



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA INDUSTRIALE

**TESI DI LAUREA MAGISTRALE IN  
INGEGNERIA DEI MATERIALI**

**MATRICI ELETTROFILATE IBRIDE PER L'INGEGNERIA DEL  
TESSUTO OSSEO: VALUTAZIONE DELL'ARRICCHIMENTO  
PROGRESSIVO DELLA FIBRA CON PEPTIDI  
AUTO-AGGREGANTI.**

*Relatore: Prof.ssa Monica Dettin*

*Correlatore: Dott.ssa Paola Brun*

*Dott.ssa Annj Zamuner*

*Laureando: DANIELE ZAVATTINI*

ANNO ACCADEMICO 2013 – 2014



# Riassunto

Questo lavoro di tesi si inserisce all'interno di un programma di ricerca volto a mettere a punto sostituti della matrice extra-cellulare per la medicina rigenerativa del tessuto osseo.

Lo scopo di questa tesi è stata la preparazione e la caratterizzazione fisica e biologica di matrici elettrofilate ibride di policaprolattone arricchite con differenti peptidi auto-aggreganti in varie concentrazioni.

Sono state effettuate differenti analisi, in particolare è stato fatto uno studio morfologico al SEM e è stato valutato l'andamento dei diametri delle nano-fibre al variare delle condizioni. Per quanto riguarda l'analisi superficiale sono state studiate la quantità e la struttura del peptide superficiale con l'ausilio di test colorimetrici, tramite spettroscopia fotoelettronica a raggi X e mediante spettroscopia all'infrarosso in trasformata di Fourier.

L'analisi delle proprietà biologiche ha compreso saggi di adesione di osteoblasti umani, la determinazione dei livelli di calcio e la valutazione dell'espressione genica di tre proteine importanti per il tessuto osseo..

Grazie a questa ricerca è stato possibile ottenere tre matrici ibride in grado di promuovere sia l'adesione che la differenziazione cellulare.





# Indice

<b>CAPITOLO 1 – Introduzione</b> .....	1
1.1 – BIOMATERIALI.....	1
1.2 - ADESIONE CELLULARE.....	3
1.3 - TESSUTO OSSEO.....	5
1.3.1 - Matrice extra-cellulare ossea.....	5
1.3.2 - Cellule del tessuto osseo.....	7
1.4 - ELETTROFILATURA.....	10
1.5 - $\epsilon$ -POLICAPROLATTONE.....	13
1.6 - STRUTTURE NANOFIBROSE.....	13
1.7 - PEPTIDI AUTO-AGGREGANTI.....	14
1.8 - FUNZIONALIZZAZIONE DEI BIOMATERIALI.....	16
1.9 - INGEGNERIA DEL TESSUTO OSSEO: STATO DELL'ARTE.....	18
1.9.1 - Matrici elettrofilate.....	18
1.9.2 - Utilizzo dei peptidi auto-aggreganti.....	21
1.9.3 - Matrici ibride elettrofilate.....	23
1.10 - SCOPO DELLA TESI.....	24
<b>CAPITOLO 2 – Materiali, Strumenti e Metodi</b> .....	25
2.1 – MATERIALI.....	25
2.1.1 – Reagenti.....	25
2.1.2 – Peptidi sintetici utilizzati.....	26

2.2 - STRUMENTI.....	27
2.2.1 - Sintetizzatore peptidico.....	27
2.2.2 - Cromatografo.....	28
2.2.3 - Apparato per elettrofilatura.....	29
2.2.4 - Microscopio elettronico a scansione.....	29
2.2.5 - Spettrofotometro UV/Vis.....	29
2.3 - METODI.....	30
2.3.1 - Sintesi e cromatografia dei peptidi auto-aggreganti.....	30
2.3.1.1 - Sintesi peptidica.....	30
2.3.1.2 - Sblocco del peptide dalla resina.....	33
2.3.1.3 - Cromatografia liquida.....	34
2.3.2 - Caratterizzazione delle matrici.....	35
2.3.2.1 - Microscopia elettronica a scansione.....	36
2.3.2.2 - Analisi statistica delle variabili.....	37
2.3.2.3 - Misura dell'angolo di contatto.....	38
2.3.2.4 - Test alla ninidrina.....	40
2.3.2.5 - Spettroscopia fotoelettronica a raggi X (XPS).....	41
2.3.2.6 - Analisi infrarossa in trasformata di Fourier (FT-IR).....	41
2.3.3 - Test statistico ANOVA.....	44
<b>CAPITOLO 3 – Parte sperimentale.....</b>	<b>45</b>
3.1 - SINTESI E CARATTERIZZAZIONE PEPTIDICA.....	45
3.1.1 - Peptide EAK.....	45
3.1.1.1 - Purificazione del peptide EAK.....	45

3.1.2 - Peptide RGD-EAK.....	48
3.1.2.1 - Sintesi del peptide RGD-EAK.....	48
3.1.2.2 - Caratterizzazione del peptide RGD-EAK.....	50
3.1.2.3 - Purificazione del peptide RGD-EAK.....	53
3.2 – ELETTRIFILATURA.....	55
3.2.1 - Messa a punto del processo.....	55
3.2.2 - Preparazione delle soluzioni.....	68
3.2.3 - Condizioni di processo.....	69
3.3 - CARATTERIZZAZIONE DELLE MATRICI.....	71
3.3.1 - Caratterizzazione morfologica al SEM o all'ESEM.....	71
3.3.2 - Analisi statistica delle variabili.....	78
3.3.3 - Angolo di contatto.....	82
3.3.4 - Test alla ninidrina.....	84
3.3.4.1 - Procedura.....	84
3.3.4.2 – Risultati e discussione.....	85
3.3.5 - Analisi XPS.....	90
3.3.6 - Analisi FT-IR.....	98
3.4 - SAGGI BIOLOGICI.....	102
3.4.1 - Coltura cellulare.....	102
3.4.2 - Semina delle cellule.....	102
3.4.3 - Test MTT.....	103
3.4.3.1 - Procedura.....	103
3.4.3.2 – Risultati e discussione.....	104

3.4.4 - Determinazione del calcio.....	110
3.4.4.1 - Procedura.....	110
3.4.4.2 - Risultati e discussione.....	112
3.4.5 - Espressione genica.....	119
3.4.5.1 - Procedura.....	119
3.4.5.2 - Risultati e discussione.....	121
3.5 – DISCUSSIONE COMPLESSIVA DEI RISULTATI.....	133
<b>CAPITOLO 4 – Conclusioni.....</b>	<b>137</b>
<b>NOMENCLATURA.....</b>	<b>139</b>
<b>RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI.....</b>	<b>143</b>
<b>RINGRAZIAMENTI.....</b>	<b>149</b>

# Capitolo 1

## Introduzione

Nell'ingegneria tessutale per la riparazione del tessuto osseo le variabili in gioco e le strategie possibili sono molteplici. Un approccio comune in letteratura riguarda l'utilizzo di strutture che imitano la matrice extra-cellulare. Le cellule dell'osso, infatti, sono "ancoraggio dipendenti" e la mancanza di un supporto impedisce loro di sopravvivere; per favorirne l'adesione e la crescita è necessario disporre di un supporto il più simile possibile a quello naturale, costituito quindi da una matrice tridimensionale fibrosa. Le matrici fibrose favoriscono oltre all'adesione, anche la proliferazione e la differenziazione delle cellule.

Dall'altro lato è importante cercare di vincolare anche dei segnali biochimici, in modo da incoraggiare ulteriormente l'interazione con le cellule; anche da questo punto di vista una struttura nanofibrosa risulta vantaggiosa grazie al suo elevato rapporto superficie-volume che permette di esporre un grande numero di segnali.

In questo capitolo si andranno a introdurre brevemente i concetti chiave per quanto riguarda i biomateriali, l'adesione cellulare e il tessuto osseo; successivamente verranno presentati i peptidi auto-aggreganti e le pubblicazioni più importanti per indicare il percorso che ha condotto alla nascita di questo lavoro di tesi.

### **1.1 - BIOMATERIALI**

I biomateriali possono essere definiti come "materiali sintetici progettati per un uso prolungato a contatto con mezzi biologici, minimizzando le eventuali reazioni avverse da parte dell'organismo". Essi nascono dall'idea di trattare il corpo umano come se fosse una macchina che si può riparare attraverso la sostituzione o riparazione dei pezzi nel caso in cui siano rotti o mal funzionanti [1]. Questo tipo di approccio a sua volta nasce dal riconoscimento dei limiti delle precedenti tecniche biomediche riguardanti la riparazione e sostituzione di organi e tessuti danneggiati. Fino a pochi anni fa, infatti, le sole soluzioni

possibili erano i trapianti (autologhi o eterologhi), le protesi artificiali, la chirurgia ricostruttiva o il trattamento farmacologico.

Tutti questi ambiti hanno compiuto enormi progressi negli anni ma sono comunque rimasti dei limiti e dei problemi:

- I trapianti eterologhi sono limitati dal basso numero di donatori disponibili, inoltre sono collegati a problemi di rigetto, patologie infettive e vanno comunque accoppiati a terapie con immunosoppressori che possono a loro volta indebolire l'organismo del paziente;
- I trapianti autologhi possono presentare problemi di infezioni, dolori cronici e necessitano inoltre di chirurgia secondaria;
- Le protesi artificiali in alcuni casi non riescono a compensare la funzionalità perduta;
- La chirurgia ricostruttiva è molto invasiva e porta in molti casi a risultati non soddisfacenti.

L'approccio dei biomateriali può risolvere alcuni di questi problemi ed è un campo in cui la ricerca è attualmente molto attiva. La loro evoluzione si può riassumere attraverso tre fasi fondamentali:

- Biomateriali di prima generazione: materiali con la caratteristica principale di essere *bioinerti*, ossia di minimizzare le interazioni chimico-fisiche tra materiale e organismo;
- Biomateriali di seconda generazione: materiali di tipo *bioattivo*, con la capacità di integrarsi velocemente con l'organismo provocando azioni e reazioni controllate, oppure *riassorbibile*, cioè in grado di essere degradati gradualmente dall'organismo senza causare rigetto o tossicità, potenzialmente sostituiti dal tessuto dell'ospite;
- Biomateriali di terza generazione: materiali che abbiano sia caratteristiche di bioattività sia di riassorbibilità.

I biomateriali di terza generazione prendono anche il nome di materiali biomimetici poiché riescono a indurre dei comportamenti nelle cellule sfruttando dei meccanismi di riconoscimento cellulare. In altre parole sono materiali con ancorate in superficie delle molecole in grado di svolgere un'attività biologica. Le molecole sulla superficie di questi materiali permettono di "dialogare" con i ricettori di membrana delle cellule e di indurre dei

comportamenti specifici [2]. Il processo con cui si legano molecole con attività biologica alla superficie di un biomateriale prende il nome di “funzionalizzazione”.

Nel corso del ventesimo secolo l’implantologia medica e i biomateriali hanno fatto dei grandi passi avanti, ma è solo negli ultimi venti anni che si sono concentrati i progressi più importanti, legati a una vera e propria rivoluzione nel modo di intendere questi materiali. Prima di allora, infatti, le protesi venivano costruite con materiali come polietilene, eventualmente associato a ceramici ricoperti di titanio, con lo scopo di ridurre il coefficiente di attrito e soprattutto aumentare al massimo l’inerzia per causare minori irritazioni possibile. Questo approccio si è dimostrato in buona parte insoddisfacente e vari studi dimostrano che non innescare alcuna reazione, positiva o negativa che sia, non è la strada giusta da percorrere. Gli studi più recenti hanno rivelato che è necessario stimolare l’organismo a reagire e riconoscere il materiale per ottenere prestazioni stabili nel lungo periodo; per questo ci si sta sempre più rivolgendo all’impiego di materiali bioattivi [3].

## **1.2 - ADESIONE CELLULARE**

Il successo di un’applicazione nell’ingegneria tessutale dipende dall’adesione e dalla proliferazione delle cellule: solo tramite questi processi è infatti possibile arrivare alla realizzazione di nuovi tessuti. L’adesione è il primo passo per poter ottenere un tessuto funzionante, anche perché è indispensabile per permettere le successive fasi di crescita, migrazione e differenziazione. Molti tipi di cellule, tra cui le cellule del tessuto osseo utilizzate in questa tesi, sono dette “ancoraggio dipendenti” perché richiedono un substrato su cui aderire per sopravvivere e formare neotessuto. L’adesione è mediata da proteine e glicosamminoglicani, in particolare le prime possono provenire dalla matrice extracellulare, è questo il caso della fibronectina, del collagene, della laminina e della vitronectina [2]. Le cellule sono quindi in grado di interagire con proteine espresse sulla superficie di altre cellule e aderire tra loro (adesione cellula-cellula) oppure possono aderire a un supporto; nei tessuti biologici tale supporto è spesso rappresentato dalla matrice extra-cellulare (extra-cellular matrix, ECM).

Le integrine svolgono un ruolo fondamentale nei meccanismi di adesione cellula-cellula e cellula-matrice; esse sono glicoproteine con funzione di recettori della membrana cellulare.

Le integrine contengono due catene distinte, chiamate subunità  $\alpha$  (alpha) e subunità  $\beta$  (beta), entrambe dotate di un dominio extra-cellulare, una zona idrofobica immersa nella membrana e una corta coda citoplasmatica. I domini citoplasmatici svolgono un importante ruolo di comunicazione tra l'ambiente esterno e il citoplasma.

Le integrine sono considerate una famiglia di proteine perché possono essere composte di differenti combinazioni di subunità  $\alpha$  e  $\beta$ , alcune di queste proteine hanno la capacità di riconoscere delle sequenze peptidiche segnale presenti in particolare nelle fibronectine della ECM.

Altre importanti proteine che svolgono un ruolo nei processi di adesione sono:

- caderine, specifiche per l'adesione cellula-cellula;
- immunoglobuline, importanti per il sistema nervoso e quello immunitario;
- selectine, la cui funzione principale riguarda l'adesione dei leucociti durante i processi infiammatori.

Alcune sequenze peptidiche sono identificabili come sequenze adesive, le quali permettono quindi l'adesione cellulare: la più studiata è probabilmente la cosiddetta sequenza RGD (Arginina-Glicina-Acido Aspartico, Arg-Gly-Asp), presente anche nella fibronectina; le integrine sono in grado di riconoscere questa sequenza e interagire con essa.

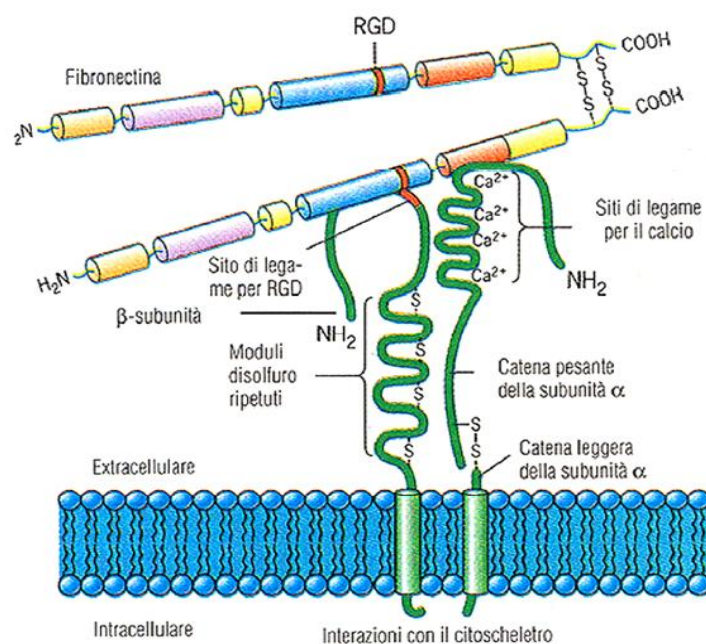


Figura 1.1 – Le integrine della membrana cellulare riconoscono la sequenza RGD nella fibronectina.



Da un punto di vista pratico, l'utilizzo delle proteine native biologicamente attive risulta piuttosto complesso, dato che sono spesso instabili, insolubili e costose; l'alternativa più usata è quella della *peptide mimicry*, ossia l'utilizzo di peptidi biomimetici contenenti le sequenze segnale della proteina originale. I vantaggi sono notevoli poiché i peptidi sono in genere composti di catene amminoacidiche molto più corte, solubili e stabili, inoltre è possibile ottenerle per sintesi.

## 1.3 - TESSUTO OSSEO

Il tessuto osseo ha la particolarità, rispetto agli altri tessuti, di essere duro, rigido e resistente. Le cellule che lo vanno a costituire sono "ancoraggio dipendenti" e quindi necessitano del supporto della matrice extra-cellulare [4].

### 1.3.1 - Matrice extra-cellulare ossea

La ECM dell'osso è formata da fibre connettivali e da sostanza amorfa. Oltre al materiale organico c'è anche una componente minerale. Le fibre connettivali sono costituite quasi integralmente da collagene di tipo I, con molti legami incrociati che mantengono unite le unità di tropo collagene.

La sostanza amorfa, avendo una composizione peculiare, è quella che distingue maggiormente l'ECM del tessuto osseo da quella degli altri tessuti connettivi; comprende proteoglicani, glicoproteine, sialoproteine e proteine contenenti acido  $\gamma$ -carbossigluttammico. I proteoglicani (proteoglycans, PGs) sono composti di glicosamminoglicani acidi, solitamente solforati. Tra i meglio conosciuti, si annoverano il proteoglicano di tipo I (PG-I) e il proteoglicano di tipo II (PG-II). Si ipotizza che il PG-II, in particolare, abbia un ruolo nell'orientare la deposizione dei cristalli minerali lungo le microfibrille di collagene. Le glicoproteine sono, di solito, fosforilate o solfatate. Esse includono diverse molecole, alcune delle quali sono coinvolte nel controllo dei processi di mineralizzazione.

Tra queste le più importanti sono:

- L'osteonectina: è la proteina più presente nel tessuto osseo e ha elevata affinità per il calcio (sia nella forma di ione libero, sia in forma associata), tanto che si ritiene

funzioni da elemento di nucleazione dei cristalli minerali e che dia luogo all'avvio della precipitazione del fosfato di calcio;

- La fosfatasi alcalina: è un enzima in grado di idrolizzare i gruppi fosfato legati a substrati organici. Si suppone che prenda parte ai processi di mineralizzazione attraverso l'apporto di ioni fosfato per la formazione di cristalli minerali e che sia coinvolta nella sintesi di matrice organica dell'osso;
- La fibronectina: è una molecola di adesione, contenente una porzione in grado di legarsi al collagene, si trova principalmente nella matrice pericellulare. Si ritiene che abbia un ruolo fondamentale nei processi di migrazione, adesione alla matrice e organizzazione delle cellule ossee;
- Le sialoproteine ossee (bone sialo-proteins, BSPs): sono proteine che contengono la sequenza RGD, la quale media l'adesione cellule-matrice, e quindi si considerano responsabili dell'adesione delle cellule alla matrice ossea. Se ne conoscono diverse: l'osteopontina (BSP-I o OPN), la BSP-II e la glicoproteina acida dell'osso. Il monitoraggio dei geni associati all'espressione delle sialoproteine è utilizzato per ottenere informazioni sulla mineralizzazione della matrice e sui livelli di interazione cellula-matrice.

Le proteine dell'osso contenenti acido  $\gamma$ -carbossigluttammico (gamma linolenic acid, GLA) sono di due tipi: osteocalcina (o proteina GLA dell'osso) e proteina GLA della matrice.

L'osteocalcina è in grado di legare lo ione calcio e può quindi renderlo indisponibile per la combinazione con lo ione fosfato - si è ipotizzato perciò che possa inibire la mineralizzazione, teoria rafforzata dal fatto che l'osteocalcina è poco presente nel tessuto in via di formazione, mentre abbonda nel tessuto osseo maturo. La proteina GLA della matrice è presente, invece, sia nell'osso maturo che in quello in via di formazione. Il suo ruolo biologico, tuttavia, non è ancora chiaro.

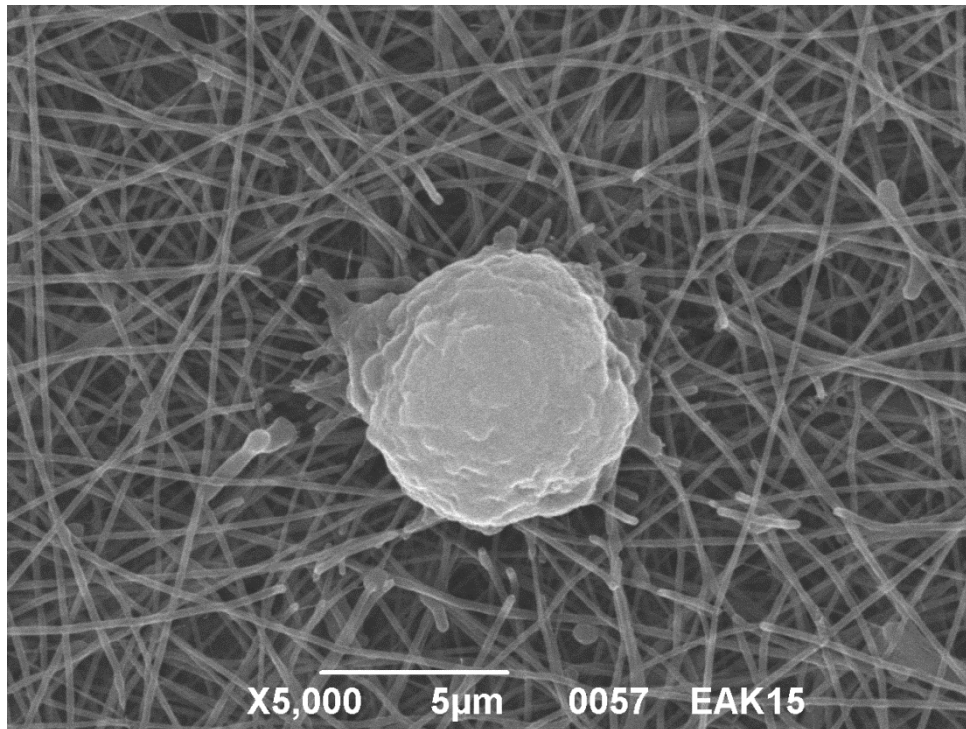
La componente minerale è costituita da cristalli di sali di calcio, (principalmente fosfato di calcio, poi carbonato di calcio e tracce di altri sali). Il fosfato di calcio è presente sotto forma di cristalli di apatite: per la maggior parte idrossiapatite ma sono anche presenti carbonatoapatite e fluoroapatite. I cristalli di apatite tendono a disporsi parallelamente alle microfibrille di collagene, di cui ricoprono la superficie e permeano le porosità. C'è continuo apporto di nuovo minerale che può depositarsi sia per formazione di nuovi cristalli, sia per

apposizione su cristalli già presenti, esso viene generato tramite specifiche molecole della matrice, prodotte dalle cellule dell'osso in un processo finemente regolato.

### 1.3.2 - Cellule del tessuto osseo

All'interno del tessuto osseo si possono riconoscere quattro tipi di cellule: le osteoprogenitrici (o preosteoblasti), gli osteoblasti, gli osteociti e gli osteoclasti. In realtà preosteoblasti, osteoblasti e osteociti sono fasi funzionali consecutive dello stesso tipo cellulare, a sua volta proveniente dalla differenziazione osteogenica di una cellula mesenchimale pluripotente dei tessuti connettivi. Se questi tipi cellulari sono autoctoni nell'osso, per contro gli osteoclasti derivano da precursori migrati nel tessuto osseo dal sangue, i preosteoclasti, differenziati da cellule staminali del midollo osseo ematopoietico. I **preosteoblasti** si collocano sulle superfici libere delle ossa e hanno capacità proliferativa; sono in grado inoltre di produrre e secernere proteine morfogenetiche dell'osso (bone morphogenetic proteins, BMPs), fattori di crescita e di differenziamento autocrini.

I preosteoblasti si trasformano in **osteoblasti** tramite differenziamento, questi ultimi sono responsabili a loro volta di processi quali la sintesi di sostanza intercellulare dell'osso e della sua mineralizzazione. Gli osteoblasti uniti tra di loro e con gli osteociti prossimali attraverso *gap junctions*, ossia interconnessioni tramite cui avviene la coordinazione dell'attività metabolica e di deposizione di matrice. Gli osteoblasti producono molecole come l'osteonectina e l'osteocalcina le quali contribuiscono alla regolazione della mineralizzazione. In particolare l'osteonectina favorisce la nucleazione dei cristalli minerali e l'osteocalcina agisce da inibitore per la precipitazione del fosfato di calcio.



*Figura 1.2 – Immagine SEM di un osteoblasto su matrice elettrofilata.*

Il processo con cui viene prodotta e mineralizzata la matrice ossea avviene con un ordine: l'osteoblasto comincia a deporre materiale osseo dal lato rivolto verso la superficie preesistente, solo successivamente ne depone in tutte le direzioni intorno a se stesso, questo separa le cellule progressivamente poiché viene interposta della matrice. Una volta finita questa fase, l'osteoblasto rallenta la propria attività metabolica e si trasforma in osteocita, contemporaneamente si differenziano altri osteoblasti a partire da cellule progenitrici.

Quando il processo di formazione di nuovo tessuto è ultimato, gli osteoblasti rimanenti cessano la loro attività, riducono gli organuli e si trasformano in una membrana di cellule appiattite dette cellule di rivestimento dell'osso, cui si attribuisce il ruolo di mediatori negli scambi tra vasi sanguigni e osteociti.

Gli osteoblasti producono e secernono anche diversi fattori solubili, tra cui il fattore di crescita trasformante  $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ , TGF-  $\beta$ ) e i fattori di crescita insulino-simili (insulin-like growth factors, IGFs).

Il TGF- $\beta$  svolge una serie di funzioni di stimolo per gli osteoblasti, è in grado di modulare la proliferazione e il differenziamento delle cellule progenitrici oltre a incrementare il metabolismo e la sintesi macromolecolare degli osteoblasti maturi. Gli IGFs sono proteine che hanno un effetto di stimolo per la crescita e il metabolismo degli osteoblasti.

Gli osteoblasti prendono parte anche al rimodellamento dell'osso sia in modo diretto, secernendo enzimi proteolitici che scindono i componenti della matrice ossea, che in modo indiretto, producendo dei fattori solubili che attivano gli osteoclasti.

Gli **osteociti** sono presenti tipicamente nell'osso maturo e sono responsabili sia del suo mantenimento che del suo rimodellamento. Il corpo dell'osteocita rimane racchiuso all'interno di una nicchia scavata nella sostanza intercellulare, detta lacuna ossea, la cui forma ricalca quella della cellula, mentre i prolungamenti sono accolti in sottili canalicoli ossei. Alle loro estremità, questi prolungamenti sono connessi, mediante *gap junctions*, con quelli degli osteociti circostanti. Ciò permette lo scambio di metaboliti e molecole-segnale tra osteociti vicini.

Nello spazio tra la membrana plasmatica delle cellule e la matrice mineralizzata rimane uno strato di tessuto osteoide che non mineralizza, tramite le lacune e i canali che lo attraversano, l'acqua e le sostanze disciolte riescono a raggiungere anche gli osteociti più distanti dai vasi sanguigni. Una volta terminato il suo ciclo vitale, l'osteocita ritrae i prolungamenti e degenera.

Gli **osteoclasti** sono cellule specificamente preposte al riassorbimento del tessuto osseo. I precursori degli osteoclasti, detti preosteoclasti, originano nel midollo osseo ematopoietico e sono imparentati con la linea differenziativa di una categoria di globuli bianchi, i monociti. I preosteoclasti si spostano all'interno del torrente circolatorio fino a quando non arrivano nei pressi della sede di riassorbimento osseo; qui possono migrare nel tessuto e si fondono per originare gli osteoclasti, in grado di dissolvere la componente minerale e di digerire enzimaticamente le componenti organiche della matrice.

Il primo passo del riassorbimento della matrice è la dissoluzione della componente minerale, processo che avviene con la formazione di una lacuna. La regolazione della funzione osteoclastica è effettuata da fattori ormonali e locali. In particolare l'inibizione del processo di riassorbimento osseo avviene per mezzo della calcitonina, un ormone che induce il distacco degli osteoclasti dall'osso e ne riduce il metabolismo.

## 1.4 - ELETTROFILATURA

L'elettrofilatura (o *electrospinning*) è stata scoperta e brevettata già negli anni '30 con il nome di filatura elettrostatica e permette di produrre filati polimerici molto fini attraverso l'applicazione di forti campi elettrici. Il suo utilizzo è però stato piuttosto ridotto per via di alcuni problemi come la resa limitata e la scarsa affidabilità e riproducibilità del processo, legata al grande numero di variabili. Nel corso degli ultimi anni, però, la messa a punto di sistemi più raffinati di controllo e soprattutto le necessità crescenti in molti ambiti hanno portato a una ripresa di questa tecnica, in grado di ottenere strutture nanometriche. Attualmente l'elettrofilatura è l'unica metodica in grado di produrre polimeri fibrosi ultrafini, con diametri sensibilmente inferiori a quelli di tutte le tecniche tradizionali e trova applicazione in numerosi settori, dal militare al biomedico [5].

Il processo consiste nell'applicare un campo elettrico molto intenso (10-40 kV) su un fluido polimerico (in genere in soluzione, ma anche fuso). La differenza di potenziale applicata porta a un aumento dell'energia elettrostatica del polimero, dovuta alla repulsione tra cariche simili; quando l'energia elettrostatica supera la tensione superficiale del polimero si forma un getto continuo diretto verso l'elettrodo opposto. Nella prima parte del getto si ha la formazione del cosiddetto *cono di Taylor*, ossia di una conformazione conica del fluido, generato quando il trasporto elettrostatico supera quello idraulico del fluido. Dopo questa zona il liquido viene accelerato e stirato dal campo elettrico e si ottengono fibre sottili. Mentre il polimero attraversa il campo elettrico si ha anche l'evaporazione del solvente che porta a un ulteriore assottigliamento delle fibre.

Prima di raggiungere il collettore, il getto diviene instabile e subisce deviazioni casuali della traiettoria la quale assume un andamento a spirale detto di *whipping motion* (movimento di "frusta"), questo porta a uno stiramento delle fibre tale da produrre filamenti di anche 100 nm, tre ordini di grandezza inferiori rispetto al diametro del getto che entra nella zona di instabilità (100  $\mu\text{m}$ ).

Il risultato è un tessuto non tessuto di fibre con orientazioni casuali depositate su un collettore (in genere metallico) scaricato a terra. Nel caso di questa tesi è stato utilizzato come collettore uno schermo statico, ma si può utilizzare anche un mandrino cilindrico messo in rotazione, in grado di avvolgere le fibre man mano che vengono raccolte per ottenere una struttura a fibre quasi parallele. Con l'*electrospinning* è possibile filare una vasta gamma di polimeri tra cui

poliammidi, polimeri polifunzionali, derivati della cellulosa, polimeri solubili in acqua, miscele polimeriche, polimeri contenenti nanoparticelle solide o piccole molecole funzionali.

Un apparato per elettrofilatura è in genere composto da:

- Una siringa contenente la soluzione polimerica da filare;
- Una pompa volumetrica su cui è montata la siringa, in modo da dosare il fluido in uscita;
- Un collettore metallico, messo a terra, montato su un supporto mobile;
- Un generatore di tensione ad alto potenziale, collegato all'ago della siringa.

Il procedimento è semplice, così come l'apparecchiatura utilizzata, tuttavia i parametri di processo sono molto numerosi e la messa a punto risulta particolarmente laboriosa. In particolare ogni coppia polimero-solvente ha bisogno di una messa a punto individuale. I parametri da cui dipende il risultato sono di due tipi diversi: parametri della soluzione (PM del polimero, tensione di vapore del solvente, conducibilità, costante dielettrica, concentrazione e viscosità) e parametri del processo (potenziale applicato, flusso, distanza ago-collettore, diametro dell'ago, temperatura e umidità, eventuale portata di flusso d'aria coassiale).

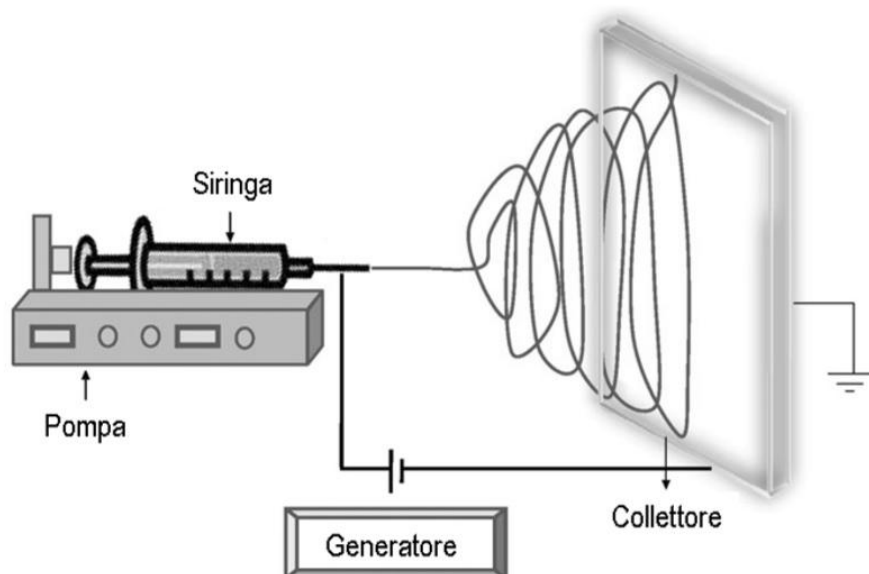


Figura 1.3 – Rappresentazione semplificata dell'apparato di elettrofilatura.

Si possono identificare dei comportamenti di massima al variare dei parametri più importanti:

- Tensione applicata: un aumento di tensione porta a una diminuzione del diametro delle fibre; si ha però un limite superiore, oltre il quale il diametro torna ad aumentare;
- Velocità di flusso: aumentando il flusso aumenta il diametro delle fibre, aumenta però anche la presenza di difetti (gocce), legati all'incompleta evaporazione del solvente;
- Distanza ago-collettore: sotto una certa distanza aumenta di molto la difettosità, aumentando la distanza aumenta il percorso delle fibre e quindi diminuisce il loro diametro, sopra un certo limite il processo smette di funzionare;
- Concentrazione del polimero: influenza la viscosità e la tensione superficiale. Esiste un limite inferiore per cui non si ha una fibra continua e uno superiore oltre il quale non si forma il getto, all'interno di questi estremi un aumento della concentrazione porta a una diminuzione della concentrazione di solvente e una diminuzione della difettosità;
- Conducibilità della soluzione: aumentando la conducibilità il diametro diminuisce, tuttavia soluzioni troppo conduttive possono dare instabilità e si ottengono diametri di fibra molto variabili;
- Volatilità del solvente: per far avvenire bene il processo è necessario utilizzare solventi volatili, al diminuire della volatilità diminuisce la densità dei pori e si possono avere fenomeni di "fusione" delle fibre, oltre alla normale difettosità;
- Umidità ambientale: è un parametro molto sensibile per il processo, se l'umidità è troppo elevata il solvente non riesce a evaporare completamente.

L'utilizzo di queste tecniche risulta particolarmente vantaggioso nell'ambito biomedico se accoppiato a un'accorta selezione dei materiali da elettrofilare: si possono infatti utilizzare materiali biodegradabili, oppure arricchiti con sequenze-segnale specifiche per promuovere la colonizzazione degli scaffold da parte delle cellule. Si possono utilizzare polimeri naturali come il collagene, il fibrinogeno, le proteine della seta, l'elastina e l'acido ialuronico [6]. Nello specifico il PCL è stato identificato come ottimo per ottenere matrici nanofibrose e degradabili, compatibili con lo scopo della rigenerazione ossea [7]. Lo svantaggio più importante di questo polimero è la sua elevata idrofobicità, problema che però ha trovato soluzioni nell'utilizzo di copolimeri con acido polilattico (PLA), nell'arricchimento con sostanze specifiche o nelle ricoperture con polimeri naturali.



## 1.5 - $\epsilon$ -POLICAPROLATTONE

L' $\epsilon$ -policaprolattone (PCL) è il polimero sintetico utilizzato in questa tesi. Si tratta di un poliesteri alifatico molto stabile termicamente e dotato di buone caratteristiche di biocompatibilità e riassorbibilità. Viene degradato in condizioni fisiologiche mediante idrolisi dei legami esterei ma questo processo risulta abbastanza lento, infatti l'utilizzo principale del PCL si trova nei dispositivi impiantabili a lunga durata.

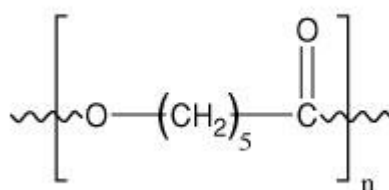


Figura 1.4 – Policaprolattone

Questo materiale ha ricevuto l'approvazione dalla Food and Drug Administration (FDA) per applicazioni nel corpo umano; si utilizza principalmente nei punti di sutura e come incapsulante per impianti a rilascio di farmaci graduale. In molti studi più recenti ha trovato applicazione anche come materiale di base *per scaffold* riassorbibili nell'ingegneria tessutale. Gli svantaggi principali sono legati alla mancanza di segnali specifici per il riconoscimento cellulare e alla scarsa idrofilicità.

## 1.6 - MATRICI NANOFIBROSE

L'utilizzo delle tecnologie più all'avanguardia permette di ottenere *scaffold* la cui dimensione delle fibre è di scala nanometrica: abbiamo diametri che possono arrivare a misurare anche meno di 100 nm. I vantaggi delle strutture nanofibrose sono numerosi, a partire dal fatto che si possono ottenere dimensioni delle fibre più simili a quelle della ECM, ma anche per la possibilità di "progettare" i materiali attraverso il loro assemblaggio a livello nanometrico, oppure per le caratteristiche chimico-fisiche che si riescono ad ottenere: i materiali di questo tipo sono in genere più resistenti, leggeri e porosi dei loro corrispettivi massivi o micrometrici, inoltre sono anche più attivi chimicamente, meno corrosivi, più conduttivi e con migliori proprietà magnetiche [8].

La caratteristica principale di queste strutture è che, al diminuire della dimensione, si ha un aumento dell'area superficiale molto marcata e, controllando questo processo si possono pilotare e migliorare molte delle proprietà del materiale; ad esempio l'aumento della superficie incrementa la zona di contatto tra materiale e ambiente biologico, influenzando anche l'interazione con le cellule e il tessuto. Bisogna anche ricordare che le componenti dei tessuti sono di scala nanometrica anch'esse e quindi è più facile farli “dialogare” con strutture del loro stesso ordine di grandezza.

## 1.7 - PEPTIDI AUTO-AGGREGANTI

L'auto-assemblaggio molecolare viene definito come la spontanea organizzazione di molecole in strutture ben definite e stabili, in condizioni di equilibrio; questo fenomeno è ubiquitario in natura e permette la formazione di macromolecole come il DNA a doppia elica, i ribosomi, il collagene, la fibroina della seta, le membrane plasmatiche. Solo di recente, tuttavia, il *self-assembly* è stato utilizzato per produrre *scaffold* per ingegneria tissutale. I peptidi auto-aggreganti o auto-assemblanti (*self assembling peptides*, SAP) sono una classe di molecole scoperta negli anni '90 da Zhang [9]. Essi hanno la caratteristica di organizzarsi in disposizioni ordinate per formare strutture bi- o tridimensionali mediante la creazione di legami non covalenti (Van der Waals, legame idrogeno e ionici, interazioni idrofobiche). Questa loro peculiarità permette di promuovere le interazioni cellulari multidimensionali e ha fatto assumere ai SAP una grande rilevanza nell'ambito dell'ingegneria tissutale.

I peptidi auto-aggreganti sono stati suddivisi in cinque tipologie [9,10]:

- 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 nanotubi peptidici e le “capsule molecolari” per il trasporto di geni e proteine;
- 5 - Tipo V: “cavità molecolari” per la biomineralizzazione.

La capacità di aggregare dei SAP si manifesta spontaneamente in soluzione fisiologica ed è originata dalla loro struttura, che deve presentare sia regioni idrofiliche sia idrofobiche. 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 II, utilizzati in questa tesi, rispondono a entrambe le esigenze essendo caratterizzati dall'alternanza di due residui a carica positiva e due residui a carica negativa. Questi peptidi tendono ad assumere in diversi solventi una struttura  $\beta$ -sheet, in cui ogni piano di  $\beta$ -sheet ha una faccia a carattere ionico con catene laterali cariche positivamente e negativamente e una faccia idrofobica. Grazie ad interazioni sia di carattere ionico sia idrofobico, i numerosi piani di  $\beta$ -sheet possono assemblarsi in strutture tridimensionali.

Il processo di auto-assemblaggio è più o meno marcato al variare di alcuni fattori, quali la sequenza peptidica, la concentrazione, il pH, il tempo, la presenza e la tipologia di sali.

I peptidi di nostro interesse sono quelli del tipo II, caratterizzati dall'alternanza tra amminoacidi idrofilici e idrofobici e da un *pattern* ionico con due residui con carica positiva, seguiti da due residui con carica negativa. Sono anche detti “molecular Lego” perché, come i mattoncini Lego, sono in grado di interagire e costruire strutture.

Il primo peptide di questo tipo ottenuto è il peptide EAK (AEAEAKAKAEAEAKAK), successivamente ne sono stati ottenuti altri, sostituendo o aggiungendo dei residui, per verificare il mantenimento della conformazione in  $\beta$ -sheet [11]. Le modificazioni non hanno comunque previsto la modifica del *pattern* di base, ossia dell'alternanza di residui polari e non polari e della periodicità dei residui carichi.

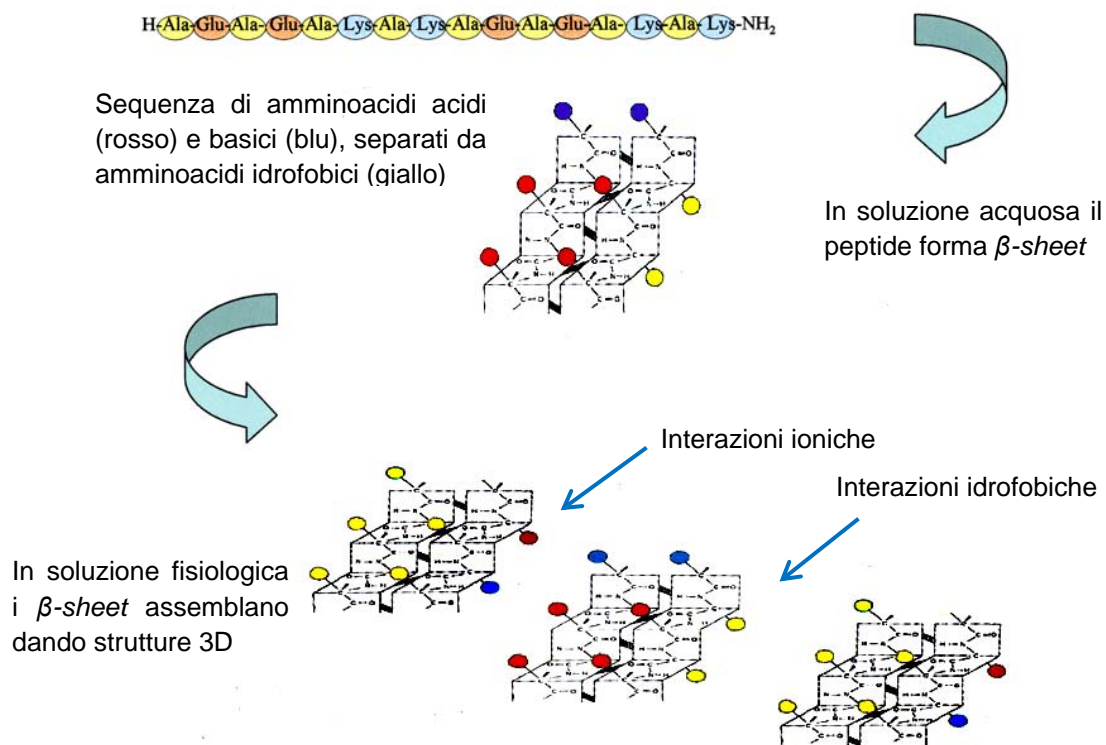


Figura 1.5 – Modello proposto per l'assemblaggio dei peptidi auto-aggreganti. Il peptide rappresentato ha l'andamento tipico dell'EAK, con gruppi positivi e negativi alternati a coppie.

Si è provato ad esempio a sostituire i gruppi idrofobici (come per la sostituzione di Ala con Abu nel caso di EAbuK o di Ala in Tyr in EYK), oppure ad aggiungere una sequenza amminoacidica (addizione in N-terminale della sequenza RGD per il peptide RGD-EAK), o ancora si è verificata l'influenza della lunghezza della catena laterale (Glu sostituito con Asp in DAK). Si è così scoperto che la sostituzione Ala $\rightarrow$ Tyr porta ancora a un SAP ma con struttura  $\beta$ -hairpin, il DAK invece tende a strutture del tipo  $\alpha$ -elica, infine i peptidi utilizzati in questa tesi, ossia RGD-EAK e EAbuK, mantengono la struttura dell'EAK e auto-aggregano in strutture  $\beta$ -sheet in soluzione salina.

## 1.8 - FUNZIONALIZZAZIONE DEI BIOMATERIALI

Una strategia vantaggiosa per migliorare le prestazioni di un biomateriale è quella di ricorrere alla funzionalizzazione biochimica, ossia di legare delle molecole organiche alla superficie del materiale, permettendogli così di interfacciarsi in modo migliore con le cellule

dell'ambiente biologico. Per ottenere questo effetto si usano ad esempio sequenze adesive o fattori di crescita, che possono essere veicolate alla superficie in tre modi principali [2, 12]:

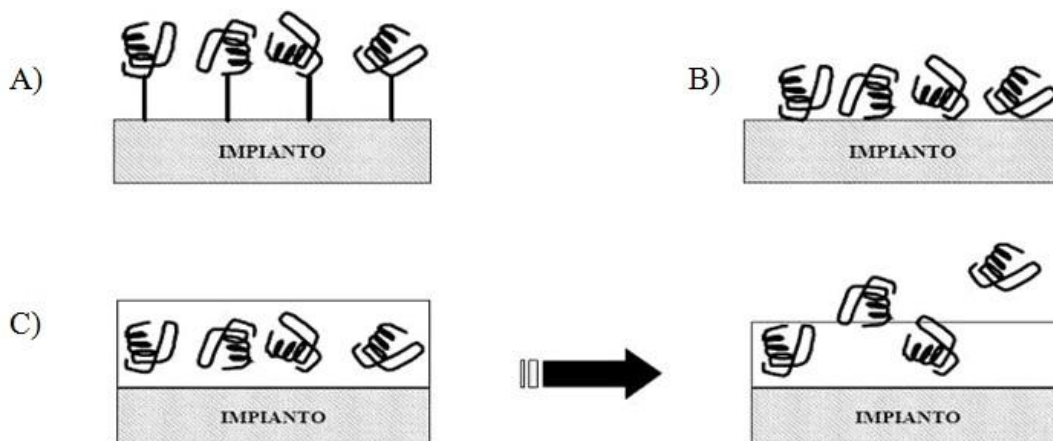


Figura 1.6 – Differenti tipologie di funzionalizzazione: covalente con spacer (A), per adsorbimento (B) e tramite carrier (C).

1. Per adsorbimento superficiale, sfruttando interazioni di tipo chimico-fisico tra le molecole e il materiale;
2. Con l'utilizzo di un *carrier* riassorbibile in cui vengono imprigionate le molecole, questo materiale *carrier* è in genere un polimero con cui viene rivestita la superficie del materiale, questa soluzione permette di rilasciare le molecole nel tempo e risulta molto funzionale per impianti a rilascio controllato di farmaci;
3. Attraverso un legame di tipo covalente, suddiviso a sua volta in due ulteriori metodi, a seconda che si utilizzi o meno uno *spacer* per distanziare la molecola dalla superficie e donargli maggiore libertà di orientazione.

Recentemente si è riusciti a ottenere un controllo ancora superiore sull'orientazione delle molecole per mezzo di tecniche come la funzionalizzazione covalente specifica. Questa strategia permette di legare le biomolecole alla superficie utilizzando uno specifico gruppo funzionale, ottenendo un ancoraggio e un'orientazione omogenei. In assenza di questi accorgimenti, infatti, le nostre molecole funzionali (in particolare i peptidi) tendono ad avere orientazioni casuali e non uniformi, correndo così il rischio di non esporre il sito di legame di nostro interesse o quantomeno di ottenere risultati meno ripetibili.

## 1.9 - INGEGNERIA DEL TESSUTO OSSEO: STATO DELL'ARTE

Attraverso l'ingegnerizzazione del tessuto osseo si cerca di ottenere un materiale con una struttura tridimensionale in grado di aiutare la riparazione dei tessuti ossei. Per ottenere questo risultato è necessario che il supporto funzioni da sostituto della ECM e permetta, o meglio ancora favorisca, l'adesione e la proliferazione cellulare. Nel seguito di questo capitolo si presentano gli studi più significativi in questo ambito, con una particolare attenzione per i materiali elettrofilati e per quelli che impiegano peptidi auto-assemblanti.

### 1.9.1- Matrici elettrofilate

Le matrici elettrofilate possono essere distinte in tre categorie a seconda della loro composizione in polimeri degradabili, materiali inorganici bioattivi e forme miste. Storicamente i polimeri sono stati i primi a essere utilizzati per questo scopo dato che offrono un certo numero di vantaggi:

- hanno una composizione chimica uniforme;
- le caratteristiche meccaniche e chimiche possono essere progettate e modificate col processo;
- sono facilmente reperibili.

Dall'altro lato molti polimeri sintetici non sono biodegradabili e questo ha ristretto di molto le scelte del materiale di base. In pratica gli unici polimeri sintetici che si trovano in letteratura sono poli- $\epsilon$ -caprolattone (PCL), acido polilattico (PLA), acido poliglicolico (PGA) e i loro copolimeri. Siccome questi tre materiali hanno differenti cinetiche di degradazione, è possibile dosare le loro quantità reciproche nei copolimeri per ottenere le caratteristiche di riassorbimento volute.

I primi lavori prodotti in quest'ambito si sono concentrati sulla verifica della dipendenza tra la struttura fibrosa e la crescita cellulare. Uno studio di Badami et al. [13] confronta degli *scaffold* elettrofilati di PLA con dei supporti lisci in polistirene seminandoli con cellule osteoprogenitrici di topo (MC3T3-E1); si è riusciti a dimostrare che la topografia del supporto

risulta determinante sia per la morfologia che per la proliferazione delle cellule. Uno studio simile [14] utilizza poli-idrossibutirrato e poli-idrossibutirrato-co-idrossivalerianato (PHB e PHBV, anch'essi polimeri degradabili) seminati con osteoblasti umani e mostra un migliore mantenimento del fenotipo cellulare rispetto a film omologhi. In un altro studio Yoshimoto et al. [7] hanno valutato il processo di *elettrospinning* per produrre scaffold di PCL e PLGA (un copolimero polilattico-poliglicolico) su cui sono state seminate delle cellule di midollo osseo di ratto (rBMSC) e hanno osservato che dopo quattro settimane la matrice di PCL aveva indotto la formazione di collagene di tipo I e di minerali di fosfato di calcio, mentre la matrice in PGLA aveva subito una significativa perdita di proprietà. Studi più recenti [15] hanno variato diametro e orientazione delle fibre per verificare le condizioni più favorevoli per la proliferazione di fibroblasti di topo e hanno scoperto che ci sono delle condizioni limite di diametro e angolo di disorientazione entro le quali le cellule riescono a proliferare indipendentemente dalla topografia.

Al processo di elettrofilatura semplice sono stati affiancati processi come il *core-shell* electrospinning, con cui è possibile filare delle nanofibre con una struttura composta di un'anima interna ricoperta di un guscio esterno. Nello studio di Nam et al. [16] sono stati messi a confronto un materiale elettrofilato di PCL e un materiale composto da un guscio esterno di PCL sopra un'anima di polietersolfoni (PES) coltivati con differenti cellule. Il vantaggio maggiore è stato quello di poter controllare il modulo elastico del materiale composito variando lo spessore reciproco degli strati. Si è osservato che le cellule embrionali mesenchimali di topo (C3H10T1/2) si differenziano in condrociti nel caso degli *scaffold* meno rigidi, mentre sugli *scaffold* a maggior rigidità si differenziano in senso osteogenico.

Una volta appurata la possibilità di progettare la struttura di un materiale per farla assomigliare alla matrice extra-cellulare naturale, e aver preso atto dei vantaggi che può portare ci si è concentrati sulla ricerca di materiali più adatti alla crescita cellulare. I polimeri sintetici sono spesso contraddistinti da una bassa idrofilicità, il che può rivelarsi un problema per l'adesione e la proliferazione cellulare. Si è quindi pensato di sostituire o accoppiare i polimeri sintetici con polimeri naturali, migliorando contemporaneamente l'idrofilicità e la biocompatibilità dei materiali composti, anche chiamati, per via della loro natura, materiali biosintetici.

In Zhang et al. [17] il PCL è stato mescolato alla gelatina per favorire l'infiltrazione di cellule BMSC rispetto al solo polimero; anche in Kim et al. [18] si è addizionata la gelatina, in questo

caso al PLA in varie proporzioni, e si è riscontrato un aumento della vitalità degli osteoblasti rispetto a uno *scaffold* elettrofilato in solo PLA. In alcuni studi si è arrivati anche a elettrofilare alcuni polimeri naturali senza il supporto dei materiali sintetici. Sono stati usati materiali come il collagene di tipo I, ottimo per strutture simili all'ECM dato che ne è il componente naturale principale, pare però che si corra il rischio, usando i solventi organici necessari per la solubilizzazione del collagene, di perdere la struttura in tripla elica del tropo collagene, come esposto in [19]. Nello stesso studio si propone di usare invece il collagene come *coating* su *scaffold* in polimeri sintetici.

