



**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**



DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

**“IL CHITOSANO COME BIOMATERIALE APPLICATO
ALL'INGEGNERIA TISSUTALE”**

Relatore: Prof. Andrea Bagno

Laureanda: Margherita Memo

ANNO ACCADEMICO 2023 –2024

Data di laurea 19/07/2024

Indice

Abstract	pagina 5
Capitolo 1: Il chitosano	pagina 7
1.1 Fonti e estrazione	pagina 7
1.2 Microstruttura e Proprietà	pagina 8
1.3 Applicazioni	pagina 10
1.3.1 Applicazioni biomediche	pagina 11
Capitolo 2: Applicazioni del chitosano all'ingegneria tissutale	pagina 13
2.1 Cartilagine	pagina 13
2.2 Dischi intervertebrali	pagina 15
2.3 Cornea	pagina 18
2.4 Vasi sanguigni	pagina 19
2.5 Cute	pagina 20
Capitolo 3: Applicazioni al tessuto osseo	pagina 23
3.1 Stampa 3D	pagina 24
3.2 Nanofibre	pagina 29
Capitolo 4: Applicazioni al parodonto	pagina 33
4.1 Strutture a strati	pagina 34
4.2 Rilascio di farmaci e fattori di crescita	pagina 34
Conclusioni	pagina 37
Bibliografia	pagina 38

Abstract

In diverse situazioni cliniche risulta necessario ripristinare o migliorare la funzionalità di tessuti biologici che l'abbiano perduta in seguito a patologie o traumi. Gli approcci tradizionali solitamente sono il trapianto da donatore o l'impianto di protesi artificiali, che però presentano alcune criticità, rispettivamente la possibilità di rigetto e problemi di biocompatibilità e funzionalità, tendenza all'usura e/o cedimento. L'ingegneria tissutale è un ambito di studio interdisciplinare che integrando l'ingegneria con le scienze biologiche si propone di superare queste criticità.

Generalmente, un tessuto ingegnerizzato viene sviluppato a partire da uno scaffold, che ha lo scopo di simulare la matrice extracellulare, sul quale vengono seminate le cellule del paziente, che rigenerano il tessuto grazie anche all'utilizzo di specifici segnali molecolari e bioreattori. Lo scaffold può essere ricavato dal tessuto decellularizzato, oppure essere costituito da una matrice tridimensionale ingegnerizzata a partire da biomateriali adatti allo scopo. Uno dei biomateriali usati a questo fine è il chitosano, un biopolimero ricavato dalla chitina. Esso si presta all'utilizzo in ingegneria tissutale, nonché in numerose altre applicazioni non solo biomediche, grazie alla sua biocompatibilità, biodegradabilità, attività antimicrobica e possibilità di subire modifiche chimiche e fisiche fino ad ottenere le proprietà e la conformazione adatte alla specifica applicazione.

Questo elaborato descrive le applicazioni del chitosano nell'ingegneria tissutale e ne approfondisce alcune, dopo aver illustrato le fonti e l'estrazione di questo biopolimero, nonché la sua struttura e le sue proprietà.

Capitolo 1. Il chitosano

Il chitosano è un biopolimero che ha trovato numerosi impieghi come biomateriale grazie alle sue proprietà favorevoli: nel rilascio di farmaci e geni, nell'ingegneria tissutale, come fattore emostatico, nella rimarginazione di ferite, come agente antimicrobico e altri ancora. Inoltre è utilizzato in ambiti non biomedicali, tra cui l'industria alimentare e quella cosmetica [1].

1.1 Fonti e estrazione

Il chitosano è derivato dalla chitina, uno dei polisaccaridi più diffusi in natura, che è contenuto, ad esempio, nei gusci di crostacei e tartarughe, nonché nell'esoscheletro degli insetti [2]. Il fatto che la biomassa necessaria alla produzione del chitosano possa essere ricavata da scarti alimentari - quali gli esoscheletri dei crostacei - acquisisce importanza alla luce del fatto che l'accumulo di tali scarti rappresenta un problema in quanto la loro biodegradazione è relativamente lenta [1].

Il chitosano viene ricavato dalla chitina per deacetilazione, tramite metodi chimici o biologici. Ad esempio, per ricavare il chitosano dai gusci di crostacei si effettua il seguente processo: i gusci vengono lavati, asciugati e macinati; successivamente vengono sottoposti ad alcuni trattamenti chimici: una soluzione alcalina consente di rimuovere le proteine, mentre una acida - ad esempio una soluzione diluita di acido cloridrico - consente di demineralizzare il materiale. A seguito di ciascuno di questi trattamenti, la frazione di materiale di interesse viene separata dagli scarti per centrifugazione, e viene lavata con acqua fino a presentare un pH neutro. A questo punto viene isolato un polimero di colore rosato, la chitina. Questa viene decolorata usando un agente ossidante, come il permanganato di potassio o l'acqua ossigenata. Dopo essere stata lavata con acido ossalico, essa viene denominata "chitina purificata".

Successivamente la chitina purificata viene convertita in chitosano sottoponendola a deacetilazione per mezzo di una soluzione alcalina concentrata, a cui la chitina è sottoposta per diverse ore. Il chitosano viene quindi separato tramite centrifugazione, lavato con acqua distillata e asciugato. Il chitosano ottenuto può essere sottoposto ad ulteriori eventuali processi di purificazione a seconda della destinazione d'uso.

Il chitosano può presentarsi in forma di scaglie bianche o giallastre, che possono essere convertite in piccole sfere o ridotte in polvere [2].

Si sono studiate fonti alternative per l'estrazione del chitosano, tra cui la parete delle cellule fungine. I vantaggi di questa soluzione, rispetto all'estrazione da crostacei, includono l'eliminazione della stagionalità nella disponibilità della biomassa, il fatto che il chitosano prodotto presenta alcune proprietà favorevoli ad alcune applicazioni biomedicali - in particolare basso peso molecolare e alto grado di deacetilazione -, e la semplificazione del processo di

estrazione, tra cui l'eliminazione del passaggio di demineralizzazione, che consente di utilizzare quantità inferiori di reagenti aggressivi [3].

Un altro approccio che consente di ridurre l'utilizzo di composti chimici aggressivi, che risultano dannosi per l'ambiente, è quello di utilizzare dei trattamenti biologici, piuttosto che chimici, per estrarre la chitina e il chitosano. Ad esempio, per la demineralizzazione è possibile utilizzare dei batteri che producono acido lattico; per la rimozione delle proteine si possono usare delle proteasi provenienti da batteri; e per la deacetilazione è possibile utilizzare dei metodi enzimatici basati sulla chitinasi. Nonostante i metodi biologici siano meno dannosi per l'ambiente, quelli chimici risultano la soluzione prevalente, in quanto presentano un tempo di lavorazione inferiore [4].

1.2 Microstruttura e proprietà

La chitina è un polimero lineare formato da saccaridi acetilati, in particolare N-acetil-D-glucosammina, legati tra loro da un legame glicosidico di tipo β . La chitina viene considerata come la ripetizione di un disaccaride per via della disposizione spaziale del gruppo N-acetile. Sono state osservate tre diverse strutture cristalline nella chitina: l' α -chitina, la β -chitina e la γ -chitina. Tipicamente, le fibre di chitina si dispongono in maniera parallela in tutte queste strutture, ma queste ultime differiscono tra loro per l'orientazione delle fibre (Figura 1.1) [5].

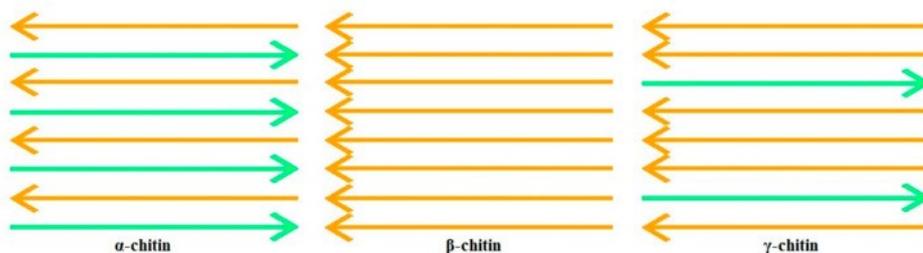


Figura 1.1: La disposizione delle fibre nelle tre forme di chitina [7]

Le chitine di tipo α e γ sono stabilizzate da legami a idrogeno in due direzioni: sia all'interno dello stesso strato che tra strati diversi, mentre la β -chitina presenta solo legami idrogeno intra-strato. [5]

La chitina viene convertita in chitosano tramite la rimozione del gruppo acetile, in modo che permanga solo il gruppo amminico. Il chitosano così ottenuto è un copolimero lineare, composto da monomeri di N-acetil-D-glucosammina e D-glucosammina, uniti da legami di tipo β -(1 \rightarrow 4).

La struttura del chitosano risulta simile a quella della cellulosa, con l'unica differenza della presenza del gruppo amminico in luogo di un gruppo ossidrilico (Figura 1.2) [6].

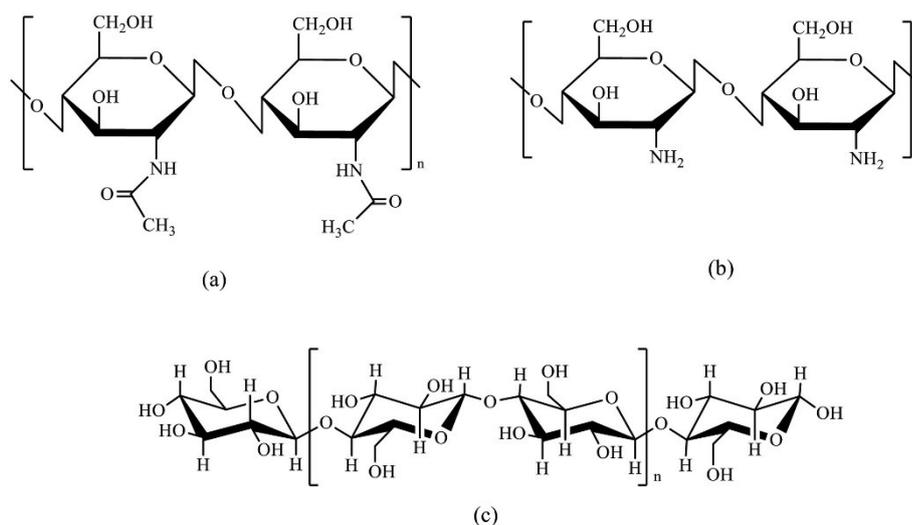


Figura 1.2: La struttura della chitina (a), del chitosano (b) e della cellulosa (c)

Il chitosano, in seguito alla deacetilazione, presenta un'alta concentrazione di gruppi amminici reattivi, che fungono da siti attivi in numerose reazioni, in modo da favorire, ad esempio, la biocompatibilità, il targeting e la solubilità. In particolare il chitosano è solubile nella maggior parte delle soluzioni acide diluite; ciò rappresenta un vantaggio rispetto alla chitina, in quanto non è necessario sciogliere il chitosano in solventi tossici: è sufficiente una soluzione debolmente acida.

Il grado di deacetilazione del chitosano, che dipende dalla fonte della chitina e dai metodi di lavorazione, è compreso tra il 56% e il 90%; tuttavia si usa parlare di chitosano solo quando il grado di deacetilazione è superiore al 70%. Il grado di deacetilazione ha importanti conseguenze sulle proprietà fisiche e chimiche del materiale, oltre che sulla biodegradazione e sull'attività immunologica. Diverse proteasi - in particolare il lisozima - oltre che alcune chitinasi, sono in grado di operare la biodegradazione del chitosano. Gli oligosaccaridi risultanti possono essere escreti oppure entrare nelle vie metaboliche. La velocità di degradazione di questo polisaccaride è influenzata da vari fattori, in particolare la sua massa molecolare, la distribuzione della N-acetil-D-glucosammina e soprattutto il grado di deacetilazione.

Il chitosano presenta numerosi effetti biologici notevoli, tra cui: antimicrobico, antibatterico, antimicotico, antitumorale, emostatico, analgesico, ipocolesterolemico, accelerazione dei tempi di guarigione.

Sono state sviluppate numerose variazioni del chitosano - ottenute tramite modifiche fisiche o chimiche, oltre che attraverso la combinazione con altri polimeri o materiali inorganici - al fine di ottenere un materiale che esibisca delle attività biologiche adatte ad applicazioni specifiche, nonché per superare i due principali difetti del chitosano:

- presenta una spiccata variabilità nel grado di deacetilazione e massa molecolare
- la solubilità in acqua è confinata ad un range di pH limitato ($\text{pH} < 6.1$) [7].

Altre caratteristiche potenzialmente problematiche del chitosano, anch'esse da gestire attraverso opportune modifiche, sono la viscosità relativamente elevata, la quantità limitata di farmaci che può trasportare e le scarse caratteristiche elastiche [8]. In particolare si è osservato che la viscosità di una soluzione di chitosano aumenta all'aumentare della concentrazione e del grado di deacetilazione, mentre diminuisce all'aumentare della temperatura. Si è inoltre determinato che il comportamento reologico del chitosano è pseudoplastico [1].

La presenza di legami a idrogeno nella struttura del chitosano lo rendono rigido, e facilmente lavorabile ad ottenere dei film caratterizzati da elevata resistenza meccanica.

Essendo il chitosano l'unico polisaccaride naturalmente carico positivamente, può formare complessi con polimeri sintetici carichi negativamente, nonché ricoprire superfici negativamente cariche, ad esempio grassi, colesterolo e proteine [2].

1.3 Applicazioni

Il chitosano è considerato un polimero multifunzionale grazie alla sua versatilità, biocompatibilità e al costo contenuto. Di seguito sono riportate alcune delle applicazioni per le quali questo biopolimero è stato utilizzato.

Nell'industria alimentare è stato usato come integratore in grado di controllare l'obesità grazie alla capacità di formare legami con i lipidi e quindi indurre l'organismo ad eliminarli; come pellicola per imballaggi in grado di prolungare la conservazione dei cibi; come conservante naturale in grado di prevenire la riduzione delle proprietà nutritive di frutta e verdura e di combattere la proliferazione micotica in alcuni cibi.

Nell'industria cosmetica è stato utilizzato per la produzione di creme, prodotti per unghie, come fattore protettivo e fortemente idratante per la cute e le labbra, e come elemento attivo nei deodoranti grazie alla tendenza a sfavorire la proliferazione di batteri.

