



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA



# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

---

DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA  
DELL'INFORMAZIONE

DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA INDUSTRIALE

CORSO DI LAUREA IN BIOINGEGNERIA  
INDUSTRIALE

## MEMBRANE FUNZIONALIZZATE CON CHITOSANO INGEGNERIZZATO PER LA RIGENERAZIONE OSSEA

Relatore: Prof.ssa Monica Dettin

Laureando: Cristian Balducci

Correlatori: Prof.ssa Paola Brun

Dott.ssa Annj Zamuner

Anno Accademico 2022/2023

Data di Laurea 6 Marzo 2023



# Sommario

<b>ABSTRACT</b> .....	7
<b>1 INTRODUZIONE</b> .....	9
1.1 IL TESSUTO OSSEO.....	9
1.1.1 Tessuto osseo corticale o compatto.....	10
1.1.2 Tessuto osseo trabecolare o spugnoso.....	11
1.1.3 Cellule del tessuto osseo.....	12
1.1.3.1 Gli osteoblasti.....	12
1.1.3.2 Le cellule del rivestimento osseo.....	13
1.1.3.3 Gli osteociti.....	13
1.1.3.4 Gli osteoclasti.....	14
1.2 LA MATRICE EXTRACELLULARE.....	15
1.2.1 La matrice extracellulare ossea.....	18
1.3 IL RIMODELLAMENTO OSSEO.....	19
1.4 Denti, Tessuto Osseo Alveolare E Parodonto.....	21
1.5 INGEGNERIA CELLULARE.....	23
1.5.1 Scaffold.....	24
1.5.2 Cellule.....	25
1.5.3 Biomolecole segnale.....	27
1.6 I BIOMATERIALI.....	27
1.6.1 Il collagene.....	28
1.6.2 Il chitosano.....	30
1.7 FATTORI BIOCHIMICI.....	31
1.7.1 I peptidi.....	31
1.7.2 Bone Morphogenic Protein (BMP) e suo mimetico.....	32
1.7.3 Funzionalizzazione biochimica.....	32
1.7.3.1 Adsorbimento superficiale.....	33
1.7.3.2 Rilascio da un coating polimerico.....	33
1.7.3.3 Legame covalente.....	33
1.8 INGEGNERIA DEL TESSUTO OSSEO.....	34
1.8.1 Perché ricorrere alla BTE.....	34
1.8.2 Principi della BTE.....	35
1.8.3 Utilizzo di fattori di crescita.....	36
1.8.4 Materiali per l'ingegneria del tessuto osseo.....	36
1.8.4.1 Chitosano nella BTE.....	37
1.9 INGEGNERIA DEL TESSUTO OSSEO ALVEOLARE.....	38
1.9.1 La rigenerazione ossea guidata.....	38
1.9.2 Le membrane.....	40
1.9.2.1 Membrane in PTFE.....	41
1.9.2.2 Membrane riassorbibili.....	41
1.9.2.3 Confronto tra le membrane in collagene e in PTFE.....	42
1.9.2.4 Altri materiali per membrane.....	43
1.10 SCOPO DELLA TESI.....	44
<b>2 MATERIALI E METODI</b> .....	46
2.1 MATERIALI.....	46
2.2 SEQUENZA PEPTIDICA.....	48
2.3 STRUMENTI.....	48
2.4 METODI.....	50

2.4.1 Sintesi peptidica su fase solida.....	50
2.4.1.1 Test della Piperidina.....	53
2.4.1.2 Deprotezione delle catene laterali e sblocco della resina.....	54
2.4.2 Cromatografia HPLC.....	55
2.4.3 Spettrometria di massa.....	56
2.4.4 Funzionalizzazione del chitosano.....	57
2.4.5 Funzionalizzazione delle membrane .....	58
2.4.5.1 Lavaggi delle membrane.....	59
2.4.6 Spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier (FT-IR).....	59
2.4.7 Spettroscopia fotoelettronica a raggi X (XPS).....	61
2.4.8 Microscopia a due fotoni (TPM).....	63
2.4.9 Saggi biologici.....	64
2.4.9.1 Proliferazione cellulare.....	65
2.4.9.2 Espressione genica q-PCR.....	65
2.4.9.3 Analisi di mineralizzazione.....	66
2.4.9.4 Saggio antibatterico.....	67
2.4.10 Analisi meccanica a trazione.....	68
2.5 Analisi statistica.....	69
<b>3 PARTE SPERIMENTALE.....</b>	<b>70</b>
3.1 SINTESI DEL PEPTIDE.....	70
3.1.1 Sblocco del peptide dalla resina e deprotezione delle catene laterali.....	71
3.1.2 Caratterizzazione del peptide.....	71
3.1.3 Purificazione del peptide.....	73
3.2 FUNZIONALIZZAZIONE DEL CHITOSANO.....	75
3.3 FUNZIONALIZZAZIONE DELLE MEMBRANE, FASE PRELIMINARE, PRIMA APPLICAZIONE.....	75
3.3.1 Metodo 1 – Prima applicazione.....	76
3.3.2 Metodo 2 – Prima applicazione.....	76
3.3.3 Metodo 3 – Prima applicazione.....	76
3.3.4 Metodo 4 – Prima applicazione.....	76
3.3.5 Lavaggi – Prima applicazione.....	76
3.3.6 Analisi FT-IR, fase preliminare.....	77
3.4 FUNZIONALIZZAZIONE DELLE MEMBRANE, FASE PRELIMINARE, SECONDA APPLICAZIONE.....	79
3.4.1 Metodo 3 – Seconda applicazione.....	79
3.4.2 Metodo 4 – Seconda applicazione.....	79
3.4.3 Lavaggi – Seconda applicazione.....	79
3.4.4 Proliferazione cellulare, fase preliminare.....	80
3.5 FUNZIONALIZZAZIONE DELLE MEMBRANE.....	80
<b>4 RISULTATI E DISCUSSIONI.....</b>	<b>83</b>
4.1 MICROSCOPIA OTTICA.....	83
4.2 SPETTROSCOPIA INFRAROSSA IN TRASFORMATA DI FOURIER (FT-IR).....	84
4.3 SPETTROSCOPIA FOTOELETTRONICA A RAGGI X (XPS).....	86
4.4 MICROSCOPIA A DUE FOTONI (TPM).....	90
4.5 SAGGI BIOLOGICI.....	92
4.5.1 Proliferazione cellulare.....	92
4.5.2 Espressione genica.....	93
4.5.2.1 Espressione genica di SPP1.....	94
4.5.2.2 Espressione genica di Runx2.....	95

4.5.3 Mineralizzazione.....	96
4.5.4 Valutazione delle proprietà antibatteriche.....	97
4.6 TEST MECCANICI.....	99
<b>5 CONCLUSIONI.....</b>	<b>102</b>
<b>REFERENZE.....</b>	<b>104</b>
<b>RINGRAZIAMENTI.....</b>	<b>108</b>



## Abstract

Secondo i dati dell'Organizzazione Mondiale della Sanità oltre 3,5 miliardi di persone soffrono di problemi del cavo orale. L'implantologia dentale è la tecnica più utilizzata per la sostituzione rimpiazzo di denti mancanti ma l'inserimento della vite danneggia il tessuto osseo alveolare, che deve rigenerarsi post-intervento in ogni direzione per saldarsi all'impianto garantendogli stabilità. È necessario limitare la perdita verticale di tessuto osseo alveolare a seguito di rimozione o perdita dentale anche laddove non si proceda con implantologia dentale.

Il metodo più utilizzato per aumentare la crescita ossea nei difetti alveolari localizzati e nei siti di impianto è la rigenerazione ossea guidata (GBR), che prevede l'utilizzo di membrane barriera che impediscono alle cellule indesiderate l'accesso alla ferita consentendolo solo alle cellule angiogeniche e progenitrici ossee. Queste membrane possono essere usate come rivestimento di impianti dentali e materiali sostitutivi dell'osso oppure le si può usare in maniera indipendente per la rigenerazione ossea o per la limitazione della perdita verticale di tessuto osseo alveolare.

Le membrane OsseoGuard® (Biomax Spa, Vicenza, Italia) in collagene di tipo I ad elevato grado di purezza estratto da tendine di Achille bovino e reticolato con Formaldeide, non permettono una soddisfacente crescita di tessuto osseo alveolare in direzione verticale, come segnalato dal dipartimento di Odontoiatria dell'Università di Padova. Per sopperire a questo difetto sono state testate due diverse funzionalizzazioni per queste membrane: una covalente con chitosano ed una con chitosano funzionalizzato con il peptide GBMP1 $\alpha$ . Il chitosano induce di per sé adesione, proliferazione e differenziazione degli osteoblasti. D'altro canto, GBMP1 $\alpha$  è un peptide della BMP-2 in grado di promuovere proliferazione degli osteoblasti e differenziamento nel fenotipo osteoblastico di cellule staminali. Diversi studi hanno confermato che Chit+GBMP1 $\alpha$  porta a miglioramenti nella deposizione di calcio da parte degli osteoblasti umani e nell'espressione di geni coinvolti nel differenziamento degli osteoblasti.

Sulle membrane funzionalizzate sono state seminati osteoblasti umani prelevati da osso mandibolare per effettuare saggi biologici di proliferazione, deposizione di calcio ed espressione genica. Sono stati inoltre effettuati test meccanici di trazione, analisi FT-IR, XPS e microscopia a due fotoni. Le analisi di microscopia ed FT-IR mostrano un buon grado di funzionalizzazione ed una buona distribuzione di chitosano e chit+GBMP1 $\alpha$ , i saggi biologici forniscono eccellenti risultati nel confronto con la membrana OsseoGuard® non trattata (soprattutto nel caso di chit+GBMP1 $\alpha$ ) ed i test meccanici confermano che i trattamenti di funzionalizzazione non variano in maniera significativa le proprietà meccaniche delle membrane.



# CAPITOLO 1

## INTRODUZIONE

Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità oltre 3,5 miliardi di persone nel mondo soffrono di problemi di salute al cavo orale, in quanto affetti da carie, gengiviti, ascessi, edentulia dovuta alla perdita dei denti in seguito a traumi, tumori, complicazioni post-operatorie o patologie ereditarie. La principale causa di danni al cavo orale è la parodontite, una malattia infiammatoria causata da batteri che lesionano i tessuti di supporto dei denti, sesta patologia cronica più diffusa al mondo.

L'implantologia dentale è, oggigiorno, la tecnica più utilizzata per il rimpiazzo di denti mancanti o che è necessario rimuovere in quanto danneggiati. Un impianto dentale è una struttura composta da materiali alloplastici (di origine non naturale) inserita nei tessuti orali per fornire supporto per protesi dentali fisse o rimovibili. Un impianto è costituito da una o più viti solitamente metalliche e per lo più in titanio, inserite all'interno dei tessuti orali, penetrando mucosa e tessuto osseo mascellare o mandibolare. Le protesi dentali sono strutture solitamente ceramiche che svolgono la naturale funzione dei denti. Possono sostituire un singolo dente venendo apposte su una singola vite oppure unire a ponte più viti rimpiazzando più denti mancanti adiacenti. La percentuale di successo degli impianti dentali è superiore al 90% [1].

L'inserimento della vite danneggia il tessuto osseo, che deve rigenerarsi al meglio post-intervento in tutte le direzioni, andando a saldarsi all'impianto. È fondamentale ottenere una buona integrazione dei materiali innestati con il tessuto osseo del soggetto ricevente, garantendo stabilità alle protesi, una buona guarigione del sito d'impianto senza alterarne la struttura anatomica, ricreando al meglio, geometricamente e morfologicamente, le strutture native. Per favorire la rigenerazione del tessuto osseo, danneggiato da patologie e/o dall'impianto dentale ed ottenere una buona osteointegrazione delle strutture impiantate, si ricorre alle tecniche classiche di ingegneria tissutale. Non sempre, comunque, in caso di parodontite è necessario ricorrere ad impianti dentali: può essere sufficiente utilizzare tecniche di ingegneria tissutale per rigenerare i tessuti danneggiati.

Si possono utilizzare tecniche di ingegneria tissutale anche per limitare la perdita di tessuto osseo in seguito a rimozione di denti danneggiati, prima di procedere ad un impianto.

### 1.1 Il tessuto osseo

Il tessuto osseo è un tessuto connettivo di sostegno caratterizzato dalla mineralizzazione della matrice extracellulare (ECM); è presente in ossa, dentina e cemento dei denti. È costituito da

una componente cellulare immersa in una ECM composta da una fase organica e da una inorganica. Quella organica è costituita per lo più da fibre di collagene e da una componente amorfa ricca di proteoglicani mentre quella inorganica, che rappresenta circa il 65% del peso di un osso, è costituita prevalentemente da fosfato e carbonato di calcio [2].

La componente cellulare è rappresentata da quattro tipi di cellule:

- Osteoblasti;
- Osteoclasti;
- Osteociti;
- Cellule del rivestimento osseo.

L'osso svolge le seguenti funzioni:

- consente la locomozione;
- supporto e protezione dei tessuti molli;
- immagazzinamento di calcio e fosfato;
- protezione del midollo osseo.

Caratteristica peculiare del tessuto osseo è la presenza di cristalli di idrossiapatite ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ), componente minerale che origina dalla nucleazione di ioni fosfato e calcio all'interno di vescicole nella ECM e conferisce alle ossa le loro caratteristiche meccaniche di rigidità, durezza e resistenza.

I cristalli di idrossiapatite si dispongono parallelamente alle lamelle di collagene creando così le lamelle di collagene mineralizzato che costituiscono la tipica struttura lamellare del tessuto osseo. Esse si orientano in maniera differente a seconda della zona di osso in cui si trovano e del tipo di osso che costituiscono. In base alla loro distribuzione è quindi possibile distinguere due tipi di tessuto osseo: tessuto osseo corticale e trabecolare. La composizione delle lamelle ossee in questi due tessuti è la medesima; ciò che varia è la loro orientazione e disposizione tridimensionale, che consente di ottimizzare il peso e la struttura delle ossa in base agli stimoli meccanici a cui sono sottoposte [3].

### **1.1.1 Tessuto osseo corticale o compatto**

Appare come una massa dura, compatta e continua. Si trova nella parte superficiale di tutte le ossa e costituisce la diafisi (parte centrale) delle ossa lunghe. Garantisce rigidità e resistenza alle sollecitazioni meccaniche. È costituito da lamelle ossee (Fig. 1.2) disposte concentricamente a formare gli osteoni (o sistemi di Havers), le unità strutturali dell'osso compatto. Gli osteoni si affiancano gli uni agli altri in maniera compatta e gli spazi residui tra diversi osteoni sono riempiti da strati di lamelle ossee orientate in maniera irregolare. Le lamelle

ossee di ogni strato sono parallele tra loro e orientate in maniera differente rispetto a quelle degli strati adiacenti. Gli spazi che non vengono riempiti si definiscono lacune e canalicoli ed in essi si trovano, solitamente, gli osteociti. All'interno degli osteoni è presente un canale, chiamato Canale di Havers, in cui scorrono vasi sanguigni e nervi [2,3,4].