In uno studio di Jin et al. [20] si è scelto di utilizzare la fibroina della seta come substrato, dimostrando l'incremento di adesione e crescita delle cellule staminali del midollo osseo umano (hBMSC) seminate. La fase di elettrofilatura è stata però realizzata con l'ausilio del polietilenoossido (PEO) in soluzione con la fibroina. Questo è stato necessario per ottenere una soluzione sufficientemente viscosa e il PEO è stato successivamente fatto sciogliere per ottenere una matrice di sola fibroina. Al diminuire della quantità di PEO si osserva un aumento della proliferazione, questo conferma il gradimento cellulare per questo tipo di *scaffold*.

Si è visto come i polimeri, sia sintetici sia naturali, possano incentivare la crescita di cellule del tessuto osseo e le loro progenitrici; per provare a ottenere una maggior differenziazione si è pensato, però, di utilizzare materiali inorganici bioattivi. Il vantaggio dovrebbe essere quello di favorire la componente inorganica tipica della matrice ossea. Sono stati effettuati, nel tempo, molti tentativi con fosfato di calcio, vetri e ceramiche bioattive, anche se nelle applicazioni per ingegneria tessutale sono comunemente accoppiati a polimeri come il polivinilalcol (PVA) o il PEO, in grado di conferire le caratteristiche di viscoelasticità necessarie per la filatura della soluzione. Ad esempio nel lavoro di Kim et al. [21] sono state prodotte nanofibre di un vetro sol-gel a base di silice e PCL e sono state confrontate con dei controlli in vetro bioattivo sinterizzato e nanofibre di solo PCL; si può notare come le nanofibre di biovetro inducano la formazione di apatite simile a quella dell'osso, inoltre la matrice testata porta a una maggiore adesione e differenziazione delle cellule rBMSC.

L'approccio più studiato è tuttavia quello di utilizzare nanofibre di idrossiepatite (HA) [22] [23] [24], fluidrossiepatite [22] e silice [25]; tutte queste matrici, in particolare la silice, contribuiscono ad incrementare la proliferazione di osteoblasti (MG63). Lo svantaggio dei



materiali inorganici tal quali risiede nella loro intrinseca fragilità, e il fatto che necessitino di trattamenti termici successivi ne impedisce l'utilizzo per il rilascio di farmaci.

Unendo la fase organica e quella inorganica si può però ovviare ai problemi di ciascuna fase: la matrice polimerica fibrosa permette, infatti, di ridurre la fragilità, aumentare la flessibilità ed evitare trattamenti termici, mentre l'additivazione con la fase inorganica migliora la biocompatibilità e favorisce sia la differenziazione osteogenica che la calcificazione della matrice. Un altro fatto importante è che un composito polimero elettrofilato + fase inorganica (in particolare collagene + nanocristalli di HA) è molto simile alla composizione originaria della matrice ossea.

Si può anche pensare di integrare nel materiale elettrofilato dei segnali biologici, strategia molto promettente. In [26], la BMP-2 viene incorporata direttamente nella soluzione da elettrofilare, composta di seta e PEO, i risultati dimostrano che lo *scaffold* ottenuto è in grado di favorire la differenziazione di cellule staminali mesenchimali umane (hMSC).

## 1.9.2 - Utilizzo dei peptidi auto-aggreganti

I peptidi auto-aggreganti hanno trovato applicazione in numerosi campi clinici, per la crescita dei neuriti e la formazione di sinapsi [27] [28], come promotori di nanofibre per microambienti intramiocardici per cellule endoteliali [29], come scaffold per lo sviluppo e la riparazione di cartilagine [30] e anche come materiali sostitutivi del tessuto osseo.

L'utilizzo nel campo della rigenerazione ossea è stato dimostrato sia tramite saggi *in vitro* sia *in vivo*. I SAP svolgono un ruolo alternativo nella costruzione di biomateriali per la crescita e la differenziazione di cellule e tessuti e sono in grado di produrre dei veri e propri *scaffold* con struttura tridimensionale. In [31] e [32] si confrontano matrici di PuraMatrix<sup>TM</sup> (ovvero il peptide RAD16-I) con strutture 2D e 3D seminate con fibroblasti embrionali primari di topo (MEF). In entrambi gli studi si è constatato che la struttura tridimensionale fornisce dei risultati migliori sia per quanto riguarda la mineralizzazione della matrice e la sintesi del collagene, sia per quanto riguarda l'attività della fosfatasi alcalina. Ne è stato dedotto non solo che la struttura tridimensionale fosse vantaggiosa, ma anche che la presenza del peptide, e in particolare della sequenza RAD, grazie alla sua somiglianza con il motivo RGD, potesse avere un'influenza positiva sulle cellule. Sullo stimolo di questa intuizione Hosseinkhanian et

al. [33] hanno realizzato delle strutture a partire da un peptide anfifilico contenente la sequenza RGD; l'utilizzo di questo peptide aumenta sia l'omogeneità di distribuzione delle cellule che la formazione dell'osso.

Partendo dallo stesso principio, Zhang et al. [34] hanno progettato il peptide RGDA16, contenente due sequenze RGD, modificando il peptide RADA16. Lo studio si basa sulla costruzione e l'analisi di uno *scaffold* composto di entrambi questi peptidi, seminato con cellule MC3T3-E1. Rispetto al riferimento costituito di solo RADA16 si sono registrati aumenti di adesione e proliferazione.

Oltre alla sequenza adesiva RGD sono state analizzate altre sequenze funzionali: la sequenza DGR, che media l'adesione dell'osteopontina, e ALK, che regola la crescita osteogenica, sono state utilizzate entrambe nello studio [35]; il risultato di questi due segnali accoppiati è stata una marcata rigenerazione ossea, legata alla differenziazione osteogenica delle cellule MC3T3-E1.

Per quanto riguarda il RAD16-I è stato testato anche *in vivo* da Misawa et al. [36], che hanno iniettato un composto commerciale a base di RAD16-I detto PuraMatrix<sup>TM</sup> in piccoli difetti ossei nel cranio di topi. Il controllo è stato eseguito utilizzando Matrigel<sup>TM</sup>, un materiale molto sfruttato, a base di laminina, collagene e fattori di crescita dell'epidermide (EGF) e derivati dalle piastrine (PDGF). Il PuraMatrix<sup>TM</sup> ha ottenuto dei risultati migliori nei test di adesione e anche l'osso rigenerato ha mostrato migliori caratteristiche meccaniche.

Lo scopo dei motivi di funzionalizzazione è quello di condizionare le cellule ad agire in un certo modo, si è quindi pensato di poter sfruttare questo *signaling* molecolare per indurre anche il processo di mineralizzazione. Hartgerink et al. [37] hanno, infatti, sintetizzato un peptide anfifilico auto-assemblante che in soluzioni acquose si struttura in nanofibre e che promuove la nucleazione di cristalli di HA, oltre che l'adesione cellulare. Il biomateriale ottenuto imita il processo naturale di mineralizzazione, in cui i cristalli di HA sono orientati parallelamente alla direzione delle fibre. Anche nel lavoro [38] si sono fatti esperimenti in questa direzione, sintetizzando un peptide che presenta una sequenza caratteristica delle sialoproteine dell'osso. La matrice finale mostra un'elevata affinità per gli ioni calcio e favorisce la mineralizzazione. La sperimentazione è stata condotta anche *in vivo* per la riparazione di piccoli difetti nel femore di topo: dopo quattro settimane dall'impianto è stata riscontrata una maggiore formazione di osso rispetto alle cavie trattate con matrice ossea allogenica, utilizzate come controllo.

### 1.9.3 - Matrici ibride elettrofilate

Si è visto come sia la struttura ottenuta con il processo di elettrofilatura che il *signaling* molecolare derivante dai peptidi possano portare a dei sostanziali vantaggi nell'applicazione di un materiale per la riparazione ossea; la frontiera più recente in questo ambito è la combinazione di queste due strategie, in altre parole la realizzazione di *scaffold* elettrofilati arricchiti con peptidi auto-aggreganti.

In un lavoro del 2012 il gruppo di ricerca di Zhu et al. [39] ha realizzato uno *scaffold* in modalità core-shell in polietilenglicole e policaprolattone (PEG/PCL) in cui il PEG è stato arricchito con rhBMP-2. Mentre il PCL funziona da sostegno e struttura, il PEG permette il rilascio graduale di proteine dell'osso. Il confronto con lo stesso materiale non arricchito ha rivelato *in vitro* una migliore differenziazione cellulare e *in vivo* una maggiore e più rapida formazione di osso.

In un altro recente lavoro, Tambralli et al. [40] suggeriscono l'idea di realizzare una matrice di PCL elettrofilato e ricoprirlo con un SAP sintetizzato da loro. Questo approccio offre il vantaggio di mantenere la struttura tipica delle matrici elettrofilate e di funzionalizzare il materiale con sequenze adesive. L'esperimento è stato svolto con cellule hMSC e si è osservato il mantenimento del fenotipo differenziato.

Un ulteriore passo avanti è stato fatto nel lavoro di Danesin et al. [41]: i SAP sono stati sciolti direttamente nella soluzione da elettrofilare assieme al PCL, evitando così il successivo processo di funzionalizzazione per ricopertura. In questo studio si mostra come la presenza dei peptidi migliori i parametri superficiali come la bagnabilità e favorisca l'adesione e la produzione di calcio di osteoblasti umani, incrementando anche l'espressione genica delle proteine prese in esame (sialoproteina dell'osso, osteopontina e fosfatasi alcalina) rispetto a uno scaffold in solo PCL. L'analisi viene effettuata includendo diversi tipi di peptidi (EAK, DAK, EAbuK, EYK, RGD-EAK e RGD-EAKsc, in cui l'ultimo funziona da controllo, non essendo auto-assemblante) alla stessa concentrazione (5%). Si è potuto osservare l'efficienza di ogni singolo peptide nel migliorare adesione e proliferazione, in particolare si è notato che il peptide non auto-assemblante ha dato dei risultati peggiori rispetto a tutti i SAP e che l'RGD-EAK, contenente la sequenza adesiva RGD, ha dato risultati leggermente migliori degli altri, in particolare nell'adesione dove ottiene un miglioramento di circa il 90% rispetto allo *scaffold* in solo polimero.

## 1.10 - SCOPO DELLA TESI

Questo lavoro di tesi nasce come prosecuzione di un percorso di ricerca sulla messa a punto di matrici ibride elettrofilate per applicazioni biomedicali, in particolare si fa riferimento all'ambito della riparazione e rigenerazione del tessuto osseo. Queste matrici sono in grado di combinare i vantaggi offerti dalla struttura nanofibrosa, ottenuta con l'*electrospinning*, con le proprietà ottenute con l'utilizzo dei peptidi auto-assemblanti, anche in termini di gradimento cellulare. Gli studi precedenti hanno mostrato risultati incoraggianti ma sono stati svolti con l'utilizzo di un rapporto fisso peptide/totale del 5%.

In questa tesi si prende in considerazione l'effetto della variazione della percentuale di peptide negli *scaffold* elettrofilati per la riparazione di tessuto osseo. Si intende quindi analizzare l'influenza di questa variabile sul processo di produzione dello *scaffold* e, successivamente, sul suo gradimento cellulare.

Per la realizzazione di questo studio sono state prodotte diciassette differenti matrici, una composta di solo PCL e quattro per ognuno dei quattro peptidi presi in esame (RGD-EAK, EAbuK, EAK e GE3-M, dove quest'ultimo è stato selezionato come controllo, non essendo auto-assemblante), con concentrazione di peptide variabile nei rapporti di 2,5%, 5%, 10% e 15% in peso rispetto al totale.

Il lavoro di tesi può essere così riassunto:

- Sintesi e caratterizzazione dei peptidi auto-aggreganti utilizzati per gli *scaffold*;
- Preparazione delle soluzioni di polimero e peptidi;
- Produzione delle matrici elettrofilate. Questa fase verrà preceduta dalla valutazione dei parametri di processo per ottenere delle matrici più omogenee e meno difettose possibili;
- Caratterizzazione delle matrici da un punto di vista morfologico. Valutazione di caratteristiche superficiali, quali la bagnabilità e l'esposizione superficiale di gruppi amminici sulle fibre;
- Caratterizzazione biologica degli scaffold: test *in vitro* di adesione e differenziamento di osteoblasti umani.

# Capitolo 2

## Materiali, Strumenti e Metodi

In questo capitolo inizialmente verranno presentati i reagenti e gli strumenti utilizzati, successivamente verrà data una breve presentazione delle metodologie di laboratorio.

### 2.1 - MATERIALI

#### 2.1.1 - Reagenti

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

- HBTU;
- HOBt.

Reagenti forniti da Biosolve (Valkenswaard, Olanda):

- NMP;
- Piperidina;
- TFA;
- DIPEA;
- DCM.

Reagenti forniti da Avantor Performance Materials (Center Valley, PA, U.S.A.):

- Metanolo;
- Etanolo.

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

- Acetonitrile;
- Acetone;
- DMF;
- Isopropanolo;

- PCL;
- TES.

Reagenti forniti da Applied Biosystems (Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA):

- Ninidrina.

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

- tutti gli amminoacidi protetti usati per la sintesi peptidica su fase solida;
- resine Rink-Amide MBHA.

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

- Dietil-etero.

Reagenti forniti da Alfa Aesar (Ward Hill, MA, USA):

- HFIP.

## 2.1.2 - Peptidi sintetici utilizzati

Peptidi utilizzati per la realizzazione delle matrici:

**GE3-M** (PM: 1333.8 Da)

Sequenza:

H-Ile-His-Ile-Gly-Pro-Gly-Arg-Ala-Phe-Tyr-Thr-Thr-OH

Presente in laboratorio, ottenuto per sintesi chimica su fase solida e purificato in precedenza.

**RGD-EAK** (PM: 1943.16 Da)

Sequenza:

H-Arg-Gly-Asp-Ala-Glu-Ala-Glu-Ala-Lys-Ala-Lys-Ala-Glu-Ala-Glu-Ala-Lys-Ala-Lys-NH<sub>2</sub>

Sintetizzato, purificato e caratterizzato nel corso della tesi.

**EAbuK**

(PM: 1728.012 Da)

Sequenza:

H-Abu-Glu-Abu-Glu-Abu-Lys-Abu-Lys-Abu-Glu-Abu-Glu-Abu-Lys-Abu-Lys-NH<sub>2</sub>

Presente in laboratorio, ottenuto per sintesi chimica su fase solida e purificato in precedenza.

**EAK 16-II**

(PM: 1614.83 Da)

Sequenza:

H-Ala-Glu-Ala-Glu-Ala-Lys-Ala-Lys-Ala-Glu-Ala-Glu-Ala-Lys-Ala-Lys-NH<sub>2</sub>

Presente in laboratorio come frazione da ripassare, è stato purificato e caratterizzato durante la tesi.

## **2.2 - STRUMENTI**

### **2.2.1 - Sintetizzatore peptidico**

Per la sintesi peptidica è stato utilizzato un sintetizzatore automatico prodotto dalla MultiSynTech (Witten, Germania) modello Syro I.

Sono stati inoltre utilizzati per le fasi di sblocco: un evaporatore rotante Rotavapor (Laborota 4100-Efficient, Heidolph Instruments, Milano, Italia), ed un liofilizzatore (Lioph. Lock 4.5, Labconco, Kansas City, MO, USA).



Figura 2.1 – Sintetizzatore Syro I (MultiSynTech)

## 2.2.2 - Cromatografo

La caratterizzazione cromatografica è avvenuta mediante l'uso di differenti sistemi cromatografici:

- HPLC Waters 600 Controller, accoppiato a rivelatore UV/Vis multicanale a lunghezza d'onda programmabile modello 2487. Il cromatogramma viene registrato da un registratore della Carlo Erba Strumentazione modello BD40/BD41 Recorder.
- HPLC Waters 1525 Binary Pump, munito di auto campionatore 2707 e di rivelatore UV/Vis multicanale a lunghezza d'onda programmabile modello 2498. La registrazione e l'integrazione dei cromatogrammi sono state ottenute utilizzando il programma gestionale Empower Pro (Waters, Milford, MA, USA).

Per le analisi cromatografiche sono state utilizzate diverse colonne, tutte costituite da gel di silice funzionalizzata, con catene idrocarburiche lineari di 18 atomi di carbonio:

- Delta Pak C<sub>18</sub> semipreparativa (Waters), 15  $\mu\text{m}$ , 100 Å, 7.8 × 300 mm;
- Nova Pak C<sub>18</sub> semipreparativa (Waters), 6  $\mu\text{m}$ , 60 Å, 7.8 × 300 mm;
- Symmetry Shield C<sub>8</sub> analitica (Waters), 5  $\mu\text{m}$ , 100 Å, 4.6 × 250 mm.
- Vydac Monomeric C<sub>18</sub> analitica (Grace), 5  $\mu\text{m}$ , 300 Å, 4.6 × 250 mm.



### **2.2.3 - Apparato per elettrofilatura**

L'apparato di elettrofilatura è stato ottenuto utilizzando una pompa volumetrica (New Era Pump Systems, Inc. Farmingdale, NY), su cui è stata montata una siringa da 2 mL, con un ago 27G (Terumo, Tokyo, Japan) in acciaio inox smussato; come collettore si è utilizzato un supporto piano in acciaio inox di 7×8 cm ricoperto da un foglio di alluminio; l'ago della siringa e il collettore sono stati posti a una certa differenza di potenziale tramite un generatore di alto voltaggio (Gamma High Voltage, Ormond Beach, FL).

### **2.2.4 - Microscopio elettronico a scansione**

Per l'analisi morfologica è stato utilizzato un microscopio elettronico a scansione modello JSM-6490 prodotto da Jeol (Akishima Tokyo, Japan).



*Figura 2.2 – Microscopio elettronico a scansione JSM-6490 (Jeol)*

### **2.2.5 - Spettrofotometro UV/Vis**

La misura dell'assorbanza delle varie soluzioni è stata effettuata con l'utilizzo di uno spettrofotometro UV/Vis Lambda 2, modello fornito da Perkin Elmer (Waltham, Massachusetts, USA).



Figura 2.3 – Spettrofotometro UV/ Vis Lambda 2 (Perkin Elmer)

## **2.3 - METODI**

### **2.3.1 - Sintesi e cromatografia dei peptidi auto-aggreganti**

#### **2.3.1.1 - Sintesi peptidica**

La sintesi dei peptidi può essere ottenuta legando tra loro, secondo una certa sequenza, gli amminoacidi di cui sono composti. Si tratta di condensare il gruppo carbossilico di un amminoacido con il gruppo amminico dell'amminoacido successivo. Il legame che si realizza è di un solo tipo, cioè ammidico ma la sintesi è un processo complesso poiché bisogna evitare che vadano a reagire i gruppi funzionali eventualmente presenti in catena laterale. Per fare in modo che questo non succeda, i gruppi laterali potenzialmente reattivi vanno protetti durante tutta la sintesi utilizzando dei gruppi protettori.

Esistono due modalità con cui è possibile eseguire la sintesi, in soluzione o in fase solida. La tecnica di sintesi più utilizzata nei laboratori di ricerca è la sintesi su fase solida (solid phase peptide synthesis, SPPS) che utilizza come supporto un polimero insolubile (resina), a cui si lega la catena peptidica tramite l'ultimo amminoacido della sequenza. La si preferisce in genere alla sintesi in soluzione perché:

- Si riducono notevolmente i tempi di produzione;

- Si evitano problemi di solubilità del peptide;
- Si evitano i processi di purificazione dei prodotti intermedi in quanto i reagenti in eccesso e i sottoprodotti di reazione possono essere rimossi per filtrazione e lavaggio.

L'utilizzo di questa tecnica ha reso il processo affidabile e rapido, permettendone l'automatizzazione. Con essa si possono preparare peptidi lunghi fino a 50 amminoacidi.

La tecnica adottata in questa tesi è la sintesi su fase solida SPPS ("Solid Phase Peptide Synthesis") messa a punto nel 1963 da Bruce Merrifield [42]. La tecnica adottata risulta oggi la più vantaggiosa in quanto permette di avere un peptide in soli cinque passaggi:

1. accrescimento progressivo della sequenza di amminoacidi su di una resina che ne diventa la base solida di partenza;
2. sblocco della catena amminoacidica sintetizzata dalla resina e rimozione dei gruppi protettori in catena laterale;
3. purificazione del peptide d'interesse dai possibili sottoprodotti di reazione;
4. eventuali modifiche chimiche post-sintesi attuate sul peptide;
5. caratterizzazione.

La crescita del peptide avviene a partire dall'estremità C-terminale e prosegue verso l'N-terminale, mentre il gruppo  $\alpha$ -carbossilico dell'ultimo amminoacido della sequenza è ancorato alla resina tramite un linker, in questo modo abbiamo crescita del peptide in fase eterogenea. Questo semplifica e accelera il processo permettendo di isolare il peptide tramite filtrazione.

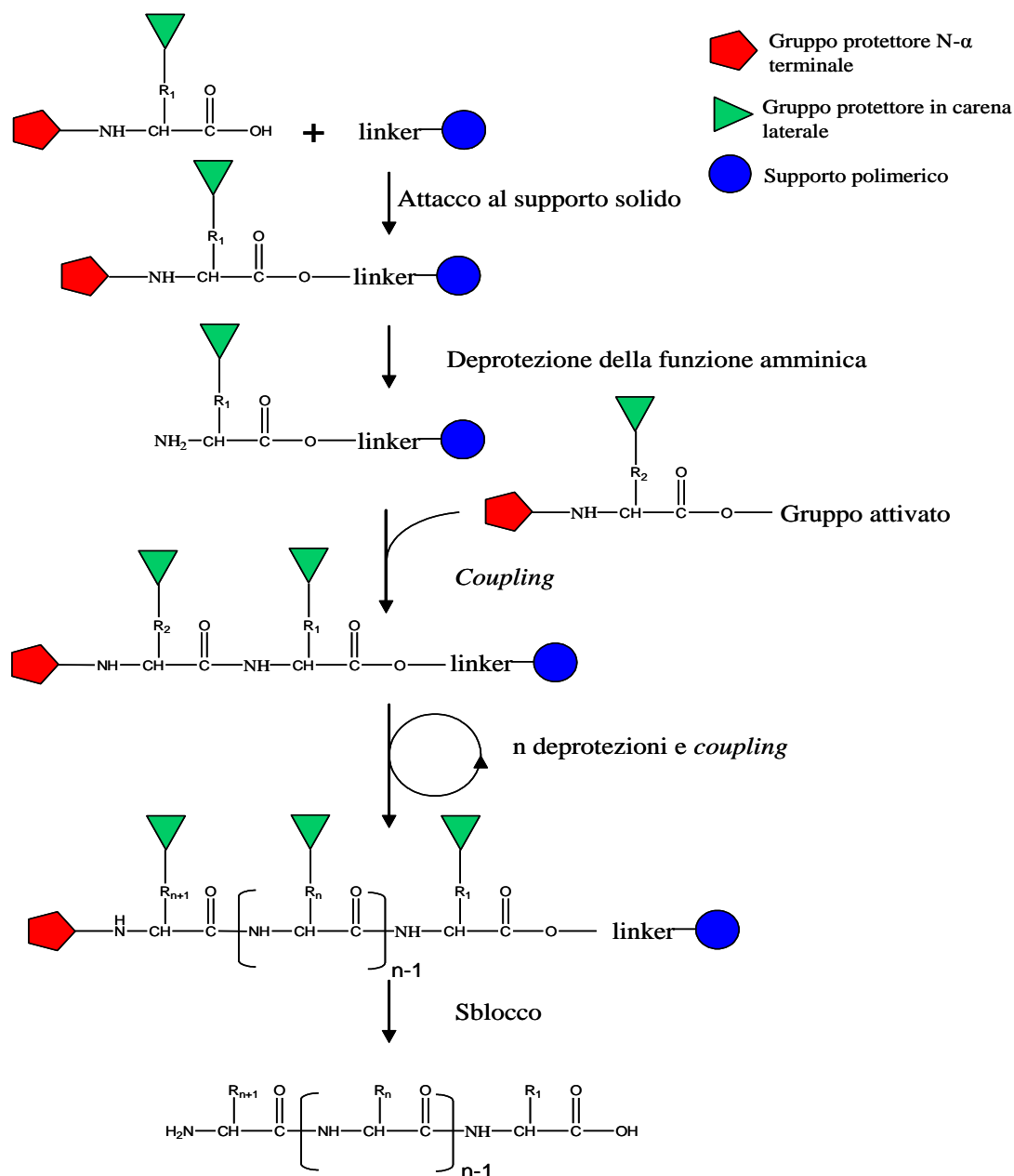


Figura 2.4 – Schema della Sintesi Peptidica su Fase Solida.

In questo lavoro di tesi si è utilizzata la resina Rink Amide MBHA (100-200 mesh) con grado di funzionalizzazione 0.7 mmoli/g.

La sintesi procede per cicli, ognuno dei quali è composto di una fase di deprotezione e una di condensazione (anche detta *coupling*): la deprotezione consiste nella rimozione del gruppo protettore  $\alpha$ -amminico del residuo amminoacidico legato al peptide in crescita; questo si ottiene grazie al trattamento con una soluzione al 40% di piperidina in DMF per 3 minuti e con una soluzione al 20% di piperidina in DMF per 12 minuti. Segue poi la reazione di condensazione

tra il gruppo  $\alpha$ -amminico e la funzione carbossilica attivata di un altro residuo, che porta alla formazione del legame peptidico. Attualmente ci sono due gruppi protettori utilizzati per il gruppo amminico, il gruppo t-Boc e il gruppo Fmoc:

- t-Boc: basato sull'utilizzo di ter-butilossicarbonil derivati, viene rimosso con acidi medio-forti, in particolare si usa acido trifluoroacetico, lo sblocco finale del peptide dalla resina si ottiene mediante il trattamento con acido fluoridrico. La chimica t-Boc è necessaria nel caso di peptidi sensibili alle basi;
- Fmoc: utilizza il gruppo 9-fluorenilmetossicarbonile per la protezione del gruppo amminico. Tale gruppo è base-labile e viene in genere rimosso con una soluzione di piperidina in DMF. Il legame tra la resina e il peptide è rimosso per trattamento con acido trifluoroacetico.

Per assicurarsi di non avere reazioni collaterali da parte dei gruppi in catena laterale, nel caso della chimica Fmoc si utilizzano protettori laterali acido-labili, rimossi generalmente con acido trifluoroacetico (TFA).

La resina deve essere scelta in base alle condizioni di reazione, al tipo di gruppi protettori utilizzati e in base al gruppo terminale del peptide che si desidera (gruppo carbossilico, gruppo ammidico, gruppo alcolico o altro).

Durante la sintesi si possono creare sottoprodotti di reazione generalmente composti di catene amminoacidiche molto simili a quelle desiderate, in quanto mancanti di uno o più residui, o troncate; questo è un limite della SPPS poiché rende più complicata la purificazione post-sintesi.

### **2.3.1.2 - Sblocco del peptide dalla resina**

Una volta terminata la sintesi si deve liberare il peptide dalla resina e dai gruppi protettori, tramite la procedura di sblocco. Bisogna però fare attenzione perché la deprotezione delle catene laterali genera specie fortemente reattive, in grado anche di generare modifiche covalenti dei residui amminoacidici. Per ridurre le reazioni collaterali si utilizzano reagenti nucleofili detti *scavenger*, simili chimicamente alle specie da proteggere. La miscela di *scavenger* varia a seconda degli amminoacidi presenti nella sequenza e in base alla tipologia di

gruppi protettori usati nelle catene laterali. La scelta della miscela di sblocco e il tempo richiesto dipendono innanzitutto dal tipo di resina impiegata, e dalla natura e dal numero dei gruppi protettori utilizzati in catena laterale.

La procedura generale di sblocco è divisa in 6 fasi:

1. Si deprotegge il gruppo amminico terminale dallo Fmoc trattando il peptide su resina con una soluzione al 20% di piperidina in DMF per 20 minuti tramite una procedura automatizzata;
2. Il reattore contenente il peptide ancorato alla resina viene lavato con diclorometano (DCM) e messo a seccare sottovuoto fino al raggiungimento di un peso costante (in genere per 2 ore);
3. Il peptide è trasferito in un pallone e trattato con una soluzione composta da 95% TFA, 2.5% H<sub>2</sub>O MilliQ e 2.5% TES [43];
4. La miscela viene mantenuta sotto blanda agitazione con l'ausilio di un agitatore magnetico per circa 90 minuti, il tutto a temperatura ambiente;
5. La resina viene separata per filtrazione su Gooch 3 e la soluzione contenente il peptide viene portata a volume ridotto mediante evaporatore rotante;
6. Si aggiunge bruscamente etere dietilico a 4°C per far precipitare il peptide, si filtra il precipitato su Gooch 4. Il precipitato viene poi seccato sotto vuoto, sciolto in H<sub>2</sub>O MilliQ e infine liofilizzato.

### **2.3.1.3 - Cromatografia liquida**

La resa del processo dovrebbe essere prossima al 100% ma il peptide ottenuto presenta sempre dei prodotti secondari, è necessario perciò purificare il peptide grezzo. Per fare ciò si utilizza la cromatografia liquida ad alta prestazione (high performance liquid chromatography, HPLC). Con il termine di cromatografia si indica un insieme di metodiche che hanno lo scopo di separare i singoli componenti di miscele complesse.

Il campione viene sciolto in una fase mobile e fatto passare attraverso una fase immiscibile, detta fase stazionaria. Alcuni elementi della miscela sono trattenuti più fortemente dalla fase stazionaria e quindi si muovono più lentamente con il flusso della fase mobile, altri viceversa sono trattenuti meno e si muovono più velocemente; questo porta a una separazione dei componenti del campione che possono essere raccolti separatamente o analizzati [44].

Nel caso dei peptidi si usa principalmente la cromatografia a fase inversa (reversed-phase chromatography, RP-HPLC), la quale permette di avere ripartizioni basate su interazioni di tipo idrofobico tra fase mobile e fase stazionaria - si usa in questo caso una fase mobile composta di soluzioni acquose e solventi organici (acetonitrile) in differenti rapporti - La soluzione in cui è stato fatto sciogliere il campione è stata introdotta in testa alla colonna cromatografica per aspirazione o per iniezione di piccolissime quantità, a seconda che il procedimento fosse rispettivamente di purificazione o caratterizzazione. Le colonne cromatografiche C18 utilizzate sono costituite da gel di silice funzionalizzata con catene idrocarburiche lineari di 18 atomi di carbonio. La cromatografia può essere eseguita in modalità isocratica o in gradiente, nel nostro caso è stata utilizzata la seconda. L'aumento graduale della percentuale di acetonitrile incrementa l'idrofobicità della fase mobile e porta a una competizione tra questa e la fase stazionaria, la conseguenza è che, a una determinata concentrazione di acetonitrile, si ha il desorbimento dell'analita.

La lettura dell'assorbanza è stata ottenuta tramite un rivelatore UV/Vis posto all'uscita della colonna cromatografica, la lunghezza d'onda  $\lambda$  è impostata a 214 nm, in corrispondenza, quindi, del picco di assorbimento del legame peptidico.

La cromatografia RP-HPLC può rispondere a due esigenze: la cromatografia semipreparativa isola l'analita dalla miscela di componenti presente nel peptide grezzo, la cromatografia analitica determina l'omogeneità delle frazioni e, abbinata alla spettrometria di massa, accerta l'identità del composto isolato. A parità di condizioni cromatografiche (peptide, gradiente e colonna) il tempo di ritenzione è, infatti, strettamente correlabile e identificativo per ogni sostanza. Inoltre l'area sottesa da ogni picco è direttamente proporzionale alla quantità di campione iniettato; questo permette di verificare il grado di purezza di ogni campione dopo purificazione. Per l'analisi dei dati ottenuti in analitica si utilizza il software Empower (Waters).

### **2.3.2 - Caratterizzazione delle matrici**

Gli *scaffold* utilizzati in questo studio sono stati ottenuti con un processo di elettrofilatura. La presenza e le diverse concentrazioni di peptide, così come le variabili del processo produttivo, modificano il materiale sotto vari aspetti, sia morfologici che chimici, prima ancora che biologici.

### 2.3.2.1 - Microscopia Elettronica a Scansione

La microscopia elettronica a scansione è un sistema di analisi morfologica elettro-ottico e si effettua con l'utilizzo dei microscopi elettronici a scansione (Scanning Electron Microscope, SEM). L'analisi si basa sull'emissione di un fascio ottico per mezzo di un filamento incandescente e sull'analisi dei segnali prodotti dall'interazione del fascio elettronico con il campione.

Le tipologie di campioni che si possono analizzare sono molto ampie, il vincolo principale è che devono essere assenti i fluidi poiché si lavora in alto vuoto. Le dimensioni dei campioni possono arrivare a circa 1 dm<sup>3</sup> e si richiede che siano conduttivi; nel caso non lo siano, si può renderli tali ricoprendoli con un sottilissimo strato di materiale conduttore, in genere oro o grafite.

Un SEM è composto da:

- una colonna elettronica, dove viene creato il fascio di elettroni;
- una camera da vuoto, dove il fascio elettronico interagisce con il campione;
- vari tipi di rivelatori, che acquisiscono i segnali dell'interazione fascio-campione e li trasferiscono agli elaboratori;
- uno schermo, in cui l'immagine viene ricostruita.

Gli elettroni sono ottenuti per effetto termoionico da un filamento in tungsteno portato ad elevata temperatura; essi vengono accelerati grazie ad un anodo posto sotto il filamento tra i 200 eV e i 30keV.

Il fascio elettronico viene fatto riconvergere e focalizzato da alcune lenti elettromagnetiche e delle fenditure poste all'interno della colonna elettronica. Una serie di bobine permette di deflettere il fascio e di fargli colpire un'area predefinita del campione. Il campione si trova nella camera, in condizioni di alto vuoto, e viene colpito dal fascio di elettroni che, interagendo con esso, perdono energia e la riemettono sotto forma di elettroni (secondari, retrodiffusi, assorbiti, trasmessi, Auger), coppie elettrone-lacuna e radiazioni (elettromagnetiche e radiazioni X). I segnali riemessi dal campione (in particolare gli elettroni secondari) vengono raccolti dai rivelatori e convertiti in un'immagine su schermo LCD, la loro intensità varia in funzione delle anisotropie morfologiche, strutturali e chimiche del campione.



La caratteristica peculiare di questo tipo di segnale è quella di essere caratterizzato fortemente dalla morfologia e questo permette di ottenere immagini in bianco e nero in cui il contrasto delle sfumature di grigio mette in risalto la tridimensionalità del campione.

### 2.3.2.2 - Analisi statistica delle variabili

Con il termine *Design of Experiment* (DoE) si intende la programmazione degli esperimenti in cui vengono fatte variare deliberatamente le variabili in ingresso in un processo in modo da poter identificare le variazioni nella risposta. Le variabili di processo vanno però distinte tra quelle controllabili  $x_i$  e quelle aleatorie  $z_i$ , dette anche rumori di fondo (come ad esempio le variabili ambientali).

L'obiettivo di questo studio è di determinare:

- le variabili che influenzano maggiormente la risposta  $y$ ;
- come aggiustare le variabili  $x_i$  più influenti al fine di avere la risposta  $y$  desiderata;
- come regolare le variabili  $x_i$  in modo da avere risposta  $y$  limitata;
- come scegliere i parametri  $x_i$  in modo da minimizzare l'effetto delle variabili  $z_i$  sulla risposta  $y$ .

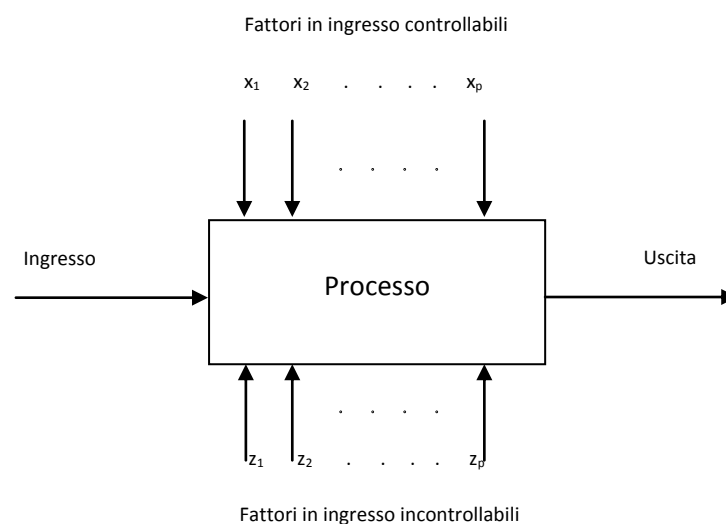


Figura 2.5 – Modello generale del processo.

Per ottenere dei risultati significativi è necessario programmare l'esperimento, ossia bisogna conoscere bene i fattori che saranno studiati, sapere come andrà condotto l'esperimento e come

utilizzare al meglio i dati ottenuti. Per una buona programmazione delle prove è conveniente seguire il seguente criterio:

- Riconoscimento ed enunciazione del problema;
- Scelta dei fattori da analizzare e dei loro livelli;
- Selezione della variabile di risposta, la quale deve fornire informazioni utili sullo studio del processo;
- Scelta del piano sperimentale, la quale comporta il numero di replicazioni previste e l'ordine delle prove;
- Esecuzione dell'esperimento, in cui deve essere monitorato accuratamente il processo per assicurarsi che tutto sia eseguito nel modo previsto;
- Analisi dei dati, la quale coinvolge metodi statistici, in modo che risultati e conclusioni siano obiettivi e non basati solo su un'opinione;
- Conclusioni e raccomandazioni, in cui devono essere presenti considerazioni pratiche una volta svolte le prove e raccomandazioni sulle linee d'azione.

Il metodo di programmazione degli esperimenti è stato utilizzato nello sviluppo e nella messa a punto del processo al fine di migliorarne le prestazioni e di renderlo più stabile rispetto alle sorgenti esterne di variabilità. Successivamente questi modelli sono stati alla base anche dell'analisi delle variabili finali per determinare l'andamento del diametro medio delle fibre dei campioni.

### **2.3.2.3 - Misura dell'angolo di contatto**

La misura dell'angolo di contatto è un metodo sperimentale per stimare la capacità di un liquido di distribuirsi su una superficie. Può essere utilizzato per misurare la bagnabilità (ad esempio, per le applicazioni biomediche, si può utilizzare l'acqua quale solvente più importante), l'energia superficiale o l'omogeneità delle superfici. Il metodo consiste nella misura dell'angolo tra la superficie e la tangente al profilo della goccia di liquido depositato sul campione. Nel caso della bagnabilità si pone una goccia d'acqua sul campione e questa tende o meno ad allargarsi a seconda del grado di bagnabilità; in particolare la goccia si allarga di più

se la superficie è molto bagnabile, mentre tende ad assumere una forma sferica se la superficie non è bagnabile.



Figura 2.6 - Misura dell'angolo di contatto per una superficie idrofobica e una idrofilica.

Si possono riconoscere tre diverse situazioni:

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

Per le applicazioni di tipo biomedico è più favorevole la situazione in cui i campioni hanno un elevato valore di bagnabilità e dunque bassi angoli di contatto, in modo da favorire l'interazione con le cellule.

Lo strumento che misura l'angolo di contatto consiste di tre elementi:

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

La bagnabilità è stata misurata mediante misura dell'angolo di contatto in *sessile drop* con uno strumento OCA30 (Dataphysics, Filderstadt, Germany) a  $25^\circ\text{C}$ . Una serie di gocce di acqua ultrapura è stata depositata sullo scaffold preventivamente fissato su un vetrino da microscopio. Sono state effettuate almeno tre misure per campione.

### 2.3.2.4 - Test alla ninidrina

Il test alla ninidrina è un test quantitativo che permette di determinare la presenza di gruppi amminici liberi. La reazione della ninidrina con i gruppi reattivi porta alla colorazione dei campioni che, una volta sciolti, possono essere analizzati con uno spettrofotometro UV. Il valore di assorbimento misurato è proporzionale al numero di gruppi reattivi esposti sulla superficie del materiale e, quindi, alla quantità di peptide sulla superficie delle nanofibre [45].

Il reagente alla base del processo è la ninidrina (2,2-diidrossi-1,3-diossoidrindene), in grado di identificare le ammine primarie e secondarie. La reazione porta a un colore blu scuro o a un viola noto con il nome di “viola di Ruhemann” nel caso delle ammine primarie, mentre quelle secondarie si arriva a un colore giallo-arancio.

L'utilizzo di questo test permette di identificare e quantificare la presenza dei gruppi amminici presenti sui peptidi. Nel caso di matrici composte di nanofibre arricchite è possibile correlare l'assorbanza misurata con il numero di gruppi reattivi esposti sulla superficie delle fibre e verificare così se all'aumentare della concentrazione di arricchimento si verifica anche un aumento della quantità di peptide in grado di interfacciarsi con il sistema biologico.

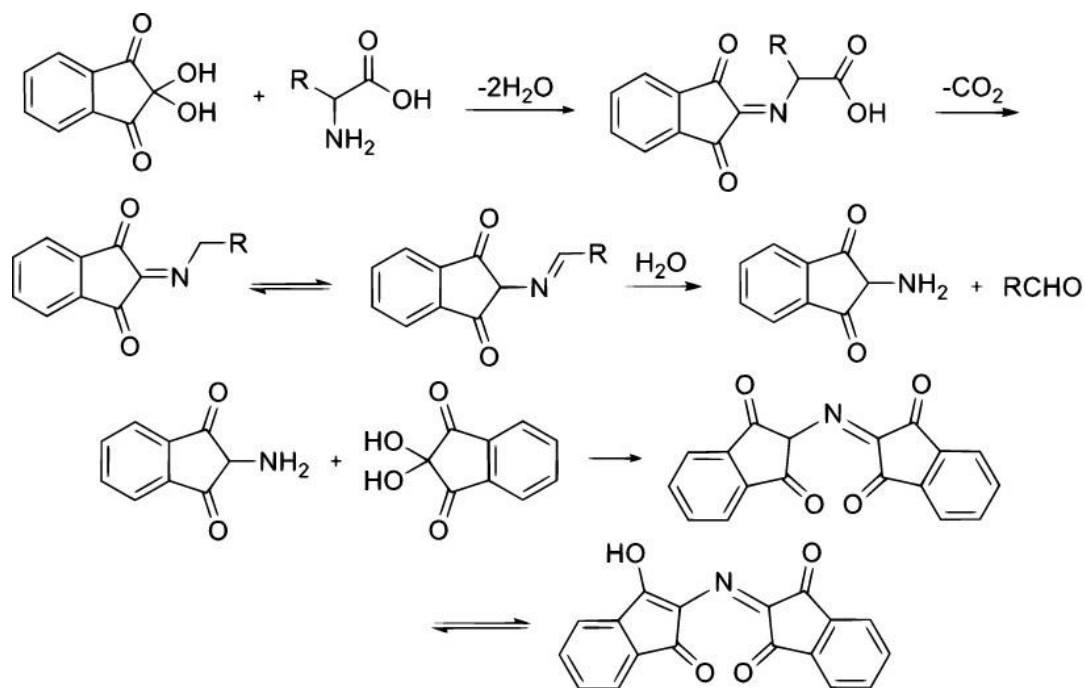


Figura 2.7 – Reazione della ninidrina.

### **2.3.2.5 - Spettroscopia fotoelettronica a raggi X (XPS)**

La spettroscopia fotoelettronica a raggi X (XPS, X-ray photoelectron spectroscopy) è un metodo spettroscopico per l'analisi delle superfici dei materiali [46]; può essere usato per determinare gli elementi chimici che compongono la superficie o per avere informazioni sullo stato di legame.

L'analisi avviene per irraggiamento con una sorgente a raggi X monocromatica i cui fotoni interagiscono con il materiale e portano all'espulsione di elettroni con una specifica energia cinetica provenienti dai primi strati atomici. L'energia cinetica di questi elettroni dipende dall'energia di legame.

La sorgente è in genere un tubo a raggi X composto da un filamento che emette elettroni per effetto termoionico che vengono accelerati verso l'anodo, andando a colpire un bersaglio (una targhetta di alluminio). L'urto dell'elettrone porta a vari meccanismi di emissione di energia, tra cui l'interazione con i nuclei atomici, in grado di produrre emissione di raggi X caratteristici.

I dati vengono successivamente raccolti da un settore elettrostatico, ossia un analizzatore in grado di dividere gli ioni in base alla loro energia cinetica.

### **2.3.2.6 - Analisi infrarossa in trasformata di Fourier (FT-IR)**

La spettroscopia infrarossa (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR) misura l'assorbimento di radiazione IR da parte di un campione. Lo spettro risultante è utile per l'identificazione, la determinazione di qualità, la consistenza e la composizione di un campione, in quanto non esistono due strutture molecolari diverse che diano lo stesso spettro. Si può quindi ottenere una sorta di "impronta digitale" per ogni materiale e struttura analizzata.

Un apparato per FTIR è composto da:

- una sorgente, che emette radiazione elettromagnetica nell'infrarosso;
- un interferometro di Michelson, a sua volta costituito da tre specchi (uno semiriflettente, uno fisso e uno mobile), che produce i pattern d'interferenza;
- un rivelatore, che misura l'interferogramma;

- un computer, che esegue la trasformata di Fourier del segnale digitalizzato.

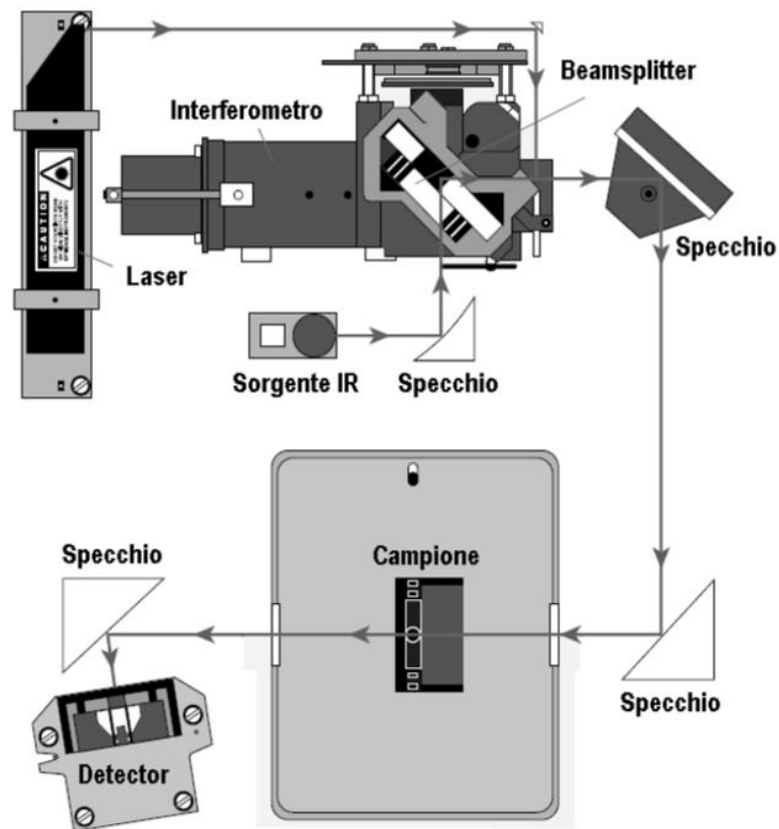


Figura 2.8 – Schema di un apparato FT-IR.

Una sorgente a incandescenza emette una radiazione policromatica in campo infrarosso, questa giunge allo specchio semiriflettente (detto *beamsplitter*), il cui scopo è quello di dividere il fascio in due metà; una metà viene indirizzata allo specchio fisso e l'altra allo specchio mobile. I due raggi vengono riflessi e tornano allo specchio semiriflettente, zona nella quale interferiscono in modo sia costruttivo che distruttivo. Ne emerge un fascio composto da un insieme complesso di modulazioni di frequenze, derivate dalla differenza nei cammini ottici dei due raggi di partenza. Il fascio così ottenuto viene indirizzato sul campione e può attraversarlo o essere riflesso dalla sua superficie (dipendentemente dal tipo di analisi, che può essere in trasmissione o in riflessione): si ha così l'assorbimento delle frequenze di energia specifiche.

Il fascio in uscita viene indirizzato sul *detector* e il segnale viene campionato a intervalli ben definiti, per cui è nota la posizione dello specchio mobile. La frequenza di campionamento e la

velocità di questo specchio sono controllate da un segnale di riferimento, prodotto dalla modulazione di un fascio laser; in questo modo l'intensità della radiazione è funzione della posizione dello specchio.

Questo segnale prende il nome di interferogramma e viene analizzato per costruire lo spettro. La procedura più frequente è quella di eseguire più scansioni e di considerare l'interferogramma medio per la ricostruzione finale. Si può poi applicare la trasformata di Fourier per ottenere un grafico dell'intensità in funzione del numero d'onda.

La radiazione infrarossa è la parte dello spettro elettromagnetico che si trova tra la regione visibile e quella delle microonde, si suddivide in IR vicino ( $13000 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ ), IR medio ( $4000 - 200 \text{ cm}^{-1}$ ) e IR lontano ( $200 - 10 \text{ cm}^{-1}$ ). Per l'analisi di polimeri e peptidi la zona di maggiore interesse è quella del medio IR (Medium Infrared, MIR).

L'assorbimento di radiazione IR comporta due tipologie di moti vibrazionali:

- *Stretching* (o stiramento), è il risultato di una continua modifica della distanza di legame tra due atomi;
- *Bending* (o piegamento), si riferisce alla variazione dell'angolo di legame dentro o fuori dal piano su cui sono situati gli atomi considerati.

L'apporto di energia necessario a produrre uno dei moti vibrazionali dipende direttamente dalla forza e dalla polarità dei legami tra gli atomi della molecola analizzata. Ogni picco nello spettro IR corrisponde, di conseguenza, all'assorbimento di energia da parte di un particolare legame o di un gruppo di legami in vibrazione. I gruppi peptidici possono dare fino a nove bande caratteristiche, detta amide A, B, I, II, III, IV, V, VI e VII, ma le più importanti sono le bande amide I e II. La banda amide I ( $1660-1620 \text{ cm}^{-1}$ ) è associata alla vibrazione di *stretching* del legame C=O. L'esatta posizione è determinata dalla conformazione e dal pattern di legami a idrogeno. La banda amide II ( $1550-1510 \text{ cm}^{-1}$ ) deriva soprattutto dalla vibrazione di *bending* del legame N-H. L'analisi IR della posizione della banda amide I è molto utile per chiarire la struttura secondaria dei peptidi: le conformazioni in  $\beta$ -sheet assorbono mediamente a  $1640-1615 \text{ cm}^{-1}$ , quelle in  $\alpha$ -elica a  $1650 \text{ cm}^{-1}$ .

Tabella 2.1 – Correlazione tra struttura delle proteine e frequenza della banda amide I.

Struttura	Banda Ammide I (cm <sup>-1</sup> )
<i>Antiparallel <math>\beta</math>-sheet/aggregated strands</i>	1675 – 1695
<i><math>3_{10}</math>-Helix</i>	1660 – 1670
<i><math>\alpha</math>-Helix</i>	1648 – 1660
<i>Unordered</i>	1640 – 1648
<i><math>\beta</math>-Sheet</i>	1625 – 1640
<i>Aggregated strands</i>	1610 – 1628

### 2.3.3 - Analisi statistica

Tutti i valori ottenuti nei saggi biologici e quelli dei test alla ninidrina sono stati fatti in triplicato, ad eccezione delle misure dell'espressione genica, fatte in duplicato. I risultati sono espressi come valori medi  $\pm$  deviazione standard. Per la valutazione della significatività dei valori è stato usato il metodo one-way ANOVA e sono stati considerati significativi i valori  $p \leq 0,05$ .

L'analisi della varianza (ANOVA) è un insieme di tecniche statistiche le quali fanno parte della statistica inferenziale che permettono di confrontare due o più gruppi di dati confrontando la variabilità *interna* a questi gruppi con la variabilità *tra* i gruppi. L'ipotesi alla base dell'ANOVA è che dati n gruppi, sia possibile scomporre la varianza in due componenti: interna ai gruppi (anche detta *Within*) e tra i gruppi (*Between*). La ragione che spinge a compiere tale distinzione è la convinzione, da parte del ricercatore, che determinati fenomeni trovino spiegazione in caratteristiche proprie del gruppo di appartenenza.



# Capitolo 3

## Parte sperimentale

In questo capitolo si andranno a descrivere nel dettaglio le procedure per la realizzazione dei campioni e dei test per poi discutere i risultati ottenuti. Dove non indicato diversamente le analisi sono state svolte presso il laboratorio della Dott.ssa Monica Dettin nel Dipartimento di Ingegneria Industriale dell'Università degli Studi di Padova.

### 3.1 - SINTESI E CARATTERIZZAZIONE PEPTIDICA

#### 3.1.1 - Peptide EAK

Sequenza: (PM: 1614.83 Da)

H-Ala-Glu-Ala-Glu-Ala-Lys-Ala-Lys-Ala-Glu-Ala-Glu-Ala-Lys-Ala-Lys-NH<sub>2</sub>

Il peptide EAK utilizzato era già presente in laboratorio in forma parzialmente purificata.

