



# UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Sede amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Scienze Farmaceutiche

SCUOLA DI DOTTORATO IN: BIOLOGIA E MEDICINA DELLA  
RIGENERAZIONE

INDIRIZZO: INGEGNERIA DEI TESSUTI E DEI TRAPIANTI

CICLO XX

**PRODUZIONE DI MICROPARTICELLE A BASE DI ACIDO  
IALURONICO PER IL RILASCIO DI FATTORI DI CRESCITA  
NELLA CURA DI ULCERE**

**Direttore della Scuola:** Ch.mo Prof. Pier Paolo Parnigotto

**Supervisore:** Ch.ma Prof.ssa Roberta Cortivo

Dipartimento di Istologia, Microbiologia e Biotecnologie Mediche

**Dottoranda:** Gloria Zorzato

DATA CONSEGNA TESI  
31 gennaio 2008

# Sommario

<b>RIASSUNTO</b>	pag. 1
<b>ABSTRACT</b>	pag. 2
<b>1. INTRODUZIONE</b>	pag. 3
<b>1.1 Rilascio controllato o programmato di farmaci</b>	pag. 3
1.1.1 Forme farmaceutiche a rilascio controllato e loro caratteristiche	pag. 4
1.1.2 Ottenimento di forme farmaceutiche a rilascio controllato su base polimerica	pag. 7
1.1.3 Polimeri utilizzati nella realizzazione di forme farmaceutiche a rilascio controllato	pag. 8
1.1.4 HYAFF 11 <sup>®</sup>	pag. 14
1.1.5 Micro- e nanoparticelle	pag. 19
1.1.6 Tecniche di produzione di micro- e nanoparticelle mediante l'uso di fluidi supercritici	pag. 20
<b>1.2 Ulcere</b>	pag. 23
1.2.1 Meccanismo di guarigione	pag. 23
1.2.2 Metidiche di cura	pag. 26
1.2.3 PDGF	pag. 29
1.2.4 Le ulcere diabetiche	pag. 33
<b>2. SCOPO DELLA TESI</b>	pag. 37
<b>3. MATERIALI E METODI</b>	pag. 38
<b>3.1 Biomateriale</b>	pag. 38
<b>3.2 Descrizione dell'impianto e procedure operative per la produzione di particelle di polimero</b>	pag. 38
<b>3.3 Analisi delle particelle</b>	pag. 43
3.3.1 SEM	pag. 43

3.3.2 Light scattering	pag. 43
<b>3.4 Valutazione della capacità di assorbimento del biomateriale</b>	pag. 44
3.4.1 Produzione del film di HYAFF 11 <sup>®</sup>	pag. 44
3.4.2 Valutazione dell'assorbimento del colorante da parte del film polimerico	pag. 44
3.4.3 Analisi immunoistochimica dell'assorbimento dei fattori di crescita da parte delle microparticelle	pag. 45
<b>3.5 Analisi del rilascio del fattore di crescita</b>	pag. 45
3.5.1 Metodo ELISA	pag. 46
<b>3.6 Realizzazione della preparazione da sperimentare</b>	pag. 46
<b>3.7 Sperimentazione animale</b>	pag. 47
3.7.1 Ottenimento delle ferite	pag. 47
3.7.2 Trattamento delle ferite	pag. 47
3.7.3 Fotografia e analisi delle ferite	pag. 48
3.7.4 Analisi immunoistochimiche	pag. 48
3.7.5 Analisi istologiche	pag. 49
3.7.6 Analisi semi-quantitative delle cellule	pag. 50
<b>4. RISULTATI</b>	pag. 51
<b>4.1 Produzione delle particelle</b>	pag. 51
<b>4.2 Analisi della capacità di assorbimento del polimero</b>	pag. 57
4.2.1 Assorbimento e diffusione di una soluzione di fluoresceina all'interno del film polimerico	pag. 57
4.2.2 Assorbimento di una soluzione di fluoresceina all'interno delle microparticelle di HYAFF 11 <sup>®</sup>	pag. 59
4.2.3 Assorbimento dei fattori di crescita PDGF e TGF- $\beta$ da parte delle microparticelle di HYAFF 11 <sup>®</sup>	pag. 60

<b>4.3 Analisi del rilascio dei fattori di crescita dalle microparticelle di HYAFF 11<sup>®</sup></b>	pag. 61
<b>4.4 Sperimentazione su modello animale</b>	pag. 70
4.4.1 Effetti del trattamento in vivo	pag. 70
4.4.2 Risposta cellulare al trattamento	pag. 73
<b>5. DISCUSSIONE</b>	pag. 75
<b>Bibliografia</b>	pag. 80

## RIASSUNTO

Nel presente lavoro viene descritta la produzione di microparticelle a base di HYAFF 11<sup>®</sup> (derivato esterificato dell'acido ialuronico) mediante un processo di precipitazione semi-continuo di tipo GAS allo scopo di ottenere un sistema di rilascio controllato di fattori di crescita da applicare nella cura di ulcere. Sono state ottimizzate le condizioni operative, quali pressione, diametro dell'ugello di iniezione, concentrazione della soluzione di biopolimero di partenza, al fine di ottenere un prodotto con le caratteristiche desiderate, in termini di morfologia e dimensioni. Le analisi svolte mediante SEM e light scattering hanno confermato l'ottenimento di particelle porose di dimensioni inferiori a 1  $\mu\text{m}$ . Grazie all'elevata area superficiale specifica, tale materiale ha dimostrato di essere in grado di assorbire facilmente coloranti e fattori di crescita da soluzioni acquose. Successivamente è stato dimostrato che il rilascio dei fattori di crescita è guidato esclusivamente da processi di erosione ed è stato creato un modello matematico per descrivere le cinetiche di rilascio.

Sono stati infine condotti degli esperimenti in vivo per valutare l'effetto del trattamento con microparticelle impregnate di PDGF, come sistema di rilascio graduale, nel processo di guarigione di ulcere profonde.

## **ABSTRACT**

The present study describes the production of hyaluronan based porous microparticles by a semi-continuous gas antisolvent (GAS) precipitation process to be used as a growth factor delivery system for in vivo treatment of ulcers. Operative process condition, such as pressure, nozzle diameter and HYAFF<sup>®</sup> solution concentrations, were adjusted to optimize particle production in terms of morphology and size. Scanning electron microscopy and light scattering demonstrated that porous nano-structured particles with a size of 300-900 nm had a high specific surface suitable for absorption of growth factors from the aqueous environment within the polymeric matrix. Water acted as a plasticizer, enhancing growth factor absorption. The absorption process was developed using a fluorescent dye and growth factors PDGF and TGF- $\beta$ . Immunohistochemical analysis confirmed the high efficiency of absorption of growth factors and a mathematical model was generated to quantify and qualify the in vitro kinetics of growth factor release from the polymeric matrix. In vivo experiments were performed with the aim to optimize timed and focal release of PDGF to promote optimal tissue repair and regeneration of full-thickness wounds.

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 Rilascio controllato o programmato di farmaci

Una delle principali linee di ricerca nel settore tecnologico farmaceutico punta l'attenzione sullo sviluppo di formulazioni in grado di liberare farmaci nell'organismo in quantità e velocità controllate. Esistono già numerose forme farmaceutiche dalle quali il rilascio può essere ritardato, o mediante le quali la velocità e la durata della liberazione del principio attivo possono essere programmate. Tali formulazioni sono definite appunto sistemi a rilascio controllato e consentono la regolazione del livello ematico del farmaco, in modo da evitare fenomeni di sotto- o sovraddosaggio e di minimizzare gli effetti collaterali indesiderati.

I metodi convenzionali di somministrazione dei farmaci, normalmente, non permettono di ottenere un rilascio controllato nel tempo del principio attivo: in molti casi, si ha un repentino rilascio del farmaco dalla forma farmaceutica e ciò può portare in breve tempo al raggiungimento del limite di tossicità, ossia la concentrazione a cui il principio attivo comporta effetti collaterali o tossici indesiderati. Questo evento è particolarmente evidente nel caso dei farmaci più recenti ottenuti tramite le biotecnologie e rappresentati da peptidi, proteine o oligonucleotidi, farmaci di nuova generazione molto attivi e caratterizzati da un ristretto intervallo terapeutico.

Una volta somministrato il farmaco, esso mantiene per un periodo relativamente breve il limite terapeutico (che equivale alla concentrazione minima al di sotto della quale non si produce l'effetto desiderato) e successivamente i suoi livelli ematici diminuiscono lentamente fino alla successiva somministrazione. Gli effetti terapeutici desiderati si potranno ottenere, dunque, solo mediante somministrazioni ripetute del farmaco, che spesso non sono ben accettate dal paziente oltre ad essere molto costose. La tecnologia farmaceutica moderna ha tentato con successo di ovviare a questi problemi con la realizzazione di sistemi di rilascio controllato dei farmaci, ossia di

preparazioni farmaceutiche che, una volta assunte dal paziente, sono in grado di liberare nel tempo il principio attivo in esse contenuto, garantendo una sua costante concentrazione a livello ematico. In questo modo si può ridurre la frequenza di somministrazione con vantaggi sia per il paziente che per quanto riguarda il costo della terapia.

Negli ultimi anni, inoltre, sono stati fatti molti sforzi per sviluppare formulazioni adatte alla somministrazione di farmaci con caratteristiche particolari, quali instabilità fisica e chimica, suscettibilità alla degradazione enzimatica, caratteristiche farmacocinetiche e farmacodinamiche non favorevoli. Il risultato delle ricerche svolte in quest'ambito è rappresentato anche dall'innovativo uso di particolari polimeri quale mezzo di rilascio e direzionamento di molecole biologicamente attive. Tali polimeri sono in grado di consentire un aumento del tempo di permanenza del farmaco nel circolo sanguigno o nella sede di applicazione, una riduzione dell'antigenicità, un'aumentata stabilità nei confronti di enzimi e quindi una maggiore biodisponibilità.

Queste innovazioni biotecnologiche non vengono sfruttate solamente per la somministrazione per via sistemica, ma anche per le applicazioni topiche destinate al trattamento di ferite, o alla medicazione dell'epidermide e delle mucose. In questo caso, è possibile controllare il rilascio nel sito di interesse utilizzando micro o nanoparticelle di natura polimerica come serbatoio del farmaco (Allémann et al., 1998, Panyam et al., 2003).

### **1.1.1 Forme farmaceutiche a rilascio controllato e loro caratteristiche**

Allo scopo di realizzare un farmaco a rilascio graduale o prolungato, sono state sviluppate varie forme farmaceutiche che possono essere suddivise in tre gruppi:

- a rilascio sostenuto: in questo caso il medicinale somministrato rende rapidamente disponibile una dose iniziale di principio attivo all'interno della fascia terapeutica ed è in grado di rilasciare per un certo tempo una dose minore, detta di mantenimento, che permette di sostituire la parte eliminata o



metabolizzata. In realtà la concentrazione non si mantiene costante ma oscilla all'interno della fascia terapeutica;

- ad azione prolungata: la quantità di medicinale somministrata è leggermente superiore rispetto a quella necessaria a raggiungere la risposta terapeutica desiderata. In questo modo, senza produrre pericolosi sovraddosaggi, si ottiene un effetto prolungato rispetto alla dose normale perché l'organismo impiega più tempo a eliminare o metabolizzare il farmaco;
- ad azione ripetuta: viene fornita una dose iniziale di medicinale e ne viene liberata una successiva quando l'effetto della prima sta svanendo.

Per la realizzazione di medicinali di questo tipo si applicano varie tecniche, che si distinguono in base al metodo con cui il principio attivo viene bloccato all'interno del preparato farmaceutico.

Questo può avvenire:

- per bloccaggio fisico mediante eccipienti e rivestimenti esterni (attualmente il metodo più diffuso);
- per inglobamento mediante resine a scambio ionico
- per inglobamento mediante polimeri biodegradabili.

La terza ed ultima tecnica, che prevede di intrappolare il farmaco in una matrice polimerica biodegradabile, si sta diffondendo in maniera particolare in questi ultimi anni. Il principio attivo, in questo caso, viene rilasciato grazie a processi di diffusione, degradazione ed erosione della matrice stessa.

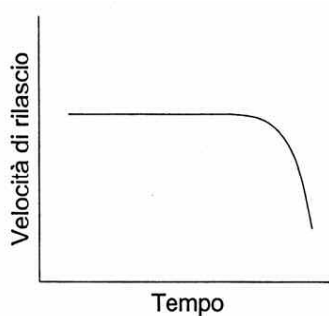
I sistemi a rilascio controllato che utilizzano sostanze polimeriche sono classificati in base al meccanismo che controlla il rilascio del farmaco.

Si hanno sistemi a controllo diffusionale, nei quali la velocità di rilascio è determinata dalla semplice diffusione del principio attivo; queste sono le forme maggiormente utilizzate dall'industria farmaceutica e possono essere distinti in sistemi a reservoir e sistemi a matrice. Per quel che riguarda i sistemi a reservoir, il farmaco è presente come core rivestito da una barriera diffusionale di tipo polimerico e questo comporta una velocità di rilascio che segue una cinetica di ordine zero, almeno per un certo tempo. In figura 1.1(a) è rappresentato un tipico profilo della velocità di rilascio di

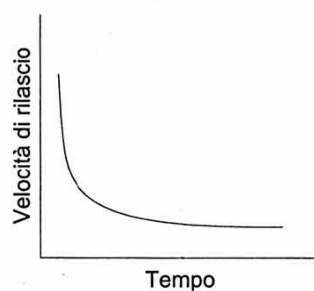
questo sistema. Si definiscono, invece, sistemi a matrice quelli in cui il principio attivo è disciolto o disperso in una matrice polimerica inerte. La velocità di rilascio in questo caso, segue l'andamento rappresentato in figura 1.1(b).

Un approccio diverso dal precedente è l'uso di sistemi erodibili, detti a controllo chimico, in cui il farmaco è idealmente distribuito in modo uniforme su tutta la matrice polimerica e il suo rilascio è generalmente governato da un effetto combinato di degradazione del polimero e di diffusione. In questo modo si ottengono cinetiche di rilascio di primo ordine, anche se sono state osservate frequentemente cinetiche più complicate, poiché la diffusione del farmaco è influenzata dalla degradazione della matrice (figura 1.2).

Nei sistemi a rigonfiamento controllato o idrogeli, invece, la matrice polimerica è interessata da complessi processi diffusionali coinvolgenti le sostanze presenti nel mezzo di dissoluzione esterno. Il rilascio controllato di farmaci per rigonfiamento (swelling) può essere raggiunto sfruttando la transizione vetrosa/amorfa dei polimeri, in presenza di agenti rigonfianti e il rilassamento macromolecolare associato a questa transizione. Sono stati messi a punto degli idrogeli che, in presenza di acqua, sono in grado di aumentare il loro volume anche di cinque volte. In questo caso il rilascio è controllato dal rigonfiamento prodotto dall'acqua e dalla successiva diffusione del farmaco attraverso il reticolo polimerico significativamente rigonfiato.

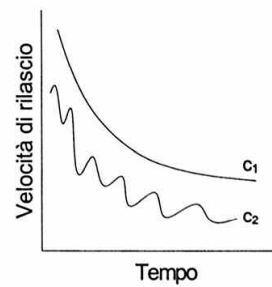


**1.1 (a)**



**1.1 (b)**

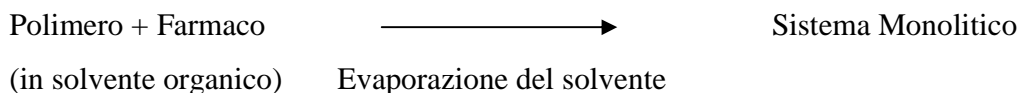
**Fig. 1.1:** (a) *Cinetica di rilascio dei sistemi a reservoir;* (b) *cinetica di rilascio dei sistemi a matrice;*



**Fig. 1.2:** *Cinetica di rilascio dei sistemi erodibili.*

### 1.1.2 Ottenimento di forme farmaceutiche a rilascio controllato su base polimerica

Esistono numerose tecniche che permettono di ottenere farmaci a rilascio graduale impiegando polimeri. Il metodo più semplice per realizzare sistemi monolitici con forma geometrica e dimensioni definite consiste nel realizzare un ambiente adeguatamente concentrato di soluzione organica di polimero contenente il farmaco di interesse e quindi procedere con l'evaporazione lenta del solvente. Con questo metodo si possono impiegare polimeri solubili in solventi organici.



L'evaporazione deve avvenire in condizioni ben controllate per evitare la formazione di sedimenti, bolle, o ammassi.

Altri metodi per preparare matrici polimeriche prevedono l'uso di raggi  $\gamma$  o UV o la polimerizzazione da induzione chimica di un miscuglio farmaco-monomero.

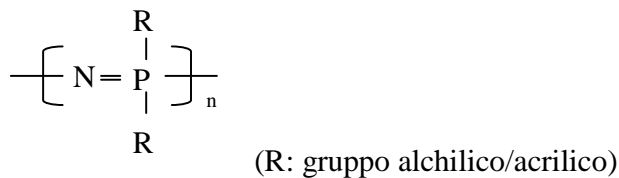
Tutte queste tecniche presentano l'inconveniente di fornire un prodotto finale inquinato da sostanze residue indesiderate, in alcuni casi anche tossiche, per cui è necessario effettuare a valle operazioni di separazione e purificazione, come filtrazioni e lavaggi, che vanno a incidere sul costo finale del preparato e che creano

sottoprodotti difficili da smaltire.

### 1.1.3 Polimeri utilizzati nella realizzazione di forme farmaceutiche a rilascio controllato

I polimeri più largamente utilizzati nel rilascio controllato dei farmaci sono: i polifosfazeni, i polimeri dell'acido lattico e dell'acido glicolico, i poli-ε-caprolattone, le polianidridi, i polialchil acrilati, i poliacrilati e i derivati dell'acido ialuronico (Chasin and Langer, 1990; Dumitru, 1994; Park et al., 1993, Soppimath et al., 2001).

**I polifosfazeni.** I polifosfazeni (POP) sono costituiti dalla ripetizione dell'unità



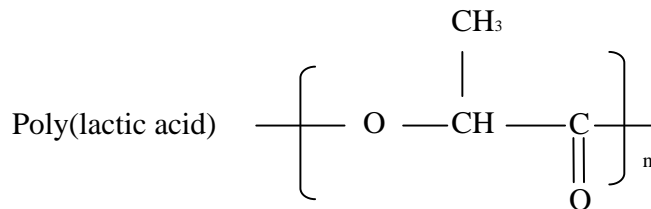
Essi sono un'importante classe di polimeri inorganici biodegradabili con un'ampia gamma di applicazioni grazie alle loro molteplici e diverse proprietà (Allock, 1998; De Jaeger and Gleria, 1998).

Nella maggior parte dei casi, essi vengono preparati mediante polimerizzazione per apertura di anello a partire dall'esaclorociclofosfazene; si ottiene così il polidiclorofosfazene, e successivamente, sfruttando reazioni di sostituzione, il cloro viene sostituito da una vasta gamma di gruppi nucleofili. La natura dei gruppi sostituenti, più che il loro numero, determina le caratteristiche di solubilità e quindi l'idrofilicità del polimero. Frequentemente i farmaci sono intrappolati fisicamente in matrici insolubili di polifosfazeni con una delle più comuni procedure per ottenere microparticelle. Da tali matrici, il rilascio avviene mediante il processo di diffusione del farmaco e l'erosione del polimero. Questa caratteristica permette il rilascio di farmaci ad alto peso molecolare come peptidi e proteine.

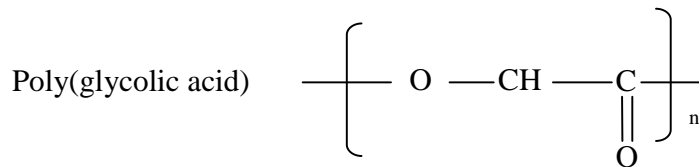
**I polimeri dell'acido lattico e dell'acido glicolico.** Questi polimeri sono stati

considerati, fino ad ora, i più interessanti ed ampiamente utilizzabili nel rilascio dei farmaci e nella realizzazione di biomateriali. I polimeri ottenuti dalla forma lineare dell'acido lattico e dell'acido glicolico prendono il nome di:

a) polilattici (PLA)



b) poliglicolici (PGA),



Mentre quelli ottenuti dalla forma ciclica dei due monomeri di partenza vengono chiamati polilattidi e poliglicolidi. I PLA hanno una maggior solubilità nei solventi organici rispetto ai PGA (Engelberg, and Kohn, 1991). La forma più comune dei polimeri dell'acido lattico è quella ottenuta dall'enantiomero L (nel corpo umano si ritrova solo tale configurazione). Il poli-L-acido lattico (PLLA) cristallizza più facilmente dei polimeri derivanti da miscugli racemici D e L, che sono completamente amorfi. Il grado di cristallizzazione che si ottiene dipende dal loro peso molecolare del polimero e dalla temperatura. Partendo dagli stessi monomeri possono essere realizzati anche dei copolimeri. L'acido polilattico co-glicolico (PLGA), è un copolimero di acido lattico e glicolico. La velocità di degradazione del PLGA dipende principalmente dalla percentuale dei due monomeri presenti nel polimero e dal pH della soluzione in cui si trova (von Recum et al., 1995).

Questi polimeri vengono frequentemente utilizzati sotto forma di microsfele per il rilascio controllato di farmaci sia a livello sistemico che topico (Anderson and Shive, 1997; Caliceti et al., 2004). Il rilascio del farmaco è regolato sia dalla diffusione delle

molecole di principio attivo dall'interno del polimero, che dall'erosione della matrice del polimero stesso.

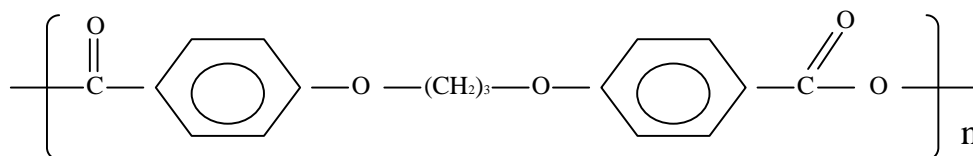
**I poli-ε-caprolattoni.** I poli-ε-coprolattoni sono polimeri di grande interesse anche perchè possono essere ricavati facilmente da materie prime poco costose (dall'ossidazione del cicloesano con l'acido peracetico e la successiva polimerizzazione con trasferimento anionico, cationico o entrambi), (Pitt, 1990). Essi possiedono una struttura semicristallina con un basso peso molecolare. Tale caratteristica strutturale li rende meno accessibili all'acqua e quindi conferisce loro una minore biodegradabilità e una bassa permeabilità ai farmaci dovuta alla tortuosità della forma cristallina.

Modifiche alla struttura e quindi della biodegradabilità si possono ottenere mediante la realizzazione di copolimeri con la cellulosa propionato, la cellulosa acetato-butirato, o l'acido polilattico.

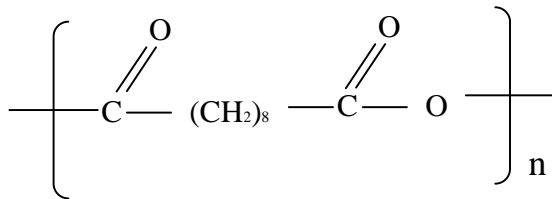
Anche i poli-ε-coprolattoni vengono frequentemente utilizzati nella preparazione di microsfe.