### 1.1.2 Tessuto osseo trabecolare o spugnoso

È costituito da una rete di trabecole formate da lamelle ossee che non si dispongono in maniera regolare, bensì risultano variamente orientate ed intrecciate lasciando ampi spazi liberi, assumendo una conformazione simile ad una spugna. Questi spazi costituiscono le cavità che contengono il midollo osseo e contribuiscono a rendere le ossa più leggere. Questo tessuto si trova nella parte interna delle ossa, dove non vi sono forti sollecitazioni meccaniche. È presente prevalentemente all'interno di ossa brevi, ossa piatte e nelle epifisi (parti terminali) delle ossa lunghe [2,3,4].

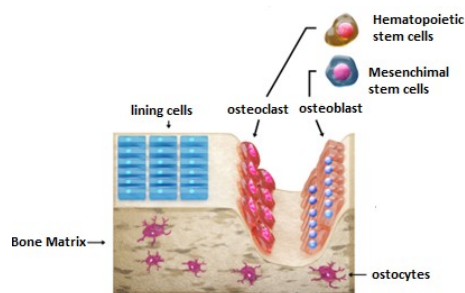


Fig. 1.1: cellule del tessuto osseo [3]

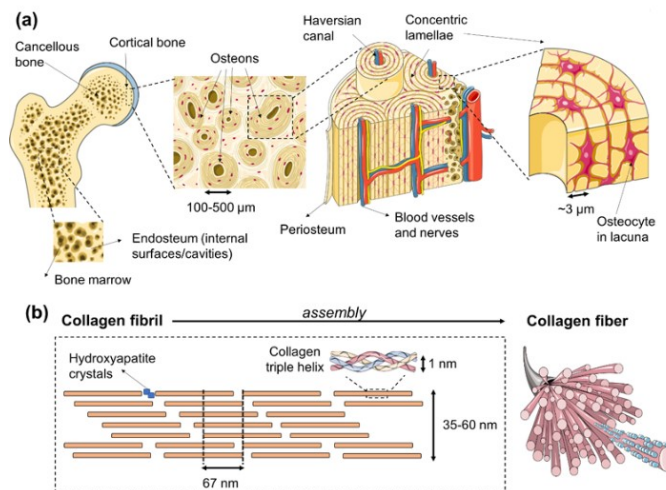


Fig. 1.2: (a) struttura del tessuto osseo (b) formazione della fibra di collagene mineralizzata [4]

L'osso è un organo estremamente dinamico: viene continuamente riassorbito dagli osteoclasti e riformato dagli osteoblasti mentre gli osteociti agiscono come meccanosensori e orchestratori

di questo processo di rimodellamento osseo. Si analizzano ora nel dettaglio i vari tipi cellulari [2,5].

### **1.1.3 Cellule del tessuto osseo**

#### **1.1.3.1 Gli osteoblasti**

Gli osteoblasti sono cellule cubiche che si trovano sulla superficie ossea e costituiscono il 4-6% del totale delle cellule ossee [3,5]. La loro funzione è formare l'osso. Gli osteoblasti secernono verso la matrice ossea l'osteotide (materiale preosseo che contiene già sostanze inorganiche, ma in quantità molto inferiore rispetto al tessuto osseo definitivo). Derivano dalle cellule staminali mesenchimali (MSC), il cui differenziamento verso il lignaggio degli osteoprogenitori richiede l'espressione di geni specifici (es. Runx2) e la sintesi di proteine morfogenetiche ossee (BMP) [6]. Durante la differenziazione degli osteoblasti, si verifica una fase di proliferazione in cui i progenitori degli osteoblasti sono considerati preosteoblasti. Il passaggio agli osteoblasti è caratterizzato da cambiamenti morfologici (diventano cellule grandi e cuboidali) da un aumento dell'espressione del fattore di trascrizione Sp7 e della secrezione di proteine della matrice ossea come l'osteocalcina (OCN), la sialoproteina ossea (BSP) I/II e il collagene di tipo I [2].

La sintesi della matrice ossea da parte degli osteoblasti avviene in due fasi: la deposizione della matrice organica e la sua mineralizzazione. Nella prima fase, gli osteoblasti secernono collagene (principalmente di tipo I), proteine (OCN, osteonectina, BSP II e osteopontina) e proteoglicani, che formano la matrice organica. La mineralizzazione avviene in due fasi: fase vescicolare e fase fibrillare. La fase vescicolare si verifica quando vescicole di matrice vengono rilasciate dal dominio apicale della membrana degli osteoblasti nella matrice ossea neoformata in cui si legano ai proteoglicani che, per via della loro carica negativa, immobilizzano gli ioni calcio immagazzinati all'interno di tali vescicole. I composti contenenti fosfato della matrice vengono degradati dalla fosfatasi alcalina (ALP) secreta dagli osteoblasti, rilasciando ioni fosfato all'interno delle stesse vescicole. Quindi, gli ioni fosfato e calcio all'interno delle vescicole si nucleano, formando i cristalli di idrossiapatite. La fase fibrillare si verifica quando la sovraturazione di ioni calcio e fosfato porta alla rottura delle vescicole ed i cristalli di idrossiapatite si diffondono nella matrice circostante [2,3,5].

### 1.1.3.2 Le cellule del rivestimento osseo

Le cellule del rivestimento osseo sono osteoblasti quiescenti di forma piatta che ricoprono le superfici ossee, dove non si verifica né il riassorbimento né la formazione ossea. Queste cellule mostrano un nucleo sottile e piatto ed il loro citoplasma si estende lungo la superficie ossea. Alcune di queste cellule mostrano processi che si estendono nei canalicoli della ECM e si osservano anche giunzioni tra cellule del rivestimento osseo adiacenti e tra queste cellule e gli osteociti. Queste cellule possono riacquistare, in caso di necessità, la loro attività secretoria, aumentando le loro dimensioni e assumendo un aspetto cuboide. Impediscono l'interazione diretta tra osteoclasti e matrice ossea quando non dovrebbe verificarsi il riassorbimento osseo [2,3].

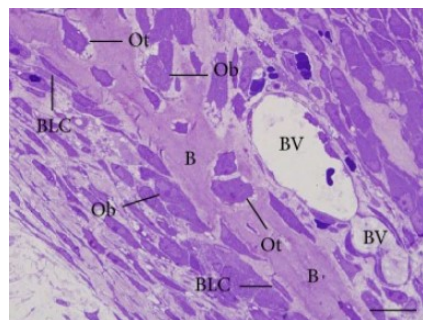


Fig. 1.3: sezione di trabecola ossea (B) colorata con toluidine blue. Si può osservare come gli osteoblasti (Ob) e le cellule di rivestimento osseo (Bone Lining Cells, BLC) siano presenti sulla superficie ossea mentre gli osteociti (Ot) sono intrappolati all'interno della matrice ossea. BV: vaso sanguigno (blood vessel). Scale bar: 15  $\mu\text{m}$ .

### 1.1.3.3 Gli osteociti

Gli osteociti costituiscono il 90-95% delle cellule ossee totali e sono le cellule più longeve (durata di vita fino a 25 anni) [6]. Al termine di un ciclo di formazione ossea, una sottopopolazione di osteoblasti diventa osteociti incapsulati nella matrice ossea generata. Questo processo è accompagnato da riduzione delle dimensioni, diminuzione del numero di organelli e aumento del rapporto nucleo-citoplasma [3]. Gli osteociti hanno morfologia dendritica. Mentre il corpo cellulare si trova all'interno della lacuna, i processi citoplasmatici (fino a 50 per ogni cellula) attraversano i canalicoli, formando il sistema lacuno-canalicolare. Questi processi citoplasmatici collegano gli osteociti agli osteociti vicini tramite giunzioni gap, nonché si collegano ai processi citoplasmatici degli osteoblasti e delle cellule del rivestimento osseo, facilitando il trasporto intercellulare di molecole segnale. Inoltre, il sistema lacuno-canalicolare degli osteociti può portare ossigeno e sostanze nutritive al corpo cellulare [2,3,4]. Gli osteociti agiscono come meccanosensori poiché la loro rete interconnessa ha la capacità di rilevare pressioni e carichi meccanici, aiutando l'adattamento dell'osso alle forze meccaniche

quotidiane. Dopo la stimolazione meccanica, gli osteociti producono diversi messaggeri secondari come adenosin trifosfato ATP, ossido nitrico e calcio che influenzano la fisiologia ossea. Così orchestrano il rimodellamento osseo, regolando l'attività di osteoblasti e osteoclasti [2,6].

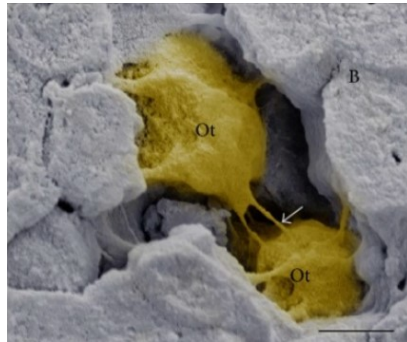


Fig. 1.4: miografia elettronica a scansione in cui si osservano due osteociti (Ot) circondati da matrice ossea (B). La freccia indica il legame tra i processi citoplasmatici dei due osteociti che creano un network interconnesso.

Scale bar: 2 $\mu$ m.

#### 1.1.3.4 Gli osteoclasti

Gli osteoclasti sono cellule multinucleate terminalmente differenziate. Vi sono quattro tipi di domini sulla membrana degli osteoclasti: la zona di ancoraggio e il *ruffled border*, in contatto con la matrice ossea, e i domini secretori basolaterali e funzionali, non in contatto con essa.

A livello del *ruffled border* è presente una H<sup>+</sup>-ATPasi vacuolare che aiuta ad acidificare la zona di riassorbimento e a consentire la dissoluzione dei cristalli di idrossiapatite. Qui protoni ed enzimi (fosfatasi acida tartrato-resistente (TRAP), catepsina K, metalloproteinasi-9 della matrice (MMP-9) ecc.) vengono trasportati in un compartimento chiamato lacuna di Howship dove avviene la degradazione ossea. I prodotti di questa degradazione vengono endocitati attraverso il *ruffled border* e trascitati nel dominio secretorio funzionale della membrana plasmatica [2,3].

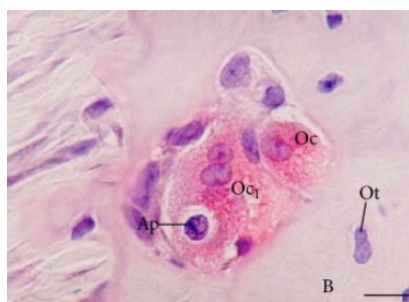


Fig. 1.5: osteoclasti TRAP-positivi (Oc e Oc1) in una lacuna ossea di riassorbimento. B: matrice ossea, Ot: osteocita. Scale bar: 15  $\mu$ m.

## 1.2 La matrice extracellulare

La matrice extracellulare (ECM) è una complessa rete di biomolecole strutturali e funzionali assemblate in diverse architetture tipiche di ciascun tessuto (Fig. 1.6) [7]. Viene prodotta e mantenuta dalle cellule stesse del tessuto che la popolano.

I ruoli della ECM all'interno di ogni tessuto sono:

- conferire al tessuto le sue caratteristiche fisico-meccaniche come rigidità, durezza, viscosità, resistenza meccanica;
- fornire supporto alle cellule del tessuto, circondandole e creando un ambiente funzionale per la loro adesione e sopravvivenza, che permetta loro di svolgere le proprie attività naturali, fondamentali per la sopravvivenza del tessuto stesso;
- costituire la geometria 3D del tessuto, fornendo alle cellule gli spazi e la porosità dei quali necessitano;
- controllare migrazione, proliferazione, differenziamento e forma delle cellule tramite la trasmissione di segnali meccanici e la diffusione di molecole biochimiche;
- immagazzinare sostanze nutritive e molecole segnale, fattori di crescita e di differenziamento;
- favorire la diffusione di sostanze nutritive e gas eliminando tutti i prodotti di scarto generati dall'attività metabolica del tessuto.

La composizione della ECM è simile in tutti i tipi di tessuto e prevede la presenza di proteine fibrose ed eteropolissaccaridi (GAGs e proteoglicani) all'interno di una sostanza di fondo amorfa, composta per lo più da acqua e sali. L'adesione cellulare avviene tra proteine della ECM quali fibronectina, laminina, collagene, vitronectina ecc. e integrine (recettori della membrana cellulare) e proteine del citoscheletro come actina, talina e vinculina.

Le proteine fibrose più rilevanti per ruolo e quantità sono collagene ed elastina [7].

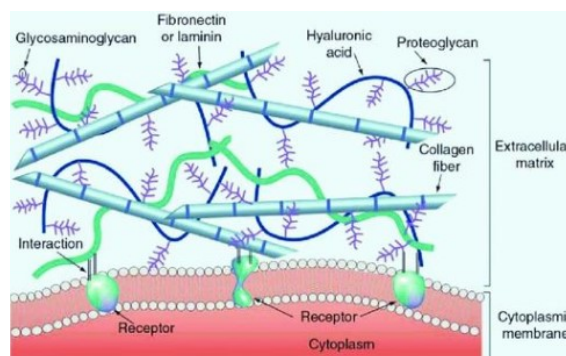


Fig. 1.6: struttura schematica della ECM

Il **collagene** è una proteina strutturale presente in tutti i distretti corporei. È la più abbondante nella ECM di ogni tessuto connettivo, costituisce circa il 25% della massa proteica totale nei mammiferi e rappresenta circa il 6% del peso corporeo umano.

La più stabile struttura del collagene è quella a tripla elica destrorsa, tipica della molecola di tropocollagene (unità base del collagene), formata a sua volta da tre catene polipeptidiche elicoidali con avvolgimento sinistrorso [8]. Ogni catena polipeptidica è costituita da sequenze amminoacidiche nelle quali si ripetono triplette costituite da: glicina, prolina ed idrossiprolina. La sequenza Gly-Pro-Hyp è la più comune (circa il 12%), le sequenze Gly-Pro-Y e Gly-X-Hyp rappresentano circa il 44% e le sequenze Gly-X-Y costituiscono il restante 44%, in cui X e Y sono un qualunque amminoacido [9]. Più molecole di tropocollagene sono unite da legami a idrogeno e ponti covalenti per costituire le microfibrille; a loro volta più microfibrille si associano per costituire la fibrilla. L'insieme di più fibrille unite da legami interfibrillari determina la formazione della fibra collagene (Fig. 1.7).