##### 3.1.1.1 - Purificazione del peptide EAK

Si è proceduto alla purificazione del peptide mediante cromatografia RP-HPLC semi-preparativa iniettando circa 30 mg di peptide per volta sciolti in circa 30 mL di eluente A. Sono state condotte in tutto due corse, nelle medesime condizioni operative:

- Colonna: Delta Pak C<sub>18</sub> (15 μm, 100 Å, 7.8 × 300 mm);
- Flusso: 4 mL/min;
- Fondoscala: 4.00 ABS;
- Eluente A: 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O MilliQ;

- Eluente B: 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN;
- Gradiente: da 0% al 4% di B in 2 minuti, poi dal 4% al 16% di B in 48 minuti;
- Detector a 214 nm;
- Velocità della carta: 0.5 cm/min.

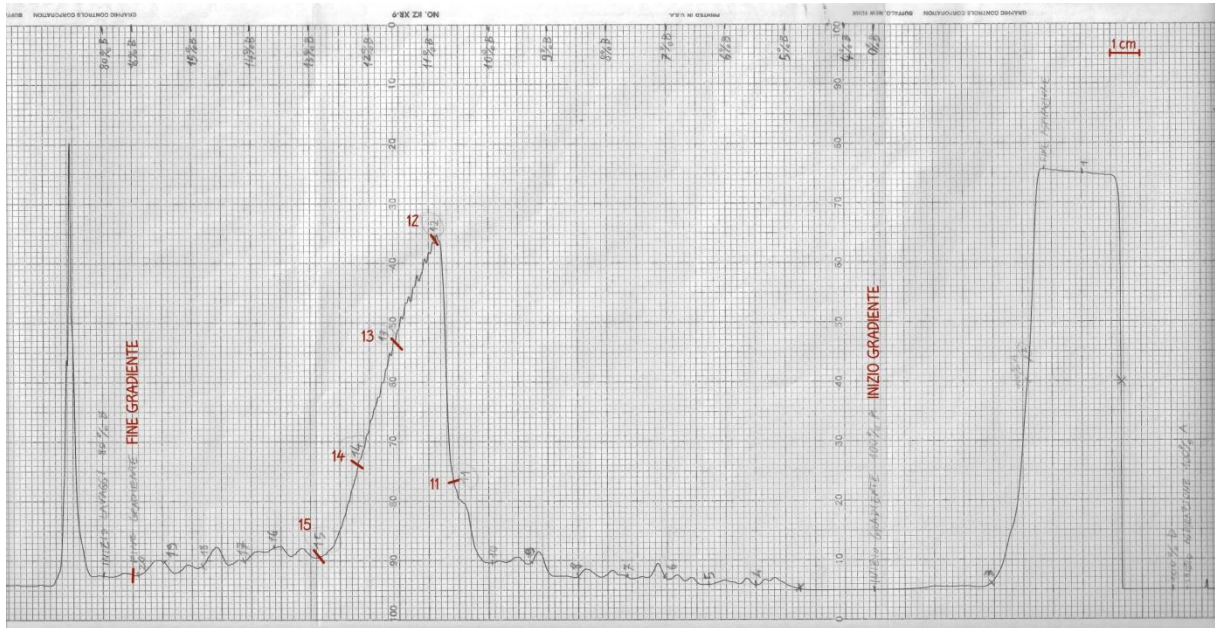


Figura 3.1 - Cromatografia semipreparativa del peptide EAK. Colonna: Delta Pak C<sub>18</sub> (15µm, 100 Å, 7.8×300nm); flusso: 4 mL/min; fondoscala: 4.00 Abs; eluente A: 0,05% TFA in H<sub>2</sub>O MilliQ; eluente B: 0,05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente: dal 0 al 4% di B, poi dal 4% al 16% di eluente B in 64 minuti; detector: 214 nm; velocità della carta 0,5 cm/min.

Da notare come si ottenga, prima dell'inizio del gradiente, l'eluizione di parte del prodotto. Nella Figura 3.1 è rappresentata la seconda delle due semi-preparative realizzate.

L'eluato è stato suddiviso in provette in base al tracciato cromatografico. Le frazioni raccolte sono state poi sottoposte a cromatografia analitica per confermare la presenza e il grado di purezza del peptide desiderato. Le condizioni operative per le corse analitiche sono:

- Colonna: Vydac Monomeric C<sub>18</sub> (5 µm, 300 Å, 4.6 × 250 mm);
- Volume di iniezione: 50 µL;
- Flusso: 1 mL/min;
- Eluente A: 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O MilliQ;

- Eluente B: 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN;
- Gradiente: dal 5% di B al 15% di B in 20 minuti;
- Detector a 214 nm.

Un esempio di risultato è rappresentato in Figura 3.2.

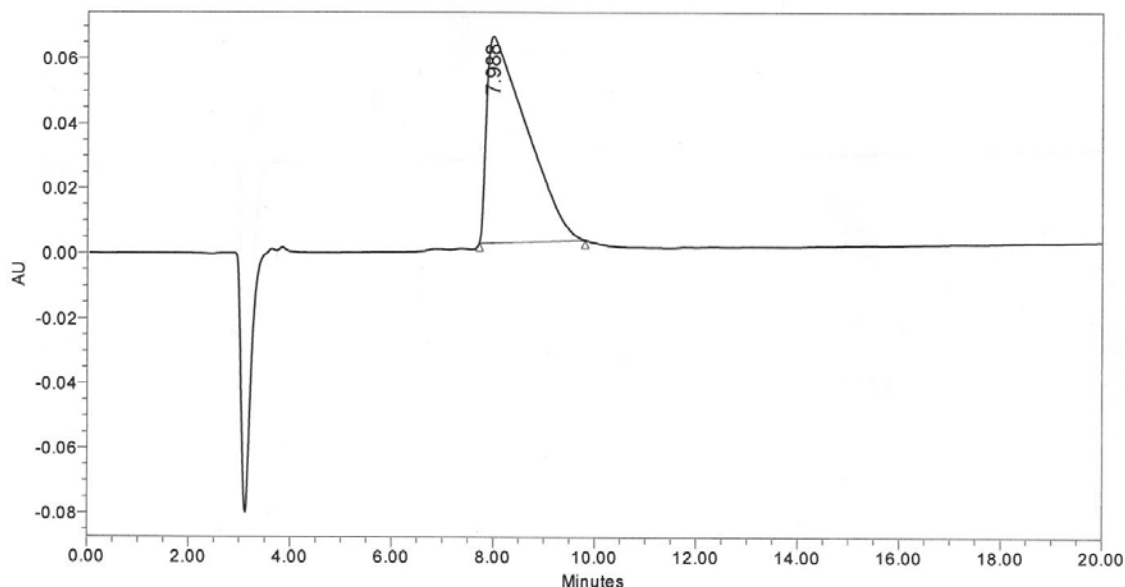


Figura 3.2 - Cromatografia analitica della frazione 14 raccolta dalla semi-preparativa riportata in figura 3.1. Colonna: Vydac Monomeric C<sub>18</sub> (5 $\mu$ m, 300 Å, 4.6 $\times$ 250nm); iniezione: 50  $\mu$ L; flusso: 1 mL/min; eluente A: 0,05% TFA in H<sub>2</sub>O MilliQ; eluente B: 0,05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente: dal 7% al 17% di eluente B in 20 minuti; lettura dell'assorbanza a 214 nm.

Tutte le analitiche presentano un picco di assorbimento a 8.0 minuti che, analizzato tramite spettrometria di massa, si è dimostrato essere il peptide desiderato.

In base al grado di omogeneità e purezza le frazioni sono state riunite e liofilizzate ottenendo:

- 9.73 mg di peptide con purezza > 99%;
- 3.81 mg di peptide con purezza > 83%;
- 17.87 mg di frazioni contenenti prodotti che eluiscono a tempi di ritenzione inferiori rispetto al prodotto *target*.

### 3.1.2 - Peptide RGD-EAK

Sequenza:

(PM: 1943.16 Da)

H-Arg-Gly-Asp-Ala-Glu-Ala-Glu-Ala-Lys-Ala-Lys-Ala-Glu-Ala-Glu-Ala-Lys-Ala-Lys-NH<sub>2</sub>

Il peptide RGD-EAK è stato sintetizzato, caratterizzato e purificato nel corso di questo lavoro di tesi.

#### 3.1.2.1 - Sintesi del peptide RGD-EAK

Il peptide auto-assemblante RGD-EAK è stato ottenuto mediante il processo di sintesi su fase solida [47], utilizzando il sintetizzatore Syro I con chimica Fmoc. Sono state condotte due sintesi, uguali e parallele. Come fase solida è stata usata la resina *Rink Amide MBHA* (sostituzione 0.7 mmoli/g). Sono stati utilizzati 180 mg (corrispondenti a 0.126 mmoli) per il primo reattore e altri 179 mg (corrispondenti a 0.1253 mmoli) per il secondo reattore.

Sono state preparate le soluzioni 0.61 M in DMF dei seguenti amminoacidi:

- Fmoc-Ala-OH;
- Fmoc-Asp(OtBu)-OH;
- Fmoc-Glu(OtBu)-OH;
- Fmoc-Gly-OH;
- Fmoc-Lys(Boc)-OH;
- Fmoc-Arg(Pmc)-OH.

Per aumentare la resa di reazione sono stati utilizzati 5 equivalenti per ciascun amminoacido rispetto alla resina.

Sono state poi preparate le soluzioni necessarie alla sintesi:

- soluzione al 40% di piperidina in DMF;
- soluzione di DIPEA in NMP;
- soluzione di 0.45M HBTU/HOBt in DMF.

## **Sintesi**

La reazione di sintesi ha avuto inizio con 6 cicli di lavaggio della resina con DMF. E' stato impostato un doppio *coupling* del primo amminoacido Fmoc-Lys(Boc)-OH per il *loading* della resina, terminato il quale si è interrotto il processo per valutare il grado di funzionalizzazione della resina con il "Test alla piperidina". Si è ottenuta una resa pari al 100%. La reazione di sintesi è poi ripresa con i restanti 18 cicli a doppio *coupling* di 45 minuti ciascuno.

La rimozione del gruppo Fmoc, protettore della funzione N- $\alpha$ -amminica di ciascun residuo incorporato nel peptide in crescita è stata condotta trattando il peptide con 1 mL della soluzione al 40% di piperidina in DMF per 12 minuti. L'attivazione del gruppo carbossilico dell'amminoacido N- $\alpha$ -Fmoc protetto, nelle reazioni di condensazione, è stata ottenuta dissolvendo 1 mL della soluzione con gli amminoacidi in 1.4 mL di soluzione 0.45 M HBTU/HOBt in DMF con l'aggiunta di 0.625 mL di DIPEA in NMP. Per finire è stato impostato il ciclo di de-protezione dal gruppo Fmoc dell'ultimo amminoacido

A sintesi terminata i due reattori sono stati sottoposti ad alcuni lavaggi con DCM, e messi a seccare sotto vuoto per 1 ora. Sono stati ottenuti 416.2 mg di peptide su resina dal primo reattore e 475.0 mg dal secondo.

## **Sblocco del peptide dalla resina**

Si è quindi proceduto con lo sblocco del peptide e la deprotezione delle catene laterali. Entrambi i reattori sono stati trattati con una miscela di 5 mL composta nell'ordine da:

- 0.125 mL di H<sub>2</sub>O MilliQ;
- 0.125 mL di TES;
- 4.750 mL di TFA.

Il TFA (95% della miscela) serve per sbloccare il peptide dalla resina e dalle protezioni laterali, il TES e l'acqua (5%) servono come *scavengers*, ovvero molecole in grado di bloccare i carbocationi che potrebbero modificare il prodotto voluto.

La reazione si è fatta decorrere per 2 ore sotto agitazione magnetica. Al termine della reazione la resina è stata filtrata via, mentre la soluzione contenente il peptide grezzo è stata raccolta in

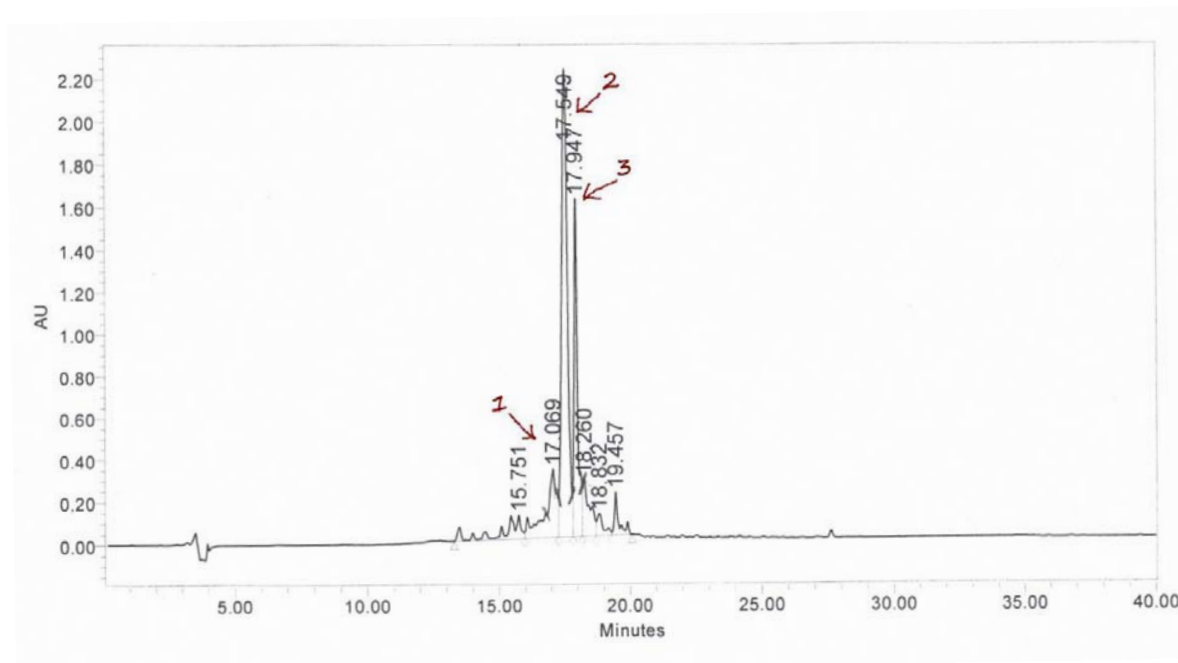
un pallone e concentrata a piccolo volume tramite evaporatore rotante. Successivamente il prodotto è stato recuperato per precipitazione mediante aggiunta di etere etilico freddo (4°C), poi filtrato con un Gooch G4 e messo a seccare sotto vuoto per 1 ora.

Una pesata grossolana dei due peptidi grezzi ottenuti dai due Gooch ha fornito rispettivamente 96.35 mg (grezzo 1) e 160.71 mg (grezzo 2) di prodotto grezzo.

### **3.1.2.2 - Caratterizzazione del peptide RGD-EAK**

0.53 mg di peptide grezzo sono stati sciolti in 0.53 mL di H<sub>2</sub>O MilliQ. La soluzione è stata poi centrifugata e filtrata. È stata poi fatta una corsa analitica alle seguenti condizioni:

- Colonna: Symmetry Shield C<sub>8</sub> (5 μm, 100 Å, 4.6 × 250 mm);
- Volume di iniezione: 200 μL;
- Flusso: 1 mL/min;
- Eluente A: 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O MilliQ;
- Eluente B: 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN;
- Gradiente: dallo 0% di B all' 80% di B in 40 minuti;
- Detector a 214 nm.



*Figura 3.3 - Cromatografia analitica del grezzo 2 con raccolta dei picchi indicati. Colonna: Symmetry Shield C<sub>8</sub> (5µm, 100 Å, 4.6×250nm); iniezione: 200 µL; flusso: 1 mL/min; eluente A: 0,05% TFA in H<sub>2</sub>O MilliQ; eluente B: 0,05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente: dal 0% all' 80% di eluente B in 40 minuti; lettura dell'assorbanza a 214 nm.*

Sono state raccolte 3 provette, delle quali la provetta 2 presenta un picco ben pronunciato a 17'30'', e un secondo picco meno profondo a quasi 18' (provetta 3).

Per stabilire l'identità dei composti sono state effettuate analisi di massa (ESI) dei 2 picchi maggiori, ovvero le frazioni 2 e 3.

Dalle due deconvoluzioni è risultato:

- Il primo picco (Fr.2) è riconducibile al peptide desiderato (PM<sub>Sperimentale</sub>: 1943.14 Da; PM<sub>Teorico</sub>: 1943.16 Da).
- Il secondo picco (Fr.3) ha invece massa 1885.14 Da ed è pertanto riconducibile alla sequenza RGD-EAK privata di una Gly (PM = 57 Da).

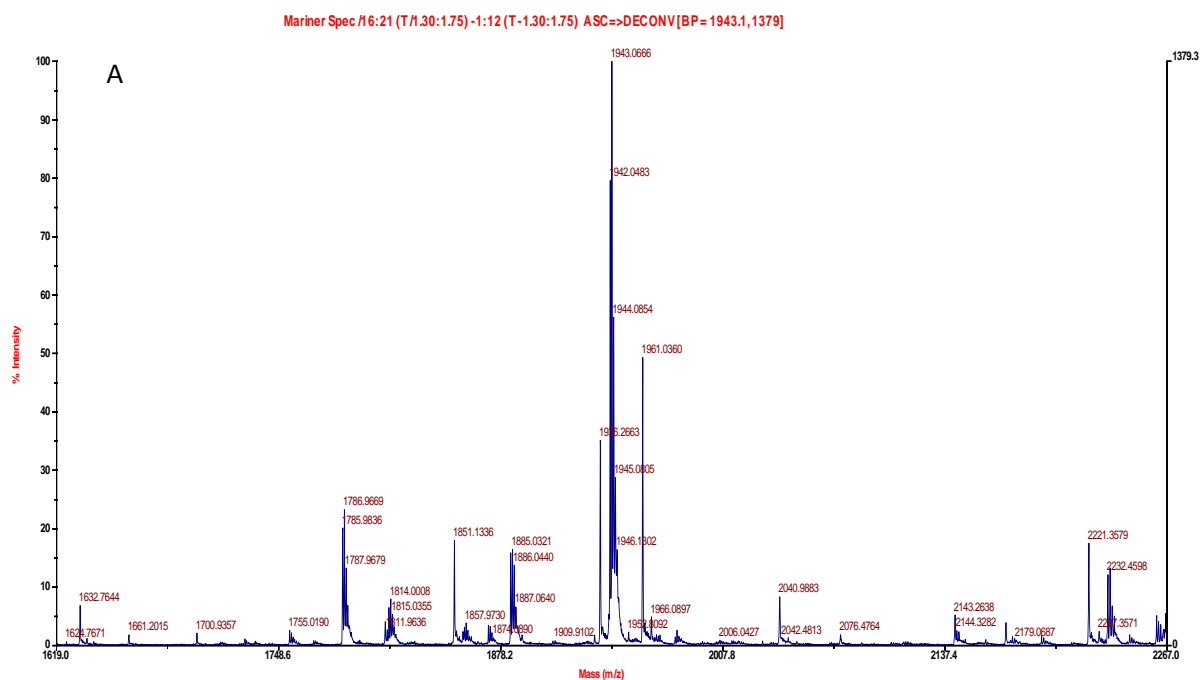


Figura 3.4 – Deconvoluzione dello spettro di massa (ESI) del peptide RGD-EAK grezzo 2, frazione 2.

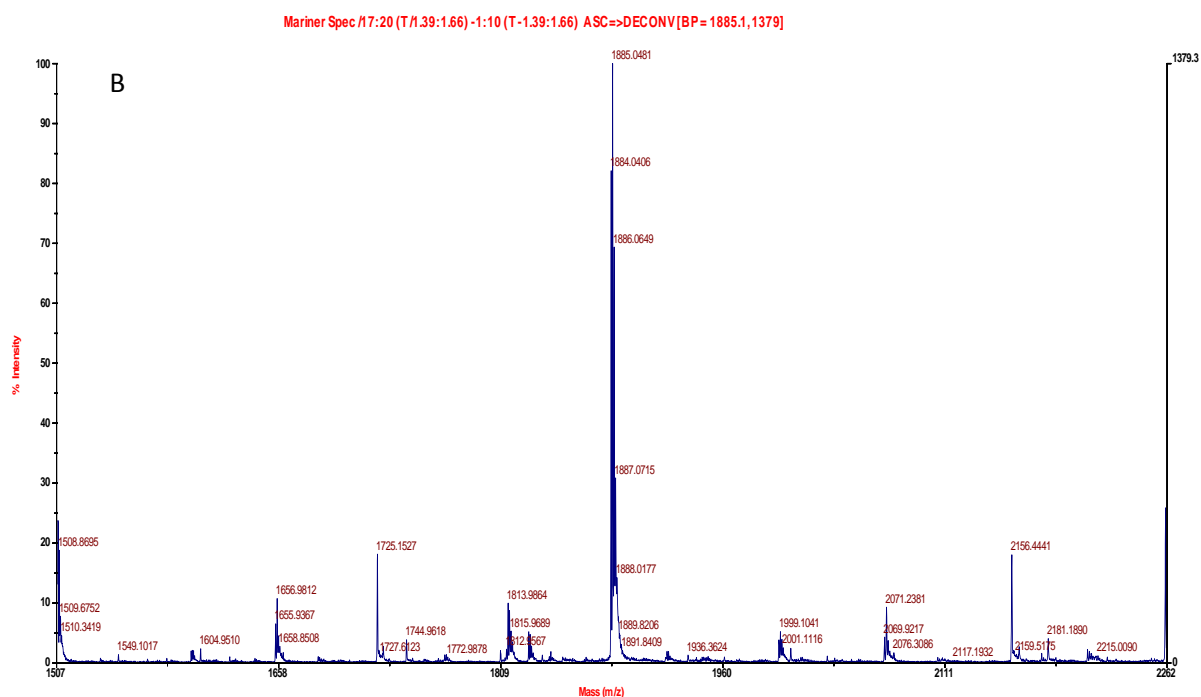


Figura 3.5 – Deconvoluzioni dello spettro di massa (ESI) del peptide RGD-EAK grezzo 2, frazione 3.



### 3.1.2.3 - Purificazione del peptide RGD-EAK

Si è quindi proceduto alla purificazione dei due grezzi, mediante cromatografia RP-HPLC semi-preparativa, iniettando circa 30 mg di peptide grezzo sciolti in circa 20 mL di eluente A per ogni corsa. Sono state condotte in tutto otto corse, nelle medesime condizioni operative:

- Colonna: Nova Pak C<sub>18</sub> (6 µm, 60 Å, 7.8 × 300 mm);
- Flusso: 4 mL/min;
- Fondoscala: 4.00 ABS;
- Eluente A: 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O MilliQ;
- Eluente B: 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN;
- Gradiente: da 0% al 10% di B in 2 minuti, poi dal 10% al 18% di B in 32 minuti;
- Detector a 214 nm;
- Velocità della carta: 0.5 cm/min.

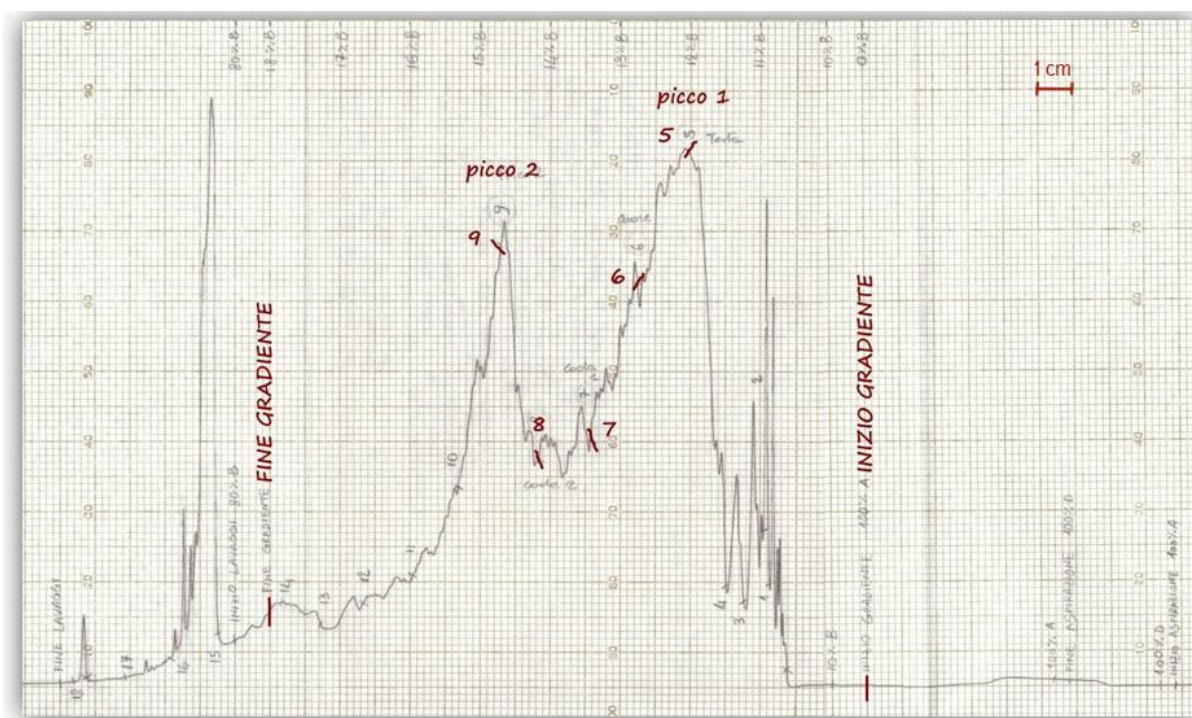
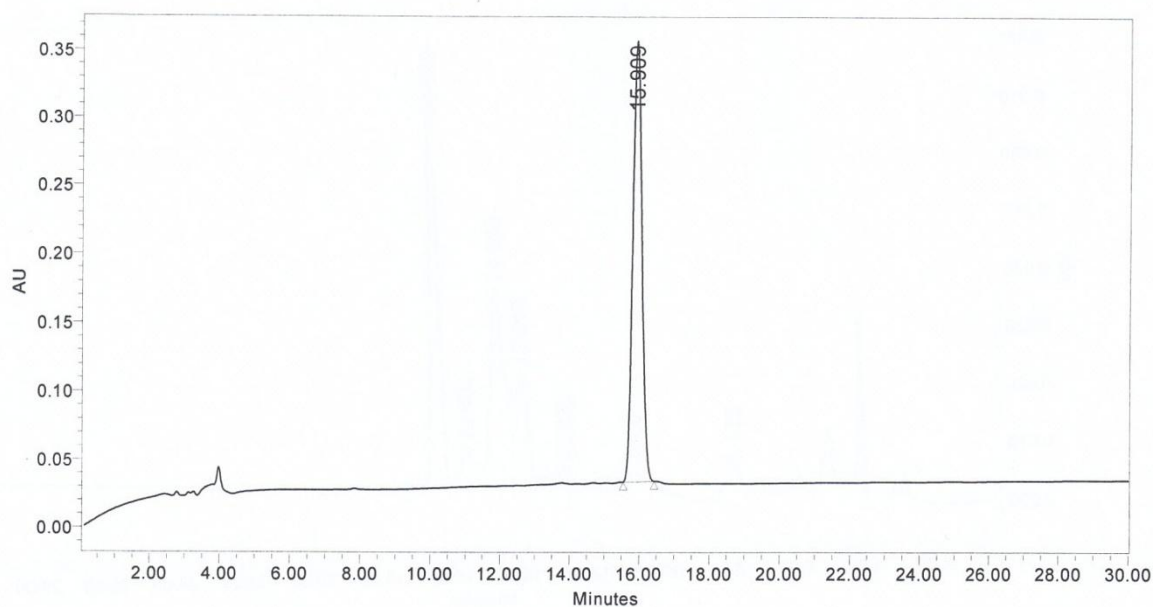


Figura 3.6 - Cromatografia semipreparativa 1 del grezzo 2 del peptide RGD-EAK. Colonna: Nova Pak C<sub>18</sub> (6µm, 60 Å, 7.8×300nm); flusso: 4 mL/min; fondoscala: 4.00 Abs; eluente A: 0,05% TFA in H<sub>2</sub>O MilliQ; eluente B: 0,05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente: dal 0 al 10 % di eluente B in 2 minuti, e dal 10 al 18% di B in 32 minuti; detector: 214 nm; velocità della carta 0,5 cm/min.

Anche nel cromatogramma della corsa semi-preparativa è evidente la presenza dei due picchi, ben distinti e imputabili a due prodotti diversi.

L'eluato è stato frazionato in differenti provette in base al tracciato cromatografico; le frazioni raccolte, comprese quelle del picco secondario, sono poi state sottoposte a cromatografia analitica per confermare la presenza del peptide desiderato, escludendo quindi ulteriori prodotti secondari di sintesi. Di seguito le condizioni operative per la cromatografia analitica di tutte le frazioni:

- Colonna: Symmetry Shield C<sub>8</sub> (5 μm, 100 Å, 4.6 × 250 mm);
- Volume di iniezione: 30 μL;
- Flusso: 1 mL/min;
- Eluente A: 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O MilliQ;
- Eluente B: 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN;
- Gradiente: dal 10% di B al 25% di B in 30 minuti;
- Detector a 214 nm.



*Figura 3.7 - Cromatografia analitica della frazione 6 raccolta dalla semi-preparativa riportata in precedenza. Colonna: Symmetry Shield C<sub>8</sub> (5μm, 100 Å, 4.6×250nm); iniezione: 30 μL; flusso: 1 mL/min; eluente A: 0,05% TFA in H<sub>2</sub>O MilliQ; eluente B: 0,05% TFA in CH<sub>3</sub>CN; gradiente: dal 10% al 25% di eluente B in 30 minuti; lettura dell'assorbanza a 214 nm.*

In base al loro grado di omogeneità le frazioni sono state riunite e liofilizzate, ottenendo:

- 53.96 mg di peptide con purezza > 99%;
- 15.97 mg di frazioni con purezza > 85%;
- 18.94 mg di frazioni con purezza > 60%;
- 18.27 mg di frazioni con purezza > 50%;
- 23.27 mg di frazioni con purezza > 40%;
- 19.46 mg di peptide privo di un residuo di Gly.

## 3.2 - ELETTROFILATURA

Gli *scaffold* elettrofilati sono stati ottenuti sotto la supervisione dell'Ing. Martina Roso nel laboratorio del Prof. Michele Modesti presso il Dipartimento di Ingegneria Industriale dell'Università degli Studi di Padova.

### 3.2.1 - Messa a punto del processo

La soluzione è stata ottenuta sciogliendo 0,2912 g di PCL in 1,64 mL di HFIP ( $\rho = 1,596$  g/mL), corrispondente a 2,6208 g, per avere una soluzione 10% wt/wt di polimero. La soluzione è stata sottoposta alternativamente a sonicazione e miscelazione con vortex fino al completo scioglimento del solido.

Per l'ottimizzazione dei parametri di processo siamo partiti dai dati presenti in letteratura. Sono state scelte le condizioni seguenti:

- Voltaggio: 16 kV
- Flusso: 1 mL/h
- Distanza ago-campione: 15 cm

La soluzione è stata versata in una siringa da 2,5 mL con ago 27G. Il processo si è svolto nelle seguenti condizioni ambientali: umidità del 69,8% e temperatura di 21,2 °C. Si è depositato circa 1 mL di soluzione.

Il campione così ottenuto è stato essiccato per 1 h sotto vuoto, metallizzato tramite deposizione di oro e poi portato ad analizzare al SEM. L'analisi morfologica ha mostrato una struttura formata di goccioline con pochissime fibre, dimostrando che le condizioni non erano ottimali per la matrice desiderata. Si è iniziata una serie di prove effettuate variando un parametro alla volta per trovare le condizioni migliori.

In una seconda sessione si è utilizzato un flusso di aria all'interno della camera di *electrospinning* allo scopo di diminuire l'umidità ambientale; utilizzando la soluzione rimanente sono stati realizzati quattro campioni alle seguenti condizioni:

Tabella 3.1 – Condizioni di elettrofilatura, secondo tentativo.

Campione	Voltaggio	Umidità	Temperatura
2	16 kV	40%	19.4 °C
3	20 kV	40%	19.5 °C
4	16 kV	25%	19.6 °C
5	20 kV	25%	19.6 °C

Distanza, ago, siringa e flusso sono invariati rispetto alla prova precedente. Anche in questo caso i campioni sono stati essiccati per 1 h sottovuoto, ricoperti da un sottile strato di oro tramite un processo di metallizzazione, e analizzati al SEM.

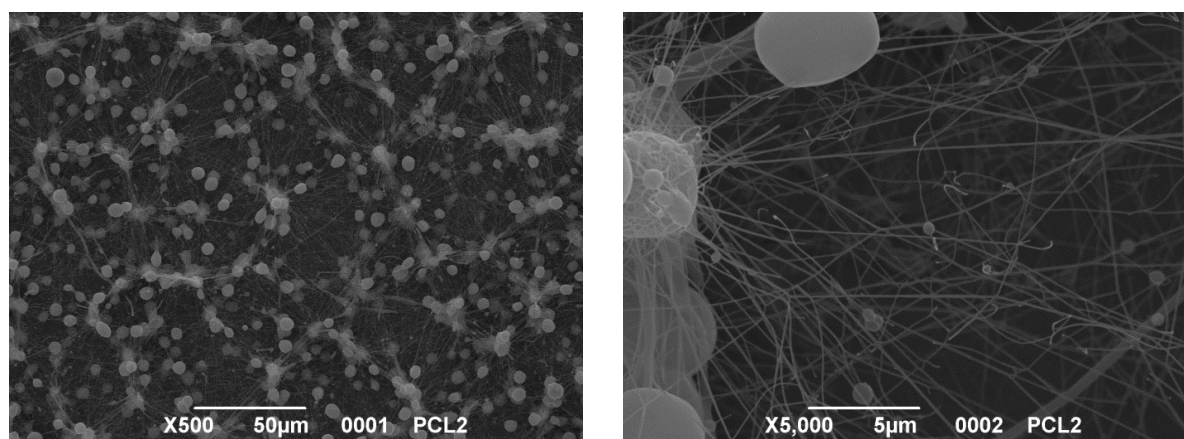


Figura 3.8 – Immagini al SEM del campione 2.

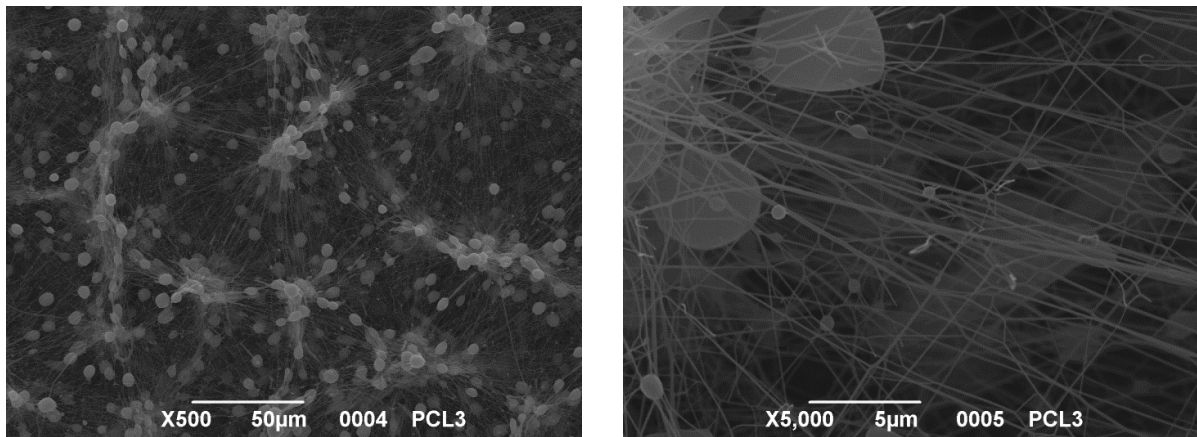


Figura 3.9 – Immagini al SEM del campione 3.

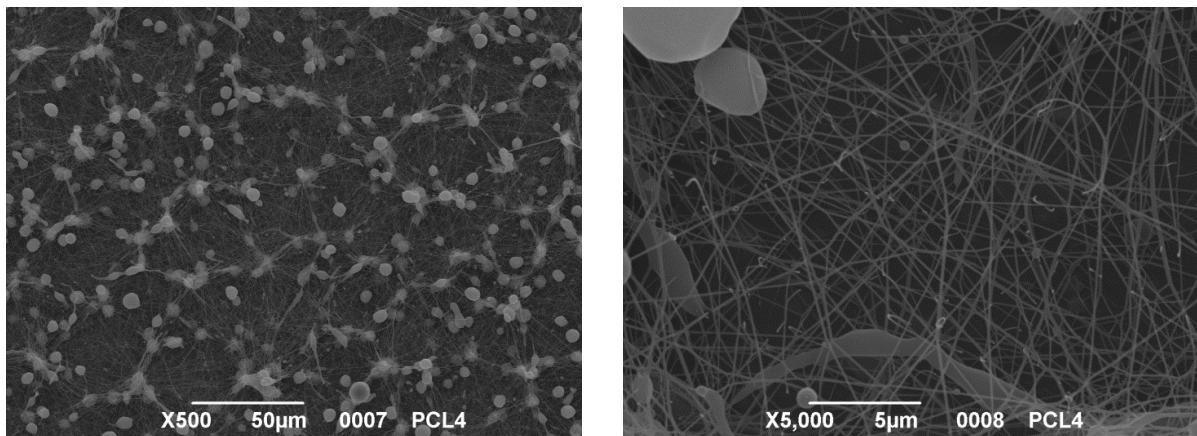


Figura 3.10 – Immagini al SEM del campione 4.

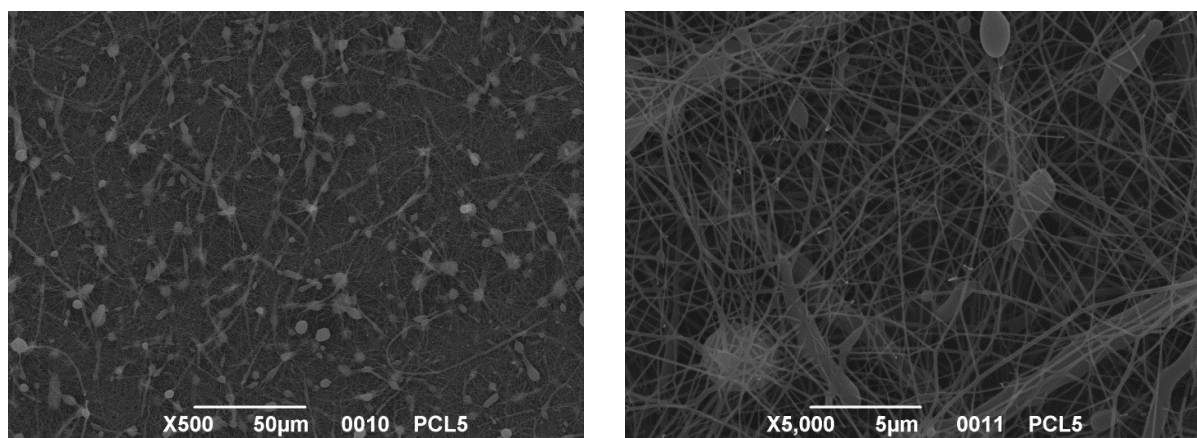


Figura 3.11 – Immagini al SEM del campione 5.

Dall'analisi morfologica si può notare la presenza di difettosità abbastanza marcate, tuttavia la struttura fibrosa migliora all'aumentare della tensione e al diminuire dell'umidità. Le matrici ottenute non sono soddisfacenti a causa delle gocce - probabilmente dovute alla mancata evaporazione di parte del solvente. Si è pensato quindi di inserire un flusso coassiale di aria in grado di direzionare il flusso in uscita (effetto analogo all'aumento di tensione applicata) e, contemporaneamente, di ridurre al minimo l'umidità nelle immediate vicinanze della fibra.

Sono stati pesati 0,17545 g di PCL e sono stati fatti sciogliere in 0.989 mL di HFIP con le stesse modalità viste in precedenza. Con questa soluzione sono stati realizzati altri quattro campioni nelle seguenti condizioni:

Tabella 3.2 – Condizioni di elettrofilatura, terzo tentativo.

Campione	Voltaggio	Umidità	Temperatura	Flusso coassiale
6	16 kV	54%	19.4 °C	0.2 bar
7	20 kV	52.2%	19.7 °C	0.2 bar
8	16 kV	52.1%	20.0 °C	0.4 bar
9	20 kV	50.4%	20.3 °C	0.4 bar

Di nuovo, distanza, siringa, ago e flusso della pompa sono gli stessi già utilizzati. Bisogna però notare che l'umidità segnata è l'umidità ambientale misurata e potrebbe essere sensibilmente diversa da quella percepita dalle fibre che si trovano in un flusso di aria con un'umidità relativa di circa il 20%.

I campioni sono stati essiccati 1 h sotto vuoto, metallizzati con uno strato di oro e analizzati al SEM.

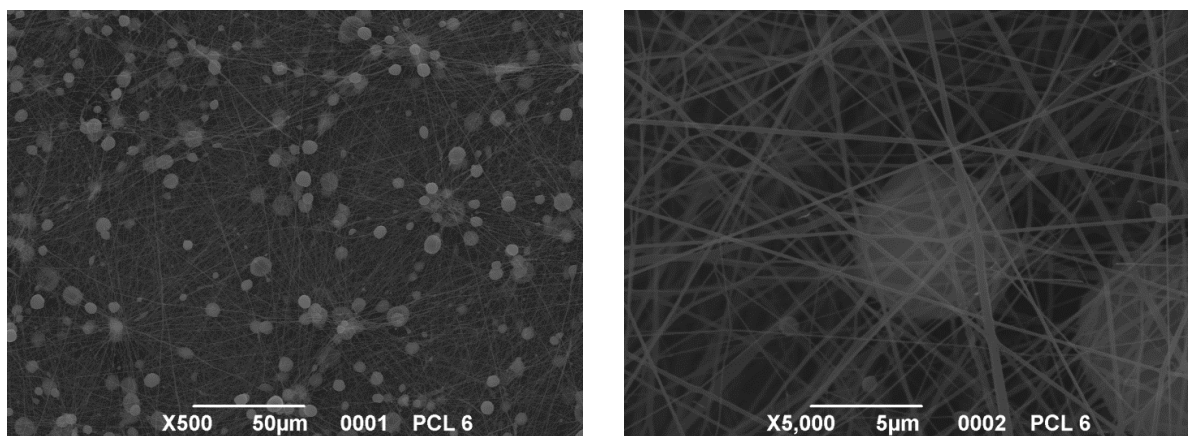


Figura 3.12 – Immagini al SEM del campione 6.



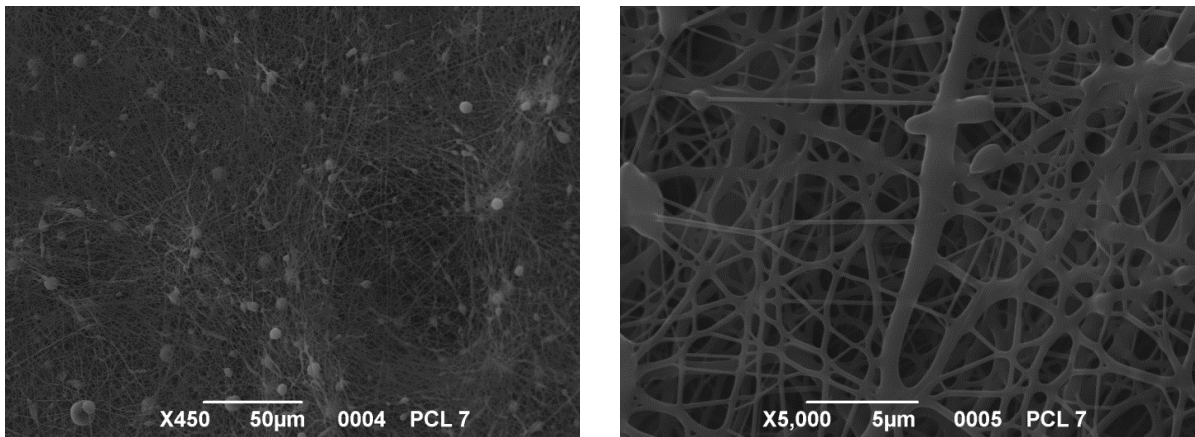


Figura 3.13 – Immagini al SEM del campione 7.

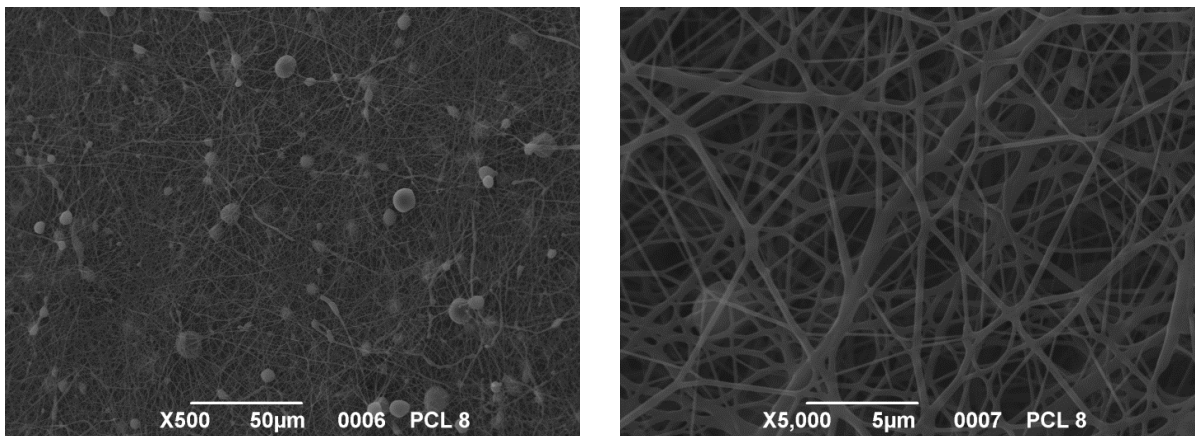


Figura 3.14 – Immagini al SEM del campione 8.

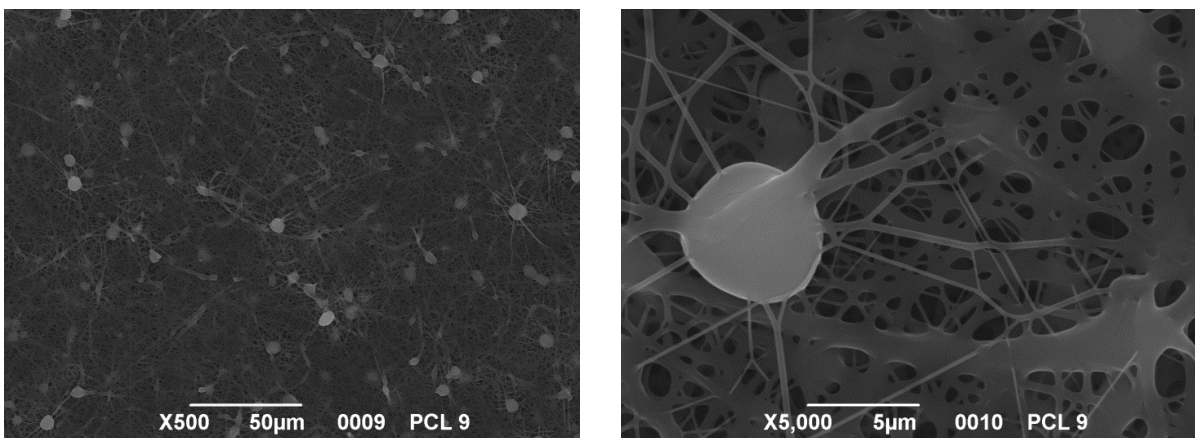


Figura 3.15 – Immagini al SEM del campione 9.

Le immagini al SEM mostrano come le prime condizioni portino a un miglioramento della struttura fibrosa con contemporaneo calo della difettosità, tuttavia le altre condizioni portano a una parziale o totale fusione delle fibre, dovuta probabilmente a delle condizioni troppo estreme che non permettono di avere il tempo necessario per l'evaporazione del solvente. Una possibilità alternativa è quella che la fusione sia legata al trattamento di metallizzazione. Si è proceduto con condizioni più simili a quelle del campione 6, variando in particolare la concentrazione del polimero in soluzione, aumentandola dal 10 al 13% wt/wt. Contestualmente è nato il sospetto che la fusione sia una conseguenza del processo di metallizzazione per le deposizioni a maggiore spessore.

La nuova soluzione di filatura è stata realizzata al 13% wt/wt pesando 0,17671 g di PCL e facendoli sciogliere in 0,741 mL di HFIP con la procedura vista in precedenza.

Le condizioni di lavoro sono state:

*Tabella 3.3 – Condizioni di elettrofilatura, quarto tentativo.*

<b>Campione</b>	<b>Voltaggio</b>	<b>Umidità</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Flusso coass.</b>	<b>Flusso</b>
<b>10</b>	16 kV	58.5%	16.9 °C	0.2 bar	0.5 mL/h
<b>11</b>	16 kV	60.8%	16.4 °C	0.2 bar	1 mL/h

Ago, siringa e distanza sono invariati. Si è pensato di provare a diminuire il flusso della pompa volumetrica in modo da far uscire dalla siringa meno materiale alla volta e permettere più facilmente l'evaporazione del solvente. Sono stati depositi 0.3 mL per campione. I campioni così ottenuti sono stati essiccati sotto vuoto per 1 h, metallizzati e analizzati al SEM.



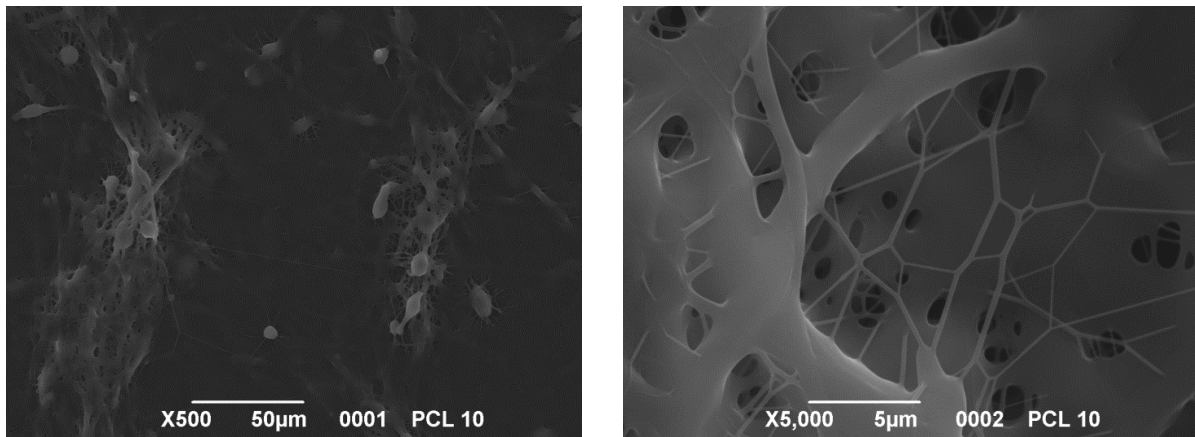


Figura 3.16 – Immagini al SEM del campione 10.

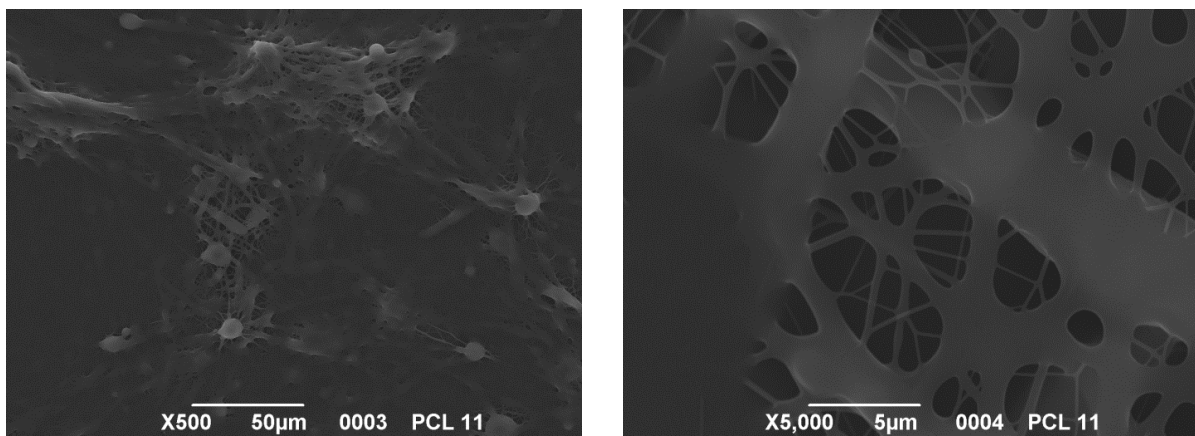


Figura 3.17 – Immagini al SEM del campione 11.

Le immagini al SEM mostrano una struttura quasi completamente fusa: un risultato del genere era completamente inaspettato e si è valutata l'idea che il processo di metallizzazione possa essere distruttivo per un materiale sensibile come il PCL. Gli stessi campioni sono stati analizzati quindi all'ESEM, siccome questa tecnica permette di analizzare i campioni senza pretrattarli con oro ci permetterebbe di isolare il contributo della metallizzazione.