In ambito tessile viene utilizzato per ricoprire altre fibre polisaccaridiche al fine di ottenere un effetto antistatico o repellente, e al fine di rendere il cotone antimicrobico. Inoltre è stato usato nell'industria cartaria per rinforzare la carta riciclata o fabbricare prodotti ecosostenibili. La carta ottenuta dal chitosano risulta essere liscia e resistente all'umidità.

Inoltre ha trovato diversi utilizzi in agricoltura, nella protezione ambientale, nella purificazione delle acque reflue, nella rimozione di ioni di metalli pesanti per chelazione, e fissazione dell'anidride carbonica [1].

In seguito vengono invece presentate le applicazioni biomediche del chitosano.

1.3.1 Applicazioni biomediche

Sono state studiate numerose applicazioni biomediche del chitosano, sia inteso come principio attivo sia come biomateriale. Ad esempio, in ambito neurologico, esistono studi che suggeriscono che gli oligosaccaridi di chitosano che presentino grado di deacetilazione del 90% e un basso peso molecolare - nonché altre forme di chitosano - potrebbero essere utilizzati nella terapia del morbo di Alzheimer [9]. Inoltre, una soluzione di oligosaccaridi di chitosano ha inibito la formazione di tessuto cicatriziale e promosso la rigenerazione degli assoni e il recupero delle funzioni sensoriali e motorie nel modello murino con lesione del nervo sciatico. Si è inoltre osservato che l'ingestione di oligosaccaride, in quantità superiori a 220 mg per chilogrammo al giorno, permetta di recuperare memoria e capacità di apprendimento nei ratti. Alcuni studi hanno combinato il chitosano con altre molecole riuscendo a rigenerare nervi danneggiati [9]. In aggiunta il chitosano è stato usato come biomateriale applicato alla terapia neurale, come fattore di crescita per alcune cellule nervose, come rivestimento di nanoparticelle che trasportano un anticorpo usato come farmaco per la malattia di Alzheimer, in grado di migliorare la stabilità e dispersività in acqua delle particelle [9].

In ambito cardiovascolare l'ingestione di chitosano e del corrispondente oligosaccaride è in grado di ridurre i livelli di colesterolo sierico in modelli murini. Inoltre il chitosano è stato usato per trasportare la doxorubicina, in modo da migliorare l'efficacia di quest'ultima contro i tumori ematologici [9].

Al contrario della chitina, gli oligosaccaridi di chitosano presentano dei potenziali effetti benefici su alcune malattie respiratorie, in quanto sono in grado di ridurre o prevenire l'infiammazione dei polmoni, lo stress ossidativo e l'apoptosi.

Studi su umani, ratti e felini hanno evidenziato come il chitosano e il relativo oligosaccaride hanno effetti terapeutici su diverse patologie renali [9].

Il chitosano aumenta l'efficacia e riduce il rischio di effetti collaterali letali di un farmaco antidiabetico, la metformina. Inoltre gli oligosaccaridi di chitosano vengono utilizzati nei sistemi di rilascio di farmaci nell'ambito della terapia contro il diabete, ad esempio: microincapsulazione dell'insulina, stabilizzazione delle nanoparticelle di selenio, incapsulazione del resveratrolo, rivestimento di sistemi di nanotubi di biossido di titanio per la metformina [9].

Il chitosano e il corrispondente oligosaccaride presentano un effetto anti-infiammatorio.

Essi inoltre hanno dimostrato un effetto antitumorale in diversi tipi di cancro: tumore ovarico, tumore al seno, cancro cervicale, carcinoma del colon-retto associato a colite, carcinoma a cellule squamose orale cellule di melanoma umano, alcune cellule di cancro ai polmoni. Il chitosano è stato inoltre utilizzato nei sistemi di rilascio di farmaci antitumorali [9]. Infatti è un

vettore eccezionale per questo genere di medicinali, in quanto è facilmente solubile in soluzioni acide diluite e può essere degradato dal lisozima e da alcuni enzimi presenti nel colon, oltre ad avere una buona attività inibitoria nei confronti della crescita delle cellule tumorali, dell'angiogenesi tumorale e dello sviluppo di metastasi. Quando applicato all'incapsulazione e targeting di alcuni farmaci antineoplastici, il chitosano permette di aumentare il periodo di ritenzione farmacologica, di diminuire la frequenza di somministrazione e la tossicità sistemica [7].

Il chitosano oligosaccaridico è stato utilizzato come agente antiossidante, in grado di rallentare il processo di invecchiamento.

Il chitosano e il relativo oligosaccaride, in combinazione con altri materiali, risultano biomateriali promettenti per favorire la rimarginazione di una ferita, sia sotto forma di idrogel che sotto forma di nanoparticelle per il trasporto di farmaci specifici [9].

Come è possibile notare dagli esempi soprariportati, sono state sviluppate numerose applicazioni in cui il chitosano è usato come biomateriale per il rilascio controllato di farmaci, eventualmente in combinazione con altri materiali, in quanto il suo utilizzo permette di migliorare l'efficacia del farmaco e di ridurre gli effetti collaterali. Ad esempio questo biopolimero può veicolare farmaci a bassa solubilità, migliorandone le proprietà di dissoluzione e la biodisponibilità [7].

Non sono state finora trattate le applicazioni del chitosano nell'ingegneria tissutale, in quanto esse costituiscono il nucleo di questo elaborato e saranno esaminate nei capitoli successivi.

Capitolo 2. Applicazioni del chitosano all'ingegneria tissutale

Nell'ambito dell'ingegneria tissutale spesso si utilizzano materiali bioattivi, cioè in grado di indurre una reazione vantaggiosa nell'organismo. Tuttavia molti di questi materiali - che possono essere formati da metalli, materiali ceramici o polimeri - presentano alcune criticità: fragilità, rigidità e difficoltà a produrre oggetti dalla forma complessa. Pertanto risulta necessario sviluppare materiali che presentino proprietà fisiche, meccaniche e biologiche selezionate appositamente per la specifica applicazione, e che possano degradarsi in maniera programmabile. Il chitosano risulta promettente in tale ambito in quanto - oltre ad essere biocompatibile e biodegradabile - può essere plasmato in diverse strutture e combinato con un'ampia gamma di materiali bioattivi. Ad esempio, nel tentativo di migliorare la resistenza meccanica e l'integrità strutturale dei biomateriali basati sul chitosano, vi sono stati addizionati altri biopolimeri - tra cui la chitina, la seta, l'alginato, il policaprolattone, l'acido polilattico e l'acido ialuronico - nonché nanoceramiche tra cui l'idrossiapatite, la silice, il biossido di titanio e la zirconia [2].

Altre caratteristiche del chitosano che lo rendono adatto a essere utilizzato nella fabbricazione di scaffold per l'ingegneria tissutale sono la somiglianza strutturale con i glicosamminoglicani, che rappresentano una delle principali componenti della matrice extracellulare, nonché la possibilità di formare strutture con pori interconnessi, permettendo la semina di un maggior numero di cellule e favorendo la migrazione di queste ultime all'interno dello scaffold [6].

I tessuti e organi in cui il chitosano è stato maggiormente utilizzato come biomateriale per l'ingegneria tissutale sono i seguenti: cartilagine, tessuto osseo, dischi intervertebrali, vasi sanguigni, cornea, cute e parodonto [2].

Nel seguito vengono trattate alcune delle applicazioni del chitosano nell'ingegneria tissutale, mentre altre verranno approfondite nei capitoli successivi.

2.1 Cartilagine

L'ingegneria tissutale della cartilagine si basa su tre componenti principali: cellule, fattori di crescita e biomateriali. Le cellule scelte a questo scopo sono spesso condrociti o cellule staminali mesenchimali. Una struttura costituita di biomateriali - denominata 'scaffold' - ha il compito di dare supporto alle cellule e di fornire loro un ambiente adeguato alla proliferazione. In particolare, lo scaffold di un tessuto cartilagineo deve presentare alcune caratteristiche: deve facilitare la differenziazione delle cellule in condrociti, avere una struttura tridimensionale che sia simile a quella della cartilagine nativa, e presentare pori che abbiano dimensione adeguata. Questa deve essere abbastanza ridotta da fornire un'area complessiva sufficientemente ampia per l'ancoraggio cellulare, ma tale da permettere la migrazione cellulare. Inoltre è necessario

che lo scaffold presenti proprietà meccaniche coerenti con quelle della cartilagine nativa e una velocità di degradazione tale da non ostacolare la rigenerazione del tessuto.

Tra i biomateriali che sono stati utilizzati per produrre gli scaffold – polimeri naturali, polimeri sintetici e bioceramiche – i polimeri naturali offrono il vantaggio di presentare analogie con i componenti della matrice extracellulare, oltre a non risultare tossici e non provocare reazioni avverse (infiammatorie o immunitarie). Tra questi, il chitosano rappresenta un candidato promettente per la produzione di scaffold spugnosi. In questo ambito risulta particolarmente rilevante la proprietà antimicrobica di questo biopolimero, accentuata dalla protonazione dei gruppi amminici, in quanto l'intervento chirurgico associato a questo genere di terapia pone un rischio di infezioni batteriche ricorrenti che possono causare perdita di cartilagine articolare e indurre una disabilità cronica [10].

Una criticità degli scaffold porosi in chitosano è data dalla ridotta rigidità meccanica degli stessi, fatto che in alcune applicazioni ha dimostrato di nuocere alla proliferazione cellulare. Per modulare le proprietà meccaniche del chitosano, in particolare per aumentarne il modulo di Young, è possibile sottoporlo ad una reazione di cross-linking. Tra i vari composti chimici che possono essere impiegati a questo scopo, risulta notevole la genipina, in quanto non presenta effetti citotossici (Figura 2.1) [11].

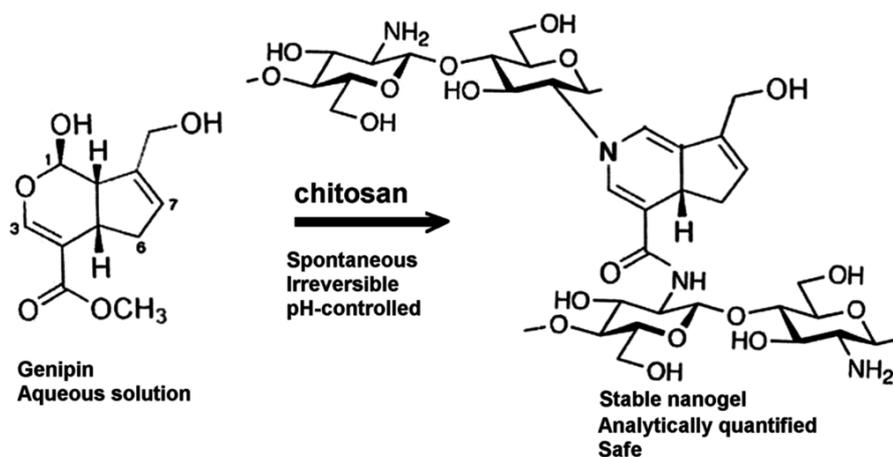


Figura 2.1: La reazione di cross-linking del chitosano tramite genipina

Uno scaffold che ha mostrato buone caratteristiche meccaniche è quello sviluppato da Zhi-Sen Shen et al. [12], ottenuto da una combinazione di chitosano e gelatina tramite il metodo di precipitazione in situ. In particolare, l'idrogel con rapporto di massa tra chitosano e gelatina di 4:4 presenta uno sforzo a rottura per compressione di 2.15 MPa e un modulo di Young di 3.25 MPa, oltre a una porosità del $68.5 \pm 2.8\%$, risulta citocompatibile e mostra una degradazione enzimatica in vitro del 65.9% in 70 giorni. Gli scaffold sono stati in grado di supportare adesione e proliferazione di cellule cartilaginee tiroidee umane.

In aggiunta alla produzione di scaffold tridimensionali, il chitosano è stato usato, nell'ambito del tessuto cartilagineo, anche come lubrificante per proteggere la cartilagine articolare dagli effetti dell'attrito, e sotto forma di idrogel opportunamente modificato come microambiente per la proliferazione di cellule staminali mesenchimali.

La massa molecolare è un parametro che influenza significativamente l'efficacia del chitosano come biomateriale per l'ingegneria del tessuto cartilagineo; in particolare si è osservato che il chitosano a medio peso molecolare (190-500 kDa) favorisce la proliferazione e differenziazione dei condrociti più efficacemente del chitosano a basso e alto peso molecolare [10].

Allo stato attuale, gli scaffold e gli idrogel basati sul chitosano offrono una prospettiva promettente nell'ambito dell'ingegnerizzazione della cartilagine articolare, come è dimostrato dalla loro efficacia nei modelli animali. Tuttavia è necessario svolgere ulteriori approfondimenti per determinare se la cartilagine ialina generata in seguito alla terapia possa riempire totalmente la sede della lesione cartilaginea, e se il tessuto neoformato presenti le stesse proprietà meccaniche e biologiche di quello nativo [13].

2.2 Dischi intervertebrali

Lo standard di riferimento per il trattamento della degenerazione dei dischi intervertebrali consiste nella rimozione del disco e la fusione delle due vertebre adiacenti. Tuttavia questo intervento spesso determina un'ulteriore degenerazione a causa dell'alterazione dei movimenti dei segmenti della colonna vertebrale.

Inoltre la rigenerazione spontanea del tessuto è complicata a causa della sua natura avascolare. La soluzione a questo problema potrebbe essere lo sviluppo di idrogel rinforzati da fibre che possano supportare la rigenerazione del disco [14].

Uno studio [14] ha sviluppato idrogel compositi contenenti chitosano e nanofibre di cellulosa, con lo scopo di ristabilire la biomeccanica dei dischi intervertebrali, oltre che di favorirne la riparazione e la rigenerazione. Le nanofibre di cellulosa forniscono un sostegno meccanico simile a quello che le fibrille di collagene apportano ai dischi nativi. Le loro notevoli prestazioni meccaniche sono dovute all'alto grado di cristallinità e all'adeguato rapporto tra lunghezza e spessore. Esse inoltre sono biocompatibili e presenti in abbondanza nella biomassa.

È stata investigata l'influenza di parametri quali la concentrazione di chitosano e di nanofibre di cellulosa sulle proprietà meccaniche dell'idrogel ottenuto, in particolare tramite prove di trazione, portando alla conclusione che tra quelle sperimentate, la composizione dalle proprietà migliori presenta il 3% di chitosano e lo 0.4% di nanofibre.

