



*Università degli Studi di Padova. Dipartimento di Istologia,
Microbiologia e Biotecnologie Mediche.*

Dr. R. Cortivo Prof. G. Abatangelo

Produzione di nano particelle di HYAFF mediante antisolvente gassoso ad alta pressione

Utilizzo di fluidi supercritici come antisolventi gassoso



Tecnica GAS



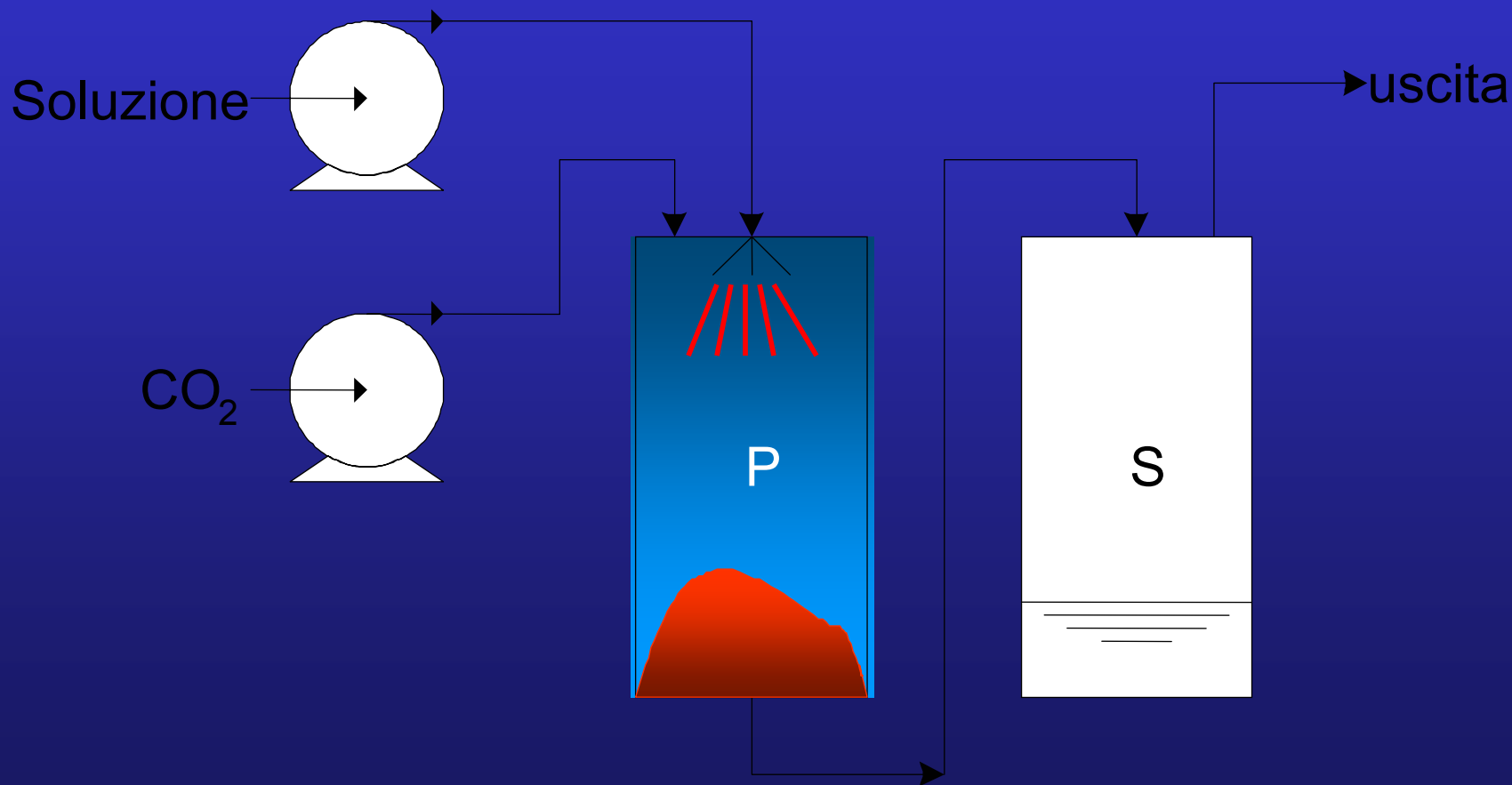
sfrutta il potere antisolvente della CO₂ per la
precipitazione di microparticelle a partire da soluzioni
organiche

Vantaggi uso CO₂:

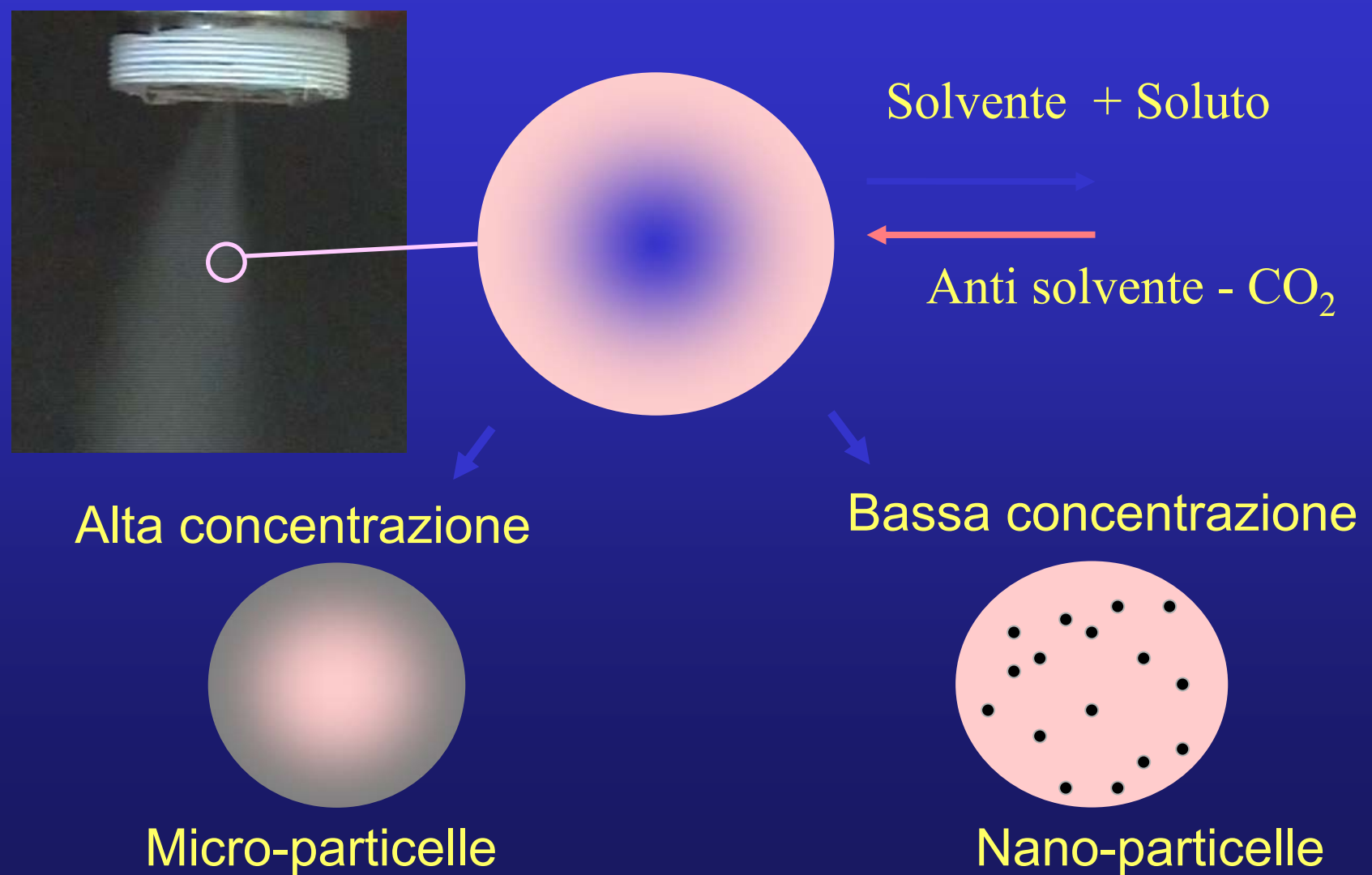
- Non pericoloso per l'uomo e per l'ambiente
- Economicamente conveniente
- Non permane nel prodotto finale

