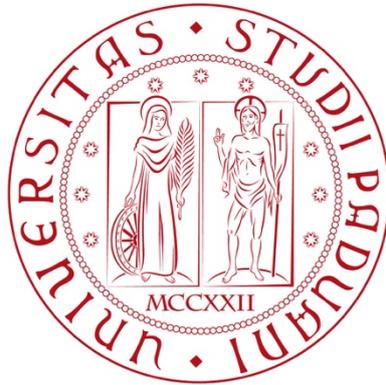


UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA



DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA INDUSTRIALE

Corso di Laurea in Ingegneria dei Materiali

**SCAFFOLDS 3D PER MODELLI IN VITRO DI TESSUTO
TUMORALE**

Relatore: *Ch.^{ma} Prof.ssa Monica Dettin*

Co-relatore: *Dott. Fabio Pieretti*

Laureando: *Stefano Centenaro*

Anno Accademico 2018/2019

Il tiro giusto nel momento giusto non viene perché lei non si stacca da se stesso.
Lei non è teso verso il compimento, ma attende il proprio fallimento.

EUGEN HERRIGEL, *Lo zen e il tiro con l'arco*

Riassunto

L'Aiom (Associazione Italiana di Oncologia Medica) ha stimato nel corso del 2019 circa 371 mila nuove diagnosi di tumore in Italia, 196 mila uomini e 175 mila donne. Tra le terapie oggi a disposizione per combattere questa malattia, l'elettrochemioterapia è una tecnica effettivamente impiegata per il trattamento di tumori legati al derma. Tuttavia, a seconda del tipo di tumore da trattare, questa tecnica deve essere ottimizzata in termini di intensità e di frequenza degli impulsi elettrici.

Il presente lavoro di tesi mira a fornire un contributo alla realizzazione di *scaffolds* 3D come modelli di tessuto tumorale *in vitro*. Attualmente sono allo studio matrici tridimensionali mimetiche delle condizioni sperimentate dalle cellule tumorali *in vivo* e migliorative dei modelli 2D o a base di soli sferoidi. In particolare, presso il laboratorio di Bioingegneria del Dipartimento di Ingegneria Industriale (DII) dell'Università degli Studi di Padova è stato ideato uno *scaffold*, mimetico dello stroma mixoide dei tumori, a base di acido ialuronico e peptidi auto-assemblanti. La formulazione di tale matrice è stata variata al fine di valutare: l'importanza della concentrazione del peptide, la necessità o meno di motivi adesivi, l'importanza di una specifica sequenza auto-assemblante.

Uno svantaggio dello *scaffold* a base di acido ialuronico e peptidi auto-assemblanti, emerso durante i saggi di vitalità cellulare, ha riguardato la sua difficile maneggiabilità. In particolare, la consistenza di tale matrice non permette di sostituire completamente il terreno di coltura durante il periodo di sperimentazione. Al fine di migliorare questo aspetto, si sono realizzate matrici di chitosano e peptidi auto-assemblanti.

Indice

1	Introduzione	1
1.1	Ingegneria tessutale.....	2
1.1.1	Medicina rigenerativa.....	2
1.1.2	Modelli <i>in vitro</i>	3
1.2	Biomateriali.....	6
1.2.1	Collagene.....	6
1.2.2	Acido ialuronico	9
1.2.3	Chitosano.....	11
1.2.4	SAP.....	15
1.3	Fattori biochimici.....	18
1.3.1	Fattori adesivi	18
1.3.2	Fattori di crescita	21
1.4	Funzionalizzazione biochimica.....	23
1.4.1	Adsorbimento	23
1.4.2	Carrier.....	23
1.4.3	Legame covalente.....	23
1.5	Elettroporazione.....	24
1.5.1	Meccanismo di funzionamento.....	25
1.5.2	Elettrochemioterapia.....	26
1.5.3	Elettrotrasferimento di geni	27
1.5.4	Elettroporazione irreversibile non termica.....	27
1.6	Scopo della tesi	28
2	Materiali e Metodi.....	29
2.1	Materiali.....	29
2.1.1	Reagenti.....	29
2.1.2	Peptidi utilizzati per l'arricchimento degli <i>scaffold</i>	30
2.2	Strumenti.....	30
2.3	Metodi	32
2.3.1	Sintesi peptidica su fase solida (SPPS).....	32
2.3.2	Spettroscopia di assorbimento UV-Vis.....	38
2.3.3	Purificazione e caratterizzazione peptidica.....	41
2.3.4	Spettrometria di massa ESI-TOF.....	44
2.3.5	Realizzazione delle matrici a base di acido ialuronico	46
2.3.6	Realizzazione delle matrici a base di chitosano.....	46
2.3.7	Test reologici.....	47
2.3.8	Saggi biologici.....	52
3	Parte sperimentale	55
3.1	Sintesi e purificazione peptidica	55
3.1.1	Sintesi del peptide EAbuK-IKVAV	55
3.1.2	Purificazione del peptide EAbuK-IKVAV	60
3.1.3	Sintesi del peptide EAK	64
3.1.4	Purificazione del peptide EAK	67
3.2	Realizzazione delle matrici.....	71
3.2.1	Matrici a base di acido ialuronico.....	71
3.2.2	Matrici a base di chitosano	72

4	<i>Risultati e discussione</i>	73
4.1	Saggi Biologici	73
4.1.1	Colture su <i>scaffolds</i> a base di HA.....	73
4.1.2	Colture su <i>scaffolds</i> a base di chitosano	78
4.2	Test Reologici	80
4.2.1	<i>Oscillation strain sweep test</i>	80
4.2.2	<i>Oscillation frequency sweep test</i>	81
5	<i>Conclusioni</i>	83
	<i>Riferimenti Bibliografici</i>	I
	<i>Ringraziamenti</i>	XIII

Capitolo 1

1 Introduzione

La Bioingegneria o Ingegneria Biomedica è una disciplina che impiega i principi dell'ingegneria (meccanica, elettrica, informatica, chimica) e della scienza (fisica, matematica, chimica, biologia) al fine di sviluppare sistemi, apparecchiature e dispositivi in grado di risolvere problematiche in ambito medico a livello diagnostico e terapeutico. Per citarne alcuni, si pensi a ^[1,2]:

- protesi di tipo ortopedico e dentario;
- apparecchiature chirurgiche come laser e robot;
- sistemi di monitoraggio dei parametri vitali e dei valori del sangue;
- dispositivi impiantabili come pacemaker o microinfusori insulinici;
- sistemi di diagnostica per immagine come l'ecografia, la radiografia o la risonanza magnetica;
- sistemi LOC (Lab-On-Chip);
- dispositivi terapeutici come il TENS (stimolazione elettrica nervosa transcutanea).

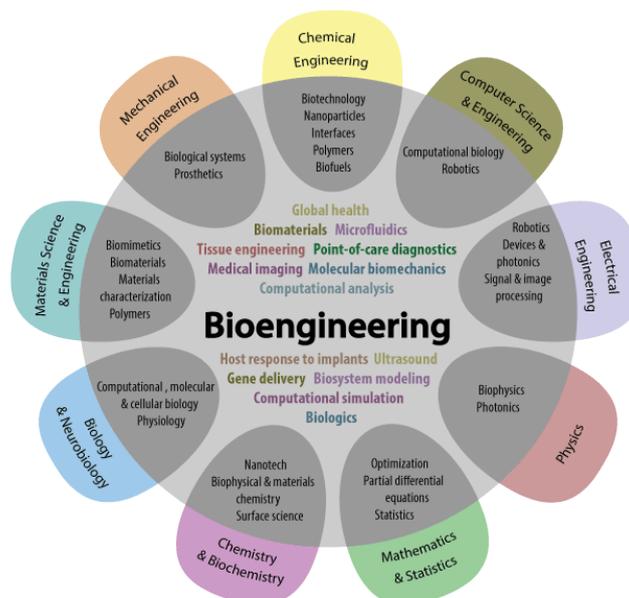


Figura 1: Diagramma di Eulero-Venn relativo all'interdisciplinarietà della Bioingegneria

1.1 Ingegneria tessutale

Tra le diverse aree di specializzazione che fanno parte di questa disciplina, l'ingegneria tessutale è un settore innovativo e in rapido sviluppo che trova applicazione nella rigenerazione dei tessuti danneggiati e nella realizzazione di modelli *in vitro* per lo studio della fisiologia e fisiopatologia umana ^[3].

1.1.1 Medicina rigenerativa

Nel primo caso, l'ingegneria tessutale si propone come possibile alternativa al trapianto autologo e allogenico, ossia quei trattamenti che tradizionalmente vengono eseguiti quando un tessuto non è più funzionante a causa di: fattori congeniti, traumi o malattie. Pur essendo queste delle valide strategie che hanno permesso di fare grandi passi avanti in campo medico e di salvare molte vite, esse presentano una serie di limitazioni che bisogna tenere in considerazione^[4,5]:

- nel trapianto autologo, donatore e ricevente sono la stessa persona. Dunque, il tessuto malato viene sostituito con un tessuto sano proveniente da un altro sito all'interno dello stesso paziente. Questo tipo di trattamento è limitato da considerazioni di carattere anatomico, infatti, essendo il tessuto sano proveniente da un ambiente diverso rispetto a quello malato, il primo è "abituato" a svolgere mansioni diverse rispetto a quest'ultimo. Ciò comporta l'impossibilità da parte del tessuto sano di svolgere al 100% le funzioni che svolgeva in precedenza il tessuto malato.
- nel trapianto allogenico, donatore e ricevente sono due persone distinte ma compatibili. Dunque, il tessuto malato del paziente viene sostituito con un tessuto sano proveniente da un'altra persona. Con questo trattamento, in primo luogo si ha molta difficoltà nel reperire quantità di tessuto sufficiente per tutti i pazienti che ne hanno necessità. In secondo luogo, si possono verificare problematiche legate al rischio di un rigetto da parte del sistema immunitario del paziente.

Invece, l'ingegneria tessutale mira a risolvere questi problemi attraverso la produzione di nuovo tessuto. Ciò richiede tre componenti essenziali: l'utilizzo di cellule staminali, l'impiego di fattori biochimici capaci di promuovere la formazione di tessuto, l'uso di un materiale di supporto che fornisca alle cellule una adeguata struttura di sostegno ^[6].

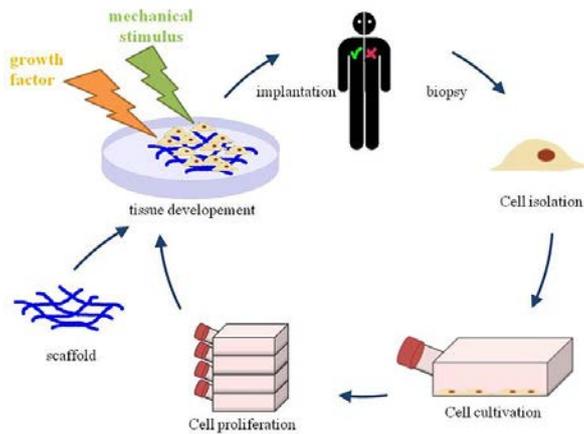


Figura 2: Schema dell'approccio che l'ingegneria tissutale adotta nel campo della medicina rigenerativa

1.1.2 Modelli *in vitro*

Per quanto riguarda il secondo campo di applicazione, si può definire la fisiologia come lo studio del funzionamento di tessuti e organi in condizioni normali mentre la fisiopatologia si occupa dello studio delle modificazioni presentate dalle funzioni organiche in una qualsiasi condizione patologica. Due mezzi fondamentali per tali studi sono: i sistemi di cultura cellulare *in vitro* e i modelli animali *in vivo*.

Per oltre un secolo, il sistema di cultura cellulare bidimensionale (2D) è stato il punto di riferimento per i ricercatori di tutto il mondo. Esso prevede di far crescere un mono-strato di cellule agganciato alla superficie di una fiasca per colture o di una piastra di Petri [7]. Per quanto consolidata, economica e facile da analizzare, la coltura cellulare bidimensionale non è in grado di mimare adeguatamente il modo in cui le cellule si sviluppano e funzionano perché essa non rispecchia la complessità dell'architettura che le cellule sperimentano *in vivo* [8]. In particolare, le cellule presentano una innaturale polarizzazione dovuta al fatto che da una parte sono legate ad un supporto rigido e piatto mentre dall'altra sono esposte alla soluzione contenente le sostanze nutritive. Ciò influisce particolarmente nell'interazione cellula-cellula, cellula-matrice extracellulare, nella diffusione di ossigeno, di nutrienti e di rifiuti metabolici, nonché nella crescita, migrazione e differenziazione cellulare [9]. Proprio per queste ragioni nel caso in cui si voglia, ad esempio, testare una nuova terapia, prima di passare alla sperimentazione clinica umana si ricorre generalmente alla sperimentazione animale. Infatti, i modelli animali sono in grado di rappresentare meglio la complessità delle interazioni che si hanno all'interno di un tessuto. Tuttavia, la sperimentazione animale è piuttosto costosa, richiede molto tempo e la fisiopatologia dell'animale usato come cavia è comunque differente dall'organismo umano [10].

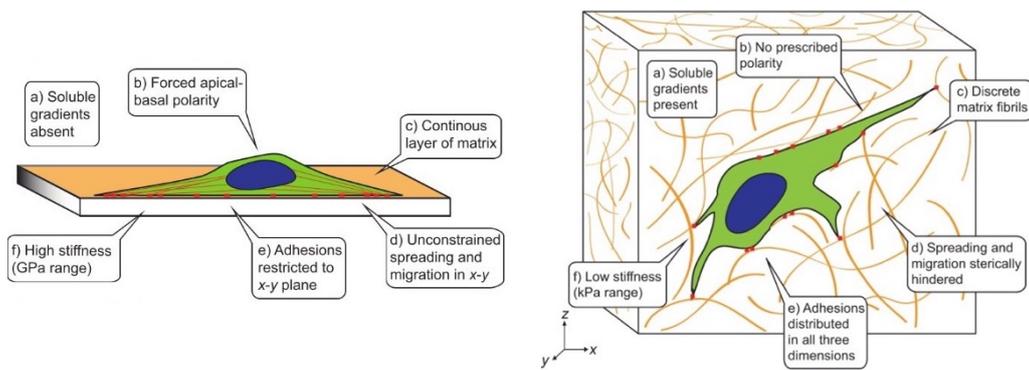


Figura 3: Confronto tra il sistema di cultura tradizionale e quello tridimensionale

L'adozione di sistemi di cultura *in vitro* tridimensionali permette di mimare meglio l'architettura presente *in vivo*, ossia consente di avere una capacità predittiva più elevata rispetto alla tradizionale cultura cellulare bidimensionale. In questo modo si prevede che, in futuro, si potrà ridurre al minimo la sperimentazione animale ^[11]. Attualmente esistono diverse tecniche di cultura 3D che possono essere riassunte nei seguenti modelli: modello *scaffold-free*, modello *scaffold-based* e modello ibrido.

Il primo modello si basa sulla formazione di sferoidi per auto-aggregazione delle cellule in particolari piastre di coltura. Per far ciò si può: utilizzare piastre a goccia sospesa (*Hanging drop*), utilizzare piastre a bassa adesione (*Low Adhesion Plates*) oppure sfruttare la levitazione magnetica (*Magnetic levitation*) ^[12].

Nel primo caso, si ha a disposizione una piastra dotata di pozzetti aperti, senza fondo progettati in modo tale da poter formare una goccia sospesa di soluzione di coltura. Le cellule coltivate all'interno di tale goccia sono in grado di aggregare in sfere caratterizzate da: uno strato periferico che, grazie alla prossimità alle fonti di ossigeno e nutrienti, è dotato di cellule proliferanti, da uno strato intermedio dotato di cellule quiescenti e da un cuore necrotico. Si tratta dunque di un modello rappresentante i diversi strati di un tumore situato in prossimità di un capillare (ossia di una fonte di ossigeno e nutrienti). La dimensione dello sferoide può essere controllata dal numero iniziale di cellule sospese, tuttavia, se si hanno tempi lunghi di cultura occorre aumentare il volume della soluzione in modo da garantire un adeguato apporto di nutrienti e consentire la formazione di sfere più grandi. Per far ciò bisogna trasferire la goccia sospesa in una piastra a bassa adesione perché in quest'ultima è possibile gestire volumi maggiori di soluzione ^[13]. Queste piastre sono caratterizzate da fondi tondeggianti, conici o a "v" e sfruttano le superfici a bassa adesione per favorire l'aggregazione delle cellule in sferoidi. Se utilizzata dal principio per culture prolungate, grazie alla loro elevata capacità di volume, permettono di eliminare gli *steps* sopracitati di manipolazione dello sferoide ^[14]. Infine, la

tecnica della levitazione magnetica si basa sempre sull'utilizzo di una piastra a bassa adesione ma, in questo caso, si sfrutta anche il fatto che le cellule sono precaricate con nanoparticelle magnetiche. Questo comporta che, applicando un campo magnetico esterno, è possibile fare galleggiare le cellule all'interfaccia liquido-aria in modo da promuovere una migliore aggregazione cellula-cellula in sferoidi [15].

Il secondo modello, quello suggerito dall'ingegneria tessutale, propone l'adozione di un supporto fisico tridimensionale (*scaffold*) che sia mimetico della matrice extracellulare, ossia sul quale le cellule possano agganciarsi, proliferare e migrare [16].

A tal proposito è di fondamentale importanza scegliere un materiale che sia [17]:

- biocompatibile, ossia che minimizzi la risposta infiammatorie e/o immunitarie nell'organismo;
- bioattivo, ossia che incorpori fattori biochimici in grado di favorire l'adesione e la crescita cellulare;
- biorisorbibile, ossia che, una volta a contatto con l'ambiente biologico, degradi progressivamente in modo da lasciare spazio al tessuto in corso di formazione;
- meccanicamente consistente con il tessuto che si vuole realizzare poiché le cellule sono in grado di "sentire" la rigidità della matrice attraverso un meccanismo conosciuto come meccano-trasduzione;
- lavorabile in modo da poter ottenere un'architettura porosa che permetta alle cellule di migrare all'interno e che promuova la diffusione dei nutrienti e l'espulsione dei rifiuti metabolici;

Il terzo modello rappresenta il più alto livello di complessità ottenibile in quanto cerca di combinare entrambe le strategie precedentemente descritte in un unico microambiente per culture 3D. Ad esempio, una possibile tecnica utilizzata per ottenere un modello ibrido è quella di incorporare gli sferoidi all'interno di *scaffold* mimetici della matrice extracellulare. In questo modo si può studiare l'interazione dello strato esterno dello sferoide con i componenti della matrice extracellulare. Un'altra tecnica prevede l'utilizzo di dispositivi di microfluidica. Questi sono progettati per studiare culture cellulari in perfusione; ad esempio, è possibile studiare l'effetto delle forze di taglio di cui fanno esperienza le cellule *in vivo* che sono esposte a flussi di sangue (si pensi alle cellule epiteliali). All'interno di questi dispositivi si possono inserire anche delle "barriere", ad esempio degli *scaffold* che simulino il comportamento della matrice extracellulare [18].

1.2 Biomateriali

È possibile dividere i materiali usati nell'ingegneria tessutale in due classi: naturali e sintetici. I primi possono essere estratti o derivati da piante, animali o da tessuti umani e, in genere, presentano un'elevata biocompatibilità anche se la loro composizione varia fortemente da *batch* a *batch*, compromettendo la riproducibilità dei risultati [19]. All'interno della classe dei biomateriali naturali si possono individuare due sottoclassi: quella dei biomateriali naturali di origine proteica e quella dei biomateriali naturali di origine polisaccarida. Il principale rappresentante della prima sottoclasse è il collagene.

1.2.1 Collagene

Il collagene è la più abbondante proteina strutturale presente negli animali. Negli esseri umani rappresenta il 25% di tutte le proteine e costituisce il 75% del peso della cute a secco [20]. La struttura del collagene si basa su una particolare struttura molecolare, detta tropocollagene, composta di tre catene polipeptidiche, denominate catene α , avvolte tra loro in modo da formare una struttura a tripla elica. Le singole catene sono caratterizzate dal ripetersi della sequenza (Gly-X-Y)_n dove la posizione X e Y viene spesso occupata da proline e idrossiprolina [21].

La glicina, data le sue piccole dimensioni, si posiziona al centro della tripla elica, mentre le più voluminose catene laterali degli altri amminoacidi occupano la parte esterna. Ciò che stabilizza la struttura a tripla elica sono le interazioni tra le catene α . In particolare, i legami a ponte idrogeno tra i gruppi NH dei residui di glicina di una catena e i gruppi OH dell'idrossiprolina di un'altra catena, assumono un ruolo fondamentale. Le molecole di tropocollagene sono in grado di associarsi in modo da formare una struttura caratterizzata da file parallele sfalsate che prende il nome di microfibrilla submicroscopica. Quest'ultime possono associarsi per formare fibrille microscopiche che, a loro volta, si organizzano in fibre microscopiche [22].

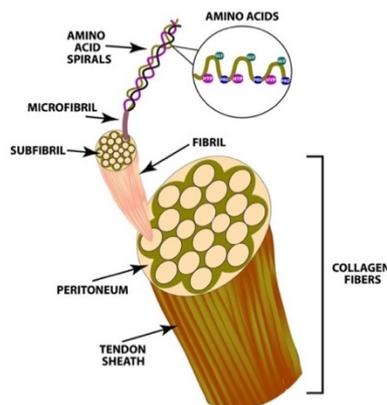


Figura 4: Struttura schematica del collagene

Ad oggi esistono 28 tipologie diverse di collagene che possono essere divise in due grandi categorie: fibrillari e non fibrillari [23]. Entrambe sono caratterizzate, all'interno di ogni catena α , dalla disposizione degli amminoacidi che prevede la presenza della glicina ogni tre residui[24]. Tuttavia, nel caso del collagene non fibrillare tale ripetizione è interrotta in certi punti. Questa interruzione può agire da giunto per la formazione, ad esempio, di strutture a rete (*network-forming*) [25]. La categoria di collagene più diffusa è quella fibrillare, infatti essa rappresenta circa il 90% di tutto il collagene presente all'interno del corpo umano [26].

Pelle, tendini e ossa di bovini o suini sono la fonte principale di estrazione di collagene. Tuttavia, l'estrazione del collagene da queste fonti animali non è esente da rischi a causa di malattie come l'encefalopatia spongiforme bovina o l'afta epizootica. Esistono inoltre problematiche di carattere religioso per quanto riguarda l'utilizzo della carne suina [27]. Per queste ragioni, gruppi di ricerca di tutto il mondo si sono adoperati a identificare delle possibili fonti di collagene alternative e sicure. A tal proposito, grande successo ha riscosso nella comunità scientifica gli studi riguardanti l'estrazione e la purificazione del collagene dalle ossa e dalla pelle di scarto del pesce [28].

Prima di estrarre il collagene occorre rimuovere alcune sostanze di natura saccaridica alle quali il collagene è legato [29]. Per fare ciò, si pretratta la materia prima con soluzioni acide o alcaline: in genere, si prediligono i processi acidi quando si ha una materia non particolarmente dura, come la pelle del pesce [30]. Invece, si ricorre a processi alcalini quando si ha una materia prima piuttosto resistente, come l'osseinina dei bovini [31].

Dopo il pretrattamento, il collagene viene estratto sulla base della sua solubilità in soluzioni saline, in soluzioni acide oppure in soluzioni alcaline con l'aggiunta di enzimi. Nei primi due casi si parla di estrazione per idrolisi chimica, nell'ultimo caso di estrazione per idrolisi enzimatica.

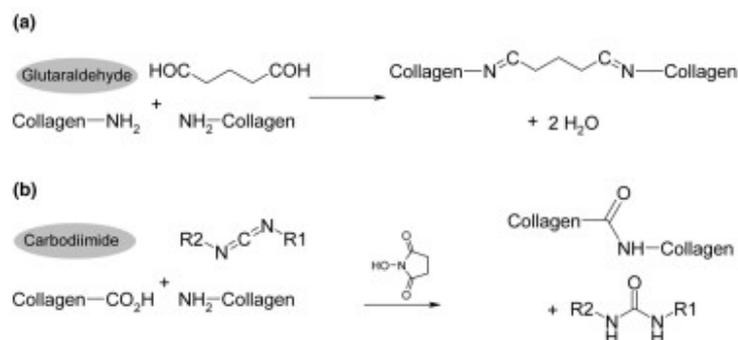


Figura 5: Schema di reticolazione: a) tramite glutaraldeide, b) tramite carbodiimmidi

L'idrolisi enzimatica presenta alcuni vantaggi rispetto alla chimica: essa consente un maggior controllo del grado di idrolisi, rese più elevate ed è un processo più *eco-friendly* rispetto all'idrolisi chimica. Tuttavia, quest'ultimo è il processo più usato in ambito industriale a causa degli elevati costi degli enzimi [32].

Il collagene, essendo un costituente fondamentale del nostro corpo, è un biomateriale ideale per la realizzazione di *scaffolds* per l'ingegneria tessutale [33]. Tuttavia, per controllare meglio il profilo di degradazione, ossia per renderlo più stabile strutturalmente e per migliorare le sue proprietà meccaniche, occorre effettuare delle modifiche tramite reticolazione di tipo fisico o chimico. Nel primo caso si ricorre all'uso di radiazioni UV, radiazioni γ o trattamenti deidrotermici (DHT) [34,35,36]. Nel secondo caso la modificazione chimica avviene tradizionalmente attraverso l'uso di glutaraldeide [37] oppure per mezzo di carbodiimmidi (EDC) [38]. Nel primo caso la reticolazione avviene per formazione di basi di Schiff tra i gruppi amminici del collagene e i gruppi aldeidici della glutaraldeide. Quest'ultima rimane come "ponte" tra i gruppi reticolati. Nel secondo caso la reticolazione avviene attraverso la formazione di un legame ammidico tra i gruppi carbossilici e amminici del collagene. In questo caso si ha un così detto *zero-length crosslinker*, ossia non vi è alcuna porzione della struttura chimica del reagente che diventi parte del legame finale tra le molecole reticolate.

Le strategie di reticolazione comportano un miglioramento delle proprietà meccaniche e strutturali ma possono provocare effetti negativi in termini di risposta cellulare *in vivo*. Per questa ragione, miscelare il collagene con altri polimeri naturali o sintetici può essere una strategia efficace per superare le limitazioni di un sistema monocomponente. Per esempio, particolare interesse hanno suscitato gli *scaffold* formati per complessazione polielettrolitica tra chitosano e collagene [39]. Inizialmente è stato osservato che le cellule staminali mesenchimali (MSCs) crescono bene su questo tipo di *scaffold*, poi lo *scaffold* coltivato con cellule staminali mesenchimali è stato impiantato in modelli animali, nelle aree colpite da ictus ischemico [40]. Attraverso la colorazione immunoistochimica si è potuto osservare la differenziazione delle MSCs in cellule neuronali e astrocitarie, suggerendo dunque un effetto neuroprotettivo di tale *scaffold*.

Per quanto riguarda la sottoclasse dei biomateriali naturali di origine polisaccarida, due esponenti molto importanti sono: l'acido ialuronico e il chitosano.

1.2.2 Acido ialuronico

L'acido ialuronico è un glicosamminoglicano lineare (non ramificato) non solfato costituito da unità ripetitive disaccaridiche (acido glucuronico e acetilglucosammina) [41]. Nel 1934, Meyer e Palmer riportarono una procedura per isolare questo nuovo glicosamminoglicano dall'umor vitreo degli occhi bovini. A volte ci si riferisce all'acido ialuronico con l'appellativo di "Ialuronano" per rimarcare il fatto che esso esiste *in vivo* sotto forma di polianione [42]. L'acido ialuronico è un costituente fondamentale della matrice extracellulare, esso si trova nell'umor vitreo dell'occhio, nel liquido sinoviale, nella pelle, nella cartilagine, nei tendini nel cordone ombelicale e nelle pareti dell'aorta. La produzione industriale di acido ialuronico si basa fondamentalmente su tre processi fondamentali: l'estrazione da tessuti animali, la fermentazione microbica di particolari ceppi batterici o il metodo enzimatico *in vitro*. Le prime due tecnologie permettono di ottenere acido ialuronico polidisperso ad elevato peso molecolare ($M_w > 10^6 Da$), mentre la terza strategia permette di ottenere sia acido ialuronico ad alto peso molecolare sia a basso peso molecolare, garantendo un maggior controllo della lunghezza di catena e una minor polidispersione [43].

Nel caso dell'estrazione animale, la fonte più accessibile per una produzione in larga scala di acido ialuronico ad alto peso molecolare sono le creste di gallo ($1,2 \times 10^6 Da$), i cordoni ombelicali umani ($3,4 \times 10^6 Da$), l'umor vitreo del bestiame ($7,7 \times 10^4 \div 1,7 \times 10^6 Da$) e il fluido sinoviale bovino ($14 \times 10^6 Da$). Diversi metodi di purificazione sono stati pubblicati dopo quello di Meyer e Palmer (1934), ma bisognerà attendere fino al 1979 per riuscire ad avere una tecnica che permetta di ottenere acido ialuronico con un grado di purezza adatto ad applicazioni mediche. Infatti, la purificazione da tessuti animali è resa difficile dal fatto che l'acido ialuronico forma complessi insieme ad altri composti, ad esempio proteoglicani [44]. Ulteriori complicazioni nella purificazione sono dovute al fatto che, come ogni prodotto terapeutico che viene estratto da fonti animali, c'è un potenziale rischio di contaminazione di tipo virale (virus dell'avaiaria) e/o proteico (encefalopatia bovina spongiforme).

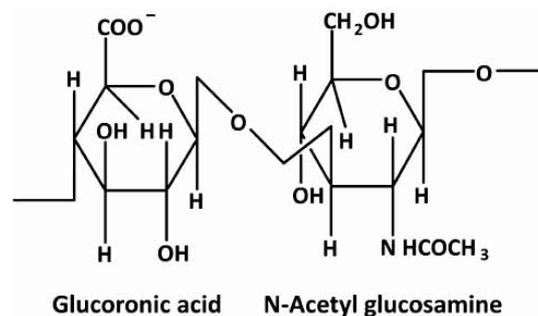


Figura 6: Unità ripetitiva dell'acido ialuronico

La tecnica della fermentazione microbica iniziò a svilupparsi a partire dagli anni 60'. In un primo momento, l'acido ialuronico veniva ottenuto per fermentazione usando batteri patogeni dello Streptococco (beta emolitici gruppo A). Questo processo permetteva di ottenere solamente $60 \div 140 \text{ mg/L}$ di acido ialuronico [45]. In seguito, grazie all'ottimizzazione del processo di estrazione e alla selezione di ceppi batterici con una maggiore efficienza, si è arrivati a $6 \div 7 \text{ g/L}$ [46]. Tuttavia, anche in questo caso il rischio di contaminazione con endotossine batteriche, proteine, acidi nucleici e metalli pesanti esisteva. Intorno agli anni 90', l'identificazione dei geni coinvolti nella biosintesi dell'acido ialuronico aprì la strada verso l'utilizzo di batteri geneticamente ingegnerizzati, dunque non patogeni e più sicuri [47].

La terza tecnica sfrutta la possibilità di isolare l'enzima ialuronano-sintase [48-49], quest'ultimo è in grado di catalizzare *in vitro* la stessa reazione che catalizza *in vivo*, ossia la sintesi dell'acido ialuronico a partire dagli zuccheri nucleotidici UDP-GlcNAc e UDP-GlcUA. Per quanto riguarda questa strategia, ulteriori studi devono essere compiuti per riuscire ad ottenere una produzione su larga scala.

L'acido ialuronico, essendo un costituente fondamentale del nostro corpo, è un biomateriale ideale per la realizzazione di *scaffolds* per l'ingegneria tissutale. Tuttavia, così com'è tende ad essere assorbito velocemente dal nostro corpo, per questo motivo occorre modificarlo chimicamente sfruttando i gruppi carbossilici e idrossilici presenti in catena [50]. Le principali modifiche chimiche che l'acido ialuronico può subire sono due: l'esterificazione e la reticolazione. L'obiettivo dell'esterificazione è quello di legare l'acido ialuronico a gruppi idrofobici in modo da ridurre le proprietà anioniche della catena, ossia ridurre la solubilità in acqua e ridurre la velocità di degradazione. Nel caso della reticolazione, si vuole convertire l'acido ialuronico in un idrogel [51] in modo da renderlo più idoneo ad applicazioni nel campo dell'ingegneria tissutale. I principali agenti reticolanti, il cui meccanismo di reazione è riportato in Fig. 7, sono: la glutaraldeide (GTA), il divinilsulfone (DVS), l'etere 1,4 butanediol diglidilico (BDDE) e le carbodiimidi (EDC).

Gli idrogeli di acido ialuronico che vengono realizzati grazie alla reticolazione sono stati intensivamente studiati per applicazioni nel campo dell'ingegneria tissutale della cartilagine [52]. In particolare, in un recente studio, idrogeli di acido ialuronico coltivati con cellule staminali mesenchimali provenienti dal cordone ombelicale sono stati impiantati in siti articolari di modelli animali. Oltre a constatare l'effetto riparatore, si è anche osservato che la parte di tessuto cartilagineo rigenerato ha sviluppato un'architettura cellulare e una quantità e distribuzione di collagene molto simile a quella del tessuto naturale [53].