Tale biomateriale è stato sottoposto ad uno studio ex vivo in cui è stato impiantato nell'anello fibroso – la porzione esterna del disco intervertebrale – estratto da un modello suino, al fine di

ristabilire il comportamento biomeccanico del disco lesionato e al contempo supportare la rigenerazione del disco e contenere la protrusione del nucleo polposo.

Per valutare il potenziale beneficio meccanico dell'impianto dell'idrogel, sono state tracciate le curve tensione-deformazione di un disco sano, uno danneggiato e uno danneggiato e sottoposto all'impianto dell'idrogel (Figura 2.2).

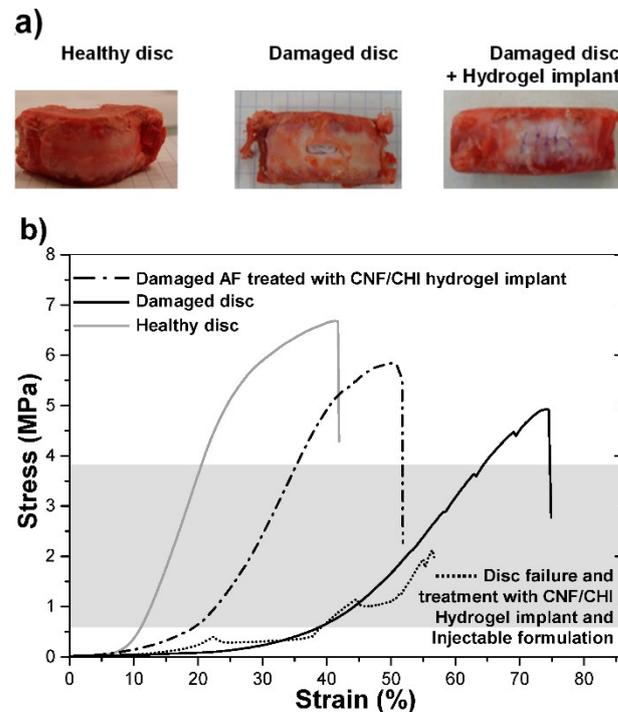


Figura 2.2: a) da sinistra a destra sono mostrati il disco sano, il disco danneggiato e il disco danneggiato sottoposto a impianto dell'idrogel. b) La curva tensione-deformazione in grigio è quella corrispondente al disco sano, quella tratteggiata al disco con impianto di idrogel e quella nera al disco danneggiato. L'ombreggiatura grigia indica l'intervallo di carico fisiologico.

Tutte le curve presentano una 'zona neutra' iniziale in cui i dischi raggiungono deformazioni relativamente elevate nonostante la tensione applicata sia ridotta. In seguito, i dischi raggiungono il 'campo elastico', che corrisponde all'intervallo di carico fisiologico. Si evidenzia il beneficio generato dall'impianto del biomateriale, in quanto il comportamento elastico del disco trattato risulta più affine a quello sano rispetto a quanto lo sia quello danneggiato. In particolare, la pendenza della curva relativa al disco con impianto nella zona elastica si avvicina a quella del disco sano. Inoltre, il disco sano presenta una tensione a rottura per compressione di 6.7 MPa, quello trattato di 5.9 MPa e quello danneggiato di 5.0 MPa, dimostrando ulteriormente il miglioramento delle proprietà meccaniche grazie alla presenza dell'idrogel.

Inoltre, è stato osservato tramite ulteriori verifiche che un tale biomateriale può fungere da contenimento contro la protrusione del nucleo polposo e che fornisce un ambiente

tridimensionale potenzialmente adatto alla proliferazione cellulare. In conclusione il biomateriale sviluppato presenta caratteristiche promettenti per l'ingegneria tissutale del disco intervertebrale.

Un altro studio [15] ha sviluppato un idrogel iniettabile che potrebbe essere utilizzato nell'ingegneria tissutale dei dischi intervertebrali e come vettore di cellule. In particolare l'idrogel è a base di chitosano, β -glicerofosfato, acido ialuronico, condroitina-6-solfato, collagene di tipo 2, gelatina e fibroina della seta. Il tempo di gelificazione e altre proprietà reologiche, la citotossicità in vitro e la morfologia del biomateriale ottenuto sono state valutate tramite apposite analisi. L'iniettabilità dell'idrogel – particolarmente significativa in quanto elimina la necessità di un intervento più invasivo – è dovuta al fatto che esso si presenta sotto forma di liquido a temperatura ambiente, ma alla temperatura di 37°C subisce una transizione di fase, della durata di circa 30 minuti, in cui viene convertito in gel.

Altre caratteristiche che rendono questo idrogel un candidato promettente per l'applicazione nell'ingegneria tissutale sono l'assenza di citotossicità, l'elevata porosità e una certa analogia con la matrice extracellulare dei dischi intervertebrali.

Un prototipo di scaffold per ingegneria tissutale del disco intervertebrale che ha superato la sperimentazione in vivo su modello porcino è quello sviluppato da Fei Yang et al. [16]. Lo scaffold proposto è un idrogel di chitosano che simula il nucleo polposo dei dischi nativi, circondato da uno strato di fibre di poli(butilene succinato-co-tereftalato) a sostituire l'anello fibroso interno, mentre un anello di polietere etere chetone funge da anello fibroso esterno.

I test in vitro hanno evidenziato che la parte centrale del disco è caratterizzata da una struttura porosa altamente interconnessa e che le cellule del disco intervertebrale sono in grado di distribuirsi efficacemente e proliferare sullo scaffold, se vi vengono seminate.

Alcuni scaffold arricchiti di cellule sono stati impiantati nella colonna vertebrale porcina danneggiata e prelevati dopo 4 e 8 settimane. Immagini radiografiche e di risonanza magnetica hanno dimostrato che i dischi ingegnerizzati presentavano un'altezza compatibile con quella dei dischi biologici, e mantenevano un'ampia matrice extracellulare e il contenuto acquoso del nucleo polposo. Si è concluso che un disco ingegnerizzato secondo questa tecnica presenta caratteristiche morfologiche e istologiche simili a quelle del disco nativo. Inoltre, dopo essere stato impiantato per 8 settimane, il disco ingegnerizzato ha mostrato proprietà meccaniche a compressione comparabili a quelle del disco nativo. Considerati i risultati positivi in questi test su modello animale, gli autori ritengono che lo scaffold da loro sviluppato sia un buon candidato per la rigenerazione dei dischi intervertebrali umani.

2.3 Cornea

Si stima che su scala globale, la proporzione tra il numero di cornee disponibili al trapianto e quello di pazienti che ne hanno necessità sia di 1:70 [17]. Pertanto, molti sforzi sono stati compiuti al fine di sviluppare una cornea ingegnerizzata. In particolare, i biomateriali basati sui polisaccaridi sono stati ampiamente esplorati in virtù della loro somiglianza con i glicosamminoglicani – abbondanti nella matrice extracellulare della cornea – nonché della loro biocompatibilità, disponibilità e modulabilità delle loro proprietà. In particolare, sono state studiate molte soluzioni che includono il chitosano. Ad esempio, degli idrogel composti di chitosano e collagene, stabilizzati tramite cross-linking con diverse sostanze, hanno mostrato migliori proprietà meccaniche, facilità di sutura, e trasparenza ottica rispetto agli scaffold non ibridi. Inoltre, tali idrogel sono risultati compatibili con le cellule della cornea, e in un modello suino di lesione corneale un biomateriale di questo tipo ha favorito la rigenerazione dell'epitelio, dello stroma e dei nervi [18].

Sono state sviluppate anche delle pellicole ultrasottili di chitosano e glicole polietilenico che mostrano proprietà meccaniche modulabili e trasparenza ottica superiore a quella della cornea nativa. Per quanto gli scaffold così ottenuti, essi hanno dimostrato di fornire un ambiente adatto per l'adesione e proliferazione in vitro di cellule dell'epitelio corneale, ma il processo con cui sono stati prodotti presenta delle criticità: non permette di controllare la microarchitettura dello scaffold e non consente di ottenere una struttura porosa, necessaria per consentire scambi di gas e nutrienti [18].

Il chitosano è stato poi utilizzato come vettore per trasportare cellule dell'epitelio al fine di favorire la rigenerazione dello stesso. In particolare è stato riscontrato che una membrana di chitosano puro permetteva una proliferazione migliore e un ancoraggio più veloce di cellule bovine dell'epitelio corneale rispetto alla membrana amniotica, che è stata impiegata in passato per tale scopo. Inoltre, si è rilevato che la modifica superficiale di un substrato di chitosano lo rende capace di favorire lo sviluppo di uno strato di cellule epiteliali corneali umane. Per migliorare il controllo sulla biodegradazione del materiale è possibile aggiungere al chitosano il policaprolattone, un polimero sintetico a degradazione lenta. Sulla membrana ibrida così ottenuta sono state coltivate delle cellule epiteliali bovine, che hanno mostrato buona proliferazione e hanno formato un monostrato continuo [19]. In aggiunta, uno studio [20] riporta che l'inclusione di nanoparticelle di chitosano all'interno di una membrana di chitosano e policaprolattone ne migliora la biocompatibilità e le caratteristiche superficiali, mantenendo la trasparenza della membrana e la possibilità delle cellule epiteliali umane di proliferarvi. Oltre a ciò, viene evidenziato come la trasparenza della membrana diminuisca all'aumentare della concentrazione di policaprolattone.

È stato sviluppato uno stroma ingegnerizzato composto di chitosano e fibroina di seta [18]. Un test in vitro ha dimostrato che su tale scaffold possono proliferare delle cellule di epitelio corneale di coniglio. Lo stroma ingegnerizzato è stato impiantato in una lesione corneale in un coniglio, senza mostrare effetti citotossici nelle successive 12 settimane. Tuttavia, prima di poter usare questo materiale per produrre degli impianti corneali, è necessario standardizzare la produzione dei suoi componenti per ridurre la variabilità del prodotto finale.

In aggiunta, il chitosano è stato utilizzato nella produzione di uno strato di idrogel che consente di nutrire e mantenere le proprietà terapeutiche delle cellule pluripotenti indotte. Un tale strato ha favorito la riparazione della cornea.

Sono stati inoltre sviluppati altri prodotti – generalmente idrogel – composti interamente o parzialmente di chitosano, da utilizzare per trattare ferite corneali e come vettore per cellule staminali limbari. Queste soluzioni hanno dimostrato di favorire la rimarginazione di ferite dell'epitelio in modelli animali, tuttavia risulta necessario determinare il grado di cross-linking a cui sottoporre i polimeri. Infatti, se questo fosse eccessivo, si andrebbe a intaccare la proliferazione cellulare e l'iniettabilità dell'idrogel, mentre se fosse insufficiente l'impianto non presenterebbe la durabilità richiesta [18].

2.4 Vasi sanguigni

Le patologie cardiovascolari rappresentano una delle principali cause di decesso a livello globale. Tra queste, una delle più frequenti è l'ostruzione delle arterie coronariche a causa dell'accumulo di placca aterosclerotica. Un intervento chirurgico di vitale importanza in questo ambito è il cosiddetto 'bypass': un vaso sanguigno, ricavato da altre regioni dell'organismo, viene innestato in sostituzione del tratto stenotico per fornire un percorso alternativo al sangue. In seguito alla scarsità di vasi biologici disponibili, alcuni studi hanno sviluppato dei potenziali scaffold per l'ingegneria tissutale dei vasi sanguigni. Uno di questi [21] ha sviluppato una struttura tubulare a due strati, composta di chitosano e gelatina. Lo strato interno presenta una struttura macroporosa, mentre quello esterno non presenta porosità. Lo scaffold ottenuto è stato valutato dal punto di vista morfologico, fisico-chimico, meccanico e nell'interazione con fibroblasti e enzimi di degradazione. I risultati ottenuti mostrano una tensione a rottura di 95.81 ± 11 kPa, un allungamento a rottura di $112.5 \pm 13\%$ e un modulo di Young di 85.16 ± 17 kPa; porosità dell'82% con pori di dimensioni comprese tra 100 e 230 μm , e biodegradazione in vitro del 50% dopo 16 giorni.

La porosità dello strato interno è fondamentale per consentire i fenomeni di trasporto dei nutrienti e per massimizzare l'area su cui possono proliferare le cellule. Ciò è confermato dal fatto che i fibroblasti umani sono stati in grado di proliferare sullo scaffold.

Le proprietà meccaniche dello scaffold sono favorite da un trattamento con glicerolo nonché dalla presenza dello strato esterno non poroso, che aumenta l'elasticità e la flessibilità complessiva, oltre a rappresentare uno strato protettivo per le cellule. Tuttavia, mancando il network di collagene caratteristico dei vasi nativi, la tensione a rottura e il modulo di Young non sono sufficientemente elevati da poter sostituire un vaso di dimensioni medio-grandi. Le proprietà meccaniche sono sufficienti per sostenere la coltura cellulare, e ciò suggerisce la possibilità di far sviluppare le cellule del paziente sullo scaffold in vitro, fintantoché queste non abbiano generato una rete di collagene tale da poter sostenere le sollecitazioni meccaniche tipiche dell'applicazione in vivo.

La biodegradazione progressiva dello strato macroporoso ha consentito un'ulteriore proliferazione dei fibroblasti.

Grazie alle evidenze appena riportate, lo scaffold sviluppato rappresenta un candidato per l'ingegneria tissutale dei vasi sanguigni.

Un altro studio [22] ha sviluppato un condotto a base di acido poli-L-lattico (PLLA), chitosano e collagene, tramite la tecnica dell'elettrofilatura (electrospinning). Sono state utilizzate varie concentrazioni di chitosano al fine di determinare quella che presentasse caratteristiche migliori. In particolare, i risultati migliori sono stati raggiunti dallo scaffold ottenuto a partire da una soluzione di PLLA al 10%, una di chitosano allo 0.5% e una di collagene all'1%, la cui tensione a rottura per trazione ha raggiunto i 2.13 MPa e la pressione di scoppio i 2593 mmHg. Questi dati sono compresi nell'intervallo dei valori caratteristici dei vasi nativi; inoltre, lo scaffold ottenuto è citocompatibile e presenta una percentuale di emolisi molto ridotta. L'aggiunta di chitosano al PLLA migliora l'adesione cellulare, in quanto riduce l'idrofobicità tipica del PLLA.

2.5 Cute

L'ingegneria tissutale della cute si pone lo scopo di accelerare la guarigione di ferite di origine meccanica o metabolica e di trattare le lesioni da ustione, in particolare di ridurre il rischio di infezione, rigenerare il tessuto e minimizzare il rischio di formazione di tessuto cicatriziale [23, 24].