La precipitazione con antisolvente supercritico (CO₂), richiede l'utilizzo di un soluto solubile in un solvente organico ma insolubile nell'anidride carbonica supercritica ed il solvente organico e l'anidride carbonica devono essere completamente miscibili.

Processo GAS



Precipitazione AntiSolvente



Impianto pilota



Laboratorio alte pressioni - DIPIC

Nano/Microsfere e fattori di crescita

Drug delivery nella rigenerazione tissutale



Utilizzo di Fattori di crescita



Promuovere migrazione, proliferazione cellulare, differenziamento, angiogenesi

Rilascio controllato con microsfere a base di materiali biodegradabili

Vantaggi:

Rilascio graduale

Presenza temporanea: Nessuna reazione da parte dell'ospite

L'estere benzilico dell'acido ialuronico presenta la seguenti caratteristiche:

- è un materiale biocompatibile e biodegradabile.**
- interagisce con numerose proteine trattenendole in maniera stabile in condizioni fisiologiche.**
- le proteine adsorbite sul polimero vengono rilasciate durante la sua degradazione.**

Principali fattori di crescita utilizzati

PDGF: platelet derived growth factor.

**Coinvolto nel processo della
riparazione tissutale nella fase della
rivascolarizzazione**

TGF β : transforming growth factor β .

**Coinvolto nel processo della
riparazione tissutale nella fase della
riepitelizzazione**

Preparazione di particelle Hyaff con PDGF/TGF- β

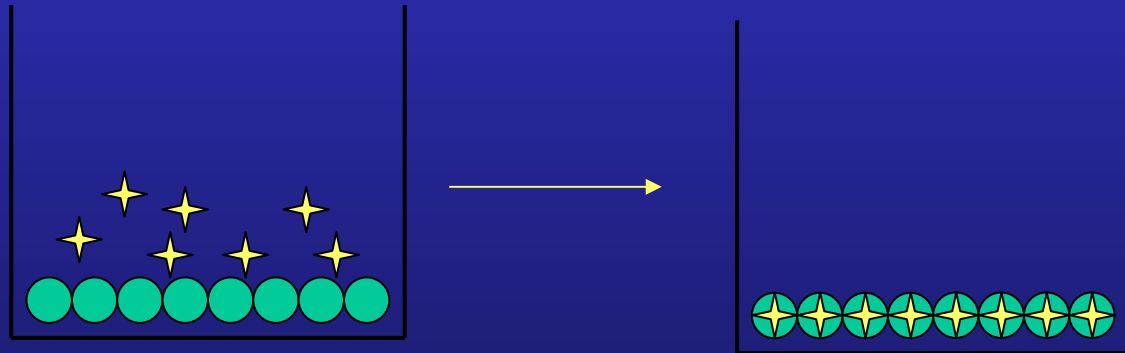
1: miscelazione di polimero e PDGF/TGF- β e successiva formazione di particelle

2: adsorbimento del PDGF/TGF- β per contatto con le particelle

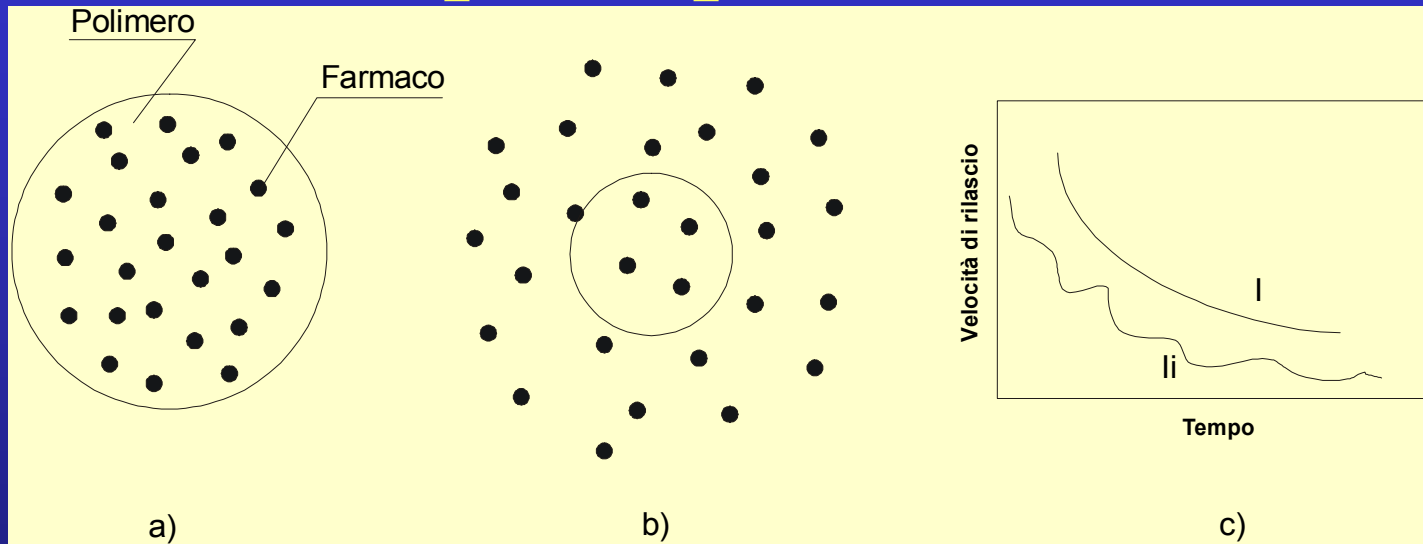
**l'adsorbimento del PDGF/TGF- β per
contatto permette la penetrazione della
citochina**

Caricamento delle microparticelle con i fattori di crescita

Assorbimento:

