



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA INDUSTRIALE

**TESI DI LAUREA MAGISTRALE IN
INGEGNERIA CHIMICA E DEI PROCESSI INDUSTRIALI**

**PROGETTAZIONE DI VALVOLE CARDIACHE
“SELF-SEEDING”: PEPTIDI AUTO-AGGREGANTI COME
“FILLER” PER PERICARDIO DECELLULARIZZATO**

Relatore: Prof. Monica Dettin
Correlatore: Prof. Michele Spina
Dott. Sabrina Facciolo

Laureanda: ANNJ ZAMUNER

ANNO ACCADEMICO 2011 – 2012

Riassunto

Il presente lavoro di tesi si inserisce all'interno del panorama attuale sulla progettazione di valvole cardiache "*self-seeding*".

In particolare, si valuta la possibilità di utilizzare nanofibre di peptidi auto-assemblanti quali "*filler*" per matrici di pericardio decellularizzate, verificandone, in primo luogo, la capacità di penetrazione all'interno della matrice stessa.

In seguito si quantificano le variazioni delle proprietà fisiche del pericardio bovino e porcino dovute al trattamento con peptide auto-assemblante e non auto-assemblante.

Data la natura non omogenea del tessuto pericardico, per entrambi gli animali, vengono sottoposte all'indagine sia la zona isotropa che anisotropa della matrice decellularizzata.

La finalità, è di creare degli *scaffolds* per bioprotesi valvolari graditi alle cellule, in modo da consentirne un completo ripopolamento in vivo, apportando, così, notevoli miglioramenti nel campo della cardiocirurgia valvolare.

Inoltre viene utilizzata la tecnica della *chemoselective ligation* per coniugare peptidi auto-assemblanti ad una sequenza adesiva ed a un fattore di crescita.

Indice

CAPITOLO 1 – Introduzione	1
1.1 VALVOLE CARDIACHE.....	1
1.2.1 Protesi valvolari meccaniche.....	3
1.2.2 Protesi valvolari biologiche.....	4
1.1.2.1 Autografts, Homografts, Xenografts.....	5
1.2.3 Protesi valvolari percutanee.....	7
1.2 INGEGNERIA TESSUTALE.....	11
1.2.1 Valvole cardiache ingegnerizzate.....	12
1.2.2 Tipologie di scaffolds per valvole cardiache ingegnerizzate.....	14
1.2.3 I biomateriali.....	16
1.2.3.1 Utilizzo del pericardio come biomateriale.....	18
1.3 ADESIONE E PROLIFERAZIONE CELLULARE.....	19
1.3.1 Sequenze adesive.....	20
1.3.2 Fattori di crescita.....	21
1.4 PEPTIDI AUTO-ASSEMBLANTI.....	22
1.5 “CHEMOSELECTIVE LIGATION” VIA OSSIMA.....	24
1.6 SCOPO DELLA TESI.....	25
CAPITOLO 2 – Materiali e Metodi	27
2.1 MATERIALI.....	27
2.1.1 Reagenti.....	27
2.1.2 Peptidi per il trattamento del pericardio bovino e porcino.....	29
2.1.2.1 EAbuK (carbossi terminale).....	29
2.1.2.2 EAbuK (amide terminale).....	29
2.1.2.3 Δ 5SDF1 β T	29
2.1.3 Peptidi e proteine per “Chemoselective Ligation”.....	29
2.1.3.1 AoaEAbuK	30
2.1.3.2 Aoa77EAbuK.....	30
2.1.3.3 (GRGDSP) ₄ K.....	30
2.1.3.4 IGF-1.....	30
2.1.4 Strumentazione di laboratorio.....	31
2.1.4.1 Sintesi peptidica su fase solida.....	31
2.1.4.2 Analisi di massa.....	31
2.1.4.3 Test alla ninidrina e Test alla piperidina.....	32
2.1.4.4 Analisi cromatografica.....	32

2.1.4.5	Analisi biologiche.....	33
2.2	METODI.....	33
2.2.1	Sintesi peptidica su fase solida.....	33
2.2.1.1	Test sulla resa di funzionalizzazione della resina.....	36
2.2.1.2	Attivazione del gruppo carbossilico	38
2.2.1.3	Test alla ninidrina.....	38
2.2.1.4	Sblocco del peptide dalla resina	40
2.2.2	Purificazione e caratterizzazione cromatografica.....	41
2.2.3	Spettrometria di massa.....	42
2.2.4	Spettroscopia di assorbimento UV/Vis.....	44
2.2.5	Matrici biologiche.....	45
2.2.5.1	Decellulazizzazione mediante protocollo TRI-COL.....	46
2.2.5.2	Misurazione delle proprietà fisiche delle matrici biologiche.....	46
2.2.5.3	Microscopia ad epifluorescenza.....	48
2.2.6	Analisi statistica.....	50
CAPITOLO 3	– Parte sperimentale.....	53
3.1	TRATTAMENTO DI MATRICI BIOLOGICHE DECELLULARIZZATE.....	53
3.1.1	Marcatura di EAbuK con sonda fluorescente.....	53
3.1.1.1	Caratterizzazione del peptide grezzo marcato.....	55
3.1.1.2	Trattamento di pericardio bovino decellularizzato con EAbuK-TAMRA.....	56
3.1.2	Trattamento di pericardio bovino decellularizzato.....	68
3.1.3	Trattamento di pericardio porcino decellularizzato.....	86
3.2	CHEMOSELECTIVE LIGATION	106
3.2.1	Bioconiugazione tra AoaEAbuK e (GRGDSP) ₄ K.....	106
3.2.1.1	Preparazione di (GRGDSP) ₄ K-chetone.....	106
3.2.1.2	Sblocco del peptide auto-assemblante AoaEAbuK dalla resina.....	109
3.2.1.3	Preparazione del coniugato EAbuK-(GRGDSP) ₄ K.....	109
3.2.2	Bioconiugazione tra Aoa77EAbuK e IGF-1.....	114
3.2.2.1	Sintesi del peptide Aoa77EAbuK.....	114
3.2.2.2	Preparazione di IGF-1-chetone.....	117
3.2.2.3	Preparazione del coniugato EAbuK-IGF-1.....	120
CONCLUSIONI	123
NOMENCLATURA	125
RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI	127
RINGRAZIAMENTI	131

Capitolo 1

Introduzione

1.1 Valvole cardiache

Il cuore è un organo muscolare cavo che in seguito a cicli di contrazione e decontrazione è in grado di spingere il sangue a tutti gli organi e tessuti del corpo. È formato da 4 camere: due atri (destro e sinistro) di forma rotondeggiante e a parete sottile, e due ventricoli (destro e sinistro) di forma più allungata e con pareti più spesse. Tale differenza di spessore è correlata al carico di lavoro svolto, infatti, si possono distinguere:

- una piccola circolazione, in cui il sangue venoso proveniente dal corpo raggiunge l'atrio destro, passa al ventricolo destro e da qui viene spinto ai polmoni per permettere l'ossigenazione;
- una grande circolazione, in cui il sangue ossigenato proveniente dai polmoni viene convogliato all'atrio sinistro, passa al ventricolo sinistro e da qui viene pompato in tutto il corpo.

È evidente che le camere sottoposte a maggior carico propulsivo sono i ventricoli e tra questi in particolare il sinistro che presenta uno spessore normalmente maggiore del destro..

Nel cuore sono presenti quattro valvole, il cui compito è quello di convogliare il flusso sanguigno in un'unica direzione durante la contrazione (sistole) ed il rilassamento delle camere cardiache (diastole), impedendone il reflusso. Le valvole cardiache sono costituite da lembi sottili, flessibili e molto resistenti, di tessuto fibroso rivestito di endotelio, saldamente ancorate agli anelli valvolari. Le valvole cardiache si suddividono in due tipologie: le valvole atrioventricolari e le valvole semilunari. Le valvole atrioventricolari, costituite rispettivamente da tre e due cuspidi, comprendono la *valvola tricuspide*, posta tra l'atrio destro ed il ventricolo destro, e la *valvola mitrale*, tra l'atrio sinistro ed il ventricolo sinistro. Le valvole che regolano il flusso sanguigno tra ventricoli e arterie presentano, invece, tre lembi a forma di nido di rondine: la *valvola polmonare*, tra ventricolo destro e arteria polmonare, e la *valvola aortica*, tra ventricolo sinistro ed aorta. In Figura 1.1 è riportata la struttura interna del cuore, in cui è possibile vedere le quattro valvole: *tricuspide*, *mitrale*, *aortica* e *polmonare*.

E' possibile che una o più valvole del cuore non funzionino come dovrebbero; questo può essere dovuto a diverse cause. Una valvola può essere strutturalmente anormale fin dalla

nascita, e necessitare di riparazione immediata nel caso in cui la malformazione sia grave. Un difetto valvolare minore invece può non essere riconosciuto per molto tempo, con un decorso lentamente evolutivo, con una fase di completa asintomaticità che può durare anche anni, ma può infine provocare nella valvola un indebolimento tale da richiedere la sostituzione o riparazione della valvola. Malattie come la febbre reumatica, o infezioni batteriche possono colpire le valvole causando cicatrici o la distruzione totale delle valvole stesse (come ad esempio nell'endocardite batterica acuta). Il processo di invecchiamento di per sé, può causare l'indurimento e la calcificazione dei foglietti valvolari, o anche la loro rottura, a causa dell'enorme numero di volte che una valvola deve aprirsi e chiudersi durante il ciclo vitale. Infatti, il cuore batte circa 100.000 volte al giorno, e quindi le valvole si devono aprire, richiudere e resistere alla pressione del sangue alcune centinaia di milioni di volte durante la vita di ogni persona. Le valvole aortica e mitralica sono le più frequentemente colpite dai processi degenerativi, mentre la valvola tricuspide può essere danneggiata da un anormale aumento di pressione causato dalla disfunzione di altre valvole. Più raramente, anche la valvola polmonare può degenerare, anche se in genere questo accade in conseguenza di una anomalia già presente alla nascita. Quando una valvola si inspessisce ed indurisce a causa di qualche malattia, la valvola cessa di aprirsi in modo corretto ed il sangue fatica a passare. Questo fenomeno prende il nome di *stenosi*. Quando invece una valvola si indebolisce ed i suoi foglietti vengono stirati, potrebbe non chiudersi più correttamente ed il sangue che l'ha attraversata tende a ritornare indietro. Questo fenomeno viene definito *insufficienza* o *rigurgito* valvolare. Molto spesso, stenosi e insufficienza coesistono, in diversa entità, sulla stessa valvola, causando la *stenoinsufficienza*. Tutti i tipi di disfunzione valvolare aumentano di molto il carico lavorativo del cuore, che tende a dilatarsi per compensare. Quando il cuore non riesce più a funzionare correttamente subentra lo scompenso cardiaco, ed infine un danno irreversibile al muscolo cardiaco.

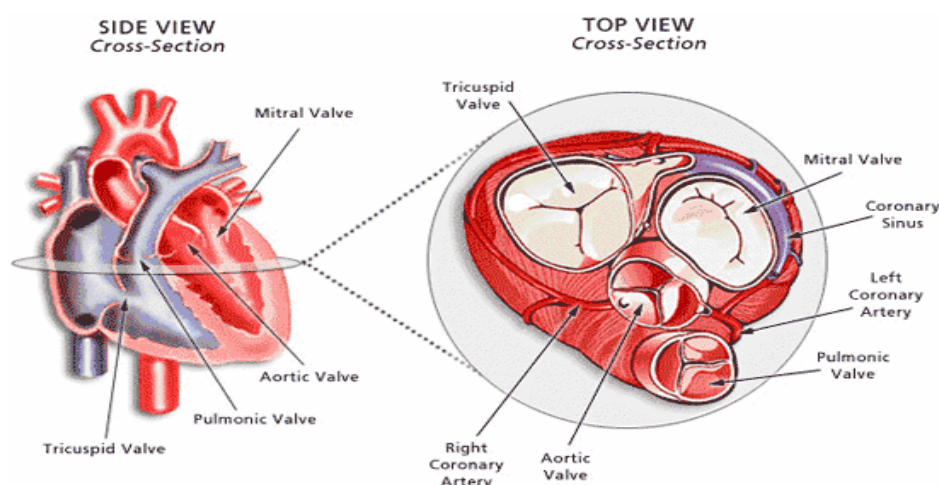


Figura 1.1 Struttura interna del cuore nella quale sono visibili le quattro valvole: tricuspidale, mitrale, aortica e polmonare.

Le malattie che colpiscono le valvole cardiache si definiscono *valvulopatie*, ed il loro trattamento risolutivo è generalmente chirurgico. La terapia medica ha, infatti, solo il compito di rallentarne la progressione e controllare i sintomi, in modo tale che il paziente possa arrivare all'intervento chirurgico nelle migliori condizioni di stabilità clinica.

Quando una valvola è talmente danneggiata da non essere riparabile, è necessario sostituirla. La vecchia valvola viene quindi rimossa e la nuova valvola artificiale viene saldamente ancorata al suo posto. Vi sono diversi tipi di protesi valvolari a disposizione del chirurgo, anche se principalmente tutte possono essere classificate in due grandi categorie: le valvole biologiche (fatte di tessuti naturali) e le valvole meccaniche (fatte di materiali artificiali).

Le protesi valvolari vengono utilizzate da oltre 40 anni, e differiscono tra loro per diverse caratteristiche: il profilo emodinamico, la durata, l'effettiva area orificiale e la trombogenicità. Nel mondo il numero di protesi impiantate è intorno a 250.000 all'anno, con un incremento annuale del 5-7%. Questa statistica evidenzia l'importanza che attualmente è associata alla ricerca di tecniche sempre più innovative nell'ambito dei sostituti valvolari e delle metodologie di intervento; lo scopo è migliorare il decorso post-operatorio ed eliminare la necessità di ulteriori operazioni chirurgiche dovute alla limitata durata delle protesi attuali.

1.1.1 Protesi valvolari meccaniche

Le valvole meccaniche, con rare eccezioni, hanno una durata media tra i 20 e i 30 anni, che le rende momentaneamente le protesi la cui funzionalità viene meno deteriorata nel tempo. Per questo motivo sono le più utilizzate nei pazienti giovani o con un'aspettativa di vita superiore ai 10-15 anni.

Le protesi valvolari meccaniche sono formate principalmente da metallo rivestito di carbonio pirolitico (materiale sintetico ritenuto meno trombogenico). Essendo quindi costituite da materiali sintetici, sono inevitabilmente trombogeniche e quindi il loro utilizzo richiede che il paziente segua una terapia anticoagulante a vita.

Il maggiore svantaggio di questo tipo di protesi è quindi dovuto all'alto potenziale di rischio di tromboembolismo, eventi emorragici ed infezioni; inoltre è molto difficile ottenere una valvola meccanica che riproduca fedelmente la forma di una valvola nativa.

Le valvole meccaniche hanno tutte una struttura di base simile formata da 3 costituenti essenziali:

1. *Occluder*: generalmente formato da una o più parti rigide e mobili, ad esempio: una palla (nelle protesi *Starr-Edwards*), un disco (nelle protesi *Bjork-Shiley*) o un "hinged leaflet" circolare o semicircolare (nelle protesi *Medtronic-Hall*, o *St. Jude Medical*). Deve essere in grado di aprirsi e chiudersi senza interferire con il flusso ematico e di adattarsi alle differenze di pressione;
2. *Housing*: in cui è inserito l'occluder;

3. *Sewing ring*: è la base o il corpo della protesi. È formato da un anello di sutura in metallo o in graffite rivestito con carbone pirolitico. Rappresenta il punto di congiunzione della protesi con i tessuti del ricevente.

Le protesi valvolari meccaniche si aprono e chiudono grazie ad un movimento passivo, che dipende dal gradiente pressorio e dai cambiamenti del flusso ematico.

In Figura 1.2 sono riportati alcuni dei modelli più importanti di valvole meccaniche.

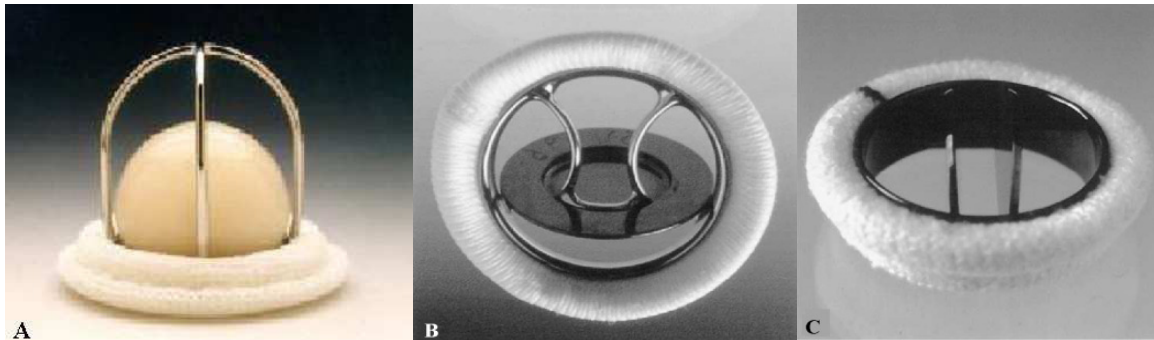


Figura 1.2 Modelli di valvole cardiache meccaniche: A) caged-ball (Starr-Edwards); B) single-tilting-disk (Medtronic-Hall); C) bileaflet-tilting-disk (St. Jude Medical) [1].

Attualmente il 90% delle valvole meccaniche impiantate è del modello a doppio disco o *bileaflet* che permette un profilo emodinamico più simile a quello fisiologico [1].

1.1.2 Protesi valvolari biologiche

Una valvola biologica, al contrario di quella meccanica, ha il vantaggio di essere morfologicamente molto simile a quella nativa, e presenta un basso potenziale trombogenico che non richiede quindi una terapia anticoagulante a lungo termine.

Il principale svantaggio di questo tipo di protesi consiste nel fatto che la loro durata nel tempo è limitata, ed inversamente proporzionale all'età del ricevente. In un paziente giovane (con età inferiore ai 40 anni), le valvole biologiche hanno una durata massima di 8-10 anni, mentre per un anziano possono durare fino a 15 anni. Questo è dovuto al differente metabolismo del calcio che per un soggetto giovane è più attivo, e tende quindi a depositarsi sui foglietti valvolari causandone l'indurimento.

Un altro grande svantaggio è legato alla possibilità di rigetto della protesi per effetto dell'azione del sistema immunitario del ricevente. Queste valvole necessitano quindi di un trattamento di decellularizzazione per eliminare dalla matrice extra-cellulare tutte le cellule del donatore. Questo trattamento modifica però le caratteristiche funzionali della matrice, riducendone, in particolare, le proprietà meccaniche. Per ovviare a quest'ultimo problema, le valvole vengono trattate con glutaraldeide, per produrre delle reticolazioni stabili sulla matrice ed incrementare nuovamente le proprietà meccaniche. Nonostante la glutaraldeide

venga allontanata con alcuni lavaggi nella matrice possono rimanere tracce di questo agente chimico, il cui lento rilascio può causare gravi problemi: citotossicità, risposta infiammatoria, calcificazione; inoltre impedisce la ripopolazione della matrice da parte delle cellule del ricevente, infatti, queste valvole non sono “vitali”.

1.1.2.1 Autografts, Homografts e Xenografts

Le protesi valvolari biologiche si possono classificare in base al tessuto biologico di cui sono costituite:

- *Autografts*: valvola cardiaca prelevata dal paziente stesso;
- *Homografts* (o *allografts*): valvola cardiaca umana rimossa post mortem;
- *Heterografts* (o *xenografts*): valvola cardiaca prelevata da specie non umane (porcine o bovine).

Gli interventi con *autografts* prevedono l’espianto della valvola polmonare del paziente (autologa) che viene impiegata per sostituire la valvola aortica (soggetta a maggiori stress meccanici), mentre in luogo della valvola polmonare viene posizionato un *homograft* (procedimento di Ross, in Figura 1.3).

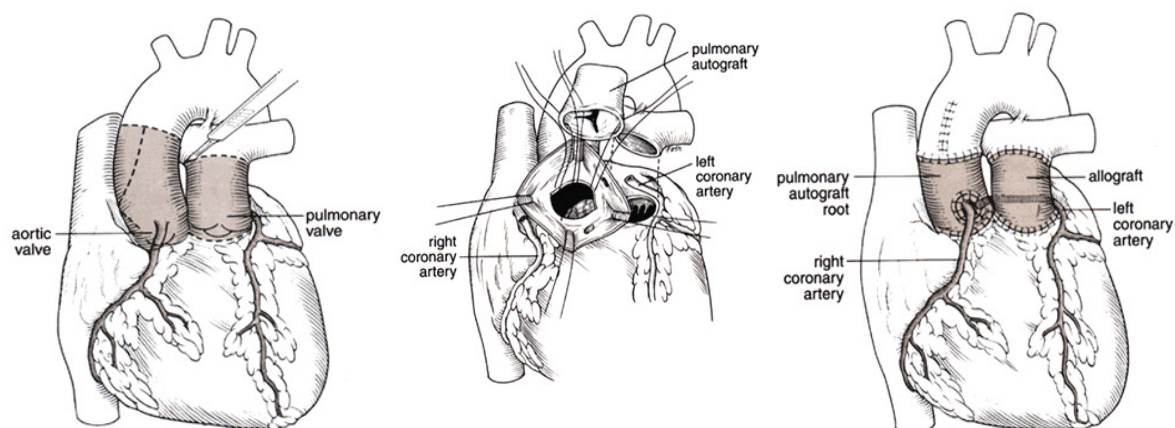


Figura 1.3 Procedura di Ross: fasi principali dell’intervento.

Questa procedura venne introdotta circa 40 anni fa, ed è stata utilizzata in un numero ridotto di individui, di giovane età e selezionati. Sono stati ottenuti degli ottimi risultati nell’applicazione di questo tipo di intervento in bambini e neonati, superiori ai risultati ottenuti con l’impiego di altre protesi aortiche. Le prestazioni emodinamiche si sono rivelate eccellenti; gli eventi tromboembolici sono rari, tanto che la terapia anticoagulante non è necessaria; il rischio di endocardite è basso. Inoltre, è stato dimostrato che nei bambini e negli adolescenti, l'*autograft* cresce assieme al paziente. I soggetti cui è stato inserito l'*autograft* polmonare non hanno avuto bisogno di reintervento, a distanza di 10 anni dall’operazione, nel 93% dei casi, ma hanno presentato un’alta incidenza di stenosi dell'*homograft* in posizione

polmonare, dovuta probabilmente a una possibile reazione infiammatoria post-operatoria. Il reintervento sull'*homograft* polmonare può essere necessario nel 20% dei pazienti, a 20 anni dal primo intervento [2].

A causa della complessità tecnica e delle potenziali insidie, nonostante le prestazioni ragguardevoli, l'uso di questa procedura rimane limitato.

Un *homograft* (o *allograft*) è una valvola cardiaca umana prelevata o da cadavere o da donatore vivente (deceduto di morte cerebrale o che ha subito un trapianto cardiaco).

Nel caso in cui l'*homograft* sia espantato da cadavere (Figura 1.4), questo viene sterilizzato con antibiotici, sottoposto a crio-preservazione in azoto liquido e conservato a -196°C fino all'intervento (anche per lunghi periodi di tempo) [3]. Nel caso di valvole prelevate da donatore vivente, la conservazione avviene a 4°C in un mezzo di cultura con penicillina, e vengono impiantate nel ricevente in tempi molto brevi, generalmente inferiori alle 48 ore.



Figura 1.4 *Homograft aortico prelevato da cadavere.*

Questo tipo di valvole ha caratteristiche di flusso eccellenti ed un'incidenza estremamente bassa di complicazioni tromboemboliche ed endocarditi post-operatorie. L'assenza di degenerazione in tali protesi è del 95% dopo 10 anni dall'intervento, e dell'80% dopo 15, mentre sembra che il processo di degenerazione tessutale acceleri dopo i 15 anni, comportando la necessità di un ulteriore intervento chirurgico. Le cause di questa degenerazione sono tuttora in fase di studio, ma sembrano essere complesse e multifattoriali [4]. Gli svantaggi di questo tipo di protesi sono: la limitata disponibilità, l'alto costo di approvvigionamento e trattamento, e le maggiori richieste tecniche di inserimento rispetto a quelle di altri tipi di protesi.

Le valvole biologiche più comunemente impiantate sono rappresentate dagli *heterografts* fissati con glutaraldeide. Queste bioprotesi si suddividono in porcine o pericardiche. Possono essere ottenute applicando il tessuto biologico su di un supporto (*stent*), che ha il compito di sostenere il tessuto mantenendo la struttura tridimensionale e di consentire un'applicazione più semplice al cuore. In generale, presentano flusso centrale, caratteristiche emodinamiche

buone e hanno il pregio di non provocare alcun fastidioso rumore come può accadere per alcune valvole meccaniche. Il rischio di complicazioni tromboemboliche è basso, ma vi è lo svantaggio del deterioramento del tessuto valvolare. Si è riscontrato che il rischio di cedimento del tessuto cresce con il passare degli anni. La presenza dello *stent* può inoltre causare una maggiore frizione e turbolenza del flusso ematico all'interno della valvola, compromettendone la durevolezza e provocando stenosi residue e calcificazione. Per questi motivi sono state progettate le valvole porcine *stent-less*. In quest'ultime protesi, sono stati eliminati sia il *sewing-ring* che lo *stent*. Questi accorgimenti hanno portato un miglioramento delle caratteristiche emodinamiche grazie ad un migliore e più libero scorrimento del sangue. L'impianto di queste valvole, d'altra parte, richiede una tecnica chirurgica più complessa rispetto alle valvole dotate di *stent* ed anello di sutura [5]. La mortalità precoce è del 5%, ed è confrontabile con quella delle valvole *stented*, ma le percentuali dei reinterventi, di eventi tromboembolici ed endocarditi sono attualmente inferiori. Infine, anche la sopravvivenza negli anni immediatamente successivi all'intervento è superiore rispetto a quella dei pazienti con valvole *stented* [6].

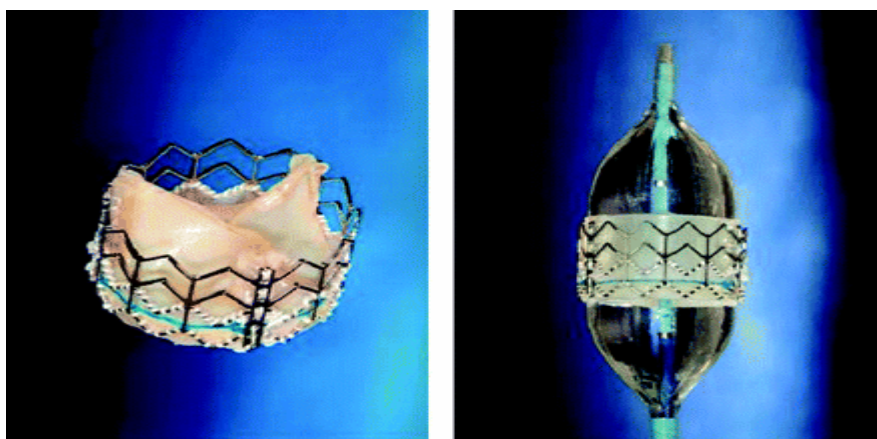
Le valvole *xenografts* pericardiche sono costituite generalmente di tessuto bovino, materiale particolarmente adatto alla produzione di *leaflet valves*, grazie alle sue caratteristiche fisiche. I lembi di pericardio sono suturati esternamente ad un supporto valvolare, determinando un lume valvolare più ampio di quello delle protesi porcine. Il tessuto viene sottoposto ad un processo di sterilizzazione per rimuovere i marker biologici ed eliminare la risposta immunitaria da parte dell'organismo ricevente. Durante il fissaggio con glutaraldeide il pericardio viene deformato in modo che si ottenga la geometria finale. Le caratteristiche emodinamiche di queste protesi sono migliori di quelle delle valvole porcine, ed uno studio comparativo, a distanza di 10 anni dall'operazione di sostituzione della valvola mitralica, ha dimostrato chiaramente una superiore durabilità degli heterografts in pericardio bovino rispetto a quelli porcini [7]. Inoltre, le protesi in pericardio hanno la possibilità di essere costruite con un ampio range di diametri poiché non sono vincolate alle dimensioni originarie della valvola, a differenza di quelle porcine.

1.1.3 Protesi valvolari percutanee

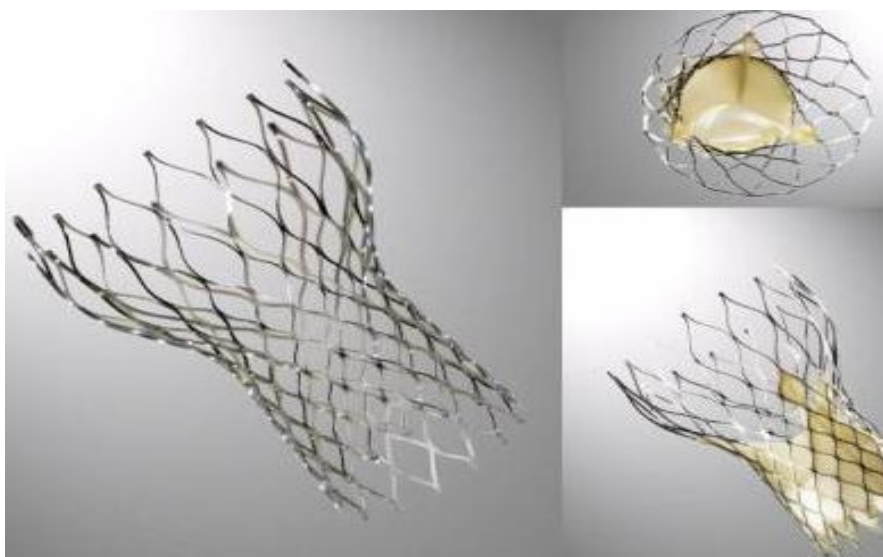
L'invecchiamento della popolazione, con l'aspettativa di vita ormai superiore agli 80 anni, ed il miglioramento delle tecnologie e opzioni mediche e chirurgiche, ha aumentato notevolmente il numero di pazienti anziani con patologie valvolari degenerative che necessiterebbero di un intervento riparativo o sostitutivo, ma il cui rischio operatorio è troppo elevato. Attualmente l'offerta di nuove tecniche mini-invasive e percutanee di riparazione valvolare è cresciuta esponenzialmente determinando così l'inizio di una nuova era nel trattamento delle patologie valvolari.

Tutte e quattro le valvole possono essere potenzialmente trattate attraverso un impianto valvolare trans-catetere, ma l'uso maggiore di questa tecnica è associato alle disfunzioni della valvola aortica.

Le valvole aortiche per impianto percutaneo al momento disponibili favoriscono l'uso di materiali biologici (il materiale di elezione è il pericardio animale) e designs *trileaflet*. I tre lembi valvolari sono cuciti o fissati ad uno *stent* circolare, montato su di un catetere per il rilascio, che può essere generalmente di due tipi: *balloon-expanding* o *self-expanding* (Figura 1.5).



a)



b)

Figura 1.5 a) *Cribier-Edwards valve*, impiantata tramite meccanismo *balloon-expanding*
b) *Medtronic CoreValve*, impiantata secondo il meccanismo di rilascio *self-expanding*.

Le valvole percutanee possono essere impiantate in modo differente, in base al tipo di *stent* che le supporta: nel caso di meccanismo *balloon-expanding*, il deposito avviene tramite l'espansione del palloncino che si trova sul catetere, nel caso di *self-expanding*, invece, tramite il ritiro dell'introduttore che guida il dispositivo in posizione e l'auto-espansione dello *stent*. In entrambi i casi non è prevista la rimozione della valvola aortica nativa, che viene invece utilizzata come base sulla quale inserire e "fissare" la protesi biologica [8]. Indipendentemente dalla metodologia di rilascio utilizzata, la procedura prevede una iniziale valvuloplastica aortica con pallone, per fornire un passaggio allargato per l'inserimento di un dispositivo valvolare di diametro maggiore [9].

Esistono tre modalità di approccio percutaneo alla valvola aortica: l'approccio anterogrado trans-settale, l'approccio retrogrado e l'approccio trans-apicale (Figura 1.6)

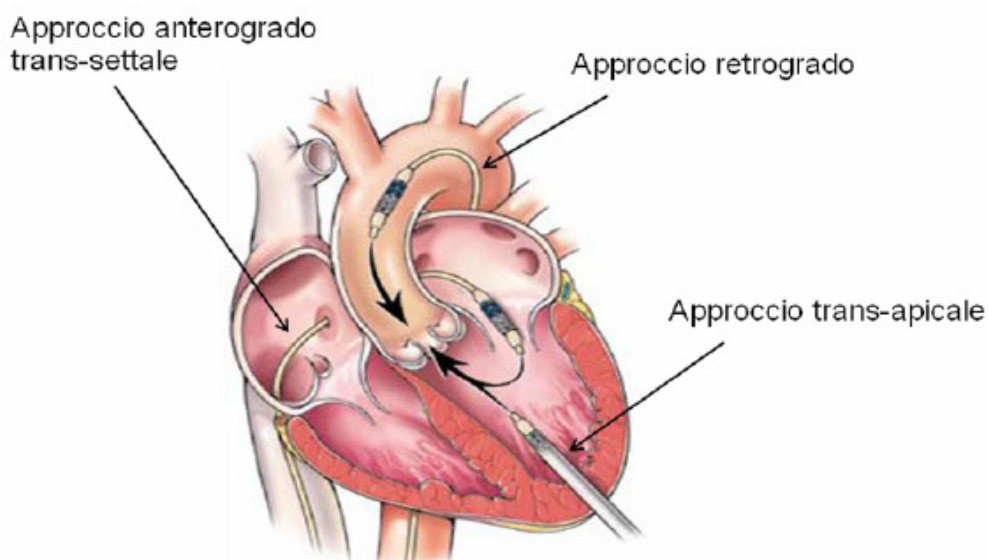


Figura 1.6 Schematizzazione dei tre possibili approcci per la sostituzione percutanea della valvola aortica.

L'approccio anterogrado è così denominato perché il catetere su cui è montata la valvola è diretto al cuore attraverso il sistema venoso, quindi segue il verso del flusso sanguigno. Questo approccio prevede l'inserimento della valvola attraverso la vena femorale mediante un introduttore e, successivamente, l'esecuzione di una puntura trans-settale, il passaggio della protesi mediante l'utilizzo di una guida di supporto rigida, nell'atrio di sinistra, attraverso la valvola mitralica, e infine attraverso quella stenotica nativa, con l'esternalizzazione finale della guida dall'arteria femorale controlaterale. La puntura trans-settale costituisce uno svantaggio, con possibili danni permanenti o temporanei della valvola mitrale che deve essere attraversata dal catetere, inoltre la metodologia è piuttosto complessa, ed è stata quasi del tutto abbandonata.

L'approccio considerato attualmente di prima scelta per la maggior parte dei pazienti è l'approccio retrogrado, così denominato poiché il catetere viene spinto fino al cuore attraverso il sistema arterioso, in verso opposto a quello del flusso sanguigno. Questa tecnica prevede l'inserimento di introduttori di calibro crescente nell'arteria femorale, o, in alternativa, nell'arteria succlavia o ascellare previo isolamento chirurgico delle stesse [10]. Questo approccio permette di evitare le complicanze funzionali o meccaniche sul lembo anteriore della valvola mitrale, inoltre non è necessaria una puntura trans-settale ed è tecnicamente più semplice. Lo svantaggio principale consiste nella possibilità di lesioni dei vasi aorto-femorali, e a potenziali danni della protesi nell'attraversamento dell'arco aortico e/o della valvola stenotica stessa [11].

L'approccio trans-apicale è riservato ai pazienti per i quali l'intervento retrogrado è controindicato; in questo caso si procede all'esposizione dell'apice cardiaco mediante minitoracotomia antero-laterale e si esegue un'incisione a livello dell'apice cardiaco; viene poi inserito un introduttore emostatico e successivamente introduttori di calibro crescente. La valvola è posizionata secondo l'approccio anterogrado, all'interno della valvola stenotica e, al termine della procedura, il ventricolo sinistro viene suturato chirurgicamente [10]. Il vantaggio principale è quello di garantire un accesso più diretto alla valvola aortica ed elimina il bisogno di accessi periferici di grandi dimensioni; lo svantaggio è collegato, invece, alla puntura apicale del ventricolo sinistro ed alla necessità di anestesia generale [11].

Nel 2009 è stato effettuato uno studio che ha avuto l'obiettivo di comparare le performance emodinamiche delle valvole percutanee con quelle delle valvole tradizionali utilizzate nell'intervento chirurgico standard [12]. I risultati di questo studio hanno mostrato che subito dopo l'intervento, la procedura percutanea era associata a più bassi gradienti transvalvolari e maggiori aree effettive dell'orifizio valvolare rispetto a quelli misurati a seguito dell'intervento chirurgico con valvole porcine sia *stent* che *stent-less*. I parametri emodinamici risultano inalterati a *follow-up* a termine intermedio, e si registra una persistente superiorità nelle prestazioni emodinamiche delle valvole percutanee anche in seguito. L'occorrenza di rigurgito aortico subito dopo l'intervento è però più presente a seguito dell'intervento percutaneo che con quello chirurgico.

Il trattamento percutaneo deve però superare evidenti ostacoli, a causa dei quali non è ancora possibile considerarlo un accettabile sostituto del trattamento chirurgico. La protesi percutanea dovrebbe, infatti, essere disponibile in misure diverse, avere un design biocompatibile, e non dovrebbe interferire con le strutture perivalvolari oltre che poter essere rilasciata attraverso cateteri dal lume inferiore. Allo stato attuale, i limiti principali dei dispositivi sono:

- limiti di accesso periferico;
- limiti di durata (per il momento non sono disponibili *follow-up* a lungo termine);
- difficoltà di posizionamento;

- rischio di migrazione della valvola che, a differenza delle altre tipologie protesiche, non viene suturata al tessuto naturale, ma solo posizionata in sede.

I metodi di impianto percutanei attualmente disponibili dovranno quindi essere valutati nell'arco dei prossimi anni, per valutarne la sicurezza, la fattibilità ed efficacia a distanza. Attualmente il campo di applicazione di questi dispositivi è limitato ai soggetti con rischio chirurgico molto elevato, e quindi etichettati come "inoperabili".

E' da sottolineare però il fatto che una procedura chirurgica molto meno invasiva, come quella offerta da questi sistemi, potrebbe determinare un cambiamento sostanziale nelle indicazioni al trattamento di alcune malattie valvolari.

1.2 Ingegneria tessutale

L'ingegneria tessutale, o *tessue engegneering*, consiste in una serie di tecniche che permettono, attraverso l'utilizzo combinato di materiali, cellule e segnali biochimici, la produzione di tessuti e forse, in un futuro non molto lontano, di interi organi.

Esistono due tipologie di approccio:

- *in vitro seeding*: è l'approccio tradizionale con bioreattore meccanico per simulare l'ambiente biologico;
- *tissue guided regeneration (in vivo)*: in questo approccio si utilizza come bioreattore direttamente il paziente, impiantando lo *scaffold* senza precedente semina cellulare in vitro.

Questa disciplina innovativa è stata definita da D. Williams in "*The Biomedical Engineering Handbook*" come: "*The application of scientific principles to the design, construction, modification, growth and maintenance of living tissue*".

Un tessuto ingegnerizzato è composto di tre costituenti fondamentali: una matrice, i fattori biochimici e le cellule del ricevente.

La matrice o *scaffold* può essere sia artificiale, come un biomateriale polimerico, sia di derivazione biologica.

I fattori biochimici sono proteine o, come più spesso capita, corte sequenze peptidiche che servono a guidare la crescita e lo sviluppo delle cellule sulla matrice.

L'utilizzo di cellule del ricevente per la semina su *scaffold* comporta uno dei vantaggi più importanti di questa tecnica: infatti, in questo modo il paziente diventa "donatore di se stesso" ed il tessuto ingegnerizzato, una volta impiantato non avrà problemi legati alla risposta immunitaria e sarà quasi del tutto simile a quello nativo. Altro fondamentale vantaggio dell'ingegneria tessutale è quello di permettere la creazione di tessuti viventi e che quindi hanno la facoltà di crescere con l'organismo del ricevente in modo congruente ed armonico, cosa di fondamentale importanza nella cura di pazienti pediatrici.

L'ingegneria tessutale ha un grande *range* di applicazioni in ambito medico, ad esempio, è stata effettuata la sostituzione di una porzione di trachea con un costrutto ingegnerizzato, ottenuto in vitro con *scaffold* biologico da cadavere [13]; in questo caso la paziente è stata dimessa a dieci giorni dall'operazione, e non è stata necessaria alcuna terapia immunosoppressiva, inoltre, a distanza di quattro mesi, il tessuto innestato è risultato normalmente vascolarizzato. L'ingegneria tessutale è stata applicata anche nella ricostruzione in vitro della vescica [14] impiantata con successo in pazienti pediatriche.

In particolare, i principi e le tecniche dell'ingegneria tessutale offrono l'opportunità di ricostruire anche strutture valvolari cardiache viventi, ovviamente ogni fase della procedura di ricostruzione rappresenta un punto cruciale, dalla scelta dello *scaffold*, alla scelta della sorgente cellulare ed il metodo di condizionamento (per l'approccio in vitro) [15].

In definitiva, l'ingegneria tessutale è quindi un nuovo settore multidisciplinare delle biotecnologie che potrebbe rivoluzionare la medicina, consentendo di rigenerare gli organi e i tessuti malati invece di limitarsi semplicemente a ripararli. Lo sviluppo di questa biotecnologia innovativa apre la strada a nuove possibilità di cura, ad una migliore qualità della vita dei pazienti e, soprattutto, alla prospettiva di superare gradualmente il problema della cronica carenza di organi da trapiantare.

1.2.1 Valvole cardiache ingegnerizzate

Attualmente la terapia elettiva per le valvulopatie è l'intervento chirurgico di sostituzione valvolare con protesi meccaniche o biologiche, non vitali ed incapaci di crescere, riparare e rimodellarsi. Questo è un limite importante soprattutto nei pazienti pediatriche. L'1% dei neonati presenta un difetto congenito, che richiede un intervento chirurgico a cuore aperto, compresa la sostituzione valvolare aortica. Questi pazienti necessitano pertanto di ripetuti interventi per sostituire il *device* stenotico con uno di diametro maggiore, data l'incapacità della protesi di crescere con il paziente: questo comporta un incremento esponenziale della mortalità e morbilità operatoria [16]. Molto interessante è anche l'applicazione dell'ingegneria tessutale alle valvole percutanee, per renderle più simili alla valvola nativa ed aumentare la durata rispetto a quelle fissate con glutaraldeide.

L'ingegneria tessutale cerca di raggiungere l'obiettivo di creare un sostituto valvolare innovativo, privo dei limiti delle precedenti protesi, in modo da poter rendere la sostituzione valvolare una procedura definitivamente risolutiva, senza necessità di successivi interventi.

Le tecniche dell'ingegneria tessutale in vitro prevedono i seguenti fondamentali passaggi [15]:

1. costruzione del supporto o *scaffold* su cui far crescere le cellule;
2. prelievo delle cellule dal paziente e preparazione della coltura cellulare per la semina su supporto;
3. semina delle cellule ed incubazione in bioreattore;

4. intervento chirurgico di sostituzione valvolare con la valvola ingegnerizzata.

In Figura 1.7 è riportata schematicamente la procedura per la costruzione di una valvola ingegnerizzata applicata a paziente pediatrico. Nel caso di ingegnerizzazione tessutale in vivo di valvola cardiaca, lo *scaffold* viene impiantato nel paziente senza preconditionamento e risemina cellulare in bioreattore.

Il successo delle protesi valvolari ingegnerizzate dipende, quindi, fundamentalmente da 3 fattori [17]:

1. lo *scaffold*: che determina la forma tridimensionale e serve come iniziale struttura guida per l'adesione cellulare e lo sviluppo tissutale, e che dopo l'impianto dovrebbe essere riassorbito e/o rimodellato;
2. il tipo di *cellule* che vanno a ripopolare lo *scaffold* e che generano un tessuto vitale;
3. le condizioni della *coltura in vitro* del costrutto vitale, prima dell'impianto nel ricevente.

Il terzo punto potrebbe non essere presente, nel momento in cui lo *scaffold* venga direttamente impiantato nel ricevente senza precedente semina cellulare *in vitro*, anche se fin'ora quest'ultima strada ha portato a risultati meno promettenti dell'impianto di matrici riseminate e preconditionate *in vitro*.

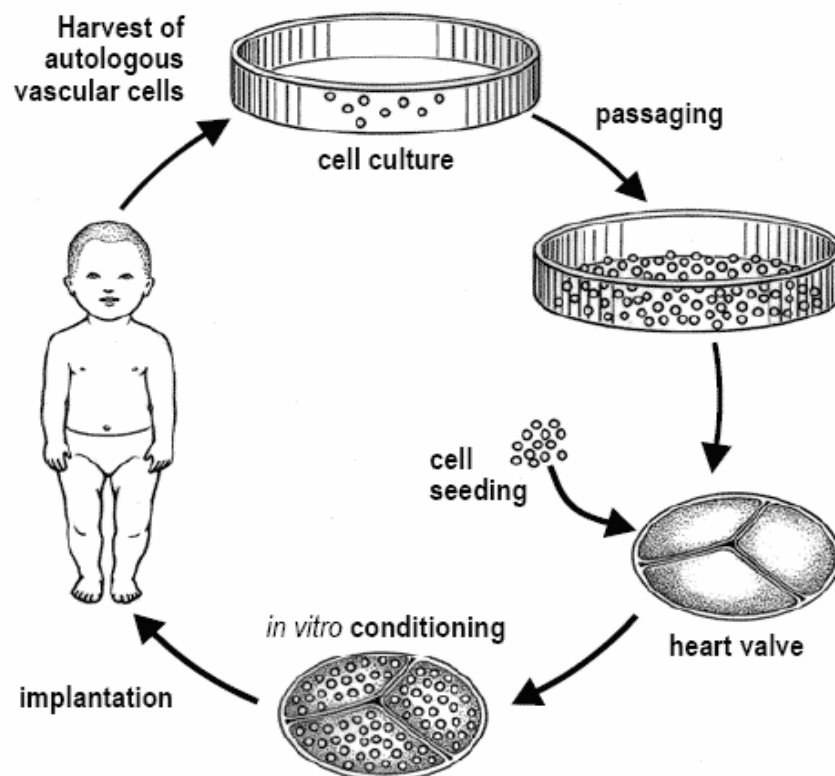


Figura 1.7 Schematizzazione della procedura di costruzione di una valvola cardiaca ingegnerizzata per paziente pediatrico. In questo caso la valvola viene preconditionata con coltura cellulare *in vitro*.

Nel 1962 furono postulate da un pioniere della cardiocirurgia, Dr. Dwight Harken [18] le caratteristiche essenziali di una protesi ideale, che furono poi estese alle valvole ingegnerizzate:

1. la valvola ingegnerizzata deve avere proprietà meccaniche e *performance* emodinamica comparabile a quella della valvola nativa;
2. deve essere costituita di un tessuto vitale: capace di sostenere l'adesione, la proliferazione e la differenziazione delle cellule del paziente;
3. deve essere capace di rimodellamento, per consentire la riparazione dei danni strutturali;
4. deve adattarsi alla crescita somatica del paziente ricevente;
5. deve poter resistere alle infezioni;
6. non deve andare incontro a calcificazione e degenerazione, in modo da durare per tutta la vita del paziente;
7. non deve scatenare reazioni infiammatorie o immunologiche;
8. non deve essere trombogena;
9. deve essere disponibile commercialmente.

La ricerca si sta muovendo proprio per trovare delle tecniche innovative in grado di dare vita ad un costrutto in grado di avere eccellenti riscontri per ciascuna delle caratteristiche sopra riportate.

1.2.2 Tipologie di scaffolds per valvole cardiache ingegnerizzate

Gli *scaffold* utilizzati dall'ingegneria tessutale sono di tre tipi:

- *sintetici*;
- *biologici*;
- *ibridi*.

Gli *scaffolds* di tipo sintetico sono costituiti di biopolimeri biodegradabili e biorisorbibili che, terminata la fase di crescita tessutale in vitro, ed innestati in vivo, lasciano spazio all'ulteriore crescita di tessuto. I primi materiali utilizzati per la costruzione di supporti sintetici sono stati l'acido poliglicolico (PGA), l'acido polilattico (PLA) ed i loro copolimeri, ma vi è una continua ricerca di nuovi materiali e combinazioni di materiali per migliorare le caratteristiche di lavorabilità e di supporto. Infatti, oggi il PGA e il PLA sono stati abbandonati perché troppo rigidi e non adatti alla crescita cellulare in vitro [19], e sono stati sostituiti con materiali come il poliidrossialcanoato (PHA) e il poli-4-idrossibutirato (P4HB). La combinazione di PGA, non intrecciato, e di P4HB, di rivestimento, conferisce allo *scaffold* termo-plasticità e consente di modellarlo in complesse forme tridimensionali, come una valvola cardiaca a 3 lembi. Il PHA, infine, è un polimero termoplastico che deriva da un batterio. È un materiale flessibile ma richiede uno speciale processo di lisciviazione salina per ottenere una porosità accettabile per la semina cellulare

[20]. Il vantaggio dei supporti sintetici è rappresentato dalla possibilità di variarne non solo le caratteristiche di biodegradabilità, biorisorbibilità ma anche le caratteristiche biomeccaniche, agendo sulla composizione chimica e sulla lavorazione. Inoltre possono essere funzionalizzati con specifici segnali molecolari in grado di migliorare ed incrementare adesione e proliferazione cellulare [15], e presentano minore tendenza ad evocare risposte immunogene. Gli svantaggi principali consistono nella difficoltà della costruzione del supporto nella forma tridimensionale corretta che sia stabile, resistente e flessibile; inoltre i polimeri presentano un'elevata trombogenicità ed una scarsa adesione e proliferazione cellulare, e nella loro degradazione potrebbero generarsi sostanze tossiche per l'organismo.

Gli *scaffolds* biologici possono essere suddivisi in *scaffolds* di origine valvolare o non valvolare.

I supporti biologici sono costituiti da matrice extracellulare umana (allogenica) o animale (eterogenica), hanno quindi una struttura che presenta naturali siti di adesione cellulare, e contengono intrinsecamente i fattori di crescita e l'informazione biologica, hanno più alte probabilità di scatenare risposta immunogenica anche se decellularizzati e fissati con glutaraldeide (che aumenta la potenziale calcificazione), ed inoltre presentano basse proprietà meccaniche. Gli *scaffolds* biologici hanno anche dimostrato una certa difficoltà di penetrazione cellulare nella matrice, con conseguente crescita tessutale incompleta [21]. Lo *scaffold* di origine valvolare, una volta decellularizzato, può essere impiantato direttamente nel ricevente, oppure può essere utilizzato come supporto per la crescita preliminare *in vitro* (in bioreattore) di cellule autologhe, e poi impiantato in vivo. L'approccio all'utilizzo di *scaffolds* decellularizzati è da preferirsi a quello di *scaffolds* artificiali, date le migliori prestazioni dei primi rispetto ai secondi. Inoltre, attualmente sembra che la strada più promettente sia quella dell'impianto di matrici riseminate e preconditionate *in vitro*, data la forte risposta immunogenica risultata dopo l'impianto di valvole decellularizzate e non riseminate che ha portato alla completa degenerazione dei tessuti e conseguente morte del paziente [22].

Un altro tipo di supporto di natura biologica è rappresentato dal pericardio, umano o eterogenico, decellularizzato. Questa matrice tridimensionale acellulare può essere utilizzata direttamente come *patch* chirurgico o per la costruzione di valvole ingegnerizzate o riseminato *in vitro* con cellule autologhe per produrre un costrutto tissutale vitale. Il pericardio ideale è quello di origine umana, poiché l'organismo ricevente lo riconosce come "self" e non attiva la risposta immunitaria, ma la disponibilità di pericardio umano è molto limitata, per cui attualmente il pericardio maggiormente utilizzato per la costruzione di valvole ingegnerizzate biologiche di origine non valvolare è il pericardio bovino (talvolta anche porcino o ovino).

Gli *scaffolds* ibridi si basano sull'idea di rivestire con un sottile strato di polimero biodegradabile una valvola porcina decellularizzata [23] per migliorarne le caratteristiche

meccaniche e biologiche. E' stato dimostrato che il tessuto ibrido viene rapidamente assimilato dall'organismo una volta che sia stato impiantato. Inoltre il rivestimento polimerico attenua l'attività pro-coagulativa delle componenti della matrice extracellulare. E' ancora materia di dibattito se queste protesi debbano o meno essere seminate in vitro prima dell'impianto, ma molti studi a lungo termine sono necessari prima di poter pensare all'applicazione clinica sull'uomo [15].

1.2.3 I biomateriali

I biomateriali rappresentano tutti quei materiali sia sintetici che naturali specificatamente progettati ed utilizzati in applicazioni biomediche come costituenti dei componenti protesici.

La storia dei biomateriali è riassunta in tre tappe fondamentali:

1. biomateriali di **1° generazione**: il materiale è *bioinerte*, ovvero di minimizza le interazioni chimico/fisiche tra organismo e materiale stesso.
2. biomateriali di **2° generazione**: il materiale è *bioattivo*, si integra velocemente con l'organismo provocando azioni e reazioni controllate nell'ambiente fisiologico, o *riassorbibile*, viene gradualmente degradato nell'organismo senza causare problemi di rigetto o tossicità.
3. biomateriali di **3° generazione**: il materiale è sia *bioattivo* che *riassorbibile*; quest'ultimi materiali rappresentano il presente ed il futuro dei biomateriali.