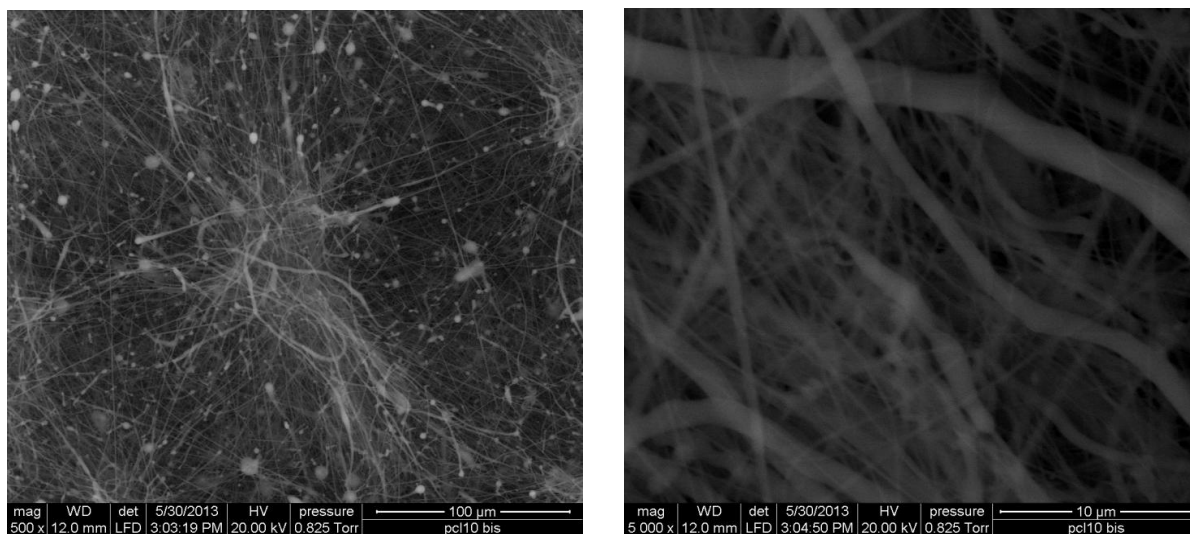


Figura 3.18 – Immagini all'ESEM del campione 10.

Le immagini ottenute in questo modo dimostrano che la struttura reticolare è intatta e che il risultato precedente è frutto del processo di metallizzazione. Il reticolo di fibre è piuttosto fitto, anche se accompagnato da un'eccessiva difettosità. Si è pensato di provare allora diverse combinazioni delle condizioni di lavoro, variando anche da distanza e il flusso della pompa volumetrica.

Sono stati pesati 0,25174 g di PCL e sono stati fatti sciogliere in 1,050 mL di HFIP, con questa soluzione sono stati realizzati 7 *scaffold* differenti nelle seguenti condizioni:

Tabella 3.4 – Condizioni di elettrofilatura, quinto tentativo.

Campione	Voltaggio	Umidità	Temperatura	Flusso coass.	Flusso	Distanza
12	16 kV	66.0%	17.4 °C	0.2 bar	0.5 mL/h	22 cm
13	20 kV	68.2%	17.4 °C	0.2 bar	0.5 mL/h	22 cm
14	20 kV	69.3%	17.3 °C	0.2 bar	0.2 mL/h	22 cm
15	16 kV	67.8%	17.3 °C	0.2 bar	0.2 mL/h	22 cm
16	16 kV	70.0%	17.4 °C	0.2 bar	0.2 mL/h	15 cm
17	20 kV	69.6%	17.5 °C	0.2 bar	0.2 mL/h	15 cm
18	20 kV	67.7%	17.4 °C	0.2 bar	0.5 mL/h	15 cm

Ago e siringa utilizzati hanno sempre le stesse caratteristiche. Le deposizioni sono state brevi, con l'utilizzo di meno di 0.1 mL per campione. Anche questi campioni sono stati essiccati sotto vuoto e analizzati al SEM, assicurandosi che la metallizzazione fosse effettuata in condizioni blande.

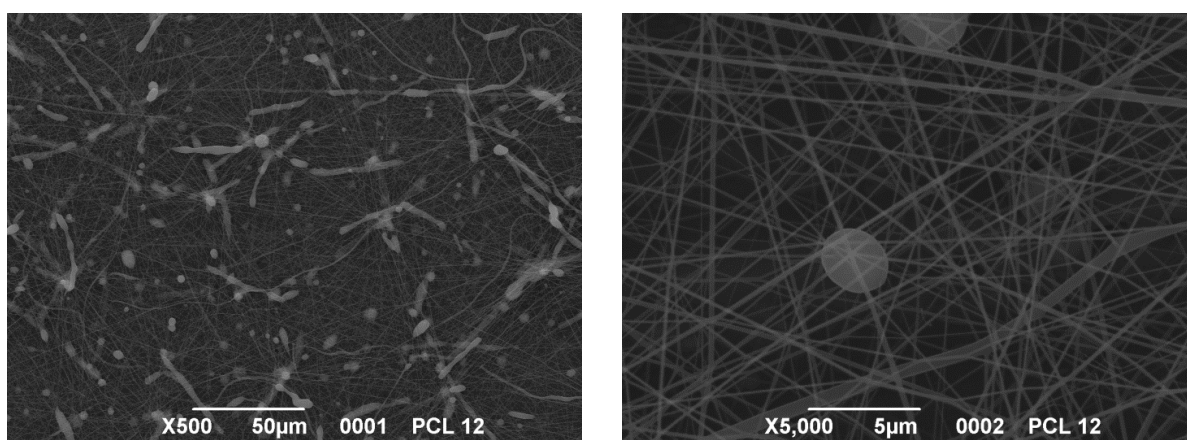


Figura 3.19 – Immagini al SEM del campione 12.

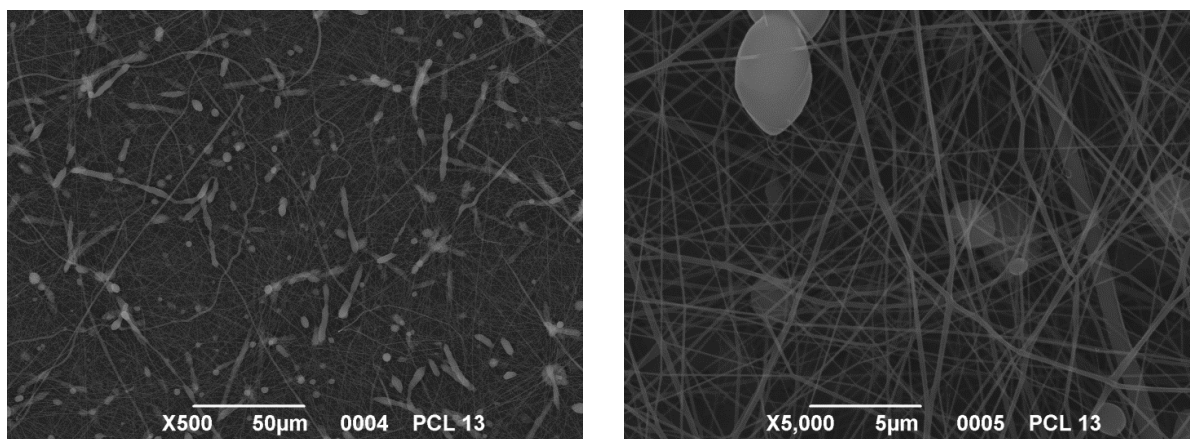


Figura 3.20 – Immagini al SEM del campione 13.

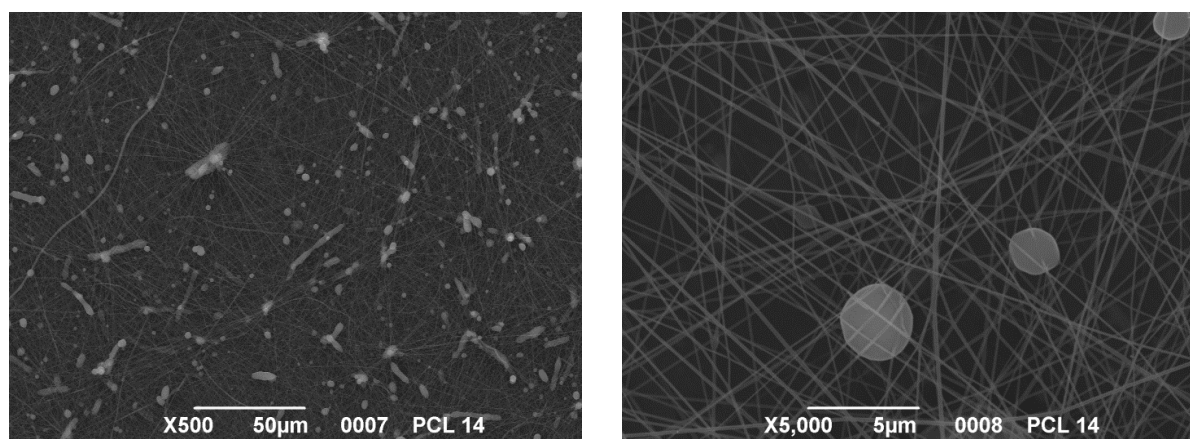


Figura 3.21 – Immagini al SEM del campione 14.

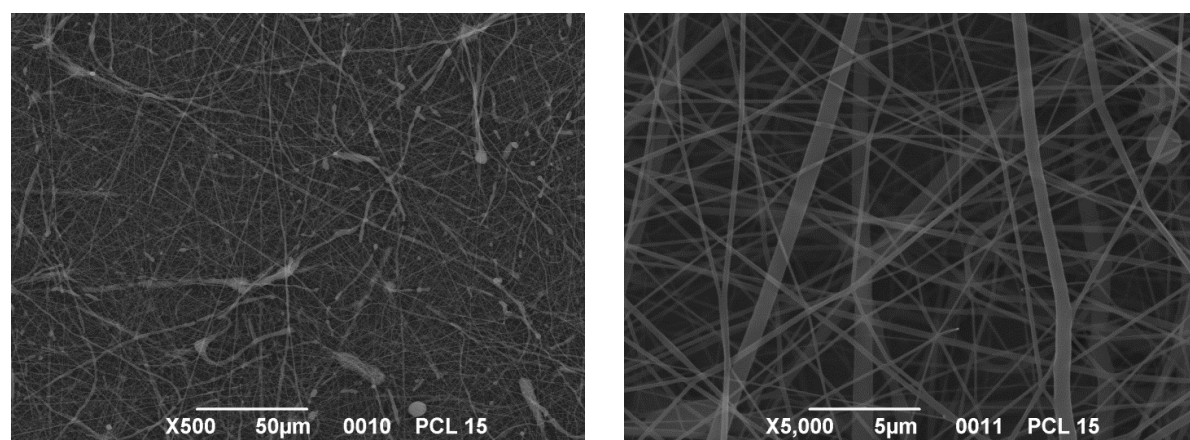


Figura 3.22 – Immagini al SEM del campione 15.

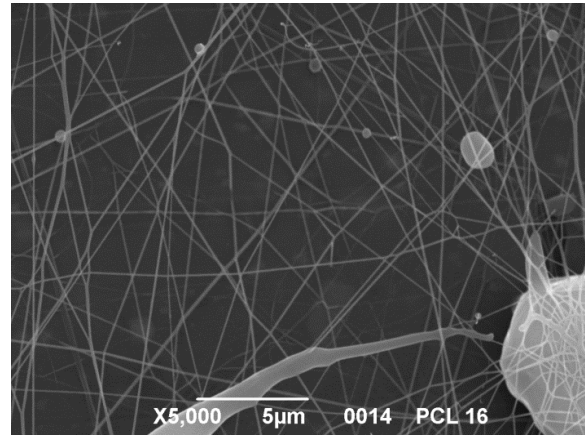
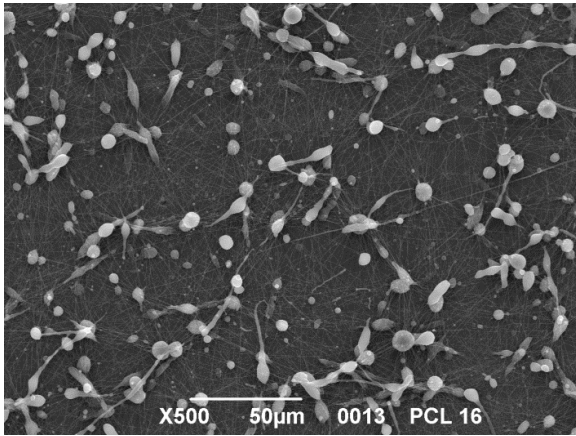


Figura 3.23 – Immagini al SEM del campione 16.

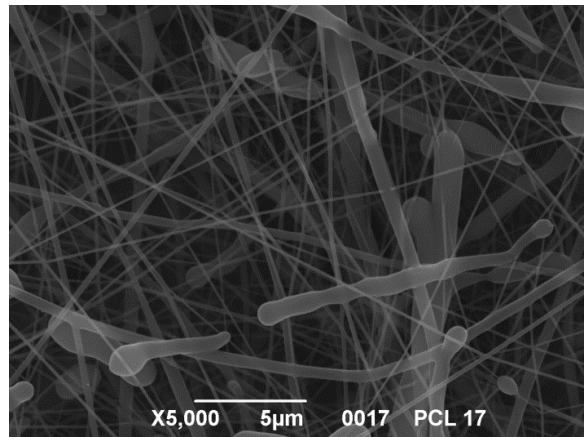
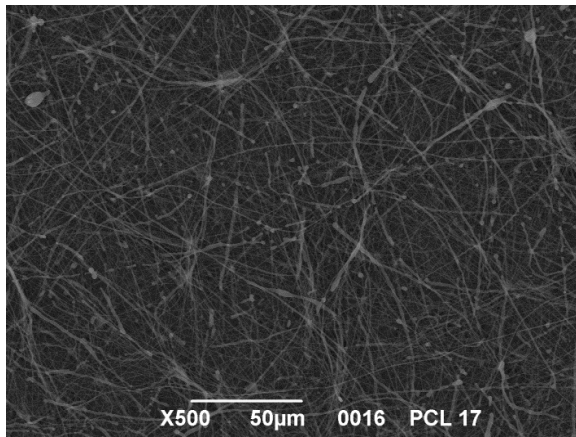


Figura 3.24 – Immagini al SEM del campione 17.

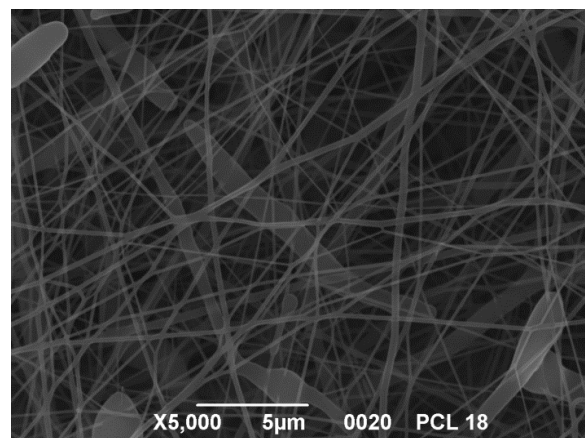
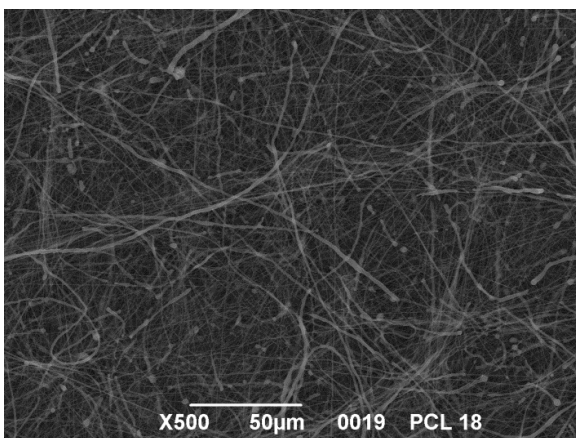


Figura 3.25 – Immagini al SEM del campione 18.

Le condizioni utilizzate per la realizzazione sono le migliori sia per quanto riguarda la quantità di difetti, sia per l'omogeneità del diametro delle fibre. Le condizioni sono dunque state scelte per la produzione delle matrici ibride, dato che la difettosità risulta. La bassa difettosità si spiega anche in base alle condizioni operative: aumentare la distanza aumenta il tempo passato in aria dalle fibre, migliorando l'evaporazione del solvente, parallelamente la diminuzione del flusso della pompa lavora nella stessa direzione. L'applicazione di una tensione più elevata, che in altri casi portava a condizioni troppo estreme, in questo caso si rivela utile per compensare la distanza maggiore del collettore.

Per verificare ulteriormente le condizioni si è deciso di valutare anche alcune matrici prodotte con una soluzione di PCL e peptide GE3-M in quattro percentuali variabili. Le soluzioni sono tutte al 13% in peso di soluto sul totale della soluzione. Per la soluzione al 2,5% wt/wt sono stati pesati 2,38 mg di peptide e 92,98 g di PCL, per la soluzione al 5% sono stati pesati 4,78 mg di peptide e 90,80 mg di PCL, per la soluzione al 10% si hanno 9,48 mg di peptide e 85,25 mg di PCL, infine per la soluzione al 15% sono stati usati 14,33 mg di peptide e 81,21 mg di PCL. Tutte le soluzioni sono state ottenute sciogliendo i peptidi e il polimero in 0,4 mL di HFIP.

Le condizioni di lavoro sono le stesse del campione 14, le condizioni ambientali sono invece le seguenti:

*Tabella 3.5 – Condizioni ambientali per elettrofilatura, sesto tentativo.*

<b>Campione</b>	<b>Arricchimento</b>	<b>Umidità</b>	<b>Temperatura</b>
<b>19</b>	2,5% GE3-M	60.4%	21.3 °C
<b>20</b>	5% GE3-M	58.9%	21.5 °C
<b>21</b>	10% GE3-M	59.0%	21.7 °C
<b>22</b>	15% GE3-M	59.0%	21.9 °C

La deposizione è stata breve. I campioni sono stati essiccati per 1 h sotto vuoto, metallizzati e analizzati al SEM.



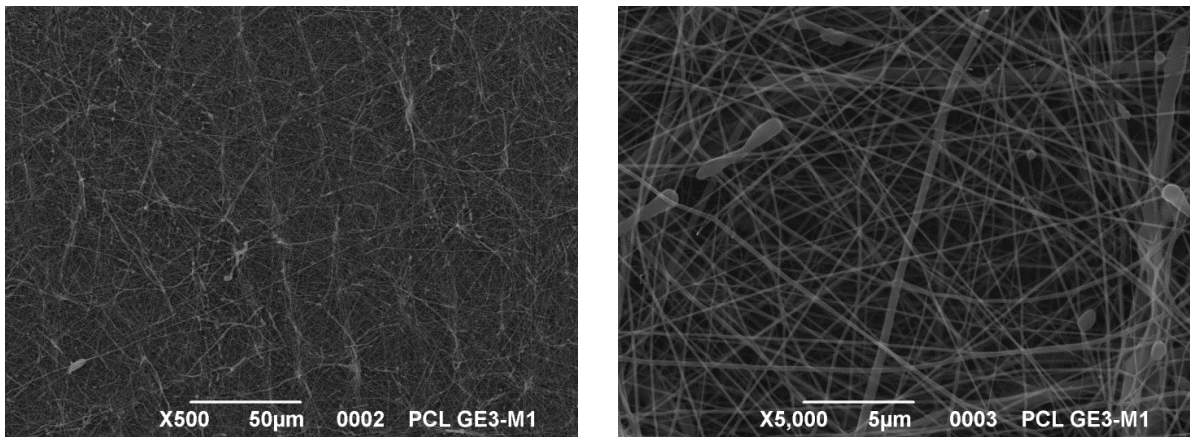


Figura 3.26 – Immagini al SEM del campione 19.

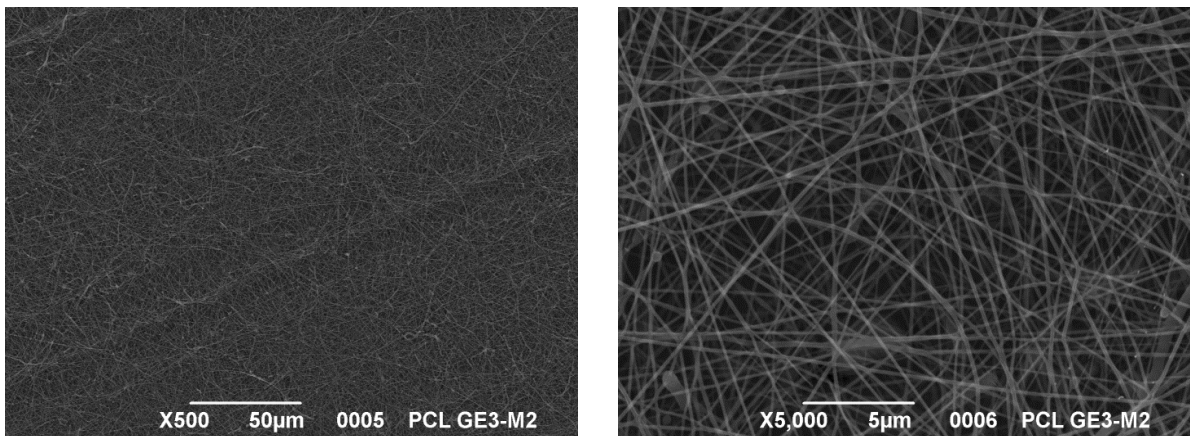


Figura 3.27 – Immagini al SEM del campione 20.

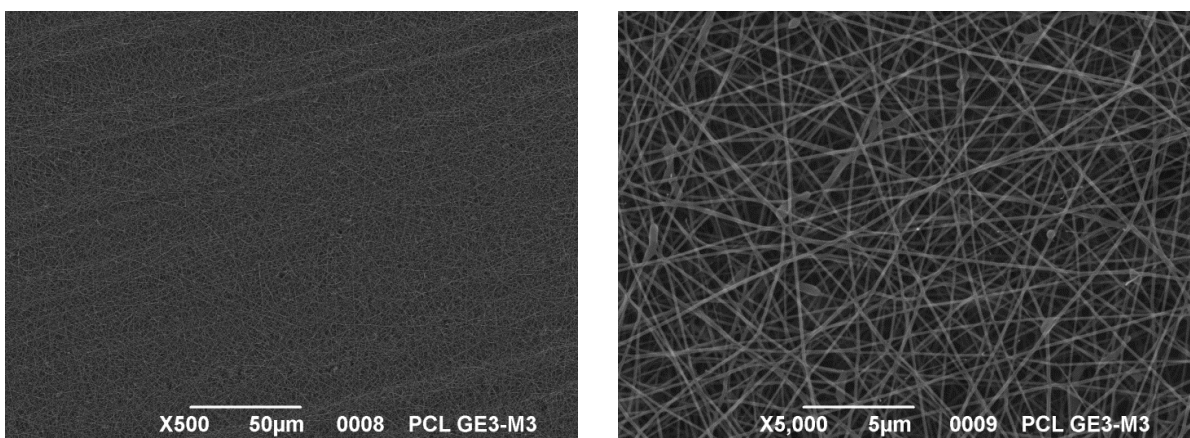
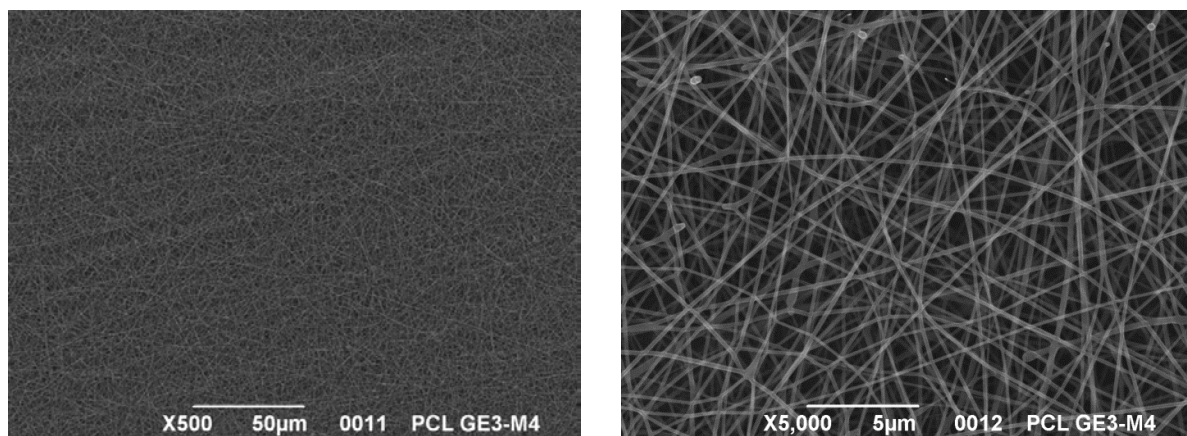


Figura 3.28 – Immagini al SEM del campione 21.



*Figura 3.29 – Immagini al SEM del campione 22.*

Le matrici contenenti peptide risultano sicuramente buone, quella con contenuto di GE3-M al 2,5% presenta ancora qualche difettosità ma le altre sono praticamente ottimali e con una fitta rete di fibre omogenee. Questa analisi conferma la bontà delle condizioni selezionate per il resto del lavoro e l'effetto positivo dell'inclusione del peptide, legato molto probabilmente all'aumento della carica della soluzione.

### **3.2.2 - Preparazione delle soluzioni**

La soluzione utilizzata per la matrice di solo PCL, così come le quattro soluzioni contenenti le percentuali crescenti di GE3-M sono quelle ottenute in precedenza, le loro composizioni sono spiegate nel paragrafo 3.2.1, (quinto e sesto tentativo). Nella seguente tabella (Tabella 3.6) sono invece presentate schematicamente le quantità di peptidi e polimero utilizzate per la preparazione delle altre soluzioni da elettrofilare.



Tabella 3.6 – Quantità di peptidi e PCL utilizzate per le soluzioni da elettrofilare.

Campione	Peso peptide	Peso PCL
2,5% RGD-EAK	1,79 mg	69,32 mg
5% RGD-EAK	3,57 mg	67,84 mg
10% RGD-EAK	7,15 mg	64,31 mg
15% RGD-EAK	10,72 mg	60,73 mg
2,5% EAbuK	1,75 mg	68,58 mg
5% EAbuK	3,60 mg	68,74 mg
10% EAbuK	7,15 mg	64,41 mg
15% EAbuK	10,79 mg	61,14 mg
2,5% EAK	1,79 mg	69,65 mg
5% EAK	3,57 mg	67,36 mg
10% EAK	7,01 mg	63,12 mg
15% EAK	10,60 mg	60,03 mg

Ogni soluzione è stata ottenuta aggiungendo 0.3 mL di HFIP in una provetta eppendorf in cui era stato posto il peptide. La miscela è stata sonicata e miscelata con il vortex fino al completo scioglimento del solido. Successivamente è stato aggiunto alla soluzione e fatto sciogliere anche il PCL, fino al raggiungimento di una miscela omogenea. Procedendo in altro ordine il peptide tende a non sciogliersi e a rimanere in sospensione.

### 3.2.3 - Condizioni di processo

Sono stati realizzati in totale 18 matrici, una per ogni combinazione di peptidi e concentrazioni più due di solo PCL, la seconda è stata realizzata poiché la prima è risultata molto difettosa e non è stata utilizzata per il lavoro.

Le condizioni operative sono riassunte di seguito:

- Voltaggio: 20 kV;
- Flusso pompa volumetrica: 0.2 mL/h;
- Distanza ago-collettore: 22 cm;

- Flusso di aria coassiale: 0.2 bar;
- Siringa: 2,5 mL;
- Ago: 27G;
- Collettore: piastra metallica 7×8 cm ricoperta con un foglio di alluminio.

Il tempo di elettrofilatura è stato fissato per tutte le prove in 90 min, valore che è sufficiente per valutare visivamente la deposizione ma non implica una durata eccessiva delle prove. Le condizioni ambientali per ogni campione sono invece le seguenti:

Tabella 3.7 – Condizioni ambientali per elettrofilatura delle matrici finali.

Campione	Composizione	Umidità	Temperatura
23	PCL	51.6%	22.1 °C
24	PCL + 2,5% GE3-M	48.7%	22.5 °C
25	PCL + 5% GE3-M	47.5%	23.1 °C
26	PCL + 10% GE3-M	47.1%	23.4 °C
27	PCL + 15% GE3-M	69.5%	24.7 °C
28	PCL + 2,5% RGD-EAK	65.2%	24.4 °C
29	PCL + 5% RGD-EAK	63.8%	24.3 °C
30	PCL + 10% RGD-EAK	63.2%	24.1 °C
31	PCL + 15% RGD-EAK	62.9%	24.1 °C
32	PCL + 2,5% EAbuK	62.3%	24.5 °C
33	PCL + 5% EAbuK	64.5%	24.4 °C
34	PCL + 10% EAbuK	63.8%	24.4 °C
35	PCL + 15% EAbuK	61.3%	24.1 °C
36	PCL	60.5%	24.2 °C
37	PCL + 2,5% EAK	41.1%	25.8 °C
38	PCL + 5% EAK	40.1%	26.0 °C
39	PCL + 10% EAK	38.6%	26.3 °C
40	PCL + 15% EAK	45.0%	26.1 °C

Dalle matrici così ottenute sono stati ricavati dei dischetti del diametro di 14 mm con l'utilizzo di un punzone di acciaio inox della dimensione opportuna. Per realizzare i dischetti il punzone è stato premuto a mano sui campioni preventivamente appoggiati su una superficie gommosa, in modo da semplificare il taglio. Sono stati ottenuti tra i 9 e gli 11 dischetti per ogni campione. Altri campioni di forme diverse (in genere quadrati o rettangoli di area 1 cm<sup>2</sup>) sono stati realizzati tagliando con delle forbici il campione.

### 3.3 - CARATTERIZZAZIONE DELLE MATRICI

#### 3.3.1 - Caratterizzazione morfologica al SEM o all'ESEM

Tutte le superfici sono state analizzate attraverso analisi elettronica a scansione per verificare la qualità della matrice e valutare le dimensioni delle fibre. Le immagini sono state ottenute con un voltaggio di 20 kV e a vari ingrandimenti (500x, 5000x e 30000x). La fase di metallizzazione, per quanto lieve, ha portato alla parziale fusione di alcune fibre e le analisi sono state ripetute all'ESEM per avere una panoramica completa.

Di seguito sono riportate le immagini di tutti i campioni a ingrandimenti di 500x e 5000x:

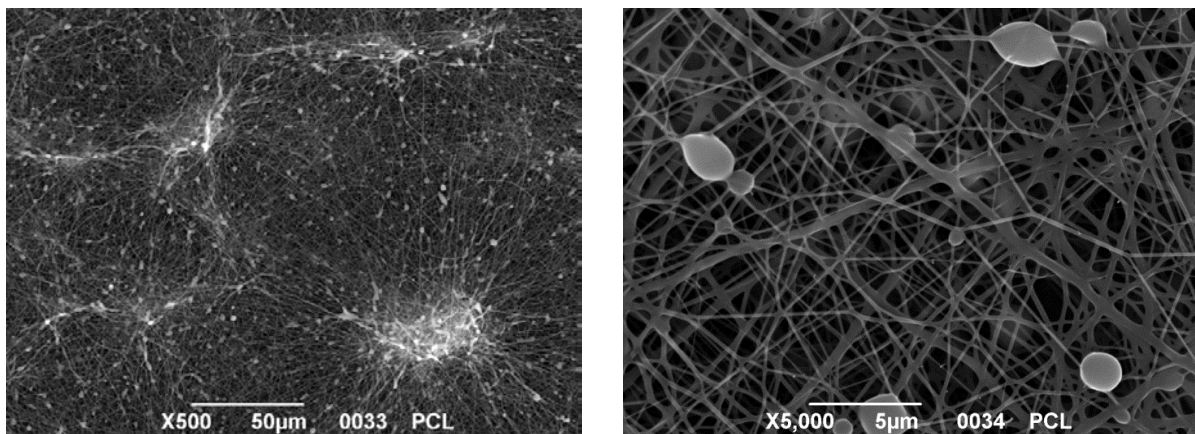


Figura 3.30 – Immagini al SEM del campione di PCL puro.

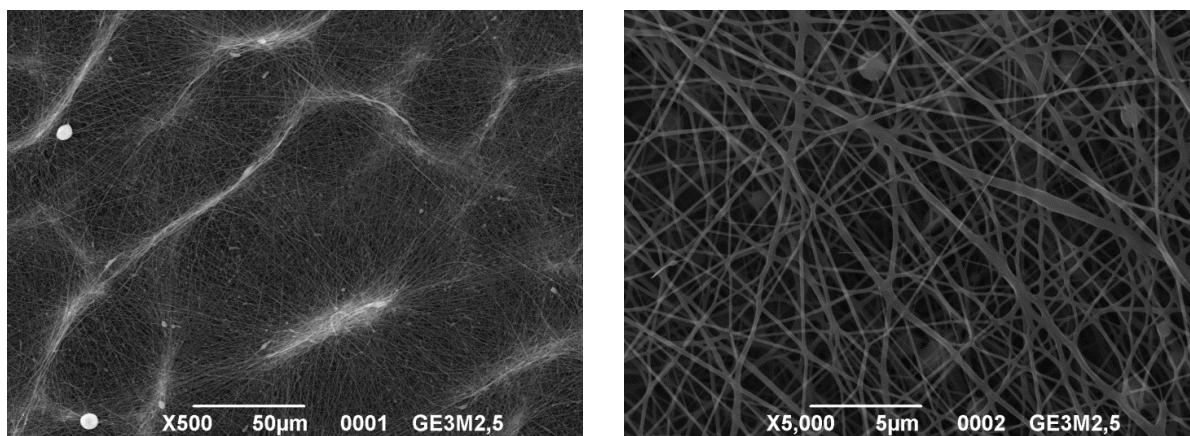


Figura 3.31 – Immagini al SEM del campione di PCL + 2,5% GE3-M.

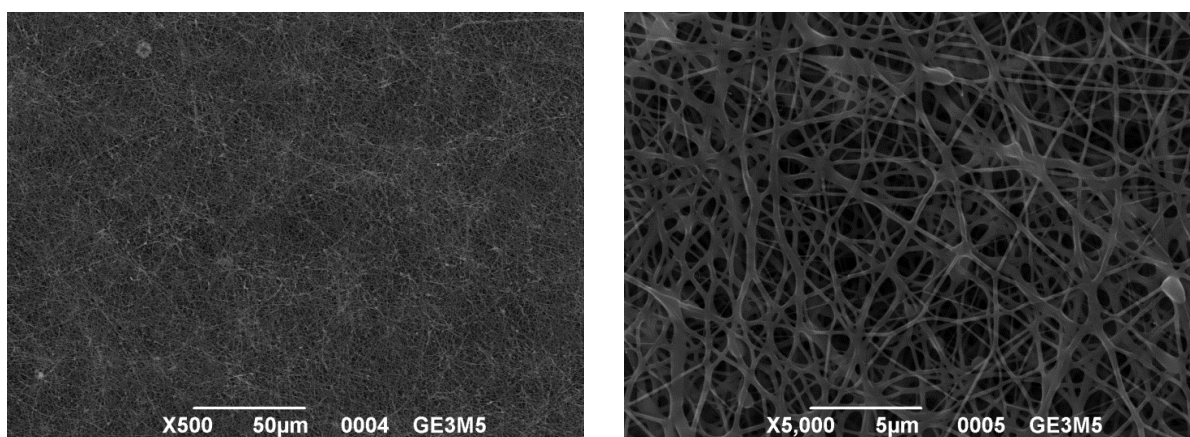


Figura 3.32 – Immagini al SEM del campione di PCL + 5% GE3-M.

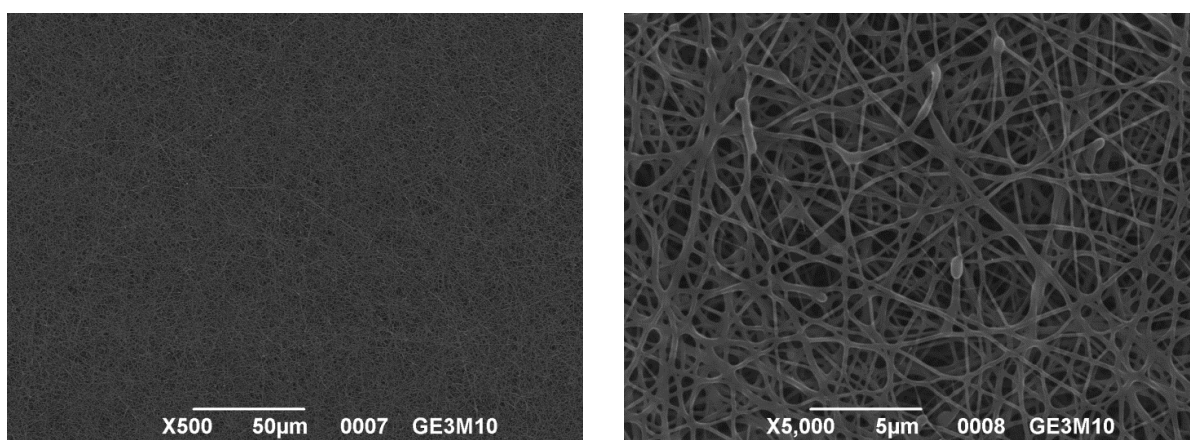


Figura 3.33 – Immagini al SEM del campione di PCL + 10% GE3-M.

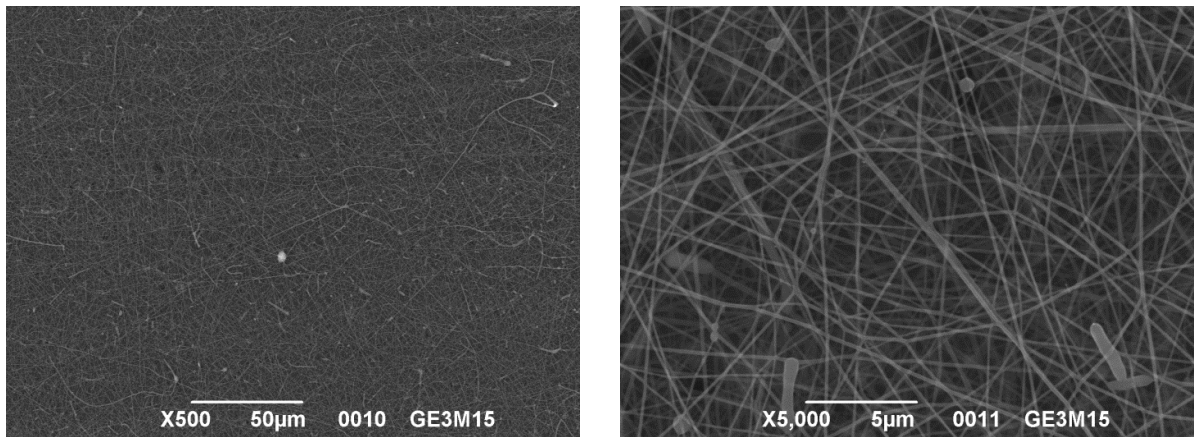


Figura 3.34 – Immagini al SEM del campione di PCL + 15% GE3-M.

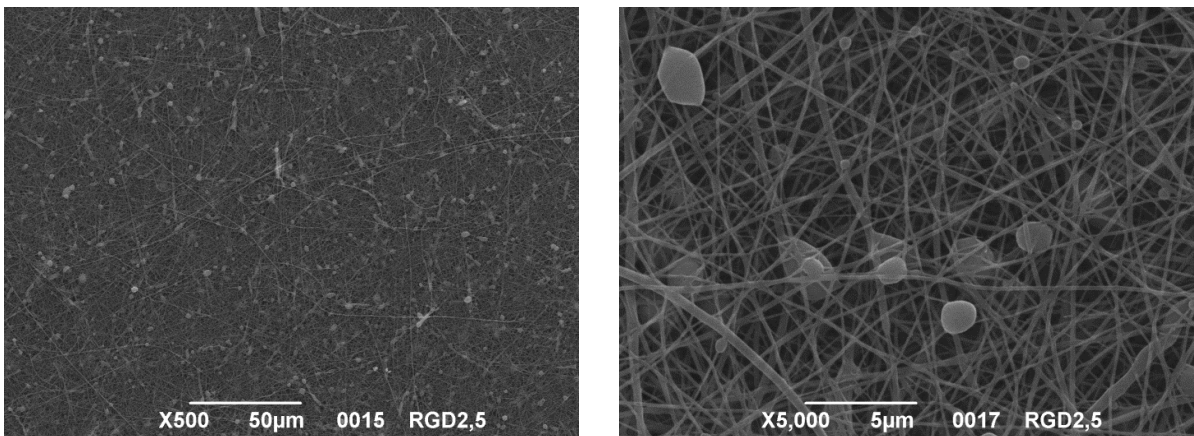


Figura 3.35 – Immagini al SEM del campione di PCL + 2,5% RGD-EAK.

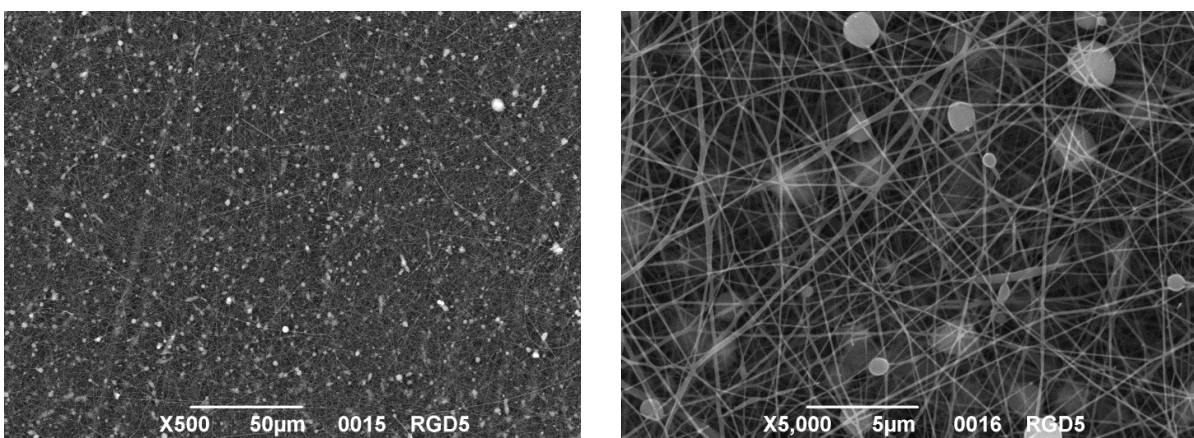


Figura 3.36 – Immagini al SEM del campione di PCL + 5% RGD-EAK.

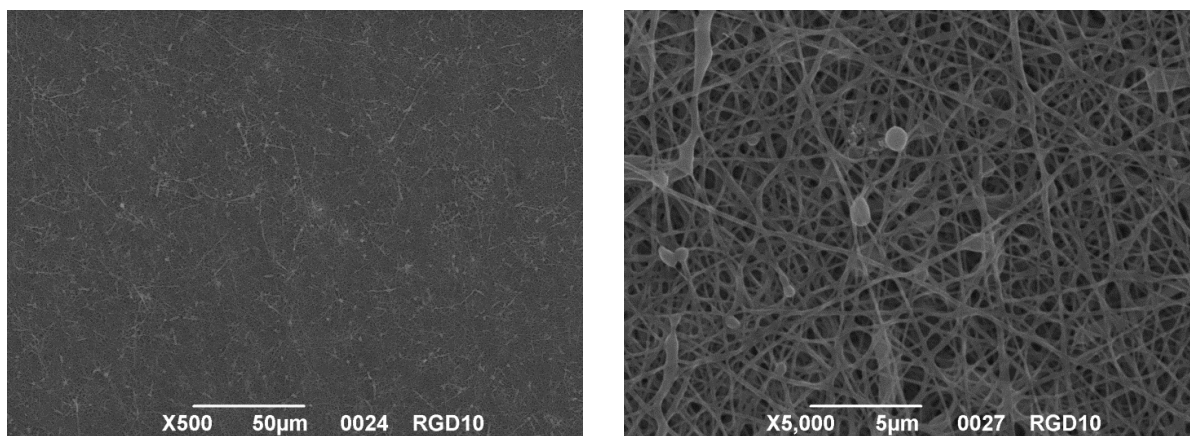


Figura 3.37 – Immagini al SEM del campione di PCL + 10% RGD-EAK.

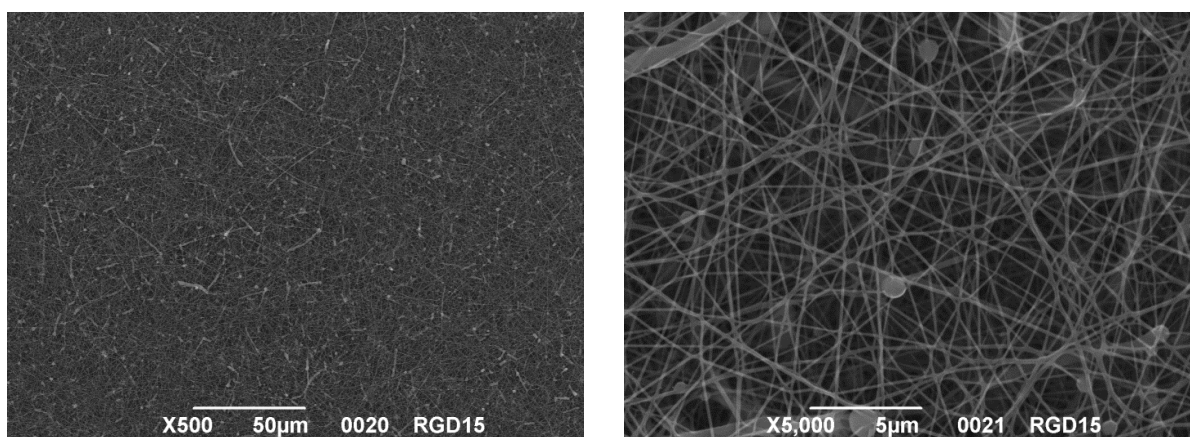


Figura 3.38 – Immagini al SEM del campione di PCL + 15% RGD-EAK.

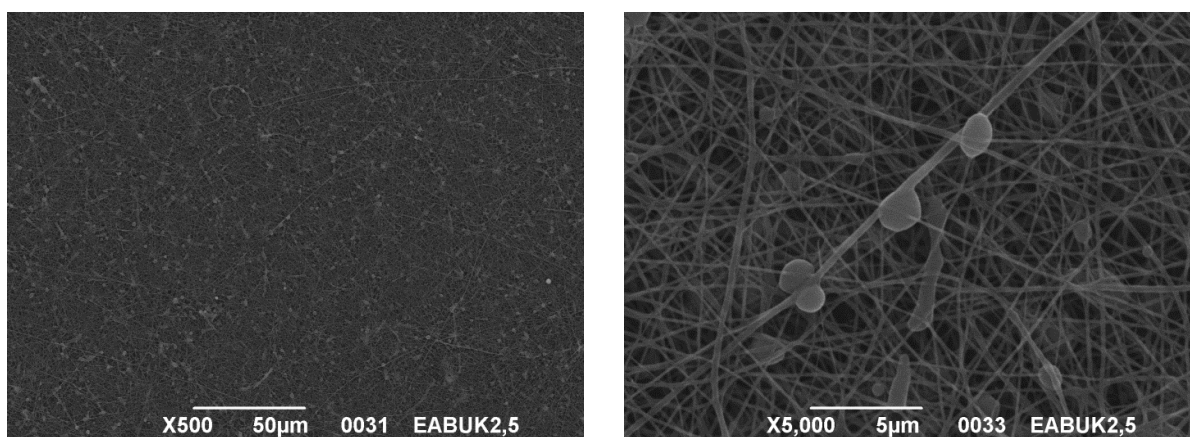


Figura 3.39 – Immagini al SEM del campione di PCL + 2,5% EABuK.



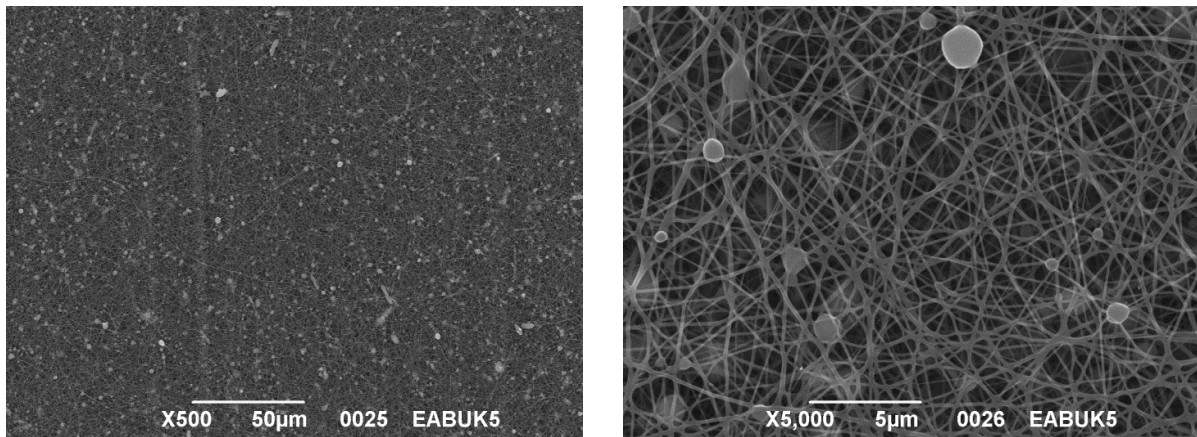


Figura 3.40 – Immagini al SEM del campione di PCL + 5% EABuK.

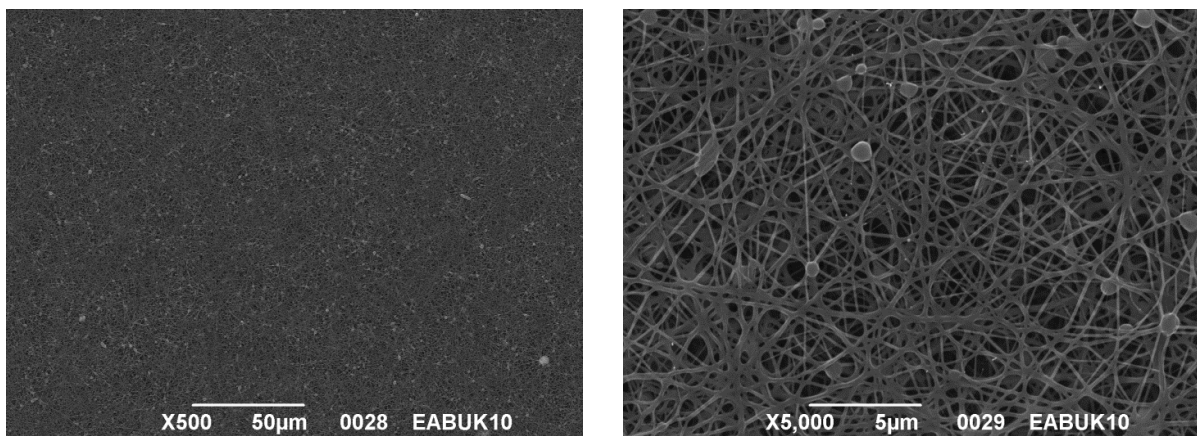


Figura 3.41 – Immagini al SEM del campione di PCL + 10% EABuK.

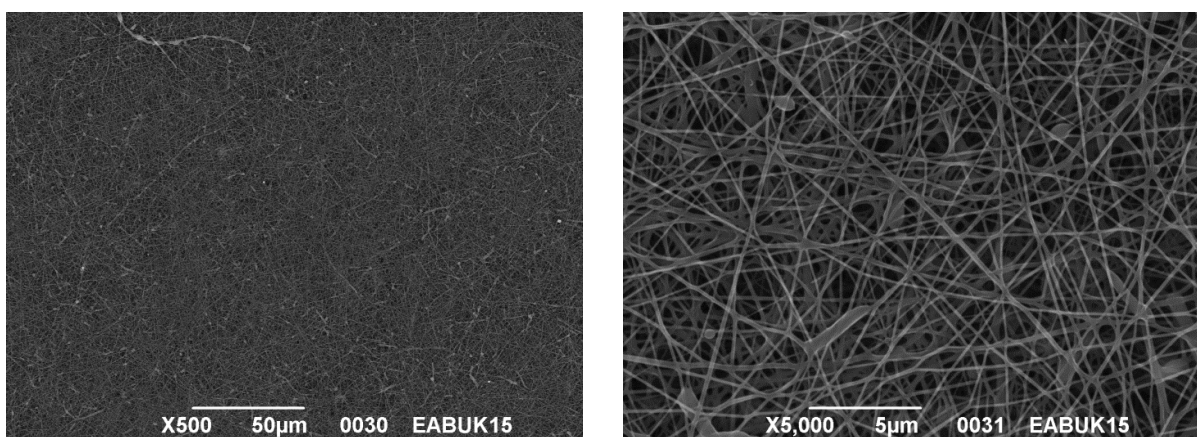


Figura 3.42 – Immagini al SEM del campione di PCL + 15% EABuK.