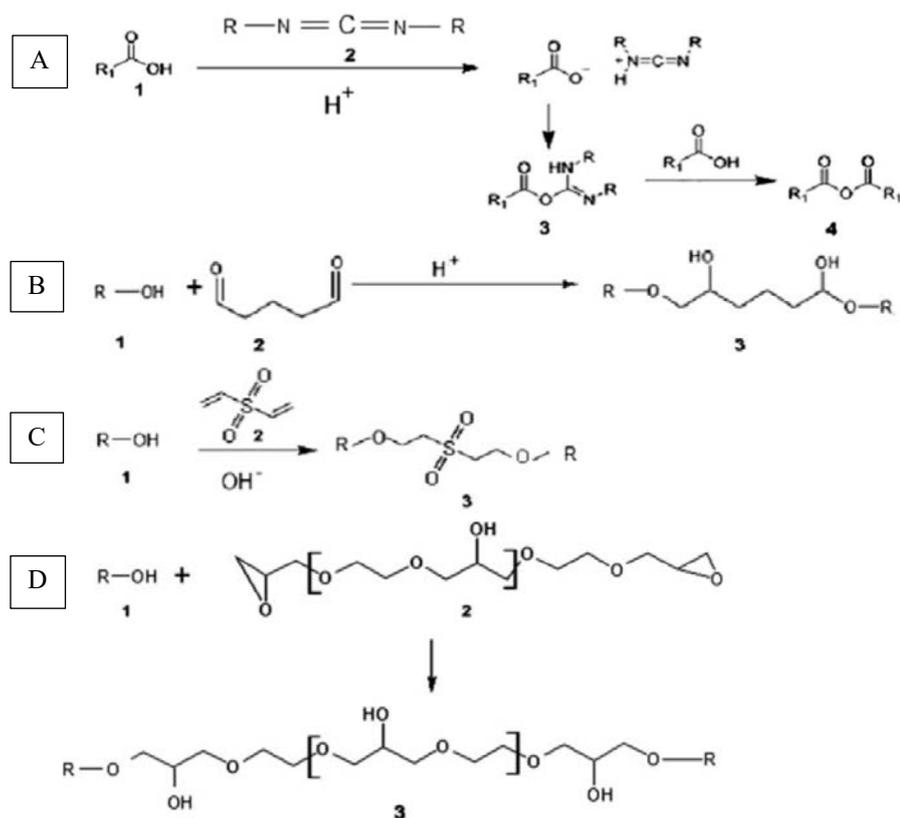


Figura 7: Schema di reticolazione: a) tramite carbodiimmidi, b) tramite glutaraldeide, c) tramite divinilsulfone d) tramite etere 1,4 butanediolo diglicidilico

Un'altra applicazione promettente di questi idrogeli riguarda il trattamento di danni al sistema nervoso centrale. In particolare, è stato dimostrato che l'incorporazione di ECM proveniente da astrociti protoplasmatici (la così detta materia grigia) all'interno di idrogeli di acido ialuronico permette di ridurre la dimensione della cicatrice gliale e di aumentare la penetrazione dell'assone all'interno della lesione [54].

1.2.3 Chitosano

Il chitosano è un polisaccaride lineare, semi-cristallino composto da unità di D-glucosammina e N-acetil-D-glucosammina [55]. Esso è l'unico polisaccaride di origine naturale caricato positivamente e viene ottenuto tramite il processo di deacetilazione della chitina. Dopo la cellulosa, la chitina è il biopolimero più abbondante sulla terra, essa si trova negli invertebrati (conchiglie dei crostacei o corazza degli insetti), ma anche nelle teste dei funghi, nelle pareti cellulari delle alghe verdi e nei lieviti [56,57,58]. In genere, le fonti vegetali sono preferite alle fonti animali dal punto di vista allergenico, oltre al fatto che le prime permettono di ottenere un prodotto più riproducibile [59].

Ci si riferisce al grado di deacetilazione (DDA) quando si vuole indicare il numero di gruppi amminici presenti in catena. Tale parametro è dato dalla seguente equazione:

$$DDA = \frac{n_{Gl}}{(n_{Gl} + n_{AcGl})} \quad (1)$$

In cui:

- *DDA* è il grado di deacetilazione;
- n_{Gl} è il numero di D-glucosammine presenti in catena;
- n_{AcGl} è il numero di N-acetil-D-glucosammine presenti in catena.

Ci si riferisce al chitosano e non più alla chitina quando si ha un grado di deacetilazione di almeno 60 [60,61]. La generazione di gruppi amminici durante il processo di deacetilazione influisce sulle proprietà fisiche, chimiche e biologiche del chitosano. Ad esempio, grazie alla protonazione dei gruppi amminici dei residui di D-glucosammina, il chitosano può essere solubilizzato in soluzioni debolmente acide [62]. Inoltre, maggiore è il numero di gruppi amminici presenti, maggiore è la formazione di legami a ponte idrogeno. Questo comporta un più elevato grado di cristallinità e, conseguentemente, migliori proprietà meccaniche. La cristallinità influisce anche sul tasso di degradazione, in particolare, elevati DDA comportano la presenza di un numero minore di gruppi acetile, dunque una riduzione dell'ingombro sterico che conduce a catene più impaccate, ossia ad una minor degradazione [63,64,65]. Infatti, è stato riportato che la chitinasi, enzima in grado di degradare le molecole di chitina in oligomeri, esercita una maggiore attività catalitica nei confronti della chitina parzialmente deacetilata rispetto al chitosano ad elevati DDA.

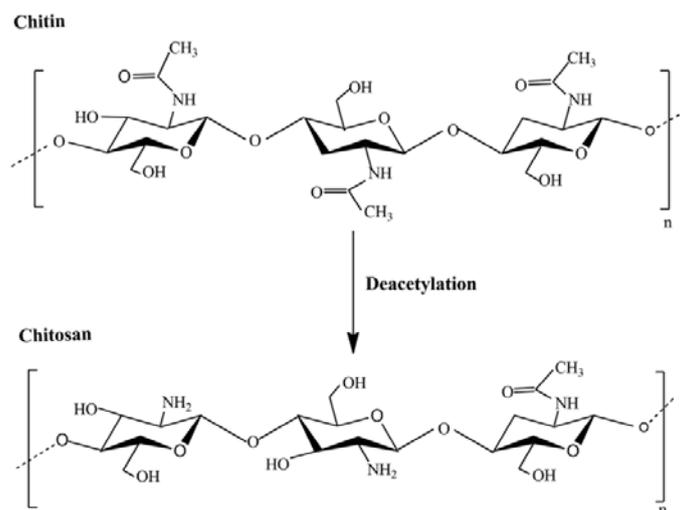


Figura 8: Struttura chimica della chitina (in alto) e del chitosano (in basso)

Esistono diverse strategie per deacetilare la chitina, le tre principali sono:

- il trattamento alcalino;
- il metodo enzimatico;
- la tecnica della *Steam Explosion*.

Nel primo caso, la chitina viene miscelata all'interno di una soluzione di NaOH a 100°C. Dopo aver lasciato reagire per un certo tempo, il prodotto viene risciacquato più volte in acqua distillata e si lascia asciugare completamente ^[66]. Nonostante questo trattamento permetta di deacetilare la chitina in modo efficace, ci sono anche degli svantaggi come ^[67]:

- I. gli elevati consumi energetici,
- II. la grande quantità di soluzione alcalina richiesta,
- III. grado di deacetilazione e peso molecolare dei prodotti caratterizzato da un'elevata dispersione.

Invece, il metodo enzimatico sfrutta la chitina deacetilasi, un enzima ottenuto da diverse fonti biologiche, come funghi e insetti ^[68]. Grazie a questo processo, più ecosostenibile rispetto al trattamento termochimico, si è in grado di ottenere un prodotto più omogeneo. Tuttavia, questo metodo presenta ancora costi piuttosto elevati legati all'utilizzo della chitina deacetilasi.

Infine, nel terzo caso si ha una tecnica di tipo idrotermico, anch'essa meno severa dal punto di vista ambientale rispetto al trattamento termochimico. Il processo consiste nell'uso di vapore saturo ad alta pressione per riscaldare rapidamente la biomassa in un reattore continuo o discontinuo. Il materiale viene tenuto alla temperatura desiderata per un breve periodo di tempo durante il quale la chitina viene distrutta, alla fine di tale intervallo di tempo la pressione viene rapidamente riportata al valore atmosferico, ottenendo una decompressione esplosiva che sfibra ulteriormente la biomassa. In Italia, presso il centro ricerche di Trisaia (MT), è presente un impianto pilota di *Steam Explosion* (uno continuo da 300 kg/h e uno batch da 1 kg/ciclo). La struttura è utilizzata per la conduzione di progetti di ricerca e sviluppo per i biocombustibili liquidi da fermentazione (etanolo) in ambito europeo. Tuttavia, la struttura è disponibile anche per attività in ambito non strettamente energetico quali l'ottenimento di zuccheri ad alto valore aggiunto da scarti, la produzione di materiali compositi da fibra vegetale, il recupero di aminoacidi da proteine ^[69].

La caratteristica fondamentale che ha reso il chitosano un materiale di grande successo per la realizzazione di *scaffold* per l'ingegneria tessutale è la sua elevata biocompatibilità, presumibilmente dovuta al fatto che la sua struttura chimica è molto simile a quella dell'acido

ialuronico [70]. A ciò si aggiunge l'elevata biodegradabilità data dal fatto che il chitosano è un polisaccaride, ossia contiene legami glicosidici distruttibili. In particolare, la biodegradazione del chitosano comporta la formazione di oligosaccaridi non tossici e di lunghezza variabile. Ciò avviene grazie agli 8 diversi tipi di chitinasi che sono state identificate negli esseri umani, 3 delle quali aventi attività enzimatica nei confronti del chitosano [71]. Infine, la natura cationica del chitosano è alquanto speciale poiché la maggior parte dei polisaccaridi sono solitamente neutri o caricati negativamente in ambiente acido. Questa proprietà permette di formare complessi elettrostatici con altri polimeri naturali e sintetici carichi negativamente [72].

Dal punto di vista meccanico e strutturale il chitosano può formare idrogeli attraverso reticolazione non-covalente, la formazione di un composto di coordinazione o la reticolazione covalente.

Nel primo caso, è interessante evidenziare il fatto che il chitosano, da solo, è in grado di formare idrogeli. Tale processo si basa sulla neutralizzazione dei gruppi amminici con conseguente inibizione delle forze repulsive tra le catene di chitosano. Questo comporta la formazione di legami a ponte idrogeno e di interazioni idrofobiche tra le catene, dunque la generazione di idrogeli. Alternativamente, grazie alla natura policationica, si possono formare idrogeli attraverso interazioni elettrostatiche con anioni (fosfati, solfati e citrati) [73], polianioni (proteine come il collagene, la cheratina e la fibroina) [74] o polisaccaridi anionici (acido ialuronico, alginato, pectina) [75].

Nel secondo caso, la strategia di reticolazione sfrutta invece la formazione di legami di coordinazione tra chitosano e ioni metallici come Pt(II), Pd(II), Mo(VI) [76]. In genere, questo tipo di idrogelo non è molto indicato per applicazioni mediche.

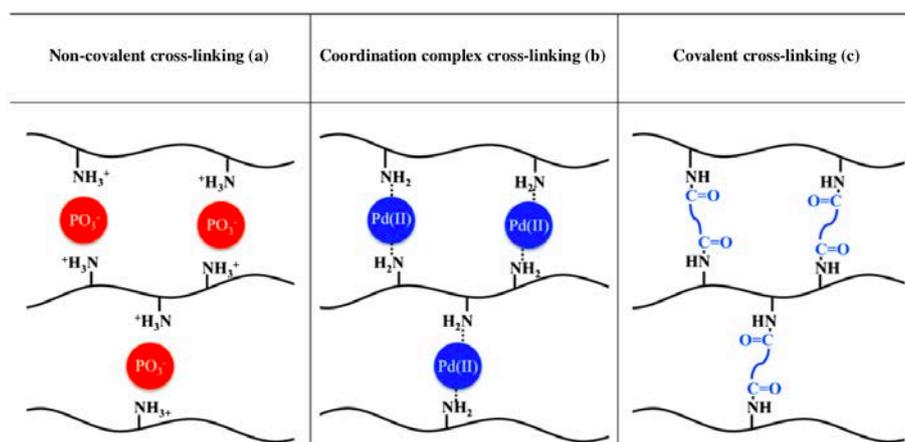


Figura 9: Rappresentazione schematica delle tre possibili vie di reticolazione del chitosano

Nel terzo caso, tramite la formazione di legami covalenti tra le catene polimeriche, è possibile ottenere idrogeli molto più stabili rispetto alla reticolazione non-covalente. Questa tecnica si basa sulla modificazione chimica della struttura primaria del chitosano, quindi, oltre al potenziale rischio di alterare le proprietà iniziali del materiale, c'è anche la possibilità che la reazione di reticolazione introduca fonti di contaminazione (residui tossici dovuti al reagente o al catalizzatore). Sia i gruppi amminici sia quelli idrossilici possono essere sfruttati per reticolare il chitosano. Una tecnica molto diffusa è quella di usare reticolanti dialdeidici come il glicossale e la glutaraldeide: entrambe sfruttano i gruppi amminici e in minor parte quelli idrossilici [77].

La peculiare natura cationica del chitosano ha spinto il mondo della ricerca nella realizzazione di *scaffold* ottenuti dalla combinazione del chitosano con altri materiali carichi negativamente. In particolare, i complessi polielettrolitici chitosano-glicosamminoglicani hanno ottenuto particolare successo nel campo dell'ingegneria tessutale. Ad esempio, *scaffold* realizzati per complessazione polielettrolitica tra il chitosano e l'acido ialuronico si sono dimostrati una valida piattaforma *in vitro* per la cultura di cellule del glioblastoma, il più aggressivo e mortale tumore al cervello negli esseri umani [78]. In particolare, si è osservata la formazione di sferoidi tumorali e una maggiore resistenza ai farmaci rispetto alle culture bidimensionali di riferimento. Questi risultati suggeriscono che gli *scaffold* chitosano-acido ialuronico possono essere dei promettenti mezzi per la messa a punto di nuove terapie per la cura di questo tumore.

Per quanto riguarda i materiali sintetici, essi possono essere molto versatili, riproducibili e lavorabili ma in genere sono meno biocompatibili rispetto ai naturali. I peptidi auto-assemblanti (SAP), grazie alla loro natura e proprietà, sono dei rappresentanti particolarmente interessanti per questa classe di materiali.

1.2.4 SAP

Nel 1989 Zhang S., presso il laboratorio di Rich A. del Massachusetts Institute of Technology, individuò la presenza di un segmento ripetuto con sequenza AEAEAKAKAEAEAKAK all'interno di una proteina del lievito [79]. Questa scoperta portò all'identificazione del primo peptide auto-assemblante della storia: EAK16, così chiamato per la sua composizione amminoacidica e per la sua lunghezza. Questo evento segnò l'inizio di un nuovo ramo di ricerca dedicato, inizialmente, alla comprensione delle dinamiche dell'autoassemblaggio, poi all'ideazione di nuove sequenze e alla loro ottimizzazione in funzione dell'applicazione. In particolare, gli sforzi si sono concentrati nella realizzazione di *scaffold* per culture cellulari 3D

in vitro, per il trasporto di farmaci ^[80], fattori di crescita ^[81] e anticorpi ^[82], per la rigenerazione di tessuti danneggiati ^[83]. Un grande passo è stato compiuto nel 2011, quando si sono portate a termine con successo le prime sperimentazioni cliniche di questi *scaffold* sull'uomo.

La progettazione di materiali auto-assemblanti molecola per molecola o atomo per atomo al fine di produrre architetture supramolecolari rappresenta un approccio di tipo *bottom-up*. Dunque, una profonda conoscenza degli elementi costitutivi in termini di struttura e proprietà di assemblaggio è di fondamentale importanza. In particolare, per quanto riguarda i peptidi auto-assemblanti, essi sono costituiti dall'alternanza di amminoacidi aventi catene laterali cariche positivamente (lisina, arginina, istidina) o negativamente (acido aspartico, acido glutammico) e amminoacidi aventi catene laterali idrofobiche (alanina, valina, leucina, isoleucina, fenilalanina). Sulla base della disposizione degli amminoacidi carichi si possono distinguere i seguenti moduli ^[84]:

- Modulo I -> - + - + - + - +
- Modulo II -> - - + + - - + +
- Modulo III -> - - - + + +
- Modulo IV -> - - - - + + + +

I peptidi auto-assemblanti vengono prodotti in laboratorio tramite tecniche oramai consolidate come la sintesi peptidica in soluzione o quella in fase solida (SPPS).

È possibile classificare i peptidi auto-assemblanti in base all'applicazione più promettente ^[85]:

- *Lego-likes peptides*, ossia peptidi per produrre *scaffolds* che assemblano in forma di nanofibre;
- *Lipids-like / surfactants-like peptides*, ossia peptidi in grado di auto-assemblare in forma di nanotubi o nanovesicole;
- *Paint-like peptides*, ossia peptidi che auto-assemblano su superfici, modificandole a livello nanometrico.

Nella prima classe rientra, ad esempio, il peptide EAK16. Questa categoria di peptidi, in soluzione fisiologica, auto-assembla formando foglietti β (*β -sheet*) grazie ad interazioni ponte idrogeno tra le catene ^[86]. Ciascun foglietto β ha una faccia caratterizzata da catene laterali cariche positivamente e negativamente mentre l'altra è caratterizzata da catene laterali idrofobiche.

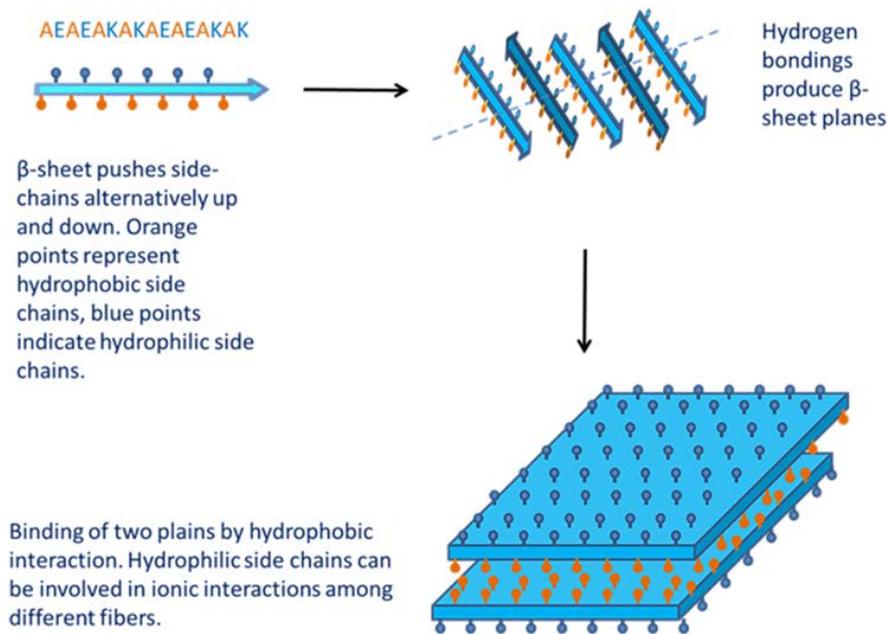


Figura 10: Schema di autoassemblaggio del peptide EAK16

Questo comporta la formazione di interazioni intermolecolari ioniche a mo' di scacchiera tra le facce cariche dei foglietti β e di interazioni di tipo idrofobico tra le facce idrofobiche dei foglietti β . In questo modo, si possono assemblare strutture tridimensionali di tipo nanofibroso in grado di contenere fino al 99,9% di acqua (*hydrogel*).

Nella seconda classe si hanno catene peptidiche dalle proprietà chimiche simili a quelle dei fosfolipidi. In particolare, sono caratterizzate da una coda costituita da amminoacidi idrofobici (3-6 residui) e una testa idrofila costituita da amminoacidi carichi positivamente o negativamente (1-2 residui). Queste catene sono relativamente corte (2-3 nm) e il loro comportamento può essere controllato attraverso una scelta ponderata degli amminoacidi. Quando auto-assemblano le catene mantengono la coda idrofobica all'interno della struttura a nanotubo / nanovesicola mentre la testa idrofila viene esposta verso l'esterno ^[87].

Nella terza classe, si hanno dei peptidi in grado di modificare le proprietà fisiche, chimiche e biologiche della superficie su cui auto-assemblano. Ad esempio, con questa tecnica è possibile rendere biologicamente attiva una superficie che intrinsecamente non lo è. In particolare, questa tecnica viene utilizzata per confinare l'aggancio delle cellule solo a determinate regioni di una certa superficie, ossia nelle zone in cui si trova il rivestimento nanometrico di peptidi ^[88].

1.3 Fattori biochimici

Come accennato, lo *scaffold* deve incorporare opportuni segnali biochimici che favoriscano l'adesione, la proliferazione e il differenziamento cellulare. In genere, tali sequenze segnale, quali i fattori di adesione e crescita, sono proteine che possono essere isolate da fonti naturali. Tuttavia, le quantità estraibili sono molto piccole e il processo di purificazione è costoso e complesso. Inoltre, la loro applicazione è spesso limitata dal fatto che sono macromolecole insolubili, instabili e facilmente degradabili. La peptido-mimetica è una tecnica che si basa sull'utilizzo di sequenze peptidiche ridotte in grado di riprodurre, del tutto o almeno in parte, le funzioni della sequenza segnale tipica della proteina nativa [89]. I peptidi biomimetici risultano più stabili, più solubili e richiedono costi più contenuti per la produzione in quantità sufficienti a soddisfare le richieste delle applicazioni cliniche. Tali molecole possono essere ottenute in grande quantità per sintesi chimica e possono essere modificate per aumentarne la stabilità. Dunque, questo approccio offre un'alternativa all'utilizzo di proteine native.

1.3.1 Fattori adesivi

Le più importanti proteine adesive della matrice extracellulare sono: fibronectina, laminina, tenascina e vitronectina.

- Fibronectina

La fibronectina ($M_w = 220\ 000\ Da$) è una glicoproteina che si presenta sotto forma di dimero con le due subunità tenute insieme da un ponte disolfuro che si realizza nella zona C-terminale; ognuna delle subunità ha una lunghezza di 60÷70 nm e uno spessore di 2÷3 nm. Pur esistendo un unico gene, mediante un meccanismo di *splicing* alternativo, la fibronectina viene prodotta in forme diverse, che differiscono per corti tratti di sequenza. Queste forme sono espresse in momenti differenti dello sviluppo e in tessuti diversi dell'organismo, suggerendo ruoli specifici per le singole forme. La fibronectina possiede specifici siti di legame ad alta affinità per i recettori cellulari, per il collagene, per i proteoglicani solforati e per la fibrina [90].

La principale funzione della fibronectina è quella di favorire il congiungimento dei fibroblasti e di altre cellule alla matrice dei tessuti connettivi (collagene e proteoglicani). In particolare, le sequenze amminoacidiche specifiche RGD, REDV e LDV giocano un ruolo importante nell'interazione con molti recettori cellulari appartenenti alla famiglia delle integrine. Inoltre, interagendo con le cellule, la fibronectina influenza la forma e l'organizzazione del

citoscheletro, risulta essenziale durante la migrazione cellulare ed è fondamentale nei processi di differenziazione cellulare che avvengono durante l'embriogenesi [91].

È importante ricordare che è presente anche un'isoforma plasmatica della fibronectina, solubile nel sangue e in altri fluidi corporei, che facilita la coagulazione sanguigna, la riparazione delle ferite e la fagocitosi. Infine, si è osservato che la fibronectina è implicata nella trasformazione e progressione dei tumori, ossia, le cellule tumorali influenzano la sintesi delle fibronectine sia dal punto di vista quantitativo sia da quello qualitativo. Dunque, la presenza di specifiche isoforme di fibronectina nelle lesioni tumorali può essere utilizzata come un marcatore diagnostico [92].

o Laminina

La laminina è una glicoproteina costituita da tre catene: α , β e γ [93]. In base alla combinazione di tali catene, si possono distinguere almeno 10 tipi di laminine presenti in tessuti differenti. Tipicamente assume una struttura quaternaria a croce latina: i 3 bracci corti sono costituiti dalle parti N-terminali delle tre catene, mentre il braccio lungo è caratterizzato dalle regioni C-terminali, legate insieme attraverso 3 ponti disulfuro intercatena. Essa è il costituente fondamentale della lamina basale: quest'ultima si trova alla base di tutti gli epitelii, gli endoteli e circonda anche singole cellule muscolari, gli adipociti e le cellule di Schwann. Inoltre, gioca un ruolo importante nella rigenerazione dei tessuti: infatti, quando i tessuti come il muscolo, il nervo e l'epitelio vengono danneggiati, la lamina basale fornisce un'impalcatura lungo la quale le cellule in rigenerazione possono migrare. La laminina presenta diversi domini dei quali almeno uno interagisce con i recettori della membrana cellulare, un altro con il collagene e un altro ancora con i proteoglicani [94].

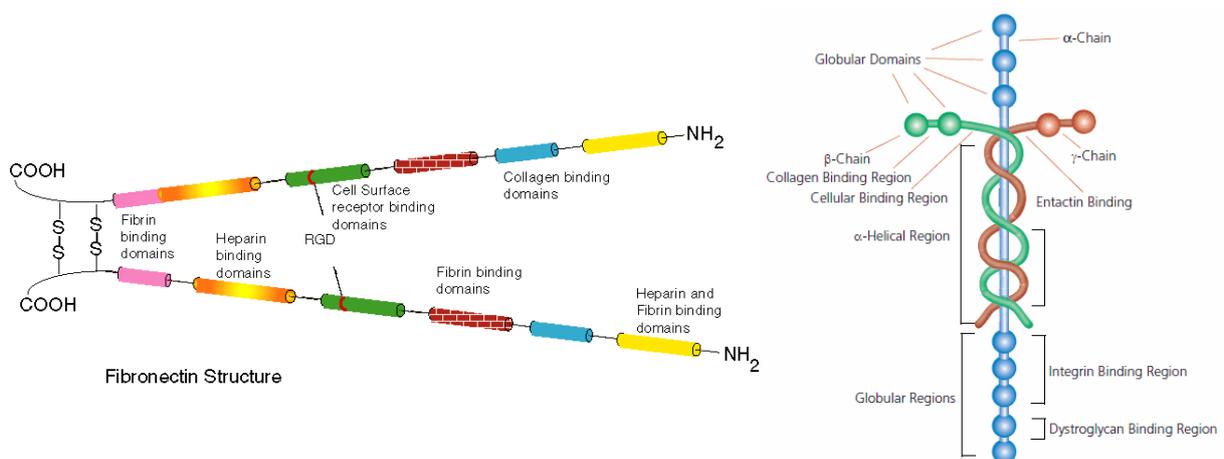


Figura 11: struttura a dimero della Fibronectina (a sinistra), struttura a croce latina della Laminina (a destra)

La principale funzione della laminina è quella di favorire il congiungimento delle cellule epiteliali alla lamina basale. Ciò avviene grazie al fatto che le laminine sono in grado, da un lato, di associarsi al *network* di collagene di tipo IV (costituente fondamentale della lamina basale) tramite il nidogeno (glicoproteina) o il perlecano (proteoglicano eparan solfato), dall'altro di legarsi alle cellule tramite specifiche sequenze amminoacidiche: RGD, IKVAV e YIGSR. La laminina è in grado di collegarsi anche a recettori cellulari non integrinici, ad esempio, al complesso distrofina-distroglicano-sarcoglicani che connette le laminine al citoscheletro delle cellule muscolari. In generale, oltre alla funzione principale di mediazione dell'adesione cellulare, si ritiene che le varie isoforme delle laminine possano modulare la crescita, la sopravvivenza, la morfologia, il differenziamento e la motilità di diversi tipi cellulari^[95].

Complesse sono le malattie genetiche riconducibili a deficit qualitativi o quantitativi delle varie isoforme della laminina. Ad esempio, la merosina, isoforma della laminina maggiormente presente nelle lamine basali delle fibre muscolari, lega l' α -distroglicano, il quale è connesso mediante il β -distroglicano alla distrofina del citoscheletro della cellula muscolare. L'assenza di merosina interrompe questo legame e porta a degenerazione del muscolo. Inoltre, la merosina è importante per la mielinizzazione e quindi la sua assenza può provocare neuropatie demielinizzanti ^[96].

o Tenascina

La tenascina è una proteina multimerica della matrice extracellulare, viene sintetizzata in grande quantità nei tessuti embrionali mentre si trova in quantità limitata nei tessuti adulti. Si conoscono quattro tipologie di tenascine ^[97]:

- la tenascina C o antigene miotendineo o citotactina;
- la tenascina R o restrictina o gianusina;
- la tenascina X;
- la tenascina W.

Tutte sono accomunate da una struttura simile costituita da un grande complesso di 6 catene polipeptidiche, identiche o simili, unite da ponti disolfuro che si proiettano a raggiera a partire da un punto centrale. Essa ha una struttura multimodulare che le permette di legarsi ad altri componenti della matrice extracellulare, a fattori solubili e patogeni, a recettori cellulari ^[98].

La principale funzione della tenascina è quella di modulare i fenomeni di adesione cellulare legandosi alla fibronectina oppure, essendo dotata del motivo adesivo RGD, legandosi

direttamente ai recettori integrinici delle cellule. Oltre a questa funzione principale, la tenascina influenza fenomeni come la forma, la migrazione e la crescita cellulare. Essendo espressa *de novo* durante la guarigione delle ferite e in condizioni patologiche (infiammazioni croniche e tumori), la tenascina viene utilizzata come marker diagnostico [99].

- o Vitronectina

La vitronectina è una glicoproteina sintetizzata principalmente dal fegato, è presente nel plasma e si deposita nei tessuti dove diviene un componente della matrice extracellulare. La sua struttura multimodulare le permette di legarsi a: glicosamminoglicani, integrine, collagene, componenti del complemento, perforina, plasminogeno e l'inibitore dell'attivatore del plasminogeno di tipo 1 [100].

La sua funzione principale è quella di favorire l'adesione cellulare, ancorandosi da un lato a componenti fondamentali della matrice extracellulare (collagene e glicosamminoglicani), dall'altro ai recettori integrinici grazie alla sequenza adesiva di cui sono dotate (RGD). Oltre a tale funzione la vitronectina, interagendo con le integrine, è in grado di promuovere la migrazione e la crescita cellulare. È coinvolta nella fibrinolisi attraverso le interazioni con l'inibitore dell'attivatore del plasminogeno di tipo 1, nella difesa immunitaria attraverso l'interazione con alcuni componenti del complemento e nell'emostasi tramite le interazioni con l'eparina. Infine, si è osservato che le interazioni della vitronectina con l'inibitore dell'attivatore del plasminogeno 1 (PAI-1) e il recettore dell'attivatore del plasminogeno di tipo urochinasi (uPAR) sono alla base di due nuove e complesse funzioni attribuite alla vitronectina: modulazione dell'angiogenesi e invasione/metastatizzazione delle cellule tumorali [101].

1.3.2 Fattori di crescita

I fattori di crescita sono proteine che si legano ad opportuni recettori sulla membrana cellulare, con lo scopo di favorire la proliferazione, la crescita e il differenziamento cellulare [102].

Il fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF), il fattore di crescita dell'epidermide (EGF) e il fattore di crescita dell'insulina (IGF), possono influenzare diversi tipi di cellule (specificità larga), mentre altri, agiscono solo su un tipo di cellule (specificità stretta). Molti fattori di crescita stimolano sia la proliferazione sia la crescita delle cellule; alcuni, come il fattore di crescita delle cellule nervose (NGF), promuovono solo la crescita dei neuroni; altri, come il fattore di crescita trasformante beta (TGF- β), a volte promuovono la proliferazione cellulare e a volte la inibiscono.

fattori	membri della famiglia	principali funzioni
specificità larga		
EGF	TGF- α Lin-3 di <i>Caenorhabditis elegans</i>	stimola la proliferazione in molti tipi di cellule; segnale induttivo nello sviluppo
FGF	numerosi sottotipi	stimola la proliferazione in molti tipi di cellule; segnale induttivo nello sviluppo; regola il differenziamento di varie cellule staminali
IGF-I	IGF-II insulina	promuove la sopravvivenza cellulare; stimola il metabolismo cellulare; promuove la proliferazione cellulare
PDGF	3 sottotipi	stimola la proliferazione delle cellule durante la guarigione delle ferite; stimola la proliferazione di alcune cellule neurogliali
TGF- β	attivine; BMP; proteine di <i>Drosophila melanogaster</i> e di <i>Xenopus</i>	potenzia o inibisce le risposte della maggior parte delle cellule ad altri fattori; regola il differenziamento di alcuni tipi di cellule; agisce da segnale induttivo nello sviluppo embrionale
specificità stretta		
interleuchina-2		stimola la proliferazione di linfociti T attivati
interleuchina-3	fattori che stimolano le colonie emopoietiche (CSF)	stimola la proliferazione e la sopravvivenza delle cellule ematiche
NGF	fattore neurotrofico derivato dal cervello (BDNF) neurotrofina-3 (NT-3) neurotrofina-4 (NT-4)	promuove la sopravvivenza e la crescita dei processi nervosi di specifiche classi di neuroni
eritropoietina		promuove la proliferazione, il differenziamento e la sopravvivenza dei precursori dei globuli rossi

Tabella 1: elenco dei principali fattori di crescita e delle loro principali funzioni.

Per esplicitare la loro azione si legano inizialmente a uno specifico recettore transmembrana, localizzato sulla superficie della cellula; la porzione intracellulare del recettore regola poi l'azione di molecole che agiscono da segnali intracellulari trasmettendo lo stimolo ad altre molecole, di solito mediante una serie di eventi a cascata di fosforilazione. Questi segnali, arrivati nel nucleo della cellula, determinano cambiamenti nella risposta dei geni. I geni controllati dai fattori di crescita sono di due categorie: geni della risposta precoce (attivati in 15 minuti) e geni della risposta tardiva (indotti dopo circa un'ora) ^[103].