I biomateriali di terza generazione sono anche definiti materiali *biomimetici*, in quanto interagiscono con i tessuti adiacenti attraverso meccanismi di riconoscimento biomolecolare [15].

Per migliorare le prestazioni di qualunque biomateriale, permettendogli di stabilire interazioni vantaggiose con l'ambiente biologico, si ricorre alla funzionalizzazione biochimica: applicando alla superficie delle molecole organiche (come le sequenze adesive o i fattori di crescita) in grado di "colloquiare" con le cellule del tessuto ospite.

Le proteine o piccole sequenze peptidiche possono essere veicolate all'interfaccia tra ambiente biologico e materiale in differenti modi (Figura 1.8):

1. attraverso adsorbimento superficiale delle molecole biologicamente attive;
2. includendo le biomolecole all'interno di un vettore riassorbibile o *carrier* (generalmente un materiale polimerico) impiegato come rivestimento superficiale dello *scaffold*. Il rilascio delle biomolecole avviene nel tempo durante la degradazione del *carrier*;
3. ancorando le molecole alla superficie attraverso un legame covalente.

Le molecole possono essere ancorate direttamente o attraverso l'introduzione di una molecola con funzione di spaziatore (o *spacer*), che permette di esporre meglio la biomolecola alle cellule conferendo maggiori gradi di libertà orientazionale [24].

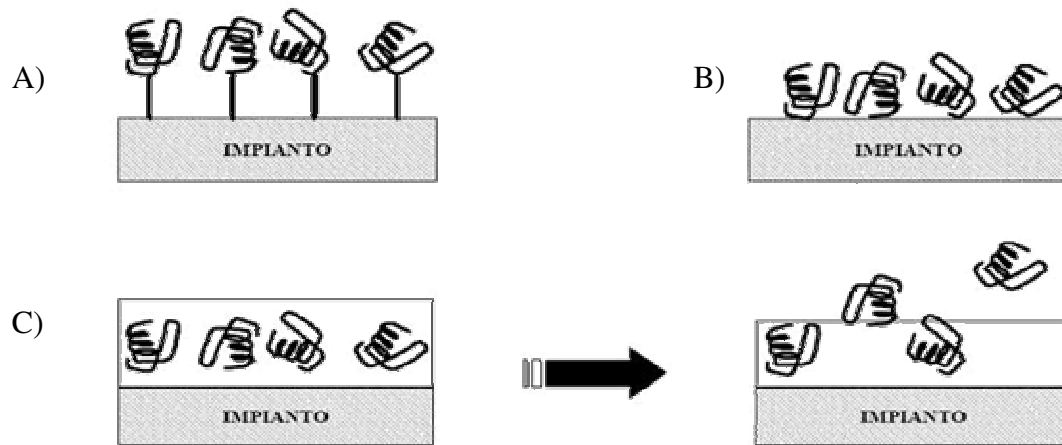


Figura 1.8 Ancoraggio mediante legame covalente con spacer (A), per adsorbimento (B) e rilascio da carrier di una proteina (C).

Facendo ricorso a tecniche di immobilizzazione covalente specifica (Figura 1.9), grazie alle quali si inducono tutte le molecole a legarsi alla superficie utilizzando il medesimo gruppo funzionale, si può ovviare all'inconveniente determinato dal fatto che, in assenza di specifici accorgimenti, peptidi e proteine si legano ai gruppi funzionali della superficie in modo del tutto casuale, provocando una orientazione non uniforme delle biomolecole in superficie, che potrebbero quindi esporre o meno il sito di legame verso i recettori cellulari.

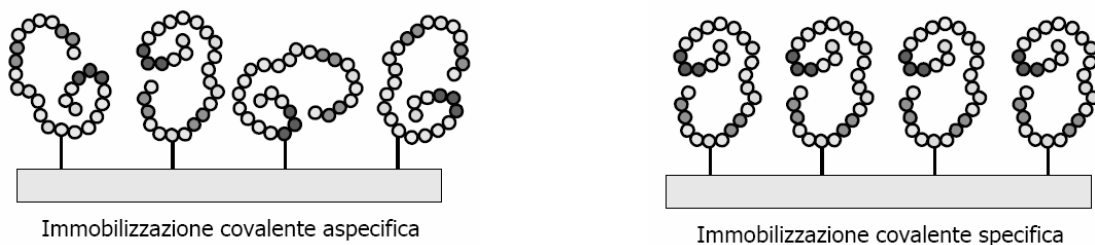


Figura 1.9 Immobilizzazione covalente aspecifica e specifica

In questo modo si possono ottenere *scaffold* funzionalizzati con biomolecole con orientazione uniforme, e che espongono tutti quindi il sito di legame desiderato verso i recettori cellulari.

L'obiettivo principale in applicazione all'ingegneria tessutale è quello di creare un'impalcatura tridimensionale capace di guidare la crescita e l'organizzazione di cellule derivate da donatore e seminate su impianti acellulari, in modo da ricreare un tessuto vitale *in vitro e/o in vivo* [25].

I biomateriali usati nell'ingegneria dei tessuti sono classificati in base a diversi criteri: il materiale di partenza, le proprietà di degradazione, le proprietà meccaniche e gli aspetti chimico-strutturali. Secondo quest'ultimo criterio, per esempio, i biomateriali possono essere suddivisi in 5 categorie: i metalli, i polimeri, le ceramiche, i compositi e i materiali biologici. Tra i materiali biologici, trova applicazioni sempre più vaste il pericardio [26].

1.2.3.1 Utilizzo del pericardio come biomateriale

Il tessuto pericardico (bovino, porcino, ovino, equino e umano) è utilizzato ampiamente sia in ambito chirurgico che sperimentale.

Alcuni degli ambiti nei quali si utilizza il pericardio sono: la neurochirurgia, la tracheoplastica, la chirurgia maxillo-facciale, la chirurgia oftalmica, ecc. L'ambito in cui è maggiormente utilizzato è però quello cardiocirurgico. Il pericardio bovino è il materiale di eccellenza per la costruzione dei lembi valvolari di bioprotesi valvolari cardiache (tradizionali e percutanee). Tali valvole biologiche sono costruite *ex-novo* utilizzando alcune porzioni di pericardio scelte e selezionate da zone specifiche del tessuto intero. Queste zone devono presentare un alto grado di uniformità di orientamento e distribuzione delle fibre di collagene e uno spessore tissutale costante [27].

Il pericardio è stato considerato a lungo un materiale di qualità inferiore rispetto ai lembi valvolari porcini per la costruzione delle bioprotesi, tuttavia, le protesi in pericardio bovino hanno dimostrato una maggiore apertura dei lembi, più completa e simmetrica, con conseguenti vantaggi emodinamici. Inoltre, la maggiore percentuale di collagene presente nel tessuto pericardico, comporterebbe una maggiore durata della valvola stessa [28].

Nella parte sperimentale di questa tesi sono stati utilizzati come biomateriali sia il pericardio bovino che quello porcino. Da entrambi gli animali sono stati prelevati, a scopo di studio, alcuni campioni da zone differenti del pericardio decellularizzato: in base alla zona di appartenenza variano, infatti le caratteristiche fisiche del tessuto.

Dopo decellularizzazione, infatti, la zona del pericardio bovino del ventricolo anteriore sinistro (VAS) presenta un orientamento più definito delle fibre collagene, mentre il ventricolo posteriore destro (VPD) quella con andamento più eterogeneo delle fibre collagene. Infine, il ventricolo anteriore destro e il ventricolo posteriore sinistro conservano dopo la decellularizzazione un andamento delle fibre collagene intermedio a quello delle due aree precedenti [26].

Per il pericardio porcino invece, dopo decellularizzazione, il ventricolo anteriore destro (VAD) presenta l'area con orientamento più regolare delle fibre collagene, come nel tessuto

nativo, mentre, il ventricolo posteriore destro (VPD) ha un orientamento meno omogeneo delle fibre collagene [26].

Lo svantaggio presentato dall'utilizzo di *scaffolds* in pericardio è il trattamento con glutaraldeide post-decellularizzazione, che promuove il processo di calcificazione dei lembi pericardici, decrementando la durata stessa della protesi. Dato questo limite dell'attuale impianto chirurgico di protesi xenogeniche, sono state adottate tecniche di ingegneria tessutale con lo scopo di produrre *scaffolds* acellulari, evitando l'effetto citotossico della fissazione in glutaraldeide e consentendone un eventuale ripopolamento *in vitro* o *in vivo* con le cellule del paziente [29]. Si è notato però che queste matrici sono difficilmente ripopolate *in vivo*; sono quindi necessari studi più approfonditi per la ricerca di metodi che promuovano l'adesione e proliferazione cellulare non solo sulla superficie dei lembi pericardici, ma anche in profondità nel tessuto decellularizzato.

1.3 Adesione e proliferazione cellulare

Affinché, attraverso le tecniche dell'ingegneria tessutale, sia possibile la realizzazione di nuovi tessuti, è fondamentale che abbiano luogo i processi di adesione e proliferazione cellulare sullo *scaffold*.

Questi processi sono basilari per la formazione ed il mantenimento della struttura dei tessuti, e quindi, per il loro corretto funzionamento.

Inoltre, l'adesione cellulare è direttamente collegata alla crescita, migrazione e differenziazione delle cellule, infatti, molte di queste sono "ancoraggio-dipendenti", cioè non possono esprimere le loro funzioni, e quindi proliferare, finché non abbiano aderito al supporto.

L'adesione può essere mediata dalla presenza di numerose proteine:

- *fibronectina, collagene, laminina, vitronectina*, della matrice extracellulare;
- *actina e vinculina*, del citoscheletro;
- *integrine*, della membrana cellulare.

Le interazioni tra queste proteine ed i corrispondenti recettori inducono la trasduzione di segnali che influenzano, l'adesione, la crescita cellulare e la formazione di tessuto [15].

L'adesione può avvenire tra cellule adiacenti oppure tra cellule e supporto, che per i tessuti biologici, come il pericardio, è rappresentato dalla matrice extracellulare.

Le *integrine* sono recettori di membrana che svolgono un ruolo di estrema importanza per i meccanismi di interazione e riconoscimento cellula-cellula e cellula-matrice.

Le integrine sono eterodimeri contenenti due distinte catene, chiamate subunità α (*alpha*) e β (*beta*); questa famiglia di glicoproteine presenta un ampio dominio extracellulare, una zona idrofobica immersa nella membrana, ed una corta coda citoplasmatica. Quest'ultima ha un ruolo molto importante nella comunicazione tra l'ambiente extracellulare ed il citoplasma.

Alcune integrine hanno la capacità di riconoscere delle sequenze peptidiche segnale presenti in altre proteine, in particolar modo nelle *fibronectine* della matrice extracellulare. Oltre alle integrine esistono anche altre molecole di adesione cellulare: *caderine*, *immunoglobuline* e *selectine*.

Le fibronectine sono proteine adesive lunghe e flessibili, normalmente presenti nella forma di dimeri con le due unità legate attraverso un ponte disolfuro.

La proliferazione cellulare è strettamente dipendente dal processo di adesione, ed è altrettanto fondamentale alla fine della crescita di nuovi tessuti. La mitosi delle cellule, necessaria alla proliferazione, è indotta dai fattori di crescita.

1.3.1 Sequenze adesive

Alcune integrine di membrana hanno la capacità di riconoscere solo brevi sequenze peptidiche, come la sequenza Arg-Gly-Asp (RGD), presente anche nella struttura primaria delle fibronectine della matrice extracellulare. La sequenza RGD fa parte, infatti, delle sequenze adesive, che permettono quindi l'adesione cellulare sulla matrice. In Figura 1.10 viene riportato schematicamente il legame integrina-fibronectina attraverso il riconoscimento della sequenza adesiva RGD.

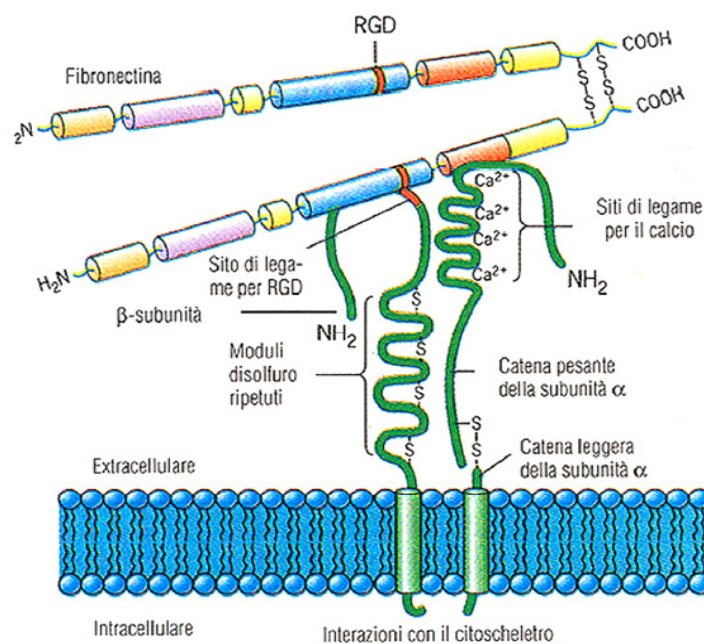


Figura 1.10 Le integrine della membrana cellulare riconoscono la sequenza adesiva RGD presente nella fibronectina [15].

L'utilizzo clinico di proteine native biologicamente attive è ostacolato dal fatto che generalmente sono instabili, insolubili e costose. Per ovviare questi problemi attualmente è

possibile utilizzare la tecnica denominata *peptide mimicry*, nella quale si utilizzano peptidi biomimetici contenenti le sequenze segnale della proteina nativa.

Diversi studi hanno provato che l'adesione cellulare su *scaffolds* (sintetici e biologici) viene incrementata grazie alla presenza di peptidi RGD: catene di amminoacidi di lunghezza differente, a partire da semplici tripeptidi, caratterizzate dalla presenza nella loro struttura della sequenza Arginina-Glicina-Acido Aspartico. Questa sequenza è fondamentale nell'attivare più di un tipo di recettore cellulare per l'adesione, e per l'impatto biologico su cellule ancoraggio-dipendenti per quanto riguarda sia l'adesione che il comportamento e la sopravvivenza.

L'attività del tripeptide è legata inoltre al blocco del terminale carbossilico o alla presenza di amminoacidi che fiancheggiano la sequenza.

L'attività varia come segue: GRGDSP > RGDS > RGD ammido-terminale > RGD carbossi-terminale (inattivo).

1.3.2 Fattori di crescita

I fattori di crescita sono proteine che si legano a specifici recettori della membrana cellulare allo scopo di attivare ben determinate funzioni cellulari tra le quali: differenziazione, proliferazione e crescita [15]. Esistono differenti tipologie di fattori di crescita ed hanno funzionalità differenti, che possono coinvolgere più tipi cellulari, oppure essere specifiche.

In questa tesi è stata utilizzata una delle proteine della famiglia degli *Insuline-like Growth Factors*: l'IGF-1. Questa famiglia è formata dalle proteine prodotte in maggiore quantità dagli osteoblasti e poi immagazzinate nelle ossa.

Le proteine più importanti degli IGFs sono proprio l'IGF-1 e l'IGF-2, dove, la prima è la principale proteina prodotta in risposta all'ormone della crescita (GH) e, di conseguenza stimola le attività cellulari di crescita e proliferazione cellulare, mentre la seconda viene prodotta per lo più dagli embrioni e nei neonati, e si pensa che possa essere il fattore di crescita fetale.

Il meccanismo d'azione degli IGFs non è stato ancora del tutto chiarito.

Nel panorama attuale della ricerca nell'ambito dell'ingegneria tessutale applicata alle valvole cardiache, occupa un ruolo di rilievo lo studio dell'attività che i fattori di crescita svolgono, sia in vitro che in vivo, una volta applicati direttamente sul tessuto oppure sullo *scaffold*. La ricerca sull'applicazione dei fattori di crescita nella funzionalizzazione dei biomateriali ha lo scopo principale di ottenere un considerevole miglioramento nelle prestazioni delle attuali protesi valvolari biologiche [15].

1.4 Peptidi auto-assemblanti

Recentemente ha assunto rilevante importanza nell'ambito dell'ingegneria tessutale l'utilizzo di peptidi auto-assemblanti come *scaffolds* per la crescita cellulare.

I peptidi auto-assemblanti sono una particolare classe di molecole caratterizzate dalla capacità di organizzarsi in strutture ordinate mediante la creazione di legami non covalenti quali le forze di *Van der Waals*, legami idrogeno e ionici, ed interazioni idrofobiche.

Tali molecole permettono di ottenere strutture bi- o tri- dimensionali da utilizzare per promuovere le interazioni cellula-cellula multidimensionali ed incrementare la densità cellulare.

La classe dei peptidi auto-assemblanti è stata suddivisa negli anni '90 da Zhang [30] in cinque tipologie principali:

1. Tipo I, o “Lego molecolari”: formano degli idrogel che possono essere utilizzati nella creazione di *scaffold*;
2. Tipo II, o “interruttori molecolari”;
3. Tipo III: “uncini molecolari” e “velcro molecolari”, sono peptidi utilizzati nei trattamenti superficiali;
4. Tipo IV: gruppo a cui appartengono i nano tubi peptidici e le “capsule molecolari” per il trasporto di geni e proteine;
5. Tipo V: “cavità molecolari” per la biomineralizzazione [31].

I peptidi auto-assemblanti sintetici possono essere derivati da proteine naturali oppure essere sintetizzati *ad hoc*. In ogni caso sono formati da una regione idrofilica e da una idrofobica, ed hanno la capacità di aggregare spontaneamente in soluzione fisiologica (*buffer*).

L'auto-assemblamento è legato sia alla natura intrinseca dei singoli amminoacidi, sia alla loro posizione nella sequenza. È, quindi, possibile ottenere una determinata struttura secondaria scegliendo e predisponendo opportunamente gli amminoacidi in sequenza.

I peptidi per auto-aggregare devono possedere due caratteristiche: la complementarietà (ossia la ripetizione di una particolare distribuzione di carica all'interno della sequenza) e la compatibilità strutturale. I peptidi ionico-complementari di Tipo I, utilizzati in questa tesi, rispondono ad entrambe le esigenze essendo caratterizzati dall'alternanza di residui positivi e negativi.

I peptidi appartenenti a questa classe assumono generalmente, in differenti solventi, una struttura secondaria di tipo β -sheet, dove ciascun piano di β -sheet ha una faccia a carattere ionico con catene laterali cariche positivamente e negativamente ed una faccia idrofobica. Grazie ad interazioni sia di carattere ionico che idrofobico, i numerosi piani di β -sheet possono assemblarsi in strutture tridimensionali (Figura 1.11).

Il processo di auto-assemblaggio dipende da diversi fattori: la sequenza peptidica, la concentrazione, il pH, la presenza di sali ed il tempo.

Anche il tipo di sale utilizzato sembra avere un ruolo importante nel processo di auto-assemblaggio: l'ordine di efficacia nell'induzione della formazione di membrane è: $\text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Cs}^+$.

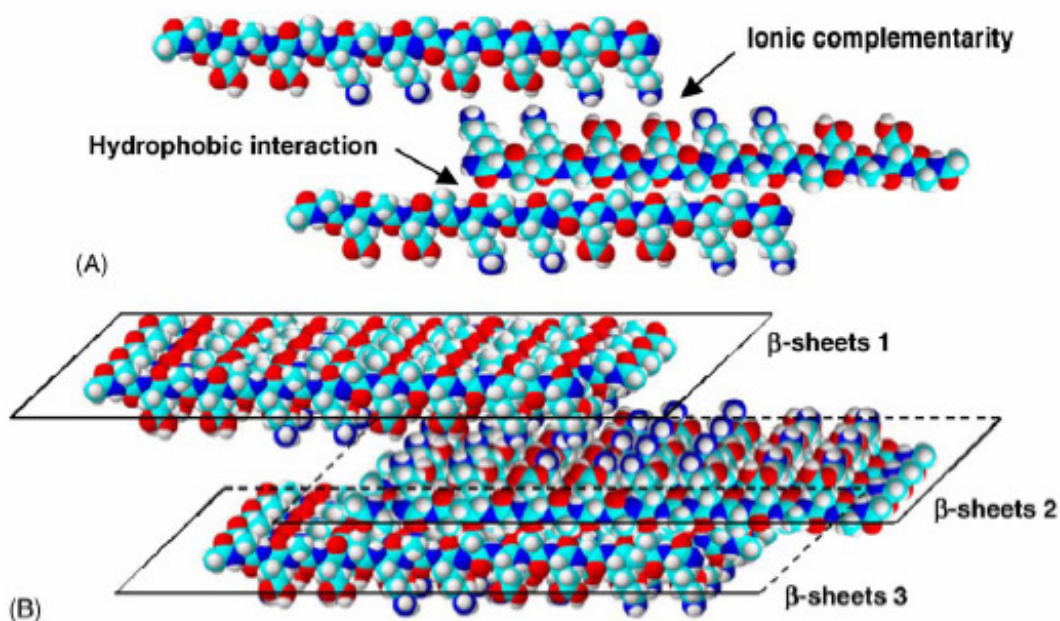


Figura 1.11 (A) Schema di auto-assemblaggio del peptide autoassemblante EAK 16-II attraverso interazioni idrofobiche e ionico-complementari. (B) Modello proposto per l'auto-assemblaggio del peptide EAK 16-II tramite aggregati basati sui β -sheet. In aggiunta ai legami idrogeno, le interazioni idrofobiche ed elettrostatiche aiutano a stabilizzare i β -sheet.

Il peptide EAK (AEAEAKAKAEAEAKAK), che si struttura in foglietti β che auto-assemblano in membrane, completamente atossiche, a seguito dell'aggiunta di sali in soluzione (più precisamente ioni monovalenti positivi), rappresenta il primo membro di questa classe di peptidi.

Recentemente, sono stati progettati una serie di peptidi auto-assemblanti ionico complementari “modificati”, con lo scopo di studiare l'abilità dei differenti residui amminoacidici di indurre le strutture β -sheet e conseguentemente di formare matrici tridimensionali in presenza di sali [32].

Le modificazioni proposte non hanno previsto modifiche nel *pattern* tipico dei peptidi auto-assemblanti, mantenendo inalterata l'alternanza di residui polari e apolari e la periodicità dei residui carichi.

Peptidi auto-assemblanti hanno trovato applicazione in diversi campi clinici: come substrati per la crescita dei neuriti e la formazione di sinapsi [33, 34]; quali promotori di nanofibre iniettabili per microambienti intramiocardici per cellule endoteliali [35]; come *scaffold* per lo sviluppo e la riparazione di cartilagine [36]; come biomateriali nelle terapie di ripristino del tessuto osseo.

1.5 “Chemoselective ligation” via ossima

La bioconiugazione consiste nel legare covalentemente biomolecole a supporti solidi oppure nel coniugare due o più biomolecole per ottenere un composto avente le proprietà combinate dei suoi componenti. In questo modo molecole naturali o sintetiche possono essere combinate chimicamente per creare dei composti unici dotati di caratteristiche opportunamente ingegnerizzate.

Si parla di *Chemoselective ligation* quando vengono coniugate covalentemente due molecole biologiche in mezzo acquoso e condizioni blande, in assenza di sostanze attivanti, ma semplicemente per reazione selettiva tra un gruppo presente nel peptide e un altro gruppo specifico localizzato in una proteina o in un'altra sequenza peptidica.

Affinché la reazione possa avvenire, è necessario modificare preventivamente il gruppo N-terminale della proteina o del peptide da coniugare; a questo scopo Francis *et al* [37] hanno messo a punto una tecnica di modificazione del terminale amminico in un gruppo aldeidico o chetonico, attraverso una reazione con piridossal-5-fosfato (PLP) in condizioni blande: soluzione acquosa a pH 6,5 e temperatura di 37°C.

La resa di reazione varia in base al tipo di residuo presente come N-terminale della sequenza: è elevata nel caso in cui il residuo sia Ala, Gly, Asp, Glu o Asn, oppure molto bassa se il residuo è Cys, Ser, His, Thr, Trp o Pro [38].

La transamminazione con PLP prevede la condensazione del gruppo amminico N-terminale della proteina con il PLP e la successiva idrolisi per formare piruvammide, riportata in Figura 1.12.

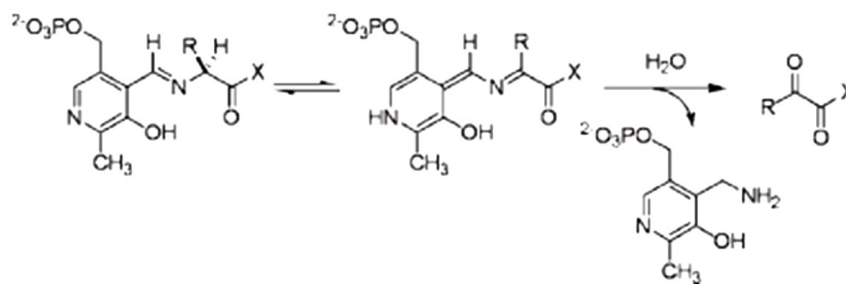


Figura 1.12 Reazione di formazione di piruvammide.

In seguito, per reazione della proteina-chetone/aldeide con un'ossiammina si ha la formazione di un'ossima (Figura 1.13).

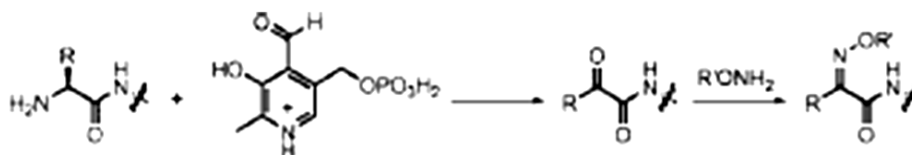


Figura 1.13 Transaminazione N-terminale mediata da PLP con la successiva formazione dell'ossima.

Lo scopo della maggior parte delle procedure di coniugazione delle proteine è creare prodotti stabili con un buon mantenimento dello stato nativo e dell'attività biologica.

Idealmente, qualunque derivatizzazione dovrebbe dare come risultato una proteina che si comporta esattamente come la sua forma nativa, ma con una funzionalità aggiunta impartitale da ciò che vi è stato bioconiugato.

In questo progetto, la tecnica della *chemoselective ligation* è stata utilizzata per coniugare il peptide autoassemblante AoaEabuK con il chetone della sequenza adesiva (GRGDSP)₄K, ed in un secondo momento con il chetone del fattore di crescita IGF-1.

1.6 Scopo della tesi

Lo studio effettuato in questo lavoro di tesi si inserisce all'interno della ricerca di sostituti di valvole cardiache. Le valvole biologiche *xenograft* attualmente impiegate, decellularizzate e fissate con glutaraldeide, hanno una durata media di dieci anni dovuta alla loro calcificazione provocata dal trattamento chimico. Né questi sostituti né le valvole *homograft* criopreservate sono in grado di promuovere la ricolonizzazione delle matrici da parte delle cellule del ricevente, evento che permetterebbe una durata maggiore dell'impianto e la capacità della valvola di modificarsi durante la crescita nel paziente pediatrico.

Per promuovere la capacità *self-seeding* i sostituti valvolari di prossima generazione dovranno evitare il fissaggio con glutaraldeide ed incentivare la ricolonizzazione da parte delle cellule del ricevente. In questo lavoro sperimentale è stata valutata la possibilità di trattare il tessuto pericardico bovino e porcino, non fissato con glutaraldeide, con i peptidi auto-assemblanti allo scopo di incrementare l'adesione e la proliferazione cellulari non solo superficiali ma anche all'interno dello *scaffold* tridimensionale costituito dalla matrice decellularizzata. Infatti, è stato ampiamente dimostrato che questi peptidi formano idrogeli molto graditi alle cellule di tipi differenti e sono inoltre molto utili come *carrier* per il *drug-delivery*. Un ulteriore sviluppo di questa ricerca riguarderà la coniugazione covalente e chemoselettiva tra la sequenza auto-assemblante e fattori adesivi o di crescita per decorare la matrice di peptidi

auto-assemblanti con messaggi biochimici in grado di promuovere l'entrata delle cellule all'interno dello *scaffold* o la differenziazione di cellule staminali mesenchimali.

Il lavoro di tesi proposto si articolerà nelle seguenti attività:

1. verifica della capacità di penetrazione dei peptidi auto-assemblanti all'interno della matrice di pericardio bovino decellularizzata;
2. analisi della variazione delle proprietà fisiche di zone differenti del pericardio bovino dovuta al trattamento con peptide auto-assemblante e non (controllo);
3. analisi della variazione delle proprietà fisiche di zone differenti del pericardio porcino in seguito al trattamento con peptide auto-assemblante e non (controllo);
4. sintesi, purificazione e caratterizzazione del coniugato covalente tra peptide auto-assemblante e sequenza adesiva;
5. sintesi e caratterizzazione della sequenza auto-assemblante da coniugare covalentemente in modo specifico e selettivo al terminale N del fattore di crescita, debitamente modificato;
6. coniugazione tra peptide auto-assemblante e fattore di crescita.

Capitolo 2

Materiali e metodi

Lo svolgimento della parte sperimentale di questo progetto di tesi ha comportato l'utilizzo di sostanze chimiche e strumentazione di laboratorio. In questo capitolo, in primo luogo verranno elencati i principali reagenti e gli strumenti utilizzati; poi, verranno brevemente descritte le diverse metodologie adoperate.

2.1 Materiali

2.1.1 Reagenti

Reagenti forniti da Sigma-Aldrich (Steinheim-Germania):

- Acetone;
- Acetonitrile;
- Acido acetico;
- DMF;
- Metanolo;
- PLP;
- TES;
- HCl;
- Idrossido di Sodio;
- Piastre Petri;
- PBS;
- Benzamidina;
- Iodoacetamide;
- PMSF;
- NEM;
- Triton;
- Colato;
- NaN_3 ;
- P_2O_5 ;
- Benzonasi;

- Percoll.

Reagenti forniti da Advanced Biotech Italia (Milano, Italia):

- HBTU;
- HOBt.

Reagenti utilizzati per effettuare il *test alla ninidrina* (o *Kaiser test*) forniti da Applied Biosystems (Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA):

- Monitor 1: soluzione al 76% (w/w) di Fenolo/Etanolo;
- Monitor 2: soluzione 0,2 mM di KCN/Piridina;
- Monitor 3: soluzione 0,28 M di Ninidrina/Etanolo.

Reagenti forniti da Carlo Erba (Milano, Italia):

- Metanolo;
- Sodio fosfato monobasico.

Reagenti forniti da Biosolve (Valkenswaard, Olanda):

- NMP;
- Piperidina;
- TFA.

Reagenti forniti da Novabiochem (Merck, Darmstadt, Germania):

- tutti gli amminoacidi protetti usati per la sintesi peptidica su fare solida;
- 5(6)-carbositetrametilrodamina (TAMRA).

Reagenti forniti da Prolabo (Merck, Darmstadt, Germania):

- Dietiletere.

Reagenti forniti da Ipsen Pharma (Boulogne-Billancourt, Francia):

- farmaco Increlex contenente IGF-1 (10 mg/mL).

Reagenti forniti da Whatman (Schelicher&Schuell, Dassel, Germania):

- carta da filtro/assorbente.

Reagenti forniti da Bio-optica (Milano, Italia)

- resina OCT (Killik).

2.1.2 Peptidi per il trattamento del pericardio bovino e porcino.

I tessuti biologici sono stati trattati con due differenti peptidi denominati: EAbuK e SDF, dei quali viene riportata la sequenza ed il peso molecolare. I seguenti peptidi erano già disponibili in laboratorio da precedenti sintesi e purificazioni.

2.1.2.1 EAbuK (carbossi terminale)

Questo peptide appartiene alla classe dei peptidi auto-assemblanti di Tipo 1, ha un peso molecolare pari a 1728,33 Da, e presenta la sequenza amminoacidica di seguito riportata:

H-Abu-Glu-Abu-Glu-Abu-Lys-Abu-Lys-Abu-Glu-Abu-Glu-Abu-Lys-Abu-Lys-OH

Questo peptide è stato utilizzato per la condenzione con 5(6)-carbossitetrametilrodamina.

2.1.2.2 EAbuK (amide terminale)

Il peptide, la cui sequenza viene sotto riportata, appartiene sempre alla classe dei peptidi auto-assemblanti di Tipo 1, ed ha un peso molecolare di 1728,01 Da e la seguente sequenza:

H-Abu-Glu-Abu-Glu-Abu-Lys-Abu-Lys-Abu-Glu-Abu-Glu-Abu-Lys-Abu-Lys-NH₂

2.1.2.3 Δ 5SDF1 β T

Il seguente peptide non appartiene alla classe dei peptidi auto-assemblanti, ha un peso molecolare pari a 2225,70 Da, e ha sequenza:

H-Lys-Trp-Ile-Gln-Glu-Tyr-Leu-Glu-Lys-Ala-Leu-Asn-Lys-Arg-Phe-Lys-Met-OH

Il peptide riproduce il frammento (56-72) della Chemochina SDF-1 β umana (3-72). Per motivi di chiarezza verrà in seguito denominato Δ 5SDF.

2.1.3 Peptidi e proteine per “Chemoselective Ligation”

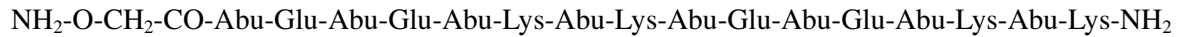
Una parte del lavoro di questa tesi si è incentrato nella realizzazione di un composto derivante dalla bioconiugazione tra il peptide auto-assemblante AoaEAbuK e la sequenza adesiva (GRGDSP)₄K.

Si è poi tentata la realizzazione di un composto derivante dalla bioconiugazione tra un peptide auto-assemblante ed una proteina, per questi esperimenti si sono utilizzati: due peptidi auto-assemblanti di Tipo 1, denominati AoaEAbuK e Aoa77EAbuK; la sequenza adesiva (GRGDSP)₄K; e la proteina umana IGF-1.

2.1.3.1 AoaEAbuK

Il peptide AoaEAbuK appartine al Tipo 1 della classe dei peptidi auto-assemblanti e presenta un peso molecolare di 1800,39 Da.

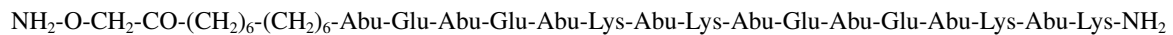
Si riporta qui sotto la sequenza del peptide:



Il peptide così caratterizzato era già disponibile in laboratorio.

2.1.3.2 Aoa77EAbuK

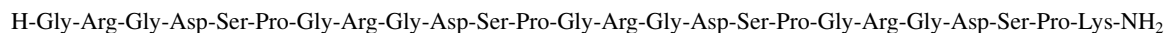
Questo peptide presenta un peso molecolare di 2055,39 Da, e fa parte della classe dei peptidi auto-assemblanti di Tipo 1. La sequenza è sotto riportata:



Il peptide è stato preparato nel corso del lavoro di tesi.

2.1.3.3 (GRGDSP)₄K

Il seguente peptide contenente la sequenza adesiva “RGD” ha un peso molecolare di 2424,51 Da. Viene di seguito riportata la sequenza:



Il peptide era già disponibile in laboratorio.

2.1.3.4 IGF-1

L'*Insulin-like growth factor 1* o IGF-1 umano è una proteina facente parte del gruppo dei fattori di crescita, e ha un peso molecolare di 7649 Da.

Viene di seguito riportata la sequenza degli amminoacidi:



2.1.4 Strumentazione di laboratorio

Per lo sviluppo della parte sperimentale di questo lavoro di tesi si sono utilizzate diverse apparecchiature di laboratorio chimico.

2.1.4.1 Sintesi peptidica su fase solida

Per la sintesi del peptide “Aoa77EAbuk” si è utilizzato il sintetizzatore automatico fornito dalla MultisynTech (Witten, Germania) modello Syro I riportato in Figura 2.1.

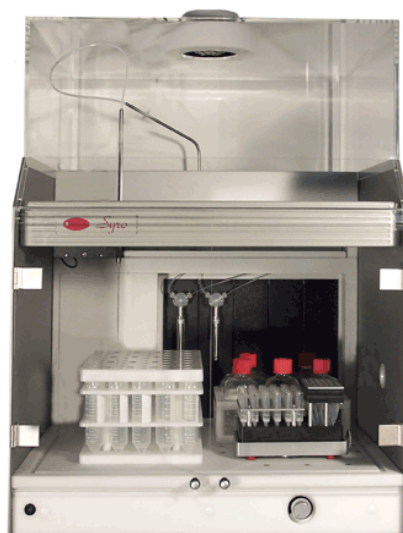


Figura 2.1 Sintetizzatore Syro I (MultisynTech).

Per la successiva purificazione dei peptidi si sono utilizzati anche i seguenti strumenti: l'evaporatore rotante (Laborota 4100-Efficient, Heidolph Instruments s.r.l., Milano, Italia), ed il liofilizzatore (Lioph. Lock 4.5, Labconco, Kansas city, MO, USA).

2.1.4.2 Analisi di massa

Per la caratterizzazione ed identificazione dei peptidi e della proteina utilizzati nella tesi, si sono effettuate diverse analisi di massa.

Le analisi di massa sono state eseguite presso il Dipartimento di Scienze del Farmaco dell'Università di Padova dal Prof. D. Dalzoppo. Lo strumento utilizzato è un ESI-TOF, modello Mariner System 5220 fornito dalla ditta Applied Biosystem (Perkin-Elmer).

Per le analisi di massa effettuate dal Dott. G. Picariello all'Istituto delle Scienze dell'Alimentazione del CNR ad Avellino, è stato utilizzato lo strumento MALDI-TOF, modello Voyager DE-Pro (PerSeptive Biosystems, Framingham, MA, USA).

2.1.4.3 Test alla ninidrina e Test alla piperidina

Per effettuare i “Test alla ninidrina” e “Test alla piperidina”, si è utilizzato lo spettrofotometro UV/Vis Lambda 2, riportato in Figura 2.2, fornito da Perkin Elmer.



Figura 2.2 Spettrofotometro UV/Vis Lambda 2 (Perkin-Elmer).

2.1.4.4 Analisi cromatografica

Per la separazione, purificazione ed analisi di peptidi e proteine si sono utilizzati due sistemi cromatografici:

- HPLC Waters 600E System Controller, munito di autocampionatore modello 717 e di rivelatore UV/Vis multicanale a lunghezza d'onda programmabile modello 2487. L'acquisizione e l'integrazione dei dati sono state eseguite dal programma Empower (Waters, Milford, MA, U.S.A.);
- HPLC Waters 600 Controller, munito di rivelatore UV/Vis multicanale a lunghezza d'onda programmabile modello 2487. L'acquisizione dei dati è stata eseguita tramite un registratore distribuito dalla Carlo Erba Strumentazione e prodotto dalla Kipp & Zonen (Delft, Olanda) modello BD40/BD41 Recorder.

Nell'analisi cromatografica si sono utilizzate colonne costituite da gel di silice funzionalizzata con catene idrocarburiche lineari di atomi di carbonio (fase stazionaria apolare), con differenti caratteristiche:

- Delta-Pak C₁₈ semipreparativa (15 μ m, 100 Å, 7,8 \times 300 mm) fornita da Waters;
- Colonna Zorbax C₁₈ semipreparativa (5 μ m, 100 Å, 9,4 \times 250 mm) fornita da Agilent (Santa Clara, California);

- Colonna Symmetry Shield C₈ analitica (5 µm, 60 Å, 4,6 × 250 mm) fornita da Waters;
- Colonna Vydac C₁₈ 218TP54 Protein&Peptide analitica (5 µm, 300 Å, 4,6 × 250 mm) fornita da Grace (Columbia, MD, U.S.A.).

Nelle analisi cromatografiche si sono utilizzati due eluenti:

- Eluente A: 0,05% di TFA in acqua MilliQ;
- Eluente B: 0,05% di TFA in acetonitrile.

L'acqua MilliQ utilizzata per le analisi è stata bi-distillata con il distillatore della ditta Cecchinato (Mestre, Italia), de-salificata, e privata dei componenti organici grazie al sistema MilliQ della ditta Waters.

2.1.4.5 Analisi biologiche

Per analizzare le matrici di pericardio mediante epifluorescenza è stato utilizzato il Microscopio ad Fluorescenza "Leica DC 300F" (Leica microsystem, Milano, Italia).

Per le misurazioni di massa è stata utilizzata una bilancia analitica (Sartorius mechatronics, Goettingen, Germania).

2.2 Metodi

2.2.1 Sintesi peptidica su fase solida

I peptidi sono stati sintetizzati mediante sintesi peptidica su fase solida "SPPS" ("Solid Phase Peptide Synthesis"), messa a punto nel 1963 da Bruce Merrifield [39, 40], utilizzando la chimica Fmoc.

La procedura automatizzata è stata impostata per il sintetizzatore Syro I.

La tecnica SPPS rappresenta attualmente il metodo più vantaggioso per la sintesi peptidica su piccola/media scala, e permette di ottenere un peptide in 5 passaggi fondamentali:

1. assemblaggio della catena di amminoacidi su di una resina che funge da supporto solido;
2. sblocco della catena dalla resina e rimozione dei gruppi protettori in catena laterale;
3. purificazione dai possibili sottoprodotti;
4. eventuali modifiche chimiche post-sintesi;
5. caratterizzazione.

Durante la sintesi, la crescita del peptide avviene dall'estremità C-terminale verso l'N-terminale, e il gruppo α-carbossilico dell'ultimo amminoacido della sequenza ancorato al

supporto solido fornito dalla resina, tramite un *linker*: la crescita della catena polimerica avviene così in fase eterogenea.

Il vantaggio fondamentale di questa tecnica è rappresentato proprio dalla presenza di una matrice insolubile. Questa permette infatti di isolare il peptide in crescita, ad ogni ciclo di reazione, attraverso una semplice filtrazione; in questo modo l'intera sintesi può avvenire in un unico reattore. Questa tecnica comporta un minor spreco di materiale grazie alla minor manipolazione ed alla elevata automatizzazione e consente una notevole riduzione dei tempi di lavoro.

Come supporti solidi vengono generalmente usate resine a base polimerica, quali, ad esempio, polistirene copolimerizzato all'1% con divinilbenzene, oppure resine poliacrilammidiche. Queste resine hanno la proprietà di rigonfiarsi fino a raggiungere un volume 10 volte quello iniziale [33] in solventi polari non protici come N,N-dimetilformammide (DMF), N-metil-2-pirrolidone (NMP) e diclorometano (DCM).

A seconda della scelta del *linker* per ancorare il peptide in crescita alla resina si può ottenere, in seguito allo sblocco (*cleavage*), un peptide acido, ammidico terminale o caratterizzato dalla presenza di un particolare gruppo funzionale. Sono disponibili in commercio resine derivatizzate con un'ampia varietà di *linker* o già funzionalizzate con il primo amminoacido protetto al gruppo α -amminico e in catena laterale, resine acido labili per permettere lo sblocco del peptide dal supporto, preservando le protezioni in catena laterale, resine resistenti in condizioni di acidolisi che riducono la perdita del peptide ancorato, e molti altri supporti per soddisfare particolari esigenze chimiche.

Se si vogliono condurre reazioni specifiche, è anche possibile sbloccare il peptide dal supporto solido lasciando però inalterate le protezioni in catena laterale, scegliendo un *linker* opportuno.

In questo lavoro di tesi, per la sintesi del peptide Aoa77EAbuK, si è utilizzata la resina Tentagel S-OH riportata in Figura 2.3. Questa resina è caratterizzata da una particolare condizione di clivaggio in ambiente basico: ciò permette di ottenere un nuovo grado di ortogonalità e la possibilità di rimuovere le protezioni in catena laterale facendo reagire il peptide ancorato al supporto in ambiente acquoso, grazie alla presenza del *linker* di PEO.

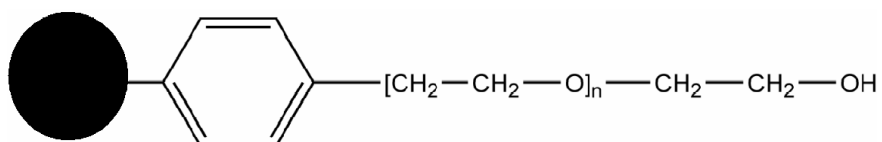


Figura 2.3 Struttura della resina Tentagel S-OH usata nel presente lavoro di tesi.

La sintesi della catena peptidica coinvolge una serie di cicli di reazione, che consistono in deprotezione e condensazione (*coupling*). Prima viene rimosso il gruppo protettore α -

amminico del residuo aminoacidico legato al peptide in crescita; questo grazie ad una soluzione al 40% di piperidina in DMF per 3 minuti e poi una soluzione al 20% di piperidina in DMF per 12 minuti. Segue poi la reazione di condensazione tra il gruppo α -amminico e la funzione α -carbossilica attivata di un altro residuo, con la conseguente formazione di un nuovo legame peptidico. In Figura 2.4 viene schematizzata la procedura di sintesi peptidica su fase solida SPPS.

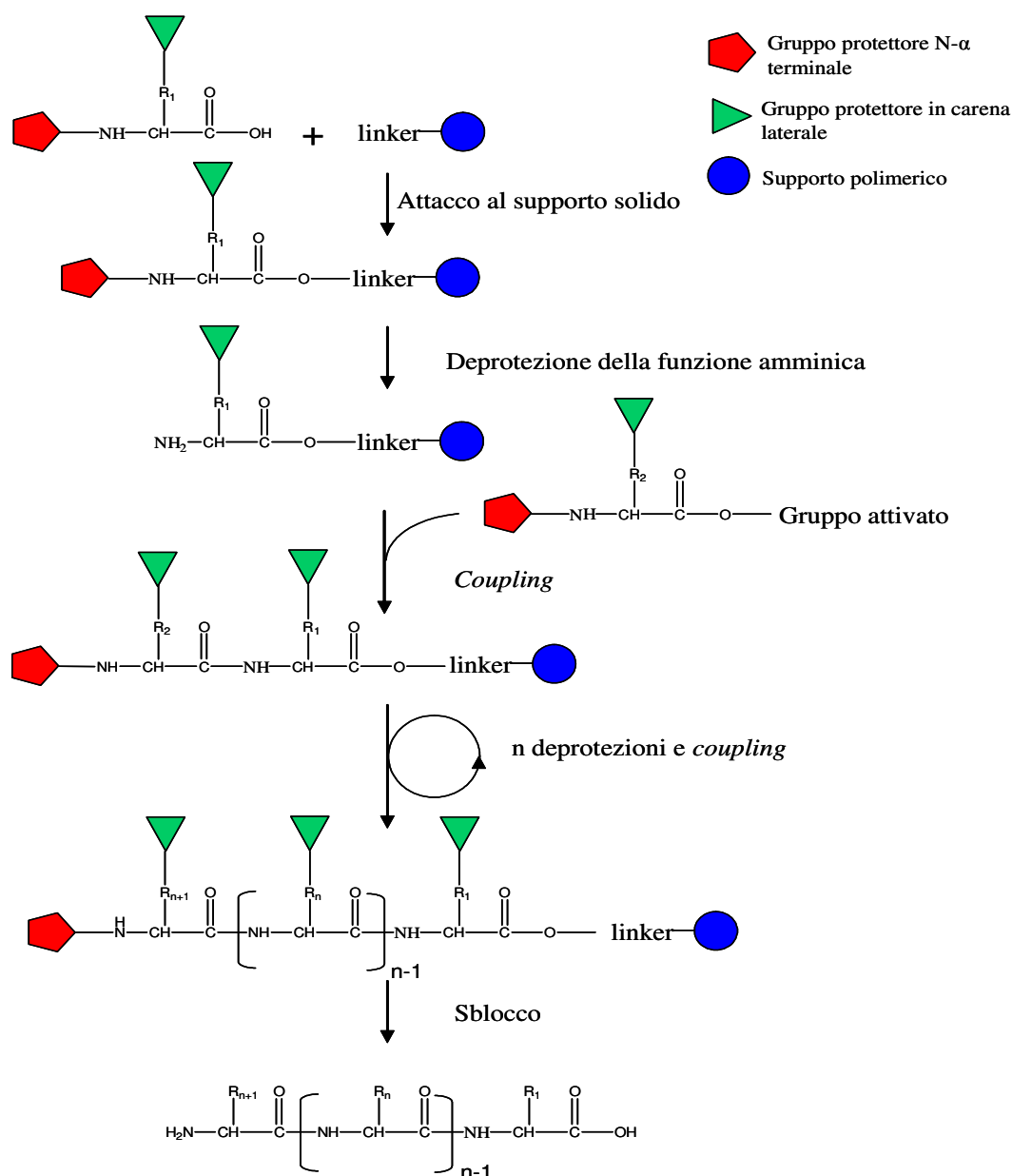
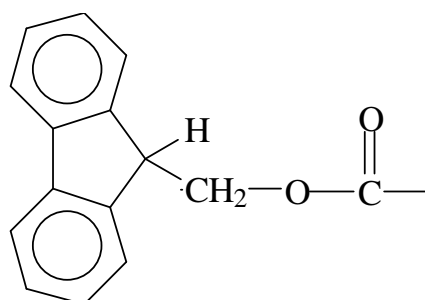


Figura 2.4 Schema generale della Sintesi Peptidica su Fase Solida SPPS.

I gruppi protettori delle catene laterali sono necessari in virtù del fatto che gli aminoacidi, oltre ai due gruppi funzionali terminali della catena principale, possono contenere in catena

laterale gruppi reattivi, che potrebbero interferire con la formazione del legame peptidico di interesse. Questi gruppi protettori devono però rimanere stabili nelle condizioni di deprotezione del gruppo protettore α -amminico della catena principale, altrimenti la loro funzione verrebbe meno; questo tipo di protezione viene denominata “protezione ortogonale”. Nella chimica Fmoc, a protezione del gruppo α -amminico dell’amminoacido, è utilizzato il gruppo base-labile Fmoc (9-fluorenilmetilossicarbonile) riportato in Figura 2.5 [41, 42], che viene rimosso in genere con piperidina, ed in catena laterale vengono utilizzati gruppi protettori acido-labili, rimossi generalmente con acido trifluoroacetico (TFA).



Fmoc

Figura 2.5 Struttura del gruppo protettore del terminale amminico denominato Fmoc.

Durante la sintesi di un peptide possono crearsi differenti sottoprodotti costituiti da sequenze incomplete (mancanti di uno o più residui, oppure troncate); questo rappresenta uno dei limiti della SPPS poiché la purificazione del prodotto desiderato da queste “impurezze” risulta non sempre immediata, data la grande somiglianza.

Per questo viene utilizzato il test alla ninidrina (“*Kaiser test*”), che permette di monitorare la resa (considerata accettabile se superiore al 98%) delle reazioni di *coupling* durante la sintesi. In questo modo, se il test fornisce come risultato una resa non soddisfacente, è possibile inserire nel programma di sintesi un ulteriore ciclo di *coupling* dello stesso amminoacido prima di passare alla sua deprotezione.

Come alternativa, è anche possibile bloccare tutti i gruppi amminici terminali che non hanno reagito, attraverso una reazione di *capping* con anidride benzoica o acetica.

2.2.1.1 Test sulla resa di funzionalizzazione della resina

La seguente procedura [33], denominata anche “test alla piperidina” viene utilizzata per quantificare la funzionalizzazione della resina con l’amminoacido, protetto al terminale α -amminico e in catena laterale.

Si preleva un campione di resina funzionalizzata di peso compreso nell’intervallo 4-8 mg, si lava più volte con metanolo e si mette a seccare sotto vuoto per 1 ora. Una volta secco, il

campione viene accuratamente pesato (ed il peso deve sempre rientrare nell'intervallo di cui sopra) e trattato con 0,5 mL di una soluzione al 20% di piperidina in DMF. Questa soluzione viene lasciata a contatto con la resina per 15 minuti agitando manualmente. La deprotezione del gruppo amminico legato al supporto solido genera l'N-(9-fluorenilmetil)piperidina che assorbe a 301 nm ($\epsilon = 7800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). In Figura 2.6 viene riportato il meccanismo di sblocco del gruppo Fmoc dall'amminoacido su resina.