**Le polianidridi.** I monomeri iniziali usati per la preparazione di questi polimeri degradabili sono acidi bicarbossilici alifatici o aromatici, con carattere idrofobico.

- Polianidride aromatica



- Polianidride alifatica



Essendo quindi di natura idrofobica, le matrici polianidridiche consentono una buona protezione dei farmaci intrappolati al loro interno nei confronti di una eventuale degradazione idrolitica (Chasin et al., 1990; Domb et al., 1994 Gorpferich, 1999). Tali polimeri tuttavia, esponendo il legame anidridico all'ambiente acquoso dei liquidi fisiologici, sono comunque sottoposti all'erosione idrolitica superficiale. L'uso delle polianidridi rappresenta un enorme vantaggio per ottenere il rilascio di farmaci molto labili che vengono dapprima ben conservati al loro interno e poi vengono liberati nell'ambiente circostante in seguito all'erosione della matrice. La velocità di degradazione delle polianidridi in ambiente acquoso dipende dalla loro composizione chimica e su questa si può intervenire per ottenere le caratteristiche volute.

Questi polimeri reagiscono facilmente con farmaci portanti gruppi amminici e vengono utilizzati per la preparazione di forme farmaceutiche adatte sia a somministrazioni sistemiche che per uso topico.

**I polialchil acrilati.** Allo scopo di ottenere il rilascio controllato di farmaci sono usati principalmente il polialchil acrilato e il polialchil cianoacrilato, preparati rispettivamente a partire da monomeri di acrilato e di cianoacrilato. Nei polialchil cianoacrilati il processo di biodegradazione è seguito da solubilizzazione e, proprio grazie a tale caratteristica, questi polimeri sono usati da molti anni come collante dei tessuti in chirurgia. Diversamente da quanto riportato per i polimeri precedenti, in questo caso, per ottenere dei dispositivi di forma particolare, non si parte dal materiale già polimerizzato, ma è possibile ottenere direttamente sia microsfele che microcapsule durante il processo stesso di polimerizzazione (Guiot et al., 1986).

La polimerizzazione eseguita in presenza di farmaci ed emulsionanti consente l'ottenimento di particelle piccolissime (nanosfele) delle dimensioni di 30-300 nm,

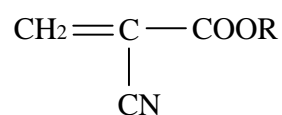
che, se somministrate per via sistemica, permettono una libera circolazione dei farmaci stessi nel sangue seguita dalla loro localizzazione negli organi bersaglio. La possibilità di ottenere questo tipo di dispositivi dipende da vari fattori, come la natura del monomero, la pKa del farmaco, la concentrazione media del principio attivo nel mezzo di polimerizzazione, e la relativa idrofobicità del farmaco e del monomero.

I farmaci possono essere assorbiti durante il processo di polimerizzazione o legati sulla superficie delle nanosfere già formate.

Acrilati



Cianoacrilati

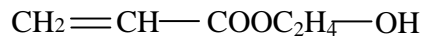


**Gli idrogeli poliacrilati.** Gli idrogeli sono da considerarsi delle matrici idrofile di grande interesse sia per uso sistemico che topico. La caratteristica principale di questi sistemi consiste nella loro grande capacità di assorbire l'acqua che, da un lato, conferisce loro un'elevata biocompatibilità e, dall'altro, modula la cinetica di rilascio di eventuali farmaci in essi intrappolati (Park et al., 1993). L'assorbimento dell'acqua, come tutte le altre proprietà fisico-chimiche, meccaniche, biologiche e farmaceutiche, dipende strettamente dalla composizione del polimero. Inoltre la possibilità di ottenere anche copolimeri di composizione qualitativa e quantitativa diversa, rende l'uso di queste sostanze altamente versatile e di grande interesse nella tecnologia farmaceutica. L'appropriata scelta della composizione del copolimero può portare ad avere molte varietà di idrogeli, da quelli chimicamente e fisicamente inerti, a quelli che sono sensibili a precisi stimoli come il variare della temperatura o del pH. I più interessanti polimeri formanti idrogeli sono quelli ottenuti con l'utilizzo di raggi gamma che inducono la polimerizzazione dei monomeri a basse temperature in presenza del farmaco e di agenti leganti in grado di dare *cross-linking*. Il

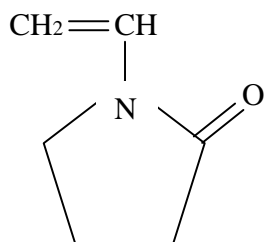


congelamento previene la precipitazione del farmaco e la sua possibile denaturazione durante il processo di polimerizzazione (Caliceti et al., 2001). I monomeri più usati sono il 2-idrossietil acrilato, il metacrilato e il vinil pirrolidone.

2-idrossietil acrilato



Vinil pirrolidone



Da questi idrogeli, il principio attivo viene rilasciato secondo una cinetica di diffusione controllata, con una velocità che dipende principalmente dalle caratteristiche di solubilità del farmaco nel mezzo esterno.

In alternativa, ponendo la matrice di gel preformata a contatto con una soluzione acquosa del farmaco, questa viene assorbita con il conseguente rigonfiamento della massa stessa. Anche questo metodo permette di caricare il farmaco nell'idrogel senza andare incontro a denaturazione.

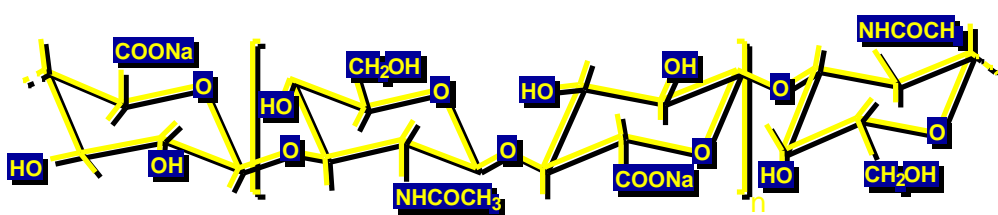
**L'acido ialuronico.** Questo polimero naturale è molto solubile in acqua e per questo le preparazioni da esso ottenute sono altamente instabili nei liquidi fisiologici e quindi non adatte al rilascio controllato dei farmaci. Tale problema viene risolto mediante la derivatizzazione con gruppi idrofobici, che portano all'ottenimento di polimeri temporaneamente insolubili.

E' noto che la lunghezza della catena è di fondamentale importanza per arrivare alla cinetica di rilascio del farmaco voluta, che è legata a sua volta alla velocità di erosione della matrice polimerica. Tale processo non dura comunque per più di

qualche giorno. Un'adeguata scelta del sostituente con cui derivatizzare l'acido ialuronico permette di ottenere prodotti privi di tossicità o immunogenicità e con buona biocompatibilità. Queste sono tutte proprietà indispensabili e ben sfruttabili per la preparazione di biomateriali (Rastelli et al., 1990; Hoekstra, 1999), a partire dal polimero naturale dell'acido ialuronico, da utilizzare nell'ingegneria dei tessuti. La molecola di acido ialuronico porta un insieme di gruppi ossidrilici e carbossilici liberi che si possono sfruttare per legare direttamente il farmaco al polisaccaride. In questo modo, durante il processo fisico dell'erosione e solubilizzazione della matrice del polimero, si ottiene un significativo abbassamento della velocità di rilascio del farmaco nell'ambiente circostante, dovuto in buona parte al tempo necessario alla rottura chimica di questi legami (Benedetti, 1994).

#### 1.1.4 HYAFF 11<sup>®</sup>

L'acido ialuronico (HA) è un eteropolimero composto dall'alternarsi di unità di acido D-glucuronico e di N-acetilglucosamina, fra loro legate con legame  $\beta$ -1,3 glicosidico. Il disaccaride che ne risulta (acido ialubiuronico) costituisce l'unità ripetitiva che si lega alla successiva con legame  $\beta$ -1,4 glicosidico (Fig. 1.3)



*Fig. 1.3 Molecola di acido ialuronico*

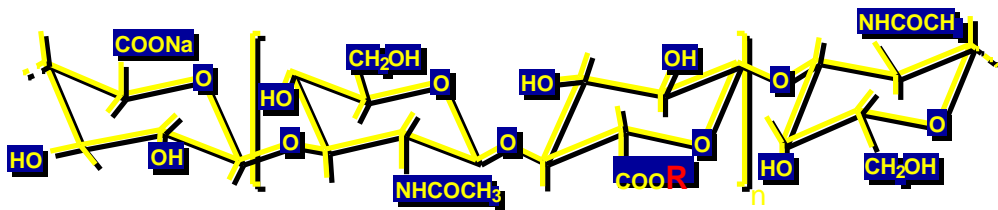
Per il notevole numero di gruppi carbossilici, l'acido ialuronico, nonostante sia costituito da catene molto lunghe (circa 20000 unità), è solubile in acqua, alla quale imparte elevata viscosità. La repulsione elettrostatica tra i gruppi COO<sup>-</sup> mantiene la molecola di acido ialuronico distesa e fortemente idratata. L'acido ialuronico ha un

peso molecolare di alcuni milioni di Da ed è un polisaccaride ubiquitariamente diffuso che gioca un ruolo importante nei tessuti molli di molti vertebrati, per le sue peculiari proprietà chimico-fisiche e biologiche. Grazie alla sua naturale tendenza a formare in ambiente acquoso matrici altamente idratate e viscosi, l'HA impartisce consistenza, elasticità e capacità lubrificante a vari tessuti quali i connettivi, il liquido sinoviale e l'umor vitreo dell'occhio. E' uno dei più importanti costituenti della matrice extracellulare ed in tale sede svolge un ruolo biologico in molti processi quali l'idratazione tissutale, l'organizzazione dei proteoglicani (Laurent, 1986; Chen, Abatangelo, 1999), il differenziamento cellulare, la migrazione, la proliferazione e l'adesione cellulare, sia in vivo che in vitro (Parthsch et al., 1989; Radice et al., 2000; Lepidi et al., 2005).

Le proprietà biologiche dell'HA quindi ne fanno un candidato ideale per lo sviluppo di nuovi biomateriali che possono avere varie applicazioni cliniche.

Negli ultimi anni, infatti, l'HA è stato impiegato per ridurre l'incidenza delle aderenze post-operatorie, come agente visco-elastico nella chirurgia oculare, nel trattamento dell'osteoartrite, nella riparazione tissutale e nella realizzazione di prodotti cosmetici (Benedetti et al., 1994).

Tuttavia, numerosi altri potenziali impieghi dell'HA sono in realtà preclusi dal fatto che esso viene rapidamente degradato una volta posto a contatto con i fluidi biologici. Negli ultimi anni, nei laboratori FAB (Fidia Advanced Biopolymers, Abano Terme, Italia), l'HA è stato utilizzato per la preparazione di polimeri semisintetici, insolubili in acqua, mediante esterificazione dei gruppi carbossilici dell'acido glucuronico con alcoli alifatici o aromatici (Capoccia et al., 1998). Il processo viene effettuato con l'aggiunta graduale dell'agente esterificante al sale d'ammonio quaternario dell'HA e i polimeri che si ottengono prendono il nome di HYAFF. Uno degli agenti esterificanti maggiormente utilizzati è l'alcol benzilico e il biopolimero che ne deriva viene chiamato HYAFF 11<sup>®</sup> (Fig. 1.4).



*Fig. 1.4* Molecola di HYAFF11<sup>®</sup>

E' importante osservare che l'esterificazione può essere controllata abbastanza accuratamente; la reazione, infatti, è stechiometrica ed il grado di esterificazione che si può raggiungere è determinato soltanto dalla quantità di agente esterificante utilizzata. In questo modo si possono ottenere derivati a diverso grado di esterificazione dei gruppi carbossilici, da 0 a 100 %, che prendono il nome di HYAFF 11-p80, HYAFF 11-p100, ecc., in base alla percentuale di esterificazione con alcol benzilico.

Questi polimeri presentano una buona stabilità ed una notevole capacità di interagire con molecole polari.

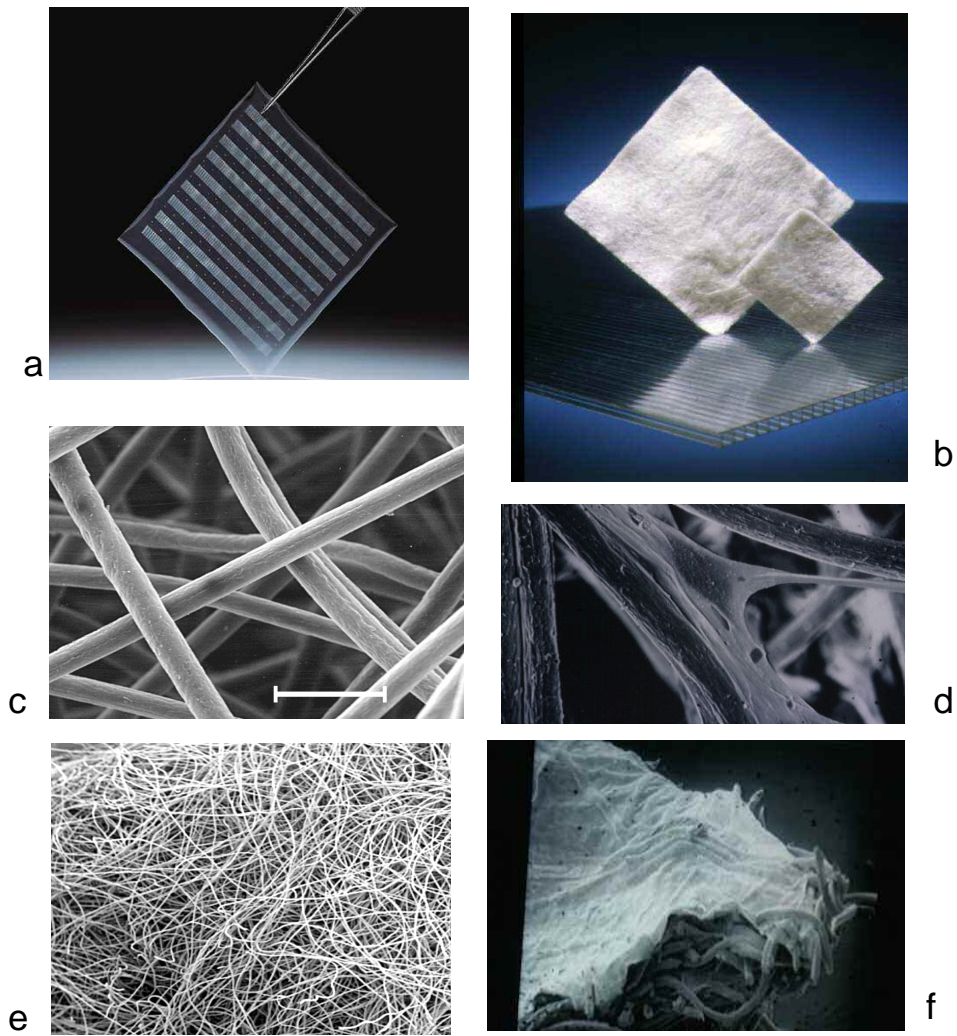
I derivati esterificati mantengono le stesse proprietà biologiche dell'HA ma, rispetto a questo, presentano un tempo di permanenza prolungato dopo l'applicazione in vivo (Rastrelli et al., 1990) e possono venire, inoltre, processati mediante varie tecniche di tessitura producendo diversi tipi di manufatti quali garze, spugne, microsfele, granuli, membrane, feltri di tessuto non-tessuto (non-woven, NW), con caratteristiche differenti, idonee ad una vasta gamma di applicazioni biomediche.

Sono stati condotti esperimenti molto accurati per chiarire differenti aspetti della biocompatibilità a lungo e breve termine dei biomateriali HYAFF, sia in vivo che in vitro (Abatangelo et al., 1997). Questi studi hanno dimostrato che tali materiali risultano essere assolutamente biocompatibili e che possono presentare differenti proprietà biologiche a seconda della modificazione chimica apportata alla molecola dell'HA (Cortivo et al., 1991). Sono state effettuate indagini per identificare e quantificare i prodotti di degradazione di questi derivati dell'HA per comprendere i loro meccanismi di bioassorbimento. Da questa ricerca è emerso che i derivati esterificati dell'HA vanno incontro ad un'idrolisi spontanea del legame estereo in

ambiente acquoso, influenzata sia dal pH che dal contenuto ionico. E' stato provato inoltre che la biodegradabilità varia a seconda del tipo di estere e del grado di esterificazione dei gruppi carbossilici della molecola originaria. Questo permette di sintetizzare biomateriali con stabilità differente che possono essere degradati in un arco di tempo variabile da pochi giorni a diversi mesi, e di poter scegliere tra questi il più adatto alla necessità prevista (Benedetti et al., 1993).

Da quanto esposto appare evidente che i biomateriali HYAFF possono essere ampiamente utilizzati per scopi farmaceutici e clinici, data la loro biocompatibilità in vitro ed in vivo e la loro biodegradabilità che può essere modulata a seconda delle esigenze specifiche (Brun et al., 1999; Tonello et al., 2005).

Ad esempio, sotto forma di garze di tessuto non-tessuto, questi biomateriali possono essere utilizzati come substrati per coltivare cellule ed ottenere costrutti da impiantare successivamente in vivo, mentre, sotto forma di microsfele, vengono impiegati come sistemi di rilascio controllato di farmaci sia a livello sistemico, che topico. In questo caso, un'interessante applicazione riguarda la cura di lesioni croniche, difficilmente guaribili con le metodiche tradizionali.



**Fig.1.5** Biomateriali a base di HYAFF 11<sup>®</sup> utilizzati nell'ingegneria dei tessuti: a) Laserskin, b) Non woven (NW), c) Fibre di NW (SEM, 1300X), d) Fibre di NW con cellula (fibroblasto) (SEM, 1300X), e) Fibre di NW (SEM, 500X), f) Fibre di NW con strato di cellule sulla superficie (SEM, 800X).

### 1.1.5 Micro- e nanoparticelle

Le microsfeere e le nanosfeere, particelle di natura polimerica aventi rispettivamente le dimensioni dell'ordine di grandezza dei micro- e nanometri, sono state proposte come trasportatori di farmaci da circa 30 anni. Esse garantiscono la possibilità di inglobare efficacemente il farmaco e di influenzarne il rilascio mediante la modulazione delle loro proprietà fisico-chimiche. Questi dispositivi possono essere sfruttati per somministrare il principio attivo sia per via sistemica che localmente.

Micro- e nanosfeere a base di polimeri naturali (come l'acido ialuronico, e quelli ottenuti dall'acido lattico e dall'acido glicolico) sono attualmente in uso a scopo terapeutico. I fattori che influenzano il rilascio del farmaco sono controllabili e sono attribuibili sia alle proprietà dei polimeri come il peso molecolare, che a caratteristiche proprie delle particelle come la loro dimensione, la loro distribuzione e la loro struttura.

Le tecniche classiche utilizzate per ottenere microparticelle comprendono varie metodiche di estrazione del solvente dall'emulsione o di evaporazione del solvente dall'emulsione, *spray drying* e *freeze drying*. Questi processi presentano però alcuni limiti come l'eccessivo uso di solvente organico con conseguenti problemi di inquinamento ambientale, tossicità dovuta all'incompleta rimozione del solvente e degradazione termica o chimica delle sostanze utilizzate.

Recentemente, sono stati introdotti processi di produzione di microparticelle basati sull'uso di fluidi supercritici (Thies et al., 1998; Elvassore et al., 2001). Tali fluidi sono caratterizzati da una bassa viscosità, una bassa tensione superficiale, un'alta diffusività ed un elevato trasporto di materia rispetto ai liquidi. Il fluido in fase supercritica ha una densità simile a quella di un liquido, ma una diffusività e una viscosità intermedia fra quelle di un liquido e quelle di un gas. E' possibile modulare la densità dei fluidi supercritici agendo su temperatura e pressione. In zona critica, infatti, la densità ha una dipendenza molto forte dalla temperatura e dalla pressione. Poiché, assieme alla densità del fluido, varia anche il suo potere solvente, questo tipo di fluidi trova largo impiego nelle tecniche di precipitazione. Nel caso in cui il fluido

supercritico sia usato come solvente, esso discioglie la sostanza e provoca una diminuzione della densità del sistema. Se invece il fluido supercritico è usato come antisolvente, aggiunto ad una soluzione di soluto in un solvente organico, provoca un'espansione del solvente, la diminuzione del suo potere solvente, l'abbassamento della densità della soluzione e la conseguente precipitazione del soluto.

Nel processo di cristallizzazione, un soluto passa dallo stato solubilizzato allo stato solido. La sovrassaturazione, cioè la differenza tra la concentrazione del soluto nella soluzione e la concentrazione di saturazione (solubilità), è la forza motrice necessaria per la nucleazione e l'accrescimento dei cristalli. In questo modo si possono ottenere micro- e nanoparticelle.

Per sfruttare le caratteristiche solventi del fluido supercritico è essenziale che la sostanza da precipitare sia solubile nel fluido scelto, mentre per impiegare quelle antisolventi sono necessarie due condizioni:

- il composto da ricristallizzare deve essere insolubile nel fluido supercritico;
- il fluido supercritico deve essere molto solubile nel solvente organico in cui il soluto viene sciolto.

### **1.1.6 Tecniche di produzione di micro- e nanoparticelle mediante l'uso di fluidi supercritici**

Uno dei fluidi supercritici maggiormente utilizzati per l'ottenimento di micro- e nanoparticelle è la CO<sub>2</sub> in quanto i valori della sua temperatura critica (31.06 °C) e della sua pressione critica (73.8 bar) sono relativamente blandi e quindi facilmente accessibili. Inoltre è economica, non è tossica, non è infiammabile e presenta un impatto ambientale minimo.

Il più promettente tra i processi che sfruttano i fluidi supercritici è quello denominato SAS (Supercritical Anti-Solvent). Esso consiste nel diminuire il potere solvente di un solvente polare in cui è disciolto un soluto, saturando la soluzione con anidride carbonica in condizioni supercritiche e causando così la precipitazione del soluto stesso.



Accanto alla SAS si sono sviluppate altre tecniche che si avvalgono delle proprietà antisolventi del fluido supercritico utilizzato.

La tecnica GAS (Gas Anti-Solvent), è una variante della SAS che prevede, dapprima la solubilizzazione del materiale solido di interesse in un solvente organico come il DMSO. La soluzione viene introdotta nel recipiente di precipitazione e contemporaneamente viene addizionato l'antisolvente (che molto frequentemente è la CO<sub>2</sub>) sotto forma gassosa, la pressione aumenta e l'antisolvente stesso entra a far parte della fase liquida contenente il soluto; a questo punto la soluzione viene espansa, con diminuzione del potere solvente del solvente organico e conseguente precipitazione del soluto. Durante questa fase, la velocità di espansione del volume dipende dalla velocità con cui viene aumentata la pressione e dalla velocità di introduzione dell'antisolvente nel recipiente di precipitazione. In seguito, l'eccesso di solvente organico viene rimosso mediante un flusso a pressione costante dell'antisolvente in fase supercritica. Il recipiente viene poi depressurizzato ed è quindi possibile recuperare il prodotto finale.

La tecnica PCA (Precipitation with a Compressed Fluid Antisolvent) consiste nell'atomizzazione di una soluzione organica all'interno di un impianto di precipitazione contenente l'antisolvente.

La tecnica ASES (Aerosol Solvent Extraction System) consiste nella polverizzazione di una soluzione contenente il soluto in una camera riempita di fluido supercritico. In questo processo vengono fatti fluire in modo continuo sia la soluzione che l'antisolvente.

