



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

FACOLTÀ DI INGEGNERIA

DIPARTIMENTO DI PROCESSI CHIMICI DELL'INGEGNERIA

Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria dei Materiali

TESI DI LAUREA

**MATRICI ELETTROFILATE PER SOSTITUTI VASCOLARI DI
PICCOLO CALIBRO: FUNZIONALIZZAZIONE COVALENTE E
INCLUSIONE DI SEQUENZE ADESIVE A CONFRONTO**

*Electrospun scaffolds for small-diameter vascular substitutes:
comparison between covalent grafting and inclusion of adhesive sequences*

Relatore: Prof.ssa Monica Dettin

Correlatore: Dott.ssa Roberta Danesin

Laureando: Paolo Pontini

Matr. n. 602818-IR

Anno Accademico 2010/2011

Alla mia famiglia

- SOMMARIO –

- SOMMARIO – I

1. INTRODUZIONE 1

1.1 NECESSITÀ DI VASI SANGUIGNI DI PICCOLO CALIBRO 1

1.2 VASI SANGUIGNI NATURALI 2

1.2.1 Angiogenesi 2

1.2.2 Tipi di vasi sanguigni 3

1.2.3 Tessuti vascolari 5

1.2.3.1 Tessuto endoteliale 5

1.2.3.2 Tessuto muscolare 7

1.2.3.3 Tessuto connettivo 8

1.3 SOSTITUTI VASCOLARI DI PICCOLO CALIBRO 9

1.3.1 Requisiti di un sostituto vascolare 9

1.3.1.1 Matrici naturali 11

1.3.1.2 Matrici sintetiche 12

1.3.1.3 Matrici composite: combinazioni di biomateriali e copolimeri 14

1.3.1.4 Matrici biomimetiche 15

1.3.2 Effetti della struttura dello *scaffold* 19

1.3.2.1 Effetti della irradiazione UV sullo *scaffold* polimerico 20

1.3.3 Effetti delle condizioni di coltura *in vitro* e *in vivo* 22

1.3.3.1 Recenti sviluppi della rigenerazione vascolare *in vivo* per sostituti biorassorbibili 23

1.4 SCAFFOLD ELETTROFILATI 24

1.4.1 Acido polilattico, poli(ϵ -caprolattone) e loro copolimeri 25

1.5 SCOPO DELLA TESI 31

2. METODI 34

2.1 SINTESI PEPTIDICA SU FASE SOLIDA (SPPS) 34

2.1.1 Conversione dei gruppi laterali ammino in azido 36

2.1.2 Sblocco del peptide dalla resina e rimozione del gruppo Fmoc 39

2.2 CROMATOGRAFIA LIQUIDA IN FASE INVERSA (RP-HPLC) 40

2.3 SPETTROMETRIA DI MASSA (MS) 43

2.4 ELECTROSPINNING 46

2.4.1	Il processo	48
2.4.1.1	Tipi di collettore	52
2.4.1.2	Nuovi apparecchi per electrospinning.....	53
2.4.2	Parametri di processo	54
2.4.2.1	Proprietà della soluzione polimerica.....	54
2.4.2.2	Electrospinning setup	56
2.4.2.3	Condizioni ambientali.....	57
2.4.3	Applicazioni dell'electrospinning	58
2.5	MICROSCOPIO ELETTRONICO A SCANSIONE (SEM)	59
2.6	XPS	62
2.7	MISURE DI ANGOLO DI CONTATTO	63
2.8	SAGGI <i>IN VITRO</i>	64
2.8.1	Test di vitalità cellulare: <i>MTT Test</i>	67
2.9	T-TEST DI STUDENT	69
3.	PARTE SPERIMENTALE	72
3.1	MATERIALI	72
3.2	STRUMENTAZIONE.....	73
3.3	RISULTATI E DISCUSSIONE	76
3.3.1	Purificazione dei peptidi.....	76
3.3.2	Preparazione degli <i>scaffold</i> elettrofilati.....	79
3.3.2.1	<i>Electrospinning</i>	79
3.3.2.2	<i>Analisi morfologica al SEM</i>	80
3.3.2.3	<i>Preparazione dei dischetti</i>	83
3.3.3	Analisi XPS e misure di angolo di contatto sugli <i>scaffold</i> condizionati con peptide 2N3RGD.....	86
3.3.4	Cinetica di rilascio del peptide (GRGDSP) ₄ K dalla matrice di PCL.....	89
3.3.5	Coltura di cellule endoteliali	91
3.3.6	Saggi di adesione/proliferazione HUVEC su <i>scaffold</i> elettrofilati di P(LLA-CL) e di PCL funzionalizzati con motivi adesivi RGD	93
5.	CONCLUSIONI	104
	- BIBLIOGRAFIA -	107
	- RINGRAZIAMENTI -	114

1. INTRODUZIONE

1.1 NECESSITÀ DI VASI SANGUIGNI DI PICCOLO CALIBRO

Secondo un recente studio statistico dell'*American Health Association*, le sole malattie cardiovascolari sono responsabili del 34% delle morti negli Stati Uniti d'America. Un'altra stima riferisce che 1 nuovo nato su 100 è affetto da malattie congenite dell'apparato cardiovascolare, pari a 36 mila bambini all'anno. La cura di tali patologie necessita di sostituti vascolari, che possono essere sintetici o biologici.

A seconda delle esigenze, cambiano i materiali utilizzati in campo clinico, come evidenziato dallo schema riportato nella Figura 1.

<i>Vascular substitute choice</i>	Vascular regions				
	Large-caliber arteries (≥ 8 mm)	Medium-caliber arteries (6-8 mm)	Small-caliber arteries (≤ 6 mm)	Venous reconstructions	Hemodialysis arterio-venous access
	Aorta, arch vessels, iliac and common femoral arteries	Carotid, subclavian, common femoral, visceral and above-the-knee arteries	Coronary, below-the-knee, tibial and peroneal arteries	Superior and inferior vena cava, ilio-femoral veins, portal vein, visceral veins	Upper > lower extremity
<i>1st choice</i>	Prosthesis (Dacron, ePTFE)	Prosthesis or autograft (equal)	Arterial or venous autograft	Saphenous spiral vein graft, deep venous autograft	Native material
<i>2nd choice</i>	Allograft, deep venous autograft	Prosthesis or autograft	Composite graft, vein interposition, prosthesis (ePTFE, Dacron), allograft, biosynthetic	Allografts, ePTFE, Dacron, biografts	ePTFE, PU, xenografts, biografts, TEBV (clinical trial)

ePTFE (expanded polytetrafluoroethylene), PU (polyurethane), TEBV (totally-engineered blood vessels).

Figura 1: Uso clinico dei sostituti vascolari¹ [1]

Il trattamento di malattie cardiovascolari con sostituti autologhi rimane una valida opzione; a tal fine si impiegano la vena safena, l'arteria mammaria interna o l'arteria radiale. Tuttavia il loro uso può essere limitato da malattie concomitanti, amputazioni o da zone a scarsa qualità tessutale. Inoltre possono insorgere complicazioni derivanti da interventi chirurgici multipli. Per questi motivi è sempre più opportuno e a volte necessario utilizzare sostituti artificiali.

In particolare il successo dei sostituti vascolari di diametro maggiore di 6 mm in materiali quali DacronTM (PET) o TeflonTM (PTFE) è ormai associato. Al contrario, la maggioranza dei

¹ *Autograft* sono sostituti autologhi, *allograft* sono sostituti provenienti da altri essere umani (ad es. da un cordone ombelicale), *xenograft* sono sostituti provenienti da specie animali, *biosynthetic graft* o *biograft* sono sostituti trattati con cellule endoteliali o resi biomimetici (con proteine/peptidi), *composite graft* sono qui intesi come misti biologici-naturali innestati tra loro, *vein interposition* è l'utilizzo di vene per collegare due vasi, *TEBV* sono vasi biorassorbibili pre-trattati con cellule endoteliali

condotti vascolari di diametro più piccolo fallisce entro 5 anni, in conseguenza dell'aumento del numero di cellule che costituiscono la parete interna del vaso (iperplasia dell'intima) o della formazione di placche sulla sua superficie interna (degenerazioni arteriosclerotiche), con conseguente restringimento (stenosi), indurimento (sclerosi) ed occlusione del vaso stesso.

L'utilizzo di vasi sanguigni realizzati con questi materiali è perciò limitato ai casi in cui vi siano flussi elevati e a condizioni di bassa resistenza. Le caratteristiche da migliorare per un impiego più ampio comprendono:

- scarsa elasticità e cedevolezza al flusso ematico (compliance);
- trombogenicità delle superfici;
- impossibilità ad accogliere la crescita di nuove cellule.

Da quanto detto, è quindi evidente l'importanza di mettere a punto sostituti appropriati di vasi di piccolo calibro [1,2, 4].

1.2 VASI SANGUIGNI NATURALI

1.2.1 Angiogenesi

In natura esistono tre diversi processi coinvolti nella formazione del letto vascolare:

1. vasculogenesi (formazione di vasi a partire da cellule staminali durante lo sviluppo embrionale);
2. angiogenesi (ramificazione e crescita di capillari pre-esistenti);
3. arteriogenesi (maturazione dei vasi con fattori di crescita specifici per il tipo di endotelio vascolare) [5].

In particolare, nel caso dell'angiogenesi, gli stimoli più comuni sono la carenza di ossigeno (ipossia), la riduzione dell'apporto di sangue (ischemia), fattori meccanici e processi infiammatori. In risposta a tali segnali le cellule endoteliali, che rivestono un ruolo chiave nel fenomeno angiogenico, rispondono degradando la membrana basale con opportuni enzimi (proteasi) e migrando verso la sorgente dello stimolo, dove proliferano. Lì si differenziano e maturano, richiamando anche cellule muscolari lisce e cellule periendoteliali, fino a formare i nuovi capillari.

In un soggetto adulto, la vascolarizzazione è generalmente in fase quiescente, e il ricambio delle cellule dei vasi sanguinei richiede anni. Tale processo è invece vitale nell'embriogenesi, nella crescita e nella rigenerazione tessutale durante la guarigione di una ferita.

Negli animali le cellule endoteliali danno origine a nuovi capillari qualora se ne crei la necessità. Si pensa che, quando le cellule nei tessuti sono private di ossigeno, rilascino fattori angiogenici che inducono la crescita di nuovi capillari. Probabilmente per questo motivo, quasi tutte le cellule dei vertebrati sono situate a non più di 50 μm da un capillare. In modo analogo, dopo una ferita, è stimolata un'esplosione di crescita di capillari nelle vicinanze del tessuto danneggiato. Anche agenti locali irritanti e infezioni causano la proliferazione di nuovi capillari, la maggior parte dei quali regrediscono e scompaiono quando l'infiammazione scompare.

L'angiogenesi è anche coinvolta nella crescita tumorale. Lo sviluppo di una massa tumorale è legato all'approvvigionamento di ossigeno e nutrienti per cui un tumore che non sia irrorato da vasi sanguinei, non può svilupparsi se non per pochi mm, perché deve dipendere dalle cellule attigue per la sopravvivenza. La formazione di nuovi vasi sanguinei è un importante processo per la progressione del tumore: favorisce la transizione da iperplasia a neoplasia, cioè il passaggio da uno stato di moltiplicazione cellulare ad uno stato di proliferazione incontrollata caratteristico delle cellule neoplastiche [6].

1.2.2 Tipi di vasi sanguigni

I vasi sanguigni si distinguono generalmente tra arterie, vene e capillari (Figura 2).

Le arterie hanno pareti spesse e sono capaci di opporre resistenza alle alte pressioni del sangue. Hanno una relativamente bassa compliance e funzionano come serbatoi di pressione. Le arteriole sono delle arterie più piccole ($< 50 \mu\text{m}$): hanno un'elevata quantità di muscolatura liscia per regolare il flusso attraverso il letto capillare. Sono importanti nel controllo della pressione arteriosa media e nella distribuzione della gittata cardiaca ai vari tessuti.

In particolare, la parete delle arterie è costituita da tre strati concentrici:

1. La tonaca interna o intima: è lo strato più interno poggiante su una esile lamina di tessuto connettivo ricco di fibre elastiche che possono ammassarsi a formare una lamina elastica interna;
2. La tunica media: è lo strato intermedio, che può essere costituito in grande prevalenza da tessuto elastico nelle arterie di grosso calibro (arterie di tipo elastico) oppure da

tessuto muscolare liscio nelle arterie di medio e piccolo calibro, cioè le arteriole (arterie di tipo muscolare);

3. La tunica avventizia: è lo strato esterno formato da tessuto connettivo, che è separato dalla tunica media dalla lamina elastica esterna.

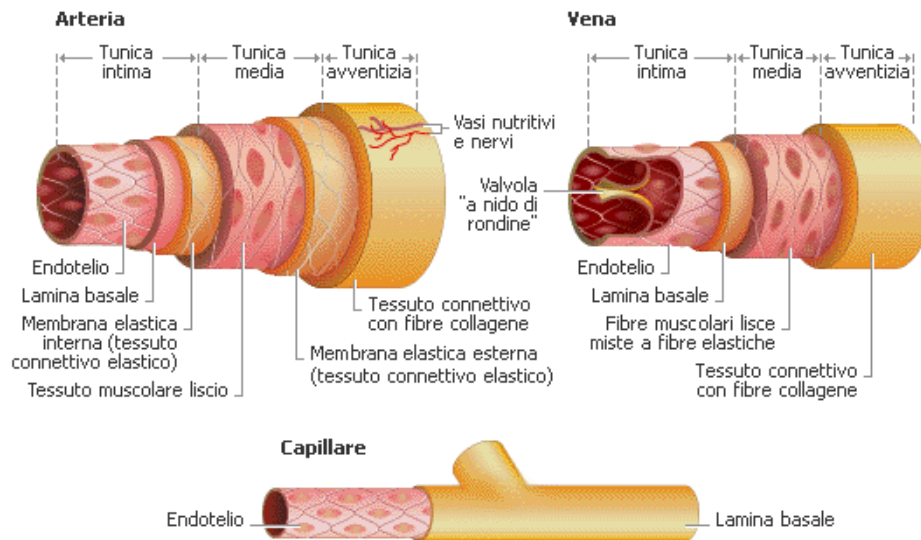


Figura 2: Struttura di un vaso arterioso, di un vaso venoso e di un capillare

I capillari sono i vasi dotati delle pareti più sottili (5-10 μm) e sono altamente permeabili all'acqua e ai piccoli soluti. Derivano dalle più fini diramazioni delle arteriole ed hanno una disposizione a rete. La loro principale funzione è quella di permettere lo scambio di materiali tra il sangue e i tessuti. La parete dei capillari è costituita da un endotelio poggiante su una sottile lamina basale.

Le vene sono dei vasi ampi con la parete sottile. La maggior parte di esse sono dotate di valvole che consentono al sangue di arrivare al cuore ma non di refluire verso la periferia. Le vene hanno un'alta compliance e funzionano da serbatoi di volume (Figura 3). Le venule, delle vene più piccole, all'uscita dai capillari sono dotate di una discreta tunica muscolare, che, regolandone il calibro, contribuisce ad aggiustare la caduta di pressione. Le venule partecipano allo scambio di sostanze dall'interstizio extracellulare al sangue da riportare al cuore.

La struttura delle vene è molto simile a quella delle arterie anche se la distinzione fra le tre tuniche non è sempre agevole; le pareti delle vene sono più sottili e meno elastiche di quelle delle arterie e quando la vena è vuota sono solitamente collassate. Va inoltre osservato che la

distinzione da un punto di vista strutturale tra vene di piccolo, medio e grande calibro, è un po' artificiosa, ma in tutti i casi la tunica media è scarsamente sviluppata [7, 8, 9].

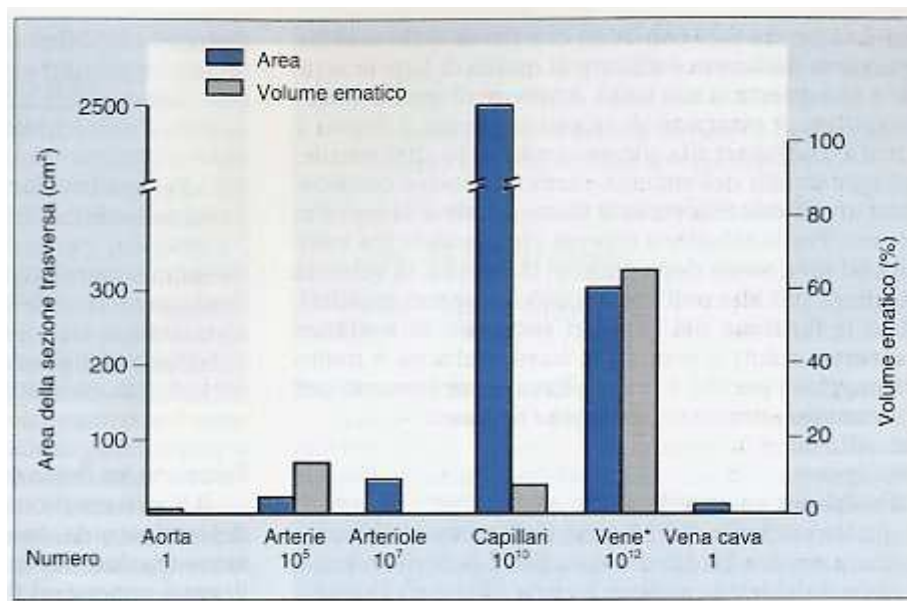


Figura 3: Numero, area della sezione trasversale totale e volume ematico dei vasi sanguigni umani [7]

Tutti gli strati di cui è composto un vaso naturale contribuiscono alla sua funzione: le cellule endoteliali promuovono una superficie interna del vaso non-trombogenica, esse sono allineate nella direzione del flusso per incrementare la ritenzione cellulare e rimangono in uno stato inattivo. Le cellule muscolari lisce nello strato medio sono disposte in direzione circolare e si trovano in uno stato non proliferativo (se proliferassero si arriverebbe all'iperplasia dell'intima o al restringimento del vaso). Lo strato medio contiene inoltre elastina quale componente elastica. Lo strato più esterno, l'avventizia, comprende collagene e fibroblasti in grado di produrre tessuto connettivo. La combinazione del collagene e dell'elastina presenti nel vaso produce, nel complesso, una struttura di natura anisotropa viscoelastica che mostra un'elasticità maggiore a pressioni basse e una maggior rigidità a pressioni elevate [10, 11].

1.2.3 Tessuti vascolari

1.2.3.1 Tessuto endoteliale

Il tessuto endoteliale è un tipo particolare di tessuto connettivo, di derivazione mesenchimale, morfologicamente simile al tessuto epiteliale pavimentoso semplice, che riveste la superficie interna dei vasi sanguigni. Le cellule endoteliali che lo compongono, sono piatte, poligonali e

allungate secondo la direzione del flusso; la faccia apicale è orientata verso il lume dei vasi ed il nucleo sporge verso di esso. Le cellule endoteliali contengono relativamente pochi organelli intracellulari (Golgi, mitocondri, reticolo endoplasmatico e ribosomi liberi), numerose vescicole pinocitosiche, per il trasporto di sostanze attraverso l'endotelio, e i caratteristici granuli elettrondensi di Weibel-Palade, presenti anche nelle piastrine. Si tratta di granuli secretori nella cui membrana è presente la P selettina nel cui interno è contenuto il fattore di von Willebrand (fattore VIII della coagulazione). Considerato in passato come un semplice rivestimento dei vasi, attualmente a tale tessuto è attribuita la capacità di elaborare una vastissima quantità di sostanze attive, in grado di modulare l'attività sia delle varie strutture della parete vasale da esso rivestite sia di interagire con le cellule ematiche e con le proteine del sistema coagulativo, che vengono in contatto con la sua superficie luminale. Molte delle sostanze secrete dalle cellule endoteliali inibiscono sia la trombosi che l'iperplasia dell'intima e sono essenziali per garantire l'omeostasi e il mantenimento dell'integrità vascolare. Parte di queste sostanze sono secrete dalle cellule endoteliali nelle immediate vicinanze (secrezione paracrina), per esercitare i loro effetti sulla parete vasale, o sono immesse nella circolazione (secrezione endocrina) per svolgere la loro azione a distanza, come nel caso delle sostanze che concorrono al controllo della pressione arteriosa (es. ossido nitrico e endotelina). Altre molecole prodotte dall'endotelio esplicano la loro azione rimanendo legate alla superficie delle cellule endoteliali, come accade per le molecole di adesione per i leucociti o per quelle che influenzano la coagulazione. In pratica l'endotelio modula il tono vasale e la stessa struttura vasale, rivestendo un ruolo estremamente importante nel rimodellamento, che si osserva nell'ipertensione, nella stenosi dopo angioplastica e nella aterosclerosi. A livello luminale, l'endotelio modula la coagulazione e le interazioni con le cellule ematiche, leucociti e piastrine. L'endotelio, essendo da un lato bersaglio dei segnali meccanici, generati dal flusso ematico, e dei segnali neuro-ormonali e dall'altro fonte di mediatori vasoattivi, svolge un ruolo fondamentale nel controllo della funzionalità delle arterie e del microcircolo. Due sono le forze meccaniche principali esercitate dal flusso ematico sulla parete vasale: stress da attrito (*shear stress*) e stress tensivo. Lo *shear stress* è prodotto dall'attrito del flusso laminare sull'endotelio e interessa esclusivamente le cellule endoteliali, mentre lo stress tensivo è prodotto dalla pressione idrostatica all'interno del vaso e interessa l'intera parete vasale (endotelio, fibroblasti, cellule muscolari lisce). Lo *shear stress* attiva le cellule endoteliali e ne promuove la liberazione di mediatori vasodilatatori, mentre lo stress tensivo stimola direttamente le cellule muscolari lisce, inducendone la contrazione, e produce lo stiramento delle cellule endoteliali. L'effetto netto sul tono vasale è il risultato della interazione tra

contrazione del muscolo indotta dalla pressione e la dilatazione endotelio-dipendente indotta dal flusso. Tale ruolo dell'endotelio nel modulare la risposta alle variazioni del flusso è stato evidenziato da Holtz (1983), che ha osservato come la dilatazione flusso-indotta sia dipendente, *in vitro* e *in vivo*, dalla integrità dell'endotelio.

1.2.3.2 Tessuto muscolare

Il tessuto muscolare liscio (Figura 4) è costituito da cellule fusiformi, con nucleo generalmente centrale e con abbondante sarcoplasma che tuttavia contiene poca mioglobina; i miofilamenti decorrono lungo l'asse maggiore delle cellule, ma sono disposti in modo irregolare per cui le cellule muscolari lisce non presentano una striatura trasversale; inoltre i muscoli lisci non sono volontari e sono innervati da sistema nervoso vegetativo che esercita una funzione di controllo in senso eccitatore o inibitore.

La muscolatura liscia è priva di placche motrici (che sono l'insieme di contatto sinaptico e fibra muscolare), perciò le terminazioni delle fibre nervose prendono rapporto diretto con le fibrocellule muscolari; la trasmissione dell'impulso dalle terminazioni nervose è mediata da sostanze chimiche, principalmente l'acetilcolina e dalla noradrenalina.

Si distinguono due tipi di muscolatura liscia: i muscoli lisci viscerali si presentano in forma di lamine, con cellule riunite tra loro da ponti citoplasmatici; essi si trovano nella parete di alcuni visceri e si contraggono quando stirati passivamente; una caratteristica di questi muscoli è la plasticità che consente in un adattamento della loro tensione all'allungamento al quale possono essere sottoposti; i muscoli lisci multiunitari sono invece costituiti da unità distinte, senza ponti di connessione e si trovano dove sono richieste contrazioni graduate e fini, come nel caso dei vasi sanguigni e nei muscoli dell'occhio; la loro contrazione non è spontanea ma dipende da impulsi nervosi.

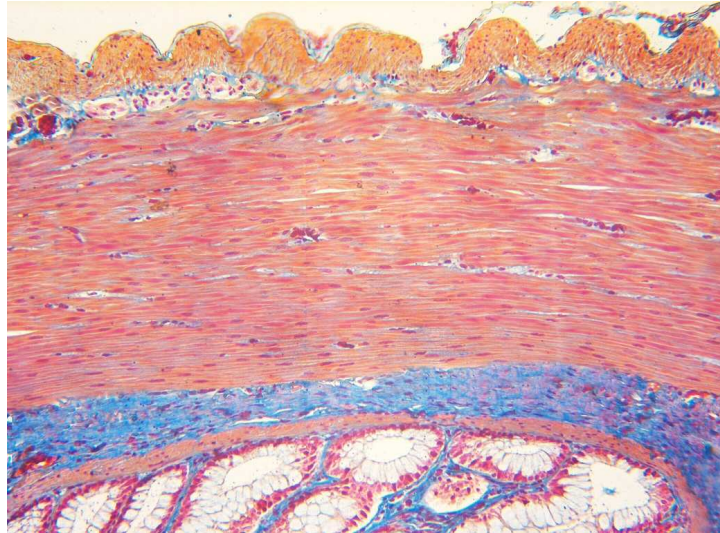


Figura 4: Immagine al microscopio ottico del tessuto muscolare liscio

1.2.3.3 Tessuto connettivo

I tessuti connettivi circondano e connettono tra loro elementi strutturali di organi ed altri tessuti ed espletano molte funzioni, da quella meccanica di sostegno a quella di scambio di sostanze tra sangue e tessuti, di riserva di materiali nutritizi, di difesa contro le infezioni (Figura 5).

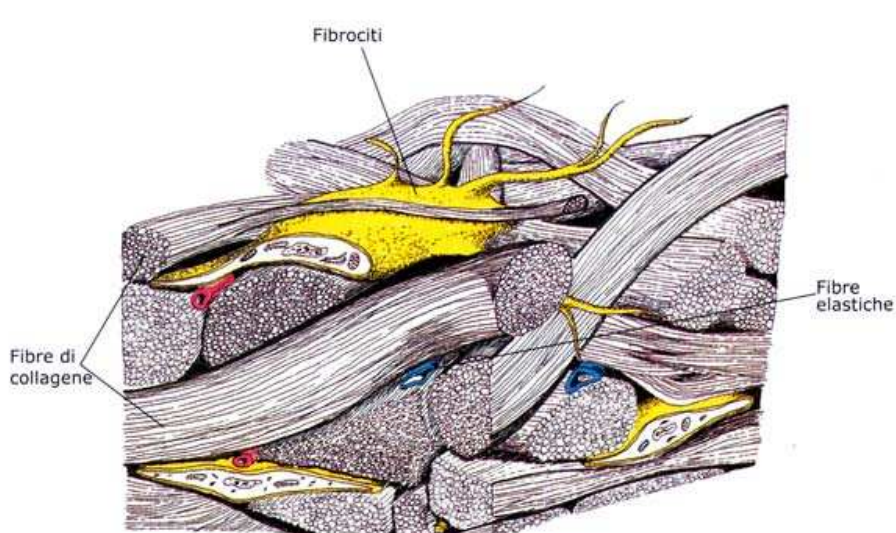


Figura 5: Struttura del tessuto connettivo

Da un punto di vista istologico il tessuto connettivo può essere suddiviso in diversi sottotipi, a seconda delle sue prerogative morfologiche e funzionali. In ogni caso si tratta di cellule non addossate le une alle altre, ma disperse in una più o meno abbondante sostanza intercellulare o

matrice extracellulare costituita da una componente amorfa e da una componente fibrosa. Il tessuto connettivo possiede un'ampia varietà di cellule, deputate a svolgere funzioni diverse in relazione anche alla natura del tessuto a cui appartengono e alla posizione che questo assume nell'organismo. In generale, è possibile operare una distinzione tra le cellule deputate alla formazione e al mantenimento della matrice (ad es. fibroblasti), cellule deputate alla difesa dell'organismo (macrofagi, mastociti e leucociti) e cellule deputate a funzioni speciali, come gli adipociti del tessuto adiposo, che accumulano grassi come riserva energetica del corpo. I fibroblasti sono le cellule fondamentali del tessuto connettivo propriamente detto; la loro funzione è quella di produrre le fibre e gli altri componenti della matrice extracellulare, che costituisce l'elemento di gran lunga più abbondante del tessuto, e dalla quale dipendono le funzioni di sostegno proprie del connettivo. I fibroblasti sono generalmente di aspetto fusiforme, con limiti citoplasmatici mal definiti sebbene ne esistano varietà che presentano morfologie anche molto diverse, come un aspetto stellato o tentacolare. Si trovano generalmente dispersi nella matrice da loro stessi creata, ed in molti casi sono disposti lungo le fibre. Quando cessano la loro attività biosintetica, i fibroblasti si trasformano in fibrociti. Pertanto, fibroblasti e fibrociti rappresentano i due momenti funzionali di una stessa cellula. Le fibre extracellulari sintetizzate dai fibroblasti possono essere classificate in fibre di collagene, reticolari, (assai esili e disposte a formare delicate maglie) ed elastiche (fibre omogenee, ramificate e dotate di grande elasticità).

1.3 SOSTITUTI VASCOLARI DI PICCOLO CALIBRO

1.3.1 Requisiti di un sostituto vascolare

Le proprietà di un vaso sanguigno sono molto complesse, a partire dalla struttura multistrato. Al fine di assicurare al sostituto vascolare un esito favorevole quando verrà impiantato, si devono soddisfare quanti più criteri possibili. In particolare, un vaso di piccolo calibro, dovrà possedere:

1. una superficie interna liscia e con un coefficiente d'attrito più basso possibile;
2. dimensioni e proprietà simili ai vasi da sostituire

In questo modo si riuscirà:

- ad evitare l'aggregazione piastrinica e fenomeni di trombosi,

- a minimizzare disturbi nel flusso,
- a trasferire in modo ottimale l'energia pulsatile;

In aggiunta il sostituto dovrà resistente al ripiegamento, essere facile da suturare e da maneggiare, nonché richiedere tempi brevi e bassi costi di produzione.

Approfondendo l'argomento, una superficie non trombogena può essere ottenuta:

- rendendo porosa la parete della protesi, con la speranza che venga promossa la formazione di neointima (nuova superficie completamente naturale). Tuttavia la formazione di una neointima vera non si verifica e specialmente attorno ai vasi di collegamento (anastomosi) il tessuto neoformato può crescere in modo abnorme (iperplasia intimale) ed occludere il vaso. Inoltre il requisito della porosità, considerata essenziale per una adeguata integrazione tissutale, comporta il problema delle perdite ematiche. Sono stati via via proposti rivestimenti biocompatibili impermeabilizzanti, con proteine o idrogeli di sintesi. E' stato proposto anche l'uso di rivestimenti bioattivi (eparina);
- utilizzando rivestimenti non porosi, in materiale sintetico inerte, opportunamente funzionalizzato in senso biologico (scarso successo clinico)
- ricreando un endotelio naturale tramite inseminazione della protesi con cellule endoteliali [12]. Le cellule endoteliali provengono dal paziente stesso per differenziazione di cellule staminali mesenchimali del midollo spinale (BMC), estraendole per biopsia ossea, di cellule endoteliali progenitrici (EPC), per separazione dal sangue adulto o ancor meglio da quello del cordone ombelicale², o di cellule staminali adipose (Figura 6) [3]. E questa la direzione attuale verso lo sviluppo di sostituti sanguigni di piccolo calibro [13].

² Il sangue del cordone ombelicale contiene fino a 10 volte più EPC del sangue adulto. Per questo motivo sono state ottenute colture differenziate già dopo 2 giorni, senza attendere diverse settimane.

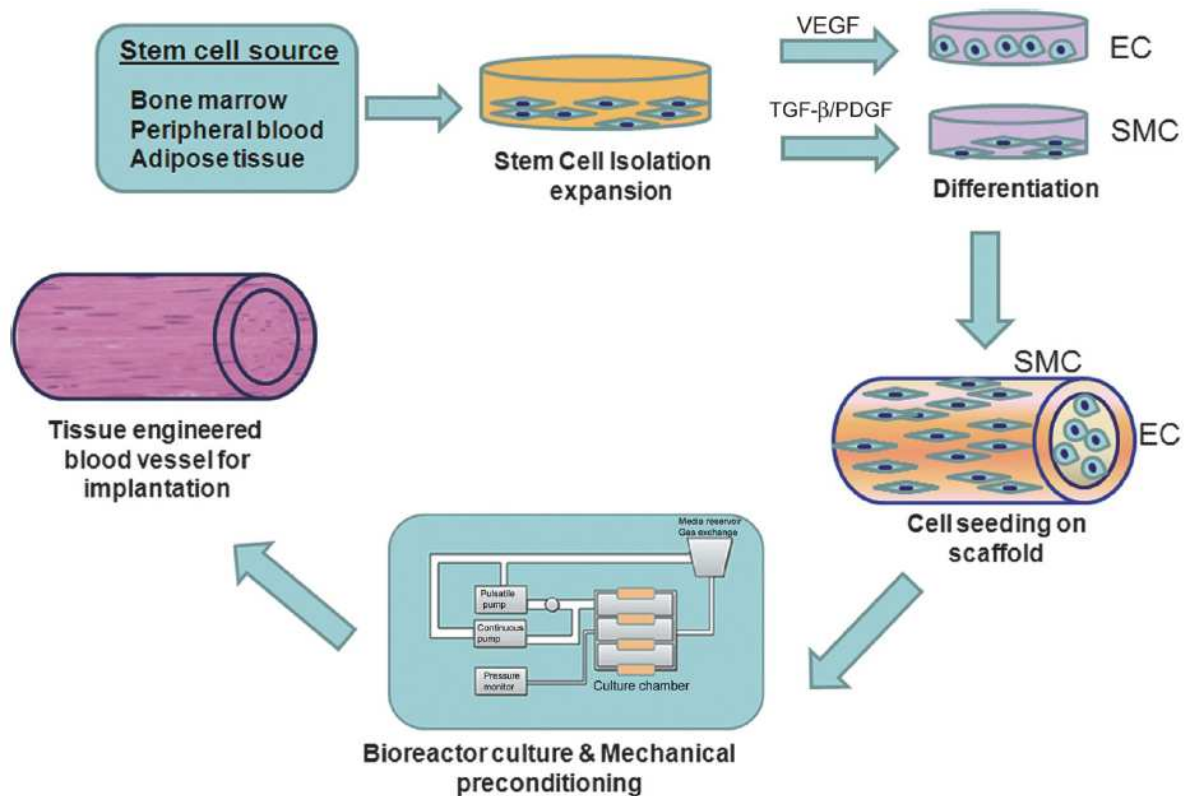


Figura 6: Realizzazione di vasi sanguigni ingegnerizzati formati da *scaffold* biologici o in polimero biorassorbibile su cui vengono seminate cellule endoteliali (EC) e muscolari lisce (SMC) ottenute da cellule staminali coltivate con opportuni fattori di crescita

Oltre ad individuare materiali che mimino in modo soddisfacente le proprietà della tonaca avventizia e dello strato medio, è quindi necessario considerare il ruolo protettivo dello strato endoteliale. È noto che le cellule endoteliali, quando sono confluenti e inattive, sono responsabili delle proprietà non trombogeniche del vaso, evitano le trombosi e l'iperplasia dell'intima [11]. In tal modo le cellule endoteliali restano adese al lume orientandosi in direzione del flusso e rimangono inattive, mentre le cellule muscolari e i fibroblasti possono interagire con la protesi dall'esterno del vaso.

Gli *scaffold* (le matrici che costituiscono il sostituto artificiale) impiegati nella medicina rigenerativa dei vasi sanguigni di piccolo calibro si distinguono essenzialmente in due tipi:

- biologici (di cui un caso particolare è quello degli *scaffold* decellularizzati e degli *scaffold* di cellule);
- polimerici biorassorbibili.

Nel tentativo di migliorare le proprietà dello *scaffold*, si può ricorrere anche all'utilizzo di compositi e di materiali bioattivi in grado di interagire biochimicamente con i tessuti circostanti.

La struttura dello *scaffold* può essere ricreata con diverse tecniche. Tuttavia attualmente una tecnica che si è rivelata promettente è sicuramente quella del *electrospinning* [14], descritta più in dettaglio nel capitolo 2.

1.3.1.1 Matrici naturali

I materiali naturali più utilizzati per la messa a punto di un sostituto di vaso sanguigno includono il collagene, l'elastina, la fibrina, l'acido ialuronico e materiali basati su polisaccaridi. In particolare il collagene è un materiale interessante per la sua capacità di “colloquiare” con le cellule. L'impiego di collagene ha portato ad un supporto con bassa *burst strength*³, incline al fallimento se impiantato come semplice struttura tubulare ad un componente. Nonostante le proprietà chimico-fisiche non-ideali di tali materiali, le loro interazioni con le cellule sono favorevoli. Le protesi basate su polisaccaridi hanno portato ad ottenere neointima nel modello animale senza dare luogo ad iperplasia o formazione di aneurismi. Ottimi i risultati della semina di cellule endoteliali su fibrina della seta: le cellule aderiscono e si allungano nella direzione delle fibre mostrando una natura non-attivata e *pattern* di crescita adeguati [15].

Due casi particolari degli *scaffold* naturali sono quelli decellularizzati e quelli costituiti da sole cellule.

- *Scaffold* decellularizzati

Possono essere simili in composizione agli *scaffold* naturali e sono ottenuti da vasi o da altri tessuti/organi come l'uretere, la pelle, il pericardio o l'intestino tenue, sia animali che umani.

Tale approccio presenta alcuni vantaggi di seguito elencati:

1. i componenti di elastina vengono mantenuti;
2. la struttura può essere preparata in anticipo;
3. sono dotati di bassa immunogenicità.

Gli *scaffold* decellularizzati possono incoraggiare la ricrescita delle cellule, in particolare delle cellule endoteliali, promuovendo il fenotipo desiderato, la morfologia e la confluenza; d'altro canto mancano della capacità di trattenere le cellule in seguito ad esposizione a *shear stress* e soffrono della stessa trombogenicità osservata per i materiali sintetici. La ricerca si sta

³ Letteralmente è la forza di scoppio, che corrisponde alla pressione da applicare affinché un foglio del materiale esploda ed è usata in misure

oggi orientando verso la pre-semina dell'impianto con cellule e la reticolazione della matrice per incrementare le sue proprietà meccaniche e per trattenere le cellule [15].

- *Scaffold* costituiti da sole cellule

Sono stati ottenuti *scaffold* costituiti unicamente da cellule sia *in vitro* che *in vivo* su animali (impianto temporaneo in cavità peritoneali), facendo crescere degli strati di cellule attorno ad un mandrino. Sebbene il loro uso sia raro nella *routine* clinica, possibilità sono offerte anche da questa tecnologia, che andrà studiata più in dettaglio nell'uomo [1, 15].

E' però necessario mettere in luce come si attenda che le cellule stesse secernano matrice extracellulare e che questa costituisca poi il supporto sul quale far aderire altre cellule.

1.3.1.2 Matrici sintetiche

I biomateriali degradabili possono essere classificati come permanenti o biodegradabili. I biomateriali permanenti non vengono solitamente intressati da pretrattamento con cellule e dovrebbero rimanere come *scaffold* di supporto per tutta la vita. Tali materiali devono possedere elevata durata, non devono fessurarsi o perdere le loro proprietà meccaniche e non devono suscitare risposte avverse nelle cellule.