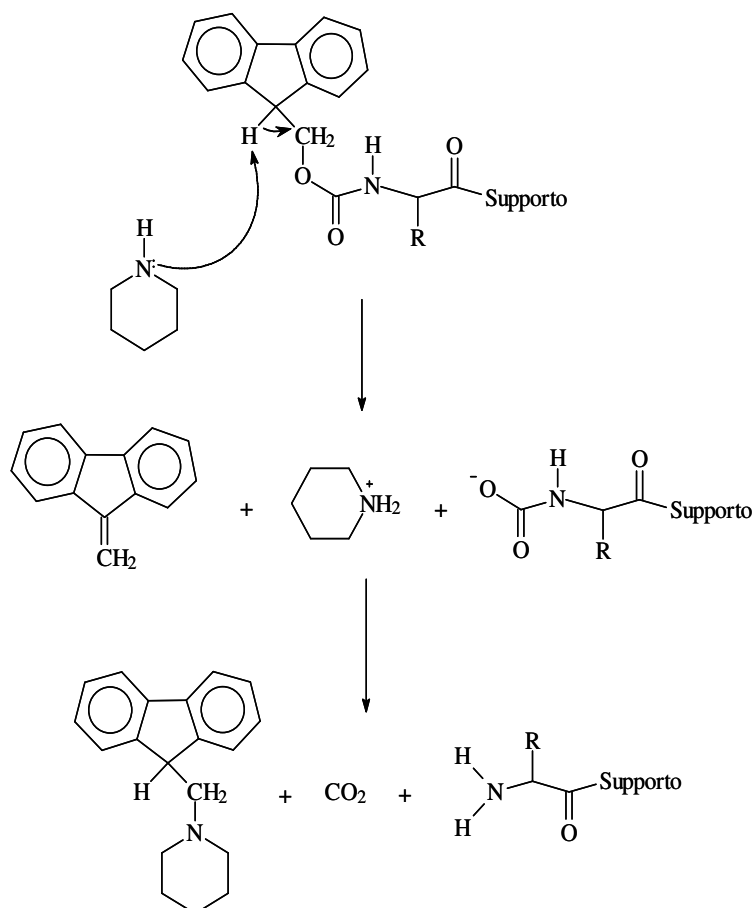


Figura 2.6 Sblocco del gruppo Fmoc dall'amminoacido su supporto solido durante il test di funzionalizzazione della resina.

Si porta la miscela ad un volume finale (V) di 50 mL con DMF, e si misura l'assorbanza a 301 nm grazie allo spettrofotometro UV/Vis a doppio raggio.

La sostituzione, espressa in [mmoli/g] viene calcolata utilizzando la seguente formula:

$$\text{Sostituzione} = (A_{301} \times V) / (7800 \times wt) \quad [1]$$

dove A_{301} è l'assorbanza a 301 nm, V è il volume della soluzione espresso in [mL], e wt è il

peso del campione di resina in [g] dopo che lo si è seccato.

2.2.1.2 Attivazione del gruppo carbossilico

Nelle numerose reazioni di coniugazione che avvengono durante la sintesi di un peptide, non è fondamentale solo l'accessibilità e la reattività della funzione amminica libera, ma è di primaria importanza anche la reattività del gruppo carbossilico dell'amminoacido da legare alla catena peptidica in crescita. Questo deve essere attivato e reso, quindi più elettrofilo.

Si cerca quindi di raggiungere rese di *coupling* molto elevate, senza però favorire possibili reazioni secondarie [43], attraverso la scelta di un gruppo attivante adeguato.

Vi sono differenti metodi di attivazione del gruppo carbossilico, ma quella attualmente più utilizzata per le sintesi automatizzate su fase solida è l'attivazione *in situ*. Questa prevede l'uso di un agente attivante: il 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio esafluorofosfato (HBTU), in presenza di N-idrossibenzotriazolo (HOBT) e di una base quale l'ammina terziaria N-N-diisopropiletilammina (DIPEA) [44, 45] (Figura 2.7).

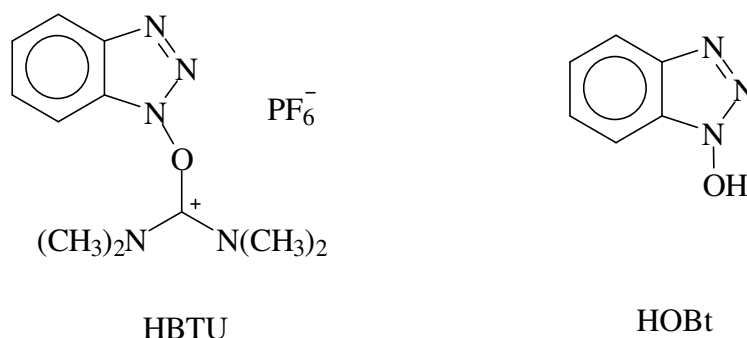


Figura 2.7 Struttura dei reagenti per l'attivazione del gruppo carbossilico: HBTU e HOBT.

La procedura automatizzata prevede l'utilizzo di 1 mL di una soluzione 0,5 M dello Fmoc-amminoacido da legare alla catena peptidica in crescita in DMF, di 1,2 mL di una soluzione 0,45 M di HBTU/HOBT in DMF (200 mL di una soluzione 0,5 M di HOBT cui si aggiungono 100 mmoli di HBTU) e di 0,5 mL di una soluzione di DIPEA in NMP per *coupling*. La maggior parte delle reazioni di *coupling* può durare da 20 min a 2 ore. La procedura standard prevede l'inserimento di un residuo in 45 min, oppure in 90 min se è previsto un *coupling* doppio.

2.2.1.3 Test alla ninidrina

Il test alla ninidrina o *Kaiser test* [40, 45, 46], è un test quantitativo che permette di determinare la presenza di gruppi amminici liberi. Si utilizza per determinare la resa di *coupling*. La procedura, prevede il prelievo di un campione di resina tra 2 e 8 mg, che va lavato con 3 aliquote di metanolo, alla prima delle quali si aggiungono 2-3 gocce di acido

acetico (per evitare un eventuale sblocco dello Fmoc). Il campione è poi seccato sotto vuoto per 1 ora e pesato accuratamente. Si aggiungono in sequenza: 75 μL di Monitor 1, 100 μL di Monitor 2 e 75 μL di Monitor 3. Si riscalda la miscela a bagnomaria a 100°C per 5 min. Si aggiungono 4,8 mL di soluzione di etanolo al 60%. Dopo aver centrifugato, si misura l'assorbanza del liquido surnatante a 570 nm [33].

La quantità di funzioni amminiche libere è calcolata mediante la seguente formula:

$$\mu\text{moli/g di gruppi amminici} = (A \times V \times 10^{-6}) / (\epsilon \times P) \quad [2]$$

dove A è la differenza tra il valore di assorbanza del campione e il valore di assorbanza della soluzione di riferimento a 570 nm (75 μL di Monitor 1, 100 μL di Monitor 2, 75 μL di Monitor 3 e 4,8 mL di soluzione di etanolo al 60%); V è il volume del campione espresso in [mL]; ϵ è il coefficiente di estinzione molare pari a 15000 [$\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$]; P è il peso del campione espresso in [mg]. La resa della reazione di *coupling* è data da:

$$\text{Resa \%} = \{1 - [\mu\text{moli/g di gruppi amminici} / (\text{sostituzione}[\text{mmoli/g}] \times 10^{-3})]\} \times 100 \quad [3]$$

La reazione attraverso la quale si ottiene il cromoforo detto complesso di Ruhemann che assorbe nel visibile a 570 nm è riportata in Figura. 2.8. Questa reazione è stato ipotizzato si ottiene con le ammine primarie; la prolina, essendo un'ammina secondaria, reagisce con la ninidrina con formazione di un addotto diverso di colore giallo [40].

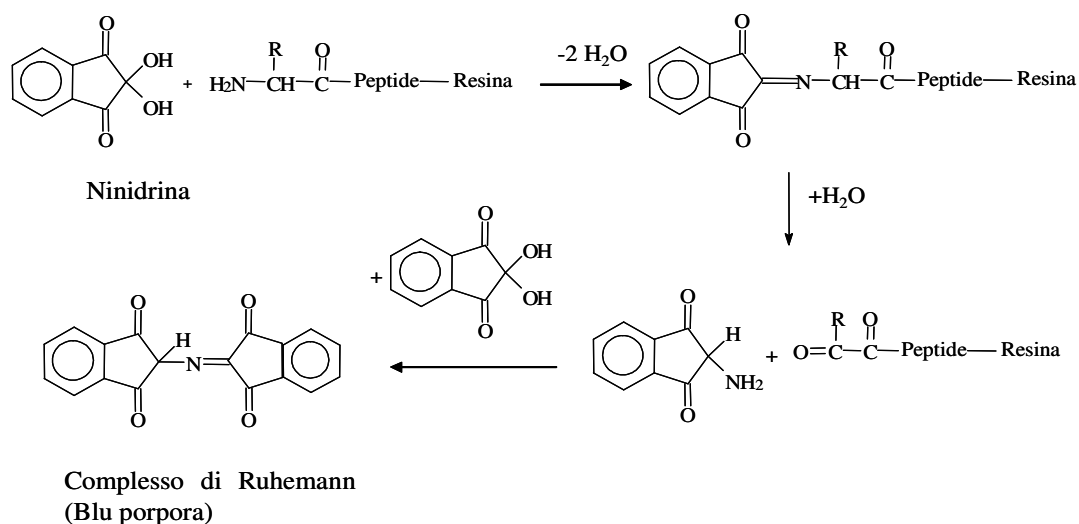


Figura 2.8 Reazione della ninidrina con il residuo N-terminale del peptide in crescita.

2.2.1.4 Sblocco del peptide dalla resina

Quando nella sintesi peptidica si utilizzano resine acido labili si può ottenere lo sblocco simultaneo del peptide dalla resina e la liberazione delle catene laterali dai gruppi protettori. Il processo di deprotezione in ambiente acido può, però generare specie altamente reattive (es. carbocationi) che possono causare modificazioni covalenti di alcuni residui amminoacidici. L'uso di reagenti nucleofili, denominati *scavengers* (reattivi con proprietà simili a quelle delle specie da proteggere), assieme al TFA durante lo sblocco, permette di ridurre in modo rilevante le reazioni collaterali indesiderate [40, 47]. La scelta della miscela di sblocco, del tipo di *scavengers* ed il tempo richiesto dalla deprotezione, dipendono dalla sequenza amminoacidica, ed in primo luogo dalla natura e numero dei gruppi protettori utilizzati in catena laterale. Si riporta di seguito una procedura di sblocco generale [48], che in questo lavoro di tesi è stata utilizzata per lo sblocco del peptide EAbuK dalla resina superacidolabile Fmoc-Lys(Boc)-Sasrin e la simultanea deprotezione dai gruppi protettori laterali, dopo aver effettuato il legame covalente specifico con TAMRA (Capitolo 3).

- Procedura generale per uno sblocco completo:

1. conclusa la sintesi si libera, con procedura automatizzata, la funzione N-terminale dal gruppo protettore Fmoc trattando il peptide protetto su resina con una soluzione 20% piperidina in DMF per 20 minuti;
2. il peptide protetto su resina senza Fmoc viene lavato con DCM e posto a seccare per circa 2 ore sotto vuoto (fino a peso costante);
3. il peptide su resina viene trasferito in un pallone e trattato con una soluzione: 95% TFA, 2,5% H₂O MilliQ e 2,5% TES (v/v/v) [49];
4. la miscela viene mantenuta sotto agitazione magnetica, a temperatura ambiente, per 1 ora e 30 minuti. Il tempo può essere incrementato in funzione del numero e del tipo di gruppi protettori presenti in catena laterale;
5. la resina viene separata per filtrazione su gooch G3 e la soluzione contenente il peptide viene portata a piccolo volume in evaporatore rotante;
6. In seguito all'aggiunta di etere dietilico freddo (~ 4°C), si ha la precipitazione del peptide, che viene successivamente filtrato con gooch G4, seccato, poi sciolto con H₂O MilliQ e liofilizzato.

Per la sintesi del peptide Aoa77EAbuK non si è potuto seguire questa procedura di sblocco generale, perché, mentre le condizioni di rimozione dei gruppi protettori in catena laterale rimangono acide, il clivaggio della resina Tentagel S-OH può essere effettuato in condizioni basiche. Si è quindi operato in due step successivi:

1. si sono rimossi i gruppi protettori laterali con la miscela acida: 95% TFA, 2,5% H₂O MilliQ e 2,5% TES (v/v/v) [49] lasciando reagire per 1 ora sotto agitazione magnetica;

2. dopo aver lavato bene il peptide deprotetto su resina con H₂O MilliQ, lo si è trattato con una soluzione 100 mM di NaOH per 25 minuti sotto blanda agitazione magnetica. Entrambe le reazioni sono state effettuate in un reattore di sintesi. Al termine della seconda reazione si è filtrata la soluzione con il peptide in un pallone e si è portato il pH a condizioni neutre/leggermente acide con una goccia di acido acetico. Da questo momento si è potuto seguire lo schema per lo sblocco generale per quanto riguarda gli ultimi due punti (5 e 6).

2.2.2 Purificazione e caratterizzazione cromatografica

La purificazione mediante separazione dei peptidi desiderati dai prodotti secondari di reazione si è ottenuta attraverso la tecnica cromatografica *Reverse Phase – High Performance Liquid Chromatography* (RP-HPLC). Questa tecnica è nata come tecnica preparativa ma si è affermata poi anche come tecnica analitica, ed è adatta alla separazione di specie non volatili termicamente labili come i peptidi [50].

L'HPLC a fase inversa è una cromatografia di ripartizione in cui la fase stazionaria ha caratteristiche apolari, mentre come fase mobile si possono utilizzare miscele a vario titolo, composte da soluzioni acquose e solventi organici (in questo lavoro di tesi si è usato esclusivamente acetonitrile come solvente organico).

L'interazione che permette la ritenzione dei peptidi nella fase stazionaria è di tipo idrofobico. La cromatografia può essere eseguita in modalità isocratica o in gradiente. In quest'ultimo caso, un aumento graduale della concentrazione di solvente organico rispetto all'acqua incrementa l'idrofobicità della fase mobile e determina la competizione tra questa e la fase stazionaria, con conseguente deadsorbimento dell'analita ad una data percentuale di solvente organico e successiva eluizione.

Generalmente, i peptidi si separano meglio in ambiente acido, conseguentemente la maggior parte delle fasi mobili contiene basse concentrazioni di acido TFA (0,05% nel caso degli eluenti usati durante il lavoro di tesi) il quale agisce come coppia ionica, aumentando la ritenzione, favorendo la solubilità dei peptidi e riducendo le interazioni elettrostatiche di questi con gli eventuali residui silanologici presenti sulla fase stazionaria. In questo lavoro di tesi le analisi si sono effettuate utilizzando come eluenti 0,05% di TFA in H₂O MilliQ (Eluente A) e 0,05% di TFA in acetonitrile (Eluente B) opportunamente degasati con elio. La soluzione contenente il campione viene introdotta in testa alla colonna cromatografica tramite aspirazione nel caso di purificazione cromatografica, o per iniezione di piccolissime quantità di analita per scopi analitici (utilizzando un pescante per gli eluenti). In Figura 2.9 viene riportato lo schema di funzionamento dell'analisi cromatografica.

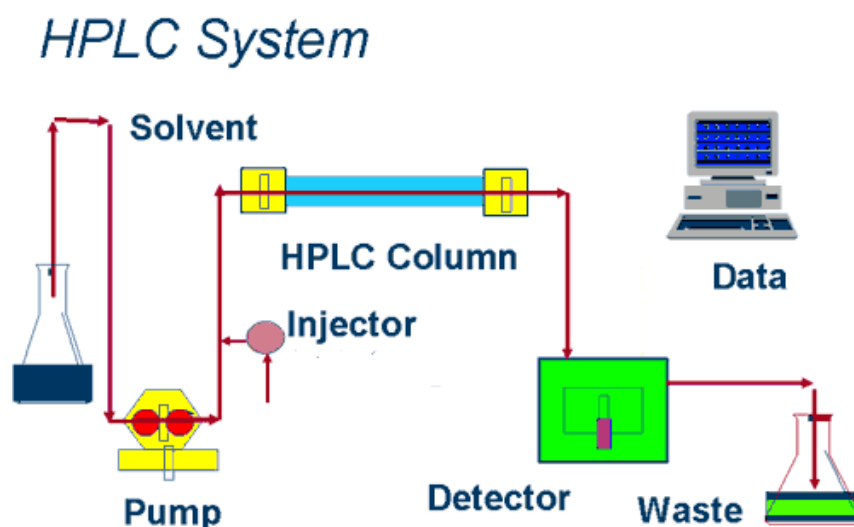


Figura 2.9 Schema un cromatografo liquido.

La cromatografia preparativa si riferisce al processo di isolamento di un composto presente in una miscela.

L'obiettivo della cromatografia analitica, è invece caratterizzare il campione in esame, ovvero giungere alla sua identificazione, e alla quantificazione del suo grado di purezza.

Note le condizioni cromatografiche (colonna, fase mobile e gradiente), il tempo di ritenzione in colonna costituisce un dato strettamente correlabile all'identità della sostanza. Inoltre, poiché l'area sottesa dal picco della sostanza è direttamente proporzionale alla quantità di campione contenuto nella miscela totale, tramite l'integrazione del tracciato cromatografico è possibile quantificare il grado di omogeneità del prodotto raggiunto dopo purificazione.

2.2.3 Spettrometria di massa

Le analisi di massa di peptidi/proteine utilizzati in questo lavoro di tesi, sono state eseguite con uno strumento ESI-TOF ed uno strumento MALDI-TOF. La spettrometria di massa (MS) è un metodo di analisi distruttivo, che consente di misurare le masse molecolari e di determinare la formula di struttura di composti incogniti, anche disponendo di quantità estremamente esigue.

Lo spettrometro è formato essenzialmente da tre parti:

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

In Figura 2.10 è rappresentato in modo schematico uno spettrometro di massa.

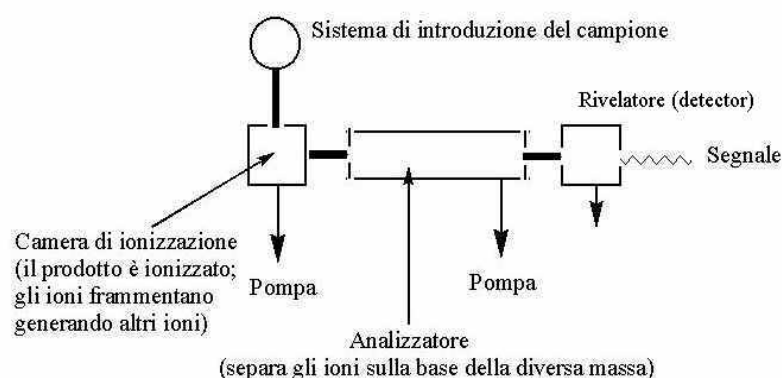


Figura 2.10 Schema di uno spettrometro di massa.

Il campione viene ionizzato in un'apposita camera di ionizzazione per impatto con un fascio di elettroni, atomi, ioni o fotoni, secondo la tecnica di ionizzazione utilizzata. Alcune tecniche di ionizzazione sono molto potenti, operano ad alta energia e portano ad una frammentazione spinta (tecniche *hard*), altre invece operano a bassa energia producendo un numero inferiore di ioni (tecniche *soft*).

Le tecniche di ionizzazione si dividono in base al tipo di sorgente utilizzata.

- ✓ Lo strumento ESI-TOF utilizza una tecnica di ionizzazione nota come *ElectroSpray Ionization* (ESI) [51] che permette una ionizzazione del campione a temperatura ambiente e la formazione di specie multicarica, e con un analizzatore di tipo TOF (*time of flight* = a tempo di volo) che seleziona gli ioni in base al loro rapporto m/z (massa/carica) e al tempo che essi impiegano per percorrere l'analizzatore. L'analizzatore TOF può misurare valori di massa anche estremamente elevati con un'alta sensibilità. Un rivelatore infine, acquisisce il flusso di ioni e trasforma il flusso di corrente in un segnale che può essere amplificato, inviato ad un computer e poi processato dal software "Data Explorer TM". La tecnica di ionizzazione ESI (*ElectroSpray Ionization*) [51] utilizza un gas inerte (es. azoto) per favorire il processo di nebulizzazione che viene provocato da una forte differenza di potenziale applicata all'ago metallico dell'iniettore il quale rilascia le goccioline cariche di soluzione (analita e solvente). L'ESI (Figura 2.11 a.) ha due caratteristiche essenziali: che la ionizzazione si verifica a pressione atmosferica e che sulla specie molecolare si può depositare una carica multipla. 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.
- ✓ Nella tecnica di ionizzazione MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*) [52] il campione è immerso in un largo eccesso di matrice e bombardato da un fascio laser invece che da un fascio di atomi accelerati. L'energia del laser è sufficiente per formare ioni quasimolecolari MH^+ ma si possono anche formare cluster analita-

matrice protonati o addotti con eventuali cationi presenti nella matrice. Il laser colpisce le molecole di matrice che, assorbendo la luce ultravioletta, passano ad uno stato eccitato e provocano un veloce riscaldamento della regione interessata; si ottiene così l'espulsione di aggregati di analita solvatato dalle molecole di matrice e una desolvatazione con conseguente trasferimento di un protone (reazione acido-base tra le molecole di analita e della matrice; Figura 2.11 b).

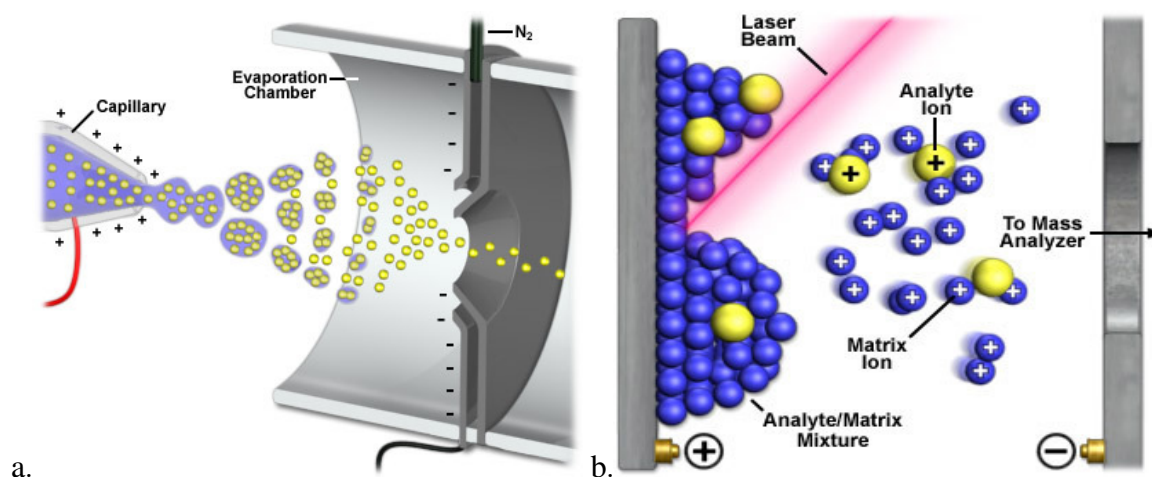


Figura 2.11 Rappresentazione schematizzata del processo di ionizzazione in una sorgente di tipo ESI (a) e di tipo MALDI (b).

La rielaborazione dei segnali in uscita dal rivelatore fornisce uno spettro di massa: cioè una serie di picchi di intensità variabile la cui posizione corrisponde ad un determinato valore di m/z mentre sull'asse delle ordinate sono riportati i valori di 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.

2.2.4 Spettroscopia di assorbimento UV/Vis

La radiazione UV/Vis copre un'ampia parte dello spettro elettromagnetico tra i 700 e i 10 nm; ma, generalmente le parti più utilizzate a scopi analitici sono il visibile (700-400 nm) e l'UV vicino (400-200 nm) [53].

Il principio su cui si basa la spettroscopia UV/Vis è quello di eccitare attraverso una radiazione gli elettroni che si trovano nei livelli energetici di una certa molecola, promuovendoli in orbitali ad energia maggiore. Affinché tale transizione abbia luogo, l'energia assorbita deve corrispondere esattamente alla differenza di energia tra i due orbitali. In un classico spettrofotometro doppio raggio UV/Vis, la radiazione policromatica generata da una sorgente (lampada a idrogeno o a deuterio per UV, lampada a tungsteno per Vis) viene

inviata ad un monocromatore; questo dispositivo seleziona la lunghezza d'onda d'interesse e la invia contemporaneamente ad una cella (con pareti in quarzo, trasparente alla radiazione) contenente la soluzione con il campione e ad un'altra cella contenente il solvente. In questo modo, con l'acquisizione dei dati tramite un rivelatore ed un registratore computerizzato, si possono facilmente eliminare le bande di assorbimento del solvente, e registrare lo spettro della sostanza in esame. La legge di Lambert-Beer descrive i rapporti tra assorbanza misurata, concentrazione del campione e lunghezza del cammino ottico:

$$A = \epsilon_{\lambda} \times b \times c \quad [4]$$

dove A è la differenza tra il valore di assorbanza del campione e il valore di assorbanza della soluzione di riferimento, c è la concentrazione molare, b è il cammino ottico espresso in cm ed ϵ_{λ} [$M^{-1}cm^{-1}$] è il coefficiente di estinzione molare della sostanza a quella particolare lunghezza d'onda.

A basse concentrazioni e per valori di assorbanza comprese tra 0,1-0,8, esiste una correlazione lineare tra A e c , e l'equazione [4] può quindi essere descritta da una retta passante per l'origine in cui, per un percorso ottico di 1 cm, il coefficiente angolare corrisponde ad ϵ .

La scelta della lunghezza d'onda appropriata, viene effettuata osservando lo spettro di assorbimento della sostanza in esame. Per avere il massimo di sensibilità ci si deve posizionare a λ_{max} di assorbimento; tuttavia spesso si deve tener conto anche di altri aspetti:

- ✓ la lunghezza d'onda scelta deve essere in un intervallo in cui l'assorbanza non vari eccessivamente in funzione di λ ;
- ✓ se sono presenti altre sostanze o altri gruppi in grado di assorbire a λ_{max} è preferibile scegliere una banda di assorbimento che sia riconducibile al solo composto in esame.

2.2.5 Matrici biologiche

In questo lavoro di tesi si sono svolti differenti esperimenti su matrici biologiche costituite da pericardi bovini e porcini decellularizzati tramite metodologia TRI-COL.

Sia la decellularizzazione dei pericardi che le misurazioni delle proprietà fisiche (massa, area, ecc.) effettuate sui dischetti di matrice dopo gli esperimenti sono stati effettuati dalla Dott.ssa Sabrina Facciolo presso il Dipartimento di Biologia "A.Vallisneri" dell'Università di Padova.

Inoltre, per il primo esperimento si è utilizzata la tecnica della microscopia ad epifluorescenza per poter verificare la presenza o meno del peptide EAbuK marcato con TAMRA all'interno dello spessore del pericardio bovino.

2.2.5.1 Decellularizzazione mediante protocollo TRI-COL

In questi esperimenti è stato applicato un metodo innovativo di decellularizzazione, denominato TRI-COL, perché prevede l'uso di due detergenti: Triton X-100 (TRI-) e colato (-COL).

In particolare, questo protocollo prevede un primo step in cui il tessuto viene trattato con inibitori di proteasi (benzamidina, iodoacetamide, PMSF, NEM); successivamente il tessuto viene lavato con soluzione ipotonica, seguito da un altro step con inibitori di proteasi in presenza di Triton X-100. In seguito il tessuto viene lavato (con soluzione di Triton X-100 e NaN_3 in tampone), e poi immerso in soluzione ipertonica contenente sempre Triton X-100.

Dopo altri due lavaggi (con soluzione di Triton X-100 e NaN_3 in tampone), il pericardio viene trattato con una soluzione contenente colato di sodio. Poi, dopo due lavaggi in PBS isotonic a pH fisiologico, il pericardio viene posto in soluzione fisiologica, e successivamente in soluzione fisiologica addizionata con isopropanolo, con lo scopo di togliere i residui di colato di sodio e Triton X-100.

Per digerire gli acidi nucleici presenti, il tessuto viene poi trattato con benzonasi, ed infine conservato in PBS o soluzione fisiologica a $+4^\circ\text{C}$.

2.2.5.2 Misurazione delle proprietà fisiche delle matrici biologiche

Al fine di valutare l'effetto della presenza dei peptidi sia auto-assemblanti che non auto-assemblanti nelle matrici di pericardio decellularizzato, dopo ogni esperimento si sono misurate le seguenti proprietà fisiche: massa, area, densità, volume, spessore e contenuto d'acqua di ciascun dischetto. Quest'ultime sono state messe a confronto con le medesime proprietà fisiche misurate da dischetti di pericardio decellularizzato non trattati con i peptidi ed utilizzati come riferimento.

Di seguito vengono riportate le procedure seguite per la misurazione delle proprietà fisiche.

Massa [g]:

I dischetti di pericardio decellularizzato, dopo il trattamento con i peptidi e i successivi lavaggi si trovano sospesi in H_2O milliQ oppure in PBS (in base al trattamento previsto dall'esperimento effettuato).

Ciascun dischetto viene asciugato su carta da filtro/assorbente, posizionato in una piastra Petri, usata come tara, e pesato con una bilancia analitica. La misura della massa è stata registrata dopo 2 minuti dal posizionamento del campione, quando il valore diveniva stabile.

Area [cm^2]:

Dopo essere stati pesati, i dischetti di pericardio si sono posizionati in una piastra Petri e coperti con un vetrino porta-oggetto per istologia, in modo da stenderli. Si è posizionato a lato dei campioni un righello professionale, in modo da avere un'unità di misura di riferimento.

Quindi i campioni sono stati fotografati con macchina fotografica digitale Canon EOS50D con macro-obiettivo Canon EF 100 mm, mantenuta a distanza fissa (20 cm) dal piano fotografato. Il programma MacBiophotonics ImageJ 1.42I è stato utilizzato per tracciare il contorno di ogni dischetto di pericardio e misurarne l'area, prendendo il righello come riferimento.

Densità [g/mL]:

La densità dei dischetti è stata determinata preparando una scala di soluzioni di Percoll disciolto in PBS 10x, di diversa densità. La preparazione ha richiesto la misura della densità di un volume noto (100 mL) di PBS con concentrazione 10x:

1. si è posto un matraccio da 100 mL, chiuso con tappo, sulla bilancia analitica per effettuare la misura della tara;
2. Il matraccio è stato rimosso dalla bilancia e riempito con 100 mL PBS 10x;
3. la massa è stata registrata dopo 2 minuti;
4. la densità è stata calcolata con la seguente formula:

$$\rho = m / V \quad [5]$$

dove ρ [g/mL] è la densità della soluzione, m [g] è la massa misurata e V [mL] è il volume della soluzione, che in questo caso è di 100 mL.

Quindi, è stato calcolato il volume di Percoll da aggiungere al PBS 10x, per preparare la soluzione con densità prescelta, usando la seguente formula (come indicato dal produttore):

$$V_p = V_f(\rho_f - 0,1 \rho_{10x} - 0,9) / (\rho_p - 1) \quad [6]$$

dove: V_p [mL] è il volume di Percoll; V_f [mL] è il volume finale della soluzione; ρ_f [g/mL] è la densità finale della soluzione; ρ_{10x} [g/mL] è la densità del PBS concentrato 10 volte (10x) e ρ_p [g/mL] è la densità del Percoll pari a 1,130.

Si sono posizionati dei becker contenenti le soluzioni di Percoll di densità compresa tra 1,039 g/mL e 1,075 g/mL in ordine di densità crescente, con una differenza di 0,003 g/mL tra una soluzione e la successiva. Per consentire una misura il più precisa possibile della densità, l'esperimento è stato condotto a temperatura costante ($24^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$) mantenendo le soluzioni ben miscelate, in modo che le micro particelle di Percoll si distribuissero uniformemente. Iniziando dalla soluzione a densità minore, i dischetti sono stati immersi in successione in ciascun becker e si è osservata la fluttuazione del campione all'interno della soluzione. Si è assunto che la densità di ciascun dischetto fosse pari alla densità della soluzione nella quale il dischetto rimaneva galleggiante circa a metà del volume, senza risalire verso la superficie o depositarsi sul fondo del bicchiere.

Volume [cm³]:

Il volume di ciascun dischetto di pericardio è stato calcolato usando la seguente formula:

$$V = m / \rho \quad [7]$$

dove: V è il volume del dischetto di pericardio espresso in [cm³]; m è la massa del dischetto in [g] e ρ è la densità in [g/mL].

Spessore [cm]:

Lo spessore medio di ogni dischetto di pericardio è stato calcolato con la seguente formula:

$$s = m / (\rho \times A) \quad [8]$$

dove: s rappresenta lo spessore medio in [cm]; m è la massa del dischetto in [g]; ρ è la densità in [g/mL] e A è l'area del dischetto in [cm²].

Contenuto d'acqua [%w/w]:

I dischetti di pericardio sono stati congelati a -20°C overnight e poi a -80°C per 8 ore.

Quindi i campioni sono stati essiccati in campana da vuoto a 37°C in 2 cicli da 24 ore ciascuno in presenza di P₂O₅.

I campioni così seccati, sono stati pesati secondo il metodo descritto in precedenza per la determinazione della massa.

Infine, il contenuto d'acqua è stato valutato attraverso la formula seguente:

$$\text{contenuto d'acqua} = 100\% - (\text{peso secco} / \text{peso idratato}) 100\% \quad [9]$$

dove per *peso idratato* si intende la massa del dischetto prima della essiccazione.

2.2.5.3 Microscopia ad epifluorescenza

La microscopia ad epifluorescenza è un particolare metodo di microscopia a fluorescenza, ed è largamente utilizzato nell'ambito della biologia.

In Figura 2.12 viene riportato lo schema di funzionamento di un microscopio ad epifluorescenza.

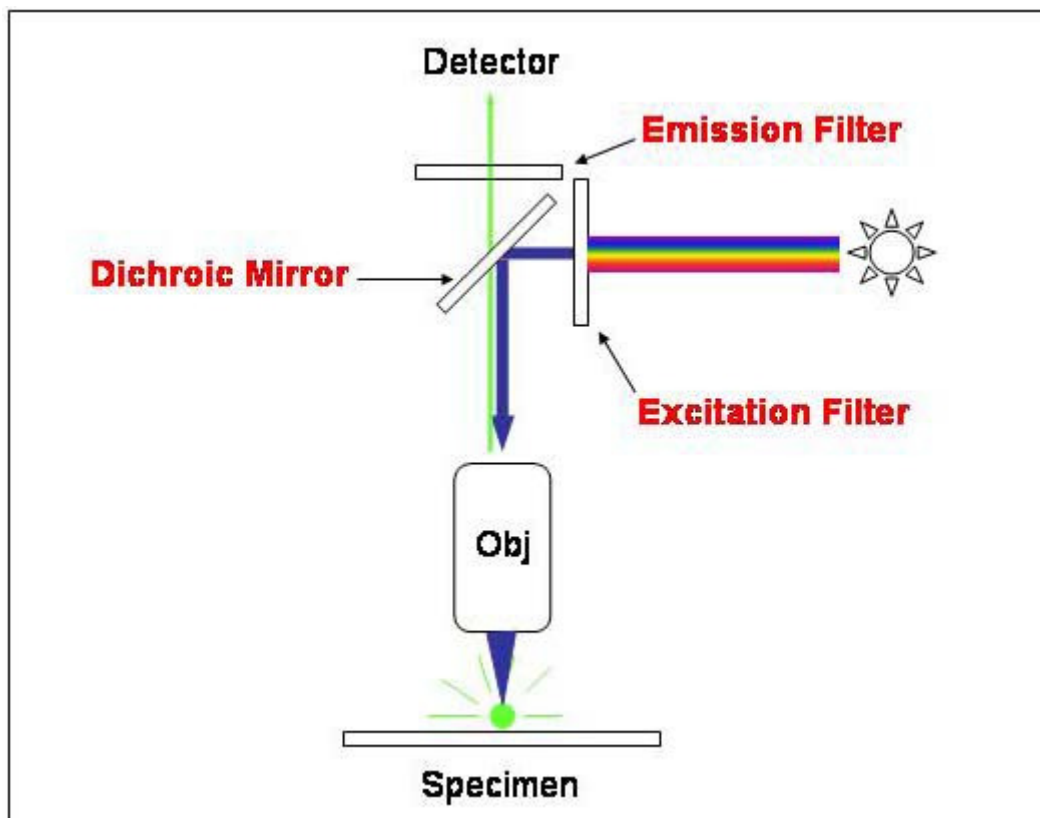


Figura 2.12 Schema di funzionamento di un microscopio ad epifluorescenza.

In pratica si ha una luce sorgente che solitamente è una lampada a xenon o a mercurio, che generalmente emette nel range UV/Visibile. La lampada emette luce in un range molto ampio, ma si vuole eccitare il fluoroforo contenuto nel campione da analizzare con una ben determinata lunghezza d'onda (in questo lavoro di tesi il fluoroforo utilizzato è la 5(6)-carbossitetrametilrodamina). Per questo scopo si utilizza un filtro di eccitazione che fa passare solo una certa lunghezza d'onda o, per essere più precisi, fa comunque passare un range di lunghezze d'onda, ma molto più ristretto di quello emesso dalla lampada. La luce emessa arriva ad uno specchio dicroico. Quest'ultimo è uno specchio particolare che può riflettere la luce o farla passare a seconda della lunghezza d'onda. Il campione viene quindi eccitato ed emette una luce di diversa lunghezza d'onda che passa nuovamente attraverso l'obiettivo ed arriva allo specchio dicroico. Lo specchio questa volta fa passare la luce emessa dal campione che può quindi arrivare al detector. Generalmente prima del detector c'è un altro filtro, detto filtro di emissione, che fa vedere solo una parte delle lunghezze d'onda emesse e questo è utile per eliminare l'eventuale altra luce (generata per qualsiasi motivo) che sia passata nell'obiettivo.

Il grosso vantaggio di questo sistema è che è relativamente semplice da usare e poco costoso ed ha una medio-buona sensibilità.

In questo lavoro di tesi per l'osservazione all'epifluorescenza dei campioni di pericardio è stato utilizzato il microscopio a fluorescenza "Leica DC 300F".

Per poter osservare al microscopio ad epifluorescenza i campioni di pericardio, è stato necessario includerli in resina "Optimal Cutting Temperature" (OCT).

Inclusione in resina OCT:

1. I campioni sono stati immersi nel mezzo di inclusione OCT liquido, all'interno di vaschette di plastica;
2. le vaschette sono state immerse in isopentano freddo e sono state poste all'interno di un vaso Dewar con N₂ liquido, fino al congelamento del mezzo di inclusione;
3. i campioni inclusi sono stati posti a -20°C e successivamente conservati a -80°C.

I campioni così inclusi in OCT sono stati tagliati al criostato in sezioni trasversali di 7µm prima di essere analizzati al microscopio ad epifluorescenza.

2.2.6 Analisi statistica

Per effettuare l'analisi statistica dei risultati ottenuti in questo lavoro di tesi è stato utilizzato il programma statistico Minitab.

Il programma restituisce la rappresentazione grafica dei dati mediante istogramma, curva di normalità e box-plot. Un istogramma (o diagramma delle distribuzioni di frequenza) raccoglie i dati in modo più compatto (anche se con minor dettaglio) e consente di visualizzare, con immediatezza, la distribuzione degli stessi.

La curva riportata sopra l'istogramma, serve a dare una prima approssimazione della distribuzione campionaria ad una distribuzione di tipo normale.

Il box-plot è una rappresentazione grafica che presenta diversi importanti indicatori dei dati osservati, quali tendenza centrale o locazione, dispersione o variabilità, allontanamento dalla simmetria distributiva e identificazione di quelle osservazioni anomale che sono distanti dal nucleo centrale dei dati (che vengono spesso denominate "outliers"). Questo grafico presenta i tre quartili, il valore minimo e massimo in una scatola rettangolare; l'ampiezza del rettangolo rappresenta la differenza interquartile con il primo quartile a sinistra ed il terzo quartile all'estremo a destra. Una linea intermedia corrisponde al secondo quartile (o mediano). Due segmenti esterni al rettangolo si estendono ai valori estremi, minimo a sinistra e massimo a destra. Questi segmenti vengono chiamati "whisker" (baffi). In alcuni software tali "baffi" sono estesi di un valore pari a $1,5(Q3-Q1)$ oltre gli estremi del rettangolo e le osservazioni che non cadono entro questi limiti sono assunte come possibili outliers.

Vengono inoltre riportati gli intervalli di confidenza al 95% della media e della mediana del campione.

Un intervallo di confidenza, calcolato dalla statistica campionaria, è definito come quel range di valori che contiene con maggiore probabilità uno sconosciuto parametro relativo all'intera popolazione. A causa della natura casuale dei dati raccolti è molto difficile che due campioni diversi della stessa popolazione diano un intervallo di confidenza uguale. Se si ripettesse il campionamento diverse volte alla fine si otterrebbe che il parametro della popolazione risulterebbe essere compreso, con una certa percentuale, all'interno di un determinato intervallo di confidenza.

La percentuale con cui questo parametro sconosciuto risulta essere compreso nell'intervallo di confidenza viene chiamato livello di confidenza dell'intervallo [54]. Considerare un livello di confidenza del 95% significa quindi che, se facessi 100 campionamenti della stessa popolazione, otterrei che i dati relativi a 95 campioni producono intervalli di confidenza che contengono il valore del parametro della popolazione, mentre ciò non si verifica per i restanti 5. Il software restituisce oltre ai grafici anche una tabella contenente: il risultato del test di normalità di *Anderson-Darling* [55], i risultati della statistica descrittiva, e gli intervalli di confidenza per la media (*Mean*), la deviazione standard (*StDev*) e la mediana (*Median*).

Molto importante è il risultato ottenuto dai test di normalità effettuati sui campioni. Un test di normalità consiste in un semplice test d'ipotesi effettuato per poter affermare che la popolazione dalla quale è stato estratto il campione sia o meno normale. Molte procedure statistiche infatti si basano sull'assunzione di normalità della popolazione; dunque, effettuare un test di normalità per verificare se rifiutare o meno quest'assunzione, risulta essere un passo molto importante per l'analisi statistica dei dati. L'ipotesi nulla (H_0) del test asserisce che la popolazione sia normale, mentre l'ipotesi alternativa afferma che la popolazione non sia normale. Per effettuare questo test si è utilizzata la procedura di *Anderson-Darling*. Questa effettua un confronto tra la funzione di distribuzione cumulativa empirica relativa ai dati del campione raccolto e la distribuzione che ci si aspetterebbe se i dati seguissero una distribuzione normale. Se la differenza ottenuta da questo confronto è sufficientemente grande, allora il test rifiuterà l'ipotesi nulla di normalità della popolazione in favore dell'ipotesi alternativa di non-normalità. Riassumendo, il test di *Anderson-Darling* misura con quale precisione i dati del campione seguano una specifica distribuzione (in questo caso quella normale); più la distribuzione si adatta ai dati del campione e minore sarà il valore reso da questo tipo di statistica, cioè il valore di *A-squared* riportato nella tabella riassuntiva. Se il *P-value* per il test di *Anderson-Darling*, assume un valore inferiore al livello di significatività α richiesto (nel caso in esame $\alpha = 0,05$) allora si può concludere che i dati non seguono una distribuzione normale e non si può confermare quindi la normalità della popolazione. Per livello di significatività α si intende il massimo livello di rischio accettabile per poter rifiutare l'ipotesi nulla quando essa è vera (errore del 1° tipo) ed è espresso come una probabilità compresa nell'intervallo tra 0 e 1.

Capitolo 3

Parte sperimentale

La parte sperimentale di questa tesi è suddivisa in due argomenti: il primo riguarda il trattamento di matrici biologiche decellularizzate con peptidi auto-assemblanti e non auto-assemblanti con lo scopo di indagarne gli effetti a livello di variazione delle proprietà fisiche; il secondo argomento tratta della *chemoselective ligation* tra un peptide auto-assemblante ed una sequenza peptidica adesiva; in seguito si è tentata la bioconiugazione di un peptide auto-assemblante con un fattore di crescita.

3.1 Trattamento di matrici biologiche decellularizzate

3.1.1 Marcatura di EAbuK con sonda fluorescente

Il peptide auto-assemblante EAbuK carbossi-terminale (capitolo 2, paragrafo 2.1.2.1) era già disponibile su resina (Sasrin superacidolabile), protetto in catena laterale e al terminale α -amminico dal gruppo Fmoc [56].

Si sono pesati 10 mg di peptide protetto su resina e sono stati posti in un reattore da sintesi.

Il peptide è stato fatto reagire per 20 minuti con 1 mL di soluzione al 20% di piperidina in DMF, agitando manualmente.

Il liquido è stato poi drenato via dal reattore in cui è rimasto il peptide protetto su resina, ma senza il gruppo Fmoc all'amminoacido N-terminale. Il peptide su resina è stato seccato in campana da vuoto per 1 ora.

Si è impostata la reazione di coupling tra il peptide auto-assemblante EAbuK protetto su resina e la sonda fluorescente 5(6)-carbossitetrametilrodamina (TAMRA).

Per la reazione di coupling ai 10 mg di EAbuK su resina ($2,498 \times 10^{-6}$ moli) sono stati aggiunti:

- ✓ 4 eq di 5(6)-carbossitetrametilrodamina (TAMRA);
- ✓ 8 eq di DIPEA 2 M in NMP;
- ✓ 4 eq di HBTU/HOBt 0,45 M in DMF.

Si sono pesati dunque 4,45 mg di TAMRA ($PM_{TAMRA} = 430,5$ Da) necessari alla reazione e sono stati sciolti in provetta di vetro con 200 μ L di DMF. A questa soluzione sono stati poi aggiunti:

- 22 μL di soluzione HBTU/HOBt 0,45 M in DMF;
- 10 μL di soluzione DIPEA 2 M in NMP.

Si è lasciato reagire per 10 minuti proteggendo la soluzione dalla luce con foglio di alluminio, data la fotosensibilità del reagente TAMRA.

La soluzione così preparata (232 μL) è stata in seguito trasferita nel reattore di sintesi con EAbuk su resina. Si è lasciato reagire per 2 ore con agitazione magnetica blanda e proteggendo la miscela dalla luce. In Figura 3.1 è riportata la reazione di coupling tra il peptide auto-assemblante su resina e la sonda fluorescente.

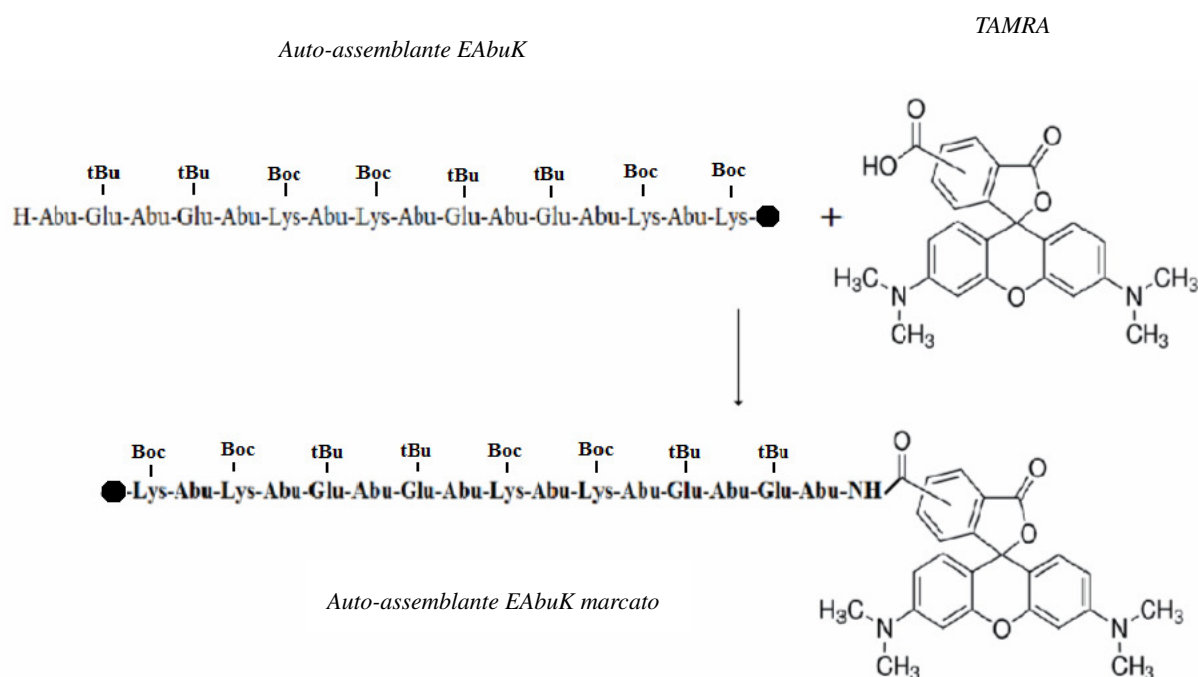


Figura 3.1 Schema di reazione tra il peptide EAbuk e la sonda fluorescente 5(6)-carbossitetrametilrodamina (TAMRA) per formare il peptide marcato (EAbuk-TAMRA) su resina.

Al termine della reazione la soluzione è stata drenata dal reattore e si sono effettuati 3 lavaggi del peptide marcato su resina con DMF e 3 lavaggi con DCM. Si è proceduto con i lavaggi finché la soluzione filtrata non è apparsa completamente limpida e trasparente, per allontanare il reagente TAMRA non reagito.

Il peptide marcato è stato messo a seccare sotto vuoto per 30 minuti. In seguito si è effettuato il test alla ninidrina, che ha permesso di valutare la resa percentuale di coupling, risultata pari all'85,83%.

3.1.1.1 Caratterizzazione del peptide grezzo marcato

Si è proceduto allo sblocco di tutto il peptide auto-assemblante marcato con TAMRA recuperato (circa 8 mg). Si è effettuato uno sblocco completo del peptide (capitolo 2, paragrafo 2.2.1.4) utilizzando una miscela così composta:

- 0,950 mL di TFA;
- 0,025 mL di TES;
- 0,025 mL di H₂O MilliQ.

Si è lasciato reagire per 1 ora e 30 minuti sotto blanda agitazione magnetica e si è poi proceduto con la metodologia di sblocco completo (capitolo 2, paragrafo 2.2.1.4). Sono stati sciolti 0,3 mg di EAbuK-TAMRA in 300 μ L di H₂O milliQ e sono stati filtrati. Con questa soluzione è stata effettuata un'analisi RP-HPLC con le seguenti condizioni: colonna: Symmetry Shield C₈; flusso: 1 mL/min; eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B: 0,05% TFA in CH₃CN; iniezione campione: 20 μ L; gradiente: dal 20% al 35% di eluente B in 30 minuti; lettura assorbanza a 214 nm e 555 nm. Successivamente, mediante un'analisi cromatografica analitica, condotta nelle le stesse condizioni della precedente, ma iniettando 60 μ L di campione, sono state raccolte le frazioni corrispondenti ai picchi: $t_{R1} = 15,666$ min e $t_{R2} = 17,430$ min. In Figura 3.2 si può vedere il cromatogramma della soluzione del peptide auto-assemblante reagito con TAMRA (in nero), e grazie alla sovrapposizione con il cromatogramma (in blu) di riferimento di una soluzione di TAMRA (pura) in PBS (concentrazione 1mg/1mL, poi ulteriormente diluita 1:10 con PBS) di cui sono stati iniettati 100 μ L, si può dedurre che il campione di EAbuK-TAMRA è effettivamente privo di TAMRA libera.

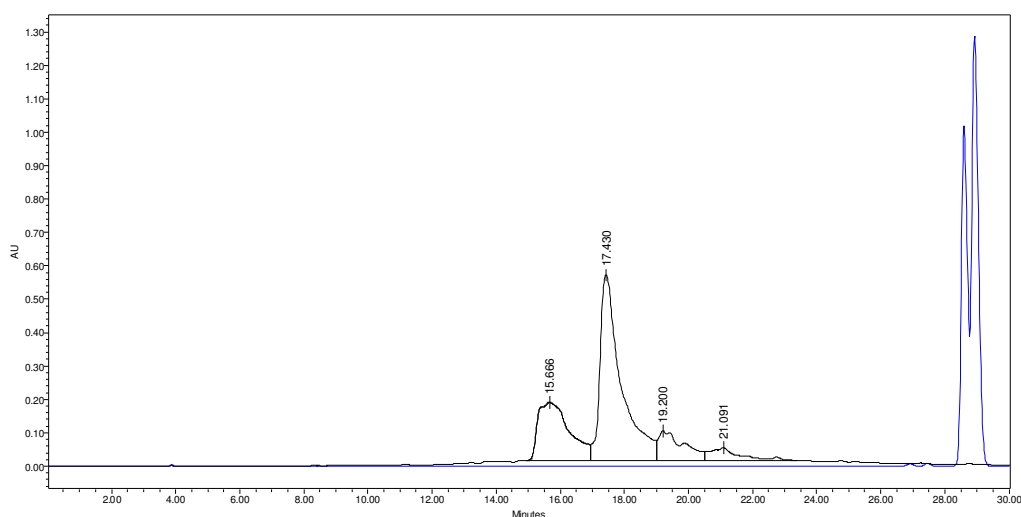


Figura 3.2 Sovrapposizione dei cromatogrammi analitici in RP-HPLC del peptide EAbuK-TAMRA (nero) e di TAMRA (blu); Le analisi sono state svolte nelle seguenti condizioni: colonna: Symmetry Shield; flusso: 1 mL/min; eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B: 0,05% TFA in CH₃CN; iniezione: 60 μ L di soluzione di EAbuK-TAMRA (1mg/1mL), 100 μ L di soluzione di TAMRA; gradiente dal 20% all'35% di eluente B in 30 min; lettura dell'assorbanza a 555 nm.

E' stato seccato 1 mL di ciascuna delle due frazioni raccolte: l'analisi di massa (ESI-TOF) ha permesso di verificare che i due picchi del cromatogramma corrispondono entrambi al peptide EAbuK-TAMRA dal peso molecolare pari a: $PM_{EAbuK-TAMRA} = 2140,52$ Da. La presenza di due picchi separati è quindi da imputare alla presenza dei due isomeri della TAMRA: la 5-carbossitetrametilrodamina e la 6-carbossitetrametilrodamina, legati al peptide auto-assemblante. In Figura 3.3 è riportato il risultato dell'analisi di massa del picco a $t_{R2} = 17,430$ min.