Il ruolo del collagene è il conferimento di stabilità meccanica alla matrice e supporto e protezione alle cellule [8].

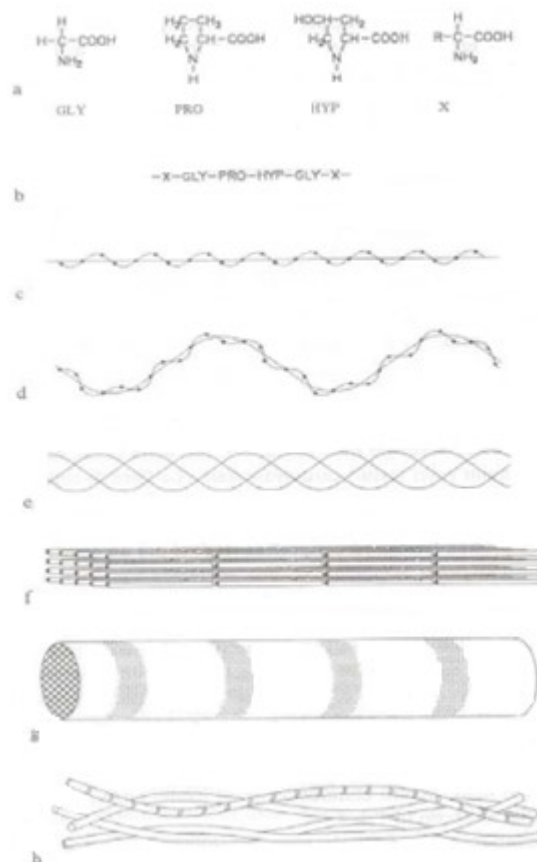


Fig. 1.7: struttura del collagene: (a) amminoacidi costituenti il collagene (X= un qualunque AA), (b) catena molecolare, (c) singola elica, (d) singola elica avvolta, (e) tripla elica avvolta, (f) microfibrille, (g) fibrilla, (h) fibre

L'**elastina** è una proteina fibrosa elastica (modulo elastico 0.6 MPa) che permette a molti tessuti di tornare alla loro forma originaria dopo essere stati sottoposti a forze di trazione o compressione. Conferisce elasticità, flessibilità e resilienza alla ECM. È costituita da fibre di diametro inferiore a quelle del collagene ma molto più lunghe, avvolte su sé stesse in assenza di carico, a creare estesi reticoli nella tipica conformazione a gomitolo (Fig. 1.8). Se sottoposte a carichi meccanici le fibre si srotolano e, essendo perfettamente elastiche, andranno incontro ad un ritorno totale nella conformazione indeformata una volta rimosso il carico, senza comportamento viscoso [8].

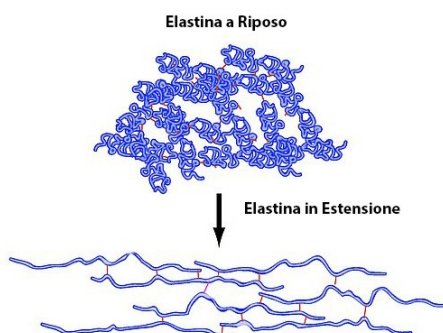


Fig. 1.8: struttura dell'elastina

La **sostanza di fondo** è costituita da H<sub>2</sub>O e sali in essa disciolti nonché numerosi tipi di eteropolisaccaridi.

Gli **eteropolisaccaridi** costituenti la ECM sono principalmente glicosaminoglicani (GAGs) e proteoglicani.

I **GAGs** sono eterosaccaridi lineari costituiti da unità strutturali composte a loro volta da due monosaccaridi: un amminozucchero e un'unità monosaccaridica acida. Hanno notevoli dimensioni che li porta ad occupare molto spazio (pertanto hanno anche funzione riempitiva all'interno della ECM) e grazie alla loro carica superficiale negativa (dovuta alla presenza di zuccheri deprotonati) sono in grado di attirare grandi quantità di H<sub>2</sub>O, conferendo al tessuto caratteristiche di incomprimibilità (carichi di compressione fanno espellere le molecole di H<sub>2</sub>O dai GAGs, lasciando che le cariche negative superficiali dei GAGs entrino in contatto respingendosi) e idratazione. Regolano la permeabilità del tessuto e attorno ad essi sono dispersi fattori di crescita. Acido ialuronico, eparina e condroitin solfato sono esempi di GAGs (Fig. 1.9) [8].

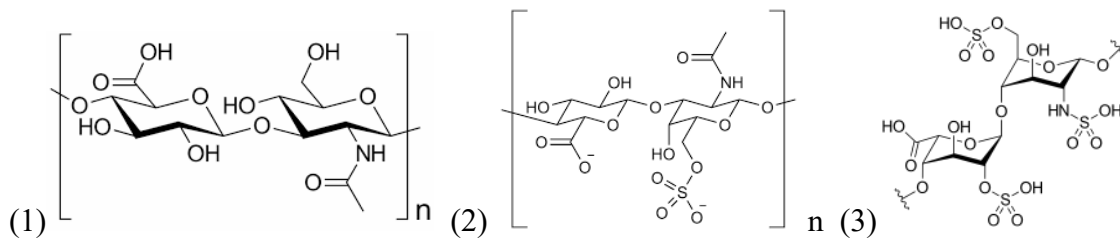


Fig1.9: struttura chimica di (1) acido ialuronico (2) condroitin solfato (3) eparina

I **proteoglicani** sono macromolecole composte da un asse centrale proteico (core) a cui sono unite covalentemente lunghe catene di disaccaridi o glicosamminoglicani (GAGs) (Fig. 1.10). I proteoglicani presenti nella matrice si associano non covalentemente e in gran numero a una singola molecola di acido ialuronico. Costituiscono una struttura altamente interconnessa che stabilizza la matrice in ambienti acquosi [8].

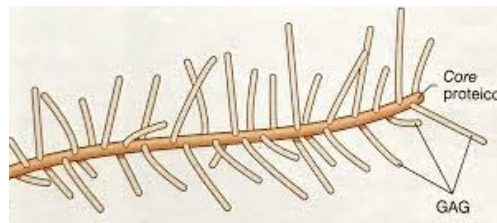


Fig. 1.10: struttura dei proteoglicani

### 1.2.1 La matrice extracellulare ossea

L'osso è composto da sali inorganici e matrice organica. La matrice organica è costituita al 90% da collagene (principalmente di tipo I) e proteine, tra cui osteocalcina, osteonectina, osteopontina, fibronectina e sialoproteina ossea II, proteine morfogenetiche ossee (BMP), fattori di crescita e proteoglicani ricchi di leucina, tra cui decorina, biglicano, lumicano, osteoaderina [3]. Il materiale inorganico è costituito prevalentemente da ioni fosfato e calcio. Sono presenti anche bicarbonato, sodio, potassio, citrato, magnesio, carbonato, fluorite, zinco, bario e stronzio. Gli ioni calcio e fosfato si nucleano per formare i cristalli di idrossiapatite ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ). Insieme al collagene, le proteine della matrice formano uno *scaffold* per la deposizione di idrossiapatite (Fig. 1.11), che conferisce la tipica rigidità e resistenza al tessuto osseo [7]. I cristalli di idrossiapatite, infatti, hanno elevata resistenza e rigidità, con modulo elastico  $E \cong 165 \text{ GPa}$  mentre il collagene ha un modulo elastico variabile con la deformazione ma per gli stati deformativi usuali si può considerare un valore pari a  $E \cong 2 \text{ GPa}$ . Il comportamento meccanico del tessuto corticale è caratterizzato da una forte anisotropia dovuta alla particolare orientazione delle lamelle ossee [10] ed il modulo elastico complessivo dell'osso corticale in direzione parallela agli osteoni è di circa 18 GPa. Il collagene aumenta la

duttilità del tessuto osseo, migliorandone il comportamento post-elastico. Aumenta la capacità di assorbimento degli urti e limita il rischio di fratture (aumento della tenacità del tessuto).

La ECM ossea fornisce supporto meccanico e può rilasciare diverse molecole che interagiscono con l'attività delle cellule ossee e, di conseguenza, partecipa al rimodellamento osseo [3,4,6].

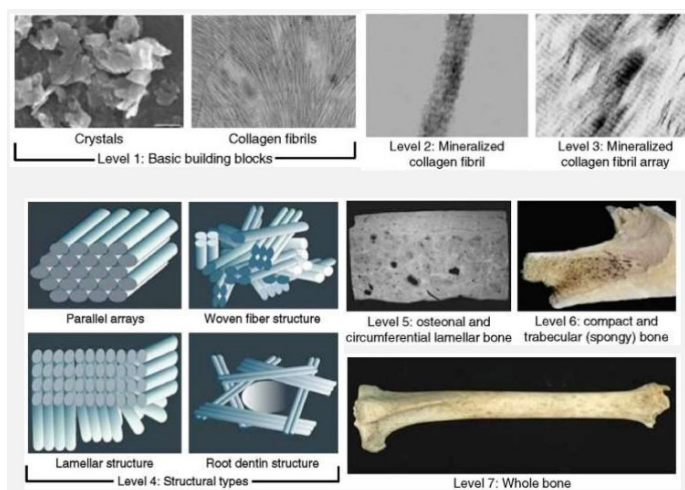


Fig. 1.11: struttura gerarchica del tessuto osseo

Le integrine sono le molecole di adesione più comuni per l'interazione tra le cellule e la matrice ossea. Osteoblasti, osteociti e osteoclasti interagiscono con la ECM ossea mediante integrine che si legano all'RGD e ad altre sequenze presenti nelle proteine della ECM come osteopontina, fibronectina, collagene e sialoproteina ossea.

Per quanto riguarda gli osteociti le interazioni si verificano tra il corpo cellulare e la ECM ossea della parete della lacuna e tra la parete dei canalicoli e i processi degli osteociti. L'osteocita e i suoi processi sono circondati da una matrice pericellulare non organizzata e fluida. Rilevando i movimenti del flusso di tale fluido, provocati da forze di tipo meccanico, è possibile per gli osteociti svolgere le loro funzioni di meccanocettori [2,7].

### 1.3 Il rimodellamento osseo

Il rimodellamento osseo è un processo complesso ottenuto dalle azioni coordinate di osteoblasti, osteociti, osteoclasti e cellule del rivestimento osseo (tutte insieme formano la struttura temporanea chiamata unità multicellulare di base (BMU)) e prevede la sostituzione del vecchio osso con quello nuovo, in un ciclo composto da tre fasi [5,11]:

- inizio del riassorbimento osseo da parte degli osteoclasti;
- passaggio (o periodo di inversione) dal riassorbimento alla formazione del nuovo osso;

- formazione ossea da parte degli osteoblasti (Fig. 1.12) [12].

Il rimodellamento osseo è necessario per la guarigione di fratture, per l'adattamento dello scheletro agli stimoli meccanici esterni e per l'omeostasi del calcio [11]. Uno squilibrio del riassorbimento e della formazione dell'osso provoca diverse malattie ossee. Ad esempio, un aumento anomalo dell'attività degli osteoclasti porta a malattie come l'osteoporosi, dove il riassorbimento supera la formazione causando una diminuzione della densità ossea e un aumento delle fratture. Nella parodontite una proliferazione batterica induce la migrazione delle cellule infiammatorie che producono mediatori chimici che stimolano la migrazione degli osteoclasti portando ad un aumento anomalo del riassorbimento osseo, che contribuisce alla perdita delle inserzioni dei denti e alla progressione della malattia. Al contrario, nell'osteopetrosi le mutazioni genetiche portano a un ridotto riassorbimento osseo, con conseguente accumulo sproporzionato di massa ossea [2].

L'equilibrio tra formazione e riassorbimento dipende dall'azione di diversi fattori locali e sistemici come ormoni, citochine, chemochine e stimolazione biomeccanica.

All'interno di cavità ossee che devono essere rimodellate si formano la BMU [11] costituita, anteriormente, da un gruppo di osteoclasti a formare il cono di taglio e, posteriormente, da un gruppo di osteoblasti a formare il cono di chiusura. È coperta da cellule del rivestimento osseo connesse alle cellule del rivestimento osseo superficiali, a loro volta in comunicazione con gli osteociti racchiusi all'interno della matrice ossea [5,12].

Nella fase iniziale del ciclo, sotto l'azione di fattori osteoclastogenici, le cellule staminali ematopoietiche si differenziano in osteoclasti maturi che avviano il riassorbimento osseo.

Durante il ciclo ci sono comunicazioni tra le cellule ossee (meccanismo di accoppiamento) tramite fattori di accoppiamento che vengono rilasciati dalla matrice ossea dopo il riassorbimento effettuato dagli osteoclasti. Esempi sono *insuline-like growth factor* (IGF),  $\beta$ -*transforming growth factor* (TGF- $\beta$ ), *Bone Morphogenetic Protein* (BMP), *Fibroblasts Growth Factor* (FGF) e fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF).

Un'altra categoria di molecole chiamate semaforine (che comprendono un'ampia famiglia di glicoproteine) è coinvolta nella comunicazione delle cellule ossee: durante la fase iniziale, gli osteoclasti esprimono un fattore chiamato semaforina4D (Sema4D) che si lega al suo recettore (Plexin-B1) presente nei preosteoblasti e ne inibisce la differenziazione in osteoblasti. Al contrario, Sema3A espresso dagli osteoblasti è un inibitore dell'osteoclastogenesi.

EphrinB2 è una molecola legata alla membrana degli osteoclasti maturi, che si lega all'ephrinB4, che si trova nella membrana plasmatica degli osteoblasti. Il legame ephrinB2/ephrinB4 promuove la differenziazione degli osteoblasti. Inoltre, gli osteoclasti

maturi secernono una serie di fattori che stimolano la differenziazione degli osteoblasti (es. le molecole di segnalazione Wnt10b, BMP6 ecc.).

Anche gli osteociti producono fattori che influenzano l'attività degli osteoblasti e degli osteoclasti. Ad esempio, il carico meccanico stimola gli osteociti a produrre fattori con azione anabolica sull'osso mentre lo scarico meccanico stimola gli osteociti a produrre fattori inibitori dell'attività degli osteoblasti, nonché fattori specifici che stimolano l'osteoclastogenesi locale.