Gli scaffold possono essere realizzati in materiali naturali o sintetici, oppure utilizzando una combinazione di entrambi [23].

Il chitosano è il polisaccaride più frequentemente utilizzato nell'ingegnerizzazione della cute. Alcune proprietà lo rendono particolarmente adatto allo scopo, tra cui l'attivazione delle piastrine, che accelera la coagulazione, la stimolazione della proliferazione dei fibroblasti, dell'angiogenesi e l'attivazione dei macrofagi. Inoltre il chitosano promuove la sintesi e

deposizione, nel sito della ferita, di collagene e acido ialuronico, importanti componenti della matrice extracellulare. Ciò accelera ulteriormente la rimarginazione della ferita e riduce la formazione di tessuto cicatriziale.

Il chitosano è stato utilizzato in diverse formulazioni, tra cui: scaffold nanofibrosi, pellicole antimicrobiche, spugne tridimensionali, idrogeli eventualmente arricchiti con cheratinociti e fibroblasti [23].

Le fibre in chitosano sono ricavate tramite la tecnica dell'elettrofilatura, nota anche come electrospinning, che verrà esposta nel paragrafo 3.2. L'ottenimento di fibre naturali tramite elettrofilatura presenta maggiori difficoltà rispetto a quanto avviene per le fibre sintetiche, in quanto si osserva: scarsa solubilità nella maggior parte dei solventi organici, alto peso molecolare, natura policationica in soluzione, e un network tridimensionale di legami idrogeno. Queste complicazioni, nel caso del chitosano, sono state superate sottoponendolo a un trattamento alcalino e successiva dissoluzione in acido acetico [25].

È stato ad esempio sviluppato uno scaffold [26] per la rigenerazione della cute in chitosano e alcol polivinilico, sottoposti a cross-linking tramite gliossale, rinforzato con nanotubi in un minerale denominato halloysite. L'incorporazione dei nanotubi migliora la resistenza meccanica fino a 3.5 volte, oltre ad aumentare la biocompatibilità e l'idrofilicità dei materiali e di conseguenza favorendo l'ancoraggio dei fibroblasti.

Un altro materiale [27] che è stato sviluppato per l'utilizzo nell'ambito della rimarginazione di ferite, è composto da nanofibre in alcol polivinilico e chitosano, con nanoparticelle di carbossimetilchitosano che incapsulano un peptide antibatterico noto come OH-CATH30. Test in vitro e in vivo hanno dimostrato che tale materiale esibisce proprietà antibatteriche e promuove la rimarginazione di ferite.

Un'ulteriore strategia per facilitare l'elettrofilatura del chitosano consiste nel combinarlo con altri polimeri che risultano più adatti alla tecnica dell'electrospinning, tra cui l'alcol polivinilico, l'acido polilattico e l'ossido di polietilene [28].

Uno studio [29] ha sviluppato uno scaffold in chitosano e ossido di polietilene, arricchito con aloe vera, ottenuto con una tecnica di elettrofilatura particolare, denominata dagli autori "Spirograph Based Mechanical System", in cui il collettore si muove secondo una geometria indicata come "Spirograph", che coincide con il luogo dei punti noto come rulletta. Questa tecnica è stata impiegata al fine di ottenere un materiale il più uniforme possibile, e il suo utilizzo è risultato in una minor degradazione meccanica, maggior idrofilicità e rimarginazione più rapida della ferita in un test in vivo, rispetto ad uno scaffold in chitosano e ossido di polietilene ottenuto con un collettore statico.

Un ulteriore studio [30] ha ottenuto nanofibre in chitosano e ossido di polietilene arricchite con bromelina, una miscela di enzimi proteolitici efficace nella pulizia delle ferite da ustione. Sono state preparate nanofibre contenenti il 2% (massa/volume) di bromelina e altre contenenti il 4%. Le prime hanno mostrato migliori caratteristiche fisico-chimiche, minor citotossicità e un profilo di rilascio più favorevole rispetto alle seconde. Un test in vivo ha dimostrato che le nanofibre contenenti il 2% di bromelina presentano una spiccata attività nel favorire la rimarginazione delle ferite, migliore di quella mostrata da nanofibre prive di bromelina.

Nell'ambito dell'ingegneria tissutale cutanea, gli idrogeli in chitosano sono usati come scaffold per coadiuvare la proliferazione cellulare. Le proprietà meccaniche del chitosano vengono migliorate tramite l'utilizzo di agenti di cross-linking [25]. Ad esempio, è stato sviluppato un idrogelo [31] in carbossimetilchitosano – un derivato del chitosano maggiormente solubile in acqua – e collagene, sottoposto a un doppio cross-linking enzimatico e chimico. Il materiale ottenuto presenta buone proprietà meccaniche e citocompatibilità, nonché elevata porosità. Un test eseguito su una ferita profonda ha dimostrato che l'idrogelo presenta una buona capacità di promuovere la rigenerazione del tessuto cutaneo.

Uno studio [32] ha combinato un idrogel e un cryogel – ottenuti miscelando glicolchitosano e poliuretano bifunzionale, con funzione di crosslinker, e arricchiti con cellule staminali derivate da tessuto adiposo – e un trattamento di agopuntura, in un modello animale di ferita in ratto diabetico, al fine di ottenere immunomodulazione e accelerazione della rimarginazione della ferita. Gli autori suggeriscono che l'utilizzo combinato di biomateriali, cellule staminali e agopuntura possa rappresentare una potenziale strategia terapeutica per la rimarginazione di ferite croniche.

Scaffold configurati come membrane possono essere utilizzati nell'ingegneria tissutale cutanea: il loro potenziale utilizzo è stato investigato [25].

Uno studio [33] ha formulato una membrana in chitosano e biossido di titanio. È stata riscontrata la formazione di legami forti O-Ti-O tra ossido di titanio e chitosano, che ha consentito di ottenere elevate porosità, resistenza meccanica, cristallinità e flessibilità delle membrane. I test concernenti l'interazione con i fibroblasti hanno rivelato che le membrane contenenti lo 0.25% di ossido di titanio sono in grado di favorire la sopravvivenza e proliferazione cellulare, e di ridurre lo stress ossidativo e l'apoptosi. Inoltre, la membrana ha mostrato una notevole attività antibatterica nei confronti dello stafilococco aureo.

Capitolo 3. Applicazioni al tessuto osseo

La matrice extracellulare dell'osso è costituita da una moltitudine di proteine strutturali e polisaccaridi, tra cui la componente principale è rappresentata da fibrille di collagene, di diametro compreso tra 35 e 60 nm, mentre la lunghezza può raggiungere 1 μm . Le fibrille sono mineralizzate da cristalli di idrossiapatite, collocati negli spazi tra di esse. I cristalli sono caratterizzati da cospicua rigidità e anisotropia [34].

Nel seguire un approccio biomimetico all'ingegnerizzazione di uno scaffold per il tessuto osseo, spesso sono stati utilizzati fosfati di calcio per imitare la componente minerale dell'osso, mentre quella organica è stata sostituita da polimeri sintetici o naturali. Questi ultimi presentano il vantaggio di causare meno reazioni avverse nell'organismo umano. In particolare il chitosano è stato proposto come biomateriale per l'ingegnerizzazione del tessuto osseo sotto diverse forme, tra cui: strutture macroporose ottenute per stampaggio (molded macroporous), strutture basate su fibre, idrogeli, microsferi e prodotti stampati in 3D [35].

Per poter sviluppare uno scaffold efficace per l'ingegneria tissutale del tessuto osseo, è necessario considerarne alcune caratteristiche peculiari.

Esistono due tipi di tessuto osseo: osso corticale e osso trabecolare. L'osso trabecolare rappresenta la regione più interna di alcune ossa, e il suo volume si ripartisce orientativamente in 25% di osso e 75% di midollo. L'osso corticale rappresenta una sorta di involucro compatto dell'osso, ed è composto al 90% di osso e per il restante 10% di porosità [36].

La resistenza a compressione dell'osso trabecolare è compresa tra i 2 e i 12 MPa, mentre quella dell'osso corticale tra i 100 e 230 MPa. Le proprietà meccaniche di uno scaffold che possa svolgere una funzione strutturale devono essere tali da sostituire il tessuto osseo, tuttavia generalmente le caratteristiche meccaniche degli scaffold a base di chitosano finora proposti sono nettamente inferiori. Per questo motivo, gli scaffold a base di chitosano non possono essere utilizzati per applicazioni strutturali, bensì in aree danneggiate del tessuto osseo di dimensioni contenute e che non siano soggette ad eccessive sollecitazioni. Ad esempio, vengono usati come supporto per l'adesione di osteoblasti che possano proliferare, e quindi produrre una matrice extracellulare mineralizzata, o come vettori per farmaci [35].

Altro fattore fondamentale da tenere in considerazione è la porosità: oltre a dotare lo scaffold di una porosità tra il 50 e il 90%, risulta necessario prendere in considerazione la possibilità di sviluppare micropori (<20 μm) e al contempo macropori (>100-400 μm). I primi agevolano la semina e la ritenzione delle cellule, nonché le interazioni tra cellule e matrice; mentre i secondi sono necessari per indurre la migrazione cellulare, l'instaurazione di un network tra le cellule, il trasporto di sostanze nutritive e la diffusione dei prodotti di scarto. Entrambe le tipologie di pori risultano inoltre efficaci nell'agevolare la vascolarizzazione [35].

Analogamente ad altri tessuti, la degradazione dello scaffold di un tessuto osseo deve avvenire alla stessa velocità di produzione del tessuto neoformato. È necessario osservare, a questo proposito, che la concentrazione di lisozima – enzima in grado di degradare il chitosano – nella matrice extracellulare dell'osso umano può essere anche mille volte maggiore rispetto a quella riscontrabile nel siero. Risulta pertanto essenziale valutare la velocità di degradazione dello scaffold in chitosano in condizioni fisiologiche, e in funzione della concentrazione di lisozima. È inoltre necessario notare che la velocità di degradazione è correlata al grado di cristallinità, che a sua volta è determinato dal grado di deacetilazione. Infatti una deacetilazione maggiore corrisponde ad una degradazione più lenta, per via della maggior vicinanza delle catene e la superiore frequenza di legami idrogeno [35].

3.1 Stampa 3D

La tecnica della stampa 3D – anche nota come manifattura additiva – offre il vantaggio di poter sviluppare uno scaffold funzionale dotato di caratteristiche ben definite e personalizzabili [37]. Tale tecnica si basa sull'aggiunta di materiale strato per strato fino all'ottenimento di un oggetto tridimensionale, a partire da un modello 3D ottenuto con specifici software di design (noti come Computer-Aided Design, CAD). Questo processo, che si differenzia dalla tradizionale manifattura sottrattiva, permette di realizzare geometrie complesse che sarebbero generalmente impossibili da ottenere tramite metodi di produzione tradizionali [38].

Nell'ambito della produzione di scaffold tramite manifattura additiva è possibile incapsularvi delle cellule, ad esempio tramite tecniche di bioprinting tridimensionale. La presenza delle cellule facilita la formazione della matrice extracellulare e favorisce il rimodellamento osseo per mezzo di attività paracrine. Altri vantaggi del bioprinting tridimensionale sono la distribuzione omogenea delle cellule e il preciso controllo dei pori e delle interconnessioni tra questi, al fine di agevolare l'infiltrazione cellulare e lo scambio di nutrienti. In aggiunta, la deposizione di cellule in posizioni predefinite migliora significativamente la vasculogenesi, provocando una rigenerazione più rapida del tessuto. Si è inoltre osservato che l'incapsulamento di concentrazioni cellulari elevate favorisce le interazioni tra cellule e la mineralizzazione, generando un potenziale osteogenico maggiore rispetto a quello ottenuto con concentrazioni cellulari inferiori [39]. Un ulteriore vantaggio dell'ottenimento dei pori tramite la manifattura additiva è il mancato utilizzo di agenti porogeni, che possono causare reazioni avverse [37].

Uno schema riassuntivo della produzione di uno scaffold per l'ingegneria tissutale dell'osso è qui riportato: tramite software si realizza un modello tridimensionale del manufatto da realizzare, che viene conseguentemente stampato combinando biomateriali adeguati, cellule

differenziate o staminali, e molecole segnale. Lo scaffold così ottenuto può essere impiantato nel tessuto osseo, al fine di favorirne la guarigione (Figura 3.1) [37].

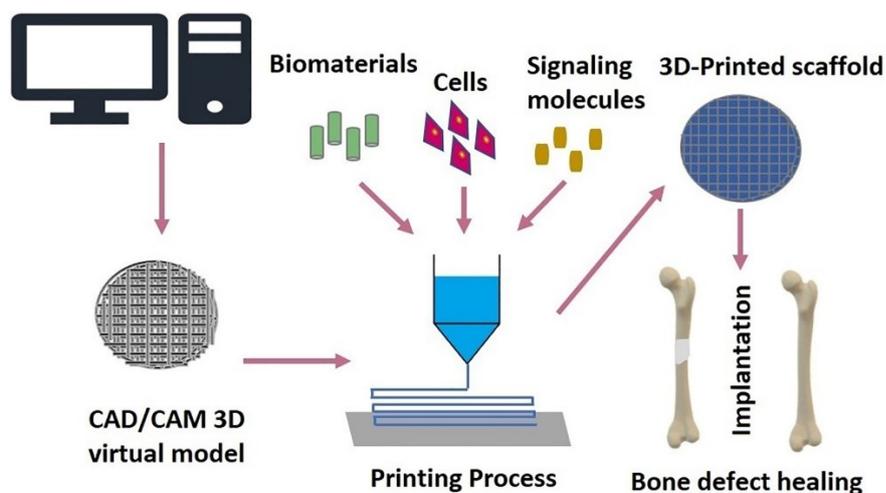


Figura 3.1: La fabbricazione dello scaffold usando la tecnica della manifattura additiva

Il chitosano ha dimostrato di possedere un effetto favorevole sulla rigenerazione del tessuto osseo, in quanto degli scaffold a base di questo biopolimero hanno indotto adesione e proliferazione cellulare, neovascolarizzazione, mineralizzazione e morfogenesi osteogenica.

Di conseguenza, questo biopolimero è stato usato – esclusivamente o in combinazione con ceramiche bioattive o altri polimeri sintetici o naturali – come materia prima per la produzione di prodotti di manifattura additiva per la rigenerazione ossea [37].