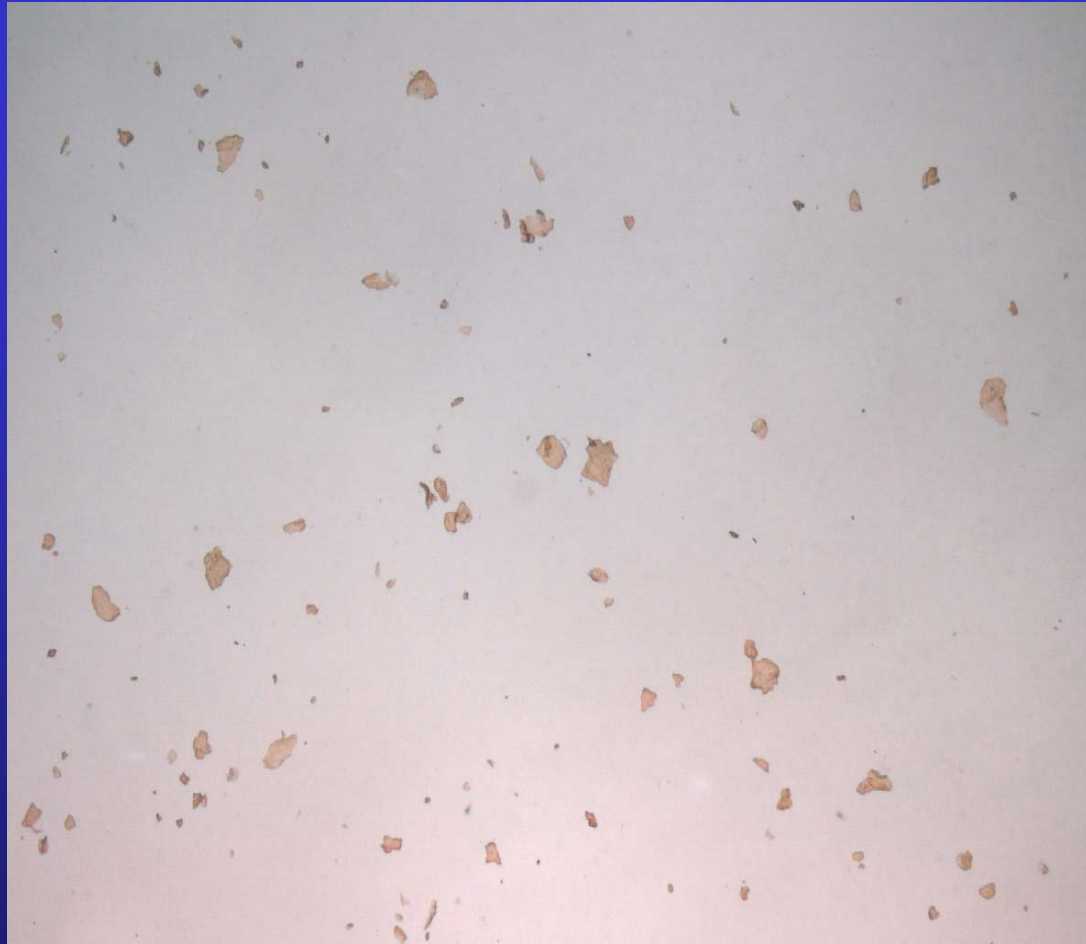


Sistemi particellari per rilascio di principi attivi



Sistema a rilascio chimico per degradazione del polimero:

- a) sistema iniziale;*
- b) sistema durante il rilascio;*
- c) andamento della velocità di rilascio.*



*Particelle di Hyaff impregnate di TGF- β
rilevato mediante reazione
immunoistochimica*

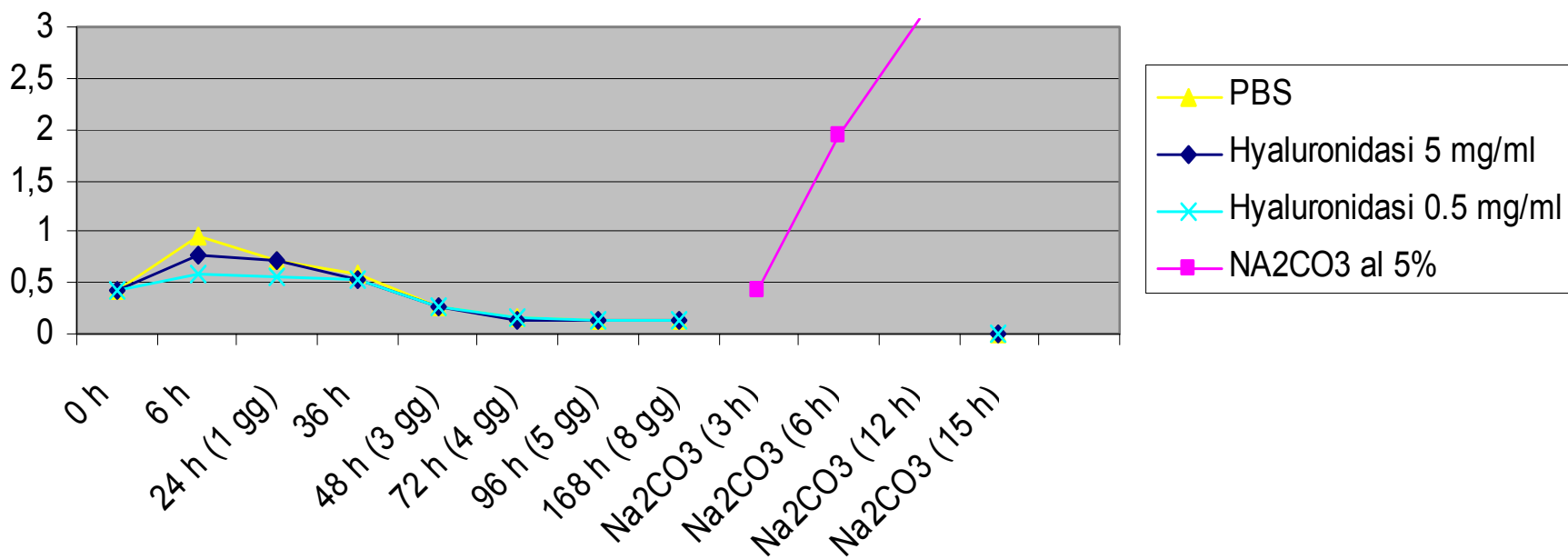
RILASCIO DEL COLORANTE NEL TEMPO

Campioni colorati con Blue di Metilene sono stati posti sotto agitazione alla temperatura di 37°C in:

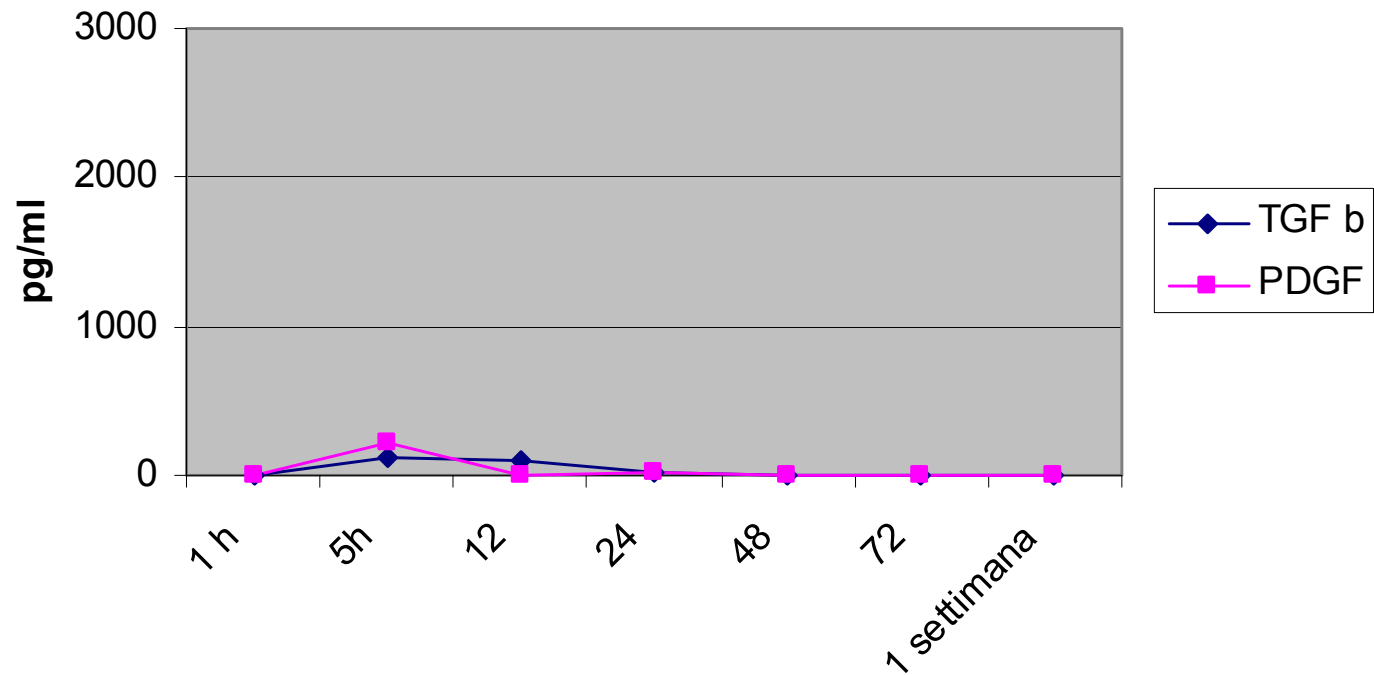
- acqua
- PBS
- Ialuronidase 0,5%
- Ialuronidase 5%
- carbonato di sodio 5%

Ogni 24 h sono stati effettuati dei prelievi del supernatante fino a 8 giorni. Successivamente è stato utilizzato il carbonato di sodio al 5% e sono stati effettuati prelievi ogni 3 ore.

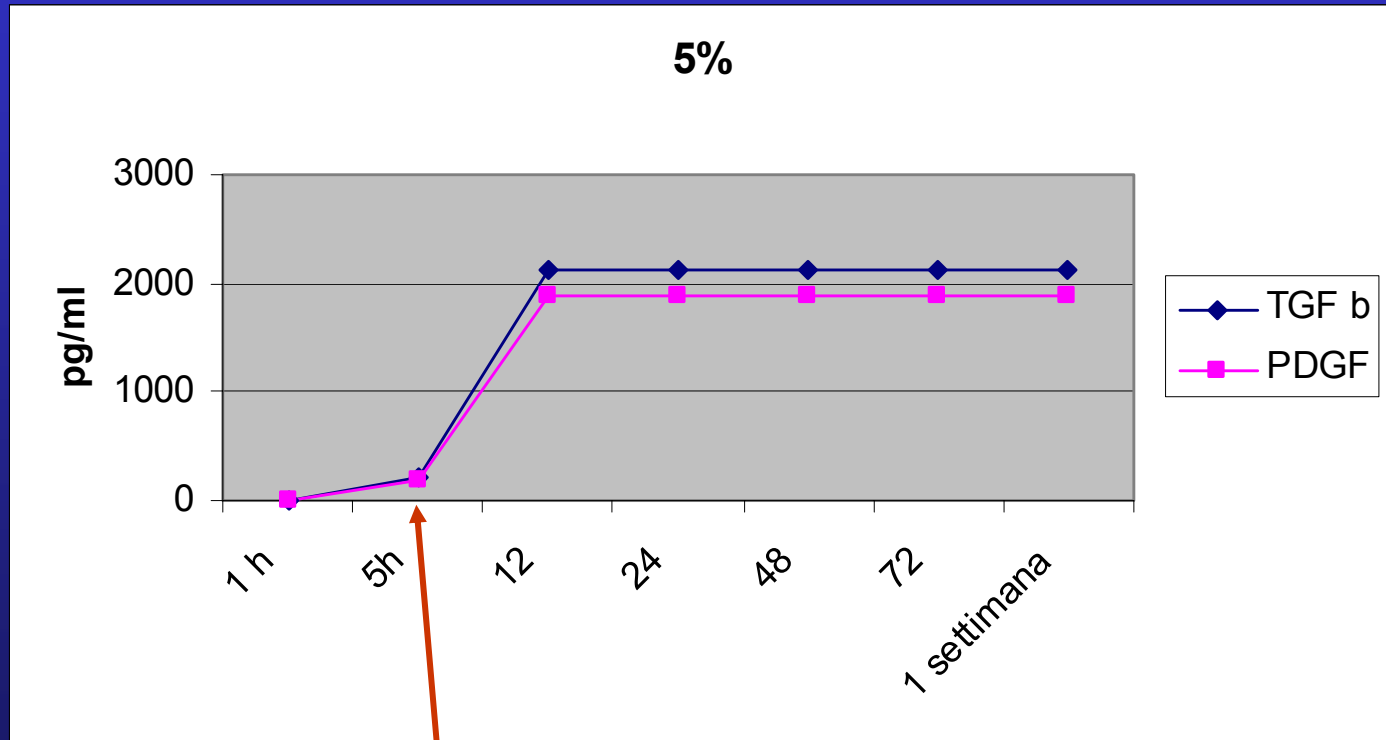
Rilascio di blu di toluidina



Dosaggio del fattore di crescita rilasciato dalle microsfele in terreno di coltura (DMEM +FCS). Metodo ELISA