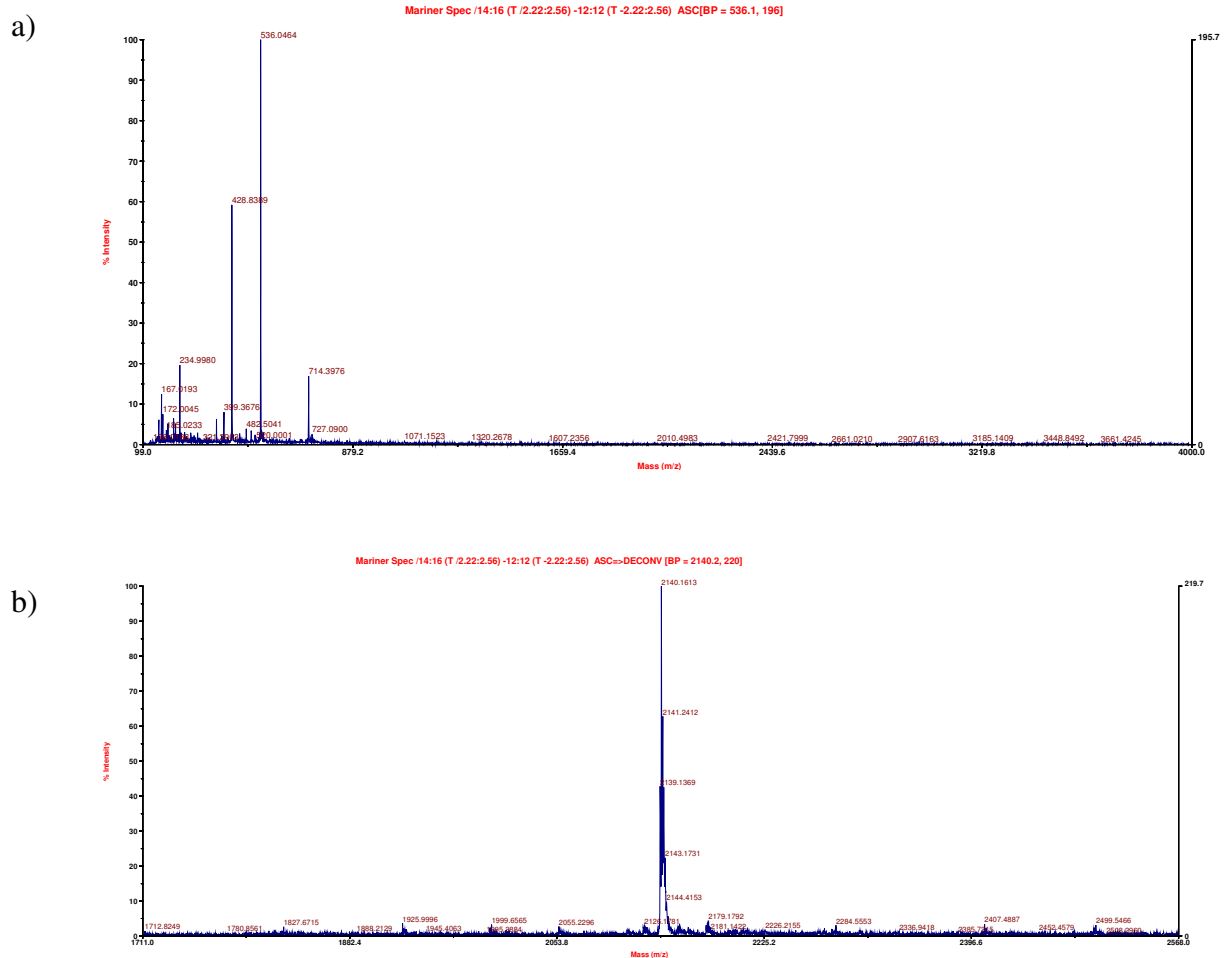


Figura 3.3 a) spettro di massa ESI-TOF della frazione raccolta a $t_{R2} = 17,430$ min; b) deconvoluzione della stessa frazione.

Il risultato dell'analisi di massa ESI-TOF del picco a $t_{R1} = 15,666$ è analogo.

3.1.1.2 Trattamento di pericardio bovino decellularizzato con EAbuK-TAMRA

Per verificare la capacità di penetrazione del peptide auto-assemblante all'interno della matrice biologica, si sono utilizzati i pericardi decellularizzati tramite metodologia TRI-COL di due bovini che si sono denominati "bovino A" e "bovino B". Sia la decellularizzazione che la preparazione dei dischetti di pericardio sono stati effettuati dalla Dott.ssa S. Facciolo presso

il laboratorio del Prof. M. Spina nel “Dipartimento di Biologia, A. Vallisneri” dell’Università di Padova.

Dal pericardio di ciascun animale sono stati tagliati dalla zona del ventricolo anteriore sinistro (VAS), dove le fibre di collagene sono ben orientate, 4 dischetti di diametro pari a 0,8 cm. Si hanno quindi: 4 dischetti trattati con il peptide EAbuK-TAMRA (2 dischetti dal bovino A e 2 dischetti dal bovino B), ed altri 4 dischetti (2 dischetti dal bovino A e 2 dischetti dal bovino B) di riferimento che non sono stati trattati con il peptide.

Procedura sperimentale:

Sono stati preparati 1400 μL con concentrazione $C = 1 \text{ mM}$ di peptide EAbuK-TAMRA. La soluzione madre è stata preparata sciogliendo 3 mg ($1,4 \times 10^{-6}$ moli) di EAbuK-TAMRA in 1400 μL di H_2O MilliQ. Con la soluzione così preparata, prima di procedere con l’esperimento, è stata effettuata un’analisi RP-HPLC in triplicato, con le stesse condizioni riportate al paragrafo precedente per l’analisi della soluzione di EAbuK-TAMRA, ma iniettando 10 μL di soluzione alla volta.

Si è posto ciascun dischetto di pericardio bovino decellularizzato in un pozzetto di una piastra da 48 pt, sono stati aggiunti 300 μL di soluzione madre sui seguenti campioni:

- ✓ 2 dischetti di pericardio decellularizzato proveniente dalla zona VAS del bovino A
- ✓ 2 dischetti di pericardio decellularizzato proveniente dalla zona VAS del bovino B

mentre altri 4 dischetti di riferimento (2 dischetti dal bovino A e 2 dischetti dal bovino B) si sono lasciati in contatto con H_2O MilliQ. La piastra è stata chiusa bene con parafilm, per evitare l’evaporazione della soluzione, e con foglio di alluminio, per la fotosensibilità del fluoroforo. I campioni sono stati lasciati a contatto con la soluzione per 24 ore a temperatura costante di 37°C con blanda agitazione. Al termine delle 24 ore di incubazione, le soluzioni con il peptide residuo sono state recuperate per effettuare delle analisi RP-HPLC in triplicato, con le stesse condizioni per l’analisi della soluzione madre di EAbuK-TAMRA preparata per l’esperimento. Una volta tolte le soluzioni contenenti il peptide marcato su 2 dischetti (1 dischetto dal bovino A e 1 dischetto dal bovino B) è stata aggiunta H_2O MilliQ, mentre gli altri 2 dischetti (1 dischetto dal bovino A e 1 dischetto dal bovino B) sono stati messi a contatto con PBS. Queste soluzioni sono state lasciate per 30 minuti a temperatura di 37°C con blanda agitazione. Il peptide EAbuK-TAMRA rimasto nei 2 dischetti posti in PBS è in grado di auto-assemblare grazie alla presenza di ioni monovalenti; il peptide rimasto nei 2 dischetti trattati poi con H_2O MilliQ dovrebbe rimanere in soluzione e non auto-assemblare; in realtà, si è riscontrato che il peptide tende ad auto-assemblare comunque, grazie alla probabile presenza di ioni residui presenti all’interno della matrice decellularizzata del pericardio.

Al termine dell’esperimento i campioni risultano essere così trattati:

- ✓ 1 da pericardio VAS bovino A trattato con EAbuK-TAMRA e poi H_2O MilliQ;

- ✓ 1 da pericardio VAS bovino B trattato con EAbuK-TAMRA e poi H₂O MilliQ;
- ✓ 1 da pericardio VAS bovino A trattato con EAbuK-TAMRA e poi PBS;
- ✓ 1 da pericardio VAS bovino B trattato con EAbuK-TAMRA e poi PBS;
- ✓ 2 da pericardio VAS bovino A non trattato con peptide e lasciato in H₂O MilliQ;
- ✓ 2 da pericardio VAS bovino B non trattato con peptide e lasciato in H₂O MilliQ.

Risultati e discussione:

Al termine dell'esperimento si sono misurate le proprietà fisiche dei dischetti di pericardio trattati con il peptide e dei dischetti di pericardio di riferimento.

In Tabella 3.1 sono riportate le proprietà fisiche misurate secondo le metodologie riportate al Capitolo 2, paragrafo 2.2.5.2, dei dischetti di pericardio bovino decellularizzato VAS, prima trattato con la soluzione di EAbuK-TAMRA e poi incubato in H₂O MilliQ.

Tabella 3.1 *Proprietà fisiche dei dischetti di pericardio trattati con il peptide EAbuK-TAMRA e poi posti in H₂O MilliQ.*

Pericardio trattato con EAbuK-TAMRA e poi H₂O MilliQ					
	<i>A [cm²]</i>	<i>m [g]</i>	<i>ρ a 24°C [g/mL]</i>	<i>V [cm³]</i>	<i>s [cm]</i>
Bovino A	0.639	0.114	1.049	0.109	0.170
Bovino B	0.701	0.125	1.047	0.119	0.171
MEDIA	<i>0.670</i>	<i>0.120</i>	<i>1.048</i>	<i>0.114</i>	<i>0.170</i>
Dev. St.	<i>0.044</i>	<i>0.008</i>	<i>0.001</i>	<i>0.008</i>	<i>0.000</i>

In Tabella 3.2 sono riportate le proprietà fisiche dei dischetti di pericardio bovino decellularizzato VAS, prima trattato con la soluzione di EAbuK-TAMRA e quindi incubato in PBS.

Tabella 3.2 *Proprietà fisiche dei dischetti di pericardio trattati con il peptide EAbuK-TAMRA e poi posti in PBS.*

Pericardio trattato con EAbuK-TAMRA e poi PBS					
	<i>A [cm²]</i>	<i>m [g]</i>	<i>ρ a 24°C [g/mL]</i>	<i>V [cm³]</i>	<i>s [cm]</i>
Bovino A	0.619	0.079	1.049	0.075	0.122
Bovino B	0.673	0.074	1.047	0.070	0.105
MEDIA	<i>0.646</i>	<i>0.076</i>	<i>1.048</i>	<i>0.073</i>	<i>0.113</i>
Dev. St.	<i>0.038</i>	<i>0.004</i>	<i>0.001</i>	<i>0.004</i>	<i>0.012</i>

In Tabella 3.3 sono riportate le proprietà fisiche dei dischetti di pericardio bovino decellularizzato VAS di riferimento, quindi non trattati con il peptide e lasciati in H₂O MilliQ.

Tabella 3.3 Proprietà fisiche dei dischetti di pericardio di riferimento non trattati con il peptide e poi posti in H₂O MilliQ.

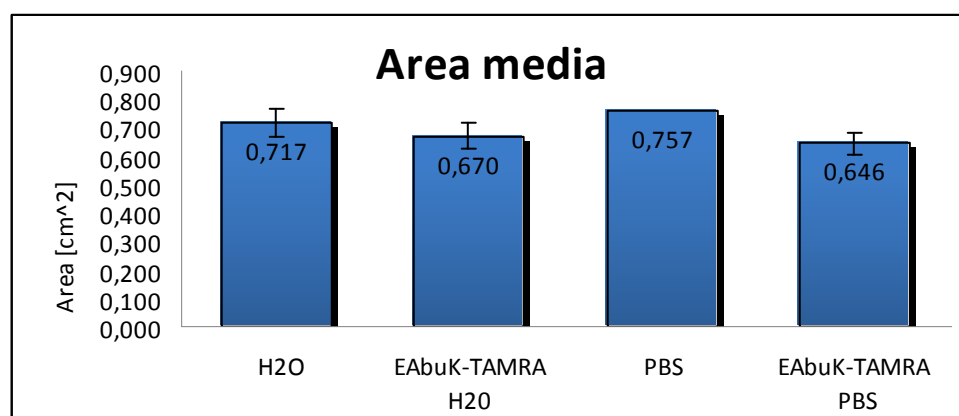
Pericardio non trattato con peptide e lasciato in H ₂ O MilliQ					
	A [cm ²]	m [g]	ρ a 24°C [g/mL]	V [cm ³]	s [cm]
Bovino A	0.726	0.057	1.049	0.055	0.075
Bovino A	0.655	0.056	1.049	0.053	0.081
Bovino B	0.717	0.046	1.047	0.044	0.062
Bovino B	0.771	0.046	1.047	0.044	0.057
MEDIA	0.717	0.051	1.048	0.049	0.069
Dev. St.	0.048	0.006	0.001	0.006	0.011

In questo esperimento non si sono utilizzati dischetti di pericardio di controllo che non fosse trattato con il peptide e fosse mantenuto in PBS invece che in H₂O MilliQ; per questo motivo, come riferimento si sono presi dei dati di media ottenuti dall'analisi di vari frammenti degli stessi pericardi bovini, e riportati poi alla media dell'area di un dischetto. Si sono quindi ottenuti i dati riportati in Tabella 3.4.

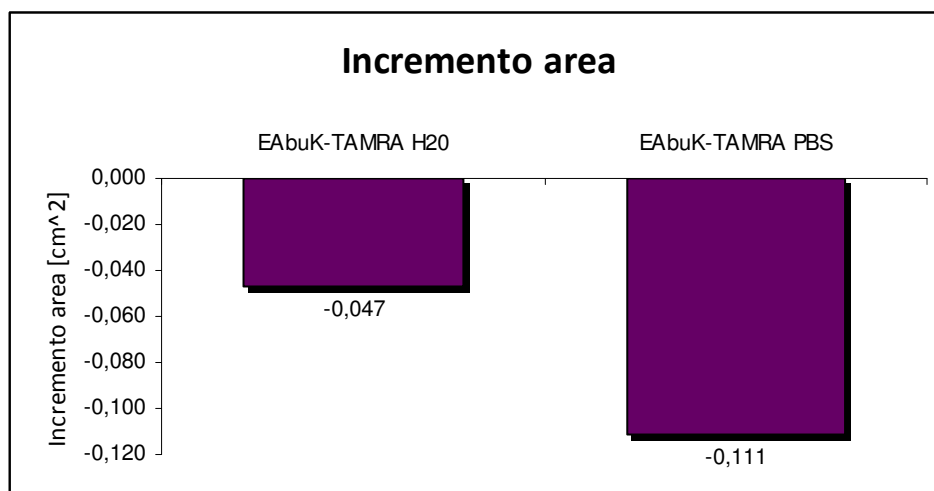
Tabella 3.4 Proprietà fisiche ricavate dall'analisi di frammenti di dischetti per il pericardio di riferimento non trattato con il peptide e poi posto in PBS.

Pericardio non trattato con peptide e lasciato in PBS			
	A [cm ²]	m [g]	s [cm]
MEDIA	0.757	0.057	0.073

Per un'interpretazione più immediata i risultati ottenuti dalla misurazione delle proprietà fisiche dei dischetti di pericardio si sono riportati graficamente. Dai grafici riportati in Figura 3.4 a) e b) è evidente come il trattamento dei dischetti di pericardio con il peptide auto-assemblante EAbuK-TAMRA abbia comportato una diminuzione dell'area degli stessi.



a)



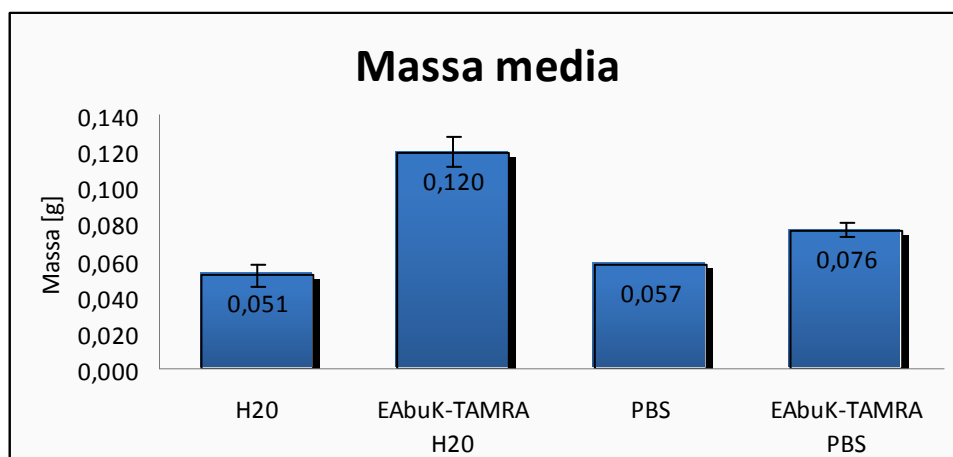
b)

Figura 3.4 a) Confronto tra l'area media [cm²] dei dischetti di pericardio bovino trattati con il peptide e poi immersi in H₂O MilliQ o PBS ed i rispettivi riferimenti; b) incremento dell'area [cm²] dei dischetti di pericardio bovino trattati con EAbuK-TAMRA rispetto all'area dei dischetti di riferimento non trattati con il peptide.

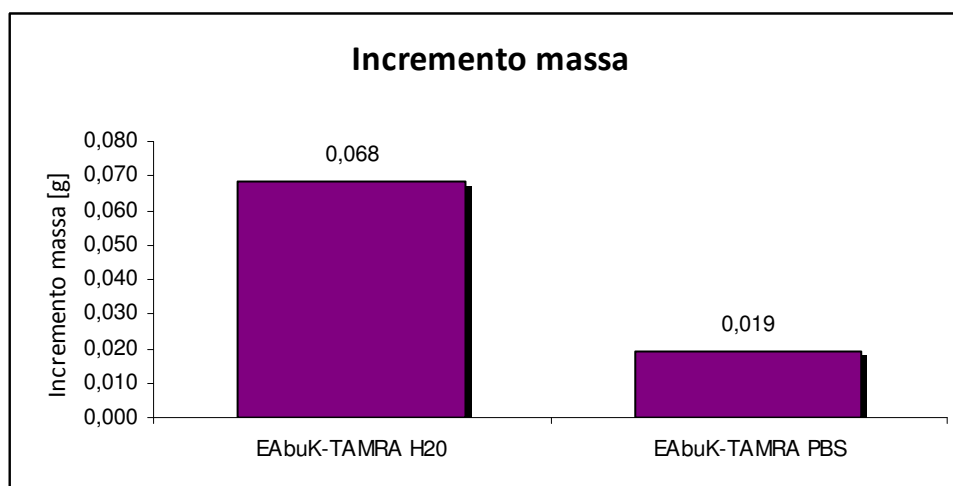
Questa diminuzione dell'area è più evidente nel caso dei dischetti trattati con il peptide e poi immersi in PBS, ma è significativa anche nel caso dei dischetti trattati con l'auto-assemblante e poi posti in H₂O MilliQ.

Il trattamento dei dischetti di pericardio VAS bovino con il peptide auto-assemblante ha portato ad un notevole aumento della massa del dischetto posto poi in H₂O MilliQ, con un incremento di massa superiore al 130% rispetto al riferimento. L'incremento di massa di dischetti trattati con il peptide e posti in PBS è minore, ma comunque presente e pari al 30% rispetto al riferimento in PBS.

In Figura 3.5 a) e b) sono riportati graficamente i risultati ottenuti dalla misurazione della massa dei dischetti.



a)

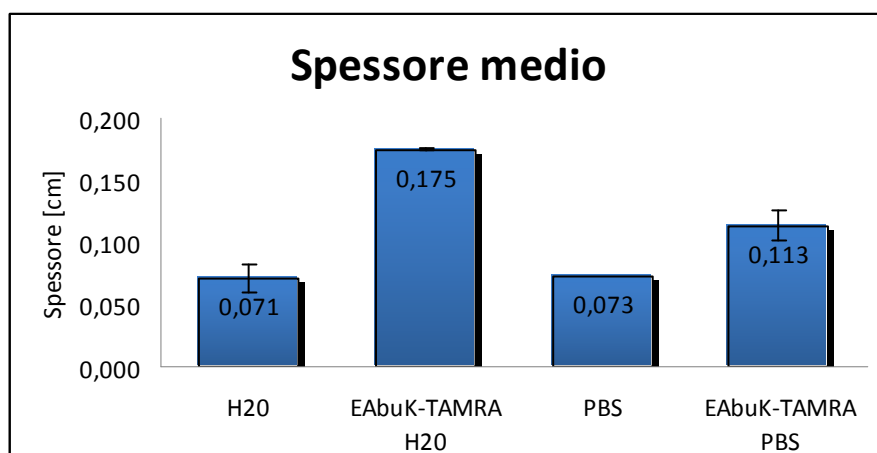


b)

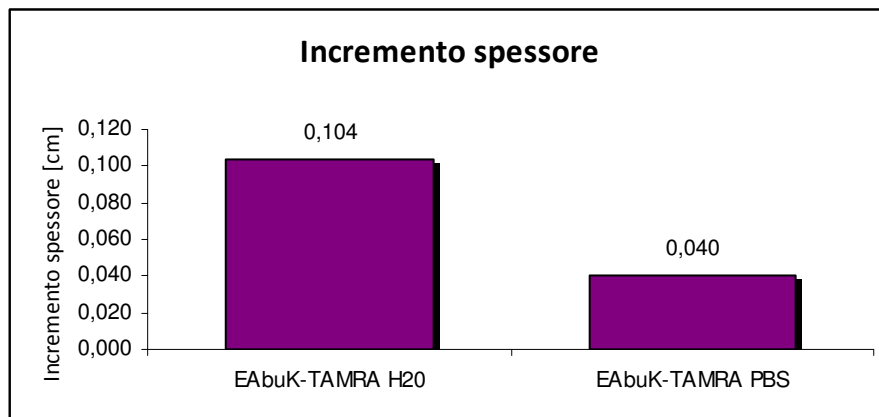
Figura 3.5 a) Confronto tra la massa media [g] dei dischetti di pericardio bovino trattati con il peptide e poi immersi in H₂O MilliQ o PBS ed i rispettivi riferimenti; b) incremento della massa [g] dei dischetti di pericardio bovino trattati con EAbuK-TAMRA rispetto alla massa dei dischetti di riferimento non trattati con il peptide.

Anche lo spessore dei dischetti trattati con il peptide auto-assemblante risulta incrementato rispetto allo spessore del pericardio di riferimento. La zona del ventricolo anteriore sinistro dalla quale sono stati tagliati i dischetti di pericardio per questo esperimento, presenta una disposizione ordinata delle fibre di collagene della matrice extracellulare; la presenza del peptide auto-assemblante sottoforma di idrogeli all'interno dello spessore del tessuto isotropo provoca un distanziamento dei piani delle fibre ordinate. In questo modo si spiegherebbe non solo l'incremento dello spessore del pericardio trattato con il peptide auto-assemblante, ma anche il decremento dell'area degli stessi dischetti come visto in Figura 3.4.

In Figura 3.6 a) e b) sono riportati graficamente i risultati ottenuti dalla misurazione dello spessore dei dischetti.



a)



b)

Figura 3.6 a) Confronto tra lo spessore medio [cm] dei dischetti di pericardio bovino trattati con il peptide e poi immersi in H₂O MilliQ o PBS ed i rispettivi riferimenti; b) incremento dello spessore [cm] dei dischetti di pericardio bovino trattati con EAbuK-TAMRA rispetto allo spessore dei dischetti di riferimento non trattati con il peptide.

L'incremento dello spessore è maggiore per i dischetti di pericardio trattati con il peptide e poi immersi in H₂O MilliQ rispetto a quelli che si sono poi immersi in PBS. Infatti, mentre per i primi l'incremento di spessore risulta del 146% rispetto al riferimento in H₂O MilliQ, per i dischetti trattato con peptide e poi immersi in PBS l'incremento di spessore è pari al 55% rispetto al riferimento in PBS.

Il minore incremento dello spessore per i dischetti posti in PBS è dovuto alla presenza dell'effetto osmotico che richiama l'acqua verso la soluzione salina.

In questo modo, nei dischetti posti in PBS entra meno acqua nella matrice di pericardio, provocando così un minore aumento dello spessore.

Dalla variazione delle proprietà fisiche del pericardio bovino dopo il trattamento con il peptide auto-assemblante, sembra che quest'ultimo sia penetrato all'interno della matrice; per confermare questa ipotesi, i dischetti sono stati inclusi in OCT e si è proceduto all'osservazione di alcune sezioni trasversali al microscopio a fluorescenza.

La presenza del peptide all'interno della matrice è rilevabile grazie alla presenza del fluoroforo (TAMRA) legato covalentemente, il quale emette alla lunghezza d'onda: $\lambda_e = 555$ nm.

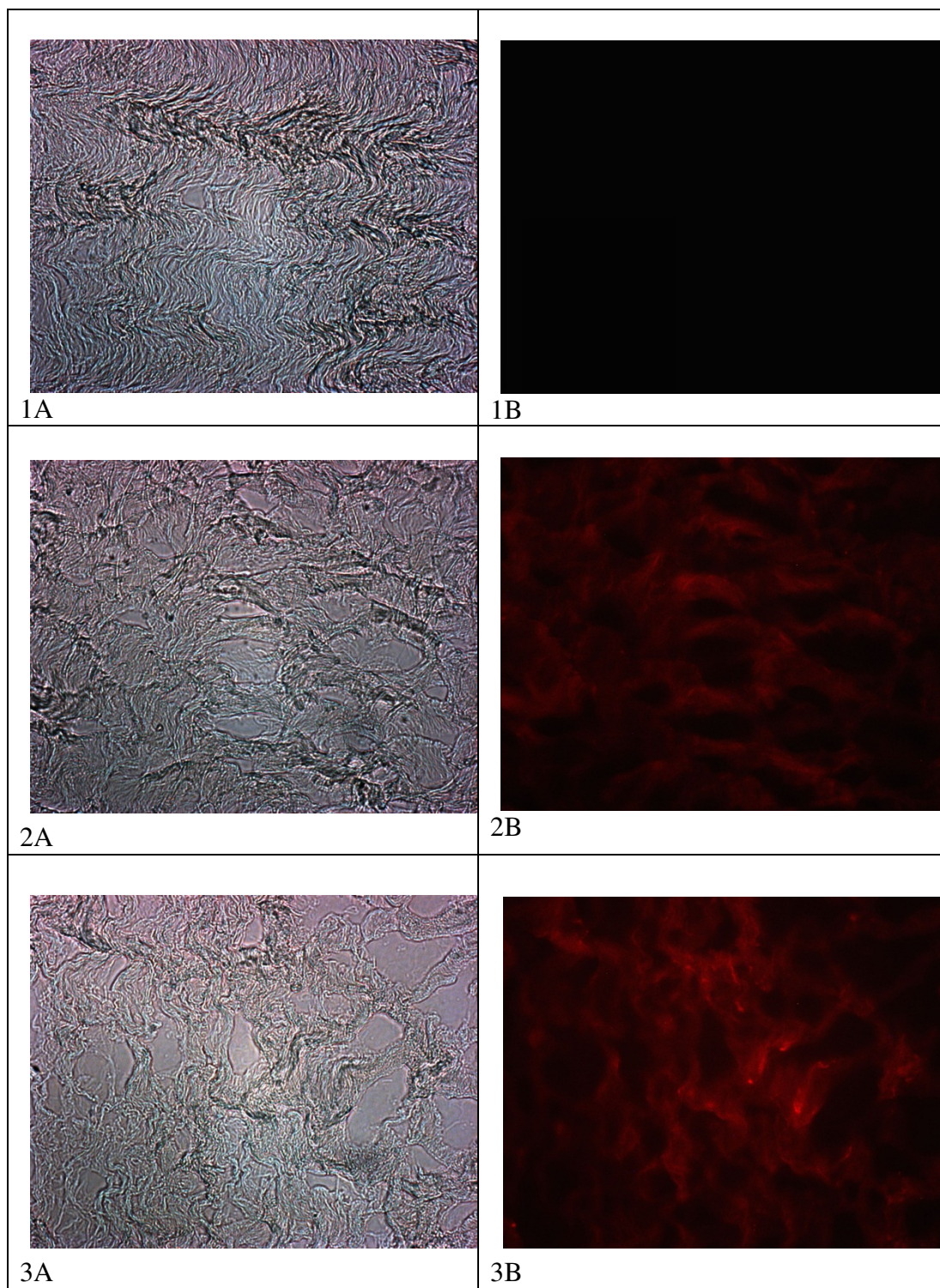


Figura 3.7 Microscopia ottica a luce bianca (A) e a fluorescenza a $\lambda_e 555$ (B) sullo stesso campione: 1A e 1B: pericardio bovino non trattato con peptide e lasciato in H_2O MilliQ; 2A e 2B: pericardio bovino trattato con peptide e poi immerso in H_2O MilliQ; 3A e 3B: pericardio bovino trattato con peptide e poi immerso in PBS.

In Figura 3.7, le immagini 1A, 2A e 3A, sono state ottenute osservando i campioni al microscopio con luce bianca. In queste immagini si vede l'andamento delle fibre di collagene che formano la matrice extracellulare del pericardio bovino lungo la sezione trasversale. Le immagini 1B, 2B e 3B, si riferiscono agli stessi campioni delle figure 1A, 2A e 3A, osservati con luce fluorescente a $\lambda_e = 555$ nm. Nel campione relativo alla figura 1B non si osserva nulla a $\lambda_e = 555$ nm, questo proprio perché essendo il pericardio di riferimento non è stato trattato con il peptide marcato con la TAMRA, mentre i campioni 2B e 3B, entrambi trattati con il peptide EAbuK-TAMRA, una volta irradiati in fluorescenza emettono in $\lambda_e = 555$ nm rivelando quindi la presenza del fluoroforo, e quindi del peptide auto-assemblante all'interno della matrice. Questo risultato permette di concludere che il peptide durante l'esperimento non si deposita solo sulla superficie della matrice di pericardio, ma riesce a penetrarvi all'interno, come desiderato.

Quantificazione del peptide trattenuto all'interno del pericardio bovino:

Per calcolare la quantità di peptide penetrata e rimasta all'interno della matrice di pericardio bovino dopo l'esperimento riportato in precedenza. Sono state utilizzate due metodologie differenti: la prima è consistita nell'analisi cromatografica del peptide residuo nelle soluzioni recuperate dopo l'incubazione con il pericardio; la seconda si è basata invece sull'idrolisi delle soluzioni recuperate e sulla lettura allo spettrofotometro UV/Vis del cromoforo TAMRA.

1. *Analisi cromatografica:* le soluzioni contenenti il peptide EAbuK-TAMRA recuperate separatamente dopo l'incubazione con i 4 dischetti di pericardio bovino (2 dal bovino 1 e 2 dal bovino 2) sono state analizzate mediante cromatografia RP-HPLC. Di ciascuna delle 4 soluzioni sono state effettuate 3 analisi con le stesse condizioni con le quali si erano effettuate le analisi RP-HPLC della soluzione madre. In Figura 3.8 sono riportati i risultati ottenuti dall'analisi cromatografica della soluzione madre e delle 4 soluzioni recuperate post-esperimento. Di ciascuna soluzione si è riportato in figura solo il cromatogramma della prima delle 3 analisi effettuate; questo perché si è notato un progressivo abbassamento del picco relativo al peptide nelle 3 analisi di ciascuna soluzione. L'abbassamento del picco può essere dovuto principalmente all'autoaggregazione del peptide durante il tempo richiesto dalle analisi cromatografiche (l'autoaggregazione è infatti un fenomeno tempo-dipendente). L'autoaggregazione del peptide sciolto in H₂O MilliQ è dovuta alla presenza di ioni monocarica all'interno della matrice di pericardio decellularizzata.

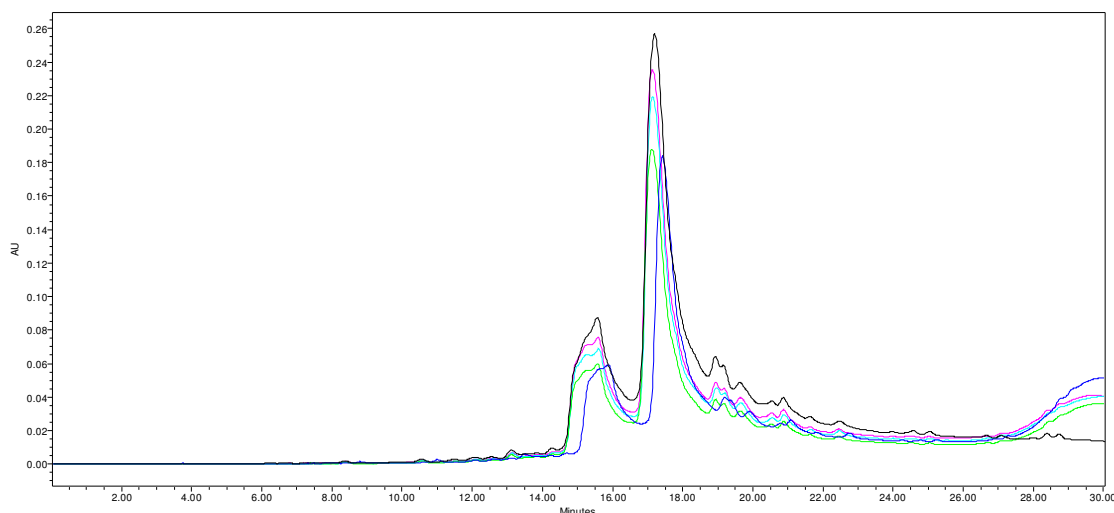


Figura 3.8 Analisi cromatografica RP-HPLC della soluzione madre di peptide EAbuK-TAMRA (nero) e delle soluzioni recuperate post-esperimento (blu, rosa, verde e azzurro). Le analisi sono state svolte nelle seguenti condizioni: colonna: Symmetry Shield; flusso: 1 mL/min; eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B: 0,05% TFA in CH₃CN; iniezione: 10 µL; gradiente dal 20% all'35% di eluente B in 30 min; lettura dell'assorbanza a 555 nm.

Attraverso la misura dell'area dei due picchi relativi al peptide EAbuK-TAMRA (si veda il paragrafo 3.1.1.1) delle soluzioni recuperate, si è calcolata la massa di peptide auto-assemblante rimasta nelle soluzioni dopo l'esperimento, e quindi, per differenza con la massa presente nel volume di soluzione madre per ciascun dischetto, si è potuto risalire alla quantità di EAbuK-TAMRA rimasto all'interno di ogni matrice di pericardio. In Tabella 3.5 sono riportati i valori di area totale dei picchi cromatografici, concentrazione delle soluzioni, numero di moli e massa del peptide in soluzione, e massa del peptide rimasta nei dischetti.

Tabella 3.5 Misure di area totale dei picchi cromatografici, concentrazione, numero di moli e massa del peptide calcolate per le soluzioni di EAbuK+TAMRA, e massa del peptide rimasta nei dischetti di pericardio.

Campione	V [µL]	$A_{\text{picchiEAbuK-TAMRA}}$	$C_{\text{EAbuK-TAMRA}}$ [mM]	$n_{\text{EAbuK-TAMRA}}$ [µmol]	$m_{\text{EAbuK-TAMRA}}$ [mg]	$m_{\text{EAbuK-TAMRA}}$ rimasta nel pericardio [mg]
Soluzione Madre	300	18521556	1.000	0.300	0.642	-
Bovino A	300	11998440	0.648	0.194	0.416	0.226
Bovino A	300	12841651	0.693	0.208	0.445	0.197
Bovino B	300	14903411	0.805	0.241	0.517	0.125
Bovino B	300	16159932	0.872	0.262	0.560	0.082

Utilizzando il programma statistico Minitab, si sono eseguite sia le rappresentazioni grafiche, utili per comprendere la distribuzione dei dati di massa di peptide rimasta all'interno dei dischetti di pericardio $m_{EAbuK-TAMRA}$, sia l'analisi statistica per ottenere gli indici riassuntivi ed il test d'ipotesi per individuare se tale distribuzione sia o meno approssimabile a quella normale.

In Figura 3.9 sono stati riportati i risultati ottenuti dopo aver eseguito un'indagine statistica dei dati relativi alla massa di peptide rimasta all'interno dei dischetti di pericardio $m_{EAbuK-TAMRA}$.

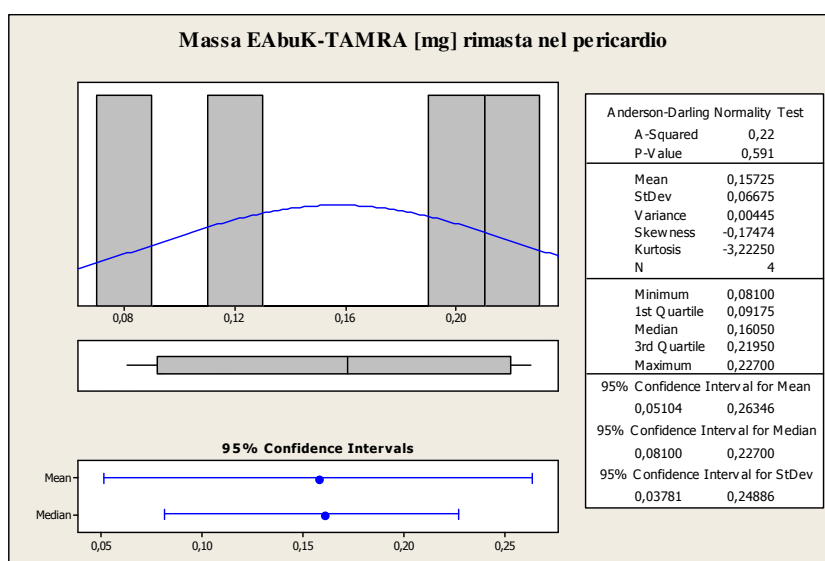


Figura 3.9 Tabella riassuntiva contenente le rappresentazioni grafiche, gli indici statistici e il test di normalità per i dati di massa [mg] di peptide EAbuK-TAMRA rimasta all'interno delle matrici di pericardio dopo l'esperimento.

La figura 3.9 riporta la rappresentazione grafica dei dati mediante istogramma, curva di normalità e box-plot. Un istogramma (o diagramma delle distribuzioni di frequenza) raccoglie i dati in modo più compatto e consente di visualizzare, con immediatezza, la distribuzione degli stessi.

La massa media di peptide rimasta all'interno dei dischetti di pericardio è $m_{EAbuK-TAMRA} = 0,157$ [mg] con un intervallo di confidenza al 95% pari a 0,051-0,263 [mg].

Il risultato del test di normalità riportato in Figura 3.9 indica che i dati relativi alla massa di peptide auto-assemblante rimasta all'interno dei dischetti di pericardio seguono una distribuzione di tipo normale poiché si è ottenuto un P -value maggiore di $\alpha = 0,05$.

2. *Idrolisi e lettura allo spettrofotometro UV/Vis*: per ovviare ai problemi di sensibilità del metodo basato sull'analisi cromatografica (visto al punto precedente) dovuti all'auto-aggregazione del peptide, si è messa a punto una tecnica di quantificazione basata sull'assorbimento della sonda TAMRA. Per valutare l'efficacia del metodo lo si

è sperimentato sulla soluzione di peptide EAbuK-TAMRA recuperata post-esperimento dal pozzetto contenente il primo dischetto di pericardio del bovino 1, e sulla soluzione di H₂O MilliQ con la quale il dischetto era rimasto a contatto per 30 min dopo l'incubazione con la prima soluzione; questa soluzione di "lavaggio" si è analizzata perché si considera che una parte del peptide non auto-aggregato sia passato in soluzione durante il lavaggio e che quindi non sia rimasto tutto all'interno della matrice di pericardio. Le due soluzioni sono state idrolizzate per lisare il peptide auto-aggregato e liberare quindi le molecole di TAMRA per poterle poi riportare in soluzione per la lettura allo spettrofotometro.

Si è proceduto nel seguente modo:

- Sono state seccate con evaporatore rotante le due soluzioni recuperate (quella per l'esperimento e quella di lavaggio del dischetto di pericardio);
- sono stati sciolti i residui di EAbuK-TAMRA ottenuti al punto precedente con 1 mL ciascuno di HCl 6 N e si è preparata una soluzione di riferimento con 0.12 mg di TAMRA in 1 mL di HCl 6 N;
- le tre soluzioni preparate al punto precedente sono state poste a 110°C per 24 ore per l'idrolisi;
- al termine dell'idrolisi i tre campioni sono stati seccati con l'evaporatore rotante e poi sciolti nuovamente in 1 mL di metanolo;
- infine si è registrata l'assorbanza delle soluzioni preparate a $\lambda = 555$ nm.

In Tabella 3.6 sono riportati i risultati ottenuti dall'analisi di spettroscopia UV/Vis delle soluzioni preparate, solo per la soluzione di lavaggio del pericardio contenente EAbuK-TAMRA non è stata necessaria un'ulteriore diluizione con metanolo.

Tabella 3.6 *Dati di assorbanza registrati a $\lambda = 555$ nm per le soluzioni contenenti il gruppo TAMRA a differenti diluizioni in metanolo.*

Soluzione	Diluizione con metanolo	Assorbanza a $\lambda = 555$
TAMRA rif. Idrolizzato	1:20	0.440
EAbuK-TAMRA soluzione post-esperimento	1:10	0.531
EAbuK-TAMRA soluzione di lavaggio	-	0.838

Conoscendo sia l'assorbanza che la concentrazione della soluzione TAMRA rif. idrolizzato, si è calcolata la ϵ_{λ} sperimentale, pari a $39461 [\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}]$, molto prossima a quella che si trova in letteratura. Si può dedurre che le condizioni di idrolisi non hanno modificato sostanzialmente il cromoforo.

Infatti, il valore sperimentale da letteratura per il coefficiente di estinzione molare della TAMRA in metanolo alla lunghezza d'onda utilizzata per l'analisi è pari a $\epsilon_{\lambda} = 40000 [\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}]$.

Grazie alla legge di *Lambert-Beer* (Capitolo 2, formula [4]) si è calcolata la concentrazione di TAMRA delle soluzioni analizzate. Conoscendo la concentrazione è stato calcolato il numero di moli di TAMRA, che risulta pari al numero di moli di peptide auto-assemblante presente nelle soluzioni prima dell'idrolisi; da quest'ultimo si è ottenuta quindi la massa di peptide EAbuK-TAMRA rimasta in soluzione dopo l'incubazione con il pericardio, e per differenza dalla quantità di peptide nella soluzione madre si è quindi calcolata la massa di EAbuK-TAMRA rimasta all'interno della matrice biologica dopo l'esperimento.

In Tabella 3.7 sono riportati i risultati ottenuti per la concentrazione di fluoroforo e i valori di numero di moli e massa del peptide EAbuK-TAMRA nelle soluzioni recuperate dopo l'esperimento con il pericardio bovino.

Tabella 3.7 Concentrazione di TAMRA, numero di moli e massa del peptide EAbuK-TAMRA nelle soluzioni recuperate dopo l'esperimento con il pericardio bovino.

Soluzione	C [mM]	n [μmoli]	m [mg]
EAbuK-TAMRA soluzione post-esperimento	0.133	0.133	0.284
EAbuK-TAMRA soluzione di lavaggio	0.021	0.021	0.044

Si è quindi recuperata post-esperimento una quantità totale pari a 0.33 mg di peptide EAbuK-TAMRA; sapendo che la quantità iniziale di peptide in soluzione prima dell'incubazione con il pericardio era pari a 0.64 mg, per semplice differenza si ottiene che la massa di peptide auto-assemblante rimasta all'interno della matrice biologica è di 0,31 mg invece che 0,23 mg come si era calcolata con la metodologia basata sull'analisi cromatografica.

3.1.2 Trattamento di pericardio bovino decellularizzato

Dopo aver verificato che il peptide auto-assemblante è in grado di penetrare all'interno della matrice extracellulare del pericardio attraverso le fibre di collagene, si è analizzata la variazione delle proprietà fisiche di zone differenti di pericardio decellularizzato dopo trattamento con soluzioni di peptide auto-assemblante.

Per fare questo sono stati decellularizzati, secondo il metodo TRI-COL, 2 pericardi bovini, che si sono denominati bovino A e bovino B. Sono stati tagliati:

- ✓ 6 dischetti dalla zona del ventricolo anteriore sinistro (VAS) del bovino A;
- ✓ 6 dischetti dalla zona del ventricolo anteriore sinistro (VAS) del bovino B;
- ✓ 6 dischetti dalla zona del ventricolo anteriore sinistro (VPD) del bovino A;
- ✓ 6 dischetti dalla zona del ventricolo posteriore destro (VPD) del bovino B.

La scelta di utilizzare due zone differenti del pericardio bovino si è basata sulla volontà di indagare in quale modo la disposizione delle fibre di collagene della matrice extracellulare influisca sulla variazione delle sue proprietà fisiche dopo il trattamento con i peptidi. Infatti, mentre la disposizione delle fibre di collagene nella zona VAS è ordinata ed il tessuto risulta quindi anisotropo (le proprietà fisiche variano in base alla direzione nella quale vengono analizzate), la disposizione delle fibre di collagene nella zona VPD è random ed il tessuto risulta dunque anisotropo.

Per l'esperimento è stato utilizzato il peptide auto-assemblante EAbuK amide-terminale (Capitolo 2, paragrafo 2.1.2.2) e, come riferimento, la sequenza peptidica $\Delta 5SDF$ (Capitolo 2, paragrafo 2.1.2.3) che non appartiene alla classe dei peptidi auto-assemblanti ma è di lunghezza e peso confrontabili rispetto a EAbuK. Entrambi i peptidi erano già disponibili in laboratorio.

Sono stati trattati con il peptide auto-assemblante un totale di 8 dischetti provenienti dalle due zone di pericardio diverse dei due animali A e B, e altri 8 dischetti sono stati trattati con il peptide non auto-assemblante $\Delta 5SDF$.

Procedura sperimentale:

Si sono preparate le due soluzioni madre dei peptidi:

- Soluzione di EAbuK: è stata preparata una soluzione a concentrazione $C_{EAbuK} = 1$ mM, sciogliendo 4,6 mg (2,65 μ mol) di peptide in 2650 μ L di H₂O MilliQ;
- Soluzione di $\Delta 5SDF$: è stata preparata una soluzione a concentrazione $C_{\Delta 5SDF} = 1$ mM, sciogliendo 5,9 mg (2,65 μ mol) di peptide in 2650 μ L di H₂O MilliQ.

Di ciascuna delle due soluzioni madre è stata effettuata l'analisi RP-HPLC in triplicato con le seguenti condizioni:

- Soluzione di EAbuK: colonna: Symmetry Shield; flusso: 1 mL/min; eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B: 0,05% TFA in CH₃CN; iniezione: 10 μ L; gradiente dal 12% al 22% di eluente B in 20 min; lettura dell'assorbanza a 214 nm;
- Soluzione di $\Delta 5SDF$: colonna: Symmetry Shield; flusso: 1 mL/min; eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B: 0,05% TFA in CH₃CN; iniezione: 10 μ L; gradiente dal 20% al 34% di eluente B in 28 min; lettura dell'assorbanza a 214 nm.

Ogni dischetto di pericardio bovino decellularizzato è stato posto in un pozzetto di una piastra da 48 pt.

Sono stati aggiunti 300 μ L di soluzione 1mM di EAbuK preparata in precedenza sui seguenti campioni:

- ✓ 4 dischetti dal pericardio del bovino A: 2 dalla zona VAS e 2 dalla zona VPD;
- ✓ 4 dischetti dal pericardio del bovino B: 2 dalla zona VAS e 2 dalla zona VPD.

Sono stati aggiunti 300 μ L di soluzione madre 1mM di $\Delta 5SDF$ sui seguenti campioni:

- ✓ 4 dischetti dal pericardio del bovino A: 2 dalla zona VAS e 2 dalla zona VPD;

✓ 4 dischetti dal pericardio del bovino B: 2 dalla zona VAS e 2 dalla zona VPD; mentre altri 8 dischetti sono stati tenuti come riferimento (4 dischetti dal bovino A e 4 dischetti dal bovino B, metà tagliati dalla zona VAS e metà dalla zona VPD del pericardio) e sono stati lasciati in contatto con H₂O MilliQ. Nei pozzetti della piastra rimasti vuoti è stata aggiunta H₂O MilliQ per mantenere l'ambiente il più possibile umido. La piastra è stata chiusa bene con parafilm per evitare l'evaporazione delle soluzioni. I campioni sono rimasti a contatto con le soluzioni per 24 ore a temperatura costante pari a 37°C sotto blanda agitazione. Al termine delle 24 ore di incubazione, le soluzioni con i peptidi residui sono state recuperate separatamente, per effettuare le analisi RP-HPLC in duplicato alle stesse condizioni utilizzate per le due soluzioni madre. Una volta tolte le soluzioni contenenti i peptidi, su 4 dischetti trattati con EAbuK (2 dal bovino A e 2 dal bovino B e per ciascun bovino i due dischetti sono 1 da VAS e 1 da VPD) e 4 dischetti trattati con Δ5SDF (sempre 2 dal bovino A e 2 dal bovino B e per ciascun bovino i due dischetti sono 1 da VAS e 1 da VPD) è stata aggiunta H₂O MilliQ, mentre nell'altra metà dei dischetti trattati con i peptidi è stato aggiunto PBS. Allo stesso modo si è proceduto con gli 8 dischetti di riferimento. Queste soluzioni sono state lasciate a contatto con i dischetti per 30 minuti a temperatura di 37°C con blanda agitazione. In questo modo il peptide EAbuK posto a contatto con il PBS auto-aggrega, mentre il peptide Δ5SDF no; per i dischetti posti poi a contatto con H₂O MilliQ si è visto che il peptide EAbuK riesce comunque ad auto-aggregare grazie alla presenza di ioni monocarica all'interno della matrice extracellulare, mentre il peptide Δ5SDF no.

Al termine dell'esperimento i campioni risultano essere così trattati:

- ✓ 2 da VAS bovino A trattato con EAbuK e poi 1 immerso in H₂O MilliQ e 1 in PBS;
- ✓ 2 da VAS bovino B trattato con EAbuK e poi 1 immerso in H₂O MilliQ e 1 in PBS;
- ✓ 2 da VPD bovino A trattato con EAbuK e poi 1 immerso in H₂O MilliQ e 1 in PBS;
- ✓ 2 da VPD bovino B trattato con EAbuK e poi 1 immerso in H₂O MilliQ e 1 in PBS;
- ✓ 2 da VAS bovino A trattato con Δ5SDF e poi 1 immerso in H₂O MilliQ e 1 in PBS;
- ✓ 2 da VAS bovino B trattato con Δ5SDF e poi 1 immerso in H₂O MilliQ e 1 in PBS;
- ✓ 2 da VPD bovino A trattato con Δ5SDF e poi 1 immerso in H₂O MilliQ e 1 in PBS;
- ✓ 2 da VPD bovino B trattato con Δ5SDF e poi 1 immerso in H₂O MilliQ e 1 in PBS;
- ✓ 2 da VAS bovino A non trattato con peptide e lasciato 1 immerso in H₂O MilliQ e 1 in PBS;
- ✓ 2 da VAS bovino B non trattato con peptide e lasciato 1 immerso in H₂O MilliQ e 1 in PBS;
- ✓ 2 da VPD bovino A non trattato con peptide e lasciato 1 immerso in H₂O MilliQ e 1 in PBS;
- ✓ 2 da VPD bovino B non trattato con peptide e lasciato 1 immerso in H₂O MilliQ e 1 in PBS.

Al termine dei 30 minuti di incubazione in H₂O MilliQ o in PBS, è stato effettuato un lavaggio in flusso dei dischetti. Per il lavaggio in flusso è stata utilizzata H₂O MilliQ oppure PBS in base al trattamento che era stato ricevuto da ciascun dischetto. La soluzione di lavaggio è stata fatta defluire per gravità attraverso la matrice del pericardio ad una velocità media di 7 mL/min regolata grazie ad una valvola installata sulla colonna nella quale si sono effettuati i lavaggi. Il lavaggio è stato eseguito per verificare se vi sia rilascio di peptide auto-assemblante.

Risultati e discussione:

Al termine dell'esperimento sono state misurate le proprietà fisiche dei dischetti di pericardio trattati o con il peptide EAbuK, o con il peptide Δ 5SDF e le proprietà fisiche dei dischetti di pericardio di riferimento.

In Tabella 3.8 a) sono riportate le proprietà fisiche del pericardio bovino decellularizzato VAS, prima trattato con la soluzione di EAbuK e poi incubato in H₂O MilliQ, mentre in Tabella 3.8 b) sono riportate le proprietà fisiche del pericardio bovino decellularizzato VAS, prima trattato con la soluzione di Δ 5SDF e poi incubato in H₂O MilliQ. Infine, in Tabella 3.8 c) sono riportate le proprietà fisiche del pericardio bovino decellularizzato VAS di riferimento, cioè non trattato con i peptidi e lasciati in H₂O MilliQ.