Sono stati sviluppati dei bioinchiostri a base di collagene e chitosano, in diverse concentrazioni, che sono stati successivamente impiegati per stampare degli scaffold potenzialmente utilizzabili nell’ambito dell’ingegneria tissutale [40]. Si è osservato che gli scaffold contenenti chitosano presentavano un minore rigonfiamento – se immersi in una apposita soluzione di test – rispetto agli scaffold contenenti solo collagene. La velocità di degradazione, il modulo di Young e la tensione a rottura per trazione risultano incrementati all’aumentare della concentrazione di chitosano. Sono stati effettuati dei saggi di adesione di cellule staminali mesenchimali ricavate da midollo osseo murino, che hanno mostrato un’abbondante crescita cellulare sulla superficie, nonché la presenza di cellule all’interno dello scaffold, evidenziando la migrazione delle stesse. Un trattamento che ha dimostrato di migliorare le caratteristiche superficiali di uno scaffold ottenuto tramite stampa 3D a partire dal chitosano, nonché l’adesione e proliferazione di preosteoblasti, è il ‘plasma etching’ tramite ossigeno [37]. Tale trattamento si riferisce a un processo sottrattivo a cui viene sottoposto lo scaffold in seguito all’interazione con un plasma di ossigeno, sostanza ossidante in grado di rimuovere materiale dalla superficie [41].

Uno studio [42] ha ottenuto uno scaffold tramite manifattura additiva, usando come materia prima una miscela di acido polilattico, fosfato β -tricalcico e idrogel di chitosano. La proprietà antibatterica dello scaffold è stata ulteriormente accentuata dall'aggiunta di amoxicillina – un antibiotico ad ampio spettro – riscontrando però una diminuzione della citocompatibilità rispetto allo scaffold privo di antibiotici. Lo scaffold con amoxicillina ha mostrato una resistenza a compressione di 1.24 ± 0.53 MPa, mentre in assenza di antibiotici la resistenza è di 1.29 ± 0.23 MPa.

Un altro studio [43] ha combinato le elevate prestazioni meccaniche dell'acido polilattico con la bioattività del chitosano e le caratteristiche osteogeniche dell'idrossiapatite, realizzando uno scaffold stampato in 3D in acido polilattico e modificandone la superficie con i restanti due materiali. Lo scaffold risultante ha mostrato migliore idrofilicità e bioattività, e di conseguenza maggiore adesione e proliferazione cellulare rispetto agli scaffold non sottoposti a modifiche superficiali. Tali risultati sono stati ottenuti tramite test in vitro con cellule di osteosarcoma umano. Gli autori ritengono che lo scaffold composito da loro sviluppato possa essere usato nell'ambito dell'ingegneria tissutale per riparare difetti ossei.

Essendo l'osso nativo un tessuto vascolarizzato, è cruciale che gli scaffold siano in grado di favorire l'angiogenesi per consentire lo sviluppo di tessuto neoformato. Uno studio [44] ha utilizzato, a questo fine, dei fagi filamentosi – virus che presentano la conformazione di una nanofibra – sottoposti ad ingegneria genetica per far sì che la loro superficie presenti un'alta densità di acido arginilglicilaspartico (RGD), un peptide in grado di reclutare le cellule endoteliali attive, fondamentali per la rigenerazione dei vasi sanguigni. Tali nanofibre virali sono in grado di indurre la differenziazione delle cellule staminali mesenchimali in osteoblasti. L'utilizzo delle nanofibre presenta dei vantaggi in confronto all'utilizzo diretto del peptide RGD, in quanto quest'ultimo non può formare strutture tridimensionali e non può formare legami chimici con gli scaffold di fosfato di calcio usati in questo studio, pertanto tende a disperdersi.

I fagi caratterizzati da alta concentrazione di RGD sono stati integrati nei pori di uno scaffold ricavato per manifattura additiva di fosfato di calcio bifasico, cioè composto da idrossiapatite e β -fosfato tricalcico. Questo scaffold biomimetico presenta una struttura uniforme caratterizzata da macropori interconnessi e micro-porosità. Le nanofibre, cariche negativamente, sono state combinate con del chitosano carico positivamente a formare una matrice stabile nei pori dello scaffold.

Lo scaffold, dopo essere stato arricchito con cellule staminali mesenchimali, è stato impiantato in un modello murino di difetto osseo. Dopo otto settimane, si è osservato che lo scaffold aveva promosso la crescita di nuovo tessuto più efficacemente di uno scaffold non arricchito da

nanofibre virali e di uno arricchito da virus non sottoposti ad ingegneria genetica. La formazione di nuovo tessuto è risultata ancora più spiccata in uno scaffold arricchito con un fattore di crescita angiogenico che ha svolto la funzione di controllo positivo.

Inoltre sono state rilevate evidenze di angiogenesi, sia in presenza del fattore angiogenico che in sua assenza. Quindi è stata individuata una nuova strategia per favorire la vascolarizzazione degli scaffold ossei, che include l'utilizzo del chitosano per formare il network di nanofibre necessarie per ottenere tale effetto.

Un altro metodo in cui il chitosano è stato utilizzato per favorire l'osteogenesi è rappresentato dall'applicazione, su uno scaffold in lega di titanio ricavato tramite manifattura additiva, di un rivestimento a base di chitosano, ossido di calcio, silice e ossido di magnesio. Questa strategia è stata ideata per sopperire al fatto che la lega scelta, pur avendo proprietà meccaniche adeguate e non mostrando citotossicità, non è caratterizzata da bioattività. Uno studio in vivo ha dimostrato che tale scaffold è in grado di favorire la rigenerazione ossea nei conigli, e pertanto gli autori ritengono che il trattamento superficiale sperimentato sia promettente per future applicazioni nell'ingegneria tissutale dell'osso [45].

Esistono altri studi che hanno utilizzato il chitosano al fine di migliorare le proprietà osteogeniche di potenziali scaffold ottenuti per manifattura additiva, individuando ad esempio le seguenti strategie: coating di collagene e chitosano su microstrutture tridimensionali ottenute per polimerizzazione a due fotoni (una tecnica di manifattura additiva in cui un laser modifica le proprietà di una regione predefinita di un polimero fotosensibile) di fotopolimero IP-L780 [46]; combinazione di un supporto meccanico macroporoso in acido polilattico prodotto tramite stampa 3D con un idrogel composito a base di chitosano e idrossiapatite [47], e formazione di un idrogel in chitosano su uno scaffold stampato tridimensionalmente a base di un polimero noto come PHBV e solfato di calcio emiidrato [48].

Sono inoltre stati effettuati alcuni studi che, combinando tecniche di manifattura additiva e biomateriali contenenti chitosano, si propongono di promuovere la mineralizzazione del sostituto osseo. Ad esempio è stato prodotto uno scaffold stampato tridimensionalmente utilizzando come materia prima un idrogel di chitosano, e successivamente mineralizzato utilizzando una tecnica – indicata nello studio come metodo McGrath – ispirata al processo di mineralizzazione che avviene nella madreperla. Si è osservata la formazione di carbonato di calcio in intima associazione con la matrice di idrogel, tuttavia risulta necessario perfezionare la morfologia e distribuzione dei minerali nella matrice tridimensionale [49].

Un ulteriore articolo ha prodotto degli scaffold stampati in 3D a base di chitosano puro, chitosano sottoposto a cross-linking con pectina e sottoposto a cross-linking con genipina. Questi scaffold risultano avere proprietà meccaniche migliori, degradazione più lenta e maggior

proliferazione degli osteoblasti in vitro rispetto ad uno scaffold in chitosano ottenuto tramite liofilizzazione. In particolare, lo scaffold ottenuto con chitosano cross-linkato con pectina ha mostrato il maggior grado di mineralizzazione e velocità di rilascio di farmaci [50].

Una differente strategia [51] che è stata proposta per migliorare la mineralizzazione di uno scaffold in chitosano consiste nell'incapsularvi nanoparticelle di ossido di ferro sottoposte a modifiche superficiali, generando un effetto magnetico.

La manifattura additiva e il processo sol-gel sono stati combinati al fine di ottenere uno scaffold composto di fase organica e inorganica, a base di idrossiapatite, chitosano e silice. L'idrossiapatite risulta distribuita in modo omogeneo nello scaffold, migliorandone le proprietà meccaniche e la mineralizzazione rispetto agli scaffold che non la contengono. Le prove di compressione hanno evidenziato resistenza a compressione e modulo elastico compatibili con quelli dell'osso trabecolare [52].

Ulteriori applicazioni, che sono state ipotizzate per il chitosano nell'ambito degli scaffold fabbricati per manifattura additiva per l'ingegneria tissutale del tessuto osseo, sono il rilascio controllato di farmaci e l'utilizzo come vettore per cellule osteoprogenitrici, al fine di favorire la rimarginazione dei difetti ossei [37]. Ad esempio, è stato sviluppato uno scaffold in lega di titanio stampato tridimensionalmente combinato con un idrogel di chitosano in grado di rilasciare icariina, un composto chimico ricavato da una pianta erbacea e in grado di favorire la differenziazione delle staminali mesenchimali, nonché la mineralizzazione della matrice extracellulare ossea. Gli scaffold in lega di titanio ottenuti tramite fusione a fascio di elettroni presentano caratteristiche meccaniche simili a quelle dell'osso, in modo da poter sostenere i carichi a cui questo è sottoposto mitigando il fenomeno dello stress shielding; lo strato di idrogel permette di ovviare alla mancata bioattività del titanio. Esperimenti in vivo e in vitro hanno dimostrato che questo scaffold permette di favorire la rigenerazione ossea e l'integrazione dell'impianto con l'osso. Gli autori ritengono di aver posto le basi teoriche per l'applicazione clinica [53].

Un altro studio [54] ha realizzato uno scaffold a base di chitosano, collagene e nano-idrossiapatite in grado di rilasciare crocina – carotenoide ricavato dallo zafferano a cui sono state attribuite proprietà osteoinduttive – che ha migliorato la biocompatibilità dello scaffold, nonché le sue proprietà meccaniche: la presenza della crocina nello scaffold ne ha aumentato il modulo di Young di una percentuale superiore al 70%.

In aggiunta, il chitosano è stato utilizzato nella stampa tridimensionale di scaffold ossei al fine di dotarli di un effetto antibatterico. In particolare uno scaffold stampato a partire da una miscela di idrossiapatite ricavata da squame di pesce, chitosano e policaprolattone ha mostrato

molte proprietà favorevoli, tra cui un effetto antibatterico che è stato determinato derivare dalla presenza di chitosano grazie al confronto con uno scaffold che non lo conteneva [55].

3.2 Nanofibre

Il chitosano, utilizzato da solo o combinato con altri materiali, può essere impiegato sotto forma di nanofibre per accelerare, tramite un effetto meccanico o biochimico, la rigenerazione ossea. Una struttura in nanofibre, infatti, è caratterizzata da un elevato rapporto tra superficie e volume, il quale favorisce l'adesione e proliferazione cellulare; al contempo la porosità garantisce un'ossigenazione adeguata. Inoltre le nanofibre sono caratterizzate da biocompatibilità e biodegradabilità controllata [56].

Le nanofibre sono caratterizzate da una certa biomimesi in quanto la matrice cellulare ossea presenta diverse componenti dalle dimensioni nanometriche. Tra le varie tecniche di preparazione delle nanofibre, l'elettrofilatura consente un preciso controllo spaziale sull'architettura del polimero, in particolare per quanto riguarda la dimensione, geometria e interconnessione dei pori [56].

L'elettrofilatura – nota anche come elettrospinning – è una tecnica che consiste nel convertire una soluzione polimerica in fibre, sfruttando delle interazioni elettrostatiche. In particolare la soluzione polimerica viene lentamente erogata da una siringa, in presenza di un ingente campo elettrico, a causa del quale la soluzione assume una carica elettrica. Di conseguenza si instaurano delle forze repulsive all'interno della soluzione che, in seguito a campi elettrici sufficientemente intensi, vincono le interazioni superficiali generando un sottile getto di liquido. Un elettrodo a carica opposta o neutro, denominato collettore, è posizionato nelle vicinanze e attrae il getto. Durante il tragitto dalla siringa al collettore, il solvente evapora, in modo che sul collettore si depositi una nanofibra solida e continua (Figura 3.2) [56].

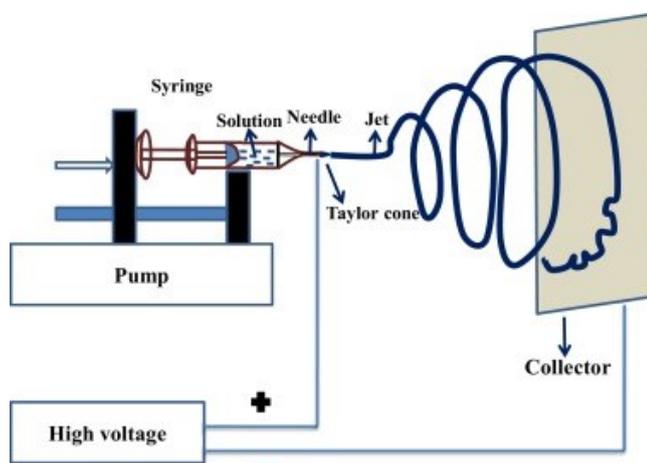


Figura 3.2: La procedura dell'elettrofilatura

La morfologia delle fibre può essere controllata modulando diversi parametri, in particolare il flusso in uscita dalla siringa, la concentrazione della soluzione, il voltaggio applicato e la distanza tra siringa e collettore.

Per migliorare le proprietà meccaniche delle nanofibre in chitosano, che generalmente non sono sufficienti per applicazioni strutturali, benché possano fornire un iniziale supporto alle cellule, sono stati intrapresi diversi approcci. Ad esempio, la combinazione con polimeri con carica elettrica opposta potrebbe giovare alle proprietà meccaniche, oppure si è osservato che per rinforzare uno scaffold in nanofibre di chitosano e policaprolattone è utile aumentare il diametro delle fibre e ridurre la porosità. Si è inoltre osservato che le prestazioni meccaniche di membrane in nanofibre di chitosano e acido poli (lattico-co-glicolico) dipendono da diversi fattori: ad esempio, le interazioni tra i due polimeri ai punti di interconnessione tra le fibre sembrano avere un effetto positivo [56]. Uno studio [57] ha provato che introdurre nelle nanofibre in chitosano delle nanoparticelle mesoporose di silice per il 10% in massa favorisce le proprietà meccaniche, mentre una percentuale maggiore le deteriora. È stata prodotta una membrana [58] in fibre di acido poli-L-lattico e chitosano, sottoposta a un trattamento superficiale con polidopamina, che mostra un notevole modulo di Young di 1.24 ± 0.012 GPa.