I biomateriali degradabili vengono influenzati nel tempo dall'aggiunta di cellule, dall'interazione del sito chirurgico con i tessuti e dalle condizioni fisiologiche. Tali biomateriali si devono degradare nel tempo gradualmente e la loro velocità di degradazione deve coordinarsi con la crescita di strutture prodotte dalle cellule. I loro prodotti di degradazione non devono essere pericolosi o fonte di infiammazione. Nelle fasi seguenti l'impianto tali materiali devono dimostrare di possedere proprietà meccaniche appropriate e devono promuovere interazioni cellula-*scaffold* benefiche. Tra i materiali più studiati ricordiamo il poliuretano in forme sia biodegradabili che permanenti. L'orientamento verso tale polimero dipende dalle sue proprietà meccaniche più vicine a quelle dei vasi naturali e migliori di quelle del Dacron™ e del ePTFE. I poliuretani sono composti di tratti rigidi (*hard*) e tratti flessibili (*soft*) che permettono il controllo delle proprietà meccaniche al variare del rapporto *hard/soft*. Il segmento *hard* fornisce la resistenza, la rigidità e la stabilità mentre il tratto *soft* assicura flessibilità. Inoltre è possibile variare la tecnica di fabbricazione ottenendo svariate strutture e forme. I primi tipi di poliuretano impiegati venivano attaccati nei tratti *soft* in seguito a stress ossidativi o idrolitici. La generazione più recente di tali materiali contiene

gruppi eteri o carbonati che li stabilizzano rendendoli meno biodegradabili anche se nei saggi *in vitro* si è osservata incidenza di morte cellulare. La morte cellulare si è evitata eliminando i diisocianati aromatici e sostituendoli con diisocianati alifatici. I primi infatti si degradano fornendo composti tossici e carcinogeni nei modelli animali.

Altri materiali proposti sono: poli(carbonato-urea) uretano e poli(estere uretano) urea che hanno portato a risultati incoraggianti sulla promozione dell'adesione cellulare: è stata osservata un'adesione e una proliferazione vivace sia di cellule endoteliali che di cellule muscolari lisce senza evidenza di risposte cellulari avverse o l'incidenza di iperplasia intinale è risultata minima. In ogni caso, nonostante questi dati preliminari ottimi, test *in vitro* hanno dimostrato che le cellule assumono morfologie deludenti a causa di mancanza di *spreading*. Quindi se la *compliance* dei poliuretani investigati è risultata di successo, vanno incoraggiate interazioni migliori con le cellule sia per ottimizzarne la morfologia che per assicurarne la ritenzione.

Anche l'uso di materiali biodegradabili è stato preso in considerazione: alcuni studiosi hanno considerato come l'introduzione di materiale permanente nel corpo umano conduca comunque a risposte immunogeniche nel lungo termine. Se il materiale che forma il vaso è in grado di degradarsi tramite un biorisorbimento a mano a mano che le cellule lo colonizzano ciò può condurre ad un vaso esclusivamente composto di cellule e matrice. I polimeri biodegradabili considerati includono: acido polilattico (PLA), acido poliglicolico (PGA), poliidrossialcanoato (PHA), polidiossianone (PDS), e policaprolattone (PCL) [15].

1.3.1.3 Matrici composite: combinazioni di biomateriali e copolimeri

La natura a più componenti del vaso naturale ha portato ad esplorare combinazioni di biomateriali. Alcune delle combinazioni proposte sono: acido poli(latticoglicolico) (poliPLGA) collagene/PLGA, gelatina/PCL, poli(glicerolsebacato), poli(3-idrossibutirrato-co-3-idrossivalerato), PEGT/PBT, acido ialuronico/gelatina, chiosano/PEO, poliuretano/polidimetilsilossano. Tali combinazioni hanno prodotto risultati incoraggianti che possiamo brevemente riassumere così: copoliesteri aromatici-alifatici permettono lo sviluppo di uno strato confluyente di cellule di midollo osseo nel lume dello *scaffold*; matrici di poliuretano-polidimetilsilossano danno buoni risultati in modelli animali con interfacce luminale mature e stabili, assenza di iperplasia intinale e deposizione di collagene; P(LLA-CL) promuovono una buona adesione di cellule muscolari lisce che esprimono un fenotipo contrattile (Figura 7).



Figura 7: Immagine al microscopio elettronico a scansione (SEM) di cellule muscolari lisce seminate su *scaffold* elettrofilato di P(LLA-CL) dopo 7 giorni di cultura

e superfici di gelatina/PCL, dotate di grande bagnabilità, assicurano un'ottima adesione cellulare e promuovono la penetrazione delle cellule nello *scaffold* se confrontati con i materiali costituiti da un singolo componente [15].

1.3.1.4 Matrici biomimetiche

In aggiunta all'uso di copolimeri sono state investigate modifiche che includono il *coating* con materiali aggiuntivi e l'ancoraggio di composti chimici o di molecole biologiche (peptidi RGD, eparina, antibiotici). Tra i *coating* studiati ci sono la gelatina, la fibronectina, il collagene, la fibrina e la laminina. L'uso di tali rivestimenti incrementa in modo significativo la fase di adesione iniziale alla superficie luminale, ma anche lo *spreading* e la proliferazione. È stato inoltre accertato che la modifica della protesi tramite funzionalizzazione con agenti biologici o farmaceutici può azzerare il potenziale infiammatorio, la reazione da corpo estraneo e le infezioni. Tra le molecole utilizzate per la funzionalizzazione sono stati impiegati peptidi quali RGDS, KQAGDV, VAPG, GRGDS. Nel caso dell'utilizzo di sequenze RGD è stato dimostrato che il *pattern* delle sequenze sulla superficie determina l'entità dell'adesione e della proliferazione [15].

La modifica della superficie con molecole bioattive è il modo più semplice per rendere i materiali biomimetici. Una volta identificati i peptidi bioattivi da utilizzare per la promozione dell'adesione e della crescita cellulare, si pone il rilevante problema di permetterne il trasporto e/o il rilascio in corrispondenza del sito ove è auspicabile possano svolgere la loro

funzione, ovvero all'interfaccia tra l'impianto ed il tessuto biologico. I metodi finora messi a punto prevedono di:

1. depositare la molecola biologicamente attiva sulla superficie dell'impianto, dove aderisce per semplice adsorbimento;
2. includere la molecola in un *carrier* riassorbibile che, degradandosi nell'ambiente biologico, ne permetta il rilascio;
3. ancorare chimicamente la molecola alla superficie dell'impianto, con formazione di un legame covalente.

Ciascuno dei tre metodi presenta vantaggi e svantaggi che vengono di seguito brevemente illustrati [13].

- Adsorbimento superficiale

L'adsorbimento sfrutta le semplici interazioni tra peptidi e/o proteine e la superficie del materiale; si realizza lasciando in contatto con la superficie dell'impianto una soluzione contenente il peptide e/o la proteina per un tempo prestabilito, in condizioni controllate. È un metodo estremamente semplice, poco costoso e facilmente realizzabile, ma presenta il grande inconveniente di non permettere una deposizione controllata sulla superficie e quindi una valutazione certa della quantità di biomolecole per unità di superficie del materiale. Infine, a causa dell'adsorbimento, la conformazione delle proteine può essere alterata con conseguente denaturazione ed eventuale perdita di attività biologica [13].

- Inclusione in un carrier

Questo metodo prevede l'utilizzo di una matrice per la veicolazione dei fattori di adesione o di crescita all'interfaccia tra tessuto ed impianto. Alla luce dell'importanza della concentrazione e dell'esposizione sulla superficie della biomolecola per promuovere una risposta cellulare e tissutale, tale approccio risulta promettente perché può guidare o modulare il rilascio dei fattori bioattivi. In questo caso, il peptide e/o la proteina vengono inglobati all'interno di un materiale (generalmente polimerico) che ne consente il trasporto ed il rilascio secondo una cinetica che varia in funzione delle caratteristiche del materiale medesimo e del metodo utilizzato per l'inclusione: il peptide e/o la proteina possono essere semplicemente disciolti nel *carrier* o legati chimicamente ad esso. Diversi sono i prodotti commerciali utilizzati a questo scopo: tra i più diffusi vi sono i co-polimeri dell'acido lattico e acido glicolico, l'acido ialuronico, gli idrogel a base di alginato. Questi prodotti devono ovviamente

possedere caratteristiche particolari: essere biocompatibili, biodegradabili e biorisorbibili, non ostacolare o mascherare l'attività biologica delle molecole trasportate, aderire al materiale senza comprometterne la possibilità di impiego in sede chirurgica. Sono stati anche proposti *coating* a base di collagene in quanto tale proteina fibrosa mima il supporto sul quale le biomolecole sono adsorbite nella matrice ossea. Secondo tale approccio, al rilascio iniziale durante i primi quattro giorni segue una ritenzione delle biomolecole dentro il rivestimento di collagene. Ne consegue che la percentuale di biomolecole rilasciate può essere controllata in base alla quantità di *coating* e in relazione all'arricchimento di quest'ultimo con il composto. La matrice di collagene può essere infine riassorbita e rimpiazzata da nuovo tessuto [13].

Un'interessante variante applicabile all'*electrospinning* è costituita dall'inglobamento del peptide nella soluzione che andrà elettrofilata per creare la matrice. Ciò consente una buona uniformità di adsorbimento, senza richiedere un trattamento *ad hoc*. E' poi possibile risalire alla quantità di peptide adsorbito attraverso semplici test cinetici di rilascio in soluzione fisiologica.

- Funzionalizzazione covalente

Per quel che riguarda la funzionalizzazione covalente, molte tecniche sono state studiate per l'immobilizzazione di proteine su supporti solidi da impiegare in varie applicazioni.

In generale, questo metodo permette di utilizzare i gruppi reattivi esistenti sulla superficie di un materiale per legare covalentemente le molecole di interesse, nella proporzione teorica di una per ogni sito di legame. Il legame può essere diretto o realizzato attraverso l'introduzione di una ulteriore molecola con funzione distanziatrice (*spacer*).

L'approccio è stato abbondantemente applicato alla superficie di materiali polimerici, di vetri e substrati a base di SiO₂, ma in letteratura sono reperibili anche metodi per la funzionalizzazione di superfici metalliche e ossidi.

Per le applicazioni ortopediche e dentali, le superfici metalliche impiegate possiedono relativamente pochi siti funzionali in grado di essere utilizzati per l'ancoraggio di biomolecole, perciò spesso tali superfici vengono ossidate tramite passivazione. L'impiego sulle superfici ossidate della chimica dei silani ha permesso di immobilizzare peptidi, enzimi e proteine adesive a differenti materiali, inclusi il titanio e le leghe NiTi, Ti6Al4V e Co-Cr-Mo. L'esito della funzionalizzazione del biomateriale dipende dal particolare tipo di silano, dalle condizioni sperimentali, dal substrato usato e dalle biomolecole. Negli esperimenti già

eseguiti è stato comunque possibile ancorare la biomolecola alla superficie metallica per parecchi giorni in presenza di condizioni fisiologiche simulate.

Le strategie utili a risolvere il problema della carenza di gruppi funzionali sul metallo includono i trattamenti al plasma e la deposizione di monostrati auto-assemblati (SAMs, *self-assembled monolayers*). I trattamenti al plasma possono essere utilizzati non solo per incrementare il numero dei gruppi ossidrilici, ma anche per depositare differenti gruppi funzionali quali gruppi amminici e carbossilici che offrono grande versatilità nelle reazioni di condensazione delle biomolecole. La deposizione di strati SAMs riguarda invece sia il processo di silanizzazione che la copertura del metallo con oro. La strategia chimica degli organosilani, composti organici in grado di legare una funzione amminica all'ossido superficiale (ad es. SiO_2 o TiO_2), permette di disporre di una seconda funzione amminica alla quale viene ancorato il peptide o, in alternativa, uno *spacer* bifunzionale capace di legare il peptide. Gli organosilani formano uno strato monomolecolare sulla superficie del materiale che, di fatto, ne modifica le proprietà. Una strategia chimica alternativa può essere utilizzata sulla superficie dei materiali preventivamente trattata con oro. Si tratta, in questo caso, di sfruttare l'affinità delle funzioni tioliche per l'oro, utilizzando peptidi che contengano un residuo di cisteina, mediante la semplice immersione del materiale ricoperto d'oro in una soluzione del peptide. Il legame che si origina è stabile per almeno 30 giorni. Un discreto numero di materiali quali vetro, quarzo, ossidi di metalli e polimeri sintetici sono stati modificati con peptidi bioattivi e caratterizzati per ciò che riguarda l'interazione delle cellule con tali superfici. Per i substrati polimerici che mancano di specifici gruppi funzionali per l'ancoraggio è stato utilizzato un metodo di immobilizzazione fotochimico [13].

- Criteri per la progettazione di superfici bioattive con motivi RGD

I materiali biomimetici permettono di regolare e controllare le interazioni cellulari a livello molecolare. Il legame del recettore cellulare con il ligando (peptide bioattivo) presente sul materiale biomimetico determina la forza dell'adesione della cellula alla superficie, la velocità di migrazione della cellula sopra o attraverso il materiale e l'estensione della formazione e l'organizzazione del citoscheletro. Poiché le risposte biologiche sono dipendenti da molteplici variabili come l'affinità tra recettore e ligando, la densità e la distribuzione spaziale del ligando, questi debbono essere considerati parametri fondamentali per la progettazione del materiale biomimetico. Tra le variabili importanti ricordiamo: la concentrazione del ligando e lo *spacer* utilizzato per distanziare il ligando dalla superficie o comunque dal sito di attacco sul materiale. Per quanto riguarda l'utilizzo nel campo dei vasi sanguigni, alcuni studi

affermano che la concentrazione minima di peptidi (quali RGDS, KQAGDV e VAPG) affinché si osservi una maggiore migrazione cellulare corrisponde a $0,2 \text{ nmol/cm}^2$, mentre oltre le 2 nmol/cm^2 la capacità di migrazione decresce, così come la proliferazione, che viene ancor più inibita.

Neff *et al.* hanno osservato un massimo di proliferazione nei fibroblasti su polistirene funzionalizzato con sequenza RGD a concentrazioni più basse di quelle ottimali per l'adesione e pari a 1.33 pmoli/cm^2 , suggerendo che esiste anche una concentrazione ottimale per la proliferazione cellulare che non coincide con la concentrazione necessaria a massimizzare l'adesione cellulare. Per mantenere l'attività biologica del peptide dopo l'immobilizzazione vanno però assicurate alla sequenza peptidica un'opportuna flessibilità e un ingombro sterico minimo, che possano garantire una agevole interazione con il recettore cellulare [13].

1.3.2 Effetti della struttura dello *scaffold*

Negli studi sui diversi copolimeri e sulla funzionalizzazione degli stessi con molecole di adesione, anti-trombotici o antibiotici si è evidenziato come le cellule siano sensibili ad un elevato numero di fattori. Si è visto come un materiale usato per una protesi vascolare come componente unico o in come combinazione di strati possa teoricamente essere ottimizzato in termini di proprietà fisiche e di interazioni cellulari. Il biomateriale selezionato per la struttura *bulk* deve essere il migliore per ciò che riguarda la *compliance* e la forza mentre la superficie deve essere ottimizzata tramite coating per influenzare le interazioni con le cellule (principalmente cellule endoteliali). I dati di letteratura dimostrano che le cellule sono sensibili inoltre alla topografia del materiale (presenza di fibre o pori, dimensione delle fibre o dei pori, spaziatura tra tali elementi, rugosità, area superficiale, orientamento delle fibre, scala micro o nano). In particolare è noto che i fibroblasti crescono su substrati caratterizzati da ampio range di pori e maglie, essi mostrano meccanismi cooperativi di crescita cellulare e *spreading* e utilizzano cellule vicine quali ponti per superare pori fino a $50 \mu\text{m}$ di diametro; tale possibilità è preclusa alle cellule endoteliali che prediligono quindi superfici con pori più piccoli e dalla struttura più definita (pori tra 18 e $60 \mu\text{m}$); le cellule muscolari lisce sono sensibili a superfici con canali con larghezza di 40 - $160 \mu\text{m}$ sulle quali passano da una disposizione *random* a un allineamento lungo l'asse dei canali modificando la loro morfologia da fibroblasto-simile verso una di tipo affusolato.

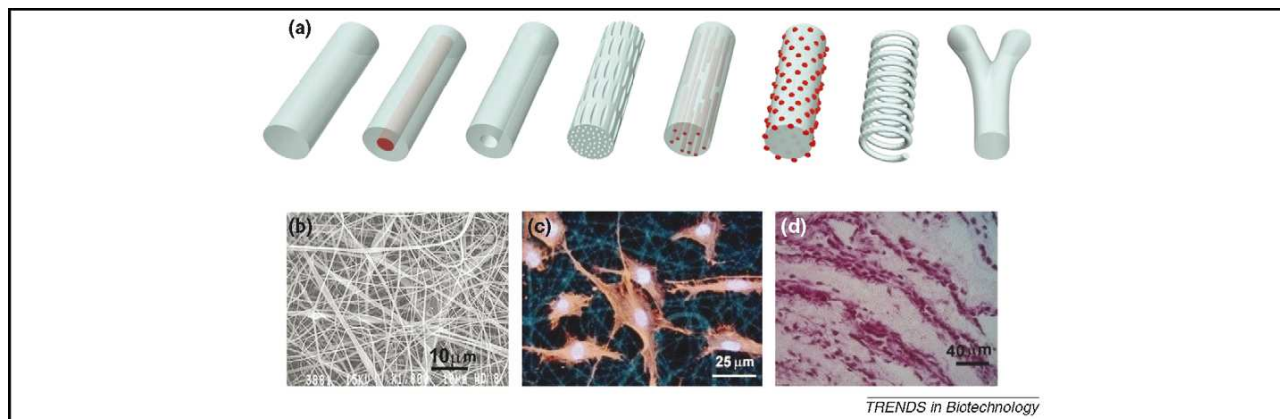


Figura 8: *Electrospinning* di scaffold nanostrutturati per applicazioni vascolari (a); micrografia al microscopio elettronico a scansione di uno scaffold nanostrutturato per applicazioni vascolari prodotto per *electrospinning* di collagene, elastina e polimeri sintetici (b); *spreading* di una cellula muscolare stellata sulla superficie di uno scaffold nanofibroso ottenuto per *electrospinning* di collagene ed elastina (c); costruito per applicazioni vascolari prodotto per *co-electrospinning* di nanofibre e cellule vive (d)

Tali caratteristiche topografiche possono essere prodotte in un ampio *range* di biomateriali attraverso tecniche quali l'*electrospinning* (Figura 8), la fotolitografia, l'*etching* (attacco chimico), tramite *moulding* (stampaggio) o *particulate leaching* (lisciviazione) [15].

1.3.2.1 Effetti della irradiazione UV sullo scaffold polimerico

I polimeri possono subire un deterioramento per:

- attacco di solventi: solubilità, resistenza agli agenti chimici, eliminazione degli additivi (es. plastificanti), rigonfiamento;
- ossidazione: in presenza di aria a temperature elevate (termo-ossidazione) o sotto azione di radiazione UV (foto-ossidazione);
- decomposizione: irraggiamento con neutroni, radiazione γ , effetto del calore.

In particolare, nel caso della presenza di una fonte di radiazione luminosa, solamente la radiazione assorbita provoca una fotodegradazione dei polimeri. Per ogni polimero esiste un intervallo di lunghezze d'onda che porta al degrado (Tabella 1).

Polimero	(nm)
Poliesteri	315
Polistirene	318, 340
Polietilene	300
Polipropilene	370 (280)
PVC	310, 370
Policarbonati	280 - 305, 330 - 360
Poliammidi	250 - 310

Tabella 1: Lunghezze d'onda o intervalli di lunghezze al di sotto delle quali si ha fotodegradazione

I valori di λ sono approssimativi, cambiano con la presenza di impurezze, processi di produzione ecc.

L'assorbimento della radiazione solare (visibile e UV) è dovuto all'eccitazione di singoli elettroni. Le bande di assorbimento sono larghe. L'eccitazione porta la transizione di un elettrone ad un livello energetico più alto non occupato (Figura 9) (nei casi in esame un orbitale di antilegame):

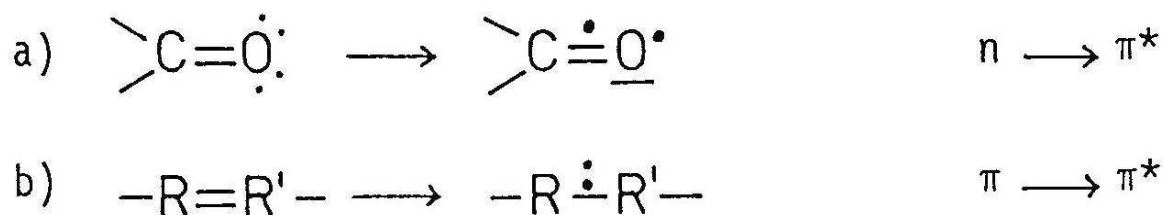


Figura 9: Transizione elettronica per irradiazione luminosa

Un numero crescente di legami doppi coniugati sposta l'assorbimento della radiazione dall'UV nella parte visibile dello spettro.

L'energia della radiazione solare, soprattutto nell'intervallo della radiazione UV, è sufficiente per rompere legami nei polimeri (Figura 10, Tabella 1 e Tabella 2).

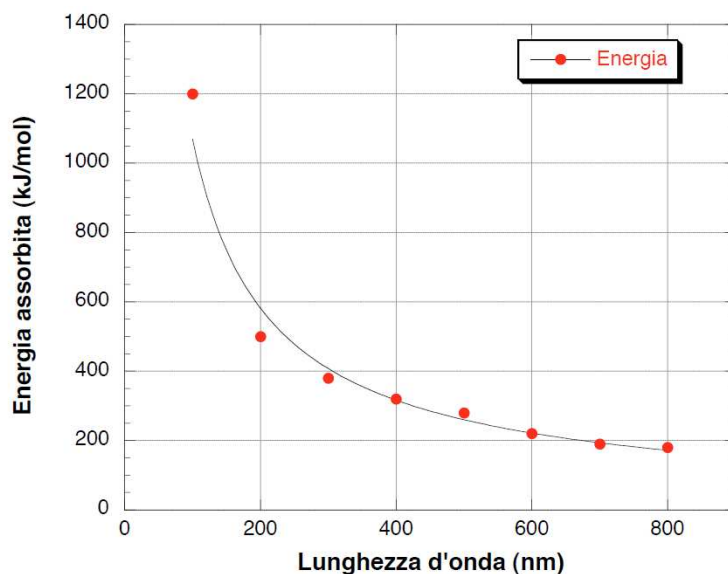


Figura 10: Andamento dell'energia assorbita al variare della lunghezza d'onda

Legame	kJ/mol
C = O	728
C = C	607
C = S	540
C – C aromatico	519
C – F	498
O – H	460
C – H etilene	443
C – C alifatico	335
C – Cl	326
C – N ammidi	222

Tabella 2: Energie di legame di corrispondenti coppie di atomi

L'energia assorbita può essere trasportata fino a 200 Å (ca. 100 atomi) lungo la catena polimerica e provocare la rottura in un punto debole della catena. Ad esempio, un gruppo carbonilico –C=O assorbe radiazione a 310 nm, l'energia del sistema aumenta di 385 kJ/mol.

Questa energia non può rompere il legame $\text{C}=\text{O}$ (728 kJ/mol), ma è sufficiente per rompere un legame $\text{C}-\text{C}$ e in questo modo può spezzare la catena [17].

1.3.3 Effetti delle condizioni di coltura *in vitro* e *in vivo*

In aggiunta alla capacità di alterare il materiale, la sua superficie e la sua topografia, altre variabili possono essere considerate per produrre un sostituto vascolare. Tra queste variabili aggiuntive ricordiamo: i tipi di cellule, i differenti tipi di coltura, le differenti modalità di semina. Quando una protesi vascolare viene impiantata è immediatamente sottoposta a forze e *stress* derivanti dal flusso sanguigno. Sono tali sollecitazioni che permettono alle cellule di allinearsi in direzione longitudinale ma è anche tale *stress* a determinare la perdita di cellule endoteliali con conseguente formazione di trombi e fallimento dell'impianto stesso. Inoltre la pressione pulsatile può indurre un cattivo adattamento tra il tratto naturale e la protesi con conseguente modifica nelle cellule muscolari e iperplasia dell'intima. Fino ad oggi la maggior parte degli studi ha operato una semina in statico delle cellule endoteliali ma recentemente gli scienziati si sono concentrati nella messa a punto di condizioni di semina in modalità dinamica. Combinazioni di semina statica e coltivazione in perfusione, pre-condizionamento di cellule endoteliali con *shear stress* gradualmente incrementati, e cellule endoteliali seminate su materiali compositi decorati con motivi RGD o molecole biologiche, sono risultati fornire livelli di ritenzione del monostrato endoteliale sempre migliori. Le cellule tradizionalmente utilizzate per ripopolare le protesi vascolari sono cellule endoteliali, fibroblasti e cellule muscolari lisce anche se sono in corso di valutazione molti tipi di cellule staminali, sia da sole che in combinazione, che includono le staminali derivate dal tessuto adiposo, dal tessuto muscolare, dal tessuto cardiaco e i progenitori delle cellule endoteliali [15].

1.3.3.1 Recenti sviluppi della rigenerazione vascolare *in vivo* per sostituti biorassorbibili

Il gruppo di ricerca di Breuer e Shinoka [16] ha recentemente scoperto i meccanismi che regolano la vascolarizzazione dei vasi sanguigni biorassorbibili *in vivo* utilizzando cellule staminali. Infatti per realizzare dei sostituti sanguigni è sufficiente seminare le cellule staminali del tessuto osseo (BMC), prelevate dal paziente con una biopsia, direttamente sullo *scaffold* biorassorbibile. Dopo appena 2 h di permanenza nel bioreattore contenente plasma

del paziente sarà possibile impiantare la protesi. La tecnica era già stata messa a punto in passato (Shinoka *et al.*, 2005) [3].

Nel 2001 Toshiharu aveva per primo impiantato *scaffold* biorisorbibili su dei bambini, con buoni risultati: gli unici problemi erano stati costrizione dello *scaffold* e stenosi, risolti con un angioplastica, per allargare i vasi.

Da quanto è emerso dallo studio di Breuer e , le cellule staminali riescono ad aderire già dopo due ore allo *scaffold* e Shinoka, dopo l'impianto, si innesca un processo infiammatorio che richiama globuli bianchi (monociti), grazie alle sostanze (citochine e proteine segnale) rilasciate dalle BCM. Le cellule staminali scompaiono, mentre i globuli bianchi richiamano le cellule endoteliali e muscolari che ricostruiranno il vaso. L'infiammazione termina appena il materiale viene riassorbito, lasciando il nuovo vaso integro. I monociti sono i veri responsabili della riendotelizzazione del vaso, proprio come accade nei neonati.

I risultati di Breuer e Shinoka sono stati realizzati su topi immunodepressi, ma presto la FDA darà la sua prima autorizzazione di protesi ingegnerizzate sull'uomo.

Questa tecnica potrebbe risolvere anche il problema di un'attesa del sostituto vascolare spesso inconciliabile con la sopravvivenza del paziente [2].

1.4 SCAFFOLD ELETTROFILATI

In generale le strutture fibrose stanno suscitando sempre maggior interesse in quanto sono simili alla matrice extracellulare e possono essere prodotte con una serie di tecniche differenti. Tra le tante tecniche quella che sta emergendo è *l'electrostatic spinning* (Figura 11). I molti parametri che caratterizzano la tecnica offrono grandi possibilità di modificare lo *scaffold* polimerico rispetto alle sue proprietà, alla struttura e alle caratteristiche topografiche.

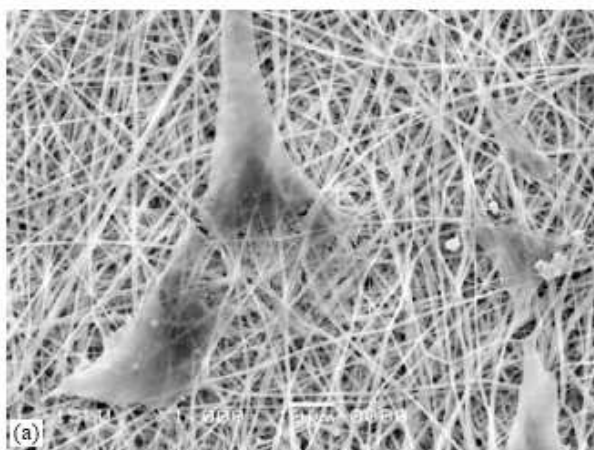


Figura 11: Micrografia SEM di ECs seminate su scaffold elettrofilato in P(LLA-CL) dopo 7 giorni di cultura

L'*elettrospinning* è un processo molto versatile, applicabile a tutti quei materiali polimerici che possono essere ricondotti allo stato fluido viscoso. Esistono due metodi per ottenere i polimeri allo stato fluido: la fusione e la dissoluzione in un solvente. Il processo di *elettrospinning* da massa fusa è applicabile solo ai polimeri termoplastici (polietilene, polipropilene, poliestere, ecc), per i quali la temperatura di fusione è decisamente inferiore alla temperatura di degradazione, mentre *l'elettrospinning* da soluzione polimeriche può essere applicato a tutti quei polimeri [18] che si sciolgono in solventi preferibilmente volatili.

Polymer Fiber

Polycaprolactone
Polyurethane
Poly(L-lactic acid)
Poly(lactic-glycolic) acid
poly(L-lactic acid)- <i>co</i> -
poly(ϵ -caprolactone)
Poly(ethylene oxide)
Poly(<i>p</i> -dioxanone- <i>co</i> -L-lactide)
block-poly(ethylene glycol)
Polyethylene terephthalate
Poly(vinyl alcohol)
Poly(methyl methacrylate)
Polycarbonate
Polystyrene
Collagen
Gelatin
Fibrinogen
Chitosan
Silk fibroin

Figura 12: Elenco di alcuni polimeri elettrofilabili

Si possono usare diversi tipi di polimeri (Figura 12): sintetici, naturali, miscele di polimeri o copolimeri. Si ottengono anche materiali compositi e ceramici. Le nanofibre di polimeri compositi si producono direttamente con il processo di *electrospinning*, invece per i ceramici ed i nanotubi di carbonio sono necessari trattamenti post-processo.

Per quanto riguarda le applicazioni di ingegneria tessutale i polimeri biorassorbibili più promettenti sono risultati, come già visto, il poli(ε-caprolattone) (PCL), l'acido polilattico (PLA), l'acido poliglicolico (PGA) o i loro copolimeri.

Tra i polimeri naturali vengono invece annoverati il collagene, il fibrinogeno, le proteine della seta, l'elastina e l'acido ialuronico. Questi, a differenza dei polimeri sintetici, garantiscono una buona biocompatibilità ma sono molto più sensibili ai trattamenti [15].

1.4.1 Acido polilattico, poli(ε-caprolattone) e loro copolimeri

Il polietilenglicole (PGA), l'acido polilattico (PLA) e l'ε-policaprolattone (PCL) appartengono tutti alla famiglia dei poliesteri alifatici biodegradabili (Figura 13 e Figura 14).

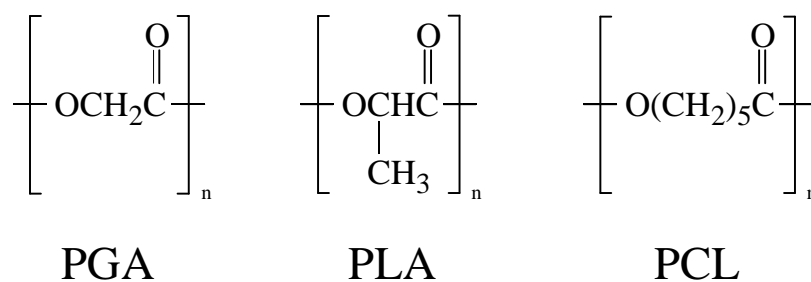


Figura 13: Poliesteri alifatici biodegradabili più comuni

Polimero	T_m (°C)	T_g (°C)	Modulo (MPa)
PGA	225-230	35-40	7
PLLA	173-178	60-65	2.7
PDLLA	amorfo	55-60	1.9
PCL	58-63	-(65-60)	0.4

Figura 14: Principali proprietà termo-meccaniche dei poliesteri alifatici biodegradabili più comuni

In particolare, l'acido polilattico è stato realizzato per la prima volta da Carothers nel 1932, con un processo di condensazione e polimerizzazione diretta in solvente e sotto vuoto spinto dell'acido lattico. Carothers abbandonò poi il polimero a causa del punto di fusione troppo basso per fibre e prodotti tessili e passò allo sviluppo del nylon [19].

Il PLA è caratterizzato da un sostituente metilico laterale assente nel PGA, che riduce l'affinità con l'acqua e quindi comporta una minore sensibilità all'idrolisi. Impiega molti mesi o anche anni a degradarsi e, per regolarne la velocità di degradazione, può essere fabbricato come copolimero insieme al PGA.

La struttura è semicristallina, ma con un grado di cristallinità minore del PGA, intorno al 35% ($T_g \sim 65^\circ\text{C}$ e la $T_f \sim 170^\circ\text{C}$). Il polimero, a causa della presenza di un centro chirale, ha due forme enantiomeriche D- ed L-, la prima conferisce uno stato amorfo al polimero. Perciò nella forma PDLLA la distribuzione casuale dei due domini in catena comporta una struttura amorfa ed un aspetto trasparente, con velocità di degradazione superiori (2-12 mesi). La velocità di idrolisi, indipendentemente dal peso molecolare del polimero, è legata al suo grado di cristallinità e alla sua composizione [5].

Come copolimero con il PCL è stato utilizzato in forma di P(LLA-CL), con resistenza attorno agli 1-3 MPa, analoga ai tessuti dei vasi sanguigni umani. La biocompatibilità è stata confermata dalla crescita di cellule HUVEC [3].

La sintesi avviene per polimerizzazione dell'acido lattico. Quest'ultimo a sua volta può essere prodotto tramite processi fermentativi ad opera dei batteri del genere *Lactobacillus* [19]. Un processo di sintesi attuale prevede l'estrazione di zuccheri (destrosio essenzialmente, ma anche glucosio e saccarosio) da farina di granturco, barbabietole da zucchero o amido di frumento e la successiva fermentazione ad acido lattico. Si preferisce partire da zuccheri raffinati piuttosto che dai meno costosi melassa o siero, poiché la purificazione dopo fermentazione è più costosa.

L'acido lattico è convertito nel dimero (lattide) che è purificato e polimerizzato (metodo dell'apertura dell'anello) ad acido polilattico senza bisogno di solventi (Figura 15). La famiglia di polimeri nasce in parte dalla stereochimica dell'acido lattico e del suo dimero. Fermentato, l'acido lattico è per il 99,5% in forma L-isomero e per lo 0,5% in forma D-isomero.

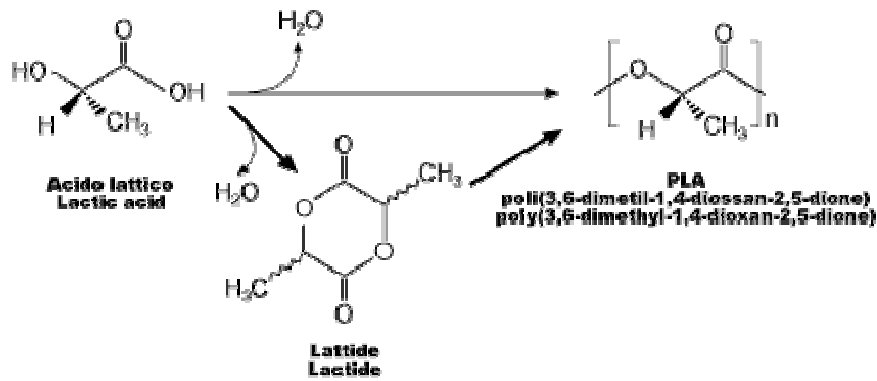


Figura 15: Vie diretta e tramite dimero per il PLA

La conversione a dimero può essere controllata per avere tre forme differenti: L-, D-, e Meso-lattidi (Figura 16).

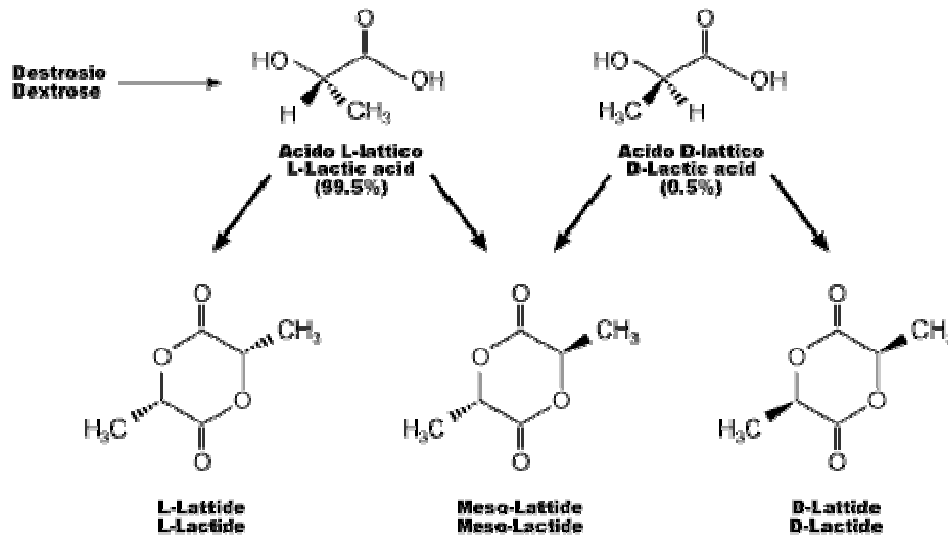


Figura 16: Sono possibili tre diversi lattidi

La polimerizzazione del lattide verso polimeri ricchi di L-isomero dà prodotti cristallini, mentre quelli che contengono più del 15% di D-isomero sono più amorfi. Il miglior controllo della stereochimica che si realizza con la via del dimero spiega la superiorità dei prodotti attuali rispetto a quelli di Carothers del 1932. La resina PLA risultante può essere estrusa come le altre resine termoplastiche per formare fibre, film, *spunbond*⁴, ecc.

Fino agli anni '80 i costi proibitivi di produzione avevano ristretto il campo di applicazione del PLA al solo settore medico. Successivamente i progressi tecnologici e l'abbassamento del costo della produzione di acido lattico per via biologica hanno ampliato il mercato del PLA

⁴ Sono filamenti estrusi, stirati e depositati su una superficie mobile, a formare una rete [fonte: INDA's Nonwoven Glossary]

anche a una scala di produzione commerciale per applicazioni diverse. Di recente il PLA è stato riproposto come legante alternativo per nontessuti cellulosici, per la facilità di degradazione idrolitica rispetto all'acetato polivinilico o ai copolimeri dell'acido etilenacrilico. Si è iniziato con applicazioni in agricoltura e nel 1998 c'è stato un rilancio per applicazioni nell'abbigliamento. [5, 20, 19].

Il poli(ϵ -caprolattone), PCL, è stato ampiamente studiato come biomateriale in quanto si degrada per idrolisi dei legami esterei ed è riassorbito nei tessuti senza rilascio di prodotti tossici.

Inizialmente il PCL era conosciuto come materiale biodegradabile *in vivo* ad opera di funghi filamentosi o *Cryptococcus laurentii*, un batterio del lievito utilizzabile nel settore dell'imballaggio. Successivamente è stato scoperto che il PCL può degradarsi anche con meccanismo idrolitico in condizioni fisiologiche e, in certe circostanze, può essere degradato enzimaticamente. La degradazione del PCL rilascia acido ϵ -idrossicaproico quale unico metabolita e avviene in due fasi:

1. idrolisi non enzimatica in massa del legame estereo;
2. frammentazione e rilascio delle specie oligomeriche.

I frammenti di PCL sono degradati da macrofagi e da cellule giganti in un processo che coinvolge anche enzimi prodotti dai lisozomi.