Esistono diversi meccanismi che regolano la produzione e l'azione dei fattori di crescita. Ad esempio, molti fattori di crescita sono sintetizzati sotto forma di precursori inattivi, in modo che debbano subire delle modifiche per diventare attivi. Un altro meccanismo agisce, invece, modificando covalentemente i fattori di crescita in modo da regolarne la diffusione e vita media. La presenza di cellule tumorali, in genere, porta ad una espressione impropria dei fattori di crescita con conseguenti fenomeni anomali come: proliferazione incontrollata e capacità di sopravvivere ai segnali di morte programmata ^[104].

1.4 Funzionalizzazione biochimica

L'arricchimento della superficie di contatto tra biomateriale e tessuto biologico con proteine adesive e fattori di crescita, o peptidi da tali molecole derivati, può essere realizzato ^[105]:

- depositando le molecole per adsorbimento superficiale,
- veicolando le molecole attraverso un *carrier* riassorbibile,
- legando covalentemente le molecole alla superficie del biomateriale.

1.4.1 Adsorbimento

Il primo metodo sfrutta interazioni chimico-fisiche tra le biomolecole e la superficie del materiale. Si realizza lasciando in contatto con la superficie del materiale una soluzione contenente le biomolecole per un certo tempo in condizioni controllate. È un metodo semplice, economico ma comporta una deposizione incerta circa la quantità di biomolecole per unità di superficie. Inoltre, la labilità del legame per adsorbimento non fornisce adeguate garanzie sulla sorte delle biomolecole quando il materiale viene posto a contatto con l'ambiente biologico.

1.4.2 Carrier

Il secondo metodo prevede di inglobare le biomolecole all'interno di un materiale che ne consente il trasporto e il rilascio secondo una cinetica che dipende dalle caratteristiche del materiale stesso e dalla modalità di inclusione: le molecole possono essere semplicemente disciolte o legate chimicamente al *carrier*. In genere, questo metodo viene impiegato per il rilascio di fattori di crescita quando si desidera una determinata cinetica di rilascio.

1.4.3 Legame covalente

Il terzo metodo prevede la formazione di un legame covalente in modo da ancorare stabilmente le biomolecole alla superficie del materiale. Il legame può essere diretto o realizzato attraverso l'introduzione di una ulteriore molecola con funzione di distanziatore (*spacer*). La presenza del distanziatore favorisce l'esposizione della biomolecola alle cellule perché conferisce maggiore libertà di orientazione. In assenza di particolari accorgimenti, si ha la formazione di un legame aspecifico tra le biomolecole e la superficie del materiale. Questo significa che le biomolecole possono esporre favorevolmente il sito di interazione con i recettori delle cellule come possono mascherarlo. Le tecniche di funzionalizzazione specifica permettono di legare le biomolecole alla superficie del materiale in modo da massimizzare la possibilità di interazione del sito attivo

con le cellule. Ciò può essere realizzato tramite fotoattivazione o protezione selettiva e reversibile. Nel primo caso si introduce nella sequenza amminoacidica un gruppo che, una volta attivato mediante esposizione alla luce UV, garantisca l'omogeneità nell'ancoraggio. Nel secondo caso si proteggono tutti i gruppi potenzialmente reattivi presenti in catena tranne quello che si vuole sfruttare per l'ancoraggio. In questo modo ci si garantisce la selettività della reazione chimica, tuttavia, occorre poi rimuovere i gruppi di protezione introdotti in modo da ristabilire la funzionalità biologica della biomolecola. Quando si ha una sequenza amminoacidica protetta è importante ricordare che essa si scioglie solamente in solventi organici. Questa strategia è applicabile alla funzionalizzazione di superfici che non vengono danneggiate da tali solventi (ad esempio il Titanio). Nel caso dei materiali polimerici sintetici o naturali si sfrutta invece la *chemoselective ligation*, ossia l'impiego di gruppi ortogonali che permettano l'aggancio selettivo del peptide alla superficie in ambiente acquoso.

1.5 Elettroporazione

Con il termine elettroporazione si intende quel fenomeno per cui, a seguito dell'applicazione di un impulso elettrico, si ha un aumento della permeabilità della membrana cellulare. Per fare ciò, le cellule vengono sospese in una soluzione conduttiva e un circuito elettrico viene chiuso intorno a questi elementi.

La storia dell'elettroporazione inizia intorno alla metà del 1700 quando Nollet, durante i suoi esperimenti, notò la formazione di macchie rosse nelle zone della pelle in cui aveva applicato delle scariche elettriche ^[106]. Nel 1913 si riconobbe che alcuni dei danni causati dai fulmini, come le figure di Lichtenberg sulla pelle, sono dovuti a fenomeni di elettroporazione irreversibile. Si ritenne che tali figure avessero la stessa origine delle macchie rosse individuate da Nollet più di un secolo addietro. Nel 1957 Stampfli e Willi descrissero il fenomeno dell'elettroporazione reversibile e irreversibile tramite esperimenti effettuati sulla membrana nervosa di una rana ^[107]. In particolare, Stampfli riportò che in certe condizioni la rottura della membrana è reversibile in altre è irreversibile. Egli comparò il fenomeno alla rottura dielettrica che si verifica all'interno di un condensatore. Nel 1982, Neumann e i suoi collaboratori introdussero, attraverso l'elettroporazione reversibile, geni estranei all'interno delle cellule: si tratta della prima applicazione medica della storia ^[108]. Nel 1987, Okino e Mohri usarono l'elettroporazione reversibile per introdurre agenti citotossici all'interno delle cellule maligne per curare un tumore ^[109]. Nel 1991 Mir pubblicò due articoli riguardanti l'uso dell'elettroporazione reversibile per il trattamento del tumore grazie alla facilitata diffusione di

farmaci antitumorali come la bleomicina: questa nuova applicazione clinica prende il nome di elettrochemioterapia ^[110]. Nel 2005 Davalos, Mir e Rubinsky pubblicarono un articolo in cui si dimostrò che l'elettroporazione irreversibile può essere utilizzata come metodo per l'ablazione di tessuti tumorali solidi ^[111].

1.5.1 Meccanismo di funzionamento

Dalla scoperta dell'elettroporazione, diverse teorie sono state proposte per descrivere il meccanismo che sta alla base di questo fenomeno. Ad oggi, la teoria che ha riscosso il maggior consenso è quella della formazione di pori acquosi nella doppia membrana fosfolipidica. Secondo questa teoria la formazione dei pori è dovuta ad una iniziale penetrazione delle molecole d'acqua all'interno della doppia membrana (Fig. 12b), a cui segue una ri-orientazione delle catene in modo che le teste polari puntino verso le molecole d'acqua (Fig. 12c). Pori instabili aventi una vita di pochi nanosecondi si possono formare anche in assenza di un campo elettrico, tuttavia è proprio l'applicazione di tale campo che permette di ottenere pori in numero, dimensione e con un tempo di vita sufficiente a rendere la membrana permeabile a molecole che altrimenti sarebbero incapaci di attraversarla ^[112].

A seconda del comportamento a livello cellulare è possibile distinguere quattro *range* di intensità del campo elettrico ^[113]:

- Bassa intensità (No elettroporazione) -> Non è possibile rilevare alcun trasporto molecolare attraverso la membrana cellulare.
- Media intensità (Elettroporazione reversibile) -> Si rileva un trasporto molecolare attraverso la membrana cellulare dato dalla formazione di pori in numero e dimensione limitata. Al termine dell'applicazione dell'impulso elettrico il trasporto cessa e le cellule riescono a richiudere le porosità rimanendo vitali.
- Alta intensità (Elettroporazione irreversibile non termica) -> Si rileva un trasporto molecolare attraverso la membrana dato dalla formazione di pori permanenti. Ossia, la larghezza dei pori è talmente elevata e/o la richiusura è talmente lenta che le cellule non riescono a sopravvivere. Nonostante la morte cellulare, non è rilevabile nessun danno di origine termica alle cellule stesse.
- Intensità molto alta (Elettroporazione irreversibile accompagnata da effetti termici) -> Il campo elettrico è in grado di aumentare la temperatura a livelli tali da causare, oltre alla formazione di pori permanenti, evidenti danni termici alle cellule.

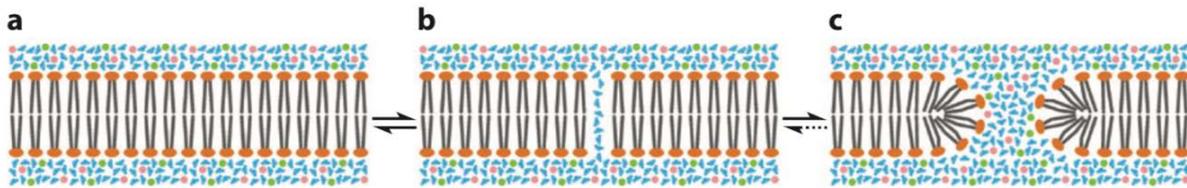


Figura 12: Schema a livello molecolare del fenomeno dell'elettroporazione

Non è possibile marcare una separazione netta a livello quantitativo tra i diversi *range* di intensità del campo elettrico in quanto i valori dipendono da parametri come:

- tipologia di cellule esposte,
- conduttività elettrica del mezzo di cui le cellule sono circondate,
- temperatura minima di danneggiamento termico delle specie in gioco.

1.5.2 Elettrochemioterapia

La tecnica dell'elettroporazione ha trovato applicazione molto promettenti in campo medico e farmaceutico. In particolare, nella panoramica dei trattamenti oncologici, l'elettrochemioterapia (ECT) è una tecnica che sta ottenendo ottimi risultati. Essa si basa sull'uso dell'elettroporazione per trasportare farmaci chemioterapici poco o per nulla permeanti all'interno delle cellule. Questo permette di ridurre notevolmente le concentrazioni di farmaco utilizzato e al contempo di aumentarne la citotossicità nei confronti delle cellule tumorali. Si è osservato che il trasporto di farmaci come la bleomicina e il cisplatino via ECT ha aumentato la loro efficacia di più del 50% rispetto alla tradizionale terapia per iniezione. Attualmente, l'elettrochemioterapia viene utilizzata nei seguenti casi ^[114]:

- tumori della pelle o del tessuto sottostante la superficie cutanea,
- metastasi cutanee,
- recidive da carcinoma della mammella,
- tumori del distretto testa e collo, incluso il cavo orale anteriore,
- recidive e metastasi da carcinoma della vulva,
- metastasi ossee.

Studi scientifici sono in corso per tumori del pancreas, del fegato e del retto.

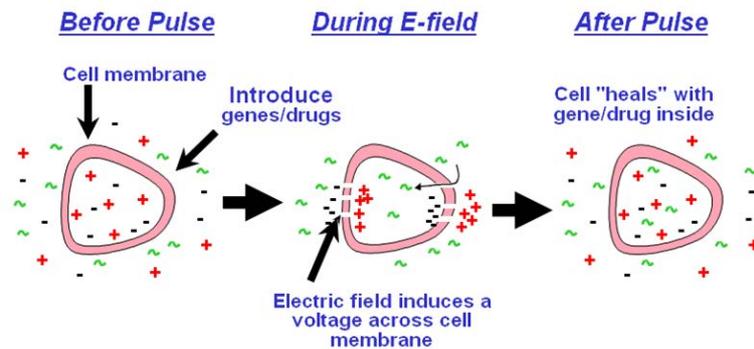


Figura 13: Schema di funzionamento dell'elettrochemioterapia/elettrotrasferimento di geni

1.5.3 Elettrotrasferimento di geni

Per potenziare significativamente l'ECT si stanno affiancando trattamenti immunostimolanti come l'elettrotrasferimento di geni (GET). Questa tecnica sfrutta l'elettroporazione per trasportare geni immunomodulatori (IL-12, IL-2, IL-15 e GM-CSF) alle cellule tumorali [115]. Altri studi si sono concentrati invece nel trasporto di geni (vasostatina, endostatina e fattori di crescita endoteliali vascolari) per colpire la vascolatura tumorale [116].

1.5.4 Elettroporazione irreversibile non termica

Infine, per il trattamento dei tumori, l'elettroporazione irreversibile non termica (NTIRE) sta emergendo come tecnica chirurgica mininvasiva per l'ablazione di tessuti tumorali. Questo trattamento applica un campo elettrico in grado di danneggiare le cellule tumorali risparmiando le altre strutture sane del tessuto. Ad esempio, nel trattamento del cancro alla prostata e al pancreas, gli studi hanno riportato una percentuale di successo del 100% [117]. Per il fegato la percentuale di successo varia tra il 50% e il 98%, mentre nel caso del trattamento del cancro ai polmoni, nessun tumore è stato asportato con successo [118]. È dunque chiaro che l'efficacia di questo trattamento varia a seconda dell'organo trattato.

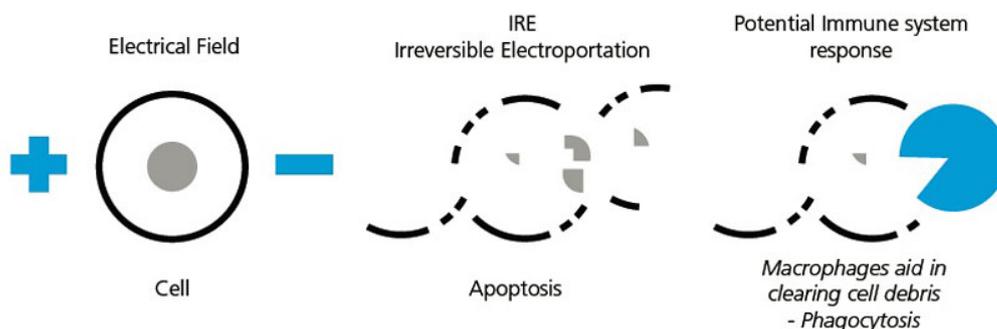


Figura 14: Schema di funzionamento dell'elettroporazione irreversibile

1.6 Scopo della tesi

Lo studio effettuato in questo lavoro di tesi rientra nel campo dello sviluppo di *scaffolds* tridimensionali per la realizzazione di modelli *in vitro* di tessuto tumorale. Grazie alla loro riproducibilità ed economicità, i sistemi di coltura cellulare bidimensionale *in vitro* rappresentano l'attuale modello di riferimento per lo studio della carcinogenesi e per lo sviluppo di nuovi farmaci e terapie. Tuttavia, in questo sistema le cellule presentano una innaturale polarizzazione dovuta al fatto che da una parte sono legate ad un supporto rigido e piatto mentre dall'altra sono esposte alla soluzione contenente le sostanze nutritive. Dunque, sono attualmente allo studio nuovi sistemi di coltura cellulare basati sull'utilizzo di *scaffold* 3D maggiormente mimetici dell'architettura che le cellule sperimentano *in vivo*.

In particolare, presso il laboratorio di Bioingegneria del Dipartimento di Ingegneria Industriale (DII) dell'Università degli Studi di Padova è stato ideato uno *scaffold* a base di acido ialuronico reticolato e arricchito con il peptide auto-assemblante EAbuK coniugato covalentemente con il motivo adesivo IKVAV. Questa matrice, mimetica dello stroma mixoide, ha ottenuto buoni risultati come modello *in vitro* per lo studio del comportamento delle cellule tumorali epiteliali derivanti dall'adenocarcinoma mammario ^[119]. In questo lavoro sperimentale è stata variata la formulazione di tale *scaffold* al fine di valutare a livello biologico e reologico:

- (i) l'importanza della concentrazione del peptide EAbuK-IKVAV,
- (ii) l'importanza di utilizzare uno specifico motivo adesivo (RGD o IKVAV) o meno,
- (iii) l'importanza di una specifica sequenza auto-assemblante (EAbuK o EAK).

Uno svantaggio della matrice a base di acido ialuronico e peptidi auto-assemblanti, emerso durante i saggi di vitalità cellulare, ha riguardato la sua difficile maneggiabilità. In particolare, la consistenza di tale *scaffold* non permette di sostituire completamente il terreno di coltura durante il periodo di sperimentazione. Si è dunque sostituito l'acido ialuronico con il chitosano al fine di migliorare questo aspetto.

Capitolo 2

2 Materiali e Metodi

2.1 Materiali

Si elencano di seguito i principali materiali utilizzati.

2.1.1 Reagenti

Reagenti forniti da *Millipore Corporation* (Merck KGaA, Darmstadt, Germania):

- Etanolo

Reagenti forniti da *VWR chemicals* (Radnor, Pennsylvania, USA):

- Acetone

Reagenti forniti da *Sigma-Aldrich* (Merck KGaA, St. Louis, Missouri, USA):

- Metanolo
- N-metil-2-pirrolidone (NMP)
- Acetonitrile;
- 1-etil-3 (3-dimetilaminopropil) carbodiimmide (EDC)
- Acido Acetico
- Acido Cloridrico
- Dimetilformammide (DMF)
- Trietossisilano (TES)

Reagenti forniti dalla *Biosolve* (Dieuze, Francia)

- Piperidina
- Dietiletere
- Diclorometano (DCM)
- Acido trifluoroacetico (TFA)
- N-etil-diisopropilammina (DIPEA)

Reagenti forniti dalla *Novabiochem* (Merck KGaA, Darmstadt, Germania):

- Amminoacidi Fmoc-protetti

- Resina Rink Amide MBHA
- 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio esafluorofosfato (HBTU)
- Etil ciano (idrossiammino) acetato (Oxyma Pure)
- [Etil ciano (idrossiammino) acetato – O^2] tri – 1 - pirrolidinfosfonio esafluorofosfato (PyOxim)
- 1-[Bis(dimetilammino)metilene]-1H-1,2,3,-triazolo[4.5-b]piridinio3-ossido esafluorofosfato (HATU)

Reagente fornito da *Contipro Biotech* (Dolni Dobrouc, Repubblica Ceca)

- Acido ialuronico (HA), PM = 1000-1250 kDa

Reagente fornito da *Heppe Medical Chitosan GmbH* (Saale, Germania)

- Chitosano, PM = 200-500 kDa, DDA = 70%

2.1.2 Peptidi utilizzati per l'arricchimento degli *scaffold*

EAbuK:

- $PM = 1728 Da$
- Sequenza:

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

EAbuK-RGD:

- $PM = 2052 Da$
- Sequenza:

H-Abu-Glu-Abu-Glu-Abu-Lys-Abu-Lys-Abu-Glu-Abu-Glu-Abu-Lys-Abu-Lys-Arg-Gly-Asp-NH₂

2.2 Strumenti

Si elencano di seguito i principali strumenti utilizzati:

- Sintetizzatore automatico modello Syro I, fornito da *MultisynTech* (Witten, Germania)
- Spettrofotometro UV-Vis modello Lambda 2, fornito da *Perkin Elmer* (Waltham, Massachusetts, USA)
- Liofilizzatore modello FreeZone 2.5 Liter Benchtop, fornito da *Labconco* (Kansas city, MO, USA)

- Evaporatore rotante modello Laborota 4000-Efficient, fornito da *Heidolph Instruments* (Schwabach, Germania)
- Bilancia analitica modello Mettler AE250, fornita da *Mettler Toledo* (Columbus, Ohio, U.S.)
- Distillatore d'acqua da laboratorio modello Stuart D4000, fornito da *Norrscope* (Chelmsford, Essex, United Kingdom)
- Sistema di purificazione dell'acqua modello Milli-Q Integral for UltraPure Water, fornito da *Merck KGaA* (Darmstadt, Germania)
- Bagno ad ultrasuoni modello Branson 1200, fornito da *Branson Ultrasonics Corp.* (Danbury, Connecticut, U.S.)
- Agitatore magnetico modello Microstirrer, fornito da *Velp Scientifica* (Usmate Velate, Italia)
- Centrifuga da banco modello Rotina 380, fornita da *Hettich GmbH & Co.* (Tuttlingen, Germania)
- Essiccatore sottovuoto fornito da *Kartell Labware* (Noviglio, Italia)
- Sistema RP-HPLC “semipreparativa” costituito da:
 - Sistema di pompaggio multisolvente HPLC modello Waters 600E, fornito da *Waters Corporation* (Milford, Massachusetts, USA)
 - Rilevatore UV/VIS multicanale a lunghezza d'onda programmabile modello Waters 2487, fornito da *Waters Corporation* (Milford, Massachusetts, USA)
 - Registratore su carta modello BD40/BD41 distribuito dalla *Carlo Erba Strumentazione* e prodotto dalla *Kipp & Zonen* (Delft, Olanda)
- Sistema RP-HPLC “analitica” costituito da:
 - Pompa binaria HPLC modello Waters 1525, fornito da *Waters Corporation* (Milford, Massachusetts, USA)
 - Autocampionatore modello Waters 2707, fornito da *Waters Corporation* (Milford, Massachusetts, USA)
 - Rilevatore UV/VIS multicanale a lunghezza d'onda programmabile modello Waters 2489, fornito da *Waters Corporation* (Milford, Massachusetts, USA)
 - Computer dotato del software di gestione dei dati cromatografici Empower Pro, sviluppato da *Waters Corporation* (Milford, Massachusetts, USA).

2.3 Metodi

Si descrivono le principali metodologie utilizzate.

2.3.1 Sintesi peptidica su fase solida (SPPS)

La sintesi peptidica su fase solida (SPPS) è una tecnica per la produzione di peptidi inventata nel 1963 da Bruce Merrifield: essa valse al suo ideatore il premio Nobel per la Chimica nel 1984 ed aprì la strada all'uso dei peptidi sintetici nella ricerca di tipo chimico e biomedico. La caratteristica innovativa che distingue la SPPS dalla sintesi peptidica in soluzione è il fatto che il peptide in crescita è legato ad un supporto insolubile (resina). Questo permette di rimuovere i reagenti in eccesso, ad ogni ciclo di reazione, attraverso dei semplici filtraggi e lavaggi, evitando il dispendioso passaggio, richiesto nel caso della sintesi in soluzione, di dover isolare e purificare il prodotto dopo ogni ciclo di reazione.

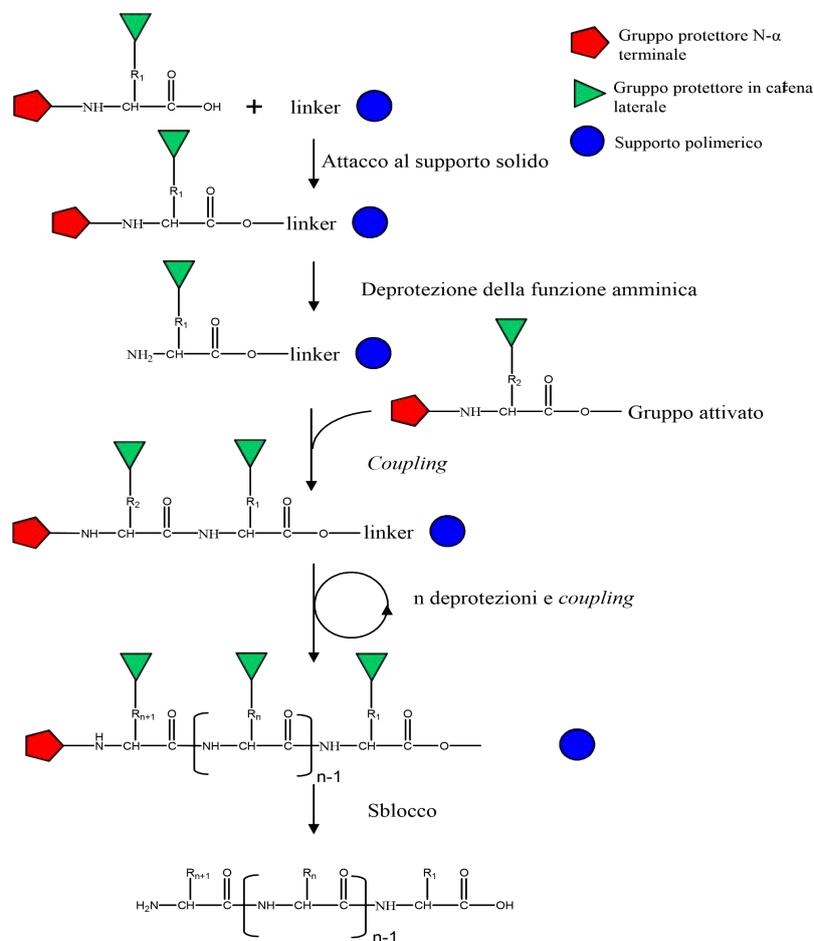


Figura 15: Schema di funzionamento della Sintesi Peptidica in Fase Solida (SPPS)

La sintesi avviene facendo crescere il peptide attraverso una serie di cicli di reazioni di deprotezione e condensazione (*coupling*) dal residuo C-terminale a quello N-terminale, con l'ultimo amminoacido della catena peptidica ancorato alla resina tramite il suo gruppo carbossilico. In particolare, ad ogni ciclo viene prima rimosso il gruppo protettore legato alla funzionalità amminica del residuo amminoacidico legato al peptide in crescita, poi si ha la reazione di condensazione tra il suddetto gruppo amminico e il gruppo carbossilico, preventivamente attivato, del residuo amminoacidico che si vuole legare alla catena in crescita. Dopo l'assemblaggio dell'intera catena peptidica, i gruppi protettori in catena laterale vengono rimossi e il peptide viene "sganciato" dalla resina. Uno schema esemplificativo dei diversi passaggi che si verificano durante la sintesi è presentato in Fig. 15.

Il gruppo scelto per proteggere la funzionalità amminica determina la chimica da impiegare per la sintesi nonché la natura dei gruppi da utilizzare per proteggere le funzionalità in catena laterale. I due gruppi protettori usati più di frequente sono:

- Fmoc, ovvero 9-fluorenilmetilossicarbonile,
- tBoc, ovvero *t*-butilossicarbonil.

Nel primo caso, come gruppi protettori in catena laterale si utilizzano, per esempio, derivati esteri, eteri e uretanici dell'alcol *t*-butilico (tBu). Invece, nel secondo caso si utilizzano, per esempio, derivati esteri, eteri e uretanici dell'alcol benzilico (Bzl). L'accoppiamento Fmoc/tBu rappresenta la più importante combinazione "ortogonale" di gruppi protettori. Il termine "ortogonale", coniato da Barany e Merrifield nel 1977, si riferisce a gruppi protettori che vengono rimossi con meccanismi chimici diversi. Infatti, il gruppo protettivo Fmoc è base-labile, mentre la rimozione dei gruppi protettori in catena laterale e lo sblocco del peptide dal supporto vengono ottenuti con acido trifluoroacetico (TFA). Invece, l'accoppiamento Boc/Bzl non è una combinazione "ortogonale" particolare perché i gruppi sono entrambi acido-labili. Infatti, il gruppo protettivo tBoc viene in genere rimosso con TFA diluito, mentre la rimozione dei gruppi protettori in catena laterale e lo sgancio del peptide dal supporto viene eseguito con acido fluoridrico (HF).

○ Deprotezione gruppo Fmoc

Nel presente lavoro di tesi si è adottata la chimica Fmoc, dunque a protezione della funzione amminica è stato utilizzato il gruppo base labile 9-fluorenilmetilossicarbonile (Fmoc). Per far avvenire la reazione di condensazione occorre, per prima cosa, deproteggere tale funzionalità dal residuo amminoacidico legato alla catena in crescita.

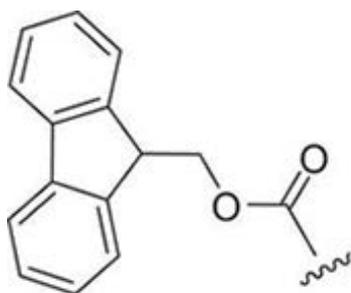


Figura 16: Gruppo protettore Fmoc

La procedura automatizzata prevede nell'ordine: i) l'iniezione nel reattore di 1 mL di soluzione al 40% di Piperidina in DMF per un tempo di reazione di 3 minuti (agitazione vortex per 15 secondi ogni minuto di reazione); ii) l'iniezione nel reattore di 0,9 mL di DMF seguita da una ulteriore iniezione di 0,9 mL di soluzione al 40% di Piperidina in DMF per un tempo di reazione di 12 minuti (agitazione vortex per 15 secondi ogni 3 minuti di reazione); iii) 6 cicli di lavaggi, ciascuno impiegando 2,2 mL di DMF.

o Attivazione gruppo carbossilico

Per far avvenire la reazione di condensazione, dopo aver deprotetto la funzione amminica del residuo amminoacidico legato al peptide in crescita, occorre attivare il gruppo carbossilico dell'amminoacido che si vuole legare al peptide in crescita. In questo lavoro di tesi si è utilizzata la tecnica di attivazione *in situ*: essa si basa sull'uso di HBTU, in presenza di Oxima Pure e DIPEA. HBTU rappresenta l'agente attivante vero e proprio, Oxima Pure rappresenta l'alternativa non esplosiva al più tradizionale HOBt e serve a prevenire la racemizzazione oltre ad aumentare la velocità ed efficienza della reazione.

Nel caso in esame, con un quantitativo pari a 240 mg di resina (sostituzione = 0,52 mmol/g corrispondente a 0,125 mmol), la procedura automatizzata prevede, per l'attivazione del gruppo carbossilico nel caso di *coupling* singolo, l'utilizzo di:

- 1 mL di soluzione 0,62 M dello Fmoc-amminoacido in DMF (o NMP nel caso di amminoacidi poco solubili in DMF) da legare alla catena peptidica in crescita (5 equivalenti)
- 1,4 mL di soluzione 0,5 M di HBTU/Oxima Pure in DMF (5 equivalenti)
- 0,625 mL di soluzione 2 M di DIPEA in NMP (10 equivalenti)

per un tempo di reazione di 45 minuti (agitazione vortex per 15 secondi ogni 3 minuti di reazione). A seguire, 5 cicli di lavaggi, ciascuno impiegando 3 mL di DMF.

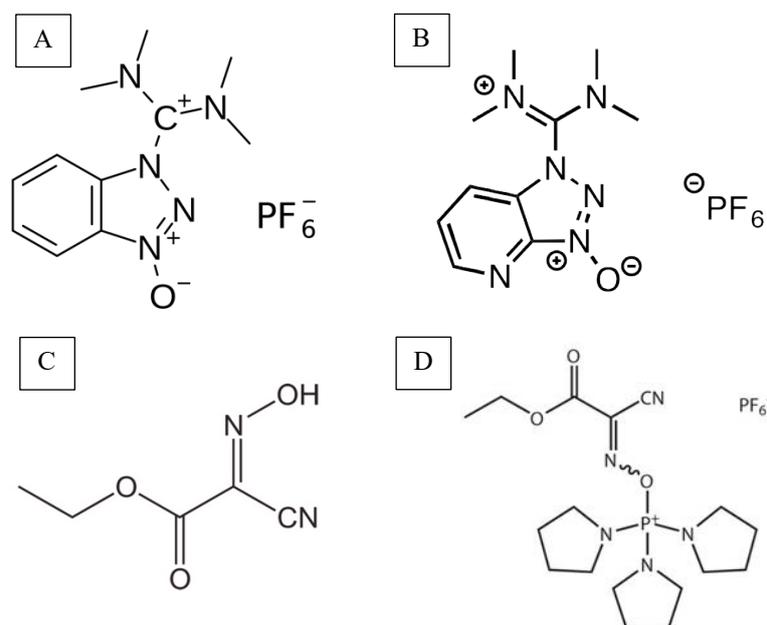


Figura 17: Struttura chimica di: A) HBTU, B) HATU, C) Oxima Pure, D) PyOxim

Tuttavia, nel caso di entrambe le sintesi peptidiche condotte in questo lavoro di tesi, l'attivazione del primo amminoacido, ossia quello da agganciare alla resina, è stato effettuato manualmente con un agente attivante avente un'efficienza maggiore: PyOxim in presenza di DIPEA. Inoltre, nel caso del peptide EAbuK-IKVAV, ciascun amminoacido della sequenza adesiva è stato agganciato utilizzando come agente attivante HATU al posto di HBTU in quanto il primo reagisce più velocemente e riduce l'epimerizzazione durante il *coupling* rispetto al secondo. Invece, il resto della sequenza di entrambi i peptidi è stata sintetizzata in *coupling* doppio secondo la procedura automatizzata sopra descritta.

o Resina

La scelta della resina dipende, oltre dal tipo di chimica che si vuole adottare per la sintesi, anche dal tipo di peptide che si vuole ottenere a seguito dello sblocco (*cleavage*). In generale, si può distinguere tra resine per sintesi di peptidi acidi e resine per sintesi di peptidi ammidi terminali.

In questo lavoro di tesi, per la sintesi peptidica si è utilizzata la resina *Rink Amide MBHA* (100-200 mesh), ottenuta legando il *Rink Amide linker* (Fmoc-2,4-dimetossi-4'-benzidrilammia) alla resina MBHA (amminometilica) tramite la Norleucina (Nle). Essa ha una funzionalità amminica in grado di reagire con il gruppo carbossilico dell'amminoacido che si vuole agganciare. Inoltre, presenta una struttura elettronica che, a seguito dello sblocco dalla resina in ambiente acido, permette di ottenere un peptide sotto forma di ammidi C-terminale.

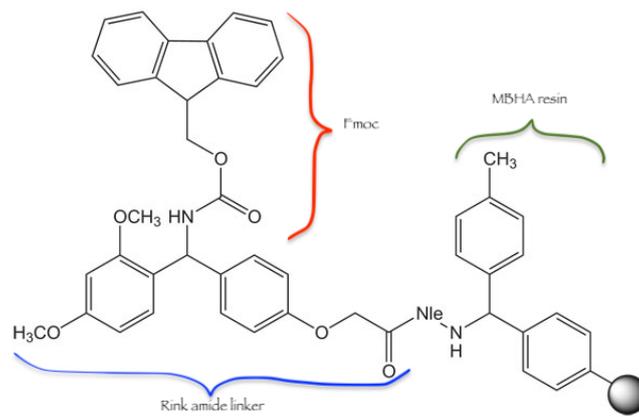


Figura 18: Resina Rink Amide MBHA

o Test sulla resa di funzionalizzazione della resina

Dopo l'aggancio del primo aminoacido alla resina (*loading*) occorre eseguire un test per verificare la resa di reazione. Questo test si basa sulla quantificazione spettrofotometrica del prodotto N-(9-fluorenilmetil) piperidina, che si forma in seguito allo sblocco del gruppo amminico dall'amminoacido su resina. Per effettuare questo test si è seguita la seguente la procedura.