Per quanto concerne l'attività biologica degli scaffold in nanofibra di chitosano, uno studio [59] ha ricavato che questi possono favorire la proliferazione e la maturazione degli osteoblasti umani e murini, oltre che la mineralizzazione. In particolare, gli osteoblasti murini si sono moltiplicati in maniera considerevolmente più efficace sugli scaffold in nanofibra piuttosto che su una pellicola in chitosano. Si è inoltre osservato che la combinazione di fibre in polietilene tereftalato (PET) e chitosano risulta maggiormente biocompatibile e antibatterica rispetto alle fibre di PET considerate singolarmente [56]. È stato inoltre notato che delle nanofibre in chitosano e idrossiapatite forniscono un ambiente distintamente più favorevole alla vitalità cellulare rispetto a pellicole di chitosano, nanofibre di chitosano e pellicole di chitosano e idrossiapatite. A questa proprietà contribuisce l'estesa area superficiale delle nanofibre in chitosano e idrossiapatite [56]. Uno studio [60] ha realizzato, con la tecnica dell'electrospinning coassiale, delle maglie di fibre in policaprolattone rivestito da uno strato di chitosano e ossido di polietilene, successivamente funzionalizzato con peptidi. Questa soluzione combina le buone proprietà meccaniche del policaprolattone con la bioattività fornita dallo strato esterno e dai peptidi. Un ulteriore studio [61] usa la tecnica dell'elettrofilatura coassiale per formare una struttura di fibre di dimensioni micrometriche e nanometriche, composte internamente di policaprolattone e esternamente di chitosano. Grazie alla maggior dimensione dei pori, rispetto ad esempio ad uno scaffold in solo chitosano, lo scaffold in policaprolattone e chitosano ha garantito maggior diffusione dei nutrienti e conseguentemente miglior proliferazione cellulare.

Un altro articolo [62] propone uno scaffold in nanofibre di PHBV (che conferisce buone proprietà meccaniche), chitosano e idrossiapatite. Questi ultimi due composti agiscono in modo sinergico per promuovere la rigenerazione del tessuto osseo.

L'osso presenta una superficie irregolare caratterizzata da porosità e rilievi, e il chitosano offre la possibilità di alterare le caratteristiche superficiali di uno scaffold al fine di favorire la proliferazione degli osteoblasti [63]. Ad esempio, è stato ideato uno scaffold [64] composito in acido polilattico (PLA) e chitosano, caratterizzato dalla combinazione di fibre a doppio strato e altre contraddistinte da una morfologia “a isola” (Figura 3.3), in cui delle strutture nanometriche di chitosano sono apposte sulla superficie di una nanofibra in PLA. Una tale struttura ha prodotto beneficio alla proliferazione cellulare e alla mineralizzazione della matrice.

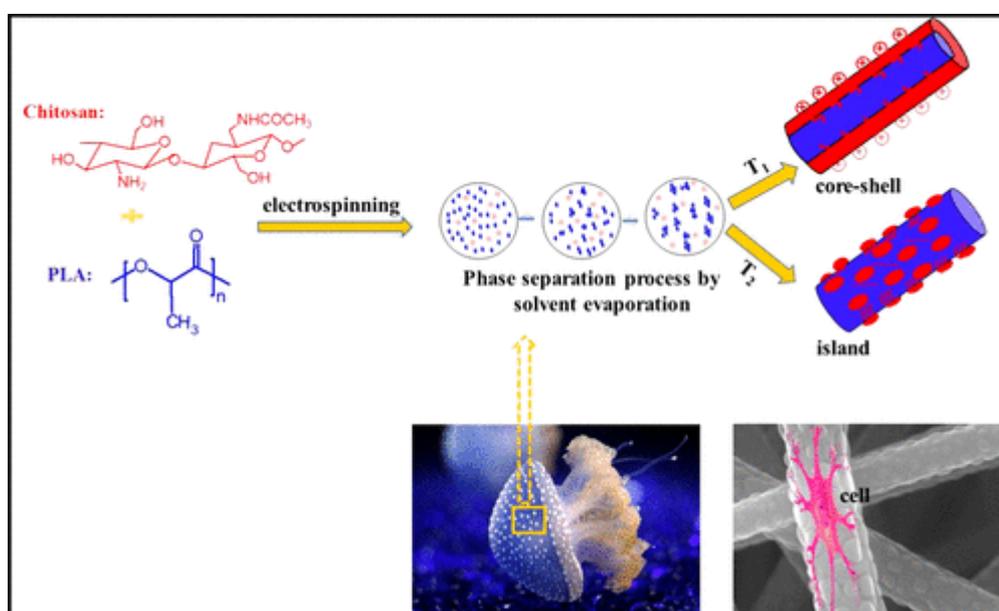


Figura 3.3: Struttura dello scaffold in chitosano e PLA con morfologia a doppio strato e “a isola”

La degradazione relativamente rapida del chitosano impone una limitazione nel suo utilizzo come unico materiale nelle applicazioni di ingegneria tissutale. Per ovviare a questo inconveniente è possibile combinare il chitosano con altre molecole che ne rallentino la degradazione [56].

A causa della presenza dei gruppi amminici, il chitosano presenta affinità con le molecole polari, tra cui l'acqua. Questo favorisce l'adsorbimento dell'acqua stessa, utile a favorire la crescita cellulare. Pertanto il chitosano è stato addizionato a fibre di polimeri sintetici idrofobici al fine di dotarle di comportamento idrofilico. A sua volta questa caratteristica consente un maggior rigonfiamento dello scaffold in ambiente acquoso che, se non eccessivo, rappresenta una caratteristica positiva in quanto facilita il trasporto di ossigeno e nutrienti [63].

Le nanofibre in chitosano possono essere utilizzate nell'ambito dell'ingegneria tissutale ossea, oltre che come materiale per la produzione di scaffold, anche per il rilascio controllato di farmaci e altre molecole. Ad esempio, le nanofibre in chitosano vengono utilizzate per rilasciare antibiotici al fine di prevenire infezioni nel sito del difetto osseo, oppure molecole in grado di favorire l'osteosintesi, o ancora fattori di crescita [63].

È infine opportuno osservare che talvolta vengono utilizzati dei derivati del chitosano piuttosto che il biopolimero stesso, al fine di ottenere specifiche caratteristiche e di ovviare alla necessità di dissolvere il chitosano in un acido organico, che potrebbe causare un effetto citotossico [63].

Capitolo 4. Applicazioni al parodonto

Uno dei tessuti ossei in cui il chitosano è ampiamente utilizzato nell'ingegneria tissutale è l'osso alveolare, parte del tessuto parodontale [65].

La parodontite è un'inflammatione cronica di origine batterica, che causa la distruzione dei tessuti che sostengono i denti, in particolare la gengiva, l'osso alveolare e il legamento parodontale. La rimozione del biofilm microbico subgengivale e la risoluzione dello stato infiammatorio potrebbero essere ottenute senza ricorrere ad interventi chirurgici, tuttavia per ripristinare completamente il parodonto è necessario rigenerare il tessuto osseo perduto. Per fare ciò, sono stati introdotti numerosi biomateriali da utilizzare nella creazione di scaffold tridimensionali che siano in grado, eventualmente coadiuvati da fattori di crescita e cellule, di promuovere adesione e proliferazione cellulare, nonché rigenerazione del tessuto. Gli scaffold devono essere caratterizzati da una porosità adeguata, in quanto una elevata densità conferisce resistenza meccanica al manufatto, mentre una spiccata porosità favorisce la migrazione cellulare e la vascolarizzazione. I biomateriali utilizzati negli scaffold possono essere suddivisi in polimeri di origine naturale e sintetica. Quelli naturali comprendono chitosano, alginato, collagene, gelatina, elastina e fibroina di seta; mentre tra i sintetici si annoverano acido polilattico (PLA), acido poliglicolico (PGA) e acido polilattico-co-glicolico (PLGA) [65].

Considerando gli scaffold in chitosano, si è osservato che la proliferazione di cementoblasti e cellule del legamento parodontale è meno efficace in scaffold realizzati esclusivamente in chitosano piuttosto che nella combinazione del biopolimero con altri biomateriali, in particolare polimerici e ceramici [65].

In diversi casi, nell'ambito della rigenerazione parodontale, si usa una combinazione di sostanze organiche – tra cui il chitosano – in quanto favoriscono la rigenerazione del legamento parodontale, e di sostanze inorganiche dotate di migliori prestazioni meccaniche, in quanto favoriscono la rigenerazione dell'osso alveolare e del cemento [66].

Un esempio di potenziale scaffold contenente chitosano sviluppato per l'ingegneria tissutale del parodonto è un idrogel ottenuto per crioessiccazione a partire da chitosano e acido ialuronico [67].

Uno studio [68] ha sviluppato uno scaffold in chitosano sottoposto a cross-linking tramite un acido dicarbossilico e arricchito con cellule del legamento parodontale umano. La reazione di cross-linking ha migliorato le proprietà meccaniche del chitosano. Si è inoltre confrontato l'effetto dello scaffold in un difetto di un osso cranico di topo, previa semina di cellule del legamento parodontale umano e in assenza della stessa. I risultati della sperimentazione hanno mostrato rigenerazione ossea simile nei due casi. Gli autori sostengono che il materiale ottenuto possa essere usato per la rigenerazione ossea.

4.1 Strutture a strati

Il chitosano può essere combinato con altri polimeri al fine di ottenere scaffold a doppio o triplo strato [65]. Ad esempio, uno studio [69] ha sviluppato una struttura multistrato al fine di consentire la rigenerazione simultanea di diversi tessuti del parodonto. In particolare una membrana multiscala in policaprolattone ottenuta per elettrofilatura ha il compito di somigliare al legamento parodontale e quindi di favorirne la rigenerazione; d'altra parte, uno scaffold in chitosano, contenente il 2% in massa di solfato di calcio (CaSO_4), ha lo scopo di rigenerare l'osso alveolare. I test eseguiti hanno permesso di constatare che lo scaffold ottenuto è in grado di favorire l'adesione, infiltrazione, proliferazione e differenziazione delle cellule staminali umane del follicolo dentale in osteoblasti e fibroblasti.

Un esempio di struttura a doppio strato per la rigenerazione dell'osso alveolare è una membrana in chitosano poroso in cui il lato a contatto con l'osso – ricoperto di idrossiapatite e arricchito con BMP 6 – ha lo scopo di favorirne la rigenerazione, mentre il lato a contatto con i tessuti molli infiammati, realizzato in fibre di policaprolattone, essendo privo di porosità impedisce la migrazione di cellule epiteliali dove deve avvenire la rigenerazione ossea, in maniera tale da non ostacolarla (Figura 4.1) [70].

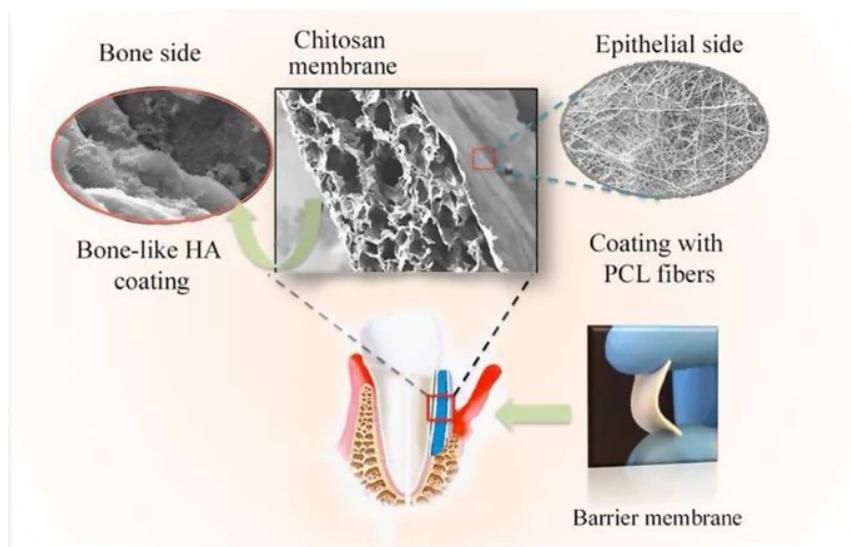


Figura 4.1: Membrana per la rigenerazione dell'osso alveolare: a sinistra il lato a contatto con l'osso, ricoperto di idrossiapatite, mentre a destra si nota lo strato in policaprolattone. Come si può osservare dalla fotografia in basso a destra, la membrana ottenuta è flessibile e facilmente manipolabile.

4.2 Rilascio di farmaci e fattori di crescita

I fattori di crescita presentano una breve emivita, pertanto – al fine di garantire una loro efficacia clinica – è necessario impiegare un sistema per il loro rilascio controllato. Uno studio [71] ha sviluppato, a questo scopo, uno scaffold in chitosano con microparticelle in alginato e PLGA, in grado di rilasciare in modo controllato e sequenziale il fattore di crescita IGF 1 e la BMP 6.

Gli studi di coltura cellulare hanno dimostrato che tali scaffold promuovono la proliferazione cellulare in maniera più efficace di scaffold costruiti esclusivamente in chitosano.

Un ulteriore studio [72] ha sviluppato uno scaffold composito per la rigenerazione dell'osso alveolare in β -fosfato tricalcico, chitosano e silice mesoporosa, ottenuto tramite il metodo della crioessiccazione e arricchito con metformina, farmaco che presenta proprietà antinfiammatorie e generalmente utilizzato per il trattamento del diabete di tipo 2. Inoltre, la metformina migliora la qualità dell'osso in pazienti diabetici, riducendo il rischio di fratture; infatti è stato osservato che favorisce la sintesi del collagene di tipo 1 e la differenziazione delle cellule progenitrici in osteoblasti. Le analisi in vitro hanno mostrato adesione cellulare, buona biocompatibilità e porosità compatibile con le applicazioni di ingegneria tissutale. Sono stati eseguiti inoltre dei test in vivo su modelli murini con parodontite, dimostrando la capacità dello scaffold di promuovere la rigenerazione dell'osso alveolare. In particolare dopo 12 settimane gli animali sono stati sacrificati ed è stata realizzata un'immagine 3D dell'osso alveolare. Un ratto che non era stato sottoposto ad alcun trattamento con biomateriali esibiva rimarginazione ossea pressoché nulla, uno sottoposto all'impianto dello scaffold non arricchito da metformina esibiva rimarginazione parziale, mentre in un ratto sottoposto a impianto di scaffold con metformina la lesione risultava per la maggior parte rimarginata (Figura 4.2).