È stato dimostrato che l'apoptosi degli osteociti agisce come un segnale chemiotattico per il reclutamento locale di osteoclasti [2,5,11,12].

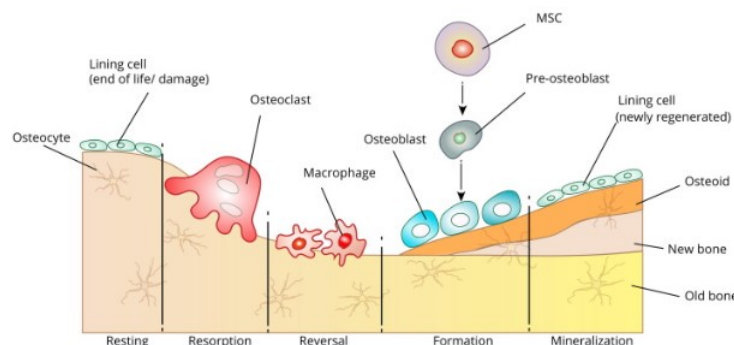


Fig. 1.12: il processo di rimodellamento osseo [12]

## 1.4 Denti, tessuto osseo alveolare e parodonto

I **denti** sono costituiti da un tessuto calcificato chiamato dentina, secreto dagli odontoblasti, composto da collagene, sialofosfoproteina della dentina, proteina della matrice dentinale e idrossiapatite. Circonda la polpa, ricca di cellule simili ai fibroblasti, vasi sanguigni e nervi. La parte esterna della dentina è ricoperta da uno strato di smalto secreto dagli ameloblasti, le cellule epiteliali orali. È il tessuto più duro del corpo umano e le sue principali proteine sono amelogenina (90%), ameloblastina, smaltina e tuftelina ed è privo di collagene. La radice ancora saldamente il dente all'osso alveolare tramite il parodonto (Fig. 1.13) [12].

L'**osso alveolare** è una componente caratteristica del tessuto osseo mascellare e mandibolare, caratterizzato da cavità dette alveoli dentali, in cui alloggiavano le radici dei denti. Le pareti degli alveoli sono rivestite da osso compatto mentre l'area compresa tra essi è occupata da osso trabecolare. Quando un dente e la sua radice vengono persi non si ha più un carico masticatorio trasmesso dal dente all'osso alveolare; esso, quindi, va incontro a riassorbimento senza nuova apposizione ossea, riducendosi fino a scomparire. L'osso basale mascellare e mandibolare mantengono intatte le proprie dimensioni a prescindere dalla presenza dei denti. Pertanto è necessario reintegrare quanto prima elementi dentari persi tramite protesi dentarie o implantologia [13,1].

Il **parodonto** comprende osso alveolare, legamento parodontale, cemento radicolare e gengiva e ha la triplice funzione di:

- ancorare il dente al tessuto osseo;
- meccanoccezione di contatto e pressione;
- conservare l'integrità dei tessuti coinvolti nella masticazione.

Agisce come un ammortizzatore per assorbire gli urti dati da masticazione e deglutizione [15].

Il **legamento parodontale** è la struttura che si interpone tra cemento della radice del dente ed osso alveolare, mantenendo la radice ancorata all'interno dell'alveolo e permettendo un'elasticità tale da distribuire le forze masticatorie su un'ampia superficie dell'osso alveolare. È inoltre responsabile della percezione della distanza tra le arcate dentarie durante la masticazione. È un tessuto connettivo molle composto da fibre collageniche di tipo I immerse in una sostanza di fondo (glicosaminoglicani, glicoproteine e acqua al 70%) orientate diversamente a seconda della zona in cui si trovano, e da diversi tipi cellulari tra cui osteoblasti e cementoblasti per la deposizione ossea, fibroblasti per il rimodellamento del legamento stesso, cellule mesenchimali indifferenziate, macrofagi, osteoclasti e cementoclasti per il riassorbimento osseo.

La sua funzione è:

- assicurare il dente ai tessuti contigui;
- proteggere i tessuti circostanti da eccessive sollecitazioni, trasformando le forze compressive in forze di tensione sull'osso alveolare, stimolando il rimodellamento osseo;
- fornire stabilità antirotazionale;
- garantire l'adeguamento oclusale all'entità dei carichi masticatori regolando i movimenti della mandibola .

A livello del colletto dentale assume forma circolare, formando un anello (sigillo dento-gengivale) che impedisce il passaggio sotto la gengiva di saliva, cibo, liquidi e batteri [15].

La **gengiva** è un tessuto connettivo molle che circonda i denti e ricopre il processo alveolare. È di colore rosa corallo, opaca e compatta. Si estende dal margine gengivale libero connesso alla corona dentale (parte esposta del dente) fino alla giunzione mucogengivale, dove continua con la mucosa alveolare che ricopre il pavimento orale. È ancorata con fasci fibrosi al cemento dentale e all'osso alveolare, risultando immobile rispetto al tessuto sottostante [16].

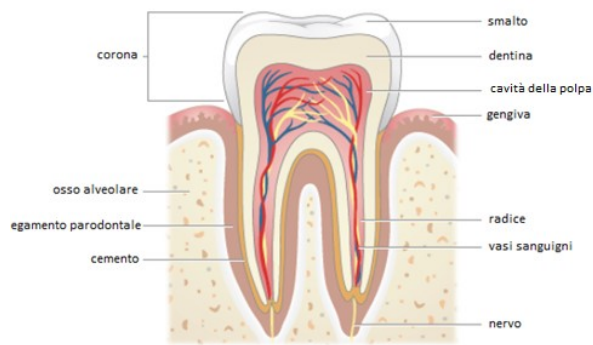


Fig. 1.13: rappresentazione schematica di dente con relative componenti, osso alveolare e parodonto

## 1.5 Ingegneria tissutale

L'ingegneria tissutale (TE) è un campo di ricerca interdisciplinare che utilizza cellule viventi, materiali biocompatibili e adeguati fattori biochimici (es. fattori di crescita) e fisici (es. carichi meccanici ciclici) in combinazione, per creare strutture simili ai tessuti nativi (Fig. 1.14). La prima definizione di TE fu data dal Dr. Langer nel 1993[17], e fu: "*an interdisciplinary field that applies the principles of engineering and life sciences toward the development of biological substitutes that restore, maintain, or improve tissue function or a whole organ*". Infatti, l'obiettivo finale è l'impianto di questi costrutti tissutali all'interno del corpo per riparare una lesione o rimpiazzare la funzione di un organo malato o danneggiato. Tali funzioni possono essere strutturali (es. ossa, cartilagine), di protezione e di trasporto (es. pelle, vasi sanguigni) o biochimiche e secretorie (es. fegato e pancreas) [18]. Nell'ingegneria tissutale gli approcci di progettazione possono includere: solo cellule (approccio *scaffold free*), cellule e *scaffold* o solo *scaffold* [19].

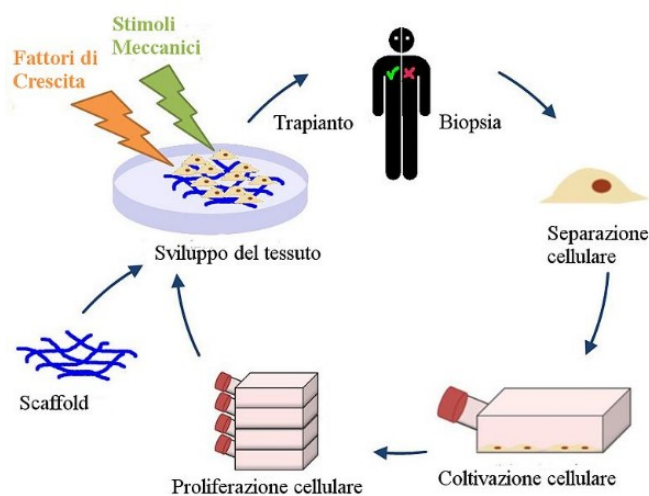


Fig. 1.16: schema concettuale alla base dell'ingegneria tissutale

### 1.5.1 Scaffold

Gli *scaffold* sono strutture 3D il cui ruolo è simulare la ECM fornendo un sostegno alle cellule che le permetta di sopravvivere svolgendo le loro funzioni come nel tessuto nativo, rifornendole di sostanze nutritive e stimoli, rendendo possibile la creazione di un nuovo tessuto funzionale [17]. Possono essere impiegati come impianti di lunga durata o come strutture temporanee. In quest'ultimo caso fungono da supporto e guida per la crescita e l'organizzazione del nuovo tessuto degradandosi quando non sono più necessari.

Gli scopi principali degli *scaffold* sono:

- Favorire adesione, migrazione, proliferazione e differenziamento cellulare;
- Ritenzione e presentazione alle cellule di fattori biochimici;
- Costituire un ambiente poroso per la diffusione dei nutrienti, dei prodotti cellulari e di scarto;
- Fornire stabilità meccanica per favorire la vitalità cellulare e l'integrazione con il tessuto nativo di cui vanno mimate le proprietà meccaniche;

Gli *scaffold* possono essere creati con biomateriali naturali o sintetici, con differenti geometrie, porosità e proprietà superficiali (Fig.1.15). Le proprietà desiderate sono [12,17,20]:

- biocompatibilità, biorisorbibilità e biodegradabilità con prodotti di degradazione non tossici e in grado di essere escreti dall'organismo senza interferenza con altri organi;
- bioattività;
- permeabilità superficiale per consentire il trasferimento di fluidi biologici;
- rugosità superficiale, geometria e porosità per promuovere l'adesione e proliferazione cellulare;
- proprietà meccaniche analoghe a quelle del tessuto da rigenerare;
- rate di degradazione controllato per trasferire il carico gradualmente al tessuto neogenerato;
- assenza di citotossicità, tumorigenicità e cancerogenità e induzione di minima risposta infiammatoria;
- compatibilità con soluzioni acquose e condizioni fisiologiche.

Una volta impiantati devono consentire una corretta colonizzazione da parte delle cellule dell'ospite oppure vi si possono seminare *in vitro* diversi tipi di cellule in grado di promuovere formazione tissutale *in vivo* differenziandosi nelle cellule del tessuto desiderato (se non sono cellule primarie) o rilasciando molecole solubili specifiche. In particolare, le cellule devono aderire, funzionare normalmente, proliferare, differenziarsi e produrre nuova matrice [20].

Un'altra considerazione importante per i costrutti di ingegneria tissutale è la presenza di stimoli meccanici come carichi meccanici ciclici, forze di taglio e presenza di fluidi [8]. Il 3D *bioprinting* è una delle tecniche più utilizzate nella produzione di *scaffold* poiché consente di ottenere porosità e geometrie precise e controllabili. Un'altra tecnica ampiamente utilizzata è l'*elettrospinning*.

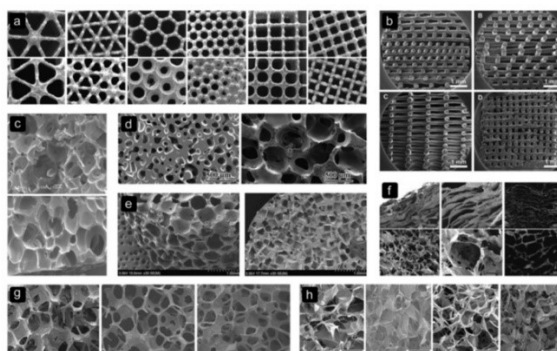


Fig. 1.15: diversi esempi di dimensioni di pori, forme e biomateriali per scaffold per TE

### 1.5.2 Cellule

Nell'ambito dell'ingegneria tissutale si utilizzano cellule da fornire in quantità sufficiente per la creazione di un costrutto funzionale, adeguatamente popolato e in grado di svolgere le funzioni richieste. Esse sono tipicamente prelevate tramite biopsia dal paziente stesso che necessita l'impianto del costrutto (cellule autologhe) e possono essere cellule primarie già differenziate o cellule staminali a vario grado di differenziazione.

Le **cellule primarie** sono cellule mature specifiche di un determinato tessuto, prive di alcuna possibilità di ulteriore differenziamento e vengono prelevate direttamente dal tessuto danneggiato, che spesso risulta essere in quantità molto limitata, rendendo pertanto difficile l'utilizzo di questo tipo di cellule. Il pro del loro impiego è l'ottima compatibilità immunologica con il paziente e con il sito di impianto. Per contro, rispetto a tutti i tipi di cellule staminali, hanno un rate di proliferazione *ex vivo* assai basso (che rende complesso e dispendioso in termini di tempo l'ottenimento del numero di cellule necessario per il popolamento dello *scaffold*) associato ad una non trascurabile probabilità di de-differenziazione durante la loro coltura *in vitro*.

Le **cellule staminali** sono cellule non differenziate, capaci di differenziarsi in diversi tipi cellulari sotto determinati stimoli meccanici o biochimici. Possiedono due proprietà che le rendono attraenti per l'ottenimento di grandi quantità cellulari:

- autorinnovamento

- pluripotenza, ovvero capacità di differenziarsi in cellule di più lignaggi (insieme di cellule specializzate che derivano da una cellula madre originale)

Esse si dividono, in base al loro grado di differenziamento, in cellule staminali **totipotenti**, **pluripotenti**, **multipotenti**, **oligopotenti**, **unipotenti** (Fig.1.16).

Le cellule staminali **totipotenti** sono identificabili con lo zigote (formato dall'unione dei gameti maschile e femminile) da cui si generano tutte le cellule ed i tessuti dell'organismo.

Le cellule staminali **pluripotenti** possono differenziarsi in tutte le cellule dell'organismo eccetto quelle extraembrionali. Si dividono in **cellule staminali embrionali (ESC)** e **cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC)**. Le prime hanno la capacità di proliferare dividendosi continuamente senza differenziarsi e, come detto, all'occorrenza e con i dovuti stimoli è possibile farle differenziare in qualsiasi cellula dell'organismo; sono però soggette a problemi di natura etica e non possono mai essere autologhe. Pertanto, presentano minore compatibilità immunologica con il ricevente. Le seconde sono cellule già differenziate di uno specifico tessuto del donatore riportate allo stato di pluripotenza tramite specifici trattamenti genici. A differenza delle ESC possono essere autologhe e non sono soggette a restrizioni etiche.

Le cellule staminali **multipotenti** (cellule progenitrici) possono differenziarsi in tutte le cellule che compongono un singolo tessuto specifico. Un esempio sono le cellule staminali **adulte**, cellule non differenziate presenti all'interno di un tessuto in grado di auto-rinnovarsi per poi differenziarsi all'occorrenza, per riparare il tessuto stesso. Anch'esse possono essere autologhe, limitando i problemi di compatibilità. Per contro, sono difficili da isolare dal tessuto da cui provengono e sono in grado di sopravvivere esclusivamente all'interno della loro nicchia.

