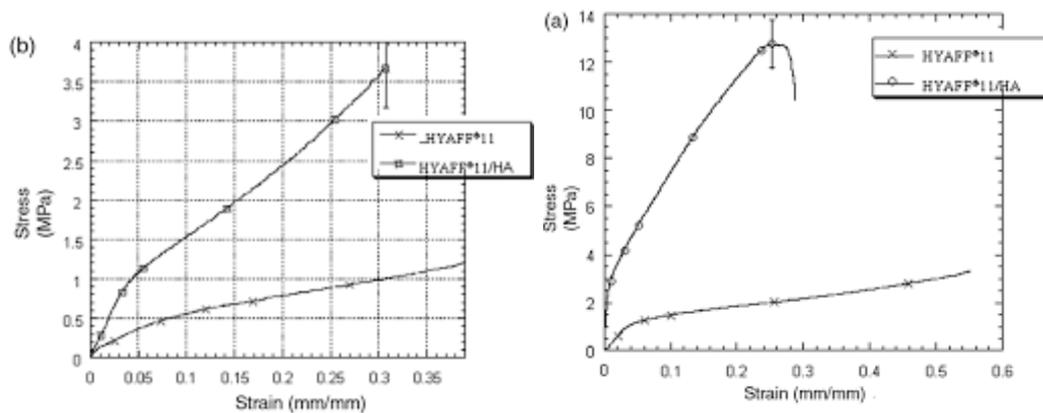
TGA PHB

6.4 HYAFF -11

Con il termine HYAFF si intende una classe di polimeri derivati dall'acido ialuronico ottenuto esterificando il gruppo carbossilico libero dell'acido glucuronico con



differenti tipi di alcol (alifatico, arilifatico, cicloalifatico e altri) per ridurre i gruppi carbossilici idrofili, carichi negativamente, del polisaccaride polianionico, accentuando così il suo comportamento idrofobo.



I due grafici presentano la prova a compressione dei 2 materiali: hyaff-11 e il composto Hyaff-11/HA, senza essere stato esposto al PBS(a) e dopo essere stato immerso(b). Sapendo che la procedura di immersione dovrebbe simulare l'ambiente fisiologico, vediamo che il comportamento del hyaff subisce modifiche relativamente basse, mentre l'acido ialuronico conferisce una resistenza maggiore al materiale.

Per il modulo elastico a compressione (E), la massima forza applicata (σ) e la deformazione massima (ϵ) abbiamo

Materiale	E(Mpa)	(Mpa)	ϵ
HYAFF11(dry)	27 +/- 5	-	-
HYAFF11-HA(dry)	340 +/-40	12 +/--1	0.24 +/- 0.01
HYAFF11 (swollen)	10 +/- 2	-	-
HYAFF11-HA (swll)	70+/-4	4+/-1	0.31+/-0.01

Nello HYAFF i valori di s e e non sono presenti a causa del comportamento plastico del materiale. (9)

7 MATERIALI E METODI

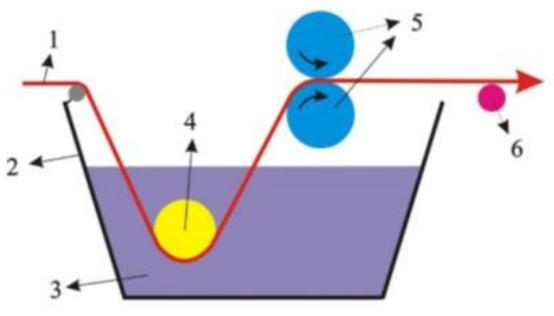
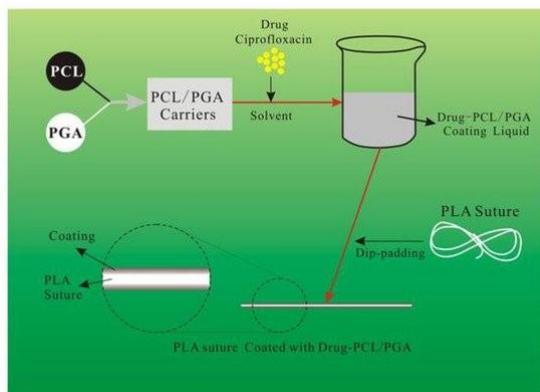
SCAFFOLD

Lo scaffold è un dispositivo medico che unisce i concetti dei DDD (drug delivery device) e delle protesi strutturali. Infatti, questi sono destinati al degradamento completo all'interno dell'organismo; una parte si degrada rilasciando fattori di crescita e farmaco, mentre l'altra verrà popolata e poi soppiantata da cellule autoctone. Per quanto possibile lo scaffold dovrà essere simile alla struttura ECM. (9b)

DRUG DELIVERY DEVICES

I D.D.D. sono presidi medici che permettono un approccio ingegneristico sul paziente. Difatti la loro proprietà principale è quella di degradarsi rilasciando farmaci.

Alla base di questa tecnologia ci sono 3 polimeri: acido polilattico (PLA), che va a formare la sutura, poli-caprolattone (PCL) e acido poliglicolico (PGA), scelti come portatori del farmaco rivestono la sutura. (9c)



L'applicazione della soluzione avviene con un processo simile alla calandratura dove: il filo in PLA(1) prima è immerso nella vasca (2) contenente appunto

la soluzione(3) e un rullo(4) e dopo pressato da 2 rulli(5) viene fatto scorrere da una guida(6). (9C)

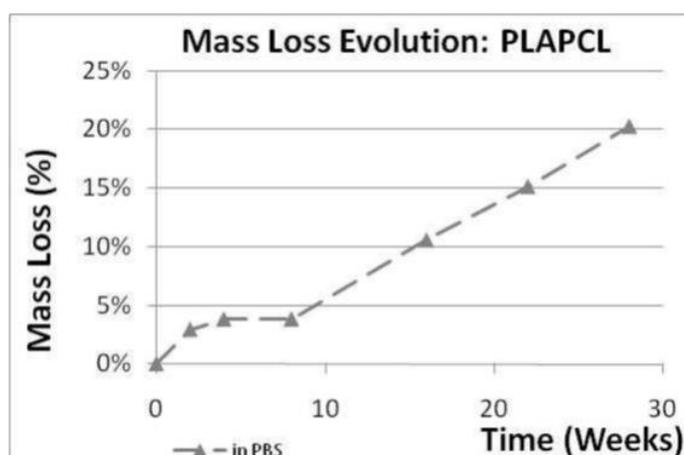
IDROGELI

Gli idrogeli sono costituiti da un reticolo polimerico ed hanno la capacità di assorbire grandi quantità di acqua. Essi sono compatibili con i sistemi biologici, possono essere degradabili e “responsivi” a stimoli esterni. Possono, infatti, esibire una significativa variazione di volume in risposta a piccole variazioni ambientali, quali pH, forza ionica, temperatura, campo elettrico etc. La loro struttura altamente porosa è facilmente modulabile e permette l’aggiunta di farmaci e il successivo rilascio ad una velocità dipendente dal coefficiente di diffusione di questi attraverso il reticolo del gel(9d).

7.1. PLA+PCL

Le suture in PLA-PCL (90:10, $M_n = 28000$, 3.3 polidispersione, $T_g = 56^\circ\text{C}$, $T_m = 157^\circ\text{C}$), con diametri di 150mm e 400 mm . Tagliati in 3 segmenti da 100mm l’uno.

l’esperimento condotto dall’autore della fonte(10) ha portato alla stesura dei seguenti grafici.



Per simulare al meglio un ambiente biologico, i

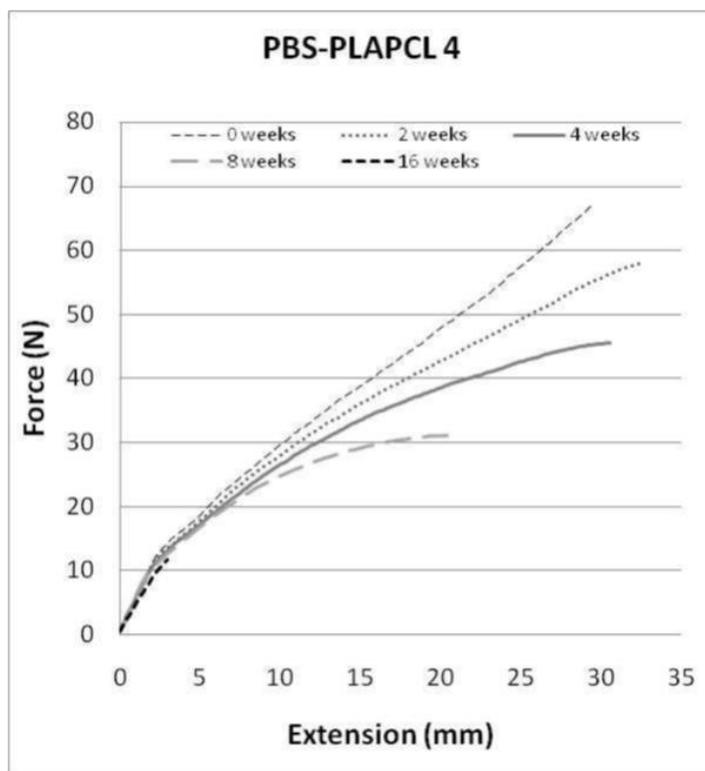
filamenti sono stati immersi in una soluzione PBS (tampone di fosfato salino) che manteneva il pH fisso a 8. Il pH del sangue è compreso tra 7.35 e 7.45 in condizioni non patologiche. Un’uscita da questo intervallo viene denominata acidosi, che può essere di 2 tipi: metabolica o

respiratoria. Questa condizione non fisiologica del pH può essere fatale per il paziente.

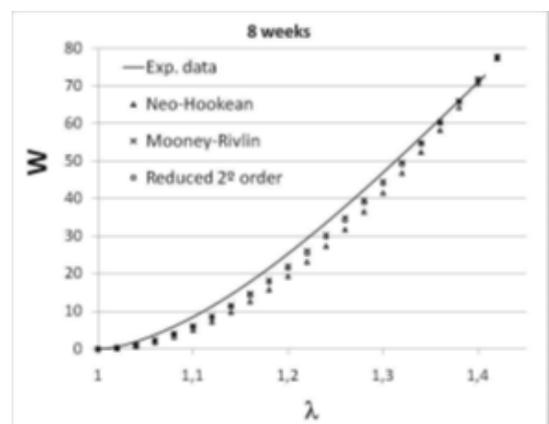
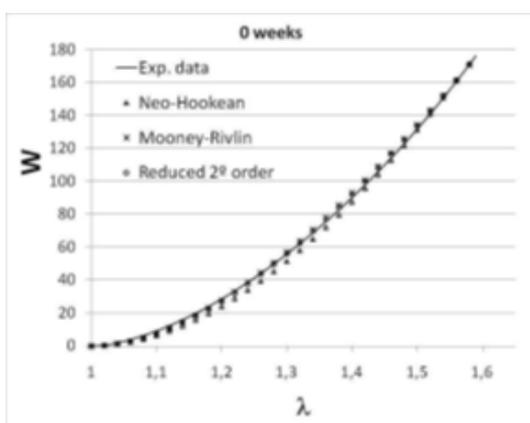
Tornando al grafico si nota come fino all'ottava settimana non ci sia una perdita di massa considerevole (<5%). Come riportato in precedenza i fenomeni di svuotamento iniziano solo dopo questo periodo di tempo.

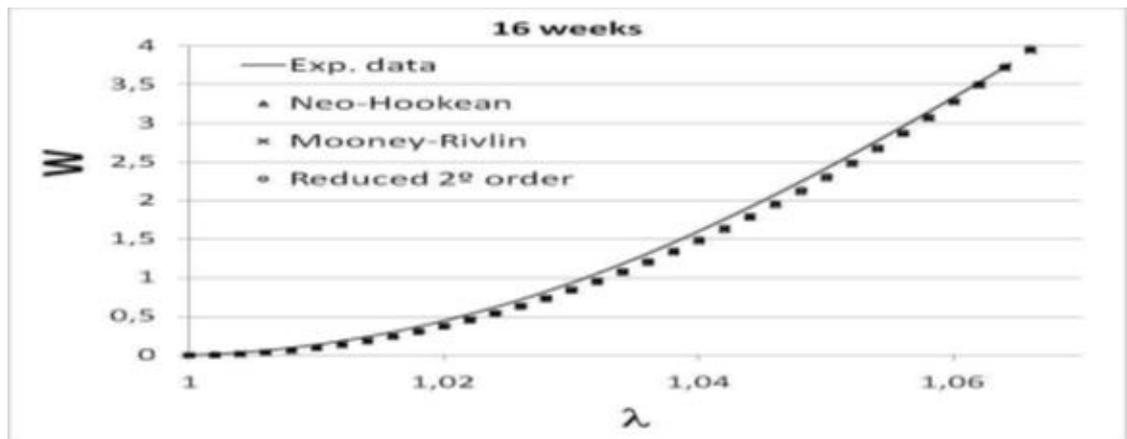
Difatti passate le prime settimane si presentano i primi vuoti che fanno impennare l'indice di perdita di massa.

La perdita di massa comporta un abbassamento della tenacità del materiale. Alla sedicesima settimana il campione di PLA-PCL ha comportamento di tipo fragile (rottura).



Al confronto di una piccola (20%), ma considerevole, perdita di massa abbiamo un abbassamento della tenacità alto (80%), senza una deformazione del campione. Quindi possiamo concludere che la diffusione è istantanea e l'idrolisi è omogenea.

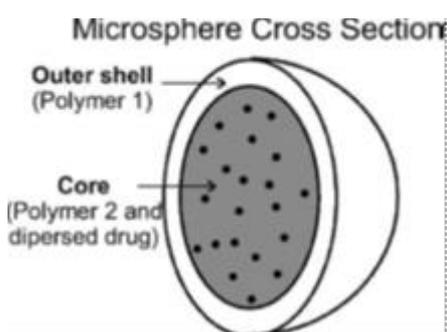




Possiamo notare come sottoposto a stress assiale, l'energia immagazzinata si riduce durante il decorso delle settimane. È sempre utile ribadire che il materiale perde molte delle sue proprietà meccaniche dopo l'8° settimana. (10)

Con l'aggiunta del farmaco al composto, tramite una polimerizzazione in emulsione, si ottiene il rivestimento della sutura sotto forma di microsfele. La quantità di polimero(α), la temperatura($1/\alpha$) e la viscosità(α) determinano la grandezza di queste. α =proporzionale

Altro aspetto da considerare nelle microsfele è la loro porosità. È stato dimostrato che la velocità alla quale il solvente è rimosso dalla sfera è dato da temperatura, pressione, e la quantità di acqua nella fase finale dell'emulsione. Inoltre, la porosità non si trova uniformemente ma si divide in: superficiale e interna.



Un'evaporazione molto veloce del solvente provoca una porosità maggiore della sfera. (11)

Ci sono due valori caratterizzanti: la quantità di farmaco(L) e l'efficienza di immagazzinamento(h).

$L = (\text{farmaco nelle particelle(g)}/\text{polimero}+\text{farmaco(g)}) * 100.$

$h = (\text{farmaco nelle particelle(g)}/\text{farmaco somministrato(g)}) * 100.$

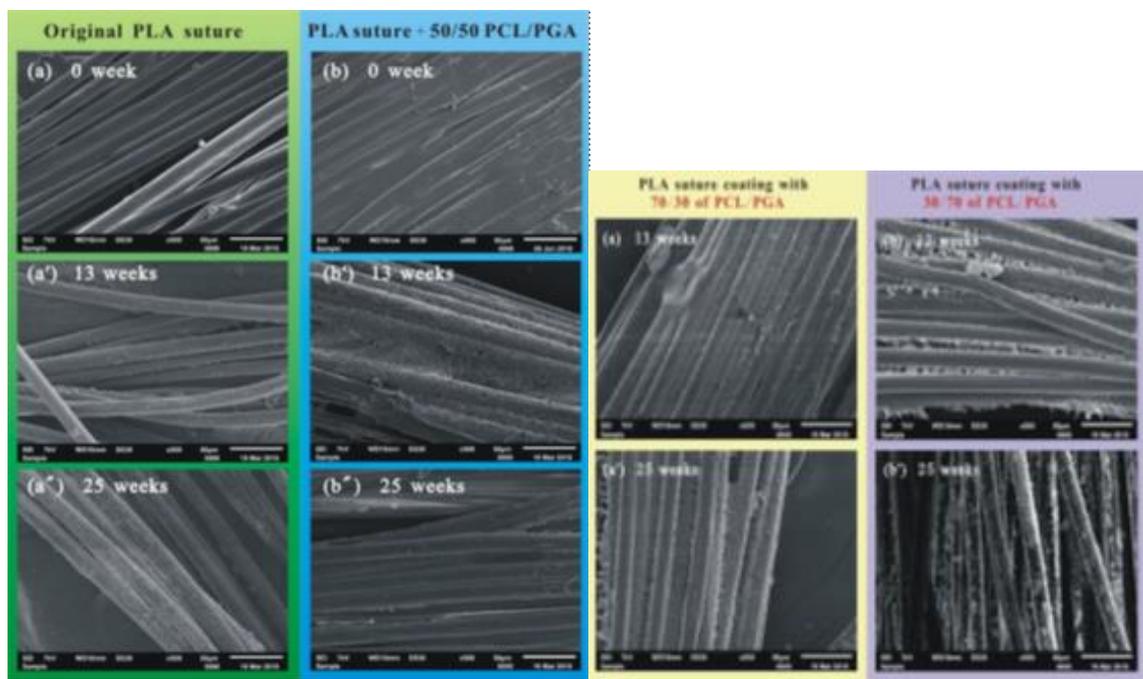
La quantità di sostanze rilasciate è descritta dall'equazione di Higuchi $M_t = K_H t^{1/2}$ dove K_H è detta costante di rilascio di Higuchi calcolate in moltiplicazione inversa.