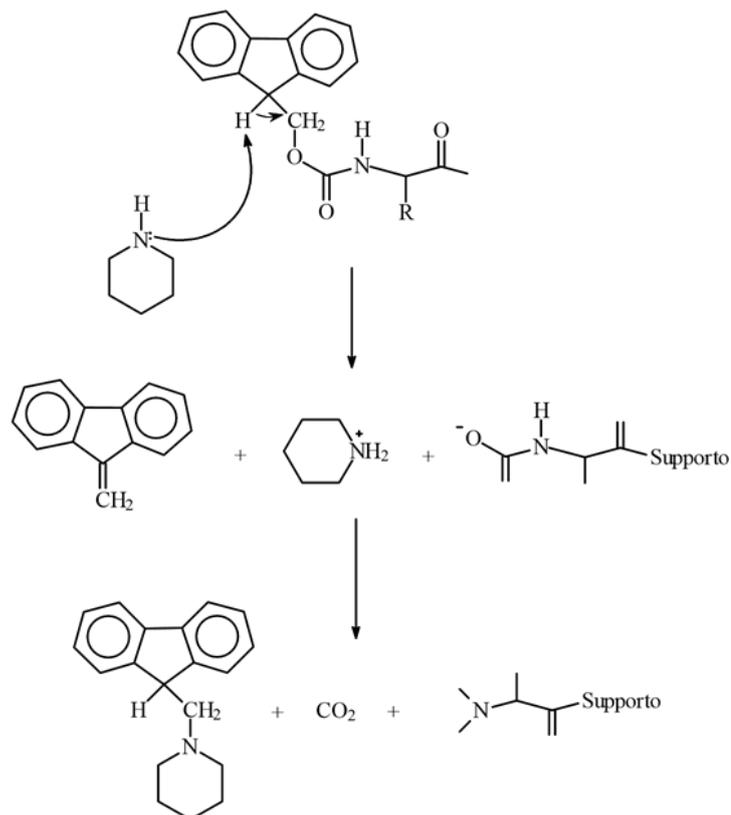


Figura 19: Deprotezione del gruppo Fmoc con Piperidina

Si preleva un campione di resina funzionalizzata, la si lava più volte con metanolo, centrifugando ogni volta e togliendo il surnatante. Dunque, si mette a essiccare in una campana sottovuoto per un'ora. A questo punto, il campione viene pesato (il peso deve essere compreso nell'intervallo 4 - 8 mg) e trattato con 0,5 mL di una soluzione al 20% di piperidina in DMF. Si lascia reagire per 15 minuti mescolando manualmente ogni tanto in modo da garantire che tutta la resina entri in contatto con la soluzione. Dunque, si diluisce con DMF fino a raggiungere un volume di 50 mL, si mescola e poi si lascia riposare per permettere alla resina di depositarsi sul fondo. Si prepara la soluzione da usare come "bianco" miscelando 0,5 mL della soluzione al 20% di piperidina in DMF precedentemente preparata con 49,5 mL di DMF. Si azzerava lo spettrofotometro Uv-Vis a 301 nm con il "bianco" e si legge l'assorbanza del campione alla stessa lunghezza d'onda.

La sostituzione sperimentale viene calcolata usando la seguente formula:

$$S_{sp} = \frac{Abs_{301} \times V_{sol}}{\epsilon \times W} \quad (2)$$

Dove:

- Abs_{301} è l'assorbanza misurata sperimentalmente alla lunghezza d'onda alla quale l'N-(9-fluorenilmetil) piperidina assorbe;
- V_{sol} [mL] è il volume della soluzione;
- $\epsilon = 7800 M^{-1}cm^{-1}$ è il coefficiente di estinzione molare, il cui valore numerico dipende dal solvente utilizzato, dalla specie chimica che dà l'assorbimento e dalla lunghezza d'onda utilizzata;
- W [g] è il peso del campione di resina dopo che lo si è essiccato.

La sostituzione teorica viene invece calcolata nel modo seguente:

$$S_t = \frac{1000}{PM_{res} + PM_{amm}} \quad (3)$$

Dove:

- PM_{res} [$\frac{g}{mol}$] è il peso molecolare della resina, ricavabile una volta nota la sostituzione della resina utilizzata (valore riportato sulla confezione);
- PM_{amm} [$\frac{g}{mol}$] è il peso del residuo amminoacidico legato alla resina.

Combinando l'eq. 2 e l'eq. 3, la resa % di funzionalizzazione viene calcolata con la seguente formula:

$$Resa = \frac{S_{sp}}{S_t} \times 100 \quad (4)$$

○ Sblocco del peptide dalla resina

Il processo di sblocco del peptide dalla resina adottato in questo lavoro di tesi avviene in ambiente acido poiché resina e gruppi protettori in catena laterale sono acido-labili. Tuttavia, il processo di deprotezione in ambiente acido può generare specie altamente reattive (carbocationi) in grado di modificare covalentemente alcuni residui amminoacidici. Per questa ragione, durante lo sblocco con TFA, si aggiungono agenti nucleofili (*scavengers*) in modo da ridurre tali reazioni collaterali indesiderate. La procedura adottata prevede i seguenti passaggi:

- conclusi i lavaggi a seguito dell'aggancio dell'ultimo amminoacido, il gruppo amminico viene deprotezionato secondo la modalità sopra descritta;
- il peptide su resina senza Fmoc viene lavato più volte con DCM e posto ad essiccare in una campana sottovuoto per circa 2 ore;
- al reattore contenente il peptide su resina essiccato viene aggiunto nell'ordine:
 - 0,125 mL di acqua MilliQ,
 - 0,125 mL di TES,
 - 4,75 mL di TFA;
- si lascia reagire per un'ora e mezza mescolando manualmente di tanto in tanto;
- per filtrazione, si separa la soluzione contenente il peptide dalla resina e si riduce il volume di tale soluzione mediante evaporatore rotante;
- si aggiunge etere dietilico (~ 4°C) per far precipitare il peptide, dunque lo si essicca sottovuoto per circa 2 ore;
- infine, il peptide viene sciolto in acqua MilliQ e messo a liofilizzare.

2.3.2 Spettroscopia di assorbimento UV-Vis

La spettroscopia UV-Vis è una delle tecniche analitiche più utilizzate grazie alla sua versatilità data dal fatto che gran parte delle molecole assorbono proprio in questo intervallo di lunghezze d'onda. La radiazione UV si estende nell'intervallo compreso tra 100 nm e 400 nm mentre la radiazione visibile nell'intervallo compreso tra 400 nm e 700 nm. Tuttavia, il *range* 100-200 nm (*deep UV*) in genere non viene utilizzato per misurazioni di routine. Tipicamente, gli

spettrometri UV-Vis sono dotati di una lampada al deuterio in grado di produrre luce nell'intervallo 175-375 nm e da una lampada a filamento di tungsteno che produce luce nell'intervallo 350-2500 nm.

○ Principio di funzionamento

Quando un fotone colpisce una molecola e viene assorbito, la molecola passa dallo stato fondamentale allo stato eccitato. La radiazione UV-Vis è in grado di promuovere gli elettroni dall'orbitale molecolare a più alta energia occupato (HOMO) all'orbitale molecolare a più bassa energia non occupato (LUMO). La differenza di energia tra HOMO e LUMO prende il nome di *band gap* e dipende dalla struttura chimica della molecola in questione. Dunque, molecole diverse hanno *band gap* diversi e quindi spettri di assorbimento diversi.

○ Struttura dello strumento

In uno spettrofotometro UV-Vis a doppio raggio una radiazione policromatica, generata dalle sopra citate lampade, viene focalizzata su una grata di diffrazione; questa è in grado di separare il fascio di luce policromatica incidente nelle varie lunghezze d'onda che lo compongono. Ogni lunghezza d'onda in ingresso è deviata in una direzione diversa dalle altre, dunque, ruotando la grata di diffrazione è possibile selezionare la radiazione monocromatica di interesse facendola passare attraverso una fenditura (*slit*). La luce proveniente dalla grata di diffrazione incontra un disco rotante diviso in settori circolari:

- se la luce colpisce il settore circolare trasparente, questa passerà attraverso la cella contenente il campione. Dunque, verrà riflessa da uno specchio verso un secondo disco rotante, ruotato in modo tale che la luce venga riflessa verso il detector (tracciato in rosso di Fig. 20).
- Se la luce colpisce il settore circolare a specchio, questa viene riflessa alla cella di riferimento. Dunque, giunge ad un secondo disco rotante, ruotato in modo tale che la luce gli passi attraverso (tracciato in verde di Fig. 20).
- Infine, se la luce colpisce il settore circolare nero del disco, essa viene bloccata e per un breve periodo di tempo nessuna radiazione passa attraverso lo strumento. Questo permette al computer di elaborare la corrente generata dal detector in assenza di luce.

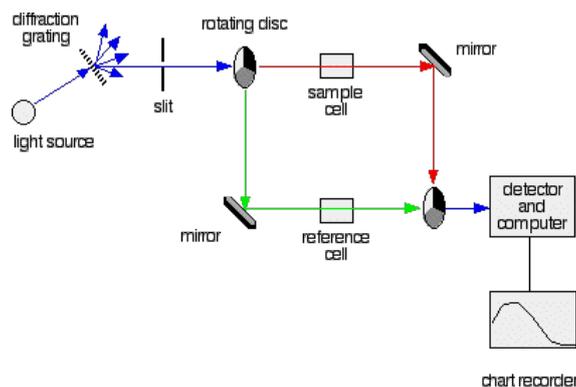


Figura 20: Schema di funzionamento spettrofotometro UV-Vis

In genere, sia la cella di riferimento, sia quella contenente il campione sono dei contenitori in quarzo progettati in modo tale che il cammino ottico della luce sia di 1 cm. La cella di analisi contiene la sostanza che si vuole testare sciolta in un solvente che non deve assorbire in maniera significativa nel *range* di lunghezze d'onda di interesse. La cella di riferimento contiene invece il solvente puro.

o Elaborazione del segnale

Il detector converte la luce in corrente: maggiore è la corrente, maggiore è l'intensità della luce. L'assorbanza viene dunque calcolata dal computer attraverso la seguente relazione:

$$A_{\lambda} = -\log_{10} \left(\frac{I}{I_0} \right) \quad (5)$$

Dove:

- I è l'intensità della luce ad una specifica lunghezza d'onda che passa attraverso la cella contenente il campione,
- I_0 è l'intensità della luce ad una specifica lunghezza d'onda che passa attraverso la cella di riferimento.

Grazie alla legge di Lambert-Beer, è possibile correlare l'assorbanza alle proprietà del materiale attraverso cui la luce sta passando tramite la seguente formula:

$$A_{\lambda} = \epsilon l c \quad (6)$$

Dove:

- $\epsilon [M^{-1}cm^{-1}]$ è il coefficiente di estinzione molare,
- $l [cm]$ è la distanza percorsa dalla luce attraverso il materiale (cammino ottico),
- $c [M]$ è la concentrazione della specie che assorbe.

2.3.3 Purificazione e caratterizzazione peptidica

- Analisi cromatografica su fase inversa (RP-HPLC)

La purificazione del peptide dai prodotti secondari di reazione è stata svolta attraverso la tecnica cromatografica *Reverse Phase - High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC)*. L'acronimo HPLC, coniato nel 1970, originariamente indicava l'elevata pressione (500 psi) che veniva utilizzata per forzare il flusso attraverso la colonna. Successivamente, con lo sviluppo di nuove pompe in grado di sviluppare pressioni molto più elevate (oltre i 6000 psi), ma anche con l'incorporazione di migliori iniettori, detector e colonne, l'acronimo HPLC rimase lo stesso ma il nome venne cambiato in *high performance liquid chromatography*. Attualmente i sistemi HPLC sono fra gli strumenti più potenti nel campo della chimica analitica grazie alla loro abilità di separare, identificare e quantificare i composti presenti in qualsiasi campione che possa essere sciolto in un liquido. Essi sono applicati in campo farmaceutico, alimentare, cosmetico, forense, ambientale e industriale.

Oltre a fornire dati analitici per identificare e quantificare i composti presenti all'interno del campione, i sistemi HPLC permettono di purificare e raccogliere determinate quantità di ogni composto attraverso un collettore di frazioni. Questo processo prende il nome di cromatografia preparativa. Una lista comprensiva dei diversi sistemi HPLC che è possibile adottare in base alle diverse esigenze è presentata in Tabella 2. In generale, all'aumentare delle quantità di campione che si vuole iniettare, aumentano le dimensioni della colonna, specialmente in termini di sezione, e la pompa deve gestire portate più elevate.

I componenti basilari di un sistema HPLC sono mostrati in Fig. 21. In particolare, si hanno i seguenti elementi:

- serbatoi contenenti i solventi (la fase mobile);
- una pompa ad alta pressione per generare e gestire la portata desiderata della fase mobile (in genere millilitri per minuto);
- un iniettore che introduce il campione all'interno del flusso della fase mobile in modo da trasportare il campione all'interno della colonna;
- una colonna contenente del materiale impaccato (fase stazionaria) che effettua la separazione;
- un detector che “vede” i diversi composti quando eluiscono dalla colonna;
- un computer che traduce il segnale elettrico generato dal detector in un cromatogramma.

Scale	Chromatographic Objective
Analytical	Information [compound ID and concentration]
Semi-preparative	Data and a small amount of purified compound [< 0.5 gram]
Preparative	Larger amounts of purified compound [> 0.5 gram]
Process [Industrial]	Manufacturing quantities [grams to kilograms]

Tabella 2: Sistemi HPLC e impiego

In generale, la separazione avviene grazie alla competizione tra la fase stazionaria e quella mobile. In particolare, si può sfruttare:

- la polarità,
- la carica elettrica o
- la dimensione delle molecole

per legare reversibilmente gli analiti alla fase stazionaria. Nel caso della separazione per polarità, esistono due modalità di funzionamento:

- a fase diretta
- a fase inversa

e due modalità di eluizione:

- modalità isocratica: in questa modalità la fase mobile, sia che essa sia un solvente puro sia che essa sia una soluzione, rimane la stessa durante l'intera analisi;
- modalità a gradiente: in questa modalità, la composizione della fase mobile cambia durante l'analisi. Al passare del tempo, la forza di eluizione della fase mobile viene incrementata in modo da far eluire i composti trattenuti più saldamente in colonna.

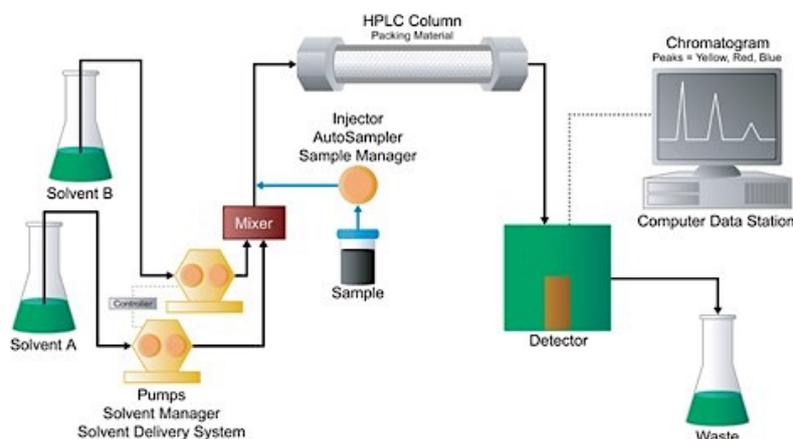


Figura 21: Schema di funzionamento HPLC

Nel caso in esame, si è utilizzato un sistema di separazione per polarità, a fase inversa e con modalità di eluizione a gradiente. Dunque, si è impiegata una fase stazionaria idrofobica (apolare) che fosse affine con l'analita ed una fase mobile la cui composizione veniva modificata nel corso dell'analisi (da polare ad apolare) in modo da entrare in competizione con la fase stazionaria. In questo modo, i composti simili in termini di polarità con la fase stazionaria escono più tardi, mentre i composti simili in termini di polarità alla fase mobile escono più rapidamente. Quindi, le diverse velocità di eluizione sono in grado di separare le componenti del campione iniettato.

Un'ottima combinazione tra fase mobile e stazionaria permette di avere un potere di risoluzione o di separazione della colonna molto elevato. Tuttavia, il potere di risoluzione dipende non solo da aspetti di tipo chimico ma anche da aspetti di tipo fisico come: la lunghezza della colonna, la dimensione delle particelle e l'uniformità del materiale impaccato. In particolare, particelle di piccola dimensione permettono di avere un potere di risoluzione maggiore ma provocano una contropressione maggiore. Aumentando la lunghezza della colonna si aumenta il potere di risoluzione ma si hanno anche tempi di analisi cromatografica più lunghi, maggiori consumi di solvente e maggiori contropressioni. È dunque di fondamentale importanza scegliere la combinazione eluente-colonna più appropriata in modo da ottimizzare i risultati della propria analisi. A tal proposito, in questo lavoro di tesi si sono utilizzate le seguenti colonne a gel di silice funzionalizzate con catene idrocarburiche lineari di 18 atomi di carbonio:

- Vydac C18 analitica ($5\ \mu\text{m}$, $300\ \text{Å}$, $4,6 \times 250\ \text{mm}$) fornita da *Grace* (Columbia, Maryland, USA)
- Nova-Pak C18 semipreparativa ($6\ \mu\text{m}$, $60\ \text{Å}$, $7,8 \times 300\ \text{mm}$) fornita da *Waters Corporation* (Milford, Massachusetts, USA)

Come fase mobile sono state usate:

- una soluzione acquosa 0,05% di TFA in H₂O MilliQ,
- una soluzione organica 0,05% di TFA in acetonitrile

in modalità di eluizione a gradiente.

Dal punto di vista dei rivelatori, dato che i campioni possono avere caratteristiche differenti, sono stati sviluppati diversi tipi di detector: UV, a fluorescenza o a indice di rifrazione. Spesso, per ottenere più informazioni da una singola iniezione, si è soliti accoppiare in serie uno dei detector precedentemente elencati ad uno spettrometro di massa: in questo caso il sistema HPLC viene classificato con la sigla LC/MC. Nel caso di questo lavoro di tesi, si è utilizzato

un detector UV impostato alla lunghezza d'onda di 214 nm, ovvero in corrispondenza del picco di assorbimento del legame peptidico.

A video l'operatore vede un cromatogramma, ossia una serie di picchi che svettano da una *baseline* in un diagramma avente come asse delle ordinate l'entità del segnale elettrico registrato dal detector (assorbanza) e come asse delle ascisse il tempo. La *baseline* rappresenta il flusso di fase mobile che passa attraverso la cella del detector, i picchi rappresentano i diversi composti. A seconda della loro concentrazione e velocità di eluizione, i picchi possono essere rispettivamente più o meno alti e più o meno spanciati e l'area sottesa al picco è direttamente proporzionale alla quantità dell'analita.

2.3.4 Spettrometria di massa ESI-TOF

Per la caratterizzazione e identificazione dei peptidi, oltre alla cromatografia RP-HPLC si possono effettuare delle analisi di massa. Queste sono state eseguite presso il Dipartimento di Scienze Farmaceutiche dell'Università di Padova dal Dott. M. Bellini con uno strumento ESI-TOF, modello Xevo G2-S QToF fornito da *Waters Corporation* (Milford, Massachusetts, USA).

Ogni spettrometro di massa è costituito dai seguenti componenti fondamentali:

1. una camera di ionizzazione, dove le molecole (nel caso del presente lavoro di tesi, peptidi) vengono ionizzate;
2. un analizzatore dove le molecole, a seguito dell'applicazione di un campo elettrico, vengono separate in funzione del valore del loro rapporto massa/carica (m/z);
3. un detector, dove gli ioni vengono rilevati e l'intensità del segnale per ciascun valore di m/z viene raccolta;
4. un computer che elabori il segnale proveniente dal detector in forma grafica, mostrando a video lo spettro di massa (valore m/z in ascisse e intensità del segnale in ordinate).

Uno schema del principio di funzionamento dello strumento è mostrato in Fig. 22.

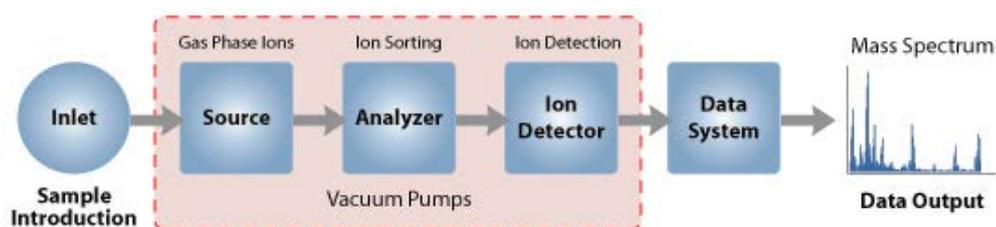


Figura 22: Schema di funzionamento della spettrometria di massa

La ionizzazione che si produce nella camera può essere:

- elettronica (sorgente EI),
- chimica (sorgente CI),
- per bombardamento con atomi veloci (sorgente FAB),
- per protonazione o ionizzazione negativa (sorgente ESI),
- per desorbimento (sorgente MALDI).

Nel presente lavoro di tesi si è utilizzata una sorgente ESI (*electrospray ionization*). Si tratta di una tecnica di ionizzazione che opera a pressione ambiente e a temperature moderate, spesso adottata per l'analisi di massa dei peptidi. Nel caso dei peptidi si ricorre sempre alla ionizzazione positiva: ossia il campione viene trasportato da un flusso di solvente contenente tracce di un acido volatile (acido acetico o trifluoroacetico). Tuttavia, è possibile operare anche mediante ionizzazione negativa, aggiungendo al flusso di solvente che trasporta il campione tracce di ammoniaca invece che di acidi. Tale flusso fuoriesce da un capillare di acciaio (in rosso in Fig. 23) e un flusso coassiale di gas inerte (azoto) produce la formazione di un aerosol. Fra il capillare metallico e il contro-elettrodo è applicata una differenza di potenziale. In queste condizioni, le molecole di soluto dissolte nelle particelle liquide che formano l'aerosol assumono carica positiva. Nel breve spazio che separa il capillare e il contro-elettrodo, per evaporazione del solvente, si ha un aumento della carica specifica delle particelle di liquido che, per repulsione coulombiana fra cariche omologhe, si frammentano dando origine ad una popolazione di ioni positivi singoli non solvatati. Il campo elettrico applicato fa sì che gli ioni positivi vengano accelerati verso il polo negativo e, passando attraverso il cono campionario, entrano in una zona a bassa pressione dalla quale, attraversando lo *skimmer*, entrano nell'analizzatore dove è praticato un alto vuoto.

Esistono diverse tipologie di analizzatore:

- analizzatore magnetico,
- analizzatore a quadrupolo,
- analizzatore a trappola ionica (*ion-trap*),
- analizzatore TOF (*time of flight* – tempo di volo).

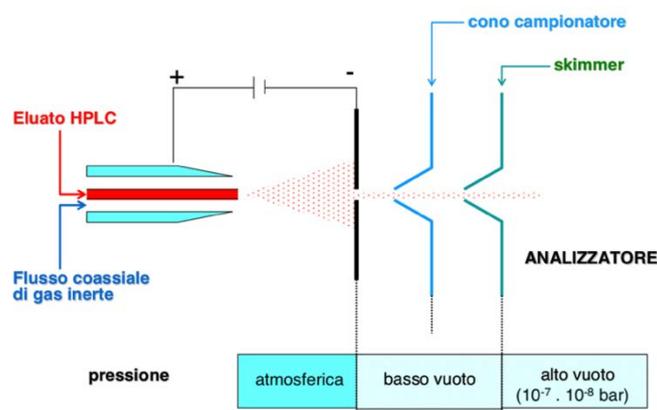


Figura 23; Rappresentazione schematica di una sorgente ESI

In questo lavoro di tesi si è utilizzato un analizzatore TOF. In questo dispositivo, il rapporto m/z dello ione peptidico viene derivato dal tempo impiegato dallo ione, che nella sorgente è stato accelerato dal campo elettrico, per percorrere il tubo di volo (uno spazio confinato, libero da campi elettrici) e giungere al rivelatore.

2.3.5 Realizzazione delle matrici a base di acido ialuronico

Per la realizzazione degli *scaffold*, si è dapprima sciolto il peptide in acqua MilliQ sotto agitazione magnetica in un becher, poi si è addizionato poco per volta l'acido ialuronico ottenendo una soluzione viscosa omogenea. La soluzione è stata dunque suddivisa nei diversi pozzetti, che sono stati ghiacciati in azoto liquido e messi a liofilizzare. A seguire, una soluzione 60 mM di EDC in 95% di etanolo è stata utilizzata per reticolare l'acido ialuronico per 24 ore a temperatura ambiente secondo il meccanismo di reazione riportato in Fig. 7A. Quindi si è proceduto con 3 lavaggi in etanolo e 3 lavaggi in acqua MilliQ. Infine, le matrici sono state ghiacciate in ghiaccio secco e messe a liofilizzare.

2.3.6 Realizzazione delle matrici a base di chitosano

Per la realizzazione degli *scaffold*, si è dapprima sciolto il peptide con una soluzione 0,2 M di acido acetico in un bacher sotto agitazione magnetica, poi si è addizionato poco per volta il chitosano.

La soluzione è stata dunque suddivisa nei diversi pozzetti, che sono stati ghiacciati in ghiaccio secco e messi a liofilizzare. Quindi si è proceduto con 3 lavaggi in etanolo e 3 lavaggi in tampone sodio-fosfato PBS 10X. Infine, le matrici sono state ghiacciate in ghiaccio secco e messe a liofilizzare.

2.3.7 Test reologici

La reologia è la scienza che si occupa dello studio del flusso o della deformazione della materia per effetto di sollecitazioni esterne. Il termine reologia è stato coniato nel 1929 dal professor Bingham del Lafayette College (Easton, Pennsylvania, USA) anche se concetti che oggi sono riconosciuti come “reologici” vennero formulati tempo addietro dal filosofo greco Eraclito con il suo celebre detto “panta rhei” (tutto scorre) e dalla profetessa ebrea Deborah, il cui nome viene utilizzato per indicare un importante numero adimensionale: il numero di Deborah.

La caratterizzazione sperimentale del comportamento reologico del materiale viene determinata attraverso uno strumento: il reometro. In particolare, è in grado di fornire informazioni riguardanti:

- la viscosità, ossia la resistenza del materiale alla deformazione. Essa è data dal rapporto tra lo sforzo e la velocità di deformazione ed è funzione della temperatura e della pressione.
- la viscoelasticità, proprietà che interessa i materiali con comportamento sia viscoso sia elastico. In particolare, è possibile misurare lo *Storage Modulus* (G') o il *Loss Modulus* (G'') rispetto al tempo, alla temperatura, alla frequenza.

Nel presente lavoro di tesi è stato utilizzato un reometro modello Discovery Hybrid Reometer-2, fornito dalla *TA Instruments* (New Castle, Delaware, USA). Si tratta di un reometro rotazionale in grado di applicare o misurare:

- il momento torcente,
- l'angolo di rotazione,
- la velocità angolare.

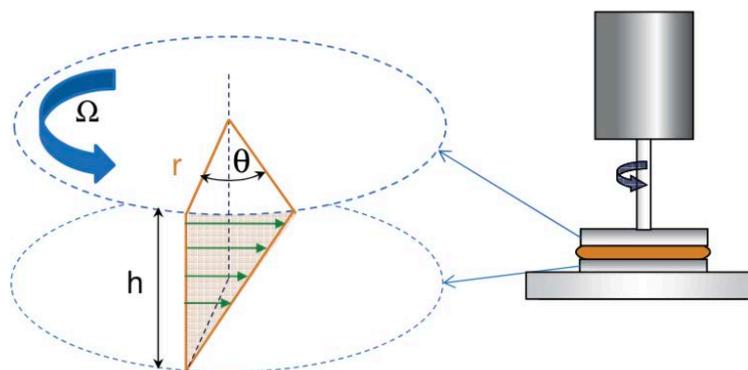


Figura 24: Struttura del reometro rotazionale impiegato

In particolare, dal momento torcente è possibile risalire allo sforzo grazie alla seguente equazione:

$$\sigma = M \times K_{\sigma} \quad (7)$$

Dove:

- $M [N \cdot m]$ è il momento torcente,
- $\sigma [Pa]$ è lo sforzo,
- $K_{\sigma}[m^{-3}]$ è una costante che dipende dalla geometria.

Dall'angolo di rotazione è possibile risalire alla deformazione di taglio attraverso la seguente equazione:

$$\gamma = \theta \times K_{\gamma} \quad (8)$$

Dove:

- $\theta [rad]$ è l'angolo di rotazione,
- γ è la deformazione,
- K_{γ} è una costante che dipende dalla geometria.

Unendo le eq. 7 e l'eq. 8 è possibile risalire al modulo di taglio del materiale:

$$G = \frac{M \times K_{\sigma}}{\theta \times K_{\gamma}} \quad (9)$$

Dove:

- $G[Pa]$ è il modulo di taglio.

Dalla velocità angolare è possibile risalire alla velocità di deformazione attraverso la seguente equazione:

$$\dot{\gamma} = K_{\gamma} \times \Omega \quad (10)$$

Dove:

- $\dot{\gamma} [\frac{rad}{s}]$ è la velocità di deformazione,
- $\Omega [\frac{rad}{s}]$ è la velocità angolare,

Unendo le eq. 7 e 10 è possibile risalire alla viscosità del materiale:

$$\mu = \frac{M \times K_{\sigma}}{K_{\gamma} \times \Omega} \quad (11)$$

Dove:

- $\mu [Pa \cdot s]$ è la viscosità.

A seconda del campione da analizzare occorre scegliere la geometria più opportuna, come mostrato in Fig. 25.

Nel presente lavoro di tesi è stata utilizzato un sistema a piatti paralleli, costituito da un disco superiore piano e mobile e un piatto inferiore fisso. Con questa geometria si ha:

$$K_{\gamma} = \frac{r}{h} \quad (12)$$

e

$$K_{\sigma} = \frac{2}{\pi r^3} \quad (13)$$

Dove:

- $r [m]$ è il raggio del disco,
- $h [m]$ è la distanza tra il disco superiore e il piatto inferiore.

Unendo l'eq. 7 e l'eq. 12 si osserva che all'aumentare del diametro del disco superiore si aumenta lo sforzo di taglio applicato al campione. Invece, unendo l'eq. 10 e l'eq. 13 possiamo dedurre che diminuendo la distanza (h) diminuisce la velocità di deformazione.



Figura 25: Rappresentazione delle diverse geometrie utilizzabili

Nel presente lavoro di tesi sono stati eseguiti i seguenti test: *Oscillation Strain Sweep* e *Oscillation Frequency Sweep*.

○ *Oscillation Strain Sweep*

Si tratta di un esperimento in cui si valuta la risposta del materiale all'aumentare dell'ampiezza di deformazione, mantenendo la frequenza e la temperatura costante. Questo test viene impiegato principalmente per determinare la LVR (*Linear Viscoelastic Region*), ossia la regione all'interno della quale la struttura del materiale non cambia.

In particolare, all'interno della LVR il modulo si mantiene costante, ossia ha un comportamento che è indipendente dalla deformazione applicata. Esiste un valore critico di ampiezza di deformazione, oltre il quale si passa dalla LVR ad una regione a comportamento non lineare. All'interno di quest'ultima, le deformazioni sono in grado di alterare la struttura del materiale, dunque il modulo diventa funzione della deformazione applicata, come mostrato in Fig. 26.

In generale, questo tipo di test dipende da diversi parametri:

- frequenza,
- temperatura,
- stato del materiale.

In particolare, aumentando la frequenza, la LVR si riduce e il modulo aumenta. Aumentando la temperatura la LVR aumenta e il modulo diminuisce. Infine, un materiale allo stato solido presenta una LVR più corta e un valore del modulo più elevato rispetto allo stesso materiale allo stato liquido.

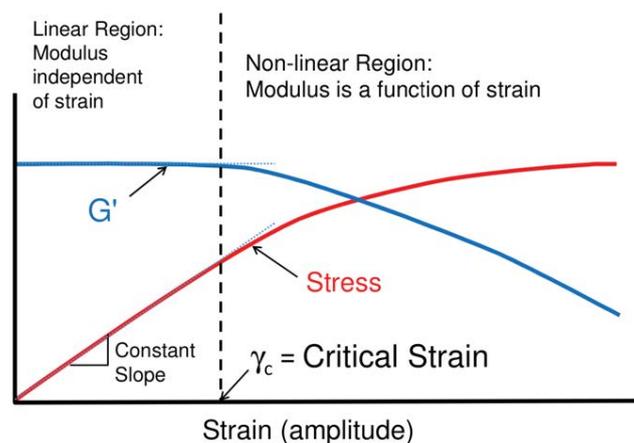


Figura 26: Rappresentazione di una tipica curva ottenuta da un *Oscillation Strain Sweep* test

○ Frequency Sweep Test

Si tratta di un esperimento in cui si valuta la risposta del materiale all'aumentare della frequenza (velocità di deformazione), mantenendo l'ampiezza (deformazione o sforzo) e la temperatura costante. Questo test viene impiegato principalmente per identificare la frequenza alla quale il materiale cambia il proprio comportamento (da elastico a viscoso e viceversa). Come mostrato in Fig. 27, tale frequenza si trova nel punto di incrocio tra la curva dello *Storage Modulus* e la curva del *Loss Modulus*. Essendo la frequenza correlabile al tempo, spesso tale frequenza limite prende il nome di tempo di rilassamento.