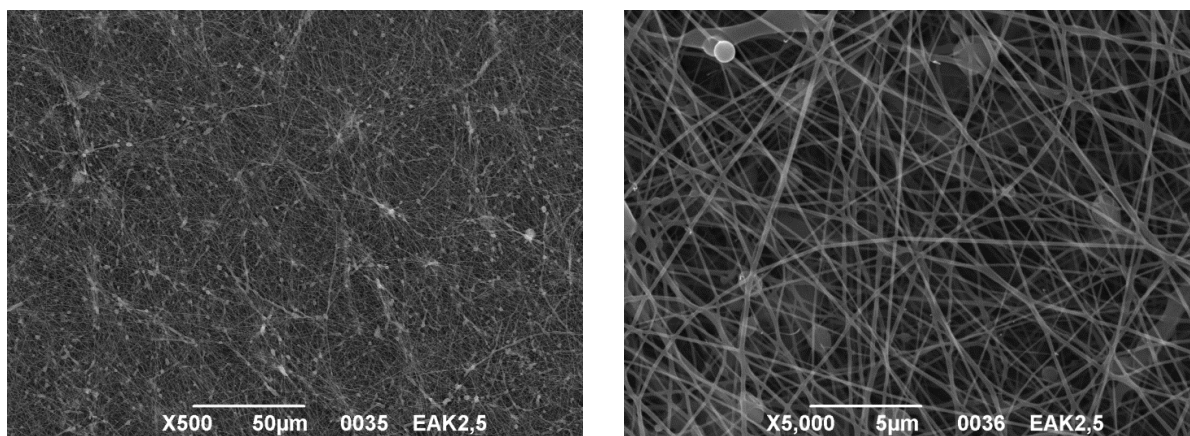


Figura 3.43 – Immagini al SEM del campione di PCL + 2,5% EAK.

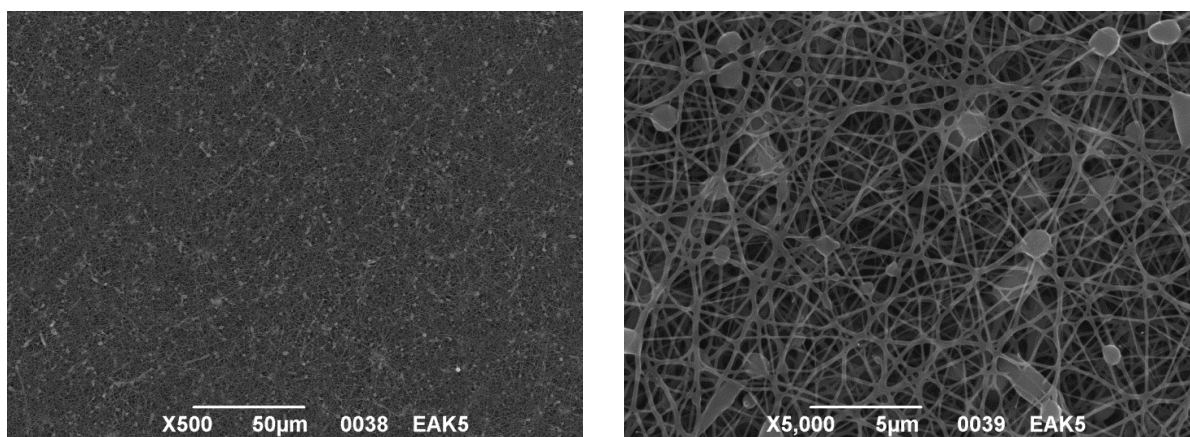


Figura 3.44 – Immagini al SEM del campione di PCL + 5% EAK.

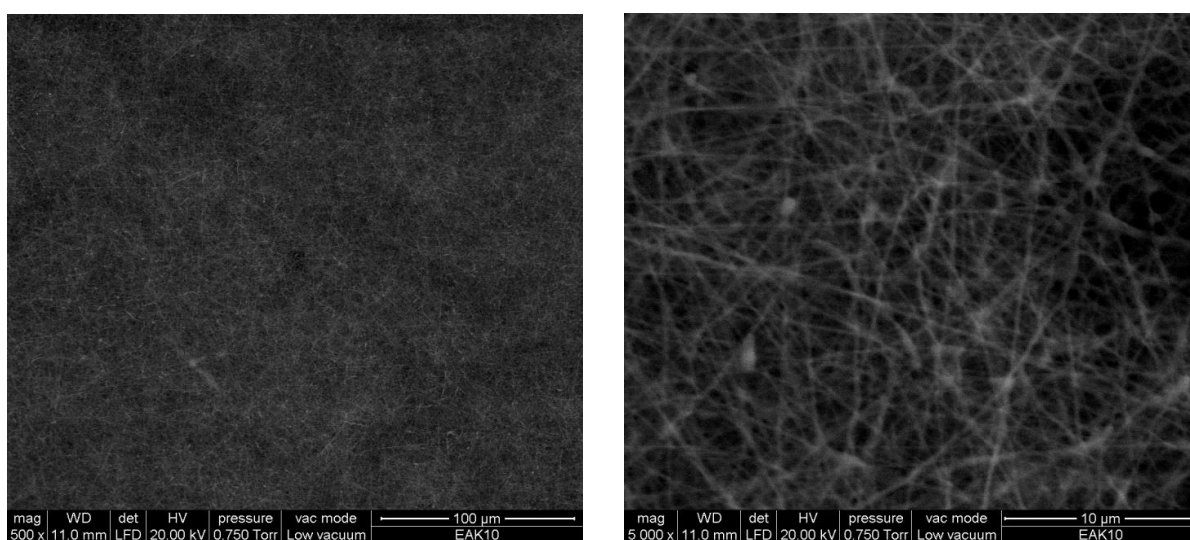


Figura 3.45 – Immagini all'ESEM del campione di PCL + 10% EAK.



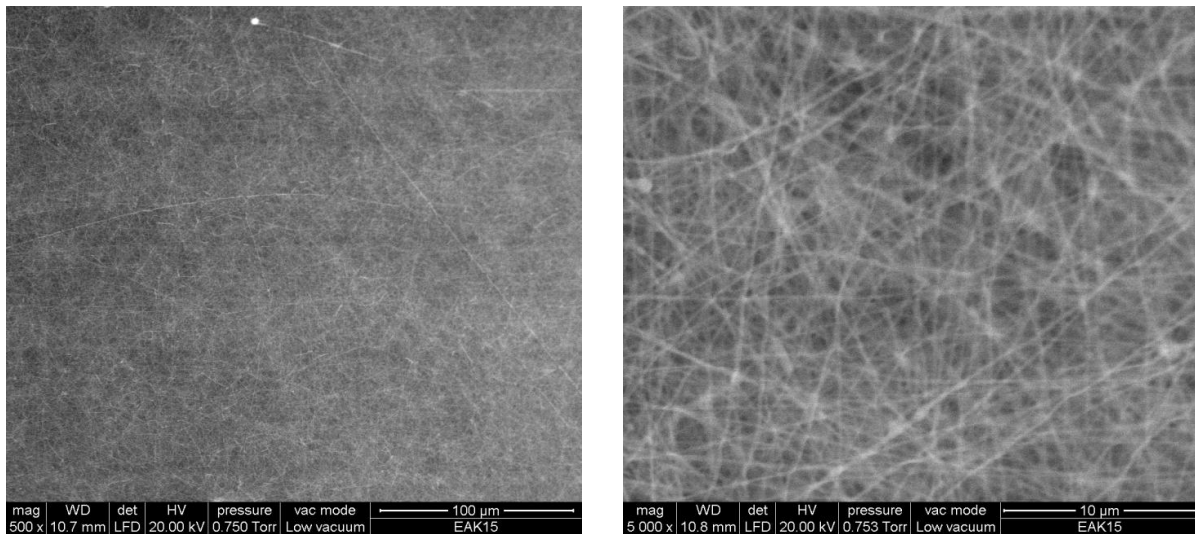


Figura 3.46 – Immagini all'ESEM del campione di PCL + 15% EAK.

Si può notare come la struttura fibrosa sia ben definita e omogenea in tutti i campioni. Alcune immagini mostrano ancora la presenza di difettosità, tuttavia le gocce sono di piccole dimensioni e in quantità ridotta e il materiale è adatto alla nostra applicazione. Come si è potuto notare in fase di messa a punto, le matrici contenenti peptidi presentano una difettosità molto inferiore rispetto a quella in solo PCL ma non si nota una particolare differenza tra i peptidi auto-aggreganti e il peptide non auto-aggregante; l'origine di questo comportamento è probabilmente da attribuire all'aumento della conducibilità della soluzione, essendo tutti i peptidi inseriti in possesso di amminoacidi carichi.

Un'altra considerazione possibile è che all'aumentare della percentuale di peptide corrisponde una diminuzione della difettosità, per lo stesso motivo indicato in precedenza.

### 3.3.2 - Analisi statistica delle variabili

Dalle immagini sopra presentate e conoscendo le variabili operative si è potuti passare all'analisi statistica. Come variabile risposta si è scelto il diametro medio delle fibre, mentre i fattori analizzati sono:

- A: concentrazione del peptide di arricchimento (Fattore numerico);
- B: Tipo di sequenza peptidica testata (Fattore categorico nominale).

I singoli fattori e i rispettivi livelli sono riportati in Tabella 3.8.

Tabella 3.8 - Elenco Fattori considerati nella pianificazione degli esperimenti

Fattore	Nome	Unità	Livello I	LivelloII	LivelloIII	LivelloIV
<b>A</b>	Concentrazione	%	2,5	5	10	15
<b>Numerico</b>						
<b>B</b>	Sequenza	-	EAbuK	EAK	GE3-M	RGD-EAK
<b>Categorico</b>						

Dai dati sperimentali in nostro possesso, e in particolare dalle informazioni morfologiche ottenute al microscopio elettronico a scansione, si è potuti passare alla valutazione del diametro medio delle fibre attraverso misure condotte con *software* per analisi d'immagine (ImageJ). I dati sono riportati in Tabella 3.9, associati alla loro deviazione standard, che rende conto del fatto che non siamo in presenza di un unico valore, bensì di una distribuzione di diametri attorno ad un valore medio.

Tabella 3.9 - Piano degli esperimenti

<b>Concentrazione</b> (%)	<b>Sequenza</b>	<b>Diametro</b> (nm)	<b>Dev.St.</b> (nm)
<b>2.5</b>	EAbuK	167	33
<b>5</b>	EAbuK	149	38
<b>10</b>	EAbuK	159	29
<b>15</b>	EAbuK	181	33
<b>2.5</b>	EAK	160	42
<b>5</b>	EAK	165	38
<b>10</b>	EAK	226	43
<b>15</b>	EAK	210	25
<b>2.5</b>	GE3-M	178	32
<b>5</b>	GE3-M	187	30
<b>10</b>	GE3-M	237	40
<b>15</b>	GE3-M	260	26
<b>2.5</b>	RGD-EAK	155	38
<b>5</b>	RGD-EAK	130	35
<b>10</b>	RGD-EAK	170	32
<b>15</b>	RGD-EAK	180	31

Quest'ultima osservazione trova riscontro in Figura 3.47 e Figura 3.48, dove sono riportati a titolo di esempio sia la distribuzione dei diametri misurati in un campione, sia i valori di diametro medio e le rispettive deviazioni standard per tutti i campioni testati. Si osserva come, a fronte di una deviazione marcata di tutti i campioni esaminati, la variazione dei diametri sia in genere compresa tra i 100 e i 280 nm.

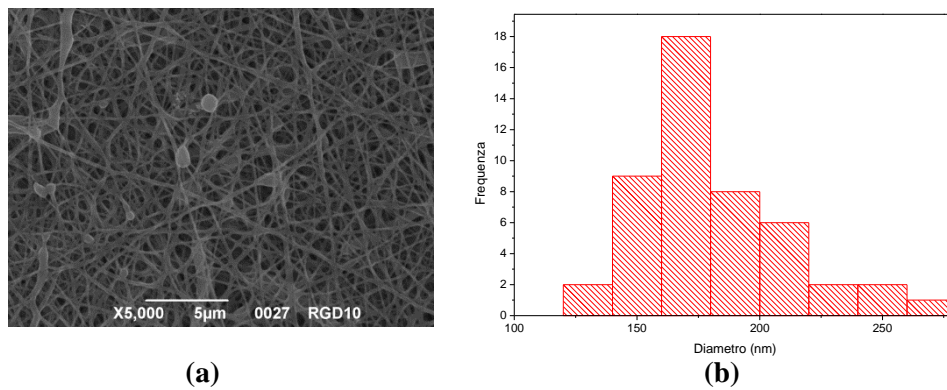


Figura 3.47 - Micrografia SEM del campione RGD-EAK ottenuto con una concentrazione di peptide del 10% (a) e distribuzione dei diametri relativa (b.)

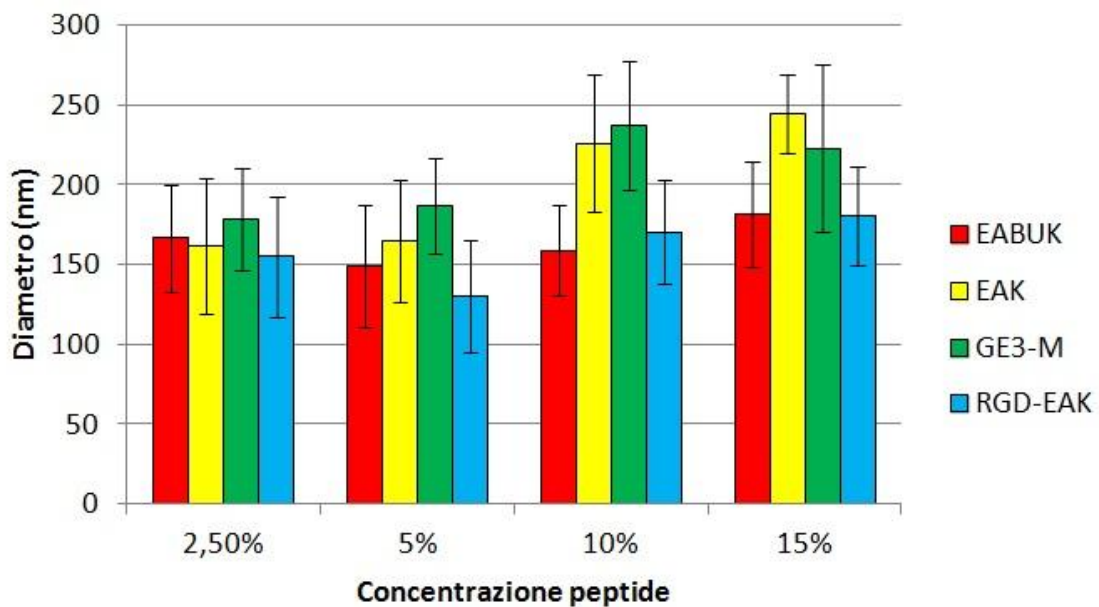


Figura 3.48 - Diametro medio delle nanofibre dei campioni testati.

A questo punto è stato ricavato un modello di *fitting* dei dati sperimentali il cui valore di  $R^2$  è 0.9351, abbastanza alto da poter considerare attendibile il modello stesso. Le equazioni finali ottenute in termini di variabili reali sono:

Sequence RGD-EAK

$$\text{DIAMETRO} = +134.2 + 3.0 * \text{Concentration}$$

Sequenza EABuK

$$\text{DIAMETRO} = +151.9 + 1.49 * \text{Concentration}$$

Sequenza EAK

$$\text{DIAMETRO} = +138 + 7.5 * \text{Concentration}$$

Sequenza GE3-M

$$\text{DIAMETRO} = +158.5 + 7.0 * \text{Concentration}$$

Il confronto tra i dati predetti dal modello e i dati sperimentali è rappresentato in Figura 3.49. Si può osservare come i valori sperimentali siano in accordo con quelli predetti dal modello, confermando quindi l'adeguatezza del modello proposto.

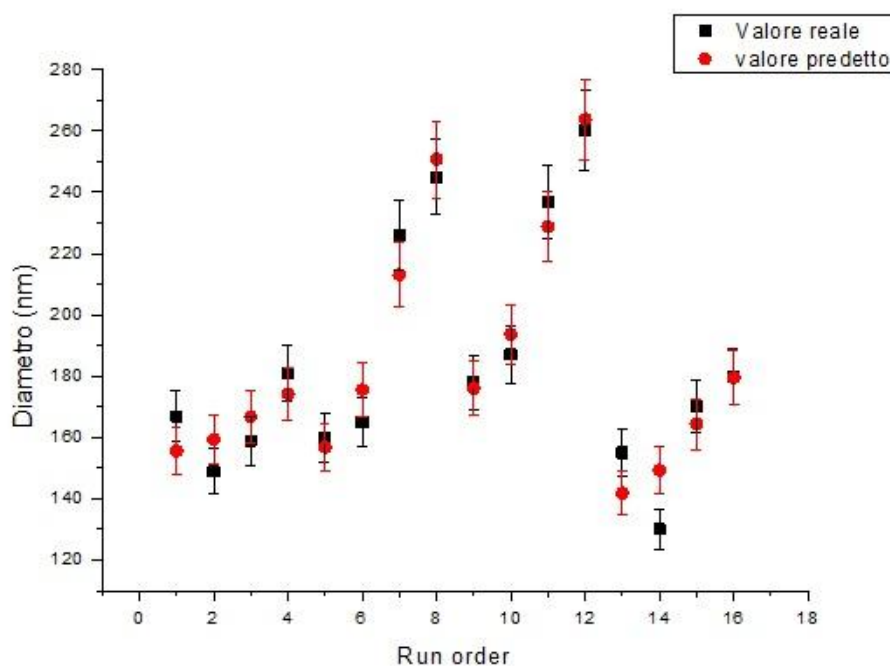


Figura 3.49 - Grafico dei valori sperimentali e dei valori predetti di Diametro medio.

Dalle equazioni e dalla rappresentazione grafica in Figura 3.50 è possibile notare che l'aumento di peptide comporta in generale un aumento del diametro medio delle fibre, seppure in genere piuttosto lieve; nei casi di GE3-M e EAK l'aumento del diametro è superiore. Tale comportamento è legato alla variazione delle principali proprietà della soluzione a seguito dell'arricchimento con i peptidi che vanno a modificare sia la conducibilità elettrica, sia la viscosità della soluzione stessa. L'effetto complessivo è probabilmente legato alla somma di più effetti concorrenti: l'aumento di concentrazione del peptide porta a un aumento della conducibilità della soluzione a cui, in genere, corrisponde una riduzione del diametro medio, a fronte dell'aumento dei fenomeni di *bending* [48]; un

altro effetto dell'aumento del peptide in soluzione è l'incremento della viscosità, a cui corrisponde un maggiore diametro medio, poiché si viene a limitare lo stretching del getto elettrofilato [49].

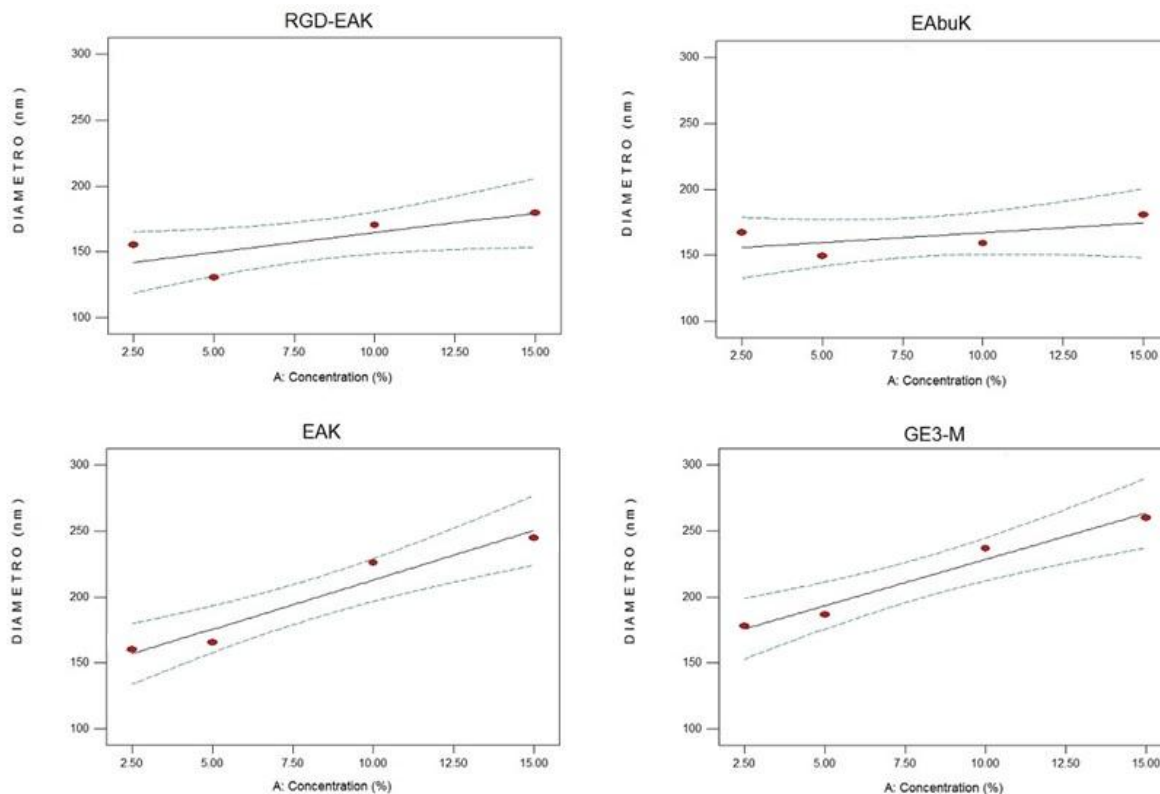


Figura 3.50 – Andamento grafico delle equazioni per il diametro medio.

### 3.3.3 - Angolo di contatto

La bagnabilità dei campioni in esame è stata eseguita presso il Dipartimento di Scienze Chimiche dell'Università degli Studi di Catania, nei laboratori del Prof. G. Marletta dalla dottoressa G. Messina mediante misura di angolo di contatto in *sessile drop*. Per effettuare le misure è stato utilizzato uno strumento OCA30 (Dataphysics) a 25°C. Una goccia di acqua ultrapura di volume pari a 2µl è stata depositata su diverse zone del campione, fissato su un vetrino da microscopio con nastro biadesivo. Almeno tre misure sono state fatte su ogni campione.

Nel caso di PCL + 2,5% EAbuK e PCL + 2.5% RGD-EAK la superficie ha mostrato una certa disomogeneità nella risposta e sono riportati più valori.

Tabella 3.10 – Misure dell'angolo di contatto per le varie superfici.

Campione	Valore di $\theta^\circ$		
<b>PCL</b>	118.3±9.1		
<b>PCL + 2.5% EAK</b>	62.2±3.3		
<b>PCL + 5% EAK</b>	51.6±4.4		
<b>PCL + 10% EAK</b>	25.0±6.0		
<b>PCL + 15% EAK</b>	23.6±6.5		
<b>PCL + 2.5% EAbuK</b>	Val. I=54.2±10.4	Val.II=121.8±2.3	Val. III=88.0±34.7
<b>PCL + 5% EAbuK</b>	38.3±7.8		
<b>PCL + 10% EAbuK</b>	32.6±3.3		
<b>PCL + 15% EAbuK</b>	30.1±3.8		
<b>PCL + 2.5% GE3-M</b>	85.9±10.2		
<b>PCL + 5% GE3-M</b>	52.1±3.7		
<b>PCL + 10% GE3-M</b>	47.1±6.5		
<b>PCL + 15% GE3-M</b>	35.7±2.5		
<b>PCL + 2.5% RGD-EAK</b>	Val. I=69.5±1.9	Val.II=118.3±4.3	Val. III=93.9±24.6
<b>PCL + 5% RGD-EAK</b>	57.3±0.4		
<b>PCL + 10% RGD-EAK</b>	23.3±3.1		
<b>PCL + 15% RGD-EAK</b>	37.6±5.6		

Si può notare come l'aggiunta del peptide porti a una diminuzione dell'angolo di contatto rispetto al solo PCL e che, aumentando la quantità di peptide, la bagnabilità della superficie tende ad aumentare fino a un certo limite (con la sola eccezione del 15% RGD-EAK che porta a un lieve aumento di  $\theta$ ). Questo dovrebbe favorire le matrici contenenti i peptidi nella fase d'interazione con le cellule.

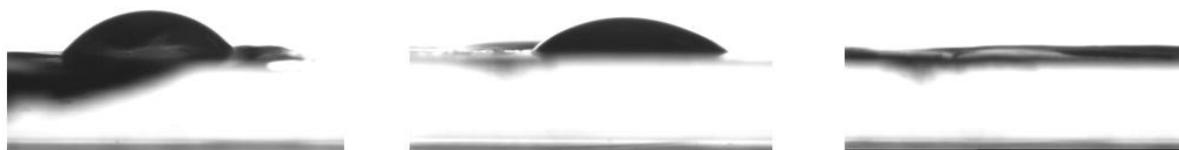


Figura 3.51 – Immagini dell'angolo di contatto su alcune delle superfici.

### 3.3.4 - Test alla ninidrina

#### 3.3.4.1 - Procedura

L'analisi, nel caso delle superfici elettrofilate, è stata effettuata, come riportato da Chuysinuan et al. [50], prelevando un campione e staccando delicatamente lo strato polimerico dal supporto di alluminio per ottenere porzioni di peso compreso tra 0,3 e 2 mg. I campioni così ottenuti sono stati pesati e ricoperti con 250  $\mu\text{L}$  di una soluzione 1 M di ninidrina in etanolo per 30 secondi, questo li ha portati ad assumere una colorazione gialla; sono stati poi messi in una provetta di vetro e riscaldati a 80 °C per 15 minuti, in modo da accelerare la reazione (che può portare a una colorazione da rosata a porpora). I campioni trattati in questo modo sono stati insuflati con azoto per eliminare le tracce di etanolo e poi sciolti in 250  $\mu\text{L}$  di diossano (marca). La soluzione ottenuta per ogni campione è stata stabilizzata per aggiunta di 250  $\mu\text{L}$  di 2-propanolo (IPA, Sigma Aldrich) e 500  $\mu\text{L}$  sono stati inseriti in una cuvetta. Si è fatta l'analisi con uno spettrofotometro UV/Vis Lambda 2 (Perkin Elmer) a 538 nm. Il riferimento, detto "bianco", è stato ottenuto con una soluzione 1:1 di diossano e IPA.

Per calcolare il numero di gruppi reattivi è stata fatta una retta di taratura partendo da una soluzione  $1 \times 10^{-2}$  M di GE3-M in acqua MilliQ (1,31 mg in 0,1 mL). Questa soluzione è stata fatta reagire con ninidrina, scaldata per 15 minuti a 80 °C e diluita a varie concentrazioni in IPA:diossano in rapporto 1:1.



### 3.3.4.2 - Risultati e discussione

Il dato che ci interessa rilevare è il numero di moli di gruppi amminici superficiali, in modo da poterlo mettere in relazione con la quantità di peptide espressa sulla superficie delle fibre. Per poter ottenere questo dato abbiamo misurato l'assorbanza delle soluzioni e l'abbiamo messa in relazione al numero di moli attraverso la retta di taratura seguente, ottenuta misurando delle soluzioni con una concentrazione molare di gruppi amminici nota.

molarità	assorb
100 $\mu\text{M}$	0,23
50 $\mu\text{M}$	0,094
25 $\mu\text{M}$	0,082
12,5 $\mu\text{M}$	0,029

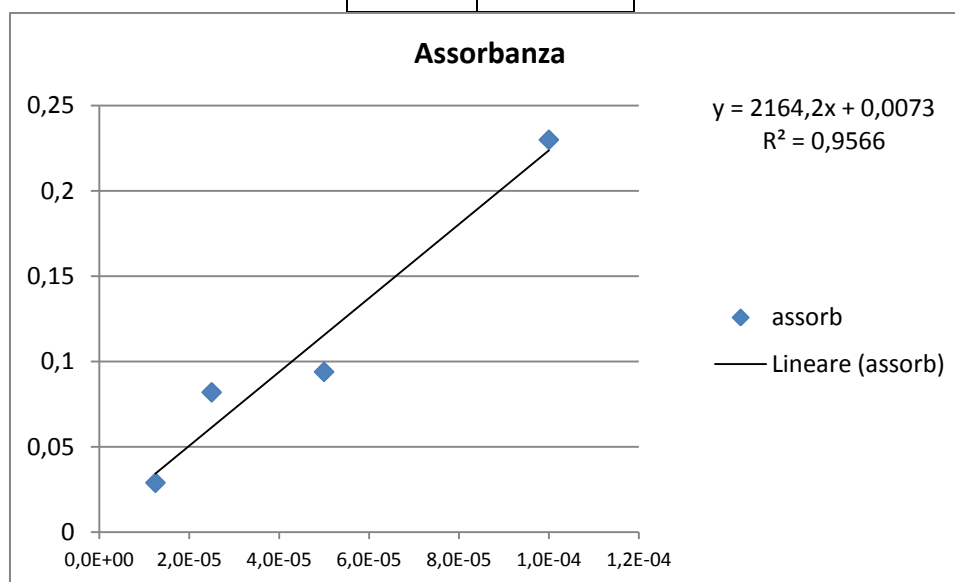


Figura 3.52 – Valori e curva standard ottenuta.

Nel seguito vengono mostrati i dati e i calcoli fatti per ottenere il numero di moli di gruppi amminici, successivamente saranno presentati dei grafici riassuntivi suddivisi prima per tipologia di peptide, al fine di valutare l'effetto della variazione di concentrazione, poi per percentuale di peptide, in modo da considerare l'effetto della variazione di peptide. Tutte le prove sono state svolte in triplicato e vengono presentate come valore medio  $\pm$  deviazione standard.

Tabella 3.11 – Dati e misure del test alla ninidrina.

campione	peso (mg)	assorbanza	molarità reattiva	molarità reattiva/peso	moli reag/peso * 10 <sup>4</sup>	media	st.dev.
PCL	1,91	0,192	2,84478E-05	1,48941E-05	7,447060552	7,37318305	1,0174524
PCL	1,74	0,196	2,90639E-05	1,67034E-05	8,351683136		
PCL	1,3	0,114	1,64341E-05	1,26416E-05	6,320805461		
2,5% GE3-M	1,76	0,714	0,000108847	6,18449E-05	30,92244177	27,9583888	2,8223917
2,5% GE3-M	2,18	0,79	0,000120553	5,52994E-05	27,64968558		
2,5% GE3-M	2,23	0,74	0,000112852	5,06061E-05	25,30303903		
5% GE3-M	2,79	0,87	0,000132874	4,76252E-05	23,81260739	26,5844551	11,816916
5% GE3-M	2,06	1,065	0,000162909	7,90818E-05	39,54090826		
5% GE3-M	2,91	0,827	9,54471E-05	3,27997E-05	16,39984956		
10% GE3-M	0,87	0,55	8,35875E-05	9,60776E-05	48,03677518	46,5810066	4,4979773
10% GE3-M	1,06	0,579	8,80541E-05	8,30899E-05	41,53494922		
10% GE3-M	0,48	0,32	4,81625E-05	0,000100339	50,1692953		
15% GE3-M	0,41	0,08	1,11974E-05	2,73106E-05	13,65532092	17,9524347	4,8925131
15% GE3-M	0,44	0,104	1,48939E-05	3,38497E-05	16,92486271		
15% GE3-M	0,31	0,101	1,44318E-05	4,65542E-05	23,27712045		
2,5% RGD-EAK	0,51	0,355	5,35533E-05	0,000105006	52,5032118	49,8968102	7,8208038
2,5% RGD-EAK	1,3	0,954	0,000145812	0,000112163	56,08159822		
2,5% RGD-EAK	0,85	0,461	6,98796E-05	8,22112E-05	41,1056207		
5% RGD-EAK	0,8	0,426	6,44888E-05	8,0611E-05	40,30550165	55,3516072	16,857194
5% RGD-EAK	0,37	0,258	3,86132E-05	0,00010436	52,17998703		
5% RGD-EAK	0,32	0,313	4,70844E-05	0,000147139	73,56933278		
10% RGD-EAK	0,57	0,575	8,7438E-05	0,0001534	76,70000557	105,060419	30,487274
10% RGD-EAK	0,34	0,454	6,88014E-05	0,000202357	101,1785363		
10% RGD-EAK	0,31	0,56	8,51277E-05	0,000274605	137,3027158		
15% RGD-EAK	0,54	0,448	6,78773E-05	0,000125699	62,84932932	83,0183023	17,527755
15% RGD-EAK	0,24	0,302	4,53901E-05	0,000189126	94,5627843		
15% RGD-EAK	0,33	0,4	6,04842E-05	0,000183286	91,64279333		
2,5% EAbuK	1,42	0,968	0,000147968	0,000104203	52,10156915	49,9451946	2,5344128
2,5% EAbuK	1,28	0,848	0,000129486	0,000101161	50,5804204		
2,5% EAbuK	0,87	0,54	8,20473E-05	9,43072E-05	47,15359414		
5% EAbuK	0,4	0,465	7,04956E-05	0,000176239	88,11955149	83,3561266	22,520817
5% EAbuK	0,48	0,65	9,89896E-05	0,000206228	103,1141864		
5% EAbuK	0,98	0,756	0,000115316	0,000117669	58,83464189		
10% EAbuK	0,36	0,866	0,000104534	0,000290373	145,1866569	144,882473	16,147226
10% EAbuK	0,34	0,575	8,7438E-05	0,000257171	128,5853034		
10% EAbuK	0,3	0,634	9,85253E-05	0,000321751	160,8754582		
15% EAbuK	0,69	1,224	0,000187398	0,000271591	135,7956237	125,295003	28,660728
15% EAbuK	0,23	0,447	6,77233E-05	0,000294449	147,2244656		
15% EAbuK	0,46	0,562	8,54357E-05	0,00018573	92,86492046		
2,5% EAK	2,02	1,044	0,000159674	7,90466E-05	39,52328973	45,357944	5,1657313
2,5% EAK	1,12	0,725	0,000110541	9,86975E-05	49,34876409		
2,5% EAK	1,06	0,657	0,000100068	9,44036E-05	47,20177805		
5% EAK	0,23	0,136	1,98226E-05	8,61851E-05	43,09253746	52,7717631	8,8511514
5% EAK	0,42	0,306	4,60062E-05	0,000109539	54,76931246		
5% EAK	0,22	0,18	2,65995E-05	0,000120907	60,4534393		
10% EAK	0,24	0,444	6,72612E-05	0,000280255	140,1274785	179,539951	35,773988
10% EAK	0,33	0,907	0,000138573	0,000419919	209,9593103		
10% EAK	0,43	1,06	0,000162138	0,000377066	188,5330634		
15% EAK	0,53	1,425	0,000218356	0,000411993	205,996493	197,399969	9,1450423
15% EAK	0,14	0,368	5,55556E-05	0,000396825	198,4126984		

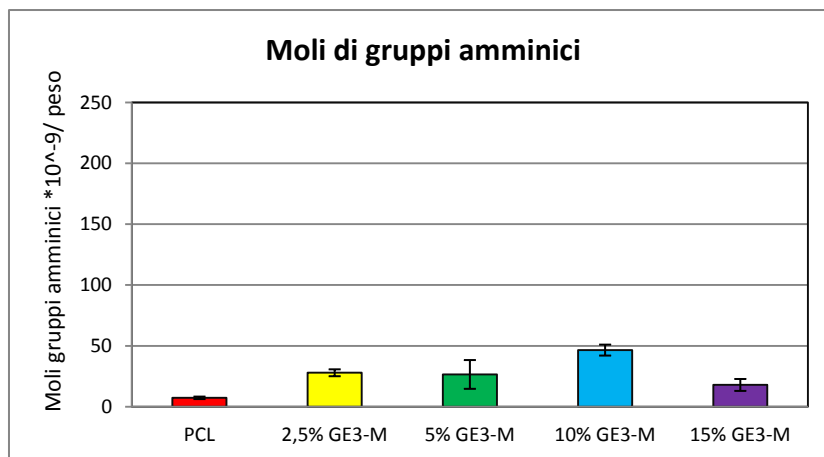


Figura 3.53 – Moli di gruppi amminici superficiali misurate con test alla ninidrina. Campioni contenenti peptide GE3-M (controllo) e riferimento. Nessun valore è risultato significativo.

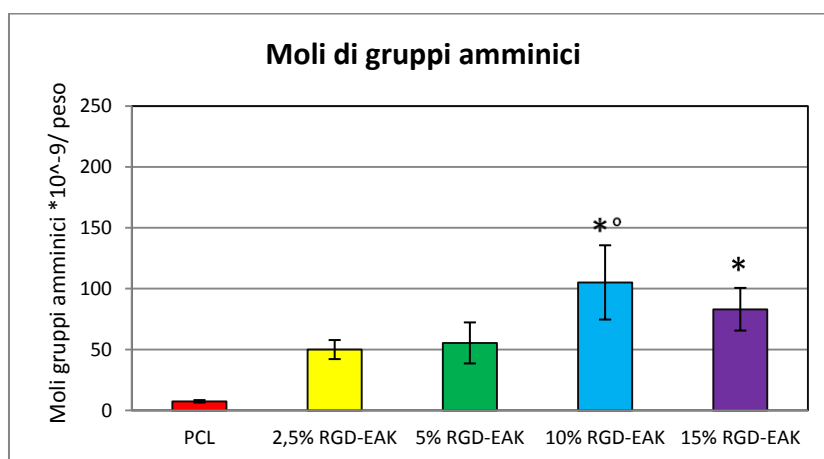


Figura 3.54 – Moli di gruppi amminici superficiali misurate con test alla ninidrina. Campioni contenenti peptide RGD-EAK e riferimento. \* =  $p$ -value < 0.05 vs PCL, ° =  $p$ -value < 0.05 vs 5% RGD-EAK con One-Way ANOVA.

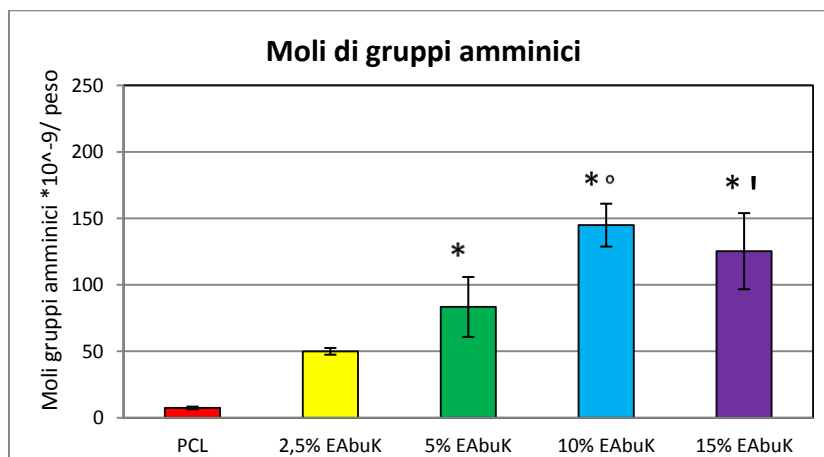


Figura 3.55 – Moli di gruppi amminici superficiali misurate con test alla ninidrina. Campioni contenenti peptide EAbuK e riferimento. \* =  $p$ -value < 0.05 vs PCL, ° =  $p$ -value < 0.05 vs 2,5% EAbuK/ 5% EAbuK, † =  $p$ -value < 0.05 vs 2,5% EAbuK con One-Way ANOVA.

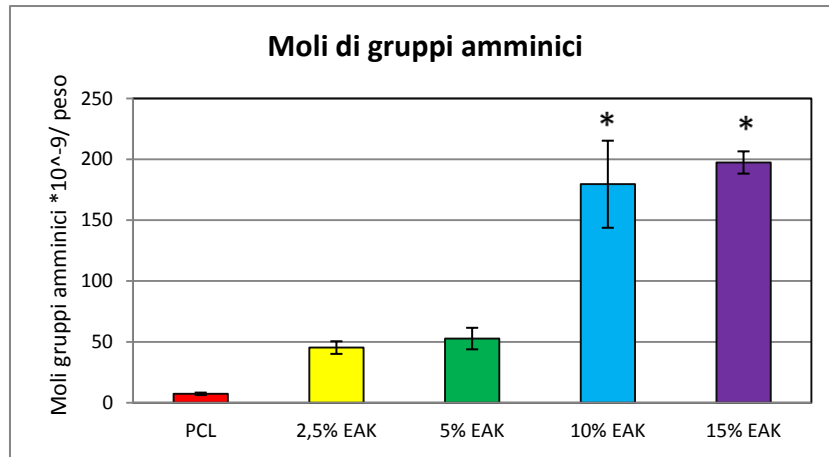


Figura 3.56 – Moli di gruppi amminici superficiali misurate con test alla ninidrina. Campioni contenenti peptide EAK e riferimento. \* = p-value < 0.05 vs PCL/ 2,5% EAK/ 5% EAK con One-Way ANOVA.

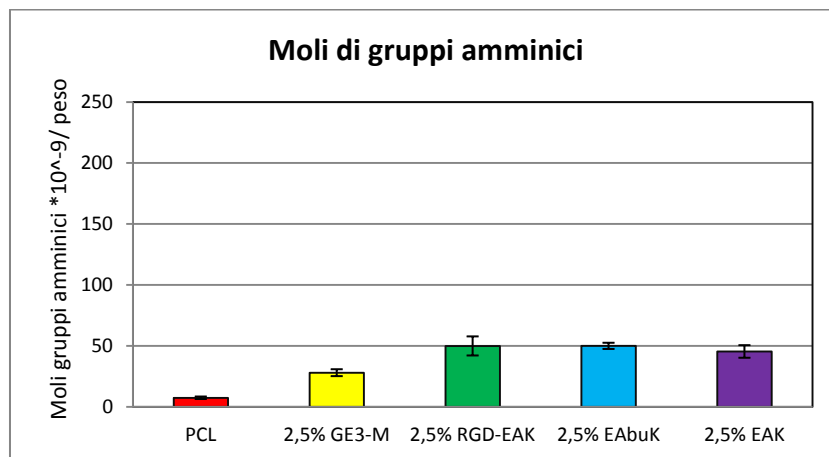


Figura 3.57 – Moli di gruppi amminici superficiali misurate con test alla ninidrina. Campioni contenenti 2,5% di peptide e riferimento. Nessun valore è risultato significativo.

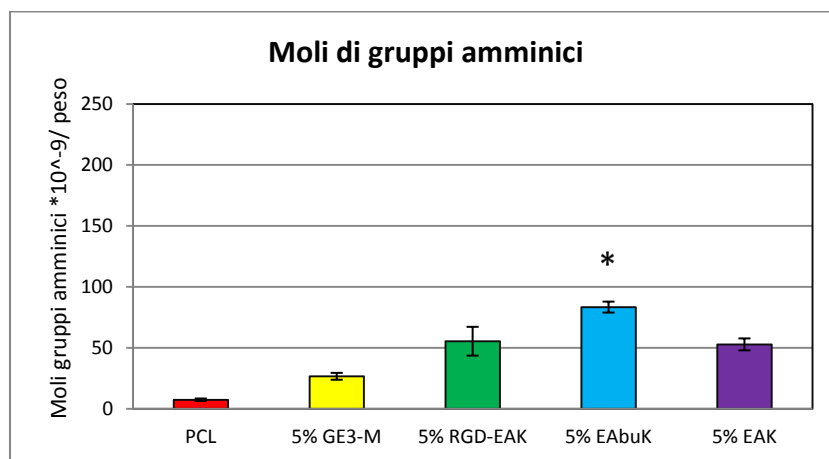


Figura 3.58 – Moli di gruppi amminici superficiali misurate con test alla ninidrina. Campioni contenenti 5% di peptide e riferimento. \* = p-value < 0.05 vs PCL/ 5% GE3-M con One-Way ANOVA.

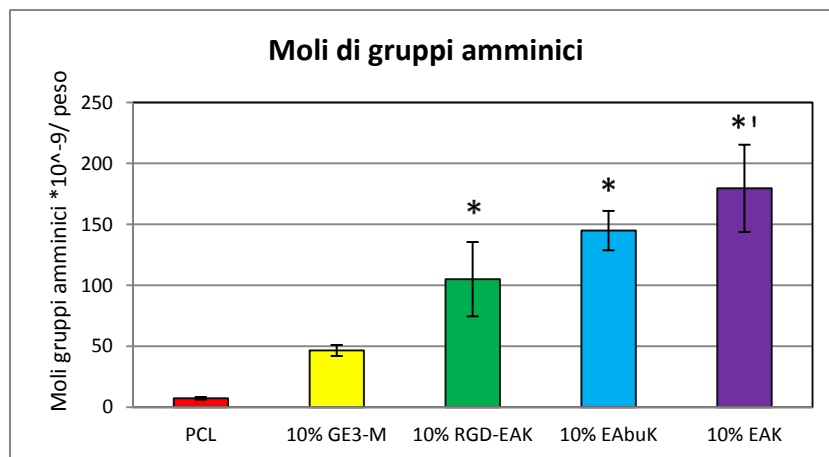


Figura 3.59 – Moli di gruppi amminici superficiali misurate con test alla ninidrina. Campioni contenenti 10% di peptide e riferimento. \* =  $p$ -value < 0.05 vs PCL/ 10% GE3-M, † =  $p$ -value < 0.05 vs 10% RGD-EAK con One-Way ANOVA.

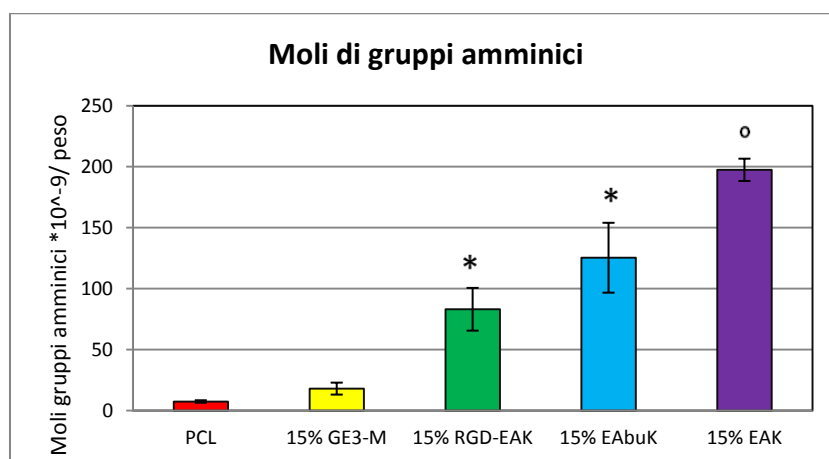


Figura 3.60 – Moli di gruppi amminici superficiali misurate con test alla ninidrina. Campioni contenenti 15% di peptide e riferimento. \* =  $p$ -value < 0.05 vs PCL/ 15% GE3-M, ° =  $p$ -value < 0.05 vs tutti gli altri campioni presi in esame con One-Way ANOVA.

I valori mostrano un incremento del numero di moli di gruppi amminici in superficie all'aumentare della concentrazione di peptide in matrice, come atteso; tuttavia si ha in tutti i casi un andamento non lineare. In particolare i peptidi auto-aggreganti sembrano raggiungere un limite di saturazione al 10%, infatti i valori al 10% e 15% di arricchimento potrebbero essere equivalenti (non ci sono differenze significative tra loro). Nel caso del GE3-M si ha non solo un raggiungimento di un limite ma addirittura un calo della quantità di gruppi amminici esposti. L'andamento nei grafici a parità di arricchimento va però valutato considerando anche il numero di gruppi amminici esposti da ogni peptide (3 per il GE3-M, 5 per EAK e EAbuK, 6 per RGD-EAK). Si può quindi intuire che l'arricchimento superficiale

per le matrici contenenti EAK e EAbuK è maggiore di quello ottenuto per l'RGD-EAK, in quanto i valori risultano superiori pur avendo meno gruppi amminici su ogni peptide.

### 3.3.5 - Analisi XPS

Nella nostra applicazione l'analisi è stata svolta presso il Dipartimento di Fisica dell'Università Roma Tre nel laboratorio della Prof.ssa G. Iucci allo scopo confermare l'arricchimento progressivo in peptide della superficie della fibra elettrofilata.

Sono stati analizzati tutti i campioni. La calibratura degli spettri è stata fatta rispetto al picco principale del C1s, relativo al legame C-C di tipo alifatico (C1) posizionato a 285,0 eV. È stata misurata la Binding Energy (BE) dei diversi segnali, che fornisce indicazioni sul loro intorno chimico; inoltre dalle aree dei segnali, mediante l'utilizzo di fattori di sensibilità di Scofield, è stato possibile risalire ai rapporti atomici dei vari elementi.

#### Spettro del PCL

I segnali C1s e O1s del PCL presentano una forma complessa e sono stati analizzati mediante un programma di curve-fitting utilizzando funzioni gaussiane come picchi componenti. Il segnale C1s è stato analizzato usando tre picchi, indicati in figura come C1, C2, C3 in ordine di BE crescente; il segnale O1s appare formato da due picchi, O1 e O2. Nella figura, i markers (●) rappresentano i punti sperimentali, le linee lo spettro calcolato e le sue componenti.

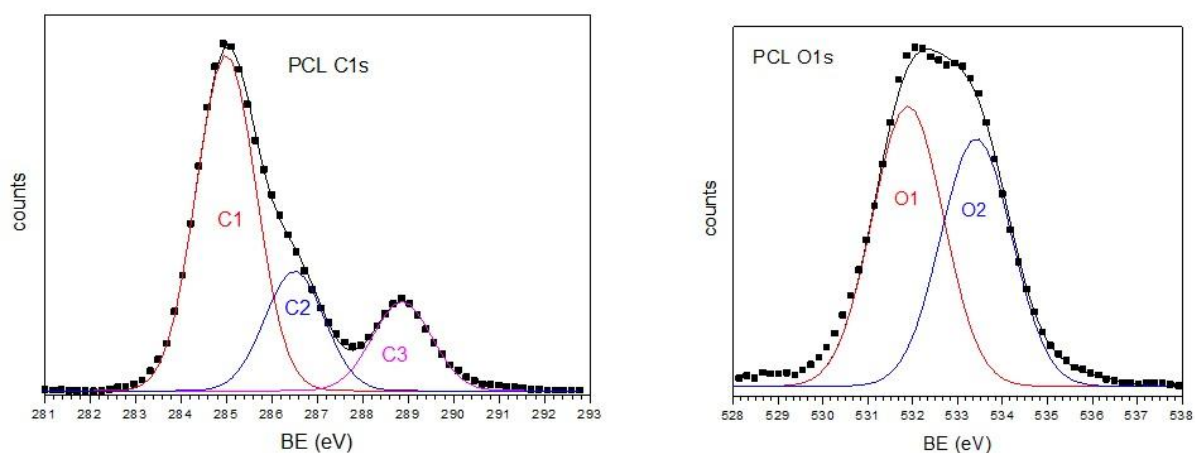


Figura 3.61 – Curve-fitting dei dati sperimentali dell'analisi XPS su PCL.

La tabella seguente mostra le BE misurate per i vari segnali e le rispettive assegnazioni in base al confronto con i dati di letteratura [51].

Tabella 3.12 – Confronto tre Binding Energy misurata e nei riferimenti.

Segnale	C1s				O1s	
	C1	C1*	C2	C3	O1	O2
assegnazione	C-C		C-O	O-C=O	O=C	O-C
BE (eV) misurata	285		286,5	288,9	531,9	533,4
BE riferimento	285	285,43	286,54	289,08	532,24	533,54

Il primo picco (C1) nello spettro C1s è dovuto a carboni di tipo alifatico, il secondo (C2) a carboni di tipo etero (C-O), il terzo (C3) ai carboni carbossilici (O-C=O). Nello spettro O1s il primo picco (O1) è dovuto a ossigeni di tipo carbonilico (O=C), il secondo (O2) a ossigeni di tipo O-C.

Il valore C1\* corrisponde al carbonio alifatico  $\alpha$  al gruppo carbonilico, indistinguibile dal C1 nel nostro caso, dato che l'XPS utilizzato non è dotato di monocromatore.

In base all'area dei vari picchi sono stati determinati i rapporti atomici fra i diversi tipi di atomi; i risultati sono mostrati in Tabella 3.13 e confrontati con i risultati attesi per il PCL sulla base della struttura molecolare, mostrata in figura.

Tabella 3.13 – Confronto tra rapporti atomici sperimentali e nei riferimenti.

Rapporti atomici	C2/C1	C3/C1	O2/O1	O/C
misurati	0,36	0,26	0,88	0,36
teorici	0,25	0,25	1	0,4

Complessivamente c'è un buon accordo tra dati sperimentali e teorici. Il rapporto C2/C1 risulta un po' più alto del previsto, forse perché sono stati uniti i segnali C1 e C1\* in un unico picco.

### Spettri del PCL + peptidi

In tutti i campioni analizzati sono stati registrati i segnali C1s, O1s, N1s. I segnali C1s e O1s sono stati analizzati usando rispettivamente tre e due picchi, analogamente agli spettri del PCL; il segnale N1s appare simmetrico ed è stato analizzato usando un solo picco. Le BE misurate sono mostrate in tabella.

Tabella 3.14 – Binding Energy misurate.