$M_t/M_\infty = kt^n$ è detta equazione di Korsmeyer-Peppas e calcola il totale cumulativo di farmaco rilasciato nell'istante t e all'equilibrio. Se $n < 0.5$ abbiamo una diffusione ideale, se $0.5 < n < 1$ la diffusione non è ideale. $n > 1$ indica lo 0 rilascio cinetico. (12)

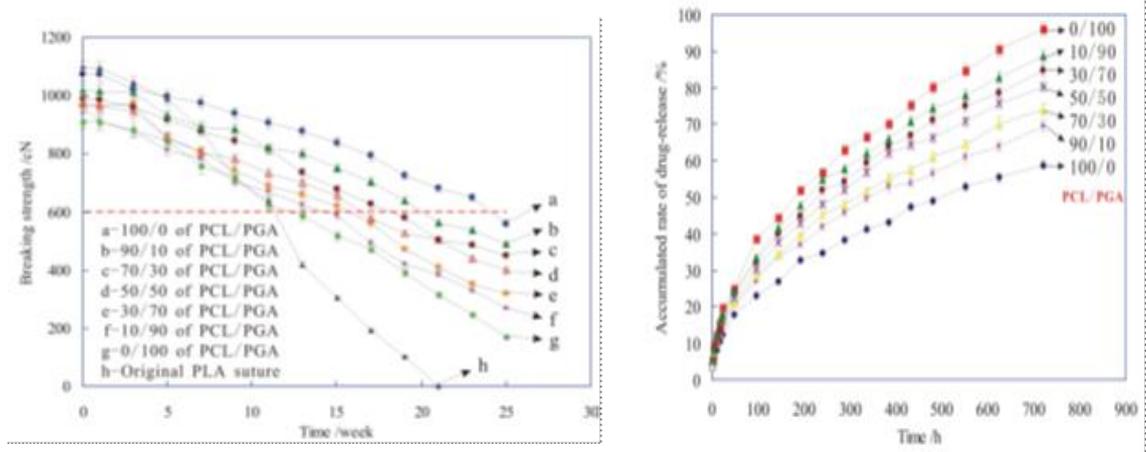
È valida anche la formula $Q_t = m_t/m_0 * 100\%.$

dove Q_t è il rilascio cumulativo, m_t la quantità rilasciata a t e m_0 quella a $t=0$.

La velocità di degradazione alla quale vengono rilasciate le sostanze è determinata da: peso molecolare, grado di cristallinità(c.v.), conformazione del polimero (e del carrier) e delle microsfele. (11)



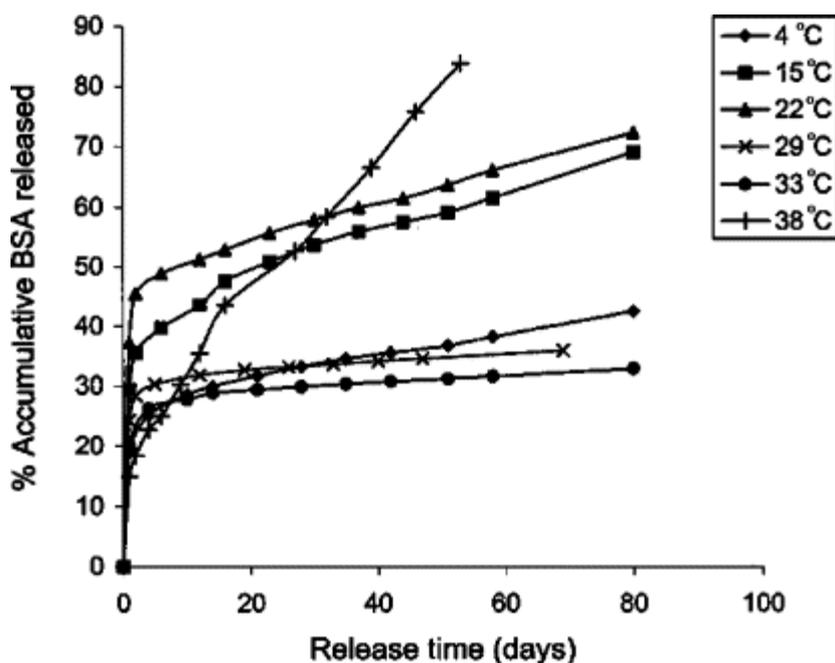
Notiamo come all'aumentare del PGA i filamenti sono man mano meno resistenti



Non solo una perdita di forza istantanea ma anche un andamento diverso della curva rispetto al tempo. Notiamo sempre l'andamento dopo l'8 settimana che rappresenta un punto notevole. La linea rossa indica i 600 cN, cioè la forza necessaria per danneggiare i tessuti epidermici umani.

Una maggiore resistenza si commuta in una velocità di degradazione minore e dunque di un rilascio del farmaco più lento.

I pori sulle microsfele formati a temperature più basse, quindi più grandi, hanno rilascio caratteristico: un'impennata iniziale e poi un appiattimento della curva, quindi un rilascio più graduale. Ciò è causato dalla degradazione esterna della sfera molto più veloce di quella interna. Per questo si cerca di creare una fascia esterna liscia che circonda il nucleo poroso al fine di limitare questo fenomeno.



Si può dire che l'aumento di porosità porta ad un aumento della velocità di rilascio.

In conclusione, la degradazione comporta una diffusione, quindi un aumento di velocità di degradazione comporta un aumento di velocità di diffusione; la diffusione del farmaco, a sua volta, provoca la degradazione del polimero. I 2 effetti sono strettamente correlati. (10)

7.2 HYAFF11

I tessuti connettivi trattati con le spugne HYAFF11 mostrano una riparazione simile a quella di altri materiali. In breve, lo scaffold è ancora presente e i pori all'interno del materiale spugnoso sono pieni di cartilagine ialina e ipertrofica.

L'adesione e la conseguente proliferazione cellulare avvengono prevalentemente nelle zone più esterne della struttura sotto forma di tessuto fibroso/fibrocartilagineo. La zona più interna tende a rimanere disabilitata e nell'eventualità di una infiltrazione cellulare queste morirebbero per mancanza di nutrienti (vascolarizzazione).

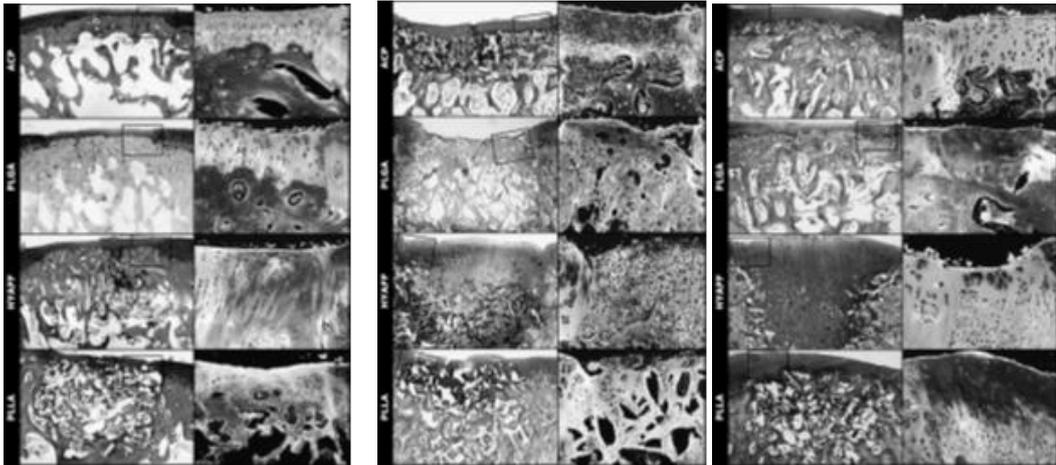
Dodici settimane dopo l'intervento, resti di scaffold sono individuabili nelle zone più profonde della zona danneggiata che è stata riempita, quasi interamente, da cartilagine.

Le aree periferiche di questa massa cartilaginea appaiono ipertrofiche, ma solo nella metà dei casi presentano formazione di osso. Nella maggior parte dei casi, la massa cartilaginea appare distaccata dal resto del tessuto. Questo potrebbe essere un artefatto dell'elaborazione istologica, ma può indicare un'area indebolita all'interno del tessuto di riparazione. segni

di lieve fibrillazione erano visibili negli strati superficiali, come è stato notato in precedenza.

A 20 settimane, le zone trattate con le spugne HYAFF -11 non presentano segni della matrice residua; grandi quantità di cartilagine riempiono la zona. C'è possibilità che dopo questo periodo la zona presenti osso formato e cartilagine già integrata all'interno del sistema.

Anche se la sperimentazione è stata condotta su cavie animali i dati sono clinicamente validi. (13)

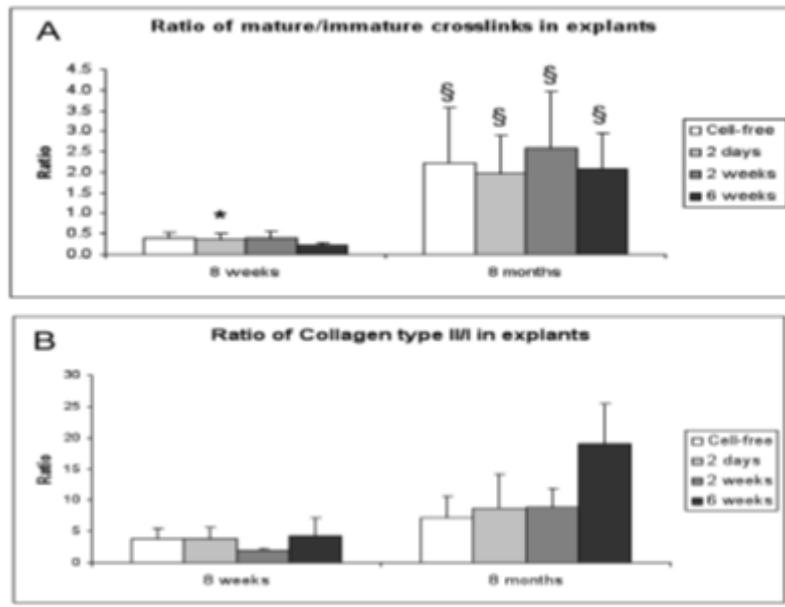


Immagini scaffold(ACP,PLGA,HYAFF,PLLA)(SEM)
4 settimane 12 settimane 20 settimane

Non è stata osservata alcuna risposta infiammatoria o altri eventi avversi correlati allo scaffold. L'esame istologico del sito di impianto ha mostrato che gli scaffold Hyaff 11 erano presenti nei difetti fino a 4 settimane o meno dall'impianto e si erano completamente riassorbiti dopo 12 settimane.(14)

7.2.1 COLTURA ECM

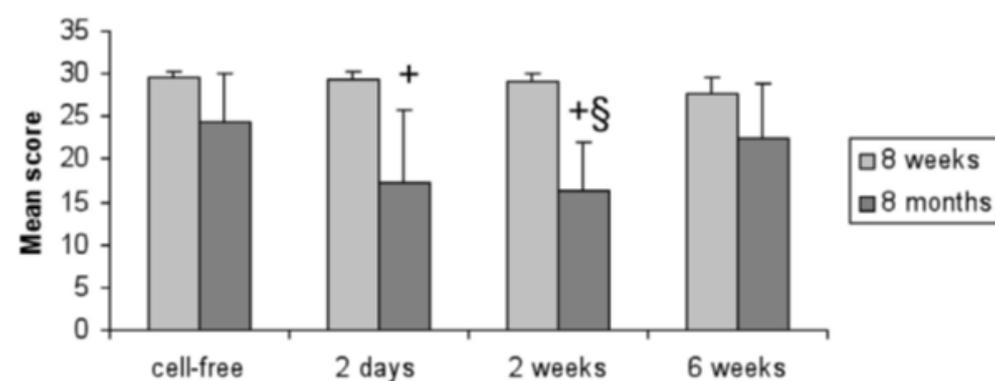
Come già detto è possibile accoppiare cellule autoctone (ECM) del paziente con matrici polimeriche sintetiche in coltura. Questo procedimento permette di modificare le proprietà dello scaffold (HYAFF 11+ECM) sia dal punto di vista meccanico, sia per l'integrazione cellulare. Attraverso uno studio in vitro si è scoperto che le colture meno mature presentano un'integrazione maggiore dell'impianto (15)



§=differenza statistica rilevante in vivo *=differenza statistica rilevante tra 6 settimane in vitro e 8 settimane in vivo

Notiamo come la maggiore integrazione delle cellule si nota nelle colture di 2 settimane. Anche se il rapporto tra collagene di tipo 2 e 1 è maggiore per le colture a 6 settimane, questo non è rilevante perché non è correlato a miglie structurali o alla riparazione del tessuto. (16)

Riportiamo l'O'Driscoll score in base alle colture



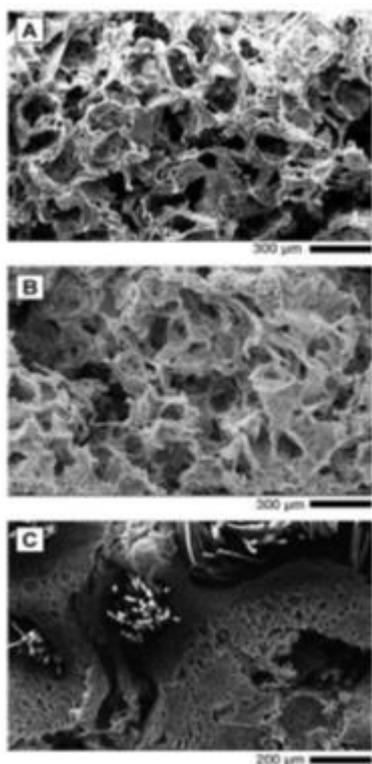
Non ci interessa il punteggio maggiore ma solo ciò che indica.

Come esposto in precedenza la coltura ottimale per una riparazione cartilaginea, sia per l'integrazione che per le qualità indicate dallo score, si ha per scaffold lasciati in coltura per 2 settimane.

7.2.2 HYAFF 11+PCL

Sono stati sviluppati tre scaffold biodegradabili basati su una matrice PCL e HYAFF11: PCL/HYAFF11 (80/20), Filler-loaded scaffolds (PHR), fiber-reinforced composite scaffolds (PHF), con proprietà chimiche e fisiche su misura, per la rigenerazione del tessuto osseo e/cartilagineo.

È stato introdotto un nuovo biomateriale riassorbibile costituito da PCL e HYAFF-11 per la sostituzione del menisco. Le proprietà del biomateriale in termini di rigenerazione del menisco tissutale sono promettenti: gli impianti sono rimasti in posizione, hanno mantenuto la loro forma e hanno mostrato proprietà meccaniche adeguate



(SBF=simulated body fluid) l'aggiunta di una S alla sigla indica l'esposizione al fluido in vitro

si possono notare in figura le 3 tipologie di mescola.

A. Hyaff/PCL(20/80) detta PH

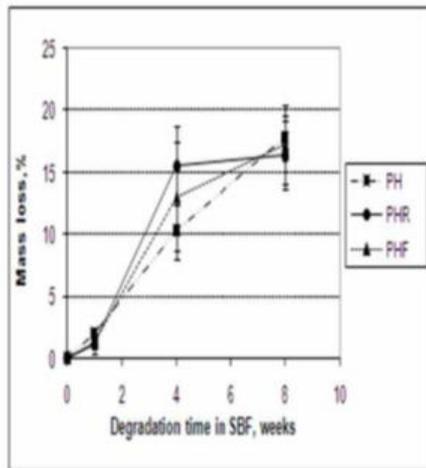
B. Hyaff/PCL con particolati di cemento R arricchito di calcio e fosfati (PHR).

C. Hyaff/PCL con rinforzo di fibre PLA(PHF)

Nel caso di PH e PHR, le immagini della sezione trasversale indicano una distribuzione spaziale omogenea dei macro-pori di forma indefinita e con dimensioni comprese tra 150 e 500 micrometri (Fig. A-B).

Nel caso degli scaffold PHF (Fig C), si osserva un'organizzazione strutturale più ordinata, con una ben definita disposizione dei pori tra fibre adiacenti.