Le cellule staminali **oligopotenti** (precursori) sono in grado di differenziarsi solo in alcuni tipi di cellule che compongono uno specifico tessuto mentre le cellule staminali **unipotenti** (cellule somatiche) possono differenziarsi solo in un unico tipo di cellule [21].

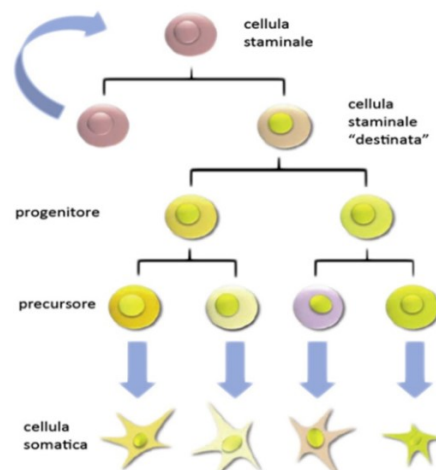


Fig. 1.16: schema gerarchico delle cellule staminali

### 1.5.3 Biomolecole segnale

Biomolecole segnale solubili come fattori di crescita, di adesione e di differenziazione vengono utilizzate per facilitare l'integrazione tra *scaffold* e cellule. Tra i fattori chimici solitamente applicati ci sono le proteine morfogenetiche ossee (BMP), il fattore di crescita dei fibroblasti ( $\beta$ FGF o FGF-2), il fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF) e il fattore di crescita  $\beta$ -trasformante (TGF- $\beta$ ) [22]. Essi possono essere incorporati nello *scaffold* durante la fabbricazione e l'erogazione controllata ne può aumentare il tempo di rilascio.

### 1.6 I biomateriali

Nell'ambito dell'ingegneria tissutale si possono utilizzare metalli, ceramiche, polimeri naturali, sintetici o compositi e *hydrogel* [17]. Negli anni si sono succedute tre generazioni di biomateriali. La prima, rappresentata prevalentemente da materiali metallici, aveva come caratteristica peculiare la bioinerzia (nessuna reazione provocata nell'organismo una volta impiantati). La seconda (metalli porosi) e la terza (prevalentemente polimeri e *hydrogel*) mostrano biodegradabilità e bioattività (capacità di suscitare una reazione positiva nell'organismo). Quest'ultima è ottenibile arricchendone la superficie con fattori di crescita o sequenze adesive [23] come verrà successivamente descritto.

I **metalli** (titanio, acciaio, cobalto ecc.) non sono biodegradabili e sono scarsamente lavorabili, di facile produzione ed elettricamente e termicamente conduttivi. Hanno eccellenti proprietà meccaniche (duttilità, resistenza alla fatica ecc.) ma scarsa capacità di integrazione coi tessuti nativi e vengono solitamente circondati da una capsula di tessuto fibrotico che ne limita il funzionamento. Degradandosi rilasciano ioni metallici, potenzialmente dannosi per l'organismo [23].

I **ceramici** sono duri ma fragili, dotati di buona resistenza meccanica ma costosi. Idrossiapatite, biovetri e ceramiche calcio-fosfato hanno proprietà meccaniche molto simili a quelle dell'osso e sono biocompatibili, bioattivi, biorisorbibili, dotati di elevata resistenza a compressione e basso coefficiente, spesso usati come rivestimento per materiali metallici. Il loro rate di degradazione è estremamente lento [23].

I **polimeri** sono costituiti da lunghe catene lineari, ramificate o reticolate, date dalla ripetizione schematica o randomica di monomeri (le unità di base), legate tra loro tramite legami covalenti.

I **polimeri naturali** come il collagene, i glicosamminoglicani (GAGs), la chitina ed il chitosano possono simulare molto bene la ECM naturale e sono dotati di biodegradabilità,

elevatissima biocompatibilità e ottima bioattività, favorendo adesione e proliferazione cellulare; tuttavia, la diversità e complessità degli stimoli che producono non consentono di avere il pieno controllo sullo sviluppo e sul differenziamento cellulare. Hanno inoltre scarse proprietà meccaniche [17].

I **polimeri sintetici** come polianidridi, acido poliglicolico (PGA), acido polilattico (PLA), policaprolattone (PCL) hanno migliori caratteristiche meccaniche, maggiore stabilità e sono più facili da produrre in quanto compatibili con numerose tecniche di fabbricazione, ma sono caratterizzati da minore biocompatibilità, maggiore immunogenicità e probabilità di produzione di prodotti di degradazione dannosi o nocivi per le cellule [17]. Modulando la loro composizione è possibile creare *scaffolds* aventi rate di degradazione controllati.

Si ricorre a materiali **compositi**, utilizzando contemporaneamente due o più elementi, per sfruttare i vantaggi degli uni per compensare i difetti degli altri. Ogni materiale utilizzato nella creazione di un composito deve essere biocompatibile [17].

Gli **hydrogel** sono materiali polimerici idratati (contenuto d'acqua maggiore del 30% del peso), composti da catene polimeriche idrofile, naturali o sintetiche. La loro integrità strutturale dipende da legami incrociati formati dalle catene polimeriche (legami covalenti) e da interazioni fisiche (legami non-covalenti). Gli hydrogel utilizzati per *scaffolds* sono biodegradabili, hanno proprietà strutturali e meccaniche simili all'ECM di molti tessuti [15], una struttura porosa che favorisce la diffusione di nutrienti e gas [3] e possono essere impiantati in maniera poco invasiva. I materiali che possono essere usati per formare *hydrogel* sono: polimeri sintetici come l'acido poliacrilico (PAA), il polivinilpirrolidone (PVP), il polivinil alcol (PVA), polimeri naturali come l'alginato, il chitosano, il collagene, la fibrina e l'acido ialuronico (HA). Gli *hydrogel* sintetici presentano proprietà chimiche facilmente controllabili e riproducibili mentre quelli derivati da polimeri naturali possiedono componenti o proprietà simili all'ECM naturale. Agenti reticolanti (es. glutaraldeide, carbodiimmide idrosolubile) possono essere utilizzati per ridurre i tassi di degradazione [14]. È possibile promuovere la bioattività di questo tipo di biomateriali tramite l'accoppiamento con proteine, fattori di crescita o farmaci [3].

Si possono produrre scaffolds di tessuto decellularizzato privando il tessuto donatore di tutta la componente cellulare di cui è composto [24].

### 1.6.1 Il collagene

Il collagene è il principale costituente della ECM, fornisce supporto per la crescita cellulare e conferisce resilienza meccanica, integrità strutturale e biologica ai tessuti. Si presenta in

morfologie molto diverse tra i vari tessuti, conferendo loro specifiche funzioni. La sua struttura è quella descritta in precedenza. La molecola di tropocollagene può essere costituita da tre catene  $\alpha$  identiche o da due catene identiche e una diversa, o anche da tre catene diverse per formare una tripla elica completa. Nel caso del collagene fibrillare le molecole di tropocollagene (300 nm di lunghezza e 1,5 nm di diametro) si auto-assemblano in fibrille striate incrociate. Esse mostrano un preciso allineamento assiale, in cui si ha sovrapposizione sfasata di triple eliche appartenenti a strati diversi e un gap tra le triple eliche (allineate testa-coda) appartenenti allo stesso strato. Le diverse catene  $\alpha$ , la loro lunghezza e la loro combinazione delineano diversi tipi di collagene e attualmente sono 29 quelli conosciuti, divisi in 4 gruppi. Il gruppo 1 è quello dei collagene fibrillari (tra cui tipo I, II, III e V), il gruppo 2 è quello dei collagene della membrana basale, il gruppo 3 è quello dei collagene a catena corta e il gruppo 4 è quello dei collagene fibrilla-associati con triple eliche interrotte (FACIT). I collagene di tipo I, II e III costituiscono circa l'80-90% del collagene totale del corpo. Quello di tipo I è il più abbondante, costituito da fibre che possono avere una lunghezza di oltre 500  $\mu\text{m}$ , un diametro di 500 nm e contenere più di 107 molecole [8,9].

I punti di forza del collagene per la produzione di *scaffolds* per TE sono:

- abbondante presenza nei tessuti dell'organismo che fa sì che non venga percepito come corpo estraneo;
- capacità di trasmettere segnali cellulari;
- possibilità di creare strutture di varie geometrie (film, membrane, nanotubi ecc.);
- biodegradabilità e biorisorbibilità, senza generazione di sottoprodotti dannosi;
- bioattività e biocompatibilità, con elevata capacità di far aderire e proliferare ogni tipo di cellula e grande capacità di favorire la differenziazione di osteoblasti e fibroblasti;
- possibilità di utilizzarlo per la creazione di idrogel.

Per contro, ha scarse proprietà meccaniche e termiche e come tutti i polimeri naturali è soggetto a batch-to-batch variation, pertanto la sua struttura non è ripetibile. Potrebbe dar luogo a reazioni immunologiche indesiderate una volta impiantato, anche veicolando patogeni, rischio a cui sono sottoposti tutti i biomateriali naturali. Esistono metodi di reticolazione (cross-linking) fisici, chimici e biologici per migliorarne le proprietà meccaniche e la stabilità. La produzione di collagene sintetico, l'utilizzo di materiali mimetici del collagene o la produzione di collagene ricombinante sono valide soluzioni per il problema della *batch-to-batch variation* e del rischio immunologico del collagene naturale [9].

Per le applicazioni biomediche, la pelle dei mammiferi e i tessuti tendinei (di origine suina, bovina e ovina) sono la fonte primaria di collagene di tipo I, mentre il collagene di tipo II viene estratto principalmente da tessuti cartilaginei di bovini e suini [9].

### 1.6.2 Il chitosano

Il chitosano è un polisaccaride lineare naturale che si ottiene tramite la reazione di parziale deacetilazione della chitina (Fig. 1.17), catena lineare costituita dalla ripetizione di N-acetilglucosammina e principale costituente dell'esoscheletro di crostacei ed insetti [25,26,27]. Dunque, i monomeri che costituiscono il chitosano sono glucosammina e N-acetilglucosammina (il cui rapporto ne determina il grado di deacetilazione, variabile tra 50% e 95%) legate tramite legami glicosidici  $\beta$  (1-4). Il chitosano deacetilato al 100% è cristallino, i gradi intermedi determinano una struttura semicristallina. Il grado di deacetilazione influisce sulla capacità adesiva cellulare e sulla biodegradabilità [25].

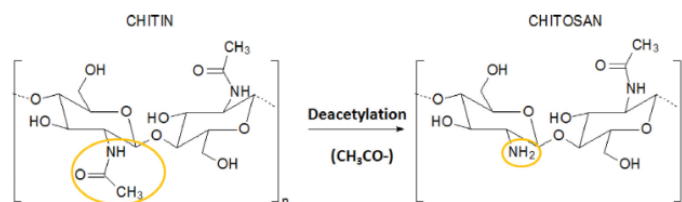


Fig. 1.17: deacetilazione della chitina

I punti di forza del chitosano nell'ambito della TE sono: biocompatibilità, biodegradabilità, non tossicità, non immunogenicità, capacità di contribuire alla guarigione delle ferite stimolando il sistema immunitario e proprietà antiossidanti [25,26,27].

La biocompatibilità del chitosano deriva dalla sua composizione monomerica di glucosammina e N-acetilglucosammina, normalmente presenti nell'organismo. In vivo mostra scarse o nulle reazioni tissutali avverse come quella di incapsulamento fibrotico [27].

La biodegradabilità dipende dal grado di deacetilazione della molecola: maggiore è il grado di deacetilazione, minore è la biodegradabilità. Nell'organismo viene degradato da enzimi idrolitici che agiscono a livello dei legami  $\beta$  (1-4) provocando la depolimerizzazione della molecola. Dalla degradazione enzimatica si generano oligosaccaridi e monosaccaridi che vengono successivamente metabolizzati [27].

Il chitosano è in grado di velocizzare il processo di guarigione delle ferite e di agire sul processo infiammatorio stimolando i macrofagi ed agendo da chemioattrattore per i neutrofili, aiutando a combattere l'infiammazione. È anche in grado di legare gli eritrociti promuovendo la coagulazione e l'emostasi [25].

Infine, è in grado di inibire la crescita di microrganismi quali lieviti e batteri [26] grazie alla presenza di cariche positive libere, derivanti dalla deacetilazione della chitina, che interagiscono con le cariche negative di superficie delle pareti batteriche.

## 1.7 Fattori biochimici

### 1.7.1 I peptidi

I peptidi sono brevi sequenze di amminoacidi (AA) e, a seconda del numero di amminoacidi di cui sono composti, sono divisi in dipeptidi (2 AA), tripeptidi (3 AA), oligopeptidi (fino a 20 AA) e polipeptidi (più di 20 AA). Vengono utilizzati per mimare funzioni di specifiche proteine senza dover ricorrere all'uso della proteina intera (peptidomimetica). Infatti, sono specifiche sequenze amminoacidiche interne alla catena proteica a determinare le proprietà delle diverse proteine. I peptidi vengono sintetizzati replicando queste e sole sequenze amminoacidiche per ottenere le funzioni desiderate. Inoltre, i peptidi sono più stabili (permettono maggiori tempi di stoccaggio), più disponibili in commercio, più economici, più facili da sintetizzare con elevati gradi di purezza e in elevate quantità, più modificabili e maneggiabili senza ricorrere in a denaturazione come per le proteine. Per contro, le proteine sono biologicamente più attive a parità di concentrazione rispetto ai peptidi [8,28].

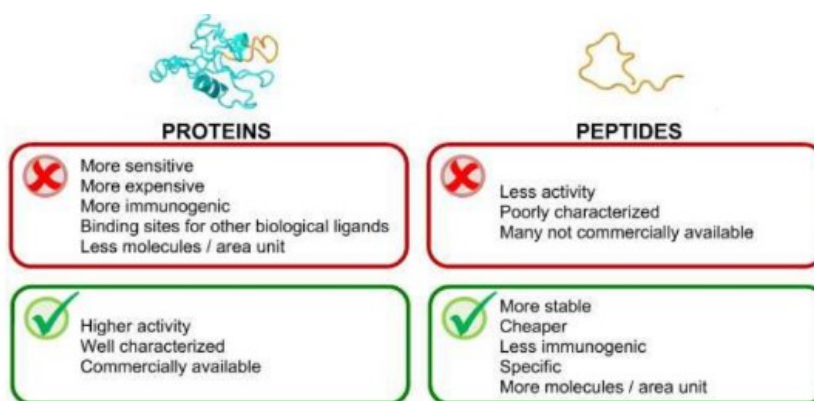


Fig. 1.20: Vantaggi e svantaggi nell'utilizzo di peptidi per mimare proteine [28]

Si fa ricorso all'impiego di peptidi biomimetici per permettere alle cellule di riconoscere il biomateriale costituente lo scaffold usato in TE. In particolare, l'obiettivo è quello di mimare le proteine costituenti la ECM naturale del tessuto in cui avverrà l'impianto in quanto sono esse ad interagire coi recettori cellulari fornendo gli stimoli ed i segnali necessari per la crescita, proliferazione, differenziamento cellulari ecc.