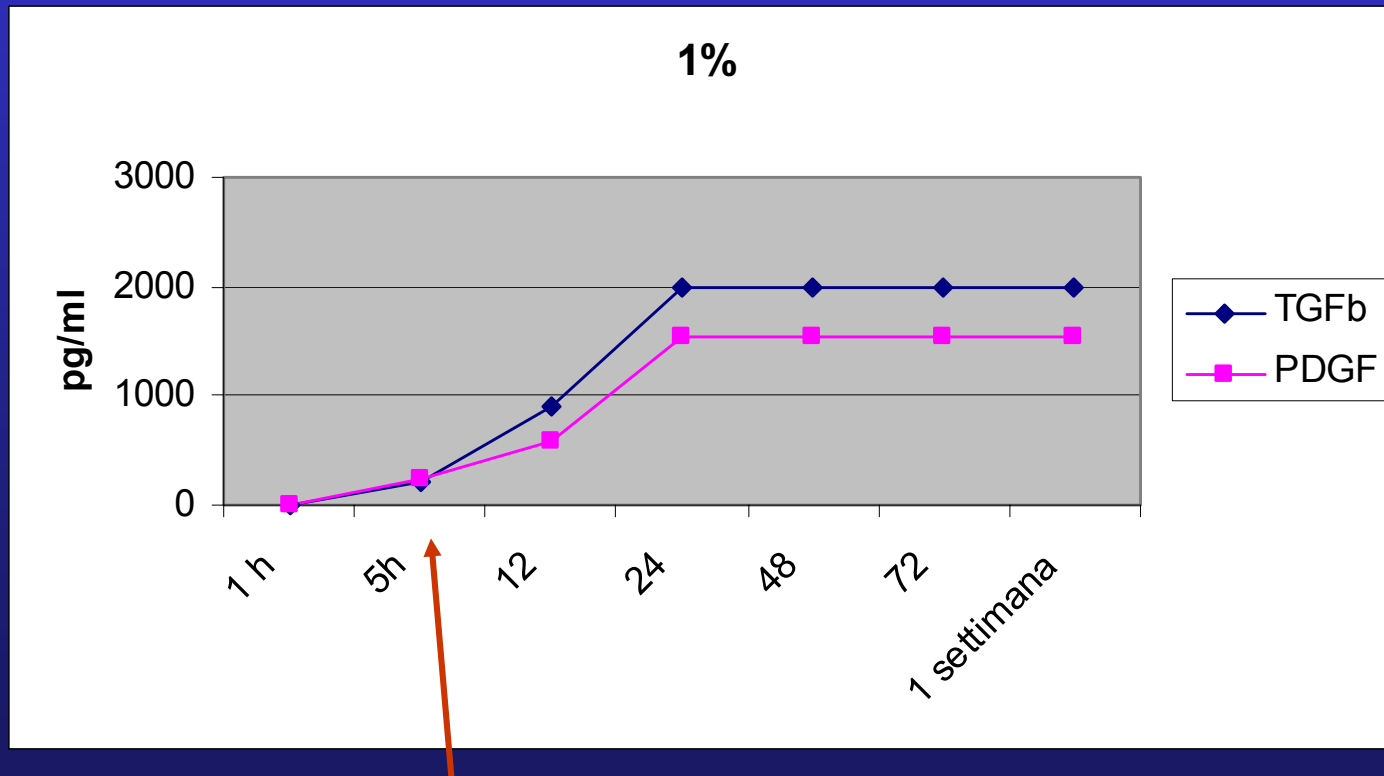


Dosaggio del fattore di crescita rilasciato dalle microsfere in terreno di coltura (DMEM +FCS) addizionato di Sodio Carbonato al 5%. Metodo ELISA



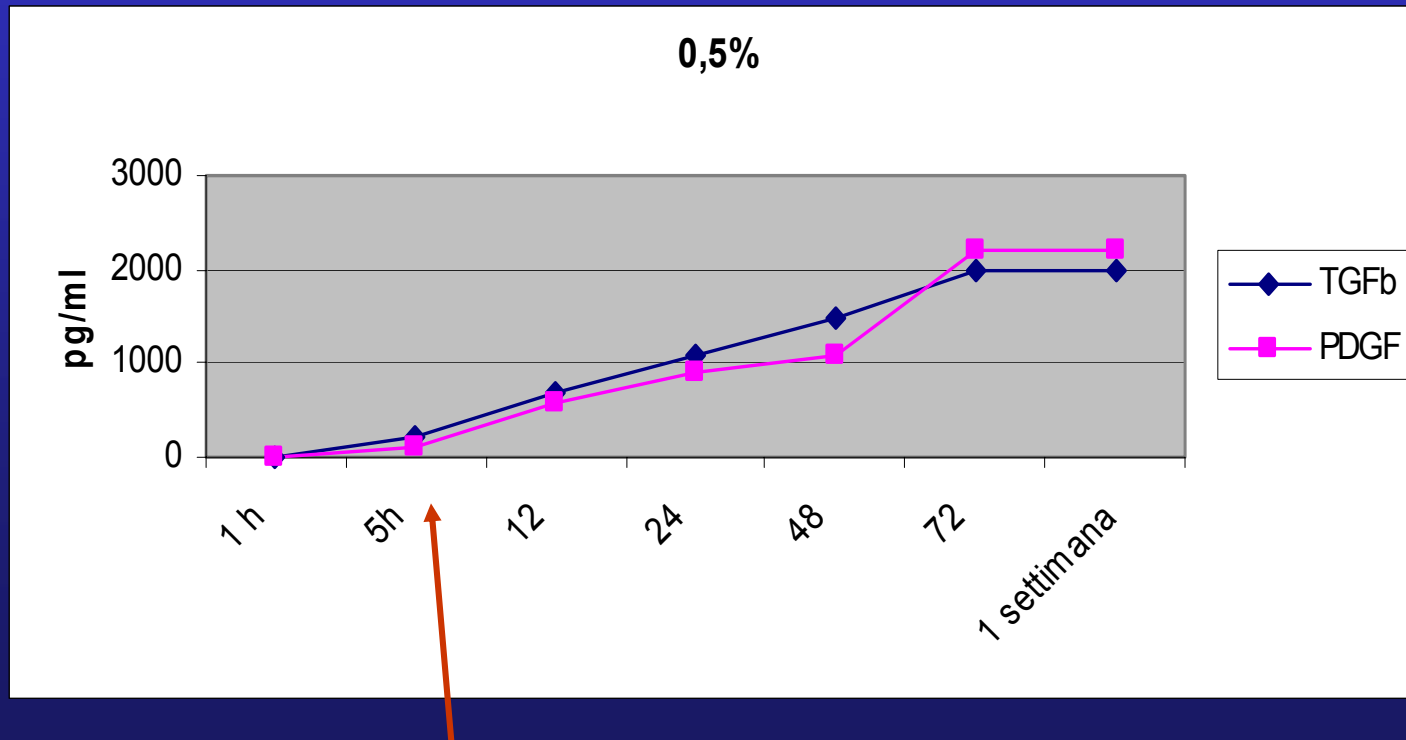
Aggiunta carbonato di sodio al 5%

Dosaggio del fattore di crescita rilasciato dalle microsfere in terreno di coltura (DMEM +FCS) addizionato di Sodio Carbonato al 1%.
Metodo ELISA