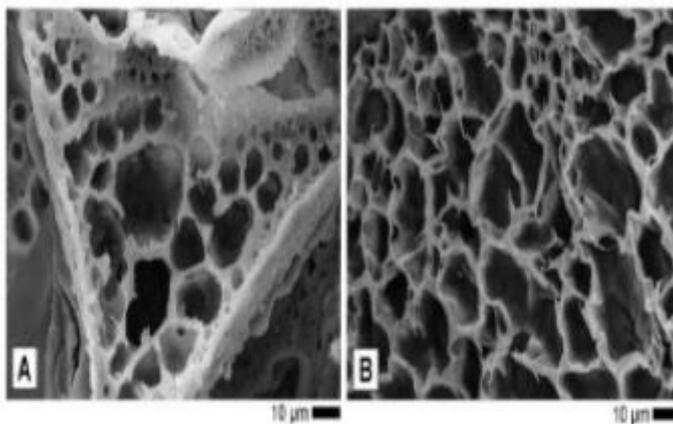
tipo	Grado porosità%	Media della dimensione pori (μm)
PHS2	81.7	0.215
PHRS2	82.8	0.226
PHF2	63.1	0.100



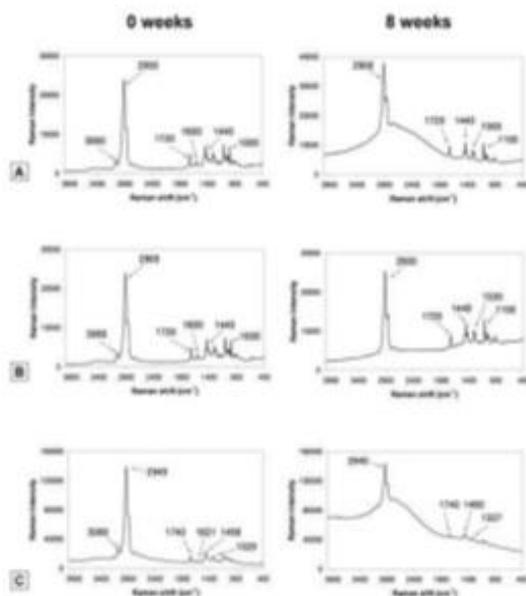
Le più significative differenze nella perdita di massa sono state osservate dopo 4 settimane di immersione. Si presume che la maggior parte della perdita di massa nelle prime settimane sia dovuta alla degradazione prodotti di HYAFF11[®]-p75 che lasciano il sistema dissolvendosi nel mezzo acquoso. La diminuzione della perdita di peso attribuibile alla decomposizione termica di segmenti HYAFF11[®], all'aumentare del tempo di

immersione in SBF, sembra confermarlo. Questo spiega anche il comportamento intermedio del PHF.

Per il PHR la degradazione più veloce è data dall'idrofilia dei particolati. Questa perdita di materiale crea delle microfrazture all'interno del copolimero.



immagini SEM A)PH B)PHF

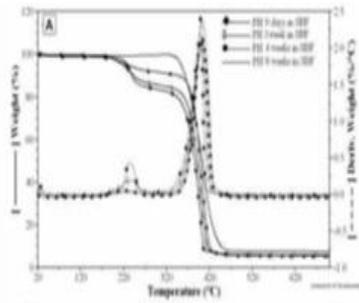


Nella spettrometria vediamo che all'8° settimana tutti i copolimeri presentano la diminuzione del grado di cristallinità, indicata come aumento della regione amorfa.

- A. PH
- B. PHR
- C. PHF

WEEK	Tg° C°	Tm1° C°	Tm2° C°	Xc, PCL%	Xc PLA%
0	-59.8	62.4	-	59.8	-
1	-60.1	63.4	147.6	75.8	-
4	-61	61.6	149.5	82.7	-
8	-61	63.4	147.6	90.3	-

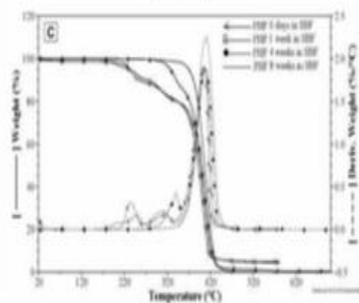
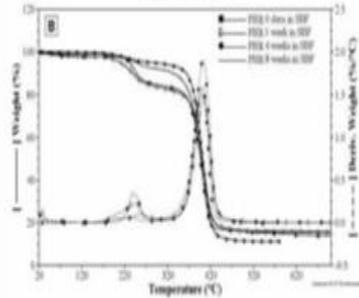
WEEK	Tg° C°	Tm1° C°	Tm2° C°	Xc, PCL%	Xc PLA%
0	-61.2	62.3	-	46.8	-
1	-60.4	63.6	-	49.3	-
4	-59.9	62.4	146.1	61.1	-
8	-61.0	62.8	143.0	61.4	-



A)PHS(thermo/calorimetria)

B)PHSR(thermo/calorimetria)

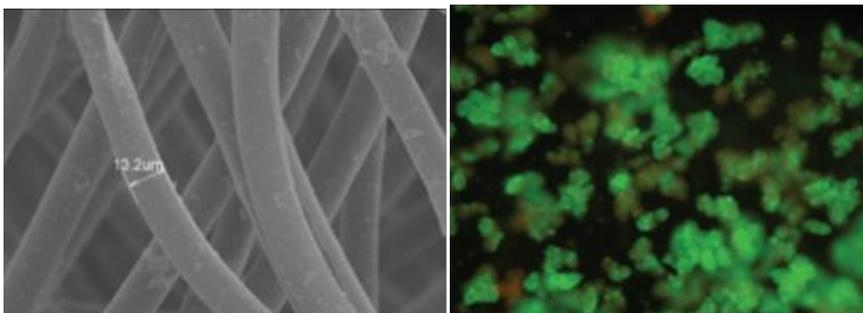
C)PHF(thermo/calorimetria)



(18)

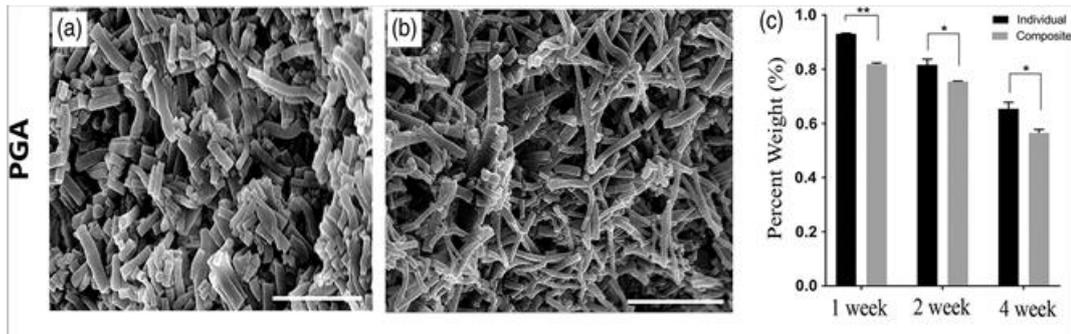
WEEK	Tg° C°	Tm1° C°	Tm2° C°	Xc, PCL%	Xc PLA%
0	-58.9	62.9	161.0	49.5	0.5
1	-60.1	63.4	161.2	49.8	0.5
4	-60.3	63.3	160.7	65.5	0.9
8	-61.1	65.4	160.5	72.0	0.2

7.3 PGA scaffold

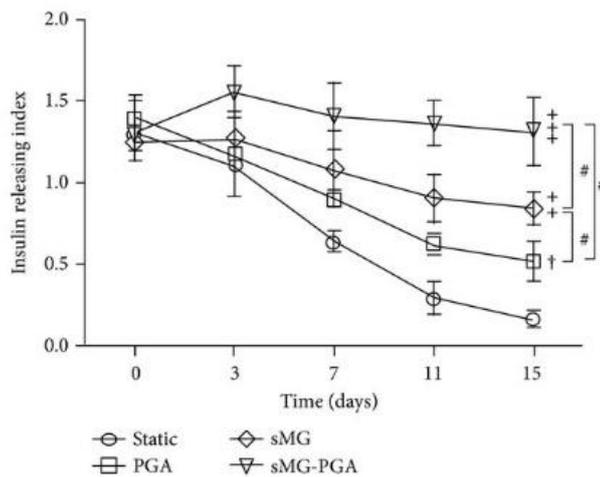


Sono caratterizzati da eccellente biocompatibilità e biodegradabilità e inoltre sono stati utilizzati come vettori per la coltura cellulare in 3D. Come mostrato in figura, gli scaffold PGA sono composti da fibre reticolate con diametri di 13,2 μm.

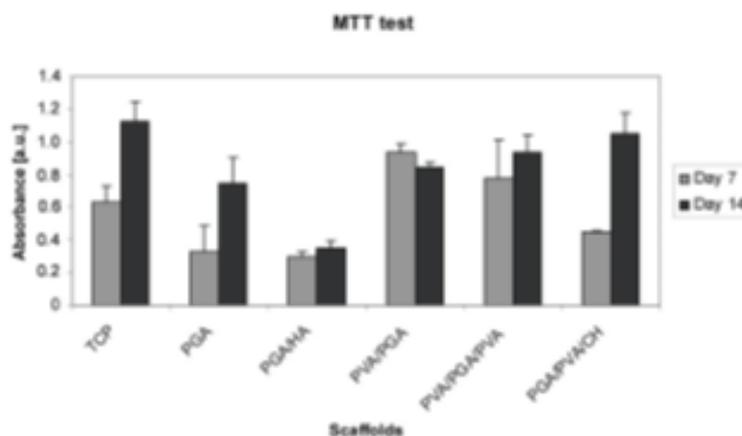
La perdita di massa di uno scaffold in PGA alla 2° settimana, che dimezza la sua tenacità, si può notare: sia come percentuale di massa rimanente (19),



sia attraverso l'indice di rilascio di sostanze (insulina) in gravità simulata (sMG) o condizione statiche (20)



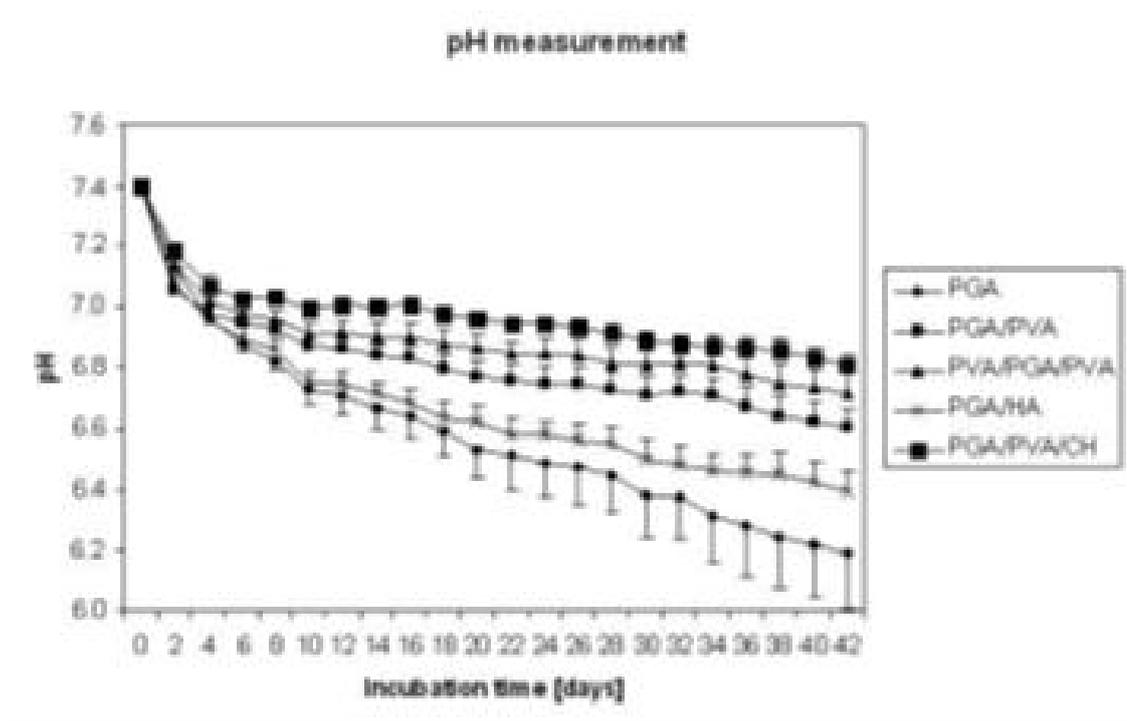
Ma anche come quantità di acqua assorbita $WA = 100 \times (M_w - M_d) / M_d$ (21)

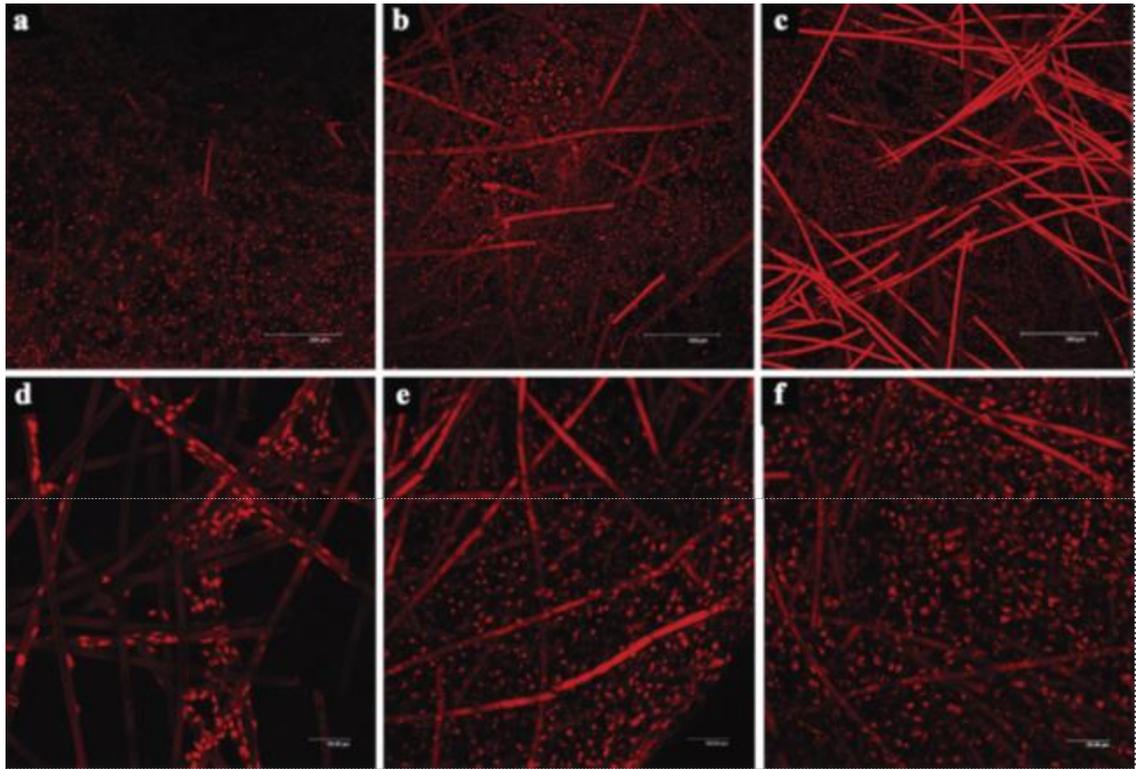


TCP= sample di controllo

Come già visto è usuale utilizzare 2 o più polimeri per migliorare le qualità meccaniche di uno scaffold. Il PGA pur avendo proprietà meccaniche notevoli, si deteriora troppo velocemente. I polimeri più usati in combinazione sono alcool polivinilico (PVA), Acido ialuronico(HA), fibre di chitina e PLLA. Nella scelta degli elementi del copolimero dobbiamo anche considerare:

-i cambiamenti del PH dell'ambiente in relazione alla composizione del materiale.





Settimane: 1

2

3

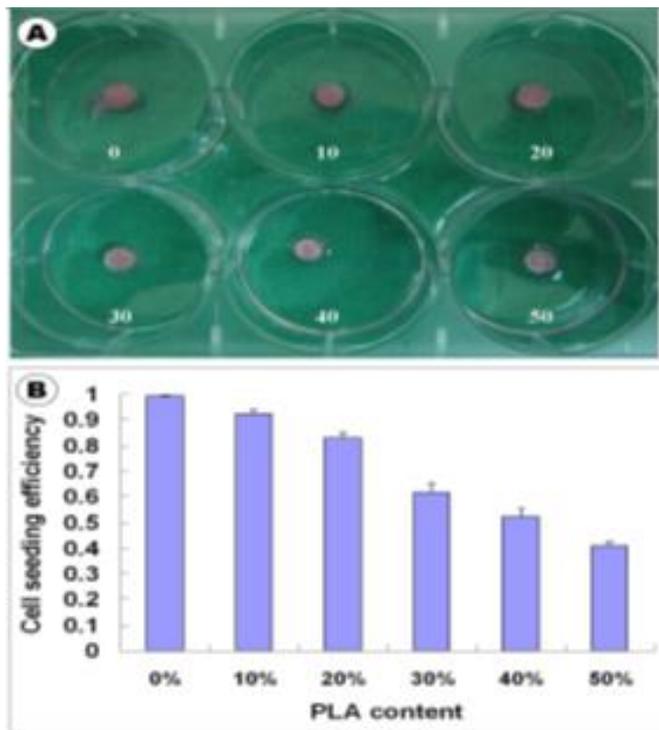
-L'Adesione cellulare (in questo caso condrociti in rosso)

a) b)c)(PVAPGA/CH), d)e)f)(PVA/PGA/PVA)

Soprattutto la combinazione col PVA(50/50)sembra favorire l'adesione cellulare.