Tabella 3.8 a) *Proprietà fisiche dei dischetti di pericardio VAS bovino decellularizzato trattati con il peptide EAbuK e poi posti in H₂O MilliQ; b) proprietà fisiche dei dischetti di pericardio VAS bovino decellularizzato trattati con il peptide Δ 5SDF e poi posti in H₂O MilliQ; c) proprietà fisiche dei dischetti di pericardio VAS bovino decellularizzato di riferimento, non trattati con i peptidi e poi posti in H₂O MilliQ.*

a)

Pericardio VAS bovino trattato con EAbuK e poi H₂O MilliQ						
	<i>A [cm²]</i>	<i>m [g]</i>	<i>ρ a 24°C [g/mL]</i>	<i>V [cm³]</i>	<i>s [cm]</i>	<i>Contenuto H₂O [%]</i>
Bovino A	0.752	0.154	1.023	0.151	0.200	94.12
Bovino B	0.678	0.164	1.014	0.162	0.238	94.18
MEDIA	<i>0.715</i>	<i>0.159</i>	<i>1.019</i>	<i>0.156</i>	<i>0.219</i>	<i>94.15</i>
Dev. St	<i>0.052</i>	<i>0.007</i>	<i>0.006</i>	<i>0.008</i>	<i>0.027</i>	<i>0.14</i>

b)

Pericardio VAS bovino trattato con Δ5SDF e poi H₂O MilliQ						
	<i>A</i> [cm ²]	<i>m</i> [g]	ρ a 24°C [g/mL]	<i>V</i> [cm ³]	<i>s</i> [cm]	Contenuto H ₂ O [%]
Bovino A	0.760	0.122	1.019	0.119	0.157	92.64
Bovino B	0.723	0.147	1.009	0.146	0.202	92.87
MEDIA	<i>0.742</i>	<i>0.134</i>	<i>1.014</i>	<i>0.133</i>	<i>0.179</i>	92.75
Dev. St	<i>0.026</i>	<i>0.018</i>	<i>0.007</i>	<i>0.019</i>	<i>0.031</i>	<i>0.16</i>

c)

Pericardio VAS bovino non trattato con i peptidi e lasciato in H₂O MilliQ						
	<i>A</i> [cm ²]	<i>m</i> [g]	ρ a 24°C [g/mL]	<i>V</i> [cm ³]	<i>s</i> [cm]	Contenuto H ₂ O [%]
Bovino A	0.642	0.104	1.019	0.102	0.160	92.83
Bovino B	0.927	0.196	1.019	0.192	0.208	92.70
MEDIA	<i>0.785</i>	<i>0.150</i>	<i>1.019</i>	<i>0.147</i>	<i>0.184</i>	92.77
Dev. St	<i>0.202</i>	<i>0.065</i>	<i>0.000</i>	<i>0.064</i>	<i>0.034</i>	<i>0.09</i>

In Tabella 3.9 a) sono riportate le proprietà fisiche del pericardio bovino decellularizzato VAS, prima trattato con la soluzione di EAbuK e poi incubato PBS, mentre in Tabella 3.9 b) sono riportate le proprietà fisiche del pericardio bovino decellularizzato VAS, prima trattato con la soluzione di Δ 5SDF e poi incubato in PBS. Infine, in Tabella 3.9 c) sono riportate le proprietà fisiche del pericardio bovino decellularizzato VAS di riferimento, cioè non trattato con i peptidi e posto poi in PBS.

Tabella 3.9 a) Proprietà fisiche dei dischetti di pericardio VAS bovino decellularizzato trattati con il peptide EAbuK e poi posti in PBS; b) proprietà fisiche dei dischetti di pericardio VAS bovino decellularizzato trattati con il peptide Δ 5SDF e poi posti in PBS; c) proprietà fisiche dei dischetti di pericardio VAS bovino decellularizzato di riferimento, non trattati con i peptidi e poi posti in PBS.

a)

Pericardio VAS bovino trattato con EAbuK e poi PBS						
	<i>A</i> [cm ²]	<i>m</i> [g]	ρ a 24°C [g/mL]	<i>V</i> [cm ³]	<i>s</i> [cm]	Contenuto H ₂ O [%]
Bovino A	0.494	0.048	1.038	0.046	0.093	87.71
Bovino B	0.520	0.068	1.040	0.065	0.125	87.34
MEDIA	<i>0.507</i>	<i>0.058</i>	<i>1.039</i>	<i>0.056</i>	<i>0.109</i>	87.53
Dev. St	<i>0.018</i>	<i>0.014</i>	<i>0.001</i>	<i>0.014</i>	<i>0.023</i>	<i>0.26</i>

b)

Pericardio VAS bovino trattato con Δ5SDF e poi PBS						
	A [cm ²]	m [g]	ρ a 24°C [g/mL]	V [cm ³]	s [cm]	Contenuto H ₂ O [%]
Bovino A	0.519	0.047	1.046	0.045	0.086	84.82
Bovino B	0.625	0.054	1.044	0.051	0.082	84.22
MEDIA	0.572	0.050	1.045	0.048	0.084	84.52
Dev. St	0.075	0.005	0.001	0.005	0.003	0.42

c)

Pericardio VAS bovino non trattato con i peptidi e posto in PBS						
	A [cm ²]	m [g]	ρ a 24°C [g/mL]	V [cm ³]	s [cm]	Contenuto H ₂ O [%]
Bovino A	0.668	0.046	1.043	0.044	0.066	84.13
Bovino B	0.583	0.057	1.043	0.054	0.093	85.70
MEDIA	0.626	0.051	1.043	0.049	0.079	84.92
Dev. St	0.060	0.008	0.000	0.007	0.019	1.11

In Tabella 3.10 a) sono riportate le proprietà fisiche del pericardio bovino decellularizzato VPD, prima trattato con la soluzione di EAbuK e poi incubato in H₂O MilliQ, mentre in Tabella 3.10 b) sono riportate le proprietà fisiche del pericardio bovino decellularizzato VPD, prima trattato con la soluzione di Δ 5SDF e poi incubato in H₂O MilliQ. Infine, in Tabella 3.10 c) sono riportate le proprietà fisiche del pericardio bovino decellularizzato VPD di riferimento, cioè non trattato con i peptidi e lasciati in H₂O MilliQ.

Tabella 3.10 a) Proprietà fisiche dei dischetti di pericardio VPD bovino decellularizzato trattati con il peptide EAbuK e poi posti in H₂O MilliQ; b) proprietà fisiche dei dischetti di pericardio VPD bovino decellularizzato trattati con il peptide Δ 5SDF e poi posti in H₂O MilliQ; c) proprietà fisiche dei dischetti di pericardio VPD bovino decellularizzato di riferimento, non trattati con i peptidi e poi posti in H₂O MilliQ.

a)

Pericardio VPD bovino trattato con EAbuK e poi H₂O MilliQ						
	A [cm ²]	m [g]	ρ a 24°C [g/mL]	V [cm ³]	s [cm]	Contenuto H ₂ O [%]
Bovino A	0.891	0.225	1.017	0.221	0.248	93.92
Bovino B	0.633	0.120	1.019	0.117	0.185	92.73
MEDIA	0.762	0.172	1.018	0.169	0.217	93.32
Dev. St	0.182	0.075	0.001	0.073	0.044	0.84

b)

Pericardio VPD bovino trattato con Δ 5SDF e poi H ₂ O MilliQ						
	A [cm ²]	m [g]	ρ a 24°C [g/mL]	V [cm ³]	s [cm]	Contenuto H ₂ O [%]
Bovino A	0.701	0.168	1.014	0.166	0.234	93.94
Bovino B	0.664	0.092	1.023	0.090	0.135	91.64
MEDIA	0.683	0.130	1.019	0.128	0.186	92.79
Dev. St	0.026	0.054	0.006	0.054	0.072	1.63

c)

Pericardio VPD bovino non trattato con i peptidi e lasciato in H ₂ O MilliQ						
	A [cm ²]	m [g]	ρ a 24°C [g/mL]	V [cm ³]	s [cm]	Contenuto H ₂ O [%]
Bovino A	0.709	0.130	1.016	0.128	0.180	93.69
Bovino B	0.635	0.127	1.017	0.125	0.197	90.57
MEDIA	0.672	0.129	1.017	0.127	0.189	92.13
Dev. St	0.052	0.002	0.001	0.002	0.012	2.20

In Tabella 3.11 a) sono riportate le proprietà fisiche del pericardio bovino decellularizzato VPD, prima trattato con la soluzione di EAbuK e poi incubato PBS, mentre in Tabella 3.11 b) sono riportate le proprietà fisiche del pericardio bovino decellularizzato VPD, prima trattato con la soluzione di Δ 5SDF e poi incubato in PBS. Infine, in Tabella 3.11 c) sono riportate le proprietà fisiche del pericardio bovino decellularizzato VPD di riferimento, cioè non trattato con i peptidi e posto poi in PBS.

Tabella 3.11 a) Proprietà fisiche dei dischetti di pericardio VPD bovino decellularizzato trattati con il peptide EAbuK e poi posti in PBS; b) proprietà fisiche dei dischetti di pericardio VPD bovino decellularizzato trattati con il peptide Δ 5SDF e poi posti in PBS; c) proprietà fisiche dei dischetti di pericardio VPD bovino decellularizzato di riferimento, non trattati con i peptidi e poi posti in PBS.

a)

Pericardio VPD bovino trattato con EAbuK e poi PBS						
	A [cm ²]	m [g]	ρ a 24°C [g/mL]	V [cm ³]	s [cm]	Contenuto H ₂ O [%]
Bovino A	0.622	0.054	1.040	0.052	0.083	85.18
Bovino B	0.491	0.052	1.040	0.050	0.102	82.30
MEDIA	0.557	0.053	1.040	0.051	0.093	83.74
Dev. St	0.093	0.001	0.000	0.001	0.014	2.04

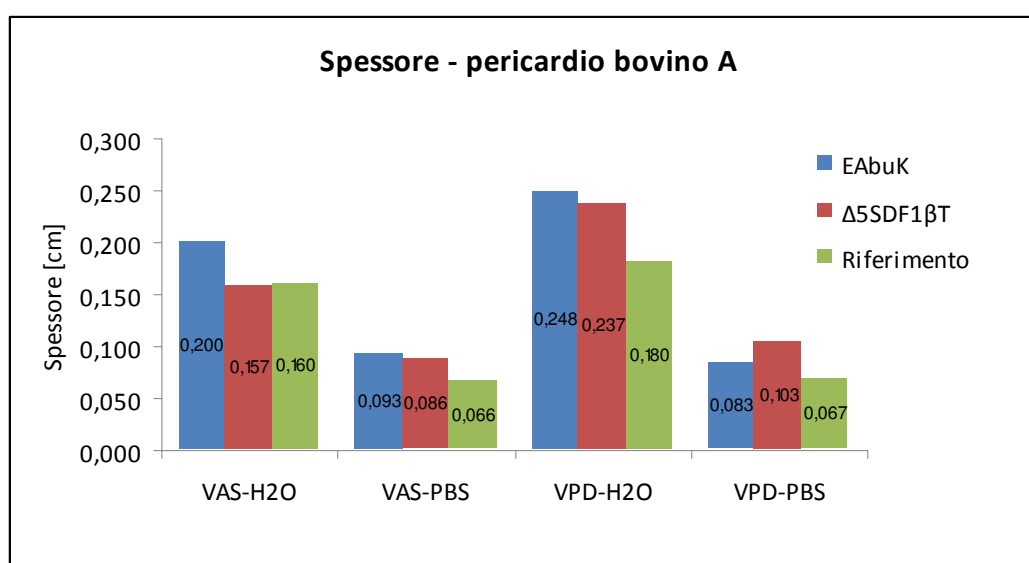
b)

Pericardio VPD bovino trattato con Δ 5SDF e poi PBS						
	A [cm ²]	m [g]	ρ a 24°C [g/mL]	V [cm ³]	s [cm]	Contenuto H ₂ O [%]
Bovino A	0.515	0.056	1.044	0.053	0.103	85.47
Bovino B	0.626	0.074	1.049	0.071	0.113	83.93
MEDIA	0.571	0.065	1.047	0.062	0.108	84.70.
Dev. St	0.078	0.013	0.004	0.012	0.007	1.09

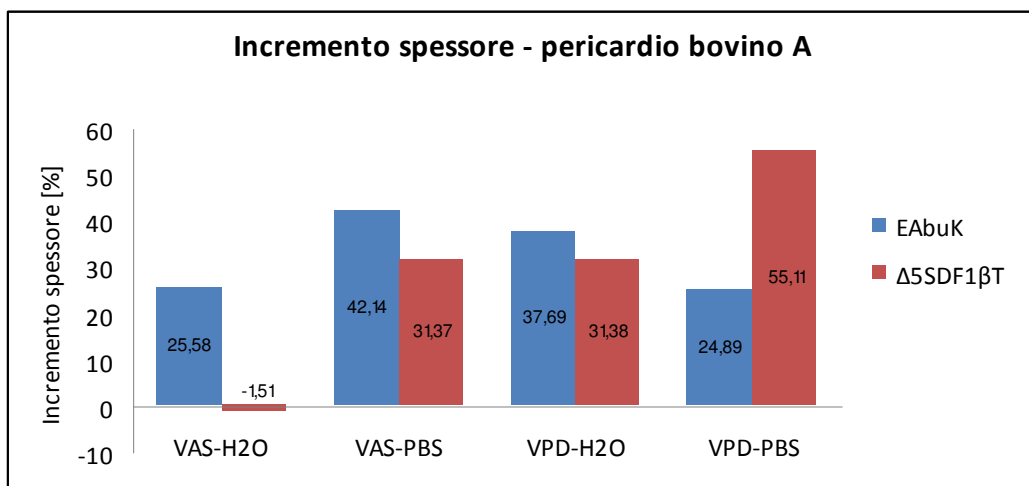
c)

Pericardio VPD bovino non trattato con i peptidi e posto in PBS						
	A [cm ²]	m [g]	ρ a 24°C [g/mL]	V [cm ³]	s [cm]	Contenuto H ₂ O [%]
Bovino A	0.567	0.040	1.046	0.038	0.067	85.69
Bovino B	0.759	0.054	1.046	0.051	0.067	83.91
MEDIA	0.663	0.047	1.046	0.044	0.067	84.80
Dev. St	0.136	0.010	0.000	0.009	0.000	1.26

Per una migliore e più immediata comprensione i valori ottenuti per le proprietà fisiche del pericardio bovino sono stati rappresentati graficamente. Nel grafico di Figura 3.10 a) è riportato lo spessore dei dischetti del pericardio del bovino A, mentre in Figura 3.10 b) si può vedere l'incremento dello spessore dei dischetti del pericardio del bovino A dopo il trattamento con il peptide auto-assemblante o con il Δ 5SDF, rispetto allo spessore del pericardio di riferimento (che non è stato in contatto con nessun peptide).



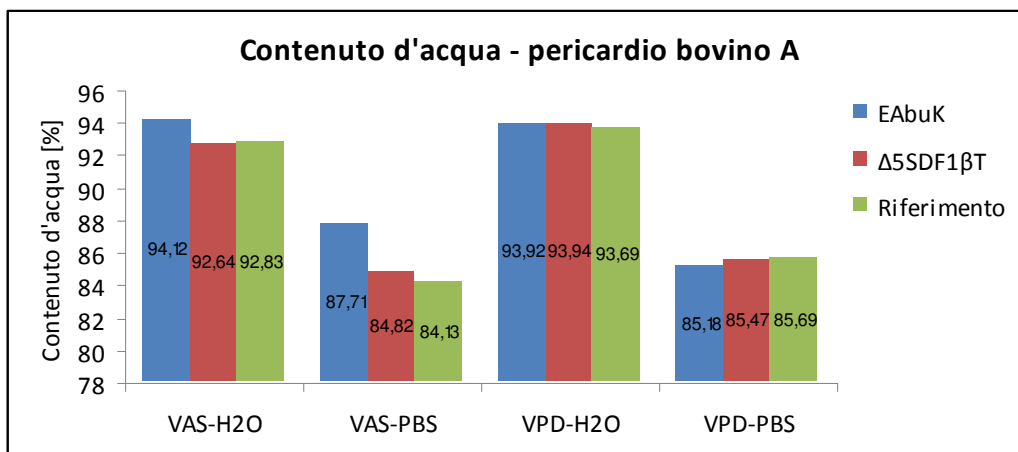
a)



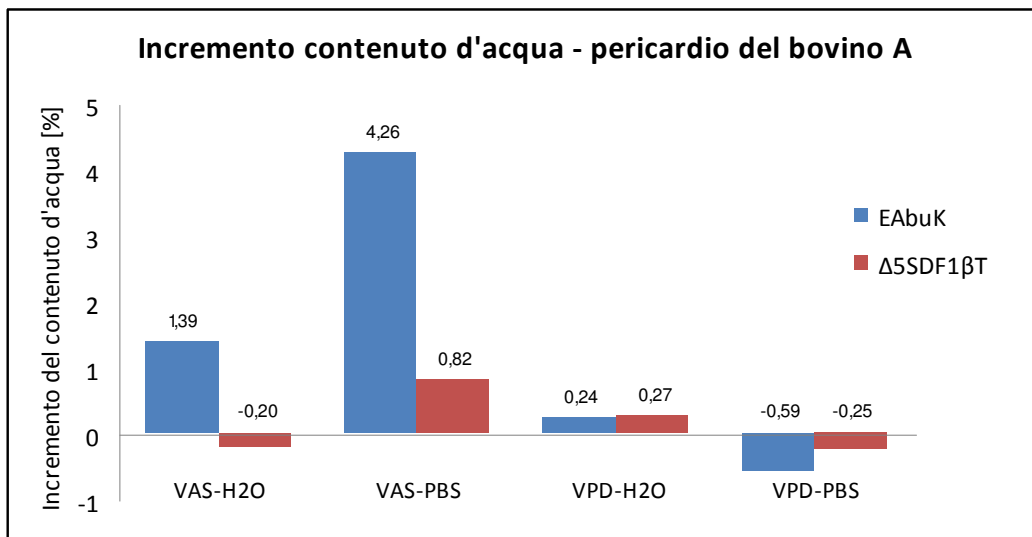
b)

Figura 3.10 a) Confronto tra lo spessore [cm] dei dischetti di pericardio bovino A (VAS e VPD) trattati con EAbuK o Δ5SDF e poi immersi in H₂O MilliQ o PBS ed i rispettivi riferimenti; b) incremento dello spessore [%] dei dischetti di pericardio bovino A trattati con EAbuK o Δ5SDF rispetto allo spessore dei dischetti di riferimento non trattati con il peptide.

Quasi tutti i campioni trattati con i peptidi presentano un incremento di spessore rispetto al pericardio di riferimento che non ha ricevuto nessun peptide, e, in particolare, il pericardio trattato con il peptide auto-assemblante EAbuK presenta un incremento di spessore sempre maggiore di quello ottenuto per il pericardio trattato con il peptide non auto-assemblante Δ5SDF ad eccezione del campione di pericardio proveniente dalla zona VPD che dopo il trattamento si è immerso in PBS, per il quale l'aumento di spessore è molto più significativo nel dischetto trattato con il peptide Δ5SDF che in quello trattato con l'auto-assemblante. Nel grafico di Figura 3.11 a) è riportato il contenuto percentuale di acqua nei dischetti del pericardio del bovino A



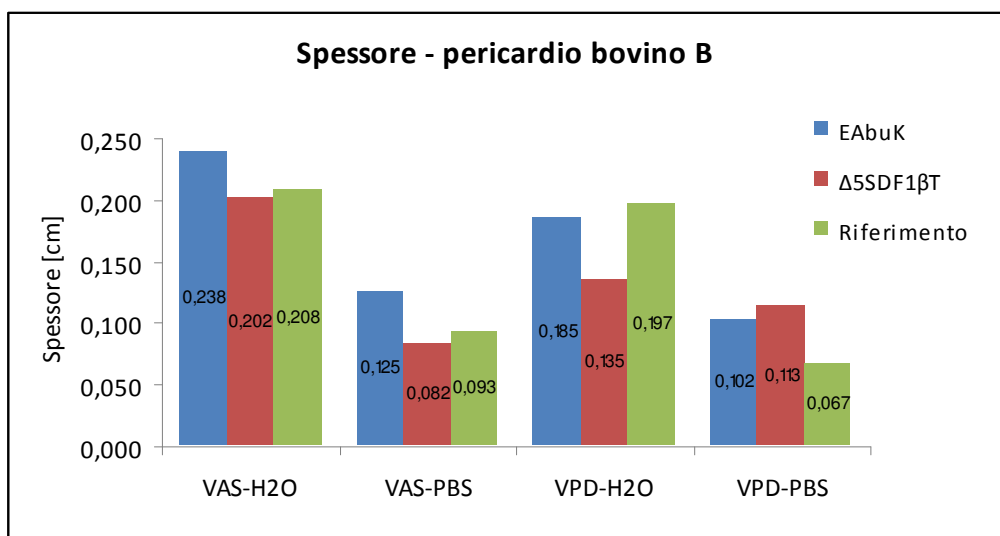
a)



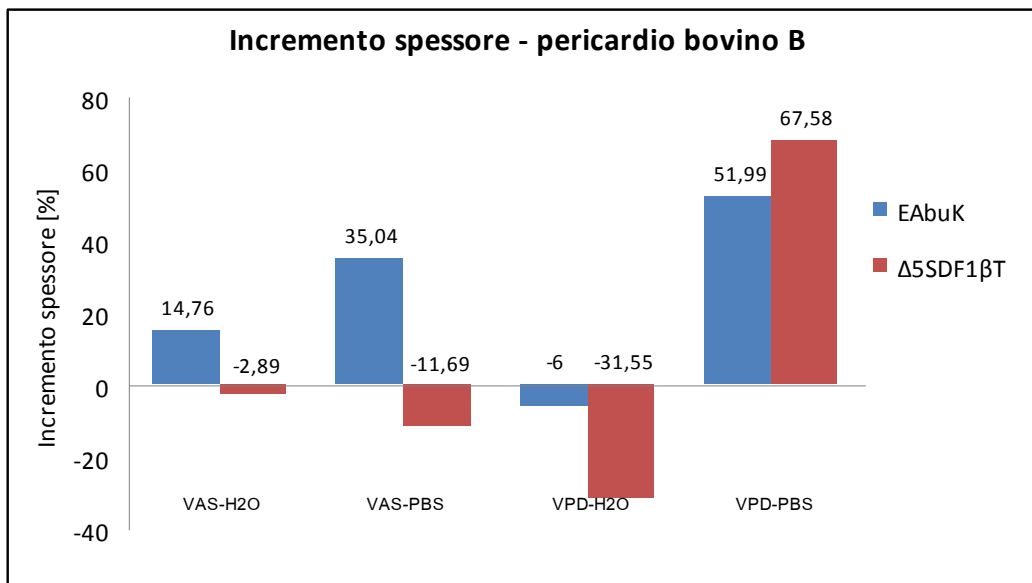
b)

Figura 3.11 a) Confronto tra il contenuto d'acqua [%] nei dischetti di pericardio bovino A (VAS e VPD) trattati con EAbuK o Δ5SDF e poi immersi in H₂O MilliQ o PBS ed i rispettivi riferimenti; b) incremento del contenuto d'acqua [%] dei dischetti di pericardio bovino A trattati con EAbuK o Δ5SDF rispetto al contenuto d'acqua dei dischetti di riferimento non trattati con il peptide.

In Figura 3.11 b) si può vedere l'incremento del contenuto d'acqua nei dischetti di pericardio del bovino A dopo il trattamento con il peptide auto-assemblante o con il Δ5SDF, rispetto al contenuto d'acqua nel pericardio di riferimento. Nel grafico di Figura 3.12 a) è riportato lo spessore dei dischetti del pericardio del bovino B, mentre in Figura 3.12 b) si può vedere l'incremento dello spessore dei dischetti del pericardio del bovino B dopo il trattamento con il peptide auto-assemblante o con il Δ5SDF, rispetto allo spessore del pericardio di riferimento (che non è stato in contatto con nessun peptide).



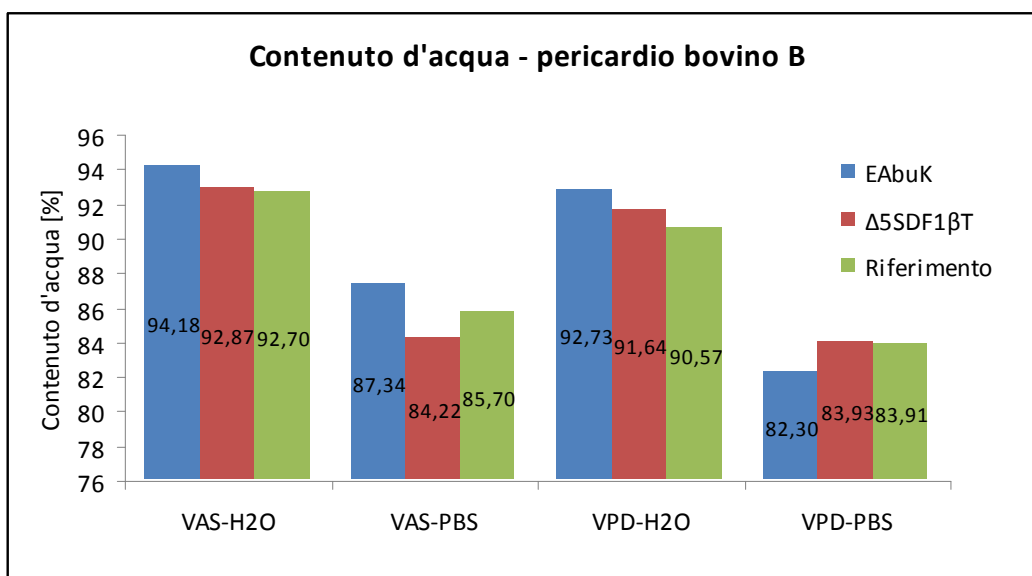
a)



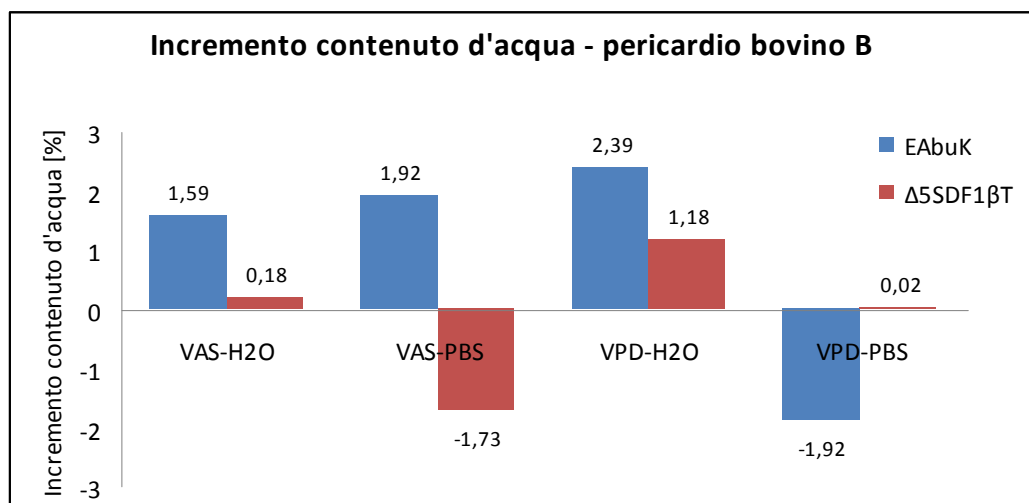
b)

Figura 3.12 a) Confronto tra lo spessore [cm] dei dischetti di pericardio bovino B (VAS e VPD) trattati con EAbuK o $\Delta 5SDF$ e poi immersi in H₂O MilliQ o PBS ed i rispettivi riferimenti; **b)** incremento dello spessore [%] dei dischetti di pericardio bovino B trattati con EAbuK o $\Delta 5SDF$ rispetto allo spessore dei dischetti di riferimento non trattati con il peptide.

Nel grafico di Figura 3.13 a) è riportato il contenuto percentuale di acqua nei dischetti del pericardio del bovino B.



a)



b)

Figura 3.13 a) Confronto tra il contenuto d'acqua [%] nei dischetti di pericardio bovino B (VAS e VPD) trattati con EAbuK o $\Delta 5SDF$ e poi immersi in H₂O MilliQ o PBS ed i rispettivi riferimenti; b) incremento del contenuto d'acqua [%] dei dischetti di pericardio bovino B trattati con EAbuK o $\Delta 5SDF$ rispetto al contenuto d'acqua dei dischetti di riferimento non trattati con il peptide.

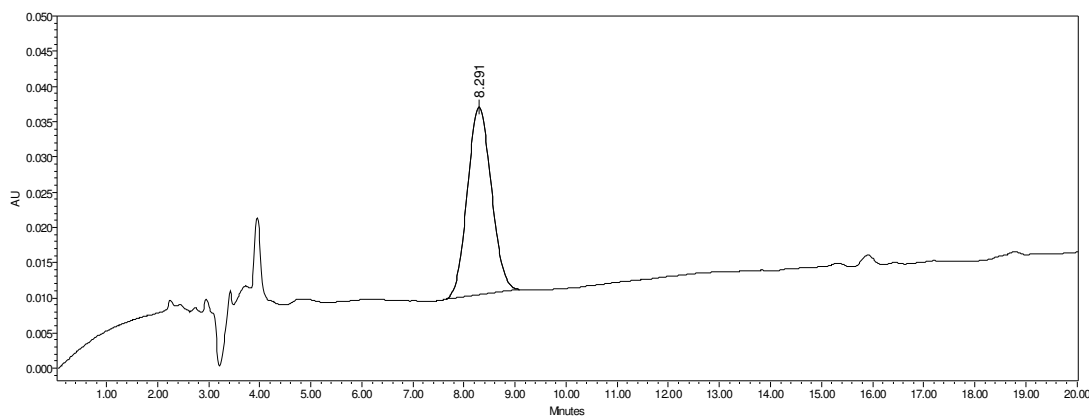
In Figura 3.13 b) si può vedere l'incremento del contenuto d'acqua nei dischetti di pericardio del bovino B dopo il trattamento con il peptide auto-assemblante o con il $\Delta 5SDF$, rispetto al contenuto d'acqua nel pericardio di riferimento. Anche per il pericardio del bovino B la presenza del peptide auto-assemblante comporta prevalentemente una tendenza all'aumento dello spessore e del contenuto d'acqua, a parte che per: la zona VPD posta in PBS per la quale il contenuto d'acqua post trattamento diminuisce, e la zona VPD posta in PBS dove lo spessore presenta un decremento rispetto al riferimento. Il peptide non auto-assemblante causa, a parte per la zona VPD in PBS un decremento dello spessore del pericardio, e provoca un incremento del contenuto d'acqua notevolmente inferiore all'auto-assemblante.

Quantificazione dei peptidi trattenuti all'interno del pericardio bovino:

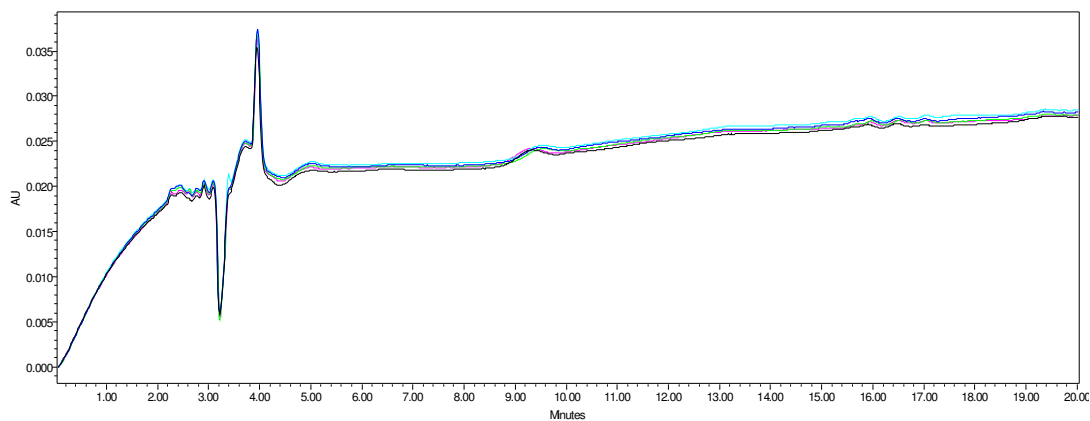
La massa di ciascun peptide trattenuta all'interno del pericardio è stata calcolata secondo la metodologia basata sull'analisi cromatografica delle soluzioni recuperate separatamente da ciascun pozzetto post-esperimento. Non è stato possibile procedere alla quantificazione mediante il metodo basato sulla lettura allo spettrofotometro delle soluzioni idrolizzate poiché in questo esperimento i peptidi non sono stati marcati con TAMRA.

Le soluzioni contenenti il peptide EAbuK recuperate separatamente dopo l'incubazione con gli 8 dischetti di pericardio bovino (4 dal bovino A e 4 dal bovino B e per ciascun bovino i 4 dischetti sono 2 da VAS e 2 da VPD) sono state analizzate mediante cromatografia RP-HPLC. Di ciascuna delle 8 soluzioni sono state effettuate 2 analisi con le stesse condizioni con le

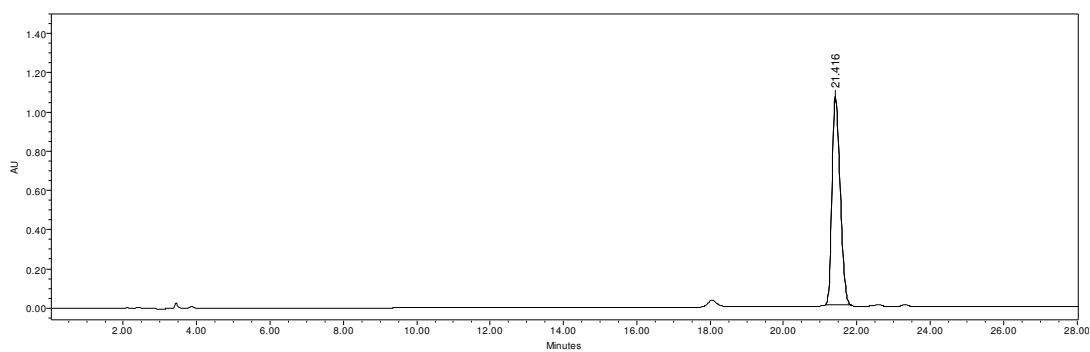
quali si erano effettuate le analisi RP-HPLC della soluzione madre. In Figura 3.14 a) sono riportati i risultati ottenuti dall'analisi cromatografica della soluzione madre e delle 8 soluzioni recuperate post-esperimento. Con le 8 soluzioni contenenti il peptide $\Delta 5$ SDF recuperate post-esperimento si è proceduto allo stesso modo. I risultati ottenuti dall'analisi cromatografica della soluzione madre e delle 8 soluzioni di EAbuK sono riportati rispettivamente in Figura 3.14 a) e b) per il peptide EAbuK e in Figura 3.14 c), d) e e) per il peptide $\Delta 5$ SDF (i cromatogrammi delle soluzioni di $\Delta 5$ SDF recuperate post-esperimento sono stati divisi in due gruppi da 4 per motivi di chiarezza). Di ciascuna soluzione si è riportato in figura solo il cromatogramma della prima delle 2 analisi effettuate.



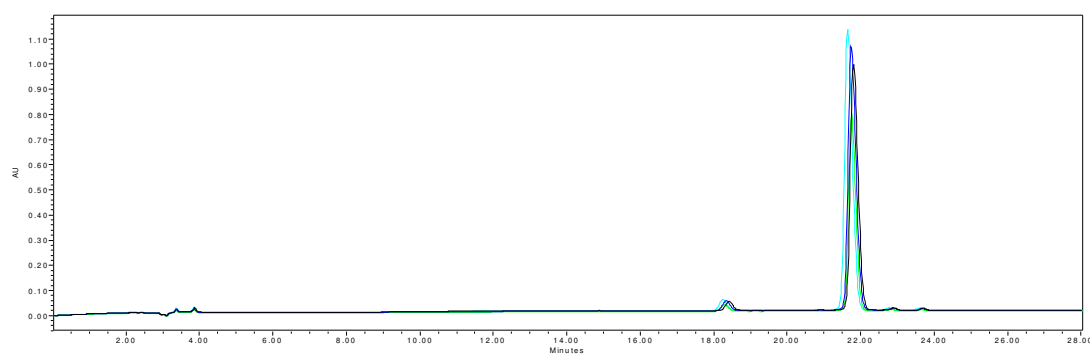
a)



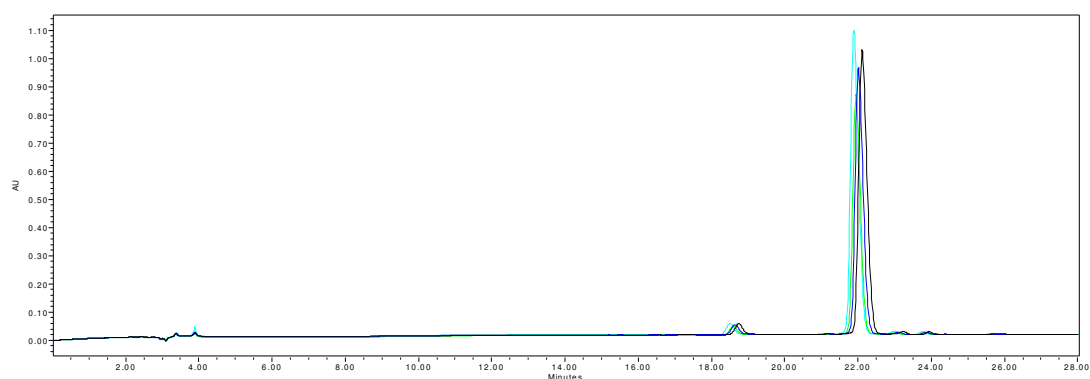
b)



c)



d)



e)

Figura 3.14 a) Analisi cromatografica RP-HPLC della soluzione madre di peptide EAbuK; b) analisi cromatografica RP-HPLC delle soluzioni di EAbuK recuperate post-esperimento su pericardio bovino. c) Analisi cromatografica RP-HPLC della soluzione madre di peptide Δ5SDF; d) ed e) analisi cromatografica RP-HPLC delle soluzioni di Δ5SDF recuperate post-esperimento su pericardio bovino. Le analisi sono state svolte nelle seguenti condizioni: colonna: Symmetry Shield; flusso: 1 mL/min; eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B: 0,05% TFA in CH₃CN; iniezione: 10 μL; gradiente dal 12% al 22% di eluente B in 20 min per le soluzioni di EAbuK mentre è stato usato il gradiente dal 20% al 34% di eluente B in 28 min per le soluzioni di Δ5SDF; lettura dell'assorbanza a 214 nm.

In Figura 3.14 è evidente come il picco del peptide auto-assemblante nelle soluzioni recuperate dopo l'esperimento sia praticamente scomparso. Questo, come nel caso dell'esperimento precedente, è da imputare al fenomeno dell'autoaggregazione. Si è deciso comunque di effettuare un calcolo della quantità di peptide libero rimasto in soluzione.

Attraverso la misura dell'area del picco relativo al peptide EAbuK o Δ5SDF in base alla soluzione recuperata, si è calcolata la massa di peptide auto-assemblante e non auto-assemblante rimasta nelle soluzioni dopo l'esperimento, e quindi, per differenza con la massa presente nel volume delle soluzioni madre per ciascun dischetto, si è potuto risalire alla quantità di Δ5SDF rimasta all'interno di ogni matrice di pericardio. In Tabella 3.12 sono riportati i valori di area totale dei picchi cromatografici, concentrazione delle soluzioni,

numero di moli e massa di EAbuK in soluzione, e massa di EAbuK rimasta nei dischetti di pericardio del bovino A e B.

Per rendere comprensibili con maggiore immediatezza i risultati riportati in Tabella 3.12, sono stati riportati graficamente nell'istogramma di Figura 3.15 i valori della massa media di EAbuK libero in soluzione.

Tabella 3.12 Misure di area totale dei picchi cromatografici, concentrazione, numero di moli e massa del peptide EAbuK calcolate per le soluzioni recuperate post-esperimento ($V = 300 \mu\text{L}$ ciascuna), e massa di EAbuK rimasta nei dischetti a) di pericardio bovino A e B.

Campione	Analisi	$A_{\text{picchiEAbuK}}$	C_{EAbuK} [mM]	n_{EAbuK} [μmol]	m_{EAbuK} [mg]	m_{EAbuK} rimasta nel pericardio [mg]		
Soluzione Madre	1	861783	1.000	0.3	0.518	-		
	2	878200	1.000	0.3	0.518	-		
	3	867480	1.000	0.3	0.518	-		
	<i>MEDIA</i>	<i>869154</i>	<i>1.000</i>	<i>0.3</i>	<i>0.518</i>	-		
	<i>Dev. St.</i>	<i>8335</i>	<i>0.000</i>	<i>0.0</i>	<i>0.000</i>	-		
	Bovino A	VAS	1	57639	0.066	0.020	0.034	0.484
2			43362	0.050	0.015	0.026	0.493	
1			47766	0.055	0.016	0.028	0.490	
2			51396	0.059	0.018	0.031	0.488	
<i>MEDIA</i>			<i>50041</i>	<i>0.058</i>	<i>0.017</i>	<i>0.030</i>	<i>0.489</i>	
<i>Dev. St.</i>			<i>6037</i>	<i>0.007</i>	<i>0.002</i>	<i>0.004</i>	<i>0.004</i>	
VPD		1	18674	0.021	0.006	0.011	0.507	
		2	21756	0.025	0.008	0.013	0.505	
		1	33491	0.039	0.012	0.020	0.498	
		2	34592	0.040	0.012	0.021	0.498	
		<i>MEDIA</i>	<i>27128</i>	<i>0.031</i>	<i>0.009</i>	<i>0.016</i>	<i>0.502</i>	
		<i>Dev. St.</i>	<i>8094</i>	<i>0.009</i>	<i>0.003</i>	<i>0.005</i>	<i>0.005</i>	
Bovino B		VAS	1	35694	0.041	0.012	0.021	0.497
			2	45881	0.053	0.016	0.027	0.491
	1		23768	0.027	0.008	0.014	0.504	
	2		24825	0.029	0.009	0.015	0.504	
	<i>MEDIA</i>		<i>32542</i>	<i>0.037</i>	<i>0.011</i>	<i>0.019</i>	<i>0.499</i>	
	<i>Dev. St.</i>		<i>10399</i>	<i>0.012</i>	<i>0.004</i>	<i>0.006</i>	<i>0.006</i>	
	VPD	1	23487	0.027	0.008	0.014	0.504	
		2	31338	0.036	0.011	0.019	0.500	
		1	26698	0.031	0.009	0.016	0.502	
		2	35142	0.040	0.012	0.021	0.497	
		<i>MEDIA</i>	<i>29166</i>	<i>0.034</i>	<i>0.010</i>	<i>0.017</i>	<i>0.501</i>	
		<i>Dev. St.</i>	<i>5124</i>	<i>0.006</i>	<i>0.002</i>	<i>0.003</i>	<i>0.003</i>	

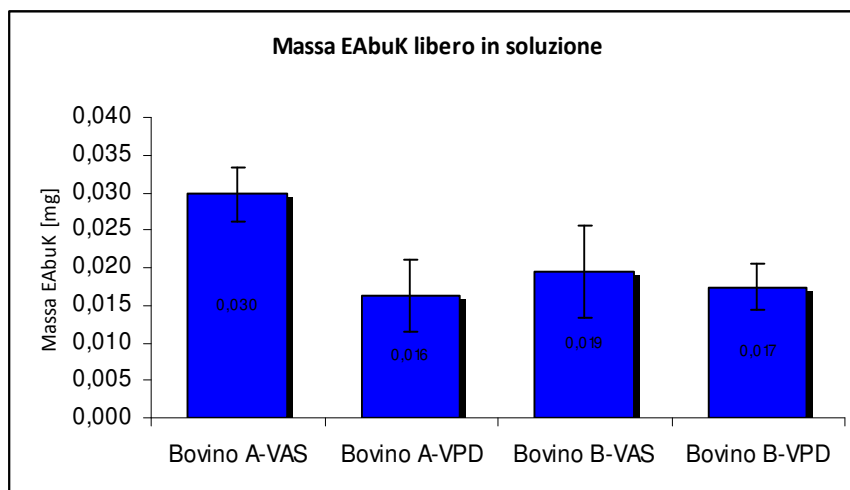


Figura 3.15 Massa media [mg] di peptide auto-assemblante EAbuK libero in soluzione dopo il trattamento delle matrici di pericardio bovino.

Infine si è effettuata con il programma Minitab l’analisi statistica di tutti i valori di massa di peptide auto-assemblante rimasto libero in soluzione dopo il trattamento delle matrici di pericardio bovino decellularizzato. L’analisi statistica è riassunta in Figura 3.16.

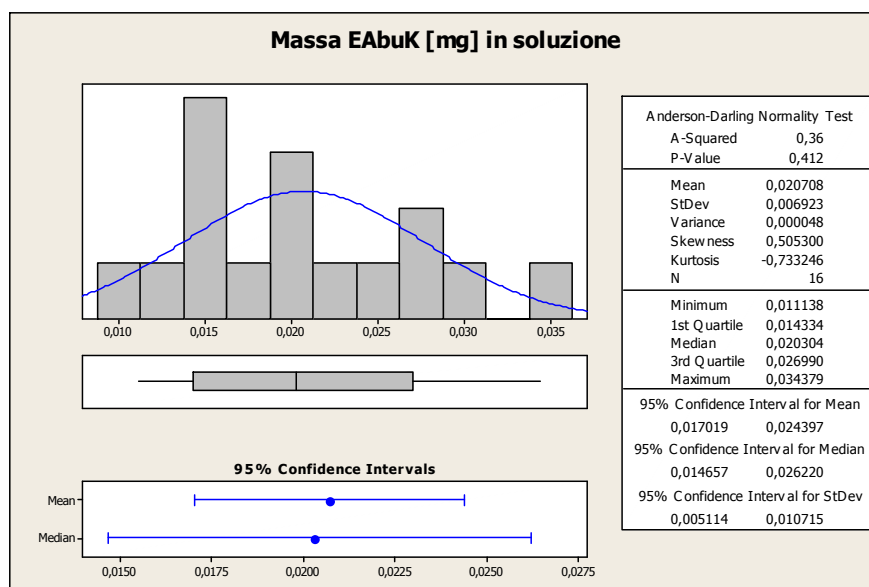


Figura 3.16 Tabella riassuntiva contenente le rappresentazioni grafiche, gli indici statistici e il test di normalità per i dati di massa [mg] di peptide EAbuK rimasta libera in soluzione dopo il trattamento delle matrici di pericardio bovino decellularizzato.

La massa media di peptide rimasta libera in soluzione dopo il trattamento dei dischetti di pericardio è $m_{EAbuK} = 0,207$ mg con un intervallo di confidenza al 95% pari a 0,170-0,244 mg. Il risultato del test di normalità indica che i dati relativi alla massa di peptide auto-

assemblante rimasta libera in soluzione, seguono una distribuzione di tipo normale infatti si è ottenuto un P -value maggiore di $\alpha = 0,05$. In Tabella 3.13 sono riportati i valori di area totale dei picchi cromatografici, concentrazione delle soluzioni, numero di moli e massa di $\Delta 5SDF$ in soluzione, e massa di $\Delta 5SDF$ rimasta nei dischetti di pericardio del bovino A e B.

Tabella 3.13 Misure di area totale dei picchi cromatografici, concentrazione, numero di moli e massa del peptide $\Delta 5SDF$ calcolate per le soluzioni recuperate post-esperimento ($V = 300 \mu L$ ciascuna), e massa di $\Delta 5SDF$ rimasta nei dischetti a) di pericardio bovino A e B.

Campione	Analisi	$A_{picchi\Delta 5SDF}$	$C_{\Delta 5SDF}$ [mM]	$n_{\Delta 5SDF}$ [μ mol]	$m_{\Delta 5SDF}$ [mg]	$m_{\Delta 5SDF}$ rimasta nel pericardio [mg]	
Soluzione Madre	1	16724704	1.000	0.3	0.668	-	
	2	16718780	1.000	0.3	0.668	-	
	3	16855377	1.000	0.3	0.668	-	
	<i>MEDIA</i>	<i>16766287</i>	<i>1.000</i>	<i>0.3</i>	<i>0.668</i>	-	
	<i>Dev. St.</i>	<i>77211</i>	<i>0.000</i>	<i>0.0</i>	<i>0.000</i>	-	
Bovino A	VAS	1	15811940	0.943	0.283	0.630	0.038
		2	15711366	0.937	0.281	0.626	0.042
		1	12344598	0.736	0.221	0.492	0.176
		2	12370349	0.738	0.221	0.493	0.175
		<i>MEDIA</i>	<i>14059563</i>	<i>0.839</i>	<i>0.252</i>	<i>0.560</i>	<i>0.108</i>
	<i>Dev. St.</i>	<i>1965861</i>	<i>0.117</i>	<i>0.035</i>	<i>0.078</i>	<i>0.078</i>	
	VPD	1	14327157	0.855	0.256	0.571	0.097
		2	14138384	0.843	0.253	0.563	0.105
		1	16482695	0.983	0.295	0.656	0.011
		2	16218933	0.967	0.290	0.646	0.022
<i>MEDIA</i>		<i>15291792</i>	<i>0.912</i>	<i>0.274</i>	<i>0.609</i>	<i>0.059</i>	
<i>Dev. St.</i>	<i>1230002</i>	<i>0.073</i>	<i>0.022</i>	<i>0.049</i>	<i>0.049</i>		
Bovino B	VAS	1	14624524	0.872	0.262	0.582	0.085
		2	14345322	0.856	0.257	0.571	0.096
		1	10475635	0.625	0.187	0.417	0.251
		2	10716244	0.639	0.192	0.427	0.241
		<i>MEDIA</i>	<i>12540431</i>	<i>0.748</i>	<i>0.224</i>	<i>0.499</i>	<i>0.168</i>
	<i>Dev. St.</i>	<i>2250341</i>	<i>0.134</i>	<i>0.040</i>	<i>0.090</i>	<i>0.090</i>	
	VPD	1	15159498	0.904	0.271	0.604	0.064
		2	15694559	0.936	0.281	0.625	0.043
		1	16203738	0.966	0.290	0.645	0.022
		2	16733947	0.998	0.299	0.666	0.013
<i>MEDIA</i>		<i>15947935</i>	<i>0.951</i>	<i>0.285</i>	<i>0.635</i>	<i>0.033</i>	
<i>Dev. St.</i>	<i>675544</i>	<i>0.040</i>	<i>0.012</i>	<i>0.027</i>	<i>0.027</i>		

In Figura 3.17 sono stati riportati graficamente i valori della massa media di $\Delta 5SDF$ trattenuta dal pericardio proveniente dalle zone VAS e VPD di ciascuno dei due bovini A e B.

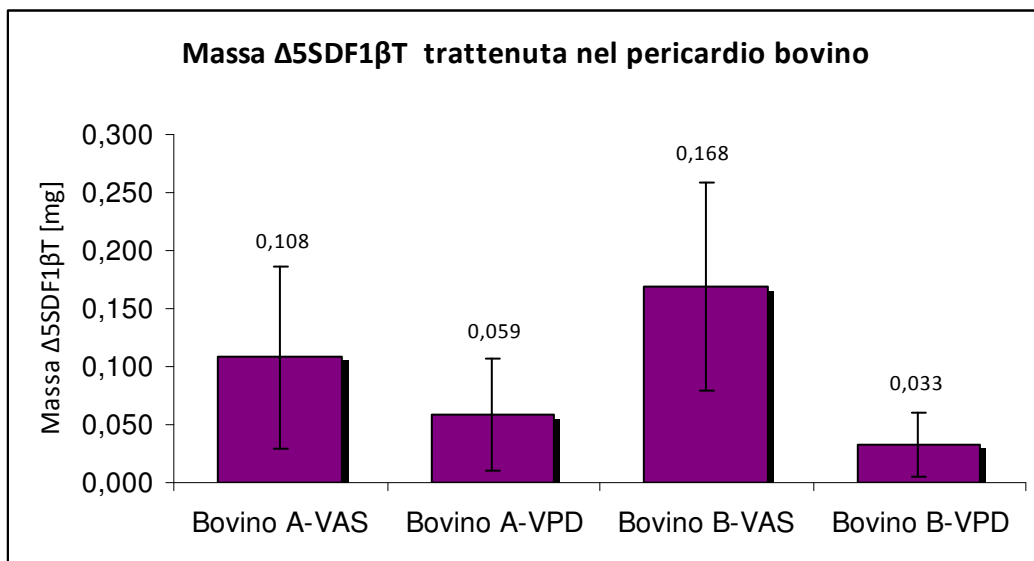


Figura 3.17 Massa media [mg] di peptide non auto-assemblante $\Delta 5SDF$ trattenuta dalle matrici di pericardio bovino decellularizzato.

L'analisi statistica dei valori di massa di peptide non auto-assemblante rimasta nelle matrici di pericardio bovino decellularizzato è riassunta in Figura 3.18.