## 1.7.2 Bone morphogenetic protein (BMP) e suo mimetico

I fattori di crescita sono proteine in grado di legarsi a specifici recettori della membrana cellulare attivando i processi di proliferazione e differenziamento cellulare [8]. Le proteine morfogenetiche dell'osso (BMP) sono fattori di crescita che regolano proliferazione, differenziamento e sopravvivenza delle cellule ossee. Esistono diverse BMPs che differiscono per struttura primaria e funzionalità. Normalmente vengono prodotte dalle cellule del tessuto osseo e rilasciate nella ECM. Le BMPs funzionano unicamente interagendo con specifici recettori cellulari di tipo I e II. Il legame al recettore di tipo II porta alla fosforilazione del recettore di tipo I che propaga il segnale fosforilando altre proteine chiamate Smad. Smad1, Smad5 e Smad8, se attivate, creano complessi eteromerici con Smad4 e si spostano nel nucleo, dove attivano la trascrizione di specifici geni che portano all'aumento di espressione genica di osteocalcina (OCN) e sialoproteina ossea (SBN), che stimolano la differenziazione cellulare in osteoblasti [29].

BMP-2, BMP-4 e BMP-7 sono i fattori di crescita più utilizzati nella BTE per via delle proprietà osteoinduttive che li contraddistinguono. La BMP-2 è la proteina che mostra il più elevato potenziale osteoinduttivo. Possiede due epitopi chiamati wrist e knuckle; il primo lega il recettore cellulare BMP IA, mentre il secondo lega il recettore cellulare BMP II [30].

Nel presente lavoro si è scelto di utilizzare il peptide GBMP1 $\alpha$ , biomimetico della proteina BMP-2 (AA 48-69 della sua sequenza), in grado di promuovere l'adesione e proliferazione di osteoblasti umani, la deposizione di calcio e l'espressione di geni di fondamentali proteine degli osteoblasti [31].

## 1.7.3 Funzionalizzazione biochimica

Lo scopo della funzionalizzazione è arricchire la superficie del biomateriale con fattori di crescita, peptidi o proteine per migliorarne le prestazioni biochimiche promuovendo i processi di adesione e proliferazione cellulare, integrazione nel sito di impianto e rigenerazione tissutale [8,32].

La funzionalizzazione può essere effettuata tramite (Fig. 1.19):

- adsorbimento delle molecole attive sulla superficie del biomateriale;
- rilascio di biomolecole da un *coating* polimerico;
- legami covalenti tra biomolecole e biomateriale.

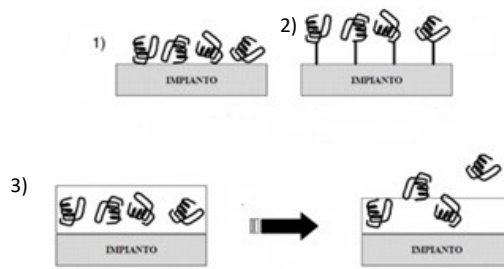


Fig. 1.19: (1) adsorbimento delle molecole attive sulla superficie del biomateriale (2) legami covalenti tra biomolecole e biomateriale (3) rilascio da un coating polimerico

### 1.7.3.1 Adsorbimento superficiale

Questo metodo sfrutta le interazioni chimico-fisiche (legami secondari) tra biomolecole e superficie del biomateriale. Si lascia semplicemente che la soluzione contenente le biomolecole rimanga in contatto con il biomateriale per un tempo prestabilito. È un metodo facile da implementare e poco costoso ma non consente di avere un controllo preciso su quantità, densità e concentrazione delle biomolecole adsorbite oltre che la loro orientazione (una biomolecola potrebbe attaccarsi al sito di legame del biomateriale tramite diversi suoi gruppi funzionali se ne presenta più di uno). I legami che si generano sono di tipo debole, quindi soggetti al rischio di de-adsorbimento post impianto. Nel caso dell'utilizzo di sequenze adesive, il loro de-adsorbimento dalla superficie implantare porta all'effetto contrario rispetto a quello auspicato ovvero all'inibizione dell'adesione cellulare [8,32].

### 1.7.3.2 Rilascio da un *coating* polimerico

Si riveste il biomateriale con uno strato polimerico biodegradabile all'interno del quale viene inserito il fattore bioattivo. Le molecole possono essere disciolte oppure legate chimicamente al polimero. È fondamentale studiare la cinetica di rilascio che dipende dal metodo di inclusione utilizzato. I materiali polimerici devono essere biodegradabili, biocompatibili, biorisorbibili e non devono ostacolare l'attività biologica delle biomolecole. Tra polimero e biomolecole si può anche utilizzare un *linker* che può essere scisso da enzimi prodotti o sovraespressi dalle cellule presenti nel tessuto o che si devono legare al biomateriale. Questa tecnica è molto utilizzata per il rilascio di fattori di crescita [8,32].

### 1.7.3.3 Legame covalente

Questo metodo prevede l'utilizzo di gruppi reattivi presenti sulla superficie del materiale con i quali i gruppi funzionali delle biomolecole possono creare legami covalenti. La funzionalizzazione può essere aspecifica se tutti i gruppi funzionali delle biomolecole vengono

lasciati deprotetti o specifica se tutti i gruppi reattivi delle biomolecole vengono protetti (non possono creare legame covalente col biomateriale) tranne uno, quello che si vuole far legare (protezione selettiva reversibile, poiché si possono deproteggere tutti i gruppi funzionali una volta avvenuto il legame). Il legame covalente offre maggiore stabilità e, in particolare, quello specifico offre la possibilità di controllare orientamento, densità e concentrazione delle biomolecole adese, facendo in modo che ad ogni sito di legame del biomateriale si leghi una sola biomolecola. Così facendo, inoltre, ogni biomolecola risulterà orientata in maniera uguale a tutte le altre.

Un'altra tecnica di legame specifico è la fotoattivazione che consiste nell'inserire nella sequenza peptidica un gruppo attivabile tramite radiazione UV che garantisce selettività e omogeneità dell'ancoraggio.

Anche in questo caso si può ricorrere all'utilizzo di uno spaziatore che si interpone tra biomateriale e biomolecola favorendo la presentazione di biomolecole corte ai recettori delle cellule [8,32].

## **1.8 Ingegneria del tessuto osseo**

### **1.8.1 Perché ricorrere alla BTE**

L'invecchiamento della popolazione porta ad una necessità di materiali sostitutivi dell'osso clinicamente efficaci in costante aumento [33]. Il tessuto osseo ha un potenziale di autorigenerazione ma, quando la lesione supera un limite dimensionale, è necessario eseguire interventi chirurgici solitamente invasivi [3,12]. Il tessuto osseo autologo è il sostituto ideale poiché possiede proprietà come osteogenicità, osteoinduttività e osteoconducibilità ma ci sono limiti al suo utilizzo [33]. Gli svantaggi dell'autotrapianto, attuale gold standard, sono: scarsità della disponibilità di siti donatori, riassorbimento variabile, rischio di comorbidità del sito donatore, alto tasso di fallimento in determinati siti e necessità di un secondo intervento chirurgico [20]. Se la quantità di sostanza ossea richiesta per riempire il difetto supera quella che può essere rimossa dal sito donatore viene utilizzato osso allogenico, soggetto a rischi di trasmissione di patogeni e rigetto da parte del ricevente [20,33]. Al fine di ridurre l'antigenicità di questi trapianti vengono utilizzate preparazioni ossee xenogeneiche [3,33] che però rimuovono in gran parte gli elementi osteoinduttivi e osteogenici, denaturando le proteine e uccidendo le cellule osteoprogenitrici del tessuto del donatore. Manca, inoltre, un completo rimodellamento, riassorbimento o degradazione dell'osso impiantato così come una significativa stimolazione dello scambio di sostanze e dell'angiogenesi [12,33]. L'ingegneria tissutale è un'ottima alternativa e offre la possibilità di rigenerare strutture ossee danneggiate

da difetti di grandi dimensioni causati da traumi, asporti tumorali o infezioni, difetti congeniti e osteoporosi senza la necessità di impianti permanenti e riduce anche la necessità di donatori [3,33].

### **1.8.2 Principi della BTE**

La BTE prevede lo sviluppo di uno *scaffold* tridimensionale osteoconduttivo biomeccanicamente stabile, ricoperto di fattori di crescita osteoinduttivi e/o cellule osteogeniche (cellule osteoprogenitrici -MSC sono le più utilizzate- o cellule ossee già differenziate). Nel caso ideale, il biomateriale introdotto, biodegradabile e biorisorbibile, verrà riassorbito e degradato nel tempo, con contemporanea rigenerazione dei tessuti negli spazi che si liberano [3,33,34]. I materiali biodegradabili sono preferiti per ridurre al minimo qualsiasi componente sintetica residua nel sito di impianto [12]. Le proprietà meccaniche del biomateriale diminuiscono con l'aumentare della degradazione e le sue funzioni vengono idealmente assunte dal tessuto generato. Le proprietà nano, micro e macro-architettoniche dello *scaffold* possono essere studiate per garantire vascolarizzazione, ossigenazione, apporto di nutrienti, smaltimento dei rifiuti cellulari e ossificazione [33].

La superficie del biomateriale è il fattore critico per la risposta immunitaria acuta del ricevente e va progettata per limitare l'adesione dei macrofagi e la loro fusione in cellule giganti da corpo estraneo. Si possono anche eseguire trattamenti sulla superficie del biomateriale per evitare l'adsorbimento proteico [20].

Il successo dell'impianto dipende da diversi parametri critici dello *scaffold* come rugosità superficiale, architettura interna, porosità, composizione chimica e biocompatibilità [12]. È richiesta una dimensione dei pori di almeno 100  $\mu\text{m}$  anche se l'osteogenesi è migliore con una dimensione dei pori di 300–500  $\mu\text{m}$  [20] poiché garantiscono vascolarizzazione e ossigenazione del costruito, buona penetrazione cellulare, diffusione dei nutrienti ed eliminazione dei prodotti di scarto. Se la dimensione dei pori è piccola l'ossigenazione e il trasferimento di massa sono limitati e non ci sarà mineralizzazione. La capacità di scambio di sostanze è determinata anche dal grado di interconnettività dei pori che per consentire l'osteogenesi dovrebbe essere vicina al 100%. Tuttavia, l'aumento della dimensione dei pori e dell'interconnettività determina una diminuzione delle proprietà meccaniche del costruito. Una struttura microporosa aumenta la superficie dello *scaffold* disponibile per le interazioni con le cellule e facilita lo scambio ionico, portando a una migliore adesione delle cellule osteogeniche attraverso un maggiore adsorbimento proteico che porta ad una migliore crescita ossea [12,20,33].

### 1.8.3 Utilizzo di fattori di crescita

Si possono incorporare ligandi, antibiotici, molecole o fattori di crescita (GF) e di trascrizione osteogenici e osteoinduttivi [31,36] nel biomateriale dello *scaffold* o farli aderire sulla superficie per migliorare l'adesione delle cellule osteogeniche, lo scambio di sostanze e la vascolarizzazione [3,12,20,33]. L'obiettivo principale della TE è ottenere tassi di rilascio del fattore di crescita efficaci per periodi di tempo prolungati e proteggere i fattori dalla degradazione fisiologica che potrebbe ridurre l'efficacia [12]. È necessario selezionare GF in dosi appropriate e progettare gli *scaffold* in modo che suscitino gli effetti del fattore di crescita desiderati.

Le BMP regolano la differenziazione osteogenica delle cellule staminali mesenchimali, il *vascular endothelial growth factor* (VEGF) favorisce la neoangiogenesi. La somministrazione combinata di VEGF e BMP-2 porta a una migliore formazione ossea e vascolarizzazione. Il *platelet-rich plasma* (PRP) è un fattore di crescita che favorisce la differenziazione di trombociti autologhi che aumentano la rigenerazione ossea, *platelet derived growth factor* (PDGF) promuove l'induzione di precursori osteoblastici, TGF- $\beta$ 1 promuove la proliferazione cellulare e la sintesi del collagene da parte dei precursori degli osteoblasti [33,34].

### 1.8.4 Biomateriali per l'ingegneria del tessuto osseo

In BTE si utilizzano *scaffolds* realizzati con polimeri, metalli e ceramiche. Alcuni biomateriali possono favorire il rilascio prolungato di fattori osteogenici, garantendo l'efficacia e il tempo appropriato per il trattamento. Il biomateriale non deve interferire con l'attività biologica dei fattori [36]. Solitamente si usano biomateriali organici (gelatina, chitosano, acido ialuronico, poli-caprolattone (PCL)), inorganici (idrossiapatite e fosfato di calcio) o compositi come idrossiapatite porosa/collagene [3].

L'utilizzo di metalli (leghe di titanio e acciaio inox) presenta limitazioni dovute alla non degradabilità, elevata rigidità, frattura a fatica, mancanza di integrazione nel tessuto ospite e infezione [20].

I nanomateriali (con componenti comprese tra 1 e 100 nm), in particolare le nanoceramiche, sembrano promettenti nel campo della BTE [20].

Molti ricercatori si concentrano sui fosfati di calcio come *scaffold* e sull'utilizzo di molecole bioattive per migliorare l'integrità cellulare una volta avvenuto l'innesto [34]. Il rilascio di ioni

calcio e fosfato da materiali a base di fosfato di calcio può indurre la differenziazione delle cellule staminali verso il fenotipo osseo.

Un'importante classe di polimeri utilizzati in BTE è rappresentata dagli *hydrogel*. Sia gli *hydrogel* naturali (agarosio, alginato e gelatine) che sintetici (a base di alcol polivinilico) sono in grado di imitare la topografia della ECM ossea e di rilasciare molecole bioattive [20].

Le ceramiche bioattive (HA, tricalciofosfato, vetro bioattivo e silicato di calcio) chimicamente simili all'osso, mostrano un'elevata resistenza a compressione e bassa duttilità, fornendo così un'elevata resistenza alla deformazione ma elevata fragilità [20].