La tecnica SEDS (Solution Enhanced Dispersion by Supercritical fluids) che è una variante della ASES, è basata sulla co-polverizzazione della soluzione del substrato in una corrente di anidride carbonica supercritica mediante l'uso di appropriati ugelli coassiali che creano correnti parallele dei fluidi.

La tecnica SAA (Supercritical Assisted Atomization) è basata sulla solubilizzazione di una fissata quantità di fluido supercritico nella soluzione e sulla successiva atomizzazione della miscela ternaria così formata.

Un metodo di cristallizzazione assai recente, DELOS (Depressurization of an

Expanded Liquid Organic Solution), propone di diminuire in maniera veloce ed omogenea la temperatura della soluzione, contenente il fluido supercritico, quando è depressurizzato dalla pressione operativa a quella atmosferica. A differenza delle altre tecniche, nel processo DELOS il fluido in questione non assume il ruolo di antisolvente, bensì funge da co-solvente nella soluzione organica di partenza.

Contrariamente alle metodiche classiche, quelle che sfruttano le proprietà dei fluidi supercritici, e in particolar modo la CO<sub>2</sub>, hanno il vantaggio di essere sicuri dal punto di vista ambientale e di conservare le caratteristiche dei composti termolabili. Inoltre, grazie alla possibilità di recuperare completamente l'antisolvente, tali processi risultano essere economicamente vantaggiosi.

## 1.2 Ulcere

Per ulcera cutanea si intende una lesione derivante dalla perdita di sostanza cutanea in assenza della normale tendenza di una ferita alla guarigione spontanea. E' la naturale conseguenza di fenomeni di degenerazione tissutale cutanea, o delle strutture sottostanti (muscoli e tendini). Essa guarisce sempre con esito cicatriziale e viene definita cronica nel caso in cui, nonostante le terapie locali e sistemiche, permanga per più di 8 settimane. Nella valutazione delle ulcere vengono prese in considerazione numerose caratteristiche:

A) Livello di interessamento dei tessuti:

- diametro e quindi superficie
- profondità

B) Caratteristiche della superficie:

- tipo di tessuto: necrotico, in fase di granulazione
- quantità di essudato: lieve, moderato, abbondante
- tipo di essudato: sieroso, sanguinolento, purulento
- presenza di tramiti fistolosi

C) Superficie adiacente alla lesione:

- colore della cute: rosa, pallida, rosso scuro, porpora, pigmentata
- presenza di edema
- presenza di fissità e di aumento della consistenza.

### 1.2.1 Meccanismo di guarigione

La guarigione delle ulcere è un processo dinamico che coinvolge mediatori solubili, cellule del sangue, matrice extracellulare (MEC) e cellule della cute. E' composta da tre fasi: infiammazione, formazione di tessuto e rimodellamento del tessuto.

Il danno tissutale causa la distruzione dei vasi sanguigni e la fuoriuscita dei costituenti del sangue. In questa fase, le piastrine svolgono importanti funzioni sia per la coagulazione che per la secrezione di numerosi mediatori come il PDGF (Platelet-

derived growth factor), che attrae e attiva i macrofagi e i fibroblasti. Numerosi mediatori vasoattivi e fattori chemotattici sono attivati dalla cascata coagulativa, dall'attivazione del complemento e dalle cellule parenchimali attivate. Queste sostanze richiamano leucociti nel sito di infiammazione.

L'infiltrato di neutrofili libera l'area di lesione dai batteri e dai corpi estranei e poi viene eliminato sotto forma di escara o dalla fagocitosi dei macrofagi. In risposta a specifiche citochine, come frammenti delle proteine della matrice extracellulare, TGF $\beta$  e MCP-1, anche i monociti infiltrano la lesione e, sotto forma di macrofagi attivati rilasciano fattori di crescita che stimolano la formazione del tessuto di granulazione. I macrofagi attivati, attraverso le integrine, si legano a specifiche proteine della matrice extracellulare, stimolando la fagocitosi dei microrganismi eventualmente presenti, l'espressione del CSF-1 (una citochina necessaria per la sopravvivenza degli stessi), l'espressione del TNF $\alpha$ , (una potente citochina infiammatoria) e l'espressione del PDGF (un potente mitogeno per i fibroblasti). Altre importanti citochine espresse dai monociti e dai macrofagi sono TGF $\alpha$ , IL-1, TGF $\beta$ , e IGF-I.

La riepitelizzazione delle ulcere ha luogo dopo poco tempo dalla lesione. A uno o due giorni dal danno, le cellule epidermiche ai margini dell'ulcera cominciano a proliferare e a migrare, determinando la separazione dell'escara dal tessuto vitale. Gli stimoli necessari perché avvengano la migrazione e la proliferazione cellulare non sono ancora stati del tutto determinati, ma possono essere ricondotti all'assenza dell'inibizione da contatto, al rilascio locale di fattori di crescita e all'incrementata espressione di recettori per i fattori di crescita.

Il nuovo stroma comincia ad invadere la cavità dell'ulcera a circa quattro giorni dal danno. I macrofagi provvedono alla continua produzione di fattori di crescita necessari per la proliferazione dei fibroblasti e per l'angiogenesi. I fibroblasti producono la nuova matrice extracellulare necessaria come supporto alla crescita delle cellule. I vasi, invece, trasportano l'ossigeno e i nutrienti necessari per il metabolismo cellulare.

I fattori di crescita, come il PDGF e il TGF $\beta$ , insieme con le molecole della matrice

extracellulare come fibrina, fibronectina e acido ialuronico, presumibilmente stimolano i fibroblasti a proliferare e migrare all'interno della lesione grazie all'espressione di appropriate integrine e alla presenza di enzimi proteolitici come la plasmina sierica, le collagenasi, le gelatinasi ed altri. Dopo la migrazione all'interno della lesione, i fibroblasti cominciano la sintesi del collagene che costituisce la matrice extracellulare provvisoria, forse come risultato dell'azione del TGF $\beta$ .

Quindi, un'abbondante matrice di collagene viene depositata all'interno dell'ulcera e, da un tessuto ricco di cellule, si passa ad una cicatrice relativamente acellulare. Le cellule andrebbero incontro al processo di apoptosi, in risposta a segnali non ancora conosciuti.

L'angiogenesi è un complesso processo che avviene nella matrice extracellulare del fondo della lesione e richiede un'adeguata proliferazione e migrazione delle cellule endoteliali. Alcune delle molecole implicate in questo processo sono: FGFa, FGFb, VEGF, TGF $\beta$ , angiogenina, angiotropina, angiopoietina-1 e trombospondina. Anche una bassa tensione di ossigeno e un'elevata concentrazione di acido lattico possono stimolare l'angiogenesi.

Molte altre molecole possono indurre l'angiogenesi stimolando la produzione di FGFb da parte dei macrofagi e delle cellule endoteliali. Le cellule epidermiche attivate possono secernere grandi quantità di VEGF. La sintesi di FGFb rappresenta la tappa critica per l'angiogenesi, durante i primi tre giorni della riparazione dell'ulcera, mentre la presenza di VEGF è determinante per l'angiogenesi dal quarto giorno in poi.

La contrazione dell'ulcera è dovuta ad una complessa interazione tra cellule, matrice extracellulare e citochine. Durante la seconda settimana di guarigione, i fibroblasti assumono le caratteristiche di miofibroblasti con delle larghe bande di miofilamenti contrattili di actina, disposti a ridosso della membrana plasmatica. La contrazione probabilmente necessita della stimolazione con TGF $\beta$  e PDGF, dell'attacco dei fibroblasti alla matrice di collagene, attraverso le integrine, e dell'intreccio dei filamenti di collagene. La continua sintesi e degradazione del collagene porta alla transizione dal tessuto di granulazione alla cicatrice. La degradazione è controllata da

numerosi enzimi proteolitici, denominati metalloproteinasi della matrice, che sono secreti dai macrofagi, dalle cellule epiteliali e dalle cellule endoteliali. Le varie fasi della riorganizzazione tissutale sono caratterizzate dall'attività di questi enzimi e dei loro inibitori che nel tempo determinano una diminuzione della tensione a livello della cicatrice.

A causa della complessità del meccanismo di guarigione delle ulcere cutanee, possono essere numerosi i fattori che determinano una cronicizzazione.

Tra i fattori locali, si annoverano l'ischemia e la necrosi dei tessuti, la disidratazione locale, le infezioni, i corpi estranei, l'assenza di risposta ai fattori di crescita, i traumi ripetuti, l'eccessiva infiammazione, l'edema e le radiazioni ionizzanti.

Tra i fattori sistemici, si possono citare i deficit nutrizionali, le patologie metaboliche e i disordini del tessuto connettivo, l'immunosoppressione e la terapia antiinfiammatoria, le alterazioni geniche ed il fumo (Singer et al, 1999; Stadelman et al, 1998).

### **1.2.2 Metodiche di cura**

In presenza di tessuti necrotici, la prima operazione che viene eseguita consiste nella necrectomia. Si possono utilizzare metodiche biochimiche (enzimi) o meccaniche (bisturi).

La presenza, invece, di un panno di fibrina richiede un semplice curettage della ferita.

A livello locale, vengono poi utilizzati disinfettanti delle classi più svariate.

Nel caso in cui ci siano delle complicanze infettive, si esegue un tampone della lesione per conoscere l'agente eziologico e trovare l'antibiotico a cui il microrganismo è più sensibile. Eseguiti questi procedimenti, infine, si utilizza una garza grassa a diretto contatto con la lesione al di sopra della quale vengono riposte delle garze imbevute di soluzione fisiologica e/o disinfettante, in modo da garantire un'adeguata idratazione e la protezione dalle infezioni.

Da sempre queste sono le basi della medicazione, che non sempre però sono

sufficienti per ottenere la guarigione ed evitare la cronicizzazione dell'ulcera. Proprio per questo sono state studiate delle ulteriori metodiche che si possono suddividere in classiche e sperimentali.

A) Tra le terapie tradizionali si annoverano:

- L'ossigenoterapia che consiste nell'espore l'ulcera a elevate pressioni di ossigeno. Questa molecola, infatti, ha un ruolo fondamentale nel metabolismo energetico, nella neosintesi di collagene, nella neovascolarizzazione, nella funzione delle cellule polimorfonucleate. Ha inoltre un'azione antibatterica diretta e può avere un effetto sinergico con alcuni antibiotici.

- Ultrasuoni, luci a varie frequenze.

- Innesti dermo-epidermici a vari spessori che, in presenza di un adeguato tessuto di granulazione, riescono ad attecchire.

- Lembi chirurgici.

B) Mentre, per quanto riguarda le terapie sperimentali, attualmente sono in corso di perfezionamento le seguenti:

- Riduzione della distruzione enzimatica dei fattori di crescita. La membrana di fibrina che si forma al di sopra dell'ulcera nelle fasi iniziali della lesione è importante per l'emostasi, la chiusura dell'ulcera ed il controllo della contaminazione batterica. Allo stesso tempo però deve essere rimossa fisicamente per permettere la formazione del tessuto di granulazione. Questo avviene grazie all'attivazione di enzimi digestivi come le collagenasi, la plasmina e le proteoglicanasi che sono rilasciati da macrofagi, mastcellule, cellule endoteliali, cheratinociti e fibroblasti. Mentre le metalloproteinasi della matrice, secrete dalle cellule endoteliali e dai macrofagi, pur essendo essenziali per la maturazione delle lesioni, possono essere responsabili della difficoltà di guarigione delle ulcere cutanee croniche. Studi recenti hanno evidenziato che le lesioni che non guariscono contengono molti neutrofili i quali secernono grandi quantità di metalloproteinasi della matrice ed elastasi, determinando un'eccessiva degradazione delle proteine ed un'inattivazione dei fattori di crescita. Le ulcere croniche, infatti, contengono un'aumentata concentrazione di metalloproteinasi se confrontate con le ulcerazioni acute.

Questi enzimi sono sotto stretto controllo degli inibitori delle metalloproteinasi (TIMP1 e TIMP2). Quindi la manipolazione della concentrazione delle TIMP può essere una via per ridurre la distruzione enzimatica dei fattori di crescita presenti nelle ulcere croniche cutanee.

- Sostituti cutanei bioingegnerizzati. Attualmente, sono disponibili lamine di cellule epidermiche senza componenti dermici, lamine costituite solo da componenti dermici e lamine costituite da elementi sia dermici che epidermici. Il loro principale effetto è promuovere la guarigione delle ulcere stimolando l'ospite a produrre una varietà di citochine che determinano, a loro volta, la produzione di componenti della membrana basale, prevengono la disidratazione, aumentano l'infiammazione e la formazione del tessuto di granulazione.

- Fattori di crescita. I fattori di crescita hanno la potenziale capacità di favorire la guarigione delle ulcere stimolando l'angiogenesi e la proliferazione cellulare, regolando la produzione e la degradazione della matrice extracellulare ed agendo da fattori chemotattici per le cellule infiammatorie e i fibroblasti. I principali e maggiormente impiegati sono: EGF, TGF $\beta$ , IGF, PDGF, ILs e CSF. Le ulcere cutanee croniche hanno una ridotta quantità di PDGF, bFGF, EGF e TGF $\beta$ , confrontate con le ulcere cutanee acute, ma la riduzione della concentrazione di fattori di crescita non è probabilmente sufficiente per spiegare la mancata guarigione di tali ulcere. Anche se i fattori di crescita sono presenti nelle ulcere croniche, la presenza delle proteinasi può giocare un ruolo importante nella neutralizzazione del loro effetto. Nel caso i fattori di crescita siano secreti in minor quantità o siano rapidamente metabolizzati, la guarigione è ritardata.

Il primo studio sull'uso locale di fattori di crescita è stato condotto da Kninghton e colleghi nel 1986. Fu usata una miscela di PDGF, TGF $\beta$ , PDAF, PF4 e altri fattori non conosciuti. Il risultato dimostrò un aumento della guarigione delle ulcere cutanee. Le interleuchine sono ematopoietiche e si pensa possano attivare i macrofagi, i granulociti e i monociti come pure stimolare la secrezione di altri fattori di crescita.

Il PDGF è stato utilizzato con successo nel trattamento delle ulcere in piedi diabetici, ed è l'unico commercialmente utilizzabile e approvato dalla FDA (Food and Drug



Administration).

### 1.2.3 PDGF

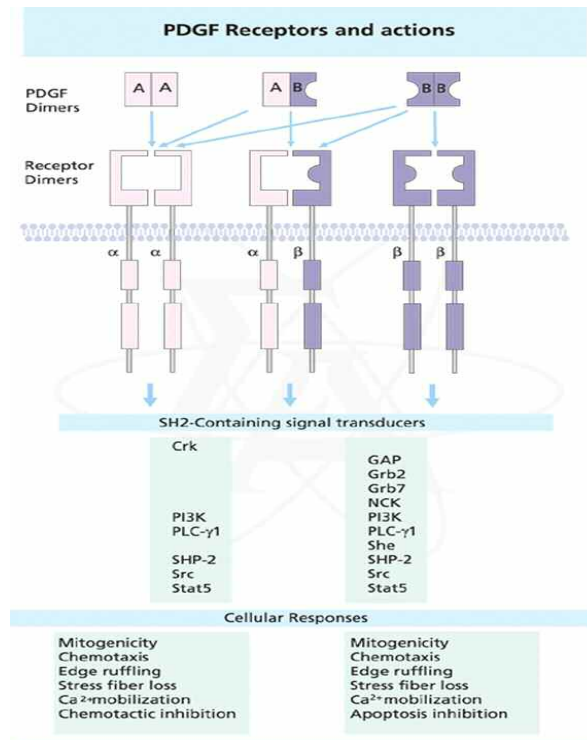
La generale capacità dei fattori di crescita di promuovere la proliferazione e la migrazione cellulare e di indurre cambiamenti nei modelli di sintesi proteica e di secrezione, ha fatto sì che essi siano divenuti i candidati prescelti per il trattamento terapeutico di particolari condizioni fisiopatologiche dove risultano essere assenti o inibiti.

Il PDGF (Platelet-derived growth factor) è uno dei principali fattori mitogeni del sangue umano ed agisce da potente attivatore sulle cellule di origine mesenchimale. In realtà, la sigla PDGF non è del tutto appropriata in quanto tale fattore è prodotto, oltre che dalle piastrine, anche da altre cellule diploidi come le cellule endoteliali, le cellule muscolari dei vasi e i monociti attivati.

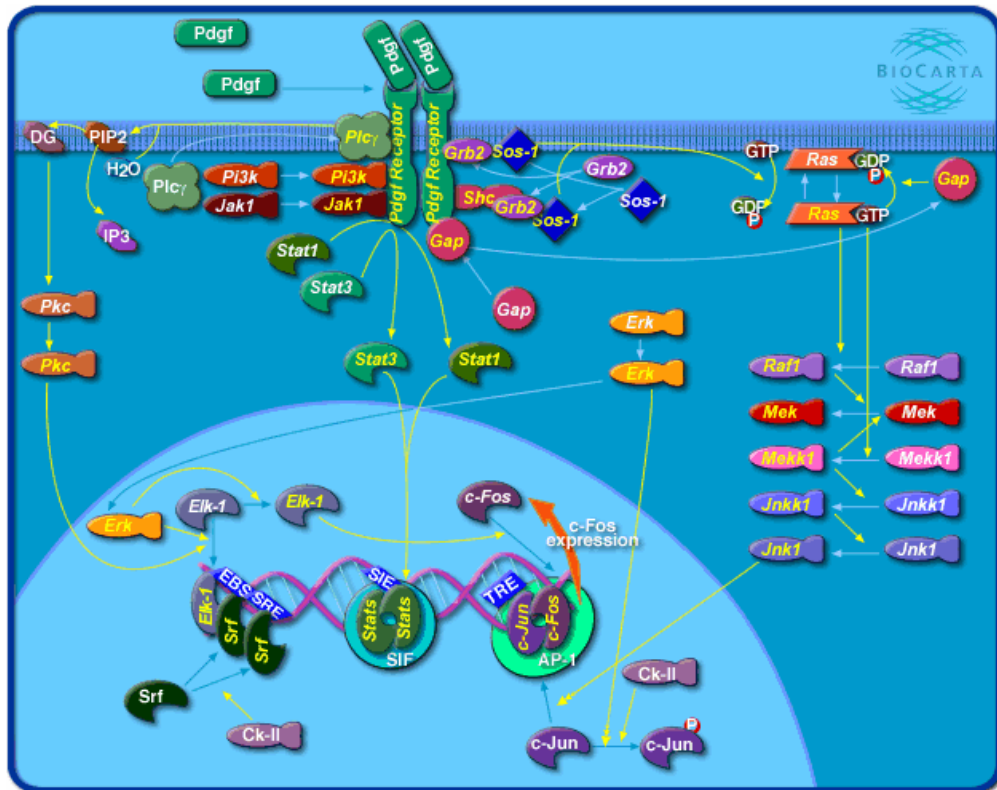
Il PDGF è formato da due differenti catene polipeptidiche legate fra loro da ponti disolfuro. Sottoposto a condizioni riducenti, il dimero PDGF si dissocia nelle due subunità monomeriche: la più grande ha peso molecolare compreso fra 15000-17000 Da ed è denominata PDGF-A e la più piccola ha peso molecolare di 14000 Da ed è denominata PDGF-B.

Dalle piastrine umane si possono isolare tre isoforme diverse del dimero PDGF, identificate con le sigle AA, AB e BB.

Fra queste, la forma presente in percentuale maggiore in tutte le specie è quella eterodimera; ciò è probabilmente correlato alla sua importanza dal punto di vista biologico. Sono state identificate anche due distinte popolazioni di recettori per il PDGF: l' $\alpha$ -recettore in grado di legare tutte le isoforme del PDGF e il  $\beta$ -recettore che lega solamente l'isoforma BB. Il legame col ligando induce la dimerizzazione dell' $\alpha$ -e/o  $\beta$ -subunità, dando luogo a tre diverse forme dimeriche del recettore. La dimerizzazione è considerata il prerequisito per la cascata di trasduzione del segnale.



**Fig. 1.6** *Struttura dei recettori per le tre isoforme del PDGF. In particolare sono riportate: struttura extracellulare, porzione intracellulare, segnali intracellulari attivati, eventi cellulari attivati.*



**Fig.1.7**

*Il Platelet Derived Growth Factor (PDGF) svolge un ruolo critico nella proliferazione e nello sviluppo cellulare. La forma biologicamente attiva è quella dimerica costituita dalle catene A e B. A seconda dei dimeri che forma, il PDGF può assumere diversi gradi di attivazione. Anche i recettori per il PDGF sono costituiti da due catene ( $\alpha$ ;  $\beta$ ) e possono associarsi in tutte le loro combinazioni ( $\alpha\alpha$ ;  $\alpha\beta$ ;  $\beta\beta$ ). In seguito al legame con il PDGF, si assiste alla fosforilazione di una tirosina del recettore che attiva una cascata di fosforilazione di altre proteine cellulari.*

L'espressione di entrambe le subunità del recettore si riscontra in cellule analoghe ai fibroblasti all'interno del letto di una ferita e nelle cellule endoteliali dell'orlo della ferita stessa. Una notevole espressione della  $\beta$ -subunità si ritrova nelle cellule endoteliali dei vasi, nel tessuto di granulazione e all'interno dell'orlo della ferita, mentre l' $\alpha$ -subunità non è espressa nelle cellule coinvolte nella formazione dei vasi durante la riparazione dei tessuti, già caratterizzate dall'espressione delle  $\beta$ -subunità. Considerando il PDGF-AB come un potenziale agente terapeutico nella guarigione delle ferite, si capisce l'importanza della presenza di entrambe le subunità dei recettori nel luogo della lesione, mentre si è trovato che nella pelle integra i recettori per il PDGF non sono presenti in alcuna forma. La loro espressione inizia in concomitanza con la manifestazione della lesione, per poi cessare a guarigione avvenuta.

La prima sperimentazione sull'uomo eseguita in una piccola randomizzazione in doppio cieco controllo-placebo, ha visto l'utilizzo del PDGF-BB, somministrato giornalmente per via topica, su ulcere croniche da pressione e ha dato dei risultati statisticamente interessanti (Robson et al., 1992). Usando tutte le indicazioni già ottenute dai precedenti studi riguardanti il PDGF e le sue applicazioni cliniche, si è passati ad allargare la sperimentazione su molti più pazienti aventi diversi tipi di ulcere croniche e si è arrivati alla conclusione che il fattore PDGF è veramente in grado di dare dei benefici terapeutici diminuendo il volume dell'ulcera e accelerandone la guarigione (Mustoe et al., 1994).

Successivamente, uno studio multicentrico in doppio-cieco placebo-controllo, su pazienti con ulcere croniche diabetiche ha dato risultati statisticamente significativi confrontando la percentuale di completa guarigione ottenuta nel gruppo trattato con PDGF-BB rispetto a quello trattato con placebo. L'autore di tale studio conclude affermando che l'applicazione topica giornaliera di PDGF-BB ricombinante umano, è sicuramente efficace nello stimolare la cicatrizzazione in tutto lo spessore e nel ribassare le estremità delle ulcere diabetiche neurotrofiche (Steed, 1995).

#### **1.2.4 Le ulcere diabetiche**

Il diabete mellito è una malattia cronica molto seria causata da fattori ereditari ed ambientali. La prevalenza globale per l'anno 1996, secondo cui sarebbero affetti da diabete 120 milioni di individui, si prevede più che raddoppiata entro l'anno 2025, ciò a causa dell'aumento dell'età media, dell'obesità, dello stile di vita sedentario, nonché del cambiamento del regime alimentare.