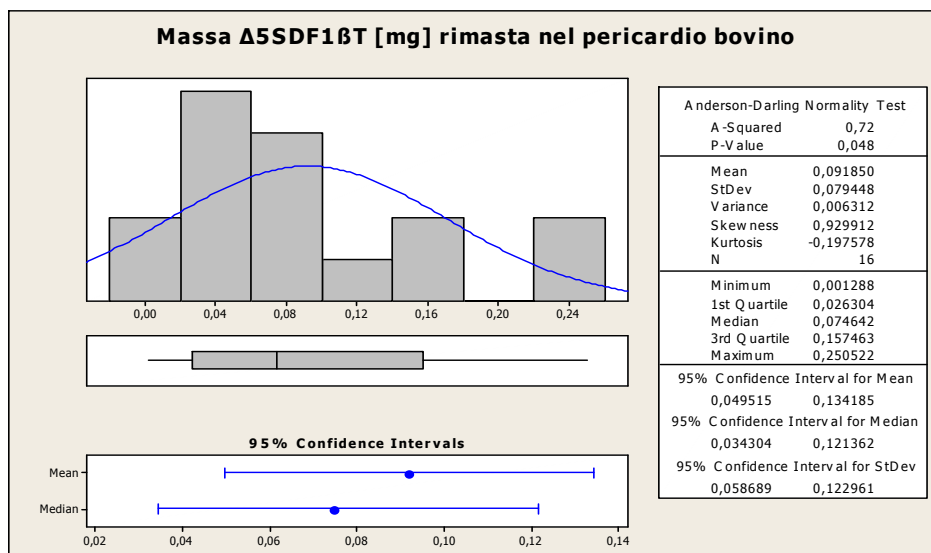


Figura 3.18 Tabella riassuntiva contenente le rappresentazioni grafiche, gli indici statistici e il test di normalità per i dati di massa [mg] di peptide $\Delta 5SDF$ rimasta all'interno delle matrici di pericardio bovino decellularizzato, dopo l'esperimento.

La massa media di peptide rimasta all'interno dei dischetti di pericardio è $m_{\Delta 5SDF} = 0,092$ mg con un intervallo di confidenza al 95% molto ampio e pari a 0,050-0,134 mg. Il risultato del test di normalità indica che i dati relativi alla massa di peptide non auto-assemblante rimasta

all'interno dei dischetti di pericardio non seguono una distribuzione di tipo normale infatti si è ottenuto un *P-value* inferiore ad $\alpha = 0,05$. Questo evidenzia la grande variabilità dei dati ottenuti per il peptide $\Delta 5\text{SDF}$. Per il peptide $\Delta 5\text{SDF}$ si nota che nella zona VAS rimane una quantità di peptide sensibilmente maggiore, e pari almeno al doppio rispetto alla quantità di peptide rimasta nella zona VPD, e questo è evidente per entrambi gli animali A e B (Figura 3.17).

3.1.3 *Trattamento di pericardio porcino decellularizzato*

Dopo aver verificato in quale modo il peptide auto-assemblante EAbuK e il peptide non auto-assemblante $\Delta 5\text{SDF}$ influiscono sulla variazione delle proprietà fisiche del pericardio bovino, si è deciso di riprodurre l'esperimento precedente (si veda il paragrafo 3.1.2) su pericardio porcino.

Per fare questo sono stati decellularizzati, secondo il metodo TRI-COL, 2 pericardi porcini, che si sono denominati porcino A e porcino B. Sono stati tagliati:

- ✓ 6 dischetti dalla zona del ventricolo anteriore destro (VAD) del porcino A;
- ✓ 6 dischetti dalla zona del ventricolo anteriore destro (VAD) del porcino B;
- ✓ 6 dischetti dalla zona del ventricolo anteriore sinistro (VPD) del porcino A;
- ✓ 6 dischetti dalla zona del ventricolo posteriore destro (VPD) del porcino B.

Anche in questo caso la scelta di utilizzare due zone differenti del pericardio bovino è dovuta alla necessità di indagare in quale modo la disposizione delle fibre di collagene della matrice extracellulare influisca sulla variazione delle sue proprietà fisiche dopo il trattamento con i peptidi. In questo esperimento si utilizzano: la zona VAD nella quale la disposizione delle fibre di collagene è ordinata ed il tessuto risulta quindi anisotropo, e la zona VPD dove la disposizione delle fibre di collagene è random ed il tessuto risulta dunque anisotropo.

Come per l'esperimento precedente, si sono utilizzati: il peptide auto-assemblante EAbuK amide-terminale (Capitolo 2, paragrafo 2.1.2.2) e la sequenza peptidica non auto-assemblante $\Delta 5\text{SDF}$ (Capitolo 2, paragrafo 2.1.2.3).

Sono stati trattati con il peptide auto-assemblante un totale di 8 dischetti provenienti dalle due zone di pericardio diverse dei due animali A e B, e altri 8 dischetti sono stati trattati con il peptide non auto-assemblante $\Delta 5\text{SDF}$.

Procedura sperimentale:

Si sono preparate le due soluzioni madre dei peptidi:

- Soluzione di EAbuK: è stata preparata una soluzione a concentrazione 1 mM, sciogliendo 4,6 mg (2,65 μmol) di peptide in 2650 μL di H_2O MilliQ;
- Soluzione di $\Delta 5\text{SDF}$: è stata preparata una soluzione a concentrazione 1 mM, sciogliendo 6,1 mg (2,65 μmol) di peptide in 2650 μL di H_2O MilliQ.

Di ciascuna delle due soluzioni madre, prima dell'esperimento, è stata effettuata l'analisi RP-HPLC in triplicato con le seguenti condizioni:

- Soluzione di EAbuK: colonna: Symmetry Shield; flusso: 1 mL/min; eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B: 0,05% TFA in CH₃CN; iniezione: 10 µL; gradiente dal 12% al 22% di eluente B in 20 min; lettura dell'assorbanza a 214 nm;
- Soluzione di Δ5SDF: colonna: Symmetry Shield; flusso: 1 mL/min; eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B: 0,05% TFA in CH₃CN; iniezione: 10 µL; gradiente dal 20% al 34% di eluente B in 28 min; lettura dell'assorbanza a 214 nm.

Ogni dischetto di pericardio porcino decellularizzato è stato posto in un pozzetto di una piastra da 48 pt.

Sono stati aggiunti 300 µL di soluzione 1mM di EAbuK preparata in precedenza sui seguenti campioni:

- ✓ 4 dischetti dal pericardio del porcino A: 2 dalla zona VAD e 2 dalla zona VPD;
- ✓ 4 dischetti dal pericardio del porcino B: 2 dalla zona VAD e 2 dalla zona VPD.

Sono stati aggiunti 300 µL di soluzione madre 1mM di Δ5SDF ai seguenti campioni:

- ✓ 4 dischetti dal pericardio del porcino A: 2 dalla zona VAD e 2 dalla zona VPD;
- ✓ 4 dischetti dal pericardio del porcino B: 2 dalla zona VAD e 2 dalla zona VPD;

mentre altri 8 dischetti sono stati utilizzati come riferimento (4 dischetti dal porcino A e 4 dischetti dal porcino B, metà tagliati dalla zona VAD e metà dalla zona VPD del pericardio) e sono stati lasciati in contatto con H₂O MilliQ. Nei pozzetti della piastra rimasti vuoti è stata aggiunta H₂O MilliQ per mantenere l'ambiente il più possibile umido. La piastra è stata chiusa bene con parafilm per evitare l'evaporazione delle soluzioni. I campioni sono rimasti a contatto con le soluzioni per 24 ore a temperatura costante pari a 37°C sotto blanda agitazione. Al termine delle 24 ore di incubazione, le soluzioni con i peptidi residui sono state recuperate separatamente, per effettuare le analisi RP-HPLC in triplicato alle stesse condizioni utilizzate per le due soluzioni madre. Una volta tolte le soluzioni contenenti i peptidi, su 4 dischetti trattati con EAbuK (2 dal porcino A e 2 dal porcino B e per ciascun porcino i due dischetti sono 1 da VAD e 1 da VPD) e 4 dischetti trattati con Δ5SDF (sempre 2 dal porcino A e 2 dal porcino B e per ciascun bovino i due dischetti sono 1 da VAD e 1 da VPD) è stata aggiunta H₂O MilliQ, mentre nell'altra metà dei dischetti trattati con i peptidi è stato aggiunto PBS. Allo stesso modo si è proceduto con gli 8 dischetti di riferimento. Queste soluzioni sono state lasciate a contatto con i dischetti per 30 minuti a temperatura di 37°C con blanda agitazione. In questo modo il peptide EAbuK posto a contatto con il PBS auto-aggrega, mentre il peptide Δ5SDF no; per i dischetti posti poi a contatto con H₂O MilliQ si è visto che il peptide EAbuK riesce comunque ad auto-aggregare grazie alla presenza di ioni monocarica all'interno della matrice extracellulare, mentre il peptide Δ5SDF no.

Al termine dell'esperimento i campioni risultano essere così trattati:

- ✓ 2 da VAD porcino A trattato con EAbuK e poi 1 immerso in H₂O MilliQ e 1 in PBS;
- ✓ 2 da VAD porcino B trattato con EAbuK e poi 1 immerso in H₂O MilliQ e 1 in PBS;
- ✓ 2 da VPD porcino A trattato con EAbuK e poi 1 immerso in H₂O MilliQ e 1 in PBS;
- ✓ 2 da VPD porcino B trattato con EAbuK e poi 1 immerso in H₂O MilliQ e 1 in PBS;
- ✓ 2 da VAD porcino A trattato con Δ5SDF e poi 1 immerso in H₂O MilliQ e 1 in PBS;
- ✓ 2 da VAD porcino B trattato con Δ5SDF e poi 1 immerso in H₂O MilliQ e 1 in PBS;
- ✓ 2 da VPD porcino A trattato con Δ5SDF e poi 1 immerso in H₂O MilliQ e 1 in PBS;
- ✓ 2 da VPD porcino B trattato con Δ5SDF e poi 1 immerso in H₂O MilliQ e 1 in PBS;
- ✓ 2 da VAD porcino A non trattato con peptide e lasciato 1 immerso in H₂O MilliQ e 1 in PBS;
- ✓ 2 da VAD porcino B non trattato con peptide e lasciato 1 immerso in H₂O MilliQ e 1 in PBS;
- ✓ 2 da VPD porcino A non trattato con peptide e lasciato 1 immerso in H₂O MilliQ e 1 in PBS;
- ✓ 2 da VPD porcino B non trattato con peptide e lasciato 1 immerso in H₂O MilliQ e 1 in PBS.

Dopo i 30 minuti di incubazione in H₂O MilliQ o PBS, è stato effettuato un lavaggio in flusso dei dischetti di pericardio. Per il lavaggio è stata utilizzata H₂O MilliQ o PBS in base al trattamento che era stato ricevuto da ciascun dischetto. La soluzione di lavaggio è stata fatta defluire per gravità attraverso la matrice del pericardio ad una velocità media di 7 mL/min regolata grazie ad una valvola installata sulla colonna nella quale si sono effettuati i lavaggi.

Il lavaggio è stato eseguito per verificare se vi sia rilascio di peptide auto-assemblante.

Risultati e discussione:

Al termine dell'esperimento sono state misurate le proprietà fisiche dei dischetti di pericardio porcino trattati o con il peptide EAbuK, o con il peptide Δ5SDF e le proprietà fisiche dei dischetti di pericardio porcino di riferimento.

In Tabella 3.14 a) sono riportate le proprietà fisiche del pericardio porcino decellularizzato VAD, prima trattato con la soluzione di EAbuK e poi incubato in H₂O MilliQ, mentre in Tabella 3.14 b) sono riportate le proprietà fisiche del pericardio porcino decellularizzato VAD, prima trattato con la soluzione di Δ5SDF e poi incubato in H₂O MilliQ. Infine, in Tabella 3.14 c) sono riportate le proprietà fisiche del pericardio bovino decellularizzato VAD di riferimento, cioè non trattato con i peptidi e lasciati in H₂O MilliQ.

Tabella 3.14 a) Proprietà fisiche dei dischetti di pericardio VAD porcino decellularizzato trattati con il peptide EAbuK e poi posti in H₂O MilliQ; b) proprietà fisiche dei dischetti di pericardio VAD porcino decellularizzato trattati con il peptide Δ5SDF e poi posti in H₂O MilliQ; c) proprietà fisiche dei dischetti di pericardio VAD porcino decellularizzato di riferimento, non trattati con i peptidi e poi posti in H₂O MilliQ.

a)

Pericardio VAD porcino trattato con EAbuK e poi H₂O MilliQ						
	<i>A</i> [cm ²]	<i>m</i> [g]	ρ a 24°C [g/mL]	<i>V</i> [cm ³]	<i>s</i> [cm]	Contenuto H ₂ O [%]
Porcino A	0.728	0.074	1.025	0.072	0.099	91.79
Porcino B	0.636	0.076	1.017	0.075	0.118	89.65
MEDIA	0.682	0.075	1.021	0.074	0.109	90.72
Dev. St	0.065	0.002	0.006	0.002	0.014	1.51

b)

Pericardio VAD porcino trattato con Δ5SDF e poi H₂O MilliQ						
	<i>A</i> [cm ²]	<i>m</i> [g]	ρ a 24°C [g/mL]	<i>V</i> [cm ³]	<i>s</i> [cm]	Contenuto H ₂ O [%]
Porcino A	0.666	0.049	1.056	0.047	0.070	85.63
Porcino B	0.637	0.057	1.038	0.055	0.086	88.98
MEDIA	0.652	0.053	1.047	0.051	0.078	87.31
Dev. St	0.021	0.005	0.013	0.006	0.011	2.37

c)

Pericardio VAD porcino non trattato con i peptidi e lasciato in H₂O MilliQ						
	<i>A</i> [cm ²]	<i>m</i> [g]	ρ a 24°C [g/mL]	<i>V</i> [cm ³]	<i>s</i> [cm]	Contenuto H ₂ O [%]
Porcino A	0.470	0.019	1.056	0.018	0.038	74.48
Porcino B	0.431	0.023	1.056	0.021	0.050	75.42
MEDIA	0.451	0.021	1.056	0.020	0.044	74.95
Dev. St	0.028	0.003	0.000	0.002	0.008	0.66

In Tabella 3.15 a) sono riportate le proprietà fisiche del pericardio porcino decellularizzato VAD, prima trattato con la soluzione di EAbuK e poi incubato PBS, mentre in Tabella 3.15 b) sono riportate le proprietà fisiche del pericardio porcino decellularizzato VAD, prima trattato con la soluzione di Δ5SDF e poi incubato in PBS. Infine, in Tabella 3.15 c) sono riportate le proprietà fisiche del pericardio porcino decellularizzato VAD di riferimento, cioè non trattato con i peptidi e posto poi in PBS.

Tabella 3.15 a) Proprietà fisiche dei dischetti di pericardio VAD porcino decellularizzato trattati con il peptide EAbuK e poi posti in PBS; b) proprietà fisiche dei dischetti di pericardio VAD porcino decellularizzato trattati con il peptide Δ 5SDF e poi posti in PBS; c) proprietà fisiche dei dischetti di pericardio VAD porcino decellularizzato di riferimento, non trattati con i peptidi e poi posti in PBS.

a)

Pericardio VAD porcino trattato con EAbuK e poi PBS						
	A [cm ²]	m [g]	ρ a 24°C [g/mL]	V [cm ³]	s [cm]	Contenuto H ₂ O [%]
Porcino A	0.527	0.038	1.043	0.036	0.069	83.68
Porcino B	0.522	0.029	1.044	0.027	0.052	79.16
MEDIA	0.525	0.033	1.044	0.032	0.061	81.42
Dev. St	0.004	0.006	0.001	0.006	0.011	3.19

b)

Pericardio VAD porcino trattato con Δ 5SDF e poi PBS						
	A [cm ²]	m [g]	ρ a 24°C [g/mL]	V [cm ³]	s [cm]	Contenuto H ₂ O [%]
Porcino A	0.527	0.035	1.043	0.033	0.063	83.28
Porcino B	0.478	0.026	1.046	0.025	0.053	81.00
MEDIA	0.503	0.031	1.045	0.029	0.058	82.14
Dev. St	0.035	0.006	0.002	0.006	0.007	1.61

c)

Pericardio VAD porcino non trattato con i peptidi e posto in PBS						
	A [cm ²]	m [g]	ρ a 24°C [g/mL]	V [cm ³]	s [cm]	Contenuto H ₂ O [%]
Porcino A	0.565	0.027	1.046	0.025	0.045	80.79
Porcino B	0.468	0.024	1.055	0.023	0.049	77.01
MEDIA	0.517	0.025	1.051	0.024	0.047	78.90
Dev. St	0.069	0.002	0.006	0.002	0.003	2.67

In Tabella 3.16 a) sono riportate le proprietà fisiche del pericardio porcino decellularizzato VPD, prima trattato con la soluzione di EAbuK e poi incubato in H₂O MilliQ, mentre in Tabella 3.16 b) sono riportate le proprietà fisiche del pericardio porcino decellularizzato VPD, prima trattato con la soluzione di Δ 5SDF e poi incubato in H₂O MilliQ. Infine, in Tabella 3.16 c) sono riportate le proprietà fisiche del pericardio porcino decellularizzato VPD di riferimento, cioè non trattato con i peptidi e lasciati in H₂O MilliQ.

Tabella 3.16 a) Proprietà fisiche dei dischetti di pericardio VPD porcino decellularizzato trattati con il peptide EAbuK e poi posti in H₂O MilliQ; b) proprietà fisiche dei dischetti di pericardio VPD porcino decellularizzato trattati con il peptide Δ5SDF e poi posti in H₂O MilliQ; c) proprietà fisiche dei dischetti di pericardio VPD porcino decellularizzato di riferimento, non trattati con i peptidi e poi posti in H₂O MilliQ.

a)

Pericardio VPD porcino trattato con EAbuK e poi H₂O MilliQ						
	<i>A</i> [cm ²]	<i>m</i> [g]	ρ a 24°C [g/mL]	<i>V</i> [cm ³]	<i>s</i> [cm]	Contenuto H ₂ O [%]
Porcino A	0.789	0.076	1.023	0.075	0.095	90.17
Porcino B	0.689	0.069	1.022	0.067	0.098	91.14
MEDIA	0.739	0.072	1.023	0.071	0.096	90.66
Dev. St	0.071	0.005	0.001	0.005	0.002	0.68

b)

Pericardio VPD porcino trattato con Δ5SDF e poi H₂O MilliQ						
	<i>A</i> [cm ²]	<i>m</i> [g]	ρ a 24°C [g/mL]	<i>V</i> [cm ³]	<i>s</i> [cm]	Contenuto H ₂ O [%]
Porcino A	0.635	0.052	1.030	0.050	0.079	88.96
Porcino B	0.689	0.058	1.028	0.056	0.082	89.58
MEDIA	0.662	0.055	1.029	0.053	0.081	89.27
Dev. St	0.038	0.004	0.001	0.004	0.002	0.44

c)

Pericardio VPD porcino non trattato con i peptidi e lasciato in H₂O MilliQ						
	<i>A</i> [cm ²]	<i>m</i> [g]	ρ a 24°C [g/mL]	<i>V</i> [cm ³]	<i>s</i> [cm]	Contenuto H ₂ O [%]
Porcino A	0.524	0.031	1.053	0.029	0.056	77.58
Porcino B	0.521	0.032	1.056	0.031	0.059	78.74
MEDIA	0.523	0.032	1.055	0.030	0.057	78.16
Dev. St	0.002	0.001	0.002	0.001	0.002	0.82

In Tabella 3.17 a) sono riportate le proprietà fisiche del pericardio porcino decellularizzato VPD, prima trattato con la soluzione di EAbuK e poi incubato PBS, mentre in Tabella 3.17 b) sono riportate le proprietà fisiche del pericardio porcino decellularizzato VPD, prima trattato con la soluzione di Δ5SDF e poi incubato in PBS. Infine, in Tabella 3.17 c) sono riportate le proprietà fisiche del pericardio porcino decellularizzato VPD di riferimento, cioè non trattato con i peptidi e posto poi in PBS.

Tabella 3.17 a) Proprietà fisiche dei dischetti di pericardio VPD porcino decellularizzato trattati con il peptide EAbuK e poi posti in PBS; b) proprietà fisiche dei dischetti di pericardio VPD porcino decellularizzato trattati con il peptide Δ 5SDF e poi posti in PBS; c) proprietà fisiche dei dischetti di pericardio VPD porcino decellularizzato di riferimento, non trattati con i peptidi e poi posti in PBS.

a)

Pericardio VPD porcino trattato con EAbuK e poi PBS						
	<i>A</i> [cm ²]	<i>m</i> [g]	ρ a 24°C [g/mL]	<i>V</i> [cm ³]	<i>s</i> [cm]	Contenuto H ₂ O [%]
Porcino A	0.519	0.0376	1.043	0.036	0.069	83.92
Porcino B	0.527	0.359	1.044	0.034	0.065	82.43
MEDIA	<i>0.523</i>	<i>0.037</i>	<i>1.044</i>	<i>0.035</i>	<i>0.067</i>	<i>83.17</i>
Dev. St	<i>0.006</i>	<i>0.001</i>	<i>0.001</i>	<i>0.001</i>	<i>0.003</i>	<i>1.05</i>

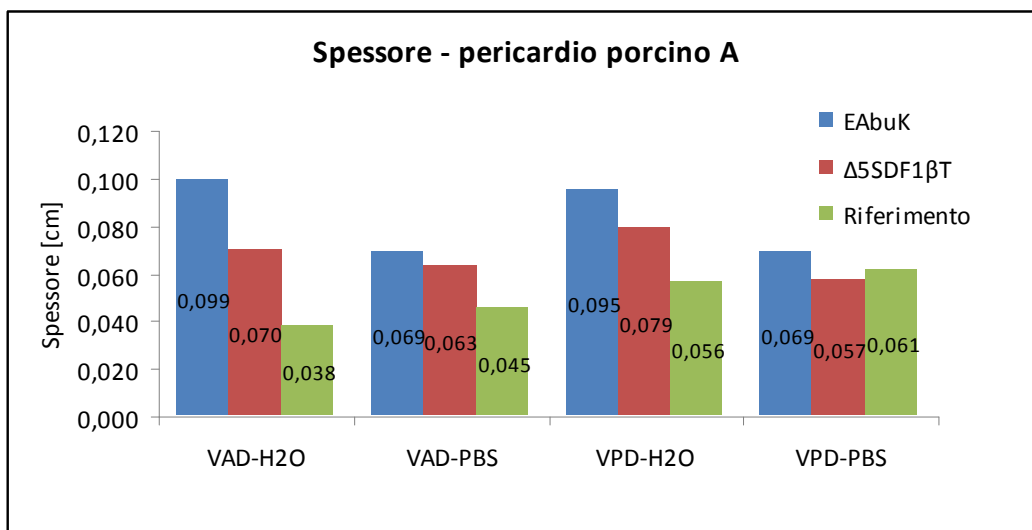
b)

Pericardio VPD porcino trattato con Δ5SDF e poi PBS						
	<i>A</i> [cm ²]	<i>m</i> [g]	ρ a 24°C [g/mL]	<i>V</i> [cm ³]	<i>s</i> [cm]	Contenuto H ₂ O [%]
Porcino A	0.628	0.037	1.044	0.036	0.057	81.94
Porcino B	0.586	0.043	1.043	0.042	0.071	81.98
MEDIA	<i>0.607</i>	<i>0.040</i>	<i>1.044</i>	<i>0.039</i>	<i>0.064</i>	<i>81.96</i>
Dev. St	<i>0.030</i>	<i>0.004</i>	<i>0.001</i>	<i>0.004</i>	<i>0.010</i>	<i>0.03</i>

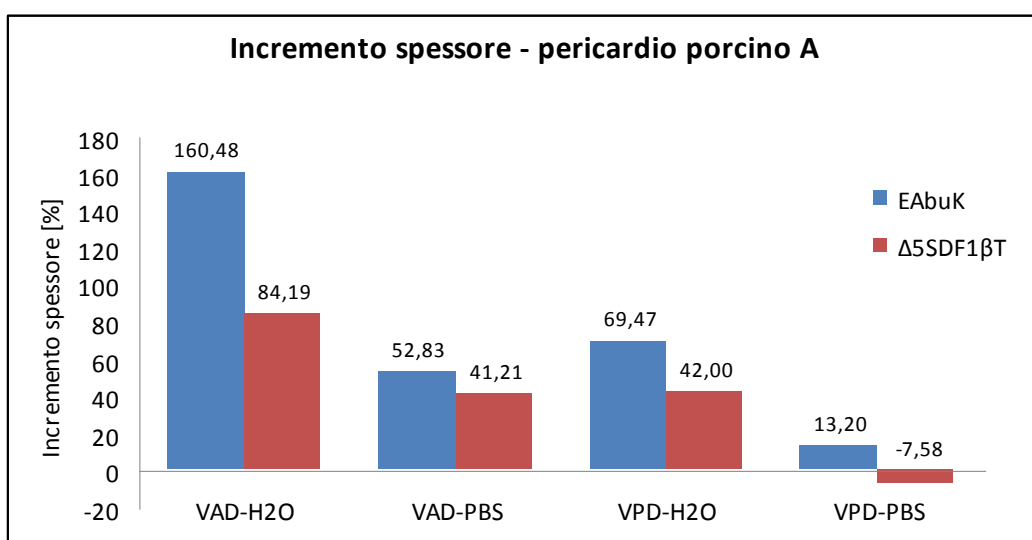
c)

Pericardio VPD porcino non trattato con i peptidi e posto in PBS						
	<i>A</i> [cm ²]	<i>m</i> [g]	ρ a 24°C [g/mL]	<i>V</i> [cm ³]	<i>s</i> [cm]	Contenuto H ₂ O [%]
Porcino A	0.491	0.030	1.041	0.030	0.061	79.45
Porcino B	0.480	0.027	1.044	0.026	0.054	77.40
MEDIA	<i>0.486</i>	<i>0.029</i>	<i>1.043</i>	<i>0.028</i>	<i>0.058</i>	<i>78.42</i>
Dev. St	<i>0.008</i>	<i>0.003</i>	<i>0.002</i>	<i>0.003</i>	<i>0.005</i>	<i>1.45</i>

Per una migliore e più immediata comprensione i valori ottenuti per le proprietà fisiche del pericardio porcino sono stati rappresentati graficamente. Nel grafico di Figura 3.19 a) è riportato lo spessore dei dischetti del pericardio del porcino A, mentre in Figura 3.19 b) si può vedere l'incremento percentuale dello spessore dei dischetti del pericardio del porcino A dopo il trattamento con il peptide auto-assemblante o con il Δ 5SDF, rispetto allo spessore del pericardio porcino di riferimento (che non è stato in contatto con nessun peptide).



a)

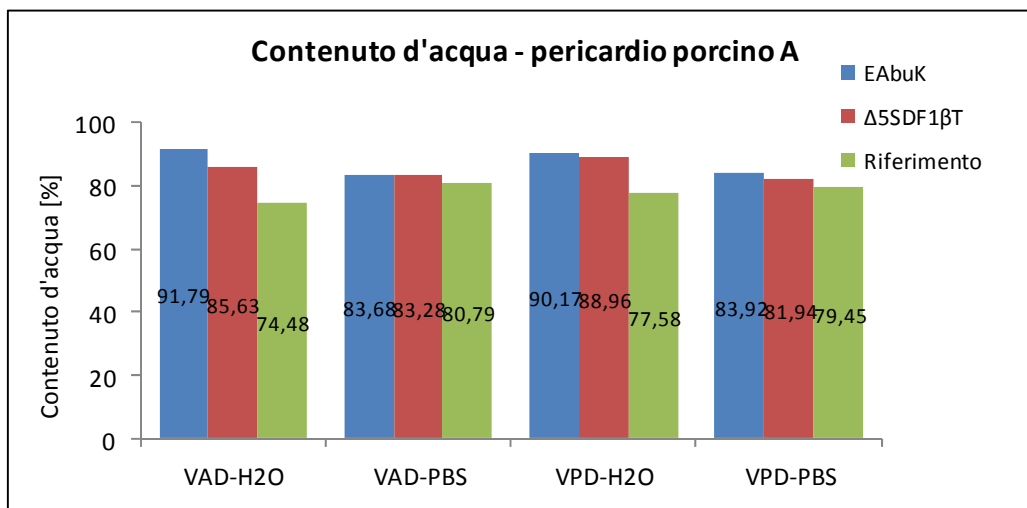


b)

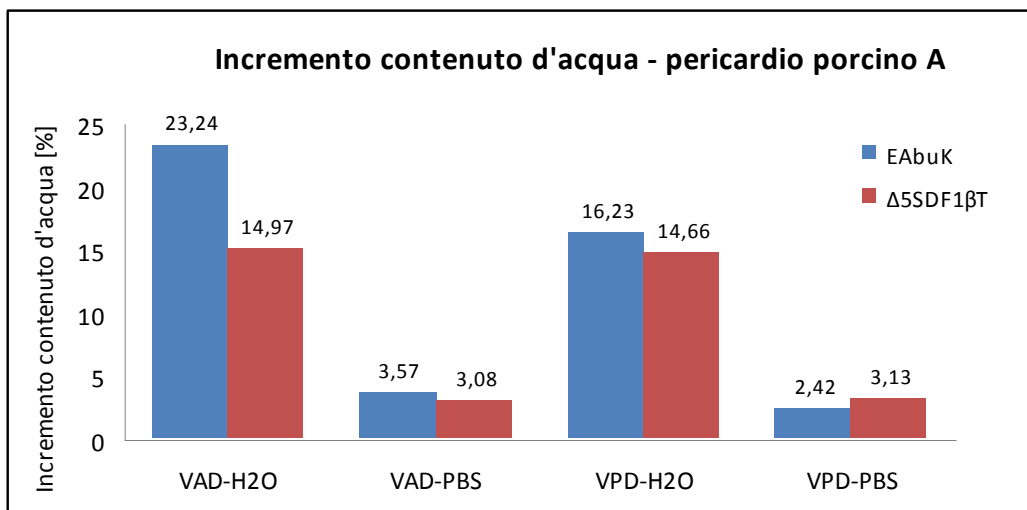
Figura 3.19 a) Confronto tra lo spessore [cm] dei dischetti di pericardio porcino A (VAD e VPD) trattati con EAbuK o Δ5SDF e poi immersi in H₂O MilliQ o PBS ed i rispettivi riferimenti; b) incremento dello spessore [%] dei dischetti di pericardio porcino A trattati con EAbuK o Δ5SDF rispetto allo spessore dei dischetti di riferimento non trattati con il peptide.

Tutti i campioni trattati con i peptidi presentano un incremento di spessore rispetto al pericardio di riferimento che non ha ricevuto nessun peptide, ad eccezione del pericardio porcino A prelevato dalla zona VPD e trattato prima con Δ5SDF e poi posto in PBS che presenta un piccolo decremento dello spessore. In particolare, il pericardio trattato con il peptide auto-assemblante EAbuK presenta un incremento di spessore sempre maggiore di

quello ottenuto per il pericardio trattato con il peptide non auto-assemblante $\Delta 5SDF$. Inoltre l'incremento dello spessore è maggiormente rilevante per i dischetti che dopo il trattamento con i peptidi sono stati posti in acqua e non in PBS. Si può notare anche, che la zona a fibre di collagene ordinate VAD presenta un incremento di spessore maggiore alla zona del pericardio VPD dove le fibre sono random, questo sia per i dischetti posti in H_2O MilliQ che per quelli posti in PBS. Nel grafico di Figura 3.20 a) è riportato il contenuto percentuale di acqua nei dischetti del pericardio del porcino A



a)



b)

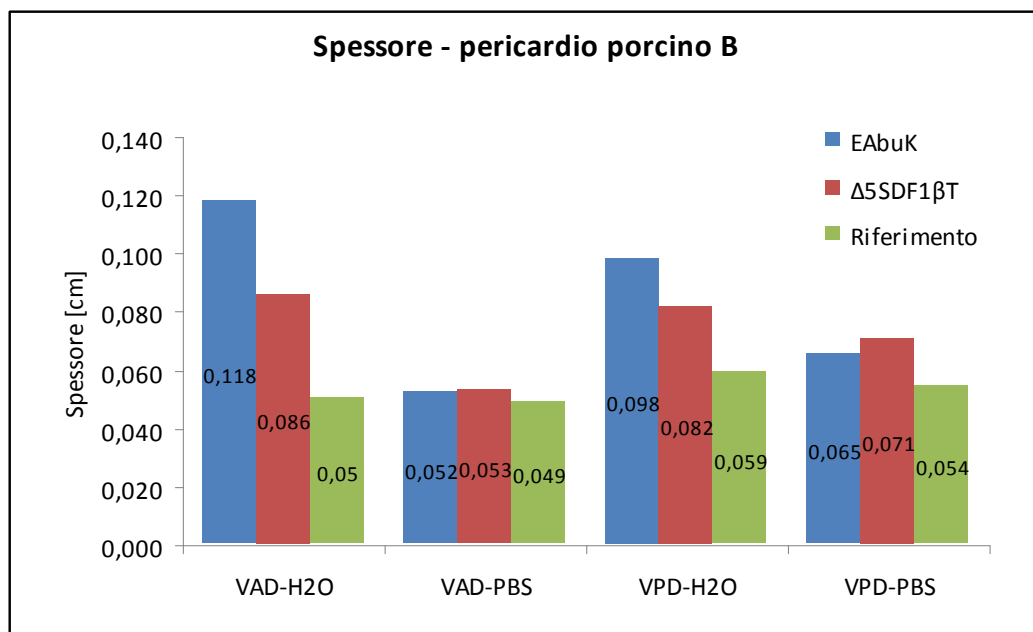
Figura 3.20 a) Confronto tra il contenuto d'acqua [%] nei dischetti di pericardio porcino A (VAD e VPD) trattati con EAbuK o $\Delta 5SDF$ e poi immersi in H_2O MilliQ o PBS ed i rispettivi riferimenti; b) incremento del contenuto d'acqua [%] dei dischetti di pericardio porcino A trattati con EAbuK o $\Delta 5SDF$ rispetto al contenuto d'acqua dei dischetti di riferimento non trattati con il peptide.

In Figura 3.20 b) si può vedere l'incremento del contenuto d'acqua nei dischetti di pericardio del porcino A dopo il trattamento con il peptide auto-assemblante o con il $\Delta 5SDF$, rispetto al contenuto d'acqua nel pericardio di riferimento.

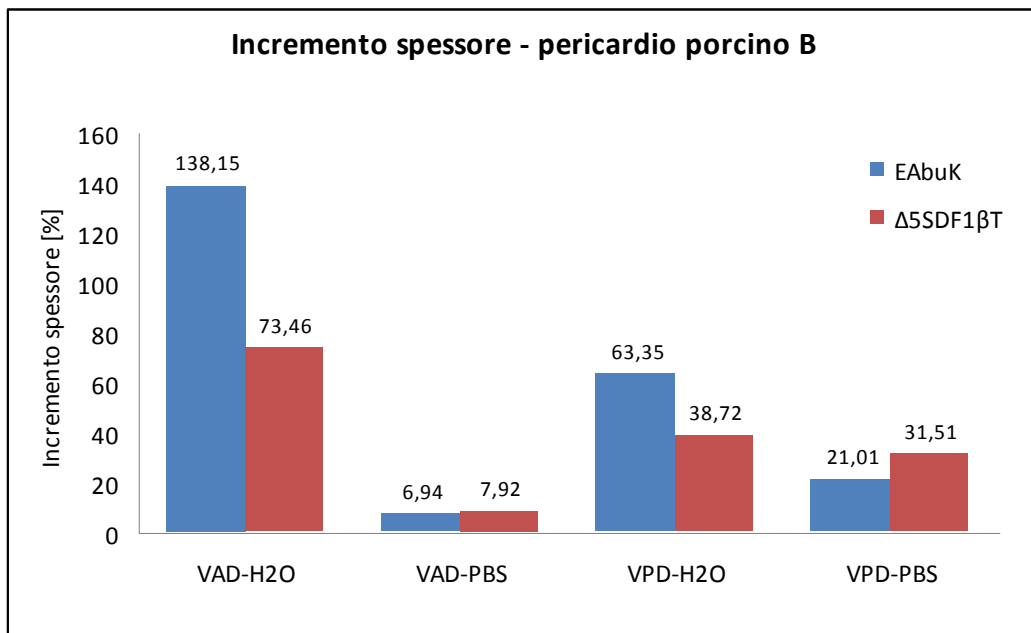
Fondamentale è la differenza dell'incremento d'acqua tra i dischetti posti in H₂O MilliQ e quelli posti in PBS, infatti, per entrambe le zone del pericardio porcino, i primi presentano un incremento molto più marcato dei secondi, e ciò spiega anche il maggiore incremento di spessore visto in Figura 3.19 b).

L'incremento del contenuto d'acqua è molto inferiore per i dischetti posti in PBS a causa dell'effetto osmotico che richiama l'acqua verso la soluzione salina.

Nel grafico di Figura 3.21 a) è riportato lo spessore dei dischetti del pericardio del porcino B, mentre in Figura 3.21 b) si può vedere l'incremento dello spessore dei dischetti del pericardio del porcino B dopo il trattamento con il peptide auto-assemblante o con il $\Delta 5SDF$, rispetto allo spessore del pericardio di riferimento (che non è stato in contatto con nessun peptide).



a)



b)

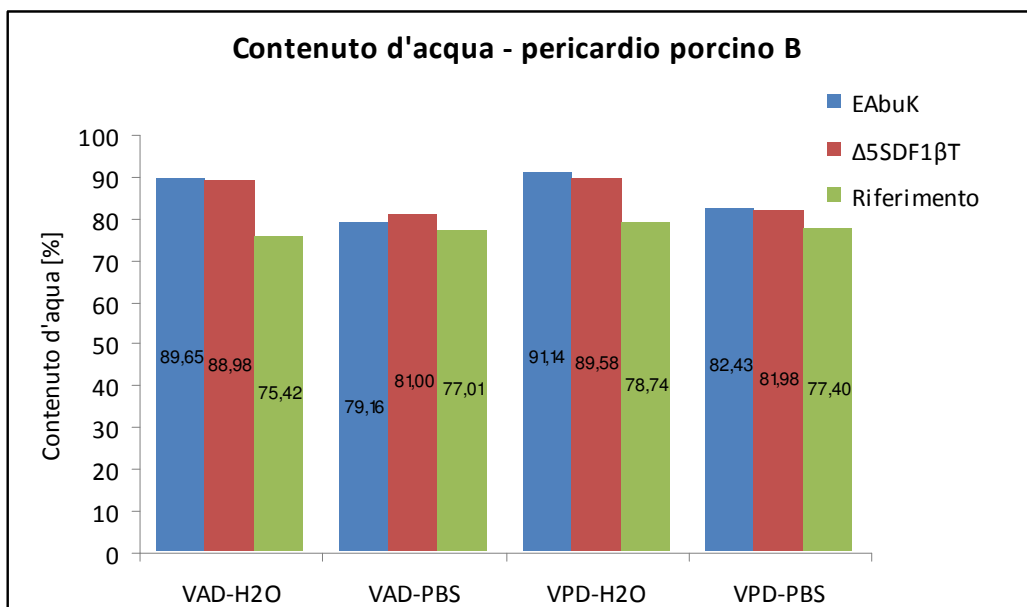
Figura 3.21 a) Confronto tra lo spessore [cm] dei dischetti di pericardio porcino B (VAD e VPD) trattati con EAbuK o Δ5SDF e poi immersi in H₂O MilliQ o PBS ed i rispettivi riferimenti; **b)** incremento dello spessore [%] dei dischetti di pericardio porcino B trattati con EAbuK o Δ5SDF rispetto allo spessore dei dischetti di riferimento non trattati con il peptide.

Anche per i campioni porcini B l'incremento di spessore è molto più marcato per i dischetti che sono stati posti in H₂O MilliQ dopo il trattamento con i peptidi rispetto a quelli in PBS. Per i dischetti posti in H₂O MilliQ, inoltre, l'effetto dell'incremento dello spessore è maggiore se sono stati trattati con il peptide auto-assemblante EAbuK. In PBS sembra, invece, che l'incremento di spessore sia maggiore, anche se in minore entità, per il pericardio trattato con il peptide non auto-assemblante Δ5SDF.

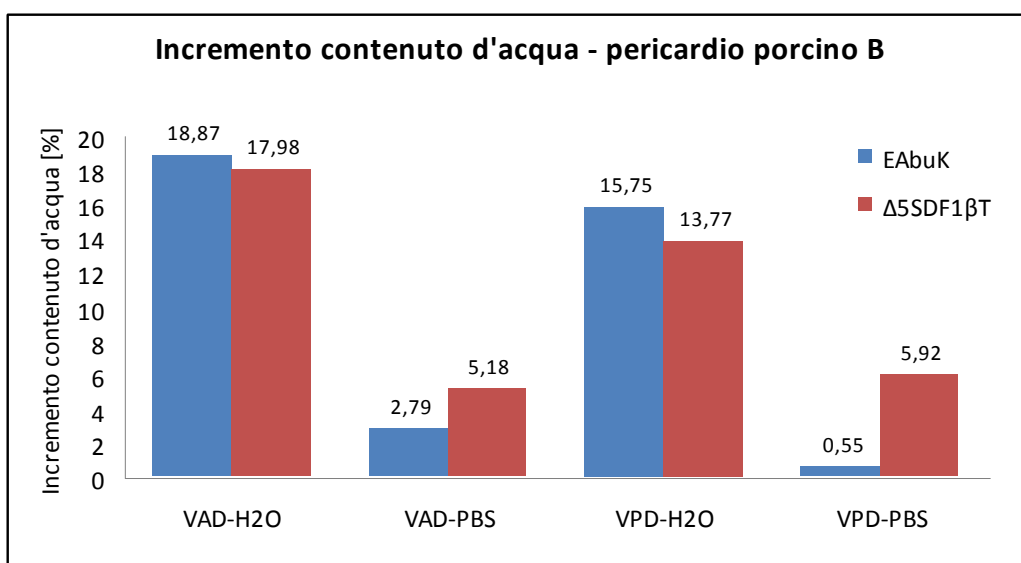
Mentre per i dischetti posti in H₂O MilliQ, la zona a fibre di collagene ordinate VAD presenta un incremento di spessore maggiore alla zona del pericardio VPD a fibre random, per quelli posti in PBS questo non è più valido.

Nel grafico di Figura 3.22 a) è riportato il contenuto percentuale di acqua nei dischetti del pericardio del porcino B.

In Figura 3.22 b) si può vedere l'incremento del contenuto d'acqua nei dischetti di pericardio del porcino B dopo il trattamento con il peptide auto-assemblante o con il Δ5SDF, rispetto al contenuto d'acqua nel pericardio di riferimento.



a)



b)

Figura 3.22 a) Confronto tra il contenuto d'acqua [%] nei dischetti di pericardio porcino B (VAD e VPD) trattati con EAbuK o $\Delta 5SDF$ e poi immersi in H_2O MilliQ o PBS ed i rispettivi riferimenti; b) incremento del contenuto d'acqua [%] dei dischetti di pericardio porcino B trattati con EAbuK o $\Delta 5SDF$ rispetto al contenuto d'acqua dei dischetti di riferimento non trattati con il peptide.

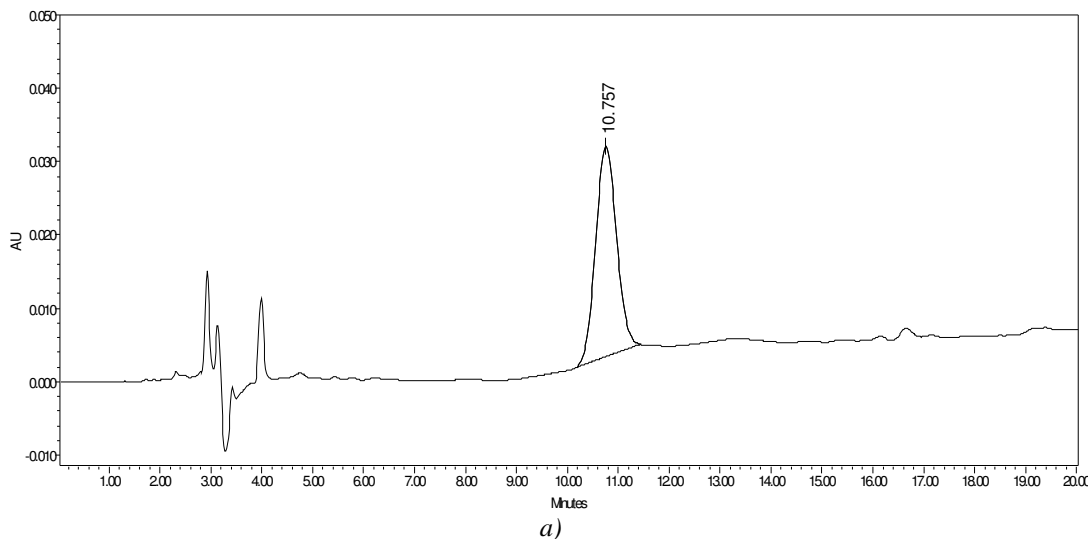
Anche per i campioni porcini B, l'incremento percentuale del contenuto d'acqua è maggiore per il pericardio che dopo aver subito il trattamento con i peptidi è stato posto in H_2O MilliQ rispetto a quelli posto in PBS. Inoltre, per i dischetti posti in H_2O MilliQ l'incremento è più

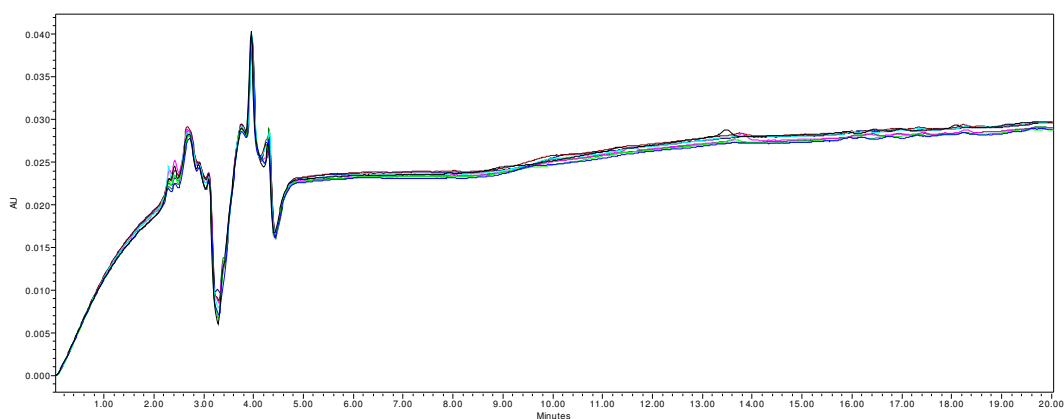
rilevante se sono stati trattati con EAbuK, per quelli posti in PBS l'incremento è più rilevante se sono stati trattati con $\Delta 5SDF$. Questo risultato concorda quindi con i dati ottenuti per l'incremento dello spessore riportati in Figura 3.21 b).

Quantificazione dei peptidi trattenuti all'interno del pericardio porcino:

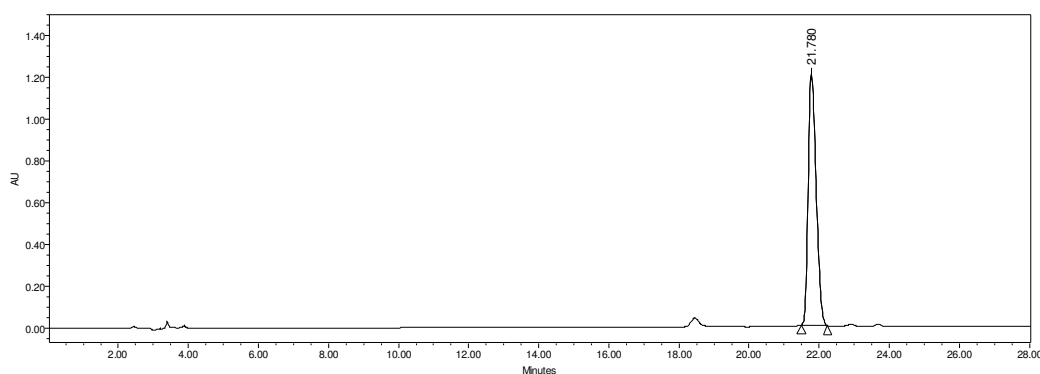
Per la quantificazione della massa dei peptidi trattenuti dalle matrici di pericardio porcino si è proceduto come per l'esperimento su pericardio bovino (si veda il Paragrafo 3.1.2). E' stata quindi utilizzata la procedura basata sull'analisi cromatografica.

Le soluzioni contenenti il peptide EAbuK recuperate separatamente dopo l'incubazione con gli 8 dischetti di pericardio porcino (4 dal porcino A e 4 dal porcino B e per ciascun porcino i 4 dischetti sono 2 da VAD e 2 da VPD) sono state analizzate mediante cromatografia RP-HPLC. Di ciascuna delle 8 soluzioni sono state effettuate 3 analisi con le stesse condizioni con le quali si erano effettuate le analisi RP-HPLC della soluzione madre. In Figura 3.23 a) sono riportati i risultati ottenuti dall'analisi cromatografica della soluzione madre e delle 8 soluzioni recuperate post-esperimento. Con le 8 soluzioni contenenti il peptide $\Delta 5SDF$ recuperate post-esperimento si è proceduto allo stesso modo. I risultati ottenuti dall'analisi cromatografica della soluzione madre e delle 8 soluzioni sono riportati rispettivamente in Figura 3.23 a) e b) per l'EAbuK, in c) e d) per il $\Delta 5SDF$. Di ciascuna soluzione si è riportato in figura solo il cromatogramma della prima delle 3 analisi effettuate.

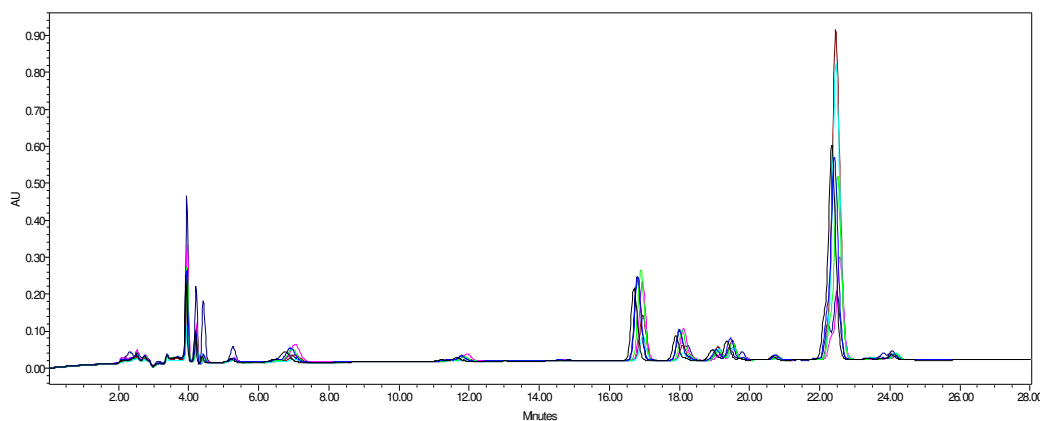




b)



c)



d)

Figura 3.23 a) Analisi cromatografica RP-HPLC della soluzione madre di peptide EAbuK; b) analisi cromatografica RP-HPLC delle soluzioni di EAbuK recuperate post-esperimento su pericardio porcino; c) analisi cromatografica RP-HPLC della soluzione madre di peptide $\Delta 5SDF$; d) analisi cromatografica RP-HPLC delle soluzioni di $\Delta 5SDF$ recuperate post-esperimento su pericardio porcino. Le analisi sono state svolte nelle seguenti condizioni: colonna: Symmetry Shield; flusso: 1 mL/min; eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B: 0,05% TFA in CH₃CN; iniezione: 10 μ L; gradiente dal 12% al 22% di eluente B in 20 min per le soluzioni di EAbuK mentre è stato usato il gradiente dal 20% al 34% di eluente B in 28 min per le soluzioni di $\Delta 5SDF$; lettura dell'assorbanza a 214 nm.

In Figura 3.23 b) è evidente come il picco relativo al peptide auto-assemblante EAbuK nelle soluzioni recuperate post-esperimento sia praticamente scomparso. Questo fenomeno può essere spiegato considerando il fatto che l'EAbuK si sia aggregato completamente grazie ai sali rimasti nella matrice del pericardio porcino dopo la decellularizzazione.

Dall'osservazione della Figura 3.23 d) si riscontra che il peptide $\Delta 5$ SDF durante l'incubazione con i dischetti di pericardio porcino ha subito un'azione di lisi da parte di enzimi rimasti all'interno della matrice biologica dopo la decellularizzazione. Infatti, mentre la soluzione madre di $\Delta 5$ SDF presenta un cromatogramma con un unico picco, i cromatogrammi delle soluzioni dello stesso peptide raccolte post-esperimento presentano diversi picchi.

Questo effetto di lisi del peptide non-autoassemblante non si era verificato con il pericardio bovino.

Per indagare sulla natura dei nuovi picchi e, quindi, su come il peptide è stato scisso dagli enzimi del pericardio porcino, è stata in seguito effettuata un'analisi cromatografica analitica della soluzione recuperata dopo il trattamento di un dischetto della zona VAD del pericardio porcino A. L'analisi cromatografica analitica è stata condotta alle stesse condizioni di quelle effettuate per tutte le altre soluzioni di $\Delta 5$ SDF, ma iniettando 50 μ L; sono state raccolte le frazioni a $t_{R1} = 16,285$, $t_{R2} = 21,909$ e $t_{R3} = 23,651$ che presentano i picchi più elevati. In Figura 3.24 è riportata l'analisi cromatografica analitica.