In particolare, se si impone una deformazione avente un tempo di applicazione (t_{app}) inferiore al tempo di rilassamento (τ), il materiale avrà un comportamento rigido (*solid-like*). Invece, se si impone una deformazione avente un tempo di applicazione più lungo, il materiale si comporterà in maniera viscosa (*liquid-like*).

Questo concetto può essere riassunto all'interno del numero di Deborah, definito come:

$$De = \frac{\tau}{t_{app}}$$

In particolare, se il numero di Deborah è minore di uno, il materiale avrà un comportamento simile ad un fluido. Viceversa, se il numero di Deborah è maggiore di uno, il materiale avrà un comportamento più simile ad un solido. Questo significa che un materiale può apparire più simile ad un solido perché ha un tempo di rilassamento molto lungo o perché è sottoposto ad un processo di deformazione molto veloce.

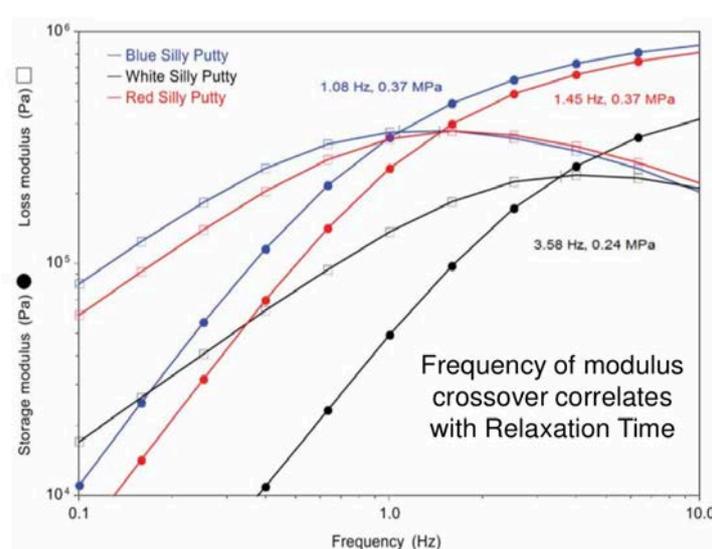


Figura 27: Rappresentazione di tipiche curve ottenute da un Oscillation Frequency Sweep test

2.3.8 Saggi biologici

La linea cellulare tumorale epiteliale HCC1954, derivata dall'adenocarcinoma mammario, è stata coltivata con un terreno proliferativo composto da RPMI, addizionato con 10% v/v di siero fetale bovino (FBS), 1% di L-glutamina e 1% di soluzione antibiotica all'interno di un incubatore a 37°C in atmosfera umidificata e al 5% di CO₂. Sono state seminate 2×10^5 cellule all'interno di ogni pozzetto di piastra a 24 pozzetti in cui è stato realizzato lo *scaffold* e, a 1,3 e 7 giorni dalla semina, è stata valutata la crescita cellulare e sono state effettuate le analisi istologiche e morfologiche.

○ Vitalità cellulare

La vitalità cellulare è stata valutata mediante saggio PrestoBlue™, seguendo le indicazioni della ditta produttrice. Il PrestoBlue™ è una soluzione a base di resazurina colorata in blu e non fluorescente in grado di permeare all'interno delle cellule. Quando questa permea all'interno di cellule vitali, l'ambiente riduce la resazurina in resorufina, di colore rosso e altamente fluorescente (λ eccitazione 560 nm, λ emissione 590 nm). La procedura prevede, al momento in cui si vuole fare il saggio (ossia a 1,3 e 7 giorni dalla semina), di rimuovere il terreno di coltura dai pozzetti contenenti gli *scaffolds* e di aggiungere una soluzione contenente una diluizione 1:10 di PrestoBlue™ in terreno di coltura. Dopo 30 minuti di incubazione, è possibile determinare la fluorescenza utilizzando un lettore di piastre Victor. I risultati vengono espressi come intensità media di fluorescenza (MFI). Le colture cresciute su polistirene trattato per colture cellulari sono state considerate come controllo.

○ Analisi morfologica

A 3 e 7 giorni dalla semina, le colture sono state osservate al microscopio ottico a contrasto di fase. Si tratta di uno strumento che, sfruttando la differenza di indice di rifrazione tra il campione da analizzare e il mezzo circostante, permette la visualizzazione senza ricorrere a metodologie di colorazione. A causa del diverso indice di rifrazione, la luce durante il passaggio attraverso i nuclei delle cellule subisce una deviazione, mentre quando attraversa il mezzo circostante non viene deviata. Questo microscopio fa convergere i raggi deviati con i raggi non deviati; in questo modo si ottiene un terzo raggio che presenta caratteristiche di ampiezza e lunghezza d'onda diverse rispetto alla luce incidente e, quindi, potrà essere percepito dall'occhio umano. Si ricorda che, affinché qualcosa possa essere vista dall'occhio umano, si devono avere delle variazioni di ampiezza e/o lunghezza d'onda.

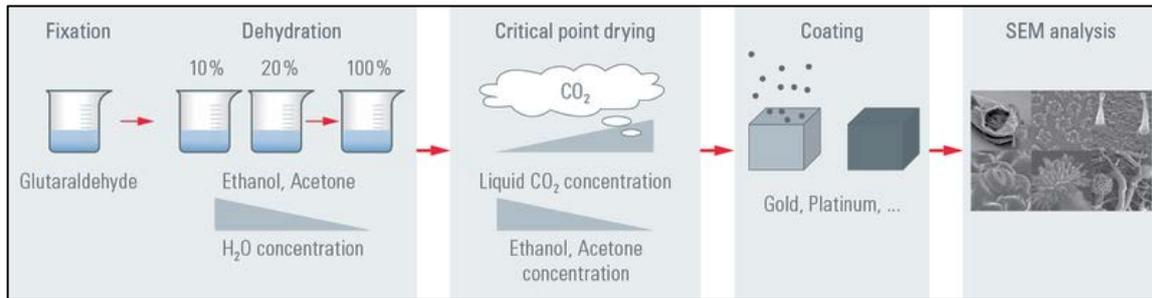


Figura 28: Schema di preparazione dei campioni per analisi al microscopio elettronico a scansione (SEM)

A 3 e 7 giorni dalla semina, le colture su *scaffold* a base di chitosano sono state anche analizzate al microscopio elettronico a scansione (SEM). Il terreno di coltura è stato rimosso, sono stati effettuati lavaggi con PBS (tampone sodio-fosfato) e le colture sono state fissate con glutaraldeide in tampone cacodilato. La disidratazione è stata raggiunta tramite passaggi in alcol a percentuali crescenti. Per rimuovere l'alcol, è stato effettuato il *Critical Point Drying*. Questo sfrutta le proprietà del punto critico di una sostanza, ossia quella condizione di temperatura e pressione per cui la fase liquida e gassosa non è più distinguibile e le tensioni superficiali all'interfaccia sono annullate. In particolare, è stata impiegata CO₂ perché ha un punto critico che si trova a 31°C e 1072 psi, una condizione che permette di non danneggiare termicamente il campione biologico. Il campione è stato introdotto in una camera a tenuta di pressione e successivamente ricoperto di CO₂ liquida. Dopo alcuni lavaggi per eliminare l'alcol, aumentando la temperatura al di sopra del valore critico, la CO₂ liquida è diventata vapore senza avere effetti di distorsione causati dalle tensioni superficiali. Successivamente, il campione è stato ancorato su un supporto di metallo tramite una pasta d'argento, che ha la funzione di condurre a terra gli elettroni incidenti durante l'osservazione al SEM. Infine, è stato metallizzato con oro per renderlo conduttivo. Uno schema delle fasi di preparazione del campione necessarie per effettuare un'analisi al SEM è riportato in Fig. 28.

o Analisi istologica

A 3 giorni dalla semina sono state eseguite due tipologie di colorazioni istologiche: l'Ematossilina-Eosina e la tricromica di Masson. In entrambi i casi, il campione è stato processato prima di poter effettuare l'analisi.

In particolare, nel caso delle colture a base di HA, il terreno è stato rimosso, la coltura trasferita su vetrino, lasciata seccare e fissata con formalina tamponata al 10%. Dopo lavaggi con PBS, i campioni sono stati colorati con tricromica di Masson, seguendo le indicazioni della ditta

produttrice. Questa colorazione colora i nuclei in viola, il citoplasma in rosso più o meno vivo, il connettivo e le strutture fortemente basiche in blu.

Invece, nel caso delle colture a base di chitosano, è stato rimosso il terreno, sono stati effettuati lavaggi con PBS e le colture sono state fissate come sopra descritto. I campioni sono stati trattati con soluzioni di saccarosio (criopreservante) a concentrazione crescente e, in seguito, inclusi in OCT. Quest'ultima è una miscela solubile in acqua di resine e glicoli in grado di creare un ambiente ideale per il congelamento in vapori di azoto. Successivamente, sono state ottenute sezioni di spessore di 8 μm tramite criostato e colorate con Ematossilina-Eosina (HE), seguendo le indicazioni della ditta produttrice. Questa colorazione evidenzia il nucleo e i vari componenti acidi (ribosomi, secreti acidi) del citoplasma in blu-viola, il citoplasma e i vari componenti basici (muscolare, connettivo, osseo) vengono colorati in rosa.

Capitolo 3

3 Parte sperimentale

Il lavoro di tesi è stato suddiviso nei seguenti punti:

- Sintesi del peptide auto-assemblante EAK e successiva purificazione per ottenere il materiale necessario alla realizzazione degli *scaffold*
- Sintesi del coniugato covalente tra peptide auto-assemblante (EAbuK) e sequenza adesiva (IKVAV). Successiva purificazione per ottenere il materiale necessario alla realizzazione degli *scaffold*
- Realizzazione degli *scaffolds* a base di acido ialuronico reticolato, arricchiti con peptidi auto-assemblanti.
- Realizzazione degli *scaffolds* a base di chitosano arricchiti con peptidi auto-assemblanti.

3.1 Sintesi e purificazione peptidica

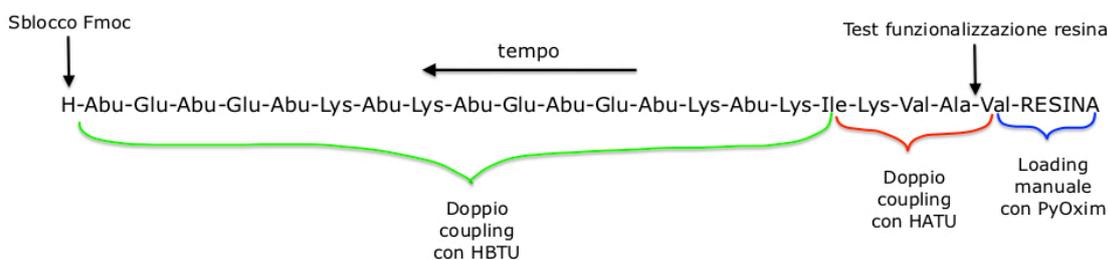
3.1.1 Sintesi del peptide EAbuK-IKVAV

- $PM = 2238 Da$
- Sequenza:

H-Abu-Glu-Abu-Glu-Abu-Lys-Abu-Lys-Abu-Glu-Abu-Glu-Abu-Lys-Abu-Lys-Ile-Lys-Val-Ala-Val-NH₂

Si tratta di un peptide auto-assemblante (EAbuK), appartenente alla classe dei peptidi denominati “Lego molecolari”, a cui è stato legato covalentemente il motivo adesivo della laminina IKVAV.

Si è sintetizzato questo peptide mediante il processo di sintesi su fase solida, adottando una chimica Fmoc e seguendo il seguente schema di sintesi:



L'aggancio del primo amminoacido alla resina (*loading*) viene eseguito manualmente, mentre i restanti *coupling* sono stati effettuati tramite il sintetizzatore automatico Syro I.

Innanzitutto, si è preparata la seguente soluzione di sintesi:

- Soluzione 40% v/v di Piperidina in DMF

Tenendo in considerazione il numero di gruppi protettori da deproteggere è stato stimato un quantitativo di soluzione da caricare all'interno del sintetizzatore pari a 100 mL. In particolare, si sono miscelati 40 mL di Piperidina e 60 mL di DMF all'interno di un cilindro graduato e, successivamente, si è trasferita la soluzione all'interno dell'apposito bottiglione da collegare al sintetizzatore.

A seguire, si è proceduto a pesare e rigonfiare (*swelling*) la resina:

- Resina e rigonfiamento

Come supporto solido, sul quale far crescere il peptide, si è utilizzata la *Rink Amide MBHA resin*. Volendo ottenere 0,125 mmol di peptide (n_{pept}) e conoscendo la sostituzione della resina ($sost_{resin}$), si è ricavato il quantitativo di resina (m_{resin}) da impiegare:

$$m_{resin} = \frac{n_{pept}}{sost_{resin}} = \frac{0,125 \text{ mmol}}{0,52 \frac{\text{mmol}}{g}} = 0,240 \text{ g} \quad (14)$$

Si sono dunque pesati 240 mg di resina all'interno del reattore e si è proceduto con il rigonfiamento trattando la resina con 3 mL di DMF per 5 minuti: 10 secondi di agitazione vortex seguiti da 20 secondi di riposo, il tutto per 10 volte. Si è filtrato e, secondo le modalità descritte al paragrafo 2.3.1 del Capitolo 2, si è avviata la procedura automatizzata di deprotezione del gruppo Fmoc dalla resina.

Si è quindi proceduto ad effettuare il *loading* manuale della resina:

- Loading della resina

Volendo utilizzare 10 equivalenti di Valina, 10 equivalenti di PyOxim e 20 equivalenti di DIPEA, sono stati svolti i seguenti calcoli. Per ottenere la massa della Fmoc-Valina e PyOxim si è usata la seguente equazione:

$$m_{reag} = PM_{reag} \times n_{pept} \times n_{equiv} \quad (15)$$

Dove:

- m_{reag} è la massa del reagente utilizzato;

- PM_{reag} è il peso molecolare del reagente utilizzato;
- n_{equiv} è il numero di equivalenti.

Dunque, sostituendo i valori nell'eq. 15 si ottiene:

$$m_{Fmoc-Val} = 339,39 \frac{g}{mol} \times 0,125 \text{ mmol} \times 10 = 0,424 \text{ g}$$

e

$$m_{PyOxim} = 527,38 \frac{g}{mol} \times 0,125 \text{ mmol} \times 10 = 0,659 \text{ g}$$

Per ottenere il volume di DIPEA si è utilizzata la seguente equazione:

$$Vol_{reag} = \frac{m_{reag}}{\rho_{reag}} \quad (16)$$

Dove:

- Vol_{reag} è il volume del reagente utilizzato,
- ρ_{reag} è la densità del reagente utilizzato.

Dunque, sostituendo i valori nell'eq. 16 si ottiene:

$$Vol_{DIPEA} = \frac{129,25 \frac{g}{mol} \times 0,125 \text{ mmol} \times 10}{0,742 \frac{g}{cm^3}} = 0,435 \text{ mL}$$

Dunque, 0,424 g di Valina, 0,659 g di PyOxim e 0,435 mL di DIPEA sono stati sciolti e miscelati in 5 mL di DMF. Il reattore contenente la resina è stato trattato con questa soluzione per 45 minuti: 10 secondi di agitazione vortex ogni 5 minuti. A seguire, si sono eseguiti nell'ordine:

- 4 lavaggi con DMF,
- 2 lavaggi con DCM,
- 2 lavaggi con metanolo.

Ciascuno lavaggio ha impiegato 4 mL di solvente, agitando per 10 secondi, lasciando riposare per 20 secondi e infine filtrando.

Come indicato nello schema di sintesi, dopo il *loading* si è effettuato il test di funzionalizzazione della resina secondo la procedura descritta al paragrafo 2.3.1 del Capitolo 2.

○ Test di funzionalizzazione della resina

Si riportano i calcoli eseguiti, sostituendo i valori all'interno delle eq. 2,3 e 4:

$$S_{sp} = \frac{0,366 \times 50 \text{ mL}}{7800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} \times 0,0053 \text{ mg}} = 0,443$$

$$S_t = \frac{1000}{1923 \frac{\text{g}}{\text{mol}} + 322,4 \frac{\text{g}}{\text{mol}}} = 0,445$$

$$Resa = \frac{0,443}{0,445} = 99,5\%$$

Avendo ottenuto una resa superiore al 98%, il test di funzionalizzazione della resina può essere considerato superato con successo.

Si è quindi proceduto con la sintesi preparando le seguenti soluzioni:

○ Soluzione 2M DIPEA in NMP

Tenendo in considerazione il numero di equivalenti di DIPEA (in questo caso 10) da utilizzare e del numero di *coupling*, è stato stimato un quantitativo di soluzione da caricare all'interno del sintetizzatore pari a 50 mL.

Sulla base dei seguenti calcoli si sono miscelati 17,4 mL di DIPEA e 32,6 mL di NMP all'interno di un cilindro graduato e, successivamente, si è trasferita la soluzione all'interno dell'apposito bottiglione da inserire all'interno del sintetizzatore. Per ottenere il volume di DIPEA si è usata la seguente equazione:

$$Vol_{reag} = \frac{n_M \times V_{sol} \times PM_{reag}}{\rho_{reag}} \quad (17)$$

Dove:

- n_M è la molarità della soluzione.

Dunque, sostituendo i valori nell'eq. 17 si ottiene:

$$Vol_{DIPEA} = \frac{2 \frac{\text{mol}}{\text{L}} \times 0,05 \text{ L} \times 129,25 \frac{\text{g}}{\text{mol}}}{0,742 \frac{\text{g}}{\text{cm}^3}} = 17,4 \text{ mL}$$

Invece, il volume di NMP utilizzato si ricava per semplice differenza tra il volume della soluzione e il volume di DIPEA, in particolare:

$$Vol_{NMP} = 50 \text{ mL} - 17,4 \text{ mL} = 32,6 \text{ mL}$$

○ Soluzione 0,5 M HATU/Oxima Pure in DMF

Tenendo in considerazione il numero di equivalenti di HATU e Oxima Pure (in questo caso 5) da utilizzare e del numero di *coupling*, è stato stimato un quantitativo di soluzione da caricare all'interno del sintetizzatore pari a 50 mL.

Sulla base dei seguenti calcoli, si sono sciolti 9,5 g di HATU e 3,55 g di Oxima Pure in DMF in modo da ottenere una soluzione avente un volume totale di 50 mL. Per ottenere la massa di HATU e di Oxima Pure si è usata la seguente equazione:

$$m_{reag} = n_M \times V_{sol} \times PM_{reag} \quad (18)$$

Dunque, sostituendo i valori nell'eq. 18 si ottiene:

$$m_{HATU} = 0,5 \frac{mol}{L} \times 0,05 L \times 380,23 \frac{g}{mol} = 9,5 g$$

$$m_{Oxima Pure} = 0,5 \frac{mol}{L} \times 0,05 L \times 142,1 \frac{g}{mol} = 3,55 g$$

○ Soluzioni 0,62 M Fmoc-amminoacido in DMF

Tenendo in considerazione il numero di equivalenti di Fmoc-amminoacido da utilizzare (in questo caso 5) e del numero di volte che ciascun amminoacido (AA) compare in catena, è stato stimato un quantitativo di soluzione, diverso per ogni AA, da caricare all'interno del sintetizzatore.

Si è quindi avviata la sintesi.

Come riportato nello schema di sintesi, terminato l'aggancio dell'Isoleucina (l'ultimo amminoacido della sequenza adesiva), la soluzione HATU/Oxima Pure è stata sostituita con una soluzione 0,5 M di HBTU/Oxima Pure in DMF.

Si è quindi preparata la seguente soluzione di sintesi:

○ Soluzione 0,5 M HBTU/Oxima Pure in DMF

Tenendo in considerazione il numero di equivalenti di HBTU e Oxima Pure (in questo caso 5) da utilizzare e del numero di *coupling*, è stato stimato un quantitativo di soluzione da caricare all'interno del sintetizzatore pari a 80 mL.

Sulla base dei seguenti calcoli, si sono sciolti 15,17 g di HBTU e 5,68 g di Oxima Pure in DMF in modo da ottenere una soluzione avente un volume totale di 80 mL. In particolare, per ottenere la massa di HBTU e di Oxima Pure si sono sostituiti i valori nell'eq. 18, ottenendo:

$$m_{HBTU} = 0,5 \frac{\text{mol}}{\text{L}} \times 0,08 \text{ L} \times 379,25 \frac{\text{g}}{\text{mol}} = 15,17 \text{ g}$$

$$m_{Oxima \text{ Pure}} = 0,5 \frac{\text{mol}}{\text{L}} \times 0,08 \text{ L} \times 142,1 \frac{\text{g}}{\text{mol}} = 5,68 \text{ g}$$

Si è quindi fatta ripartire la sintesi e, portati a termine i rimanenti 16 cicli, si è proceduto allo sblocco del peptide dalla resina secondo la procedura descritta al paragrafo 2.3.1 del Capitolo 2.

3.1.2 Purificazione del peptide EAbuK-IKVAV

Per valutare la quantità del prodotto grezzo ottenuto si è svolta un'analisi cromatografica analitica preliminare (Fig. 30). Per fare ciò, si è sciolto 1 mg di peptide in 1 mL di acqua MilliQ e si è filtrata la soluzione all'interno di una Eppendorf.

L'analisi HPLC analitica è stata svolta nelle seguenti condizioni:

- Colonna: Vydac C18 (5 μm , 300 Å, 4,6 \times 250 mm).
- Volume di iniezione: 100 μL .
- Flusso: 1 mL/min.
- Eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ.
- Eluente B: 0,05% TFA in acetonitrile.
- Gradiente: dallo 0% di B al 40% di B in 40 minuti.
- Lettura dell'assorbanza (λ) a 214 nm.

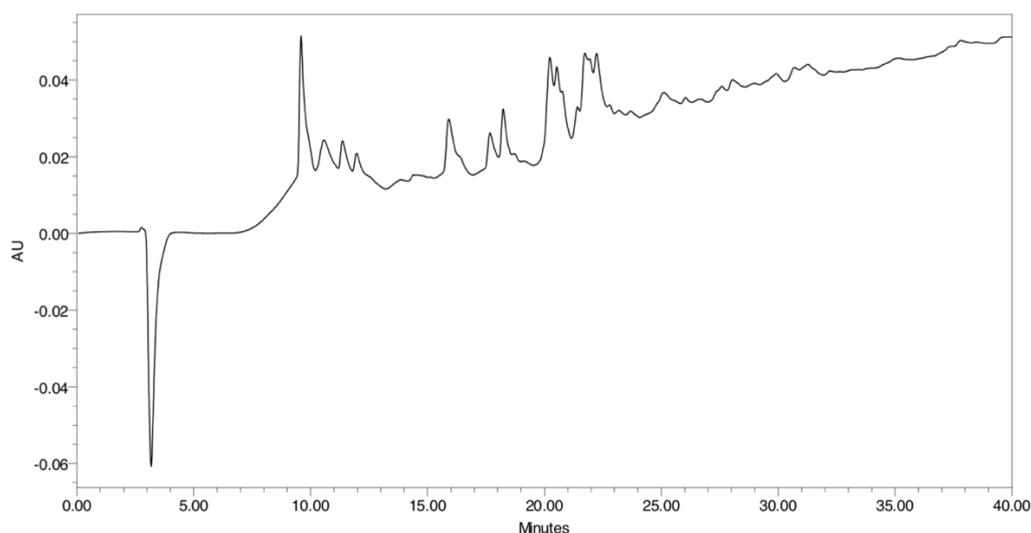


Figura 29: Cromatografia analitica del peptide EAbuK-IKVAV grezzo. Colonna: Vydac C18; volume di iniezione 100 μL ; flusso: 1 mL/min; eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B: 0,05% TFA in acetonitrile; gradiente: dallo 0% di B al 40% di B in 40 minuti; λ : 214 nm

A seguire, è stata condotta un'analisi cromatografica semipreparativa per separare il prodotto dalle impurezze (Fig. 31). Dunque, si sono sciolti 20 mg di peptide in 20 mL di acqua MilliQ e si è filtrata la soluzione in un becher.

L'analisi HPLC semipreparativa è stata eseguita nelle seguenti condizioni:

- Colonna: NovaPak C18 (6 μm , 60 \AA , 7,8 \times 300 mm).
- Flusso: 4 mL/min.
- Eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ.
- Eluente B: 0,05% TFA in acetonitrile.
- Gradiente: dal 5% di B al 25% di B in 40 minuti.
- Lettura dell'assorbanza (λ) a 214 nm.
- Velocità carta: 0,5 cm/min.

L'eluato è stato frazionato in diverse provette in base al tracciato cromatografico. In particolare, sono stati raccolti 3 pool:

1. Il primo che raccoglie le frazioni contenenti il picco in aspirazione
2. Il secondo che raccoglie la frazione contenente il primo picco successivo alla fine del gradiente (lavaggi)
3. Il terzo che raccoglie la frazione contenente il secondo picco successivo alla fine del gradiente (lavaggi)

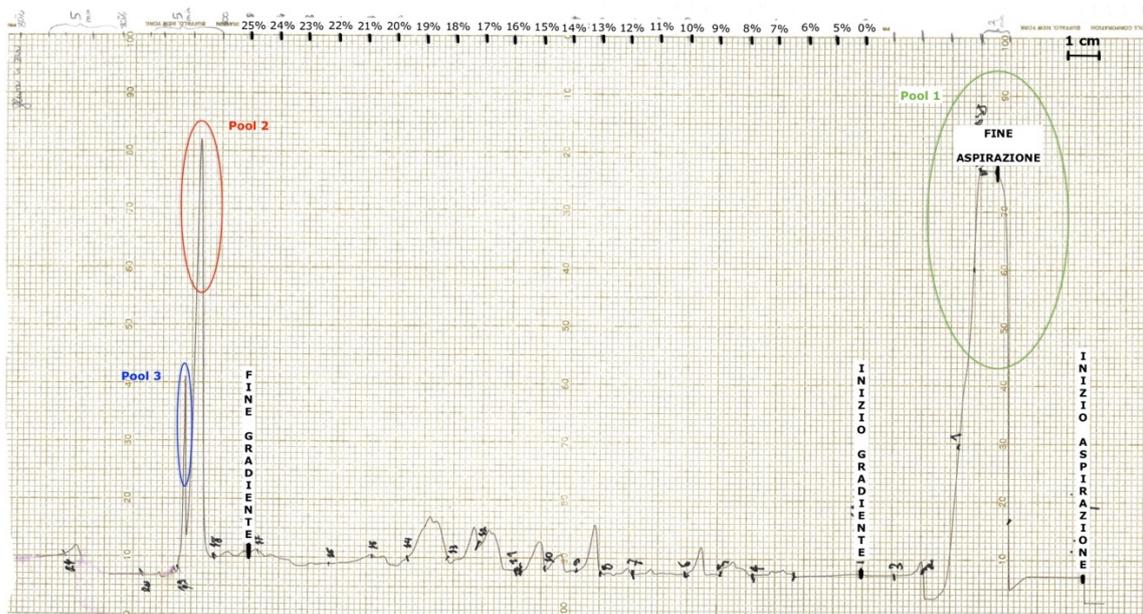


Figura 30: Cromatografia semipreparativa del peptide EAbuK-IKVAV grezzo. Colonna: NovaPak C18; flusso: 4 mL/min; eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B: 0,05% TFA in acetonitrile; gradiente: dal 5% di B al 25% di B in 40 minuti; λ : 214 nm; velocità carta: 0,5 cm/min

Nel corso degli anni si è osservato che la natura auto-aggregante di questo peptide non permette di determinare, tramite cromatografia analitica, il grado di omogeneità ottenuto in quanto il cromatogramma è caratterizzato dalla presenza di più picchi principali non corrispondenti necessariamente ad impurezze ma bensì alle diverse forme di auto-aggregazione del peptide.

Si è quindi deciso di eseguire un'analisi di massa di tali pool.

- Pool 1

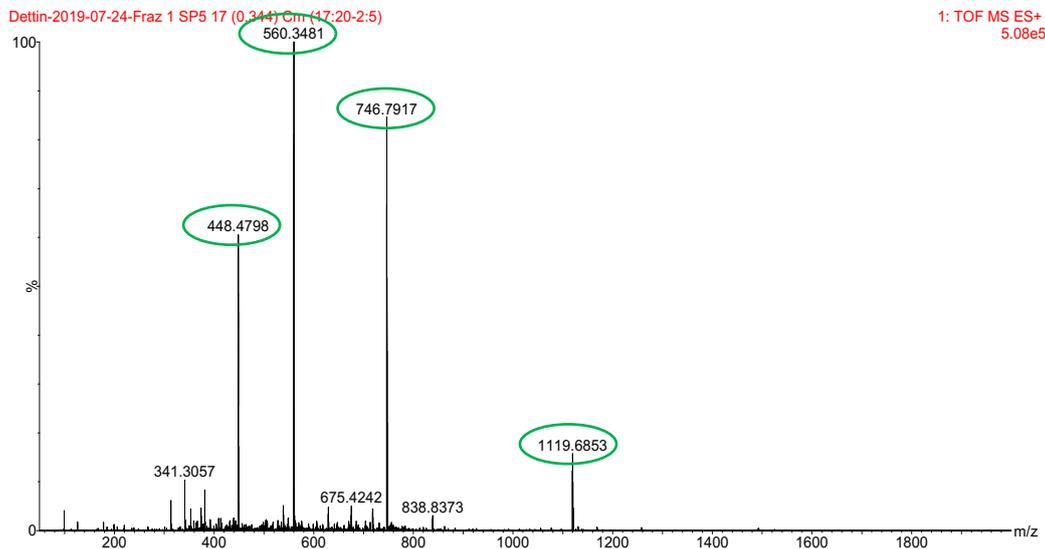


Figura 31: Spettro di massa (ESI) del peptide EAbuK-IKVAV, pool contenente le frazioni in aspirazione

- Pool 2

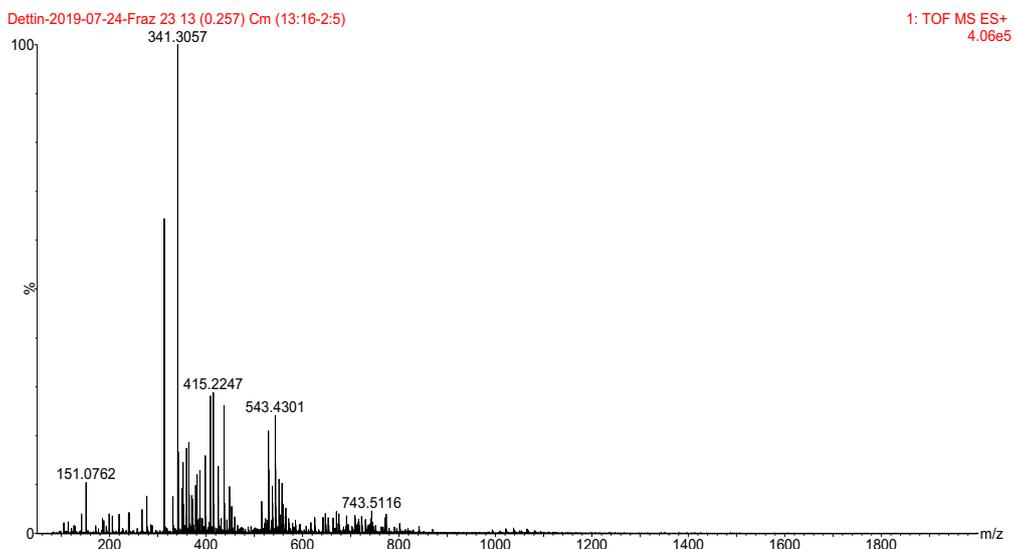


Figura 32: spettro di massa (ESI) del peptide EAbuK-IKVAV: pool contenente il secondo picco dopo la fine del gradiente (lavaggi)

- Pool 3

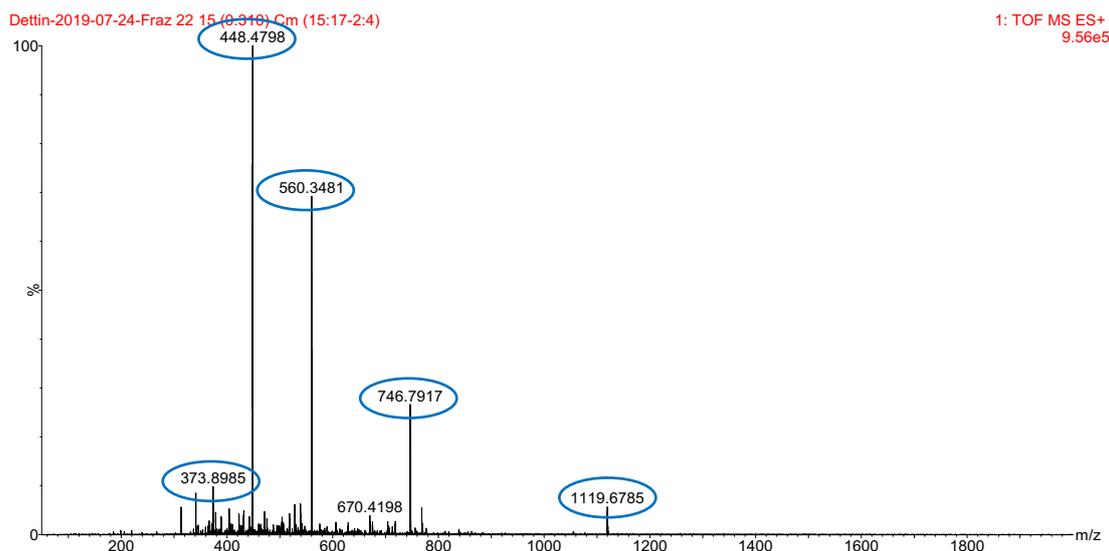


Figura 33: spettro di massa (ESI) del peptide EAbuK-IKVAV: pool contenente il primo picco dopo la fine del gradiente (lavaggi)

Per interpretare correttamente lo spettro è importante ricordare che i peptidi possono portare cariche multiple ed è possibile conoscere lo stato di carica di un peptide tramite dei calcoli di deconvoluzione: ossia, se il peptide porta una sola carica elettrica lo ione monocarica $(M+H)^+$ ha un rapporto m/z pari a $(M+H)/1$ mentre se lo ione ha due cariche $(M+2H)^{2+}$, il rapporto m/z sarà $(M+2H)/2$ e così via. Lo spettro di massa è ovviamente più complesso di quello che si avrebbe se il peptide avesse carica unitaria ma questa maggiore popolazione dello spettro di massa può essere semplificata valutando la corrispondenza fra i valori di M che derivano, applicando un semplice calcolo, da diversi valori m/z .