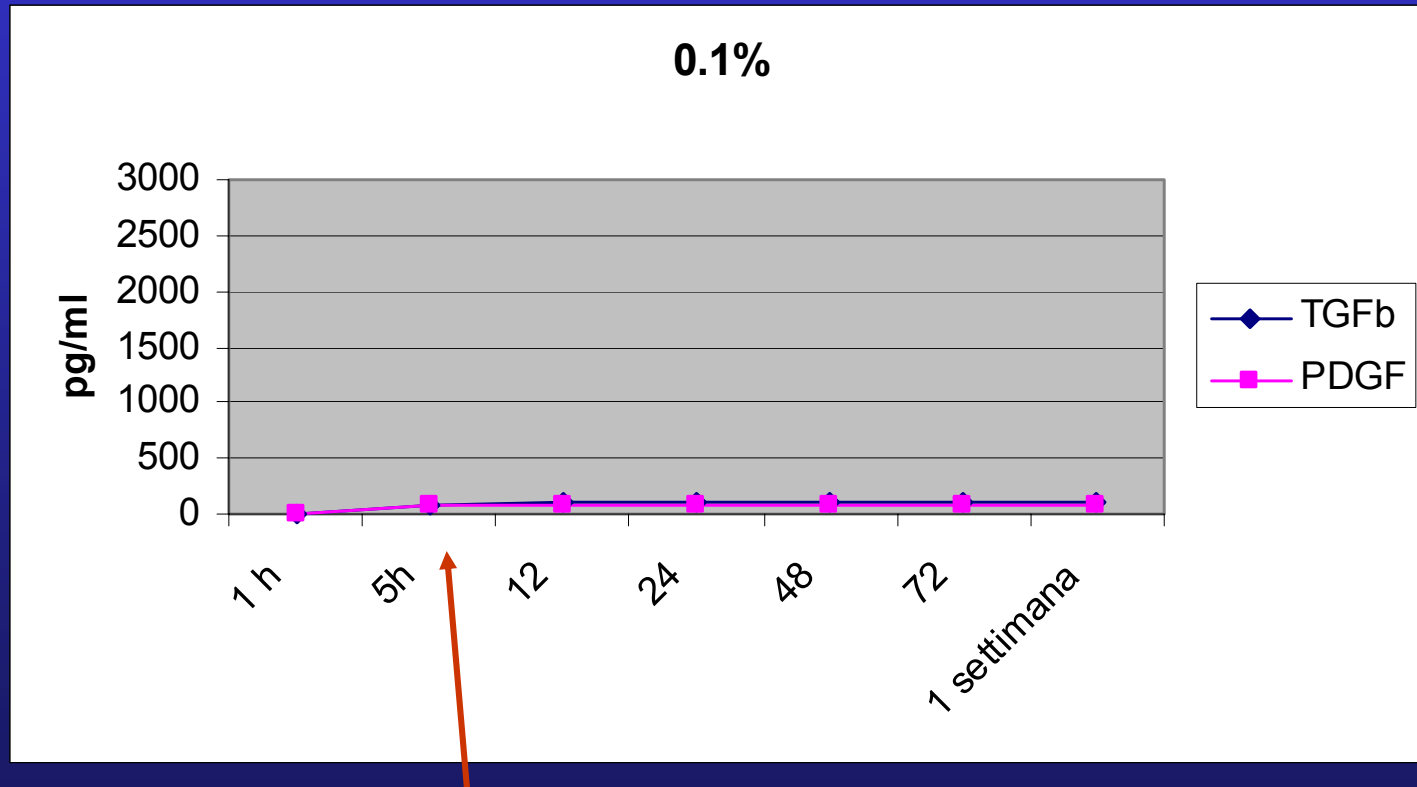


Aggiunta carbonato di sodio al 1%

Dosaggio del fattore di crescita rilasciato dalle microsfere in terreno di coltura (DMEM +FCS) addizionato di Sodio Carbonato al 0.5%.
Metodo ELISA



Dosaggio del fattore di crescita rilasciato dalle microsfere in terreno di coltura (DMEM +FCS) addizionato di Sodio Carbonato al 0.1%.
Metodo ELISA



Aggiunta carbonato di sodio al 0.1%

Variazioni pH nel mezzo

pH DMEM completo → 7.2

+ NaCO₃ 5% → 10.2

+ NaCO₃ 1% → 9.9

+ NaCO₃ 0.5% → 9.6

+ NaCO₃ 0.1% → 8.6

Ambiente tossico
per le cellule

Sperimentazione su modello animale

Modello animale: 6 ratti adulti (Wistar) sacrificati a 7, 14 e 21 giorni dall'intervento

Tipo di lesione: ferita superficiale (2 X 2 cm) praticata con dermatomo sul dorso dell'animale (spessore 5 mm)

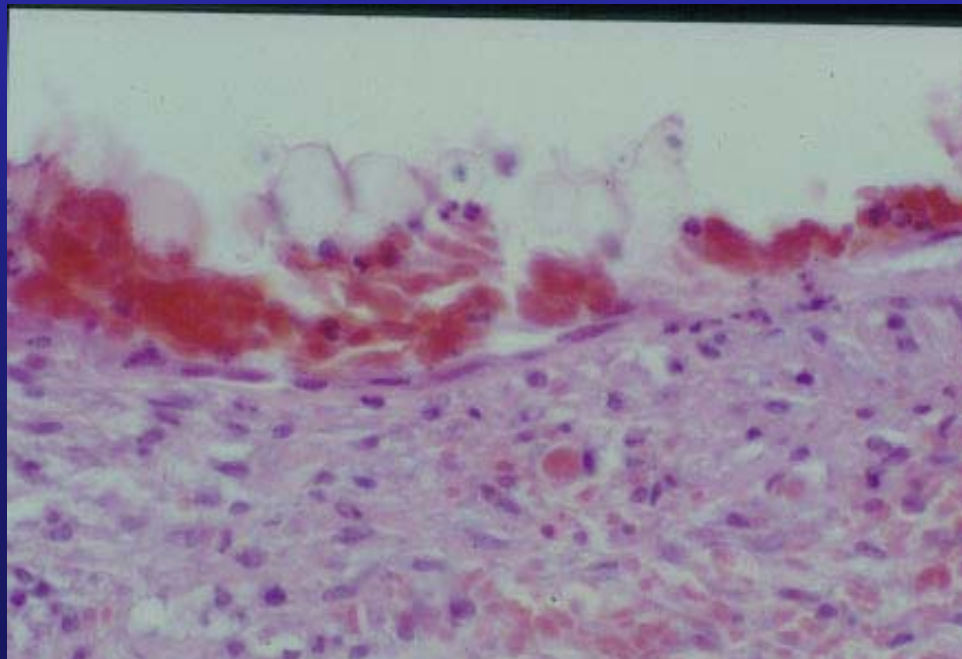
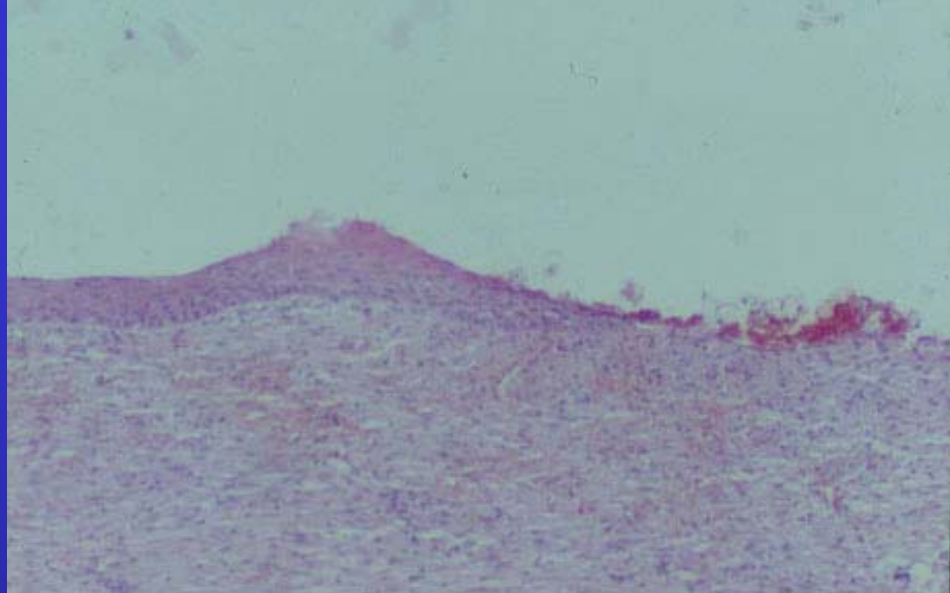
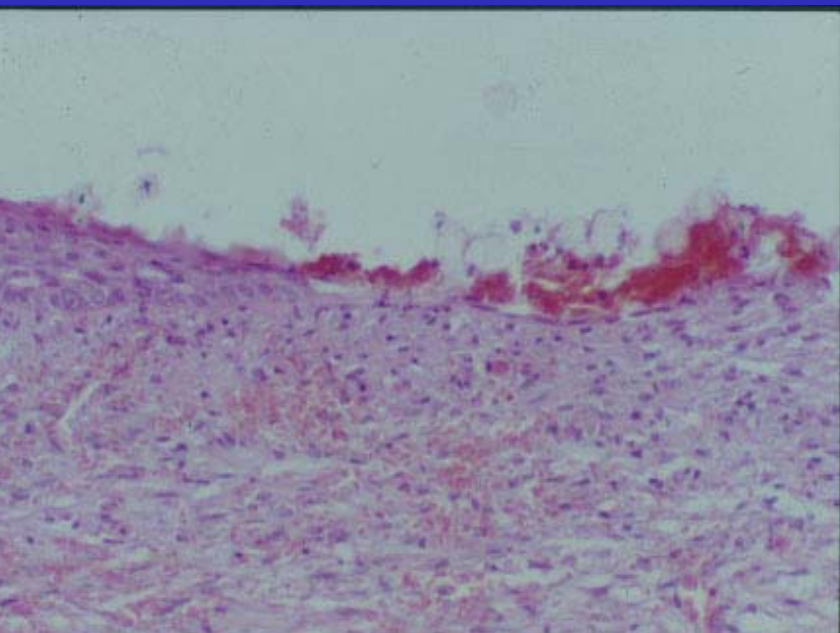
Tipo di trattamento: applicazione ogni 3 giorni di 1 ml di gel di acido ialuronico contenente microparticelle (2 mg / ml) caricate con PDGF 0,01%