Sebbene svariate complicanze come cardiopatie, insufficienza renale e cecità colpiscano seriamente gli individui affetti da diabete, le ulcere croniche che interessano il piede fanno pagare il tributo maggiore. Il 40-70% di tutte le amputazioni delle estremità inferiori è correlata al diabete mellito e queste sono per l'85% conseguenza di ulcere del piede. I fattori più importanti che predispongono allo sviluppo di ulcere del piede sono la neuropatia periferica, microtraumi del piede e deformità. Molti individui affetti da diabete perdono la sensibilità a livello dei piedi e possono non rendersi conto di ripetuti microtraumi o di lesioni della cute del piede. Una volta formatasi l'ulcera, una combinazione di più fattori rallenta il normale processo di guarigione e può favorire l'insorgere di un'infezione o di una gangrena, con conseguente lunga degenza ospedaliera e, nel caso peggiore, amputazione. Fattori determinanti predittivi per l'esito delle ulcere del piede diabetico sono le infezioni, l'ischemia, il trattamento delle lesioni, la riduzione del carico e la neuropatia.

Nell'ultimo decennio sono state formulate in alcuni paesi delle linee guida per la prevenzione e per il trattamento del piede diabetico che hanno portato però alla redazione di documenti non omogenei. Si è resa pertanto necessaria la realizzazione di un Documento di Consenso internazionale che potesse essere il punto di partenza per la formulazione di linee guida per i differenti paesi o aree geografiche.

Nella definizione riportata in tale documento il piede diabetico viene definito come: "una condizione di infezione, ulcerazione e/o distruzione di tessuti profondi associate ad anomalie neurologiche e a vari gradi di vasculopatia periferica degli arti inferiori" (secondo criteri stabiliti dall'OMS).

Nel documento di consenso per le lesioni del piede viene riportata la classificazione

di Wagner, che è quella più diffusamente utilizzata (Wagner, Foot Ankle 1981) e che prevede 5 classi:

Classe 0: non ulcerazioni, presenza di eventuali deformità, edema

Classe 1: ulcera superficiale

Classe 2: ulcera profonda fino al tendine, alla capsula articolare, all'osso, senza infezione

Classe 3: ulcera profonda con ascesso, osteomielite, artrite settica

Classe 4: gangrena localizzata alle dita o al tallone

Classe 5: gangrena di tutto il piede o di una porzione significativa

Nella maggior parte dei casi la fisiopatologia dell'ulcerazione del piede vede come causa principale della formazione della lesione una neuropatia sensitiva, motoria ed autonoma e in tal caso si parla di ulcere neuropatiche. Vi sono poi ulcere esclusivamente ischemiche, nonché un gruppo misto di ulcere neuroischemiche.

In realtà le lesioni del piede diabetico si manifestano frequentemente in seguito alla combinazione di due o più fattori di rischio che sopraggiungono congiuntamente.

La neuropatia sensitiva è accompagnata dalla perdita della sensibilità al dolore, dell'avvertenza della pressione, della temperatura e degli stimoli propriocettivi. La neuropatia motoria comporta atrofia e debolezza dei muscoli intrinseci del piede con conseguente deformità nella flessione delle dita ed anomalie nella deambulazione. La neuropatia autonoma si manifesta con ridotte o assenti secrezioni sudoripare, che provocano secchezza della pelle con screpolature e fessurazioni.

La vasculopatia periferica (PVD) correlata al diabete, spesso associata a traumi minori o a ferite superficiali, può sfociare in ulcere del piede unicamente ischemiche assai dolorose e costituisce il fattore più importante nel determinare l'esito della lesione.

Frequentemente, però, la PVD e la neuropatia sono presenti contemporaneamente nello stesso paziente. E' probabile che la riduzione del flusso sanguigno cutaneo, dovuto a disturbi macrovascolari, renda il sistema vascolare più suscettibile ad occlusioni nel corso di periodi di elevata pressione biomeccanica sulla cute.

Si è constatato che esiste una stretta relazione tra l'anormale pressione di carico del

piede e l'incidenza di ulcerazione plantare. Una volta formatasi un'ulcera, questa non potrà guarire (anche se l'apporto circolatorio è adeguato) fintanto che non viene rimosso il carico meccanico. Ai pazienti che presentano un'ulcera del piede si consigliano speciali apparecchi come gambaletti gessati a contatto totale, stivaletti in resine polimeriche o tutori di scarico che sono molto efficaci se applicati correttamente. La loro funzione è quella di scaricare l'ipercarico pressorio che ha determinato la lesione stessa. Esistono molte pubblicazioni che riportano un'alta percentuale di guarigione dell'ulcera plantare entro 6-10 settimane dall'uso del gambaletto gessato, tanto che questa tecnica di scarico pressorio è ampiamente riconosciuta come il "gold standard" per l'ulcera del piede diabetico (Lavery et al., 1996). Allo stesso modo viene raccomandato l'uso di garze avvolgenti non adesive impregnate di paraffina.

Una specialità medicinale innovativa proposta nel trattamento topico di base delle ulcere diabetiche, è il Regranex gel 0,01% (beclapermin, Ortho-McNeil Pharmaceuticals), contenente PDGF-BB ricombinante umano. In uno studio comparativo eseguito usando un gel placebo, su 328 pazienti affetti da ulcere diabetiche croniche del piede (Wieman et al., 1998), i risultati hanno mostrato una maggior incidenza di cicatrizzazione (50% vs 35% dei pazienti) o di diminuzione dell'area dell'ulcera in tempi molto più brevi (86 vs 127 giorni). Steed e colleghi (1996) calcolarono che il 48% dei pazienti trattati con una formulazione in gel contenente PDGF umano ricombinante erano guariti, contro il 25% dei pazienti trattati con il gel placebo.

Recentemente è stato proposto, per il trattamento delle ulcere diabetiche, l'uso di innesti di pelle artificiale autologa preparata con tecniche di ingegneria tissutale (Gentzkow et al., 1996; Grey et al., 1998). Un esempio di derma autologo ingegnerizzato è quello che si ottiene utilizzando un biomateriale costituito dall'estere benzilico dell'acido ialuronico sul quale vengono coltivati fibroblasti e cheratinociti autologhi (Andreassi et al., 1991). L'estere benzilico dell'acido ialuronico è un materiale ideale per questo scopo in quanto è biocompatibile, riassorbibile e integrabile con i tessuti ulcerati (Rastrelli et al., 1990; Harris et al., 1999; Galassi et

al., 2000). Su questa base sono già stati realizzati e immessi in commercio due prodotti medicali:

- Hyalograft 3D<sup>®</sup> (Fidia Advanced Byopolimers, Abano Terme, Italia), costituito da una matrice tridimensionale di microfibre di HYAFF 11<sup>®</sup> (estere benzilico dell'acido ialuronico) e fibroblasti autologhi a formare un sostituto dermico autologo;

- Laserskin autograft<sup>®</sup> (Fidia Advanced Byopolimers, Abano Terme, Italia), costituita da una membrana di HYAFF 11<sup>®</sup> (estere benzilico dell'acido ialuronico) microperforata al laser con cheratinociti autologhi (Pavesio et al., 2003).

Tuttavia il problema del trattamento delle ulcere diabetiche rimane ampiamente aperto, in quanto le attuali metodiche di cura richiedono un'elevata compliance del paziente e costi non trascurabili.



## 2. SCOPO DELLA TESI

Scopo della presente tesi è la produzione di microparticelle a base di estere benzilico dell'acido ialuronico (materiale HYAFF 11<sup>®</sup>) con la funzione di supporto per il rilascio di fattori di crescita da applicare nella cura di ulcere.

La tecnica di produzione utilizzata per ottenere tali microparticelle prende il nome di GAS e prevede l'utilizzo della CO<sub>2</sub> come fluido supercritico. La scelta di questo fluido supercritico risulta particolarmente vantaggiosa, in quanto i valori della sua temperatura critica e della sua pressione critica (31.06 °C e 73.8 bar) sono relativamente blandi e quindi facilmente accessibili. Inoltre è economica, non è tossica, non è infiammabile e presenta un impatto ambientale minimo.

Nella prima fase del progetto verranno messe a punto le condizioni ottimali per la produzione delle microparticelle variando le condizioni operative quali pressione, temperatura, concentrazione della soluzione di partenza, dimensione dell'ugello di iniezione nella camera di precipitazione, velocità di flusso dell'antisolvente. I prodotti ottenuti verranno analizzati mediante microscopia elettronica a scansione e light scattering al fine di determinarne la forma e le dimensioni.

Una volta stabilite le condizioni ottimali di produzione, si procederà ad analizzare la capacità di assorbire coloranti e fattori di crescita da parte delle microparticelle e alla determinazione delle relative cinetiche di rilascio in diverse condizioni.

Nella seconda parte del lavoro, verrà sperimentata l'applicazione in vivo delle microparticelle caricate con PDGF, uno dei principali fattori di crescita coinvolti nella guarigione delle ferite.

A tale proposito verranno utilizzati ratti Wistar sui quali verranno praticate cutanee a tutto spessore che saranno trattate con le microparticelle caricate con il fattore di crescita e relativi controlli.

Saranno eseguite analisi istologiche ed immunoistochimiche atte a valutare la progressione della riepitelizzazione.

## 3. MATERIALI E METODI

### 3.1 Biomateriale

E' stato utilizzato come biomateriale di partenza lo HYAFF 11<sup>®</sup> (acido ialuronico esterificato al 100% con alcol benzilico) sotto forma di tessuto non tessuto.

Il biomateriale è stato gentilmente fornito dalla Fidia Advance Biopolymers (FAB di Abano Terme, Padova, Italia).

### 3.2 Descrizione dell'impianto e procedure operative per la produzione di particelle di polimero

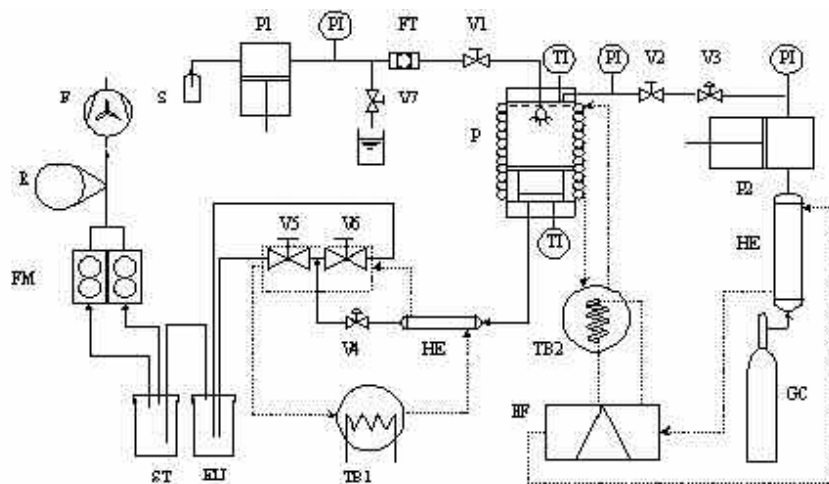
Le microparticelle sono state ottenute mediante un processo semi-continuo di tipo GAS (l'impianto utilizzato si trova presso il laboratorio del Dr. Elvassore, Dipartimento di Processi Chimici, Università di Padova).

Con questo metodo, una soluzione di HYAFF 11<sup>®</sup> in DMSO in forma nebulizzata e la CO<sub>2</sub> supercritica, con funzione di antisolvente, vengono continuamente introdotte nel recipiente di precipitazione, dove la pressione viene aumentata e la CO<sub>2</sub> entra a far parte della fase liquida contenente lo HYAFF 11<sup>®</sup>. A questo punto, la soluzione si espande, con diminuzione del potere solvente del DMSO e conseguente precipitazione del biopolimero sotto forma di particelle di ridotte dimensioni. L'impianto utilizzato per la preparazione delle particelle di polimero, mostrato in fig.

3.1 è composto dalle seguenti unità:

- **S**, serbatoio contenente la soluzione organica;
- **P1**, pompa per l'iniezione in circolo della soluzione organica;
- **V7**, valvola di spurgo
- **FT**, filtro
- **V1, V2**, valvole millimetriche di regolazione fine;
- **P**, camera di precipitazione o precipitatore;

- **V3, V4**, valvole on-off;
- **P2**, pompa per la CO<sub>2</sub>;
- **HE**, scambiatore di calore a tubi concentrici;
- **GC**, bombola contenente CO<sub>2</sub>;
- **RF**, ciclo refrigerante;
- **V5, V6**, valvole di laminazione;
- **TB1, TB2**, vasche termostate;
- **EU**, unità di espansione;
- **ST**, unità di recupero del solvente;
- **FM**, flussimetri;
- **R**, rotametro;
- **F**, sistema di aspirazione.



**Fig. 3.1**

*Schema dell'impianto utilizzato per la produzione sperimentale delle microparticelle di HYAFF 11<sup>®</sup> con la tecnica GAS.*

Come è possibile notare, la configurazione dell'impianto prevede una camera di precipitazione, due linee di alimentazione (una per il gas antisolvente e l'altra per la soluzione da nebulizzare), una linea di uscita per il gas contenente il solvente residuo ed un insieme di altri elementi necessari per il funzionamento dell'impianto.

La procedura di attivazione dell'impianto, che consente di raggiungere le condizioni operative di temperatura ottimali, inizia dalla messa in funzione del dispositivo refrigerante e del gruppo termostatico per la circolazione del glicole nelle serpentine di raffreddamento, almeno un paio d'ore prima dell'inizio dell'operazione. Successivamente viene avviato il bagno termostato del glicole che circola nel circuito di riscaldamento delle valvole di laminazione. Contemporaneamente si verifica il corretto funzionamento dell'ugello, il cui diametro interno può essere modificato durante l'esecuzione del test da 50 a 250  $\mu\text{m}$ . Raggiunta nella tubazione una pressione superiore a quella presente nella camera di precipitazione, si apre la valvola V1 e la soluzione da trattare in pochi secondi entra. Successivamente per mezzo della pompa P2 si inietta l'antisolvente puro ( $\text{CO}_2$ ) e viene effettuata una pressurizzazione fino al raggiungimento della pressione alla quale si vuole eseguire la precipitazione. Contemporaneamente alla pressione, un altro parametro da impostare è il flusso di antisolvente che deve restare sufficientemente costante e la temperatura deve stabilizzarsi. Esaurita la soluzione di biopolimero da nebulizzare, si continua a far fluire la  $\text{CO}_2$  per circa un'ora, con lo scopo di allontanare il solvente residuo che potrebbe ridisciogliere il precipitato durante la successiva fase di depressurizzazione e che, in ogni caso, costituirebbe un'impurezza indesiderata nelle particelle di prodotto. Per l'intera durata della fase di estrazione del solvente dalle particelle la temperatura interna della camera è portata ad un valore superiore a quello mantenuto nel corso della precipitazione. Questo valore non deve essere troppo elevato per non nuocere ad eventuali componenti termicamente sensibili e per non oltrepassare la temperatura di transizione vetrosa del polimero (che è minore di quella reale per effetto del fluido supercritico). Allo stesso tempo, la temperatura a cui viene eseguito il lavaggio non deve essere troppo bassa per non ridurre l'efficienza di estrazione del

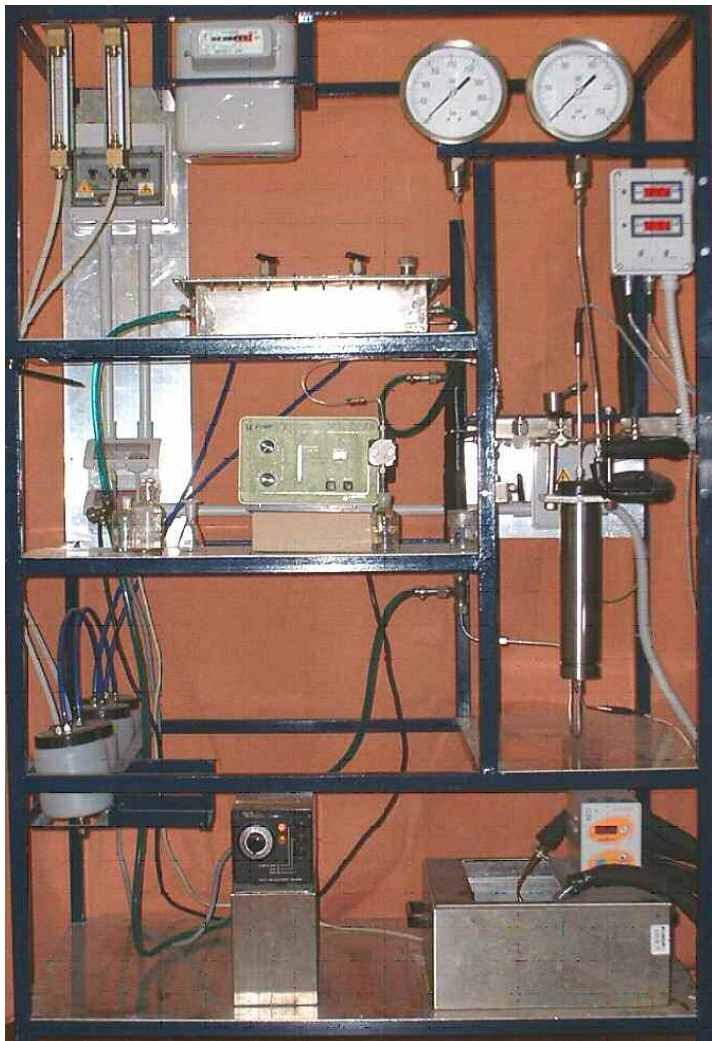
solvente e per non scendere sotto il punto di solidificazione del solvente organico.

Alla fine della fase di lavaggio si spegne la pompa della CO<sub>2</sub>, si chiudono le valvole di laminazione e si procede all'ultima operazione che consiste nella depressurizzazione dell'impianto. Per non abbassare troppo la temperatura all'interno del contenitore di precipitazione e quindi non causare il congelamento dell'eventuale solvente residuo, l'operazione deve essere condotta lentamente aprendo per brevi periodi anche la valvola di sfiato V7 in modo da liberare la linea dal solvente ancora presente in essa; l'ugello ed il filtro devono essere puliti in modo da evitare gocciolamenti che vadano a bagnare il precipitato. A questo punto la camera di precipitazione può essere aperta, le particelle vengono raccolte e pesate per calcolare la resa del processo.

Durante la preparazione, nella camera di iniezione è stata sono stati utilizzati valori di temperatura compresi fra i 21-30 °C, la pressione è stata variata tra i 150-200 bar e la velocità di flusso della CO<sub>2</sub> tra 1.5 e 6 ml/min.

Il biopolimero HYAFF 11<sup>®</sup> è stato sciolto in DMSO per ottenere in ogni esperimento 10 ml di soluzione con una concentrazione variabile fra lo 0.3-1.0% (p/V).

Le micro-particelle formatesi alla fine del processo sono state raccolte su un filtro da 0.22 µm (Millipore, type GS) posto sul fondo della camera di precipitazione.



**Fig. 3.2**

*Foto dell'impianto utilizzato per la produzione sperimentale delle microparticelle di HYAFF 11<sup>®</sup> con la tecnica GAS.*

### **3.3 Analisi delle particelle**

La morfologia delle particelle è stata analizzata mediante microscopia a scansione, mentre le loro dimensioni sono state valutate sfruttando la tecnica del light scattering.

#### **3.3.1 SEM**

La morfologia delle particelle è stata esaminata con l'uso di un microscopio elettronico a scansione (SEM) (Stereoscan 440, Leica Cambridge).

Per l'esecuzione dell'analisi, ogni campione di materiale ottenuto è stato disperso in acqua milli-Q e sonicato per 45 minuti mediante un apposito sistema a ultrasuoni (CP104, Vetrotecnica, Italia) in modo da sminuzzare gli aggregati di particelle. Ciascun campione è stato quindi centrifugato per 5 minuti a 2000 rpm (Megafuge 1.0, Heraeus) e il surnatante è stato rimosso. Questa operazione è stata ripetuta per 4-5 volte in modo da rimuovere anche i frammenti più piccoli. Successivamente, 0,1 mL d'acqua contenenti le particelle sono stati depositati su un supporto di vetro ed è stato lasciato evaporare naturalmente il solvente. Le particelle sono state poi sottoposte ad un processo di rivestimento con lamina d'oro (Polaron, SEM coating system) ed in fine sono state osservate al microscopio elettronico a scansione.

#### **3.3.2 Light scattering**

Per ogni test eseguito, un campione di 0.5 mg di microparticelle è stato disperso in acqua milli-Q e gli aggregati di particelle sono stati frantumati per mezzo di ultrasuoni. Mediante centrifugazione a 2000 rpm per 30 secondi, si sono ottenute due porzioni contenenti microparticelle di varie dimensioni e in ciascuna è stata determinata, mediante light scattering (DLS Nicomp 380, Particle Sizing Systems, Inc. Santa Barbara, USA), la gamma dei diametri delle particelle stesse. Infine, l'acqua è stata fatta evaporare sotto vuoto e le particelle ottenute da ciascuna aliquota

sono state pesate per determinarne la percentuale sul totale del campione pesato.

### **3.4 Valutazione della capacità di assorbimento del biomateriale**

Per valutare la capacità di assorbimento del polimero sono stati preparati dei films di HYAFF 11<sup>®</sup> da impregnare con fluoresceina (colorante solubile in acqua) alla concentrazione di 10 µg/ml.

Inoltre sono state svolte analisi immunoistochimiche sulle microparticelle impregnate con due diversi fattori di crescita, PDGF e TGFβ, alla concentrazione di 0,5 µg/ml.

#### **3.4.1 Produzione del film di HYAFF 11<sup>®</sup>**

Il film è stato ottenuto da una soluzione al 10% (p/V) di HYAFF 11<sup>®</sup> in DMSO: 0,5 mL di tale soluzione sono stati depositati su un supporto di vetro, stesi con una spatola e posti a 65°C per 30 minuti al fine di ottenere l'evaporazione del solvente. Successivamente, il film ottenuto, dello spessore di 50 µm, è stato sollevato dal supporto con l'aiuto di una piccola pinza.

#### **3.4.2 Valutazione dell'assorbimento del colorante da parte del film polimerico**

L'assorbimento del colorante nel film polimerico è stato ottenuto immergendo il film stesso nella soluzione di colorante per tempi di contatto variabili: 5 minuti, 60 minuti, 24 ore, 72 ore.

La capacità di assorbimento del colorante nell'intero spessore del film è stata messa in rilievo mediante l'analisi di una serie di criosezioni del campione dello spessore di 7 µm l'una.

Il film è stato incluso nel mezzo di fissazione OCT (Tissue-Tek OCT, Sakura Finetek, USA), congelato in azoto liquido e conservato a -80° C. Usando un ultramicrotomo sono state poi tagliate sezioni di 7 µm di spessore e poste su vetrini per essere osservate al microscopio a fluorescenza.



### **3.4.3 Analisi immunoistochimica dell'assorbimento dei fattori di crescita da parte delle microparticelle**

L'assorbimento del fattore di crescita nelle particelle è stato valutato qualitativamente mediante analisi immunoistochimiche indirette, sfruttando cioè un sistema di tre anticorpi e utilizzando il metodo di rivelazione APAAP (sistema fosfatasi alcalina anti-fosfatasi alcalina), in cui la reazione con uno specifico substrato cromogeno (FAST RED) dà luogo ad una colorazione rossa che conferma la presenza dell'antigene.