Nel caso in esame si ha:

- 2 cariche: $\frac{2238 + 2}{2} = 1120 \text{ Da}$
- 3 cariche: $\frac{2238 + 3}{3} = 747 \text{ Da}$
- 4 cariche: $\frac{2238 + 4}{4} = 560,5 \text{ Da}$
- 5 cariche: $\frac{2238 + 5}{5} = 448,6 \text{ Da}$
- 6 cariche: $\frac{2238 + 6}{6} = 374 \text{ Da}$

Dunque, dalle analisi di massa è stato possibile identificare nel primo e nel terzo pool il peptide EAbuK-IKVAV senza impurezze degne di nota. In particolare, si sono ricavati:

- 12 mg di peptide purificato dal primo pool,

- 0,5 mg di peptide purificato dal terzo pool.

In base allo stesso procedimento e agli stessi principi di purificazione, sono state eseguite altre 5 semipreparative caricando aliquote dai 10 ai 40 mg ciascuna. Tutti i pool di nostro interesse sono stati quindi liofilizzati e utilizzati per l'arricchimento degli *scaffolds* a base di acido ialuronico e a base di chitosano.

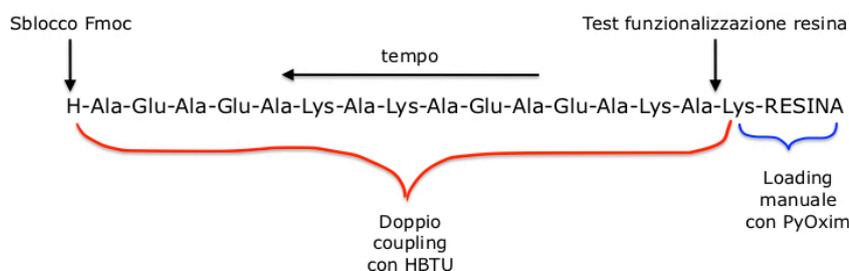
3.1.3 Sintesi del peptide EAK

- $PM = 1615 Da$
- Sequenza:

H-Ala-Glu-Ala-Glu-Ala-Lys-Ala-Lys-Ala-Glu-Ala-Glu-Ala-Lys-Ala-Lys-NH₂

Questo peptide appartiene alla classe dei peptidi auto-assemblanti denominati “Lego molecolari”. Diversamente dal caso precedente, nessun motivo adesivo è stato legato covalentemente alla catena peptidica.

Si è sintetizzato questo peptide mediante il processo di sintesi su fase solida, adottando una chimica Fmoc e seguendo il seguente schema di sintesi:



L'aggancio del primo amminoacido alla resina (*loading*) viene eseguito manualmente, mentre i restanti *coupling* sono stati effettuati tramite il sintetizzatore automatico Syro I.

Innanzitutto, si è preparata la seguente soluzione di sintesi:

- Soluzione 40% v/v di Piperidina in DMF

Tenendo in considerazione il numero di gruppi protettori da deproteggere è stato stimato un quantitativo di soluzione da caricare all'interno del sintetizzatore pari a 100 mL. In modo analogo alla sintesi precedente, si sono miscelati 40 mL di Piperidina e 60 mL di DMF all'interno di un cilindro graduato e, successivamente, si è trasferita la soluzione all'interno dell'apposito bottiglione da collegare al sintetizzatore.

A seguire, si è proceduto a pesare e rigonfiare (*swelling*) la resina:

○ Resina e rigonfiamento

Come supporto solido, sul quale far crescere il peptide, si è utilizzata la *Rink Amide MBHA resin*. Volendo ottenere 0,125 mmol di peptide e conoscendo la sostituzione della resina, si è ricavato il quantitativo di resina da impiegare (per i calcoli si faccia riferimento all'eq. 14). Si sono dunque pesati 240 mg di resina all'interno del reattore e si è proceduto con il rigonfiamento trattando la resina con 3 mL di DMF per 5 minuti: 10 secondi di agitazione vortex seguiti da 20 secondi di riposo, il tutto per 10 volte. Si è filtrato e, secondo le modalità descritte al paragrafo 2,3,1 del Capitolo 2, si è avviata la procedura automatizzata di deprotezione del gruppo Fmoc dalla resina.

Si è quindi proceduto ad effettuare il *loading* manuale della resina:

○ Loading della resina

Volendo utilizzare 10 equivalenti di Lisina, 10 equivalenti di PyOxim e 20 equivalenti di DIPEA, sono stati svolti i seguenti calcoli sfruttando l'eq 15 e 16.

$$m_{Lis} = 468,54 \frac{g}{mol} \times 0,125 \text{ mmol} \times 10 = 0,586 \text{ g}$$

$$m_{PyOxim} = 527,38 \frac{g}{mol} \times 0,125 \text{ mmol} \times 10 = 0,659 \text{ g}$$

$$Vol_{DIPEA} = \frac{129,25 \frac{g}{mol} \times 0,125 \text{ mmol} \times 10}{0,742 \frac{g}{cm^3}} = 0,435 \text{ mL}$$

Dunque, 0,586 g di Lisina, 0,659 g di PyOxim e 0,435 mL di DIPEA sono stati sciolti e miscelati in 5 mL di DMF. Il reattore contenente la resina è stato trattato con questa soluzione per 45 minuti: 10 secondi di agitazione vortex ogni 5 minuti. A seguire, si sono eseguiti nell'ordine:

- 4 lavaggi con DMF,
- 2 lavaggi con DCM,
- 2 lavaggi con metanolo.

Ciascun lavaggio ha impiegato 4 mL di solvente, agitando per 10 secondi, lasciando riposare per 20 secondi e infine filtrando.

Come indicato nello schema di sintesi, dopo il *loading* si è effettuato il test di funzionalizzazione della resina secondo la procedura descritta al paragrafo 2.3.1 del Capitolo 2.

○ Test di funzionalizzazione della resina

Si riportano i calcoli eseguiti e i risultati ottenuti:

$$S_{sp} = \frac{0,37 \times 50 \text{ mL}}{7800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} \times 0,0057 \text{ mg}} = 0,416$$

$$S_t = \frac{1000}{1923 \frac{\text{g}}{\text{mol}} + 450,5 \frac{\text{g}}{\text{mol}}} = 0,421$$

$$\text{Resa} = \frac{0,416}{0,421} = 98,8\%$$

Avendo ottenuto una resa superiore al 98%, il test di funzionalizzazione della resina può essere considerato superato con successo. Si è quindi proceduto con la sintesi preparando le seguenti soluzioni:

○ Soluzione 2M DIPEA in NMP

Tenendo in considerazione il numero di equivalenti di DIPEA (in questo caso 10) da utilizzare e del numero di *coupling*, è stato stimato un quantitativo di soluzione da caricare all'interno del sintetizzatore pari a 50 mL. In modo analogo alla sintesi precedente, si sono miscelati 17,4 mL di DIPEA e 32,6 mL di NMP all'interno di un cilindro graduato e, successivamente, si è trasferita la soluzione all'interno dell'apposito bottiglione da inserire all'interno del sintetizzatore.

○ Soluzioni 0,62 M Fmoc-amminoacido in DMF

Tenendo in considerazione il numero di equivalenti di Fmoc-amminoacido da utilizzare (in questo caso 5) e del numero di volte che ciascun AA compare in catena, è stato stimato un quantitativo di soluzione, diverso per ogni AA, da caricare all'interno del sintetizzatore.

○ Soluzione 0,5 M HBTU/Oxima Pure in DMF

Tenendo in considerazione il numero di equivalenti di HBTU e Oxima Pure (in questo caso 5) da utilizzare e del numero di *coupling*, è stato stimato un quantitativo di soluzione da caricare all'interno del sintetizzatore pari a 100 mL.

Sulla base dei seguenti calcoli, si sono sciolti all'interno di un cilindro graduato 18,96 g di HBTU e 5,68 g di Oxima Pure in DMF in modo da ottenere una soluzione avente un volume totale di 100 mL. In particolare, per ottenere la massa di HBTU e di Oxima Pure si sono sostituiti i valori nell'eq. 18, ottenendo:

$$m_{HBTU} = 0,5 \frac{\text{mol}}{\text{L}} \times 0,1 \text{ L} \times 379,25 \frac{\text{g}}{\text{mol}} = 18,96 \text{ g}$$

$$m_{Oxima \text{ Pure}} = 0,5 \frac{\text{mol}}{\text{L}} \times 0,1 \text{ L} \times 142,1 \frac{\text{g}}{\text{mol}} = 7,1 \text{ g}$$

La soluzione è stata dunque trasferita nell'apposito bottiglione da collegare al sintetizzatore e si è fatta partire la sintesi.

Portati a termine i rimanenti 15 cicli, si è proceduto allo sblocco del peptide dalla resina secondo la procedura descritta al paragrafo 2.3.1 del Capitolo 2.

3.1.4 Purificazione del peptide EAK

Per valutare la le composizioni del prodotto grezzo ottenuto si è svolta un'analisi cromatografica analitica preliminare (Fig. 34). Per fare ciò si è sciolto 1 mg di peptide in 1 mL di acqua MilliQ e si è filtrata la soluzione all'interno di una Eppendorf.

L'analisi HPLC analitica è stata svolta nelle seguenti condizioni:

- Colonna: Vydac C18 (5 μm , 300 \AA , 4,6 \times 250 mm).
- Volume di iniezione: 100 μL .
- Flusso: 1 mL/min.
- Eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ.
- Eluente B: 0,05% TFA in acetonitrile.
- Gradiente: dallo 0% di B al 20% di B in 20 minuti.
- Lettura dell'assorbanza (λ) a 214 nm.

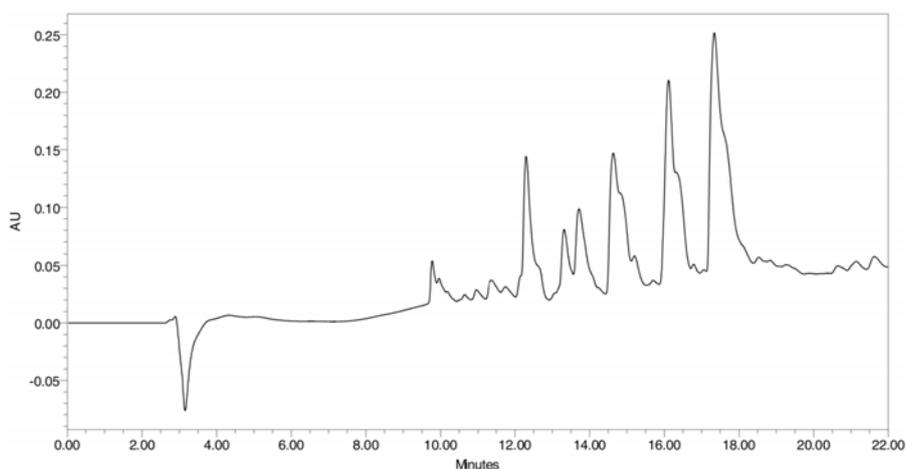


Figura 34: Cromatografia analitica del peptide EAbuK-IKVAV grezzo. Colonna: Vydac C18; volume di iniezione 100 μL ; flusso: 1 mL/min; eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B: 0,05% TFA in acetonitrile; gradiente: dallo 0% di B al 20% di B in 20 minuti; λ : 214 nm

A seguire, è stata condotta un'analisi cromatografica semipreparativa per separare il prodotto dalle impurezze (Fig. 35). Dunque, si sono sciolti 40 mg di peptide in 40 mL di acqua MilliQ e si è filtrata la soluzione in un becher.

L'analisi HPLC semipreparativa è stata eseguita nelle seguenti condizioni:

- Colonna: NovaPak C18 (6 μm , 60 \AA , 7,8 \times 300 mm).
- Flusso: 4 mL/min.
- Eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ.
- Eluente B: 0,05% TFA in acetonitrile.
- Gradiente: dallo 0% di B al 20% di B in 40 minuti.
- Lettura dell'assorbanza (λ) a 214 nm.
- Velocità carta: 0,5 cm/min.

L'eluato è stato frazionato in diverse provette in base al tracciato cromatografico. In particolare, sono stati raccolti 4 pool:

1. Il primo che raccoglie le frazioni contenenti il picco in aspirazione;
2. Il secondo che raccoglie le frazioni contenente l'eluato dal 7% al 14% di B;
3. Il terzo che raccoglie la frazione contenente l'eluato dal 14% al 20% di B;
4. Il quarto che raccoglie le frazioni contenenti i lavaggi.

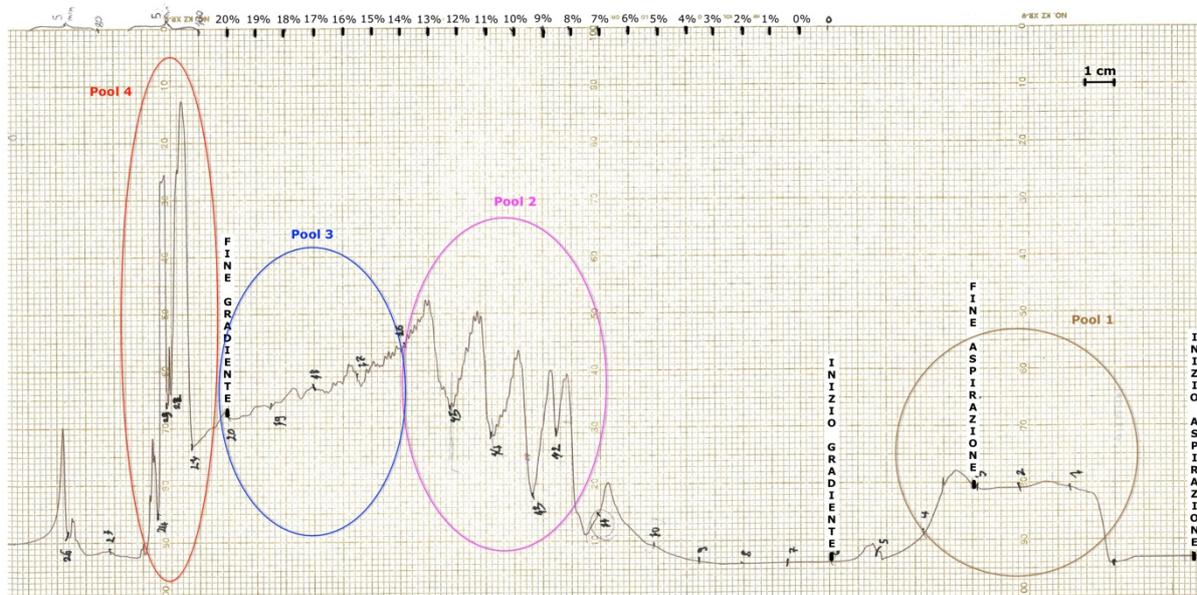


Figura 35: Cromatografia semipreparativa del peptide EAK grezzo. Colonna: NovaPak C18; flusso: 4 mL/min; eluente A: 0,05% TFA in H₂O MilliQ; eluente B: 0,05% TFA in acetonitrile; gradiente: dallo 0% di B al 20% di B in 40 minuti; λ : 214 nm; velocità carta: 0,5 cm/min

Per le stesse motivazioni addotte per il peptide EAbuK-IKVAV, anche per il peptide EAK si è deciso di eseguire un'analisi di massa di tali pool.

- Pool 1:

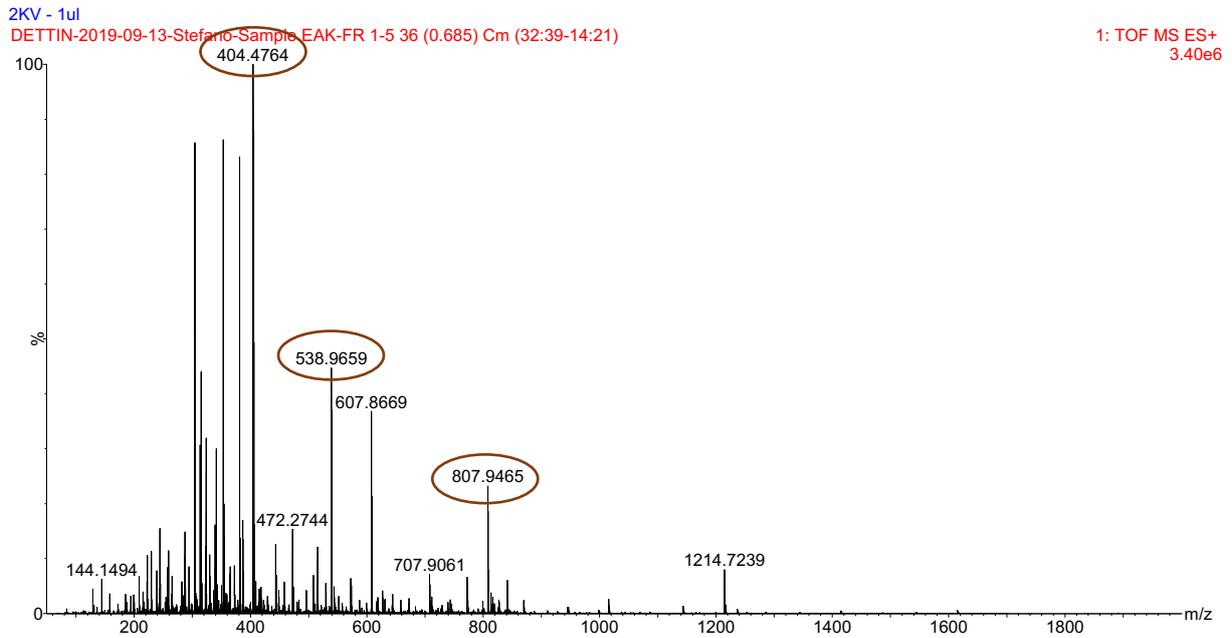


Figura 36: spettro di massa (ESI) del peptide EAK: pool contenente le frazioni in aspirazione

- Pool 2

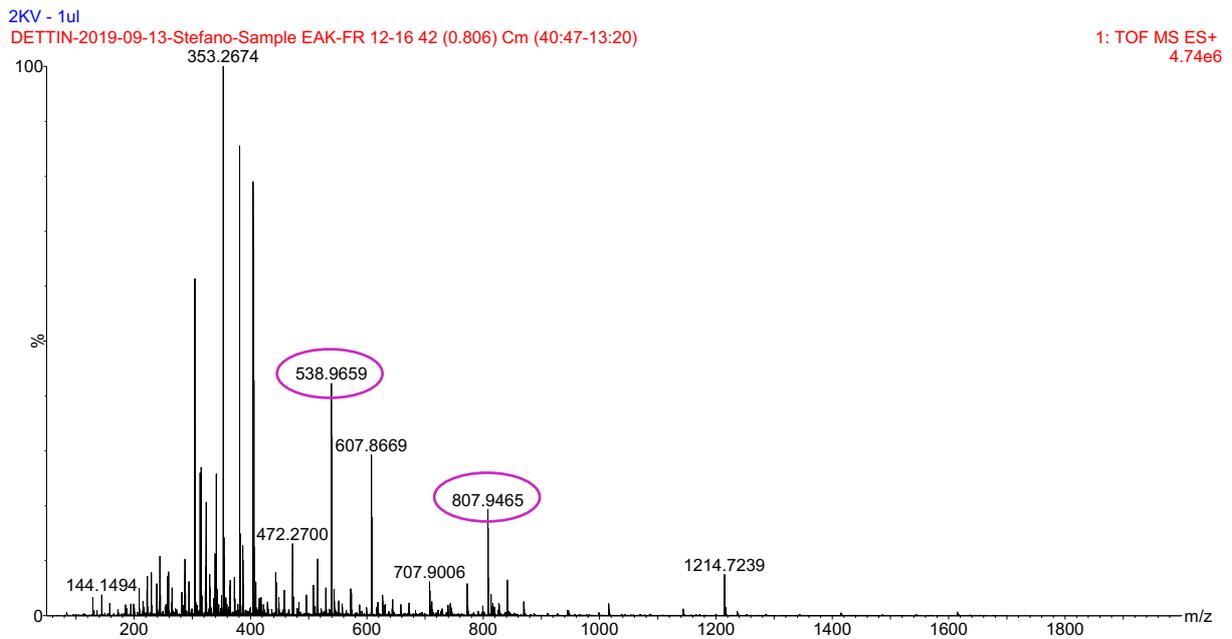


Figura 37: spettro di massa (ESI) del peptide EAK: pool contenente l'eluato dal 7% al 14% di B

- Pool 3

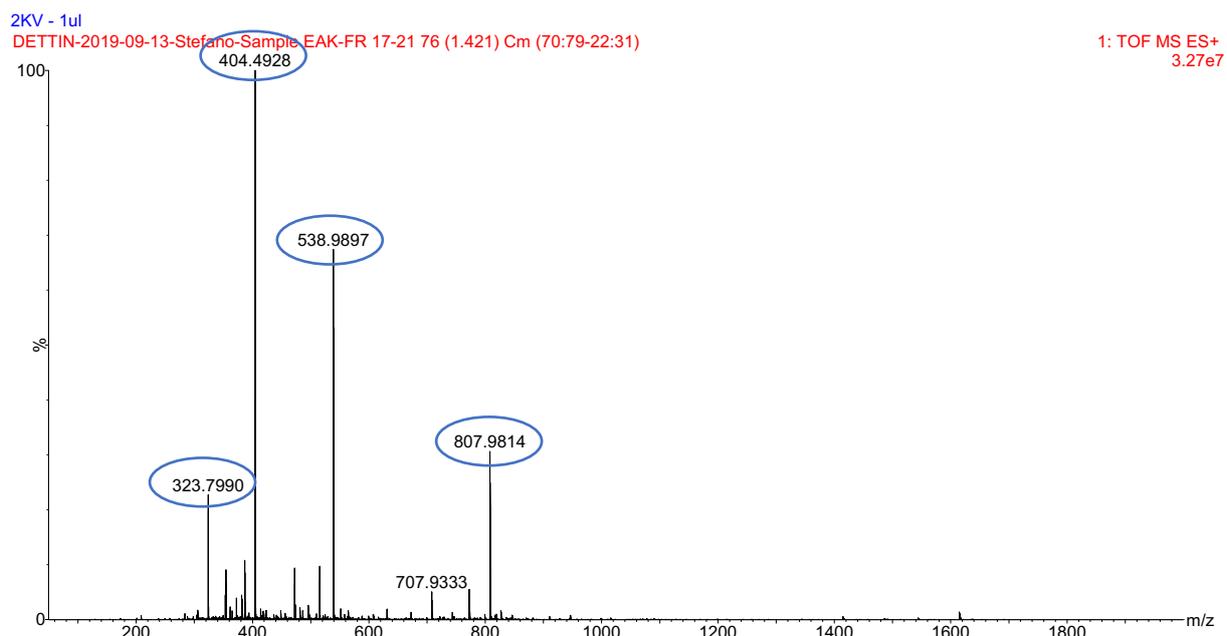


Figura 38: Spettro di massa (ESI) del peptide EAK: pool contenente l'eluato dal 14% al 20% di B

- Pool 4

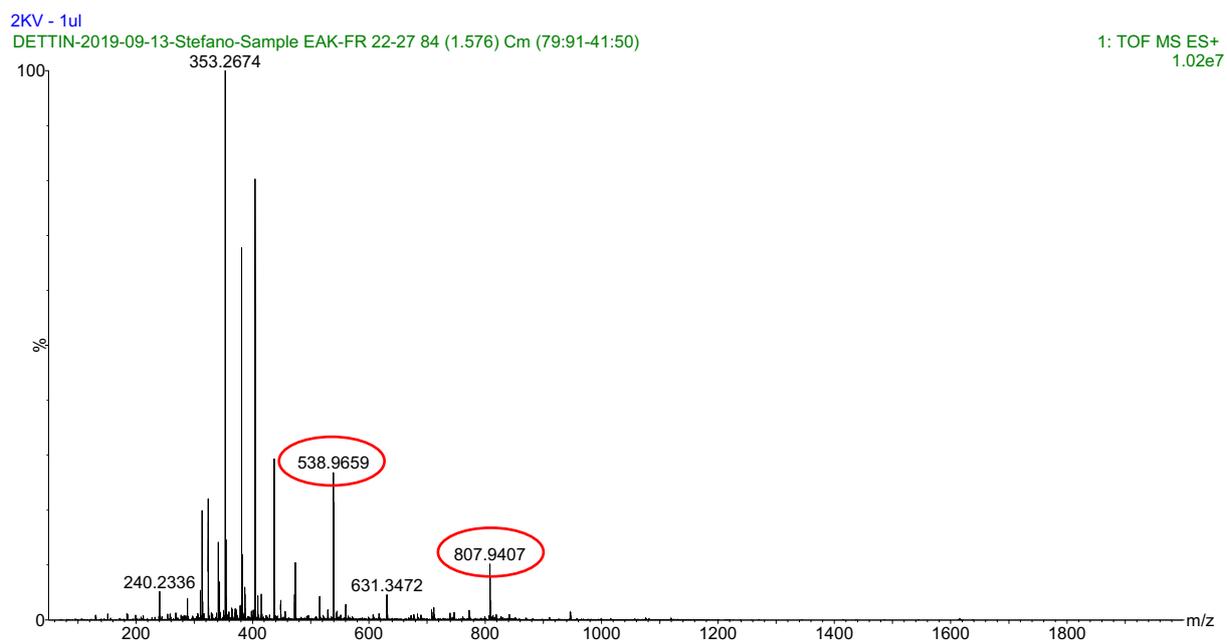


Figura 39: spettro di massa (ESI) del peptide EAK: pool contenente i lavaggi

Come prima, applicando un semplice calcolo, si valuta la corrispondenza fra i valori di M che derivano da diversi valori m/z.

Nel caso in esame si ha:

- 2 cariche: $\frac{1615+2}{2} = 808 \text{ Da}$
- 3 cariche: $\frac{1615+3}{3} = 539 \text{ Da}$
- 4 cariche: $\frac{1615+4}{4} = 404 \text{ Da}$
- 5 cariche: $\frac{1615+5}{5} = 324 \text{ Da}$

Dunque, dalle analisi di massa è stato possibile identificare nel terzo pool il peptide EAK senza impurezze degne di nota. In particolare, si sono ottenuti 10 mg di peptide purificato dal terzo pool.

In base allo stesso procedimento e agli stessi principi di purificazione, sono state eseguite altre 4 semipreparative caricando aliquote dai 35 ai 40 mg ciascuna. Tutti i pool di nostro interesse sono stati quindi liofilizzati e utilizzati per l'arricchimento degli *scaffolds* a base di acido ialuronico.

3.2 Realizzazione delle matrici

3.2.1 Matrici a base di acido ialuronico

Per la realizzazione degli *scaffold*, si è dapprima sciolto il peptide in acqua MilliQ sotto agitazione magnetica in un becher, poi si è addizionato poco per volta l'acido ialuronico ottenendo una soluzione viscosa omogenea. Per tutti gli *scaffold* si è rispettata la seguente ricetta: 300 mg di HA per 23,8 ml di acqua MilliQ; invece, il quantitativo di peptide utilizzato è stato di:

- 15 mg per gli *scaffold* aventi il 5% in peso di peptide rispetto all'HA
- 7,5 mg per gli *scaffold* aventi il 2,5% in peso di peptide rispetto all'HA
- 30 mg per gli *scaffold* aventi il 10% in peso di peptide rispetto all'HA

Con i quantitativi sopra riportati si sono riempiti 36 pozzetti da 15,5 mm di diametro ponendo 500 mg di soluzione per ogni pozzetto. Gli *scaffolds* sono stati quindi ghiacciati in azoto liquido e messi a liofilizzare.

Per reticolare si è utilizzata una soluzione 60 mM di EDC in 95% di etanolo lasciando reagire per 24 ore a temperatura ambiente.

In particolare, per 36 pozzetti si sono utilizzati 191,7 mg di EDC in 20 mL di etanolo, versando 500 μL di soluzione di reticolazione in ogni pozzetto e coprendo quest'ultimi con del parafilm per evitare l'evaporazione dell'etanolo durante il tempo di reazione.

Si è proceduto dunque con i lavaggi per rimuovere i residui di reazione. Per far ciò ciascun pozzetto è stato trattato con 3 mL di etanolo, si è sonicato per un minuto, si è lasciato riposare per due minuti e infine si è rimosso il liquido dal pozzetto. Questa operazione è stata ripetuta per tre volte con etanolo e per tre volte con acqua MilliQ. Le matrici sono state dunque ghiacciate in ghiaccio secco e messe a liofilizzare.

3.2.2 Matrici a base di chitosano

Per la realizzazione degli *scaffold*, si è dapprima sciolto il peptide una soluzione 0,2 M di acido acetico sotto agitazione magnetica, poi si è addizionato poco per volta il chitosano. Per tutti gli *scaffolds* si sono rispettate le seguenti proporzioni: 0,42 mg di peptide (13% in peso rispetto al chitosano) e 3,15 mg di chitosano in 472 μ L di soluzione 0,2 M di acido acetico.

Con i quantitativi sopra riportati si è riempito un pozzetto da 15,5 mm di diametro con 375 mg di soluzione. Lo *scaffold* è stato quindi ghiacciato con ghiaccio secco e messo a liofilizzare.

A seguire, si è proceduto con i lavaggi: per far ciò si è trattato il pozzetto con 3 mL di etanolo, si è sonicato per un minuto, si è lasciato riposare per due minuti e infine si è rimosso il liquido dal pozzetto. Questa operazione è stata ripetuta per tre volte con etanolo e per tre volte con tampone sodio-fosfato (PBS 10X). Lo *scaffold* è stato dunque ghiacciato in ghiaccio secco e messo a liofilizzare.

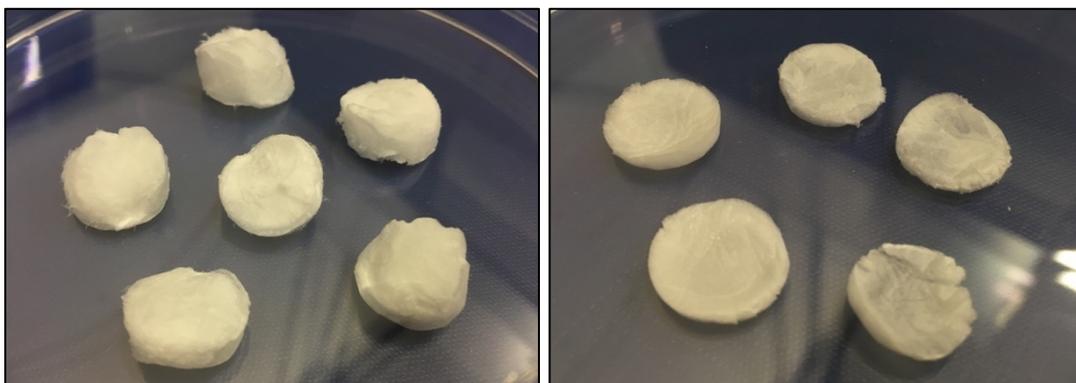


Figura 40: Matrici di acido ialuronico reticolato arricchite con peptidi auto-assemblanti (a sinistra); Matrici di chitosano arricchite con peptidi auto-assemblanti (a destra)

Capitolo 4

4 Risultati e discussione

Si riportano i risultati e la discussione relativa ai saggi biologici e ai test reologici.

4.1 Saggi Biologici

4.1.1 Colture su *scaffolds* a base di HA

La vitalità cellulare della linea cellulare tumorale epiteliale HCC1954, derivata dall'adenocarcinoma mammario, nei diversi *scaffolds* a base di HA arricchiti con peptidi è stata valutata mediante saggio PrestoBlue™. I risultati a 1,3 e 7 giorni sono riportati in Fig. 41.

Come atteso, la proliferazione cellulare è stata significativamente maggiore nelle colture cresciute su plastica, utilizzate come controllo. Tuttavia, tutti gli *scaffolds* sono in grado di sostenere la proliferazione cellulare, con un incremento della vitalità cellulare da 1 a 3 giorni e una successiva diminuzione a 7 giorni, eccezion fatta per le colture su *scaffolds* arricchiti con EAbuK-IKVAV 5% wt/wt nelle quali si registra un aumento piccolo ma progressivo della fluorescenza. I risultati insoddisfacenti a 7 giorni possono essere conseguenti all'impossibilità di sostituire completamente il terreno di coltura durante il periodo della sperimentazione. Infatti, gli *scaffold* formano gel non aderenti al fondo del pozzetto e sono facilmente rimovibili insieme al terreno di coltura. Di conseguenza, quest'ultimo non è stato sostituito a giorni alterni, ma sono state solo aggiunte aliquote pari 200 μ L. Quindi, il mezzo di coltura non è stato solo carente di nutrienti, ma ha anche contenuto i prodotti del catabolismo cellulare che possono limitare la crescita cellulare.