I compositi possono essere copolimeri o compositi polimero-ceramica. Il PLGA (acido polilattico + poliglicolico) è ottimo per le applicazioni BTE grazie alla sua biodegradabilità e facilità di fabbricazione. I compositi polimerico-ceramici sono i più biomimetici, poiché l'osso è un materiale composito costituito fibre di collagene e cristalli di HA. L'incorporazione di inclusioni inorganiche come particelle di bioceramiche e biovetri, nanotubi di carbonio, particelle metalliche o di lega di magnesio sembrano influenzare positivamente le proprietà meccaniche degli *scaffolds* polimerici. Viceversa, si possono incorporare polimeri nelle ceramiche per veicolare meglio proteine o fattori di crescita e migliorare le proprietà meccaniche dell'impianto *in vivo* [20,34].

#### **1.8.4.1 Chitosano nella BTE**

Il chitosano ha carica positiva data dai gruppi amminici della glucosamina tramite i quali può interagire elettrostaticamente con proteoglicani e GAGs (composti anionici) che nel tessuto osseo legano e modulano l'attività di GF e citochine che a loro volta modulano proliferazione e differenziamento degli osteoblasti [35].

Il chitosano è malleabile, ha porosità controllabile, induce adesione osteoblastica e non è tossico per gli osteoblasti [31]; ha però bassa resistenza meccanica, elevata fragilità e rigidità. Utilizzando agenti reticolanti si possono ottenere *scaffolds* più elastici e con adeguata porosità.

Aggiungendo bioceramiche agli *scaffold* in chitosano si possono ottenere proprietà meccaniche e osteoconduttività molto simili a quelle dell'osso (il chitosano ha proprietà meccaniche più scarse del tessuto osseo). Aggiungendo nanocompositi di idrossiapatite (HA) si ottengono *scaffold* con elevata osteoinduttività, osteoconduttività ed osteogenicità, resistenza a flessione, biodegradazione e adesione, proliferazione e diffusione cellulare. Il fosfato di calcio aiuta a migliorare la biocompatibilità e la cinetica di degradazione e riassorbimento dello *scaffold* [35].

In BTE si può utilizzare chitosano anche per rivestire superfici protesiche per migliorare l'adesione cellulare alla superficie. Infine, grazie alle proprietà antibatteriche del chitosano si riduce il rischio di infezioni post-impianto. Per incrementare la capacità osteoinduttiva si possono funzionalizzare gli *scaffolds* in chitosano con fattori di crescita o peptidi biomimetici, favorendo proliferazione e differenziazione degli osteoblasti e migliorando la neovascolarizzazione *in vivo*.

Chit+GBMP1a mostra un notevole miglioramento nella deposizione di calcio e nell'espressione di geni coinvolti nella differenziazione degli osteoblasti. Infatti, le cellule coltivate su Chit-GBMP1a mostrano elevati livelli di espressione di mRNA di vitronectina e osteopontina, proteine della ECM ossea essenziali nel differenziamento osteogenico [31].

Anche la funzionalizzazione con il peptide HVP porta a un aumento significativo della proliferazione e differenziazione cellulare rispetto al solo chitosano ma l'aumento del grado di funzionalizzazione fa diminuire l'attività antibatterico del chitosano [36].

## **1.9 Ingegneria del tessuto osseo alveolare**

Gli impianti orali servono per inserire protesi dentarie in situazioni di edentulia parziale o totale derivante da patologie congenite o post-traumatiche, difetti post-chirurgici o asportazione tumorale [37,38]. La normale risposta della cresta alveolare dopo la perdita dentale è il riassorbimento, prevalentemente in orizzontale ma anche in verticale [39]. Si pianifica la ricostruzione protesica desiderata e si posizionano gli impianti nella posizione ottimale per ottenere il risultato pianificato e la rigenerazione ossea necessaria per l'osteointegrazione degli impianti. Un prerequisito per un impianto efficace è una quantità sufficiente di osso nel sito ricevente per consentire l'osteointegrazione della superficie implantare endossea [37,39].

### **1.9.1 La rigenerazione ossea guidata**

Il metodo meglio documentato e più utilizzato per aumentare l'osso nei difetti alveolari localizzati e rigenerare i tessuti parodontali perduti è la rigenerazione ossea guidata (GBR), teorizzata all'inizio degli anni '80 [39] da Nyman & Karring. La GBR permette di aumentare l'osso dove non ce n'è un volume sufficiente per il posizionamento di impianti dentali endossei. Così consente il posizionamento di impianti in aree prive di una quantità di osso sufficiente per il posizionamento standard dell'impianto o con un'anatomia ossea sfavorevole per l'implantologia. Consente inoltre di aumentare il tessuto osseo post-impianto, favorendo la

rigenerazione dell'osso alveolare danneggiato dall'intervento. È una tecnica che prevede l'utilizzo di membrane barriera [34,37,38,39,42] che impediscono alle cellule indesiderate di ogni tipo di accedere alla ferita e, allo stesso tempo, consentono l'accesso, nel coagulo di sangue protetto dalla membrana, di cellule angiogeniche e progenitrici ossee per rigenerare l'osso. Ciò è importante per garantire che il sito di impianto non si riempia di cellule di tessuto molle, il quale si rigenera più velocemente del tessuto osseo [37,39,40].

Con le membrane si possono rivestire impianti dentali e materiali sostitutivi dell'osso (autologhi o no) [41] oppure le si può usare in maniera indipendente per la rigenerazione ossea [40]. Nel primo caso stabilizzano i materiali innestati limitandone il riassorbimento e separandoli dai tessuti circostanti. Nel secondo caso si ha elevata compressione della membrana da parte dei tessuti molli circostanti e per superare questo problema sono state sviluppate membrane rinforzate in metallo [39].

La GBR ha portato a nuove possibilità per rigenerare cemento radicolare, legamento parodontale e osso alveolare [39]. Xenotrapianti e autotrapianti ossei ricoperti da membrane in collagene nativo o membrane in politetrafluoroetilene espanso (e-PTFE) sono le migliori tecniche di aumento osseo documentati. L'utilizzo di blocchi ossei autogeni (con o senza membrane e con o senza combinazione con materiali sostitutivi ossei) è sempre più redditizio in termini di guadagno osseo in larghezza in difetti ossei di grandi dimensioni. Al fine di evitare i rischi associati agli allotrapianti, è preferibile l'uso di materiali sostitutivi dell'osso tipici della BTE [37].

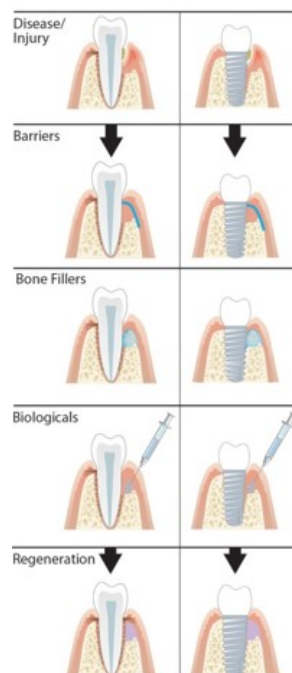


Fig. 1.19: Il principio della GBR: una membrana protettiva viene posizionata sopra il materiale dell'innesto osseo per impedire alle cellule fibroblastiche di colonizzare il difetto, consentendo alle cellule ossee di migrare e

riempirlo, con conseguente rigenerazione e deposizione ossea diretta. Si mostra anche l'utilizzo di fattori biologici per migliorare la riuscita dell'impianto [39]

## 1.9.2 Le membrane

Le proprietà delle membrane appropriate per la GBR comprendono biocompatibilità, integrazione col tessuto ospite, occlusività cellulare, capacità di creare e mantenere spazio nel difetto osseo, adeguata gestibilità, sicurezza clinica e efficacia a lungo termine. Possono essere classificate in riassorbibili o non riassorbibili [37,40]. Quelle riassorbibili possono essere naturali o sintetiche [37,39] e possono anche essere suddivise in autogene, allogene, xenogene e alloplastiche [38]. Idealmente, il tasso di biodegradazione delle membrane dovrebbe corrispondere al tasso di formazione del nuovo tessuto senza generare residui permanenti. Inoltre, le proprietà meccaniche delle membrane dovrebbero essere sufficientemente elevate per resistere al loro posizionamento e utilizzo *in vivo* [39]. Per ottenere l'aumento osseo verticale, una membrana deve essere supportata da un dispositivo che crea spazio come una rete o una placca per osteosintesi in titanio [40,43,44]. Le membrane agiscono anche come dispositivi di rilascio di antibiotici e fattori di crescita. I fattori di crescita utilizzati nell'ingegneria dei tessuti parodontali includono il derivato della matrice dello smalto (EMD), il fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF), le proteine morfogenetiche ossee (BMP), il fattore di crescita endoteliale vascolare e il fattore di crescita  $\beta$ -trasformante. Diversi studi sul trattamento per l'aumento del seno mascellare hanno riportato il miglioramento del guadagno osseo e la capacità di preservare l'altezza della cresta alveolare con BMP-2 [38]. Le superfici delle membrane idrofobiche sono migliori per l'adsorbimento proteico rispetto alle superfici idrofile per via delle forti interazioni idrofobiche che si verificano tra superficie e proteine. Le proteine adsorbite hanno il potenziale per attrarre specifici fattori di crescita e cellule progenitrici fondamentali per la rigenerazione/riparazione dei tessuti [39].

L'uso di membrane non è esente da complicazioni. La principale causa di fallimento del GBR è correlata all'esposizione precoce al cavo orale della membrana, che porta alla contaminazione e all'infezione del biomateriale, compromettendo la rigenerazione ossea [43]. I siti GBR hanno maggiori probabilità di essere colonizzati da batteri parodontali rispetto ai siti trattati senza membrane [39].

Esempi di membrane utilizzate per procedure di GBR sono: collagene nativo o reticolato, PTFE denso o espanso, poliuretano, titanio, PLA, PLG, PLGA, PEG [37,40].

### 1.9.2.1 Membrane in PTFE

Le membrane in politetrafluoroetilene espanso (e-PTFE) sono state la prima generazione di membrane barriera utilizzate per procedure di GBR. e-PTFE è un polimero sintetico con una struttura porosa, che non induce reazioni immunologiche e resiste alla degradazione microbica ed enzimatica da parte dei tessuti. L'integrazione di un rinforzo in titanio all'interno delle membrane in e-PTFE ne aumenta la stabilità meccanica [36,40]. Membrane in e-PTFE possono portare ad ampi aumenti ossei laterali e verticali. Si può ottenere una buona rigenerazione ossea anche senza l'uso di materiale d'innesto, usando solo membrane in e-PTFE. Tuttavia, una combinazione di membrana e innesto osseo o sostituto osseo è migliore per l'aumento della crescita ossea nel difetto. I limiti delle membrane in e-PTFE sono [36,40]:

- esposizione prematura della membrana alla cavità orale: la superficie porosa della membrana viene rapidamente colonizzata dai microbi orali portando ad infezioni dei tessuti adiacenti e alla necessità di rimozione anticipata della membrana, con conseguente alterata rigenerazione ossea;
- necessità di un intervento chirurgico di rimozione della membrana, associato ad un maggiore rischio di danni ai tessuti.

Le membrane in PTFE denso (d-PTFE) sono meno soggette a complicazioni rispetto alle membrane in e-PTFE. Questo deriva dal fatto che e-PTFE presenta minore occlusività cellulare (dimensione dei pori più ampia), che porta ad una più facile penetrazione batterica che compromette la guarigione dell'innesto [44].

### 1.9.2.2 Membrane riassorbibili

Le membrane riassorbibili presentano i seguenti vantaggi: nessuna necessità di chirurgia di rimozione della membrana, più ampia gamma di tecniche chirurgiche possibili per l'integrazione all'ambiente, migliore rapporto costo-efficacia e diminuzione dei rischi per il paziente. Di conseguenza, le membrane riassorbibili sono preferite, quando possibile, per il trattamento dei difetti ossei orizzontali. Tuttavia, la difficoltà di mantenere la funzione di barriera per un periodo di tempo appropriato è un difetto delle membrane riassorbibili e la mancanza di stabilità del materiale rende obbligatorio l'uso di materiali di supporto. Inoltre, il processo di riassorbimento della membrana può interferire con la guarigione della ferita [37].

Le membrane **in collagene** nativo (attuale gold standard per la GBR) mostrano una buona integrazione tissutale, vascolarizzazione rapida e biodegradazione senza reazione da corpo estraneo. Forniscono buoni risultati (gli osteoblasti mostrano maggiore aderenza alle superfici

delle membrane in collagene rispetto ad altre superfici) e bassi tassi di complicazione. Il collagene ha anche bassa immunogenicità ed è emostatico. Contrariamente alle membrane non riassorbibili, l'epitelizzazione del collagene esposto al cavo orale è spontanea e questo è un vantaggio perché non servono interventi chirurgici di rimozione in quanto non ha influenza sulla rigenerazione ossea [37,39]. L'utilizzo di membrane in collagene a proteggere sostituti ossei migliora sempre il tasso di sopravvivenza dell'impianto, per qualsiasi sostituto osseo utilizzato [40].

I limiti delle membrane in collagene nativo sono le proprietà meccaniche sfavorevoli, come la scarsa resistenza al collasso ed il rapido degrado da parte dell'attività enzimatica delle collagenasi endogene dei tessuti e dei microbi ospiti, con conseguente perdita anticipata della funzione di barriera [44]. Il tempo di degradazione del collagene nativo può variare considerevolmente a seconda della sua origine e della sua struttura. Esistono diversi processi fisici, chimici ed enzimatici per la reticolazione del collagene, per prolungarne il tempo di degradazione. L'aumento del grado di reticolazione corrisponde ad un tempo di biodegradazione prolungato ma integrazione coi tessuti e rigenerazione ossea lievemente peggiori, possibile reazione da corpo estraneo e lieve aumento di esposizione prematura della membrana al cavo orale. Le membrane di collagene si possono arricchire di antibiotici, eparina solfato o essere arricchite con fibronectina [37,39,44].