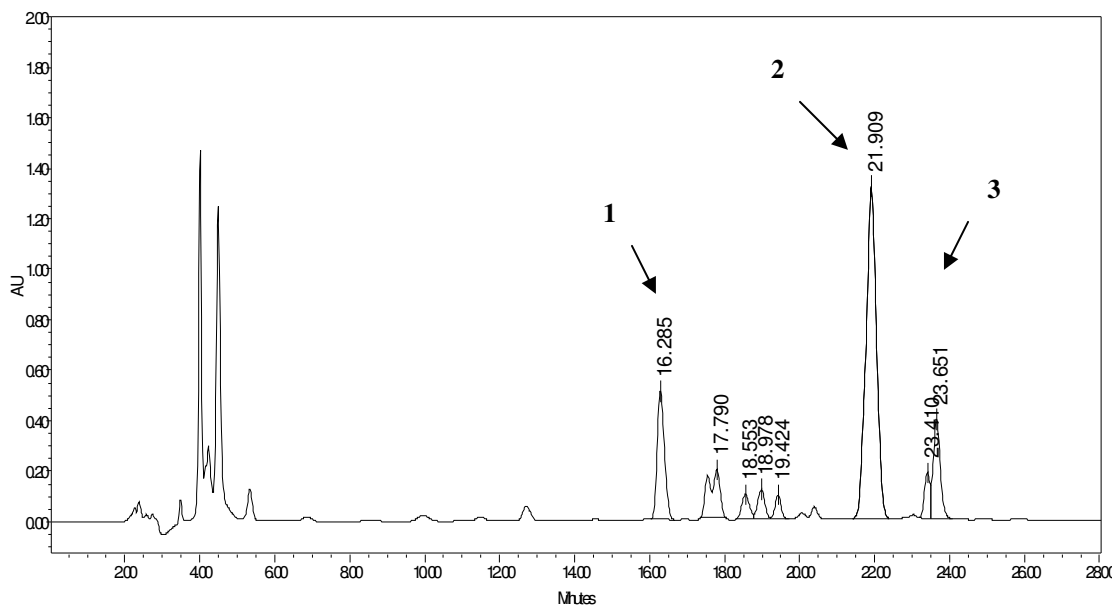


Figura 3.24 Analisi cromatografica analitica della soluzione di $\Delta 5$ SDF raccolta post-esperimento su pericardio porcino A zona VAD. L'analisi è stata svolta nelle seguenti condizioni: colonna: Symmetry Shield; flusso: 1 mL/min; eluente A: 0,05% TFA in H_2O MilliQ; eluente B: 0,05% TFA in CH_3CN ; iniezione: 50 μ L; gradiente dal 20% al 34% di eluente B in 28 min; lettura dell'assorbanza a 214 nm.

Sono stati seccati 200 μL delle frazioni 1 e 3, e 100 μL della frazione 2. L'analisi di massa (ESI-TOF) delle tre frazioni ha dato i risultati riportati in Tabella 3.18.

Tabella 3.18 *Peso molecolare e caratterizzazione delle frazioni raccolte dall'analisi cromatografica analitica della soluzione di ΔSSDF post-esperimento su pericardio porcino.*

Frazione	t_R [min]	PM [Da]	Caratterizzazione
1	16.285	1819	ΔSSDF a cui sono stati lisati gli ultimi 3 amminoacidi della sequenza: FKM
2	21.909	2225	ΔSSDF
3	23.651	2097	ΔSSDF a cui sono è stato lisato l'amminoacido iniziale della sequenza: K

Attraverso la misura dell'area del picco relativo al peptide EAbuK o ΔSSDF in base alla soluzione recuperata, si è calcolata la massa di peptide auto-assemblante e non auto-assemblante rimasta nelle soluzioni dopo l'esperimento.

Per differenza tra la massa presente nel volume delle soluzioni madre per ciascun dischetto e quella calcolata attraverso l'analisi cromatografica, si è risaliti alla quantità di EAbuK e di ΔSSDF rimasta all'interno di ogni matrice di pericardio.

In questo caso i valori ottenuti saranno però maggiormente affetti da errore dovuto:

- per l'EAbuK all'autoaggregazione che impedisce la rilevazione del peptide dall'analisi cromatografica
- per il ΔSSDF al fatto che con questo metodo si ottiene un valore di massa rimasta nel pericardio comprendente anche il peptide lisato che invece non è stato effettivamente trattenuto dalla matrice.

I risultati consentono però di dare una prima stima seppure approssimativa della quantità di peptide rimasto all'interno del pericardio porcino.

In Tabella 3.19 sono riportati i valori di area totale dei picchi cromatografici, concentrazione delle soluzioni, numero di moli e massa di EAbuK in soluzione, e massa di EAbuK rimasta nei dischetti di pericardio porcino A e B.

Sono stati riportati graficamente nell'istogramma di Figura 3.25 i valori di massa media di EAbuK rimasta libera in soluzione dopo il trattamento del pericardio proveniente dalle zone VAD e VPD di ciascuno dei due animali A e B.

Tabella 3.19 Misure di area totale dei picchi cromatografici, concentrazione, numero di moli e massa del peptide EAbuK calcolate per le soluzioni recuperate post-esperimento ($V = 300 \mu\text{L}$ ciascuna), e massa di EAbuK rimasta nei dischetti a) di pericardio porcino A e B.

Campione	Analisi	$A_{\text{picchiEAbuK}}$	C_{EAbuK} [mM]	n_{EAbuK} [μmol]	m_{EAbuK} [mg]	m_{EAbuK} rimasta nel pericardio [mg]	
Soluzione Madre	1	833251	1.000	0.3	0.518	-	
	2	925140	1.000	0.3	0.518	-	
	3	949883	1.000	0.3	0.518	-	
	<i>MEDIA</i>	<i>902758</i>	<i>1.000</i>	<i>0.3</i>	<i>0.518</i>	-	
	<i>Dev. St.</i>	<i>61453</i>	<i>0.000</i>	<i>0.0</i>	<i>0.000</i>	-	
Porcino A	VAD	1	25421	0.028	0.008	0.015	0,504
		2	11846	0.013	0.004	0.007	0,512
		3	6406	0.007	0.002	0.004	0,515
		1	5885	0.007	0.002	0.003	0,515
		2	5885	0.007	0.002	0.003	0,515
		3	11136	0.012	0.004	0.006	0,512
		<i>MEDIA</i>	<i>11097</i>	<i>0.012</i>	<i>0.004</i>	<i>0.006</i>	<i>0,512</i>
		<i>Dev. St.</i>	<i>7511</i>	<i>0.008</i>	<i>0.002</i>	<i>0.004</i>	<i>0,004</i>
	VPD	1	3028	0.003	0.001	0,002	0,517
		2	4684	0.005	0.002	0,003	0,516
		3	2981	0.003	0.001	0,002	0,517
		1	5029	0.006	0.002	0,003	0,516
		2	5294	0.006	0.002	0,003	0,515
		3	6213	0.007	0.002	0,004	0,515
<i>MEDIA</i>		<i>4538</i>	<i>0.005</i>	<i>0.002</i>	<i>0.003</i>	<i>0,516</i>	
<i>Dev. St.</i>		<i>1292</i>	<i>0.001</i>	<i>0.000</i>	<i>0.001</i>	<i>0,001</i>	
Porcino B	VAD	1	6164	0.007	0.002	0.004	0,515
		2	7978	0.009	0.003	0.005	0,514
		3	9192	0.010	0.003	0.005	0,513
		1	16288	0.018	0.005	0.009	0,509
		2	2094	0.002	0.001	0.001	0,517
		3	3431	0.004	0.001	0.002	0,516
		<i>MEDIA</i>	<i>7525</i>	<i>0.008</i>	<i>0.003</i>	<i>0.004</i>	<i>0,514</i>
	<i>Dev. St.</i>	<i>5057</i>	<i>0.006</i>	<i>0.002</i>	<i>0.003</i>	<i>0,003</i>	
	VPD	1	3780	0.004	0.001	0.002	0,516
		2	5825	0.006	0.002	0.003	0,515
		3	1321	0.001	0.000	0.001	0,518
		1	10209	0.011	0.003	0.006	0,513
		2	14782	0.016	0.005	0.008	0,510
		3	8801	0.010	0.003	0.005	0,513
<i>MEDIA</i>		<i>7453</i>	<i>0.008</i>	<i>0.002</i>	<i>0.004</i>	<i>0,514</i>	
<i>Dev. St.</i>	<i>4835</i>	<i>0.005</i>	<i>0.002</i>	<i>0.003</i>	<i>0,003</i>		

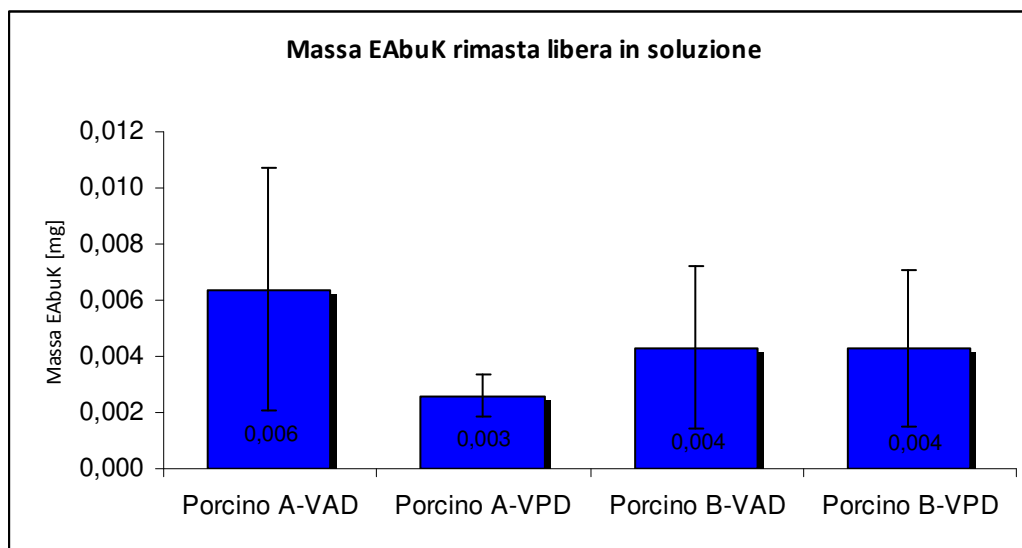


Figura 3.25 Massa media [mg] di peptide auto-assemblante EAbuK rimasta libera in soluzione dopo il trattamento delle matrici di pericardio porcino decellularizzato.

In Figura 3.26 è riassunta l'indagine statistica effettuata su tutti i valori di massa di peptide auto-assemblante rimasta libera in soluzione dopo il trattamento delle matrici di pericardio porcino decellularizzato riportati nella Tabella 3.18.

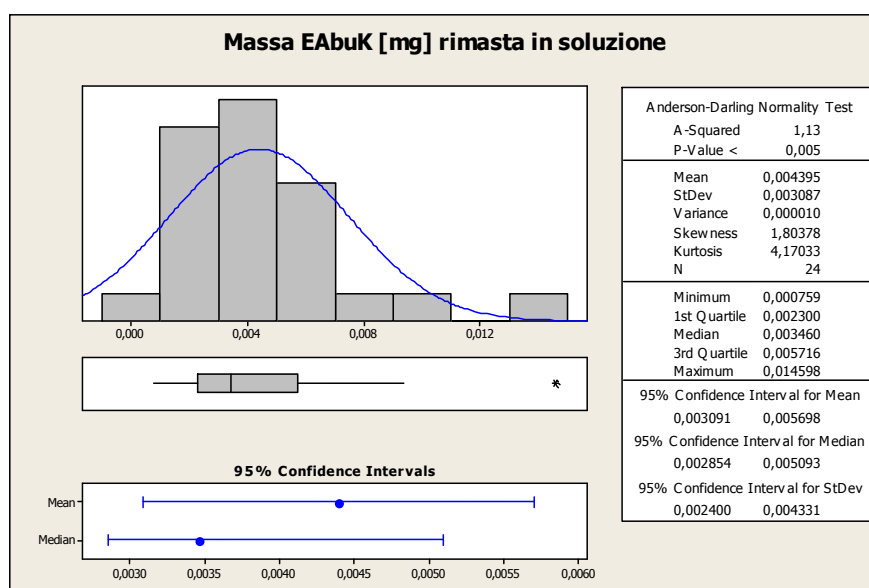


Figura 3.26 Tabella riassuntiva contenente le rappresentazioni grafiche, gli indici statistici e il test di normalità per i dati di massa [mg] di peptide EAbuK rimasta libera in soluzione dopo il trattamento delle matrici di pericardio porcino decellularizzato.

La massa media di peptide rimasta in soluzione dopo il trattamento dei dischetti di pericardio è $m_{EAbuK} = 0,004$ mg con un intervallo di confidenza al 95% pari a 0,003-0,006 mg. Il risultato del test di normalità indica che i dati relativi alla massa di peptide auto-assemblante libero in soluzione, non seguono una distribuzione di tipo normale poiché si è ottenuto un P -

value inferiore ad $\alpha = 0,05$. In Tabella 3.20 sono riportati i valori di area totale dei picchi cromatografici, concentrazione delle soluzioni, numero di moli e massa di $\Delta 5SDF$ in soluzione, e massa di $\Delta 5SDF$ rimasta nei dischetti di pericardio del porcino A e B.

Tabella 3.20 Misure di area totale dei picchi cromatografici, concentrazione, numero di moli e massa del peptide $\Delta 5SDF$ calcolate per le soluzioni recuperate post-esperimento ($V = 300 \mu L$ ciascuna), e massa di $\Delta 5SDF$ rimasta nei dischetti a) di pericardio porcino A e B.

Campione	Analisi	$A_{picchi\Delta 5SDF}$	$C_{\Delta 5SDF}$ [mM]	$n_{\Delta 5SDF}$ [μmol]	$m_{\Delta 5SDF}$ [mg]	$m_{\Delta 5SDF}$ rimasta nel pericardio [mg]	
Soluzione Madre	1	19041396	1.000	0.3	0.668	-	
	2	19212389	1.000	0.3	0.668	-	
	3	19248897	1.000	0.3	0.668	-	
	<i>MEDIA</i>	<i>19167561</i>	<i>1.000</i>	<i>0.3</i>	<i>0.668</i>	-	
	<i>Dev. St.</i>	<i>110776</i>	<i>0.000</i>	<i>0.0</i>	<i>0.000</i>	-	
Porcino A	VAD	1	5419569	0.283	0.085	0.189	0,479
		2	5382758	0.281	0.084	0.188	0,480
		3	5363551	0.280	0.084	0.187	0,481
		1	12637322	0.659	0.198	0.440	0,227
		2	12802096	0.668	0.200	0.446	0,222
		3	12817859	0.669	0.201	0.447	0,221
	<i>MEDIA</i>	<i>9070526</i>	<i>0.473</i>	<i>0.142</i>	<i>0.315</i>	<i>0,352</i>	
	<i>Dev. St.</i>	<i>4033855</i>	<i>0.210</i>	<i>0.063</i>	<i>0,141</i>	<i>0,141</i>	
	VPD	1	9257480	0.483	0.145	0.322	0,345
		2	9246883	0.482	0.145	0.322	0,346
		3	9257142	0.483	0.145	0.322	0,345
		1	4483315	0.234	0.070	0.156	0,512
		2	4525989	0.236	0.071	0.158	0,510
		3	4533621	0.237	0.071	0.158	0,510
<i>MEDIA</i>		<i>6884072</i>	<i>0.359</i>	<i>0.108</i>	<i>0.240</i>	<i>0,428</i>	
<i>Dev. St.</i>		<i>2596005</i>	<i>0.135</i>	<i>0.041</i>	<i>0,090</i>	<i>0,090</i>	
Porcino B	VAD	1	8813414	0.460	0.138	0.307	0,361
		2	8735400	0.456	0.137	0.304	0,363
		3	8818429	0.460	0.138	0.307	0,361
		1	14235763	0.743	0.223	0.496	0,172
		2	14310034	0.747	0.224	0.498	0,169
		3	14373974	0.750	0.225	0.501	0,167
	<i>MEDIA</i>	<i>11547836</i>	<i>0.602</i>	<i>0.181</i>	<i>0.402</i>	<i>0,265</i>	
	<i>Dev. St.</i>	<i>3022524</i>	<i>0.158</i>	<i>0.047</i>	<i>0,105</i>	<i>0,105</i>	
	VPD	1	7783102	0.406	0.122	0.271	0,397
		2	7816479	0.408	0.122	0.272	0,395
		3	7880547	0.411	0.123	0.275	0,393
		1	2516008	0.131	0.039	0.088	0,580
		2	2571830	0.134	0.040	0.090	0,578
		3	2500341	0.130	0.039	0.087	0,581
<i>MEDIA</i>		<i>5178051</i>	<i>0.270</i>	<i>0.081</i>	<i>0.180</i>	<i>0,487</i>	
<i>Dev. St.</i>		<i>2901726</i>	<i>0.151</i>	<i>0.045</i>	<i>0,101</i>	<i>0,101</i>	

Per una migliore comprensione i valori della massa media di $\Delta 5SDF$ trattenuta dal pericardio proveniente dalle zone VAD e VPD di ciascuno dei due bovini A e B sono stati riportati graficamente nell'istogramma di Figura 3.27.

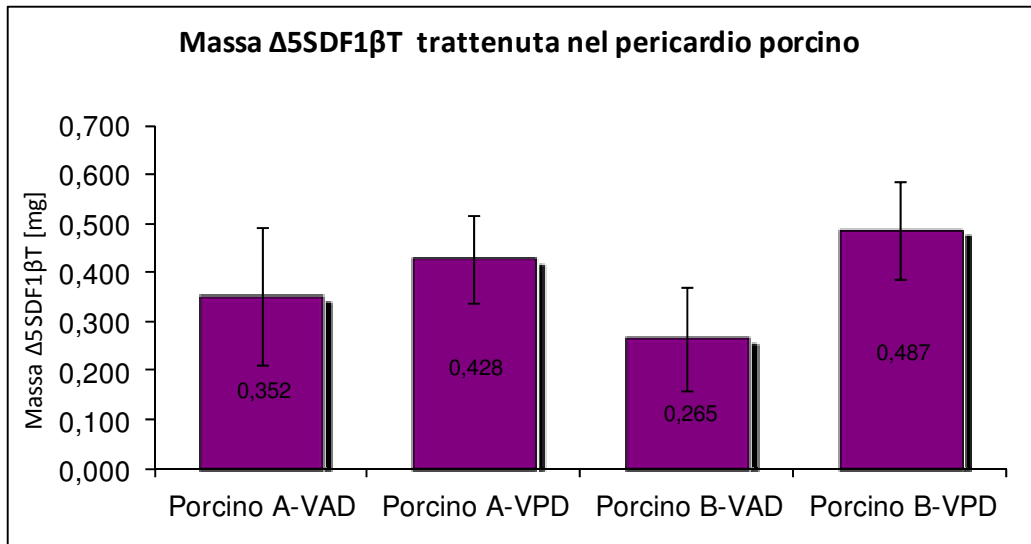


Figura 3.27 Massa media [mg] di peptide non auto-assemblante $\Delta 5SDF$ trattenuta dalle matrici di pericardio porcino decellularizzato.

Infine, con il software Minitab, è stata effettuata l'indagine statistica di tutti i dati ottenuti per la massa di peptide non auto-assemblante rimasta nelle matrici di pericardio porcino.

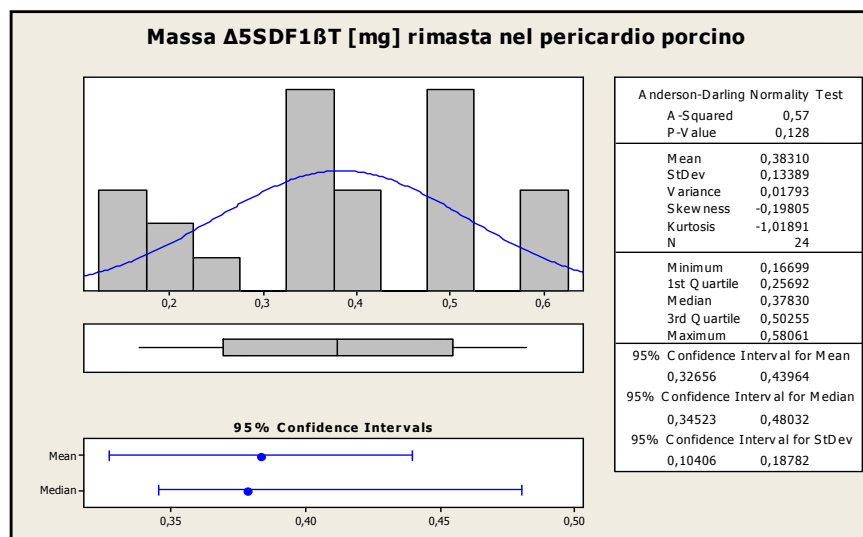


Figura 3.28 Tabella riassuntiva contenente le rappresentazioni grafiche, gli indici statistici e il test di normalità per i dati di massa [mg] di peptide $\Delta 5SDF$ rimasta all'interno delle matrici di pericardio porcino decellularizzato, dopo l'esperimento.

L'analisi statistica è riportata nei grafici e nella tabella di Figura 3.28, nella quale si vede che la massa media di peptide rimasta all'interno dei dischetti di pericardio è 0,383 mg con un intervallo di confidenza al 95% di 0,327-0,440 mg. Il risultato del test di normalità indica che

i dati relativi alla massa di peptide non auto-assemblante rimasta all'interno dei dischetti di pericardio seguono una distribuzione di tipo normale infatti si è ottenuto un P -value pari a 0,128, quindi superiore ad $\alpha = 0,05$.

Per il peptide non auto-assemblante si nota che nella zona VAD rimane una quantità di peptide sensibilmente minore alla quantità di peptide rimasta nella zona VPD, e questo è evidente per entrambi i porcini A e B (Figura 3.27), mentre si era osservato che per il pericardio bovino era la zona a fibre ordinate VAS a trattenere la maggior quantità di $\Delta 5$ SDF (si veda la Figura 3.17). Per il pericardio porcino trattato con l'auto-assemblante, come nel caso di quello bovino, la variabilità dei dati di massa del peptide trattenuto all'interno delle matrici è inferiore rispetto al pericardio porcino trattato con il peptide non auto-assemblante.

3.2 Chemoselective ligation

Questa parte del lavoro di tesi riguarda la bioconiugazione dei peptidi auto-assemblanti con una sequenza adesiva, e poi con una proteina.

3.2.1 Bioconiugazione tra AoaEAbuK e $(GRGDSP)_4K$

3.2.1.1 Preparazione di $(GRGDSP)_4K$ -chetone

È stata preparata una soluzione 10 mM di PLP in tampone 25 mM fosfato di sodio a pH 6,5. Sono state fatte reagire $7,6 \times 10^{-5}$ moli di PLP con $3,8 \times 10^{-6}$ moli di $(GRGDSP)_4K$ (Capitolo 2, Paragrafo 2.1.3.3), per avere un rapporto molare 20:1, in tampone 25 mM fosfato di sodio a pH 6,5. Sono stati pesati 9,23 mg di $(GRGDSP)_4K$ e posti in una provetta di vetro. Al $(GRGDSP)_4K$ sono stati aggiunti 7,7 mL della soluzione di PLP. La reazione è stata condotta ad una temperatura di 37 °C per 18 ore (Figura 3.29).

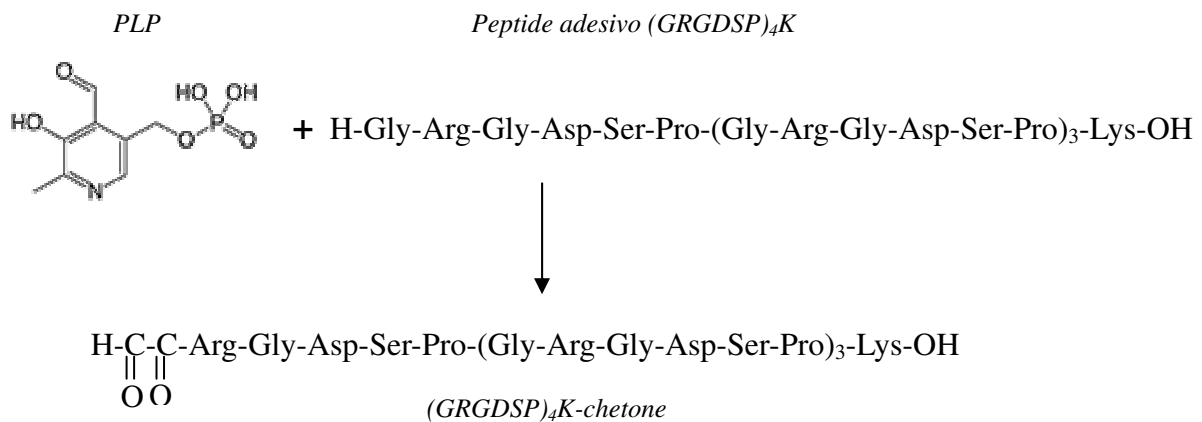


Figura 3.29 Reazione tra PLP e il peptide adesivo $(GRGDSP)_4K$, per formare il chetone.

Trascorse le 18 ore di reazione, la miscela è stata filtrata ed è stata effettuata un'analisi RP-HPLC semipreparativa iniettando tutta la soluzione.

L'analisi riportata in Figura 3.29 è stata condotta con le seguenti condizioni: colonna Delta-pak C₁₈; eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B: 0,05% TFA in CH₃CN; gradiente: da 0% a 13 % di eluente B in 52 minuti, poi all'80% di eluente B per 10 min; flusso: 4 mL/min; detector: 214 nm.

Le frazioni sono state raccolte in provette distinte.

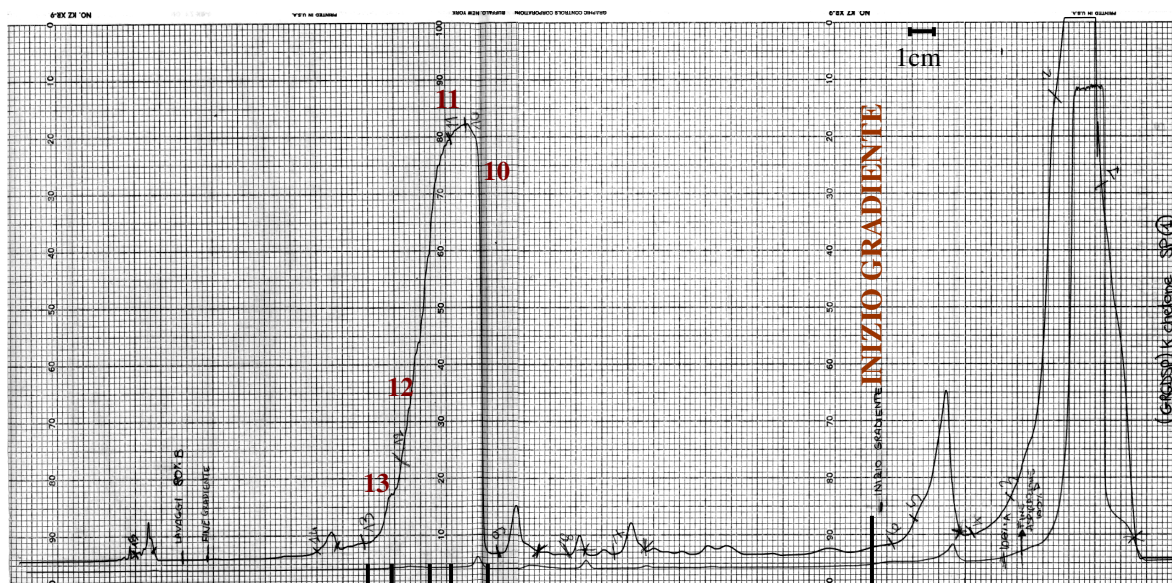


Figura 3.30 Analisi cromatografica RP-HPLC semipreparativa della miscela di reazione per isolare il prodotto di reazione: (GRGDSP)4K-chetone. Condizioni dell'analisi: colonna Delta-pak C₁₈; eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B: 0,05% TFA in CH₃CN; gradiente: da 0% a 13% di eluente B in 52 minuti, poi all'80% di eluente B per 10 min; flusso: 4 mL/min; fondoscala: 4,0 Abs; velocità della carta: 0,5 cm/min; detector: 214 nm

Le frazioni 10, 11, 12, 13, indicate in Figura 3.30, sono state in seguito analizzate in RP-HPLC analitica, eseguita nelle seguenti condizioni: colonna: Symmetry Shield; flusso: 1,0 mL/min; eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B: 0,05% TFA in CH₃CN; iniezione: 20 µL; gradiente dallo 0% al 30% di eluente B in 30 min, lettura dell'assorbanza a 214 nm. In Figura 3.30 è stato riportato il cromatogramma ottenuto dall'analisi RP-HPLC della frazione 12 raccolta nella semipreparativa di Figura 3.29.

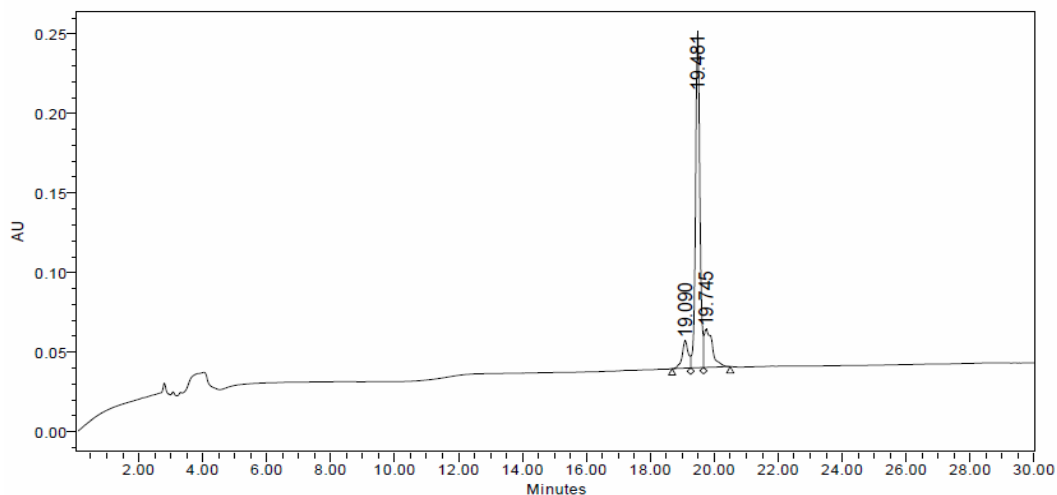


Figura 3.31 Analisi RP-HPLC analitica della frazione 12 raccolta dalla semipreparaiva in figura 3.30. Colonna: Symmetry Shield; flusso: 1,0 mL/min; eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B: 0,05% TFA in CH₃CN; iniezione: 20 μ L; gradiente da 0% a 30% di eluente B in 30 min, lettura dell'assorbanza a 214 nm.

Esaminando i cromatogrammi delle analisi RP-HPLC si è deciso di utilizzare solo le frazioni 11 e 12 per la reazione successiva di coupling, in quanto presentavano il picco più alto in corrispondenza del tempo di ritenzione del (GRGDSP)₄K-chetone. In Figura 3.32 è riportato lo spettro di massa MALDI-TOF della frazione 12.

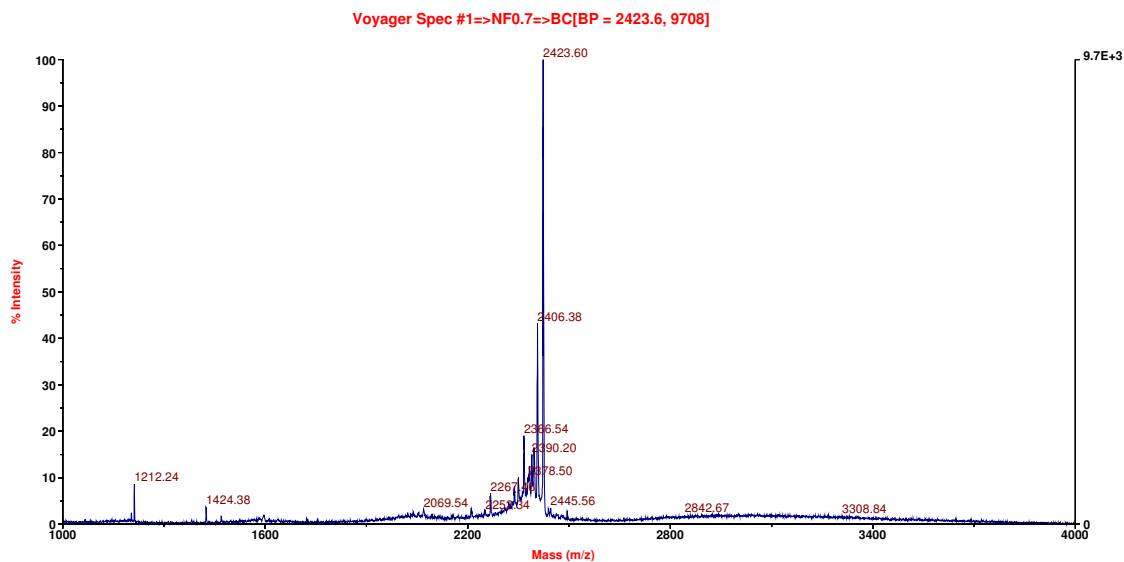


Figura 3.32 Spettro di massa MALDI-TOF della frazione 12 raccolta dalla semipreparaiva in figura 3.30. Il peso molecolare risultante dall'analisi indica la presenza di (GRGDSP)₄K-chetone.

Le frazioni 11 e 12, contenenti (GRGDSP)₄K-chetone sono state trasferite in un pallone, e liofilizzate. Al termine della liofilizzazione sono stati pesati 3,00 mg di (GRGDSP)₄K-chetone (pari a $1,238 \times 10^{-6}$ moli).

3.2.1.2 Sblocco del peptide auto-assemblante AoaEAbuK dalla resina

Sono stati prelevati 100 mg di peptide AoaEAbuK su resina (si veda Capitolo 2, Paragrafo 2.1.3.1) già disponibile in laboratorio da precedente sintesi [56], e sono stati trasferiti in un reattore (siringa con setto poroso).

Si è proceduto con lo sblocco dalla resina Sasrin superacidolabile e dai gruppi protettori in catena laterale in un unico step, secondo la procedura generale di sblocco completo riportata al paragrafo 2.2.1.4 del Capitolo 2.

La miscela di sblocco di volume totale pari a 5 mL è stata così composta:

- 4,75 mL TFA;
- 0,125 mL TES;
- 0,125 mL H₂O MilliQ.

Al termine dello sblocco si sono ottenuti 22,287 mg ($1,238 \times 10^{-5}$ moli) di peptide grezzo; necessari per mantenere un rapporto molare di 1 a 10 rispetto al chetone, per la reazione successiva.

3.2.1.3 Preparazione del coniugato EAbuK-(GRGDSP)₄K

Sono state fatte reagire $1,238 \times 10^{-5}$ moli di AoaEAbuK, con $1,238 \times 10^{-6}$ moli di (GRGDSP)₄K-chetone (rapporto 10:1) in H₂O MilliQ. È stata preparata una soluzione 1 mM di AoaEAbuK: il peptide grezzo (~22,287 mg) contenuto nel pallone è stato diluito con 12,38 mL di H₂O MilliQ. La soluzione è stata trasferita nel pallone contenente 3 mg di (GRGDSP)₄K-chetone pesati precedentemente. La miscela è stata lasciata reagire a temperatura ambiente per 24 ore. La reazione tra il peptide auto-assemblante AoaEAbuK e la sequenza adesiva (GRGDSP)₄K-chetone è riportata in Figura 3.33.

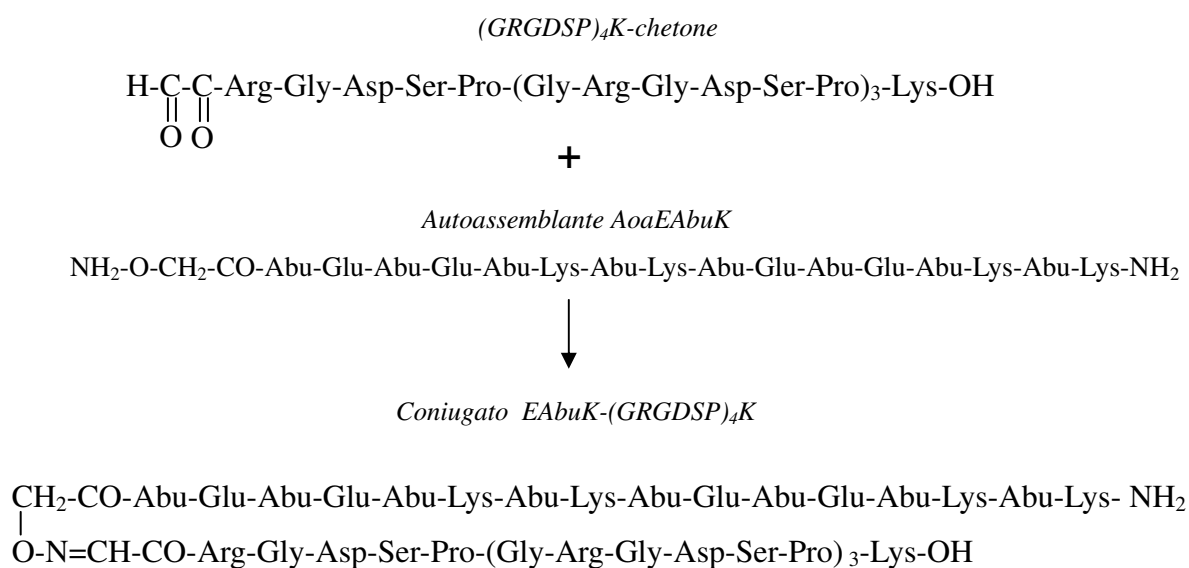


Figura 3.33 Reazione tra il peptide autoassemblante AoaEAbuK e la sequenza adesiva (GRGDSP)₄K-chetone, per formare il coniugato EAbuK-(GRGDSP)₄K.

Finita la reazione, la miscela è stata filtrata in un becker. E' stata effettuata un'analisi RP-HPLC semipreparativa, iniettando tutta la soluzione, nelle seguenti condizioni: colonna: Delta-pak C₁₈; eluente A: 0,05% TFA in H₂O; eluente B: 0,05% TFA in CH₃CN; gradiente: da 0% a 5% di eluente B in 2 minuti, poi da 5% al 60% di eluente B in 110 minuti, poi da 60% a 75% di eluente B in 22 minuti, infine all'80% di eluente B per 10 min; flusso: 4 mL/min; misura dell'assorbanza: 214 nm.

Le frazioni sono state raccolte in provette distinte.

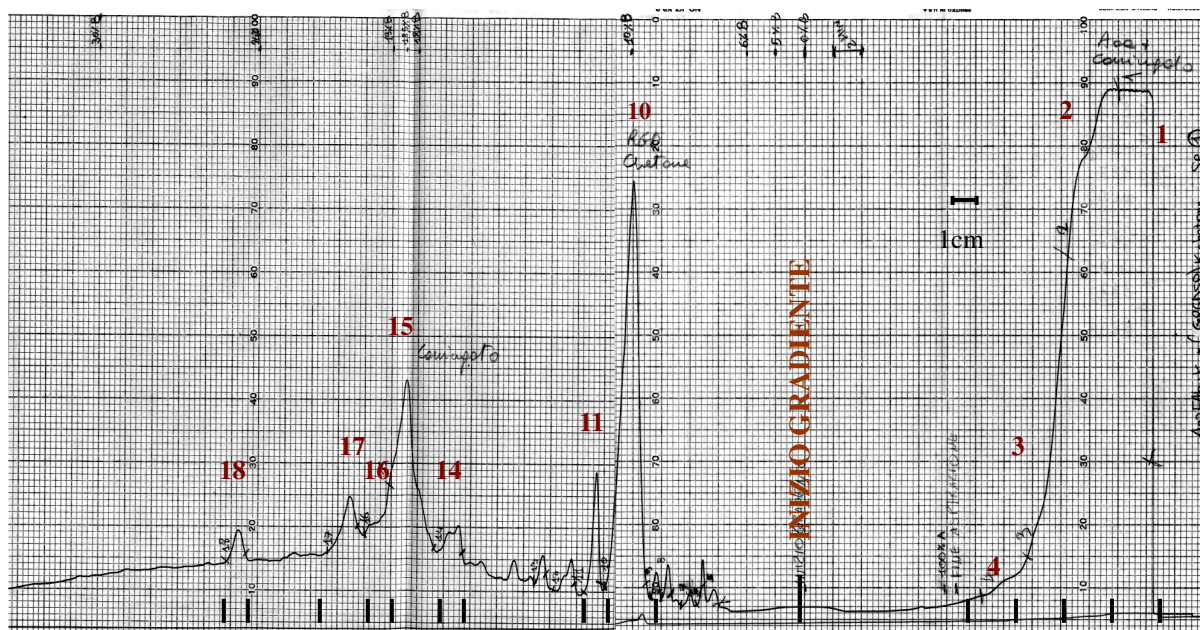


Figura 3.34 Analisi cromatografica RP-HPLC semipreparativa della miscela di reazione per isolare il prodotto di reazione: EAbuK-(GRGDSP)₄K. Sono state utilizzate le seguenti condizioni: colonna: Delta-pak C₁₈; eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B: 0,05% TFA in CH₃CN; gradiente: da 0% a 5 % di eluente B in 2 minuti, poi da 5% a 60 % di eluente B in 110 minuti, poi da 60% a 75% di eluente B in 22 minuti, infine all'80% di eluente B per 10 min; flusso: 4 mL/min; fondoscala: 4,0 Abs; velocità della carta: 0,5 cm/min; detector: 214 nm.

E' stato seccato sottovuoto 1 mL della frazione 1 ed è stato poi analizzato con spettrometria di massa MALDI-TOF.

Il risultato ha confermato la presenza di un composto con peso molecolare 4206,902 Da, corrispondente a quello del prodotto desiderato (Massa teorica: 4205.902 Da).

Le frazioni 1, 2, 3, 4, 10, 11, 14, 15, 16, 17, 18 sono state analizzate in RP-HPLC analitica, eseguita nelle seguenti condizioni: colonna: Symmetry Shield; flusso: 1,0 mL/min; eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B: 0,05% TFA in CH₃CN; iniezione: 20 µL; gradiente da 0% a 70% di eluente B in 70 min, lettura dell'assorbanza a 214 nm.

In Figura 3.35 è riportato il cromatogramma della frazione 1 raccolta durante l'analisi cromatografica semipreparativa di Figura 3.34.

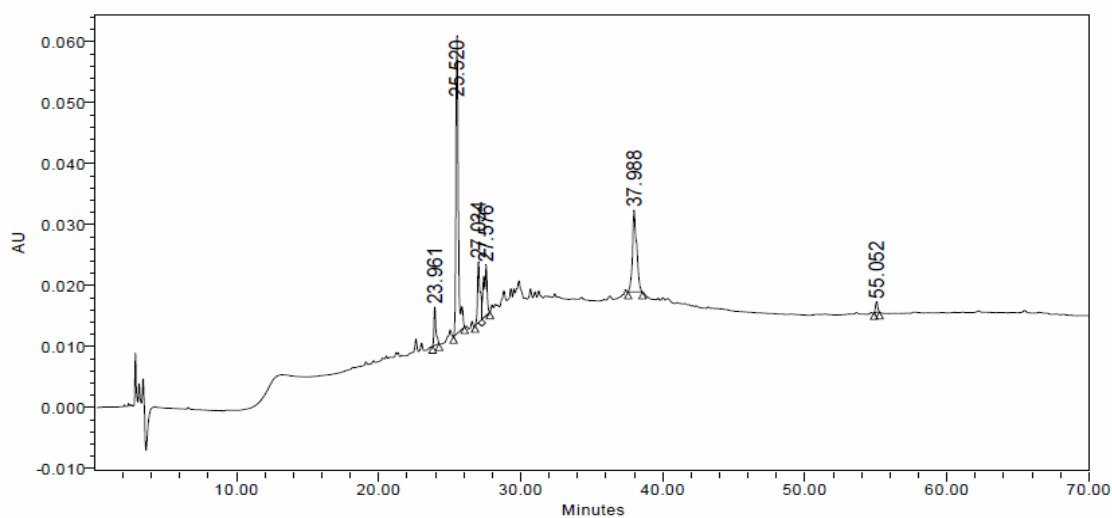


Figura 3.35 Analisi RP-HPLC analitica della frazione 1 raccolta dalla semipreparativa in Figura 3.34. Colonna: Symmetry Shield; flusso: 1,0 mL/min; eluente: 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B: 0,05% TFA in CH₃CN; iniezione: 20 µL; gradiente da 0% a 70% di eluente B in 70 min, lettura dell'assorbanza a 214 nm.

Esaminando i cromatogrammi ottenuti, si è deciso di effettuare un'altra corsa semipreparativa con HPLC, iniettando le frazioni 1, 2, 3, 4.

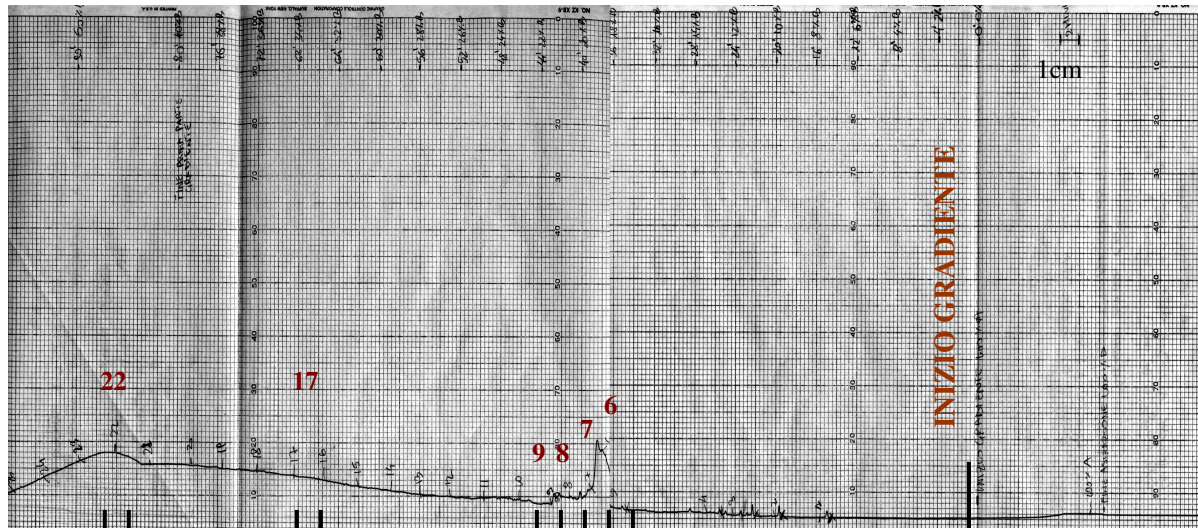


Figura 3.36 RP-HPLC semipreparativa delle frazioni 1, 2, 3, 4 raccolte dalla semipreparativa riportata in Figura 3.34. Colonna: Zorbax C₁₈; eluente A: 0,05% TFA in H₂O; eluente B: 0,05% TFA in CH₃CN; gradiente: da 0 a 40 % di eluente B in 80 minuti, poi da 40% a 80 % di eluente B in 20 minuti, infine all'80% di eluente B per 10 min; flusso: 4 mL/min; fondoscala: 2,0 Abs; velocità della carta: 0,5 cm/min; detector: 214 nm.

Le 4 frazioni sono dunque state riunite in un becker e diluite con eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ, fino ad avere un volume complessivo di 100 mL. La soluzione è poi stata iniettata per l'analisi cromatografica semipreparativa, operando nelle seguenti condizioni: colonna: Zorbax C₁₈; eluente A: 0,05% TFA in H₂O; eluente B: 0,05% TFA in CH₃CN; gradiente: da 0% a 40 % di eluente B in 80 minuti, poi da 40% a 80 % di eluente B in 20 minuti, infine all'80% di eluente B per 10 min; flusso: 4 mL/min; detector: 214 nm.

In Figura 3.36 è riportato il risultato dell'analisi RP-HPLC semipreparativa.

Le frazioni 6, 7, 8, 9, 17, 22 sono state analizzate in cromatografia RP-HPLC analitica, eseguita nelle seguenti condizioni: colonna: Symmetry Shield; flusso: 1,0 mL/min; eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B: 0,05% TFA in CH₃CN; iniezione: 50 µL; gradiente da 0% a 70% di eluente B in 70 min, lettura dell'assorbanza a 214 nm.

In Figura 3.37 è riportato il cromatogramma della frazione 6 raccolta dall'analisi RP-HPLC semipreparativa di Figura 3.34.

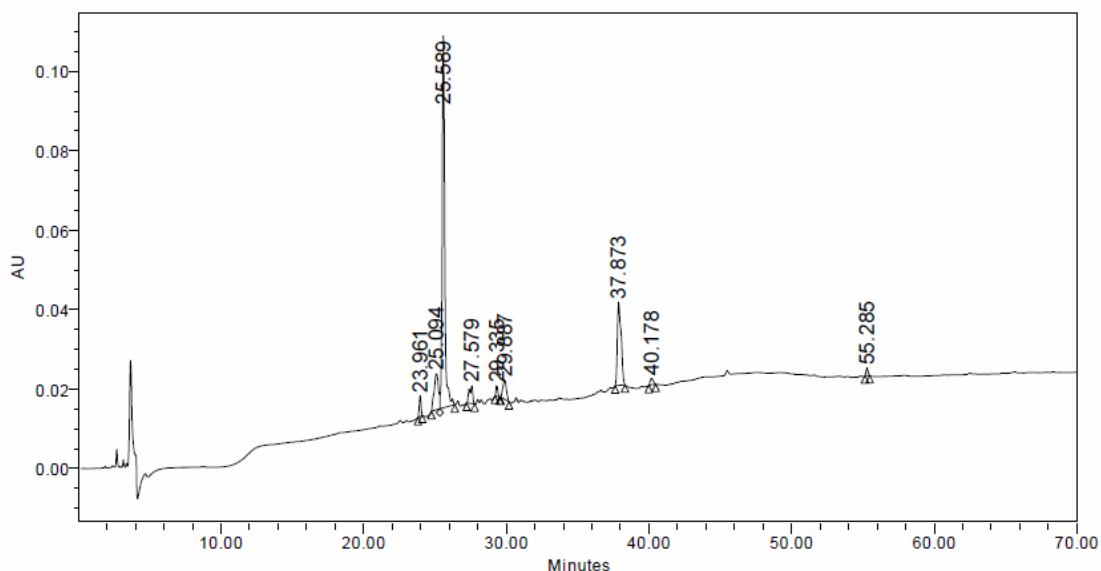
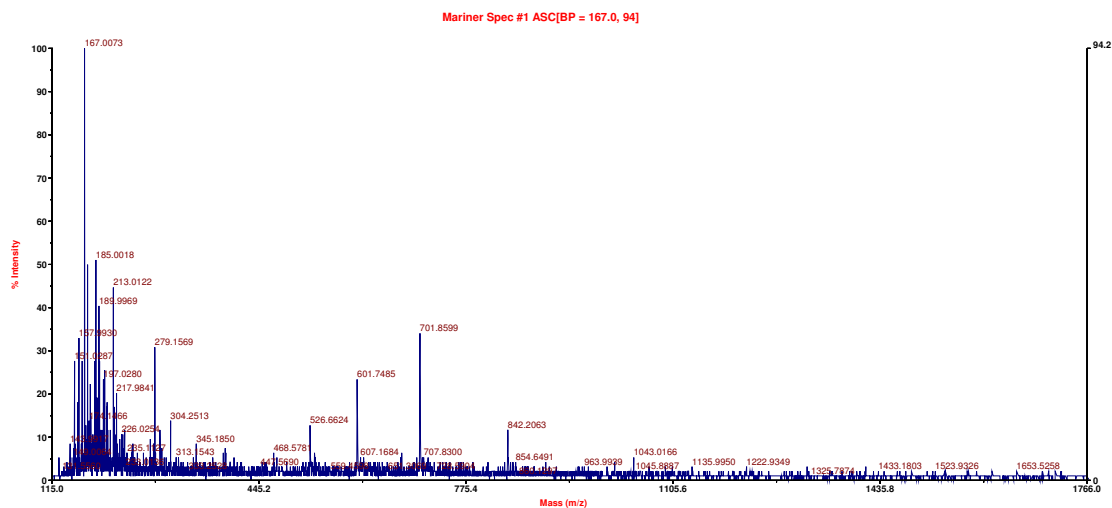


Figura 3.37 Analisi cromatografica analitica della frazione 6 raccolta dalla semipreparativa riportata in Figura 3.36. Colonna: Symmetry Shield; flusso: 1,0 mL/min; eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B: 0,05% TFA in CH₃CN; iniezione: 100 µL; gradiente da 0% a 40% di eluente B in 40 min, lettura dell'assorbanza a 214 nm.