Tenendo fermo come *time point* di confronto la vitalità a 3 giorni, è possibile osservare che:

- gli *scaffolds* arricchiti con EAbuK-IKVAV inducono effetti diversi in funzione della concentrazione di peptide utilizzata. In particolare, gli *scaffolds* contenenti il 2,5% wt/wt e il 10% wt/wt di peptide sostengono la proliferazione in modo più efficace rispetto agli *scaffolds* contenenti il 5% wt/wt di peptide.
- Utilizzando la stessa concentrazione di peptide (5% wt/wt) ma sostituendo la sequenza adesiva IKVAV con quella RGD, si registra una vitalità cellulare maggiore negli *scaffolds* contenenti il motivo adesivo della fibronectina rispetto a quelli contenenti la sequenza adesiva della laminina.

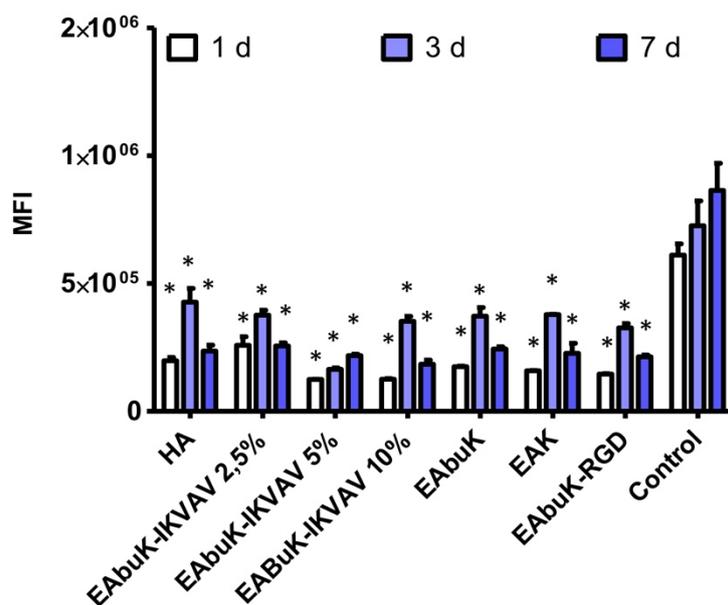


Figura 41: Vitalità cellulare a differenti intervalli di tempo. MFI: intensità media di fluorescenza. * $p < 0.05$ vs corrispondenti colture di controllo

- Le colture su *scaffolds* arricchiti con il peptide EAbuK 5% wt/wt presentano una proliferazione superiore rispetto agli *scaffolds* arricchiti con EAbuK-IKVAV 5% wt/wt. Questo potrebbe suggerire che la struttura nanofibrosa dei peptidi auto-assemblanti sia più importante della sequenza adesiva per sostenere la proliferazione cellulare.
- Infine, sostituendo la sequenza auto-assemblante EAbuK 5% wt/wt con EAK 5% wt/wt, la vitalità cellulare rimane paragonabile.

L'analisi morfologica delle colture su *scaffolds* a base di HA a 3 giorni dalla semina è stata effettuata tramite microscopio ottico a contrasto di fase (Fig. 42). È possibile osservare che:

- rispetto alle colture di controllo in adesione, nelle quali si osserva la formazione di un monostrato semiconfluente di cellule, in tutti gli *scaffolds* si nota la presenza di aggregati cellulari sotto forma di sferoidi.
- Nel caso degli *scaffolds* a base di solo HA, queste strutture sono in numero e dimensione limitata.
- L'arricchimento degli *scaffolds* con la sequenza auto-assemblante EAbuK induce un lieve aumento del numero di sferoidi, mantenendo il loro diametro pressoché invariato. Inoltre, in queste colture si nota la presenza di una componente extracellulare sia fibrosa che amorfa.
- L'inserimento della sequenza adesiva RGD comporta un aumento della dimensione degli sferoidi senza apportare grandi cambiamenti in termini di numerosità di tali aggregati rispetto agli *scaffolds* arricchiti con solo EAbuK.

- L'effetto della sequenza adesiva IKVAV sembra essere dose-dipendente. Infatti, l'aumento della concentrazione del peptide si accompagna ad un incremento sia del numero sia delle dimensioni degli sferoidi. Anche in queste colture, è possibile notare una componente extracellulare.
- Infine, sostituendo la sequenza auto-assemblante EAbuK con EAK, si registra un aumento del numero di sferoidi e della componente extracellulare.

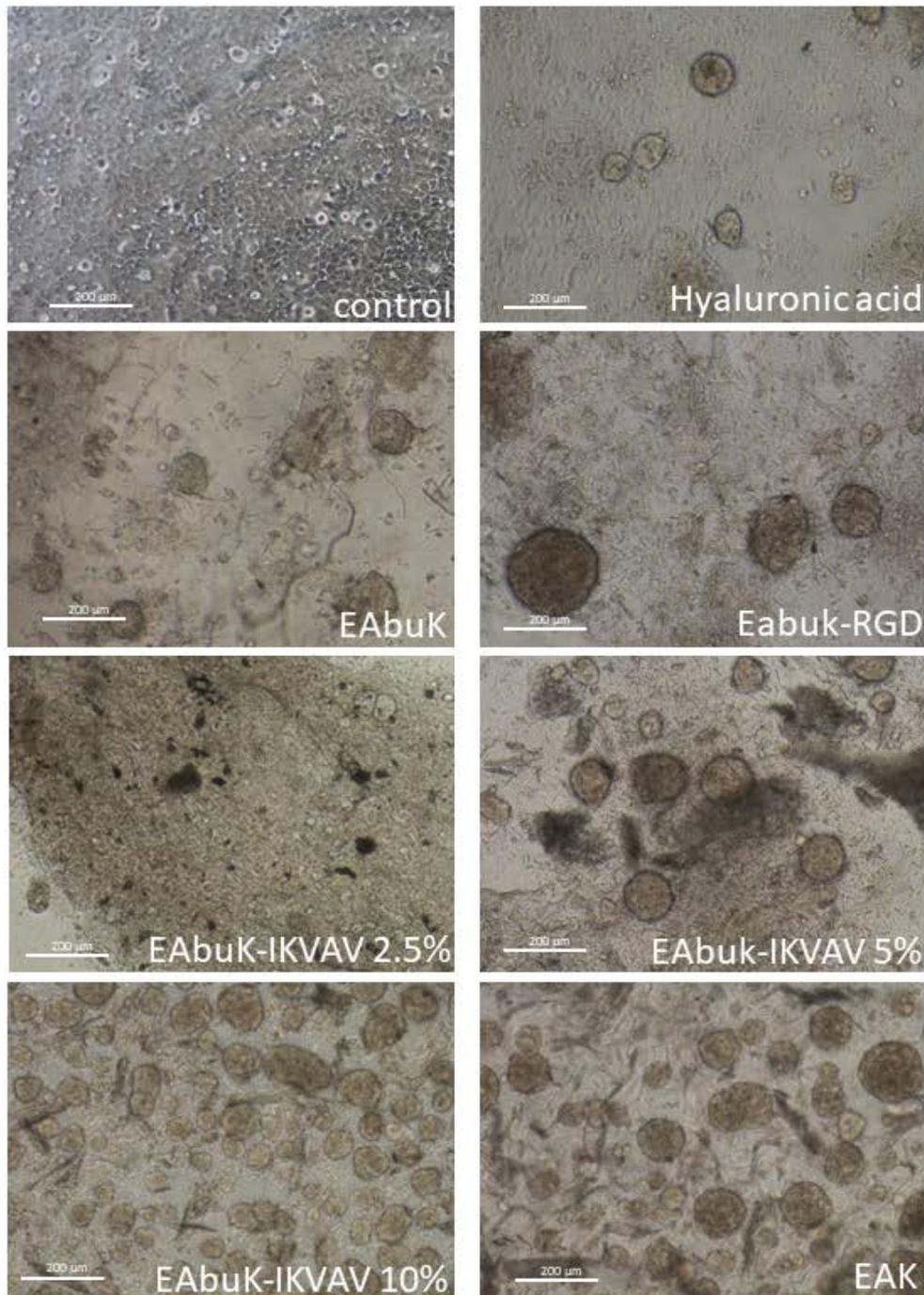


Figura 42: Microscopia ottica a contrasto di fase di colture a 3 giorni dalla semina. Bar: 200 µm.

In accordo con i risultati dei saggi di vitalità cellulare, l'analisi morfologica a 7 giorni dalla semina ha evidenziato una forte diminuzione della componente cellulare, con un aumento di quella extracellulare nelle colture su EAK e su EAbuK-IKVAV al 5% e al 10% (Fig. 43).

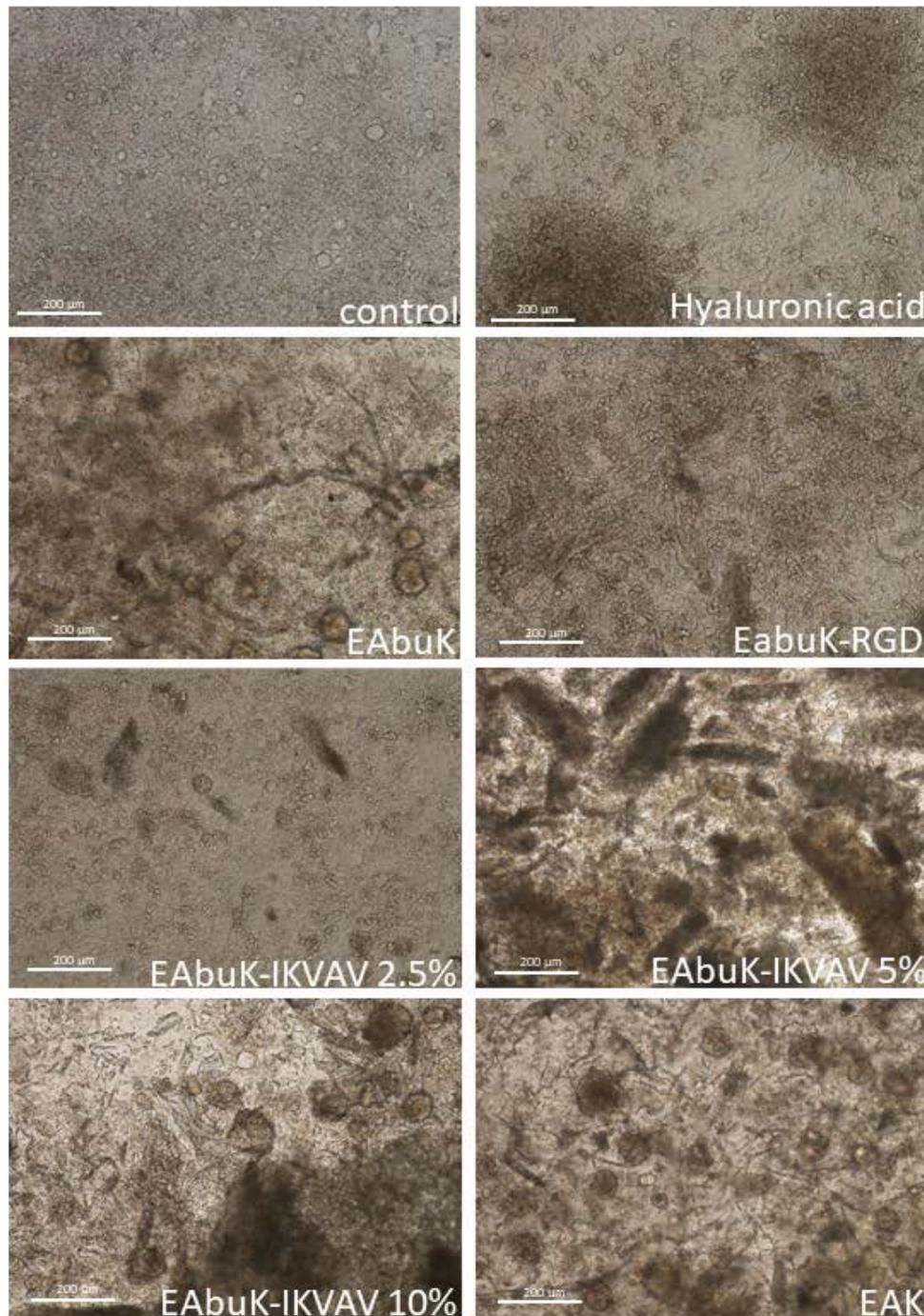


Figura 43: Microscopia ottica a contrasto di fase di colture a 7 giorni dalla semina. Bar: 200 µm.

A 3 giorni dalla semina, la produzione di collagene è stata verificata tramite colorazione tricromica di Masson (Fig. 44). Tutte le colture (anche se in gradi diversi) presentano delle aree colorate in blu, indicanti la presenza di collagene. In particolare:

- nelle colture su *scaffolds* a base di solo HA, il collagene si organizza a formare filamenti sottili soprattutto in prossimità degli sferoidi.
- Un aumento della componente filamentosa in termini sia di densità che di spessore viene evidenziata nelle colture su *scaffolds* arricchiti con il peptide auto-assemblante EAbuK.
- L'inserimento della sequenza adesiva IKVAV si traduce in un incremento della produzione di collagene, specialmente quando la concentrazione del peptide è pari al 2,5% wt/wt dove, però, non si rileva la formazione di fibre, che sono invece presenti quando la concentrazione della sequenza adesiva è pari al 5% wt/wt.
- Le colture su *scaffolds* arricchiti con il peptide auto-assemblante EAK sono caratterizzate da una fitta rete di fibre.

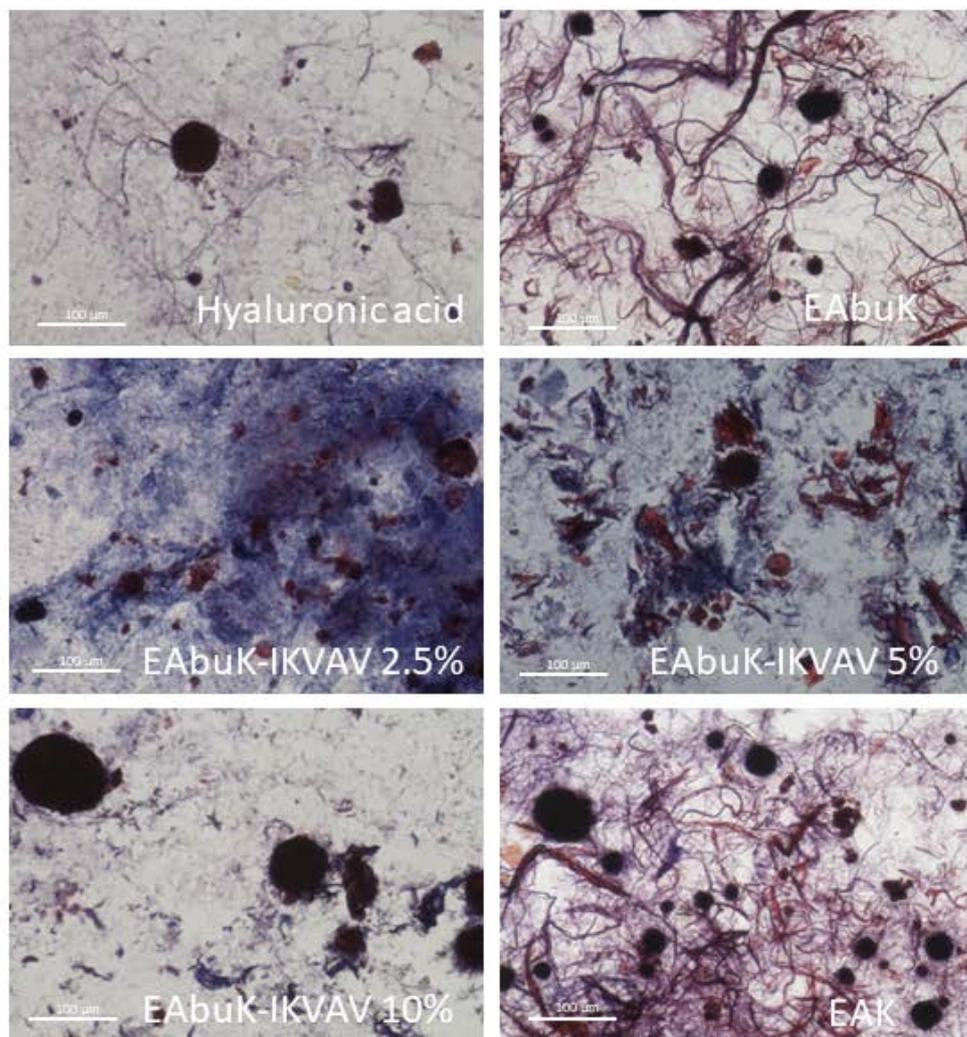


Figura 44: Microscopia ottica di colture a 3 giorni dalla semina colorate con Masson tricromica che evidenzia le fibre collagene in blue e il citoplasma in rosso. Bar: 100 µm.

4.1.2 Colture su *scaffolds* a base di chitosano

Sebbene la proliferazione cellulare sia minore nelle colture su *scaffolds* a base di chitosano rispetto a quelle di controllo, la vitalità cellulare aumenta progressivamente con il tempo di coltura (Fig. 45). Gli *scaffolds* a base di chitosano mantengono, infatti, una consistenza tale da renderli molto più maneggevoli rispetto agli *scaffolds* a base di HA. In particolare, risulta possibile rimuovere completamente il terreno a giorni alterni e sostituirlo con terreno fresco che favorisca la crescita cellulare. A 3 e 7 giorni dalla semina, l'arricchimento con la sequenza adesiva IKVAV aumenta in modo significativo la crescita cellulare rispetto al solo chitosano.

L'analisi morfologica al microscopio ottico a contrasto di fase ha evidenziato in entrambe le colture la formazione di sferoidi già a 3 giorni dalla semina (Fig. 46). Queste strutture sono più numerose e presentano dimensioni maggiori nelle colture cresciute sugli *scaffolds* arricchiti con il peptide auto-assemblante EAbuK-IKVAV rispetto a quelle coltivate sugli *scaffolds* a base di solo chitosano.

Queste osservazioni sono state confermate dall'analisi al SEM (Fig. 47). La superficie di entrambe le tipologie di colture appare rivestita di un monostrato confluyente a partire da 3 giorni dalla semina, intervallato in alcuni punti dalla presenza di formazioni sferoidali. Queste ultime sono presenti anche all'interno dello *scaffold*, come evidenziato dall'analisi istologica effettuata con colorazione HE (Fig. 48), e appaiono più numerose nelle colture arricchite con IKVAV. Inoltre, si evidenzia in questi ultimi *scaffolds* una struttura maggiormente compatta rispetto a quelli formati da solo chitosano.

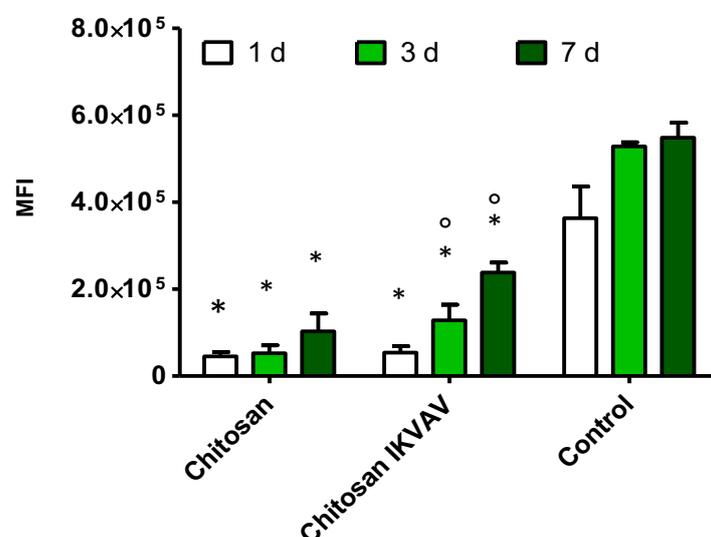


Figura 45: Vitalità cellulare a differenti intervalli di tempo. MFI: intensità media di fluorescenza. * $p < 0.05$ vs corrispondenti colture di controllo, ° $p < 0.05$ vs corrispondenti colture su chitosano.

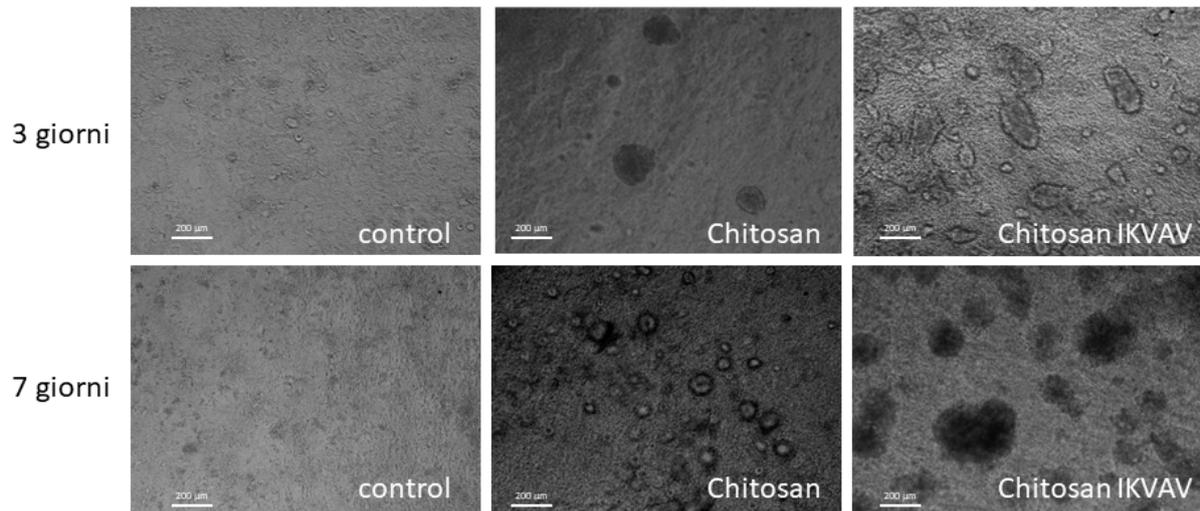


Figura 46: Microscopia ottica a contrasto di fase di colture a 3 e 7 giorni dalla semina. Bar: 200 µm.

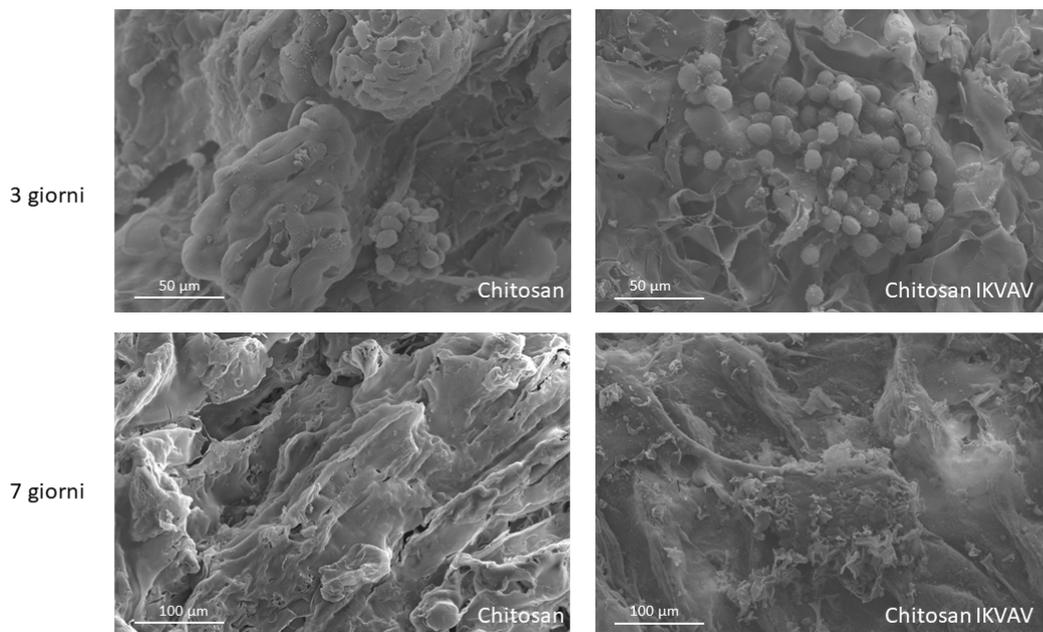


Figura 47: Microscopia elettronica a scansione (SEM) di colture a 3 e a 7 giorni dalla semina. Bar: 50 µm e 100 µm, rispettivamente.

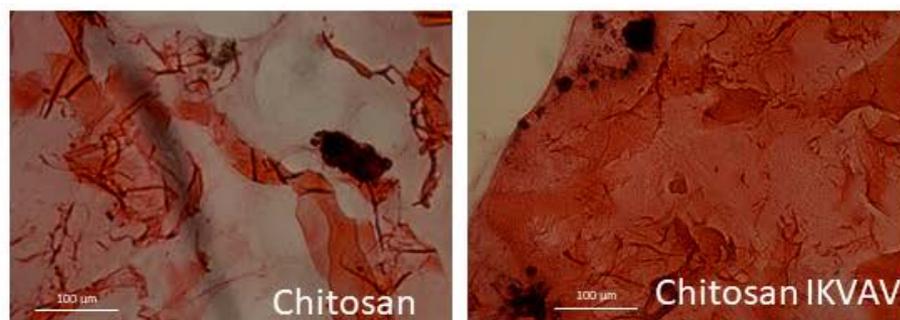


Figura 48: Microscopia ottica di colture a 3 giorni dalla semina colorate con ematossilina-eosina che evidenzia le cellule in blu-voiletto e il collagene in rosa. Bar: 100 µm.

4.2 Test Reologici

4.2.1 Oscillation strain sweep test

I diversi *scaffolds* a base di HA arricchiti con peptidi sono stati idratati con 450 μL di mezzo di coltura RPMI e, dopo 5 minuti, sottoposti ad un *Oscillation strain sweep test*. Questo è stato condotto mantenendo una temperatura costante di 37°C e imponendo un aumento dell'ampiezza di deformazione a partire da una deformazione dello 0,01%, fino ad arrivare alla deformazione obbiettivo pari allo 0,8%. La frequenza è stata mantenuta costante a 1 Hz, valore tipicamente impiegato per questo tipo di analisi.

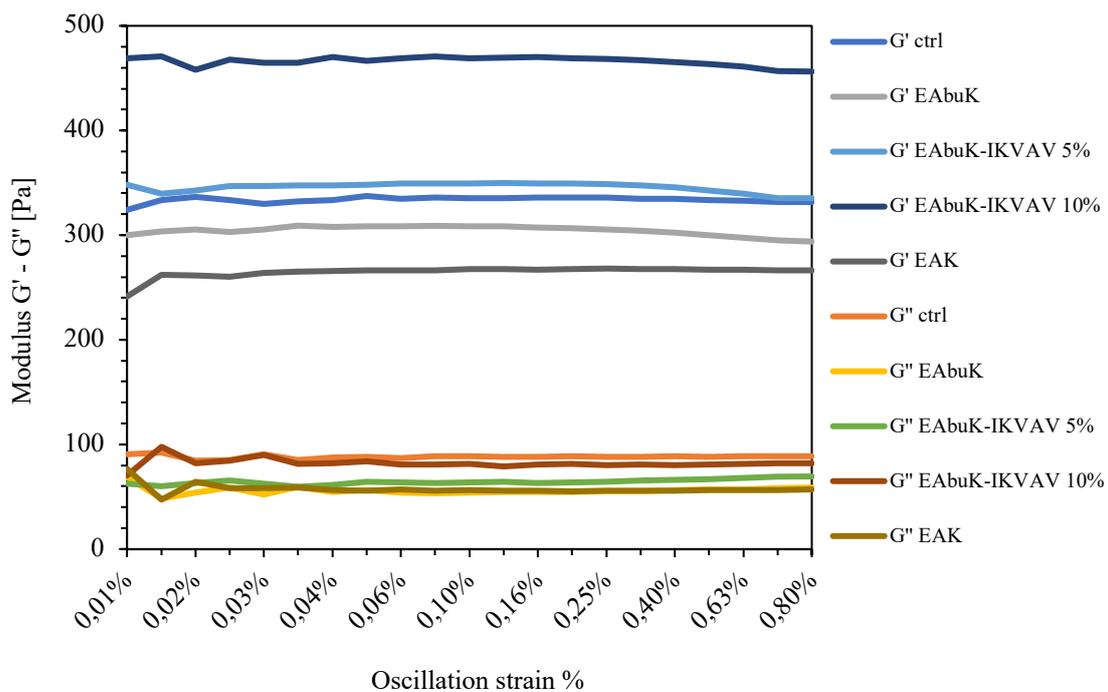


Figura 49: Oscillation strain sweep per i diversi scaffolds a base di HA arricchiti con peptidi

Nel grafico di Fig. 49 sono riportati i valori dello *Storage Modulus* (G') e del *Loss Modulus* (G'') medi di ogni *scaffold* in funzione della deformazione percentuale. Tutti gli *scaffolds* hanno mantenuto un modulo costante all'aumentare della deformazione, si può dunque concludere che nell'intervallo di deformazione analizzato, tutti gli *scaffolds* si trovano all'interno della LVR, ossia la regione in cui la deformazione applicata non comporta alterazioni nella struttura del materiale degne di nota. È possibile anche osservare che tutti gli *scaffolds* hanno mostrato uno *Storage Modulus* (G') sempre maggiore del *Loss Modulus* (G''), evidenziando il fatto che il comportamento elastico è sempre dominante rispetto al comportamento viscoso. Inoltre, gli *scaffolds* arricchiti con il peptide auto-assemblante EAbuK-IKVAV 10% wt/wt, presentano valori di G' ben superiori degli altri *scaffolds*. Questo comportamento potrebbe essere dovuto

alla maggior concentrazione del peptide auto-assemblante che, grazie alla sua struttura nanofibrosa, potrebbe aver agito da rinforzo della matrice, migliorandone le proprietà meccaniche.

4.2.2 Oscillation frequency sweep test

A seguito dell'*Oscillation strain sweep test*, i diversi *scaffolds* a base di HA arricchiti con peptidi sono stati idratati con 450 μL di medio di coltura RPMI e, dopo 5 minuti, sottoposti ad un *Oscillation frequency sweep test*. Questo è stato condotto mantenendo una temperatura costante di 37°C e imponendo un aumento della frequenza (velocità di deformazione) a partire da una frequenza di 0,1 Hz fino ad arrivare alla frequenza obiettivo di 3 Hz. L'ampiezza di deformazione è stata mantenuta costante e pari allo 0,1%, ossia in modo da rimanere all'interno dell'LVR.

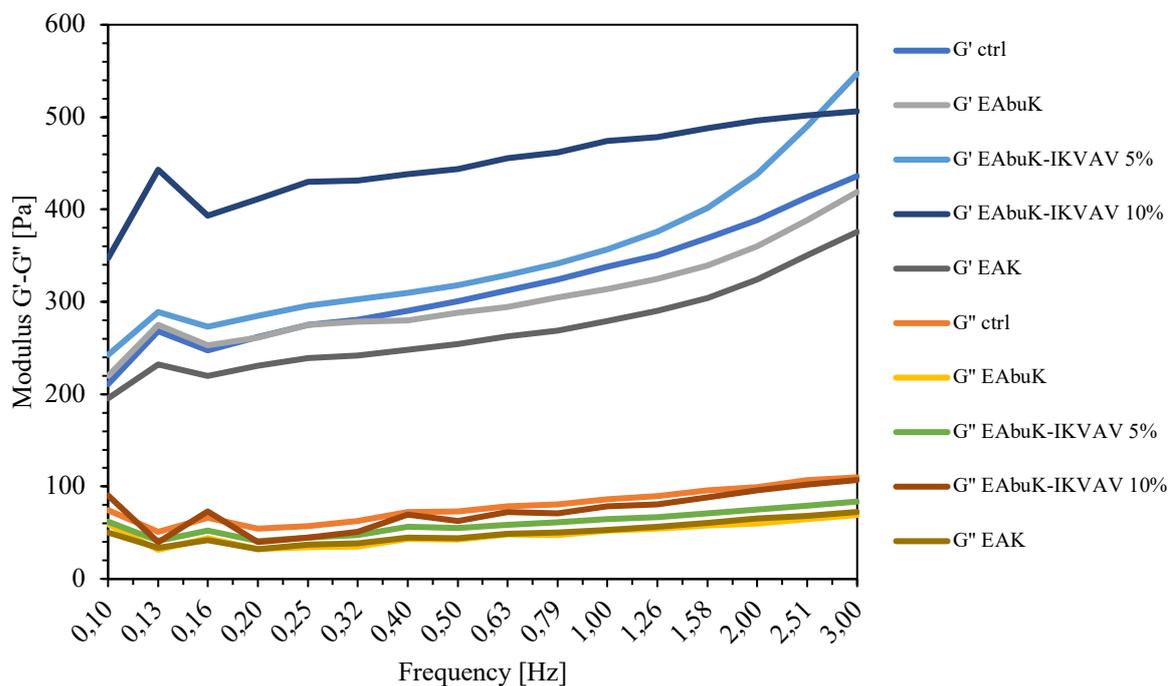


Figura 50: Oscillation strain sweep per i diversi scaffolds a base di HA arricchiti con peptidi

Nel grafico di Fig. 50 sono riportati i valori dello *Storage Modulus* (G') e del *Loss Modulus* (G'') medi di ogni *scaffold* in funzione della frequenza. La regione ad alti valori di frequenza corrisponde al comportamento assunto dal materiale in seguito ad una elevata velocità di deformazione, viceversa, la regione a bassi valori di frequenza corrisponde al comportamento assunto dal materiale in seguito ad una bassa velocità di deformazione. Anche in questo caso, tutti gli *scaffolds* hanno mostrato uno *Storage Modulus* (G') che è sempre maggiore del *Loss*

Modulus (G''), evidenziando il fatto che il comportamento elastico è sempre dominante. Inoltre, è possibile osservare che tutti gli *scaffolds* hanno mostrato una certa dipendenza del modulo dalla frequenza. In generale, maggiore è la dipendenza del modulo dalla frequenza, maggiore è il comportamento viscoso del materiale. È possibile quindi concludere che, ad elevate frequenze, una risposta di tipo viscoso comincia ad influenzare il comportamento del materiale. Questo comportamento sembra essere meno pronunciato nel caso degli *scaffolds* arricchiti con il peptide auto-assemblante EAbuK-IKVAV 10% wt/wt. Probabilmente ciò è legato alla maggiore concentrazione del peptide, che, grazie alla struttura nanofibrosa, permette al materiale di conservare un comportamento elastico a frequenze più elevate.