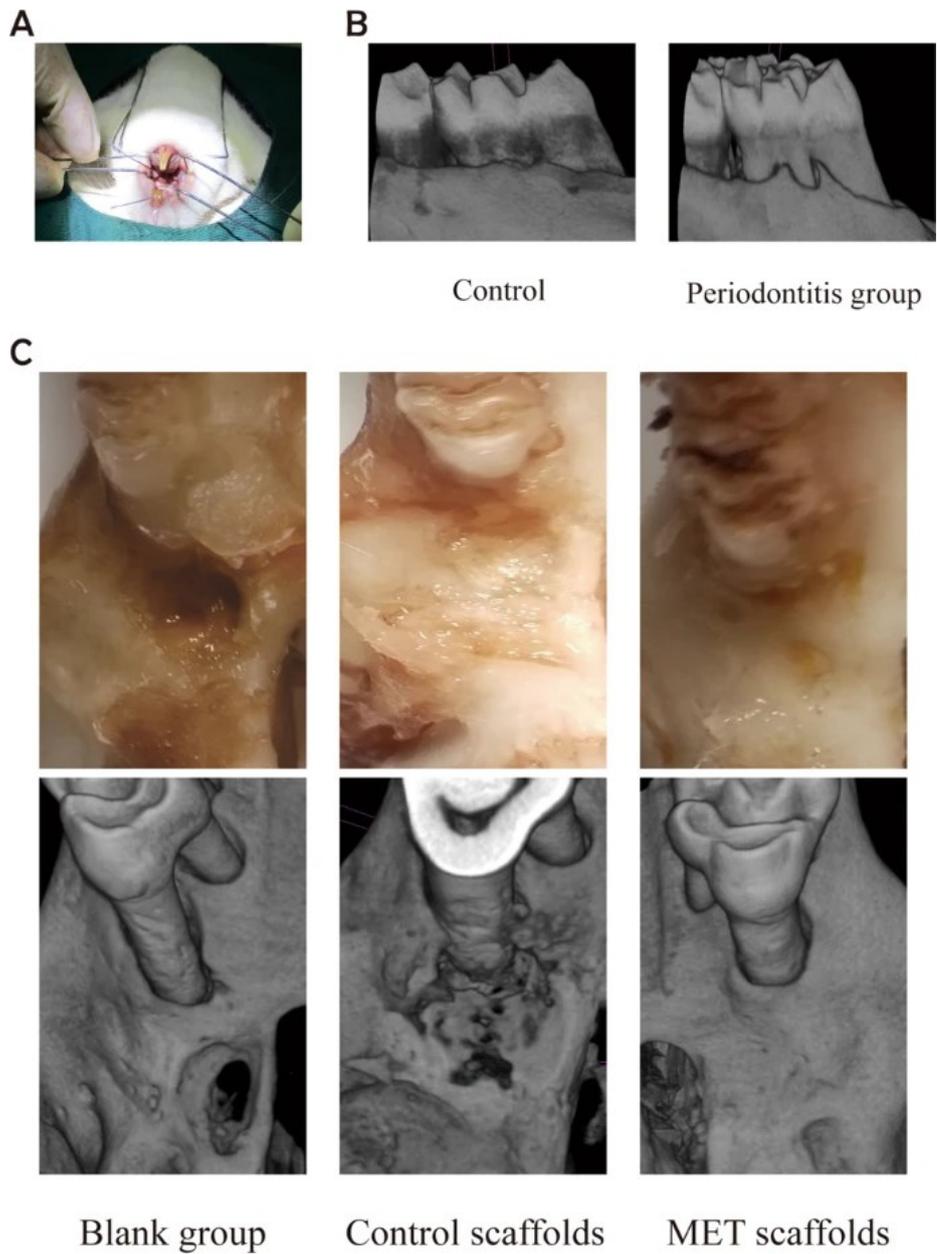


Figura 4.2: A) Intervento di induzione della parodontite; B) Confronto tra il tessuto parodontale di ratto sano e di ratto con parodontite indotta; C) Confronto della rigenerazione dopo 12 settimane in un ratto a cui non è stato impiantato alcun materiale, uno a cui è stato impiantato uno scaffold non arricchito da metformina e uno a cui è stato impiantato lo scaffold con metformina

Conclusioni

Dopo una generale trattazione delle caratteristiche e degli utilizzi del chitosano, è stata svolta una rassegna delle sue applicazioni nell'ingegneria tissutale di vari distretti corporei.

In particolare, nelle applicazioni ai tessuti presi in esame, il chitosano ha mostrato buone potenzialità come biomateriale utilizzato nella produzione di scaffold, oltre che come vettore per farmaci, molecole bioattive e cellule, o ancora come molecola che induce una particolare reazione nel tessuto.

Il chitosano ha mostrato, nell'applicazione a questi tessuti, molti risvolti positivi, tra cui la capacità di costruire scaffold compatibili con la proliferazione cellulare necessaria alla rigenerazione del tessuto, fino al punto di favorirla; o ancora un prezioso effetto antibatterico.

Tuttavia permangono ancora alcune criticità da risolvere, in particolare prima di poter utilizzare scaffold in chitosano nella pratica clinica. In particolare in alcuni tessuti, come quello osseo o cartilagineo, è necessario sviluppare soluzioni che garantiscono la possibilità di sorreggere senza danno i carichi a cui questi tessuti sono sottoposti. Inoltre, in taluni casi, risulta necessario svolgere ulteriori accertamenti, o determinare alcuni parametri ottimali da utilizzare durante la produzione, ad esempio il grado di cross-linking a cui sottoporre il materiale. Alcuni autori sottolineano inoltre che sia necessario, ad esempio nel caso di uno scaffold di stroma corneale, standardizzare la produzione dei materiali utilizzati al fine di ridurre la variabilità del prodotto finale.

Bibliografia

- [1] Prasanna S. Bakshi, D. Selvakumar, Krishna Kadirvelu, N.S. Kumar; Chitosan as an environment friendly biomaterial – a review on recent modifications and applications; *International Journal of Biological Macromolecules* (vol 150); 2020; 1072-1083
- [2] Minhajul Islam, Shahruzzaman, Shanta Biswas, Nurus Sakib, Taslim Ur Rashid; Chitosan based bioactive materials in tissue engineering applications-A review; *Bioactive Materials* (vol 5); 2020; 164-183
- [3] Nafisa Islam, Mizanul Hoque, Salman Farsi Taharat; Recent advances in extraction of chitin and chitosan; *World Journal of Microbiology and Biotechnology* (vol 39); 2022
- [4] Hakima El Knidri, Raja Belaabed, Abdellah Addaou, Ali Laajeb, Ahmed Lahsini; Extraction, chemical modification and characterization of chitin and chitosan; *International Journal of Biological Macromolecules* (vol 120); 2018; 1181-1189
- [5] Bernard Moussian; Chitin: Structure, Chemistry and Biology; dal libro ‘Targeting Chitin-containing Organisms’; 2019; 5-18
- [6] Shakeel Ahmed, Annu, Akbar Ali, Javed Sheikh; A review on chitosan centred scaffolds and their applications in tissue engineering; *International Journal of Biological Macromolecules* (vol 116); 2018; 849-862
- [7] Rayssa de Sousa Victor, Adillys Marcelo de Cunha Santos, Bianca Viana de Sousa, Gelmires de Araújo Neves, Lisiane Navarro de Lima Santana, Romualdo Rodrigues Menezes; A Review on Chitosan’s Uses as Biomaterial: Tissue Engineering, Drug Delivery Systems and Cancer Treatment; *Materials* (vol 13); 2020
- [8] Hamed Kazemi Shariat Panahi, Mona Dehghani, Hamid Amiri, Gilles J. Guillemin, Vijay Kumar Gupta, Ahmed Rajaei, Yadong Yang, Wanxi Peng, Junting Pan, Mortaza Aghbashlo, Meisam Tabatabaei; Current and emerging applications of saccharide-modified chitosan: a critical review; *Biotechnology Advances* (vol 66); 2023
- [9] Saravut Satitsri, Chatchai Muanprasat; Chitin and Chitosan Derivatives as Biomaterial Resources for Biological and Biomedical Applications; *Molecules* (vol 25); 2020
- [10] Runjie Zang, Shwu Jen Chang, Yanzhen Jing, LiYuan Wang, Ching-Jung Chen, Jen-Tsai Liu; Application of chitosan with different molecular weights in cartilage tissue engineering; *Carbohydrate Polymers* (vol 314); 2023
- [11] Riccardo A. A. Muzzarelli, Mohamad El Mehtedi, Carlo Bottegoni, Alberto Aquili, Antonio Gigante; Genipin-Crosslinked Chitosan Gels and Scaffolds for Tissue Engineering and Regeneration of Cartilage and Bone; *Marine Drugs* (vol 13); 2015; 7314-7338

- [12] Zhi-Sen Shen, Xiang Cui, Rui-Xia Hou, Qun Li, Hong-Xia Deng, Jun Fu; Tough biodegradable chitosan-gelatin hydrogels via in situ precipitation for potential cartilage tissue engineering; *RSC Advances* (vol 5); 2015; 55640-55647
- [13] Yevgeniy Kim, Zharylkasyn Zharkinbekov, Kamila Raziyeva, Laura Tabyldiyeva, Kamila Berikova, Dias Zhumagul, Kamila Temirkhanova, Arman Saparov; Chitosan-Based Biomaterials for Tissue Regeneration; *Pharmaceutics* (vol 15); 2023
- [14] Ingo Doench, Tuan Ahn Tran, Laurent David, Alexandra Montembault, Eric Viguiet, Christian Gorzelanny, Guillame Sudre, Thibaut Cachon, Malika Louback-Mohamed, Niels Horbelt, Carlos Peniche-Covas, Anayancy Osorio-Madrado; Cellulose Nanofiber-Reinforced Chitosan Hydrogel Composites For Intervertebral Disc Tissue Repair; *Biomimetics* (vol 4); 2019
- [15] Masoud Ghorbani, Jafar Ai, Mohammad Reza Nourani, Mahmoud Azami, Batool Hashemi Beni, Shiva Asadpour, Sima Bordbar; Injectable natural polymer compound for tissue engineering of intervertebral disc: In vitro study; *Materials Science and Engineering C* (vol 80); 2017; 502-508;
- [16] Fei Yang, Dongqin Xiao, Qiao Zhao, Zhu Chen, Kang Liu, Shixiao Chen, Xiao Sun, Qiuju Yue, Ruolan Zhang, Gang Feng; Fabrication of a novel whole tissue-engineered intervertebral disc for intervertebral disc regeneration in the porcine lumbar spine; *RSC Advances* (vol 8); 2018; 39013-39021
- [17] Philippe Gain, Rémy Julienne, Zhiguo He, Mansour Aldossary, Sophie Acquart, Fabrice Cognasse, Gilles Thuret; Global Survey of Corneal Transplantation and Eye Banking; *JAMA Ophthalmology* (vol 134); 2016
- [18] Qiwei Dong, Dingkun Wu, Moqiu Li, Wei Dong; Polysaccharides, as biological macromolecule-based scaffolding biomaterials in cornea tissue engineering: A review; *Tissue and Cell* (vol 76); 2022
- [19] Zhi Chen, Jingjing You, Xiao Liu, Simon Cooper, Christopher Hodge, Gerard Sutton, Jeremy M Crook, Gordon G Wallace; Biomaterials for corneal bioengineering; *Biomedical Materials* (vol 13); 2018
- [20] Tahereh Tayebi, Alireza BARadaran-Rafii, Abbas Hajifathali, Azam Rahimpour, Hakimeh Zali, Alireza Shaabani, Hassan Niknejad; Biofabrication of chitosan/chitosan nanoparticles/polycaprolactone transparent membrane for corneal endothelial tissue engineering; *Scientific Reports – Nature* (vol 11); 2021
- [21] Ravindra V. Badhe, Divya Bijukumar, Dharmesh R. Chejara, Mostafa Mabrouk, Yahya E. Choonara, Pradeep Kumar, Lisa C. du Toit, Pierre P.D. Kondiah, Viness Pillay; A composite

chitosan-gelatin bi-layered, biomimetic macroporous scaffold for blood vessel tissue engineering; *Carbohydrate Polymers* (vol 157); 2017; 1215-1225

[22] Iffa A. Fiqrianti, Prihartini Widiyanti, Muhammad A. Manaf, Claudia Y. Savira, Nadia R. Cahyani, Fitria R. Bella; Poly-L-lactic Acid (PLLA)-Chitosan-Collagen Electrospun Tube for Vascular Graft Application; *Journal of Functional Biomaterials* (vol 9); 2018

[23] Atul A. Chaudhari, Komal Vig, Dieudonné Radé Baganizi, Rajnish Sahu, Saurabh Dixit, Vida Dennis, Shree Ram Singh and Shreekumar R. Pillai; Future Prospects for Scaffolding Methods and Biomaterials in Skin Tissue Engineering: A Review; *International Journal of Molecular Sciences* (vol 17); 2016

[24] Loai A. Elfawy, Chiew Yong Ng, Ibrahim N. Amirrah, Zawani Mazlan, Adzim Poh Yuen Wen, Nur Izzah Md Fadilah, Manira Maarof, Yogeswaran Lokanathan, Mh Busra Fauzi; Sustainable Approach of Functional Biomaterials–Tissue Engineering for Skin Burn Treatment: A Comprehensive Review; *Pharmaceuticals* (vol 16); 2023

[25] Charitha Thambiliyagodage, Madara Jayanetti, Amavin Mendis, Geethma Ekanayake, Heshan Liyanaarachchi, Saravanamuthu Vigneswaran; Recent Advances in Chitosan-Based Applications—A Review; *Materials* (vol 16); 2023

[26] Mojtaba Koosha, Mohammad Raoufi, Hamideh Moravvej; One-pot reactive electrospinning of chitosan/PVA hydrogel nanofibers reinforced by halloysite nanotubes with enhanced fibroblast cell attachment for skin tissue regeneration; *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* (vol 179); 2019; 270-279

[27] Pengfei Zou, Wen-Hui Lee, Zhiquin Gao, Di Qin, Yuxia Wang, Jiao Liu, Tongyi Sun, Yuanyuan Gao; Wound dressing from polyvinyl alcohol/chitosan electrospun fiber membrane loaded with OH-CATH30 nanoparticles; *Carbohydrate Polymers* (vol 232); 2020