Il PCL è un polimero semicristallino con bassa temperatura di transizione vetrosa, $T_g \sim -60^\circ\text{C}$ e $T_f \sim 60^\circ\text{C}$; la componente amorfa a temperatura ambiente si trova sempre nello stato gommoso. Questa proprietà è insolita fra i più comuni poliesteri alifatici e contribuisce alla notevole permeabilità del PCL a molti principi attivi. Per queste sue caratteristiche il PCL è molto usato nella progettazione di dispositivi per il rilascio controllato di farmaci.

La sintesi del PCL può avvenire attraverso differenti meccanismi di polimerizzazione: anionica, cationica, radicalica e di coordinazione. Il peso molecolare, l'indice di polidispersione e la natura dei gruppi terminali dipendono dal tipo di reazione di polimerizzazione.

Il PCL generalmente viene preparato per apertura del ciclo dell' ϵ -caprolattone (Figura 17), *ring opening polymerization* (ROP), usando un alcool mono-, di-, multi-funzionale come iniziatore in presenza di un centro di coordinazione metallico (Sn, Zn, Al), tipicamente originato da composti

come Sn(etilesanoato)₂ (gli alcolossidi metallici sono eccellenti iniziatori della polimerizzazione anionica di monomeri eterociclici). La polimerizzazione anionica di tipo ‘vivente’ è il metodo più versatile per preparare il PCL e i suoi copolimeri con alte conversioni e con bassi indici di polidispersione ($M_w/M_n=1,2$).

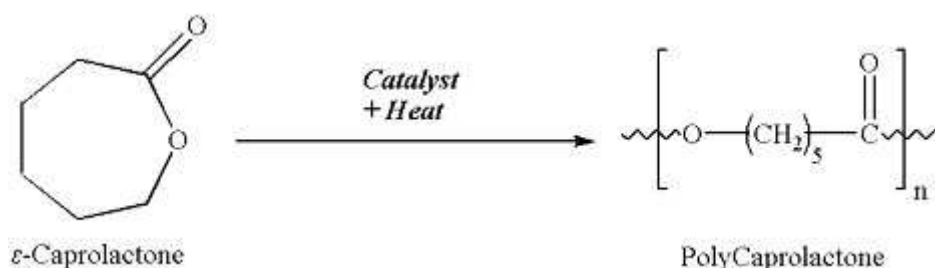


Figura 17: Reazione di polimerizzazione del PCL per apertura dell'anello (ROP)

Il PCL ha una biocompatibilità perfino superiore a quella del PLLA, ma, essendo un materiale semicristallino a bassa T_g , ha proprietà meccaniche scadenti e tempi di biodegradazione troppo lunghi, causati da un forte carattere idrofobico e da un'elevata cristallinità. È necessario, quindi, ovviare a questi inconvenienti senza sacrificare le proprietà di maggiore interesse quali biodegradabilità, biocompatibilità, elevata permeabilità a sostanze bioattive e atossicità [3, 21].

1.5 SCOPO DELLA TESI

Il presente lavoro di tesi si inserisce in un progetto di ricerca più ampio, che riguarda l'ottenimento di un impianto vascolare biorassorbibile di forma cilindrica e diametro inferiore ai 6 mm. Sono note, infatti, le problematiche già emerse con l'utilizzo dei materiali impiegati per protesi di diametro maggiore. L'idea del progetto è di realizzare almeno due strati che siano in grado di mimare il lume e lo strato medio di un vaso naturale. Gli sforzi compiuti fino ad ora si sono concentrati nel ricreare la struttura dello strato interno del vaso, sfruttando le potenzialità offerte dalla tecnica dell'*electrospinning*.

Come polimeri biocompatibili sono stati considerati il policaprolattone e un suo copolimero 70:30 (wt:wt) con l'acido polilattico.

Per rendere biomimetico lo *scaffold* elettrofilato sono stati aggiunti motivi RGD in modo da promuovere l'adesione di cellule endoteliali che, nel prosieguo dello studio, dovrebbero essere seminate all'interno del vaso.

A tal fine sono stati utilizzati due peptidi di sintesi denominati 2N3RGD e (GRGDSP)₄K, le sequenze dei quali vengono riportate in Figura 18.

H-Phe(p-N₃)-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Phe(p-N₃)-NH₂

H-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Lys-OH

Figura 18: Sequenza completa del peptide fotoattivabile 2N3RGD, PM = 2671,7 Da (sopra) e del peptide adesivo (GRGDSP)₄K, PM = 2424,51 Da (sotto)

Tali peptidi presentano quattro motivi adesivi (GRGDSP) per singola catena. Studi precedentemente svolti hanno dimostrato la maggior efficacia di queste sequenze ripetute nell'incrementare l'adesione cellulare rispetto a sequenze più corte o a peptidi ramificati [22]. La veicolazione del peptide all'interfaccia materiale/tessuto biologico è stata operata con due modalità differenti nel caso della matrice in PCL:

- legando covalentemente il peptide 2N3RGD alla superficie dello *scaffold* mediante attivazione tramite irradiazione UV dei gruppi azido introdotti ai terminali della sequenza;
- attraverso inclusione nella soluzione del polimero prima del processo di elettrofilatura.

Scopo della tesi risulta dunque valutare l'effetto di questi tipi di veicolazione di sequenze peptidiche sull'adesione e la proliferazione di cellule HUVEC provenienti da cordone ombelicale umano.

L'utilizzo di due materiali differenti (PCL e P(LLA-CL)) per operare l'ancoraggio covalente del peptide fotoattivo permetterà un confronto tra due diversi *scaffold* polimerici nella messa a punto del sostituto biomimetico.

La tesi si articolerà nelle seguenti fasi:

- Preparazione di matrici elettrofilate modificate per ancoraggio covalente di peptidi di sintesi:
 1. purificazione del peptide fotoattivo 2N3RGD⁵ Fmoc-protetto precedentemente sintetizzato;
 2. elettrofilatura di matrici di PCL e P(LLA-CL) in soluzione DCM/DMF (70:30) (wt:wt). L'ottimizzazione dei parametri di *electrospinning* è stata necessaria per le matrici in PCL, mentre nel caso del copolimero P(LLA-CL) si sono utilizzati i parametri riportati in un lavoro di tesi precedente [23];
 3. analisi morfologica al SEM delle matrici elettrofilate;
 4. adsorbimento del peptide alla superficie mediante condizionamento della stessa con soluzioni acquose del peptide a tre concentrazioni differenti;
 5. fotoattivazione dei gruppi azido mediante radiazioni ultraviolette a 366 e 254 nm;
 6. caratterizzazione delle superfici con misure di angolo di contatto e XPS;
 7. saggi di adesione di cellule HUVEC a 24 h in presenza o meno di siero;
 8. saggi di proliferazione a 3 e 7 giorni in assenza di siero.

- Preparazione di matrici elettrofilate contenenti il peptide sintetico di sintesi (GRGDSP)₄K:
 1. purificazione di aliquote del peptide (GRGDSP)₄K sintetizzato precedentemente;
 2. elettrofilatura di una soluzione al 10 % in esafluoroisopropanolo secondo i parametri in [24] arricchita del peptide (GRGDSP)₄K (1 mg/ml);
 3. un lavoro di tesi parallelo [24] e hanno riguardato solo la concentrazione di peptide che sembrava aver dato maggior beneficio all'adesione nel caso del peptide fotoattivo (1 mg/ml);

⁵ Il peptide denominato Fmoc-2N3RGD proviene a sua volta dalla conversione dei gruppi ammino in azido (fotoattivabili) del peptide Fmoc-2NH2RGD.

4. valutazione della cinetica di rilascio del peptide dalla matrice in soluzione fisiologica a 37°C;
5. saggi di adesione di cellule HUVEC a 24 h in presenza o meno di siero;
6. saggi di proliferazione a 3 e 7 giorni in assenza di siero.

2. METODI

2.1 SINTESI PEPTIDICA SU FASE SOLIDA (SPPS)

La tecnica *Solid Phase Peptide Synthesis* (SPPS), messa a punto nel 1963 da Bruce Merrifield, è attualmente il metodo più vantaggioso per la sintesi peptidica.

La produzione di un peptide con questa tecnica richiede generalmente 5 passaggi:

1. ancoraggio al supporto solido e assemblaggio della catena;
2. sblocco dalla resina e rimozione dei gruppi protettori in catena laterale;
3. purificazione;
4. eventuali modifiche chimiche post-sintesi;
5. caratterizzazione.

Diversamente da quanto avviene nelle cellule, la sequenza peptidica è sintetizzata a partire dall'estremità C-terminale verso l'N-terminale, con il gruppo carbossilico dell'ultimo aminoacido della sequenza legato ad un supporto solido (resina) tramite un *linker*. L'ancoraggio ad una matrice insolubile costituisce il vantaggio principale di questa tecnica in quanto permette di condurre l'intera sintesi nello stesso recipiente, e di isolare il prodotto alla fine di ogni ciclo attraverso semplice filtrazione. Questo comporta una ridotta perdita di materiale dovuto ad una minore manipolazione ed una sensibile riduzione dei tempi di lavoro, grazie alla possibilità di automatizzazione della procedura.

I due metodi più comuni per la sintesi di catene peptidiche tramite SPPS si basano sulla reattività dei rispettivi gruppi protettori del terminale α -amminico:

1. il *t*-Boc (*tert*-butilossicarbonil), rimosso in ambiente acido;
2. l'Fmoc (N^{α} -9-fluorenilmetilossicarbonil), rimosso in ambiente basico (Figura 19) [25, 26, 27].

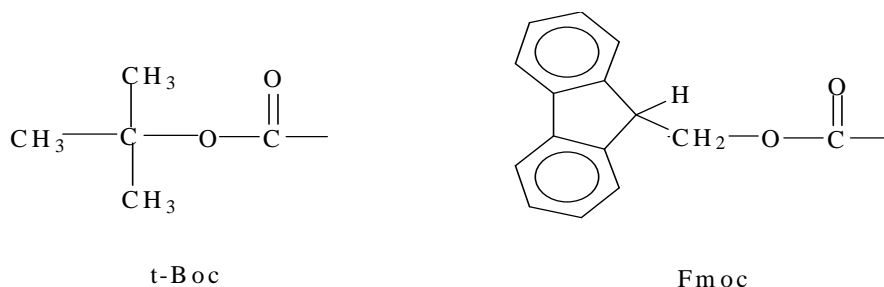


Figura 19: Struttura dei gruppi protettori del terminale α -amminico, *t*-Boc e Fmoc

La sintesi del peptide presentato in questa tesi è stata eseguita con strategia Fmoc. L'assemblaggio della catena consiste in una serie di cicli di reazioni di deprotezione del gruppo protettore α -amminico del residuo legato al peptide in crescita e di condensazione o *coupling* tra il gruppo α -amminico e la funzione carbossilica attivata di un nuovo residuo, con formazione di un legame peptidico (Figura 20). Gli amminoacidi oltre al terminale α -amminico e a quello carbossilico, possono contenere in catena laterale altri gruppi reattivi: sarà dunque necessaria una strategia di protezione delle catene laterali con gruppi che risultano stabili nelle condizioni di rimozione del gruppo protettore α -amminico della catena principale, tale strategia va sotto il nome di protezione ortogonale.

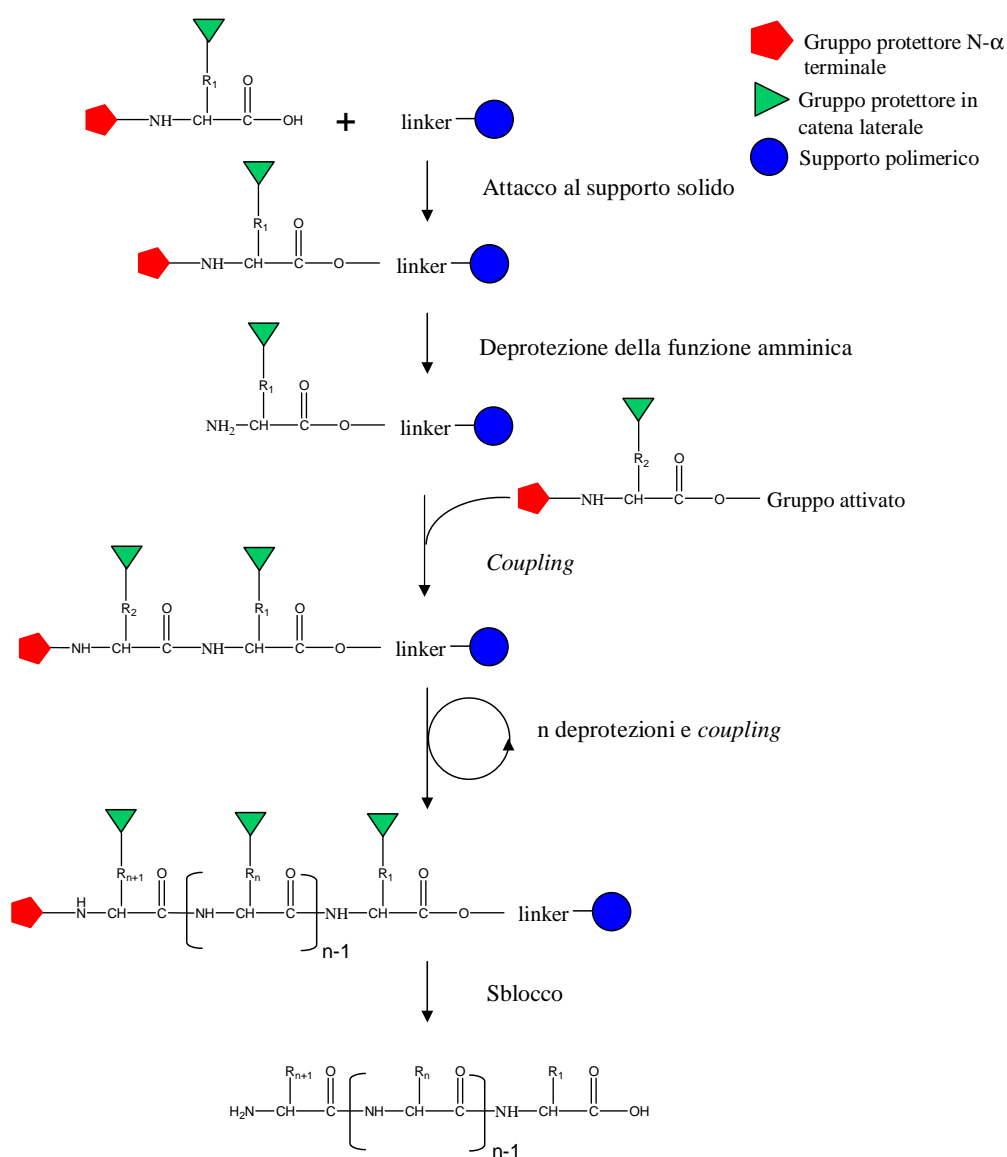


Figura 20: Schema generale della sintesi peptidica su fase solida

Nel caso in cui si operi con la chimica Fmoc, al termine della sintesi il peptide viene generalmente sbloccato dal supporto solido per reazione con acido trifluoroacetico TFA, con rottura del legame che ancora il peptide alla resina. Questa operazione spesso comporta la simultanea rimozione dei gruppi protettori in catena laterale [27] (Figura 21).

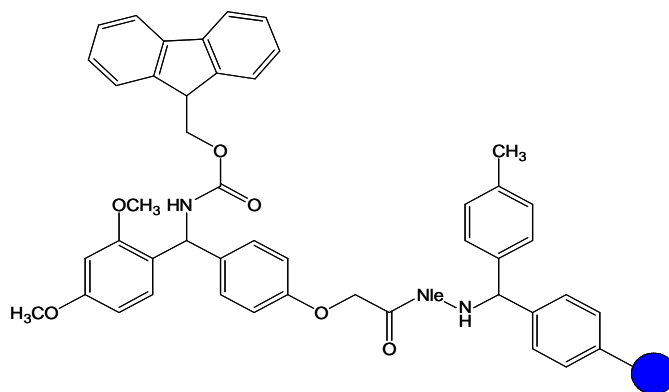


Figura 21: Esempio di resina: struttura del supporto solido Rink amide MBHA resin

2.1.1 Conversione dei gruppi laterali ammino in azido

Prima di procedere allo sblocco della resina, alla rimozione del gruppo Fmoc e degli altri gruppi protettori in catena laterale, il peptide su resina viene sottoposto alla conversione dei gruppi ammino in azido. Infatti il peptide 2N3RGD, considerato in questo lavoro di tesi, è stato sviluppato per funzionalizzare matrici fibrose elettrofilate tramite fotoimmobilizzazione. La *photoimmobilization* è un'applicazione particolare del *photoaffinity labeling*, una tecnica che utilizza ligandi fotoattivabili soprattutto per l'identificazione dei recettori di un farmaco. Nella *photoimmobilization* un *photoprobe*, cioè una sonda fotoattiva, viene utilizzato per legare covalentemente la molecola su una superficie [28].

I marcatori di fotoaffinità utilizzati normalmente sono dei gruppi chimici, stabili in ambiente acquoso, che per fotolisi formano specie radicaliche che permettono loro di reagire con le molecole di una matrice, indipendentemente dalla presenza di siti nucleofili o elettrofili. I gruppi fotoreattivi più comunemente utilizzati sono: gli α -diazochetoni, i chetoni α,β -insaturi, le diazirine, le arilazidi e il gruppo p-nitrofenile (Figura 22). Lo stato di singoletto o di tripletto della specie generata dalla luce determina la reazione preferita nel *crosslinking* tra

ligando e recettore [29]. La chimica dei radicali nitrene e carbene⁶, sebbene sia stata a lungo investigata, non è ancora del tutto chiarita. Dalle attuali conoscenze si deduce che l'intermedio reattivo carbene è più reattivo del nitrene. Tuttavia una più elevata reattività non sempre rappresenta un vantaggio in quanto può determinare la predominanza di reazioni non specifiche; in particolar modo si è osservato che la maggioranza dei gruppi che portano alla formazione di carbene non è adatta alla marcatura di peptidi [30].

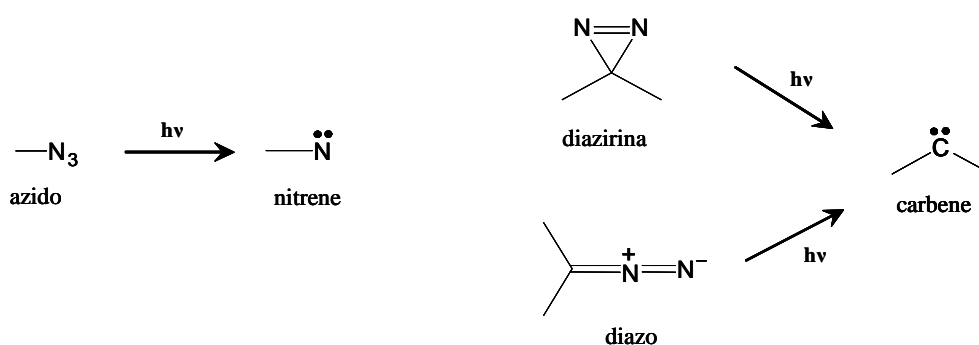


Figura 22: I gruppi azido, diazirina e diazo e le rispettive specie reattive generate per fotoattivazione

D'altra parte l'introduzione di gruppi azido avviene preferenzialmente mediante arilazidi; questi composti sono i marcatori meglio conosciuti usati in combinazione con i peptidi poiché risultano stabili alla maggior parte dei trattamenti acidi o basici usati durante la sintesi.

Purtroppo, anche l'uso delle arilazidi non è del tutto privo di svantaggi. Tali gruppi non sono, infatti, stabili a condizioni riducenti e quindi non vanno esposti ad idrogenolisi o ai tioli; inoltre dalla fotolisi delle arilazidi si formano fenilnitreni, che sono certamente molto reattivi, ma che possono subire anche un riarrangiamento a deidroazepina, intermedio a reattività limitata (Figura 23) [31].

⁶ Esistono due differenti tipi di carbeni: il carbene singoletto e il carbene tripletto. Il carbene singoletto è ibridato sp^2 ed è planare, possiede due elettroni appaiati e un orbitale p vuoto. Il carbene tripletto può invece essere sia planare sp^2 che lineare con ibridazione sp : caratteristica comune è la presenza di due elettroni spaiati. I termini "singoletto" e "tripletto" si riferiscono propriamente alle configurazioni quantiche di spin possibili per due elettroni: tre nel caso del tripletto e una per il singoletto, che ha elettroni sempre antiparalleli. Normalmente lo stato di tripletto è quello a più bassa energia e quindi più stabile in condizioni normali [<http://en.wikipedia.org/wiki/Carbene>, www.chimica.unipd.it/mariagabriella.severin/privata/...2006/bs8.pdf]. Il nitrene è l'analogo del carbene per l'N, che però è monovalente e non divalente, come invece il C del carbene. [<http://en.wikipedia.org/wiki/Nitrene> e <http://clem.msced.edu/~wiederm/advorgppt/carbenes.ppt>]

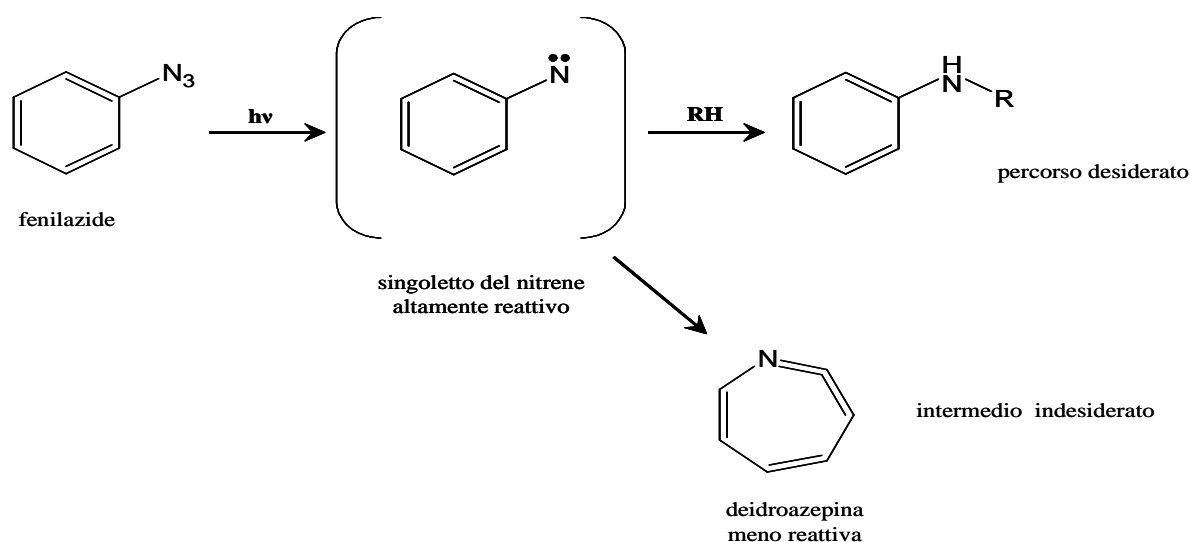


Figura 23: Reattività degli intermedi nella fotochimica delle fenilazidi.

Nel caso della sintesi del peptide 2N3RGD si è scelto di inserire gruppi arilazide nei peptidi sintetizzati.

In generale l'incorporazione di gruppi arilazide nei peptidi può essere intrapresa in due modi:

1. per derivatizzazione di un peptide già sintetizzato. A tale scopo sono usati agenti eterobifunzionali, recanti un gruppo fotoreattivo e un gruppo funzionale in grado di stabilire un legame stabile con un peptide;
2. tramite sintesi *ex-novo* di un peptide fotoattivo per incorporazione di amminoacidi già marcati durante il processo di sintesi. Per introdurre il gruppo azido, è possibile in tal caso seguire due tecniche:
 - a. utilizzare un residuo di p-azidofenilalanina,
 - b. introdurre un residuo di p-nitro/p-amminofenilalanina da convertire in seguito in p-azidofenilalanina [30] (Figura 24).

Per questa sintesi si è deciso di sintetizzare *ex novo* il peptide fotoreattivo per introduzione di un residuo di p-aminofenilalanina e successiva conversione in gruppo azido.

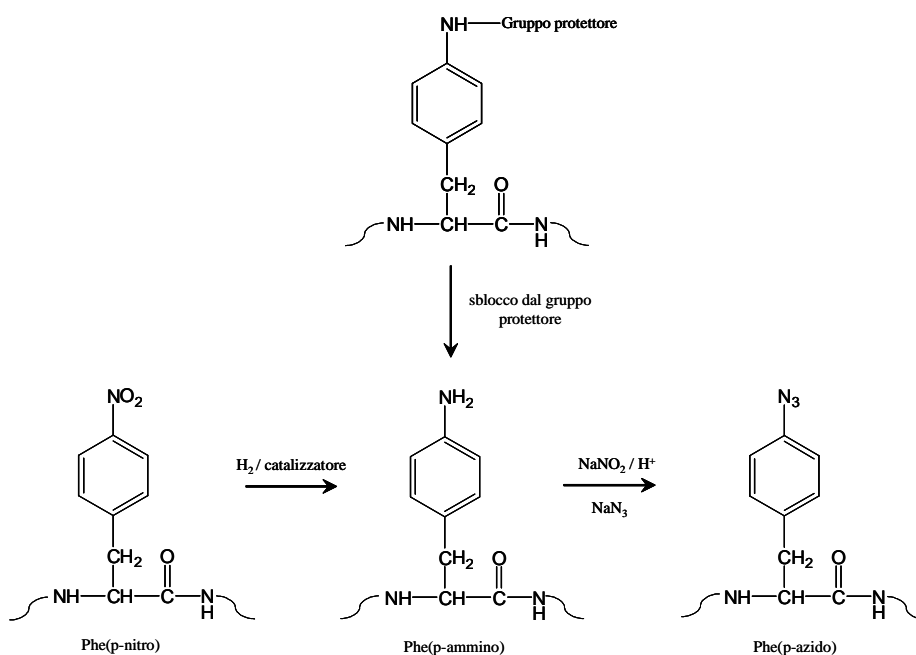


Figura 24: Vie sintetiche per ottenere un residuo di Phe(*p*-azido) a partire da un residuo di Phe(*p*-ammino) o Phe(*p*-nitro)

2.1.2 Sblocco del peptide dalla resina e rimozione del gruppo Fmoc

Quando si tratta il peptide su resina con la miscela di sblocco, si può ottenere la concomitante liberazione delle catene laterali dai rispettivi gruppi protettori, oltre al distacco del peptide dalla resina. La deprotezione delle catene laterali genera specie altamente reattive (ad es. carbocationi) che possono comportare delle reazioni secondarie indesiderate. L'uso, assieme al TFA, di reagenti nucleofili noti come *scavengers* (reagenti che hanno proprietà chimiche simili a quelle delle specie da proteggere) riduce in modo rilevante queste reazioni collaterali. La miscela di *scavengers* varia secondo gli amminoacidi presenti nella sequenza e in base al tipo di gruppi protettori usati per le catene laterali. Tipici *scavengers* sono l'acqua, composti a base di tioli e di fenoli.

La scelta della miscela di sblocco e il tempo richiesto dipendono soprattutto dalla natura e dal numero di gruppi protettori in catena laterale.[27]

Per il peptide Fmoc-2N3RGD lo sblocco dalla resina e la deprotezione delle catene laterali avvengono secondo la seguente procedura:

1. il reattore con il peptide su resina viene lavato con DCM e posto a seccare per almeno 2h sotto vuoto (fino a peso costante);

2. si trasferisce il peptide su resina in un pallone e lo si addiziona della miscela di sblocco costituita da 95% TFA, 2,5% H₂O MilliQ e 2,5% TES (trietilsilano, uno *scavenger* meno maleodorante dei tioli);
3. la miscela viene mantenuta sotto agitazione magnetica a temperatura ambiente per 2h, tempo che può essere incrementato in funzione del numero e tipo di gruppi protettori presenti in catena laterale (in questo caso aumenta proporzionalmente al numero di gruppi protettori Pmc dell'Arg presenti nella sequenza, che sono dei 2,2,5,7,8-pentametilcroman-6-sulfonil);
4. si elimina la resina tramite filtrazione su gooch G3 e la soluzione contenente il peptide viene portata a piccolo volume con un evaporatore rotante. Si precipita quindi il peptide in seguito all'aggiunta di etere dietilico freddo (~ 4°C). Il precipitato viene filtrato su gooch G4, seccato, sciolto in H₂O MilliQ e liofilizzato.

La rimozione del gruppo protettore N-terminale Fmoc, che è la fase svolta effettivamente in questa tesi a partire dal peptide Fmoc-2N3RGD (sintetizzato in passato all'interno del laboratorio), è stata eseguita successivamente allo sblocco del peptide dalla resina:

1. la miscela di sblocco 20% piperidina v/v in DMF (~ 10 ml ogni mg di peptide) viene lasciata 15min a reagire, agitando manualmente 4-5 volte;
2. si lascia svaporare e, quando la soluzione è quasi a secco, si aggiunge etere dietilico freddo (~ 4°C) sotto agitazione con un'ancoretta magnetica. Si filtra con gooch G4, che viene seccato insieme al pallone sotto vuoto per 1 h, e si preleva il peptide dal filtro, lavando con acqua MilliQ per recuperarne il residuo.

2.2 CROMATOGRAFIA LIQUIDA IN FASE INVERSA (RP-HPLC)

La purificazione dei peptidi sintetizzati è stata realizzata utilizzando la tecnica cromatografica RP-HPLC (*Reverse Phase – High Performance Liquid Chromatography*).

Il termine cromatografia riunisce un gruppo di importanti e differenti metodi in grado di separare componenti assai simili da miscele complesse.

Il campione viene sciolto in una fase mobile (gas, liquido o fluido supercritico), che viene poi fatta passare attraverso una fase stazionaria immiscibile. I componenti che vengono maggiormente trattenuti dalla fase stazionaria, perché ad essa più affini, si muovono più

lentamente con il flusso della fase mobile, mentre quelli debolmente trattenuti si muovono più rapidamente. A causa della diversa mobilità, quindi, i componenti del campione si separano in bande discrete e possono perciò essere analizzati qualitativamente e/o quantitativamente oppure essere isolati e raccolti.

I vari metodi cromatografici possono essere classificati (Figura 25) in base al tipo di fase mobile e stazionaria o in base al tipo di equilibri che i soluti instaurano tra le due fasi:

- 1) cromatografia di ripartizione o cromatografia liquido-liquido
- 2) cromatografia di adsorbimento o cromatografia solido-liquido
- 3) cromatografia a scambio ionico
- 4) cromatografia di permeazione gel
- 5) cromatografia di gel-filtrazione

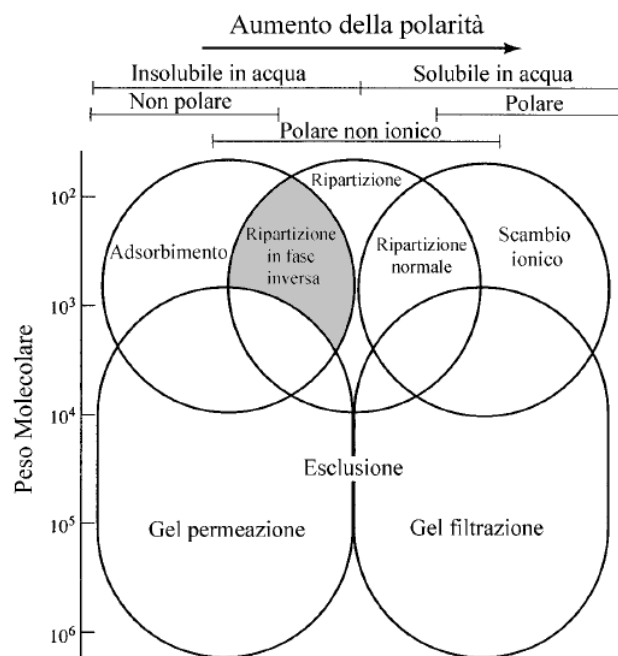


Figura 25: Applicazione dei 5 tipi di HPLC più usati, in base al peso molecolare e alla polarità dei composti da separare

In particolare, nella cromatografia liquida (LC) la fase mobile è costituita da un liquido, mentre la fase stazionaria può essere: un solido (cromatografia di adsorbimento), o un altro liquido immiscibile adsorbito su particelle solide impaccate in una colonna (cromatografia di ripartizione), o uno scambiatore anionico o cationico (cromatografia a scambio ionico).

Solo alla fine degli anni '60 è stata sviluppata una tecnologia adatta alla fabbricazione di piccole particelle, di grandezza variabile dai 5 ai 10 μm , per incrementare l'efficienza di impaccamento delle colonne. Il nome di *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC)

serve quindi a distinguere questa nuova tecnologia dalla cromatografia classica, ormai usata quasi esclusivamente per scopi preparativi. Le colonne vengono riempite con gel di silice funzionalizzata (granuli 3-10 μm), lunghe tra i 10 e i 30 cm e con diametro interno tra i 3,9 e gli 8,0 mm. La quantità di prodotto che può essere purificata dipende, perciò, da:

1. dimensioni della colonna (Figura 26),
2. specifiche di riempimento.

L'utilizzo di pompe a diverse centinaia di atmosfere risulta necessario per forzare la fase mobile attraverso la colonna e così evitare tempi smisuratamente lunghi [32].

Column Dimension

- **Short** (30-50mm) - short run times, low backpressure
- **Long** (250-300mm) - higher resolution, long run times
- **Narrow** (\leq 2.1mm) - higher detector sensitivity
- **Wide** (10-22mm) - high sample loading

Figura 26: Effetto della dimensione delle colonne sulla cromatografia HPLC [33]

Nello specifico, la RP-HPLC è una particolare cromatografia di ripartizione in cui la fase stazionaria ha caratteristiche apolari: nel presente lavoro di tesi sono state utilizzate colonne con gel di silice funzionalizzata con catene idrocarburiche lineari di 18 atomi di carbonio. Come fase mobile possono essere utilizzate miscele a vario titolo, composte da soluzioni acquose e solventi organici, in genere CH_3CN (acetonitrile). L'interazione che permette la ritenzione dei peptidi nella fase stazionaria è quindi di tipo idrofobico (Figura 27).

C18 or Octadecylsilane (ODS)

Very nonpolar - Retention is based on London (dispersion) interactions with hydrophobic compounds.

Example Alltech Phase: Alltima[®] C18

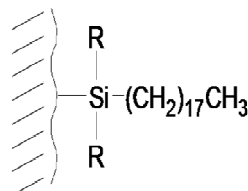


Figura 27: Esempio di funzionalizzazione dei gel di silice con gruppi altamente idrofobici [33]

La cromatografia può essere eseguita in modalità isocratica (cioè con concentrazione costante nel tempo) o impostando un gradiente. Nel secondo caso un aumento graduale della concentrazione di acetonitrile rispetto all'acqua incrementa l'idrofobicità della fase mobile e

determina la competizione tra questa e la fase stazionaria, con conseguente desorbimento dell'analita ad una data percentuale di acetonitrile e successiva eluizione.

In genere i peptidi sono separati meglio in ambiente acido. Di conseguenza la maggior parte delle fasi mobili contengono basse concentrazioni di acido TFA (0.05% nel caso dei due eluenti usati, che sono appunto CH₃CN e H₂O MilliQ), il quale agisce come coppia ionica incrementando la ritenzione, favorendo la solubilità dei peptidi e riducendo le interazioni elettrostatiche di questi con gli eventuali residui silanologici presenti sulla fase stazionaria; tale composto, inoltre, non assorbe nella regione UV utilizzata per la rivelazione e viene facilmente rimosso. E' proprio la composizione della fase mobile che di solito influenza maggiormente la separazione rispetto al tipo di fase stazionaria utilizzata.

La soluzione contenente il campione può essere introdotta in testa alla colonna cromatografica tramite iniezione o anche aspirazione. All'uscita della colonna cromatografica è posto un rivelatore che può essere di varia natura: gli strumenti adoperati nel presente lavoro utilizzano spettrofotometri UV come detector impostati alla lunghezza d'onda (λ) di 214 nm, ovvero in corrispondenza del picco di assorbimento del legame peptidico.

2.3 SPETTROMETRIA DI MASSA (MS)

La spettrometria di massa (MS) è un metodo di analisi distruttivo qualitativo, ampiamente usato in chimica organica, che permette di misurare i pesi molecolari e di determinare la formula di struttura di composti incogniti, anche disponendo di quantità esigue di campione.

Per prima cosa la molecola incognita deve essere ionizzata. Una volta creati gli ioni in fase gassosa questi possono essere separati nell'analizzatore, o nello spazio o nel tempo, in base al loro rapporto m/z (massa/carica).

Tutti gli spettrometri di massa richiedono per il loro funzionamento un vuoto molto spinto, per impedire, a seguito dell'urto con i gas dell'atmosfera, una perdita di ionizzazione, e sono costituiti essenzialmente da tre parti:

1. una camera di ionizzazione o sorgente;
2. un analizzatore;
3. un rivelatore.

Il campione in esame non deve essere necessariamente puro e può essere introdotto sotto diverse forme fisiche: i gas si trovano già nella forma fisica adatta; i solidi e i liquidi devono

prima essere vaporizzati; nei casi di sostanze poco volatili si ricorre a derivatizzazione. Per introdurre il campione è necessario avere un'interfaccia per passare dalla pressione atmosferica al vuoto ($\sim 10^{-6}$ torr). Il campione viene ionizzato in una camera di ionizzazione per impatto con un fascio di elettroni, atomi, ioni o fotoni, in relazione alla tecnica di ionizzazione impiegata. Alcune tecniche di ionizzazione sono estremamente energiche, e portano ad una frammentazione spinta della molecola (tecniche *hard*): la ionizzazione con elettroni accelerati da un potenziale di 70 volt è un metodo ad alta energia e porta ad una estesa frammentazione, che lascia poco o niente dello ione molecolare. In assenza dello ione molecolare, il peso molecolare e la struttura non sono facilmente determinabili. Questo fatto ha portato alla messa a punto di tecniche di ionizzazione a più bassa energia, producendo un numero inferiore di ioni (tecniche *soft*) (Tabella 3).

TECNICHE HARD	TECNICHE SOFT
Ionizzazione elettronica o <i>Electron Ionization</i> (EI)	Ionizzazione chimica o <i>Chemical Ionization</i> (CI)
	Bombardamento con atomi veloci o <i>Fast Atom Bombardment</i> (FAB)
	Ionizzazione termospray o <i>Thermospray Ionization</i> (TSP)
	Ionizzazione elettrospray o <i>Electrospray Ionization</i> (ESI)
	Ionizzazione chimica a pressione atmosferica o <i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i> (APCI)
	Desorbimento laser assistito da matrice o <i>Matrix Assisted Laser Desorption</i> (MALDI)

Tabella 3: Classificazione delle tecniche di spettrometria di massa in base al tipo di sorgente

Nel presente lavoro di tesi è stato utilizzato uno strumento ESI-TOF. La tecnica di ionizzazione ESI (*ElectroSpray Ionization*) utilizza un gas inerte (di solito azoto) per favorire un processo di nebulizzazione provocato da una forte differenza di potenziale. La d.d.p. viene applicata all'ago metallico dell'iniettore, che genera goccioline cariche di soluzione (analita e solvente). Le caratteristiche essenziali dell'ES sono che:

1. la ionizzazione si verifica a pressione atmosferica;
2. si può depositare una carica multipla sulla specie molecolare.

Questo processo avviene in soluzione (acquosa e organica), che viene poi nebulizzata in una camera termostata, ad 80 °C in genere, in cui è applicato un campo elettrico (Figura 28).