La proliferazione è collegata a doppio filo con la presenza di liquido del materiale, perché questo, in vivo, porta i nutrienti alle cellule sedimentate. (22)

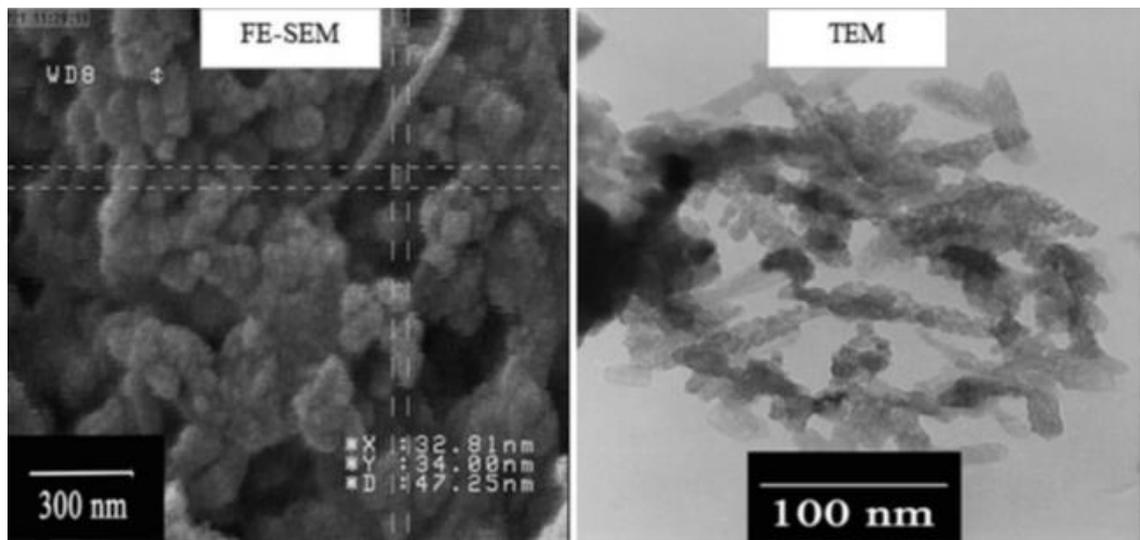
7.3.1 PGA-PLA SCAFFOLD



Come già visto la combinazione di PLA-PGA è particolarmente versatile sia dal punto di vista meccanico, l'aggiunta dell'acido polilattico rinforza la struttura, sia dal punto di vista della proliferazione cellulare.

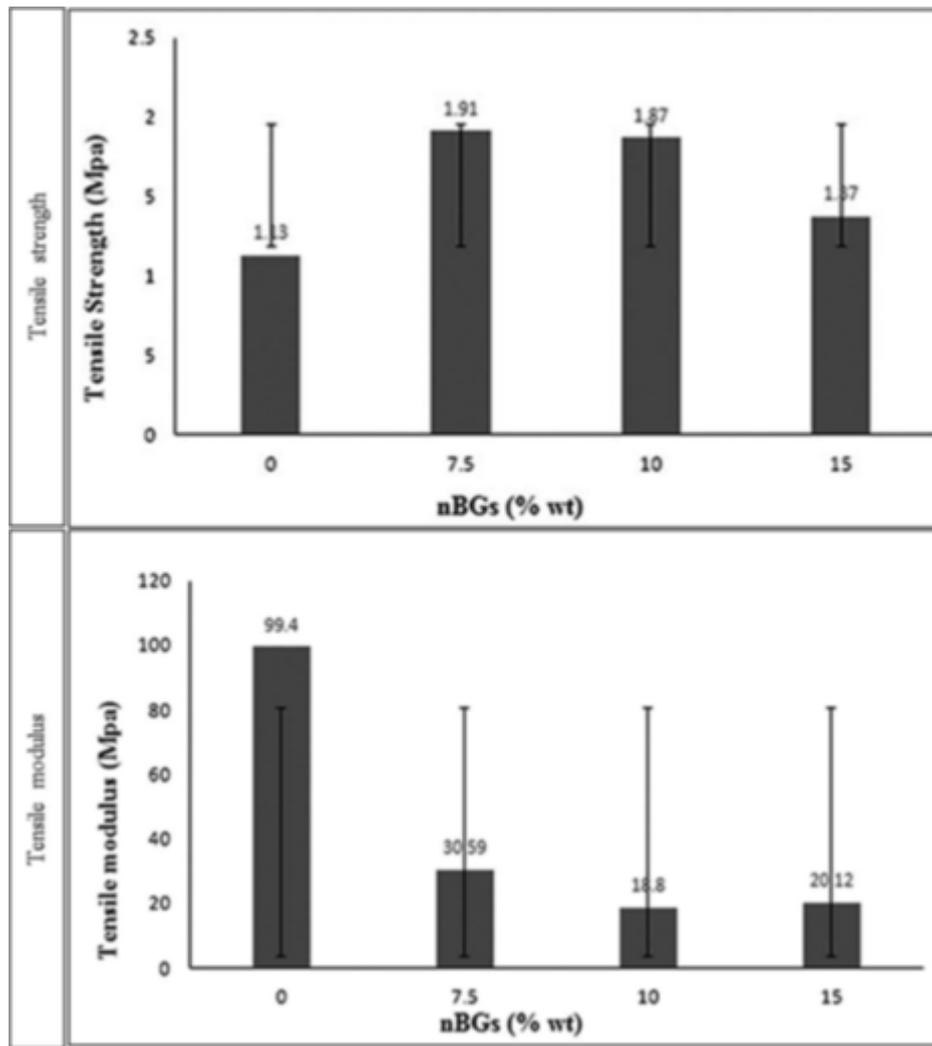
Il giusto compromesso si ottiene con la percentuale di PLA al 20%, dato che percentuali maggiori sfavoriscono l'adesione cellulare. (23)

7.4 Scaffold in PHB



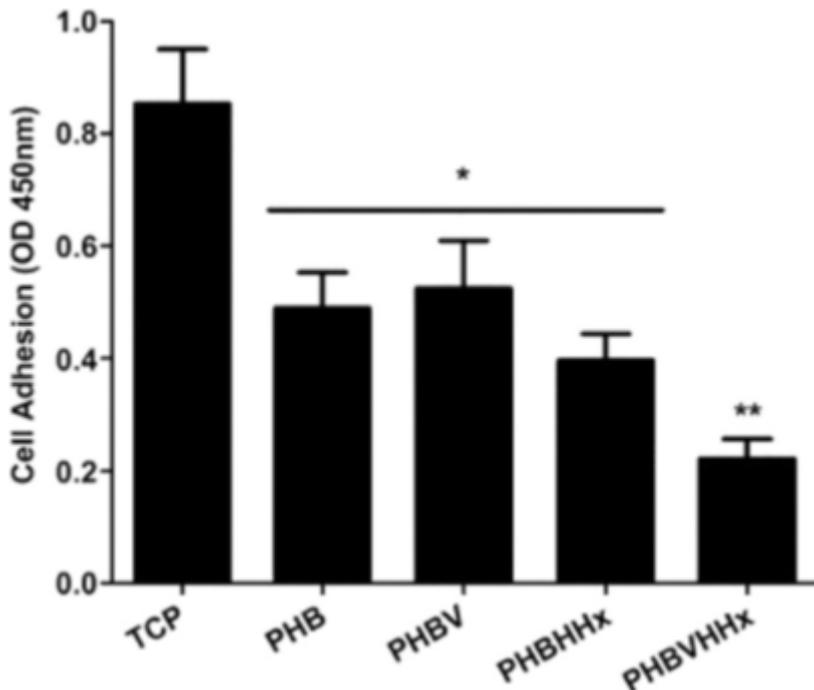
Data la sua elevata biocompatibilità il PHB è uno dei polimeri più promettenti, ma è molto fragile. In figura abbiamo 2 scaffold realizzati attraverso elettrospinnig (nano-fibre) con l'aggiunta di biovetri(nBG). La dimensione delle nano particelle era inferiore a 100 nm. Secondo

queste immagini le nanoparticelle sono per lo più sferiche. Se queste presentano grande area superficiale tendono ad agglomerarsi. Un vasto range di dimensioni di particelle causa formazione di pori. Inoltre, la diminuzione di concentrazione del polimero comporta una diminuzione del diametro delle fibre. La porosità della struttura si assesta intorno al 80% nel primo strato, 50% nel secondo e 20% nel terzo per ogni tipo di composizione.

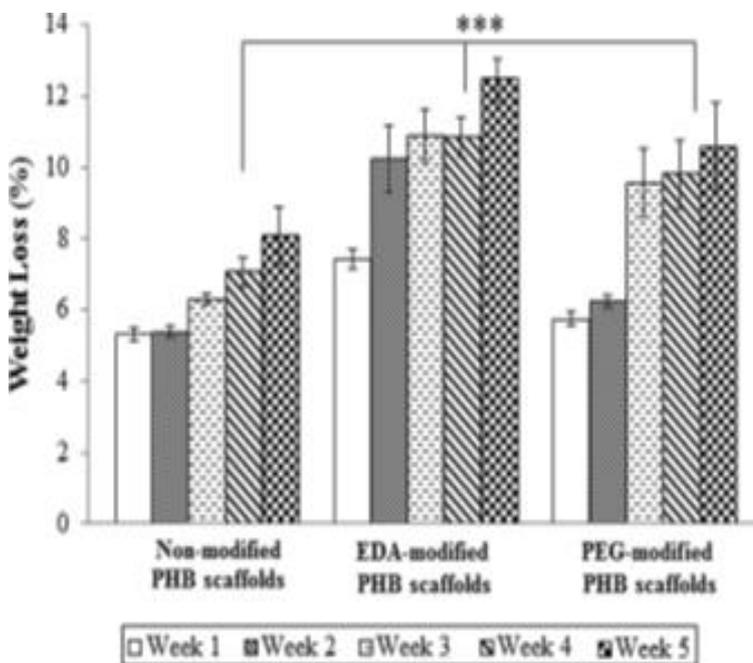


L'aggiunta di nBG al PHB ha diminuito il modulo elastico del polimero e di conseguenza è aumentata la fragilità dello scaffold. Usare gli nBG come riempitivi porta alla polimerizzazione incompleta e l'impossibilità della rete polimerica di formarsi completamente. In altre parole, l'effetto dell'ammorbimento delle nanoparticelle può disturbare i legami idrogeno e quindi ridurre il modulo elastico dei nanocompositi PHB/nBGs. Secondo i dati, al fine della riparazione ossea, la quantità ottimale di per la realizzazione di scaffold è del 7.5% del peso totale di nBG. (24).

Il poli-3-idrossibutirrato-co-3-idrossivalerato (PHBV), poli-(3-idrossibutirrato-co-3-idrossiesanoato) (PHBHHx), sono 2 modifiche al PHB al fine di ottenere migliori proprietà meccaniche e adesione cellulare, mantenendo comunque la biocompatibilità dei prodotti di degradazione.

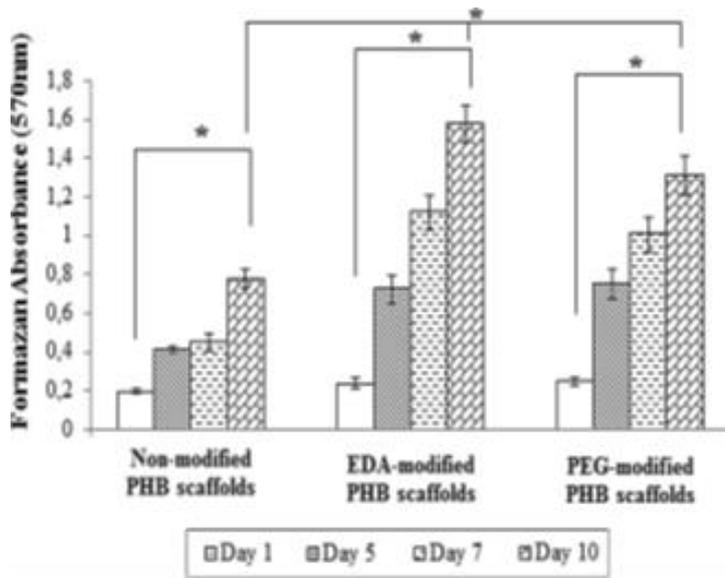


Tuttavia, non esiste una regola precisa per l'adesione cellulare, in quanto, come si vede in figura, per gli osteoblasti, il PHBHHx presenta una percentuale minore di adesione cellulare rispetto al PHB.

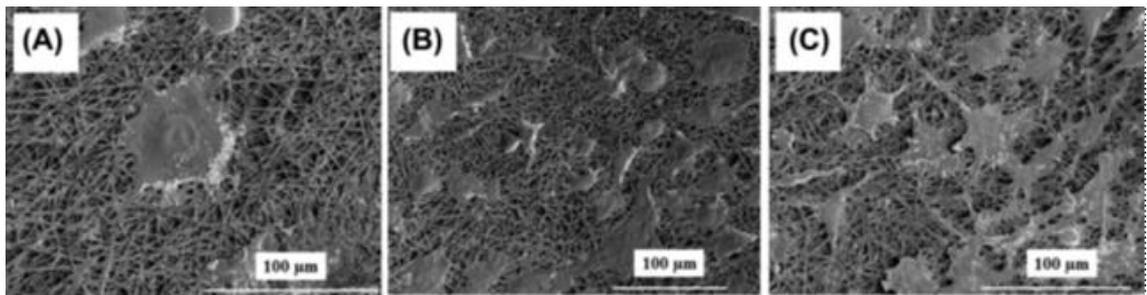


oppure possiamo avere combinazioni con PEG o etilendiamina(EDA) e valutare la perdita di massa in vitro e l'

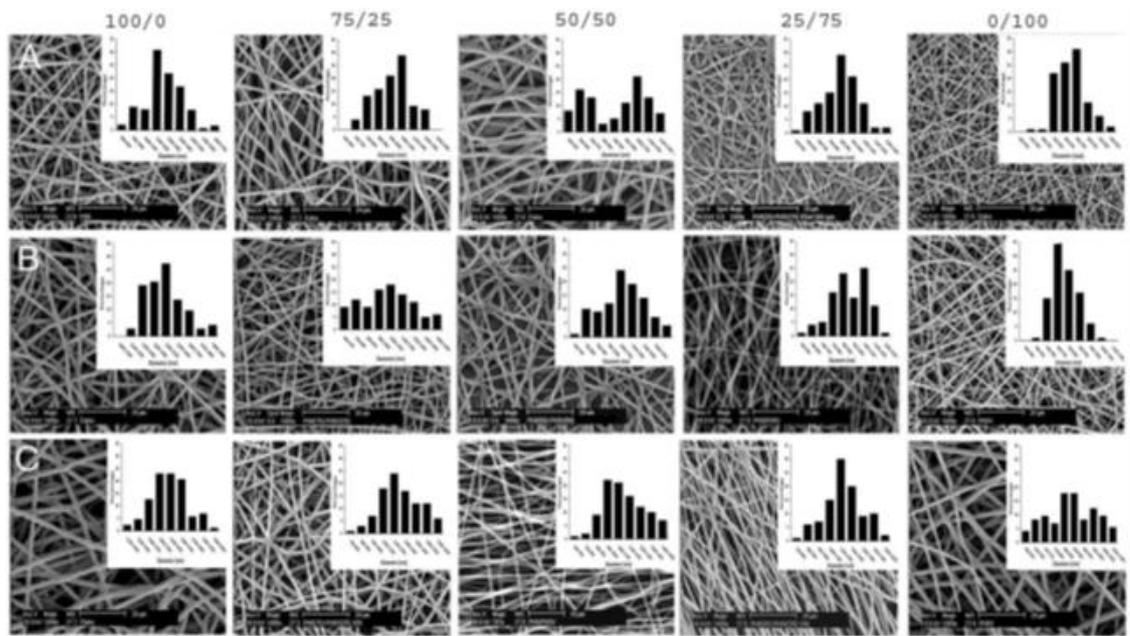
adesione cellulare. Come già visto l'adesione cellulare dipende dalla affinità con l'acqua del polimero. Quindi, per avere una migliore adesione dobbiamo sacrificare la resistenza del polimero.