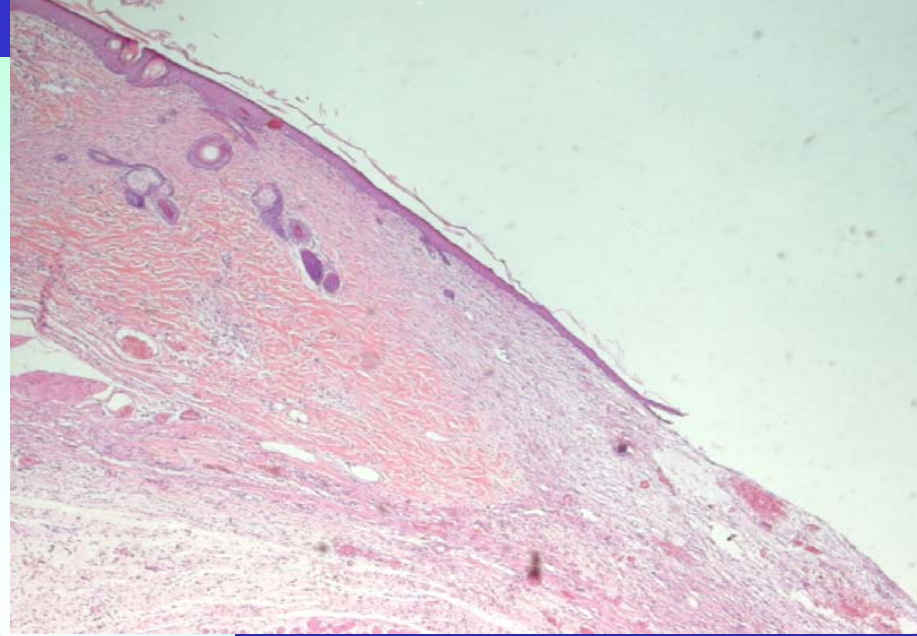
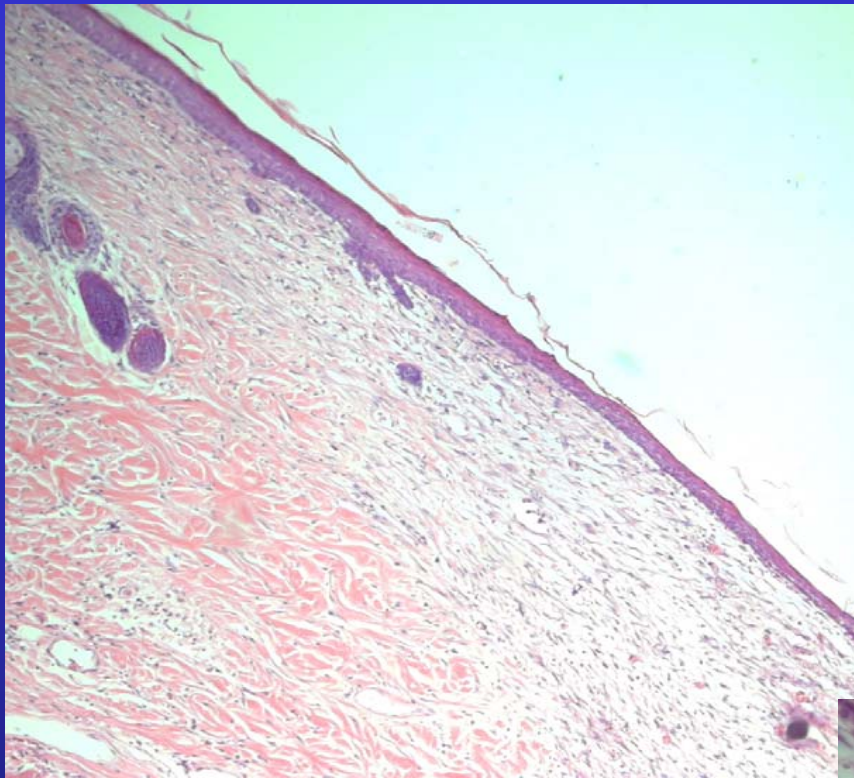
Sperimentazione su modello animale

L'intera area della ferita è stata asportata e divisa in due metà.