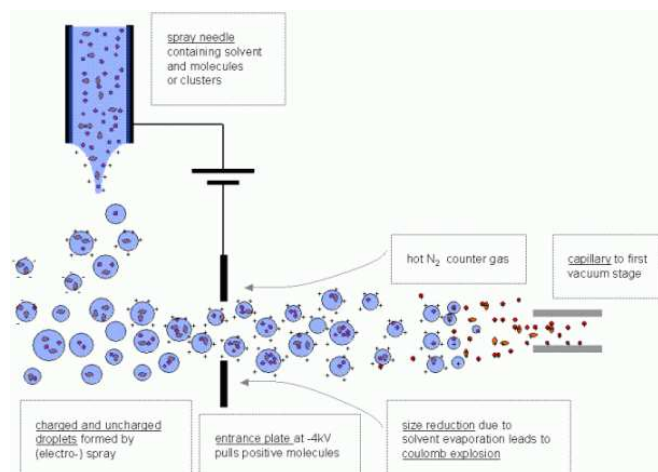


Figura 28: Rappresentazione schematica del processo di ionizzazione che avviene in una sorgente ES

La nebulizzazione comporta la formazione di piccole goccioline di solvente che contengono delle specie ionizzate (analita carico). Nella sorgente il gas inerte fluisce a bassa velocità per favorire l'evaporazione del solvente, questo permette di trattare anche composti termolabili. Con il procedere dell'evaporazione del solvente, le goccioline si rimpiccioliscono fino a che la repulsione elettrica, aumentata a causa della crescente densità di carica, supera la tensione superficiale della goccia. A questo punto la gocciolina "scoppia" (la repulsione ha superato il limite di Rayleigh), creando una corrente di ioni che vengono poi focalizzati da un gradiente di campo verso l'analizzatore.

Una caratteristica peculiare di questa tecnica di ionizzazione è di essere capace di provocare la formazione di specie multicarica. Nelle tecniche precedenti, infatti, z era sempre uguale ad 1, mentre nella tecnica ESI è possibile variare anche la carica z , per cui se si vogliono osservare molecole molto grandi bisogna favorirne la ionizzazione con una maggiore d.d.p.

L'analizzatore impiegato è di tipo TOF (*time of flight* = a tempo di volo) e si basa sul principio che ioni di differente valore m/z hanno la stessa energia cinetica, ma differente velocità. Occorre considerare, infatti, che gli ioni accelerati dal campo elettrico nella camera di ionizzazione possiedono un'energia cinetica pari a quella fornita dal campo stesso:

$$\frac{1}{2} m v^2 = zV$$

dove m è la massa, v la velocità, z la carica dello ione e V la differenza di potenziale. Lo ione accelerato quindi acquista energia cinetica a spese del campo elettrico. Così gli ioni che hanno il rapporto m/z minore arriveranno al rivelatore prima di quelli più pesanti, visto che la d.d.p. è un parametro costante. L'analizzatore ha la forma di un tubo in cui viene fatto un alto vuoto

e dove sono assenti sia campi elettrici che magnetici. In questo modo si riescono a misurare valori di massa anche estremamente elevati e si ha un'alta sensibilità.

All'uscita dell'analizzatore si trova il rivelatore, per la quantificazione degli ioni. La maggioranza dei rivelatori funziona ad impatto elettronico o per cattura ionica. Entrambi i tipi richiedono una superficie che raccolga gli ioni e dove la carica venga neutralizzata. Si realizza quindi un trasferimento di elettroni ed un flusso di corrente (TIC = *Total Ion Current*), che può essere amplificato ed infine convertito in un segnale registrabile su carta o processabile da un computer. Lo spettro multicarica (m/z vs Intensity%) viene trasformato matematicamente per deconvoluzione della gaussiana dal computer, e genera lo spettro di massa (m/z vs Intensity%) in cui appare il valore del PM della specie rispetto all'abbondanza relativa degli ioni analizzati. Le intensità dei picchi sono espresse in percentuali del picco più intenso, il cosiddetto *picco base*, cui si assegna arbitrariamente il valore di 100. Il potere risolutivo ($PR = m/\Delta m$), o risoluzione, dà una misura di quanto sensibile a differenze di massa è lo strumento utilizzato e dipende direttamente dalla massa del campione analizzato.

Gli svantaggi dell'uso di questa tecnica sono:

1. l'incompatibilità con l'utilizzo di tamponi non volatili e solventi organici apolari;
2. l'inibizione della ionizzazione con alte concentrazioni saline.

I vantaggi sono, invece:

1. il buon utilizzo con analiti volatili e non volatili, ionici e/o polari;
2. le informazioni sul peso molecolare;
3. la scarsa frammentazione;
4. l'elevata sensibilità;
5. la determinazione di alti pesi molecolari: l'*electrospray* è in grado di ionizzare biomolecole aventi massa fino a oltre 10^6 Da., grazie alla formazione di specie multicarica;
6. la possibilità di interfacciamento con la cromatografia liquida, che ne ha garantito un largo impiego per analisi biologiche e farmaceutiche [34, 35, 36].

2.4 ELECTROSPINNING

L'*electrospinning* è una tecnica brevettata già nel 1902 da J. F Cooley, ma il suo sviluppo verso un'applicazione commerciale avviene con Anton Formhals nel 1934. Con Norton, nel

1936, viene ideato anche l'*electrospinning* a partire da un fuso, oltre che da una soluzione. Dal '34 al '44 vengono registrati diversi brevetti, indirizzati alla produzione di filati. Contemporaneamente nel 1938 due sovietici, N.D Rozenblum and I.V Petryanov-Sokolov, sviluppano i primi filtri, elettrofilando acetato di cellulosa in un solvente a base di DCM ed etanolo. I "Petryanov filters" verranno effettivamente utilizzati per le maschere antigas.

Il modello matematico che spiega questa tecnica è stato studiato tra il '64 ed il '69 da Sir Geoffrey Ingram Taylor.

Solo dai primi anni '90, tuttavia, diversi studiosi hanno dimostrato come molti polimeri organici possano essere elettrofilati in forma di nanofibre. In particolare, a Reneker si deve anche l'origine del termine "*electrospinning*" [37]. Proprio in conseguenza di questi ultimi studi, l'*electrospinning* ha trovato un uso significativo nel campo dell'ingegneria tessutale negli ultimi dieci anni. Infatti la tecnica permette di ottenere *scaffold* polimerici con fibre ultrafini (micron/nanofibre: $5\mu\text{m} - 50\text{nm}$ [38]), in grado di mimare le caratteristiche della ECM attraverso l'applicazione di un forte campo elettrico su un fluido costituito da un polimero in soluzione o fuso. Oltre ai polimeri è possibile elettrofilare anche ceramici e nano compositi, via precursori sol-gel [39].

L'apparecchiatura (Figura 29) è composta di:

1. una siringa, che contiene la soluzione polimerica da elettrofilare;
2. una pompa, che dosa il fluido in uscita dalla siringa;
3. un generatore DC (*direct current*) di tensione ad alto potenziale (di solito $< 30\text{kV}$ [40]), collegato all'ago della siringa per mezzo di un contatto elettrico (il *setup* può essere sia in polarità positiva che negativa [41]);
4. un collettore metallico, posto a terra, che ha la funzione di raccogliere le fibre.

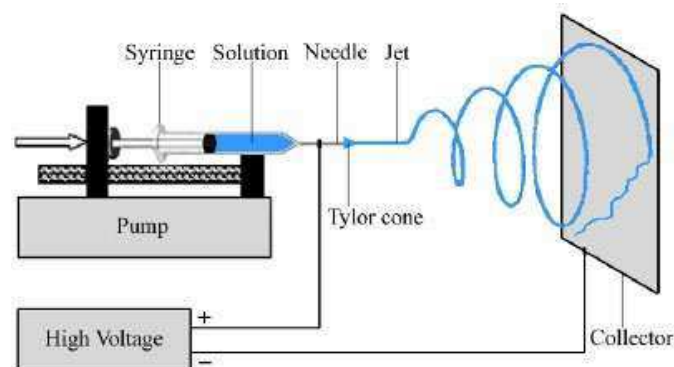


Figura 29: Rappresentazione schematica dell'apparato di *electrospinning* [43]

I vantaggi dell'*electrospinning* si possono riassumere in:

1. struttura a fibre, di diametro controllabile, che mima quella dell'ECM (l'ECM ha fibre tra 50 e 500 nm);
2. alto rapporto superficie/volume delle fibre ultrafini, che consente una significativa adesione cellulare. In particolare sembra che le dimensioni micrometriche siano più gradite alle cellule di quelle submicrometriche [44];
3. controllo dell'orientazione delle fibre;
4. ampio range di materiali elettrofilabili [41,43].

2.4.1 Il processo

L'*electrospinning* può essere visto come un caso particolare dell'*electrospraying*. L'*electrospraying* (o *electrospray*), infatti, è un metodo di atomizzazione di fluidi che ha applicazioni nella spettrometria di massa e nel campo industriale dei rivestimenti superficiali [37].

Se il fluido utilizzato per l'*electrospinning* ha un basso peso molecolare, il getto diventa instabile prima di raggiungere il collettore e si trasforma proprio in uno *spray* di piccole gocce elettrostaticamente cariche. Utilizzando, invece, polimeri fluidi, le forze viscoelastiche stabilizzano il getto, permettendo la formazione di finissimi filamenti carichi che si depositano in un intrico di fibre. I diametri sono ampiamente inferiori a quelli delle fibre estruse e stirate con forze meccaniche (wet, dry e melt spinning: Figura 30, dove il diametro è di circa 10 μ m e oltre) [43].

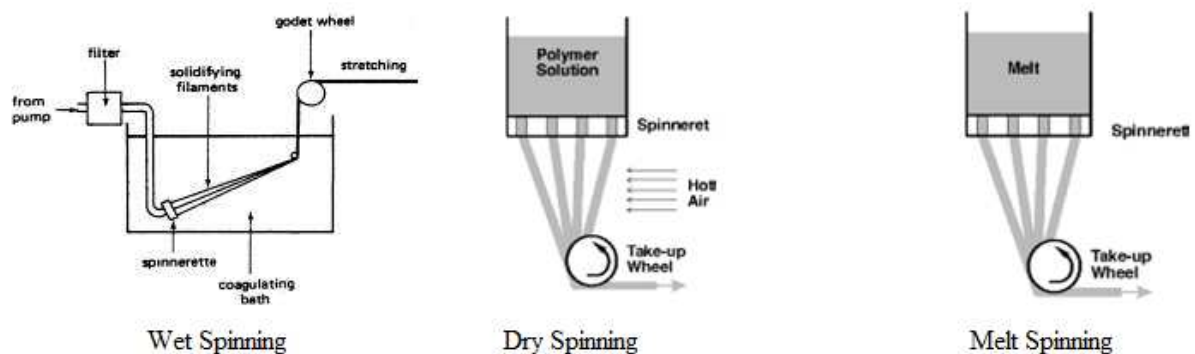


Figura 30: Tecniche meccaniche di filatura di fibre [43]

In particolare il percorso del fluido può essere diviso in quattro regioni:

1. Formazione del cono di Taylor:

quando il potenziale elettrico supera un valore critico, caratteristico della soluzione polimerica, il fluido che esce dal capillare (l'ago) cambia forma e si trasforma in un cono [37]. Questo è noto come cono di Taylor, ed è prodotto dalla repulsione elettrostatica tra le cariche elettriche che si accumulano sul polimero, che vince le forze legate alla tensione superficiale e alla viscosità della soluzione (trascurando la forza di gravità e le forze inerziali) (Figura 31) [39,45].

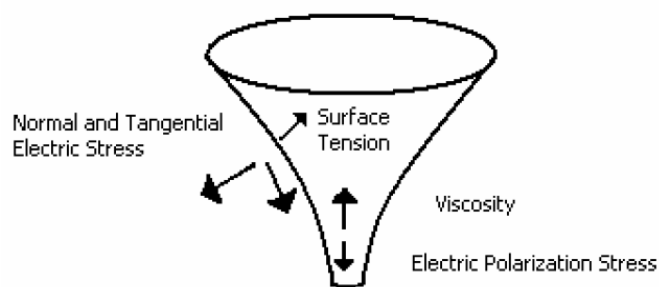


Figura 31: Forze nel cono liquido [45]

2. Formazione del filamento (zona di stabilità):

incrementando ancora il voltaggio, un getto carico esce dalla punta del cono (Figura 32) ed il processo di *electrospinning* inizia.

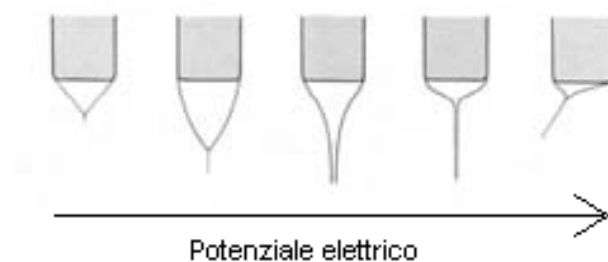


Figura 32: Evoluzione del cono di Taylor all'aumentare del potenziale elettrico fino alla formazione di un filamento

3. Zona di instabilità:

un tempo si pensava che il responsabile della diminuzione di diametro fosse il fenomeno dello *splaying*, cioè la frammentazione del getto in tanti filamenti sempre più piccoli, che

si verificherebbe a causa della repulsione elettrostatica. L'idea era apparentemente supportata anche dalle immagini reali (Figura 33).



Figura 33: Apertura del getto principale di una soluzione acquosa di PEO ($t < 1\text{ms}$) [46]

In realtà lo *splaying*, pur avvenendo, non è responsabile di questo fenomeno. Invece, in base al modello attuale, esistono tre instabilità che competono l'una con l'altra (Figura 34):

- l'instabilità di Rayleigh (o non conduttiva assialsimmetrica), anche detta *varicose instability*;
- l'instabilità conduttiva assialsimmetrica;
- il *whipping motion* (movimento di frusta), non assialsimmetrica, anche detta *kink instability*. [45,46]

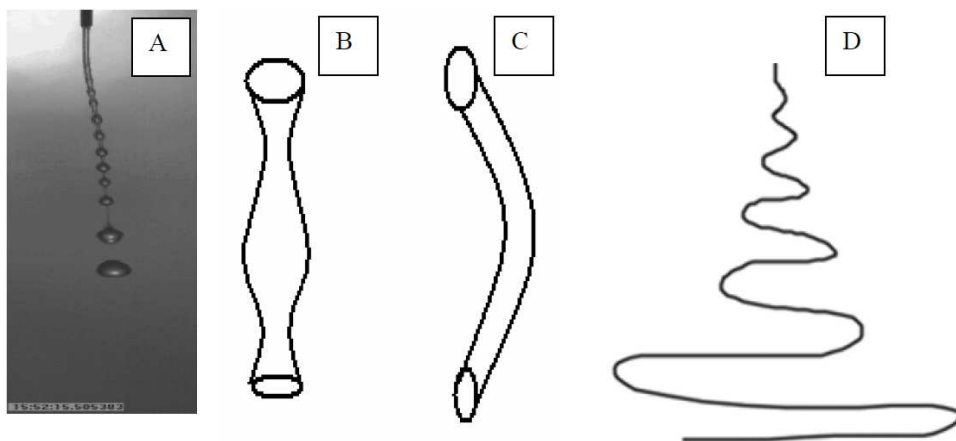


Figura 34: Instabilità di Rayleigh (A), instabilità conduttiva assialsimmetrica (B), instabilità di *bending* e *whipping motion* (C,D) [45]

L'instabilità di Rayleigh⁷ è prevalente con bassi flussi e campi elettrici, e dipende soprattutto dalla tensione superficiale. Appena, però, la densità di carica supera un valore limite, l'effetto viene meno. Le altre due instabilità insorgono, invece, con l'aumentare del campo elettrico.

L'instabilità conduttiva sembra essere la responsabile della formazione di gocce, sebbene ciò non sia confermato in letteratura. [45]

In ogni caso, almeno a potenziali e flussi sufficientemente alti, il fenomeno prevalente è quello dello *whipping motion*, movimento di frusta. Esso dipende dalla formazione di piccole curvature nel getto (*bending*) che provocano la formazione di un momento dipolare $P(z)$ perpendicolare al getto stesso. Il getto assume così un moto spiraliforme, con raggio crescente, cioè il percorso complessivo è a forma di cono. La torsione così impartita, insieme all'accelerazione del campo elettrico e alla repulsione elettrostatica sono responsabili dello *stretching* della fibra [47]. Questo stiro, associato anche alla evaporazione del solvente, porterà ad una riduzione del diametro del getto. Nel caso dei ceramici il calo del diametro dipende anche dalla scomparsa del polimero e dalla cristallizzazione.

Solo con fotografie a tempi molto brevi di esposizione ($t \ll 1$ ms [46]) è stato possibile accorgersi del *whipping motion* (Figura 35b). In particolare ci possono essere anche delle ulteriori instabilità di *bending* lungo il getto (Figura 35a) [45].

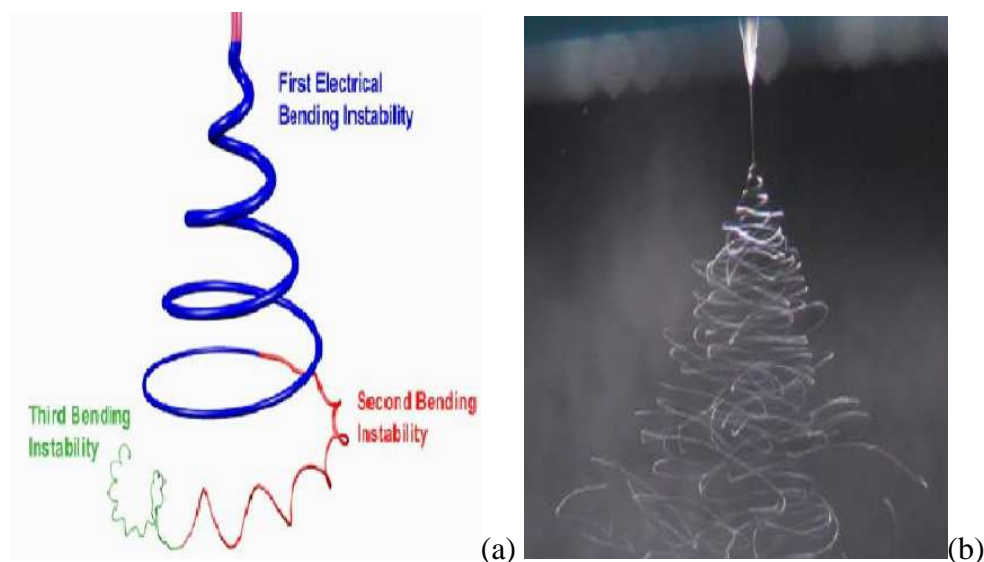


Figura 35: Schematizzazione (a) e foto del *whipping motion* (b) [49]

⁷ L'instabilità di Rayleigh - Plateau, a volte chiamata anche instabilità capillare, è un'instabilità fluidodinamica dovuta all'azione della tensione superficiale, che tende a destabilizzare un sistema fluido per crearne uno con lo stesso volume ma minore superficie. Un esempio classico di instabilità capillare è dato dalla rottura di un getto di forma cilindrica in piccole gocce. [http://it.wikipedia.org/wiki/Instabilit%C3%A0_di_Rayleigh-Plateau]

4. Collettore:

le fibre impattano e si depositano sul collettore collegato a terra (ad esempio un foglio di alluminio). Le cariche trasportate dal getto completano così il circuito elettrico [45]. E' stato dimostrato che le fibre elettrofilate possiedono un più basso grado di cristallinità, a causa del rapido riarrangiamento delle catene che hanno subito uno stiro elevato, dopo evaporazione del solvente. La concentrazione della soluzione o il voltaggio applicato non hanno un'incidenza significativa sul grado di cristallinità [46].

2.4.1.1 Tipi di collettore

Il collettore, oltre ad essere a piano statico (orizzontale/verticale) (Figura 36a), può avere diverse configurazioni (Figura 36b,c).

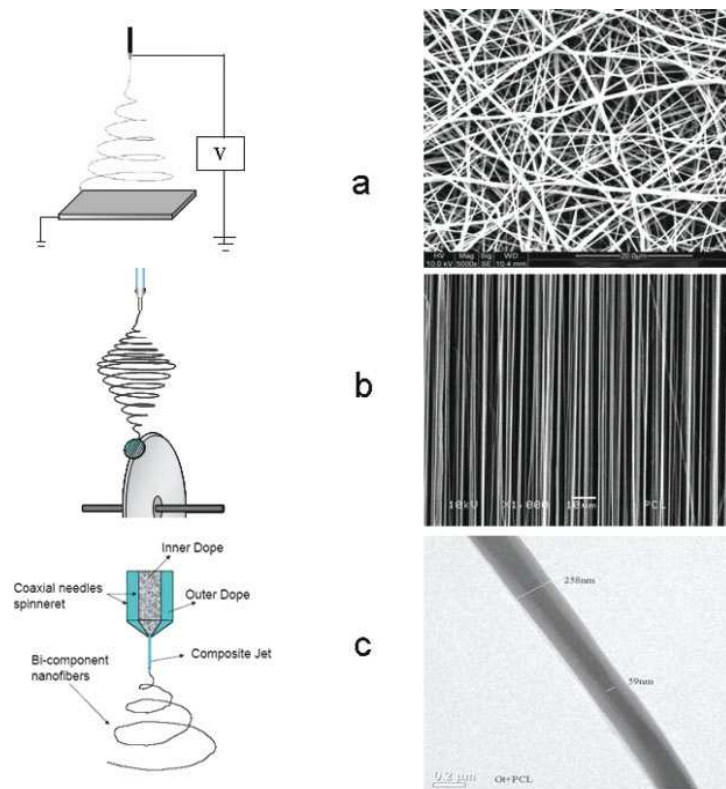


Figura 36: Rappresentazione schematica di vari tipi di collettore: statico (a), a disco rotante (b), coassiale (c) [18]

Nei casi in cui il collettore sia rotante (a disco o anche a cilindro), si ottengono fibre allineate uniassialmente. E' stato dimostrato che ciò favorisce la migrazione cellulare sulla matrice, in accordo con la teoria che le cellule hanno la massima probabilità di migrare in direzioni

associate con proprietà chimiche, strutturali o meccaniche del substrato. L'allineamento delle fibre è particolarmente interessante per applicazioni in cui sia richiesta un'orientazione cellulare, come per i vasi sanguigni [18]. Un problema di questa tecnica è quello di regolare la velocità di rotazione rispetto a quella di emissione delle fibre: se troppo bassa l'allineamento sarà ridotto, se troppo alta le fibre si romperanno [42].

Un collettore coassiale, invece, è utile per produrre fibre *core-shell*. Grazie a questa tecnica si possono controllare lo spessore della *shell*, la resistenza meccanica e le proprietà di rilascio. Per questo le fibre così ottenute sono applicabili per il rilascio di fattori di crescita e farmaci, oltre che per lo sviluppo di sensori e di compositi per la *tissue engineering* [18].

2.4.1.2 Nuovi apparecchi per *electrospinning*

Una recente apparecchiatura (2003) chiamata Nanospider™ (Figura 37), brevettata dalla università di Liberec, partner esclusivo della Elmarco s.r.o., ha sviluppato una tecnica più semplice di *electrospinning*, senza l'uso di capillari. In tal caso, infatti, i coni di Taylor si creano a partire dal sottile film superficiale di soluzione presente su un cilindro rotante. Così lo strato di soluzione si riforma continuamente, con il vantaggio che la distanza tra i coni di Taylor viene regolata dal processo stesso, aumentando la qualità delle fibre. A ciò si aggiunge una maggior capacità produttiva dell'apparecchio. Queste caratteristiche offrono una significativa possibilità allo sviluppo industriale dell'*electrospinning* [49].

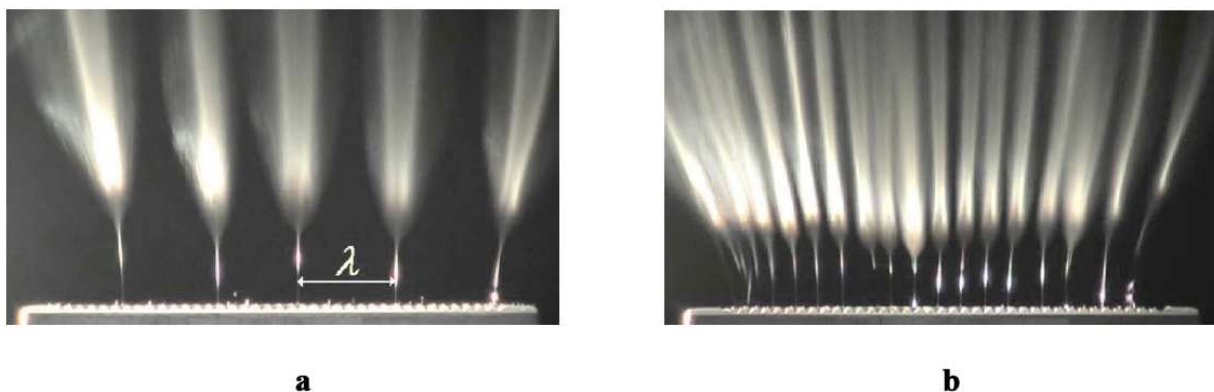


Figura 37: *Electrospinning* da liquido a superficie libera di alcol polivinilico a 32kV (a) e 43kV (b) [49]

2.4.2 Parametri di processo

Ci sono molti parametri che influenzano il processo di *electrospinning* e la morfologia delle fibre, che possono presentarsi con gocce, con pori o lisce (Tabella 4). Questi possono essere classificati in tre categorie: proprietà della soluzione polimerica, *Electrospinning setup* e condizioni ambientali. A queste si aggiunge il tipo di collettore utilizzato.

CATEGORIE DI PARAMETRI	PARAMETRI	DIPENDENZA DA ALTRE PROPRIETÀ	EFFETTO DI UN AUMENTO SUL DIAMETRO DELLE FIBRE
PROPRIETÀ DELLA SOLUZIONE POLIMERICA	Viscosità	concentrazione, peso molecolare	>
	Conducibilità elettrica	costante dielettrica	<
	Tensione superficiale	viscosità	>
ELECTROSPINNING SETUP	Voltaggio	/	leggermente < ⁸
	Portata di pompaggio	/	leggermente >
	Distanza ago - collettore	/	<
	Diametro Φ dell'ago	/	>
CONDIZIONI AMBIENTALI	Umidità	/	/
	Temperatura	/	<

Tabella 4: Parametri di processo e loro influenza sul diametro delle fibre della matrice elettrofilata

2.4.2.1 Proprietà della soluzione polimerica

Le proprietà della soluzione dipendono dalla sua viscosità, conducibilità elettrica e tensione superficiale. Chiaramente esse sono legate sia alle caratteristiche del polimero che a quelle del solvente.

1. Viscosità:

la viscosità della soluzione polimerica è uno dei parametri che più influenza il diametro e la morfologia delle fibre. Dal suo valore dipende l'entità delle forze viscoelastiche che si oppongono allo *splaying* del getto. Le forze viscoelastiche sono strettamente correlate alla struttura (lineare, ramificata o reticolata) del polimero e al suo peso molecolare. Quindi

⁸ Sebbene in [42] sia detto il contrario, studi recenti hanno dimostrato come tendenzialmente vi sia un calo del diametro medio con l'aumentare del voltaggio [52].

per ogni sistema considerato esiste un intervallo di concentrazione limite: al di sotto di questo, i concatenamenti (*chain entanglements*) sono troppo limitati per favorire il processo di filatura e si formano gocce, mentre, al di sopra, la goccia di soluzione si asciuga prima che il getto inizi a trascinare le fibre accelerate dal campo elettrico verso il collettore.

Per incrementare la viscosità della soluzione si può aumentare il peso molecolare oppure la concentrazione del polimero in soluzione. Aumentando la viscosità aumenta, però, anche il diametro delle fibre, perché la soluzione oppone più resistenza allo stiro da parte del campo elettrico, e di conseguenza il getto si stabilizza e fa un percorso più corto [42].

Va sottolineato che un polimero con un maggior grado di cristallinità avrà tendenzialmente una viscosità minore di uno amorfo, visto che il numero di *entanglements* sarà inferiore. Inoltre per comprendere l'andamento della viscosità bisognerà conoscere le temperature di transizione vetrosa, per capire quanto mobili siano le catene polimeriche a temperatura ambiente.

Le fibre elettrofilate hanno tipicamente una distribuzione unimodale. Invece, per soluzioni di PEO molto concentrate (e quindi viscosose), è stata osservata una distribuzione bimodale. Era presente una seconda popolazione di fibre, con un diametro approssimativamente tre volte più grande rispetto alla popolazione primaria, e ciò è stato attribuito a fenomeni di *splaying* [18].

2. Conducibilità elettrica:

l'aumento della conducibilità della soluzione provoca una maggiore repulsione di carica del getto, e quindi un maggior stiro delle fibre, che decrescono di diametro. [42]

Uno degli approcci per incrementare la conducibilità della soluzione è quello di aggiungere dei sali [51] o usare un solvente più conduttivo [52], come ad esempio la N,N-dimetilformammide DMF, che infatti ha costante dielettrica elevata ($\epsilon = 36,7$) [44, 52].

3. Tensione superficiale:

al fine di produrre le nanofibre la carica elettrica imposta deve superare la tensione superficiale della soluzione. Durante il processo di *electrospinning* avviene lo stiramento del getto al quale la tensione superficiale si oppone causando la formazione di gocce o di fibre con gocce. Affinché questo fenomeno non abbia luogo conviene quindi avere una soluzione con tensione superficiale bassa, ottenibile, oltre che con un opportuno solvente,

anche aumentando la viscosità della soluzione. Infatti in questo modo gli *entanglements* tra solvente e polimero prevengono la formazione di *cluster* [42].

2.4.2.2 Electrospinning setup

I parametri di *setup* sono legati al processo produttivo delle nanofibre e sono: il voltaggio, la portata, la distanza dal collettore e il diametro dell'orifizio.

1. Voltaggio:

l'aumento del voltaggio provoca una maggiore repulsione elettrostatica del getto, che risentirà di uno stiro maggiore. Si ottengono, perciò, fibre più sottili (Figura 38).

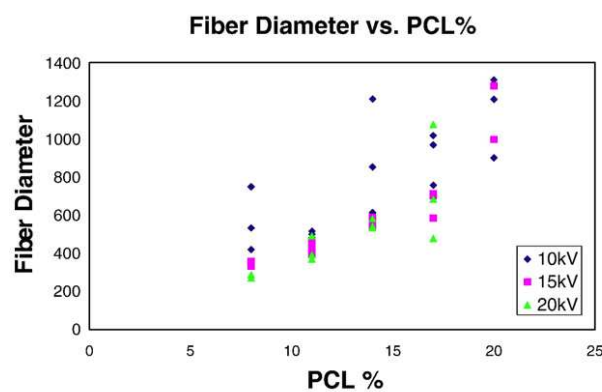


Figura 38: Legame tra diametro delle fibre, concentrazione e voltaggio [51]

Ad elevate differenze di potenziale i diametri delle fibre tornano invece a crescere, a causa della difficoltà che ha il solvente ad evaporare (ad es. per il PEO, che è poco viscoso, al 7% wt dipolimero in H₂O, 9kV sono già un potenziale elevato) [18].

2. Portata di pompaggio:

portate elevate generano un aumento della dimensione delle fibre. Infatti queste non hanno tempo sufficiente per permettere al solvente di evaporare [42]. Comunque questo parametro non è così influente come altri.

3. Distanza tra il foro e lo schermo:

variando la distanza tra il foro e lo schermo si influenza il tempo di percorrenza e la potenza del campo elettrico. Se la distanza è ridotta il getto ha un tempo minimo a

disposizione per asciugarsi prima di arrivare al collettore, ma anche l'intensità del campo elettrico aumenta incrementando l'accelerazione del getto. Per questo motivo la dimensione delle fibre aumenta [42].

4. Diametro dell'orifizio:

un ago con un diametro interno minore riduce il numero di gocce (Tabella 5) ed anche il diametro delle fibre. La goccia che si trova all'estremità dell' ago ha dimensioni minori e la sua tensione superficiale aumenta. A parità di voltaggio, c'è bisogno di una forza coulombiana maggiore affinché il getto si formi, con conseguente diminuzione dell'accelerazione del getto. Serve quindi più tempo perché venga stirato ed assottigliato prima di arrivare al collettore. [53]

DIAMETRO (mm)	CARATTERISTICHE DELLE FIBRE E DEL PROCESSO
1.2 (G18)	Gocce sulle fibre e occlusione dell'ago
0.8 (G21)	Occlusione occasionale dell'ago
0.7 (G22)	Rara occlusione dell'ago
0.4 (G27)	Nessuna occlusione

Tabella 5: Effetto del diametro dell'orifizio sulle caratteristiche delle fibre e del processo per una soluzione al 5% wt di P(LLA-CL) (70:30) a 12kV

2.4.2.3 Condizioni ambientali

I parametri ambientali influenzano la morfologia delle fibre ed il campo elettrico esterno.

1. Umidità:

al crescere dell'umidità crescono la dimensione, il numero e la distribuzione dei pori sulla superficie delle fibre [42]. Allo stesso tempo, a seconda del polimero, l'aumento dell'umidità provoca una crescita o una diminuzione del diametro delle fibre. Ad esempio per il PVP (o analogamente per il PEO), il diametro cala a causa della minor velocità di solidificazione (Figura 39). [54]

2. Temperatura:

l'incremento della temperatura della soluzione ha due effetti contrapposti per l'*electrospinning*, in quanto aumenta la velocità di evaporazione del solvente, per cui cresce la dimensione delle fibre, ma diminuisce la viscosità, con effetto opposto (Figura 39) [42, 54]. Chiaramente la temperatura non può essere troppo aumentata se si usano nel processo enzimi o proteine.

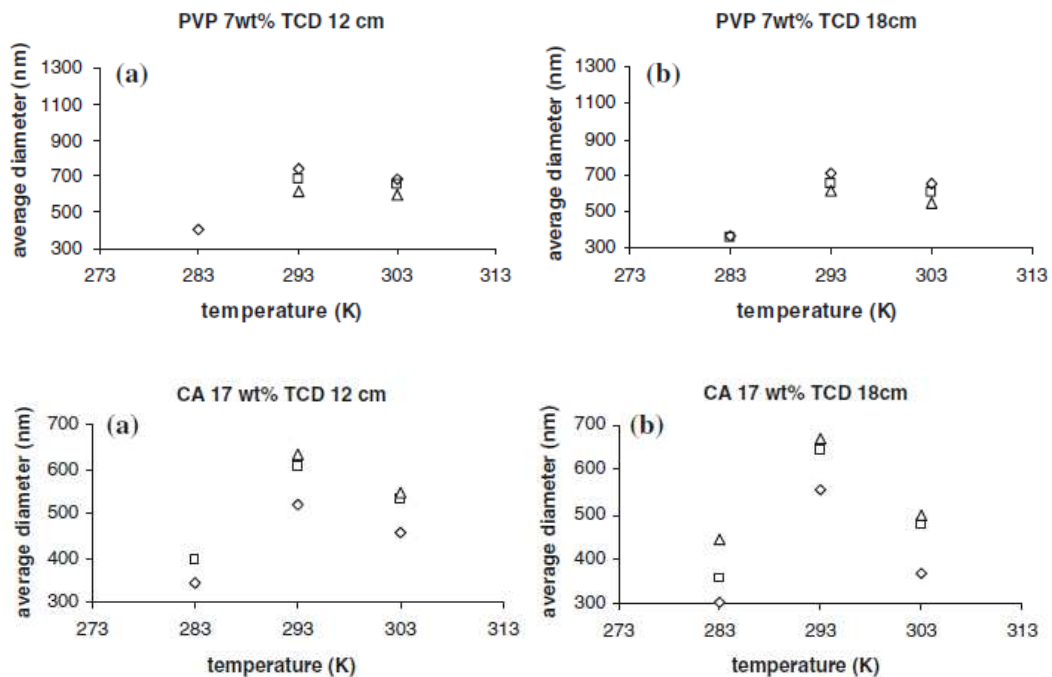


Figura 39: Effetto della temperatura e dell'umidità (RH: 20% diamante, 30% quadrato, 45% triangolo) per due materiali a diverse concentrazioni e TCD (distanza ago-collettore) [54]

2.4.3 Applicazioni dell'*electrospinning*

Quando i polimeri fibrosi passano da diametri micrometrici a nanometrici emergono molte nuove caratteristiche, tra cui due sono ritenute maggiormente significative: maggior rapporto superficie/volume (fino a mille volte superiore rispetto a quello delle microfibre) e proprietà meccaniche e strutturali superiori (maggiore rigidità e forza tensile in relazione al diametro). Inoltre, lavorando in specifiche condizioni con certi polimeri, si riesce ad inserire nelle fibre un grado di porosità elevatissimo con dimensione dei pori controllabile.

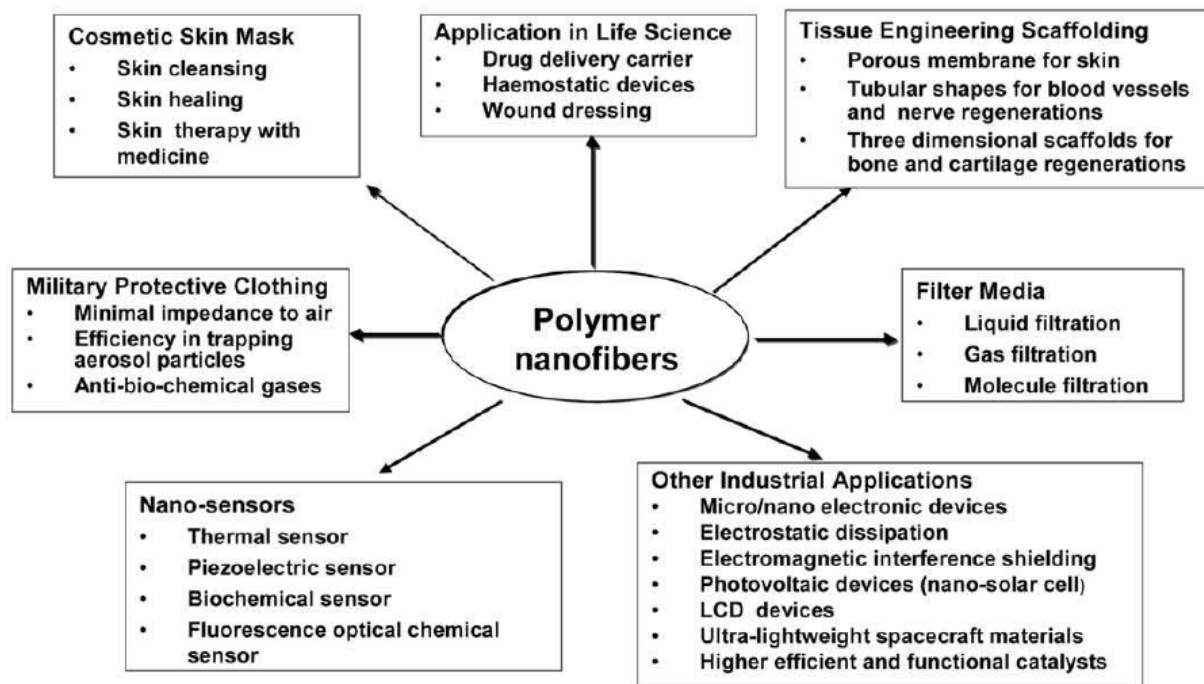


Figura 40: Potenziali applicazioni dell'*electrospinning*

Applicazioni industriali dell'*electrospinning* coprono i seguenti campi: microelettronica, produzione e accumulo di energia, salute, biotecnologie, ambiente, difesa e sicurezza [55] (Figura 40) [55]. Esse rimangono, però, ancora in fase sperimentale e solo in qualche caso sono già commercialmente prodotte, come i filtri per aria e liquidi [57, 57].