La differenza di valori maggiore si trova dopo il settimo giorno. (26)



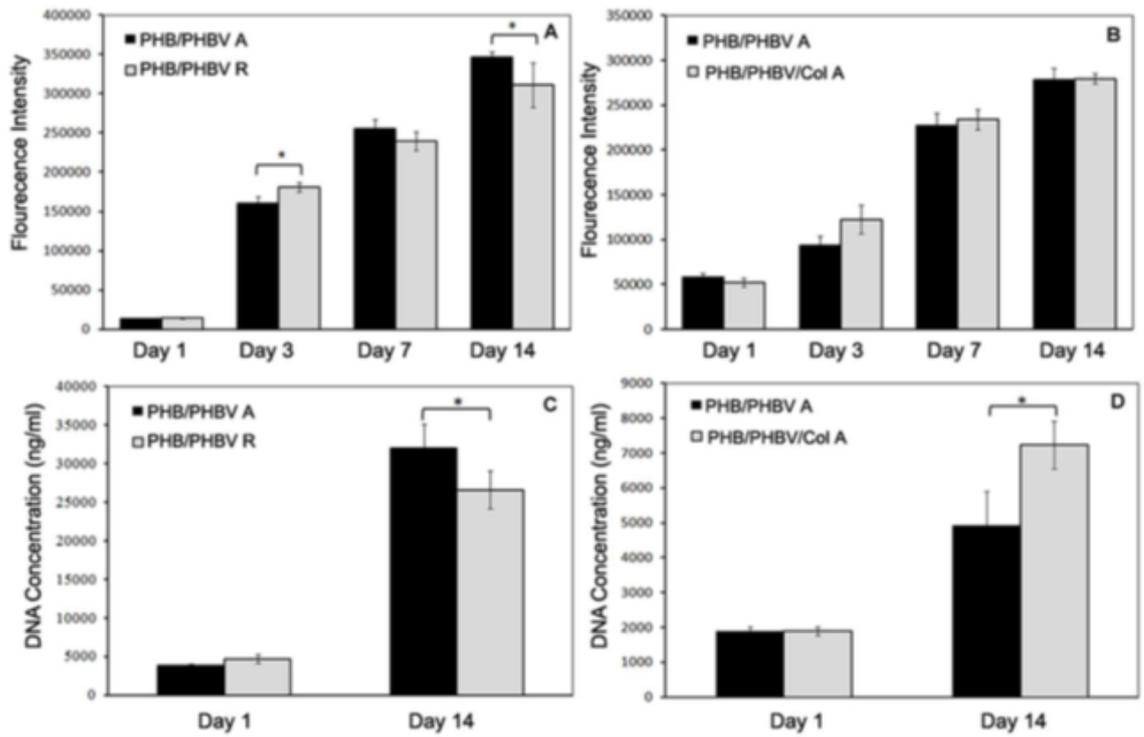
In figura troviamo le immagini SEM nel 7° giorno dei 3 tipi di scaffold: A)PHB B)PHB+EDA C)PHB+PEG.



La fila A indica scaffold realizzati con elettrospinning con concentrazione di 6% di polimero, B pari all'8% e c al 10%. Mentre le proporzioni indicate in alto esprimono le percentuali di PHB/PHBV del copolimero. Notiamo come una maggiore concentrazione di polimero nella soluzione aumenti lo spessore medio dei filamenti, mentre l'aumento di PHBV ne diminuisce i diametri.

d.filamenti((nm)	100/0	75/25	50/50	25/75	0/100
A	800–1700	500–1400	400–1300	400–1300	200–650
B	1000–1900	600–1500	600–1500	400–1300	300–1200
C	1100–2000	700–1600	600–1500	700–1600	600–1100

Anche l'impacchettamento delle fibre gioca un ruolo importante dato che ne influenza sia le proprietà meccaniche che l'adesione cellulare.



	Tensile stress (MPa)	Tensile strain (%)	Tensile modulus (MPa)	Thickness (mm)
PHB random nanofibers	1.7±0.3	5.3±0.7	67.8±23.5	0.31±0.02
PHB/PHBV random nanofibers	3.4±0.3	8.6±2.0	59.3±11.3	0.26±0.02
PHBV random nanofibers	4.9±0.5	46.1±20.0	254.0±25.4	0.19±0.01
PHB/PHBV aligned nanofibers	1.3±0.1	91.7±23.5	45.4±4.7	0.25±0.01

doi:10.1371/journal.pone.0057137.t001

Sono stati valutati filamenti allineati (A) e in disposizione casuale (R).

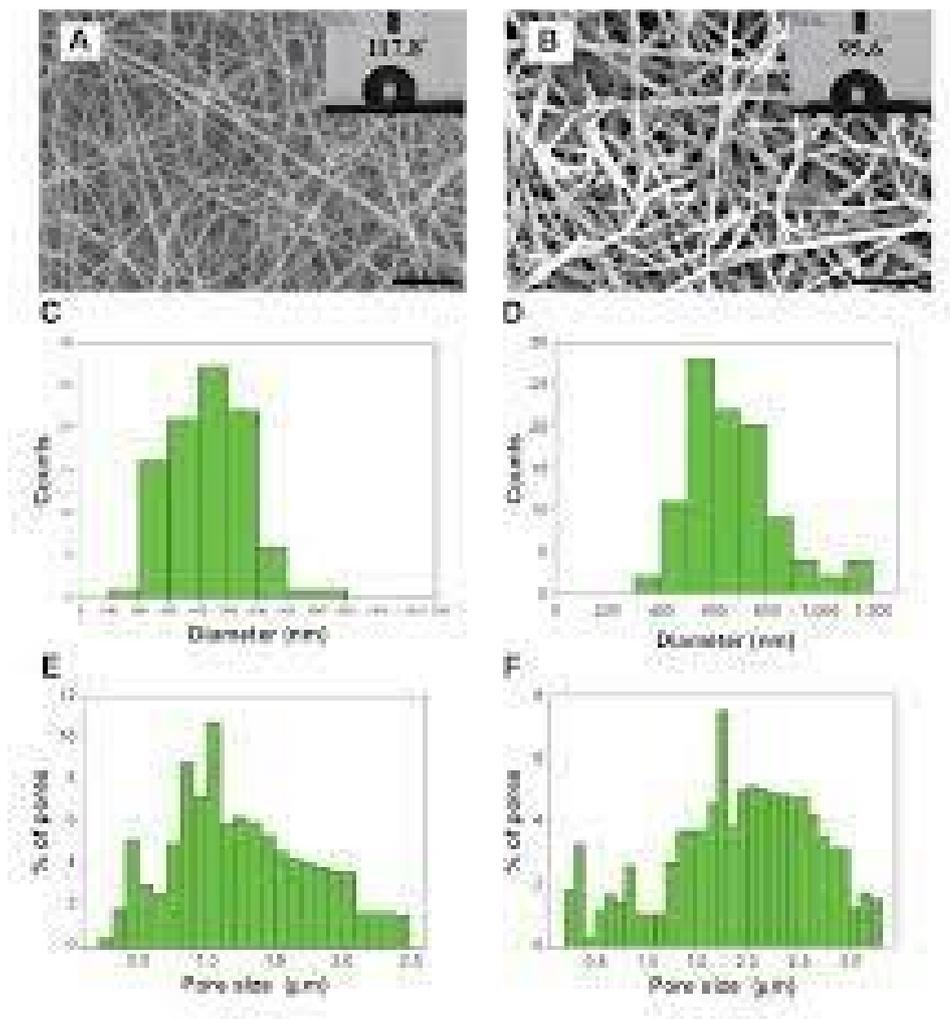
Un impacchettamento preciso favorisce l'adesione cellulare, mentre una disposizione casuale aumenta la tenacità del polimero. Si può ricondurre anche questo all'azione esercitata dall'acqua non solo come agente idrolitico del polimero, ma anche come portatrice di nutrienti per le cellule sedimentate. (27).

7.5.0 POLIESTERI+(HA E CD)

PLA, PCL, PGA e collagene sono i materiali principali usati in combinazione tra di loro o con altri composti (HA, CD) per migliorare le proprietà meccaniche e la velocità di rilascio.

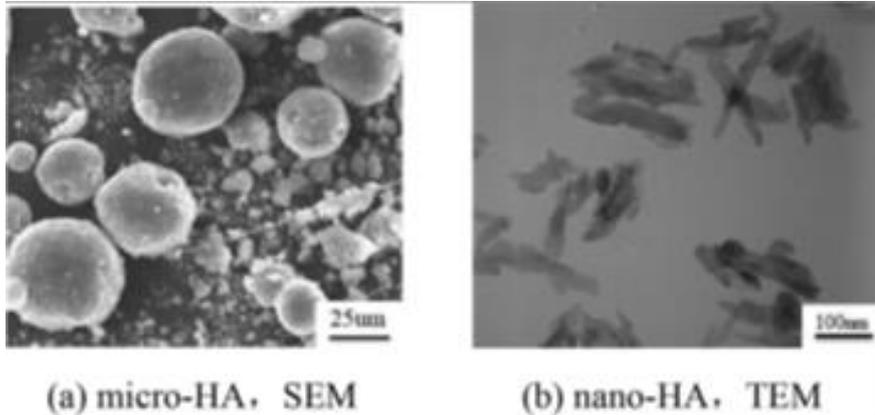
Valutiamo ora le nano-fibre di PCL in combinazione con HA e come la struttura del materiale ne venga modificata.

Gli istogrammi rivelano che il diametro medio della fibra di PCL è aumentato da 432,1 a 673,1 nm dopo l'innesto di HA ; tuttavia, non vi era alcuna differenza statistica tra i valori. Con l'aggiunta di HA, la distribuzione della dimensione dei pori delle membrane è passata da 0,2-2,5 a 0,2-3,3 μm , con la dimensione dei pori che aumenta da 1,0-1,1 a 1,7-1,8 μm . Questo spostamento ha causato un aumento significativo della dimensione media dei pori da 1,17 (PCL NFM) a 1,93 μm (PCL-g-HA NFM). l'aggiunta di HA comporta anche l'aumento del grado di cristallinità.

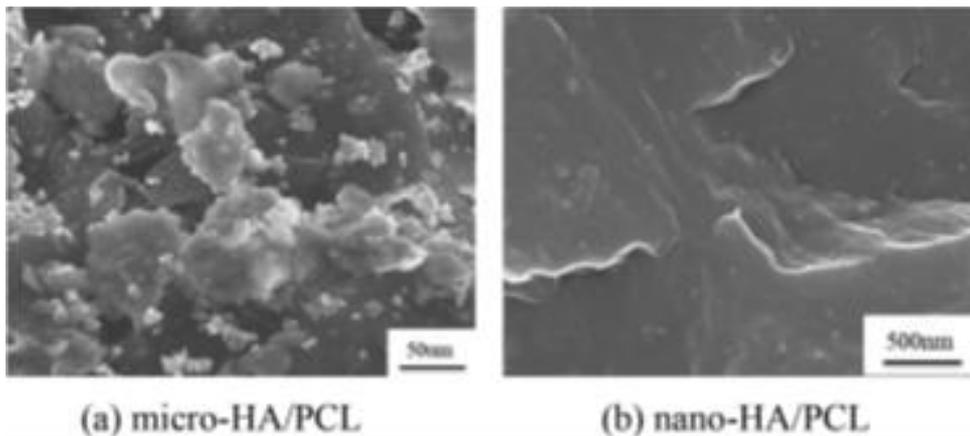


7.5.1 NFM(membrane nanofibrose)

Esiste un'ulteriore differenza nei composti PCL-HA in base allo spessore delle fibre che compongono lo scaffold



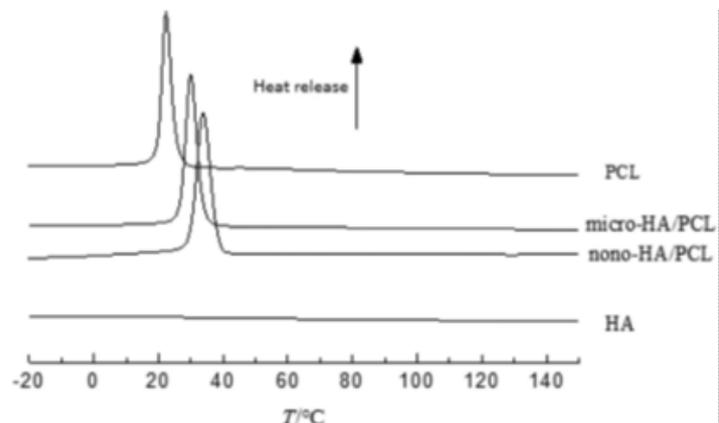
Analisi microscopica :



Analisi della sezione trasversale dello scaffold.

Lo spessore del filamento comporta:

grado di cristallinità e
velocità di
cristallizzazione (DSC)

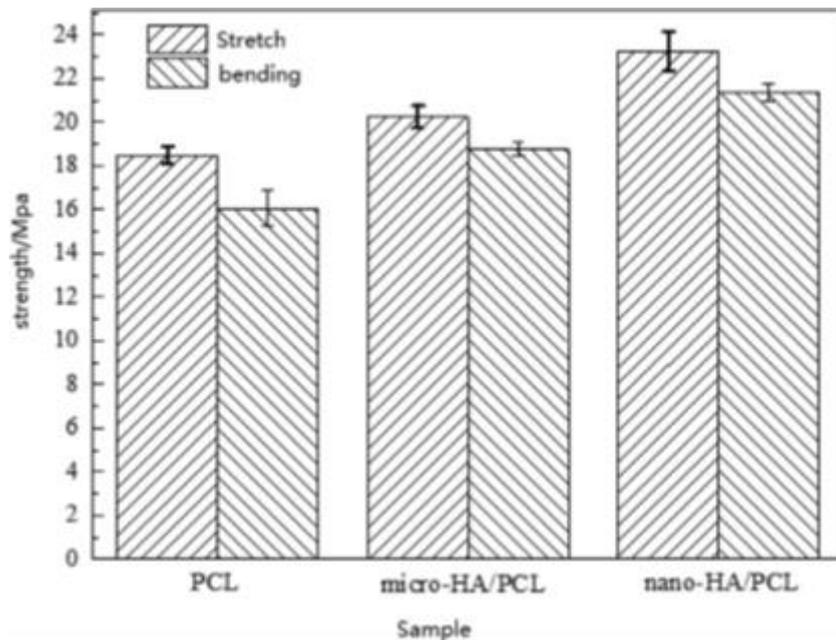


Dimensione dei pori:

micro[217(L)x190(S)]nm

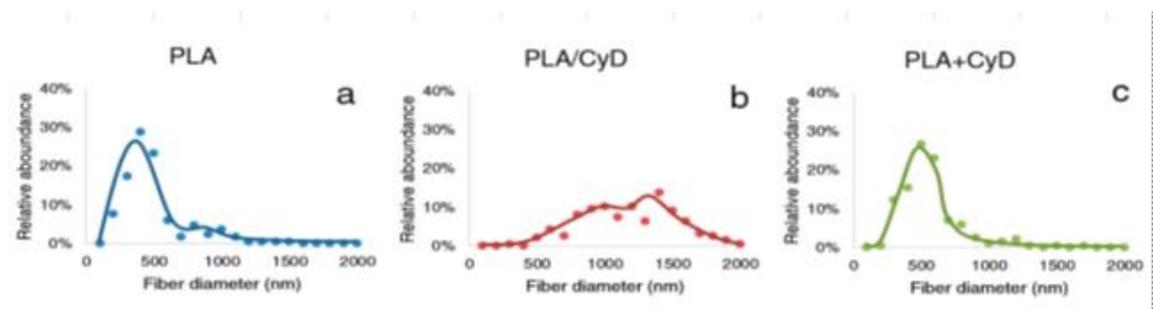
nano[239(L)x204(S)]nm

resistenza meccanica:



considerando i seguenti dati possiamo dire che gli scaffold nano-HA/PCL sono più adatti ad alle applicazioni per tessuto osseo.

Le **ciclodestrine**, per esempio, (CyD o CD) sono un tipo di destrine costituite da oligosaccaridi, che data la loro capacità di formare complessi stabili, possono modificare le proprietà dei materiali a cui esse aderiscono.