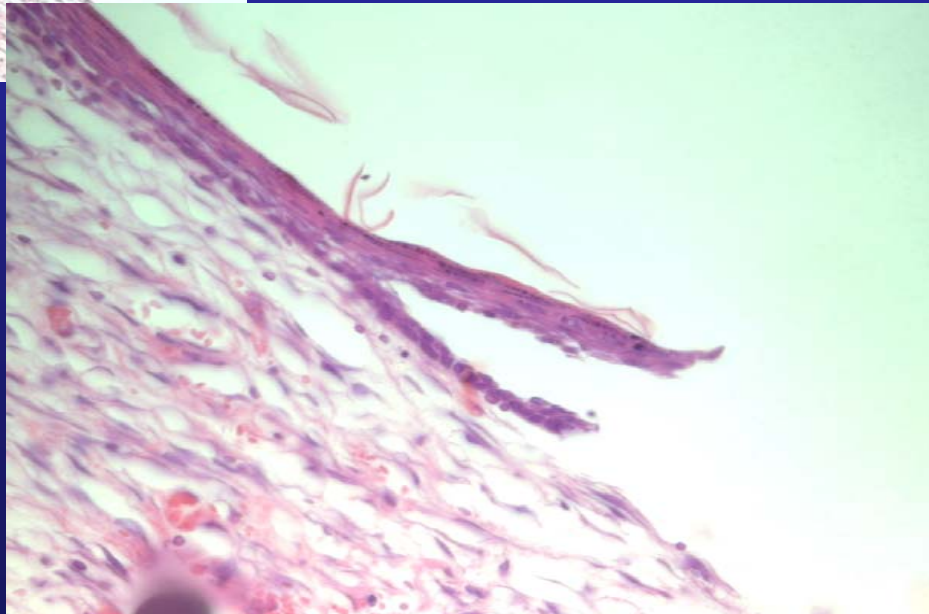
Dopo inclusione in paraffina, le fette sono state colorate con ematossilina/eosina per misurare la velocità di migrazione delle cellule a partire dai bordi sani.

A 7, 14, 21 giorni è stata misurata la distanza percorsa dall'epitelio neoformato.

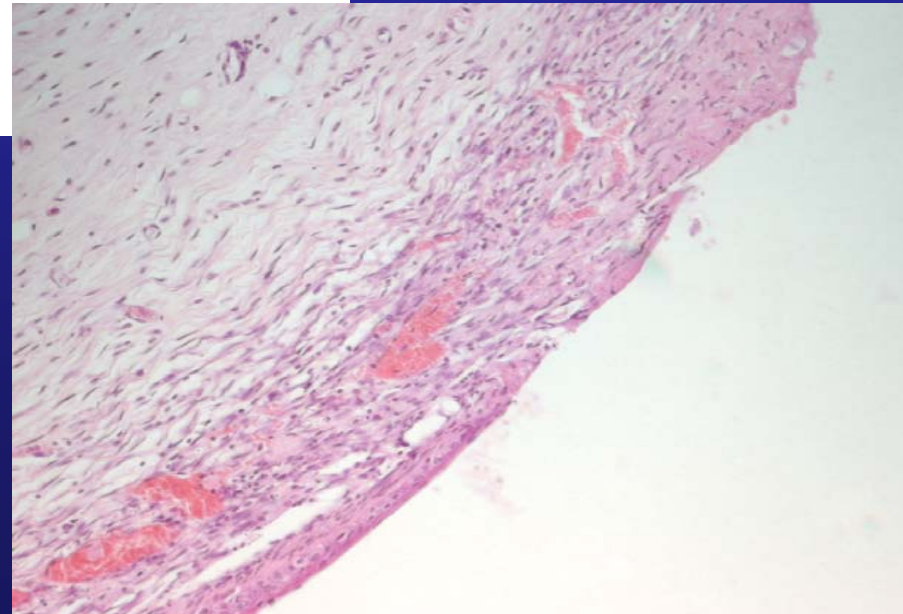
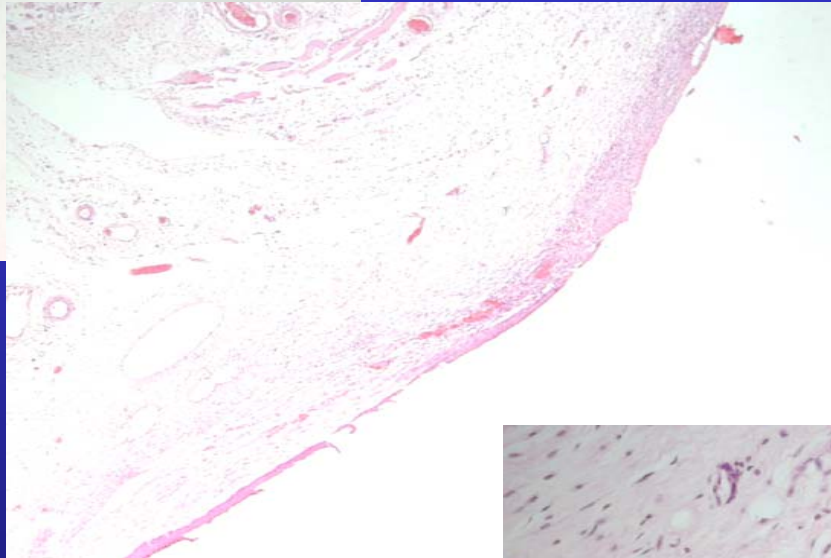
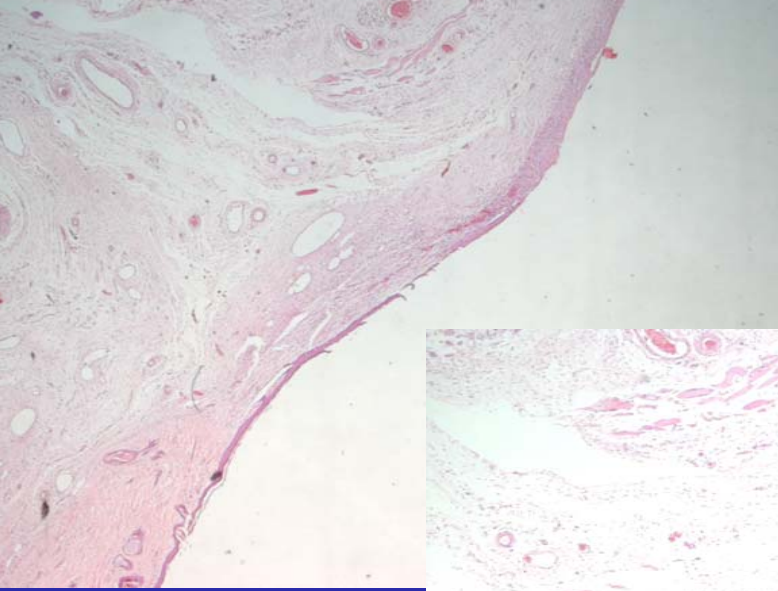




Controllo 7 giorni



Trattato 7 giorni



giorni	Controllo (migrazione cm)	Trattato (migrazione cm)
7	0.5	0.7
14	0.7	1.0
21	1.0	1.0

Sperimentazione sull'uomo

**Utilizzo delle microsfere caricate con PDGF
per la cura di ulcere diabetiche**

**Ulcere diabetiche di diametro inf. a 5 cm di 5
pazienti che sono stati trattati per 1 mese
con applicazioni ogni 3 giorni di GEL di
acido ialuronico contenente le microsfere
caricate con PDGF al 0.01 %**

LE NANOTECNOLOGIE

I risultati preliminari hanno evidenziato una stimolazione del processo di riepitelizzazione delle ulcere.

Durata della lesione (mesi)	Sede	Tempo di guarigione (settimane)
5	Plantare	5
3	I dito piede	4
8	Plantare	6
2	Moncone avampiede	4
3	Moncone avampiede	4
4	Malleolare interna	6