Un recente utilizzo commerciale in campo biomedico è quello dell'*AVflo*TM per l'emodialisi, la prima protesi di accesso vascolare a sfruttare le proprietà di una matrice elettrofilata, insieme alla *NovaMesh*TM, rete per ernia ventrale. In entrambi i casi il materiale è polycarbouretanico [58].

2.5 MICROSCOPIO ELETTRONICO A SCANSIONE (SEM)

Il microscopio elettronico a scansione (SEM), disponibile in commercio dal 1965, è uno strumento ora molto diffuso con un vastissimo campo di applicazioni. La sua buona risoluzione e la notevole profondità di fuoco consentono di osservare ad alti ingrandimenti con sorprendente tridimensionalità la topografia superficiale di differenti campioni. L'immagine viene prodotta facendo compiere ad un sottile fascio di elettroni un movimento di esplorazione (scansione) di una porzione di superficie del campione e rappresentando sullo

schermo di un tubo a raggi catodici (CTR) o su schermo a cristalli liquidi (LCD) l'intensità con cui gli elettroni (secondari, retrodiffusi, ecc.) vengono emessi in funzione della posizione. Il principio di funzionamento dello strumento (Figura 41):

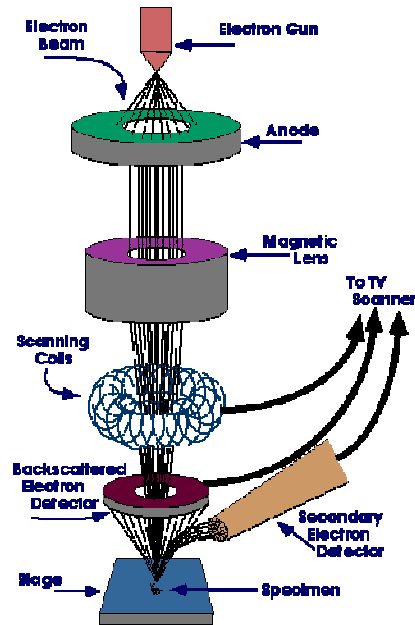


Figura 41: Schema a blocchi di un microscopio elettronico a scansione

1. sfrutta l'emissione di un fascio elettronico da parte di un filamento (di tungsteno o altro materiale più efficiente come L_aB_6) per effetto termoionico, accelerato da un campo elettrico applicato tra il filamento stesso (catodo), mantenuto ad un elevato potenziale negativo, e l'anodo, collegato a massa.
2. Il fascio viene focalizzato lungo una colonna sotto vuoto (attorno a 10^{-5} torr), mediante un sistema di lenti elettromagnetiche (tipicamente due lenti condensatrici e una lente obbiettivo), per ottenere un fascio finale di sezione molto ristretta (tipicamente 10 nm in strumenti standard e 1 nm in strumenti ad alta risoluzione). Le tensioni acceleratrici vanno da 1 a 50 kV, mentre le correnti degli elettroni focalizzati sono approssimativamente dell'ordine dei 10^{-7} - 10^{-8} A.
3. Il fascio di elettroni focalizzati analizza la superficie del campione per l'effetto di due coppie di bobine di deflessione incorporate nell'obbiettivo, che lo fanno muovere secondo righe parallele e successive e gli fanno quindi esplorare una piccola zona quadrata o rettangolare. Un sistema di movimentazione permette di spostare il

portacampioni relativamente alla sonda per variare la zona del campione in esame, nonché per variarne l'angolo di inclinazione.

4. Con un opportuno rivelatore viene raccolto il segnale, ad esempio gli elettroni retrodiffusi, la cui intensità è utilizzata per modulare la luminosità dello *spot* di un tubo a raggi catodici (CTR).

La posizione dello *spot* sullo schermo del tubo a raggi catodici viene comandata dallo stesso generatore che alimenta anche le bobine di deflessione dello *spot* del CTR. Si ottiene così un sincronismo tra la scansione del campione da parte della sonda e quello dello *spot* sullo schermo del CTR, e quindi l'immagine finale è una mappa dell'intensità di emissione degli elettroni secondari di corrispondenza biunivoca, punto per punto, fra lo schermo fluorescente e un'area della superficie del campione. L'ingrandimento è dato semplicemente dal rapporto tra le dimensioni lineari dell'immagine sul CTR e quelle della zona esplorata. Perciò al massimo si avrà un 20000x (= 0,2 mm/10 nm) se la risoluzione massima del SEM è 10 nm e tenendo conto che l'occhio umano ha un potere risolutivo di circa 0,2 mm. Con il microscopio ottico (OM), invece, non si va normalmente oltre i 1000x.

Una delle caratteristiche più conosciute della microscopia elettronica a scansione è la facilità di preparazione dei campioni. In molti casi si ha a che fare con campioni che risultano buoni conduttori sia di elettricità sia del calore e che non si alterano per effetto del vuoto. In tal caso è sufficiente ridurre il campione a dimensioni accettabili e fissarlo sul piattino portacampioni mediante un adesivo a bassa tensione di vapore o un pezzo di nastro biadesivo. A seconda della delicatezza del campione si può precedentemente rimuovere la polvere o la sporcizia mediante un lavaggio ultrasonico. I solventi usati in questi trattamenti devono, però, essere inerti e non lasciare tracce.

I campioni da esaminare devono essere sufficientemente conduttori o resi tali mediante deposizione per evaporazione di un film sottile di metallo (tipicamente oro, come in questo caso, o anche grafite). Un campione non conduttore, infatti, si caricherebbe elettricamente causando distorsioni e contrasti anomali nell'immagine. Lo strato deve essere il più uniforme possibile in modo da non alterare o oscurare la topografia superficiale del campione.

Al termine della preparazione il piattino col campione viene posto sul portacampioni dello strumento, che si posiziona sotto la colonna in una sede che funge da anticamera temporanea. Dopo circa un minuto il vuoto nell'anticamera è dello stesso ordine di grandezza di quello della colonna per far arrivare il fascio di elettroni primari al campione. [60]

2.6 XPS

La spettroscopia fotoelettronica indotta da raggi X (XPS)⁹ è un metodo analitico che permette di determinare le specie chimiche presenti sulla superficie di un campione. Fa parte delle spettroscopie elettroniche, insieme alla spettroscopia Auger (AES), che si basa sull'eccitazione con elettroni o talora raggi X, rilevando l'emissione di elettroni secondari, e a quella fotoelettronica ultravioletta (UPS), con radiazione UV (poco usata).

L'XPS è largamente utilizzata sia nell'ambito della pura ricerca scientifica che in ambito applicativo/industriale (studi sulla corrosione, ossidazione, catalisi e microelettronica). Il fenomeno che sta alla base di questa tecnica di analisi è l'effetto fotoelettrico (Figura 42): atomi colpiti da fotoni X monocromatici (di energia $h\nu$) emettono fotoelettroni, le cui energie cinetiche (E) dipendono dai livelli energetici dai quali sono stati estratti.

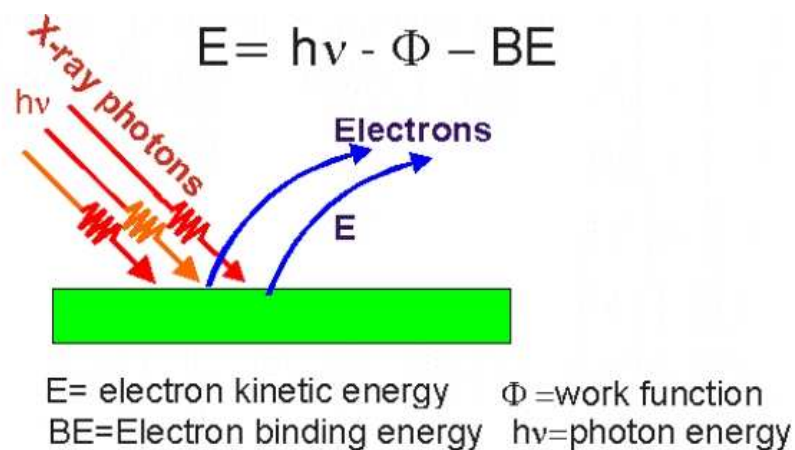


Figura 42: Principio di funzionamento dell'XPS: l'effetto fotoelettrico (equazione riferita ad un elettrone)

Attraverso la misura dell'energia cinetica dei fotoelettroni è quindi possibile valutare l'energia di legame degli atomi di origine (BE) e stabilire in maniera esatta l'elemento chimico di provenienza. Siccome l'energia cinetica dell'elettrone viene misurata con uno spettrometro di elettroni, si introduce un fattore di correzione, detto funzione lavoro (Φ), per tenere conto dell'intorno elettrostatico nel quale l'elettrone è generato e misurato.

La tecnica XPS permette la determinazione non solo delle specie chimiche presenti, ma anche della natura dei legami nei quali sono coinvolte mediante l'analisi della posizione (*Chemical Shift*) dei picchi fotoelettronici rispetto ai valori tabulati e riferentesi alle specie atomiche pure.

⁹ In alternativa può essere chiamata anche spettroscopia elettronica per analisi chimiche (ESCA).

In particolare la scansione da 0 a 1000 eV permette di identificare e quantificare, con un margine di errore del 10%, gli elementi presenti. Invece le scansioni a livello dei singoli elementi permettono la determinazione dell'esatta energia di legame, e quindi dello stato di valenza di ogni atomo (ad es. O_{1s} , C_{1s} ,...). In tal caso i valori non sono espressi in termini assoluti, ma sono dei rapporti relativi (ad es. O_{1s}/C_{1s}).

L'informazione ottenuta è strettamente legata ai primi strati atomici (3-50 Å), il che fa dell'XPS una delle principali tecniche di analisi superficiale. Infatti solo gli elettroni prodotti nei pochi monostrati superiori del campione hanno la possibilità di emergere dalla superficie con energia inalterata. La maggioranza degli elettroni perde invece energia tramite collisioni anelastiche [60, 61].

2.7 MISURE DI ANGOLO DI CONTATTO

L'angolo di contatto (θ) è l'indice della bagnabilità di una superficie, che determina la capacità di un liquido di distribuirsi su di essa.

Il metodo consiste nella misura dell'angolo tra la tangente al profilo di una goccia, depositata sulla superficie del campione, e la superficie stessa. Lo strumento che misura l'angolo di contatto è composto da tre elementi:

- una piattaforma che ospita il campione;
- una sorgente di luce ;
- una telecamera interfacciata ad un computer.

Ad una estremità della piattaforma si trova la sorgente di luce, mentre all'altra estremità si trova l'ottica di misura. Un *software* consente di catturare le immagini e di misurare l'angolo di contatto del liquido sulla superficie solida.

La tensione superficiale è il risultato diretto dello squilibrio tra le forze atomiche o molecolari che esistono tra due fasi diverse. Se si considera una molecola posta sulla superficie, essa è attratta verso l'interno, dove può essere circondata da molecole contigue che esercitano un campo uniforme. Di conseguenza la superficie di un materiale possiede una tensione (o energia libera) superficiale maggiore rispetto all'interno del corpo, e quindi tenderà a minimizzare la propria area. Il valore dell'angolo di contatto è associabile dal punto di vista termodinamico alle tensioni superficiali solido-gas (γ_{SG}), solido-liquido (γ_{SL}) e liquido-gas (γ_{LG}) (Figura 43a), secondo l'equazione di Young:

$$\gamma_{SG} - \gamma_{SL} - \gamma_{LG} \cos \theta = 0$$

Nel caso di campioni ad uso biomedico, il parametro più importante è la bagnabilità del materiale. La goccia d'acqua posta sulla superficie piana del campione tende ad allargarsi quando la superficie è bagnabile, viceversa, assume una forma sferica quando la superficie non è bagnabile (Figura 43b).

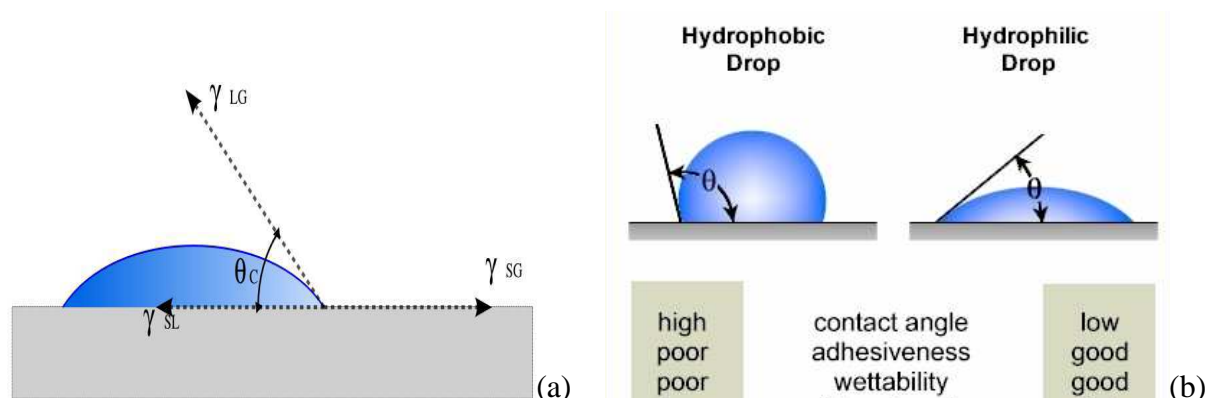


Figura 43: Angolo di contatto: tensioni superficiali di interfaccia (a) e caratteristiche di una superficie idrofobica e di una idrofilica (b)

In pratica, se con θ si indica l'angolo di contatto, sono possibili tre situazioni:

- $\theta=0^\circ$, la superficie è completamente bagnabile;
- $0^\circ < \theta < 90^\circ$, la superficie è parzialmente bagnabile;
- $\theta > 90^\circ$, la superficie non è bagnabile.

Angoli di contatto bassi (e quindi γ_{SL} elevate) sono auspicabili per un biomateriale che debba essere colonizzato dalle cellule [61].

2.8 SAGGI IN VITRO

I saggi biologici vengono eseguiti a partire da colture cellulari. In generale l'isolamento delle cellule segue le seguenti fasi:

1. distruzione contatti cellula-matrice e cellula-cellula tramite digestione enzimatica;
2. sospensione o coltura cellulare eterogenea: selezione del tipo cellulare;
3. coltura cellulare omogenea;

Dopo l'isolamento si procede alla coltivazione (Figura 44) delle colture cellulari, che si suddividono in:

1. primarie: se derivano direttamente dalla dissociazione di un tessuto od organo. Hanno caratteristiche biochimiche che si avvicinano maggiormente a quelle in vivo, ma la loro vita è limitata e, per la realizzazione di progetti a lunga scadenza, è necessario prevedere diversi isolamenti [62];
2. secondarie, terziarie,...: se le cellule in coltura derivano da colture precedenti (subcoltivazione);
3. linee cellulari: sono, invece, cellule in grado di replicarsi indefinitamente in coltura. Derivano da colture primarie di tumori o da manipolazioni genetiche di colture primarie non tumorali (immortalizzazione) [64].

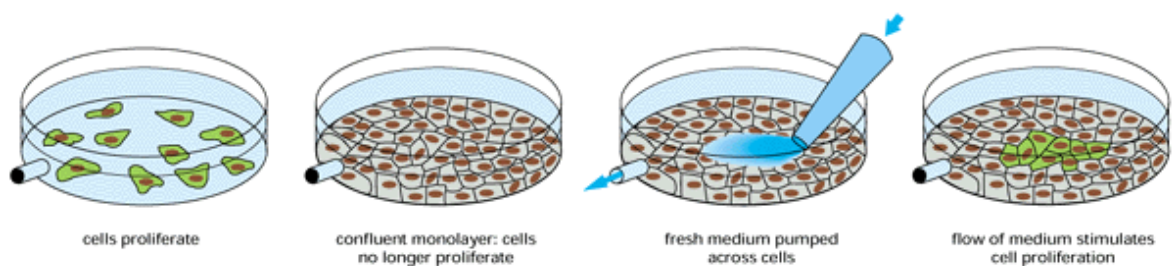


Figura 44: Proliferazione *in vitro*: per alcuni tipi di cellule (come le HUVEC) alla confluenza c'è inibizione per contatto cellula-cellula e si forma un monostrato; la proliferazione può essere stimolata con nuovo siero [65]

In questo lavoro di tesi si fa riferimento a cellule HUVEC ottenute da cordone ombelicale umano, provenienti sempre dal terzo stadio di coltura.

La conta del numero di cellule da seminare si effettua al microscopio ottico, con la camera di Bürker (Figura 45). Questa è costituita da un vetro spesso, in cui è ricavata una camera capillare. La parete superiore della camera è composta da un vetrino bloccato da due graffe laterali. Al microscopio diventano evidenti una serie di linee ortogonali tra loro, che delimitano delle aree e quindi dei volumi.

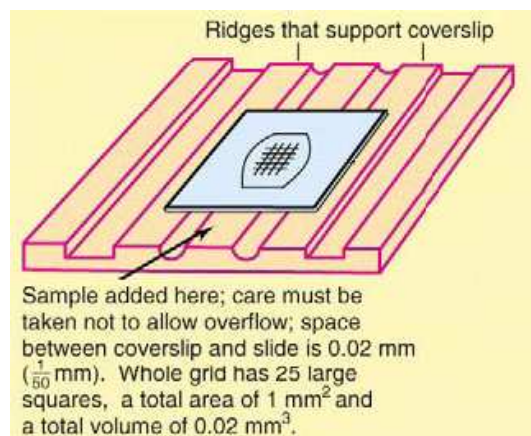


Figura 45: Camera di Bürker

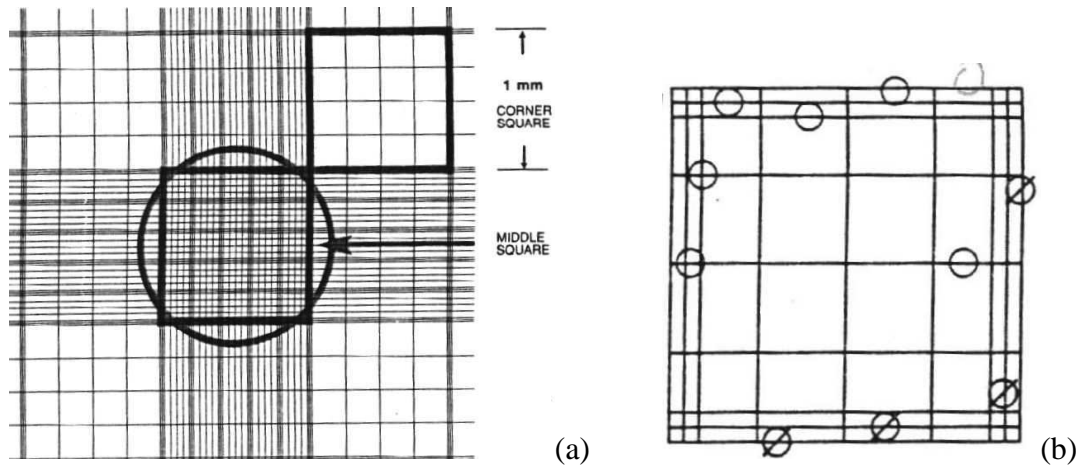


Figura 46: Griglia utilizzata nel conteggio con camera di Bürker (a) e particolare di un quadrato ad angolo (b)

1. Prima del conteggio si devono staccare le cellule dalla piastra ed eliminare gli aggregati cellulari mediante trattamento enzimatico o chimico (ad es. si usa una soluzione di tripsina, che degrada le proteine di adesione della matrice, ed EDTA, chelante di Ca^{2+} e Mg^{2+} , indispensabili per l'adesione [66]); [67]
2. si trasferisce quindi una piccola quantità di sospensione cellulare in entrambe le camere del vetrino (con il coprioggetto montato), permettendo il riempimento della camera per capillarità;
3. partendo dalla prima camera, si contano le cellule nel quadrato centrale da 1mm e nei 4 quadrati da 1 mm agli angoli (Figura 46(a)). In particolare, si considerano anche le cellule in alto e a sinistra che toccano la linea centrale del perimetro di ciascun quadrato, non, invece, le cellule che toccano la linea centrale in basso e a destra (Figura 46(b)). Si ripete la procedura per la seconda camera;
4. se si contano meno di 200 o più di 500 cellule nei 10 quadrati (20-50 cellule per singolo quadrato) bisogna aggiustare opportunamente la concentrazione della sospensione;
5. il calcolo effettivo si esegue tenendo conto che ciascun quadrato dell'emocitometro, con il coprioggetto in posizione, ha un volume di $0,1 \text{ mm}^3$, cioè 10^{-4} cm^3 . La concentrazione di cellule per ml sarà allora:

$$\text{Cellule per ml} = \text{conteggio medio per quadrato} \times \text{fattore di diluizione} \times 10^4 \text{ [68]}$$

2.8.1 Test di vitalità cellulare: *MTT Test*

L'*MTT test* è un saggio colorimetrico, introdotto da Tim Mosmann nel 1983, utilizzato per stimare il numero di cellule metabolicamente attive. Si possono così indagare l'adesione e la proliferazione delle cellule così come la citotossicità. Tuttavia per essere certi della capacità delle cellule di replicarsi dovremmo eseguire ad esempio un test che valuti la quantità di DNA.

L'*MTT* valuta la vitalità delle cellule servendosi di un agente ossidante cromogeno (*MTT bromide*) corrispondente ad un sistema policiclico ($C_{18}H_{16}BrN_5S$) (Figura 47) dotato di un anello tetrazolico che può essere facilmente ridotto dalle succinato deidrogenasi cellulari o da altri sistemi di trasporto elettronico, formando - per apertura dell'anello tetrazolico - un composto cromoforo azotato detto formazano, il cui gruppo funzionale caratteristico è $R^1NH-N=CR^2-N=NR^3$ (Figura 48).

Il formazano forma dei cristalli insolubili nell'ambiente intracellulare a cui le membrane risultano sostanzialmente impermeabili: è quindi permessa l'entrata della molecola cromogena nella cellula, ma non l'uscita del formazano se questo è stato correttamente metabolizzato. Ciò significa che le catene di trasporto elettronico sono ancora metabolicamente attive, cioè dotate di potere riducente.

La trasformazione dell'*MTT* vede un viraggio della molecola da giallo a blu scuro - violetto. Le cellule appaiono così visibili con tale colore e quindi è sufficiente aggiungere un solvente come l'isopropanolo o il DMSO per dissolvere la membrana cellulare e liberare il formazano in tutta la soluzione. Dalla lettura dell'assorbanza allo spettrofotometro ELISA si potrà così stimare il numero di deidrogenasi e catene di trasporto mitocondriali attive e quindi indirettamente il numero di cellule vitali nel campione. [69,70]

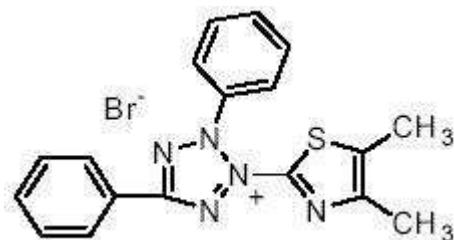


Figura 47: *MTT bromide*, composto organico ridotto dai mitocondri

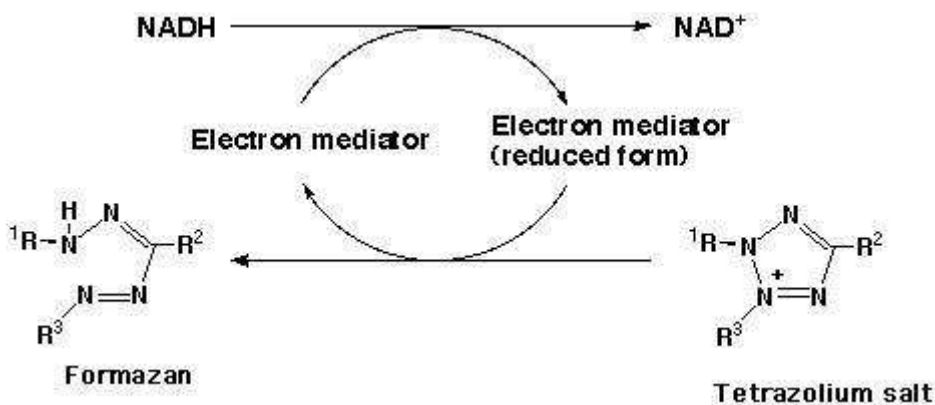


Figura 48: Schema del processo di apertura dell'anello tetrazolico

I cristalli solubilizzati sono quantificati di solito con metodo colorimetrico alla lunghezza d'onda di 570 nm (assorbanza del colorante ridotto), anche se l'intervallo accettato è comunque 550-600 nm [70].

Va tuttavia tenuto conto che la soluzione finale di formazano è instabile a temperatura ambiente, quindi si raccomanda di eseguire le misure ad un tempo standardizzato e di mantenere i campioni a 4°C se bisogna misurare più campioni contemporaneamente. Infatti è stata rilevata una significativa differenza tra campioni analizzati ad intervalli di 15 minuti a temperatura ambiente. Al contrario ciò non si osserva a 4°C. La stessa diluizione da utilizzare deve essere scelta opportunamente per minimizzare l'effetto di una variazione nel numero di cellule e quindi ad esempio in Figura 49 si sono scelte la 1+7 e la 1+9. [71]

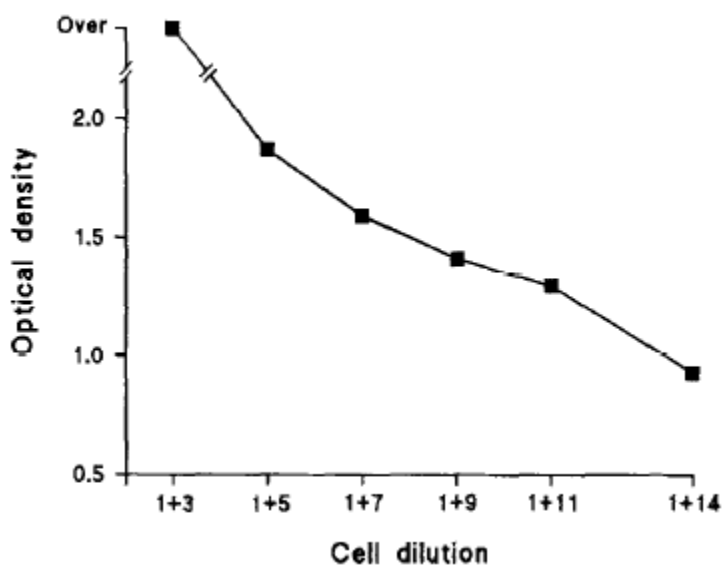


Figura 49: Esempio di curva standard di diluizione

Si utilizzano curve standard di calibrazione (quella qui utilizzata è stata elaborata in un precedente lavoro di tesi) [23] per quantificare in modo assoluto il numero di cellule presenti. Nel caso si voglia studiare la citotossicità, generalmente si definisce citotossica la concentrazione che uccide il 50% di cellule (IC₅₀) [71].

2.9 T-TEST DI STUDENT

Il t-test di Student (pseudonimo di William Sealy Gosset [73]) è un metodo di analisi statistica per verificare se due gruppi di dati abbiano la stessa distribuzione (Figura 50). Ciò corrisponde ad affermare che i due gruppi hanno la stessa media μ e la stessa varianza σ^2 . Queste sono le due ipotesi su cui si basa il test, nella forma classica.

La distribuzione t di Student è definita come:

$$t = \frac{\bar{X} - \bar{Y}}{\sqrt{\sigma_X^2/n_1 + \sigma_Y^2/n_2}} = \frac{\bar{X} - \bar{Y}}{\sqrt{\sigma_{\bar{X}}^2 + \sigma_{\bar{Y}}^2}}$$

dove \bar{X} e \bar{Y} sono le medie di X_1, \dots, X_n e Y_1, \dots, Y_n , cioè due gruppi di variabili aleatorie indipendenti ed identicamente distribuite, di leggi normali (o gaussiane¹⁰) rispettivamente $N(\mu_X, \sigma_X^2)$ e $N(\mu_Y, \sigma_Y^2)$, in cui μ = media e σ^2 = varianza.

Se valgono le due ipotesi sull'uguaglianza di μ e σ^2 , si può anche scrivere che $X_i = \mu + \sigma Z_i$ e $Y_i = \mu + \sigma W_i$, con Z_i e W_i indipendenti e di legge $N(0,1)$). Quindi t diventa:

$$t = \frac{\bar{X} - \bar{Y}}{\sqrt{\sigma_X^2/n_1 + \sigma_Y^2/n_2}} = \frac{\sigma(\bar{Z} - \bar{W})}{\sqrt{\sigma^2(\sigma_Z^2/n_1 + \sigma_W^2/n_2)}} = \frac{(\bar{Z} - \bar{W})}{\sqrt{\sigma_Z^2/n_1 + \sigma_W^2/n_2}}$$

Da questa formulazione si nota come t dipenda solo da leggi normali e dal numero di campioni n_1 ed n_2 . Si può dimostrare che in realtà la distribuzione t è legata soltanto al

¹⁰ La distribuzione gaussiana è detta anche normale, perché moltissimi fenomeni possono essere descritti da una curva gaussiana o *Gauss-like* (cioè simile). Si tratta di una curva dalla classica forma a campana che ha un massimo attorno alla media dei valori misurati e può essere più o meno stretta a seconda della dispersione dei valori attorno alla media. La dispersione si misura con la deviazione standard, e una delle proprietà della gaussiana è che il 68% delle misurazioni differisce dalla media meno della deviazione standard, mentre il 95% meno di due deviazioni standard. Quindi maggiore è la deviazione standard, più la gaussiana è "aperta" e più c'è la possibilità che la media (il punto più alto) non sia rappresentativo di tanti casi. [http://www.albanesi.it/Notizie/curva_di_gauss.htm]

$$f(x) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}} \quad \text{con} \quad -\infty < x < \infty$$

(dove μ = media e σ = deviazione standard o scarto quadratico medio)

numero di gradi di libertà $v = n_1 + n_2 - 2$. Quest'ultima formula deriva dal fatto che per calcolare la varianza di n campioni si divide per $n-1$ (infatti non si divide per n , perché non si sta considerando la varianza dell'intera popolazione, ma solo di un gruppo di campioni) ad es. per X_1, \dots, X_n campioni si dimostra che:

$$\sigma_x^2 = s_x^2 = \frac{1}{n_1 - 1} \sum_1^{n_1} (X_i - \bar{X})^2$$

La t di Student è, perciò, il rapporto tra la differenza delle medie e la deviazione standard di questa differenza. Se due campioni venissero dalla stessa popolazione, sarebbe improbabile che t avesse dei valori alti. In particolare si sceglie un livello α di accettabilità del test, detto anche errore di prima specie, che rappresenta la probabilità di sbagliare nell'accettare l'ipotesi dell'uguaglianza delle due distribuzioni. Di solito in biologia si usa un α del 5%. Il motivo è che, scegliendo un α più piccolo, la t critica ammissibile sarebbe maggiore, e quindi diminuirebbe la possibilità di distinguere differenze significative più piccole, se fossero presenti. Si parla in questo caso di errore di seconda specie β .

La potenza di un test si misura, allora, come $1-\beta$, cioè come la probabilità di non fare un errore di seconda specie. Essa dipende da:

1. l' α che si è disposti a tollerare: al crescere di α aumenta la potenza del test;
2. la variazione $\mu_X - \mu_Y$ che si vuole misurare: al suo crescere aumenta la potenza;
3. la taglia n del gruppo considerato: al suo crescere, aumenta la potenza.

A seconda dei v e degli α , sono tabulate le varie t , che calano all'aumentare di α e di v . [75]

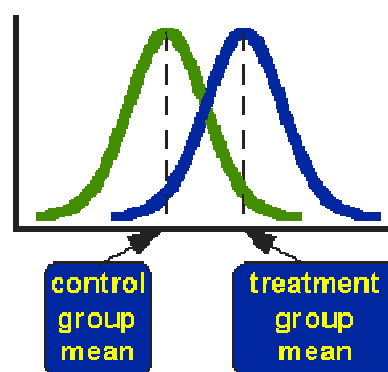


Figura 50: Distribuzioni idealizzate per i campioni di controllo e trattati [74]

In questa tesi il t -test è stato utilizzato per confrontare i dati del controllo (il materiale dello scaffold) con quelli del campione trattato (*scaffold* irradiati o trattati con peptide legato covalentemente o inglobato). L'obiettivo è quello di accertare se ci sia effettivamente una

differenza statisticamente significativa tra il controllo e lo *scaffold* trattato, per l'adesione e la proliferazione cellulari. In questo caso le due ipotesi di partenza sono adeguate, visto che comunque a priori non si può sapere se ci sarà una differenza significativa né tra le medie né tra le varianze. Inoltre l'evoluzione di un certo saggio biologico è sicuramente indipendente da quella di un altro.

Nella pratica si può utilizzare ad esempio un foglio di lavoro excel, inserendo in tal caso la funzione TEST.T (matrice dati 1; matrice dati 2; coda; tipo), dove:

- matrice dati 1 e 2 = medie prima e seconda serie di dati:
chiaramente le due matrici devono essere composte ciascuna da almeno due elementi, altrimenti si divide per zero (essendo $n-1 = 0$ nella deviazione standard del campione);
- coda = 1 o 2 (come in questo caso):
a seconda che il test sia unilatero (se non interessa ad esempio che un dato sia superiore alla media) o bilatero (se interessa vedere quale sia la significatività indipendentemente dal fatto che la differenza sia positiva o negativa);
- tipo = 1, 2 (come in questo caso) o 3:
1, se il test è accoppiato, cioè i due gruppi di dati sono tra loro dipendenti; 2 e 3, se invece sono indipendenti, rispettivamente con ipotesi di varianza uguale o diversa tra i dati.

Va sottolineato che il valore finale restituito è la probabilità che i due gruppi di dati abbiano la stessa media, e non l'errore α commesso. Perciò, per osservare una differenza significativa, basterà trovare un valore $p < 0,05$, cioè minore di α .

Nel caso i gruppi considerati contemporaneamente fossero, invece, più di due, il t-test non sarebbe più applicabile con questa formulazione. Infatti la probabilità di compiere almeno un errore di prima specie α nell'eseguire k test di Student sarebbe pari a $k\alpha$. Ad esempio con 5 gruppi di dati si avrebbero 15 test possibili (cioè le combinazioni semplici $C_{5,2}$), e quindi addirittura un $k\alpha = 75\%$, per $\alpha = 5\%$. In altri termini, più della metà delle volte il risultato del t-test sarebbe errato.

Per risolvere questo problema:

1. di solito si utilizza il t-test di Bonferroni, che impone di avere un livello di errore $\alpha' = \alpha/k$ per ciascuno dei k test eseguiti. Ciò comporta che l'errore di prima specie α_T commesso sarà $\alpha_T < k\alpha' = \alpha$;
2. in alternativa si può impiegare l'F-test di Fischer, di cui il t-test è un caso particolare. Dove i due stimatori t ed F sono legati dalla relazione $F = t^2$ [75].

3. PARTE SPERIMENTALE

3.1 MATERIALI

I materiali impiegati nei laboratori del Dipartimento di Processi Chimici dell'Ingegneria, elencati in base alla ditta produttrice, sono:

- *Sigma-Aldrich* (Steinheim, Germania): acetonitrile, 1,1,1-3,3,3-esafluoro-2-propanolo (HFIP).
- *Sigma-Aldrich* (St.Louis, USA): policaprolattone (PCL), M_n medio 60 kDa;
- *Biosolve* (Valkenswaard, Olanda): piperidina, diclorometano (DCM), N,N-dimetilformammide (DMF), acido trifluoroacetico (TFA).
- *Carlo Erba* (Milano, Italia): anidride fosforica, sodio fosfato bibasico.
- *Prolabo* (Parigi, Francia): dietilere, cloruro di sodio.
- *PURAC biochem* (Gorinchen, Holland): copolimero acido lattice-caprolattone (P(LLA-CL)), PURASORB PLC 7015 Ratio M/M %70/30.

I materiali impiegati presso i laboratori del Prof. P.P. Parnigotto e della Prof.ssa M. T. Conconi del Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, elencati in base alla ditta produttrice, sono:

- *Promo Cell* (Hidelberg, Germania): terreno selettivo per cellule endoteliali MV2 (terreno base).
- *Gibco-Invitrogen Corporation* (Milano, Italia): soluzione tampone sodio-fosfato.
- *BD Biosciences*, (Franklin Lakes, NJ USA): fibronectina, piastra Petri *tissue-culture*.
- *Sigma*: soluzione MTT (3-(4,5-dimetiltiazolo-2-il)-2,5-difeniltetrazolobromuro), BSA (*Serum Bovine Albumin*), collagenasi IV, antibiotico e antimicotico (formulazione: 10000 unità/ml di penicillina G, 10 mg/ml di streptomina solfato e 25 µg/ml di anfotericina B), .

3.2 STRUMENTAZIONE

1. Cromatografia RP-HPLC:

- HPLC *Waters 600 Controller* munito di rivelatore UV/Vis modello *Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector*. Utilizzo per cromatografie semipreparative;
- HPLC *Waters 600E*, munito di autocampionatore modello 717 e di rivelatore UV/Vis modello *Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector*. L'acquisizione e l'integrazione dei dati sono state eseguite dal programma *Empower (Waters)*. Utilizzo per cromatografie analitiche.

Le cromatografie semipreparative e analitiche hanno scopi diversi: le prime servono a separare quantità maggiori (dell'ordine delle decine di milligrammi), le seconde sono utilizzate per caratterizzare i peptidi ottenuti, discriminandone la purezza.

Le colonne utilizzate sono le seguenti:

- Delta-Pak HR C₁₈ SP (15 μ m, 100 Å, 7,8 \times 300 mm), della *Waters*: per le cromatografie semipreparative dei peptidi Fmoc-2N3RGD e 2N3RGD;
- Nova-Pak HR C₁₈ SP (6 μ m, 60 Å, 7,8 \times 300 mm), della *Waters*: per le cromatografie semipreparative del peptide (GRGDSP)₄K;
- Vydac C₁₈ 238TP54 monomeric analitica (5 μ m, 300 Å, 4,6 \times 250 mm), della *Grace*: per le cromatografie analitiche del peptide Fmoc-2N3RGD;
- Vydac C₁₈ 218TP54 protein & peptide analitica (5 μ m, 300 Å, 4,6 \times 250 mm), della *Grace*: per le cromatografie analitiche dei peptidi 2N3RGD e (GRGDSP)₄K.

L'acqua MilliQ utilizzata in cromatografia viene preparata in due fasi: prima è distillata con un sistema messo a punto dalla ditta *Cecchinato (Mestre, Italia)*, e quindi desalificata e privata degli organici con il sistema MilliQ (*Waters*).

2. Spettrometria di massa:

le analisi di massa sono state effettuate dal Dott. D. Dalzoppo del Dipartimento di Scienze Farmaceutiche dell'Università di Padova. Lo strumento utilizzato è un ESI-TOF, modello Mariner System 5220 dell'Applied Biosystem (Perkin-Elmer, Analytical Instruments, Norwalk, CT, USA).

3. *Electrospinning*:

L'elettrofilatura degli *scaffold* è stata eseguita presso il laboratorio del Prof. M. Modesti del Dipartimento di Processi Chimici dell'Ingegneria, Università di Padova. L'apparato per l'elettrofilatura risulta così composto:

- generatore di alto voltaggio: *Gamma High Voltage*;
- siringa da 2,5 ml con ago in acciaio inox smussato G27 (diametro int. 0,4 mm): *Terumo*;
- pompa: *New Era Pump Systems, Inc.*;
- piastra quadrata in acciaio inox ricoperta da un foglio di alluminio come collettore vero e proprio.