Segnale		C1s			O1s		N1s
		C1	C2	C3	O1	O2	
<b>PCL</b>	2,5%	285	286,5	288,9	531,9	533,4	399,9
	5%	285	286,5	288,8	531,8	533,4	399,8
<b>EAK</b>	10%	285	286,5	288,7	531,7	533,3	399,8
	15%	285	286,5	288,7	531,8	533,4	399,9
<b>PCL</b>	2,5%	285	286,5	288,8	531,8	533,3	399,8
	5%	285	286,5	288,8	531,9	533,5	399,8
<b>EAbuK</b>	10%	285	286,5	288,7	531,6	533,3	399,8
	15%	285	286,5	288,7	531,7	533,3	399,8
<b>PCL</b>	2,5%	285	286,5	288,8	531,8	533,3	399,8
	5%	285	286,5	288,8	531,7	533,3	399,8
<b>RGD-EAK</b>	10%	285	286,5	288,7	531,6	533,2	399,9
	15%	285	286,5	288,7	531,8	533,4	400
<b>PCL</b>	2,5%	285	286,5	288,8	531,8	533,3	399,8
	5%	285	286,5	288,8	531,8	533,3	399,8
<b>GE3M</b>	10%	285	286,5	288,7	531,7	533,3	399,9
	15%	285	286,5	288,7	531,8	533,3	399,9

Il dato più importante è la comparsa del segnale N1s ad una BE (circa 399,8-399,9 eV) tipica di una poliammide [51], ovvero dell'azoto del legame peptidico [52, 53]. Essendo il PCL il componente principale i segnali C1s e O1s sono complessivamente costanti. Quando erano stati effettuati gli spettri XPS di EAK, EAbuK e RGD EAK [4-6], il segnale C1s era stato analizzato utilizzando 3 picchi: C1 relativo ai carboni alifatici (C-C) a BE=285.0 eV, C2



relativo ai carboni O=C-C-N della catena peptidica a BE= 286,5 eV e C3 relativo ai carboni O=C-N della catena peptidica a BE=288,3 eV [4-6]. Con il nostro strumento non è possibile risolvere mediante *fitting* i segnali relativi ai carboni di tipo O=C-O e O=C-N, troppo vicini come BE; tuttavia nella tabella si osserva che il segnale C3 tende leggermente a spostarsi a più bassa BE al crescere della percentuale di peptide nel film.

I rapporti atomici misurati sono i seguenti:

Tabella 3.15 – Rapporti atomici misurati.

		C2/C1	C3/C1	O2/O1	O/C	N/C
<b>PCL + EAK</b>	2,5%	0,38	0,28	0,85	0,3	0,0065
	5%	0,38	0,275	0,79	0,355	0,013
	10%	0,4	0,29	0,71	0,39	0,03
	15%	0,38	0,28	0,62	0,41	0,037
<b>PCL + EAbuK</b>	2,5%	0,37	0,27	0,87	0,345	0,0095
	5%	0,365	0,265	0,87	0,333	0,015
	10%	0,36	0,26	0,82	0,345	0,029
	15%	0,375	0,275	0,705	0,38	0,039
<b>PCL + RGD-EAK</b>	2,5%	0,365	0,265	0,87	0,355	0,008
	5%	0,39	0,275	0,855	0,375	0,0155
	10%	0,39	0,285	0,85	0,36	0,027
	15%	0,34	0,26	0,70	0,41	0,0325
<b>PCL + GE3-M</b>	2,5%	0,375	0,27	0,82	0,375	0,0085
	5%	0,375	0,265	0,80	0,40	0,021
	10%	0,38	0,266	0,745	0,375	0,040
	15%	0,39	0,255	0,70	0,40	0,040

Il dato più significativo è l'aumento del contenuto di azoto (N/C) all'aumentare della percentuale di peptide, andamento che si riscontra in tutti i sistemi analizzati. C'è inoltre una lieve diminuzione del rapporto O2/O1 all'aumentare del peptide nel film; questo risultato è coerente con l'elevato numero di ossigeni di tipo O=C del legame peptidico ma presentano un contenuto più ridotto di ossigeni di tipo O-C. Gli altri rapporti non mostrano variazioni significative.

La tabella che segue mostra i rapporti atomici calcolati per i quattro peptidi investigati:

Tabella 3.16 – Rapporti atomici calcolati per i peptidi.

peptide	C2/C1	C3/C1	O2/O1	O/C	N/C
<b>EAK</b>	0,714	0,714	0,2	0,353	0,309
<b>EAbuK</b>	0,555	0,555	0,2	0,315	0,276
<b>RGD-EAK</b>	0,774	0,806	0,208	0,362	0,3375
<b>GE3-M</b>	0,552	0,448	0,272	0,241	0,276

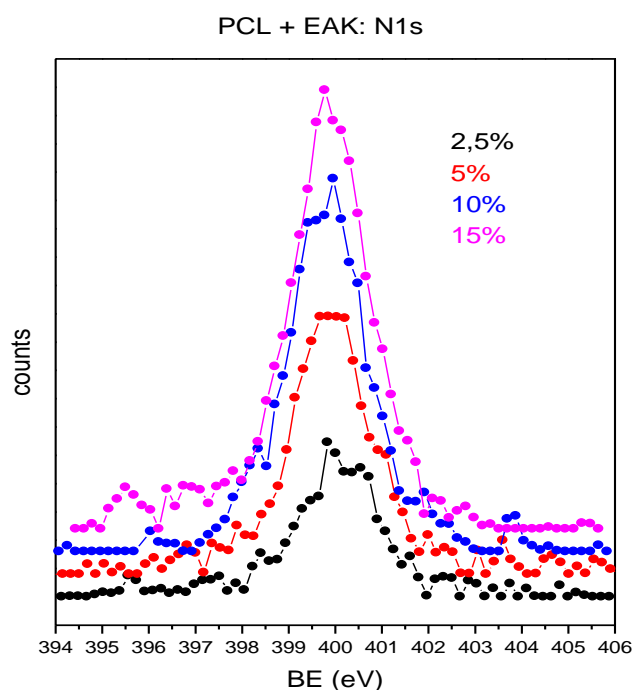


Figura 3.62 - Evoluzione del segnale N1s all'aumentare della percentuale di peptide per il sistema PCL + EAK.

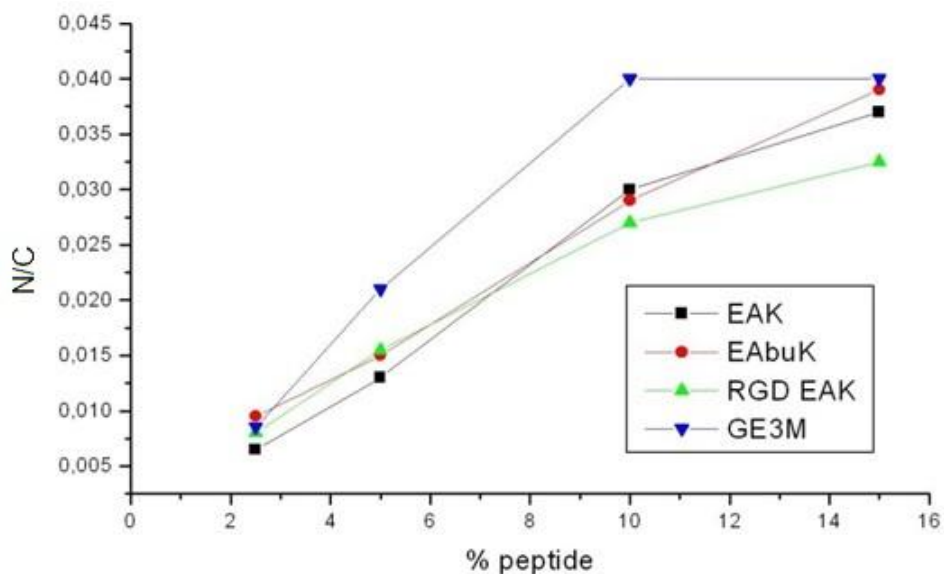


Figura 3.63 - Rapporto N/C in funzione della percentuale di peptide nella matrice.

Si conferma che il contenuto di azoto di tipo peptidico nel film cresce al crescere della percentuale di peptide nelle fibre, come atteso. L'incremento non sembra lineare per GE3-M e al 10% sembra esserci un effetto di saturazione. Quest'ultimo dato però forse meriterebbe di essere ricontrollato.

Le misure XPS per tutti e quattro i sistemi investigati, evidenziano l'efficace arricchimento con peptide delle fibre di PCL, in quantità crescente al crescere della percentuale di peptide aggiunto. La BE del segnale N1s è quella tipica di un azoto ammidico, come atteso. A partire da questi dati si può anche stimare la quantità di peptide in superficie in modo quantitativo.

Ci sono due approcci possibili, quello più semplice permette di stimare la percentuale di peptide facendo il rapporto tra rapporto atomico N/C misurato nel campione  $(N/C)_{meas}$  e rapporto N/C calcolato nel corrispondente peptide tal quale  $(N/C)_{pept}$ :

$$d(\%) = \frac{(N/C)_{meas}}{(N/C)_{pept}} \times 100$$

Per poter svolgere il calcolo si deve partire dai dati presenti nella tabella successiva:

Tabella 3.17 – Atomi dei vari elementi e rapporti calcolati per i quattro peptidi.

peptide	C	N	O	C1	C2	C3	O1	O2	C2/C1	C3/C1	O2/O1	O/C	N/C
<b>EAK</b>	68	21	24	28	20	20	20	4	0,714	0,714	0,2	0,353	0,309
<b>EAbuK</b>	76	21	24	36	20	20	20	4	0,555	0,555	0,2	0,315	0,276
<b>RGDEAK</b>	80	27	29	31	24	25	24	5	0,774	0,806	0,208	0,362	0,3375
<b>GE3M</b>	58	16	14	29	16	13	11	3	0,552	0,448	0,272	0,241	0,276

I risultati ottenuti sono presentati nella prima parte della tabella successiva.

Tabella 3.18 – Risultati per la stima della quantità di peptide superficiale.

		(N/C) <sub>meas</sub>	(N/C) <sub>pept</sub>	d (%)	(C/N) <sub>meas</sub>	N <sub>pept</sub>	C <sub>pept</sub>	n <sub>PCL</sub>	1/n <sub>PCL</sub>
<b>PCL</b>	2,50%	0,0065	0,309	2,1	154	21	68	527	0,0019
+	5%	0,013	0,309	4,2	77	21	68	258	0,0039
<b>EAK</b>	10%	0,03	0,309	9,7	33	21	68	105	0,0095
	15%	0,037	0,309	12,0	27	21	68	83	0,0120
<b>PCL</b>	2,50%	0,0095	0,276	3,4	105	21	76	356	0,0028
+	5%	0,015	0,276	5,4	67	21	76	221	0,0045
<b>EAbuK</b>	10%	0,029	0,276	10,5	34	21	76	108	0,0093
	15%	0,039	0,276	14,1	26	21	76	77	0,0130
<b>PCL</b>	2,50%	0,008	0,337	2,4	125	27	80	549	0,0018
+	5%	0,0155	0,337	4,6	65	27	80	277	0,0036
<b>RGD-EAK</b>	10%	0,027	0,337	8,0	37	27	80	153	0,0065
	15%	0,0325	0,337	9,6	31	27	80	125	0,0080
<b>PCL</b>	2,50%	0,0085	0,276	3,1	118	16	58	304	0,0033
+	5%	0,021	0,276	7,6	48	16	58	117	0,0085
<b>GE3M</b>	10%	0,04	0,276	14,5	25	16	58	57	0,0175
	15%	0,04	0,276	14,5	25	16	58	57	0,0175

Si può notare come il contenuto di EAK nelle matrici al 15% appaia sottostimato, come pure i valori di RGD-EAK nelle matrici al 10% e 15%. Al contrario il contributo di GE3-M appare sovrastimato nelle matrici al 5 e al 10%.

Un secondo metodo possibile è quello di calcolare il numero di unità monomeriche per molecola di peptide ( $n_{PCL}$ ), ovvero il suo inverso ( $1/n_{PCL}$ ) che corrisponde al numero di molecole di peptide per ogni unità monomerica di PCL.

Per poter fare questo calcolo è necessario innanzitutto considerare il rapporto  $(N/C)_{meas}$ , in cui gli atomi di azoto appartengono tutti al peptide, mentre gli atomi di carbonio appartengono soprattutto al PCL.

A noi interessa determinare  $n_{PCL}$  che possiamo trovare all'interno della formula:

$$(N/C)_{meas} = \frac{N}{C} = \frac{N_{pept}}{C_{pept} + C_{PCL}} = \frac{N_{pept}}{C_{pept} + 6 \times n_{PCL}}$$

In cui  $(N/C)_{meas}$  è un valore misurato, mentre  $N_{pept}$  e  $C_{pept}$  sono valori teorici, presi direttamente dalla Tabella 3.17.  $C_{PCL}$  è il numero di atomi di carbonio provenienti dal PCL e lo si può ottenere dal numero di unità monomeriche per molecola di peptide, moltiplicandolo per il numero di atomi di carbonio presente in ogni unità monomerica.

Da cui:

$$(C/N)_{meas} = \frac{C_{pept} + 6 \times n_{PCL}}{N_{pept}}$$

$$(N/C)_{meas} \times N_{pept} = C_{pept} + 6 \times n_{PCL} \Rightarrow n_{PCL} = [(N/C)_{meas} \times N_{pept} - C_{pept}] / 6$$

Da questi conti si possono ottenere le ultime due colonne della tabella e la stima di nostro interesse. Gli andamenti ottenuti con i due metodi sono molto simili tra loro e confermano che si ha una crescita della quantità di peptide in superficie (e nei primi 5-10 nm di spessore) all'aumentare della concentrazione di peptide inserito, questo andamento però sembra avere un limite superiore che al 10% è già raggiunto dal GE3-M, mentre gli altri peptidi tendono probabilmente a un *plateau* per concentrazioni più elevate. Nell' EAbuK l'effetto è meno marcato, mentre nell'RGD-EAK si ha un calo di pendenza piuttosto netto.

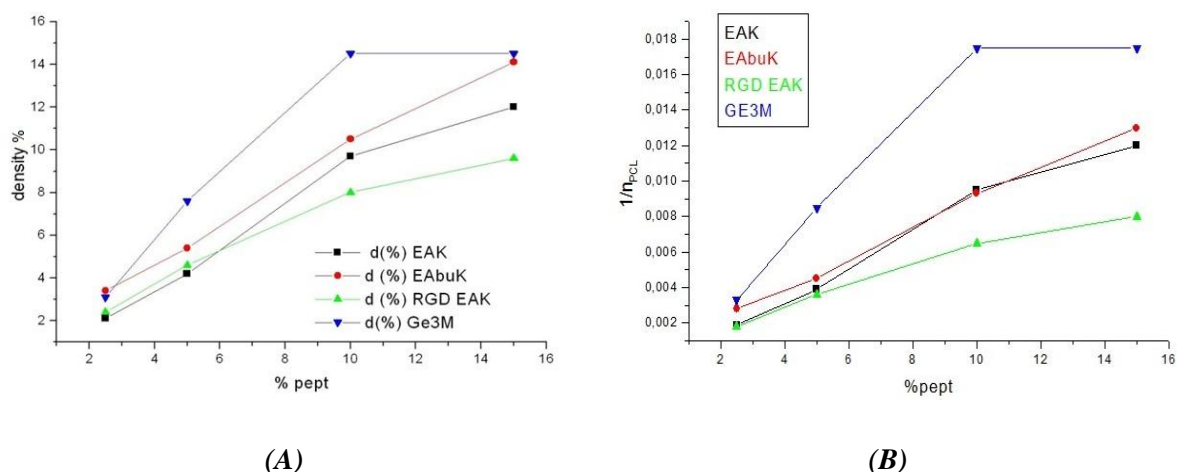


Figura 3.64 – Andamento calcolato di  $d(\%)$  (A) e  $1/n_{PCL}$  (B) per i quattro peptidi.

### 3.3.6 - Analisi FT-IR

L'analisi FT-IT è stata svolta presso il Dipartimento di Fisica dell'Università Roma Tre nel laboratorio della Prof.ssa G. Iucci allo scopo confermare l'arricchimento progressivo in peptide della superficie della fibra elettrofilata.

Sono stati registrati gli spettri FT-IR in riflettanza (mediante accessorio *monolayer grazing angle*) di tutti i campioni analizzati. La figura mostra lo spettro del PCL tal quale e lo spettro registrato in precedenza di EAK depositato su oro. I segnali principali sono quelli relativi allo stretching dei legami C-H della catena alifatica ( $\nu_{C-H}$ , a 2854, 2937  $\text{cm}^{-1}$ ) ed ai legami C=O ( $\nu_{C=O}$ , 1743  $\text{cm}^{-1}$ ) e C-O ( $\nu_{C-O}$ , 1175  $\text{cm}^{-1}$ ) del gruppo carbossilico della funzione esterea.

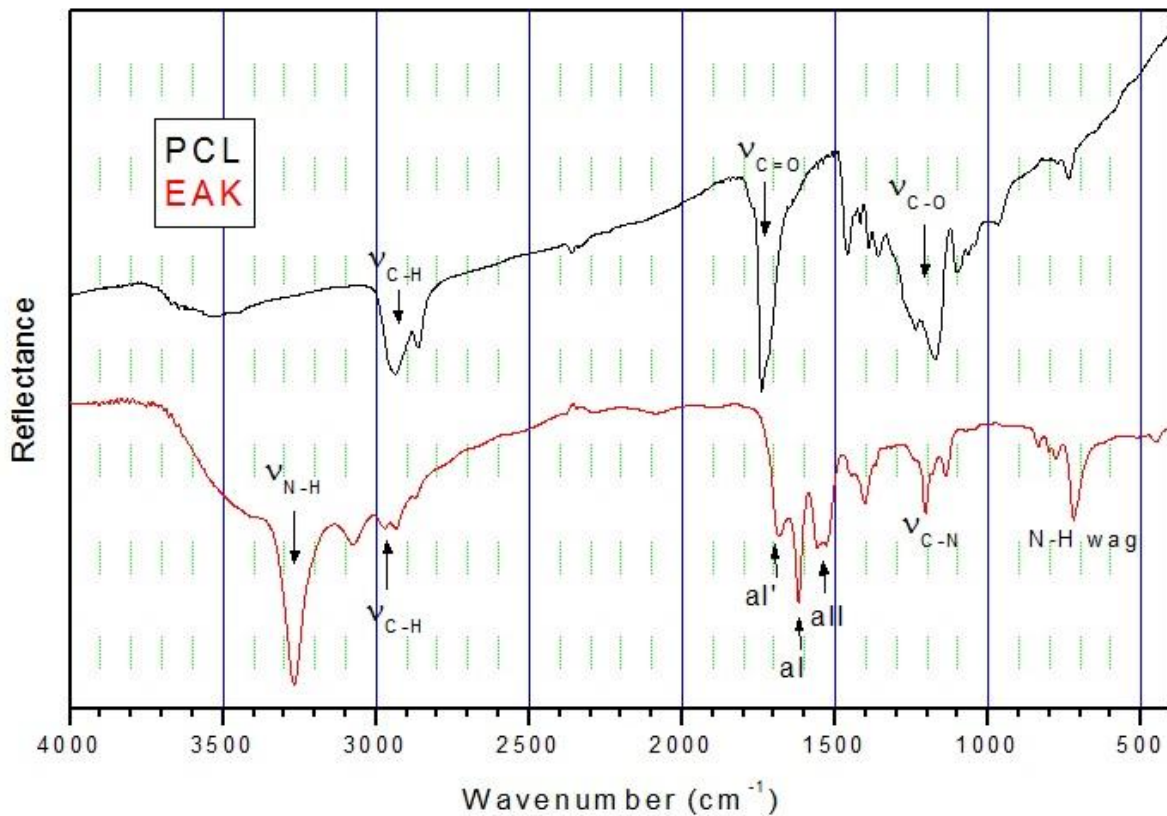


Figura 3.65 – Spettro FT-IR di PCL, misura bibliografica per EAK e assegnazione dei segnali relativi.

Gli altri spettri registrati in precedenza (EAbuK e RGD-EAK) risultano estremamente simili a quello dell'EAK.

Le bande più significative per le ammidi sono quelle comprese nella regione 1700-1500  $\text{cm}^{-1}$ , ossia le bande amide I (1610-1690  $\text{cm}^{-1}$ ) e amide II (circa 1550  $\text{cm}^{-1}$ ), corrispondenti rispettivamente allo *stretching* del legame C=O ( $\nu_{\text{C=O}}$ ) ed al *bending* dell'N-H ( $\delta_{\text{N-H}}$ ). La forma o struttura fine della banda amide I può fornire informazioni sulla conformazione dei peptidi. Per strutture di tipo  $\alpha$ -elica la banda amide I si trova a  $\sim 1650 \text{ cm}^{-1}$ , in parziale sovrapposizione con il *random coil*, mentre per strutture di tipo  $\beta$ -sheet la banda amide I si trova tra 1620 e 1640  $\text{cm}^{-1}$ , risultando la frequenza tanto più bassa quanto più forte è il legame idrogeno intercatena. Le strutture  $\beta$ -sheet presentano anche una seconda banda amide I (amide I') tra 1670 e 1685  $\text{cm}^{-1}$ .

Nello spettro di EAK (EAbuK e RGD-EAK) la banda amide I cade a circa 1620  $\text{cm}^{-1}$ , con una banda amide I' a 1680  $\text{cm}^{-1}$ , indice di una conformazione  $\beta$ -sheet.

In Figura 3.66 sono riportati gli spettri del PCL arricchito con EAK per osservare le modifiche indotte negli spettri rispetto al solo PCL. Gli spettri del PCL arricchito con EAbuK e RGD-EAK sono sostanzialmente identici.

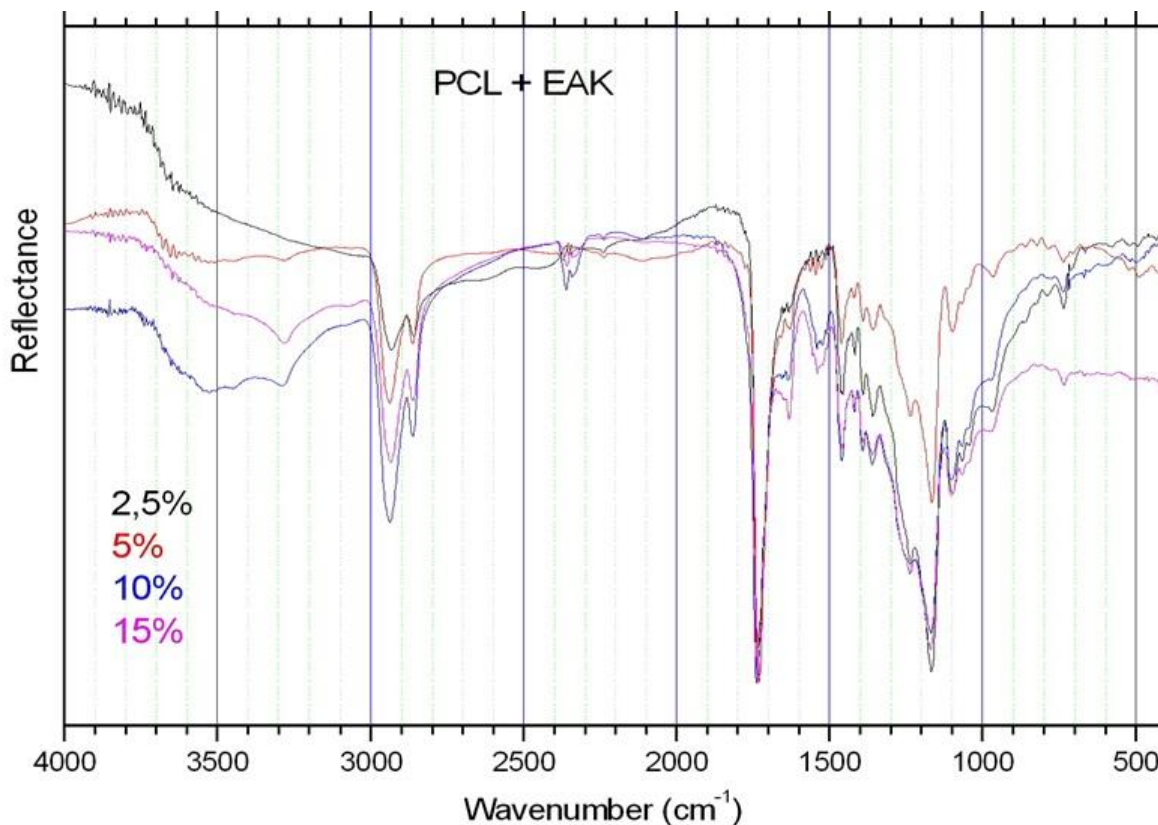


Figura 3.66 - Spettri FT-IR del PCL arricchito con EAK.

Il PCL rimane il componente principale delle matrici, quindi anche lo spettro FT-IR risulta simile a quello visto in precedenza. Si possono notare, tuttavia, alcune importanti differenze:

- compare la banda a  $3300\text{ cm}^{-1}$  tipica dello stretching dell'N-H ( $\nu_{\text{N-H}}$ ) in EAK;
- a fianco dello stretching C=O del PCL compaiono le bande amide I e amide II di EAK.

L'intensità delle bande del peptide aumenta al crescere della sua percentuale.

Per analizzare meglio le bande amide I e amide II conviene osservare l'espansione della regione  $1800\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$ .



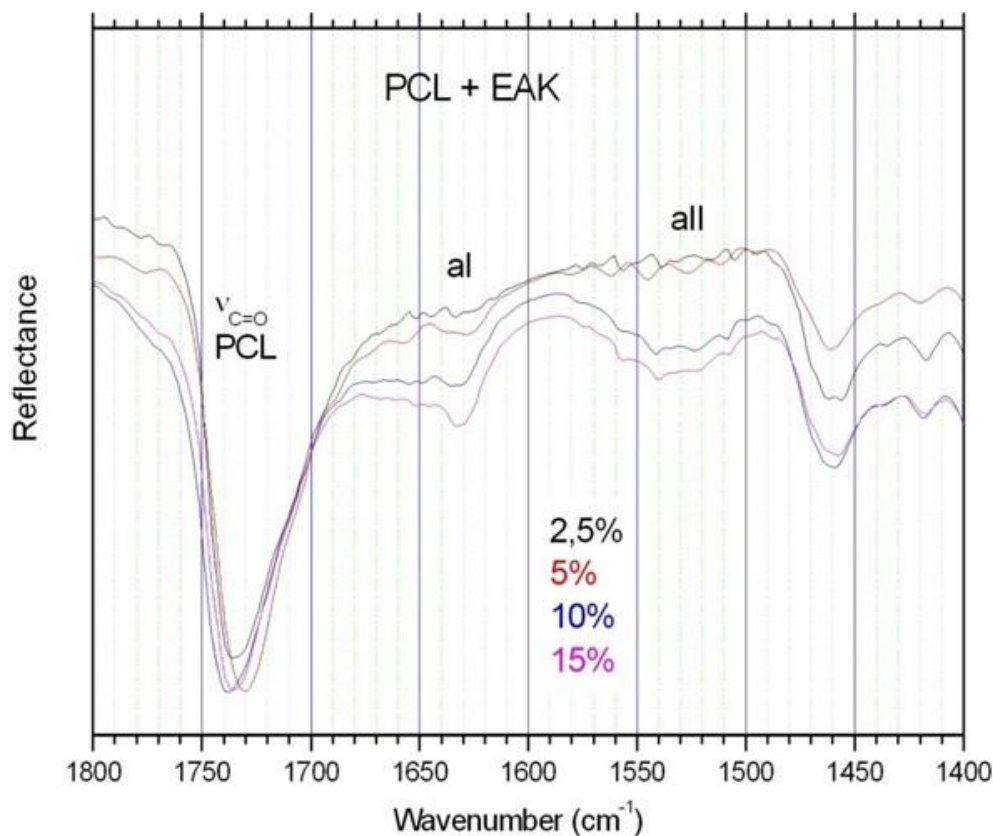


Figura 3.67 – Spettro FT-IR: espansione della regione 1800-1400  $\text{cm}^{-1}$ .

La figura mostra l'incremento dell'intensità delle bande amide I (aI, 1620-1630  $\text{cm}^{-1}$ ) e amide II (aII, circa 1530-1540  $\text{cm}^{-1}$ ) del peptide EAK rispetto allo stretching C=O del PCL al crescere della percentuale EAK. La banda amide I, inoltre, rimane in una posizione tipica della conformazione  $\beta$ -sheet, l'inserimento all'interno delle fibre di PCL sembra non cambiare la conformazione secondaria tipica degli auto-aggreganti. La banda amide I' non è visibile perché meno intensa e perché parzialmente coperta dallo stretching C=O del PCL. Per contro, gli spettri registrati per il sistema PCL + GE3M non mostrano alcun picco a 1620-1630  $\text{cm}^{-1}$ .

Gli spettri FTIR confermano che per i peptidi autoassemblanti, l'inserimento nelle fibre di PCL non sembra alterare la struttura secondaria: la  $\beta$ -sheet risulta invariata.

## 3.4 - SAGGI BIOLOGICI

Sono stati impiegati modelli di colture cellulari *in vitro* e tecniche di biologia molecolare per valutare l'interazione tra le matrici ottenute e le cellule. Queste prove sono state effettuate presso il laboratorio del Prof. Ignazio Castagliuolo, Dipartimento di Medicina Molecolare dell'Università degli Studi di Padova, in collaborazione e sotto la supervisione della Dott.ssa Paola Brun.

### 3.4.1 - Coltura cellulare

Gli osteoblasti umani sono stati isolati dall'osso mandibolare di un uomo sano adulto di 38 anni e coltivati a 37 °C (in atmosfera contenente il 5% di CO<sub>2</sub>) in fiasche per coltura cellulare in terreno completo costituito da Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM), addizionato di 20% (v/v) di siero bovino fetale (fetal bovine serum, FBS) inattivato al calore, di 10 U/ml di penicillina e streptomina, di 1% (v/v) di sodio piruvato, di 1% (v/v) di amminoacidi non essenziali e di 1 U/ml di insulina. Al raggiungimento del 90% di confluenza, le cellule sono state staccate mediante incubazione con tripsina e coltivate nel terreno di coltura di differenziazione arricchito con 50 µg/ml di acido ascorbico, 10 nM di desametasone e 10 mM di β-glicerofosfato, per almeno 10 gg prima di eseguire i saggi sperimentali. Il terreno è stato rinnovato ogni 3 gg. Tutti i reagenti utilizzati per la coltura cellulare sono stati forniti da Gibco, Milano.

### 3.4.2 - Semina delle cellule

Dalle matrici elettrofilate sono stati ottenuti dei campioni circolari del diametro di 14 mm con l'utilizzo di un punzone di acciaio inossidabile direttamente sul supporto di alluminio. Da ogni matrice elettrofilata sono stati ottenuti circa 10 campioni, prevedendo così alcuni campioni di scorta. I dischi così ottenuti sono stati fissati sul fondo di pozzetti di piastre per colture cellulari. In tali esperimenti sono state utilizzate piastre in polistirene da 24 pozzetti Costar (Corning, Glandale, AZ). Gli *scaffold* sono stati sterilizzati con etanolo (Carlo Erba, Roma, Italia) al 20% (v/v) per 10 min e, quindi, lavati con PBS.

Gli osteoblasti sono stati seminati in terreno di differenziazione alla concentrazione di  $1 \times 10^5$  cellule/cm<sup>2</sup>.

Per il saggio MTT sono stati utilizzati 3 dischi per ogni campione. Le piastre sono state incubate a 37 °C per 2 h, tempo precedentemente riportato come necessario per garantire l'adesione delle cellule [54]. Passato questo tempo, si è provveduto alla rimozione da ogni pozzetto del terreno e delle cellule non adese e al lavaggio con PBS, per eseguire il saggio MTT.

Analoga procedura è stata effettuata per la determinazione dei livelli di calcio, dove tuttavia l'incubazione è stata protratta per 7 gg, rinnovando il terreno ogni 2 gg. Per lo studio dell'espressione dei geni implicati nell'osteogenesi la prova è stata invece effettuata in duplicato e gli osteoblasti sono stati coltivati sugli *scaffold* per 24 h.

### **3.4.3 - Test MTT**

#### **3.4.3.1 - Procedura**

Il test MTT serve a determinare la vitalità cellulare. Allestendo in parallelo una curva standard con una quantità nota di cellule è inoltre possibile quantificare le cellule, dal momento che il numero di cellule vitali è direttamente proporzionale al viraggio della colorazione da giallo a blu/viola quando trattate con bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). La variazione di colore è legata alla riduzione dell'MTT (inizialmente di colore giallo) trasformato in formazano (blu/viola) ad opera degli enzimi mitocondriali. La riduzione ha luogo solo se gli enzimi reduttasi dei mitocondri sono operativi e, dunque, la misura è direttamente proporzionale al numero di cellule metabolicamente attive.

I pozzetti contenenti gli *scaffold* incubati con le cellule per 2 h sono stati lavati ed addizionati a una soluzione di MTT (5 mg/ml in terreno di coltura, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). I campioni sono quindi stati incubati per 4 h a 37 °C, in questo modo il supporto ha assunto una colorazione gialla. Le deidrogenasi mitocondriali delle cellule adese (e vitali) aprono l'anello tetrazolico, producendo cristalli di formazano di colore viola, insolubili in acqua. Il formazano, inoltre, non permea attraverso la membrana citoplasmatica e una volta prodotto si accumula all'interno delle cellule. Al termine dell'incubazione ad ogni campione è stata

aggiunta una soluzione di SDS 10% (p/v) (Sigma-Aldrich), acidificata con HCl 0.01 N (Sigma-Aldrich), in grado di lisare la membrana cellulare e solubilizzare i cristalli di formazano. I campioni sono stati mantenuti in agitazione per far sciogliere i cristalli e ottenere una soluzione omogenea.

La lettura dei valori d'assorbanza è stata eseguita con il lettore per micropiastre Sunrise (Tecan, Männedorf, CH) a 620 nm su 100  $\mu$ L della soluzione presente in ciascun pozzetto trasferiti in piastre da 96 pz. L'assorbanza misurata è direttamente proporzionale alla quantità di formazano in soluzione.

Contestualmente è stata anche allestita una curva standard mediante semina di quantità scalari note di cellule. Il saggio MTT è quindi stato eseguito anche su questi campioni e mediante regressione lineare è stato dunque possibile determinare la quantità di cellule presente in ogni campione.

#### **3.4.3.2 – Risultati e discussione**

La lettura dei dati ci ha fornito dei valori che sono stati ricondotti al numero di cellule tramite una curva standard. La curva standard e i valori da cui è stata ottenuta sono riportati in Figura X.

c. standard	
OD	n cells
0,47	20000
0,217	10000
0,103	5000
0,051	0

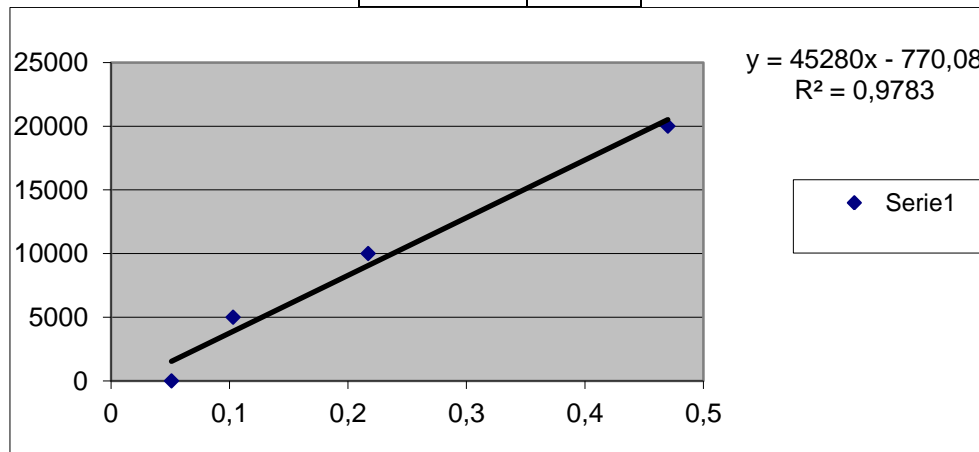


Figura 3.68 – Valori e curva standard ottenuta.

Una volta ottenuta una corrispondenza possiamo calcolare il numero di cellule per ogni campione come fatto nella tabella successiva. I saggi biologici sono stati svolti in triplicato per ogni campione e nei grafici viene riportato il valore medio  $\pm$  deviazione standard. I dati, essendo molto numerosi, sono stati raccolti in diversi grafici, raggruppati prima per tipologia di peptide, al fine di valutare l'effetto della variazione di concentrazione, poi per percentuale di peptide, in modo da considerare l'effetto della variazione di peptide.

Tabella 3.19 – Valori ottenuti per il test di adesione cellulare.

OD	n cell	Media	DEV.ST.	OD	n cell	Media	DEV.ST.
	PCL						
0,605	26624,32						
0,63	27756,32	25205,55	3484,011				
0,486	21236						
	GE3-M				EAbuK		
2,5% GE3-M				2,5% EAbuK			
0,595	26171,52			0,586	25764		
0,815	36133,12	32903,15	5831,342	0,969	43106,24	35891,63	9030,645
0,821	36404,8			0,874	38804,64		
5% GE3-M				5% EAbuK			
1,103	49173,76			1,136	50668		
0,939	41747,84	45068,37	3774,661	0,943	41928,96	48675,68	6003,827
0,995	44283,52			1,197	53430,08		
10% GE3-M				10% EAbuK			
0,704	31107,04			1,007	44826,88		
0,892	39619,68	37416,05	5545,891	1,103	49173,76	45883,41	2909,688
0,934	41521,44			0,981	43649,6		
15% GE3-M				15% EAbuK			
0,988	43966,56			0,721	31876,8		
0,993	44192,96	42894,93	2055,3	0,702	31016,48	32027,73	1094,553
0,912	40525,28			0,75	33189,92		
	RGDEAK				EAK		
2,5% RGDEAK				2,5% EAK			
0,583	25628,16			1,111	49536		
0,74	32737,12	32782,4	7176,987	1,257	56146,88	52720,69	3312,05
0,9	39981,92			1,176	52479,2		
5% RGD-EAK				5% EAK			
0,794	35182,24			0,758	33552,16		
1,12	49943,52	44147,68	7874,555	0,699	30880,64	32405,07	1375,151
1,062	47317,28			0,741	32782,4		
10% RGD-EAK				10% EAK			
0,97	43151,52			0,839	37219,84		
1,228	54833,76	47211,63	6605,657	0,873	38759,36	35891,63	3714,432
0,981	43649,6			0,717	31695,68		
15% RGD-EAK				15% EAK			
1,284	57369,44			0,993	44192,96		
0,959	42653,44	50637,81	7437,553	1,183	52796,16	49279,41	4511,291
1,163	51890,56			1,14	50849,12		

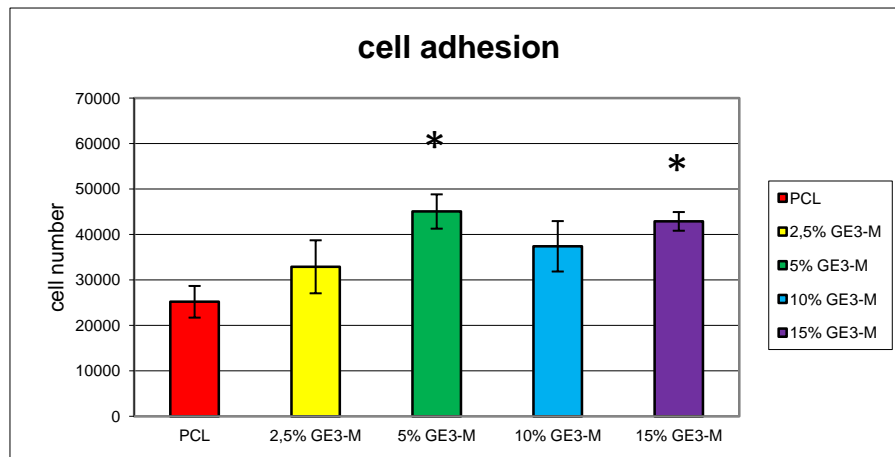


Figura 3.69 – Adesione di osteoblasti umani sulle matrici determinata a 2 ore dalla semina tramite saggio MTT. Campioni contenenti peptide GE3-M (controllo) e riferimento. \* =  $p$ -value < 0.05 vs PCL con One-Way ANOVA.

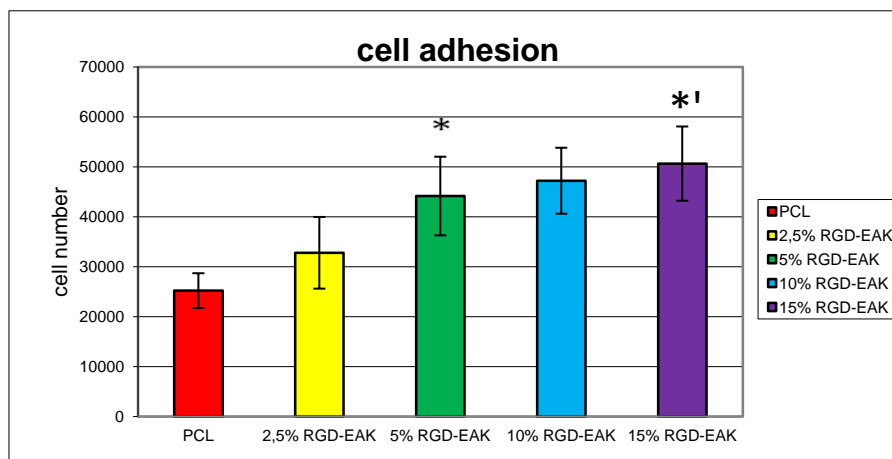


Figura 3.70 – Adesione di osteoblasti umani sulle matrici determinata a 2 ore dalla semina tramite saggio MTT. Campioni contenenti peptide RGD-EAK e riferimento. \* =  $p$ -value < 0.05 vs PCL, ' =  $p$ -value < 0,05 vs 2,5% RGD-EAK con One-Way ANOVA.

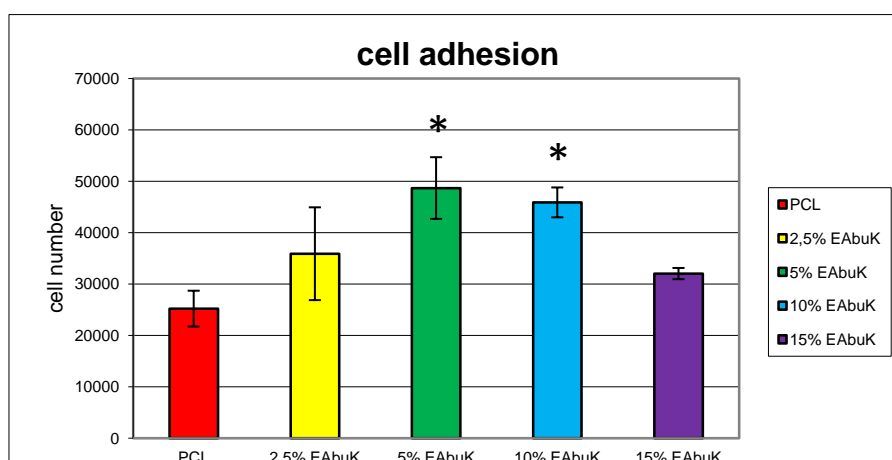


Figura 3.71 – Adesione di osteoblasti umani sulle matrici determinata a 2 ore dalla semina tramite saggio MTT. Campioni contenenti peptide EAbuK e riferimento. \* =  $p$ -value < 0.05 vs PCL con One-Way ANOVA.

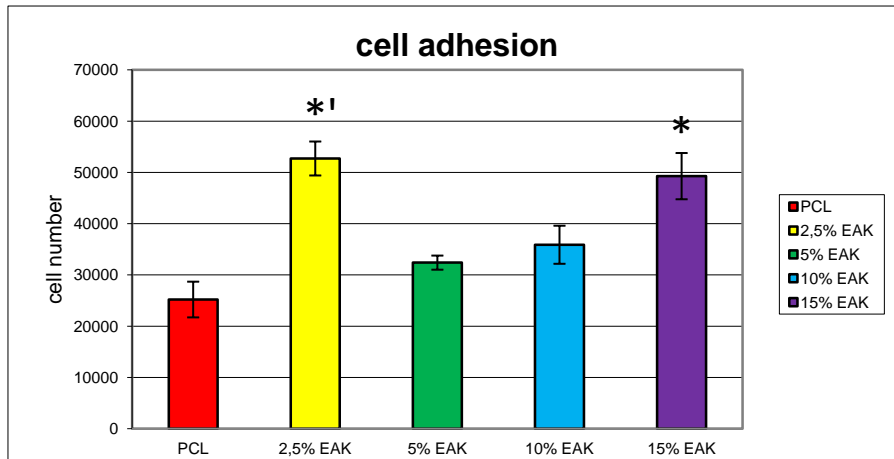


Figura 3.72 – Adesione di osteoblasti umani sulle matrici determinata a 2 ore dalla semina tramite saggio MTT. Campioni contenenti peptide EAK e riferimento. \* =  $p$ -value < 0.05 vs PCL, ' =  $p$ -value < 0.05 vs 5% EAK con One-Way ANOVA.

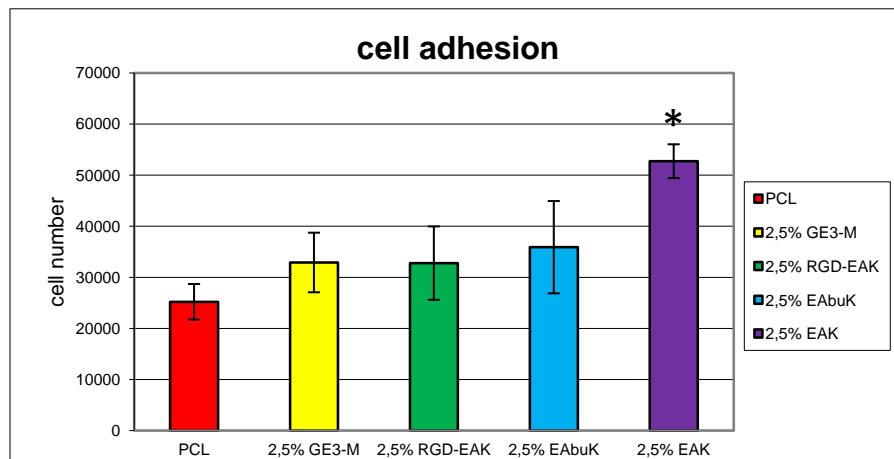


Figura 3.73 – Adesione di osteoblasti umani sulle matrici determinata a 2 ore dalla semina tramite saggio MTT. Campioni contenenti 2,5% di peptide e riferimento. \* =  $p$ -value < 0.05 vs PCL/ 2,5% GE3-M/ 2,5% RGD-EAK con One-Way ANOVA.

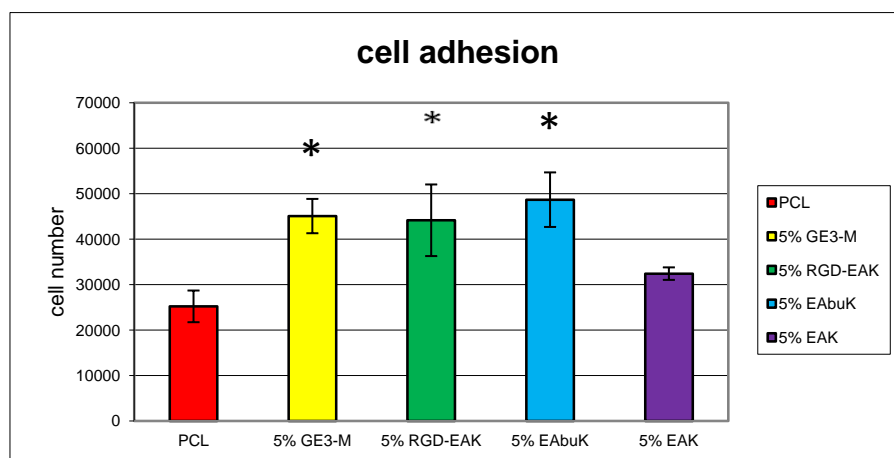


Figura 3.74 – Adesione di osteoblasti umani sulle matrici determinata a 2 ore dalla semina tramite saggio MTT. Campioni contenenti 5% di peptide e riferimento. \* =  $p$ -value < 0.05 vs PCL con One-Way ANOVA.



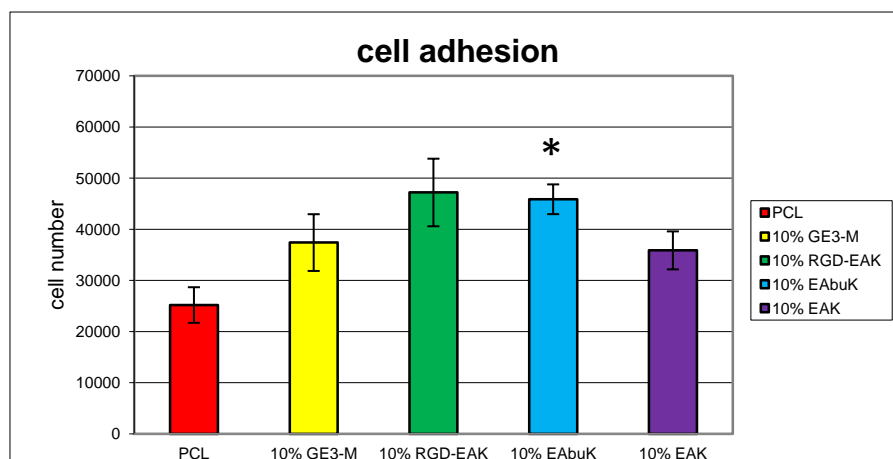


Figura 3.75 – Adesione di osteoblasti umani sulle matrici determinata a 2 ore dalla semina tramite saggio MTT. Campioni contenenti 10% di peptide e riferimento. \* =  $p$ -value < 0.05 vs PCL con One-Way ANOVA.

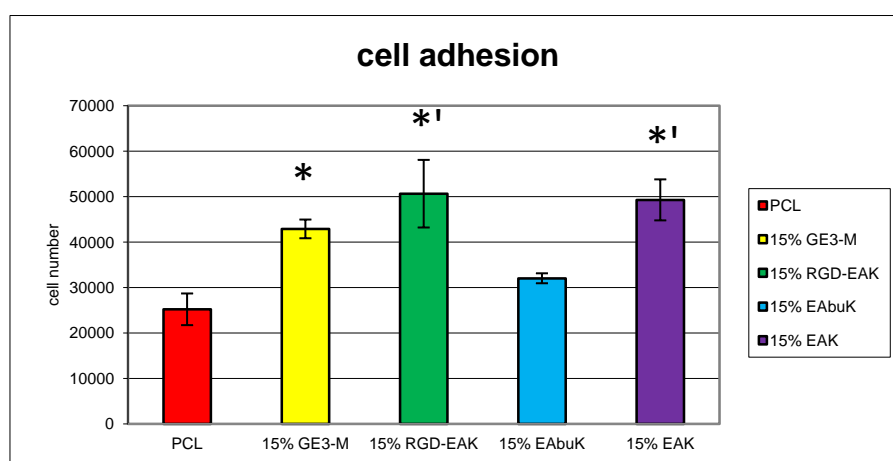


Figura 3.76 – Adesione di osteoblasti umani sulle matrici determinata a 2 ore dalla semina tramite saggio MTT. Campioni contenenti 15% di peptide e riferimento. \* =  $p$ -value < 0.05 vs PCL, ' =  $p$ -value < 0,05 vs 15% EAbuK con One-Way ANOVA.

Osservando i dati si possono riconoscere alcune matrici il cui comportamento in fase di adesione risulta migliore di altre. Si può anche notare come nel caso dell'RGD-EAK, contenente la sequenza di adesione RGD, ci sia un andamento del tipo dose-risposta per l'adesione cellulare; al contrario l'EAbuK mostra il miglior comportamento a concentrazioni intermedie (5% e 10%) mentre il peptide EAK manifesta elevata adesione a specifiche concentrazioni (2,5% e 15%) ma non si riconosce un andamento complessivo. Si ha un raffronto interessante nella valutazione dei vari peptidi alla concentrazione di 5% poiché l'andamento è riproducibile rispetto a quello evidenziato in alcuni studi precedenti [41]. L'introduzione della sequenza RGD nella sequenza autoassemblante EAK porta a risultati altalenanti:

- nelle matrici al 2,5% l'arricchimento con EAK porta ad un incremento significativo nell'adesione rispetto a RGD-EAK;
- nelle matrici al 5% e al 10% si può intuire come le matrici RGD-EAK incrementino l'adesione rispetto alla matrice EAK;
- nelle matrici al 15% i due *scaffold* si comportano allo stesso modo.

Tale risultato può essere letto alla luce del fatto che esistono degli intervalli finestra per le concentrazioni di molecole adesive che promuovono l'*attachment* delle cellule e probabilmente queste coincidono con i valori di densità peptidica superficiale dei campioni con RGD-EAK al 5% e 10%.

La presenza di peptidi anche non auto-assemblanti porta a matrici in grado di stimolare l'adesione degli osteoblasti. La componente peptidica modifica la bagnabilità della superficie e questo può essere uno dei motivi del gradimento cellulare.

L'incremento di adesione rispetto al PCL del gE3-M è dell'80%. L'arricchimento della matrice con i peptidi auto-assemblanti porta comunque a incrementi più elevati per tutte e tre le sequenze pari a circa + 100% rispetto al PCL. È curioso osservare come tale incremento venga raggiunto nei 3 casi in corrispondenza a percentuali differenti di peptidi. Tali dati a riprova della capacità della cellula di discriminare tra peptidi non auto-assemblanti e peptidi auto-assemblanti e della proprietà di questi ultimi di stimolare effetti benefici.

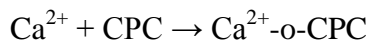
### **3.4.4 - Determinazione dei livelli di calcio: o-CPC**

#### **3.4.4.1 - Procedura**

Il saggio *o*-CPC consente la determinazione della concentrazione di calcio presente in una coltura *in vitro*, per mezzo di una misura colorimetrica. La quantità di calcio rappresenta un utile indicatore del grado di mineralizzazione della matrice prodotta dalle cellule: idealmente maggiore sarà il numero di osteoblasti vitali e attivi, maggiore sarà la quantità di matrice ossea prodotta e maggiore la concentrazione di calcio registrata.