Nella figura(a) vediamo che lo spessore delle fibre della PLA è variabile all'interno del materiale. L'aggiunta di CyD in soluzione(98,5% PLA, 1,5% CyD) (b) o ancorato alle fibre(c), sotto forma di polvere, influisce sulla curva. Quindi si può concludere che il CyD "inspessisce" i filamenti. (30)

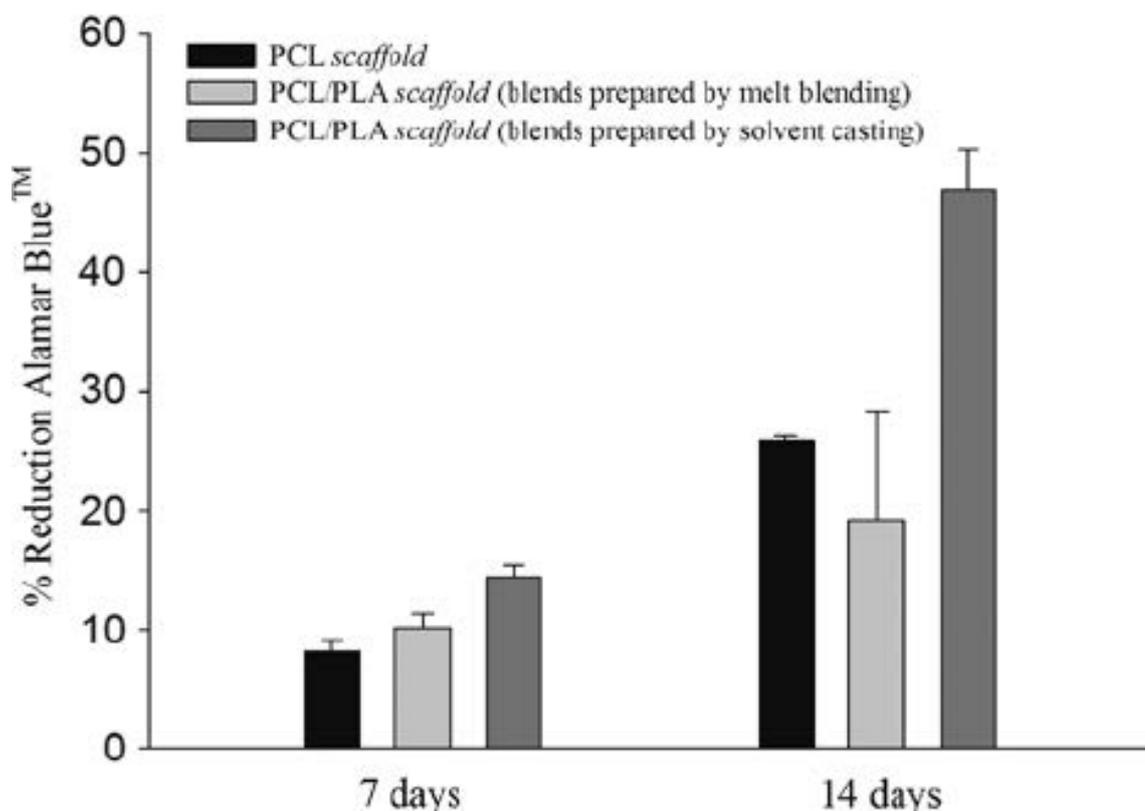
7.5.2 SCAFFOLD IN PCL-PLA

Analizzeremo i polimeri in PCL e PLA preparati in 2 modalità: solvent casting o tramite fusione.

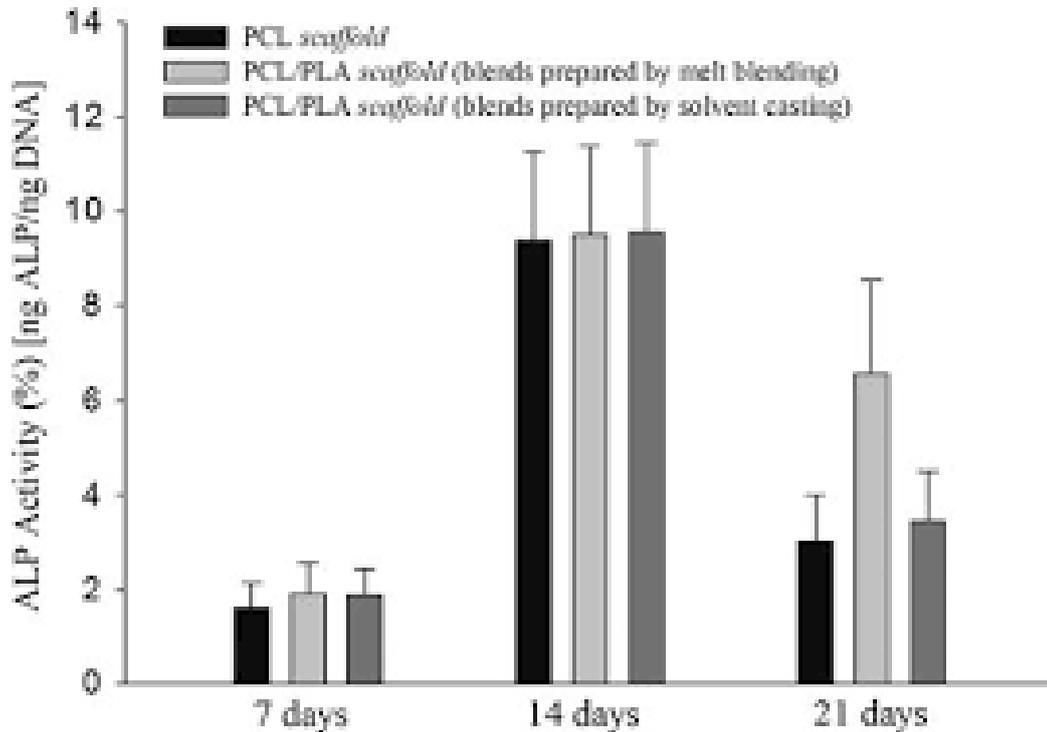
La scelta di una fra le due influisce sulle proprietà del materiale.

Useremo 2 parametri per indicare le differenze:

1)Alamar Blue Assay che determina l'adesione e la proliferazione delle cellule in 7 e 14 giorni



2) Alkaline phosphate che determina la proprietà delle cellule sedimentate di differenziarsi nel processo di osteogenesi.



I risultati mostrano che gli scaffold di PCL/PLA presentano un migliore comportamento biologico. Inoltre, è stato possibile osservare che il metodo di miscelazione determina fortemente: la rugosità superficiale, adesione e proliferazione cellulare degli scaffold.

Gli Scaffold PCL/PLA prodotti da miscele preparate con solvent casting, presentano una ridotta dimensione dei pori, che anche aumenta la proliferazione cellulare. (31)

In tabella la dimensione dei pori.

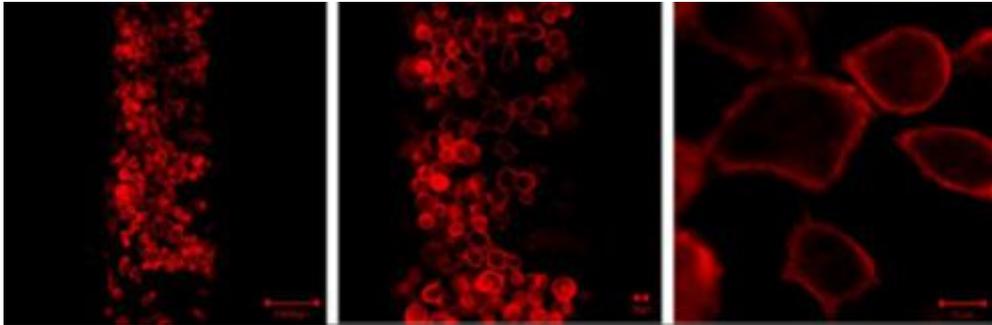
standard deviation).

	Theoretical values [μm]	PCL scaffold [μm]	PCL/PLA scaffold - blends prepared by melt blending [μm]	PCL/PLA scaffold - blends prepared by solvent casting [μm]
PS	350	354,4 \pm 3,9	311,6 \pm 17	294 \pm 12
FW	300	310 \pm 9,5	414,8 \pm 12	434 \pm 27
ST	280	263 \pm 13,7	288 \pm 14,8	367 \pm 27,7
FD	650	647,2 \pm 27	678 \pm 37	651 \pm 10

La composizione del materiale determina:

la proliferazione cellulare.

Per scaffold in PCL

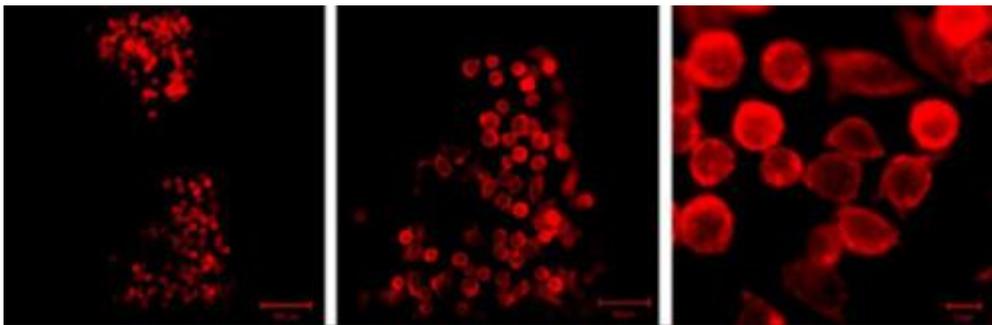


Ingrandimento x20

x40

x60

Per scaffold in PCL/PLA preparati in fusione

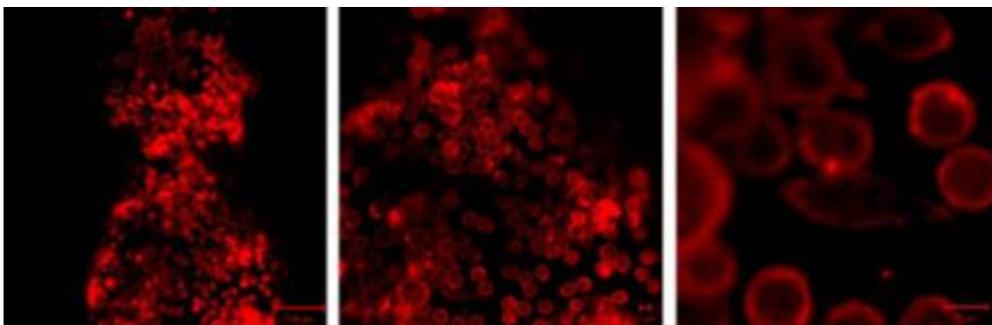


Ingrandimento x20

x40

x60

Per scaffold in PCL/PLA preparati in solvent casting



Ingrandimento x20

x40

x60

La variazione del modulo elastico

Table IV Mechanical properties of PCL and PCL/PLA scaffolds

Material	Compressive modulus E (MPa)	Maximum stress σ_{max} (MPa)
PCL	18.7 \pm 3.0	4.4 \pm 0.4
PCL/PLA (blends prepared by melt blending)	146.5 \pm 14.0	18.5 \pm 1.3
PCL/PLA (blends prepared by solvent casting)	112.3 \pm 13.7	28.0 \pm 5.0

in conclusione, possiamo dire che gli scaffold preparati mescolando PCL e PLA sono particolarmente funzionali alla ricostruzione ossea. (31)

8 STUDI CLINICI

8.1 O'Driscoll score

Il primo punteggio "riparazione della cartilagine" è stato utilizzato per valutare la qualità della riparazione del tessuto connettivo, nei conigli, dopo l'innesto periostale a seguito di un trauma cartilagineo. Questo punteggio specifico per la riparazione della cartilagine, che ora viene spesso definito punteggio di O'Driscoll, comprendeva quattro categorie ('natura del tessuto predominante', 'caratteristiche strutturali', 'libertà da alterazioni cellulari di degenerazione' e 'libertà da alterazioni degenerative nella cartilagine adiacente') ed è stato frequentemente utilizzato per l'analisi della cartilagine negli studi sugli animali. L' O'Driscoll è uno dei pochi punteggi in cui viene valutata l'integrazione" del tessuto di riparazione con l'ambiente circostante. Tuttavia, i punti aggiunti (o sottratti), in questo campo, non influiscono molto sul punteggio finale. (32)

Non bisogna considerare lo score come una classifica, cioè i valori più alti sono migliori dei più bassi (o il contrario), ma come un riassunto di tutte le proprietà del materiale che ci indicano quale possa essere il suo campo di utilizzo migliore. (33)

Characteristics	Score
Nature of predominant tissue	
Cellular morphology	
Hyaline articular cartilage	4
Incompletely differentiated mesenchyme	2
Fibrous tissue or bone	0
Safranin-O staining of the matrix	
Normal or nearly normal	3
Moderate	2
Slight	1
None	0
Structural characteristics	
Surface regularity	
Smooth and intact	3
Superficial horizontal lamination	2
Fissures 25–100% of the thickness	1
Severe disruption including fibrillation	0
Structural integrity	
Normal	2
Slight disruption including cysts	1
Severe disintegration	0
Thickness	
100% of normal adjacent cartilage	2
50–100% of normal cartilage	1
0–50% of normal cartilage	0
Bonding to the adjacent cartilage	
Bonded at both ends of graft	2
Bonded at one end or partially at both ends	1
Not bonded	0
Freedom from cellular changes of degeneration	
Hypocellularity	
Normal cellularity	3
Slight hypocellularity	2
Moderate hypocellularity	1
Severe hypocellularity	0
Chondrocyte clustering	
No clusters	2
<25% of the cells	1
25–100% of the cells	0
Freedom from degenerative changes in adjacent cartilage	
Normal cellularity, no clusters, and normal staining	3
Normal cellularity, mild clusters, and slight staining	2
Mild or moderate hypocellularity, slight staining	1
Severe hypocellularity, poor or no staining	0
Total	24

8.1.1 TEGNER ACTIVITY SCORE .

Un punteggio che indica lo stato di forma fisica di un individuo: va da 0(infermo) a 10(sportivo agonista) ed è un mezzo efficace per constatare la riuscita di un intervento e la funzionalità riacquistata mediante un impianto

Please indicate below the **HIGHEST** level of activity that you are able to participate in **CURRENTLY**.

- Level 10 Competitive sports-soccer, football, rugby (national elite)
- Level 9 Competitive sports-soccer, football, rugby (lower divisions), ice hockey, wrestling, gymnastics, basketball
- Level 8 Competitive sports-racquetball, squash or badminton, track and field athletics (jumping, etc.), downhill skiing
- Level 7 Competitive sports-tennis, running, motorcars speedway, handball
Recreational sports-soccer, football, rugby, ice-hockey, basketball, squash, racquetball, running
- Level 6 Recreational sports-tennis and badminton, handball, racquetball, downhill skiing, jogging at least 5 x per week
- Level 5 Work-heavy labor (construction, etc.)
Competitive sports-cycling, cross-country skiing
Recreational sports-jogging on uneven ground at least twice weekly
- Level 4 Work-moderately heavy labor (e.g. truck driving, etc.)
Recreational sports-cycling, cross-country skiing, jogging on even ground at least twice weekly
- Level 3 Work-light labor (nursing, etc.)
Competitive and recreational sports-swimming, walking in forest possible
- Level 2 Walking on uneven ground possible, but impossible to back pack or hike
- Level 1 Work-sedentary (secretarial, etc.)
- Level 0 Sick leave or disability pension because of knee problems

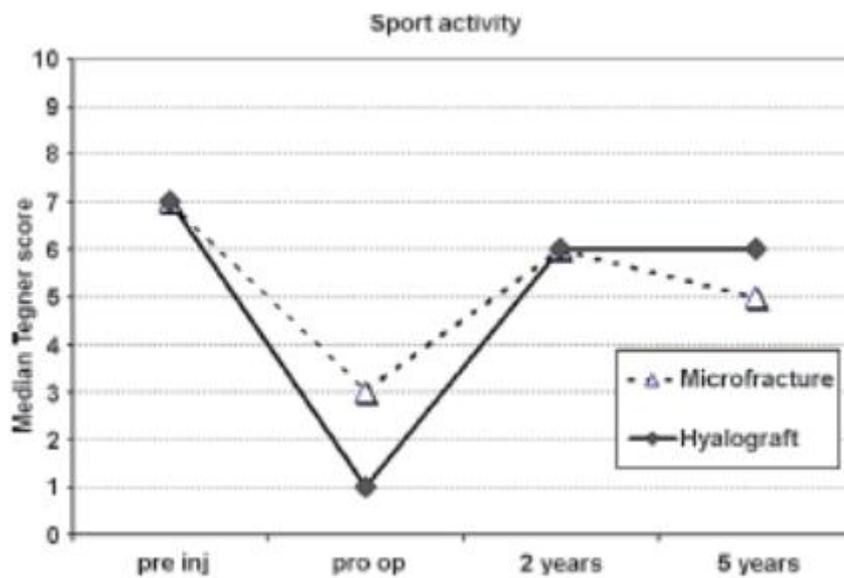
8.2 CARTILAGINE DEL GINOCCHIO

Nella fase iniziale (0-6 settimane), le strategie riabilitative si concentrano sul controllo del dolore, della diffusione, della perdita di movimento e dell'atrofia muscolare e l'obiettivo principale del trattamento è proteggere la zona trattata prevenendo il carico per circa 4 settimane.