4. Analisi al SEM:

le immagini delle matrici elettrofilate in questa tesi sono state eseguite presso i laboratori del Prof. Ramous del Dipartimento di Processi Chimici dell'Ingegneria dall'Ing. K. Brunelli, utilizzando:

- metallizzatore: *POLARON Sem Coating System*;
- microscopio a scansione elettronica: *Cambridge Stereoscan 440 SEM*.

Le immagini sulle matrici di PCL per l'analisi di proliferazione a 3 giorni delle cellule sono state invece eseguite al CUGAS di Padova (*JSM Jeol 6490*).

5. Irradiazione dei campioni:

la lampada UV impiegata per l'irradiazione dei campioni condizionati con peptide fotosensibile è un *UVSL-15, CHECCHINATO A. (Venezia, Italia)*.

6. Analisi XPS:

le analisi sono state effettuate dalla Dott.ssa G. Iucci del Dipartimento di Fisica, Università Roma Tre.

7. Misure di angolo di contatto:

le misure sono state eseguite dalla Prof.ssa V. Samouillan del Dipartimento di Fisica dei Polimeri, Università "Paul Sabatier" di Toulouse Cedex 9 (Francia)

8. pHmetro:

il pHmetro usato per la misura del pH della soluzione sodio-fosfato nelle cinetiche di rilascio è un *FE20/EL20 METTLER TOLEDO*.

9. Spettrofotometro:

lo spettrofotometro per piastre ELISA è un *Microplate autoreader EL 13 (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT)*.

3.3 RISULTATI E DISCUSSIONE

3.3.1 Purificazione dei peptidi

- Purificazione del peptide Fmoc-2N3RGD

Sono state eseguite sette corse semipreparative su fase inversa, utilizzando circa un centinaio di mg per volta di prodotto grezzo sintetizzato in precedenza. Le condizioni utilizzate sono: colonna = Delta Pak HR C₁₈ SP; flusso = 4,0 ml/min; eluente A = 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B = 0,05% TFA in CH₃CN; gradiente = 0-15% B in 2 min e 15-55% B in 20 min; rivelatore spento.

Le corse analitiche di controllo sono state eseguite secondo le condizioni di seguito riportate: colonna = Vydac C₁₈ 238TP54 monomeric analitica; flusso = 1,0 ml/min; eluente A = 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B = 0,05% TFA in CH₃CN; gradiente = 29-39% B in 20 min; rivelatore a 214 nm. Le frazioni migliori sono state riunite e liofilizzate.

- Deprotezione del gruppo Fmoc

La rimozione del gruppo protettore Fmoc è stata ottenuta trattando il peptide Fmoc-2N3RGD con una miscela al 20% v/v di piperidina in DMF (~ 10 ml ogni mg di peptide) per 15 min sotto blanda agitazione. Il peptide è stato recuperato portando la miscela di reazione a piccolo volume in evaporatore rotante, precipitando con dietilere freddo sotto agitazione, e filtrando con gooch G4. Il precipitato è stato seccato sotto vuoto per 1h.

- Purificazione del peptide 2N3RGD

Si sono effettuate tre semipreparative utilizzando circa 10 mg per volta di 2N3RGD, nelle stesse condizioni sopra riportate nel paragrafo “Purificazione del peptide Fmoc-2N3RGD”, salvo che con diverso gradiente = 0-13% B in 2 min e 13-23% B in 40 min.

Le varie frazioni sono state sottoposte a corse analitiche e riunite secondo il grado di purezza. Le condizioni impostate per le analitiche sono: colonna = Vydac C₁₈ 218TP54 protein & peptide analitica; flusso = 1,0 ml/min; eluente A = 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B = 0,05% TFA in CH₃CN; gradiente = 13-23% B in 20 min; rivelatore a 214 nm.

Alla fine delle riunioni, dall'integrazione del tracciato cromatografico, è stato calcolato che una frazione aveva purezza maggiore del 91,7% (~ 6,5 mg).

L'identità del componente principale della frazione migliore è stata accertata mediante spettrometria di massa ESI-TOF: si nota la corrispondenza tra la massa teorica del peptide (2671,70 Da) e quella sperimentale dopo deconvoluzione (2671,18 Da) (Figura 51).

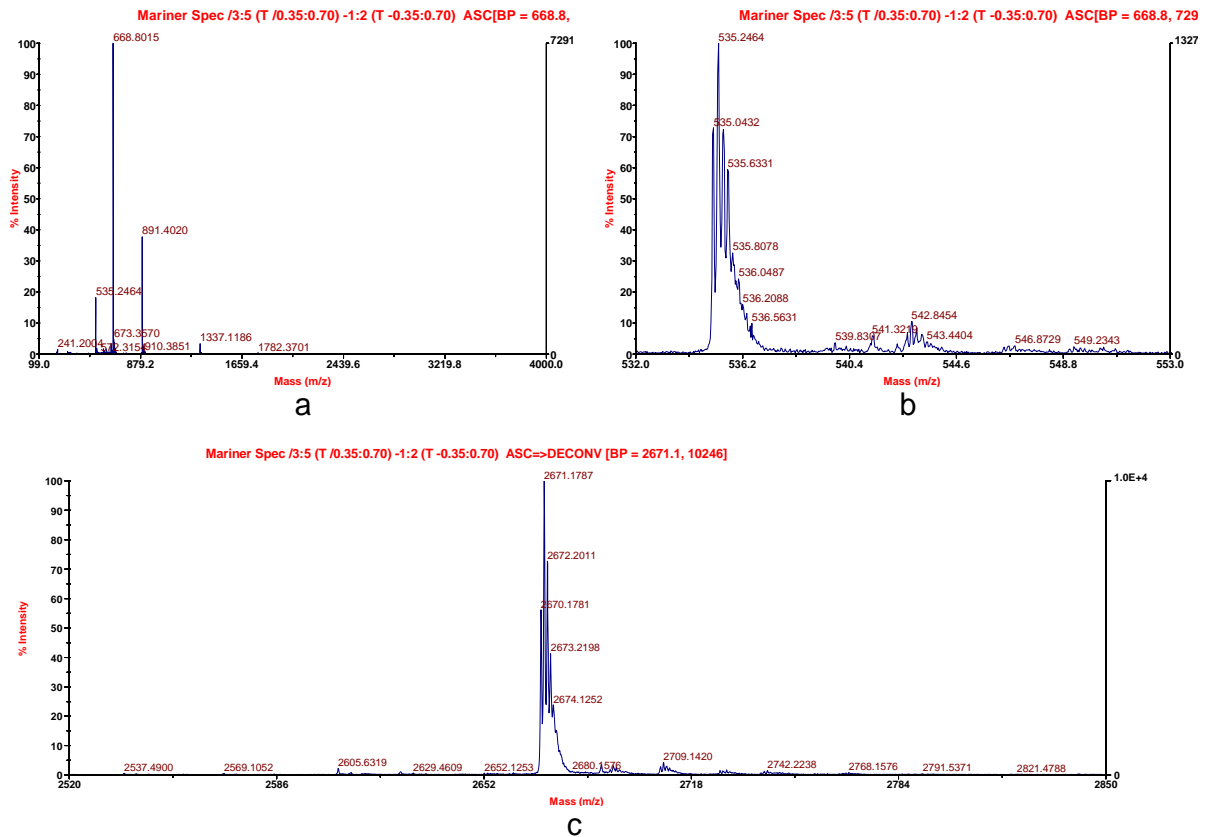


Figura 51: Spettro di massa (ESI-TOF) della frazione di purezza maggiore, prima della riunione: spettro intero (a), particolare dello spettro, in cui si osserva il *pattern* dell' $[M+H]^{5+}$ (b); spettro finale dopo deconvoluzione (c)

La frazione migliore ottenuta è stata a sua volta riunita con frazioni già disponibili a grado di omogeneità paragonabile. In tal modo si sono ottenuti 22,24 mg di peptide puro al 91,4% di purezza (22,24 mg) (Figura 52). Le condizioni delle analitiche sono sempre le stesse descritte sopra per il 2N3RGD. Questa frazione è stata utilizzata per funzionalizzare gli *scaffold* dei saggi a 24 h.

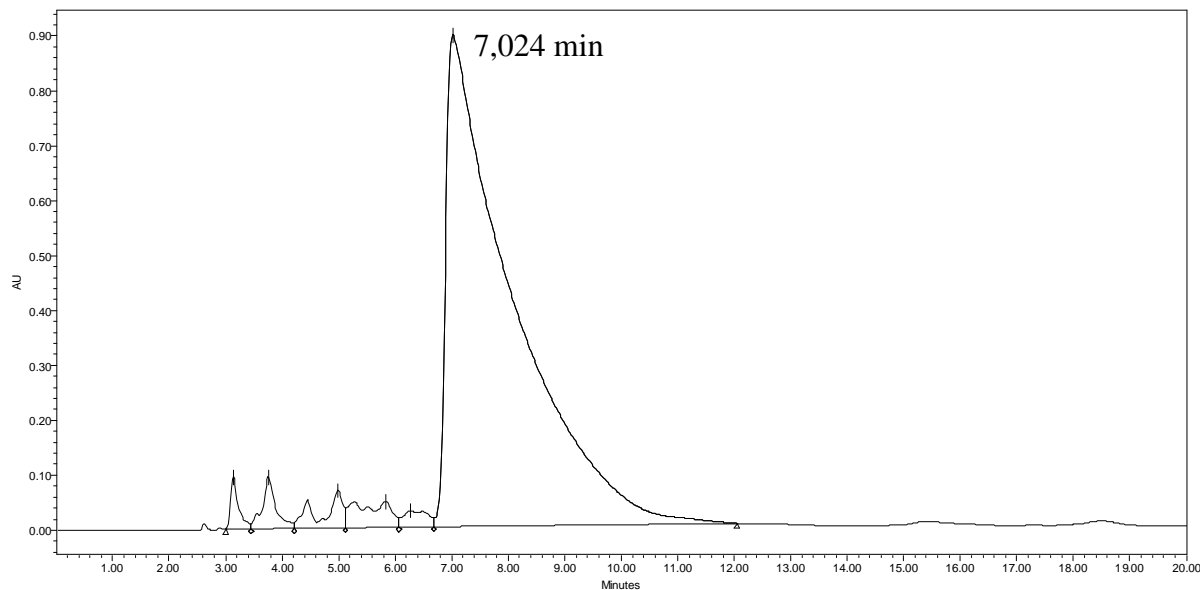


Figura 52: Cromatografia analitica in RP-HPLC della frazione finale al 91,4% di purezza del peptide 2N3RGD, ottenuta iniettando 20 μ l. Il peptide eluisce a $t_R = 7,024$ min

Da un'analogia purificazione del peptide, recuperato dopo la fase di condizionamento delle matrici, è stata ottenuta una nuova frazione al 95,6% di purezza (7,83 mg¹¹), poi impiegata nei saggi a 3 e 7 giorni (utilizzati 5,7 mg).

- Purificazione del peptide (GRGDSP)₄K:

Si è operata la purificazione con due semipreparative (~ 25 mg per volta), utilizzando frazioni del prodotto a grado di omogeneità medio alto (80-90%), già disponibili da sintesi su fase solida eseguita in precedenza. Le condizioni impostate nelle semipreparative sono state: colonna = Nova-Pak HR C₁₈ SP; flusso = 4,0 ml/min; eluente A = 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B = 0,05% TFA in CH₃CN; gradiente = 0-4% B in 2 min e 4-12% B in 32 min; rivelatore a 214 nm.

Le varie frazioni sono state caratterizzate tramite corse analitiche e riunite secondo il grado di purezza. Le condizioni impostate per le analitiche sono le stesse del 2N3RGD, salvo che con diverso gradiente = 4-14% B in 20 min.

¹¹ La quantità effettiva utilizzata nella purificazione corrisponde a circa metà della soluzione di recupero dei saggi a 24 h, la restante parte non è stata ancora purificata.

La purezza della frazione migliore (27,96 mg) è risultata del 97,4%. La forma allargata del picco sembrava tuttavia presentare alcuni flessi, indice, forse, di specie differenti dal peptide desiderato, ma che co-eluiscono con lo stesso (Figura 53).

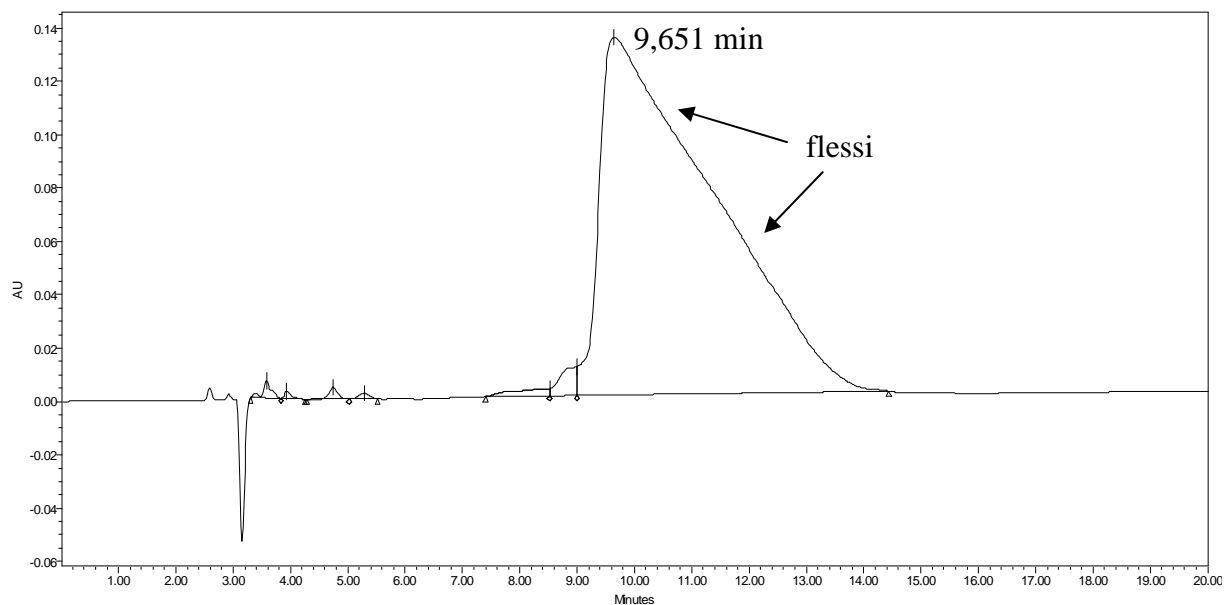


Figura 53: Cromatografia analitica in RP-HPLC della frazione finale al 97,4% di purezza del peptide (GRGDSP)₄K, ottenuta iniettando 30 μ l; il peptide eluisce a $t_R = 9,651$ min

L'analisi di massa ha evidenziato che si trattava di un artefatto: si nota, infatti, l'ottima corrispondenza tra la massa teorica del peptide (2424,51 Da) e quella sperimentale dopo deconvoluzione (2424,15 Da) (Figura 4).

Errore. L'origine riferimento non è stata trovata.: Spettro di massa (ESI-TOF) della frazione di purezza 97,4% del peptide (GRGDSP)₄K, corrispondente al cromatogramma in Figura 53: spettro intero (a); spettro dopo deconvoluzione (b)

3.3.2 Preparazione degli *scaffold* elettrofilati

3.3.2.1 *Electrospinning*

Le soluzioni di PCL e P(LLA-CL) (70:30) (wt:wt) e della soluzione di PCL + 1 mg/ml di (GRGDSP)₄K in esafluoroisopropanolo sono state elettrofilate secondo le impostazioni riportate (Tabella 6 e Tabella 7).

MATERIALE	CONCENTRAZIONE POLIMERO	GAP	SOLVENTE	VOLTAGGIO	FLUSSO E DURATA	AGO
PCL (60 kDa)	25% wt	15cm	DCM:DMF (70:30) (wt:wt) ($\rho = 1,32$ e $0,95$ g/ml)	8 kV	1 ml/h x 1 h	G27
P(LLA-CL) (70 wt : 30 wt)	10% wt	10cm				

Tabella 6: Parametri di elettrofilatura delle soluzioni di PCL e P(LLA-CL) in DCM/DMF (70:30) (wt:wt)

MATERIALE	CONCENTRAZIONE POLIMERO	GAP	SOLVENTE	VOLTAGGIO	FLUSSO E DURATA	AGO
PCL (60 kDa)	10% wt	15 cm	HFIP ($\rho = 1,596$ g/ml)	16 kV	1 ml/h x 1 h	G27
PCL (60 kDa) + 1 mg/ml (GRGDSP) ₄ K						

Tabella 7: Parametri di elettrofilatura delle soluzioni di PCL in HFIP

I solventi organici utilizzati hanno caratteristiche diverse tra loro:

- il DCM è un solvente volatile dei polimeri, a bassa costante dielettrica ($T_{eb} = 40^{\circ}\text{C}$, $\epsilon \sim 9$);
- la DMF è un non solvente dei polimeri, altobollente e con un valore elevato di ϵ ($T_{eb} = 153^{\circ}\text{C}$, $\epsilon \sim 37$);
- l'HFIP è un solente per polimeri e peptidi piuttosto volatile e possiede un valore di ϵ intermedio ($T_{eb} = 59^{\circ}\text{C}$, $\epsilon \sim 17$).

Ogni campione elettrofilato è stato prodotto a temperatura ambiente e immediatamente essiccato per 1h sotto vuoto, per favorire l'evaporazione dei residui di solvente.

3.3.2.2 Analisi morfologica al SEM

- PCL e P(LLA-CL) da funzionalizzare covalentemente con 2N3RGD

In un lavoro di tesi svolto in precedenza [23] le strutture osservate al SEM del P(LLA-CL) risultavano già ottimali (Figura 54a). Non altrettanto si poteva dire per le strutture degli *scaffold* in PCL, contrassegnate dalla presenza di numerose gocce che interrompevano la continuità delle fibre (Figura 54b).

Nel P(LLA-CL) le fibre sono orientate casualmente, il diametro varia in un *range* compreso tra i 600 nm e i 2 μm e la larghezza delle maglie generate dall'intreccio reciproco delle fibre varia tra i 3,5 μm e i 20 μm .

La scelta delle variabili per migliorare la struttura del PCL è stata effettuata sulla base di alcune prove sperimentali. Il criterio utilizzato è stato quello di aumentare la concentrazione di PCL in soluzione e la distanza ago-collettore, tenendo invariati gli altri parametri. Infatti, provando a raddoppiare il voltaggio, non è stata riscontrata una significativa differenza morfologica. In particolare va osservato che la viscosità della soluzione contenente PCL sarà più bassa di quella del P(LLA-CL), visto che la temperatura di transizione vetrosa del PCL è notevolmente più bassa. Perciò probabilmente la grande quantità di gocce dipendeva da questo fatto. La distanza invece è stata aumentata per compensare l'effetto di una concentrazione maggiore sulla dimensione delle fibre.

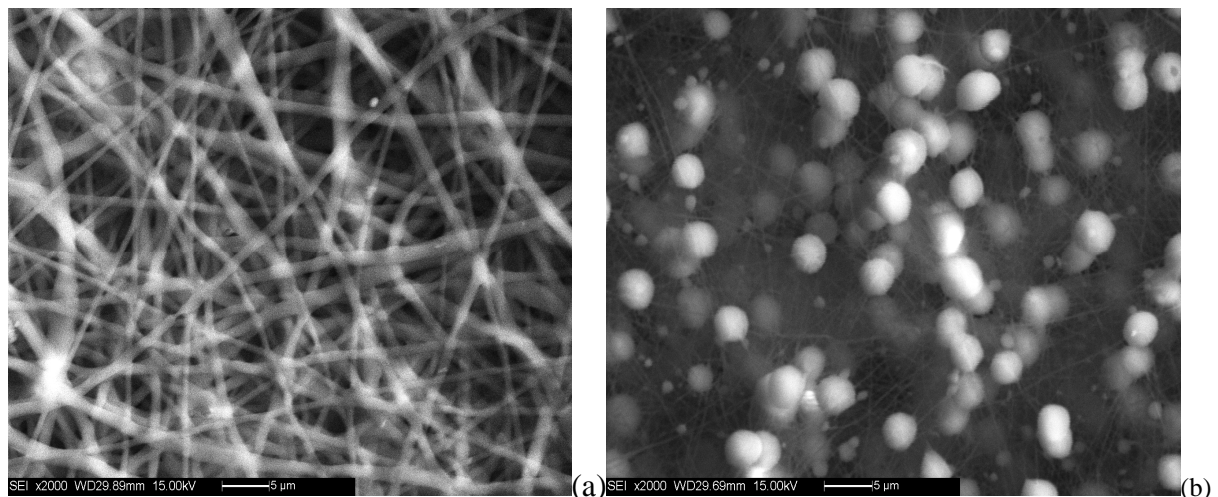


Figura 54: Micrografie SEM di P(LLA-CL) (70:30) (wt:wt) (a) e PCL (b) elettrofilati a partire da una soluzione al 10% wt di polimero in DCM/DMF (70:30) (wt:wt) ottenute nelle stesse condizioni sperimentali; analisi eseguite presso il Dipartimento di Geofisica dell'Università di Padova, trattando i campioni con grafite [23]

Va segnalata anche l'importanza assunta dal foglio di alluminio nel determinare le superfici su cui effettivamente è stato depositato il polimero. L'alluminio deve avere una superficie il più possibile uniforme, per evitare disomogeneità nella distribuzione di carica del foglio.

Per l'analisi al SEM gli *scaffold* elettrofilati sono stati sottoposti a metallizzazione con un sottile strato di oro. Le morfologie di PCL 25% wt in DCM:DMF (70:30) (wt:wt) non sembrano risentire di evidenti artefatti morfologici introdotti dall'oro stesso (Figura 55).

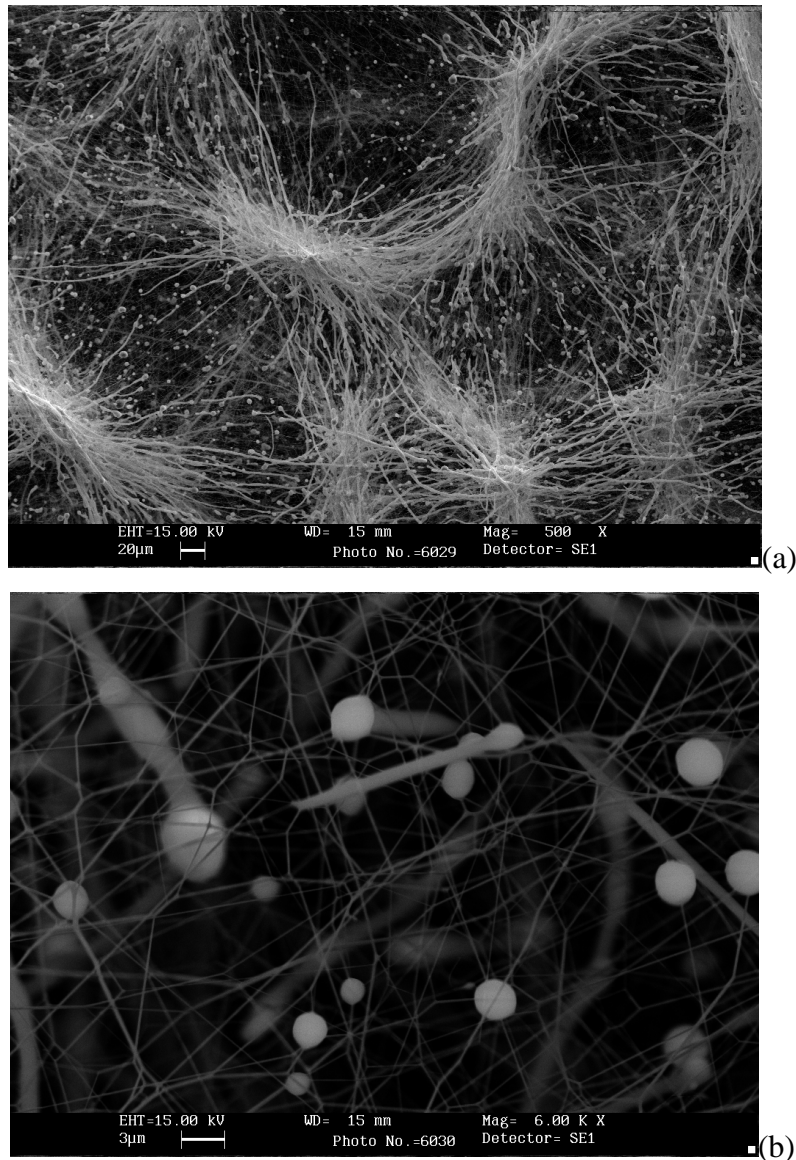


Figura 55: Micrografie SEM, a diversi ingrandimenti (a,b), di PCL elettrofilato a partire da una soluzione al 10% wt di polimero in DCM/DMF (70:30) (wt:wt)

Il risultato, per quanto non esente da alcune gocce, evidenzia una distribuzione bimodale (come atteso dall'uso di un'alta concentrazione di polimero), che ha dimensioni delle fibre sia tra 1-3 μm che di poche centinaia di nm. Inoltre si nota un addensamento di fibre, a formare una superficie rugosa visibile ad occhio nudo.

E' stato dimostrato che fibre di pochi μm sono più favorevoli per le cellule delle fibre nanometriche, per quanto l'ECM abbia una dimensione compresa tra 500 e 50 nm [44].

E' già stato dimostrato che il trattamento dei campioni con peptide 2N3RGD e la successiva irradiazione della superficie per operare il *cross-linking*, non alterano la struttura della matrici [23].

- PCL arricchito di peptide (GRGDSP)₄K

Lo *scaffold* di PCL è stato elettrofilato a partire dai parametri impostati in un lavoro di tesi parallelo (Figura 56).

Tutte le fibre sono lisce e non presentano gocce. I diametri variano tra 100 e 200 nm [24], a maglie piuttosto fitte.

Non è stato ancora possibile indagare se la struttura si modifichi con l'introduzione del peptide durante l'elettrofilatura. Tuttavia, da studi eseguiti sulle stesse strutture di PCL funzionalizzate con peptidi auto-assemblanti al 5% in peso, è stato dimostrato che non c'è una modifica macroscopica della struttura matrice [24]. Presumibilmente sarà analogo il risultato per un arricchimento di 1 mg/ml ovvero a percentuali quasi nove volte inferiori.

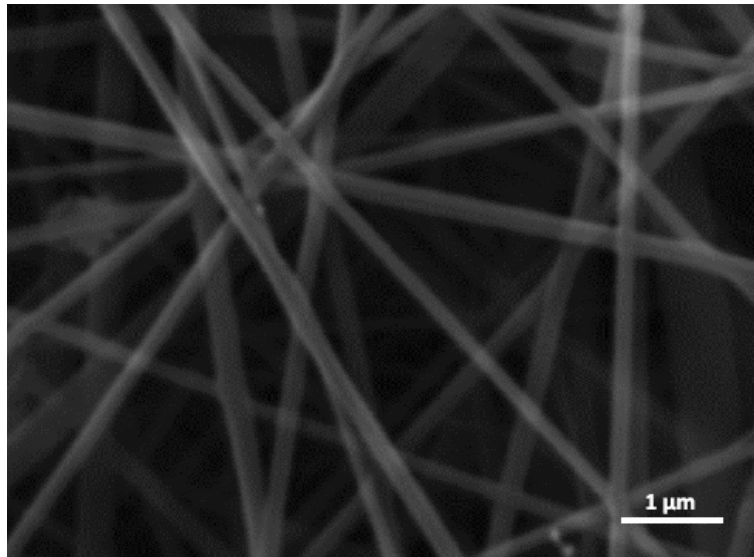


Figura 56: Micrografie SEM di PCL elettrofilato a partire da una soluzione al 10% wt di polimero in HFIP; analisi effettuate presso il Dipartimento di Processi Chimici dell'Ingegneria dell'Università di Padova, trattando i campioni con grafite [24]

3.3.2.3 Preparazione dei dischetti

Per poter eseguire i saggi in pozzetti da 24 pz è stato necessario ricavare dei dischetti di dimensione opportuna. Alcuni sono stati utilizzati direttamente (dischetti in materiale puro o con peptide inglobato), altri sono stati sottoposti al trattamento di irradiazione o di funzionalizzazione e irradiazione (Tabella 8).

CASO 2N3RGD	CASO (GRGDSP) ₄ K
PCL e P(LLA-CL) puri	PCL puro
PCL e P(LLA-CL) irradiati con UV	
PCL e P(LLA-CL) + 0,01 mg/ml peptide	PCL + 1 mg/ml peptide
PCL e P(LLA-CL) + 0,1 mg/ml peptide	
PCL e P(LLA-CL) + 1 mg/ml peptide	

Tabella 8: Tipologie di dischetti impiegati nei saggi

1. Punzonatura:

gli *scaffold* in copolimero P(LLA-CL) non possono essere punzonati direttamente. Il motivo è che il copolimero si ritira una volta immerso in acqua o comunque in soluzione acquosa. Ciò era già stato osservato in una tesi precedente [23], dove c'erano stati distacchi durante le prove preliminari dei saggi biologici con il rischio di infiltrazione delle cellule al di sotto dello *scaffold*.

Per il distacco della matrice è stato immerso il copolimero in un cristallizzatore contenente acqua MilliQ. La matrice è stata lasciata a contatto con l'acqua MilliQ per il tempo minimo necessario al distacco spontaneo di un lembo del film polimerico. Se il foglio elettrofilato non viene lasciato a lungo in frigo, bastano pochi minuti. Nel caso la matrice non si stacchi spontaneamente, si può agevolare l'infiltrazione dell'acqua sollevando leggermente un lembo. Il polimero staccato è stato depositato su un altro foglio di alluminio, sul quale è stato posto ad essiccare. Tuttavia nel trasporto della matrice da un foglio di alluminio all'altro va posta attenzione nell'evitare la naturale tendenza del copolimero ad arrotolarsi e accartocciarsi. Allo stesso tempo non bisogna stirare il copolimero, che altrimenti potrebbe risultare troppo sottile o accorciarsi, una volta punzonato e staccato dopo essiccazione.

La matrice è stata essiccata per 30 min sotto vuoto in presenza di P₂O₅ ed è stata punzonata nonché privata delicatamente dell'alluminio.

Per quanto riguarda i campioni in PCL, la produzione dello *scaffold* può essere effettuata per punzonatura diretta della matrice depositata sul collettore di alluminio, non essendoci problemi di ritiro. Per questo motivo l'alluminio non viene staccato dal PCL.

Il numero di campioni che si possono ottenere da un foglio elettrofilato è variabile: nelle tre condizioni di *electrospinning* si riescono ad ottenere, nei casi migliori, 10-20 dischetti per il copolimero, mentre per i due tipi di *scaffold* in PCL il numero è 2-3 volte maggiore.

Chiaramente la maggior distanza dell'ago dal collettore durante l'*electrospinning* aumenta la superficie su cui il polimero viene depositato.

2. Condizionamento e irradiazione dei dischetti:

nel caso si intenda legare covalentemente e superficialmente il peptide alla matrice di PCL o di P(LLA-CL), si utilizzerà il 2N3RGD. Dopo una prima fase in cui il peptide viene fatto adsorbire alla superficie (condizionamento), si attivano, mediante irradiazione, i gruppi azido per formare legami covalenti tra peptide e matrice (Figura 57).

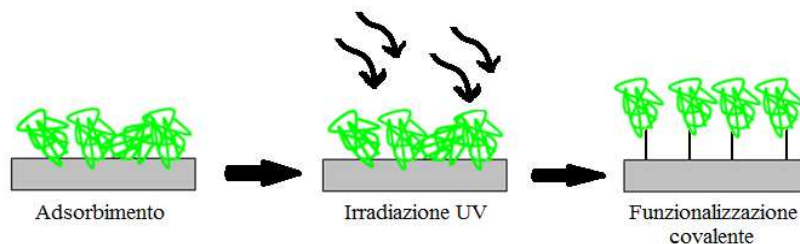


Figura 57: Fasi del processo di funzionalizzazione covalente per irradiazione UV dei gruppi azido

- Condizionamento:

il condizionamento dello *scaffold* con peptide fotoattivabile di adesione è stato effettuato preparando tre soluzioni a diversa concentrazione di peptide: 1 mg/ml (= 0,37 mM), 0,1 mg/ml e 0,01 mg/ml.

Per ogni soluzione sono stati precedentemente posizionati i dischetti sul fondo dei pozzetti di una piastra per colture da 24 pz e poi sono stati addizionati 300 μ l di soluzione peptidica a ciascun campione. Il tutto è stato così lasciato 1h a temperatura ambiente e al buio. Terminata la fase di condizionamento i campioni sono stati essiccati sotto vuoto con P_2O_5 per 1 h. La soluzione rimanente nelle piastre di coltura è stata recuperata e liofilizzata. Il recupero del peptide è stato confermato mediante una corsa cromatografica analitica.

- Irradiazione:

al fine di operare la reazione fotochimica che porta alla funzionalizzazione covalente dello *scaffold*, i campioni sono stati irradiati con lampada UV: a 254 nm per 30 min e a 366 nm per 30 min. I dischetti di P(LLA-CL) sono stati irradiati da entrambe le facce, per essere sicuri di esporre alle cellule la faccia appropriata.

La distanza tra *scaffold* e lampada è stata impostata a circa 1 cm. I campioni così prodotti sono stati conservati sigillati in frigo e al buio.

3.3.3 Analisi XPS e misure di angolo di contatto sugli *scaffold* condizionati con peptide 2N3RGD

- Analisi XPS

Le superfici degli *scaffold* ottenuti da soluzioni di DCM/DMF (70:30) (wt:wt) sono state analizzate all’XPS per verificare l’effettiva presenza del peptide 2N3RGD nei casi in cui la superficie sia stata condizionata. La misura è stata eseguita dopo opportuni lavaggi della superficie per eliminare il peptide adsorbito non fotoattivato.

MATERIALE	SEGNALE	ATTRIBUZIONE	BE (eV) misurata	BE (eV) di riferimento
<p>PCL</p> $\begin{array}{c} 2 \\ \text{O} \\ \parallel \\ 1 \\ -[(\text{CH}_2)_4-\text{C}-\text{O}-\text{CH}_2-]_n \\ 1 \quad 3 \quad 2 \end{array}$	C ₁	C-C	285,0	285,0
	C ₂	C-O	286,7	286,54
	C ₃	O-C=O	289,0	289,08
	O ₁	O-C	532,2	532,24
	O ₂	O=C	533,6	533,54
<p>P(LLA-CL)</p> $\begin{array}{c} 2 \text{O} \\ \parallel \\ 1 \quad 2 \\ (-\text{C}-\text{O}-\text{CH}-)_n \\ 3 \\ 1 \text{CH}_3 \end{array} + \text{PCL}$	C ₁	C-C	285,0	285,0
	C ₂	C-O	287,1	286,98
	C ₃	O-C=O	289,2	289,06
	O ₁	O-C	532,2	532,24
	O ₂	O=C	533,7	533,54

Tabella 9: Formule chimiche di PCL e P(LLA-CL) con indicati i rispettivi tipi di atomi, che presentano un segnale diverso a seconda dei legami

I segnali rilevati con scansione 0-1000 eV sono corrispondenti a quelli di riferimento per i diversi legami (Tabella 9).

Dal confronto con il materiale puro (Tabella 10) emerge la presenza di azoto nei campioni condizionati con il peptide per entrambi i tipi di *scaffold*. I rapporti N/C ed N/O crescono all’aumentare della concentrazione di peptide, come si nota dal grafico in Figura 58.

MATERIALE	C ₁ /C ₃	C ₂ /C ₃	O ₁ /O ₂	C/O	N/C	N/O
PCL	8,6	1,5	1,6	5,2	/	/
PCL + 1mg/ml 2N3RGD	6,3	1,7	1,5	4,4	0,023	0,1
PCL + 0,1mg/ml 2N3RGD	6	1,6	1,5	4,5	0,008	0,033
PCL + 0,01mg/ml 2N3RGD	7	1,6	2,4	4	0,005	0,02
P(LLA-CL)	3,5	1,2	1,2	2,85	/	/
P(LLA-CL) + 1mg/ml 2N3RGD	2,8	1,2	1,4	2,7	0,02	0,067
P(LLA-CL) + 0,1mg/ml 2N3RGD	3	1,2	1,4	2,9	0,0125	0,033
P(LLA-CL) + 0,01mg/ml 2N3RGD	3,2	1,2	1,4	2,5	0,0067	0,017

Tabella 10: Rapporti relativi degli elementi presenti nei vari *scaffold*. I rapporti si riferiscono ai diversi tipi di segnale riportati in Tabella 9

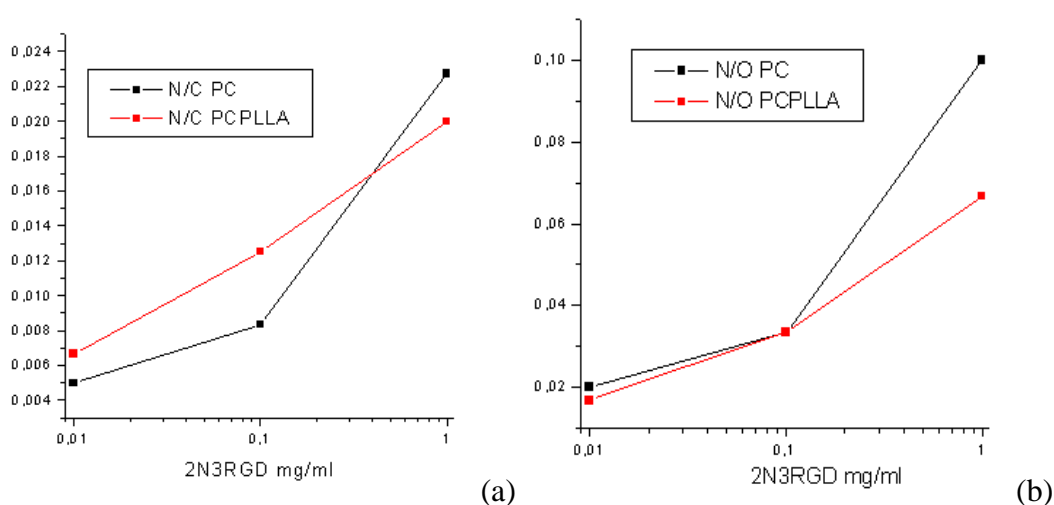


Figura 58: Analisi XPS: aumento dei rapporti C/O (a) ed N/O (b) al crescere della concentrazione di peptide per PCL (PC in figura) e P(LLA-CL) (PCPLLA in figura)

- Misure di angolo di contatto

Le misure di angolo di contatto sono state eseguite depositando una goccia di soluzione fisiologica (PBS) sulla superfici P(LLA-CL) (70:30) (wt:wt) in DCM/DMF (70:30) (wt:wt) ottenuto nelle varie condizioni. Le misure sono state eseguite in triplo. Dalle figure (Figura 59) emerge in tutti i casi una grande idrofobicità superficiale, con minime differenze (valori riportati in Tabella 11). In particolare l'irradiazione UV sembra aumentare leggermente l'idrofobicità, che viene compensata significativamente dal peptide solo alla concentrazione minore (0,001 mg/ml).

Le misure sulla superficie di PCL sono ancora in corso, tuttavia analogamente non ci si aspetta una significativa differenza tra *scaffold* condizionati con peptide e non.