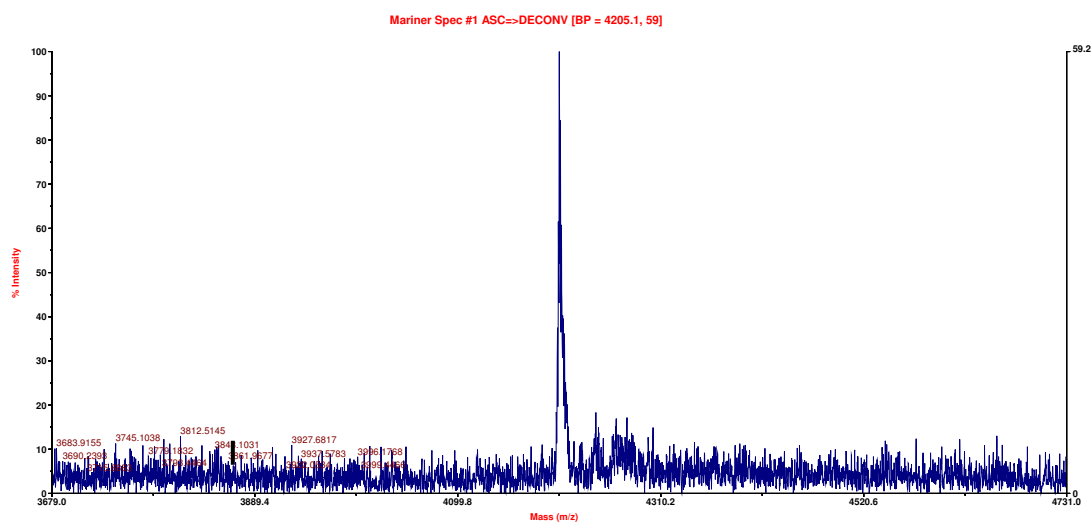
In alcuni cromatogrammi, si nota un picco elevato in corrispondenza di un tempo di ritenzione pari a 25,6 minuti. Si è deciso di raccogliere questo picco, e di analizzarlo con spettrometria di massa.

Sono state effettuate 2 analisi cromatografiche analitiche, iniettando la frazione 6, raccolta dalla semipreparativa di Figura 3.36, secondo le condizioni seguenti: colonna: Symmetry Shield; flusso: 1,0 mL/min; eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B: 0,05% TFA in CH₃CN; iniezione: 100 µL; gradiente da 0% a 40% di eluente B in 40 min, lettura dell'assorbanza a 214 nm.

Il volume raccolto a tempo di ritenzione pari a 25,6 minuti è stato messo a seccare sotto vuoto, e poi il campione è stato analizzato con spettrometro di massa ESI-TOF. I risultati, riportati in Figura 3.38, hanno rivelato la presenza del prodotto desiderato EAbuK-(GRGDSP)₄K di peso molecolare pari a 4206,902 Da.



a)



b)

Figura 3.38 a) Spettro di massa (ESI-TOF) del picco con $t_R=25,6$ minuti rappresentato nel cromatogramma riportato in Fig. 3.37; b) deconvoluzione dello stesso picco.

In un pallone sono state riunite le frazioni 6 e 7 della semipreparativa in figura 3.36, dato che contengono il coniugato, senza la presenza di particolari impurezze, il pallone è stato poi

messo a liofilizzare. Dalle frazioni 6 e 7 si sono ottenuti 0,51 mg di coniugato EAbuK-(GRGDSP)₄K.

In un altro pallone, invece, sono state riunite le frazioni 8 ÷ 24 della semipreparativa di Figura 3.36, contenenti il coniugato, ma con impurezze; sono dunque state effettuate diverse analitiche per purificare il coniugato, isolando ogni volta il picco a tempo di ritenzione pari a 25,6 minuti. Il prodotto desiderato è stato poi trasferito in un pallone e liofilizzato.

3.2.1 Bioconiugazione tra Aoa77EAbuK e IGF-1

3.2.2.1 Sintesi del peptide Aoa77EAbuK

Sequenza:

(PM: 2055.39 Da)

NH₂-O-CH₂-CO-(CH₂)₆-(CH₂)₆-Abu-Glu-Abu-Glu-Abu-Lys-Abu-Lys-Abu-Glu-Abu-Glu-Abu-Lys-Abu-Lys-NH₂

Sintesi:

Il peptide autoassemblante Aoa77EAbuK è stato ottenuto tramite il processo di sintesi su fase solida SPPS con chimica Fmoc, utilizzando il sintetizzatore automatico Syro I.

Il supporto solido utilizzato per la sintesi è la resina Tentagel S-OH, un copolimero graffato che consiste in una matrice di polistirene a bassa reticolazione con catene di polietilenglicole (PEG o POE) graffate. Sono stati pesati 0,54 g di resina con sostituzione pari a 0,24 mmoli/g. Per la sintesi del peptide è stata seguita la procedura riportata di seguito:

1. Sono state preparate le soluzioni 0,57 M dei seguenti amminoacidi (in H₂O MilliQ):
 - a. Fmoc-Glu(OtBu)-OH;
 - b. Fmoc-Lys(Boc)-OH;
 - c. Fmoc-Abu-OH;
 - d. Fmoc-acido 7-amminoeptanoico;
 - e. BisBoc-Aoa-OH.
2. Sono stati effettuati 3 lavaggi della resina con DMF. La resina, è stata funzionalizzata tramite doppio *coupling*, ciascuno di 45 minuti, con l'amminoacido Fmoc-Lys(Boc)-OH. Per ciascun *coupling* sono stati utilizzati:
 - a. 5 eq di Fmoc-Lys(Boc)-OH sciolti in 1 mL di DMF;
 - b. 0,05 eq di DMAP sciolti in 65 µL di DMF;
 - c. 2,5 eq di DIC sciolti in 51 µL di DMF.
3. La resa della reazione di funzionalizzazione della resina è stata determinata tramite il Test alla Piperidina ed è risultata essere pari al 99%.

4. Si è continuata la sintesi con sintetizzatore Syro I, effettuando dei *coupling* singoli per le prime cinque condensazioni, e *coupling* doppi per i restanti amminoacidi; ogni condensazione ha una durata di circa 45 minuti.
5. la rimozione del gruppo Fmoc, protettore della funzione N- α -amminica di ciascun residuo, è stata ottenuta trattando il peptide in crescita su resina con una soluzione al 40% di piperidina in DMF per 3 minuti, e poi per ulteriori 12 minuti con una soluzione al 20% di piperidina in DMF.
6. L'attivazione del gruppo carbossilico dell'amminoacido N- α -Fmoc protetto, nelle reazioni di condensazione, è stata ottenuta trattando 1 mL della soluzione dell'amminoacido (5 eq) con l'aggiunta di 1,4 mL di soluzione 0,45 M HBTU/HOBt in DMF (5 eq) e 0,625 mL di DIPEA 2,5 M in NMP (10 eq).
7. Al termine della sintesi, il peptide protetto su resina, con gruppo Aoa-BisBoc N-terminale è stato lavato con DCM e seccato sotto vuoto per 1 ora e 30 minuti: sono stati ottenuti 0,840 g di peptide su resina.

Deprotezione dai gruppi laterali:

Sono stati prelevati 10,8 mg di peptide su resina, trasferiti in un reattore a siringa e si è proceduto aggiungendo 1 mL di miscela così composta:

- 0,925 mL TFA;
- 0,025 mL TES;
- 0,025 mL H₂O MilliQ.

La soluzione è stata lasciata a contatto con il peptide per 1 ora a temperatura ambiente, sotto blanda agitazione magnetica. Alla fine della reazione è stata drenata la soluzione, ed il peptide deprotetto su resina è stato lavato 3 volte con TFA e 3 volte con PBS 50 mM (3 lavaggi da 3 mL per 3 minuti ciascuno).

Sblocco dalla resina:

Lo sblocco del peptide Aoa77EAbuK dalla resina Tentagel S-OH avviene in ambiente basico. Si è proceduto quindi addizionando nel reattore di sintesi, in cui è contenuto il peptide deprotetto su resina, 1 mL di soluzione di NaOH 0,1 M.

La soluzione di reazione si è lasciata per 25 minuti a temperatura ambiente con agitazione magnetica.

Al termine della reazione la soluzione basica contenente il peptide Aoa77EAbuK non protetto viene drenata dal reattore e raccolta in un pallone insieme a 3 lavaggi della resina con 2,34 mL totali di PBS 50 mM.

La soluzione ottenuta è stata poi liofilizzata.

Caratterizzazione del peptide grezzo:

Sono stati pesati 11,2 mg di peptide liofilizzato e sciolti in 1 mL di H₂O MilliQ; la soluzione ottenuta è stata filtrata ed analizzata con RP-HPLC analitica e sono state raccolte separatamente 12 frazioni. L'analisi cromatografica, riportata in Figura 3.39, è stata eseguita con le seguenti condizioni: colonna: Symmetry Shield; flusso: 1,0 mL/min; eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B: 0,05% TFA in CH₃CN; iniezione: 150 µL; gradiente prima 5 minuti al 100% di eluente A, poi da 0% a 80% di eluente B in 40 minuti, infine 10 minuti all'80% di eluente B; lettura dell'assorbanza a 214 nm. Sono state liofilizzate le frazioni 4, 5 e 6 delle quali poi è stata effettuata l'analisi di massa ESI-TOF.

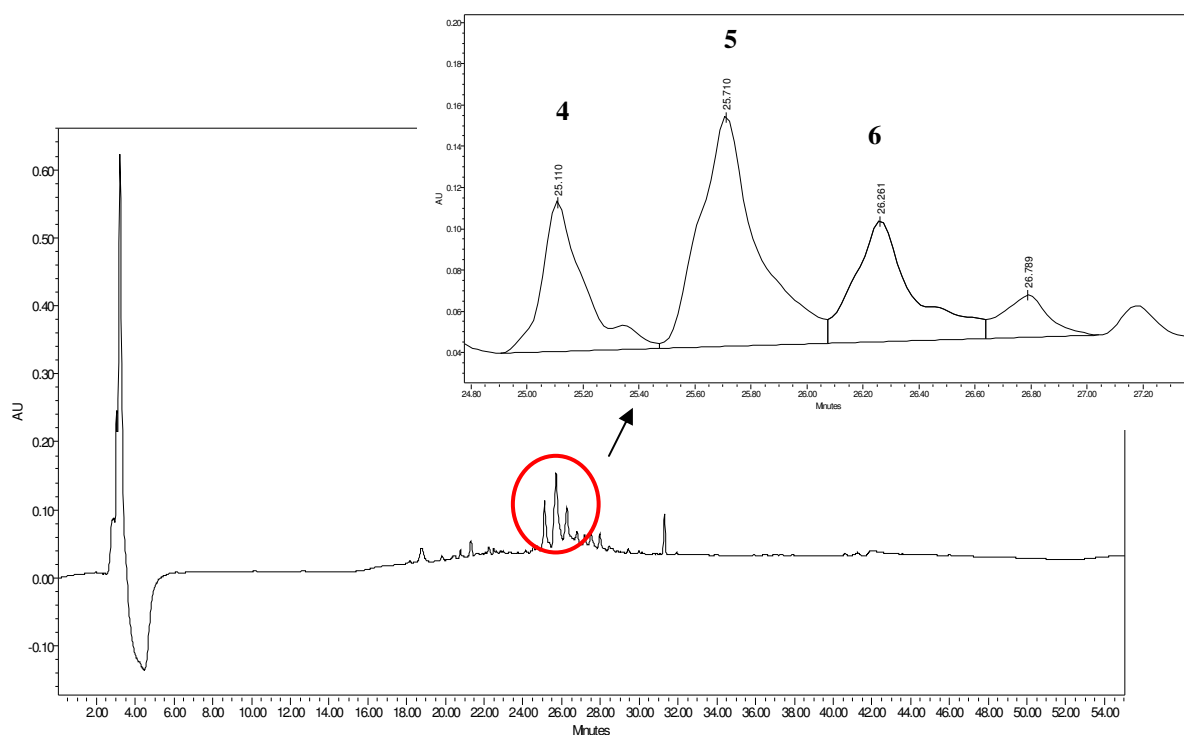
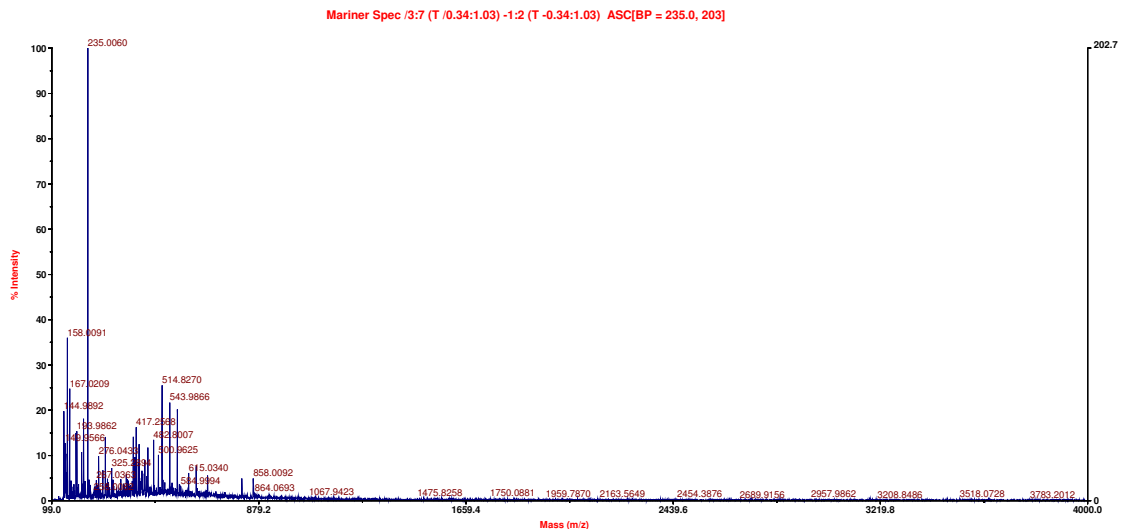
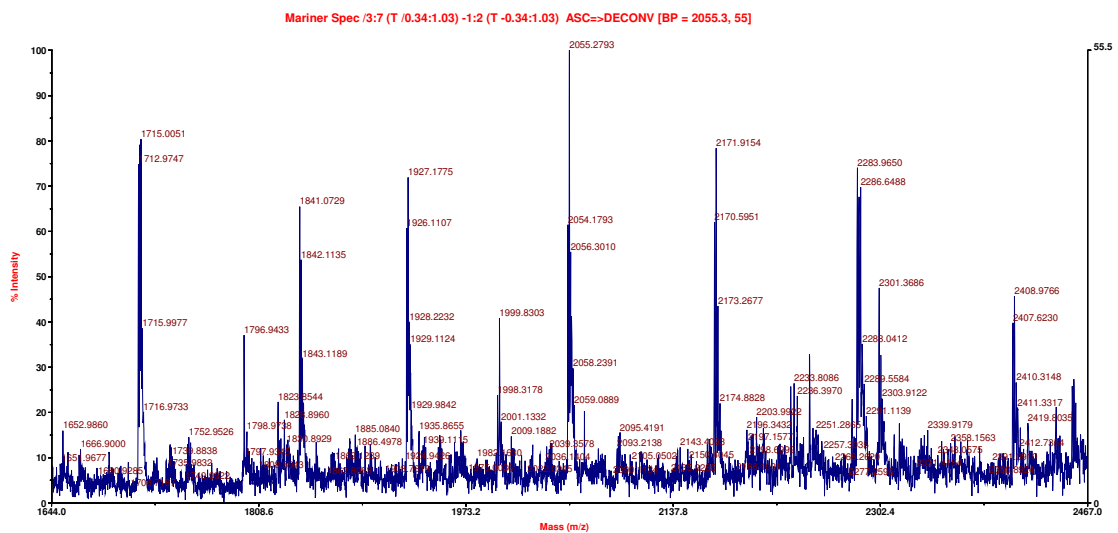


Figura 3.39 Analisi cromatografica RP-HPLC analitica del peptide grezzo Aoa77EAbuK con le condizioni: colonna: Symmetry Shield; flusso: 1,0 mL/min; eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B: 0,05% TFA in CH₃CN; iniezione: 150 µL; gradiente prima 5 minuti al 100% di eluente A, poi da 0% a 80% di eluente B in 40 minuti, infine 10 minuti all'80% di eluente B; lettura dell'assorbanza a 214 nm. Nel riquadro in alto a destra è riportato un ingrandimento del cromatogramma, in cui sono ben visibili le frazioni raccolte: 4, 5 e 6.

Mediante spettrometria di massa (ESI-TOF); è stato così confermata la presenza del peptide a peso molecolare di 2055,3 Da nelle frazioni 5 e 6 che è molto è pari a quello teorico (2055.392 Da), il peptide sintetizzato contiene dunque la sequenza esatta di amminoacidi, anche se sono presenti delle impurezze.



a)



b)

Figura 3.40 a) Spettrometria di massa ESI-TOF della frazione 6 raccolta nell'analisi cromatografica analitica di Figura 3.38; b) deconvoluzione della stessa frazione.

In Figura 3.40 è riportato il risultato dell'analisi di massa ESI-TOF eseguita per la frazione 6 raccolta durante l'analisi cromatografica di Figura 3.39.

3.2.2.2 Preparazione di IGF-1-chetone

Per avere un rapporto molare 2000:1, sono state fatte reagire $2,615 \times 10^{-3}$ moli di PLP con $1,307 \times 10^{-6}$ moli di IGF-1 (Capitolo 2, Paragrafo 2.1.3.4), in tampone 25 mM fosfato di sodio a pH 6,5. Sono stati presi 10 mg (corrispondenti a $1,307 \times 10^{-6}$ moli) di IGF-1 e sciolti in 1 mL di tampone sodio fosfato 25 mM. È stata preparata una soluzione 100 mM di PLP in

tampone fosfato di sodio 25 mM, sciogliendo in un becker 649,13 mg di PLP e mantenendo il pH a 6,5 con l'aggiunta di NaOH 1 N. La soluzione di IGF-1 è stata trasferita nel becker contenente la soluzione di PLP e il volume è stato portato a 26,3 mL totali sempre con tampone. La concentrazione dell'IGF-1 in nella miscela di reazione è 0,05 mM. La reazione è stata condotta per 3 ore a temperatura di 37°C e 1 ora a temperatura ambiente, facendo gorgogliare nella soluzione un flusso di azoto per mantenere un'atmosfera inerte (Figura 3.41).

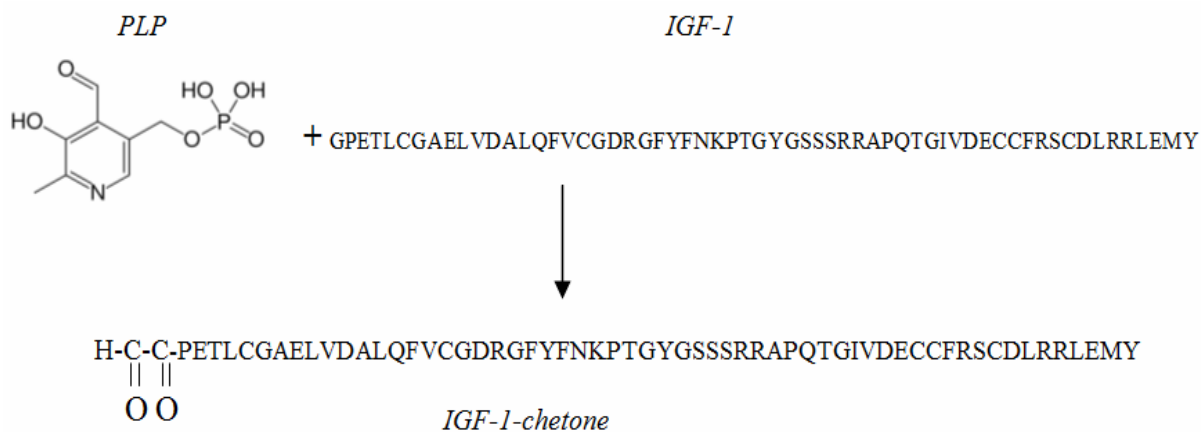


Figura 3.41 Reazione tra PLP e la proteina umana IGF-1, per formare il chetone.

Trascorse le 4 ore di reazione, è stata effettuata un'analisi RP-HPLC semipreparativa iniettando tutta la soluzione.

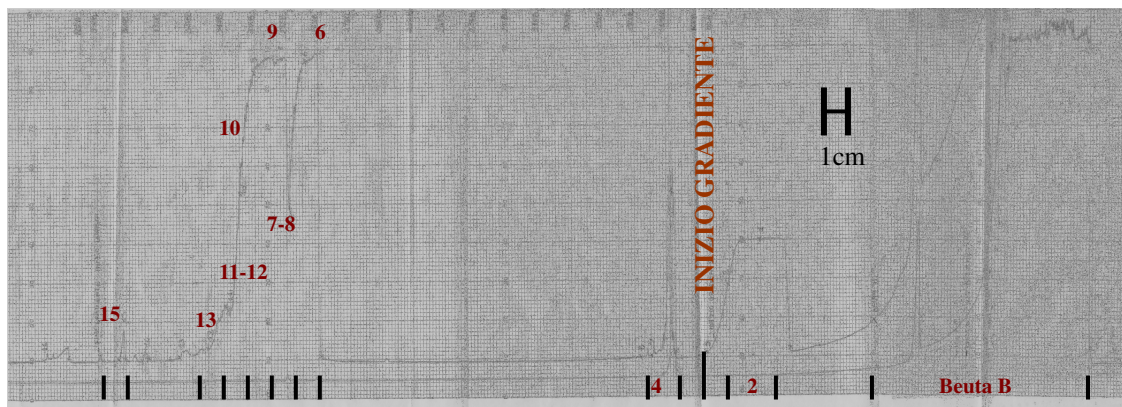


Figura 3.42 Analisi cromatografica RP-HPLC semipreparativa della miscela di reazione per isolare il prodotto di reazione: IGF-1-chetone. Condizioni dell'analisi: colonna Zorbax C18; eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B: 0,05% TFA in CH₃CN; gradiente: da 0% a 16% di eluente B in 2 minuti, poi da 16% a 35% di eluente B in 76 minuti, infine all'80% di eluente B per 10 min; flusso: 4 mL/min; fondoscala: 4,0 Abs; velocità della carta: 0,5 cm/min; detector: 214 nm

L'analisi riportata in Figura 3.42 è stata condotta con le seguenti condizioni: colonna Zorbax C18; eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B: 0,05% TFA in CH₃CN; gradiente: da

0% a 16 % di eluente B in 2 minuti, poi da 16% a 35% di eluente B in 76 minuti, infine all'80% di eluente B per 10 min; flusso: 4 mL/min; detector: 214 nm e 348 nm.

Le frazioni sono state raccolte in provette distinte.

Le frazioni "beuta B", 2, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15 indicate in Figura 3.42, sono state in seguito analizzate in RP-HPLC analitica, eseguita nelle seguenti condizioni: colonna: Vydac C₁₈; flusso: 1,0 mL/min; eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B: 0,05% TFA in CH₃CN; iniezione: 20 µL; gradiente dal 20% al 40% di eluente B in 40 min, lettura dell'assorbanza a 214 nm. In Figura 3.43 sono stati riportati i cromatogrammi ottenuti dall'analisi RP-HPLC delle frazioni 9, 10 e 11 raccolte nella semipreparativa di Figura 3.42.

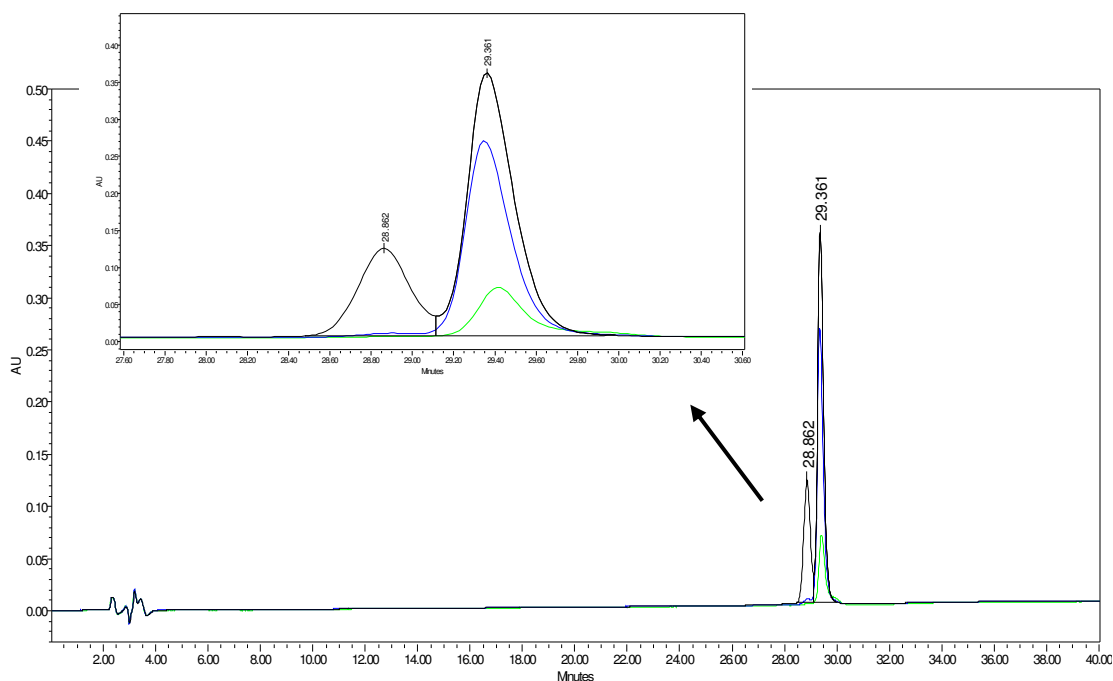


Figura 3.43 Sovrapposizione dei cromatogrammi da analisi RP-HPLC analitica delle frazioni: 9 (nero), 10 (blu) e 11 (verde) raccolte dalla semipreparativa in figura 3.42. Colonna: Symmetry Shield; flusso: 1,0 mL/min; eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B: 0,05% TFA in CH₃CN; iniezione: 20 µL; gradiente da 20% a 40% di eluente B in 40 min, lettura dell'assorbanza a 214 nm.

L'analisi di massa della frazione 10 con tempo di ritenzione: $t_R = 29,361$ ha dato come esito un peso molecolare pari a 7648 Da che è quello del prodotto desiderato IGF-1-chetone. L'analisi di massa del picco a tempo di ritenzione $t_R = 28,862$ della frazione 9 ha rivelato un peso molecolare di 7664 Da, corrispondente alla proteina IGF-1 con la Meteonina, in sequenza, ossidata.

Esaminando i cromatogrammi delle analisi RP-HPLC si è deciso di utilizzare solo le frazioni 9, 10 e 11 per la reazione successiva di coupling, in quanto presentavano il picco più alto in corrispondenza del tempo di ritenzione dell'IGF-1-chetone. Tali frazioni sono state quindi

liofilizzate. Al termine della liofilizzazione non è stato possibile pesare il prodotto ottenuto, a causa dell'elevata elettrostaticità (peso approssimativo: 6 mg di IGF-1-chetone).

3.2.2.3 Preparazione del coniugato EAbuK-IGF-1

Rispetto alla reazione di coniugazione per formare il composto EAbuK-(GRGDSP)₄K che è stata effettuata con entrambi i reagenti in soluzione, questa reazione di coupling viene effettuata con il peptide auto-assemblante ancorato su resina e l'IGF-1-chetone in soluzione.

Si è effettuata la deprotezione dai gruppi laterali di 100 mg di Aoa77EAbuK nella stessa modalità riportata al Paragrafo 3.2.2.1, ma con una miscela di reazione di 5 mL così composta:

- 4,750 mL di TFA;
- 0,125 mL di TES;
- 0,125 mL di H₂O MilliQ.

Inoltre i lavaggi non sono stati effettuati con PBS ma con H₂O MilliQ. Il peptide deproteetto su resina è stato poi messo a seccare in campana da vuoto per 2 ore.

Sono state fatte reagire $3,922 \times 10^{-7}$ moli di Aoa77EAbuK, con $7,844 \times 10^{-7}$ moli di IGF-1-chetone (rapporto 1:2) in H₂O MilliQ. Sono stati pesati 2,50 mg di Aoa77EAbuK deproteetto su resina e sono stati posti in un reattore a siringa. Si sono sciolti i 6 mg di IGF-1-chetone in 500 μ L di H₂O MilliQ. La soluzione è stata poi trasferita nel reattore con il peptide auto-assemblante.

La miscela è stata lasciata reagire a temperatura ambiente per 21 ore. La reazione tra il peptide auto-assemblante Aoa77EAbuK e la proteina IGF-1-chetone è riportata in Figura 3.44.

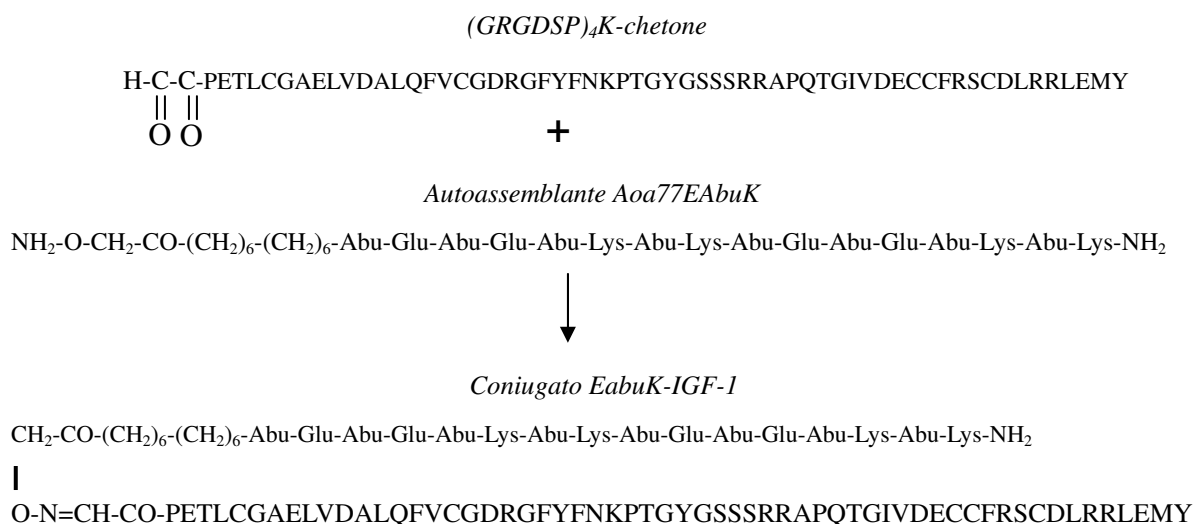


Figura 3.44 Reazione tra il peptide autoassemblante AoaEAbuK e la proteina umana IGF-1-chetone, per formare il coniugato EAbuK-IGF-1.

Finita la reazione, la soluzione contenente l'IGF-1-chetone in eccesso è stata filtrata in un pallone. La resina è stata lavata con H₂O MilliQ.

In seguito si è effettuato lo sblocco del coniugato e del peptide su resina con 500 µL di soluzione 0,1 mM di NaOH, lasciando reagire per 25 minuti a temperatura ambiente con agitazione magnetica. Al termine della reazione di sblocco, la soluzione basica è stata filtrata in un pallone ed è stata aggiunta una goccia di acido acetico per neutralizzare il pH.

La soluzione è stata portata a piccolo volume con l'evaporatore rotante e poi, aggiungendo etere dietilico freddo (circa 4°C) si è fatto precipitare il peptide ed il coniugato, che si è potuto separare dalla soluzione contenente i sali.

La soluzione seccata sotto vuoto è stata analizzata con spettroscopia di massa MALDI-TOF che ha rivelato la presenza del peptide auto-assemblante e di IGF-1 chetone, ma non vi è la presenza del prodotto desiderato EAbuK-IGF-1 di peso molecolare 9685,392 Da. Si presume che il picco di peso molecolare 4294,31 Da sia un'impurezza.

In Figura 3.45 è riportato lo spettro ottenuto dall'analisi di massa MALDI-TOF effettuata sulla soluzione post-sblocco dalla resina.

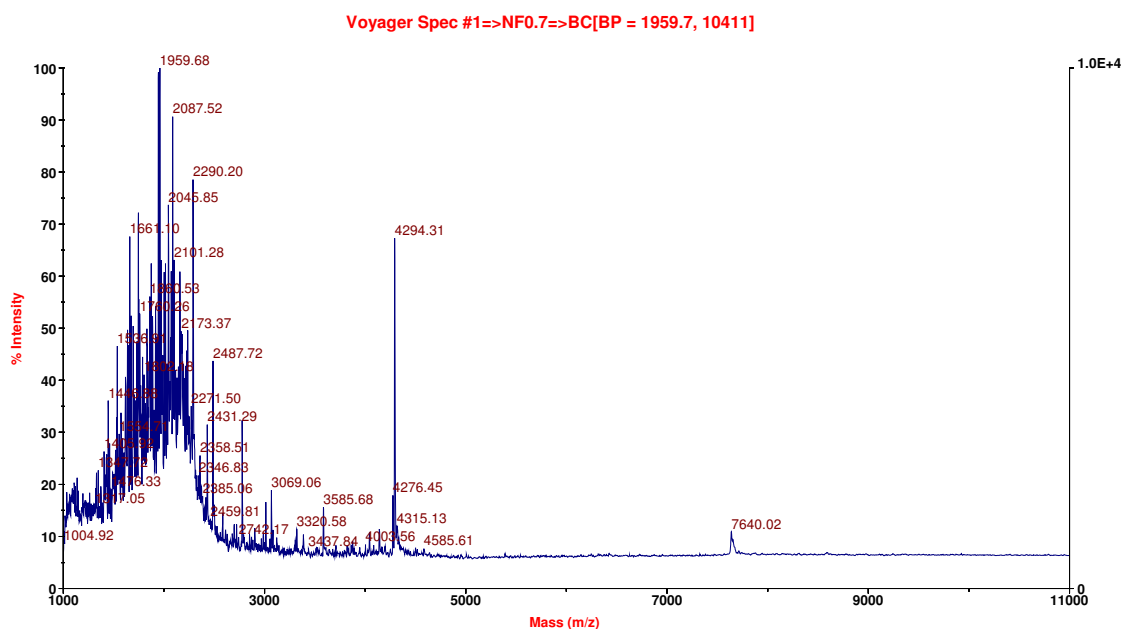


Figura 3.45 Analisi di massa MALDI-TOF effettuata sulla soluzione post-sblocco dalla resina dopo la reazione di condensazione tra Aoa77EabuK e IGF-1-chetone.

Conclusioni

Il seguente studio ha riguardato l'utilizzo di nanofibre di peptidi auto-assemblanti come "filler" per matrici biologiche decellularizzate, nell'ambito della progettazione di valvole cardiache "self-seeding".

Le principali conclusioni che possiamo trarre dai dati sperimentali sono riassunte brevemente come segue:

- ✓ il peptide auto-assemblante EAbuK è in grado di permeare il pericardio bovino decellularizzato;
- ✓ la presenza di peptide auto-assemblante nella zona VAS del pericardio bovino comporta un incremento dello spessore e del contenuto d'acqua, sia in H₂O che in PBS in tutti i campioni, anche di bovini differenti; l'effetto è imputabile alle proprietà auto-assemblanti della sequenza in quanto un risultato analogo non viene ottenuto utilizzando il peptide di controllo che non ha proprietà auto-aggreganti. Inoltre possiamo affermare che un analogo *trend* dei dati non si riscontra nei risultati ottenuti con il pericardio bovino VPD, segno che anche la disposizione delle fibre di collagene gioca un ruolo importante nelle modifiche fisiche sul pericardio indotte dal peptide auto-assemblante. Un'ipotesi allo studio è che proprio le fibre di collagene orientate su piani orizzontali nei campioni VAS vadano a interagire con le catene laterali dei peptidi auto-assemblanti orientando orizzontalmente i piani β -sheet. Se i piani β -sheet si orientano parallelamente alle fibre di collagene la crescita dello scaffold, per accatastamento dei piani (come in un mazzo di carte) deve portare ad un aumento dello spessore della matrice di pericardio.
- ✓ la presenza di peptide auto-assemblante sia nella zona VAD che VPD del pericardio porcino, comporta un incremento sia dello spessore che del contenuto d'acqua (sia in H₂O che in PBS);
- ✓ la presenza di peptide non auto-assemblante provoca un incremento dello spessore del pericardio porcino da zona VAD, mentre la zona VPD è fortemente influenzata dalla variabilità interindividuale;
- ✓ il trattamento del pericardio porcino decellularizzato, con peptide non auto-assemblante provoca un aumento del contenuto d'acqua in ciascuna delle zone della matrice. La formulazione di un'ipotesi che colleghi tutti i dati sperimentali nel caso del pericardio porcino risulta più difficile. Sono allo studio tutte le caratteristiche in cui divergono il pericardio bovino e porcino, inoltre verranno a breve eseguiti altri esperimenti sia sul pericardio bovino che porcino per potere operare su un numero maggiore di dati.

- ✓ La presenza di enzimi in grado di digerire il peptide $\Delta 5\text{SDF}$, individuata nel solo pericardio porcino, grazie alla caratterizzazione dei frammenti del peptide, è un dato molto interessante. Essendo il processo di decellularizzazione uguale nel caso del pericardio bovino e porcino si sta studiando che cosa risulti proteggere gli enzimi proteolitici del pericardio porcino dal trattamento di inattivazione. In ogni caso l'utilizzo del peptide $\Delta 5\text{SDF}$ potrebbe essere utile come saggio per evidenziare l'effettiva inibizione degli enzimi proteolitici ottenuta durante il processo di decellularizzazione.

Per la parte del progetto che guarda all'arricchimento dello scaffold di peptidi auto-aggreganti con molecole bioattive, in questo lavoro di tesi, è stato sintetizzato con successo il coniugato EAbuK-(GRGDSP)₄K mentre la strategia di coniugazione tra EAbuK e IGF-1 non ha portato al prodotto voluto.

Nomenclatura

PGA = acido poliglicolico
PLA = acido polilattico
PHA = poliidrossialcanoato
P4HB = poli-4-idrossibutirrato
PLP = pirossidal-5-fosfato
DMF = N,N-dimetilformammide
TES = trietilsilano
PBS = soluzione tampone fosfato
PMSF = phenylmethanesulfonylfluoride
NEM = N-ethylmaleimide
HBTU = 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio esafluorofosfato
HOBt = 1-idrossibenzotriazolo
NMP = N-metil-2-pirrolidone
TFA = acido trifluoroacetico
DCM = diclorometano
PEO = polietilenglicole
PEG = polietilenglicole
DIPEA = N,N-diisopropiletilammina
TRI = triton
COL = colato
TAMRA = 5(6)-carbossitetrametilrodamina
OCT = optimal cutting temperature
 $\Delta 5SDF1\beta T = \Delta 5SDF$
VAS = ventricolo anteriore sinistro
VPD = ventricolo posteriore destro
VAD = ventricolo anteriore destro
A / Ala = alanina
C / Cys = cisteina
D / Asp = acido aspartico
E / Glu = acido glutammico
F / Phe = fenilalanina
G / Gly = glicina
H / His = istidina
I / Ile = isoleucina
K / Lys = lisina
L / Leu = leucina
M / Met = metionina
N / Asn = asparagina
P / Pro = prolina

Q / Gln = glutammina

R / Arg = arginina

S / Ser = serina

T / Thr = treonina

V / Val = valina

Y / Tyr = tirosina

W / Trp = triptofano

Abu = acido 2-amminobutirrico

Fmoc = 9-fluorenilmetilossicarbonile

OtBu = *ter*-butilossi

t-Boc = *terz*-butilossicarbonile (abbreviato Boc)

Boc = vedi *t*-Boc

GH = ormone della crescita

IGFs = insuline-like growth factors

HPLC = *High Performance Liquid Chromatography*

RP-HPLC = *Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography*

UV/VIS = ultravioletto/visibile

ESI = *ElectroSpray Ionization*

TOF = *Time Of Flight*

MALDI = *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*

SPPS = *Solid Phase Peptide Syntesis*

PR = potere risolutivo

Q = quartile

PM = peso molecolare

eq = equivalenti

C / c = concentrazione molare [M]

A = area [cm]

A_{λ} = assorbanza [-]

*w*_t = peso del campione [g]

m = massa [g]

n = numero di moli [mol]

V = volume [cm³] o [mL]

s = spessore [cm]

P = peso del campione [g]

b = cammino ottico [cm]

Dev. St. = deviazione standard

*t*_R = tempo di ritenzione [sec]

ρ = densità [g/mL]

λ = lunghezza d'onda [nm]

λ_{\max} = lunghezza d'onda di massimo assorbimento [nm]

ϵ_{λ} = coefficiente di estinzione molare [M⁻¹cm⁻¹]

Riferimenti bibliografici

1. Butany J., Ahluwalia M.S., Munroe C., Fayet C., Ahn C., Blit P., Kepron C., Cusimano R.J., Leask R.L.: *Mechanical heart valve prostheses: identification and evaluation*. Cardiovascular Pathology. 2002; 12: 1-22
2. Kouchoukos N.T.: *Aortic allografts and pulmonary autografts for replacement of the aortic valve and aortic root*. Ann Thorac Surg. 1999; 67: 1846-8
3. Dossche K.M., de la Rivie A.B., Morshuis w.j., Schepens M.A., Defauw J.J., Ernst S.M.: *Cryopreserved Aortic Allografts for Aortic Root Reconstruction: A Single Institution's Experience*. Ann Thorac Surg. 1999; 67: 1617-22
4. Palka P., Harrocks S., Lange A., Burstow D.J., O'Brien M.F.: *Primary aortic valve replacement with cryopreserved aortic allograft. An echocardiographic follow-up study of 570 patients*. Circulation. 2002 Jan 1; 105(1): 61-6
5. Kerchove L., Glineur D., El Khoury G., Noirhomme P.: *Stentless valves for aortic valve replacement: where do we stand?*. Current Opinion in Cardiology. 2007; 22: 96-103
6. Hoffmann G., Lutter G., Crème J.: *Durability of Bioprothetic Cardiac Valves*. Dtsch Arztebl int. 2008 Feb; 105(8): 143-148
7. Thamilarasan M., Griffin B.: *Choosing the most appropriate valve operation and prothesis*. Cleve. clin. med. 2002 sep; 69(9): 688-90, 693-4, 696-8
8. Zegdi R., Khabbaz Z., Borenstein N., Fabiani N.J.: *A repositionable valved stent for endovascular treatment of deteriorated bioprostheses*. J. Am. Coll. Cardiol. 2006; 48: 1365-8
9. Feldman T., Leon M.B.: *Prospects for Percutaneous Valve Therapies*. Circulation. 2007; 116: 2866-2877
10. Godino C., Colombo A.: *Il trattamento percutaneo della stenosi aortica. Indicazione e limiti*. Unità di emodinamica – Ospedale San Raffaele di Milano
11. Singh I.M., Shishehbor M.H., Christofferson R.D., Tzucu E.M., Kapadia S.R.: *Percutaneous treatment of aortic valve stenosis*. Cleve. Clin. Med. 2008 Nov; 75(11): 805-12
12. Clavel M.A., Webb J.G., Pibarot P., Altwegg L., Dumont E., Thompson C., et al: *Comparison of the hemodynamic performance of percutaneous and surgical bioprostheses for the treatment of severe aortic stenosis*. J. Am. Coll. Cardiol. 2009; 53: 1883-91

13. Macchiarini, Jungebluth, Go, Asnaghi, Rees, Cogan, Dodson, Martorell, Bellini, Parnigotto, Dickinson, Hollander, Mantero, Conconi, Birchall: *Clinical transplantation of tissue-engineered airway*. The Lancet. 2008; 372: 2023-2030
14. Atala, Bauer, Soker, Yoo, Retik: *Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty*. Lancet. 2006; 367: 1241-46
15. Di Bello C., Bagno A.: *Interazioni tra biomateriali e tessuti*. Collana di ingegneria biomedica. Pàtron editore. 2009.
16. Sacks M.S., Schoen F.J., Mayer J.E.: *Bioengineering challenges for heart valve tissue engineering*. Annu. Rev. Biomed. Eng. 2009; 11: 289-313
17. Neuwander S., Hoerstrup S.P.: *Heart valve tissue engineering*. Transpl. Immunol. 2004; 12: 359-65
18. Hacken D.F., Taylor W.J., Lefemine A.A., Lunzer S., Low H.B., Cohen M.L., Jacobeny J.A.: *Aortic valve replacement with a caged ball valve*. Am. J. Cardiol. 1962; 9: 292-299
19. Vasely I. et al.: *Heart valve tissue engineering*. Cir. Res. 2005; 97: 743-755
20. Flameng W. Et al.: *A new approach to heart valve tissue engineering*. International Journal of Cardiology. 2004; 95: 55-56
21. Knight R.L., Wilcox H.E., Korossis S.A., Fischer J., Ingham E.: *The use of acellular matrices for the tissue engineering of cardiac valves*. J. Engineering on medicine. 2008; 222: 129-143
22. Simon, Kasimir, Seebacher, Weigel, Ullrich, Salzer-Muhar, Rieder, Wolner: *Early failure of the tissue engineered porcine heart valve SYNERGRAFT in pediatric patients*. Eur. J. Cardiothorac. Surg. 2003; 23: 1002-6
23. Stamm, Khosravi, Grabow, Schmohl, Treckmann, Drechsel, Nan, Schmitz, Haubold, Steinhoff: *Biomatrix/Polymer Composite Material for Heart Valve Tissue Engineering*. Ann. Thorac. Surg. 2004; 78: 2084-93
24. Nanci, Wuest J.D., Peru L., Brunet P., Sharma V., Zalzal S., McKee M.D.: *Chemical modification of titanium surfaces for covalent attachment of biological molecules*, J.Biomed.Mater.Res. 1998; 40(2): 324-335
25. Griffith L.G. et al.: *Polymeric Biomaterials*. Acta. Mater. 2000; 48: 263-277
26. Manzan E.: *Valutazione di biomateriali per la creazione di scaffolds da utilizzare nell'Ingegneria Tissutale: caratterizzazione delle proprietà fisiche e degli aspetti morfo-strutturali del pericardio bovino e porcino, prima e dopo decellularizzazione*. Tesi di laurea specialistica in medicina e chirurgia. Università di Padova. 2011
27. Hiester E.D., Sacks M.S.: *Optimal bovine pericardial tissue selection sites. II. Cartographic analysis*. J. Biomed. Mater. Res. 1998; 39: 215-221

28. Hiester E.D., Sacks M.S.: *Optimal bovine pericardial tissue selection sites. I. Fiber architecture and tissue thickness measurement*. J. Biomed. Mater. Res. 1998; 39: 207-214
29. Korossis S.A., Booth C., Wilcox H.E., Watterson K.G., Kearney J.N., Fisher J.: *Tissue engineering of cardiac valve prostheses II: biomedical characterization of decellularized porcine aortic heart valves*. J. Heart Valve Dis. 2002; 11: 463-71
30. Zhang S. et al.: *Emerging biological materials through molecular self-assembly*. Biotech. Adv. 2002; 20: 321-339
31. Turella F.: *Nano-Scaffold di polimeri naturali e sintetici per l'ingegneria tessutale: preparazione e caratterizzazione*. Laurea Specialistica in Scienza ed Ingegneria dei Materiali. Dipartimento di Ingegneria Meccanica, settore Materiali, Padova. 2008.
32. Gambaretto R., Tonin L., Di Bello C., Dettin M.: *Self-Assembling Peptides: Sequence, Secondary Structure in solution and Film Formation*. Biopolymers. 2008; 89: 906-915.
33. *User Manual*, Model 431A Peptide Synthesizer (1990) Applied Biosystem (ed.), versione 1.12.
34. Todd C. Holmes, Sonsoles de Lacalle, Xing Su, Guosong Liu, Alexander Rich, Shuguang Zhang: *Extensive neurite outgrowth and active synapse formation on self-assembling peptide scaffolds*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2000; 97: 6728-6733
35. Schachner M.: *Neurobiology: Nervous engineering*, Nature. 2000; 405: 747-748.
36. Davis M.E., Motion M.J.P., Narmoneva D.A., Takahashi T., Hakuno D., Kamm R.D., Zhang S., Lee R.T.: *Injectable Self-Assembling Peptide Nanofibers Create Intramyocardial Microenvironments for Endothelial Cells*. Circulation. 2005; 111: 442-450
37. Misawa H., Kobayashi N., Soto-Gutierrez A., Chen Y., Yoshida A., Rivas-Carrillo J.D., Navarro-Alvarez N., Tanaka K., Miki A., Takei J., Ueda T., Tanaka M., Endo H., Tanaka N., Ozaki T.: *PuraMatrixTM Facilitates Bone Regeneration in Bone Defects of Calvaria in Mice*. Cell Transplantation. 2006; 15: 903-910
38. Gilmore J.M., Scheck R.A., Esser-Kahn A.P., Joshi N.S., Francis M.B.: *N-terminal protein modification through a biomimetic transamination reaction*. Angew. Chem. Int. Ed. 2006; 45: 5307-5311
39. Merrifield B., *Solid Phase Synthesis*. Science. 1986; 232: 341-347
40. Fields G.B., Tian Z., Barany G.: *Synthetic Peptides: A User's Guide*. Grant G.A. (ed), W.H. Freeman and Company 1992 (New York).

41. Fields G.B., Noble R.L.: *Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids*. Int. J. Pept. Prot. Res. 1990; 35: 161-214.
42. Carpino L.A. Han G.Y.: *The 9-Fluorenylmethoxycarbonyl Amino-Protecting Group*. J. Org. Chem. 1972; 37: 3404-3409
43. Grant G.A.: *Synthetic peptides A User's Guide*, II ed, Oxford University Press, 2002
44. Fields C.G., Lloyd D.H., Macdonald R.L., Ottenson K.M., Noble R.L.: *HBTU activation for automated Fmoc solid-phase peptide synthesis*. Peptide Research. 1991; 4: 95-101
45. Ball H.L., Mascagni P.: *Chemical synthesis and purification of protein: a methodology*. Int. J. Peptide Protein Res. 1996; 48: 31-47
46. Sarin V.K., Kent B.H., Tam J.P., Merrifield R.B.: *Quantitative monitoring of solid-phase peptide synthesis by the ninhydrin reaction*. Analyt. Biochem. 1981; 117: 147-157.
47. King D.S., Fields C.G., Fields G.B.: *A cleavage method which minimized side reaction following Fmoc solid phase peptide synthesis*. Int. J. Peptide Protein Res. 1990; 36: 255-266
48. *Introduction to Cleavage Techniques*, "Strategies in Peptide Synthesis", Applied Biosystem (ed), 1990
49. Pearson D.A., Blanchette M., Baker M.L., Guindon C.A.: *Trialkylsilanes as scavengers for the trifluoroacetic acid deblocking of protecting groups in peptide synthesis*. Tetrahedron Letters. 1989; 30: 2739-2742
50. Stulik K., Pacakova V., Suchankova J., Claessens H.A.: *Stationary phase for peptide analysis by high performance liquid chromatography: a review*. Analytica Chimica Acta. 1997; 352: 1-19
51. Siuzdak G.: *The Emergence of Mass Spectrometry in Biochemical Research*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994; 91: 11290-11297
52. Beavis R.C., Chait B.T.: *High-Accuracy Molecular Mass Determination of Proteins Using Matrix-Assisted Laser Desorption Mass Spectrometry*. Analytical Chemistry, 1990; 62: 1836-1840
53. Bauer H.H., Christian G.D., O'Reilly J.E.: *Analisi strumentale* (1985) Piccin.
54. Montgomery D.C.: *Controllo statistico della qualità*. McGraw-Hill Libri Italia s.r.l. Milano. 2000
55. Bellucco E.: *Il controllo statistico della qualità con Minitab*. FrancoAngeli. Milano. 2007
56. Gallina G.: *Progettazione, realizzazione e caratterizzazione di superfici biomimetiche osteoinduttive per applicazioni protesiche*. Tesi di laurea in Ingegneria Chimica e dei Processi Industriali. Università di Padova. 2011

Ringraziamenti

Ringrazio: la professoressa Monica Dettin, per la professionalità, la disponibilità e gentilezza costantemente dimostratemi; la dottoressa Roberta Danesin, per avermi insegnato passo dopo passo le procedure di laboratorio, e per il supporto nel loro svolgimento.

Ringrazio: il professore Michele Spina per la supervisione del lavoro sulle matrici biologiche ed i preziosi consigli; la dottoressa Sabrina Facciolo, per la professionalità e l'allegria che ha sempre riversato nel suo lavoro.

Ringrazio: Gianluca Gallina per l'allegria compagnia durante le interminabili semipreparative e per avermi insegnato che anche pulire le provette è un'arte che bisogna saper apprezzare!

Un ringraziamento speciale va ai miei genitori per il sostegno incondizionato, e per aver sempre creduto fermamente nelle mie capacità guidandomi ed incoraggiandomi.

Ringrazio mio fratello Wilfried per la sua capacità di ricordarmi che si può fare sempre di meglio (e con "non troppo sforzo" eh!).

Ringrazio la nonna Tersilla, per l'incoraggiamento non solo nello studio ma in ogni mia scelta.

Un ringraziamento particolare va a Mattia, per il suo supporto senza riserve che mi ha accompagnato, aiutandomi, durante tutti questi anni di studio.

Ringrazio: Elena per la bellissima amicizia di una vita; Valentina per la sua capacità di mettermi sempre di buon umore; Clizia, Chiara e Michela per aver reso gli anni di convivenza "da studio" tra i più belli ed indimenticabili!

Ringrazio tutti i "nemici" per avermi costantemente istigato a fissare nuovi obiettivi; e tutti gli amici che mi hanno sostenuto nel raggiungere nuovi traguardi.