Capitolo 5

5 Conclusioni

Nell'ambito della ricerca contro il cancro, è molto avvertita l'esigenza di trovare un modello di tessuto tumorale *in vitro* che sia il più possibile simile al microambiente tumorale *in vivo* per lo studio di nuovi farmaci e la messa appunto di nuove terapie. Attualmente sono allo studio matrici tridimensionali che mimino gli stimoli che le cellule sperimentano *in vivo*, estremamente più sofisticati rispetto ai sistemi di coltura cellulare bidimensionali e i modelli a base di soli sferoidi. Il presente lavoro presenta lo studio di una matrice a base di acido ialuronico e peptidi auto-assemblanti, mimetica dello stroma mixoide, ideata presso il laboratorio di Bioingegneria del Dipartimento di Ingegneria Industriale (DII) dell'Università degli Studi di Padova. Tale matrice ha ottenuto buoni risultati come modello *in vitro* per lo studio del comportamento delle cellule tumorali epiteliali derivanti dall'adenocarcinoma mammario. Al fine di caratterizzare e ottimizzare questo *scaffold*, si è variata la formulazione della matrice e si è valutato l'effetto dal punto di vista biologico e reologico.

In particolare, è emerso che la struttura nanofibrosa dei peptidi auto-assemblanti sembra essere più importante della sequenza adesiva per sostenere la proliferazione cellulare; tuttavia l'innesto della sequenza adesiva permette di ottenere sferoidi di maggiore dimensione. Inoltre, è stato riscontrato che la presenza dei peptidi auto-assemblanti comporta un aumento della componente filamentosa depositata dalle cellule in termini sia di densità che di spessore.

A fronte della difficile maneggiabilità delle matrici di acido ialuronico e peptidi auto-assemblanti, si è sostituito l'HA con il chitosano, ottenendo risultati favorevoli. In particolare, si è riscontrato che l'arricchimento con peptidi auto-assemblanti aumenta in modo significativo la crescita cellulare, il numero e la dimensione degli sferoidi rispetto agli *scaffolds* di solo chitosano.

La caratterizzazione reologica ha evidenziato che tutti gli *scaffolds* analizzati presentano un comportamento elastico dominante all'interno dell'intervallo di deformazione compreso tra lo 0,1% e lo 0,8%. Inoltre, la maggiore concentrazione del peptide sembrerebbe influire in maniera significativa sulle proprietà meccaniche della matrice. Infine, è stato registrato che, mantenendo una deformazione costante pari allo 0,1%, ad elevate velocità di deformazione (frequenza) una risposta di tipo viscoso comincia ad influenzare il comportamento del materiale.

Si tratta di test reologici preliminari grazie ai quali si è posto le basi per un più approfondito studio avente la finalità di studiare come le proprietà meccaniche sono in grado di influenzare il comportamento a livello biologico.

In un prossimo futuro le matrici realizzate verranno utilizzate nella messa a punto dei parametri per l'elettroporazione e nella valutazione di nuovi chemioterapici.

Riferimenti Bibliografici

- [1] <https://www.stoodnt.com/blog/biomedical-engineering-overview-education-specializations-universities-careers-and-jobs/>
- [2] <https://www.livescience.com/48001-biomedical-engineering.html>
- [3] Castells S. C., Alemany R. M., Fernandez M. T, Recha S. L., Lopez C. P Aloy R. C. et al. (2013). Current Applications of Tissue Engineering in Biomedicine. *Journal of Biochips & Tissue chips* 2(4), 1-14. doi: 10.4172/2153-0777
- [4] O'Brien F. (2011). Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today* 14(3), 88-95. doi: 10.1016/S1369-7021(11)70058-X
- [5] Lalan S., Pomerantseva I. & Vacanti J. (2001). Tissue Engineering and Its Potential Impact on Surgery. *World Journal of Surgery* 25(11), 1458-1466. doi: 10.1007/s00268-001-0131-3
- [6] Mhanna R. & Hasan A. (2017). Introduction to Tissue Engineering. In Hasan A. (Ed.) *Tissue Engineering for Artificial Organs: Regenerative Medicine, Smart Diagnostics and Personalized Medicine*, Weinheim, Germania:Wiley-VCH, 3-34.
- [7] Breslin S. & O'Driscoll L. (2013). Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. *Drug Discovery Today* 18(5), 240-249. doi: 10.1016/j.drudis.2012.10.003
- [8] Pampaloni F., Reynaud E. G. & Stelzer E. H. (2007). The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(10), 839-845. doi: 10.1038/nrm2236
- [9] Smalley K. S. M., Lioni M. & Herlyn M. (2006). Life isn't flat: Taking cancer biology to the next dimension. *In Vitro Cell. Dev. Biol. - Animal* 42(8), 242-247. doi: 10.1290/0604027.1
- [10] Griffith L. G. & Swartz M. A. (2006). Capturing complex 3D tissue physiology *in vitro*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7(3), 211-224. doi: 10.1038/nrm1858
- [11] Edmondson R., Broglie J. J., Adcock A. F. & Yang L. (2014). Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors. *Assay Drug Dev Technol.* 12(4), 207-218. doi: 10.1089/adt.2014.573.
- [12] Stadler M., Walter S., Walzl A., Kramer N., Unger C., Scherzer M. et al. (2015). Increased complexity in carcinomas: analyzing and modeling the interaction of human cancer cells with their microenvironment. *Semin. Cancer Biol.* 35, 107–124. doi: 10.1016/j.semcancer.2015.08.007

- [13] Langhans S. A. (2018). Three-Dimensional in Vitro Cell Culture Models in Drug Discovery and Drug Repositioning, *Front. Pharmacol.* 9(6), 1-14. doi: 10.3389/fphar.2018.00006
- [14] Friedrich J., Seidel C., Ebner R. & Kunz-Schughart L. A. (2009). Spheroid- based drug screen: considerations and practical approach. *Nat. Protoc.* 4, 309–324. doi: 10.1038/nprot.2008.226
- [15] Souza G. R., Molina J. R., Raphael R. M., Ozawa M. G., Stark D. J., Levin, C. S. et al. (2010). Three-dimensional tissue culture based on magnetic cell levitation. *Nat. Nanotechnol.* 5, 291–296. doi: 10.1038/nnano.2010.23
- [16] Caliarì S. R. & Burdick, J. A. (2016). A practical guide to hydrogels for cell culture. *Nat. Methods* 13(5), 405–414. doi: 10.1038/nmeth.3839
- [17] Sharma K., Mujawar M. & Kaushik A. (2019). State of Art Functional Biomaterials for Tissue Engineering. *Frontiers in Materials* 6, 1-10. doi: 10.3389/fmats.2019.00172
- [18] Yong A. M. K., Li Z., Merajver D. S. & Fu J. (2017). Tracking the tumor invasion front using long-term fluidic tumoroid culture. *Sci. Rep.* 7, 1-7. doi: 10.1038/s41598-017-10874-1
- [19] Carletti E., Motta A. & Migliaresi C. (2010). Scaffolds for Tissue Engineering and 3D Cell Culture. In Haycock J. W. (Ed.) *3D Cell Culture: Methods and Protocols*, Totowa, New Jersey, USA: Humana Press, 17-40.
- [20] Shoulders D. M. & Raines T. R. (2009). Collagen Structure and Stability. *Annu Rev Biochem.* 78, 929-958. doi: 10.1146/annurev.biochem.77.032207.120833
- [21] Ramshaw J. A., Shah N. K. & Brodsky B. (1998). Gly-X-Y tripeptide frequencies in collagen: a context for host-guest triple-helical peptides. *J Struct Biol.*, 122(1-2), 86-91. doi: 10.1006/jsbi.1998.3977
- [22] Bella J. & Hulmes D. J. (2017). Fibrillar collagens. *Subcell. Biochem.*, 82, 457–490. doi: 10.1007/978-3-319-49674-0_14
- [23] Copes F., Pien N., Van Vlierberghe S., Boccafoschi F. & Mantovani D. (2019). Collagen-Based Tissue Engineering Strategies for Vascular Medicine. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 7(166), 1-15. doi: 10.3389/fbioe.2019.00166
- [24] Gelse K., Poschl E. & Aigner T. (2003). Collagens: structure, function and biosynthesis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55(12), 1531-1546. doi: 10.1016/j.addr.2003.08.002

- [25] Gordon M. & Hahn R. (2009). Collagens. *Cell Tissue Res.* 339(1), 247-257. doi: 10.1007/s00441-009-0844-4
- [26] Sheehy E. J., Cunniffe G. M. & O'Brien F. J. (2017). Collagen-based biomaterials for tissue regeneration and repair. In Barbosa A. M. & Martins C. M. (Eds) *Peptides and Proteins as Biomaterials for Tissue Regeneration and Repair*, Cambridge, United Kingdom: Woodhead Publishing, 127-150
- [27] Arumugam S. K. G., Sharma D., Balakrishnan M. R., & Ettiyappan P. B. J. (2018). Extraction, optimization and characterization of collagen from sole fish skin. *Sustainable Chemistry and Pharmacy* 9, 19-26. doi: 10.1016/j.scp.2018.04.003
- [28] Yamada S., Yamamoto K., Ikeda T., Yanagiguchi K. & Hayashi Y. (2014). Potency of Fish Collagen as a Scaffold for Regenerative Medicine. *BioMed Research International* 14, 1-8. doi: 10.1155/2014/302932.
- [29] Ran X. G. & Wang L. Y. (2014). Use of ultrasonic and pepsin treatment in tandem for collagen extraction from meat industry by-products. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 94(3), 585-590. doi: 10.1002/jsfa.6299
- [30] Ledward D. A. (2000). Gelatin. In Philips G. O. & Williams P. A. (Eds) *Handbook of hydrocolloids*, Cambridge, United Kingdom: Woodhead Publishing, 67-86.
- [31] Liu D., Wei G., Li T., Hu J., Lu N., Regenstein J. M. & Zhou P. (2015). Effects of alkaline pretreatments and acid extraction conditions on the acid-soluble collagen from grass carp skin. *Food Chemistry* 172, 836-843. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.09.147
- [32] Schmidt M. M., Dornelles R. C. P., Mello R. O., Kubota E. H., Mazutti M. A., Kempka A. P. & Demiate I. M. (2016). Collagen extraction process. *International Food Research Journal* 23(3), 913-922. Retrieved from [http://www.ifrj.upm.edu.my/23%20\(03\)%202016/\(1\).pdf](http://www.ifrj.upm.edu.my/23%20(03)%202016/(1).pdf)
- [33] Chanjuan D. & Yonggang L. (2016). Application of Collagen Scaffold in Tissue Engineering: Recent Advances and New Perspectives. *Polymers* 8(42), 1-20. doi: 10.3390/polym8020042
- [34] Wang W., Zhang Y., Ye R. & Ni Y. (2015). Physical crosslinkings of edible collagen casing. *Int. J. Biol. Macromol* 81, 920–925. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2015.09.032
- [35] Takitoh T., Bessho M., Hirose M., Ohgushi H., Mori H. & Hara M. (2015). Gamma-cross-linked nonfibrillar collagen gel as a scaffold for osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J. Biosci. Bioeng.* 119(2), 217–225. doi: 10.1016/j.jbiosc.2014.07.008

- [36] Maslennikova A., Kochueva M., Ignatieva N., Vitkin A., Zakharkina O., Kamensky V. et al. (2015). Effects of gamma irradiation on collagen damage and remodeling. *Int. J. Radiat. Biol.* 91(3), 240–247. doi: 10.3109/09553002.2014.969848
- [37] Yoshioka S. A. & Goissis G. (2008). Thermal and spectrophotometric studies of new crosslinking method for collagen matrix with glutaraldehyde acetals. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 19(3), 1215–1223. doi: 10.1007/s10856-007-0151-0
- [38] Suchý T., Šupová M., Sauerová P., Verdánová M., Sucharda Z., Rýglová Š. et al. (2015). The effects of different cross-linking conditions on collagen-based nanocomposite scaffolds-an *in vitro* evaluation using mesenchymal stem cells. *Biomed. Mater.* 10(6), 1-14. doi: 10.1088/1748-6041/10/6/065008
- [39] Martínez A., Blanco M. D., Davidenko N. & Cameron R.E. (2015). Tailoring chitosan/collagen scaffolds for tissue engineering: Effect of composition and different crosslinking agents on scaffold properties. *Carbohydr. Polym* 132, 606–619. Doi: 10.1016/j.carbpol.2015.06.084
- [40] Yan F., Yue W., Zhang Y., Mao G., Gao K., Zuo, Z. et al. (2015). Chitosan-collagen porous scaffold and bone marrow mesenchymal stem cell transplantation for ischemic stroke. *Neural. Regen. Res.* 10(9), 1421–1426. doi: 10.4103/1673-5374.163466
- [41] Zhu Z., Wang Y. M., Yang J. & Luo X. S. (2017). Hyaluronic acid: a versatile biomaterial in tissue engineering. *Plast. Aesthet. Res.* 57(4), 219–227. doi: 10.20517/2347-9264.2017.71
- [42] Collins M. & Birkinshaw C. (2013). Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering - A review. *Carbohydrate Polymers* 92(2), 1262–1279. Doi: 10.1016/j.carbpol.2012.10.028
- [43] Boeriu G. C., Springer J., Kooy K. F., Van den Broek L. & Eggink G. (2013). Production Methods for Hyaluronan. *International Journal of Carbohydrate Chemistry* 5, 1-14. doi: 10.1155/2013/624967
- [44] O'Regan M., Martini I., Crescenzi F., De Luca C. & Lansing M. (1994). Molecular mechanisms and genetics of hyaluronan biosynthesis. *International Journal of Biological Macromolecules* 16(6), 283–286. doi: 10.1016/0141-8130(94)90056-6
- [45] Kendall F. E., Heidelberger M. & Dawson M. H. (1937). A serologically inactive polysaccharide elaborated by mucoid strains of group A hemolytic Streptococcus. *The Journal*

of *Biological Chemistry* 118(1), 61–69. Retrieved from <http://www.jbc.org/content/118/1/61.full.pdf>

[46] Kim J. H., Yoo S. J., Oh D. K., Kweon Y. G., Park D. W., Lee C. H. & Gil G. H. (1996). Selection of a *Streptococcus equi* mutant and optimization of culture conditions for the production of high molecular weight hyaluronic acid. *Enzyme and Microbial Technology* 19(6), 440–445. doi: 10.1016/S0141-0229(96)00019-1

[47] Mao Z., Shin D. H. & Chen R. (2009). A recombinant *E. coli* bioprocess for hyaluronan synthesis. *Applied Microbiology and Biotechnology* 84(1), 63–69. doi: 10.1007/s00253-009-1963-2

[48] DeAngelis P. L., Papaconstantinou J. & Weigel P. H. (1993). Molecular cloning, identification, and sequence of the hyaluronan synthase gene from group A *Streptococcus pyogenes*. *The Journal of Biological Chemistry* 268(26), 19181–19184. Retrieved from <http://www.jbc.org/content/268/26/19181.long>

[49] DeAngelis P. L., Papaconstantinou J. & Weigel P. H. (1993). Isolation of a *Streptococcus pyogenes* gene locus that directs hyaluronan biosynthesis in acapsular mutants and in heterologous bacteria. *The Journal of Biological Chemistry* 268(20), 14568–14571. Retrieved from <http://www.jbc.org/cgi/pmidlookup?view=long&pmid=8325836>

[50] Zhu Z., Wang Y. M., Yang J. & Luo X. S. (2017). Hyaluronic acid: a versatile biomaterial in tissue engineering. *Plast. Aesthet. Res.* 4, 219–227. doi: 10.20517/2347-9264.2017.71

[51] Segura T., Anderson B. C., Chung P. H., Webber R. E., Shull K. R. & Shea L. D. (2005). Crosslinked hyaluronic acid hydrogels: a strategy to functionalize and pattern. *Biomaterials* 26(4), 359–371. doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.02.067

[52] Park Y. B., Ha C. W., Kim J. A., Han W. J., Rhim J. H., Lee H. J. et al. (2017). Single-stage cell-based cartilage repair in a rabbit model: cell tracking and *in vivo* chondrogenesis of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells and hyaluronic acid hydrogel composite. *Osteoarthritis Cartilage* 25(4), 570–580. doi: 10.1016/j.joca.2016.10.012

[53] Rhim J., Ha C. W., Park Y. B., Kim J. A., Han W. J., Choi S. et al. (2017). Cartilage repair by various concentrations of placenta-derived mesenchymal stem cells and hyaluronic acid hydrogels in a rabbit model. *Osteoarthritis Cartilage* 25(1), S160. doi: 10.1016/j.joca.2017.02.272

- [54] Thompson R. E., Pardieck J., Smith L., Kenny P., Crawford L., Shoichet M. & Sakiyama-Elbert S. (2018). Effect of hyaluronic acid hydrogels containing astrocyte-derived extracellular matrix and/or V2a interneurons on histologic outcomes following spinal cord injury. *Biomaterials* 162, 208–223. doi: 10.1016/j.biomaterials.2018.02.013
- [55] Rinaudo M. (2006). Chitin and chitosan: properties and applications. *Prog. Polym. Sci.* 31(7), 603–632. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001
- [56] Rane K. D. & Hoover D. G. (1993). Production of chitosan by fungi. *Food Biotechnol* 7(1), 11–33. doi: 10.1080/08905439309549843
- [57] Aranaz I., Harris R. & Heras A. (2010) Chitosan amphiphilic derivatives. Chemistry and applications. *Curr. Org. Chem.* 14(3), 308–330. doi: 10.2174/138527210790231919
- [58] Aranaz I., Mengibar M., Harris R., Panos I., Miralles B., Acosta N. et al. (2009). Functional characterization of chitin and chitosan. *Curr. Chem. Biol.* 3(2), 203–230. doi: 10.2174/2212796810903020203
- [59] Wu T., Zivanovic S., Draughon F. A., Sams C. E. (2004). Chitin and chitosan value-added products from mushroom waste. *J. Agricult. Food Chem.* 52(26), 7905–7910. doi: 10.1021/jf0492565
- [60] Acosta N., Jimenez C., Borau V. & Heras A. (1993). Extraction and characterization of chitin from crustaceans. *Biomass Bioenergy* 5(2), 145–153. doi: 10.1016/0961-9534(93)90096-M
- [61] Madihally S. V. & Matthew H. W. T. (1999). Porous chitosan scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* 20(12), 1133–1142. doi: 10.1016/s0142-9612(99)00011-3
- [62] Croisier F. & Jérôme C. (2013). Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *European Polymer Journal* 49(4), 780–792. Doi: 10.1016/j.eurpolymj.2012.12.009
- [63] Aiba S. (1992). Studies on chitosan: 4. Lysozymic hydrolysis of partially N-acetylated chitosans. *Int. J. Biol. Macromol.* 14(4), 225–228. doi: 10.1016/s0141-8130(05)80032-7
- [64] Tomihata K. & Ikada Y. (1997). In vitro and in vivo degradation of films in chitin and its deacetylated derivatives. *Biomaterials* 18(7), 567–575. doi: 10.1016/s0142-9612(96)00167-6
- [65] Zhang H. & Neau S. H. (2001). In vitro degradation of chitosan by a commercial enzyme preparation: effect of molecular weight and degree of deacetylation. *Biomaterials* 22(12), 1653–1658. doi: 10.1016/s0142-9612(00)00326-4

- [66] Potivas, T. & Laokuldilok, T. (2014). Deacetylation of chitin and the properties of chitosan films with various deacetylation degrees. *Chiang Mai University Journal of Natural Sciences* 13(1), 559–567. doi: 10.12982/CMUJNS.2014.0058
- [67] Tan T. S., Chin H. Y., Tsai M. L. & Liu C. L. (2015). Structural alterations, pore generation, and deacetylation of α - and β -chitin submitted to steam explosion. *Carbohydrate Polymers* 122, 321–328. doi: 10.1016/j.carbpol.2015.01.016
- [68] Tsigos I., Martinou A., Kafetzopoulos D. & Bouriotis V. (2000). Chitin deacetylases: new, versatile tools in biotechnology. *Trends in Biotechnology* 18(7), 305–312. doi: 10.1016/s0167-7799(00)01462-1
- [69] <http://www.trisaia.enea.it/trisaia/it/laboratori-e-impianti/impianto-steam-explosion>
- [70] Lahiji A., Sohrabi A., Hungerford D. S. & Frondoza C. G. (2000). Chitosan supports the expression of extracellular matrix proteins in human osteoblasts and chondrocytes. *J. Biomed. Mater. Res.* 51(4), 586–595. doi: 10.1002/1097-4636(20000915)51:4<586::AID-JBM6>3.0.CO;2-S
- [71] Funkhouser J. D. & Aronson N. N. Jr (2007). Chitinase family GH18: evolutionary insights from the genomic history of a diverse protein family. *BMC Evol. Biol.* 7, 1-16. doi: 10.1186/1471-2148-7-96
- [72] Cheung F. C. R., Ng B. T. & Wong H. J. (2015). Chitosan: An Update on Potential Biomedical and Pharmaceutical Applications. *Mar Drugs* 13(8), 5156–5186. doi: 10.3390/md13085156
- [73] Shu X. Z. & Zhu K. J. (2002). Controlled drug release properties of ionically cross-linked chitosan beads: the influence of anion structure. *Int. J. Pharm.* 233(1-2), 217–225. doi: 10.1016/S0378-5173(01)00943-7
- [74] Mao J. S., Cui Y. L., Wang X. H., Sun Y., Yin Y. J., Zhao H. M. et al. (2004). A preliminary study on chitosan and gelatin polyelectrolyte complex cytocompatibility by cell cycle and apoptosis analysis. *Biomaterials* 25(18), 3973–3981. doi: 10.1016/j.biomaterials.2003.10.080
- [75] Boddohi S., Moore N., Johnson P. A. & Kipper M. J. (2009). Polysaccharide-based polyelectrolyte complex nanoparticles from chitosan, heparin, and hyaluronan. *Biomacromolecules* 10(6), 1402–1409. doi: 10.1021/bm801513e

- [76] Brack H. P., Tirmizi S. A. & Risen W. M. Jr (1997). A spectroscopic and viscometric study of the metal ion-induced gelation of the biopolymer chitosan. *Polymer* 38(10), 2351–2362. doi: 10.1016/S0032-3861(96)00780-X
- [77] Hennink W. E. & Van N. C. F. (2002). Novel crosslinking methods to design hydrogels. *Adv. Drug Delivery Rev.* 54(1), 13–36. doi: 10.1016/s0169-409x(01)00240-x
- [78] Florczyk S. J., Wang K., Jana S., Wood D. L., Sytsma S. K., Sham J. et al. (2013). Porous chitosan-hyaluronic acid scaffolds as a mimic of glioblastoma microenvironment ECM. *Biomaterials* 34(38), 10143-10150. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.09.034
- [79] Zhang S., Lockshin C., Herbert A., Winter E. & Rich A. (1992). Zuotin, a putative Z-DNA binding protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO. J.* 11(10), 3787 – 3796. Retrieved from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC556839/>
- [80] Fung S. Y., Yang H. & Chen P. (2008). Sequence effect of self-assembling peptides on the complexation and in vitro delivery of the hydrophobic anticancer drug ellipticine. *PLoS ONE* 3(4), 1-12. doi: 10.1371/journal.pone.0001956
- [81] Gelain F., Unsworth L. & Zhang S. (2010). Slow and sustained release of active cytokines from designer self-assembling peptide nanofiber scaffolds for adult mouse neural stem cell cultures. *J. Controlled Release* 145(3), 231-239. doi: 10.1016/j.jconrel.2010.04.026
- [82] Koutsopoulos S. & Zhang S. (2012). Two-layered injectable self-assembling peptide scaffold hydrogels for long-term sustained release of human antibodies. *J. Controlled Release* 160(3), 451-458. doi: 10.1016/j.jconrel.2012.03.014
- [83] Koutsopoulos S. & Zhang S. (2013). Long-term three-dimensional neural tissue cultures in functionalized self-assembling peptide hydrogels, Matrigel and Collagen I. *Acta Biomater* 9(2), 5162-5169. doi: 10.1016/j.actbio.2012.09.010
- [84] Zhang S. (2002). Emerging biological materials through molecular self-assembly. *Biotechnol. Adv.* 20(5-6), 321-339. doi: 10.1016/S0734-9750(02)00026-5
- [85] Zhang S. (2017). Discovery and design of self-assembling peptides. *Interface Focus* 7(6), 1-18. doi: 10.1098/rsfs.2017.0028
- [86] Zhang S., Holmes T., Lockshin C. & Rich A. (1993). Spontaneous assembly of a self-complementary oligopeptide to form a stable macroscopic membrane. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 90(8), 3334-3338. doi: 10.1073/pnas.90.8.3334

- [87] Vauthey S., Santoso S., Gong H., Watson N. & Zhang S. (2002). Molecular self-assembly of surfactant-like peptides to form nanotubes and nanovesicles. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 99(8), 5355-5360. doi:10.1073/pnas.072089599
- [88] Zhang S., Yan L., Altman M., Lasse M., Nugent H, Frankel F. et al. (1999). Biological surface engineering: a simple system for cell pattern formation. *Biomaterials* 20(13), 1213-1220. doi:10.1016/S0142-9612(99)432#00014-9
- [89] Groß A., Hashimoto C., Sticht H. & Eichler J. (2015). Synthetic Peptides as Protein Mimics *Front. Bioeng. Biotechnol.* 3, 1-16. doi:10.3389/fbioe.2015.00211
- [90] Pankov R. & Yamada M. K. (2002). Fibronectin at a glance. *Journal of Cell Science* 115, 3861-3863. doi: 10.1242/jcs.00059
- [91] Singh P., Carraher C. & Schwarzbauer E. J. (2010). Assembly of Fibronectin Extracellular Matrix. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 26, 397–419. doi: 10.1146/annurev-cellbio-100109-104020
- [92] Wang P. J. & Hielscher A. (2017). Fibronectin: How Its Aberrant Expression in Tumors May Improve Therapeutic Targeting. *J. Cancer* 8(4), 674–682. doi: 10.7150/jca.16901
- [93] Domogatskaya A., Rodin S. & Tryggvason K. (2012). Functional Diversity of Laminins *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 28, 523–53. doi: 10.1146/annurev-cellbio-101011-155750
- [94] Jayadev R. & Sherwood D. R. (2017). Basement membranes. *Curr Biol.* 27(6), 207-211. doi: 10.1016/j.cub.2017.02.006.
- [95] Aumailley M. & Smyth N. (1998). The role of laminins in basement membrane function. *J. Anat.* 193, 1–21. doi: 10.1046/j.1469-7580.1998.19310001.x
- [96] McGowan A. K. & Marinkovich P. M (2000). Laminins and Human Disease. *Microscopy research and Technique* 51(3), 262-279. doi: 10.1002/1097-0029(20001101)51:3<262::AID-JEMT6>3.0.CO;2-V
- [97] Chiquet E. R. (2004). Tenascins. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36, 986–990. doi: 10.1016/j.biocel.2003.12.002
- [98] Mildwood S. K., Chiquet M., Tucker P. R. & Orend G. (2016). Tenascin-C at a glance. *Journal of Cell Science* 129(23), 4321-4327. doi: 10.1242/jcs.190546
- [99] Tucker P. R. & Degen M. (2019). The Expression and Possible Functions of Tenascin-W During Development and Disease. *Front. Cell Dev. Biol.* 7(53), 1-10. doi: 10.3389/fcell.2019.00053

- [100] Schwartz I., Seger D. & Shaltiel S. (1999). Vitronectin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31(5), 539-544. doi: 10.1016/s1357-2725(99)00005-9
- [101] Hyangsoon N., Sungguan H. & Shuang H. (2013). Role of Urokinase Receptor in Tumor Progression and Development. *Theranostics* 3(7), 487–495. doi: 10.7150/thno.4218
- [102] https://www.prospecbio.com/growth_factors
- [103] Heldin C. H. & Westermark B. (1984). Growth factors: mechanism of action and relation to oncogenes. *Cell.* 37(1), 9-20. doi: 10.1016/0092-8674(84)90296-4
- [104] Witsch E., Sela M. & Yarden Y. (2010). Roles for Growth Factors in Cancer Progression. *Physiology (Bethesda)* 25(2), 85–101. doi: 10.1152/physiol.00045.2009
- [105] Di Bello C. & Bagno A. (2016). *Biomateriali: dalla Scienza dei Materiali alle Applicazioni Cliniche*. Bologna: Pàtron Editore.
- [106] Nollet J. A. (1754). *Recherches sur les causes particulieres des phenomenes electriques*. Paris: Guerin & Delatour
- [107] Stampfli R. & Willi M. (1957). Membrane potential of a Ranvier node measured after electrical destruction of its membrane. *Experientia* 13(7), 297–298. doi: 10.1007/bf02158430
- [108] Neumann E., Schaefer R. M., Wang Y. & Hofschneider P. H. (1982). Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J.* 1(7), 841–845. Retrieved from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC553119/>
- [109] Okino M. & Mohri H. (1987). Effects of a high-voltage electrical impulse and an anticancer drug on in vivo growing tumors. *Jpn. J. Cancer Res. Gann.* 78(12), 1319–1321.
- [110] Mir L. M., Orlowski S., Belehradek J. J. & Paoletti C. (1991). Electrochemotherapy potentiation of antitumour effect of bleomycin by local electric pulses. *Eur. J. Cancer.* 27(1), 68–72. Doi: 10.1016/0277-5379(91)90064-k
- [111] Davalos R., Mir L. M. & Rubinsky B. (2005). Tissue ablation with irreversible electroporation. *Ann. Biomed. Eng.* 33(2), 223–231. doi: 10.1007/s10439-005-8981-8
- [112] Kotnik T., Kramar P., Pucihar G., Miklavcic D. & Tarek M. (2012). Cell membrane electroporation - part 1: the phenomenon. *IEEE Electrical Insulation* 28(5), 14–23. doi: 10.1109/MEI.2012.6268438

- [113] Yarmush L. M., Golberg A., Sersa G., Kotnik T. & Miklavcic D. (2014). Electroporation-Based Technologies for Medicine: Principles, Applications, and Challenges. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 16, 295–320. doi: 10.1146/annurev-bioeng-071813-104622
- [114] <https://www.igea.it/it/oncologia/elettrochemioterapia/domande-frequenti#close>
- [115] Heller L. C. & Heller R. (2010). Electroporation gene therapy preclinical and clinical trials for melanoma. *Curr. Gene Ther.* 10(4), 312–317. doi: 10.2174/156652310791823489
- [116] Jazowiecka R. J., Jarosz M. & Szala S. (2006). Combination of vasostatin gene therapy with cyclophosphamide inhibits growth of B16(F10) melanoma tumours. *Acta Biochim. Pol.* 53(1), 199–202. Retrieved from: http://www.actabp.pl/pdf/1_2006/199.pdf
- [117] Martin R. C. G., McFarland K., Ellis S. & Velanovich V. (2012). Irreversible electroporation therapy in the management of locally advanced pancreatic adenocarcinoma. *J. Am. Coll. Surg.* 215(3), 361–369. doi: 10.1016/j.jamcollsurg.2012.05.021
- [118] Usman M., Moore W., Talati R., Watkins K. & Bilfinger T.V. (2012). Irreversible electroporation of lung neoplasm: a case series. *Med. Sci. Monit.* 18(6), 43–47. doi: 10.12659/msm.882888
- [119] Brun P., Dettin M., Campana G. L., Dughiero F., Sgarbossa P., Bernardello C. et al. (2019). Cell-seeded 3D scaffolds as in vitro models for electroporation. *Bioelectrochemistry* 125, 15-24. doi: 10.1016/j.bioelechem.2018.08.006

Ringraziamenti

Desidero dedicare questo spazio per ricordare e ringraziare tutti coloro che mi hanno aiutato a raggiungere questo importante traguardo accademico e personale. Ringrazio anzitutto la Prof.ssa Monica Dettin, relatrice di questa tesi, per avermi ospitato presso il laboratorio di Bioingegneria e per avermi insegnato tanto della sua disciplina. Ringrazio il Dott. Fabio Pieretti, co-relatore di questa tesi, per aver stimolato il mio interesse per l'argomento qui discusso e per avermi guidato durante l'attività sperimentale. Ringrazio la Prof.ssa Maria Teresa Conconi e la Dott.ssa Bianca Bazzolo per la disponibilità e il supporto nella realizzazione della parte sperimentale legata ai saggi biologici. Ringrazio l'Ing. Annj Zamuner per la disponibilità e il supporto nella realizzazione della parte sperimentale legata ai test reologici. Ringrazio l'Ing. Martina Todesco per i confronti costruttivi e gli spunti forniti alla mia tesi. Proseguo ringraziando i colleghi e gli amici che mi hanno incoraggiato con parole, gesti, messaggi, risate, camminate, chiacchierate; in particolare Alex, Dominic, Luca, Mattia, Marco, Alessio, Alessandro, Marika, Anna, Chiara, Annalisa e Jacopo. Un ringraziamento speciale va alla mia famiglia, in particolare ai miei genitori e a mio fratello per il loro instancabile sostegno emotivo ed economico che mi ha permesso di giungere alla fine di questo percorso universitario. Infine, ringrazio nonno Pompeo, gli zii Gianfranco, Valli, Matteo, Arianna e la "cuginetta" Sara per l'incoraggiamento e l'affetto che mi hanno dimostrato.

Grazie a tutti, di cuore!