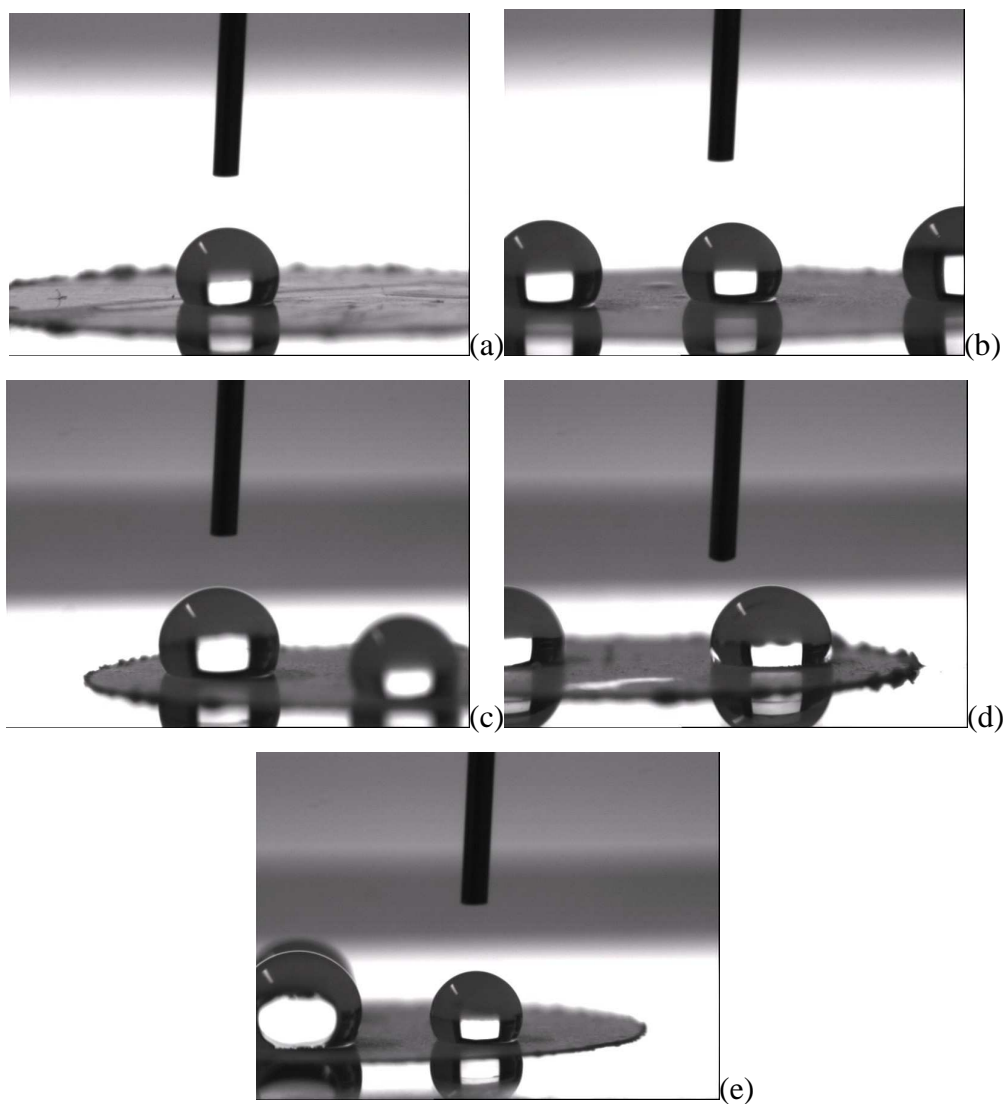


Figura 59: Immagini di gocce di PBS su P(LLA-CL) (a), P(LLA-CL) irradiato con UV (b), P(LLA-CL) + 0,01 mg/ml (c), P(LLA-CL) + 0,1 mg/ml (d) e P(LLA-CL) + 1 mg/ml (e): si evidenzia la grande idrofobicità della superficie

CAMPIONE	$\theta_{\text{medio}} (^{\circ})$	Deviazione standard ($^{\circ}$)
Controllo	118,9	0,52
UV	122,9	1,06
0.01 mg/ml	118,3	1,19
0.1 mg/ml	120,4	0,99
1 mg/ml	122,3	0,53

Tabella 11: Misure di angolo di contatto su P(LLA-CL) nelle diverse condizioni riportate in Figura 59

3.3.4 Cinetica di rilascio del peptide (GRGDSP)₄K dalla matrice di PCL

I test di rilascio nel tempo di (GRGDSP)₄K è stato eseguito su tre matrici di PCL + 1 mg/ml di peptide immerse in soluzione fisiologica, facendo la media dei risultati.

Ogni matrice elettrofilata è stata ritagliata manualmente in modo da poterne stimare l'area superficiale. I film polimerici sono stati staccati dal foglio di alluminio e pesati. Le zone scartate durante il taglio sono state a loro volta distaccate e pesate per poter calcolare la frazione effettiva impiegata nei test. Questa è stata poi posta sul fondo di una provetta, e addizionata di 1 ml di soluzione fisiologica a 37°C, precedentemente preparata (sodio fosfato 10 mM e NaCl 150 mM in H₂O MilliQ, portata a pH 7,4) [76]. Un millilitro è una quantità sufficiente ad immergere tutto lo *scaffold* e a rilevare un segnale adeguato in RP-HPLC.

Sono stati prelevati 115 µl di soluzione ogni ora per le prime cinque ore, e altri 115 µl a 15 h e a 4 giorni. Per ciascun prelievo sono stati addizionati alla soluzione 115 µl di soluzione fisiologica. Dei 115 µl prelevati, 100 µl sono quelli effettivamente iniettati in RP-HPLC. Dall'area sottesa al picco di assorbimento sono state ricavate le quantità di peptide rilasciato in nmol, grazie alla retta di taratura ottenuta precedentemente analizzando quantità di peptide note (Figura 60).

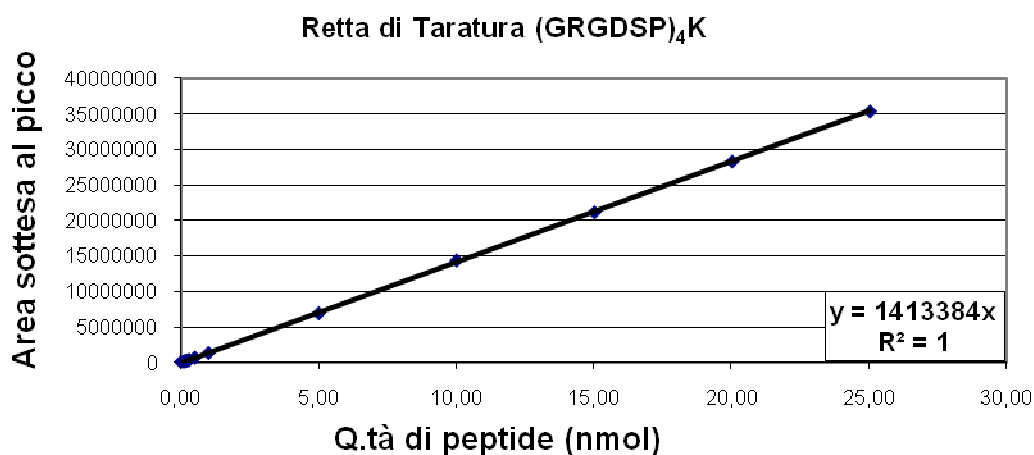


Figura 60: Retta di taratura della quantità di peptide rilasciato

Le nanomoli di peptide rilasciato ad ogni prelievo sono state calcolate sommando alla quantità rilasciata a quella certa estrazione anche le quantità perse in tutti i 115 µl precedentemente estratti. Ad esempio dopo 3 h si è calcolata la quantità di peptide nei 100 µl, riferendola al volume della soluzione (1 ml) e si sono sommate le quantità presenti nei 115 µl dopo 2 e dopo 1 h.

Le quantità sono state convertite in percentuali di peptide rilasciato. Questo calcolo è stato effettuato anche tenendo conto della percentuale teorica di peptide elettrofilato rispetto a quella effettivamente depositata sul collettore (~70%) e alla porzione di *scaffold* utilizzata nel test (~64%). La quantità di peptide iniziale è risultata quindi circa la metà rispetto al milligrammo utilizzato nella preparazione della soluzione. Il tutto viene riportato in Tabella 12, insieme alla frazione di nmol di peptide / mg PCL.

Prove	Massa teorica scaffold PCL ¹² (mg)	Massa pesata totale scaffold PCL (mg)	Massa pesata totale scaffold PCL in % della teorica	Massa pesata utilizzata (mg)	Massa pesata utilizzata in % della totale	MASSA PEP. (mg)	Moli pep. (nmol)	Superficie considerata (cm ²)	nmol PEP. su mg PCL
a	176,555	115,160	65,226	80,360	69,781	0,455	187,731	145,940	2,336 (0,57% wt del PCL)
b		113,530	64,303	82,960	73,073	0,470	193,805	158,550	
c		110,940	62,836	75,440	68,001	0,427	176,237	160,780	
Media	/	113,210	64,122	79,587	70,285	0,451	185,924	155,090	2,336

Tabella 12: Massa del peptide presente nello *scaffold* durante il test di rilascio

Il test di rilascio (Figura 61), dimostra che la quantità di peptide (GRGDSP)₄K in soluzione arriva ad una concentrazione costante già a 15 h con solo poco più di un terzo di peptide rilasciato. I dati da cui si è rielaborato il grafico sono riportati in Tabella 13.

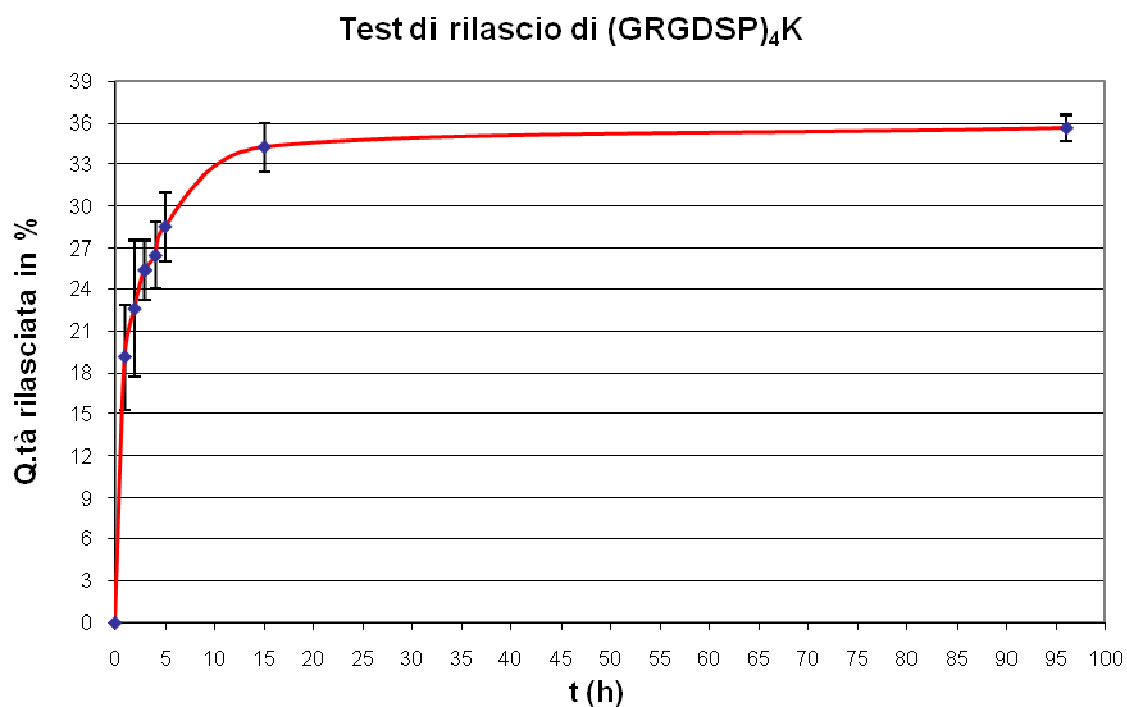


Figura 61: Test di rilascio nel tempo di (GRGDSP)₄K

¹²655,02 mg di massa teorica di PCL / 3,71 ml di volume della soluz. di HFIP x 1 ml/h x 1 h di electrospinning

Tempi per le varie prove		Area sottesa al picco	Q.tà prelevata da provetta (µl)	Q.tà immessa in provetta (µl)	Q.tà iniettata con RP-HPLC (µl)	Q.tà letta con HPLC (nmol)	Q.tà reali in soluz. ¹³ (nmol)	Q.tà ril. %	Q.tà ril. Media%	Dev. St. %
1 h	a	2955897	65	115	50	2,091	41,827	22,280	19,1	3,8
	b	3955988	115	115	100	2,799	27,989	14,909		
	c	5337673	170	115	100	3,777	37,765	20,117		
2 h	a	6362699	115	115	100	4,502	49,987	26,627	22,6	4,9
	b	4091631	115	115	100	2,895	32,168	17,135		
	c	5803609	115	115	100	4,106	45,223	24,090		
3 h	a	5958345	115	115	100	4,216	52,160	27,785	25,4	2,2
	b	5338575	115	115	100	3,777	44,320	23,608		
	c	5272756	115	115	100	3,731	46,396	24,714		
4 h	a	5631950	115	115	100	3,985	54,583	29,075	26,4	2,4
	b	5323706	115	115	100	3,767	48,558	25,866		
	c	4544110	115	115	100	3,215	45,815	24,404		
5 h	a	5587014	115	115	100	3,953	58,832	31,339	28,4	2,5
	b	4935260	115	115	100	3,492	50,141	26,709		
	c	4828121	115	115	100	3,416	51,411	27,385		
15 h	a	6225112	115	115	100	4,404	68,118	36,285	34,2	1,8
	b	6041348	115	115	100	4,274	61,983	33,017		
	c	5930723	115	115	100	4,196	62,711	33,405		
96 h (4 gg)	a	5629308	115	115	100	3,983	68,757	36,625	35,6	1,0
	b	6015197	115	115	100	4,256	66,713	35,537		
	c	5580977	115	115	100	3,95	65,20	34,730		

Tabella 13: Quantità di peptide mediamente rilasciata nel tempo quantificata via RP-HPLC

Se non si tenesse conto della progressiva diluizione dovuta alla sostituzione di 115µl di soluzione contenente il peptide con altrettanti di PBS puro, l'andamento della curva risulterebbe anomalo, con una specie di *plateau* al 22% circa. Né l'uno né l'altro caso corrispondono propriamente alla situazione presente nei saggi, dove il terreno non viene cambiato né a 24 h né a 3 giorni, ma solo nel caso a 7 giorni (due volte). Tuttavia il dato del 33% è sicuramente un valore utile, per quanto indicativo, ad interpretare i risultati ottenuti nei saggi.

3.3.5 Coltura di cellule endoteliali

Le cellule HUVEC sono state estratte dal cordone ombelicale umano attraverso digestione con Collagenasi IV, enzima che digerisce il collagene componente il tessuto connettivo e che permette di disgregare i legami fra le cellule. Viene seguita una serie di lavaggi ripetuti, sia

¹³ Si è tenuto conto della diversa quantità prelevata dalla provetta nei casi 1a e 1c (dove sono stati prelevati valori diversi per errori di pipettatura) rispetto ad 1ml di soluzione teorico, nonché della diversa quantità letta via RP-HPLC nel caso 1h_a

internamente che esternamente alla vena, con una soluzione tampone sodio-fosfato (PBS). Questa soluzione viene addizionata con 2-3% di antibiotico e di antimicotico, per eliminare eventuali coaguli di sangue. Il cordone è stato incanalato per introdurre all'interno della vena una soluzione 0,1% (w/v) di collagenasi IV in PBS. Si è lasciato incubare con l'enzima per 15 minuti a 37°C in atmosfera umidificata. Terminato il periodo di digestione, le cellule estratte sono state raccolte tramite lavaggio con 3-5 ml di terreno selettivo per cellule endoteliali MV₂ (terreno base). Questo terreno specifico, secondo le istruzioni del produttore, è completato dall'aggiunta dei seguenti fattori:

Siero Fetale Bovino (FCS)	5%
human Epidermal Growth Factor (hEGF)	5.0 ng/ml
Idrocortisone (HC)	0.2 µg/ml
Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)	0.5 ng/ml
human basic Fibroblast Growth Factor (hbFGF)	10 ng/ml
R3 IGF-1	20 ng/ml
Acido Ascorbico (AA)	1 µg/ml
Antibiotico/antimicotico	1%

Il terreno così composto è definito completo.

La sospensione cellulare isolata è stata centrifugata a 1500 giri/minuto per 5 minuti e il *pellet*, risospeso nel terreno sopraindicato, è stato seminato in una piastra Petri *tissue-culture* precedentemente condizionata con una soluzione di fibronectina (1 µg/cm²) in PBS. I saggi condotti sono stati effettuati in triplicato impiegando cellule endoteliali provenienti da colture al 3° passaggio.

Va infine sottolineato che i cordoni considerati provengono da due donatori diversi (il primo donatore è lo stesso della tesi precedente): le cellule del primo cordone, al 3° passaggio, si sono ad un certo punto esaurite. Solo nei saggi a 24 h eseguiti sulla matrice con (GRGDSP)₄K il cordone utilizzato è stato lo stesso. L'utilizzo di cellule da sorgenti diverse incrementa la variabilità del dato, anche se permette di valutare in modo più soddisfacente la risposta biologica in vista di un impiego *in vivo*. Il tempo a disposizione della tesi non ha consentito di effettuare almeno tre saggi in tutte le condizioni. In particolare, la preparazione dei campioni del caso 2N3RGD è risultata più lunga, visto che coinvolge un numero di passaggi superiore:

si è dunque scelto di ripetere il saggio a 7 giorni invece che a 3, poiché risultava fornire dati più significativi (Tabella 14).

DURATA SAGGIO	Numero di saggi caso 2N3RGD	Numero di saggi caso (GRGDSP) ₄ K
24 h	3 ¹⁴	3
3 giorni	1	3
7 giorni	2	3

Tabella 14: Prospetto dei saggi effettuati

3.3.6 Saggi di adesione/proliferazione HUVEC su *scaffold* elettrofilati di P(LLA-CL) e di PCL funzionalizzati con motivi adesivi RGD

La valutazione della vitalità cellulare e della proliferazione delle colture di cellule endoteliali seminate sugli *scaffold* è stata effettuata mediante l'impiego di un saggio colorimetrico, che utilizza sali di tetrazolo, quale il 3-(4,5-dimetiltiazolo-2-il)-2,5-difeniltetrazolobromuro (MTT). Il test MTT sfrutta la riduzione del composto tetrazolico di colore giallo in cristalli viola di formazano, trasformazione operata dalle deidrogenasi presenti nelle cellule vitali metabolicamente attive. I cristalli che si formano risultano insolubili in ambiente acquoso e devono essere estratti dalle cellule. Uno dei vari protocolli prevede l'uso di un solvente organico, il 2-propanolo, eventualmente acidificato con 0,04 M HCl. La determinazione quantitativa avviene tramite lettura spettrofotometrica a 570 nm.

I dischetti, su lamina d'alluminio (PCL) o senza (P(LLA-CL)), sono stati posti sul fondo di una piastra per colture da 24 pozzetti fissandoli con anellini, e sono stati trattati per 10 minuti con una soluzione all'80% d'etanolo, al fine di sterilizzarli. Al termine, dopo ripetuti lavaggi con PBS all'1% di antibiotico/antifungineo (2 volte), sono state seminate le cellule endoteliali sui campioni ad una densità di copertura del pozzetto (diametro 2 cm) di $3,2 \times 10^4$ cellule/cm² (3 e 7 giorni) o di $6,5 \times 10^4$ cellule/cm² (24 h). E' stato utilizzato 1 ml per seminare rispettivamente 50 mila e 100 mila cellule per pozzetto. Nei saggi con a 24 h, ovvero nel caso dei saggi di adesione, è stato usato sia il terreno MV₂ completo di fattori di crescita che quello

¹⁴ Dove per il caso P(LLA-CL) si è potuto tener conto nelle medie anche dei risultati del saggio eseguito nella tesi precedente, essendo lo *scaffold* uguale [23].

MV₂ *medium* base, mentre l'incubazione a 3 e 7 giorni è stata protratta solo in MV₂ base, arricchito dell'1% di FCS e AF, sostituendo dopo 7 giorni per 2 volte il terreno con 1 ml di fresco.

A 4 h dal termine dell'incubazione a 37°C, sono stati aggiunti 100 µl di soluzione MTT nei pozzetti (5 mg/ml in PBS), affinché il composto fosse metabolizzato dalle cellule. I cristalli di formazano derivanti dalla trasformazione dell'MTT sono stati solubilizzati con 200 µl di isopropanolo sotto blanda agitazione meccanica per 20 min al buio. La lettura dei valori d'assorbanza è stata eseguita a 570 nm in piastre da 96 pz con spettrofotometro ELISA. Per ogni dischetto sono state lette tre estrazioni di soluzione di 50 µl ciascuna. Per ogni condizione sono state valutate la vitalità e la proliferazione cellulari dopo 24 h e 3 e 7 giorni. I risultati per ogni saggio sono la media di tre campioni. Di ogni saggio è stata poi fatta la media dei valori, espressi sia in %, rispetto al campione di materiale puro, che come numero di cellule vitali adese al campione. La conversione da assorbanza a numero di cellule è stata fatta con la retta di taratura ottenuta nella tesi precedente, di equazione [23]:

$$\text{numero cellule} = 1,8 \cdot 10^6 \text{ numero cellule}$$

La retta di taratura è stata ottenuta seminando su piastre da 24 pozzetti quantità note di cellule, lasciando in incubazione a 37 °C per 5 h e successivamente eseguendo un *MTT Test*.

L'analisi statistica sui risultati finali dei saggi è stata effettuata, infine, con il t-test di Student, rispetto al controllo in materiale puro non trattato ($p < 0,05$).

Prima di eseguire i saggi di proliferazione, sono state fatte alcune prove a 2, 3, 4 e 7 giorni su PCL (elettrofilato in DCM/DMF) in terreno completo, per valutare quali fossero i tempi più indicativi. In Figura 62 si può osservare il tipico andamento di crescita esponenziale (il fattore 0,1337 ad esponente rappresenta il tasso di ecuplicazione), dove ogni punto sperimentale corrisponde alla media di due dischetti.

Come tempi più significativi sono stati presi in considerazione 3 e 7 giorni. La scelta del tipo di terreno (base o completo) è stata fatta sulla base di una prova ulteriore su altri due dischetti di PCL (Figura 63).

Proliferazione nel tempo in MV2 completo su PCL in DCM/DMF

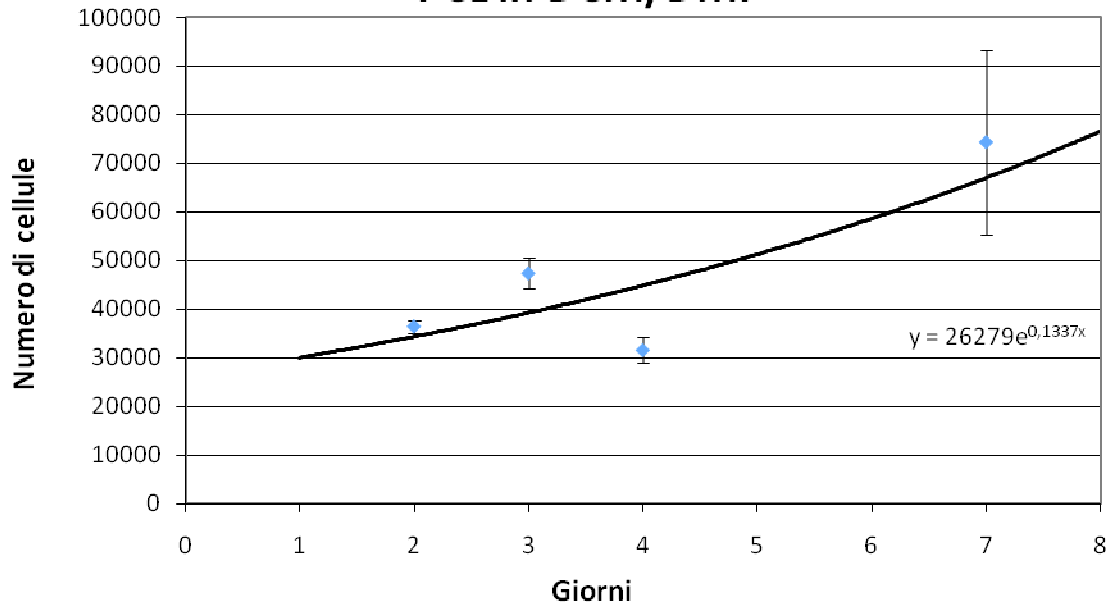


Figura 62: Proliferazione nel tempo su PCL (elettrofilato in DCM/DMF), utilizzando terreno MV2 completo

Dalla Figura 63 si può osservare che il terreno base non incide significativamente sulla proliferazione e ciò aiuterà a distinguere l'effetto vero e proprio della presenza del peptide, evitando allo stesso tempo di avere fenomeni di confluenza. Inoltre il terreno base limita gli effetti di differenziamento cellulare, che darebbero origine a sovrastrutture (formazione di pareti capillari,...), inibendo la proliferazione.

Effetto del terreno a tempi diversi su PCL in DCM/DMF

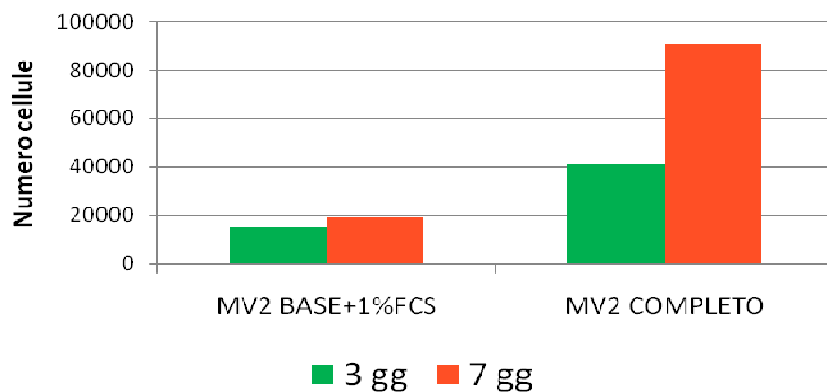


Figura 63: Effetto del terreno sulla proliferazione a 3 e 7 giorni su PCL (elettrofilato in DCM/DMF)

Le immagini scattate al SEM (Figura 64) hanno evidenziato uno *spreading* non sempre ottimale sulla superficie dello *scaffold* a 3 giorni. Ciò, però, non deve far pensare che questa conformazione assunta delle cellule debba necessariamente ripresentarsi a 7 giorni [77]

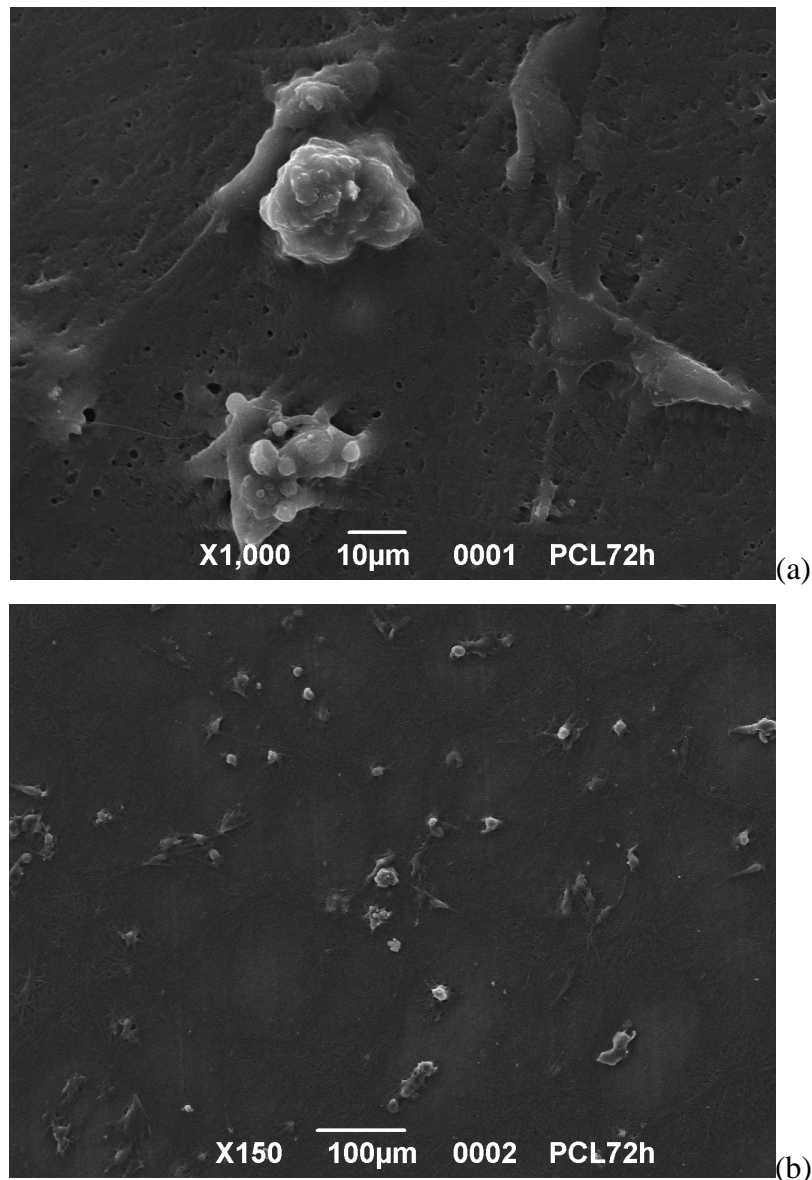


Figura 64: Immagini al SEM a diversi ingrandimenti (a,b) degli *scaffold* in PCL (elettrofilato in DCM/DMF) a 3 giorni dalla semina di cellule HUVEC

Non esistono ad oggi molti dati in letteratura su studi biologici eseguiti su matrici biomimetiche di polimeri elettrofilati. Il contributo di Andukuri et al. [78] valuta l'adesione di cellule HUVEC su uno *scaffold* elettrofilato di PCL reso biomimetico per trattamento superficiale con peptidi autoassemblanti contenenti sequenze adesive: l'adesione a 2 h su alcune matrici biomimetiche viene incrementata del 33% rispetto al controllo.

- Saggi di adesione a 24 h

I risultati dei saggi di adesione sono stati riassunti nei due casi: con terreno MV₂ base (Figura 65) e con terreno MV₂ completo (Figura 66), esprimendo i dati sia in numero di cellule adese che in confronto percentuale rispetto al controllo.

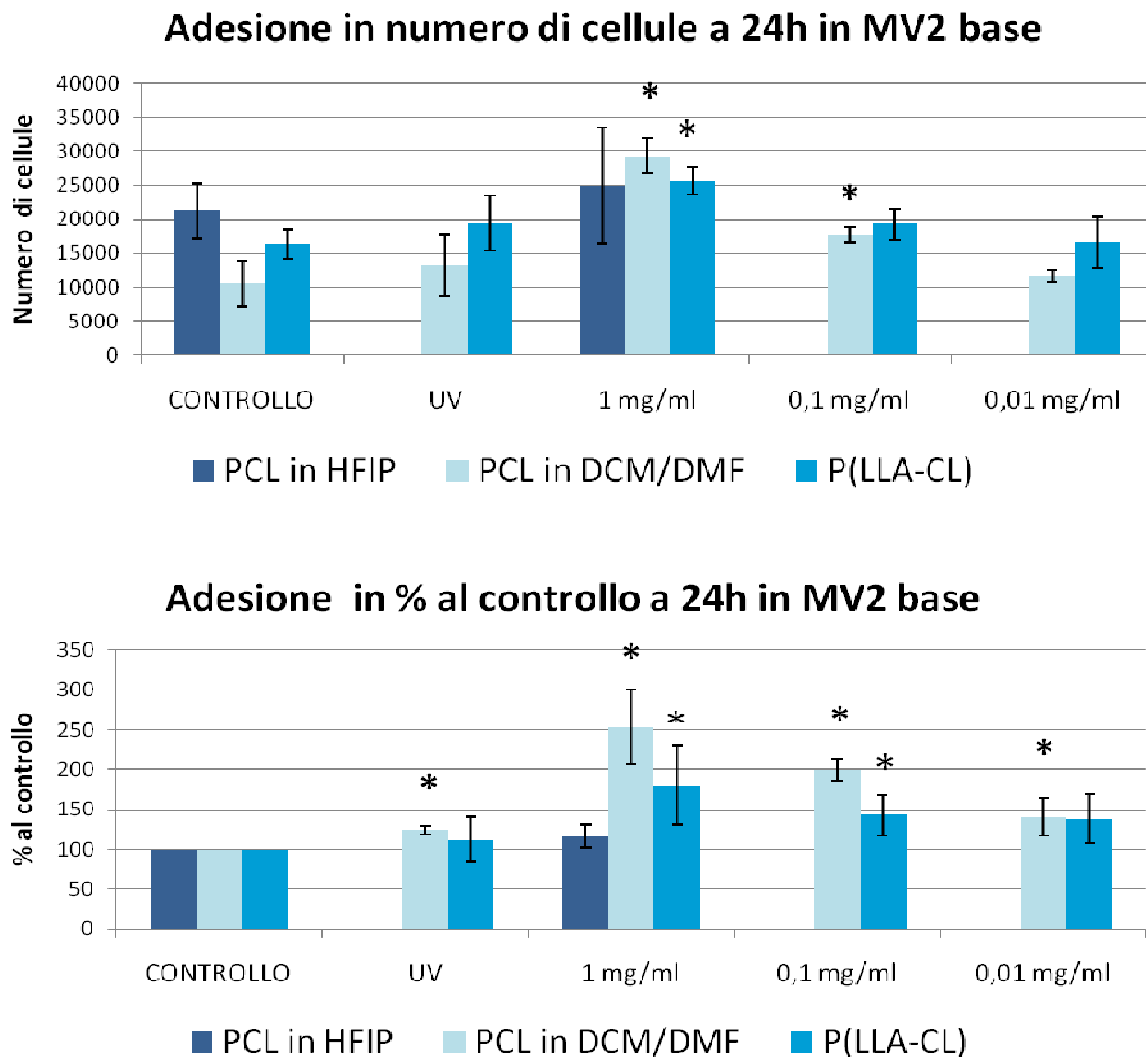


Figura 65: Adesione in numero di cellule e in % rispetto al controllo a 24 h in terreno MV₂ base (* = p < 0,05)

Per quanto riguarda l'uso di tre tipi di substrati diversi, l'adesione delle cellule HUVEC agli *scaffold* di PCL in DCM/DMF e di P(LLA-CL) premia sempre maggiormente il copolimero, mentre il PCL in HFIP dà risultati contrastanti tra terreno base, in cui il dato è il migliore dei tre tipi di substrati, e completo, dove è il peggiore. Sembra però degno di nota che il numero di cellule che aderiscono al solo policaprolattone in terreno base sia molto diverso tra i due tipi di PCL: ~ 10000 cellule per PCL elettrofilato da soluzione DCM/DMF e ~ 20000 cellule per PCL elettrofilato in HFIP. Sarebbe che la matrice di PCL elettrofilata in alcol risulti

maggiormente gradita alle cellule e ciò potrebbe indurre in futuro a valutare la funzionalizzazione covalente di questa matrice. Tuttavia vanno osservati anche i risultati ottenuti a 3 e 7 giorni per comprendere le potenzialità di questo *scaffold*.

Il trattamento con radiazione UV su P(LLA-CL) e PCL in DCM/DMF sembra apportare delle modifiche positive allo *scaffold*, che vengono rilevate dalle cellule.

In assenza di siero l'ancoraggio covalente del peptide produce un incremento molto significativo dell'adesione a 24 h. Nel caso della matrice di PCL reticolata con la concentrazione maggiore di peptide adesivo (1 mg/ml) lo *scaffold* biomimetico è in grado di incrementare l'adesione di 2,5 volte rispetto al non trattato. Questa matrice risulta avere in assoluto il numero di cellule adese più elevato. Analogamente la matrice di copolimero funzionalizzata con la concentrazione maggiore di peptide incrementa di circa 1,8 volte l'adesione iniziale al non trattato. Le concentrazioni inferiori inducono effetti meno marcati per entrambe le matrici.

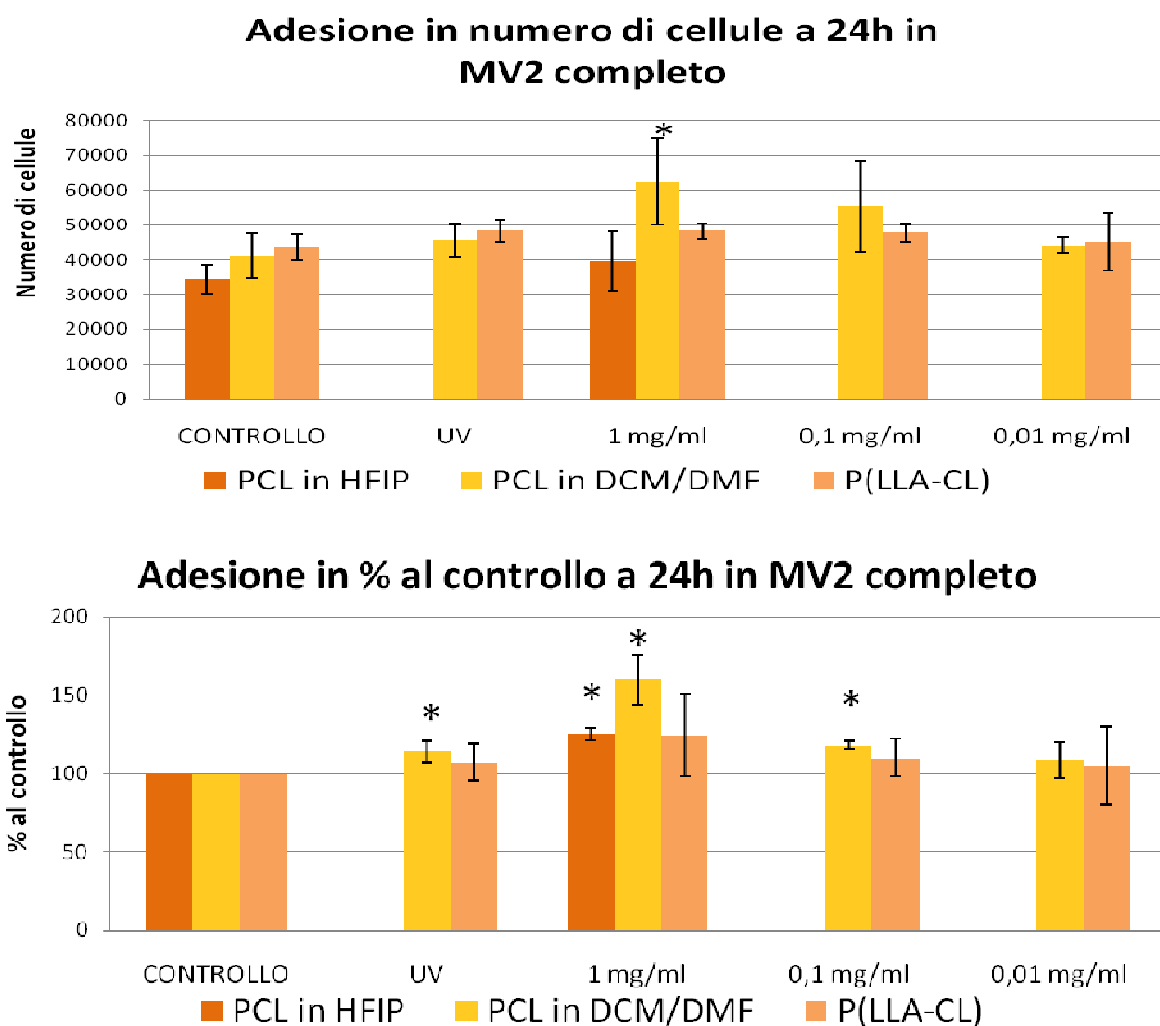


Figura 66: Adesione in numero di cellule e in % rispetto al controllo a 24 h in terreno MV2 completo (* = $p < 0,05$)

L'aggiunta di terreno completo nel saggio di adesione a 24 h produce un appiattimento delle differenze evidenziate, segno di una competizione tra le sequenze segnale peptidiche legate alla superficie e l'adsorbimento di proteine adesive. L'appiattimento è più marcato nel caso del copolimero mentre l'adesione alla matrice di PCL elettrofilato in DCM/DMF pretrattata con la concentrazione maggiore di peptide si mantiene significativamente più elevata rispetto al controllo: l'incremento di adesione, anche nella condizione meno favorevole della presenza di terreno completo, è del 60% rispetto al controllo.