Le sezioni del campione precedentemente incluso in OCT (Tissue-Tek OCT, Sakura Finetek, USA) sono state trattate nel seguente modo:

- incubazione con siero di coniglio diluito 1:20 per 20 minuti, al fine di saturare i siti aspecifici;
- lavaggio con tampone (TRIZMA maleato 0.05 M, pH 7.6);
- incubazione con anticorpo monoclonale primario di topo anti-PDGF umano, diluito 1: 250, per 90 minuti;
- lavaggio con tampone;
- incubazione con anticorpo secondario di coniglio diluito 1: 25 per 30 minuti;
- lavaggio con tampone;
- incubazione con anticorpo legato alla fosfatasi alcalina diluito 1:50 per 30 minuti;
- lavaggio con tampone;
- incubazione con la soluzione colorante (FAST RED).

### **3.5 Analisi del rilascio del fattore di crescita**

Il rilascio del fattore di crescita dalle particelle di HYAFF 11<sup>®</sup> è stato studiato nelle seguenti condizioni:

- fisiologiche (tampone fosfato);
- in presenza di ialuronidasi alle concentrazioni di 5 mg/ml e 0,5 mg/ml;

- in soluzione alcalina (con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> alle concentrazioni: 1, 5, 10, 50 µg/mL).

### **3.5.1 Metodo ELISA**

La quantificazione del fattore di crescita liberato è stata effettuata utilizzando un saggio immunoenzimatico in assorbimento ELISA (SPI biokit; PDGF o TGFβ enzyme immunoassay kit).

Per eseguire il test è stata impiegata una piastra di reazione con i pozzetti adsorbiti di anticorpi anti-PDGF o anti-TGFβ, nei quali è stata posta una determinata aliquota di soluzione in esame contenente gli antigeni PDGF o TGFβ. La piastra è stata incubata per permettere la formazione dell'eventuale complesso antigene-anticorpo, dopodiché la soluzione contenente gli antigeni liberi è stata rimossa. E' stata eseguita una seconda incubazione con un'aliquota di anticorpo secondario, legato all'enzima fosfatasi alcalina, per la rivelazione del complesso antigene-anticorpo primario. Infine è stato aggiunto, nei pozzetti di reazione, il substrato specifico per l'enzima. Il prodotto di tale reazione è colorato e quindi la presenza del complesso antigene-anticorpo primario viene rilevata attraverso lo sviluppo di una colorazione, la cui intensità dipende, a parità di tempo di incubazione, dal numero di complessi presenti.

### **3.6 Realizzazione della preparazione da sperimentare**

Una serie di aliquote di 2 mg di microparticelle sono state caricate con il fattore di crescita per contatto per 24 ore con una soluzione acquosa di PDGF allo 0,01%. Successivamente è stato fatto evaporare il solvente e ogni aliquota di 2 mg di microparticelle impregnate di fattore di crescita è stata incorporata in 1 mL di gel inerte. Parallelamente, aliquote di 2 mg di microparticelle prive di fattore di crescita sono state incorporate in 1 mL del medesimo gel inerte, al fine di valutare un eventuale effetto del biomateriale come tale nella guarigione delle ferite.

### **3.7 Sperimentazione animale**

Per valutare l'effetto delle microparticelle caricate con PDGF nella guarigione di ulcere cutanee, è stato messo a punto un modello di sperimentazione animale che ha previsto l'uso di ratti Wistar adulti del peso di 250-350 g.

#### **3.7.1 Ottenimento delle ferite**

Sul dorso, precedentemente rasato, di ciascun animale sono state praticate chirurgicamente tre ferite circolari a tutto spessore (estese cioè fino al panniculus carnosus) del diametro di 1 cm, distanti 1,5 cm l'una dall'altra. Durante tali procedure chirurgiche, gli animali sono stati sottoposti ad anestesia con alotano.

Ogni ferita è stata coperta con un bendaggio semi-occlusivo a base di poliuretano (Tegaderm, 3M, St. Paul, MN).

#### **3.7.2 Trattamento delle ferite**

Le ferite sono state divise in tre gruppi a seconda del tipo di trattamento a cui sono state sottoposte:

- A) trattamento con microparticelle impregnate di PDGF disperse in gel inerte (PEM)
- B) trattamento con microparticelle tal quali disperse in gel inerte (M)
- C) trattamento con il solo gel inerte (I)

Ogni ferita è stata medicata bisettimanalmente con una dose di 7 mg/cm<sup>2</sup> della relativa preparazione.

Gli animali sono stati sacrificati a 3, 5, 7, 14, 21 giorni con una dose di barbiturico (Nembutal sodium solution, Abbott Laboratories) e le ferite sono state asportate con un bordo eccedente di 2 mm. I campioni sono stati quindi fissati in formalina 10% o

immediatamente congelati in azoto liquido, previa inclusione in OCT, a seconda del tipo di analisi successiva.

Tutte le procedure chirurgiche sono state eseguite dallo stesso chirurgo e seguendo il medesimo protocollo.

Gli animali non sono stati sottoposti ad alcuna profilassi antibiotica e sono stati alimentati secondo un regime dietetico standard.

### **3.7.3 Fotografia e analisi delle ferite**

Ai vari intervalli di tempo, prima dell'asportazione dal dorso dell'animale, ogni ferita è stata fotografata con una macro-lente con riproduzione 2:1 e pellicola ISO 100. Ogni foto include una barra graduata in mm. E' stata individuata un'area di analisi (DAA) in ciascuna ferita. Mediante un apposito software, le ferite sono state analizzate come riportato da Harries et al. Sono state misurate le aree rimaste aperte all'interno di ciascuna ferita ed è stata calcolata l'area neoepitelializzata (NEA) sottraendo l'area della ferita rimasta ad ogni intervallo di tempo da quella della ferita iniziale. E' stata quindi determinata, per ogni ferita, la percentuale di neoepitelizzazione (NE) mediante la seguente equazione:

$$NE = (NEA/DAA) \times 100$$

### **3.7.4 Analisi immunoistochimiche**

Per le analisi immunoistochimiche, sono state preparate criosezioni di 7 µm (previa inclusione in OCT) adagiate su vetrini ricoperti di gelatina e fissate con acetone assoluto per 10 minuti.

Mediante la procedura APAAP è stata messa in evidenza la presenza di collagene di tipo I (Coll-1), fibroblasti (FU) e cellule endoteliali (CD-31). Una volta saturati i siti antigenici aspecifici con siero di coniglio 1:20 in TRIZMA maleato 0,05 M pH 7,6 (Sigma) per 20 minuti, è stato aggiunto l'anticorpo primario (Ab mouse 1:800, DAKO). Dopo incubazione per 2 ore, i campioni sono stati lavati con la soluzione

tampone ed è stato aggiunto l'anticorpo secondario (Link Ab rabbit anti-mouse 1:25, DAKO) per 30 minuti. Infine, dopo lavaggio con tampone, le sezioni sono state incubate con il terzo anticorpo legante la fosfatasi alcalina (mouse APAAP Ab 1:50, DAKO) per 30 minuti. Dopo un ulteriore lavaggio con tampone, è stato aggiunto il substrato FAST RED (Sigma) e lasciato reagire per 20 minuti. Infine è stata effettuata una contro colorazione con ematossilina (Sigma).

Le varie reazioni immunoistochimiche sono state condotte in camere umidificate a temperatura ambiente.

### **3.7.5 Analisi istologiche**

Per le analisi istologiche, i campioni sono stati fissati in formalina 10%, inclusi in paraffina e colorati con ematossilina ed eosina.

L'inclusione in paraffina è stata effettuata secondo il seguente protocollo:

- Formalina 10% per 2-4 ore (anche fino a 12 ore)
- Etanolo 70% per 1 ora
- Etanolo 80% per 45 minuti
- Etanolo 95% per 45 minuti
- Etanolo 100% per 45 minuti
- Xilolo per 45 minuti
- Xilolo in stufa a 60°C per 45 minuti
- Xilolo/paraffina 1:1 in stufa a 60 °C per 1 ora
- Paraffina pura liquida per 1 ora
- Taglio al microtomo.

Prima della colorazione istologica le sezioni hanno subito una sparaffinatura secondo quanto segue:

- Xilolo per 3-4 minuti;
- Etanolo 100% per 4 minuti;
- Etanolo 95% per 2 minuti;
- Etanolo 80% per 2 minuti;

- Acqua per 5 minuti.

Al termine le sezioni sono state colorate con ematossilina ed eosina.

### **3.7.6 Analisi semi-quantitativa delle cellule**

Per valutare la risposta cellulare al trattamento, 2 operatori hanno analizzato in modo indipendente tre vetrini per ogni esperimento con un ingrandimento iniziale pari a 20×. Ogni vetrino conteneva 3 sezioni dello stesso campione e sono stati analizzati 5 campi di 322  $\mu\text{m}^2$  ciascuno per ogni sezione.

Le cellule dell'infiammazione sono state identificate mediante colorazione con ematossilina ed eosina, i fibroblasti e le cellule endoteliali mediante reazione immunohistochimica (positività per anti-FU e anti CD31 rispettivamente).

## 4. RISULTATI

### 4.1 Produzione delle particelle

Al fine di determinare le migliori condizioni operative atte alla produzione di microparticelle con forma e dimensioni il più possibile uniformi e regolari, in questa prima fase sono stati eseguiti diversi test di produzione apportando specifiche modifiche alle variabili di processo.

In particolare sono stati presi in considerazione i seguenti parametri:

- pressione;
- diametro interno dell'ugello di iniezione della soluzione organica nella camera di precipitazione;
- concentrazione della soluzione organica di partenza;
- temperatura
- velocità di flusso della CO<sub>2</sub>.

In tabella 1 si riportano le condizioni applicate nelle diverse prove effettuate.

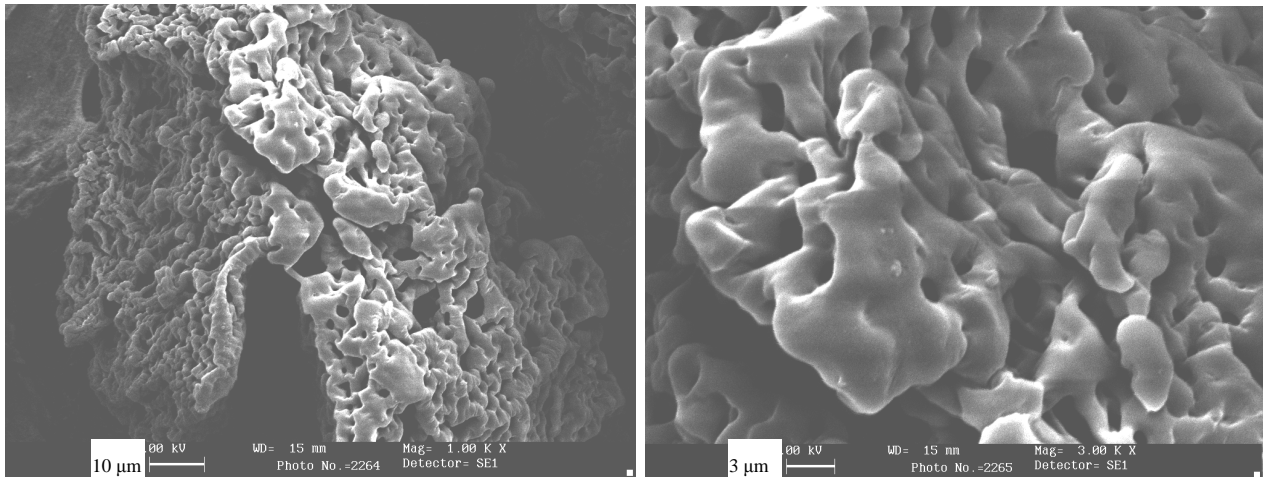
**Tabella 1.** Sommario delle condizioni operative per gli esperimenti GAS.

Test n°	HYAFF11®/ DMSO (p/V)	UgelloØ (µm)	Pressione (mPa)	Temperatura (°C)	Velocità di flusso CO <sub>2</sub> (ml/min)
1	0.3	250	15	25	6
2	1.0	250	15	21	6
3	0.7	100	15	24	5
4	0.5	100	15	28	6
5	0.3	100	15	30	6
6	0.3	50	15	23	1.5
7	0.3	100	20	21	5.6

### Test n. 1 e test n. 2

Si è potuto inizialmente osservare che, con un diametro dell'ugello di nebulizzazione di 250  $\mu\text{m}$ , le particelle ottenute presentavano delle dimensioni piuttosto elevate (intorno ai 100  $\mu\text{m}$ ), risultavano molto compatte (anche dopo sonicazione) e presentavano una considerevole microporosità.

In figura 4.1 si può osservare la microporosità superficiale delle particelle ottenute dall'esperimento n. 1. Come si può facilmente notare, si tratta di agglomerati compatti di dimensioni non adatte allo scopo prefissato. Il test n. 2 ha dato luogo a particelle di aspetto molto simile e con dimensioni del tutto analoghe.



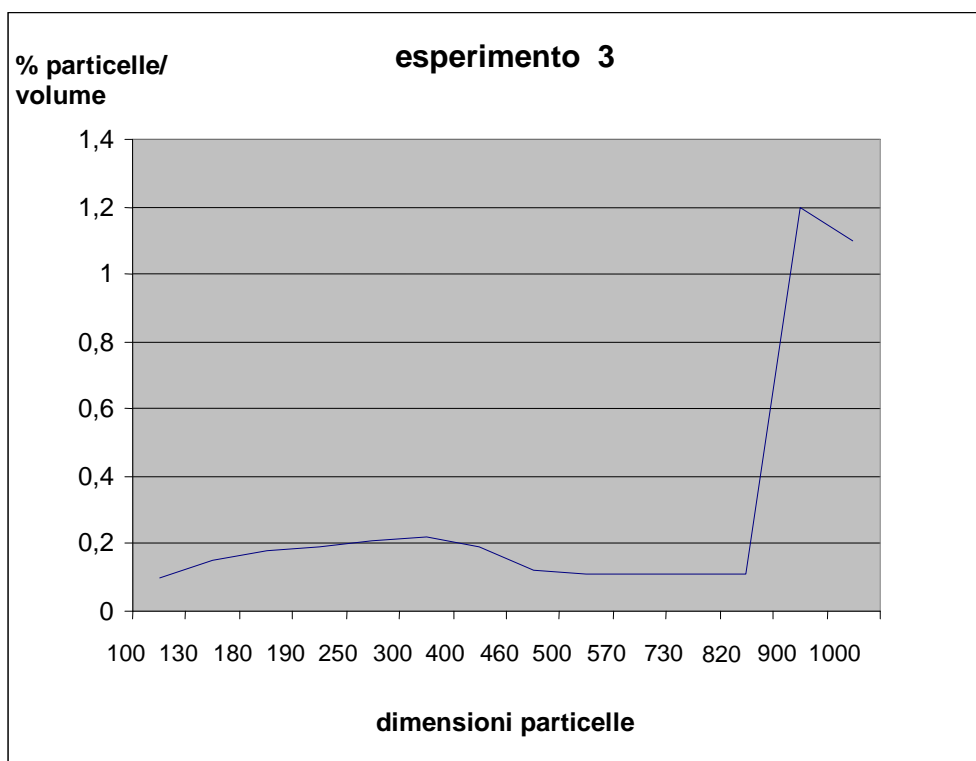
**Fig. 4.1**

*Immagini relative al SEM relative alle particelle ottenute nel test n. 1: a) 1000x; b) 3000x. Il test n. 2 ha dato luogo ad un materiale con un aspetto del tutto analogo.*

### Test n. 3

Visti i precedenti risultati, è stato diminuito il diametro dell'ugello fino a 100  $\mu\text{m}$ , ma anche in questo caso sono stati ottenuti agglomerati particellari compatti che, anche se sottoposti a sonicazione, non hanno liberato particelle di dimensioni inferiori ai 900 nm. Come si può osservare, infatti, nella fig.4.2 relativa all'analisi al light scattering, la maggior parte delle particelle ha un diametro superiore ai 900 nm.



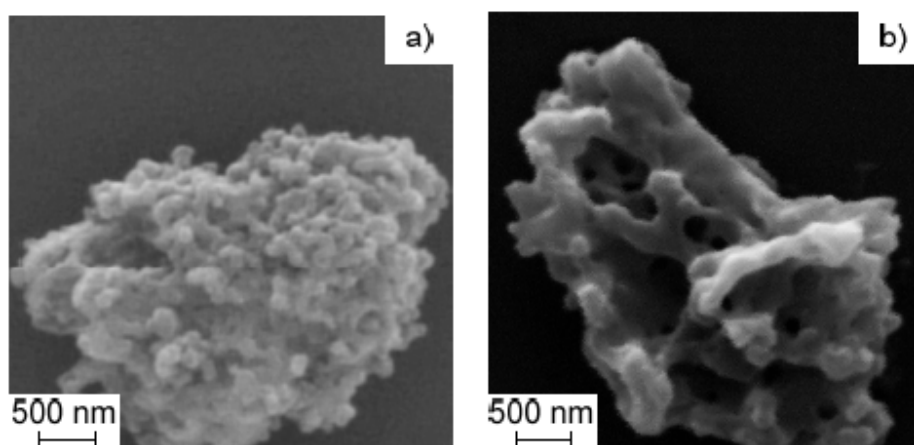


**Fig. 4.2** *Analisi al light scattering delle microparticelle di HYAFF 11<sup>®</sup> ottenute dall'esperimento n. 3. Le dimensioni delle particelle sono espresse in nm.*

#### **Test n. 4 e test n. 5**

Negli esperimenti 4 e 5, rispetto al precedente, è stata diminuita la concentrazione della soluzione organica di partenza da 0,7% p/V a 0,5% e 0,3% rispettivamente. In entrambi i casi è stato ottenuto un materiale finemente particolato, dopo sonicazione per 20 minuti degli agglomerati raccolti nella camera di precipitazione. In particolare è stata ottenuta una frazione di particelle con dimensioni superiori ai 900 nm e una frazione di particelle sub-micrometriche, come si può notare in figura 4.3. Dalle medesime immagini si può notare che il prodotto ottenuto risulta formato da nanoparticelle stabilmente ammassate tra loro. Questo risultato è stato di particolare rilievo, in quanto la nano-porosità conferisce al materiale ottenuto un'elevata

superficie specifica, caratteristica auspicabile in vista delle future applicazioni nel rilascio di fattori di crescita.



**Fig. 4.3** *Analisi morfologica (SEM) del materiale ottenuto dal test n. 4: a) 21020x; b) 12000x. L'esperimento n. 5 ha dato origine ad un materiale del tutto simile.*

#### **Test n. 6**

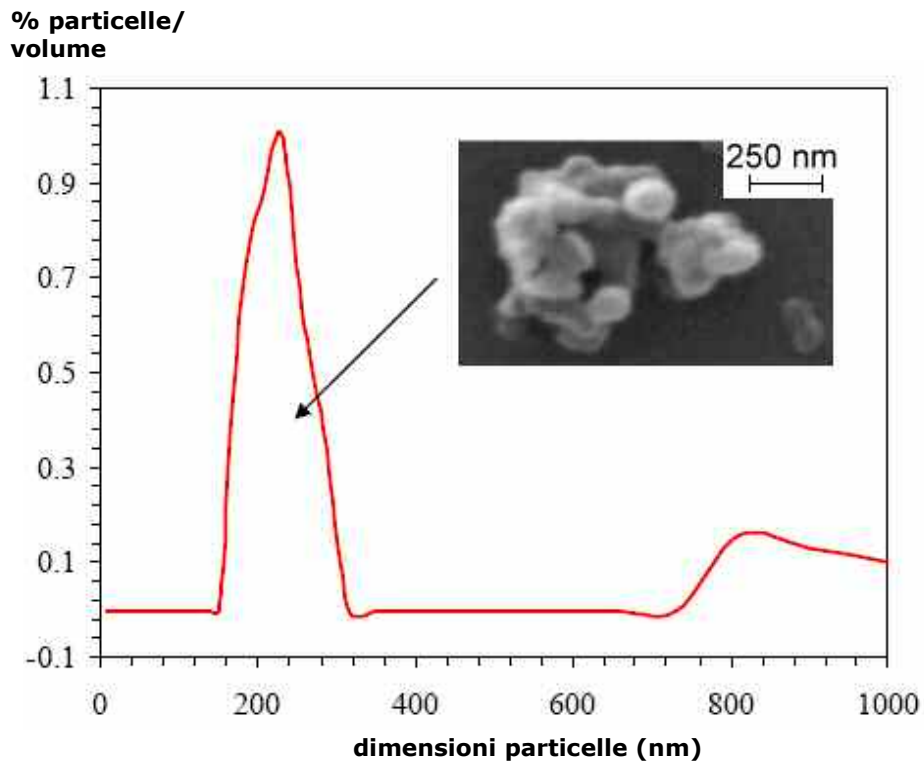
Allo scopo di diminuire ulteriormente le dimensioni delle particelle, è stato diminuito il diametro dell'ugello di nebulizzazione fino a 50  $\mu\text{m}$ , ma non sono stati ottenuti i risultati sperati. Con un diametro così piccolo, infatti, si sono verificati problemi di occlusione durante le operazioni di iniezione, bassa resa e scarsa riproducibilità.

#### **Test n. 7**

In ultima istanza, è stato fatto un intervento di modifica sulla pressione all'interno della camera di nebulizzazione. In particolare, la pressione è stata aumentata da 15 a 20 MPa. Questa variazione ha dato origine a particelle con caratteristiche morfologiche simili a quelle degli esperimenti 4 e 5, ma con dimensioni nettamente inferiori.

Il materiale è stato sottoposto a light scattering e in figura 4.4 si riporta il risultato di tale analisi. Come si può osservare, in queste condizioni si ottiene un'alta resa di

particelle (75%) con dimensioni comprese tra i 200 e i 300 nm.



**Fig. 4.4** *Analisi al light scattering delle microparticelle di HYAFF 11<sup>®</sup> ottenute dall'esperimento n. 7. Nell'insero viene riportata una fotografia al SEM di una particella appartenente alla frazione di dimensioni minori (51200x).*

Riassumendo, le condizioni operative degli esperimenti 1, 2 e 6 non sono state considerate adeguate alla produzione di particelle con le caratteristiche morfologiche e le dimensioni desiderate. Il materiale ottenuto da questi esperimenti non è stato sottoposto a light scattering.

Gli esperimenti 3 e 5 hanno dato luogo pressoché al 100% di particelle di dimensioni superiori a 1  $\mu\text{m}$ .

Negli esperimenti 4 e 7, invece, è stata ottenuta una distribuzione delle dimensioni delle particelle di tipo bimodale con una frazione di particelle piccole intorno ai 300 nm e una frazione di particelle grandi intorno ai 900 nm, come riportato di seguito

nella tabella 2.

**Tabella 2.** Sommario dei risultati ottenuti mediante light scattering nell'analisi delle dimensioni delle particelle e rapporto tra la frazione pesata di particelle piccole e la frazione pesata di particelle grandi.

<b>Test n.</b>	<b>Ø medio (nm) delle particelle piccole</b>	<b>Rapporto (%w/w)</b>	<b>Ø medio (nm) delle particelle grandi</b>	<b>Rapporto (%w/w)</b>
3	400 ± 100	~ 0	1000 ± 120	~ 100
4	400 ± 112	83	900 ± 135	17
5	380 ± 61	~ 0	900 ± 81	~ 100
7	270 ± 78	75	900 ± 135	25

Ricordando le condizioni operative schematizzate in tabella 1, si può notare come piccole variazioni della concentrazione della soluzione di partenza associate al medesimo diametro dell'ugello (100 µm) si traducano in sostanziali differenze nel rapporto tra la frazione di particelle piccole e la frazione di particelle grandi.