La gestione del dolore postoperatorio consente una mobilitazione precoce, che contribuisce a una risoluzione più rapida del gonfiore, favorisce la guarigione dei difetti e la riparazione articolare e previene lo sviluppo di aderenze. Il secondo giorno postoperatorio, è stata raccomandata la mobilitazione auto-assistita del ginocchio o il movimento passivo continuato per 6 ore al giorno con 1 ciclo al minuto fino al raggiungimento di 90° di flessione. Sono stati eseguiti esercizi di mobilitazione controllata con gamma ridotta di movimento, esercizi isometrici e isotonici precoci e compressione meccanica controllata. Nella terza o quarta settimana, era consentito il progressivo carico del peso con le stampelle. La maggior parte dei pazienti ha raggiunto il carico completo entro 6 settimane. L'atto dell'andatura in piscina ha facilitato il recupero del movimento normale.

Tra le 11 e le 32 settimane dopo l'intervento, l'obiettivo della riabilitazione è quello di tornare a un corretto percorso di corsa attraverso esercizi: propriocettivi, di forza, di resistenza e allenamento aerobico. Quando la riabilitazione procede senza complicazioni, questa fase può terminare entro 30-32 settimane dall'intervento. Alla fine di questo tempo, il paziente dovrebbe essere in grado di salire e scendere le scale e correre in avanti a velocità media senza problemi.

Partendo da un individuo sano e mediamente in forma, con punteggio Tegner compreso tra 6/7, la riabilitazione di un paziente, quando possibile, avviene nel periodo di 24 mesi.



Size of Lesion, cm ²	No. of Patients	International Knee Documentation Committee		
		Objective: 5-Year Median (25th-75th)	Subjective: 5-Year Mean (SD)	Tegner: 5-Year Median (25th-75th)
Overall				
<2	24	3.5 (3-4)	74.4 (15.8)	5.5 (4-6)
≥2 <3	36	4 (3-4)	76.9 (19.5)	6 (4-7)
≥3	20	3 (3-4)	73.2 (17.0)	5 (3-5.5)
Kruskal-Wallis test		NS	NS	NS
Microfractures				
<2	11	3 (3-3)	73.6 (11.2)	5 (5-6)
≥2 <3	18	3 (2-3)	68.9 (17.3)	5 (4-6)
≥3	11	3 (2.5-3)	69.1 (13.9)	5 (3.5-5.5)
Kruskal Wallis test		NS	NS	NS
Hyalograft C				
<2	13	4 (4-4)	75.0 (19.3)	6 (4-6)
≥2 <3	18	4 (4-4)	84.9 (18.6)	6.5 (3-7)
≥3	9	4 (3-4)	78.3 (19.9)	4 (3-5)
Kruskal-Wallis test		NS	NS	NS

*No statistically significant difference was found between groups. SD, standard deviation; NS, not significant.

Ovviamente tutto deve essere rapportato all'entità dell'infortunio.

Nota positiva è che nel periodo di 5 anni dall'operazione non ci siano particolari peggioramenti della zona interessata.

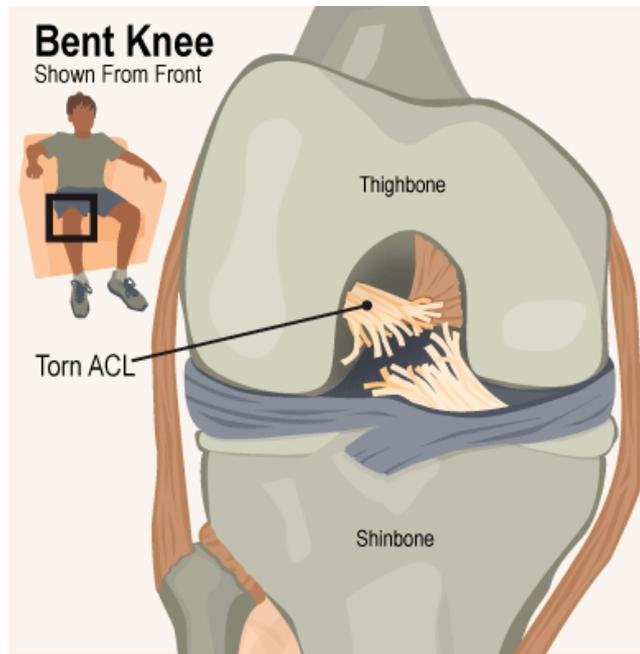
Si può concludere che il trattamento tramite HYAFF da solo o con abbinamento di HA o ECM sia indicato per la riparazione di tendini e cartilagine, o più in generale tessuto connettivo. (14)

9. Tecnologie polimeriche

Possiamo ricondurre i dispositivi in 3 macroaree: suture, scaffold, idrogel.

Ricordiamo che questi hanno le stesse finalità: sorreggere e favorire la rigenerazione dei tessuti; quindi, la scelta di dispositivo ricade sulla compatibilità e il desiderio di imitare il quanto più possibile i tessuti della regione anatomica dove è posto il polimero.

9.1 ACL

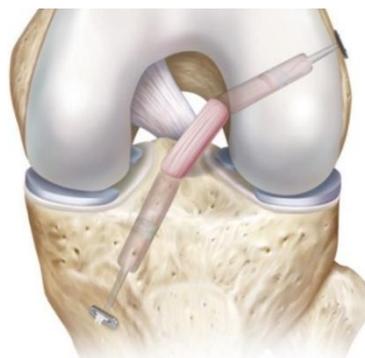
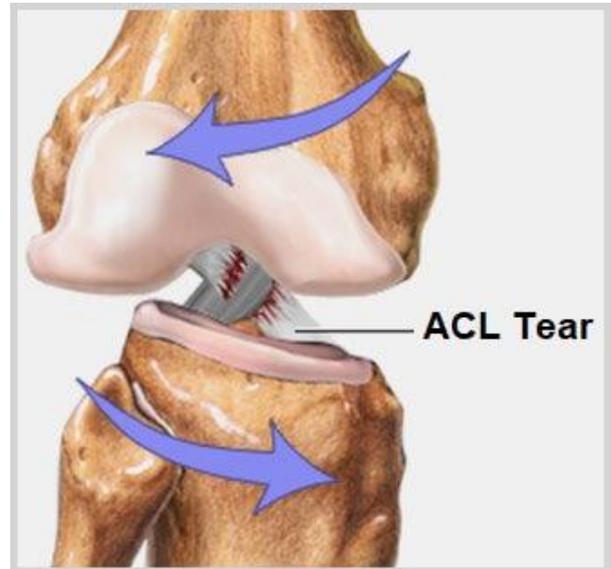


La rottura del legamento crociato anteriore (ACL) è tra le più temute dagli atleti di qualsiasi lega. Questo perché i tempi di recupero sono molto lunghi e in ogni caso è difficile che il malcapitato riesca a tornare ai livelli pre-infortunio. Basti pensare che fino a 20 anni fa questo avvenimento decretava la fine della carriera.

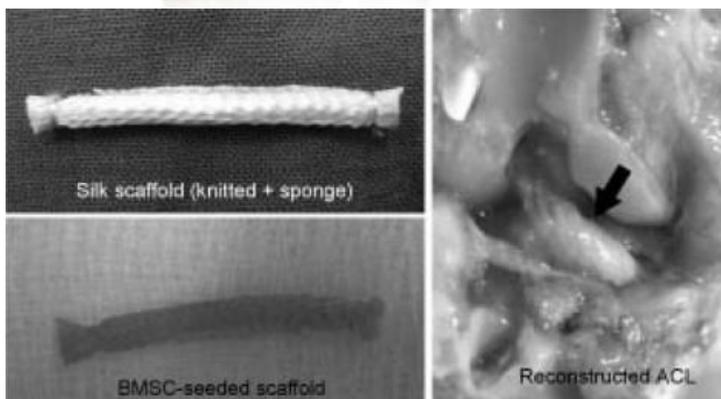
la rottura sopraggiunge in diverse situazioni: un contatto sbagliato col terreno, una collisione o un cambio di direzione improvviso. L'evento accomunante e scatenante è la torsione dell'articolazione ginocchio seguita da una estensione.

La rottura può portare dolore intenso o esserne completamente priva in un primo momento: non è raro vedere atleti che escono dal campo di gioco sulle loro gambe dopo averla subita.

La difficoltà del trattamento è data dalla scarsità di vasi nella zona, che come visto, sono necessari per la proliferazione e riproduzione cellulare.



Ma ora vediamo il sistema di ancoraggio osso-legamento, che sostituisce il tessuto connettivo e ne favorisce la riparazione.



La scelta dei materiali è fondamentale perché deve soddisfare sia le necessità di adesione cellulare sia i carichi previsti per una zona del corpo così stressata. (34)

La forma è quella di una cima nautica, con i filamenti avvolti su 2 strati. I materiali impiegati sono vari: Seta (in questo caso), copolimeri (PGA-PLA-PCL-HYAFF) e tessuti di origine naturale in combinazione con cellule autoctone.(35)

9.2 TENDINE DI ACHILLE

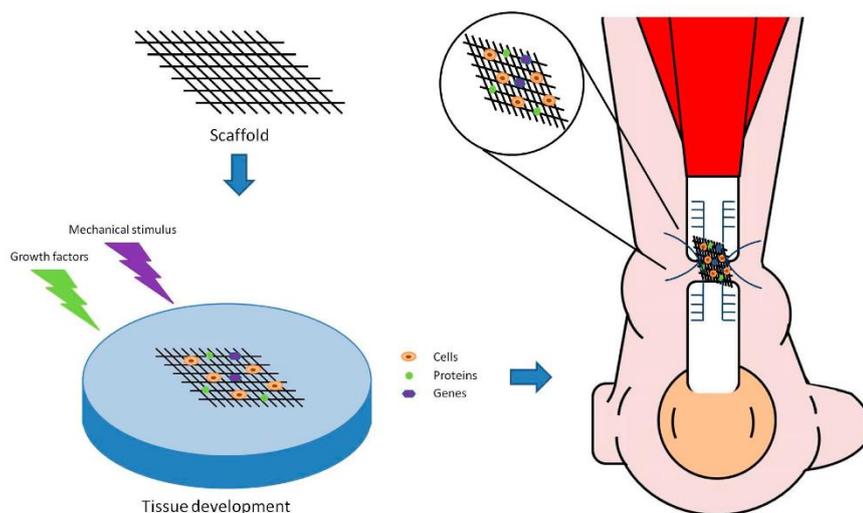


© MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL EDUCATION AND RESEARCH. ALL RIGHTS RESERVED.

Quello di Achille è il tendine più grande del corpo che collega il polpaccio al calcagno. È facile notarlo, visto che nei soggetti particolarmente allenati e con poca massa grassa sporge in maniera particolarmente vistosa.

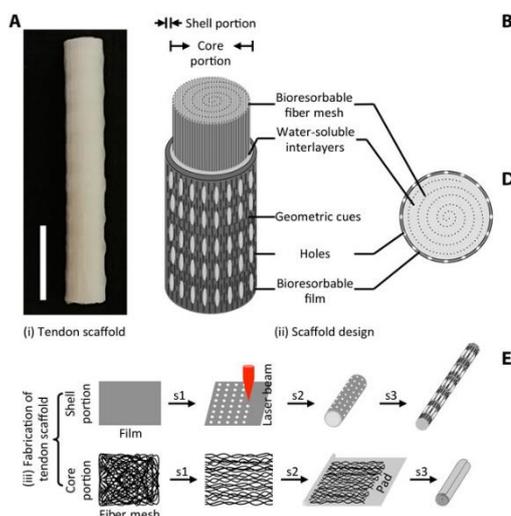
Essendo una zona sollecitata, la maggior parte degli infortuni è portata dallo stress ripetuto e protratto. La rottura solitamente è accompagnata da un “pop” udibile e provoca: dolore, rigidità della

caviglia e difficoltà nel movimento del piede.



Per la riparazione del tendine si impiantano scaffold polimerici con aggiunta in vitro di fattori di crescita ed ECM .(36)

in questo caso abbiamo fibre di PCL avvolte fra di loro a modellare un cilindro che a sua volta è inserito in un singolo ulteriore foglietto di polimero.



Difatti le strutture di riparazione tendinea seguono tutto questo pattern morfologico.(37)

9.3 CORDE VOCALI



Le corde vocali sono due lembi tendinei che, con il passaggio dell'aria, vibrano e producono suoni.

lo Scaffold realizzato si presenta con una

struttura porosa (50-100 micrometri) in copolimero di PLA-PGA-PLGA che può essere orientata in maniera casuale(D) o

longitudinalmente(E). Le nano fibre che compongono la struttura si

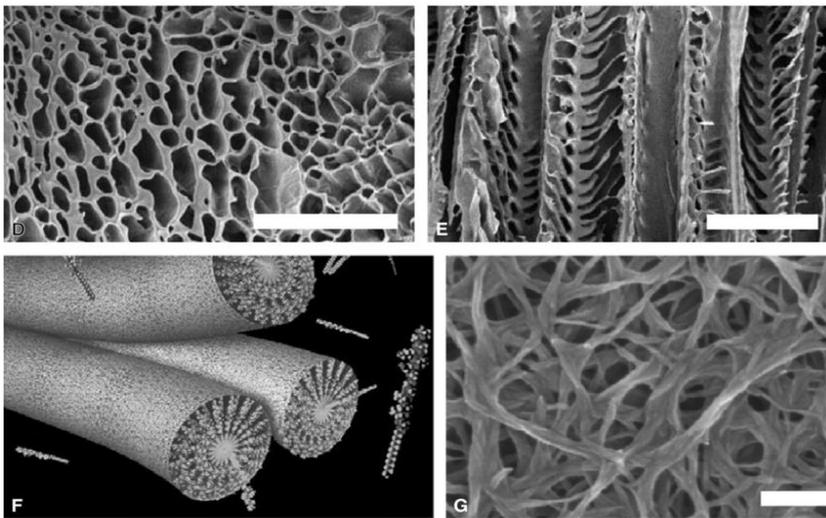
organizzano in

forma cilindrica e

si intrecciano

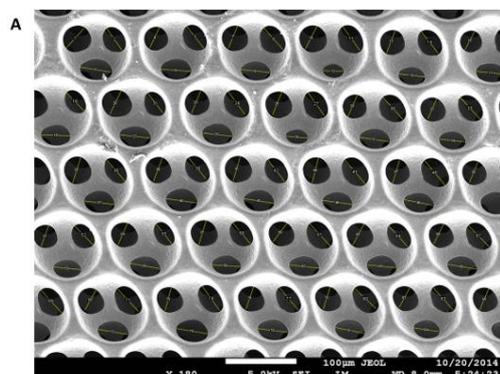
come una rete.

(38)



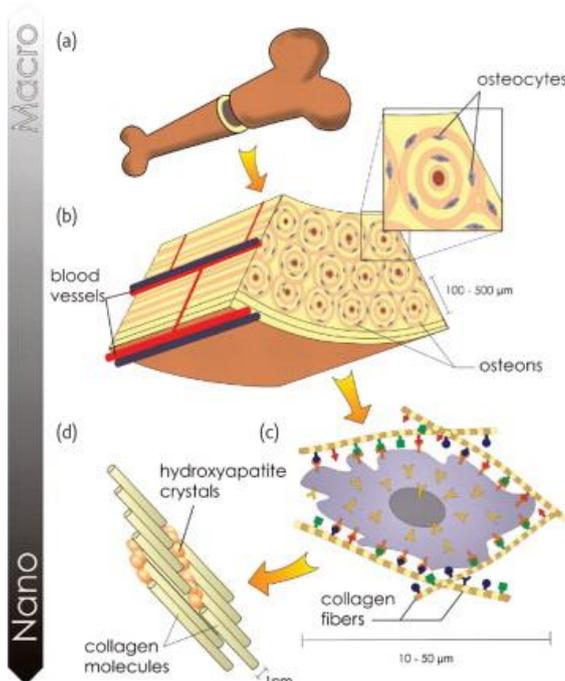
9.4 FEGATO

Il trapianto di organi o di qualsiasi altro tipo di tessuto può portare alla reazione di rigetto da parte del corpo. Un nuovo metodo innovativo è quello di usare in combinazione cellule autoctone e pluripotenti al fine della rigenerazione tissutale superando il problema del rigetto.



Questi idrogel a base di polistirene e PEG servono come impalcatura 3D per la coltura degli epatociti sia in funzione di rigenerazione dei tessuti sia per lo studio delle patologie che colpiscono l'organo. (39)

9.5 BTE (bone tissue engineering)



nanofibre al fine di simulare la conformazione ossea. I polimeri più utilizzati sono: PLA, nella forma di PLLA, PGLA(PGA), PCL e PHBV. I filamenti porosi vengono allineati a formare un gomitolo cavo a simulare la morfologia di un osso lungo(41).