Nel caso delle matrici ottenute inglobando il peptide (GRGDSP)₄K nella matrice polimerica si assiste ad un incremento di adesione a 24 h del 20% rispetto al controllo (PCL) in assenza di terreno completo: il dato appare modesto se confrontato al +150% dell'adesione al PCL funzionalizzato covalentemente con il peptide 2N3RGD alla concentrazione di 1 mg/ml.

Nel caso dello *scaffold* di PCL con inglobato il peptide di adesione, gli esperimenti in presenza di terreno completo non portano a sostanziali modifiche del dato: pur essendo maggiori le cellule adese al controllo, in questo caso l'incremento per l'arricchimento con il peptide risulta comunque del 20%. Essendo il rilascio dalla matrice limitato, si può ipotizzare che l'effetto anti-adesivo del peptide in soluzione risulti modesto.

- Saggi di proliferazione a 3 e 7 giorni

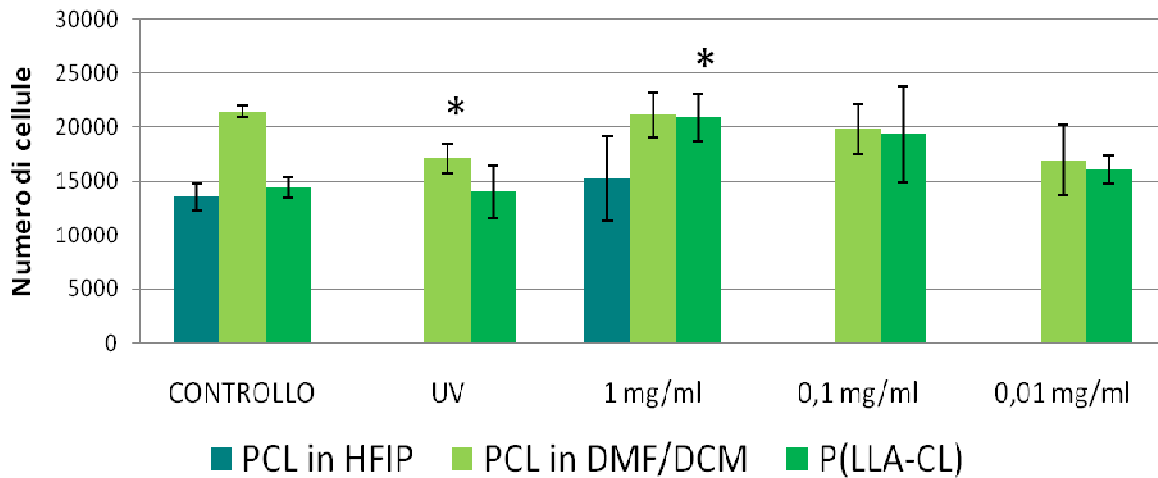
I risultati dei saggi di proliferazione sono riportati in Figura 67 e Figura 68.

Va sottolineato che a 3 giorni è stato eseguito solo un saggio su PCL elettrofilato in DCM/DMF e su P(LLA-CL), mentre per PCL in HFIP ne sono stati fatti tre. I dati sono perciò ancora indicativi.

In generale il numero di cellule presenti sui vari campioni, trattati e non, risulta comparabile.

I tre tipi di substrati sembrano comunque differire tra loro, ma questa volta è il PCL in DCM/DMF a fornire l'adesione migliore. Nel confronto con il PCL in HFIP, tuttavia, può influire l'utilizzo di cellule provenienti da cordoni diversi nei tre saggi rispetto al singolo saggio del PCL in DCM/DMF, che però rimane in ogni caso migliore del dato ottenuto utilizzando la matrice di P(LLA-CL).

Proliferazione in numero di cellule a 3 giorni



Proliferazione in % al controllo a 3 giorni

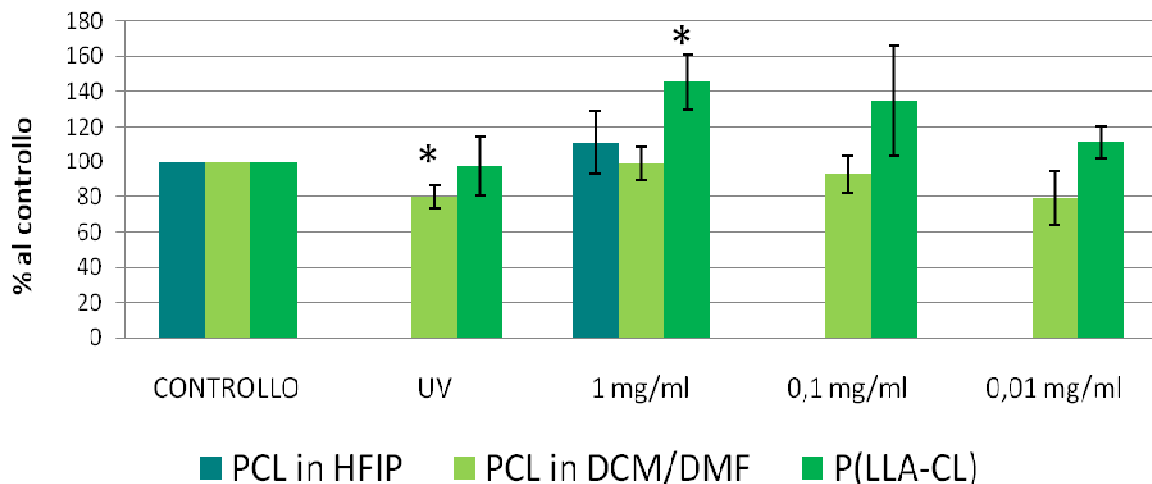
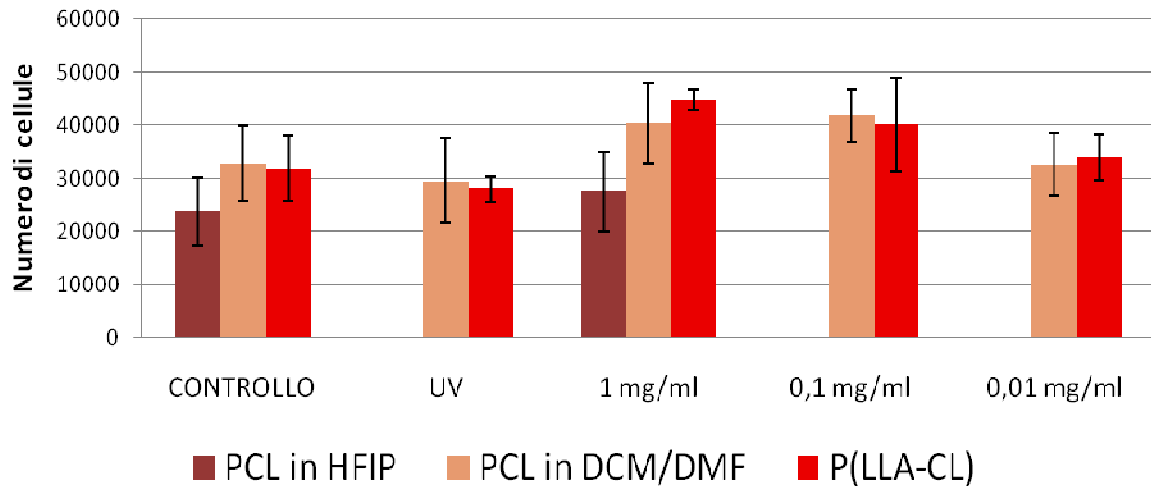


Figura 67: Proliferazione in numero di cellule e in % rispetto al controllo a 3 giorni (terreno MV2 base) (* = $p < 0,05$)

Il trattamento con UV del PCL elettrofilato in DCM/DMF sembra, in controtendenza con l'adesione, alterare in qualche modo il substrato, rendendolo meno gradito alle cellule. La presenza dei peptidi pare ovviare a tale penalizzazione soltanto alla concentrazione maggiore (1 mg/ml), senza però apportare nessun significativo miglioramento. L'effetto degli UV è invece trascurabile nel caso del P(LLA-CL), dove si osserva un leggero calo della proliferazione. I peptidi incrementano di parecchio la proliferazione rispetto al controllo (+140%), che però rimane analoga in valore assoluto al PCL in DCM/DMF.

Il PCL con peptide inglobato sembra aumentare solo del 10% la proliferazione rispetto al controllo, ma il dato non è significativo, viste le alte deviazioni standard.

Proliferazione in numero di cellule a 7 giorni



Proliferazione in % al controllo a 7 giorni

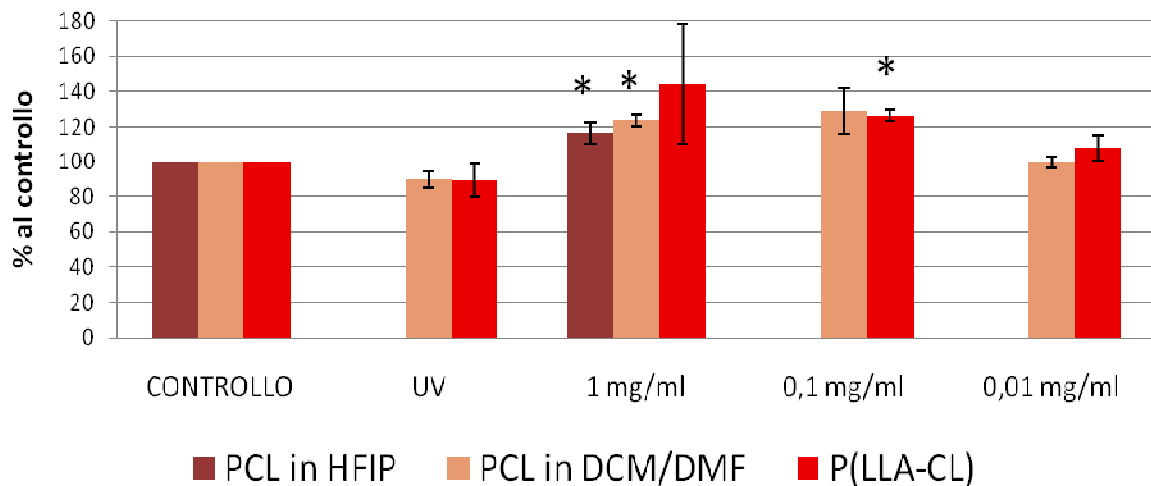


Figura 68: Proliferazione in numero di cellule e in % rispetto al controllo a 7 giorni (terreno MV2 base) (* = $p < 0,05$)

A 7 giorni sembra esserci una differenza tra matrice reticolata e non riguardo al numero di cellule presenti, in favore della prima, anche se i dati non risultano significativi. Probabilmente ciò è imputabile anche all'uso di cordoni diversi.

In particolare sembrerebbe che l'effetto della matrice di PCL in DCM/DMF e di quella in P(LLA-CL) sulla proliferazione sia analogo. Allo stesso tempo il valore è però leggermente migliore di quello della matrice di PCL in HFIP. Gli *scaffold* irradiati con UV confermano, invece, di essere substrati meno graditi alle cellule.

Per tutti gli *scaffold* gli incrementi riguardano il trattato alla maggior concentrazione peptidica e arrivano a circa un 20% in più del controllo. Ciò è vero anche per concentrazioni di 0,1 mg/ml. Solo il P(LLA-CL) arriva ad un +40% per il caso a concentrazione maggiore.

I risultati a 3 e 7 giorni sono stati infine rielaborati per evidenziare anche l'andamento della crescita cellulare nel tempo (Figura 69) (non vengono riportate le significatività rispetto al controllo, analoghe alle precedenti).

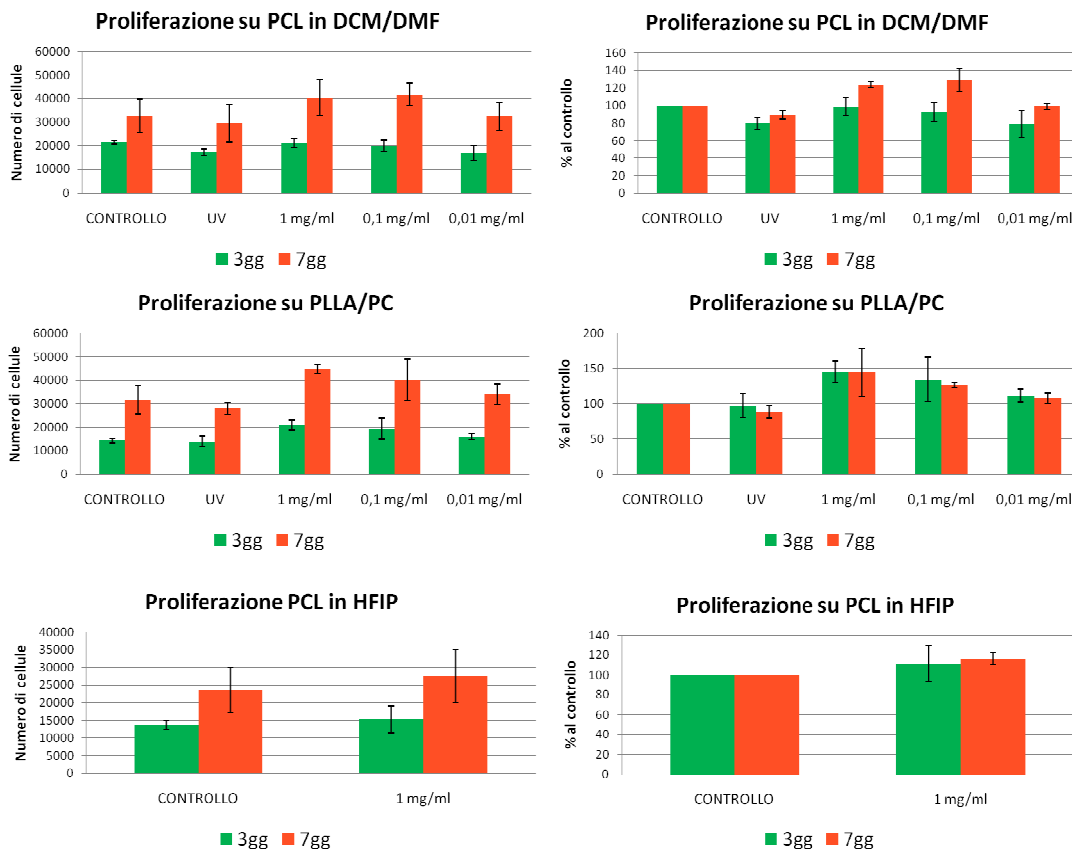


Figura 69: Proliferazione nel tempo in numero di cellule e in % rispetto al controllo per i tre tipi di substrati (terreno MV2 base)

Apparentemente si nota una differenza tra l'incremento nel caso degli *scaffold* di PCL elettrofilati in HFIP rispetto a quelli elettrofilati in DCM/DMF. Il PCL in DCM/DMF ed il P(LLA-CL) evidenziano, infatti, un aumento significativo nel numero di cellule, passando da 3 a 7 giorni. Il dato, comunque, è ancora provvisorio. E' invece certo che il PCL elettrofilato in HFIP non sembra avere una struttura così promettente per quanto riguarda la proliferazione cellulare, seppure favorisca l'adesione.

Il *trend* di proliferazione percentuale a 3 a 7 giorni evidenzia come per ogni caso l'incremento sia costante. Solo il PCL in DCM/DMF sembra aver subito un aumento consistente, ma i

punti sperimentali a 3 giorni sono poco significativi, essendo basati su un solo saggio, peraltro con un appiattimento consistente tra controllo e trattato con peptide.

In generale ciò può essere evidenziato anche matematicamente [79], confrontando l'aumento percentuale tra campione trattato e controllo per 3 e 7 giorni: se le due percentuali coincidono significa che il tasso di crescita delle due popolazioni di cellule è lo stesso, indicando una continuità nell'efficacia del peptide o nella penalizzazione realizzata dagli UV. Infatti per andamenti esponenziali, come sono le cinetiche di crescita cellulari, due rapporti uguali corrispondono alle stesse differenze tra grafici con identico andamento:

$$\%_{3gg} = \frac{N_{TRATTATO-3gg}}{N_{CONTROLLO-3gg}} = \frac{N_{TRATTATO-0} e^{\mu_{TRATTATO} t_{3gg}}}{N_{CONTROLLO-0} e^{\mu_{CONTROLLO} t_{3gg}}} = \frac{N_{TRATTATO-0}}{N_{CONTROLLO-0}} e^{(\mu_{TRATTATO} - \mu_{CONTROLLO}) t_{3gg}}$$

$$\%_{3gg} = \frac{N_{TRATTATO-7gg}}{N_{CONTROLLO-7gg}} = \frac{N_{TRATTATO-0} e^{\mu_{TRATTATO} t_{7gg}}}{N_{CONTROLLO-0} e^{\mu_{CONTROLLO} t_{7gg}}} = \frac{N_{TRATTATO-0}}{N_{CONTROLLO-0}} e^{(\mu_{TRATTATO} - \mu_{CONTROLLO}) t_{7gg}}$$

N_0 , N_{3gg} e N_{7gg} = numero di cellule a tempi di 0, 3 e 7 giorni per trattato o controllo;

μ = tasso di crescita (numero di euplicazioni nell'unità di tempo);

t_{3gg} e t_{7gg} = tempi a 3 e 7 giorni.

5. CONCLUSIONI

In questo lavoro di tesi è stata indagata l'efficacia di peptidi adesivi contenenti motivi RGD nel migliorare l'adesione e la proliferazione di cellule endoteliali HUVEC, per la realizzazione di vasi sanguigni di piccolo calibro. La tesi è la continuazione di un progetto più ampio e ha il suo contributo originale nell'impiego di peptidi di sintesi per ottenere *scaffold* elettrofilati di tipo biomimetico.

Le principali conclusioni alle quali si è giunti possono essere brevemente riassunte come segue:

1. L'utilizzo dell'elettrofilatura ha permesso di ottenere matrici polimeriche con una struttura fibrosa in grado di mimare la matrice extracellulare. Le fibre ottenute in questo lavoro di tesi hanno diametri compresi tra 1-3 μm e qualche centinaio di nm.
2. Le reazioni che convertono i gruppi azido in specie radicaliche permettono l'ancoraggio covalente del peptide 2N3RGD alle matrici come confermato dai dati XPS.
3. Le matrici biomimetiche ottenute per ancoraggio covalente non presentano maggior bagnabilità rispetto a quelle non funzionalizzate.
4. Per quanto riguarda le proprietà adesive in terreno base dei tre *scaffold* non funzionalizzati, il miglior risultato è quello del PCL in HFIP. Se si confrontano invece i dati di adesione ottenuti sempre a 24 h in terreno completo si comportano meglio le matrici ottenute da soluzioni di DCM/DMF.
5. L'irradiazione degli *scaffold* elettrofilati da soluzioni di DCM/DMF sembra sortire effetti contrastanti favorendo l'adesione ma inibendo la proliferazione rispetto al controllo. Tale effetto potrebbe essere dovuto ad una reticolazione indotta dalla rottura dei legami singoli C-C in seguito all'irradiazione che andrebbe a penalizzare la migrazione cellulare.
6. In tutti i casi trattati l'arricchimento dello *scaffold* con i peptidi porta ad un incremento dell'adesione cellulare, sia in terreno base che in terreno completo. Il risultato più eclatante è quello del PCL ottenuto da soluzione di DCM/DMF e funzionalizzato con il peptide 2N3RGD mediante la soluzione peptidica a più alta concentrazione: l'adesione viene incrementata del 150% in terreno base e del 60% in terreno completo rispetto alla medesima superficie non funzionalizzata. Questo dato è sicuramente molto importante, poiché dimostra un aumento consistente dell'adesione in condizioni che mimano quelle presenti *in vivo* nelle quali lo *scaffold* verrà utilizzato al termine della sperimentazione.

7. L'inclusione del peptide (GRGDSP)₄K nella matrice di PCL elettrofilata da una soluzione di HFIP dà risultati meno rilevanti: si ottiene un incremento dell'adesione a 24 ore del 20% rispetto al controllo in entrambi i terreni.
8. La proliferazione a 3 e 7 giorni viene incrementata in presenza delle superfici biomimetiche ma in maniera minore rispetto ai dati di adesione. In particolare a 7 giorni si osserva un incremento del 20% per le matrici di PCL sia funzionalizzate covalentemente che contenenti i peptidi adesivi, mentre si osserva un incremento del 40% nella matrice di P(LLA-CL) funzionalizzata alla concentrazione maggiore di peptide (1 mg/ml).
9. I dati nel loro complesso sembrano indicare che la scelta migliore nella strategia di veicolazione dei peptidi alla superficie impiantare sia l'ancoraggio covalente di tipo specifico. L'utilizzo di peptidi con fotomarcatori permette di orientare le catene peptidiche sulla superficie dello *scaffold* e soprattutto evita l'impiego dei gruppi funzionali delle catene laterali per ottenere il legame covalente con la matrice, preservando tali gruppi per l'interazione con le integrine cellulari.

Gli sviluppi prossimi di questa ricerca comprenderanno studi sulle proprietà meccaniche delle matrici reticolate con i peptidi, la conferma di alcuni dati sperimentali di proliferazione e analisi morfologiche delle cellule adese ai vari *scaffold*. Verranno eseguiti inoltre approfondimenti sull'effetto delle radiazioni sulla struttura delle matrici con modifica dei tempi e delle lunghezze d'onda impiegate.

I risultati ottenuti incoraggiano a proseguire la ricerca *in vivo* o con semina in dinamico su bireattore, non solo considerando l'applicazione a vasi di piccolo calibro, ma anche quella a vasi di calibro maggiore caratterizzati da un flusso ematico più elevato, dove la maggior forza di adesione promossa dai peptidi potrebbe risultare preziosa.

- BIBLIOGRAFIA -

1. J. Chlupáč, E. Filová, L. Bačáková, “Blood Vessel Replacement: 50 years of Development and Tissue Engineering Paradigms in Vascular Surgery” *Physiological Research* 58 (2), 119-139 (2009)
2. S. Nuti, “Tissue Engineered Vascular Grafts: The Bright Future of Heart Health”, *Yale Scientific Magazine* (2010)
3. D. Pankajakshan, D. K. Agrawal, “Scaffold in tissue engineering of blood vessels”, *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 88, 855-873 (2010)
4. Sudhakar Nuti, “Tissue Engineered Vascular Grafts: The Bright Future of Heart Health”, *Yale Scientific Magazine* (2 ottobre 2010)
5. O. Oliviero, “Nuovi materiali funzionali per l’ingegneria del tessuto vascolare”, tesi di dottorato in ingegneria dei materiali e delle strutture, XX ciclo, università “Federico II” di Napoli (2007)
6. M. L. Finezzo, “Confronto strutturale e studio dell’attività biologica di angiogenina e lactogenina per possibili applicazioni di terapia medica e ingegneria tessutale”, tesi di dottorato in biologia e medicina della rigenerazione, indirizzo ingegneria dei tessuti, XX ciclo, università di Padova (2007)
7. Claudio Babiloni, “Sistema cardiovascolare”, slide, insegnamento di “Fisiologia umana”, dipartimento di fisiologia umana e farmacologia, università “La Sapienza” di Roma,
http://www.orientamento.unifg.it/dwn/entrata/corso_preparazione_medicina08/fisiologia/5-Cardiovascolare.pdf (2008)
8. M. Bracale, “Fisiologia dell'apparato cardiocircolatorio (1a parte)”, appunti del corso di Elettronica Biomedica (a.a. 2009-2010)
9. Alessandro Zandonà, “Scaffold e bioreattori per la costruzione di vasi sanguigni ingegnerizzati”, tesi di laurea triennale in ingegneria biomedica, dipartimento di processi chimici dell’ingegneria, università di Padova (a.a. 2010-2011)
10. M. S. Baguneid, A. M. Seifalian, H. J. Salacinski, D. Murray, G. Hamilton and M. G. Walker, “Tissue engineering of blood vessels”, *British Journal of Surgery* 93, 282-290 (2006)

11. B.C. Isenberg, C. Williams, R. T. Tranquillo, "Endothelialization and flow conditioning of fibrin-based media-equivalents", *Annals of Biomedical Engineering* 34, 971-985 (2006)
12. "Protesi vascolari", slide, http://www.dea.uniroma3.it/elchem/Resources/BM_5_ProtVasc.pdf (2005)
13. M. Dettin, "Bioactive surfaces using peptide grafting in tissue engineering", cap. 19 di "Cellular response to biomaterials" ed. da Lucy Di Silvio, Woodhead Publishing Limited, CRC Press (2009)
14. H. Wu, J. Fan, C.-C. Chu, J. Wu, "Electrospinning of small diameter 3-D nanofibrous tubular scaffolds with controllable nanofiber orientations for vascular grafts", *Journal of Materials Science: Materials Medicine* (21), 3207-3215 (2010)
15. K. D. Andrews, J. A. Hunt, "Developing smaller-diameter biocompatible vascular grafts", cap. 9 di "Cellular response to biomaterials" ed. da Lucy Di Silvio, Woodhead Publishing Limited, CRC Press (2009)
16. T. L. Mirensky, N. Hibino, R. F. Sawh-Martinez, T. Yi, G. Villalona, Toshiharu Shinoka, Christopher K. Breuer, "Tissue-engineered vascular grafts: does cell seeding matter?", *Journal of pediatric surgery* 45 (6), 1299-1305 (2010)
17. B. Elsener, "I-materiali polimerici", slide del corso di Degradazione dei materiali non-metallici, facoltà di ingegneria, università di Cagliari, http://dipcia.unica.it/superf/Degradazione/Polimeri_Capitolo2.pdf (a.a. 2005-2006)
18. J. Venugopal, Sharon Low, Aw Tar Choon, S. Ramakrishna, "Interaction of Cells and Nanofiber Scaffolds in Tissue Engineering", *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 34-48 (2007)
19. A. Thumiger, "Le materie plastiche", articolo, <http://www.regione.vda.it/gestione/riview/templates/aspx/environnement.aspx?pkArt=571>
20. Calvin Woodings Consulting, "Nuovi sviluppi nei tessuti biodegradabili", articolo (UK) <http://www.technica.net/NF/NF3/biodegradabili.htm>
21. M. Canciello, "Sistemi polimerici multicomponenti biorassorbibili per applicazioni biomediche e farmaceutiche", tesi di dottorato in scienze chimiche, XXI ciclo, università "Federico II" di Napoli (2008)

22. M. Dettin, M. T. Conconi, R. Gambaretto, A. Pasquato, M. Folin, C. Di Bello, P. P. Parnigotto, "Novel osteoblast-adhesive peptides for dental/orthopedic biomaterials", *Journal of Biomedical Materials Research* 60, 466-471 (2002)
23. E. Dainese, "Scaffold elettrofilati per l'ingegneria dei vasi sanguigni", tesi di laurea specialistica in scienza e ingegneria dei materiali, dipartimento di processi chimici dell'ingegneria, università di Padova (a.a. 2008-2009)
24. E. Bozza, "Matrici elettrofilate di peptidi auto-assemblanti per l'ingegneria del tessuto osseo", tesi di laurea magistrale in ingegneria biomedica, dipartimento di processi chimici dell'ingegneria, università di Padova (a.a. 2009-2010)
25. B. Merrifield, "Solid Phase Syntesis", *Science* 232, 341-347 (1986)
26. G. B. Fields, Z. Tian, and G. Barany, "Synthetic Peptides: A User's Guide" (Grant, G.A., ed.), 77-183, W.H. Freeman and Co., New York, NY (1992)
27. R. K. Lawson-Smith, K. A. Woodhouse, "Synthesis of Synthetic Polymers: Poly(amino acids)", cap. 54 di "Methods of Tissue Engineering", ed. da A. Atala e R. P. Lanza, AP (2002)
28. G. Dormán, G. D. Prestwich, "Using photolabile ligands in drug discovery and development", *Trends in Biotechnology* 18, 64-77 (2000)
29. S. A. Fleming, "Chemical Reagents in Photoaffinity Labeling", *Tetrahedron* 51, 12479-12520 (1995)
30. Grant G.A. ed., "Synthetic Peptides: A User's Guide", 2nd edn., Oxford University Press, (2002)
31. Y. Hatanaka, Y. Sadakane, "Photoaffinity labeling in drug discovery and developments: Chemical gateway for entering", *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2, 271-288 (2002)
32. G. Vitali, "Cromatografia liquida ad alta pressione", http://www.chimicando.it/esperimenti/chimica_analitica_quantitativa/Corso_HPLC/corso_hplc_prima_part (2002)
33. C. S. Young, R. J. Weigand, "An Efficient Approach to Column Selection in HPLC Method Development", Alltech Associates, Inc., <http://download.5117.com/download-action-26.htm>

34. Dott. Andrea Raffaelli del CNR di Pisa, “Che cos’è la spettrometria di massa”, traduzione da “What is Mass Spectrometry”, ASMS, http://www.incaweb.org/education/pdf/Spettrometria_di_massa.pdf
35. “Corso di Metodi fisici in chimica organica”, dispense del corso, università degli studi Salerno, facoltà di Farmacia, fonte di laboratorio (2005)
36. Achille Cappiello, “Spettrometria di massa”, slide, fonte di laboratorio (2000)
37. Electrospinz nanofibre engineering: <http://www.electrospinz.co.nz/electrospinning.php>
38. W. Cui, Y. Zhou, J. Chang, “Electrospun nanofibrous materials for tissue engineering and drug delivery”, *Science and technology of Advanced Materials* 11, 014108 (11pp) (2010)
39. R. P. A. Hartman, O. J. Brunner, D. M. A. Camelot, J. C. M. Marijnissen, “Electrohydrodynamic atomization in the cone-jet mode: Physical modeling of the liquid cone and jet”, *Journal of Aerosol Science* 30 (7), 823-849 (1999)
40. X. Wang, H. Niu, T. Lin, X. Wang, “Needleless Electrospinning of Nanofibers With a Conical Wire Coil”, *Polymer Engineering & Science* 49, 1582-1586 (2009)
41. S. Lingaiah, K. N. Shivakumar, R. Sadler, M. Sharpe, “Electrospinning of nanofabrics”, Center for Composite Materials Research (2007)
42. L. Bosworth, S. Downes, “Biocompatible three-dimensional scaffolds for tendon tissue engineering using electrospinning”, cap. 1 di “Cellular response to biomaterials” ed. da Lucy Di Silvio, Woodhead Publishing Limited, CRC Press (2009)
43. A. G. Azar, “Electrospinning Of Polymeric Nanofibers in Lab scale”, *Experimental Biophysics* Spring 2010
44. C. Del Gaudio, A. Bianco, M. Folin, S. Baiguera, M. Grigioni, “Structural characterization and cell response evaluation of electrospun PCL membranes: micrometric versus submicrometric fibers”, *Journal of Biomedical Materials Research* 89 Part A, 1028-1038 (2009)
45. P. J. Goldstein, “Electrospinning of ceramic and nanocomposite nanofibers”, tesi di laurea magistrale in scienze, università della Florida (2004)
46. Y. M. Shin, M. M. Hohman, M. P. Brenner, G. C. Rutledge, “Electrospinning: A whipping fluid jet generates submicron polymer fibers”, *Applied Physics Letters* 78 (8), 1149-1151 (2001)

47. S. Karra, "Modeling electrospinning process and numerical scheme using lattice Boltzmann method to simulate viscoelastic fluid flows", tesi di laurea, Indian Institute of Technology Madras (2007)
48. C. Hsu, S. Shivkumar, "Nano-sized beads and porous fiber constructs of Poly(ϵ -caprolactone) produced by electrospinning", *Journal of Materials Science* 39, 3003-3013 (2004)
49. C. Feng, K. C. Khulbe, T. Matsuura, "Recent Progress in the Preparation, Characterization, and Applications of Nanofibers and Nanofiber Membranes via Electrospinning/Interfacial Polymerization", *Journal of Applied Polymer Science* 115, 756-776 (2010)
50. S. Petrik, M. Maly, "Needleless Electrospinning of Nanofibers With a Conical Wire Coil", Elmarco s.r.o. (2009)
51. J. M. Deitzel, J. Kleinmeyer, D. Harris, N. C. Beck Tan, "The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles", *Polymer* 42, 261-272 (2001)
52. V. Beachley, X. Wen, "Effect of electrospinning parameters on the nanofiber diameter and length", *Materials Science and Engineering C* 29, 663-668 (2009)
53. L. Buruaga, A. Gonzalez, J. J. Iruin, "Electrospinning of poly (2-ethyl-2-oxazoline)", *Journal of Materials Science* 44, 3186-3191 (2009)
54. X. M. Moa, C.Y. Xub, M. Kotakib, S. Ramakrishnaa, "Electrospun P(LLA-CL) nanofiber: a biomimetic extracellular matrix for smooth muscle cell and endothelial cell proliferation", *Biomaterials* 25, 1883-1890 (2004)
55. S. De Vrieze, T. Van Camp, A. Nelvig, B. Hagstro'm, P. Westbroek, K. De Clerck, "The effect of temperature and humidity on electrospinning", *J. Mater. Sci.* 44, 1357-1362 (2009)
56. NANO-CAT srl: http://www.nanocat.it/nanofibers_I.html
57. Donaldson Company Inc: <http://www.donaldson.com/en/industrialair/literature/063434.pdf>
58. Finetex Technology Inc: <http://www.finetextech.com/>
59. Nicast Ltd.: <http://www.nicast.com/index.aspx?id=2930>

60. G. Principi, “Caratterizzazione dei materiali”, dispense del corso, università degli studi di Padova (a.a. 2006-2007)
61. D. A. Skoong, J. J. Leary, “Chimica analitica strumentale”, EdiSES, cap. 16 (1995)
62. C. Di Bello, “Biomateriali”, Collana di Ingegneria Biomedica, Pàtron Editore, cap. 7 (2004)
63. G. Paoella, “Vitalità e proliferazione di cellule in coltura”, <http://www.federica.unina.it/scienze-biotecnologiche/biotecnologie-cellulari-e-molecolari/vitalita-e-proliferazione-di-cellule-in-coltura/>
64. “Colture cellulari”, slide, fonte di laboratorio (2008-2009)
65. “Presentazione sul ciclo cellulare”, slide, fonte di laboratorio (2008-2009)
66. “Linee cellulari”, slide, [http://xfiles.farmacia.uniba.it/farmol/didattica_web/40/argomenti/linee%20cellulari%20\(4\).pps](http://xfiles.farmacia.uniba.it/farmol/didattica_web/40/argomenti/linee%20cellulari%20(4).pps)
67. “Colture Cellulari”, slide, www.uniroma2.it/didattica/bio-clil/deposito/colture_cellulari.ppt
68. “Tossicologia”, slide, <http://www.tursiops-biology.com/appunti/tossicologia.pdf>, (2000)
69. S. Inayat-Hussain, N. F. Rajab, “*In vitro* testing of biomaterials toxicity and biocompatibility”, cap. 20 di “Cellular response to biomaterials” ed. da Lucy Di Silvio, Woodhead Publishing Limited, CRC Press, 514-516 (2009)
70. ATCC, “MTT Cell Proliferation Assay Instructions”, Catalogo n° 30-1010K (2001)
71. H. Wan, R. Williams, P. Doherty, D. F. Williams, “A study of the reproducibility of the MTT test”, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 5, 154-159 (1994)
72. E. Dainese, “Scaffold elettrofilati per l’ingegneria dei vasi sanguigni”, tesi di laurea specialistica in scienza e ingegneria dei materiali, dipartimento di processi chimici dell’ingegneria, università di Padova (a.a. 2008-2009)
73. http://en.wikipedia.org/wiki/T_test
74. http://www.socialresearchmethods.net/kb/stat_t.php
75. T. Vargiolu, “Elementi di probabilità e statistica”, dispense del corso, Università degli studi di Padova, Cleup (a.a. 1999-2000)
76. M. Dettin, A. Bagno, M. Morpurgo, A. Cacchioli, M. T. Conconi, C. Di Bello, C. Gabbi, R. Gambaretto, P. P. Parnigotto, S. Pizzinato, F. Ravanetti, M. Guglielmi,

- “Evaluation of Silicon Dioxide–Based Coating Enriched with Bioactive Peptides Mapped on Human Vitronectin and Fibronectin: *In Vitro* and *In Vivo* Assays”, *Tissue Engineering* 12 (12), 3509-3523 (2006)
77. Ting Liu, Wai Keng Teng, Barbara P. Chan, Sing Yian Chew, “Photochemical crosslinked electrospun collagen nanofibers: Synthesis, characterization and neural stem cell interactions”, *Journal of Biomedical Materials Research* 95A (1), 276–282 (2010)
78. Andukuri, M. Kushwaha, A. Tambralli, J. M. Anderson, D. R. Dean, J. L. Berry, Y. Sohn, Y.-S. Yoon, B. C. Brott, H.-W. Jun, “A hybrid biomimetic nanomatrix composed of electrospun polycaprolactone and bioactive peptide amphiphiles for cardiovascular implants”, *Acta Biomaterialia* 7, 225-233 (2011)
79. F. Manzoni, “Modelli matematici in chimica e biologia”, tesina, ISS G. Natta Bergamo, Ricerca Irre Lombardia, http://www.itisnatabg.it/news/files/IRRE_tesina%20fin.%20Manzoni%2016.pdf (2005-2006)

- RINGRAZIAMENTI -

Al termine di questo lavoro di tesi, desidero ringraziare la Prof.ssa Monica Dettin per la grande disponibilità e serietà dimostrata durante questi mesi, e in particolar modo nell'ultimo periodo. La tesi proposta mi ha fatto toccare con mano l'importanza della interdisciplinarietà delle conoscenze nella risoluzione dei problemi pratici, aprendomi a uno sguardo più ampio sul campo dell'ingegneria biomedica.

A questo ringraziamento aggiungo quello alla mia correlatrice, Dott.ssa Roberta Danesin, e alla Dott.ssa Francesca Ghezzi, che mi hanno sempre seguito nella parte biologica e chimica di questo lavoro e in ogni problema incontrato. Un grande grazie alle mie due colleghe di laboratorio, Elena e Natali, che con me hanno vissuto questi mesi in serenità. Il clima di tutto il laboratorio è sempre stato cordiale e di collaborazione.

Ringrazio ancora la Dott.ssa Martina Roso e il Dott. Stefano Monetti per i validi consigli nel campo dell'*electrospinning*, insieme al tecnico di laboratorio Romeo, ai dottorandi, ai ricercatori. Grazie agli altri laureandi: Michela, Silvia, Iacopo e i miei due compagni Daniele e Davide per le chiacchierate. Ringrazio anche la Dott.ssa Ilenia Zanusso, che ha ben seguito con Roberta i saggi biologici e tutti gli altri compagni di corso, che qui non cito, ma con cui ho condiviso pranzi in mensa, fatiche e momenti divertenti.

In ultimo, ma è come fosse al primo posto, ringrazio la mia famiglia: i miei genitori e mia sorella Marta sempre pronti ad incoraggiarmi ogni giorno, senza scordare tutti i miei super amici di lunga e corta data: grazie a tutti!