Le condizioni sperimentali ottimali quindi, considerando morfologia, dimensioni delle particelle e percentuale di particelle piccole, sono quelle utilizzate nell'esperimento 7. Una pressione maggiore (20 MPa) ha dato luogo alla formazione altamente riproducibile di particelle aventi un diametro medio di 270 ± 78 nm. Inoltre, complessivamente, l'analisi al light scattering ha dimostrato che il 90-98% delle particelle ottenute in queste condizioni aveva un diametro inferiore a 1 µm. L'analisi al SEM ha infine messo in evidenza che esse possedevano una porosità nanostrutturata e, di conseguenza, un'elevata superficie specifica.

Pertanto sono state scelte queste condizioni operative per la produzione delle particelle da utilizzare successivamente per studiare la capacità di assorbimento del materiale e il rilascio di fattori di crescita, nonché da utilizzare nel trattamento delle ferite nella sperimentazione in vivo.

## **4.2 Analisi della capacità di assorbimento del polimero**

Dal momento che l'acqua può fungere da agente plasticizzante a livello della matrice polimerica, aumentando eventualmente l'assorbimento di soluti da una soluzione acquosa, è stato valutato mediante DSC il contenuto in acqua all'interno del film polimerico spesso 50  $\mu\text{m}$  ed è stato ottenuto un valore pari all'8,5% (w/w). In seguito ad essiccamento sottovuoto a temperatura ambiente per 15 ore, il contenuto in acqua era del 5,5%, valore che è passato al 3,7% (w/w) dopo trattamento in stufa a 105°C per 15 ore. Questi risultati dimostrano l'abilità della matrice polimerica di assorbire permanentemente considerevoli quantità di acqua, che può agire da plasticizzante incrementando l'assorbimento di molecole biologicamente attive idrosolubili.

### **4.2.1 Assorbimento e diffusione di una soluzione di fluoresceina all'interno del film polimerico**

Le prove di assorbimento sono state effettuate sul film polimerico dello spessore di 50  $\mu\text{m}$  utilizzando una soluzione acquosa di fluoresceina alla concentrazione di 10  $\mu\text{g/mL}$ . 4 porzioni di film polimerico sono state incubate nella soluzione di colorante per i seguenti intervalli di tempo:

- a) 5 minuti;
- b) 60 minuti;
- c) 24 ore;
- d) 72 ore.

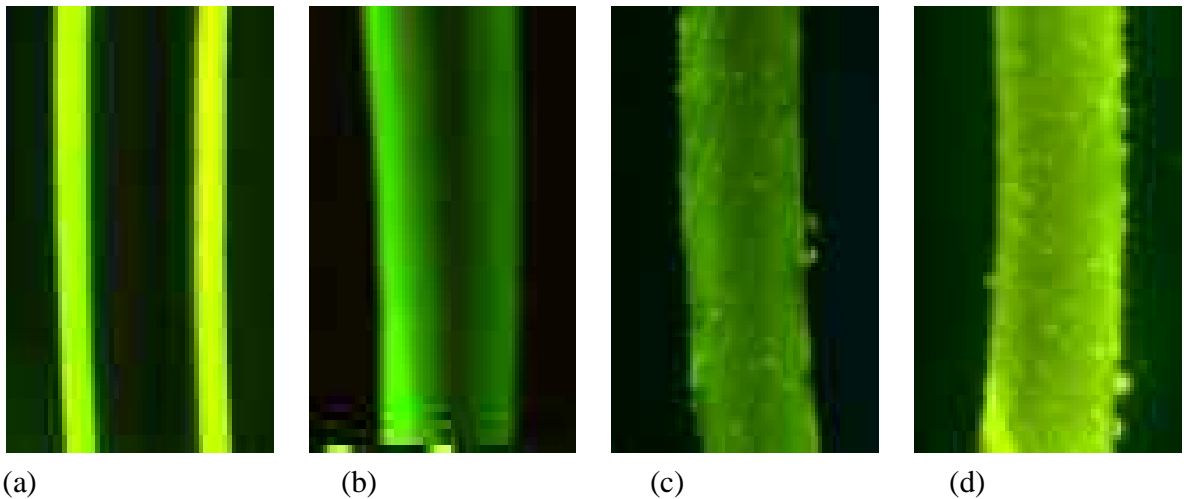
Il grado di assorbimento del colorante e la sua penetrazione nel materiale sono stati analizzati al microscopio a fluorescenza su sezioni trasversali dello spessore di 7  $\mu\text{m}$ .

Come si può osservare in fig. 4.5 (a), a seguito del contatto con il colorante per 5 minuti, solo la superficie del polimero risulta impregnata (per uno spessore di  $25,4 \pm 0,9 \mu\text{m}$ ).

A partire da 60 minuti di contatto, come mostrato in fig. 4.5 (b), lo strato di colorante diventa più spesso e più intenso e, dopo 24 ore, la presenza del colorante è visibile

nello strato più profondo del polimero, come appare in fig. 4.5 (c).

Dopo 72 ore, come si può osservare in fig. 4.5 (d), il colorante ha raggiunto una distribuzione omogenea nell'intero spessore del film.

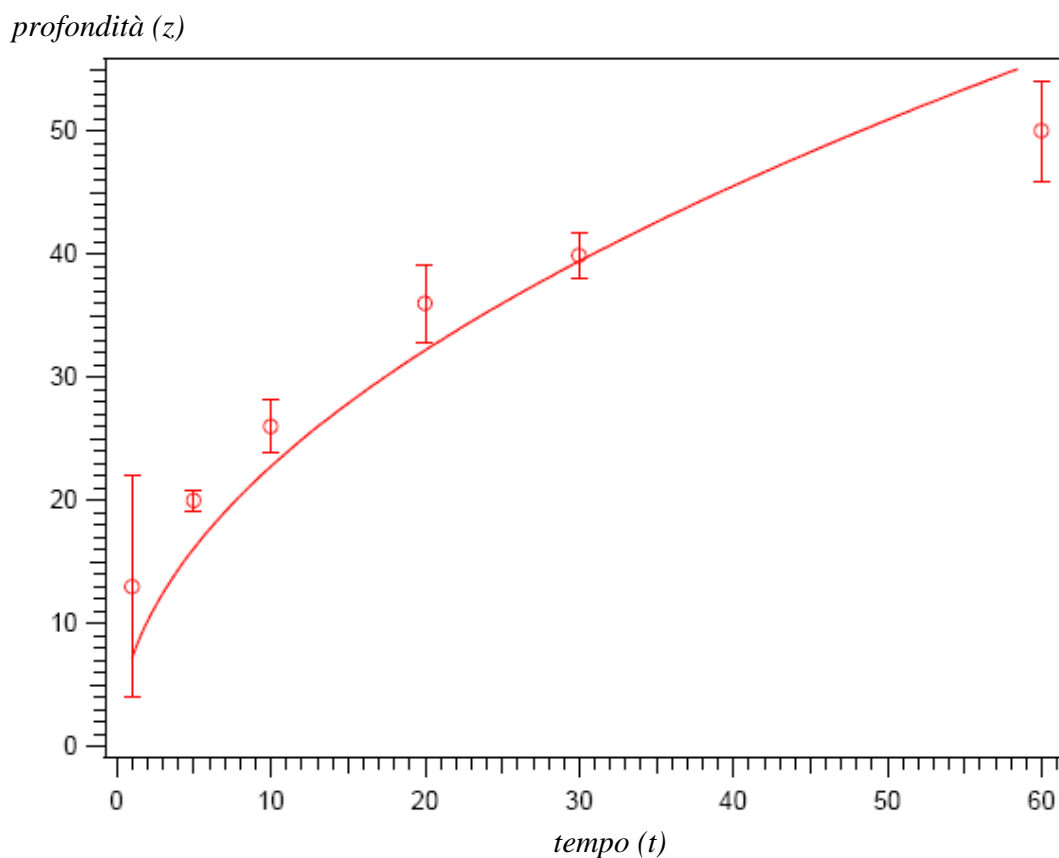


**Fig. 4.5** Microfotografia (10x) di microsezioni di films di HYAFF 11<sup>®</sup> impregnate con soluzione acquosa di sodio fluoresceinato: (a) dopo 5 minuti di contatto, (b) dopo 60 minuti di contatto, (c) dopo 24 ore di contatto, (d) dopo 72 ore di contatto.

E' stata quindi ottenuta una stima del coefficiente di diffusione del colorante ( $D_{dye}$ ) mettendo in relazione i valori sperimentali della profondità di penetrazione ( $z$ ) della fluoresceina ottenute dalle immagini in fluorescenza. I dati sperimentali sono stati correlati mediante la seguente equazione che descrive l'andamento della diffusione nel tempo di una sostanza all'interno di una matrice polimerica come funzione della coordinata assiale  $z$ :

$$c_{dye} / c_{dye,0} = \operatorname{erfc} \left( z / 2 \sqrt{D_{dye} \cdot t} \right) \quad (1)$$

Dove  $c_{dye}$  è la concentrazione molare del colorante al tempo  $t$ ;  $c_{ye,0}$  è la concentrazione molare del colorante quando  $z=0$ ; la profondità  $z$  corrisponde allo spessore della porzione del film che appare fluorescente. Il valore del coefficiente di diffusione  $D_{dye}$  calcolato è risultato essere  $1,2 \times 10^{-9} \pm 0,2 \times 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$ .

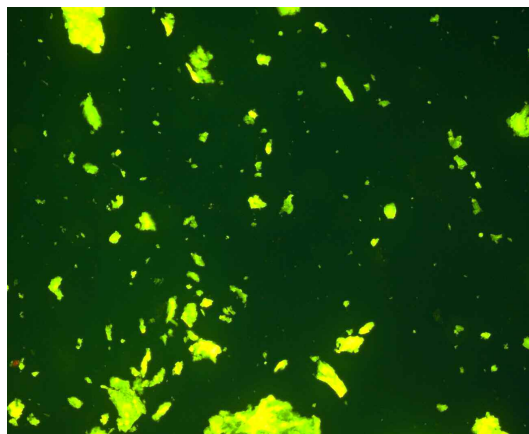


**Fig. 4.6** *Profondità di penetrazione della fluoresceina nel film di HYAFF 11<sup>®</sup> in funzione del tempo di contatto.*

#### **4.2.2 Assorbimento di una soluzione di fluoresceina all'interno delle microparticelle di HYAFF 11<sup>®</sup>**

Anche le microparticelle di HYAFF 11<sup>®</sup> sono state impregnate con la medesima soluzione di fluoresceina per gli stessi tempi di contatto utilizzati nel caso del film.

Come si può osservare in fig. 4.7, dopo 24 ore di contatto, la distribuzione del colorante è omogenea.



**Fig. 4.7** *Microfotografia di particelle di HYAFF 11<sup>®</sup> impregnate di soluzione acquosa di sodio fluoresceinato (per un tempo di contatto di 24 ore).*

#### **4.2.3 Assorbimento dei fattori di crescita PDGF e TGF- $\beta$ da parte delle microparticelle di HYAFF 11<sup>®</sup>**

Le microparticelle sono state poste in contatto con una soluzione della concentrazione di 0,5  $\mu\text{g/mL}$  di PDGF o TGF- $\beta$  per gli stessi intervalli di tempo usati nel caso della fluoresceina.

Per rilevare l'avvenuto assorbimento, le microparticelle sono state sottoposte ad analisi immunostochimica. Si è potuto constatare un assorbimento pressoché completo di entrambi i fattori di crescita all'interno delle microparticelle.

Nella figura 4.7 relativa al PDGF, si può notare che, già dopo 24 ore, le particelle hanno assorbito in modo omogeneo il fattore di crescita, come dimostrato dalla colorazione rossastra uniformemente distribuita.

Immagini analoghe sono state ottenute per le particelle impregnate con il TGF- $\beta$ .





**Fig. 4.7** *Immunoistochimica di microparticelle di HYAFF 11<sup>®</sup> impregnate di fattore di crescita PDGF lasciato a contatto con le particelle per 24 ore.*

### **4.3 Analisi del rilascio dei fattori di crescita dalle microparticelle di HYAFF 11<sup>®</sup>**

I profili di rilascio in vitro danno importanti informazioni per poter prevedere correttamente il comportamento in vivo di una forma farmaceutica a rilascio controllato.

Nel nostro caso, il rilascio del fattore di crescita è stato valutato mediante test ELISA: le microparticelle impregnate di fattore di crescita (PDGF e TGF- $\beta$  alla concentrazione di 0,5  $\mu\text{g/mL}$ ) sono state incubate in diverse condizioni e, a tempi prefissati, è stata dosata la quantità di PDGF e TGF- $\beta$  rilasciata.

In particolare, per avvicinarsi il più possibile al contesto della somministrazione topica del preparato finale, le prove di rilascio sono state svolte risospendendo le particelle in 2 mL di mezzo ricevente.

Gli esperimenti, quindi, sono stati condotti nelle seguenti condizioni:

- in PBS;
- in PBS + Ialuronidasi 0,5%;

- in PBS + Ialuronidasi 5%;
- in PBS + carbonato di sodio 5%;
- in PBS + carbonato di sodio 1%;
- in PBS + carbonato di sodio 0.5%;
- in PBS + carbonato di sodio 0.1%

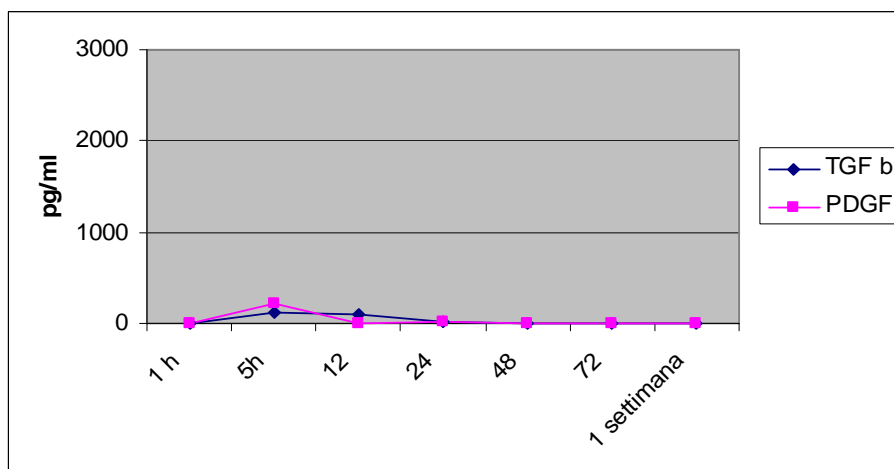
Sono state pertanto analizzate 3 specifiche situazioni:

- soluzione tampone;
- presenza concentrazioni diverse di un enzima in grado di degradare l'acido ialuronico;
- presenza di diverse concentrazioni di una sostanza in grado di alterare il pH e la forza ionica del mezzo.

Le microparticelle impregnate di fattore di crescita (PDGF o TGF- $\beta$ ) sono state incubate in tampone fosfato e, a tempi prefissati (1, 5, 12, 24, 48, 72 ore e 1 settimana), tale soluzione è stata analizzata per determinare la quantità di fattore di crescita rilasciato.

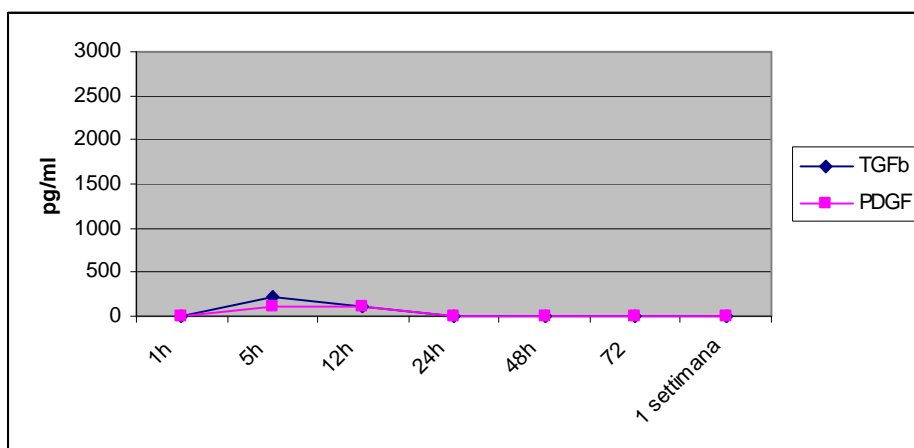
Contrariamente all'acido ialuronico tal quale, che risulta altamente idrosolubile, il suo estere benzilico presenta un comportamento molto diverso nei confronti dell'acqua e dei fluidi biologici. Come riportato in letteratura (Avitabile et al., 2001; Leach et al., 2005), è noto che il rilascio in vitro da supporti a base di HYAFF 11<sup>®</sup> non è osservabile entro 15 giorni in condizioni fisiologiche. Essendo costituiti da esteri benzilici dell'acido ialuronico, gli scaffolds a base di HYAFF 11<sup>®</sup> formano una trama gelificata dalla quale il rilascio di farmaci o fattori di crescita può essere controllato per lunghi periodi nel mezzo di coltura (Esposito et al., 2005).

Come si può osservare in figura 4.8, dove viene riportato il grafico ottenuto dai dosaggi di fattore di crescita in PBS, infatti, ad esclusione di un piccolo picco che indica un leggero rilascio della sostanza dopo 5 ore di incubazione, non se rilevano quantità significative nel mezzo negli intervalli successivi.

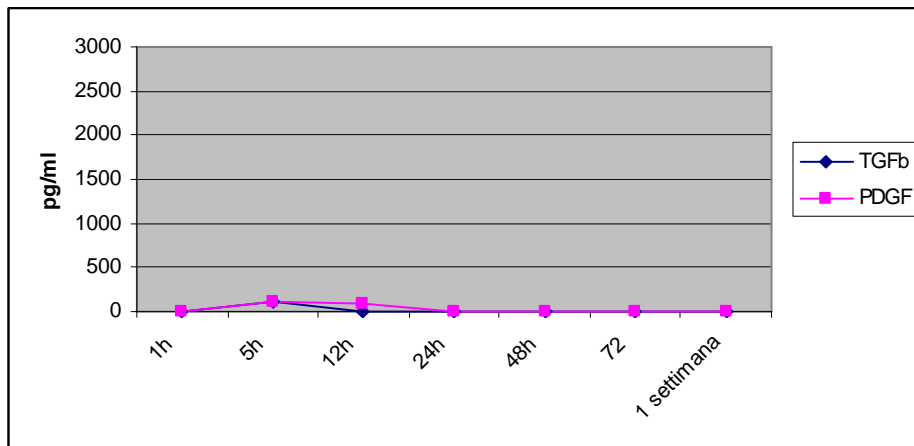


**Fig. 4.8** Rilascio *in vitro* di TGF- $\beta$  e PDGF da microparticelle impregnate, poste ad incubare in tampone fosfato.

Un identico andamento si è verificato anche in presenza di ialuronidasi ad entrambe le concentrazioni, come è mostrato nei grafici riportati in fig. 4.9 e 4.10.



**Fig. 4.9** Rilascio *in vitro* di TGF- $\beta$  e PDGF da microparticelle impregnate, poste ad incubare in tampone fosfato e ialuronidasi allo 0,5%.

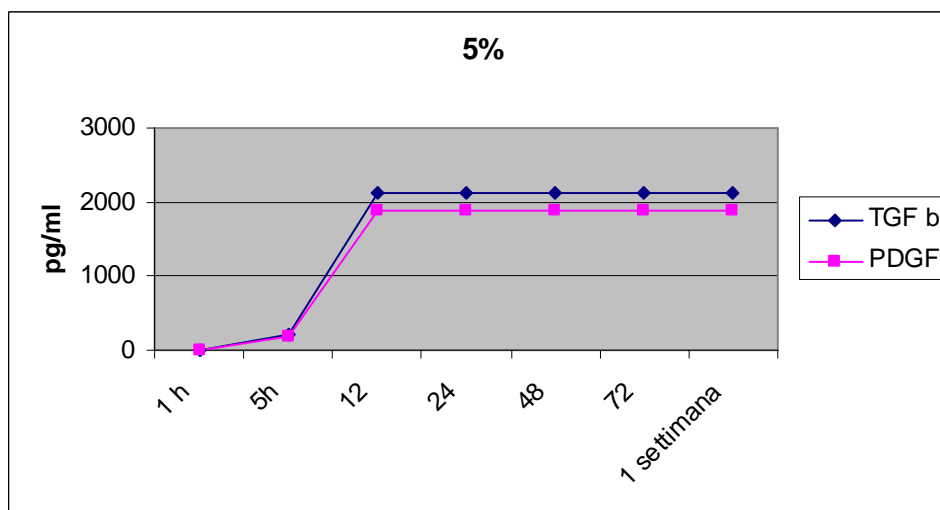


**Fig. 4.10** Rilascio *in vitro* di TGF- $\beta$  e PDGF da microparticelle impregnate, poste ad incubare in tampone fosfato e ialuronidasi al 5%.

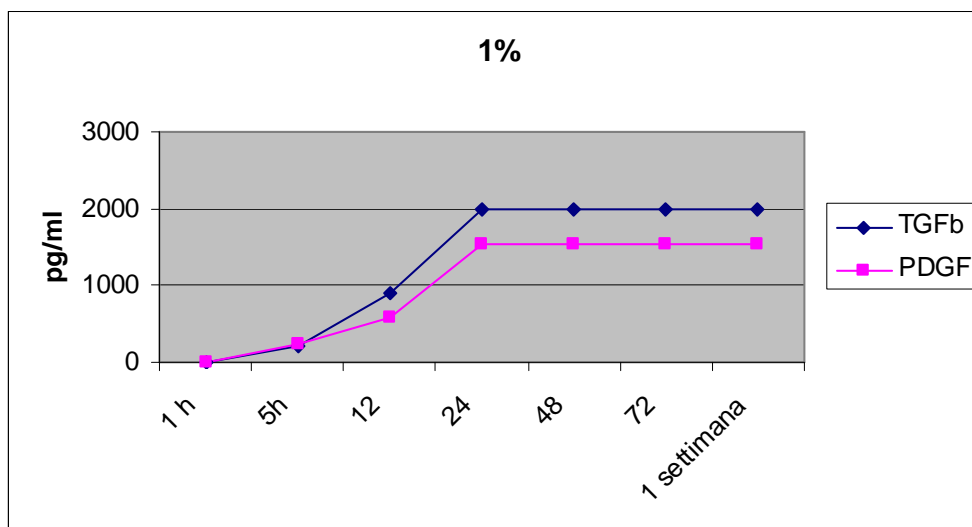
Come si evince da questi risultati, la presenza di ialuronidasi nel mezzo di incubazione non induce la degradazione del polimero. Questa osservazione conferma che i carbossilici dell'acido glucuronico sono i centri di attivazione di questo enzima e che il bloccaggio di questi gruppi mediante il legame estereo con l'alcol benzilico, presente nello HYAFF 11<sup>®</sup>, impedisce la scissione del legame  $\beta$ -1,4 glicosidico da parte della ialuronidasi.