In tale saggio è stato utilizzato l'*o*-cresoltaleina complessone (*o*-CPC), un indicatore acido-base in grado di formare complessi colorati con metalli diversi, a seconda delle condizioni di reazione. A pH acido o neutro la soluzione di *o*-CPC è sostanzialmente incolore, mentre a pH

alcalini, grazie alla reazione con calcio e magnesio, si assiste a un graduale viraggio da incolore a rosa, e infine porpora ( $\text{pH} \geq 12$ ). Spesso vengono incorporati al reagente sia 8-idrossichinolina, in quanto lega preferenzialmente il magnesio e, quindi, ne previene l'interferenza, sia 2-amino-2-metil-1-propanolo, il quale evita il viraggio prematuro del colore e consente di operare a pH meno alcalini. La *o*-cresolftaleina complessone reagisce con gli ioni calcio, formando un complesso color porpora.



L'intensità del colore viene misurata con uno spettrofotometro, tra i 550 e i 650 nm. L'assorbanza è direttamente proporzionale alla concentrazione di calcio presente nel campione esaminato. Al fine di normalizzare i livelli di calcio alla densità di cellule effettivamente presenti, si è fatto riferimento alla concentrazione proteica in ciascun campione.

Il saggio è stato eseguito sugli scaffold elettrofilati, preparati e sterilizzati come precedentemente descritto, seminati con osteoblasti umani alla concentrazione di  $2 \times 10^5$  cellule/pz, e incubati per 7 giorni con terreno di differenziazione a  $37^\circ\text{C}$  e al 5% di  $\text{CO}_2$ . Il terreno di coltura veniva rinnovato ogni 2 giorni. Per procedere alla valutazione del contenuto di calcio, dopo 7 giorni il terreno è stato rimosso e gli *scaffold* sono stati lavati con PBS e, quindi, incubati per 30 min a  $4^\circ\text{C}$  con acido tricloroacetico (TCA, Sigma, soluzione al 5% (p/v) in PBS), per lisare le membrane citoplasmatiche ed estrarre le proteine cellulari. Un volume pari a 100 microlitri di lisato cellulare è stato quindi trasferito in piastre per microtitolazione da 96 pozzetti ed aggiunto di pari volume di una soluzione di *o*-cresolftaleina complessone (100  $\mu\text{M}$ ) e 0.142 g/ml di 2-amino, 2-methyl, 1-propanolo, pH 10,7. L'intensità del colore è stata misurata alla lunghezza d'onda di 620 nm. La determinazione dei livelli di calcio è stata condotta allestendo parallelamente una curva standard ottenuta con diluizioni base 10 di una soluzione di carbonato di calcio (da 30 mg/ml a 0 mg/ml).

La normalizzazione alla densità cellulare di ogni scaffold è stata effettuata misurando la concentrazione proteica nel rispettivo campione con il saggio dell'acido bicinconinico (Bicinchinic acid BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific). Il Kit è formato da Reagente A, un buffer alcalino costituito da sodio carbonato, sodio bicarbonato, acido bicinconinico e sodio tartrato in idrossido di sodio 0,1 M, e Reagente B, una soluzione al 4% di solfato rameico, che combinati al momento dell'esecuzione del saggio costituiscono la working

solution. Il metodo consiste di due reazioni consecutive. In primo luogo, in ambiente alcalino, si forma un complesso tra le catene proteiche e lo ione  $\text{Cu}^{2+}$  del solfato rameico: la presenza di Cys e di residui aromatici (Trp, Tyr), e gli stessi legami peptidici promuovono la riduzione a ione  $\text{Cu}^+$  (reazione di Biuret). La quantità di ione  $\text{Cu}^{2+}$  ridotta risulta proporzionale alla quantità di proteine presenti in soluzione. Successivamente due molecole di acido bicinconinico si complessano con uno ione  $\text{Cu}^+$ , formando un composto porpora determinabile spettrofotometricamente. Dal punto di vista operativo, per ogni campione 25  $\mu\text{L}$  di lisato cellulare, precedentemente ottenuto con il trattamento con TCA, vengono trasferiti in piastra da 96 pozzetti e addizionati di 200  $\mu\text{L}$  della working solution del Kit BCA. Dopo un'incubazione di 10 minuti a  $37^\circ\text{C}$ , si effettua la lettura della piastra tramite il lettore per micropiastre Sunrise (Tecan) a 620 nm. La concentrazione proteica del campione viene ottenuta mediante regressione lineare, allestendo una curva standard con diluizioni 1:2 di siero albumina bovina (BSA, Sigma), a partire da 2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . La quantità di Calcio presente nel campione viene espressa come  $\text{mg Ca}^{2+}/\text{mg}$  di proteine cellulari del saggio BCA. Anche in questo caso, ogni analisi, eseguita in triplicato, è stata condotta in parallelo su tutti i tipi di scaffold elettrofilati (solo PCL o PCL/peptide).

#### 3.4.4.2 - Risultati e discussione

I dati per questa prova vanno ricavati a partire da due letture parallele, una per il calcio e una per le proteine, il valore finale, espresso come  $\text{mg Ca}^{2+}/\text{mg}$  proteine è quindi normalizzato sul numero di proteine presenti. Per ottenere sia il valore del  $\text{Ca}^{2+}$  che quello delle proteine è necessario utilizzare delle curve standard.

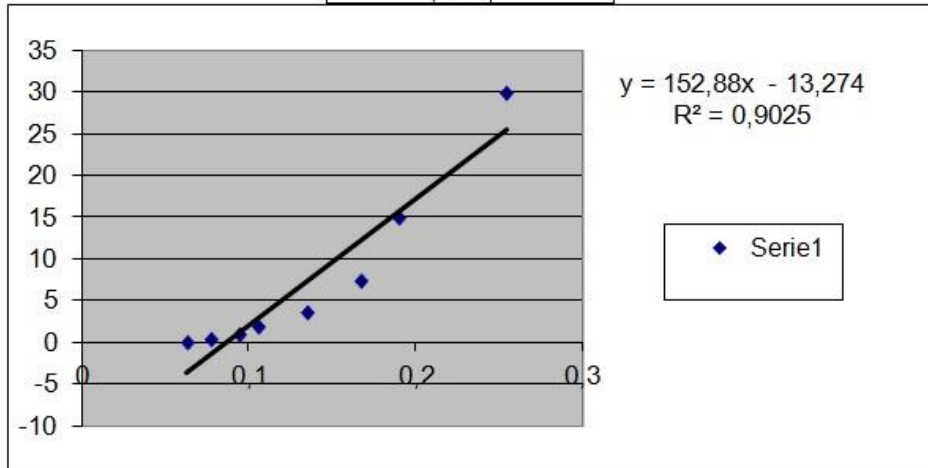
Una volta ottenuta una corrispondenza possiamo determinare il livello di calcio per ogni campione. I saggi biologici sono stati svolti in triplicato e nei grafici viene riportato il valore medio  $\pm$  deviazione standard. I dati, essendo molto numerosi, sono stati raccolti in diversi grafici, raggruppati prima per tipologia di peptide, al fine di valutare l'effetto della variazione di concentrazione, poi per percentuale di peptide, in modo da considerare l'effetto della variazione di peptide.

I risultati in questo caso portano a differenziare il comportamento tra matrici arricchite con peptidi auto-aggreganti e matrici con peptide di controllo, nel caso del GE3-M infatti si nota

una stabilità nella risposta, con il solo valore per il 5% di arricchimento leggermente più elevato degli altri (2,31 volte il solo PCL). Le matrici con auto-aggreganti mostrano invece una maggiore diversità di risposta al variare della concentrazione, inoltre si evidenziano delle specifiche quantità di peptide per cui i livelli di calcio sono molto elevati, mentre per altre non c'è una sostanziale differenza dal solo PCL. Non si riconosce una correlazione tra la variazione di concentrazione peptidica della matrice e la concentrazione di calcio.

Per ogni singola concentrazione, tuttavia, il valore migliore è espresso dai peptidi auto-aggreganti e mai dallo *scaffold* contenente GE3-M. I valori migliori sono stati ottenuti con il 15% EAK (3,31 volte il PCL), il 5% EAbuK (3,18 volte) e il 10% RGD-EAK (3,06 volte rispetto al PCL non arricchito).

c. standard	calcio
OD	mg ml
0,254	30
0,189	15
0,167	7,5
0,135	3,75
0,105	1,875
0,094	0,937
0,077	0,468
0,063	0



c. standard	proteine
OD	mg ml
0,348	20
0,304	15
0,226	10
0,194	7,5
0,176	5
0,164	2,5
0,156	1,25
0,155	0,625

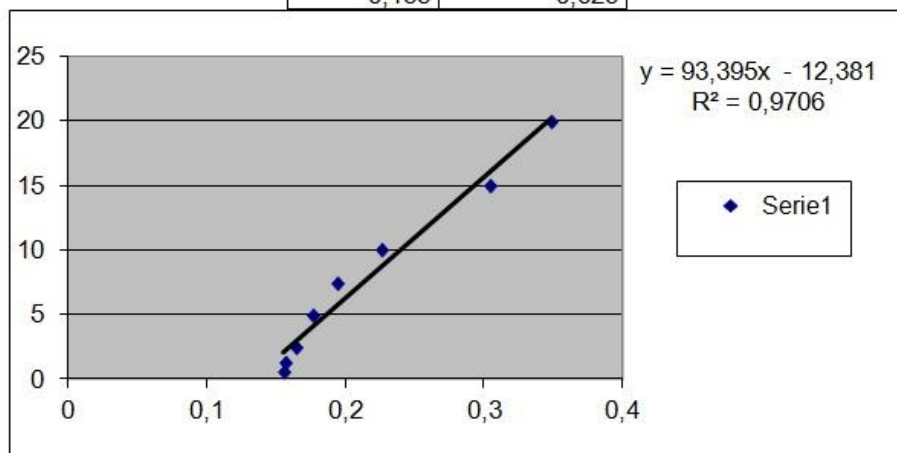


Figura 3.77 – Dati e curve standard ottenute per la stima del calcio e delle proteine.

Tabella 3.20 – Dati ottenuti per i livelli di calcio.

	O.D.	mg/ml	O.D.	proteine mg/ml	rapporto	media	dev st
pcl	0,129	6,44752	0,26	11,9017	0,541731		
	0,123	5,53024	0,216	7,79232	0,709704	0,748292	0,228313
	0,132	6,90616	0,207	6,951765	0,99344		
2,5 ge3m	0,188	15,46744	0,246	10,59417	1,459995		
	0,161	11,33968	0,245	10,500775	1,07989	1,372152	0,259731
	0,172	13,02136	0,221	8,259295	1,57657		
5ge3m	0,193	16,23184	0,245	10,500775	1,545775		
	0,194	16,38472	0,232	9,28664	1,764332	1,73437	0,175541
	0,181	14,39728	0,214	7,60553	1,893002		
10ge3m	0,172	13,02136	0,242	10,22059	1,274032		
	0,189	15,62032	0,241	10,127195	1,542413	1,381556	0,141917
	0,174	13,32712	0,24	10,0338	1,328223		
15ge3m	0,283	29,99104	0,37	22,17515	1,352462		
	0,228	21,58264	0,288	14,51676	1,486739	1,466221	0,105014
	0,233	22,34704	0,286	14,32997	1,559462		
2,5rgd	0,154	10,26952	0,32	17,5054	0,586649		
	0,143	8,58784	0,284	14,14318	0,607207	0,666045	0,120155
	0,146	9,04648	0,253	11,247935	0,804279		
5rgd	0,224	20,97112	0,268	12,64886	1,657945		
	0,231	22,04128	0,279	13,676205	1,611652	1,753187	0,206357
	0,215	19,5952	0,238	9,84701	1,989964		
10rgd	0,222	20,66536	0,221	8,259295	2,502073		
	0,215	19,5952	0,215	7,698925	2,545187	2,288408	0,407986
	0,275	28,768	0,302	15,82429	1,817965		
15rgd	0,161	11,33968	0,376	22,73552	0,498765		
	0,118	4,76584	0,206	6,85837	0,694894	0,552573	0,124469
	0,117	4,61296	0,239	9,940405	0,464062		
2,5eabuk	0,139	7,97632	0,261	11,995095	0,664965		
	0,138	7,82344	0,294	15,07713	0,518895	0,699507	0,200131
	0,191	15,92608	0,319	17,412005	0,914661		
5eabuk	0,385	45,5848	0,355	20,774225	2,194296		
	0,271	28,15648	0,25	10,96775	2,567207	2,379197	0,186475
	0,221	20,51248	0,225	8,632875	2,376089		
10eabuk	0,145	8,8936	0,21	7,23195	1,229765		
	0,188	15,46744	0,46	30,5807	0,505791	0,77961	0,392881
	0,129	6,44752	0,247	10,687565	0,603273		
15eabuk	0,124	5,68312	0,261	11,995095	0,473787		
	0,109	3,38992	0,404	25,35058	0,133722	0,478216	0,34673
	0,178	13,93864	0,313	16,851635	0,827139		
2,5eak	0,226	21,27688	0,259	11,808305	1,801857		
	0,292	31,36696	0,287	14,423365	2,174732	2,013269	0,19139
	0,284	30,14392	0,289	14,610155	2,063217		
5eak	0,123	5,53024	0,264	12,27528	0,450518		
	0,137	7,67056	0,218	7,97911	0,96133	0,704929	0,255412
	0,224	20,97112	0,452	29,83354	0,702938		
10eak	0,171	12,86848	0,259	11,808305	1,089782		
	0,172	13,02136	0,301	15,730895	0,827757	0,884416	0,183711
	0,145	8,8936	0,262	12,08849	0,735708		
15eak	0,214	19,44232	0,216	7,79232	2,495062		
	0,321	35,80048	0,315	17,038425	2,101161	2,474035	0,362817
	0,312	34,42456	0,263	12,181885	2,825881		

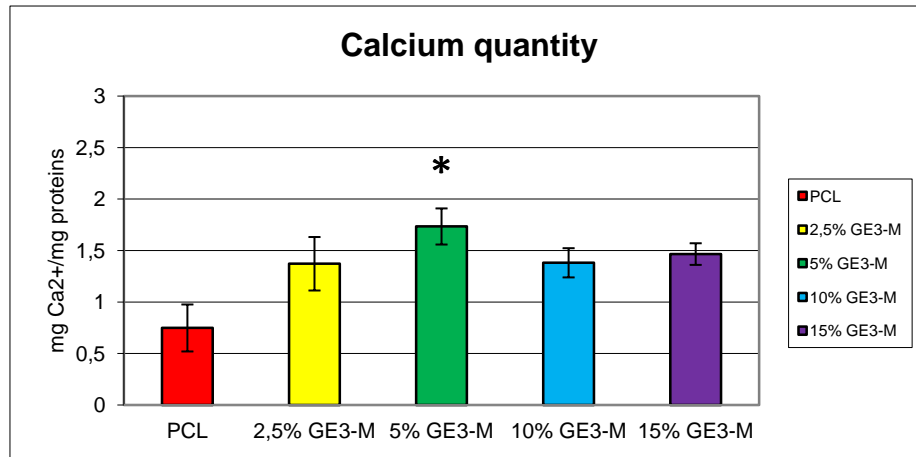


Figura 3.78 – Livelli di calcio misurati a 7 giorni dalla semina. Campioni contenenti peptide GE3-M (controllo) e riferimento. \* =  $p$ -value < 0.05 vs PCL con One-Way ANOVA.

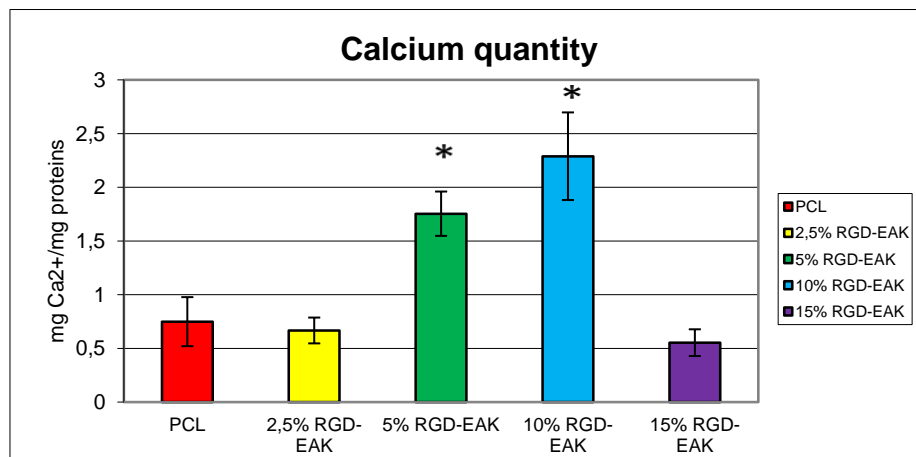


Figura 3.79 – Livelli di calcio misurati a 7 giorni dalla semina. Campioni contenenti peptide RGD-EAK e riferimento. \* =  $p$ -value < 0.05 vs PCL/ 2,5% RGD-EAK/ 15% RGD-EAK con One-Way ANOVA.

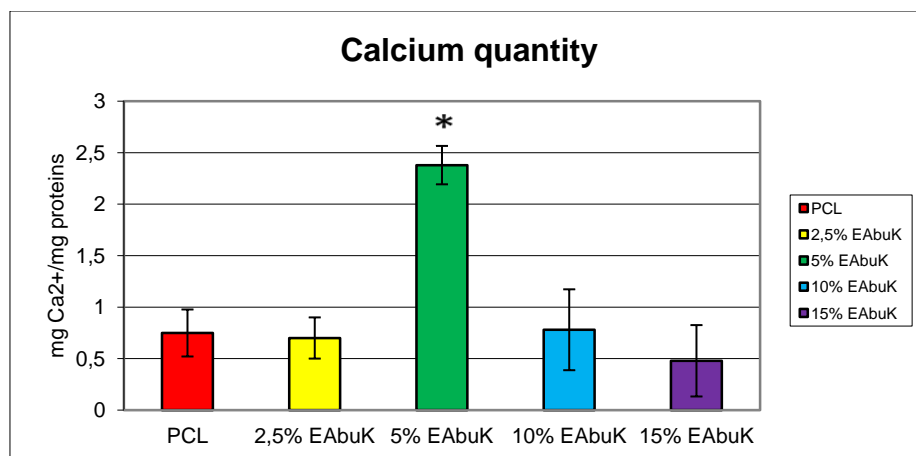


Figura 3.80 – Livelli di calcio misurati a 7 giorni dalla semina. Campioni contenenti peptide EAbuK e riferimento. \* =  $p$ -value < 0.05 vs tutti gli altri campioni presi in esame con One-Way ANOVA.



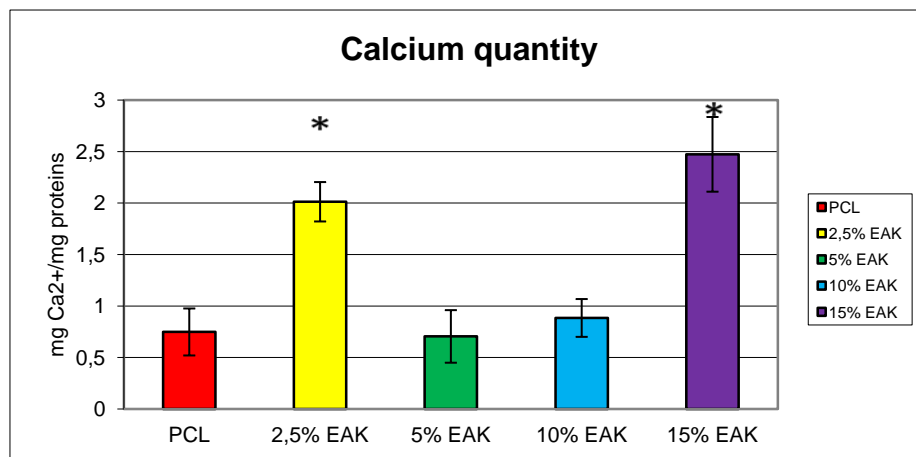


Figura 3.81 – Livelli di calcio misurati a 7 giorni dalla semina. Campioni contenenti peptide EAK e riferimento. \* = p-value < 0.05 vs PCL/ 5% EAK/ 10% EAK con One-Way ANOVA.

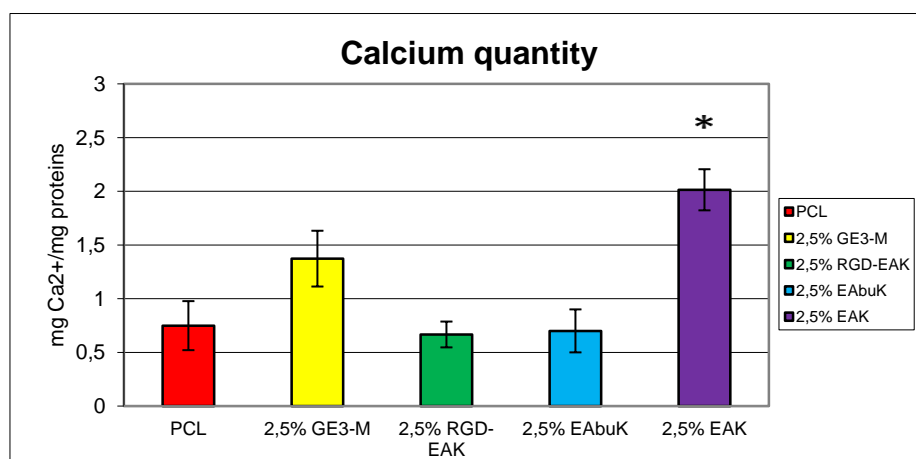


Figura 3.82 – Livelli di calcio misurati a 7 giorni dalla semina. Campioni contenenti 2,5% di peptide e riferimento. \* = p-value < 0.05 vs PCL/ 2,5% RGD-EAK/ 2,5% EAbuK con One-Way ANOVA.

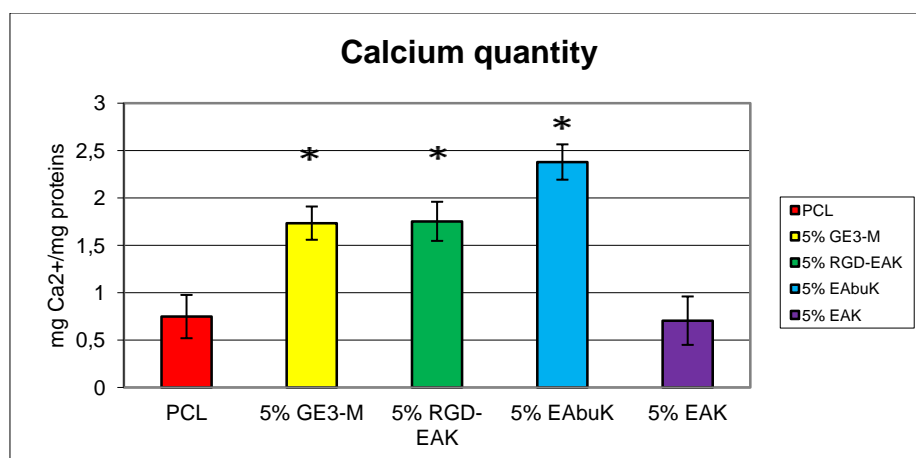


Figura 3.83 – Livelli di calcio misurati a 7 giorni dalla semina. Campioni contenenti 5% di peptide e riferimento. \* = p-value < 0.05 vs PCL/ 5% EAK con One-Way ANOVA.

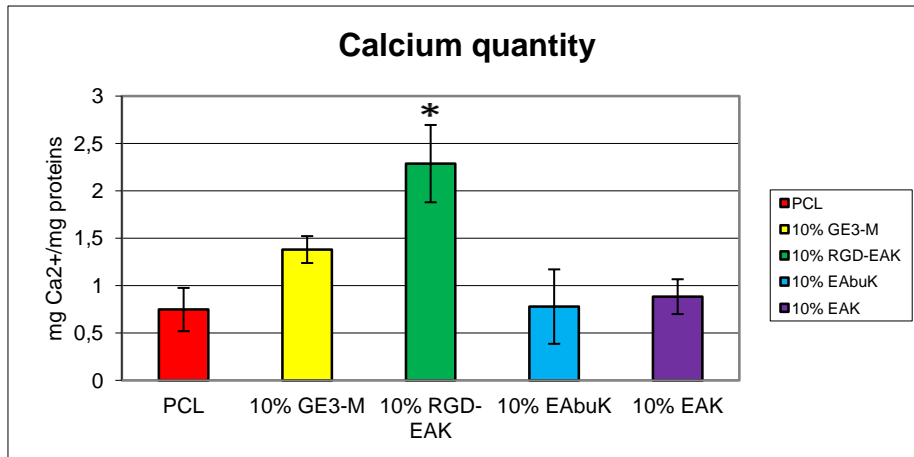


Figura 3.84 – Livelli di calcio misurati a 7 giorni dalla semina. Campioni contenenti 10% di peptide e riferimento. \* =  $p$ -value < 0.05 vs tutti gli altri campioni presi in esame con One-Way ANOVA.

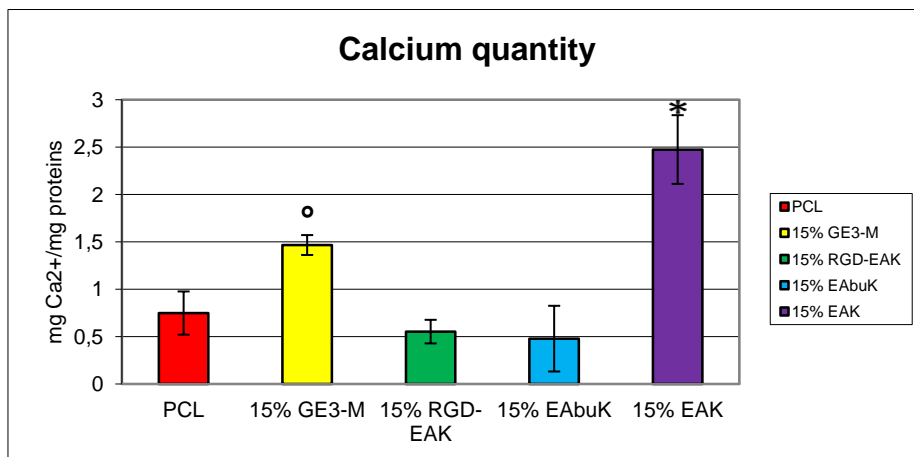


Figura 3.85 – Livelli di calcio misurati a 7 giorni dalla semina. Campioni contenenti 15% di peptide e riferimento. \* =  $p$ -value < 0.05 vs tutti gli altri campioni presi in esame, ° =  $p$ -value < 0.05 vs 15% RGD-EAK/ 15% EAbuK/ 15% EAK con One-Way ANOVA.

### 3.4.5 - Espressione genica: q-PCR

#### 3.4.5.1 - Procedura

Il diverso grado di mineralizzazione promosso delle matrici elettrofilate, è stato ulteriormente valutato attraverso lo studio dell'espressione genica degli osteoblasti su di esse seminati.

Per lo studio dell'espressione genica descritto in questa tesi, si è ricorsi alla metodica *Polymerase Chain Reaction* (PCR), e in particolare alla *real time*-PCR (rt-PCR o PCR quantitativa, q-PCR) un'ottimizzazione della normale PCR che permette, oltre all'amplificazione, anche l'analisi quantitativa del cDNA (DNA codificante), ossia del DNA complementare ottenuto dalla reazione di retrotrascrizione dell'mRNA estratto dal campione.

Gli osteoblasti seminati sui diversi *scaffold* sono stati incubati per 24 ore con terreno di differenziazione a 37°C e al 5% di CO<sub>2</sub>. Il metodo di analisi genica si sviluppa in 3 fasi: estrazione dell'mRNA dalle cellule seminate sulle matrici, retrotrascrizione per ottenere cDNA, amplificazione e quantificazione di cDNA mediante q-PCR.

L'RNA totale è stato estratto dagli osteoblasti mediante il kit "SV Total RNA Isolation System" (Promega, Madison, WI). Il DNA contaminante è stato rimosso mediante trattamento per 15 min con DNase I. Cinque µg di RNA così estratto sono stati utilizzati per generare DNA codificante (cDNA) per mezzo di *random primers* ad innesco casuale e dell'enzima del virus della leucemia murina (MuLV, Applied Biosystems, Carlsbad, CA). I livelli di trascritti mRNA specifici sono stati determinati mediante reazione di amplificazione *real time* (rt-PCR), utilizzando il termociclatore ABI Prism 7700 e la miscela di reazione *TaqMan Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Carlsbad, CA), contenente anche *primer* e sonde specifiche per i geni da determinare. In genere, vengono utilizzati *primer* che permettono di circoscrivere a pochi nucleotidi la sequenza da replicare e che siano inoltre specifici per il gene obiettivo dell'analisi. In questo lavoro di tesi, è stata eseguita la quantificazione di geni codificanti osteopontina (OPN), sialoproteina ossea (BSP) e il fattore di trascrizione 2 correlato a Runt (RUNX2), proteine legate alla differenziazione degli osteoblasti e in grado di legarsi al calcio e/o al fosforo coordinando la deposizione extracellulare ordinata di minerali attraverso una regolazione della quantità e della grandezza dei cristalli di idrossiapatite che si formano. La sequenza dei *primer* è riportata in Tabella. Poiché generalmente i livelli di mRNA trascritto sono correlabili all'espressione proteica, una

sovraespressione di questi geni indica un maggior grado di mineralizzazione promosso dagli *scaffold*. Come controllo negativo è stato analizzato, al posto del cDNA, un pari volume di acqua nelle stesse condizioni. Per ogni gene, inoltre, una curva standard è stata allestita mediante amplificazione di una quantità nota del corrispondente cDNA, precedentemente clonato nel vettore pGEM-T (Promega, Madison, WI). Infine l'espressione di ogni gene è stata normalizzata all'espressione di un gene endogeno, la gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GA3PDH).

Le reazioni chiave che avvengono durante una PCR sono:

- Denaturazione (separazione): la miscela di reazione è portata ad elevate temperature comprese tra i 95°C e 99°C per ottenere la denaturazione della doppia elica di DNA.
- *Annealing* (appaiaimento): la temperatura è abbassata a 60°C per permettere l'appaiaimento dei *primer* alle sequenze complementari sul cDNA.
- Estensione (allungamento): la temperatura viene nuovamente alzata alla condizione di lavoro ottimale della DNA-polimerasi scelta, generalmente tra i 65°C e i 72°C, per permettere l'allungamento degli amplificati ottenuti precedentemente.

Il ciclo descritto viene ripetuto per 40 volte ed ogni volta l'amplificato di nuova generazione è ulteriormente duplicato. Non si superano generalmente i 50 cicli, in quanto, anche se idealmente si dovrebbe ottenere un raddoppio del DNA-target ad ogni ciclo, nella pratica la reazione giunge a plateau per esaurimento dei reagenti. La q-PCR permette la contemporanea amplificazione e quantificazione del cDNA grazie all'utilizzo di sonde fluorescenti e di termociclatori dotati di raggi laser in grado di eccitare e leggere i segnali fluorescenti. In questo studio in particolare è stata utilizzata la miscela TaqMan composta da *quencer* e un *reporter* legati ad un probe specifico per ogni gene amplificato (UPL, Roche, Basel, Switzerland) in grado di emettere fluorescenza solo dopo l'amplificazione del cDNA di interesse. La quantità di fluorescenza emessa risulta essere direttamente proporzionale alla quantità di cDNA presente nel campione ed amplificato nel corso della reazione di PCR.

Tabella 3.21 – Geni analizzati e rispettivi primers.

Gene	Primer
GA3PDH	fw: 5'-cgggaagcccatcacca-3' rv: 5'-ccggcctcacccatt-3'
BSP	fw: 5'-caatctgtgccactcactgc-3' rv: 5'-tcatttggtgattgcttcct-3'
OPN	fw: 5'-cgcacctgacatccagta-3' rv: 5'-ggctgtccaatcagaagg-3'
RUNX2	fw: 5'-cagtgacacatgctcagcaa-3' rv: 5'-gctcacgtcgctcatttg-3'

### 3.4.5.2 - Risultati e discussione

I dati ottenuti con la q-PCR non possono essere presi tal quali ma vanno inizialmente normalizzati all'espressione del gene endogeno gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GA3PDH) che è proporzionale al numero di cellule presenti. In questo modo è possibile evidenziare la differenziazione cellulare mediata dagli scaffolds in modo indipendente dal numero di cellule.

Sono stati analizzati tre geni, riportati in seguito nell'ordine cronologico in cui sono state svolte le prove.

I saggi biologici sono stati svolti in duplicato e nei grafici viene riportato il valore medio  $\pm$  deviazione standard. I dati, essendo molto numerosi, sono stati raccolti in diversi grafici, raggruppati prima per tipologia di peptide, al fine di valutare l'effetto della variazione di concentrazione, poi per percentuale di peptide, in modo da considerare l'effetto della variazione di peptide.

Tabella 3.22 – Dati ottenuti dall'analisi PCR e loro normalizzazioni.

Campione	n copie mRNA	BSP		osteopontina		Runx2	
	<b>GADPH</b>						
PCL	234,0229	759000	3243,272	3,00E+02	1,281926	6,20E+01	2,65E-01
	243,678648	523000	2146,269	3,02E+02	1,239337	70,467	2,89E-01
2,5% GE3-M	243,678648	535000	2195,514	0	0	63,23	2,59E-01
	237,118636	510000	2150,822	0	0	49,07	2,07E-01
5% GE3-M	245,595056	0	0	259,81	1,05788	7,41E+00	3,02E-02
	233,433236	0	0	278,84	1,194517	6,98	2,99E-02
10% GE3-M	239,624708	830000	3463,75	0	0	7,12E+01	2,97E-01
	245,152808	933000	3805,79	0	0	80,65	3,29E-01
15% GE3-M	240,582912	0	0	0,00E+00	0	4,16E+01	1,73E-01
	235,8656	0	0	0,00E+00	0	56,78	2,41E-01
2,5% RGD-EAK	245,595056	722000	2939,799	0	0	7,16E+01	2,91E-01
	236,750096	689000	2910,242	0,00E+00	0	80,56	3,40E-01
5% RGD-EAK	228,421092	1575000	6895,16	0	0	9,92E+02	4,34E+00
	234,0229	1770000	7563,362	0	0	796,94	3,41E+00
10% RGD-EAK	225,325356	5150000	22855,84	753166,5	3342,573	18040,32	8,01E+01
	225,17794	4700000	20872,38	723161,5	3211,511	17950,4	7,97E+01
15% RGD-EAK	222,745576	649000	2913,638	1,19E+03	5,342418	9,89E+01	4,44E-01
	234,907396	715000	3043,753	7,64E+02	3,252345	79,05	3,37E-01
2,5% EAbuK	243,2364	1450000,00	5961,279	979,94	4,028756	78,99	3,25E-01
	246,18472	1760000	7149,103	913,94	3,712416	89,05	3,62E-01
5% EAbuK	239,845832	2620000	10923,68	600002,9	2501,619	2879,38	1,20E+01
	237,33976	2780000	11713,17	570007,2	2401,651	3005,43	1,27E+01
10% EAbuK	249,059332	926000,00	3717,99	626,94	2,517232	78,99	3,17E-01
	242,204488	750000,00	3096,557	5,71E+02	2,357512	89,05	3,68E-01
15% EAbuK	250,6072	110235	439,8716	2,11E+03	8,419551	8,72E+01	3,48E-01
	250,6072	100253	400,0404	2,91E+02	1,16118	89,05	3,55E-01
2,5% EAK	244,120896	816000	3342,606	0	0	479,38	1,96E+00
	230,116376	781000	3393,935	0	0	549,56	2,39E+00
5% EAK	224,883108	755000	3357,3	0	0	1,51E+02	6,71E-01
	229,674128	812000	3535,444	0	0	143,65	6,25E-01
10% EAK	230,853456	647000	2802,644	2,17E+03	9,399903	2,07E+02	8,95E-01
	228,12626	758000	3322,721	2,17E+03	9,512276	187,5	8,22E-01
15% EAK	223,482656	2780000	12439,44	550000,1	2461,042	4,21E+03	1,88E+01
	229,453004	2640000	11505,62	700000	3050,734	4176,5	1,82E+01

Tabella 3.23 – Media e deviazione standard per i tre geni analizzati.

Campione	media BSP	dev BSP	media OPN	dev OPN	media runx2	dev runx2
PCL	2694,7708	775,6983	1,26063149	0,030115	0,27705569	0,017146
2,5% GE3-M	2173,1683	31,602292	0	0	0,23321195	0,03715
5% GE3-M	0	0	1,12619837	0,096617	0,03003655	0,000191
10% GE3-M	3634,7696	241,85874	0	0	0,31305489	0,022519
15% GE3-M	0	0	0	0	0,20682184	0,047954
2,5% RGD-EAK	2925,0201	20,899885	0	0	0,31580382	0,034607
5% RGD-EAK	7229,2612	472,49037	0	0	3,87412481	0,662887
10% RGD-EAK	21864,11	1402,5157	3277,04226	92,67477	79,8899692	0,245305
15% RGD-EAK	2978,6954	92,004843	4,29738178	1,477905	0,39025996	0,076006
2,5% EAbuK	6555,1911	839,91876	3,87058559	0,223686	0,34323303	0,026145
5% EAbuK	11318,425	558,24828	2451,63495	70,68841	12,3340571	0,465175
10% EAbuK	3407,2733	439,4192	2,43737179	0,112939	0,34240894	0,035717
15% EAbuK	419,95601	28,164953	4,79036516	5,132443	0,35164592	0,00522
2,5% EAK	3368,2705	36,294933	0	0	2,17594105	0,300155
5% EAK	3446,3718	125,96696	0	0	0,64845566	0,032533
10% EAK	3062,6826	367,7504	9,45608941	0,07946	0,85821006	0,051331
15% EAK	11972,534	660,31047	2755,88771	416,9753	18,515593	0,44351

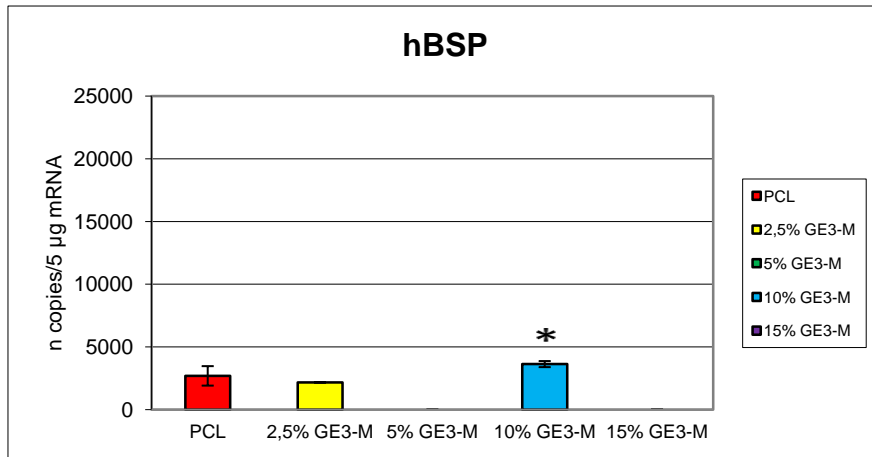


Figura 3.86 – Espressione del gene hBSP effettuata a 2 giorni dalla semina tramite q-PCR. Campioni contenenti peptide GE3-M (controllo) e riferimento. \* = p-value < 0.05 vs 5% GE3-M/ 15% GE3-M con One-Way ANOVA.

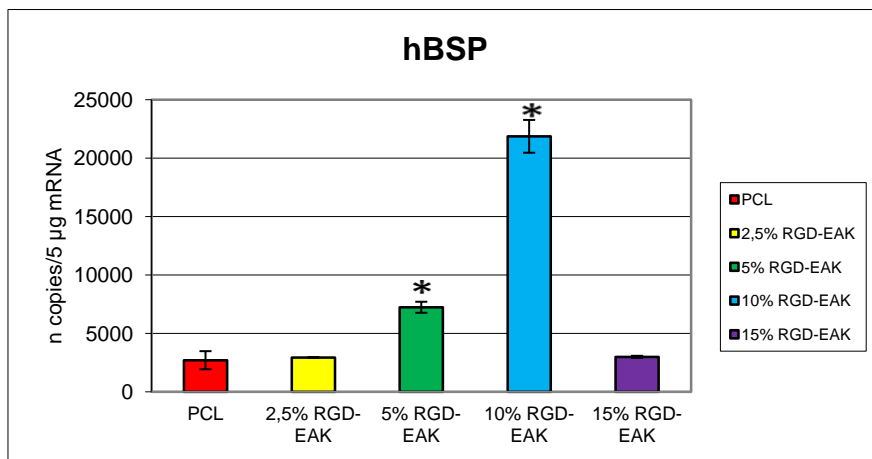


Figura 3.87 – Espressione del gene hBSP effettuata a 2 giorni dalla semina tramite q-PCR. Campioni contenenti peptide RGD-EAK e riferimento. \* = p-value < 0.05 vs tutti gli altri campioni presi in esame con One-Way ANOVA.

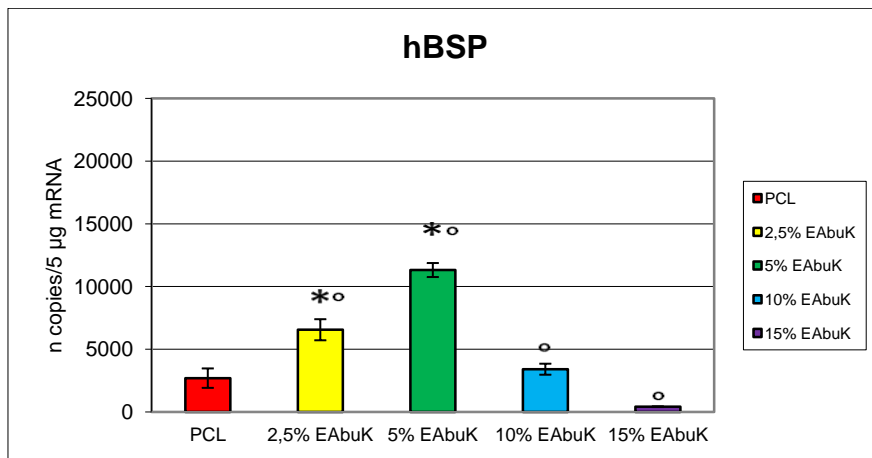


Figura 3.88 – Espressione del gene hBSP effettuata a 2 giorni dalla semina tramite q-PCR. Campioni contenenti peptide EAbuK e riferimento. \* = p-value < 0.05 vs PCL, ° = p-value < 0,05 vs tutti gli altri campioni arricchiti con EAbuK con One-Way ANOVA.



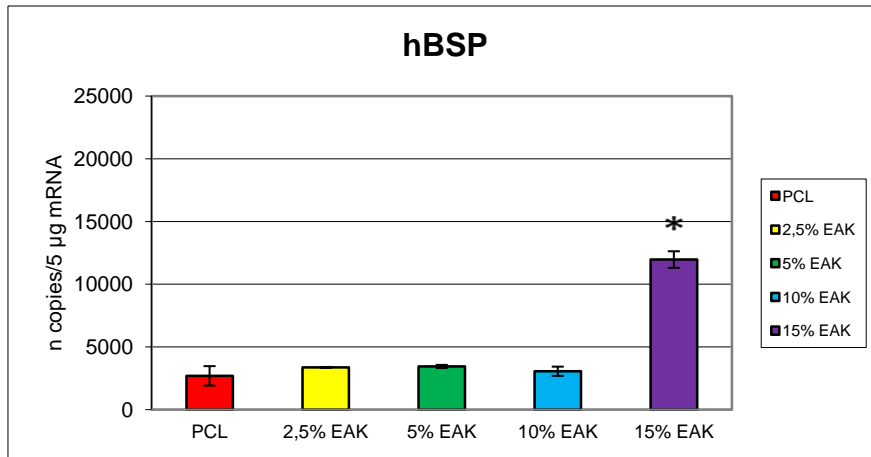


Figura 3.89 – Espressione del gene hBSP effettuata a 2 giorni dalla semina tramite q-PCR. Campioni contenenti peptide EAK e riferimento. \* = p-value < 0.05 vs tutti gli altri campioni presi in esame con One-Way ANOVA.

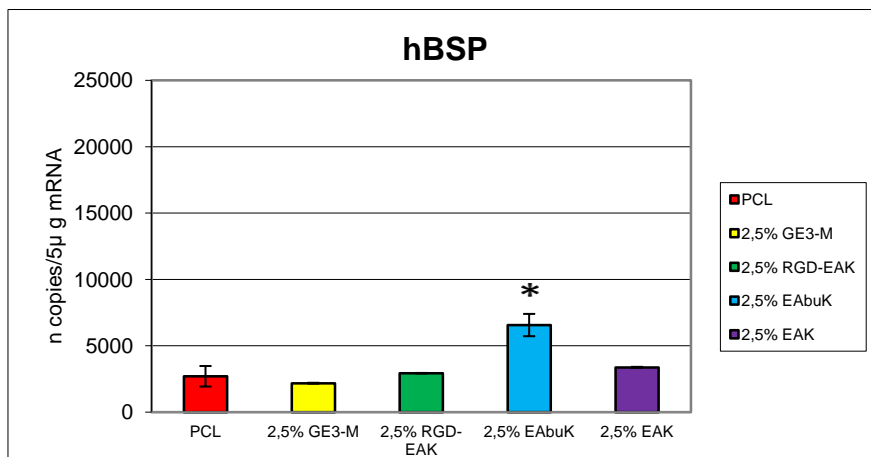


Figura 3.90 – Espressione del gene hBSP effettuata a 2 giorni dalla semina tramite q-PCR. Campioni contenenti 2,5% di peptide e riferimento. \* = p-value < 0.05 vs tutti gli altri campioni presi in esame con One-Way ANOVA.

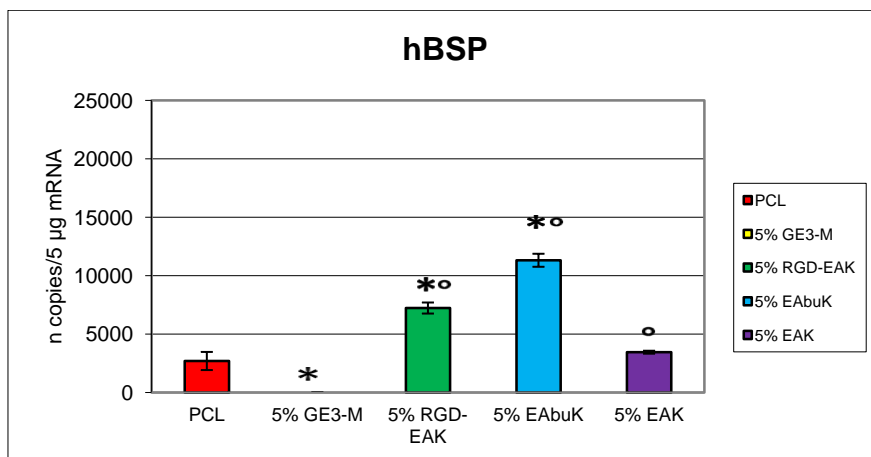


Figura 3.91 – Espressione del gene hBSP effettuata a 2 giorni dalla semina tramite q-PCR. Campioni contenenti 5% di peptide e riferimento. \* = p-value < 0.05 vs PCL, ° = p-value < 0.05 vs tutti gli altri campioni arricchiti al 2,5% di peptide con One-Way ANOVA.

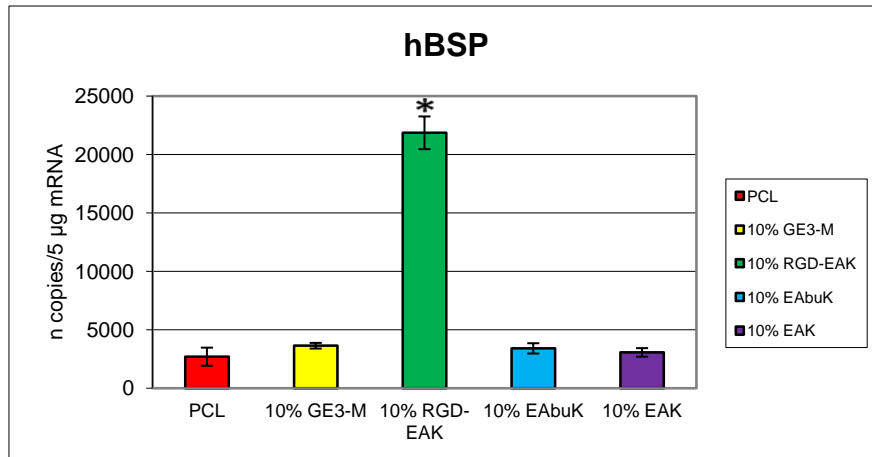


Figura 3.92 – Espressione del gene hBSP effettuata a 2 giorni dalla semina tramite q-PCR. Campioni contenenti 10% di peptide e riferimento. \* = p-value < 0.05 vs tutti gli altri campioni presi in esame con One-Way ANOVA.

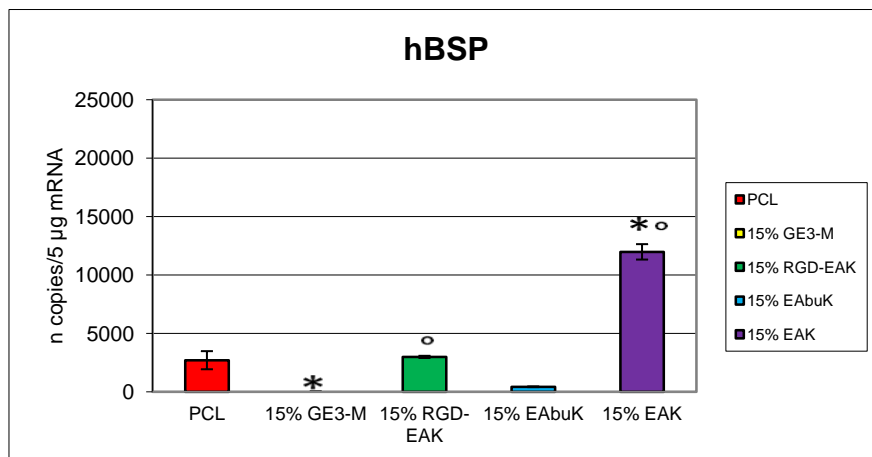


Figura 3.93 – Espressione del gene hBSP effettuata a 2 giorni dalla semina tramite q-PCR. Campioni contenenti 15% di peptide e riferimento. \* = p-value < 0.05 vs PCL, ° = p-value < 0.05 vs tutti gli altri campioni arricchiti al 15% di peptide con One-Way ANOVA.

Da un'analisi dei dati raccolti sull'espressione del gene hBSP possiamo notare come le matrici arricchite con GE3-M non portino, alle concentrazioni considerate, nessun sostanziale miglioramento rispetto al solo PCL, diversamente i SAP possono portare, in specifiche quantità, a dei miglioramenti anche molto netti, come nei casi del 10%RGD-EAK (miglioramento dell'811% rispetto al solo PCL) o del 15% EAK (444% vs PCL), circa paragonabile al 5% EAbuK, che porta ad un aumento pari al 420% rispetto al riferimento.

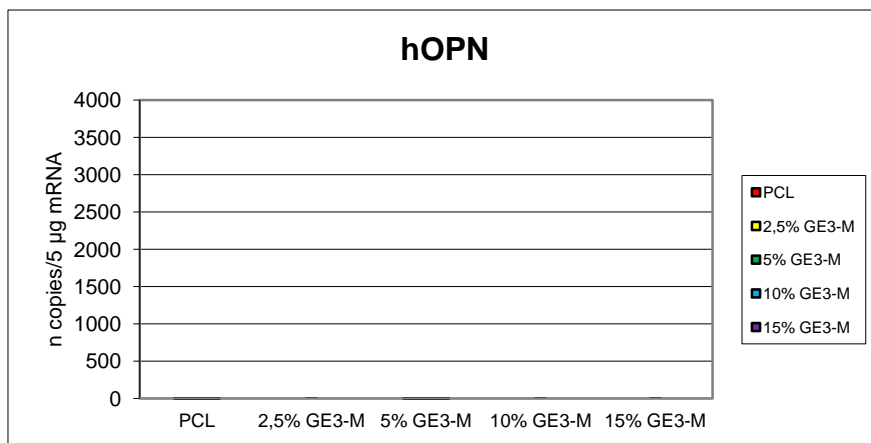


Figura 3.94 – Espressione del gene hOPN effettuata a 2 giorni dalla semina tramite q-PCR. Campioni contenenti peptide GE3-M (controllo) e riferimento. Nessun gruppo di valori è risultato significativo con One-Way ANOVA.

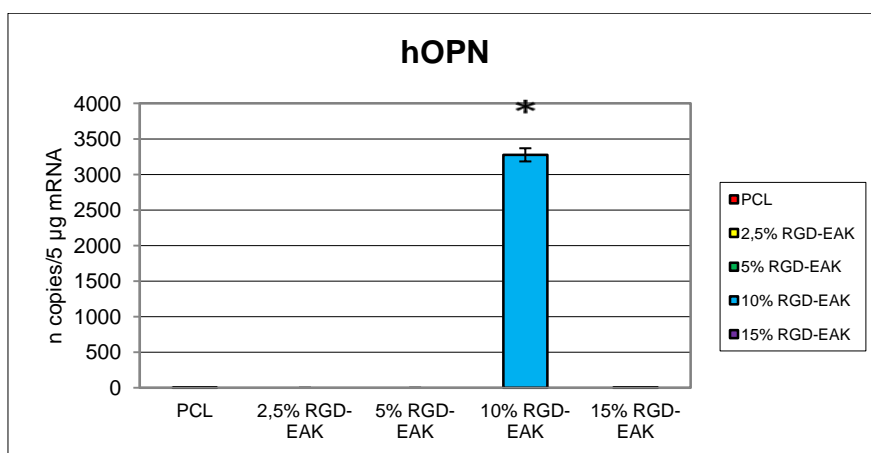


Figura 3.95 – Espressione del gene hOPN effettuata a 2 giorni dalla semina tramite q-PCR. Campioni contenenti peptide RGD-EAK e riferimento. \* = p-value < 0.05 vs tutti gli altri campioni presi in esame con One-Way ANOVA.