[28] Andreea-Teodora Iacob, Maria Drăgan, Oana-Maria Ionescu, Lenuța Profire, Anton Ficai, Ecaterina Andronescu, Luninița Georgeta Confederat, Dan Lupașcu; An Overview of Biopolymeric Electrospun Nanofibers Based on Polysaccharides for Wound Healing Management; *Pharmaceutics* (vol 12); 2020

[29] Pitchaimuthu Pathalamuthu, A. Siddharthan, Venkateshwarapuram Rengaswami Giridev, Victor Victoria, Ramar Thangam, Srinivasan Sivasubramanian, Vincent Savariar, Thillaipandian Hemamalini; Enhanced performance of Aloe vera incorporated chitosan-polyethylene oxide electrospun wound scaffold produced using novel Spirograph based collector assembly; *International Journal of Biological Macromolecules* (vol 140); 2019; 808-824

- [30] Samaneh Bayat, Nafise Amiri, Elham Pishavar, Fatemeh Kalalinia, Jebrail Movaffagh, Maryam Hashemi; Bromelain-loaded chitosan nanofibers prepared by electrospinning method for burn wound healing in animal models; *Life Sciences* (vol 229); 2019; 57-66
- [31] Jing Cao, Pan Wang, Yannan Liu, Chenhui Zhu, Daidi Fan; Double crosslinked HLC-CCS hydrogel tissue engineering scaffold for skin wound healing; *International Journal of Biological Macromolecules* (vol 155); 2020; 625-635
- [32] Tsai-Yu Chen, Tsung-Kai Wen, Niann-Tzyy Dai, Shan-hui Hsu; Cryogel/hydrogel biomaterials and acupuncture combined to promote diabetic skin wound healing through immunomodulation; *Biomaterials* (vol 269); 2021
- [33] Sudhanshu Shekhar Behera, Urmimala Das, Awanish Kumar, Akalabya Bissoyi, Abhishek Kumar Singh; Chitosan/TiO₂ composite membrane improves proliferation and survival of L929 fibroblast cells: Application in wound dressing and skin regeneration; *International Journal of Biological Macromolecules* (vol 98); 329-340
- [34] Diana Lopes, Cláudia Martins-Cruz, Mariana B. Oliveira, João F. Mano; Bone physiology as inspiration for tissue regenerative therapies; *Biomaterials* (vol 185); 2018; 240-275
- [35] Antonia Ressler; Chitosan-Based Biomaterials for Bone Tissue Engineering Applications: A Short Review; *Polymers* (vol 14); 2022
- [36] Gregory Chang, Sean Boone, Dimitri Martel, Chamith S. Rajapakse, Robert S. Hallyburton, Mitch Valko, Stephen Honig, Ravinder R. Regatte; MRI Assessment of Bone Structure and Microarchitecture; *Journal of Magnetic Resonance Imaging* (vol 46); 2017; 323-337
- [37] L. Roshini Yadav, Sanjana Viji Chandran, Krishnaraj Lavanya, Nagarajan Selvamurugan; Chitosan-based 3D-printed scaffolds for bone tissue engineering; *International Journal of Biological Macromolecules* (vol 183); 2021; 1925-1938
- [38] Longfei Zhou, Jenna Miller, Jeremiah Vezza, Maksim Mayster, Muhammad Raffay, Quentin Justice, Zainab Al Tamimi, Gavyn Hansotte, Lavanya Devi Sunkara, Jessica Bernat; Additive Manufacturing: A Comprehensive Review; *Sensors* (vol 24); 2024
- [39] Sampath Swetha, Krishnaraj Lavanya, R. Sruthi, Nagarajan Selvamurugan; An insight into cell-laden 3D-printed constructs for bone tissue engineering; *Journal of Materials Chemistry B* (vol 8); 2020; 9836-9862
- [40] Hairui Suo, Jiaying Zhang, Mingen Xu, Ling Wang; Low-temperature 3D printing of collagen and chitosan composite for tissue engineering; *Materials Science and Engineering C* (vol 123); 2021

- [41] Kateryna Bazaka, Oleg Baranov, Uroš Cvelbar, Bojan Podgornik, Youmei Wang, Shiyong Wang, Luxiang Xu, Jain Wei Mark Lim, Igor Levchenko, Shuyan Xu; Oxygen plasmas: a sharp chisel and handy trowel for nanofabrication; *Nanoscale* (vol 10); 2018; 17494-17511
- [42] Mehmet Onur Aydogdu, Ebru Toksoy Oner, Nazmi Ekren, Gokce Erdemir, Serap Erdem Kuruca, Esra Yuca, Muge Sennaroglu Bostan, Mehmet S. Eroglu, Fakhra Ikram, Muhammet Uzun, Oguzhan Gunduz; Comparative characterization of the hydrogel added PLA/ β -TCP scaffolds produced by 3D bioprinting; *Bioprinting* (articolo in stampa, riferimento: <https://doi.org/10.1016/j.bprint.2019.e00046>)
- [43] Muhammad Anwaar Nazeer, Ozgun Can Onder, Ilkem Sevgili, Emel Yilgor, Ibrahim Halil Kavakli, Iskender Yilgor; 3D printed poly(lactic acid) scaffolds modified with chitosan and hydroxyapatite for bone repair applications; *Materials Today Communications* (vol 25); 2020
- [44] Jianglin Wang, Mingying Yang, Ye Zhu, Lin Wang, Antoni P. Tomsia, Chuanbin Mao; Phage Nanofibers Induce Vascularized Osteogenesis in 3D Printed Bone Scaffolds; *Advanced Materials* (vol 26); 2014; 4961-4966
- [45] Chun-Hao Tsai, Chih-Hung Hung, Che-Nan Kuo, Cheng-Yu Chen, Yu-Ning Peng, Ming-You Shie; Improved Bioactivity of 3D Printed Porous Titanium Alloy Scaffold with Chitosan/Magnesium-Calcium Silicate Composite for Orthopaedic Applications; *Materials* (vol 12); 2019
- [46] Irina Alexandra Păun, Cosmin Cătălin Mustăciosu, Roxana Cristina Popescu, Bogdan Ștefăniță Călin, Mona Mihăilescu; Collagen/Chitosan Functionalization of Complex 3D Structures Fabricated by Laser Direct Writing via Two-Photon Polymerization for Enhanced Osteogenesis; *International Journal of Molecular Sciences* (vol 21); 2020
- [47] Anamarija Rogina, Lidija Pribolšan, Andrija Hanžek, Luis Gómez-Estrada, Gloria Gallego Ferrer, Inga Marijanović, Marica Ivanković, Hrvoje Ivanković; Macroporous poly(lactic acid) construct supporting the osteoinductive porous chitosan-based hydrogel for bone tissue engineering; *Polymer* (vol 98); 2016; 172-181
- [48] Xiangling Ye, Lihua Li, Zefeng Lin, Weiliang Yang, Mingyang Duan, Lingling Chen, Yuanjun Xia, Zepeng Chen, Yao Lu, Ying Zhang; Integrating 3D-printed PHBV/Calcium sulfate hemihydrate scaffold and chitosan hydrogel for enhanced osteogenic property; *Carbohydrate Polymers* (vol 202); 2018; 106-114
- [49] Mima Kurian, Ross Stevens, Kathryn M McGrath; Towards the development of Artificial Bone Grafts: Combining Synthetic Biomineralisation with 3D Printing; *Journal of Functional Biomaterials* (vol 10); 2019

- [50] I-Hsin Liu, Shih-Hsin Chang, Hsin-Yi Lin; Chitosan-based hydrogel tissue scaffolds made by 3D plotting promotes osteoblast proliferation and mineralization; *Biomedical Materials* (vol 10); 2015
- [51] Hsin-Yi Lin, Hung-Yi Huang, Sheng-Jie Shiue, Jen-Kun Cheng; Osteogenic effects of inductive coupling magnetism from magnetic 3D printed hydrogel scaffold; *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* (vol 504); 2020
- [52] Yifan Dong, Jinning Liang, Yihang Cui, Shan Xu, Naru Zhao; Fabrication of novel bioactive hydroxyapatite-chitosan-silica hybrid scaffolds: Combined the sol-gel method with 3D plotting technique; *Carbohydrate Polymers* (vol 197); 2018; 183-193
- [53] Chenyi Zhu, Yudong Jia, Yanfeng Tang, Chaowei Guo, Jianing Xi, Chaojun Sun, Hongjun Li, Wenlong Wang, Yuankun Zhai, Yingjie Zhu, Youwen Liu; Functionalized chitosan hydrogel promotes osseointegration at the interface of 3D printed titanium alloy scaffolds; *International Journal of Biological Macromolecules* (vol 266); 2024
- [54] Nafiseh Jirofti, Maryam Hashemi, Ali Moradi, Fatemeh Kalalinia; Fabrication and characterization of 3D printing biocompatible crocin-loaded chitosan/collagen/hydroxyapatite-based scaffolds for bone tissue engineering applications; *International Journal of Biological Macromolecules* (vol 252); 2023
- [55] Zhihua Liu, Jinnan Shi, Lingying Chen, Xiaoyu He, Yiyong Weng, Xiaoyan Zhang, Da-Peng Yang, Haiming Yu; 3D printing of fish-scale derived hydroxyapatite/chitosan/PCL scaffold for bone tissue engineering; *International Journal of Biological Macromolecules* (vol 274); 2024
- [56] Kalimuthu Balagangadharan, Selvaraj Dhivya, Nagarajan Selvamurugan; Chitosan based nanofibers in bone tissue engineering; *International Journal of Biological Macromolecules* (vol 104); 2017; 1372-1382
- [57] Kai Li, Hailang Sun, Haitao Sui, Yongxing Zhang, He Liang, Xiaofeng Wu, Qinghua Zhao; Composite mesoporous silica nanoparticle/chitosan nanofibers for bone tissue engineering; *RSC Advances* (vol 5); 2015; 17541-17549
- [58] Hua Liu, Wenling Li, Wei Wen, Binghong Luo, Mingxian Liu, Shan Ding, Changren Zhou; Mechanical properties and osteogenic activity of poly(L-lactide) fibrous membrane synergistically enhanced by chitosan nanofibers and polydopamine layer; *Materials Science & Engineering C* (vol 81); 2017; 280-290
- [59] Ming-Hua Ho, Mei-Hsiu Liao, Yi-Ling Lin, Chien-Hao Lai, Pei-I Lin, Ruei-Ming Chen; Improving effects of chitosan nanofiber scaffolds on osteoblast proliferation and maturation; *International Journal of Nanomedicine* (vol 9); 2014; 4293-4304

- [60] Prasad Vaidya, Tijana Grove, Kevin J Edgar, Aaron S Goldstein; Surface grafting of chitosan shell, polycaprolactone core fiber meshes to confer bioactivity; *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* (vol 30); 2015; 258-274
- [61] Seda Surucu, Hilal Turkoglu Sasmazel; Development of core-shell coaxially electrospun composite PCL/chitosan scaffolds
- [62] Sai Zhang, Molamma P. Prabhakaran, Xiaohong Qin, Seeram Ramakrishna; Biocomposite scaffolds for bone regeneration: Role of chitosan and hydroxyapatite within poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate on mechanical properties and in vitro evaluation; *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* (vol 51); 2015; 88-98
- [63] S Shree Ganesh, Ramprasad Anushikaa, Venkadesan Sri Swetha Victoria, Krishnaraj Lavanya, Abinaya Shanmugavadivu, Nagarajan Selvamurugan; Recent Advancements in Electrospun Chitin and Chitosan Nanofibers for Bone Tissue Engineering Applications; *Journal of Functional Biomaterials* (vol 14); 2023
- [64] Ting Xu, Hongyang Yang, Dongzhi Yang, Zhong-Zhen Yu; Polylactic Acid Nanofiber Scaffold Decorated with Chitosan Islandlike Topography for Bone Tissue Engineering; *ACS Applied Materials & Interfaces* (vol 9); 2017; 21094-21104
- [65] Dorina Lauritano, Luisa Limongelli, Giulia Moreo, Gianfranco Favia, Francesco Carinci; Nanomaterials for Periodontal Tissue Engineering: Chitosan-Based Scaffolds. A Systematic Review; *Nanomaterials* (vol 10); 2020
- [66] Hongyu Gao, Nan Wu, Nini Wang, Jie Li, Jie Sun, Qiang Peng; Chitosan-based therapeutic systems and their potentials in treatment of oral diseases; *Journal of Biological Macromolecules* (vol 222); 2022; 3178-3194
- [67] Diego G. Miranda, Sônia M. Malmonge, Doris M. Campos, Nina G. Attik, Brigitte Grosogeat, Kerstin Gritsch; A chitosan-hyaluronic acid hydrogel scaffold for periodontal tissue engineering; *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* (vol 104); 2016
- [68] Teerawat Sukpaita, Suwabun Chirachancha, Pornchanok Suwattanachai, Vincent Everts, Atiphan Pimkhaokham, Ruchanee Salingcarnboriboon Ampornaramveth; In Vivo Bone Regeneration Induced by a Scaffold of Chitosan/Dicarboxylic Acid Seeded with Human Periodontal Ligament Cells; *International Journal of Molecular Sciences* (vol 20); 2019
- [69] M. Nivedhitha Sundaram, Srinivasan Sowmya, Subrahmanian Deepthi, Joel D. Bumgardener, Rangasamy Jayakumar; Bilayered construct for simultaneous regeneration of alveolar bone and periodontal ligament; *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* (vol 104); 2016; 761-770

- [70] Menemşe Gümüşderelioğlu, Elif Sunal, Tuğrul Tolga Demirtaş, Arlin S. Kiremitçi; Chitosan-based double-faced barrier membrane coated with functional nanostructures and loaded with BMP-6; *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* (vol 31); 2020
- [71] Tuğba Duruel, Anıl Sera Çakmak, Abdullah Akman, Rahime M. Nohutcu, Menemşe Gümüşderelioğlu; Sequential IGF-1 and BMP-6 releasing chitosan/alginate/PLGA hybrid scaffolds for periodontal regeneration; *International Journal of Biological Macromolecules* (vol 104); 2017; 232-241
- [72] Wanghan Xu, Wei Tan, Chan Li, Keke Wu, Xinyi Zeng, Liwei Xiao; Metformin-loaded β -TCP/CTS/SBA-15 composite scaffolds promote alveolar bone regeneration in a rat model of periodontitis; *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* (vol 32); 2021