Pertanto, al fine di verificare se invece un'alterazione del pH e della forza ionica del mezzo potessero influenzare la degradazione del biomateriale portando a modifiche rilevanti nella velocità di rilascio del fattore di crescita, si è provveduto ad aggiungere, dopo 5 ore di incubazione delle microparticelle in PBS, carbonato di sodio in concentrazioni crescenti dallo 0,1 al 5%.

Come si può osservare in fig. 4.11, l'aggiunta del carbonato di sodio ad una concentrazione del 5% ha dato luogo ad un rilascio immediato e continuo di entrambi i fattori di crescita testati. Tale rilascio ha raggiunto il valore massimo dopo 12 ore e si è poi stabilizzato dando gli stessi risultati nelle determinazioni successive.



**Fig. 4.11** Rilascio *in vitro* di TGF- $\beta$  e PDGF da microparticelle impregnate, in funzione del tempo in presenza di  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  alla concentrazione del 5.0%.

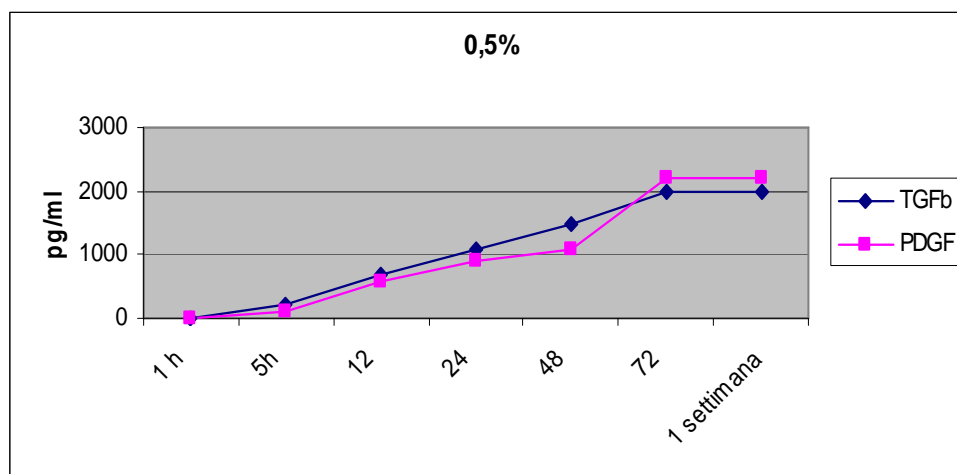


**Fig. 4.12** Rilascio *in vitro* di TGF e PDGF da microparticelle impregnate, in funzione del tempo in presenza di  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  alla concentrazione dell'1%.

Nella fig. 4.12 si può osservare che, utilizzando una soluzione di carbonato di sodio alla concentrazione dell'1%, il rilascio dei fattori di crescita non inizia

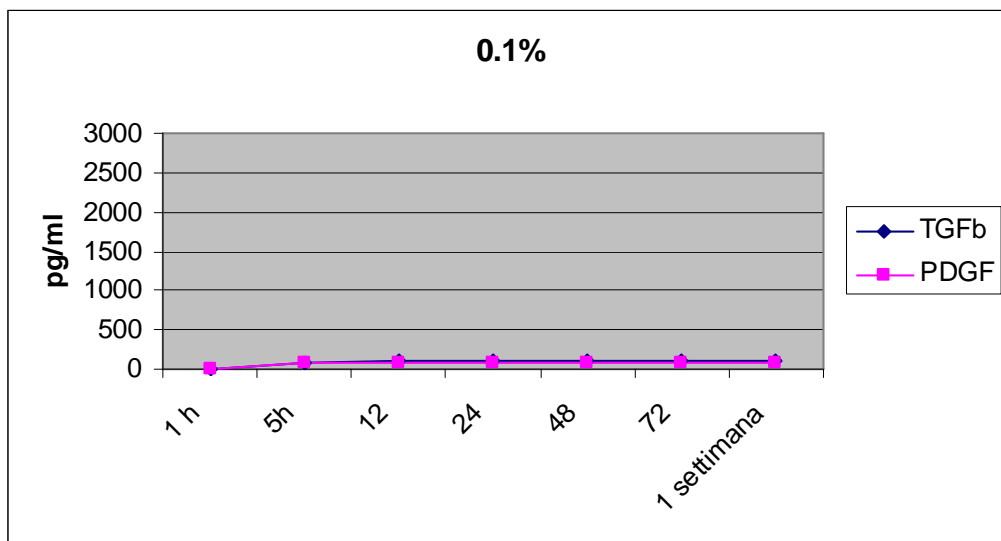
immediatamente e prosegue più lentamente rispetto a quanto osservato nel precedente esperimento. La concentrazione massima di fattore di crescita nel mezzo viene raggiunta dopo 24 ore.

Come è possibile notare in figura 4.13, invece, aggiungendo una soluzione di carbonato di sodio alla concentrazione dello 0.5%, i dati ottenuti dalle diverse determinazioni danno origine ad una curva molto diversa dalle precedenti. Questo ci permette di osservare che il rilascio dei fattori di crescita inizia e continua molto lentamente ed in maniera graduale fino alle 48 ore. Per il PDGF, a questo punto, vi è un piccolo incremento del rilascio, che poi si stabilizza.



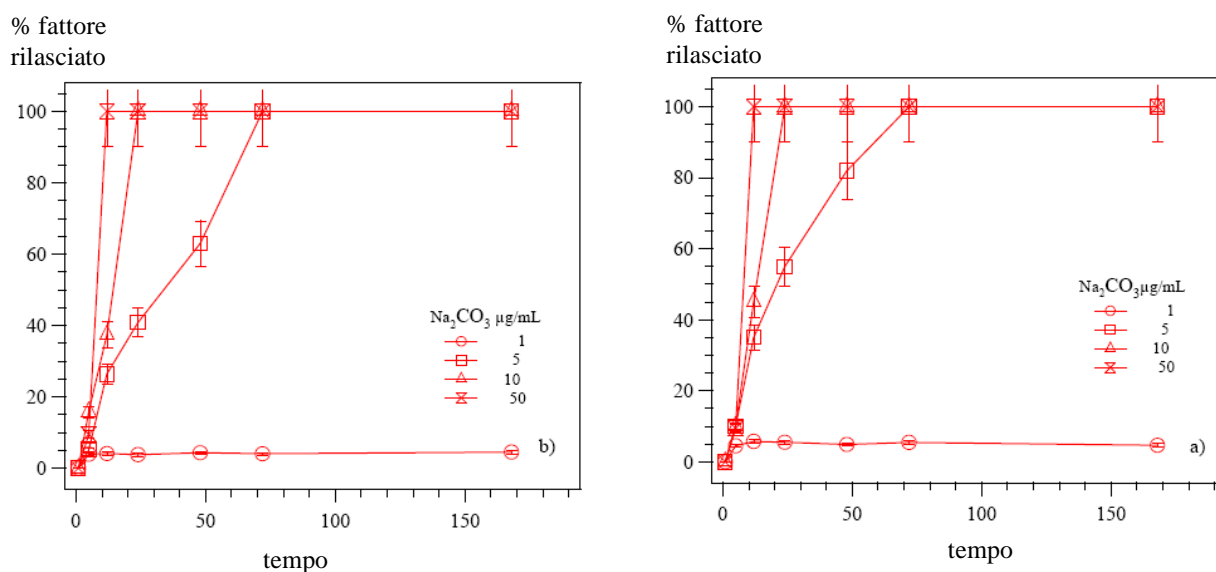
**Fig. 4.13** Rilascio *in vitro* di TGF e PDGF da microparticelle impregnate, in funzione del tempo in presenza di  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  alla concentrazione dello 0.5%.

Nella figura 4.14 è riportato il grafico ottenuto dalle determinazioni eseguite su un campione di materiale posto ad incubare con una soluzione di carbonato di sodio alla concentrazione dello 0.1%. Come si può notare, non esiste alcun picco che indichi l'avvenuto rilascio dei fattori di crescita. Il grafico è molto simile a quello ottenuto usando il solo tampone fosfato.



**Fig. 4.14** Rilascio *in vitro* di TGF e PDGF da microparticelle impregnate, in funzione del tempo in presenza di  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  alla concentrazione dello 0.1%.

Analizzando i profili di rilascio, si può osservare che, all'aumentare della concentrazione di  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , aumenta il rilascio dei fattori di crescita, come riassunto in figura 4.15, nella quale ogni valore viene riportato come media di sei indipendenti esperimenti.



**Fig. 4.15** Rilascio *in vitro* di TGF- $\beta$  (a) e PDGF (b) dalle microparticelle impregnate in funzione del tempo a diverse concentrazioni di  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Le linee fungono da guida.

La quantità massima di PDGF e TGF- $\beta$  rilasciati corrisponde all'ammontare del fattore di crescita assorbito dalle particelle, che è stato stimato essere 0,9 ng/mg (0,9 ng di fattore di crescita per ogni mg di particelle).

Al fine di analizzare il meccanismo di rilascio e la sua dipendenza dalla concentrazione di carbonato di sodio, i profili sperimentali di liberazione del fattore di crescita sono stati adattati in base alla seguente equazione, sviluppata per descrivere il rilascio di sostanze da particelle polimeriche di forma sferica (Arifin et al., 2006):

$$M_t/M_\infty = 1 - (1 - K \cdot t)^3 \quad (2)$$

dove  $M_t/M_\infty$  rappresenta la frazione di sostanza rilasciata al tempo  $t$ ;  $M_t$  e  $M_\infty$  indicano rispettivamente la quantità cumulativa di sostanza rilasciata al tempo  $t$  (minuti) dopo

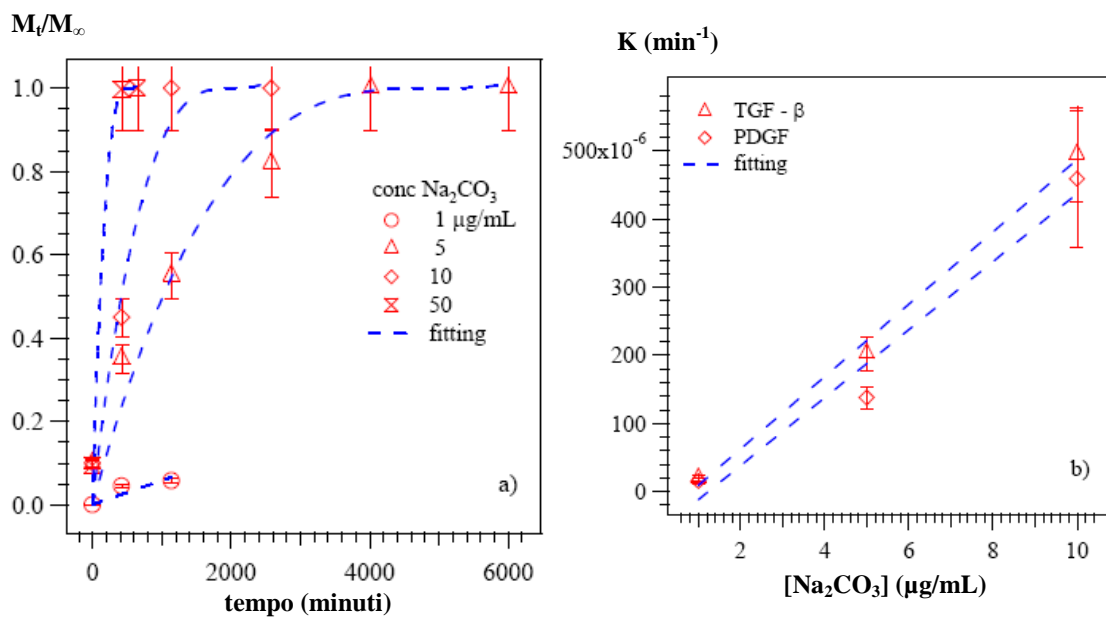


l'aggiunta di  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  e all'infinito.  $K$  è una costante che dipende dalla costante di erosione superficiale ( $k_{eros}$ ), dalla concentrazione iniziale di fattore di crescita inglobato nella matrice ( $C_0$ ) e il raggio delle microsferi ( $R$ ) al tempo 0:

$$K = k_{eros}/C_0R \quad (3)$$

Nella figura 4.16 (a) è riportata la correlazione tra i dati sperimentali relativi al rilascio del TGF- $\beta$  e il modello matematico dato dall'equazione (2); un andamento del tutto sovrapponibile è stato ottenuto anche nel caso del PDGF.

L'erosione del polimero è dovuta all'azione del carbonato di sodio. Per questa ragione, i valori di  $K$  sono stato messi in relazione con la concentrazione di  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ed è stato osservato un andamento lineare come appare evidente in figura 4.16 (b).



**Fig. 4.16** a) Comparazione tra il modello matematico dato dall'equazione (2) e i dati sperimentali relativi al rilascio del TFG- $\beta$  a diverse concentrazioni di  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ; b) Correlazione lineare tra  $K$  e la concentrazione di  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  per entrambi i fattori di crescita.

Questi risultati indicano quindi che il rilascio del fattore di crescita è principalmente

guidato dal processo di erosione della matrice polimerica. La presenza di  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  alcalinizza l'ambiente e in queste condizioni avviene l'idrolisi dei legami esterei dello HYAFF 11<sup>®</sup>, con liberazione dei gruppi carbossilici e conseguente progressivo aumento della solubilità della matrice.

#### **4.4 Sperimentazione su modello animale**

Al fine di determinare eventuali applicazioni topiche delle microparticelle caricate con PDGF, è stata effettuata una sperimentazione in vivo su ratti adulti del peso di 250-350 g.

##### **4.4.1 Effetti del trattamento in vivo**

Come riportato nella sezione Materiali e Metodi, le ferite sono state divise in tre gruppi a seconda del tipo di trattamento a cui sono state sottoposte:

- A) trattamento con microparticelle impregnate di PDGF disperse in gel inerte (PEM)
- B) trattamento con microparticelle tal quali disperse in gel inerte (M)
- C) trattamento con il solo gel inerte (I)

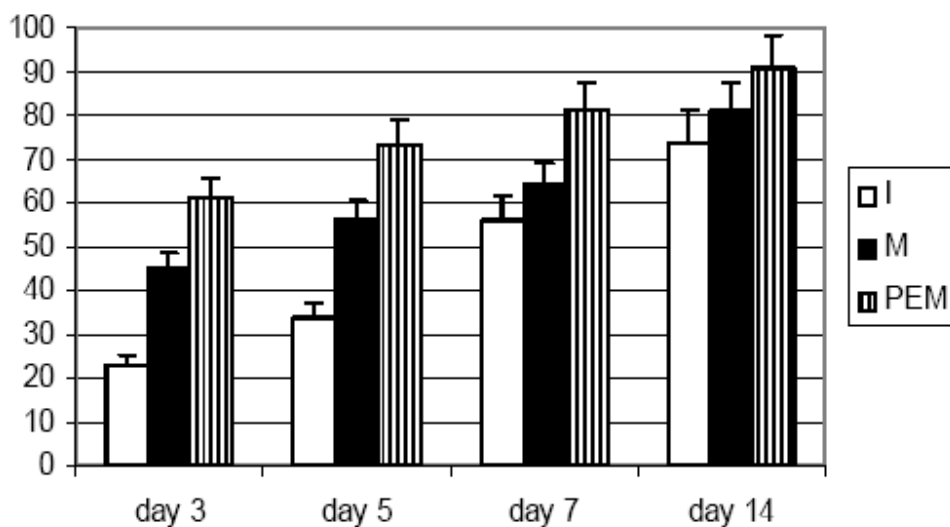
Le ferite sono state medicate bisettimanalmente con una dose di  $7 \text{ mg/cm}^2$  della relativa preparazione e analizzate a distanza di 3, 5, 7, 14 giorni per valutare la percentuale di neopitelizzazione.

Il trattamento con le microparticelle impregnate di PDGF ha mostrato una cinetica di riepitelizzazione molto più favorevole rispetto agli altri due tipi di trattamento.

Come appare evidente in figura 4.17, a 3 giorni si osserva una notevole differenza nell'effetto dei tre differenti preparati. Col passare del tempo tale differenza via via diminuisce, ma rimane comunque evidente e a 21 giorni tutte le ulcere risultano chiuse. Questo si può spiegare ricordando che il meccanismo di guarigione delle ferite nel ratto è di per sé molto rapido ed efficiente. Tuttavia il trattamento con le particelle impregnate di PDGF ha dimostrato di rendere più veloce il processo di

riepitelizzazione, evento auspicabile al fine di ridurre l'instaurarsi di complicanze di ulcere croniche come quelle del piede diabetico. Le infezioni, ad esempio, sono tra le cause principali di aggravamenti e complicazioni di tali patologie e la possibilità di rendere più rapido il processo di chiusura della ferita minimizza le probabilità che essa venga infettata.

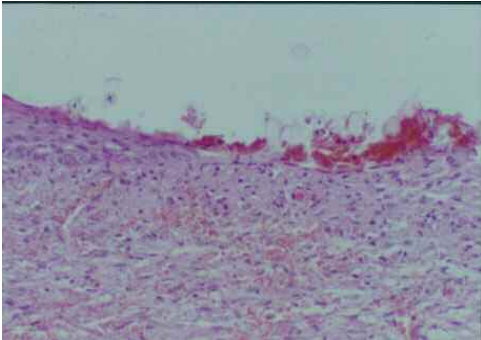
% di guarigione



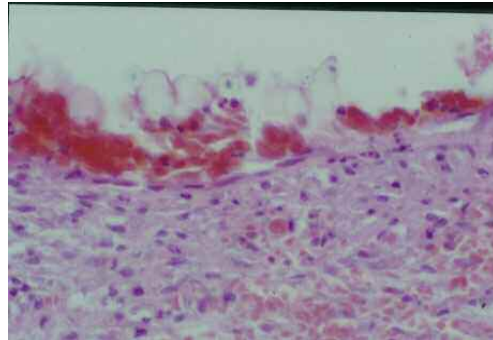
**Fig. 4.17** Modello di epitelizzazione delle ferite trattate con gel inerte (I), microparticelle senza fattore di crescita disperse in veicolo inerte (M) e microparticelle impregnate di PDGF disperse in veicolo inerte (PEM). La percentuale di guarigione riflette la percentuale di neoepitelizzazione degli spazi interstiziali. Le barre rappresentano il valore medio  $\pm$  deviazione standard.

Di seguito vengono riportate delle immagini di ferite a 7 giorni di trattamento con gel inerte (I) (figura 4.18), con microparticelle disperse in gel inerte (M) (figura 4.19) o con microparticelle impregnate di PDGF disperse in gel inerte (PEM) (figura 4.20). Come si può osservare, nel terzo caso, l'avanzamento dell'epitelio è decisamente più accentuato.

**a)**

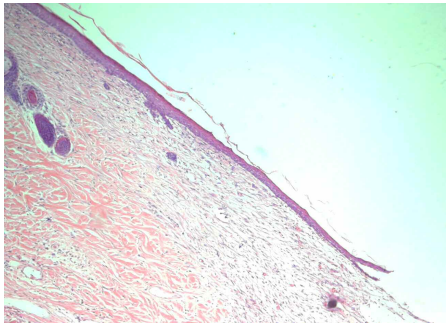


**b)**

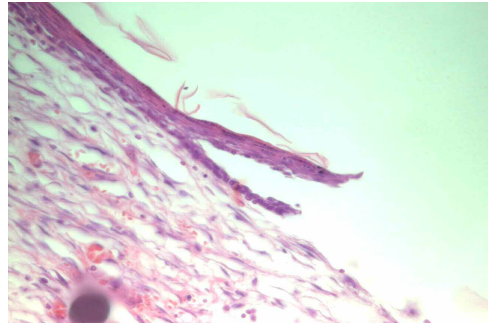


**Fig. 4.18** *Ferita trattata con gel inerte (I) a 7 giorni: a) ingrandimento 10x , b) ingrandimento 40x.*

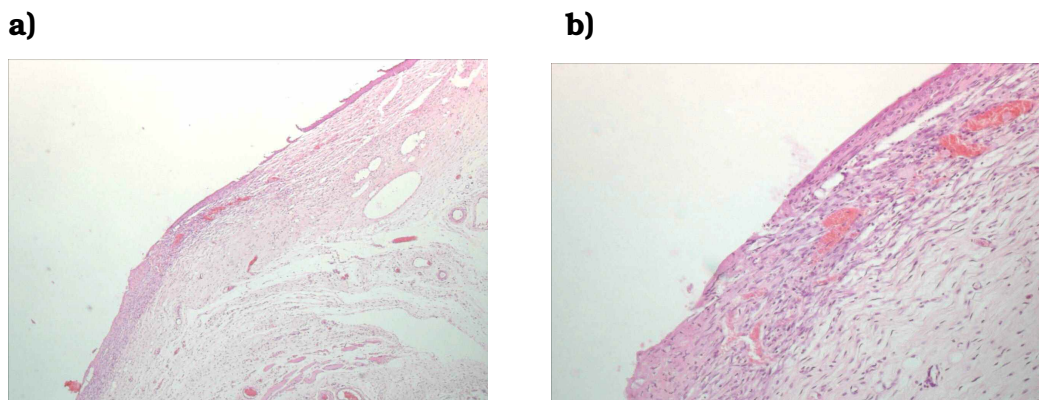
**a)**



**b)**



**Fig. 4.19** *Ferita trattata con microparticelle disperse in gel inerte (M) a 7 giorni: a) ingrandimento 5x , b) ingrandimento 20x.*



**Fig. 4.20** *Ferita trattata con micro particelle impregnate di PDGF disperse in gel inerte (PEM) a 7 giorni: a) ingrandimento 5x , b) ingrandimento 20x.*

#### **4.4.2 Risposta cellulare al trattamento**

La risposta cellulare al trattamento delle ferite può essere schematizzata come riportato di seguito nella tabella 3.

Come si può notare, al giorno 3, il trattamento con il solo gel inerte ha mostrato una scarsa infiltrazione di cellule dell'infiammazione, contrariamente ai trattamenti M e PEM hanno dato comportato anche la comparsa di fibroblasti. In nessuna ferita è risultato presente collagene di tipo I e solo nelle ferite trattate con PEM erano presenti alcune cellule endoteliali.

Ai giorni 5 e 7, nelle ferite trattate con il gel inerte è stato notato un aumento delle cellule dell'infiammazione, tuttavia gli altri due tipi di trattamento hanno mostrato un incremento molto maggiore di tali tipi di cellule. Inoltre nei casi trattati con M e PEM è stato osservato un gran numero di cellule endoteliali e fibroblasti. Fibre di collagene I erano presenti in maniera omogenea nel tessuto trattato con PEM.

Al giorno 14, le ulcere trattate con PEM e M hanno mostrato un ulteriore incremento dei fibroblasti e delle fibre di collagene di tipo I.

Al giorno 21, tutte le ferite erano chiuse.

**Tabella 3.** Risposta cellulare al trattamento.

La scala adottata per definire la quantità di cellule rilevate va da “non presenti” (-) a “abbondantemente presenti” (+++).