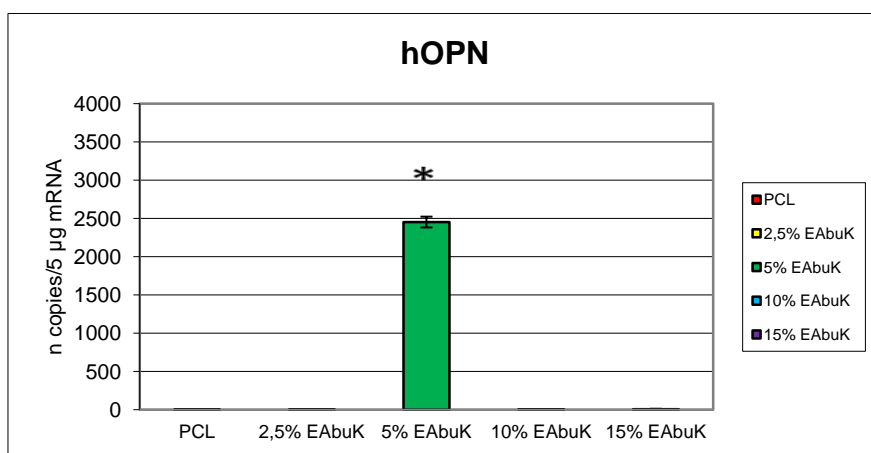


Figura 3.96 – Espressione del gene hOPN effettuata a 2 giorni dalla semina tramite q-PCR. Campioni contenenti peptide EAbuK e riferimento. \* = p-value < 0.05 vs tutti gli altri campioni presi in esame con One-Way ANOVA.

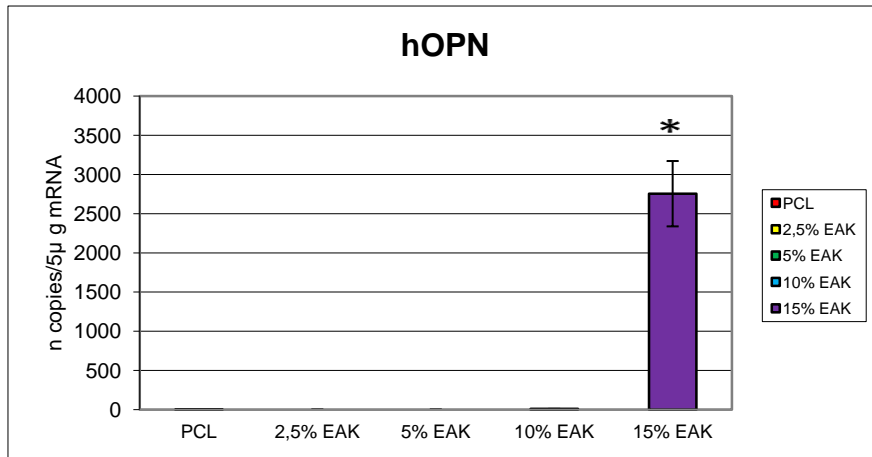


Figura 3.97 – Espressione del gene hOPN effettuata a 2 giorni dalla semina tramite q-PCR. Campioni contenenti peptide EAK e riferimento. \* = p-value < 0.05 vs tutti gli altri campioni presi in esame con One-Way ANOVA.

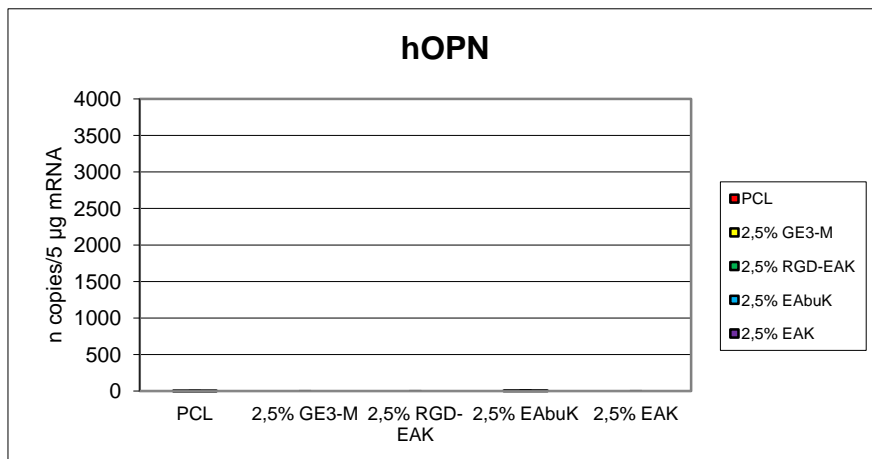


Figura 3.98 – Espressione del gene hOPN effettuata a 2 giorni dalla semina tramite q-PCR. Campioni contenenti 2,5% di peptide e riferimento. Nessun gruppo di valori è risultato significativo con One-Way ANOVA.

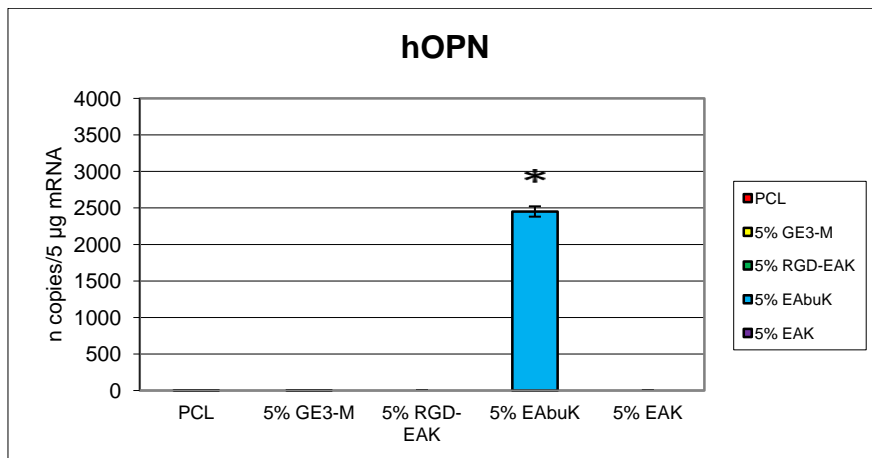


Figura 3.99 – Espressione del gene hOPN effettuata a 2 giorni dalla semina tramite q-PCR. Campioni contenenti 5% di peptide e riferimento. \* = p-value < 0.05 vs tutti gli altri campioni presi in esame con One-Way ANOVA.

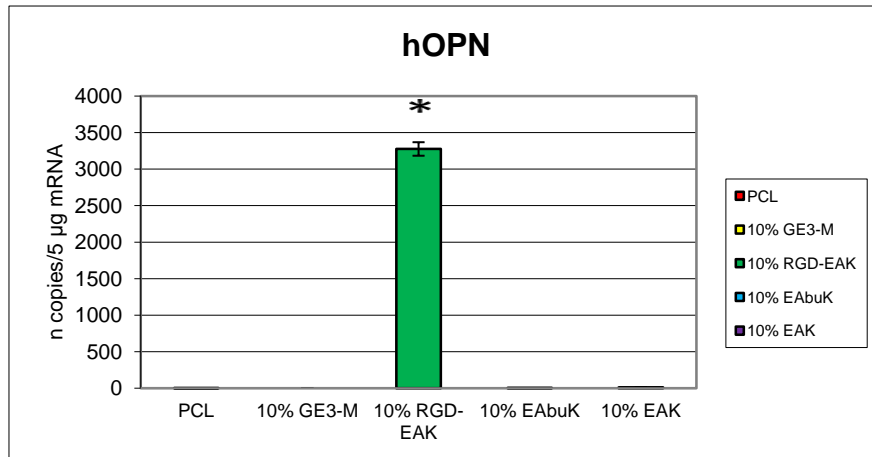


Figura 3.100 – Espressione del gene hOPN effettuata a 2 giorni dalla semina tramite q-PCR. Campioni contenenti 10% di peptide e riferimento. \* = p-value < 0.05 vs tutti gli altri campioni presi in esame con One-Way ANOVA.

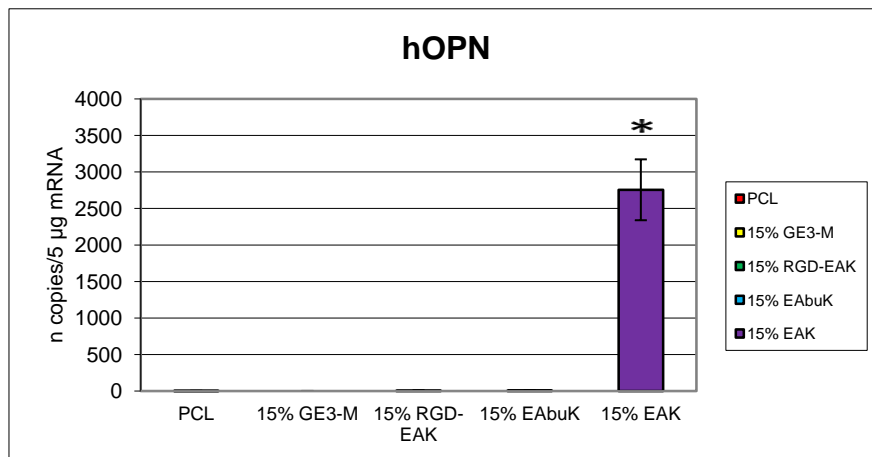


Figura 3.101 – Espressione del gene hOPN effettuata a 2 giorni dalla semina tramite q-PCR. Campioni contenenti 15% di peptide e riferimento. \* = p-value < 0.05 vs tutti gli altri campioni presi in esame con One-Way ANOVA.

L'espressione del gene hOPN ha mostrato di essere efficace solo su tre matrici, 10% RGD-EAK, che esprime osteopontina in quantità 2599 volte superiori rispetto al solo PCL, 5% EAbuK, la cui espressione è di 1944 volte quella del PCL, e 15% EAK, in cui l'osteopontina è 2186 volte maggiore del riferimento. In tutte le altre concentrazioni e nel caso del peptide non auto-aggregante, invece, i risultati sono estremamente bassi e confrontabili con la matrice non arricchita.

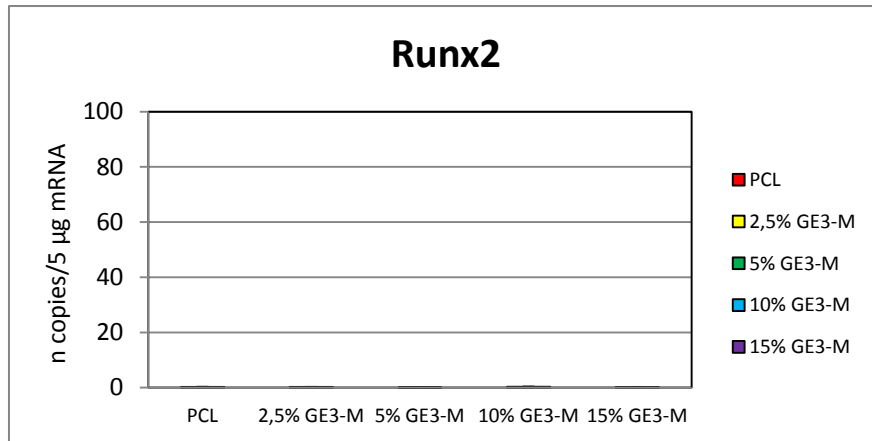


Figura 3.102 – Espressione del gene Runx2 effettuata a 2 giorni dalla semina tramite q-PCR. Campioni contenenti peptide GE3-M (controllo) e riferimento. Nessun gruppo di valori è risultato significativo con One-Way ANOVA.

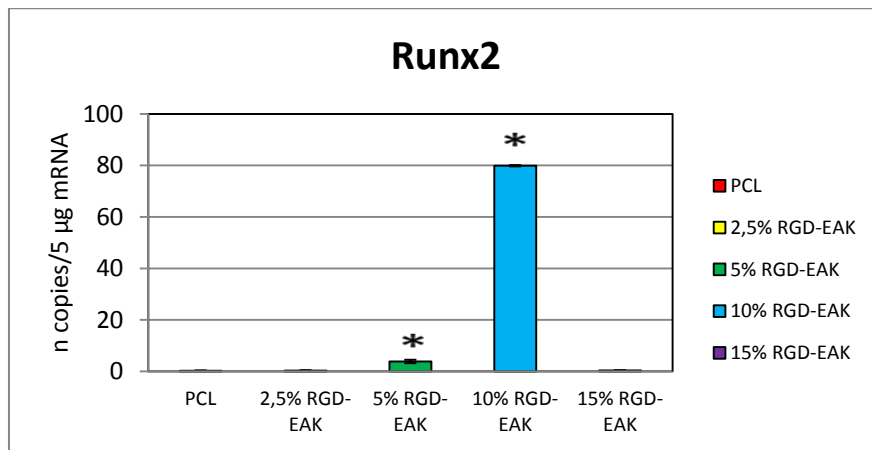


Figura 3.103 – Espressione del gene Runx2 effettuata a 2 giorni dalla semina tramite q-PCR. Campioni contenenti peptide RGD-EAK e riferimento. \* = p-value < 0.05 vs tutti gli altri campioni presi in esame con One-Way ANOVA.

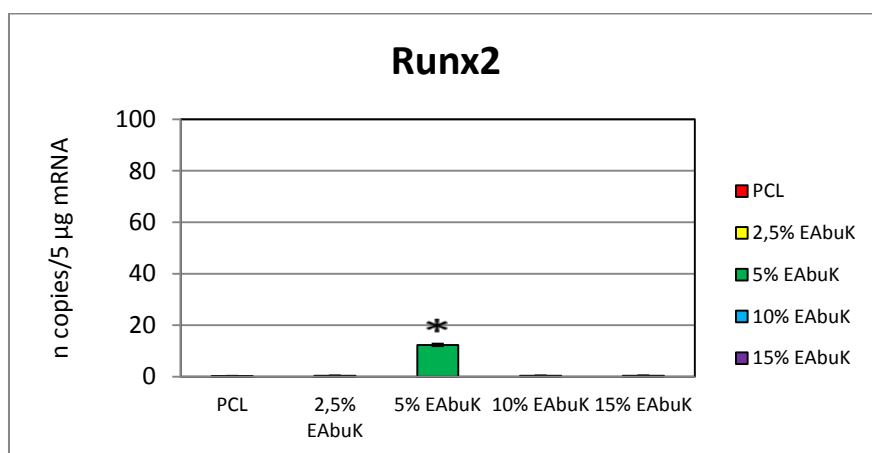


Figura 3.104 – Espressione del gene Runx2 effettuata a 2 giorni dalla semina tramite q-PCR. Campioni contenenti peptide EAbuK e riferimento. \* = p-value < 0.05 vs tutti gli altri campioni presi in esame con One-Way ANOVA.

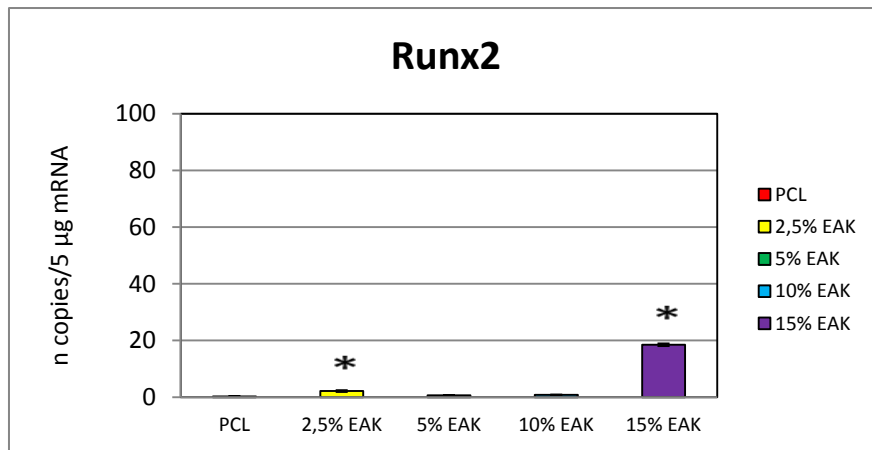


Figura 3.105 – Espressione del gene Runx2 effettuata a 2 giorni dalla semina tramite q-PCR. Campioni contenenti peptide EAK e riferimento. \* = p-value < 0.05 vs tutti gli altri campioni presi in esame con One-Way ANOVA.

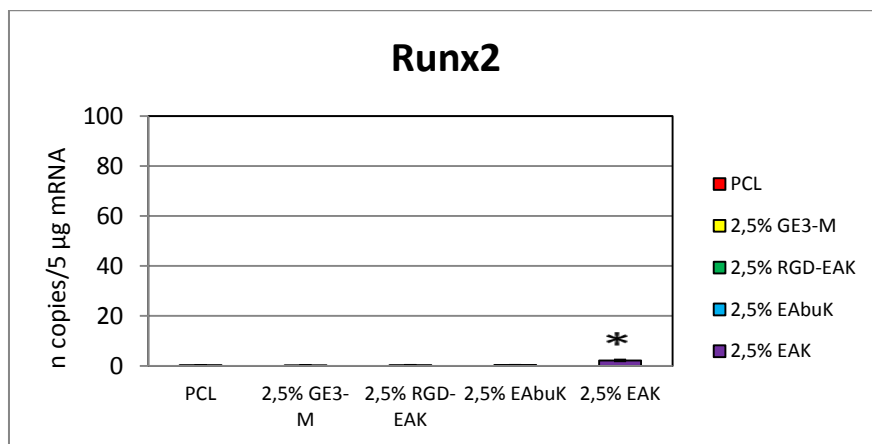


Figura 3.106– Espressione del gene Runx2 effettuata a 2 giorni dalla semina tramite q-PCR. Campioni contenenti 2,5% di peptide e riferimento. \* = p-value < 0.05 vs tutti gli altri campioni presi in esame con One-Way ANOVA.

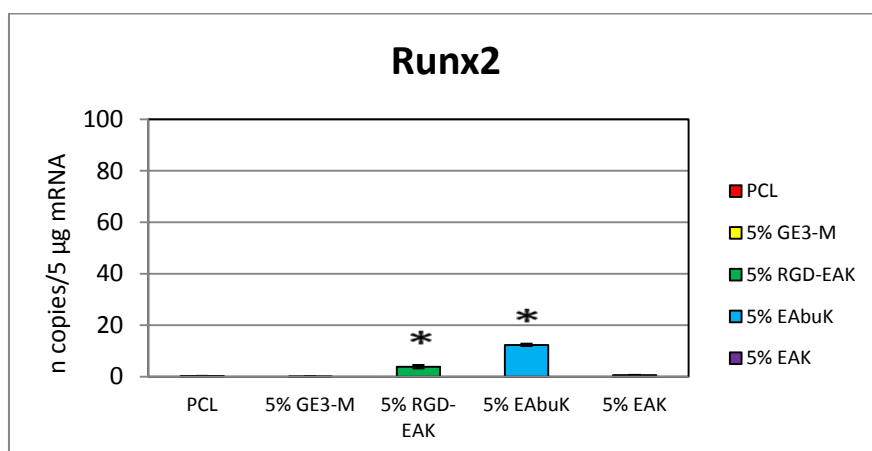


Figura 3.107 – Espressione del gene Runx2 effettuata a 2 giorni dalla semina tramite q-PCR. Campioni contenenti 5% di peptide e riferimento. \* = p-value < 0.05 vs tutti gli altri campioni presi in esame con One-Way ANOVA.

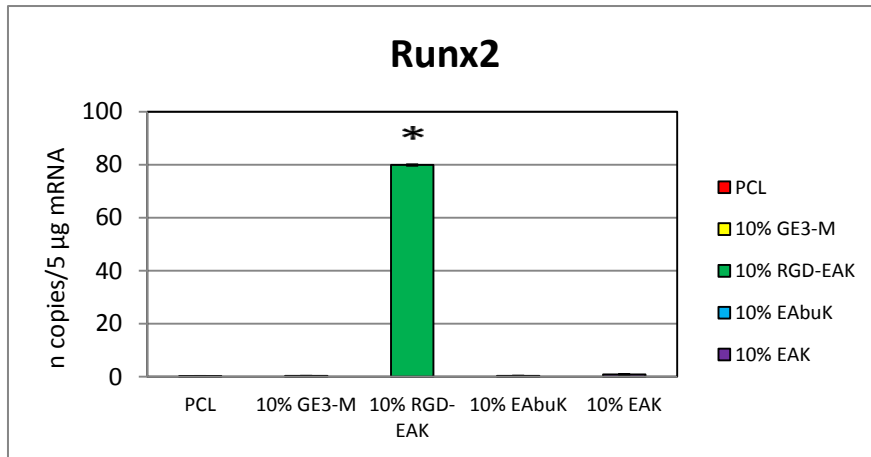


Figura 3.108 – Espressione del gene Runx2 effettuata a 2 giorni dalla semina tramite q-PCR. Campioni contenenti 10% di peptide e riferimento. \* = p-value < 0.05 vs tutti gli altri campioni presi in esame con One-Way ANOVA.

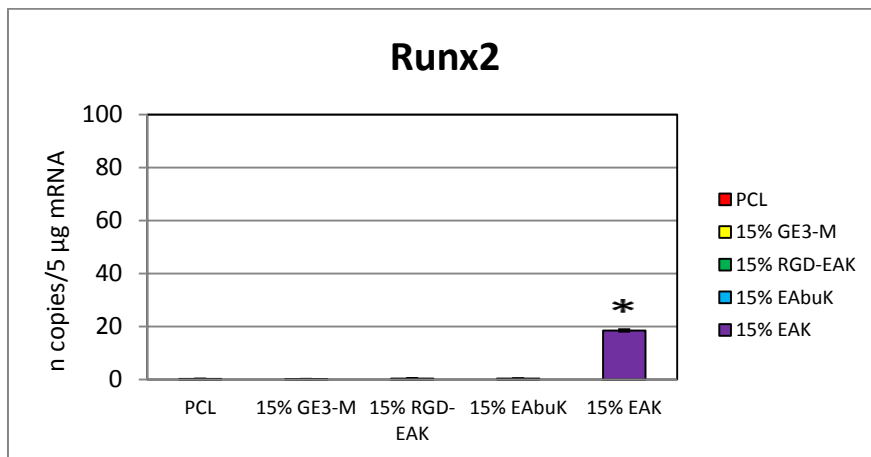


Figura 3.109 – Espressione del gene Runx2 effettuata a 2 giorni dalla semina tramite q-PCR. Campioni contenenti 15% di peptide e riferimento. \* = p-value < 0.05 vs tutti gli altri campioni presi in esame con One-Way ANOVA.

L'espressione genica di Runx2 non aumenta in maniera statisticamente significativa rispetto a PCL in seguito all'arricchimento con GE3-M mentre è possibile notare un aumento dell'espressione genica per alcune matrici arricchite con SAP. Infatti, osteoblasti seminati su scaffolds arricchiti con 10% RGD-EAK riportano un aumento dell'espressione relativa a Runx2 pari a 288 volte rispetto a quella ottenuta con la matrice in solo PCL, mentre 15% EAK aumenta l'espressione di Runx2 di 66 volte rispetto a PCL, 5% EAbuK di 44 volte contro PCL, 5% RGD-EAK 13 volte) ed infine 2,5% EAK evidenzia un aumento di 7 volte dell'espressione di Runx2 rispetto alla matrice con solo PCL.



### 3.5 - DISCUSSIONE COMPLESSIVA DEI RISULTATI

La comprensione dei meccanismi che mediano l'adesione delle cellule ai biomateriali non solo migliorerà la conoscenza dei processi cellulari coinvolti nell'ancoraggio delle cellule alla matrice extracellulare e la loro conseguente migrazione e differenziazione, ma permetterà anche di creare una piattaforma di conoscenze fondamentali per individuare strategie di riparazione di tessuti o organi e metodi di contrasto a patologie come le metastasi tumorali associate alla perdita da parte delle cellule della necessità di ancoraggio.

In questo importante filone d'indagine si innesta il presente lavoro di tesi in cui sono stati ottenuti scaffold fibrosi ibridi tra policaprolattone e peptidi auto-assemblanti per elettrofilatura di soluzioni in esafluoroisopropanolo a concentrazioni crescenti di peptidi auto-assemblanti.

L'interazione tra le cellule e il biomateriale dipende da innumerevoli variabili. Per quello che riguarda il biomateriale vi sono sia motivi molecolari specifici (peptidi adesivi come il motivo RGD o proteine della matrice extracellulare) e motivi non specifici quali la carica superficiale, la bagnabilità, la morfologia e la topografia.

La caratterizzazione chimico-fisica degli scaffold ha portato a dei risultati che possono essere così brevemente riassunti:

1. Il diametro delle fibre ibride cresce al crescere della percentuale peptidica per tutti i campioni. L'intervallo di variabilità è compreso tra 130 nm e 260 nm.
2. Le maglie, essendo i supporti elettrofilati per un ugual tempo nelle medesime condizioni, sono abbastanza omogenee. I punti 1 e 2 dimostrano che, per così dire, la rugosità superficiale della matrice elettrofilata sperimentata dalle cellule risulta pressoché invariata per i differenti campioni.
3. La difettosità in forma di gocce, presente nella matrice di solo PCL, tende a diminuire (e in alcuni casi a scomparire) all'aumentare della concentrazione di peptide.
4. I gruppi superficiali amminici presenti sulla superficie della fibra crescono al crescere della concentrazione peptidica come atteso. Sia i dati ottenuti con il test alla ninidrina sia le valutazioni XPS mettono in luce una tendenza alla saturazione per le concentrazioni superiori al 10% più marcata per il peptide di controllo.

5. La valutazione della bagnabilità indica che l'arricchimento con peptidi della matrice in PCL, siano essi sequenze auto-aggreganti o meno, porta a superfici via via più idrofiliche.
6. L'analisi FT-IR conferma che il processo di elettrofilatura ed inclusione in PCL non altera la struttura secondaria  $\beta$ -sheet tipica dei peptidi auto-aggreganti che sta alla base della loro capacità di formare idrogeli caratterizzati da un network di nanofibre intrecciate.

La caratterizzazione biologica ha portato a questi risultati:

1. L'arricchimento del PCL con tutti i peptidi proposti porta a un incremento nel numero di cellule adese. Incrementi dell'adesione del 100% rispetto al PCL sono presenti nelle matrici arricchite con i peptidi auto-assemblanti mentre l'incremento di adesività si ferma ad un +80% per il peptide non auto-assemblante di controllo. In ciascuna matrice vi sono più arricchimenti che portano ad incrementi significativi rispetto alla matrice di solo PCL (2.5% e 15% per EAK; 5% e 10% per EAbuK, 5% e 15% per RGD-EAK e 5% e 15% per GE3-M).
2. Per ciò che riguarda i livelli di calcio, le matrici arricchite di peptidi forniscono valori più alti rispetto al controllo. Le matrici contenenti i peptidi auto-assemblanti raggiungono, a determinate concentrazioni, incrementi maggiori rispetto a quelli ottenuti con il peptide non auto-aggregante. E' interessante notare che si ottengono per ciascun tipo di matrice i valori maggiori di calcio in corrispondenza di percentuali che hanno fornito ottimi risultati nei saggi di adesione.
3. I dati riguardanti l'espressione genica restringono in modo netto il numero delle matrici in grado di interagire in modo specifico con le cellule. L'espressione genica di hBSP, hOPN e hRunx2 risultano incrementate in modo significativo per tre matrici: EAK al 15%; RGD-EAK al 10% e EAbuK al 5%.

E' degno di nota sottolineare come le matrici EAK al 15%; RGD-EAK al 10% e EAbuK al 5% (da ora chiamate matrici bioattive) siano in grado di incrementare tutte le risposte cellulari investigate: adesione, produzione di calcio, espressione genica di proteine importanti per gli osteoblasti.

E' chiaro quindi che le cellule prediligono le matrici contenenti peptidi auto-aggreganti, ma per ciascuna sequenza auto-aggregante l'arricchimento preferito è differente.

Al fine di capire quali possono essere le caratteristiche dello scaffold alla base del gradimento cellulare, sono state esaminati tutti i dati in nostro possesso. Per quello che riguarda le variabili non specifiche:

- La morfologia delle matrici è alquanto simile in quanto a diametro delle fibre ibride, all'ampiezza delle maglie e anche alla difettosità (dati non riportati).
- La carica superficiale delle fibre è dovuta alla percentuale di peptidi esposti in superficie. I gruppi amminici esposti per GE3-M sembrano di molto inferiori rispetto a quelli presenti per i peptidi auto-aggreganti. Le matrici bioattive sono caratterizzate da alte percentuali di gruppi amminici superficiali. Tale differenza non sembra presente nei dati XPS, a tal proposito è necessario ricordare come questa tecnica registri la quantità dei vari atomi componenti la matrice entro i primi 5-10 nm dalla superficie. Se il dato che attesta la differente densità superficiale di gruppi amminici verrà confermato potrebbe essere spiegabile attraverso una differente disposizione delle catene peptidiche che nel caso degli auto-assemblanti hanno una forma estesa che permette una maggior esposizione delle catene laterali degli amminoacidi mentre nel caso del GE3-M la forma *random* porterebbe a un'esposizione inferiore dei gruppi carichi. Poiché si sta parlando di gruppi carichi positivamente il dato potrebbe essere in accordo con quanto riportato in letteratura [55] ovvero che le superfici cariche positivamente risultano promuovere l'adesione cellulare meglio di quanto sappiano fare superfici con carica netta negativa. Il meccanismo di attrazione sembra sia mediato dal glicocalice delle cellule, dalle integrine o altre proteine della matrice extracellulare.
- In letteratura si trovano valori di angolo di contatto considerati ottimali (attorno a 60°, [55]) per incentivare l'adesione: nel nostro caso nessuna delle matrici bioattive fornisce una superficie leggermente idrofilica come quella indicata in letteratura.

Per ciò che riguarda le variabili specifiche:

- I peptidi auto-aggreganti vengono utilizzati come scaffold per la crescita di cellule e la loro veicolazione. Il loro gradimento da parte delle cellule sembra legato alla loro

struttura nanofibrosa molto ricca in acqua [9]. Le tre matrici che hanno massimizzato l'adesione, la produzione di calcio e l'espressione genica delle tre proteine importanti per il tessuto osseo appartengono a pieno titolo a questa classe di peptidi. Il peptide GE3-M è in grado di incrementare l'adesione e anche la produzione di calcio mentre non induce espressione genica: probabilmente il miglioramento dell'adesione può essere dovuto alla creazione di una matrice più idrofilica rispetto al PCL di partenza.

- In uno dei peptidi auto-assemblanti testati vi è la presenza di un motivo specifico per l'adesione cellulare: il motivo RGD. Se si osservano i dati di adesione per le matrici contenenti questo peptide si osservano valori medi via via maggiori all'incrementare del contenuto peptidico: ciò sembra indicare l'importanza ai fini dell'adesione della concentrazione superficiale di tale motivo. Se però andiamo a mettere in correlazione questi dati con quelli relativi alle matrici arricchite con EAK si può vedere che i risultati ottenuti con RGD-EAK superano quelli ottenuti con EAK nel caso degli arricchimenti 5% e 10%, risultano pressoché identici per l'arricchimento al 15% e addirittura la matrice di EAK al 2.5% surclassa in adesione la matrice al 2.5% di RGD-EAK. Questi dati sembrano indicare la presenza di un intervallo finestra per le concentrazioni di RGD bioattive, ma anche la preferenza di matrici di solo EAK per gli arricchimenti a percentuali basse forse dovuto a modifiche strutturali dell'idrogel dovute all'inserimento di una sequenza addizionale rispetto al *pattern* tipico degli auto-assemblanti. Resta comunque assodato che la matrice al 10% in RGD-EAK induce gli incrementi più pronunciati rispetto al controllo in tutti i saggi biologici eseguiti.

Riassumendo, per quanto riguarda le variabili specifiche, resta da investigare a fondo - ai fini di motivare la predilezione delle cellule per le matrici bioattive - la struttura nanofibrosa che ciascun peptide auto-aggregante utilizzato assume nelle differenti matrici ibride.

# Capitolo 4

## Conclusioni

In questo lavoro di tesi sono stati elettrofilati numerosi *scaffold*, contenenti differenti percentuali di vari peptidi. È stata effettuata anche una dettagliata analisi delle caratteristiche superficiali e morfologiche.

Abbiamo avuto nuovamente conferma del gradimento cellulare per i peptidi auto-aggreganti rispetto ai peptidi non auto-aggreganti: i SAP hanno dato risultati mediamente migliori del GE3-M, la differenza è stata ancora più marcata nel caso dell'espressione genica, in cui esclusivamente i peptidi auto-assemblanti hanno portato a miglioramenti significativi.

Sono state individuate in particolare tre matrici che hanno dato dei risultati estremamente positivi nei saggi biologici. Le matrici contenenti il 10% di RGD-EAK, il 5% di EAbuK e il 15% di EAK hanno mostrato incrementi dell'adesione cellulare dell'ordine del +100% rispetto al riferimento, incrementi molto significativi nei livelli di calcio e miglioramenti sorprendenti per quanto riguarda l'espressione genica di tre marcatori.

Nonostante l'accurata fase di caratterizzazione delle matrici, non è stato possibile determinare una relazione semplice in grado di spiegare la "scelta" delle specifiche concentrazioni di peptide operata dalle cellule, si è potuto tuttavia notare come per ogni peptide le prestazioni migliori siano state ottenute per percentuali diverse; il che ci porta a supporre che vi sia una relazione complessa che coinvolge sia la natura del singolo peptide che la struttura nanofibrosa che tale peptide assume a quella data concentrazione.

È utile osservare come nella pur ricca produzione scientifica internazionale su questi argomenti manchi uno studio, come quello qui proposto, su un arricchimento progressivo delle fibre elettrofilate con biomolecole.

Uno degli svantaggi degli idrogeli di peptidi auto-assemblanti è la carenza di proprietà meccaniche adeguate a molte applicazioni: gli idrogeli sono molto soffici e difficili da maneggiare. L'inclusione in materiali polimerici come il PCL può compensare tale carenza ovviando, allo stesso tempo, ai maggiori svantaggi dei polimeri sintetici: l'idrofobicità e l'assenza di segnali biochimici.

Gli sviluppi futuri saranno quindi volti a determinare le proprietà meccaniche delle matrici ibride gradite alle cellule.



# Nomenclatura

A = Ala = alanina

Abu = acido 2-amminobutirrico

BMP-2 = proteine morfogenetiche dell'osso di tipo 2

BMPs = proteine morfogenetiche dell'osso

BMSC = cellule staminali del midollo osseo

BSP = sialoproteina dell'osso

cDNA = DNA complementare

D = Asp = acido aspartico

DCM = diclorometano

DIPEA = N,N-diisopropilettilammina

DMF = N,N-dimetilformammide

DNA = acido desossiribonucleico

DoE = Design of Experiment

E = Glu = acido glutammico

ECM = matrice extra-cellulare

EGF = fattore di crescita epiteliale

ESEM = microscopio elettronico a scansione ambientale

FBS = siero fetale bovino

FDA = Food and Drug Administration

Fr = frazione

FT-IR = spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier

G = Gly = glicina

GA3PDH = gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi

GLA = acido  $\gamma$ -carbossiglutammico

HA = idrossiapatite

hBMSC = cellule staminali del midollo osseo umano

hBSP = sialoproteina dell'osso umano

HBTU = 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio esafluorofosfato

HFIP = esafluoro-2-propanolo

H = His = istidina

HOBt = 1-idrossibenzotriazolo

hOPN = osteopontina umana

HPLC = cromatografia liquida ad alta prestazione

IGF = fattore di crescita insulino-simile

IR = infrarossi

K = Lys = lisina

MEF = fibroblasti embrionali primari

mRNA = RNA messaggero

MTT = 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

NMP = N-metil-2-pirrolidone

*o*-CPC = *o*-cresoltaleina complessone

OPN = osteopontina

PBS = tampone fosfato salino

PCL = policaprolattone

PCR = Polymerase Chain Reaction

PDGF = fattore di crescita derivato dalle pastrine

PEO = polietilen ossido

PES = polietersolfoni

PGA = acido poliglicolico

PGs = proteoglicani

PHB = poli-idrossibutirrato poli-idrossibutirrato-co-idrossivalerianato

PHBV = poli-idrossibutirrato-co-idrossivalerianato

F = Phe = fenilalanina

PLA = acido polilattico

PLGA = copolimero PGA/PLA

PM = peso molecolare

P = Pro = prolina

PVA = polivinilalcol

q-PCR = PCR quantitativa

R = Arg = arginina

rBMSC = cellule staminali del midollo osseo di ratto

RGD = sequenza arginina + glicina + acido aspartico



rp-HPLC = cromatografia liquida ad alta prestazione a fase inversa

rt-PCR = PCR in tempo reale

Runx2 = Runt-related transcription factor 2

SAP = peptidi auto-aggreganti

SEM = microscopio elettronico a scansione

SPPS = sintesi peptidica in fase solida

TCA = acido tricloroacetico

TES = trietilsilano

TFA = acido trifluoroacetico

TGF = fattore di crescita trasformante

T = Thr = treonina

Y = Tyr = tirosina

UV = ultravioletti

Vis = visibile

XPS = spettroscopia fotoelettronica a raggi X



# Riferimenti bibliografici

1. Di Bello C., *Biomateriali - Introduzione allo studio dei materiali per uso biomedico*. Patron Editore, Bologna, 2004.
2. Di Bello C., A. Bagno, *Interazioni tra biomateriali e tessuti*. Patron Editore, Bologna, 2009.
3. Gambaretto R, *Peptidi per la progettazione di biomateriali innovativi: sintesi e studi conformazionali*. Dottorato di ricerca in Scienze Chimiche, Facoltà di Scienze matematiche, fisiche, naturali, Università degli Studi di Napoli, 2005.
4. J.P. Bilezikian, *Principles of bone biology*. Elsevier, 2008
5. Pham Q.P. Sharma U. Mikos A.G. *Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: a review*. Tissue Eng., 2006; 12 (5): 1197-211.
6. Sell S.A., McClure M.J., Ayres C.E. Simpson D.G., Bowlin G.L. *Preliminary investigation of air gap electrospun silk-fibroin-based structures for ligament analogue engineering*. J. Biomater Sci Polym Ed. 2010. Epub.
7. H. Yoshimoto, Y.M. Shin, H. Terai, J.P. Vacanti, *A biodegradable nanofiber scaffold by electrospinning and its potential for bone tissue engineering*. Biomaterials, 2003; 24: 2077–2082.
8. Zhang L, Thomas J. Webster *Nanotechnology and nanomaterials: Promises for improved tissue regeneration*. Nano Today, 2009; 4(1): 66-80.
9. Zhang S. et al.: *Emerging biological materials through molecular self-assembly*. Biotech. Adv. 2002; 20: 321-339.
10. 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, Università degli Studi di Padova. 2008.
11. Gambaretto R., Tonin L., Di Bello C., Dettin M. *Self-assembling peptides: sequence, secondary structure in solution and film formation*. Biopolymers. 2008; 89 (11): 906:15
12. Nanci A, Wuest JD, Peru L, Brunet P, Sharma V, Zalzal S, McKee MD, *Chemical modification of titanium surfaces for covalent attachment of biological molecules*. Journal of Biomedical Material Research, 1998; 40(2): 324-35.

13. A. S. Badami, M. R. Kreke, M. S. Thompson, J. S. Riffle, A. S. Goldstein, *Effect of fiber diameter on spreading, proliferation, and differentiation of osteoblastic cells on electrospun poly(lactic acid) substrates*. *Biomaterials*, vol. 27, pp. 596–606, 2006.
14. A.S. Badami, M.R. Kreke, M.S. Thompson, J.S. Riffle, A.S. Goldstein, *Bone scaffolds from electrospun fiber mats of poly(3-hydroxybutyrate), poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and their blend*. *Polymer*, vol. 48, pp. 1419–1427, 2007.
15. Bashur C.A., Dahlgren L.A., Goldstein A.S. *Effect of fiber diameter and orientation on fibroblast morphology and proliferation on electrospun poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) meshes*. *Biomaterials*. 2006; 27 (33): 5681-8.
16. Nam J. Johnson J. Lannutti J. J. Agarwal S. *Modulation of embryonic mesenchymal progenitor cell differentiation via control over pure mechanical modulus in electrospun nanofibers*. *Acta biomater.* 2011; 7 (4): 1516-24.
17. Y. Zhang, H. Ouyang, C.T. Lim, S. Ramakrishna, Z.M. Huang, *Electrospinning of gelatin fibers and gelatin/PCL composite fibrous scaffolds*. *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 72B, pp. 156–165, 2005.
18. H.W. Kim, H.S. Yu, H.H. Lee, *Nanofibrous matrices of poly(lactic acid) and gelatin polymeric blends for the improvement of cellular responses*. *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 87A, pp. 25–32, 2008.
19. D.I. Zeugolis, S.T. Khew, E.S.Y. Yew, A.K. Ekaputra, Y.W. Tong, L.L. Yung, D.W. Hutmacher, C. Sheppard, M. Raghunath, *Electrospinning of pure collagen nano-fibres - Just an expensive way to make gelatin?*. *Biomaterials*, vol. 29, pp. 2293–2305, 2008.
20. H.J. Jin, J. Chen, V. Karageorgiou, G.H. Altman, D.L. Kaplan, *Human bone marrow stromal cell responses on electrospun silk fibroin mats*. *Biomaterials*, vol. 25, pp. 1039–1047, 2004.
21. H.W.Kim, H.E.Kim, J.C.Knowles, *Production and potential of bio-active glass nanofibers as a next-generation biomaterial*. *Adv. Funct. Mater.*, vol. 16, pp. 1529–1535, 2006.
22. H.W. Kim, H.E. Kim, *Nanofiber generation of hydroxyapatite and fluor-hydroxyapatite bioceramics*. *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 77B, pp. 323–328, 2006.
23. Y. Wu, L.L. Hench, *Preparation of hydroxyapatite fibers by electrospinning technique*. *J. Am. Ceram. Soc.*, vol. 87, pp. 1988–1991, 2004.

24. X. Dai, S. Shivkumar, *Electrospinning of PVA-calcium phosphate sol precursors for the production of fibrous hydroxyapatite*. J. Am. Ceram. Soc., vol. 90, pp. 1412–1419, 2007.
25. S. Sakai, Y. Yamada, T. Yamaguchi, K. Kawakami, *Prospective use of electrospun ultra-fine silicate fibers for bone tissue engineering*. Biotechnol. J., vol. 1, pp. 958–962, 2006.
26. C. Lia, C. Veparia, H.J. Jina, H.J. Kima, D.L. Kaplan, *Electro-spun silk-BMP-2 scaffolds for bone tissue engineering*. Biomaterials, vol. 27, pp. 3115–3124, 2006.
27. *User Manual*, Model 431A Peptide Synthesizer (1990) Applied Biosystem (ed.), versione 1.12.
28. 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.
29. Schachner M.: *Neurobiology: Nervous engineering*, Nature. 2000; 405: 747-748.
30. 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.
31. E. Garreta, E. Genové, S. Borrós, C.E. Semino, *Osteogenic differentiation of mouse embryonic stem cells and mouse embryonic fibroblasts in a three-dimensional self-assembling peptide scaffold*. Tissue Eng., vol. 12, pp. 2215–2227, 2006.
32. K. Hamada, M. Hirose, T. Yamashita, H. Ohgushi, *Spatial distribution of mineralized bone matrix produced by marrow mesenchymal stem cells in self-assembling peptide hydrogel scaffold*. J. Biomed. Mater. Res., vol. 84A, pp. 128–136, 2008.
33. H. Hosseinkhania, M. Hosseinkhanib, F. Tianc, H. Kobayashic, Y. Tabata, *Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in self-assembled peptide-amphiphile nanofibers*. Biomaterials, vol. 27, pp. 4079–4086, 2006.
34. F. Zhang, G.S. Shi, L.F. Ren, F.Q. Hu, S.L. Li, Z.J. Xie, *Designer self-assembling peptide scaffold stimulates pre-osteoblast attachment, spreading and proliferation*. J. Mater. Sci., Mater. Med., vol. 20, pp. 1475–1481, 2009.

35. A. Horii, X. Wang, F. Gelain, S. Zhang, *Biological designer self-assembling peptide nanofiber scaffolds significantly enhance osteoblast proliferation, differentiation and 3-D migration*. PloS ONE, vol. 2, pp. 190–199, 2007.
36. H. Misawa, N. Kobayashi, A. Soto-Gutierrez, Y. Chen, A. Yoshida, J.D.Rivas-Carrillo, N.Navarro-Alvarez, K.Tanaka, A.Miki, J.Takei, T. Ueda, M. Tanaka, H. Endo, N. Tanaka, T. Ozaki, *PuraMatrix™ facilitates bone regeneration in bone defects of calvaria in mice*. Cell Transplant., vol. 15, pp. 903–910, 2006.
37. J.D. Hartgerink, E. Beniash, S.I. Stupp, *Self-assembly and mineralization of peptide-amphiphile nanofibers*. Science, vol. 294, pp. 1684–1688, 2001.
38. A. Mata, Y. Geng, K.J. Henrikson, C. Aparicio, S.R. Stock, R.L. Satcher, S.I. Stupp, *Bone regeneration mediated by biomimetic mineralization of a nanofiber matrix*. Biomaterials, vol. 31, pp. 6004–6012, 2010.
39. Zhu H. Yu D. Zhou Y. Wang C. Gao M. Jiang H. Wang H. *Biological activity of a nanofibrous barrier membrane containing bone morphogenetic protein formed by core-shell electrospinning as a sustained delivery vehicle*. J. Biomed mater. 2013; 101 (4): 541-52.
40. A. Tambralli, B. Blakeney, J. Anderson, M. Kushwaha, A. Andukuri, D. Dean, H.W. Jun, *A hybrid biomimetic scaffold composed of electrospun polycaprolactone nanofibers and self-assembled peptide amphiphile nanofibers*. Biofabrication, vol. 1, pp. 1–11, 2009.
41. Danesin R. Brun P. Roso M. Delaunay F. Samoullain V. Brunelli K. Iucci G. Ghezzi F. Modesti M. Castagliuolo I. Dettin M. *Self-assembling peptide-enriched electrospun polycaprolactone scaffolds promote the h-osteoblast adhesion and modulate differentiation-associated gene expression*. Bone. 2012; 51 (5): 851-9.
42. Merrifield RB, *Solid Phase Synthesis*. Science. 1986; 232: 341-7.
43. Pearson DA, Blanchette M, Baker ML, Guindon A, *Trialkylsilanes as scavengers for the trifluoroacetic acid deblocking of protecting groups in peptide synthesis*. Tetrahedron Letters, 1989; 30(21): 2739-42.
44. Stulik K, Pacakova V, Suchankova J, Claessens HA, *Stationary phase for peptide analysis by high performance liquid chromatography: a review*. Analytica Chimica Acta, 1997; 352(1-3): 1-19.

45. 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.
46. Tougaard S. *XPS for quantitative analysis of surface nano-structures*. *Microsc. Microanal.* 2005; Suppl. 2: 676-7.
47. Bison G. *Peptidi auto-assemblanti nella formulazione di nanofibre polimeriche orientate per la riparazione del tessuto nervoso*. Laurea Specialistica in Ingegneria dei Materiali. Dipartimento di Ingegneria Industriale, Università degli Studi di Padova. 2013.
48. W.K. Son, J.H. Youk, T.S. Lee, W.H. Park,. *The effect of solution properties and polyelectrolyte on electrospinning of ultrafine poly(ethylene oxide) fibres*. *Polymer* (2004); 45: 2959-2966.
49. C. Mit-uppatham, M. Nithitanakul, P. Supaphol,. *Ultrafine electrospun polyamide-6 fibers: effect of solution conditions on morphology and average fiber diameter*. *Chem Physic* 2004; 205: 2327-2338.
50. Chuysinuan P. Pavasant P. Supaphol P. *Preparation and characterization of caffeic acid-grafted electrospun poly(L-lactic acid) fiber mats for biomedical applications*. *ACS appl. Mater. Interfaces*. 2012; Epub.
51. G. Beamson, D. Briggs *High Resolution XPS of Organic Polymers*. ESCA Scienta 300 Database John Wiley & Sons Ed.
52. G.Polzonetti, C.Battocchio, G.Iucci, M.Dettin, R. Gambaretto, C. Di Bello, V.Carravetta. *Thin films of a self-assembling peptide on TiO<sub>2</sub> and Au studied by NEXAFS, XPS and IR spectroscopies*. *Materials Science and Engineering C*. 2006; 26: 929-934.
53. G.Iucci, C.Battocchio, M. Dettin., R.Gambaretto, C.Di Bello, F. Borgatti, V. Carravetta, S. Monti, G. Polzonetti. *Peptides adsorption on TiO<sub>2</sub> and Au: molecular organization investigated by NEXAFS, XPS and IR*. *Surface Science*. 2007; 601: 3843-3849.
54. Brun P. Ghezzi F. Roso M. Danesin R. Palù G. Bagno A. Modesti M. Castagliuolo I. Dettin M. *Electrospun scaffolds of self-assembling peptides with poly(ethylene oxide) for bone tissue engineering*. *Acta Biomater*. 2011; 7 (6): 2526-32.
55. Leal-Egana A. Diaz-Cuenca A. Boccaccini A. R. *Tuning of cell-biomaterial anchorage for tissue regeneration*. *Acta Biomater*. 2013; 25 (29): 4049-57.





# Ringraziamenti

Mi sembra doveroso ringraziare tutti coloro che hanno partecipato alla realizzazione di questo lavoro, innanzitutto la Professoressa Monica Dettin, per la sua disponibilità, la sua competenza e il suo costante impegno. Un ringraziamento va anche alla dottoressa Paola Brun, per la pazienza dimostrata, il suo sostegno e la sua simpatia. Grazie anche alla dottoressa Annj Zamuner per avermi insegnato tutto quello che so del laboratorio, per aver saputo rispondere alle mie domande e per il suo proverbiale buonumore del lunedì mattina. Devo ringraziare anche l'ingegner Martina Roso, sempre pronta a seguire i progressi del lavoro e a mettermi del suo perché venisse al meglio.

Un doveroso ringraziamento va ai colleghi del laboratorio: parafrasando Conrad posso dire che non sarebbero potuti essere migliori nemmeno se avessi deciso io come farli; quindi grazie a Margherita, che mi ha affiancato per tutto il tirocinio, e a Marco, ma anche a tutti gli altri.

Voglio ringraziare la mia famiglia, i miei fratelli, Stefano e Mauro, le nonne Daria e Gina e in particolare i miei genitori per avermi permesso di studiare e avermi sostenuto per tutto questo periodo di studi e prima ancora, da quando riesco a ricordare. Ho avuto la fortuna di poter scegliere cosa fare e di aver avuto il loro appoggio trasversale in quasi tutte le avventure che ho voluto intraprendere.

Voglio anche ringraziare tutte le persone che mi sono state vicine dal 2006, quando mi sono iscritto all'Università, sia a quelli arrivati di recente che a quelli che si sono allontanati nel frattempo, oltre ovviamente a quelli che mi sono rimasti vicini nonostante tutti gli anni passati.

Un ringraziamento speciale va a Valentina, l'unica persona in grado di sopportarmi anche sotto stress e di essere anche quasi contenta di farlo, sempre e comunque al mio fianco qualunque cosa succedesse.

I ringraziamenti sarebbero davvero tanti e sarebbe impossibile stabilire un ordine, dunque proseguirò in ordine casuale, cercando di non dimenticare nessuno, ma sicuro di farlo. Ringrazio Andrea, amico ormai da una vita, che mi insegna ogni volta come basti poco a far

capire a una persona che ci tieni a lei, assieme a lui ringrazio anche Rachele, grande organizzatrice di rimpatriate riparatrici e cara amica. I due Matteo, nell'ordine che loro preferiscono: si sono incontrati poche volte ma entrambi sono stati in grado di starmi vicino, sostenermi quando ho avuto dei momenti difficili, accompagnarmi nelle avventure artistiche e imparare a conoscermi come pochi altri. Un altro doveroso ringraziamento va a Giovanna, che pur dalle fredde terre scandinave riesce a mandare affetto (e correzioni). Ringrazio anche l'altro Andrea, non senza una vena polemica, ma cosciente di quanto la sua amicizia sia stata importante per farmi crescere.

Ne rimangono tanti da ringraziare, e qui partiranno le dimenticanze: Matteo, Adelaide (ormai irreperibile), Edda, Riccardo, Nicola, Sara, Nicola, Cristina, Chiara, Orianna, Davide, Mara, i nuovi arrivati Sha, Carlo e Davide, Giacomo, Damiano e anche un pochino Stefano.

Ringrazio tutti di cuore. Avrei voluto mettere una frase strappalacrime alla fine di questi ringraziamenti, una di quelle che rimangono impresse e scaldano il cuore, ma purtroppo non mi viene nulla quindi beh, ciao, alla prossima!