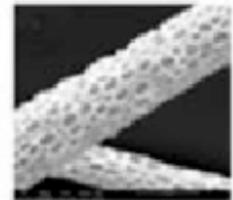
Lo scaffold deve sopportare carichi elevati e permettere la rigenerazione cellulare. La scelta del PGA risulta ideale per le proprietà meccaniche ($E=7$ GPa) ma si degrada troppo velocemente e per questo viene usato il suo composito con il PLA. Il PCL offre un'ottima adesione cellulare, ma i suoi prodotti di degradazione possono essere tossici. Dunque, una soluzione è usare combinazioni di tutti i polimeri sintetici citati con l'aggiunta di quelli naturali (chitosano e HA). Inoltre, questi scaffold devono essere soggetti alla mineralizzazione della zona corticale. (42)

L'elevata capacità rigenerativa dell'osso porta la maggior parte delle fratture a guarire senza la necessità di un intervento importante. Quando è necessaria un'operazione, la scelta degli scaffold polimerici rappresenta un aspetto importante, poiché i prodotti di degradazione e i solventi utilizzati nei metodi di produzione possono causare infiammazioni. In aggiunta, la scelta del materiale deve essere compatibile con la fabbricazione di scaffold composti da micro e

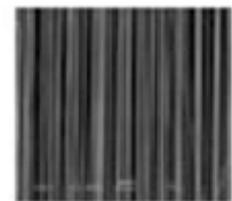
Synthetic

- PCL
- PLLA
- PLGA
- PHBV

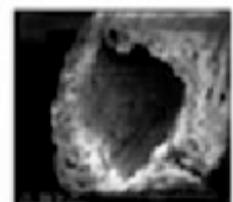
Porous

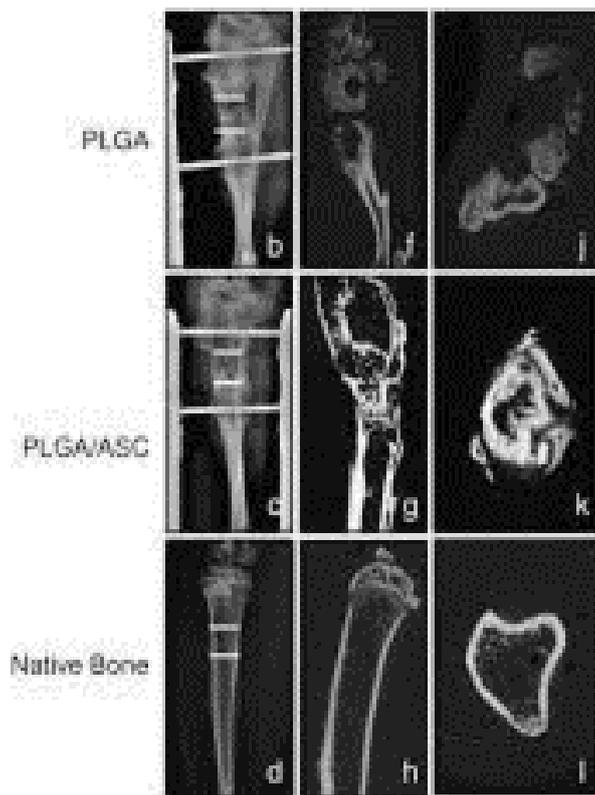


Aligned



Hollow yarn



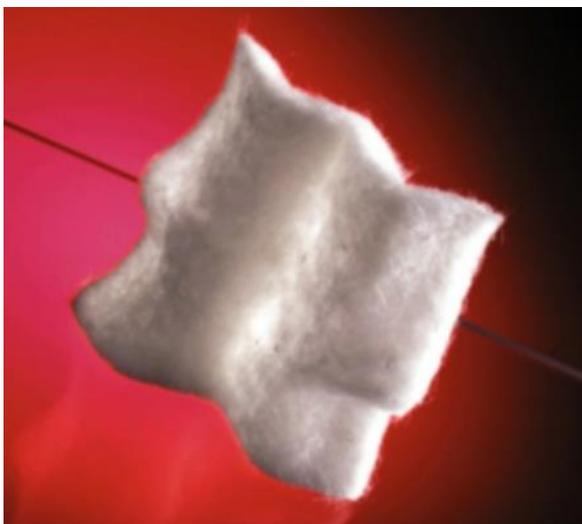


la figura rappresenta le radiografie di tre ratti, a cui è stata rotta e successivamente curata la tibia, ad 8 settimane dall'intervento.

La prima immagine rappresenta una tibia a cui è stato applicato uno scaffold a base di PLGA, la seconda una combinazione di quest'ultimo con cellule adipose dello stroma (ASC) e la terza l'osso tibiale semplice.

La combinazione di cellule adipose e copolimero ha ottenuto il risultato migliore sia dal punto di vista meccanico che della proliferazione cellulare. (43)

9.6 PELLE ARTIFICIALE



Questi dispositivi sono di estrema importanza per la cura delle ulcere croniche, in particolare quelle del piede diabetico, di quelle di origine vascolare e dei grandi ustionati. Il piede è una delle parti del corpo più sottoposte a stress meccanico e diventa estremamente vulnerabile per i soggetti diabetici: col tempo questi danni ripetuti possono portare a ferite che si cicatrizzano lentamente o a infezioni difficili da

curare e che, nei casi più gravi, richiedono l'intervento del chirurgo (ulcere croniche). Il materiale più utilizzato per trattare queste condizioni è lo HYAFF-11. questo possiede una funzione biologica mediata dal rilascio controllato del proprio acido e un ruolo strutturale che favorisce l'adesione e l'organizzazione tridimensionale delle cellule affinché possano ricostituire un vero e proprio tessuto. Man mano che le cellule producono la matrice extracellulare, il supporto di HYAFF va incontro ad un processo di biodegradazione, liberando acido ialuronico a sua volta degradato attraverso processi metabolici. (44)

10 CONCLUSIONI

Come ho cercato di far capire nel corso della tesi, i materiali polimerici rappresentano un punto fermo della medicina: dalla semplice sutura alla simulazione, o meglio, la riproduzione di organi al fine di studiare le malattie e le patologie dalle quali possono essere affetti. Le tecniche che ci permettono di ricreare in vitro tessuto organico sono tutt'oggi una realtà, che comunque deve essere ancora sviluppata e studiata al fine di superare: sia i problemi etici dei rapporti tra donatore e ricevente, sia per ottenere la disponibilità immediata di un rene, per esempio.

Possiamo spendere anche una parola sulla riparazione ossea. Creare protesi capaci di favorire la ricrescita dell'osso supererà tutti i problemi di manutenzione ed eventuale sostituzione, che necessitano un dispositivo classico.

Anche la riparazione tendinea e muscolare, che ha fatto passi da gigante, come visto, potrà porsi nuovi limiti e colmare quel piccolo, ma considerevole, deficit che lascia nei pazienti.

Riferimenti bibliografici

- (0)
- (1) Treccani.
- (2) Le informazioni anatomiche si riferiscono tutte al testo: "Anatomia dell'uomo" di: Glauco, Ambrosi; Dario, Cantino; Paolo, Castano; Silvia, Correr; D'Este, Loredana; Rosario F., Donato; Familiari, Giuseppe; Francesco, Fornai; Massimo, Gulisano; Annalisa, Iannello; Ludovico, Magauida; Maria F., Marcello; Alberto M., Martelli; Paolo, Pacini; Mario, Rende; Pellegrino, Rossi; Chiarella, Sforza; Carlo, Tacchetti; Roberto, Toni; Giovanni, Zummo (2006)
- (3) W. Zhu, J. Li, Y.J. Leong, I. Rozen, X. Qu, R. Dong, Z. Wu, W. Gao, P.H. Chung, J. Wang, S. Chen, 3D-printed artificial microfish, *Adv. Mater.* 27 (2015) 4411–4417. doi:10.1002/adma.201501372.
- (4) 3D bioprinting of functional tissue models for personalized drug screening and in vitro disease modeling Xuanyi Ma¹, Justin Liu², Wei Zhu³, Min Tang³, Natalie Lawrence³, Claire Yu³, Maling Gou⁴, Shaochen Chen^{1,2,3,4}
- (5) Scaffold: A Novel Carrier for Cell and Drug Delivery, Tarun Garg, Saahil Arora, Murthy R S Ra
- (6) Xolymers(trattamenti al plasma)
- (7) Biomaterial Fabrication, Dr. Arjun Namboodiri
- (8) Bone Generating Fibre Polyhydroxybutyrate (PHB), *Jsmat Zerin*
- (9) Chemical–Physical Characterization and in vitro Preliminary Biological Assessment of Hyaluronic Acid Benzyl Ester–Hydroxyapatite Composite, C. GIORDANO*, V. SANGINARIO AND L. AMBROSIO, L. DI SILVIO, M. SANTIN
- (9b) B. P. Chan¹ and K. W. Leong²
- (9c)
**Shuqiang Liu 1,2,*^y, Juanjuan Yu 1,^y, Huimin Li 1, Kaiwen Wang 1, Gaihong Wu 1,*^y, Bowen Wang 1, Mingfang Liu 1, Yao Zhang 1, Peng Wang 1, Jie Zhang 1, JieWu 1, Yifan Jing 1,
Fu Li 1,2 and Man Zhang 1,2
- (9d) IPCB Luigi Ambrosio, Assunta Borzacchiello
- (10)(A.C. Vieira^{1,2,*}, J.C. Vieira¹, J.M. Ferra³, F.D. Magalhães³, R.M. Guedes ², A.T. Marques² Mechanical Study of PLA-PCL Fibers during In Vitro Degradation)
- (11) S. Freiberg, X.X. Zhu*.2004
- (12) Viral Tamboli, Gyan P. Mishra, and Ashim K. Mitra 2012
- (13) Repair of osteochondral defects with hyaluronan- and polyester-based scaffolds Luis A. Solchaga Ph.D.^{yz*}, Johnna S. Temenoff Ph.D.^x, Jizong Gao M.D., Ph.D.^z, Antonio G. Mikos Ph.D.^x, Arnold I. Caplan Ph.D.^z and Victor M. Goldberg M.D.^y
- (14)EUROPEAN MEDICINE AGENCY
- (15)Obradovic et al., 2001
- (16)INFLUENCE OF *IN VITRO* MATURATION OF ENGINEERED CARTILAGE ON THE OUTCOME OF OSTEOCHONDRAL REPAIR IN A GOAT MODEL S. Miot¹, W. Brehm^{2, 5}, S. Dickinson³, T. Sims³, A. Wixmerten¹, C. Longinotti⁴, A.P. Hollander³, P. Mainil-Varlet² and I. Martin¹
- (17) A tissue engineering approach to meniscus regeneration in a sheep model¹ C. Chiari M.D.^y, U. Koller M.D.^y, R. Dorotka M.D.^y, C. Eder M.Sc.^y, R. Plasenzotti D.V.M.^z, S.

- Lang M.D.x, L. Ambrosio Ph.D.k, E. Tognana Ph.D.{, E. Kon M.D.#, D. Salter M.D.yy and S. Nehrer M.D., Ph.D.y*
- (18) Morphology And Degradation Properties Of Pcl/Hyaff11 Composite Scaffolds With Multiscale Degradation Rate V. Guarino, M. Lewandowska, M. Bil, B. Polak, L. Ambrosio
- (19) The improvement of cell infiltration in an electrospun scaffold with multiple synthetic biodegradable polymers using sacrificial PEO microparticles Jacob Hodge,
- (20) Simulated Microgravity Combined with Polyglycolic Acid Scaffold Culture Conditions Improves the Function of Pancreatic Islets Yimin Song,1 ZhengWei,2 Chun Song,2 Shanshan Xie, 2 Jinfa Feng,3 Jiehou Fan, 2 Zengling Zhang,2 and Yubo Shi2
- (21) Non-Woven PGA/PVA Fibrous Mesh as an Appropriate Scaffold for Chondrocyte Proliferation, M. RAMPICHOVÁ^{1,2}, E. KOŠŤÁKOVÁ³, E. FILOVÁ¹, E. PROSECKÁ^{1,2}, M. PLENCNER^{1,2}, L. OCHERETNÁ³, A. LYTVYNETS¹, D. LUKÁČ³, E. AMLER^{1,2,4}
- (22) The effect of different surface treatment methods on the physical, chemical and biological performances of a PGA scaffold Yimin Song,^a Minghua Ren,^b Yadong Wu, ^{*c} Siyu Li,^b Chun Song,^b Fang Wang^c and Yudong Huang^c
- (23) Fabrication of PGA/PLA Scaffold with the Shape of Human Nose Qiong Li, Lu Zhang, Guangdong Zhou, Wei Liu and Yilin Cao
- (24) Effects of nano-bioactive glass on structural, mechanical and bioactivity properties of Poly (3-hydroxybutyrate) electrospun scaffold for bone tissue engineering applications Razieh Iron Mehdi Mehdikhani Elham Naghashzargar[...] Dariush Semnani
- (25) Emerging bone tissue engineering via Polyhydroxyalkanoate (PHA)-based scaffolds Janice Limb,¹ Mingliang You^{c,1}, Jian Li^d, Zibiao Li^{a,*}
- (26) Surface-modified bacterial nanofibrillar PHB scaffolds for bladder tissue repair Zeynep Karahaliloğlu, Murat Demirebilek, Mesut Şam, Necdet Sağlam, Alpay Koray Mızrak & Emir Baki Denkbaş
- (27) Fabrication, Characterization and Cellular Compatibility of Poly(Hydroxy Alkanoate) Composite Nanofibrous Scaffolds for Nerve Tissue Engineering
- (28) Shih-Hsien Chen, Chih-Hao Chen, Jyh-Ping Chen
- (29). 3D printing of HA / PCL composite tissue engineering scaffolds Zhiwei Jiao, Bin Luo, Shengyi Xiang, Haopeng Ma, Yuan Yu, Weimin Yang
- (30) Silvia Palmieri^{1,*}, Mattia Pierpaoli^{2,*}, Luca Riderelli³, Sheng Qi⁴, and Maria Letizia Ruello
- (31) Characterisation of PCL and PCL/PLA scaffolds for tissue engineering Patricio T.a, Domingos M. a, Gloria A.b, Bartolo P.a* (osteosarcoma MG-63 cells)
- (32) Evaluation of histological scoring systems for tissue engineered, repaired and osteoarthritic cartilage M. Rutgersy, M. J. P. van Pelty, W. J. A. Dhertzy, L. B. Creemersy and D. B. F. Sarisy
- (33) Effect of Autologous Platelet Rich Fibrin on the Healing of Experimental Articular Cartilage Defects of the Knee in an Animal Model Davoud Kazemi,¹ Ashraf Fakhrjou,² Vahid Mirzazadeh Dizaji,³ and Majid Khanzadeh Alishahi
- (34) Anterior Cruciate Ligament Reconstruction in a Rabbit Model Using Silk-Collagen Scaffold and Comparison with Autograft Fanggang Bi, Zhongli Shi, An Liu, Peng Guo, Shigui Yan*
- (35) Scaffolds for tendon and ligament tissue engineering Author links open overlay panel J.C.H.Goh S.Sahoo
- (36) The Role of Scaffolds in Tendon Tissue Engineering Angelo V. Vasiliadis^{1,2,*} and Konstantinos Katakalos
- (37) Functional regeneration of tendons using scaffolds with physical anisotropy engineered via microarchitectural manipulation View ORCID Profile Z. Wang^{1,2,*}, View ORCID

- ProfileW. J. Lee^{3,4}, View ORCID ProfileB. T. H. Koh⁵, M. Hong⁶, W. Wang⁵, P. N. Lim¹, J. Feng¹, L. S. Park³, M. Kim³ and View ORCID ProfileE. S. Thian¹.
- (38)Scaffolds to promote spinal cord regeneration S. SAKIYAMA-ELBERT¹ , P.J. JOHNSON¹ , S.I. HODGETTS^{2, 3} , G.W. PLANT^{2, 3, 4} , AND A.R. HARVEY² * ¹ Department of Biomedical Engineering, Washington University, St. Louis, MO, USA
- (39)Fabbricazione di invertito colloidale cristallo poli (glicole etilenico) Scaffold: una piattaforma Cell Culture tridimensionale per il fegato Tissue Engineering doi: 10.3791/54331 Published: August 27, 2016 Hitomi Shirahama¹, Supriya K. Kumar¹, Won-Yong Jeon¹, Myung Hee Kim¹, Jae Ho Lee¹, Soon Seng Ng¹, Seyed R. Tabaei¹, Nam-Joon Cho^{1,2}
- (40) Z., Yu, D., Zhong, Z., Liang, Q., Jing, X., 1999. Enzymatic degradation of polycaprolactone)/poly(dllactide) blends in phosphate buffer solution. Polymer. 40, 2859–2862.
- (41)Development of biomimetic electrospun polymeric biomaterials for bone tissue engineering. A Review, Anuj Kumar, Sugandha chahal, fathima Shahitha Jahir Hussain.
- (42)Biomaterials for bone tissue engineering. Molly M.Stevens
- (43)Enhancement of tibial regeneration in a rat model by adipose-derived stromal cells in a PLGA scaffold Byung-Hyun Park a,¹ , Lu Zhou b,¹ , Kyu Yun Jang c , Ho Sung Park c , Jung Min Lim d , Sun Jung Yoon b , Sang Yong Lee e , Jung Ryul Kim b,f, *
- (44)Advanced ReviewTissue scaffolds for skin woundhealing and dermal reconstructionS. P. Zhong,¹Y. Z. Zhang²and C. T. Lim^{1,3,4}