<b>Giorni</b>		<b>Cellule dell'infiammazione</b>	<b>Fibroblasti</b>	<b>Cellule endoteliali</b>	<b>Collagene tipo I</b>
<b>3</b>	<b>I</b>	-	+	-	-
	<b>M</b>	+	++	-	-
	<b>PEM</b>	+	++	+	-
<b>5</b>	<b>I</b>	++	+	+	+
	<b>M</b>	++	++	++	+
	<b>PEM</b>	++	+++	++	++
<b>7</b>	<b>I</b>	++	++	+	+
	<b>M</b>	++	++	++	++
	<b>PEM</b>	++	+++	+++	+++
<b>14</b>	<b>I</b>	++	++	++	++
	<b>M</b>	++	+++	+++	+++
	<b>PEM</b>	++	+++	+++	+++

## 5. DISCUSSIONE

In questi ultimi anni l'industria farmaceutica oltre ad occuparsi dello sviluppo di nuovi principi attivi si è concentrata anche sulla messa appunto di innovative tecnologie farmaceutiche. Il fine è quello di produrre delle formulazioni in grado di consentire un rilascio controllato, mirato e prolungato nel tempo del farmaco con il grande vantaggio di poter diminuire la frequenza di somministrazione, evitare i fenomeni di sotto- o sovraddosaggio e minimizzare gli effetti collaterali indesiderati. Uno dei risultati ottenuti in tale ambito è rappresentato dall'uso innovativo di particolari polimeri quali mezzi di trasporto, rilascio e direzionamento di molecole biologicamente attive. Questi polimeri sono in grado di consentire un aumento del tempo di permanenza del farmaco, di ridurre l'antigenicità, di aumentarne la stabilità e la biodisponibilità.

Tra le varie tecniche deputate alla realizzazione di simili preparati, vi è la possibilità di intrappolare il farmaco in una matrice polimerica biodegradabile. In questo caso, il principio attivo viene poi rilasciato grazie a processi di diffusione, degradazione e/o erosione della matrice stessa.

I polimeri più largamente utilizzati nel rilascio controllato dei farmaci sono i polifosfazeni, i polimeri dell'acido lattico e dell'acido glicolico, i poli- $\epsilon$ -coprolattoni, le polianidridi, i polialchilacrilati, i poliacrilati e i derivati dell'acido ialuronico (HA). Nella presente tesi è stato utilizzato l'estere benzilico dell'acido ialuronico, materiale HYAFF11<sup>®</sup> (Fidia Advanced Biopolymers, Abano Terme, Italia). Negli ultimi anni nei laboratori FAB (Fidia Advanced Biopolymers, Abano Terme, Italia), l'HA è stato utilizzato per la preparazione di polimeri semisintetici, insolubili in acqua, mediante esterificazione dei gruppi carbossilici dell'acido glucuronico con alcoli alifatici o aromatici. Il processo viene effettuato con l'aggiunta graduale dell'agente esterificante al sale d'ammonio quaternario dell'HA ed i polimeri che si ottengono prendono il nome di HYAFF. Uno degli agenti esterificanti maggiormente utilizzati è l'alcol benzilico e il biopolimero che ne deriva viene chiamato HYAFF 11<sup>®</sup>.

I derivati esterificati mantengono le stesse proprietà biologiche dell'HA ma, rispetto a

questo, presentano un tempo di permanenza prolungato dopo l'applicazione in vivo e possono venire, inoltre, processati mediante varie tecniche di tessitura producendo diversi tipi di manufatti quali garze, spugne, microsfele, granuli, membrane, feltri di tessuto non-tessuto (non-woven, NW), con caratteristiche differenti, idonee ad una vasta gamma di applicazioni biomediche. Studi approfonditi hanno dimostrato che tali materiali risultano essere assolutamente biocompatibili e si è verificato che i derivati esterificati dell'HA vanno incontro ad un'idrolisi spontanea del legame estereo in ambiente acquoso, influenzata sia dal pH che dal contenuto ionico. È stato provato inoltre, che la biodegradabilità varia a seconda del tipo di estere e del grado di esterificazione dei gruppi carbossilici della molecola originaria.

Nel presente studio il materiale HYAFF11<sup>®</sup> è stato utilizzato per la produzione di microparticelle mediante una tecnica innovativa basata sull'uso di fluidi supercritici.

Molti autori hanno ottenuto microparticelle a base di HYAFF11<sup>®</sup> per il rilascio di farmaci sfruttando tecniche di estrazione che prevedono l'uso di solventi organici (Esposito et al., 2005).

Tali metodiche, però, non sono molto flessibili e adeguabili alle particolari esigenze applicative e il prodotto finale è spesso contaminato da indesiderati residui di solvente.

In questo caso, è stata quindi adottata la tecnica GAS (gas antisolvent), utilizzando come fluido supercritico la CO<sub>2</sub>.

La scelta della CO<sub>2</sub> come fluido supercritico con la funzione di antisolvente risulta particolarmente vantaggiosa, in quanto i valori della sua temperatura critica e della sua pressione critica (31.06 °C e 73.8 bar) sono relativamente blandi e quindi facilmente accessibili. Inoltre è economica, non è tossica, non è infiammabile e presenta un impatto ambientale minimo.

Nella prima fase di sperimentazione si sono variate le condizioni di produzione al fine di definire quelle migliori per la produzione delle microparticelle.

Nel processo di precipitazione GAS, la soluzione organica del polimero (HYAFF11<sup>®</sup> in DMSO) viene nebulizzata nella camera di precipitazione dove viene contemporaneamente introdotta CO<sub>2</sub> in condizioni supercritiche. Grazie alla sua



completa miscibilità con il solvente organico utilizzato, la CO<sub>2</sub> diffonde nelle goccioline della soluzione organica contenente il polimero e provoca una riduzione della concentrazione del solvente stesso. La CO<sub>2</sub> agisce dunque da antisolvente e la sua efficienza dipende dalla pressione mantenuta all'interno della camera di precipitazione. Lo scopo principale da raggiungere è stato l'ottenimento di particelle più piccole possibile e di consistenza spugnosa, al fine di avere a disposizione un'elevata superficie specifica.

Utilizzando alte concentrazioni di polimero (1% w/w), un elevato diametro dell'ugello (250 µm) e/o una ridotta velocità di flusso della CO<sub>2</sub>, la soluzione non ha dato origine a microparticelle bensì ad ammassi spugnosi grossolani o altri prodotti con una superficie pressoché liscia. Al contrario, è stato ottenuto un materiale con le caratteristiche auspicabili mediante una soluzione meno concentrata, un diametro dell'ugello inferiore, un elevato flusso di iniezione dell'antisolvente e un'alta densità dell'ambiente in cui avviene la nebulizzazione. Quest'ultimo aspetto è particolarmente importante ed è legato alla densità della CO<sub>2</sub> nella camera di precipitazione.

La morfologia delle particelle è stata analizzata mediante microscopia a scansione (SEM) e le loro dimensioni sono state valutate sfruttando la tecnica del light scattering.

I risultati migliori sono stati ottenuti con una soluzione polimerica allo 0,3% (w/w), un diametro dell'ugello di iniezione pari a 100 µm, una pressione di 200 bar e una velocità di flusso della CO<sub>2</sub> di 5,6 mL/min. In queste condizioni sono state, infatti, ottenute particelle spugnose con dimensioni inferiori a 1 µm e la distribuzione modale delle loro dimensioni è risultata essere bimodale, con netta prevalenza di particelle considerate "piccole", ossia con un diametro medio compreso tra 180 e 320 µm.

Una volta ottenute le microparticelle con le caratteristiche desiderate, si è passati a studiarne le capacità di assorbimento al fine di poterle caricare col fattore di crescita desiderato.

Una strategia sperimentale, precedentemente usata per creare microparticelle caricate con insulina (Elvassore et al., 2001), applicabile per ottenere microparticelle

impregnate di fattore di crescita è la coprecipitazione del fattore di crescita e del polimero mediante la tecnica GAS partendo da un'unica soluzione. Le particelle così ottenute possiedono una corretta morfologia, ma in fattore di crescita è scarsamente presente al loro interno e risulta inattivo, probabilmente perché le condizioni operative portano alla sua denaturazione.

Per questa ragione, è stata sviluppata una procedura alternativa per portare il fattore di crescita all'interno della matrice polimerica. Si tratta di un processo di assorbimento del fattore di crescita nelle microparticelle, dopo la loro produzione, sfruttando l'acqua come veicolo di trasporto della proteina all'interno della struttura polimerica. L'elevata affinità dello HYAFF11<sup>®</sup> per l'acqua è stata confermata mediante DSC. A questo punto è stata verificata la capacità di assorbimento da parte del polimero di una molecola fluorescente (fluoresceina) da una soluzione acquosa della stessa. È stato osservato che sia sottoforma di film (dello spessore di 50 µm), sia sottoforma di microparticelle, lo HYAFF11<sup>®</sup> è in grado di assorbire completamente il colorante dopo 72 ore di contatto. L'avvenuto assorbimento negli strati più profondi del film è stato messo in rilievo tramite l'analisi di una serie di criosezioni dello spessore di 7 µm l'una. Si è potuto osservare che, dopo 5 minuti di contatto, solo la superficie risulta impregnata, dopo 60 minuti lo strato di colorante diventa più spesso, dopo 24 ore il colorante è visibile fin nello strato più profondo e, dopo 72 ore di contatto, viene raggiunta l'omogeneità in tutto lo spessore. La fluoresceina, fatta assorbire alle microparticelle di HYAFF 11<sup>®</sup>, ha mostrato una distribuzione del tutto omogenea. Le prove di assorbimento sono state poi effettuate con i fattori di crescita PDGF e TGF-β e, anche in questo caso, le particelle hanno dimostrato un assorbimento omogeneo. Ciò è stato dimostrato dalla comparsa, in seguito a reazione immunoistochimica indiretta, di un'uniforme colorazione rossastra visibile al microscopio.

Successivamente si è passati ad analizzare il profilo di rilascio dei fattori di crescita in vitro, al fine di avere importanti informazioni sull'efficienza del sistema di rilascio ottenuto. La quantificazione del fattore di crescita rilasciato è stata fatta mediante test ELISA. Le microparticelle impregnate di fattore di crescita (PDGF e TGFβ alla

concentrazione di 0,5 µg/mL) sono state incubate in tampone fosfato e trascorsi gli intervalli di tempo prefissati, tale soluzione è stata analizzata allo scopo di determinare la quantità di PDGF e TGF-β rilasciata. Lo scarso rilascio dei fattori di crescita in condizioni fisiologiche può essere dovuto alla loro elevata affinità per il polimero, quindi si è rivelato necessario ricorrere a delle condizioni sperimentali in grado di favorirne la degradazione della matrice. Inizialmente si è pensato di usare una soluzione di ialuronidasi a due diverse concentrazioni (0,5 e 5%), ma il profilo di rilascio è risultato analogo a quello rilevato in presenza della sola soluzione fisiologica. Questo perché la presenza dei gruppi benzilici rende inaccessibile all'enzima il legame β-1,4 glicosidico.

Si è fatto quindi ricorso al carbonato di sodio, a diverse concentrazioni (0,1; 0,5; 1; 5%), come suggerito in letteratura (Milella et al., 2002). In presenza di Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, lo HYAFF 11<sup>®</sup> va incontro ad idrolisi basica e la matrice polimerica diventa via via più solubile. La costante di degradazione dipende linearmente dalla concentrazione di carbonato di sodio. Quindi il rilascio del fattore di crescita dipende dalla velocità di degradazione del polimero, come dimostrato mediante modelli matematici.

Questi risultati dimostrano che il rilascio dei fattori di crescita dalle microparticelle di HYAFF<sup>®</sup> prodotte mediante la tecnica GAS è guidato principalmente da fenomeni di erosione superficiale. Altri fenomeni di trasporto, come il processo di diffusione all'interno della matrice e nella soluzione acquosa, sono praticamente assenti.

Alla luce di tutto ciò, sono quindi stati allestiti degli esperimenti su modello animale al fine di indagare l'effetto in vivo delle microparticelle impregnate di PDGF, molecola notoriamente coinvolta nella formazione del tessuto di granulazione, in grado di stimolare la deposizione di collagene e promuovere la riepitelizzazione. La chiusura di una ferita richiede sia la proliferazione che la migrazione dei cheratinociti. In questo caso, le ferite trattate con le microparticelle impregnate di PDGF rendevano più favorevole la cinetica di riepitelizzazione. Pertanto questo tipo di trattamento può risultare utile nel favorire la chiusura di ferite e potrà essere preso in considerazione in futuro nella cura di ferite croniche di difficile guarigione come le ulcere del piede diabetico.

## **Bibliografia**

Abatangelo G, Barbucci R, Brun P, Lamponi S. Biocompatibility and enzymatic degradation studies on sulphated hyaluronic acid derivatives. *Biomaterials*, 1997; 18: 14114-1415.

Allcock HR, Functional polyphosphazenes, in *Functional Polymers: Modern Synthetic Methods and Novel Structures* (A.O. Patil, D.N. Schulz B.N. Novak, eds.), 1998, Vol. 704, Ch. 18, pp. 261-275, ACS Symposium Series, Washington.

Anderson JM and Shive MS, Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres, *Adv. Drug Del. Rev.*, 1997, 28: 5–24.

Andreassi L, Casini L, Trabucchi E, Diamantini S, Rastrelli A, Donati L, Tenchini ML, Malcovati M. Human Keratinocytes cultured on membranes composed of benzyl ester of hyaluronic acid suitable for grafting, 1991, *Wounds*, 3: 116-125.

Arifin DY, Lee LY, Wang CH. Mathematical modeling and simulation of drug release from microspheres: Implications to drug delivery systems, *Advanced Drug Delivery Reviews* 2006, 58: 1274-1325.

Avitabile T, Marano F, Castiglione F, Bucolo C, Cro M, Ambrosio L, Ferrauto C, Reibaldi A. Biocompatibility and biodegradation of intravitreal hyaluronan implants in rabbits. *Biomaterials*, 2001, 22(3):195-200.

Benedetti L, Cortivo R, Berti A, Pea F, Mazzi M, Moras M, Abatangelo G. Biocompatibility and biodegradation of different hyaluronan derivatives (HYAFF) implanted in rats, *Biomaterials*, 1993, 14:1154-1160.

Benedetti L. New Biomaterials from hyaluronic acid, *Med Dev Technol*, 1994, 11: 32-37.

Brun P, Abatangelo G, Radice M, Zacchi V, Guidolin D, Daga Gordini D, Cortivo R.. Chondrocyte aggregation and reorganization into three-dimensional scaffolds. *J Biomed Mater Res*, 1999, 46(3): 337-46.

Caliceti P, Elvassore N and Bertuccio A. Production of insulin loaded PEG/PLA nano-particles by gas anti-solvent techniques, *J. Pharm. Sci.*, 2001, 90: 1628–1636.

Caliceti P, Salmaso S, Elvassore N, Bertuccio A. Effective protein release from PEG/PLA nano-particles produced by gas anti-solvent techniques, *J. Control. Release*, 2004, 94: 195–205.

Caliceti P, Salmaso S, Lante A, Yoshida M, Katakai R, Martellini F, Mei LHI and Carenza M. Controlled release of biomolecules from temperature-sensitive hydrogels obtained by radiation polymerisation. *J. Control Release*, 2001, 75: 173–181.

Chasin M, Langer R. (eds.), 1990, *Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems, Drugs and the Pharmaceutical Sciences, Volume 45*, Marcel Dekker, Inc., New York.

Chen WJ, Abatangelo G. Functions of hyaluronan in wound repair. *Wound Repair Regen*, 1999, 7(2): 79-89. Review.

Capoccia D, Doherty P, Radice M, Brun P, Abatangelo G, Williams DF. Semisynthetic resorbable materials from hyaluronan esterification. *Biomaterials*, 1998, 19:2101-2127.

Cortivo R, Brun P, Rastrelli A, Abatangelo G. In vitro studies of biocompatibility of hyaluronic acid esters, *Biomaterials*, 1991, 12: 727-736.

De Jawger R, Gleria M. Poly(organophosphazene)s and related compounds: synthesis, properties and applications, *Progr. Polym. Sci.* 1998, 23: 179-276.

Domb AJ, Amselem S, Langer R, Maniar M. Polyanhydrides as carriers of Drugs, in *Biomedical Polymers, Designed-to-Degrade Systems (S:W: Shslaby, ed.)*, 1994, pp. 69-96, Hanser Publ., Munich.

Dumitru S. (ed.). *Polymeric Biomaterials*, 1994, Marcel Dekker, Inc., New York.

Elvassore N, Bertucco A, Caliceti P. Production of insulin-loaded poly(ethylene glycol)/poly(l-lactide) (PEG/PLA) nanoparticles by gas antisolvent techniques, *Journal of pharmaceutical sciences*, 2001, 90: 1628-1636.

Engelberg I, Kohn J. Physico-mechanical properties of degradable polymers used in medical applications: a comparative study, *Biomaterials*, 1991, 12: 292-304.

Esposito E, Menegatti E, Cortesi R. Hyaluronan-based microspheres as tools for drug delivery: a comparative study, *Int J Pharm*, 2005, 288(1): 35-49.

Galassi G, Brun P, Radice M, Cortivo R, Zanon GF, Genovese P, Abatangelo G. In vitro reconstructed dermis implanted in human wounds: degradation studies of the HA-based supporting scaffold, *Biomaterials*, 2000, 21: 2183-2191.

Gentzkow GD, Iwasaki SD, Hershon KS, Mengel M, Prendergast JJ, Ricotta JJ, Steed DP, Lipkin S. Use of Dermagraft, a cultured human dermis, to treat diabetic foot ulcers, *Diabetes Care*, 1996, 19: 350-354.

Gopferich A. Biodegradable polymers: Polyamides, *Encyclopedia of Controlled Drug Delivery* (E. Mathiowitz, ed.), 1999, Vol. 1, pp. 60-71, John Wiley & Sons, New York.

Grey IE, Lowe G, Bale S, Harding KG. The use of cultured dermis in the treatment of diabetic foot ulcers, 1998, *J Wound Care* 7: 324-325.

Guiot P., Couvrier P. (eds.). *Polymeric Nanoparticles and Microspheres*, CRC Press, 1986, Inc, Boca Raton.

Harris PA, Di Francesco F, Barisoni D, Leigh IM, Navsaria HA. Use of hyaluronic acid and cultured autologous keratinocytes and fibroblasts in extensive burns, *Lancet*, 1999, 353: 35-36.

Hoekstra D. Hyaluronan-modified surfaces for medical devices, *Med. Dev. Diagn. Ind.* 1999, 48-52.

Knighton DR, Ciresi KF, Fiegel VD, Austin LL, Butler EL. Classification and treatment of chronic nonhealing wounds. Successful treatment with autologous platelet-derived wound healing factors (PDWHF). *Ann Surg.*, 1986, 204(3):322-30.

Laurent TC, Fraser JRE. The properties and turnover of Hyaluronan. *Ciba Foundation Symposium: Function of the Proteoglycans* 1986; 9-29.

Lavery LA, Vela SA, Lavery DC, Quebedeaux TL. Reducing dynamic foot pressures in high-risk diabetic patients with foot ulcerations: a comparison of treatments. *Diabetes Care*, 1996, 19: 818-821.

Leach JB, Schmidt CE. Characterization of protein release from photocrosslinkable hyaluronic acid-polyethylene glycol hydrogel tissue engineering scaffolds. *Biomaterials*, 2005, 26(2):125-35.

Lepidi S, Abatangelo G, Vindigni V, Deriu GP, Zavan B, Tonello C, Cortivo R. In vivo regeneration of small-diameter (2 mm) arteries using a polymer scaffold. *FASEB J.*, 2006, Jan;20(1):103-5.

Milella E, Brescia E, Massaro C, Ramires PA, Miglietta MR, Fiori V, Aversa P. Physico-chemical properties and degradability of non-woven hyaluronan benzil esters as tissue engineering scaffolds, *Biomaterials*, 2002, 23: 1053-1063.

Mustoe TA, Culter NR, Allman RM, Goode PS, Deuel TF, Prause JA, Bear M, Serdar CM and Pierce GF. A phase II study to evaluate recombinant platelet-derived growth factor-BB in the treatment of stage 3 and 4 pressure ulcers. *Arch. Surg.*, 1994, 129: 213-219.

Panyam EJ and Labhasetwar V. Biodegradable nano-particles for drug and gene delivery to cells and tissue, *Adv. Drug Del. Rev.*, 2003, 55: 329–347.

Park K, Shalaby WSW, Park H (eds.). *Biodegradable Hydrogels for Drug Delivery*, Technomic Publishing Co., 1993, Inc., Lancaster.

Partsch G, Schwarzer CH, Neumiüller J, Dunky A, Petera P, Brbl H, Ittner G, Jantsch S. Modulation of the migration and chemotaxis of PMN cells by hyaluronic acid, *Zeitschrift für Rheumatologie*, 1989, 48: 123-128.

Pavesio A, Abatangelo G, Borrione A, Brocchetta D, Hollander AP, Kon E, Torasso F, Zanasi S, Marcacci M. Hyaluronan-based scaffolds (Hyalograft C) in the treatment of knee cartilage defects: preliminary clinical findings. *Novartis Found Symp.*, 2003, 249:203-17; discussion 229-33, 234-8, 239-41. Review.

Pitt C. Poly- $\epsilon$ -caprolactone and its copolymers. *Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems* (M. Chasin, R. Langer, eds.), 1990, pp. 71-120, Marcel Dekker, New York.

Radice M, Brun P, Cortivo R, Scapinelli R, Battaliard C, Abatangelo G. Hyaluronan-based biopolymers as delivery vehicles for bone-marrow-derived mesenchymal progenitors. *J Biomed Mater Res*, 2000, 50(2):101-9.

Rastelli A, Beccaro M, Biviano F, Calderini G, Pastorello A. Hyaluronic acid esters, a new class of semisynthetic biopolymers: chemical and physico-chemical properties, *Clinical Implant Materials-Advances in Biomaterials*, 1990. Vol. 9 (g. Heimke, U. Soltész, A.J.C. Lee, eds.), pp. 199-206, Elsevier, Amsterdam.

Robson MC, Phillips LG, Thomason A, Altrock BW, Pence PC, Heggors JP, Johnston AF, McHugh TP, Antohony MS, Robson LE, Odom LL, Yanagihara D and Pierce GF. Recombinant human platelet-derived growth factor-BB for the treatment of chronic pressure ulcers, *Ann. Plast. Surg.*, 1992, 29: 193-201.

Singer AJ, Clark RAF. Cutaneous wound healing. *The New England J Med*, 1999, 341(10): 738-46.

Stadelmann WK, Digenis AG, Tobin GR. Physiology and Healg Dynamics of Cronic Cutaneous Wounds, *The American J Surg*, 1998, 176(2A Suppl): 26S-38S, Review.

Steed DL. Clinical evaluation of recombinant human platelet- derived growth factor for the treatment of lower extremity diabetic ulcus. *J. Vasc. Surg.*, 1995, 21: 71-78.

Steed DL, Donohoe D, Webster MW, Lindsley L. Effect of extensive debridement and treatment on the healing of diabetic foot ulcers, *J Am Coll Surg.*, 1996, 183: 61-64.

Thies J and Müller BW. Size controlled production of biodegradable microparticles with supercritical gases, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 1998, 45: 67-74.

Tonello C, Vindigni V, Zavan B, Abatangelo S, Abatangelo G, Brun P, Cortivo R. In vitro reconstruction of an endothelialized skin substitute provided with a microcapillary network using biopolymer scaffolds. *FASEB J.*, 2005, 19(11):1546-8.

Von Recum HA, Cleek RL, Eskin SG, Mikos AG. Degradation of polydispersed poly(L-lactic acid) to modulate lactic acid release. *Biomaterials*, 1995, 16(6):441-7.

Wieman TJ, Smiell JM, Su Y. Efficacy and safety of a topical gel formulation of recombinant human platelet-derived growth factor-BB (becclapermin) in patients with chronic neuropathic diabetic ulcers: a phase III randomized placebo controlled double-blind study. *Diabetes Care*, 1998, 21: 822-827.