### **1.9.2.3 Confronto tra membrane in collagene e in PTFE**

Si ha maggiore riempimento del difetto osseo con le membrane in collagene mentre i tassi di sopravvivenza dell'impianto sono molto simili [37,39] (leggermente migliori per il collagene). Per la formazione di tessuto osseo il collagene debolmente reticolato è migliore dell'e-PTFE che a sua volta è migliore del collagene altamente reticolato. L'uso di membrane in e-PTFE porta ad una minore ampiezza della cresta alveolare, ad una maggiore necessità di procedure di innesto aggiuntive e tassi di complicazione più elevati. Entrambi i materiali danno comunque una integrazione tissutale clinicamente efficace (sempre superiore al 92%) e una analoga crescita ossea verticale [37,39,41,43]. In definitiva non ci sono differenze statisticamente rilevanti tra l'uso delle due membrane [39,43,44]. La crescita ossea verticale e orizzontale è dell'ordine dei mm (in genere da 1 a 5 mm) con valori variabili in base alle dimensioni ed alla posizione del difetto, alle origini del difetto ed alle tecniche utilizzate. Ad esempio, la crescita ossea verticale risulta spesso superiore nella zona dei molari rispetto a qualsiasi altra zona, si possono riscontrare grandi differenze a seconda che si analizzi la parte linguale o quella buccale

del tessuto osseo in tutti i punti di mandibola e mascella; ottenere minore perdita ossea in seguito a rimozione dentale dovuta a fratture risulta meno complesso rispetto ad ottenerla a seguito di qualsiasi altra origine di difetto. Le deiscenze di membrana sono più frequenti con e-PTFE e riducono significativamente la formazione di nuovo osso. A causa del maggior rischio di complicanze e del maggior numero di interventi chirurgici, l'uso di membrane in e-PTFE è giustificato solo quando la stabilità della regione di intervento non è fornita dalle pareti ossee adiacenti. È preferibile l'uso di membrane in e-PTFE rinforzate con titanio o materiali di supporto [37].

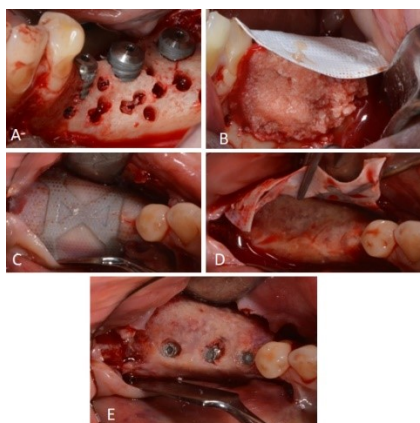


Fig. 1.20: Applicazione membrana in PTFE (A) perforazione corticale e inserimento dell'impianto (B) fissaggio della membrana in PTFE sull'innesto osseo (C) membrana dopo 9 mesi (D) rimozione della membrana (E) rigenerazione ossea tridimensionale attorno all'impianto [43]

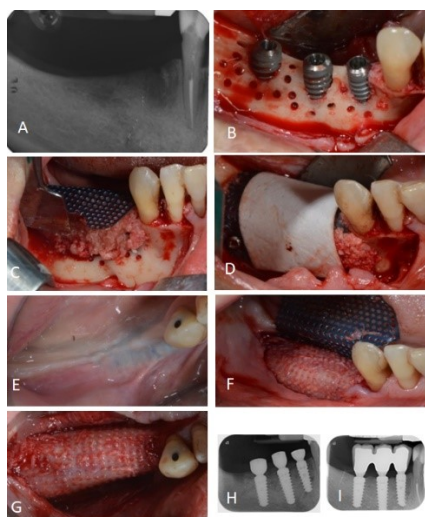


Fig. 1.21: Applicazione membrana in collagene (A) sito pre-implantare ai raggi X (B) perforazione corticale e inserimento dell'impianto (C) fissaggio supporto in titanio sull'innesto osseo (D) applicazione della membrana in collagene sul supporto in titanio (E) guarigione dopo 9 mesi dall'impianto (F) rimozione supporto in titanio (G) rigenerazione ossea tridimensionale attorno all'impianto (H, I) sito post-implantare ai raggi X [43].

#### 1.9.2.4 Altri materiali per membrane

Anche l'uso di membrane sintetiche riassorbibili a base di PLA, PLG, trimetilcarbonato e loro copolimeri si è dimostrato efficace. Tuttavia, l'uso di queste membrane può essere soggetto a

reazioni infiammatorie da corpo estraneo a causa dei loro prodotti di degradazione e danno riempimento ridotto dei difetti ossei rispetto alle membrane di e-PTFE, maggiore rischio di complicanze dei tessuti molli e minore capacità di mantenere lo spessore orizzontale della regione rigenerata. PEG è biocompatibile e oclusivo e ha consentito la formazione di quantità simili di nuovo osso rispetto a e-PTFE e PLA. La membrana di PEG è efficace quanto la membrana di collagene nativo in termini di riparazione dei difetti verticali delle zone perimplantari ed è promettente per l'aumento osseo laterale in zone difficili [37].

## **1.10 Scopo della tesi**

Lo scopo del presente lavoro è favorire ed incrementare la formazione di tessuto osseo alveolare per il rialzo del pavimento del seno mascellare post impianto che si ottiene con le membrane attualmente in uso e migliorarne i tassi di successo implantari, utilizzando tecniche di ingegneria tissutale. In questo lavoro ci si concentra sulle membrane OsseoGuard®: si tratta di membrane in collagene di tipo I ad elevato grado di purezza estratto da tendine di Achille bovino e reticolato con Formaldeide (prodotte da Collagen Matrix, Inc., Oakland, New Jersey; distribuite da Zimmer Biomet Dental, Palm Beach Gardens, Florida; fornite da Biomax Spa, Vicenza, Italia). Sono completamente riassorbibili in 6/9 mesi, tempo che ben si adatta alla guarigione di difetti ossei perimplantari ed alveoli post estrattivi oltre che alla rigenerazione ossea dopo resezioni radicolari, procedure di elevazione del rialzo del seno mascellare e aumenti localizzati delle creste ossee. Queste membrane mostrano una resistenza elevata allo strappo delle suture dovuta alla loro struttura con matrice a fibrille, possono essere sagomate facilmente, posizionate asciutte o idratate, non richiedono di essere posizionate da un solo lato specifico e sono ottime per rigenerare difetti di grandi dimensioni mantenendo gli spazi (informazioni tratte dalle specifiche del prodotto rese note dal produttore). Tuttavia, la crescita di tessuto osseo alveolare in direzione verticale ottenuta con queste membrane non è sempre soddisfacente come segnalato dal dipartimento di Odontoiatria dell'Università di Padova, così come la limitazione della perdita verticale di tessuto osseo alveolare a seguito di rimozione dentale [45]. Qualità e densità ossee ottenute non sono ottimali.

Per migliorare le prestazioni di tali membrane si procede allo sviluppo di patch ibridi funzionalizzandole con chitosano deacetilato al 70% al fine di incrementarne la capacità trombogenica per aumentarne la possibilità di indurre formazione verticale di nuovo osso. Si ancora covalentemente il chitosano alle membrane in collagene con l'utilizzo di EDC/sulfo-NHS. Inoltre, si testa la funzionalizzazione delle membrane con chitosano a sua volta funzionalizzato con GBMP1 $\alpha$ , peptide della BMP-2 in grado, come detto, di promuovere la

proliferazione degli osteoblasti umani e il differenziamento nel fenotipo osteoblastico di cellule staminali.

## CAPITOLO 2

### MATERIALI E METODI

#### 2.1 Materiali

Colonne cromatografiche:

- Colonna Atlantis dC18 OBD Preparative Column (10  $\mu\text{m}$ , 100  $\text{\AA}$ , 10  $\times$  250 mm, Waters);
- Colonna Atlantis dC18 (5  $\mu\text{m}$ , 100  $\text{\AA}$ , 4.6  $\times$  250 mm, Waters).

Reagenti forniti da Merck KGaA, Sigma-Aldrich (St. Luis, Missouri, Stati Uniti)

- Acetone;
- Diclorometano (DCM);
- Metanolo (MeOH);
- N, N-Diisopropilettilamina (DIPEA);
- Etil cianoidrossiimino acetato (Oxyma Pure);
- 3- [Bis (dimetilammino) metilico] -3H-benzotriazol-1-ossido esafluorofosfato(HBTU);
- acido acetico (AcOH);
- N-(3-dimetilamminopropil)-N'-etilcarbodiimmide (EDC);
- N-idrossisulfosuccinimmide (sulfo-NHS).

Reagenti forniti da Merck KGaA, Millipore (Burlington, Massachusetts, Stati Uniti):

- Aminoacidi chimica Fmoc: Alanina (Fmoc-Ala-OH), Acido Aspartico (Fmoc-Asp(OBut)), Fenilalanina (Fmoc-Phe), Istidina (Fmoc-His(Trt)), Isoleucina (Fmoc-Ile), Leucina (Fmoc-Leu), Asparagina (Fmoc-Asn(Trt)), Prolina (Fmoc-Pro), Glutamina (Fmoc-Gln(Trt)), Serina (Fmoc-Ser(But)), Treonina (Fmoc-Thr(But)), Valina (Fmoc-Val)
- Spaziatore: acido 7-aminoeptanoico;
- Sodio Cianoboroidruro ( $\text{NaBH}_3\text{CN}$ );
- resina Rink-Amide MBHA, grado di funzionalizzazione 0.62 mmol/g;
- Trietilsilano (TES);

Reagenti forniti da Biosolve (Valkenswaard, Holland):

- acido trifluoroacetico (TFA).

Reagenti forniti da Carlo Erba (Milan, Italy):

- N, N-dimetilformamide (DMF);
- Dietil etere;
- Acetonitrile;

Reagenti forniti da Scharlab (Barcelona, Spain):

- Etanolo (EtOH).

Reagenti forniti da Heppe Medical Chitosan GmbH (Halle, Germany):

- Chitosano 70/1000.

Reagenti forniti da Carl Roth (Anfahrt, Germania):

- Piperidina.

Reagenti forniti da Iris Biotech GmbH (Marktredwitz, Germany):

- N-Metil-2-pirrolidone (NMP).

Materiale fornito da Biomax Spa, Vicenza, Italia (prodotte da Collagen Matrix, Inc., Oakland, New Jersey; distribuite da Zimmer Biomet Dental, Palm Beach Gardens, Florida):

- 35 Membrane OsseoGuard®, 30mm x 40mm, collagene di tipo I ad elevato grado di purezza, estratto da tendine di Achille bovino e reticolato con Formaldeide.

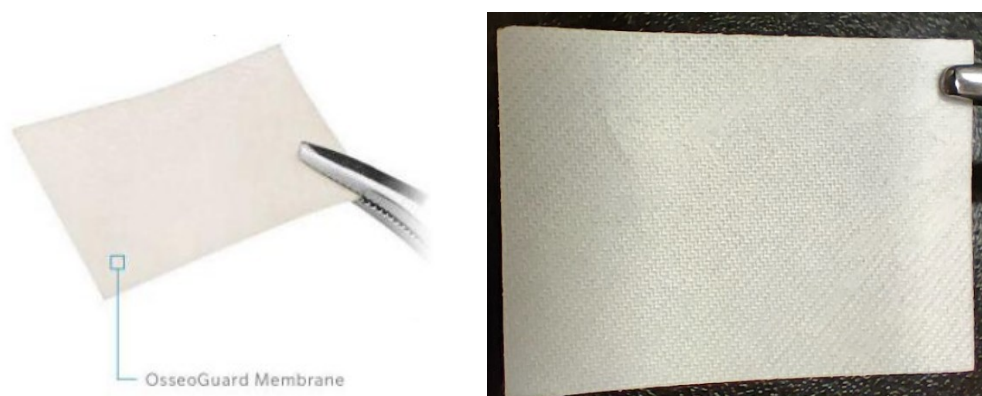


Fig.2.1: Membrana riassorbibile OsseoGuard®, a sx immagine commerciale, a dx membrana utilizzata

## 2.2 Sequenza peptidica

È stato sintetizzato il peptide SxGBMP1a (AA 48-69 di BMP-2) per la funzionalizzazione del chitosano. La sequenza peptidica è la seguente: H-Ser-Ch<sub>2</sub>-Pro-Phe-Pro-Leu-Ala-Asp-His-Leu-Asn-Ser-Thr-Asn-His-Ala-Ile-Val-Gln-Thr-Leu-Val-Asn-Ser-NH<sub>2</sub>

Peso molecolare: 2601.943 Da

Si vuole ottenere un gruppo aldeidico N-terminale, necessario per la funzionalizzazione, per creare un legame con un gruppo amminico del chitosano formando una base di Schiff che verrà poi ridotta ad ammina secondaria. La Serina N-terminale verrà quindi ossidata con Periodato di Sodio (NaIO<sub>4</sub>) ed al termine del processo di ossidazione si ottiene, al suo posto, un gruppo  $\alpha$ -chetoaldeide legato ad un carbonile. Lo spaziatore serve per aumentare la flessibilità del peptide e per separarlo dal biomateriale rendendolo più riconoscibile alle cellule del tessuto in cui il costruito viene impiantato.

## 2.3 Strumenti

### Sintetizzatore

Si è utilizzato il sintetizzatore automatico programmabile modello Syro I della MultiSynTech GmbH (Witten, Germania). La programmazione è stata operata tramite il software Syro XP.



Fig. 2.2: Sintetizzatore Syro I

### Cromatografo

RP-HPLC analitica: sistema HPLC Waters<sup>TM</sup> 1525 composto da pompa binaria, autocampionatore Waters<sup>TM</sup> 2707, lampada UV/Vis multicanale a lunghezza d'onda programmabile Waters<sup>TM</sup> 2489. Software Empower 2 Build 2154.



Fig. 2.3: cromatografo per analitiche

RP-HPLC semipreparativa: pompa Waters<sup>TM</sup> 600 equipaggiato con Controller, lampada UV/Vis multicanale a lunghezza d'onda programmabile Waters<sup>TM</sup> 2487, e registratore BD 40/BD 41 (Carlo Erba Instruments/Kipp & Zonen Delft BV, Delft, Paesi Bassi).



Fig.2.4: cromatografo per semipreparative

### **Spettrometro di massa MALDI-TOF**

Si è utilizzato lo strumento del Dipartimento di Scienze Chimiche dell'Università degli Studi di Padova. Spettrometro di massa 4800 MALDI-TOF/TOFTM Analyzer, della AB Sciex Pte Ltd. (Singapore), software 4000 Series Explorer<sup>TM</sup>, della Applied Biosystems (Foster City, CA, USA).

**Evaporatore rotante**, modello Rotavapor Laborota 4000-Efficient, Heidolph Instruments GmbH & Co.KG (Schwabach, Germania);



Fig. 2.5: Evaporatore rotante

**Liofilizzatore**, modello FreeZone® 2.5 Dry Systems 76705 Series, Labconco Corp. (Kansas City, MO, USA);



Fig.2.6: Liofilizzatore

**Sistema Milli-Q® Plus**, Millipore Corporation (Billerica, MA, USA);

**Agitatore meccanico**, modello SuperMixer, Continental Instruments;

**Sonicator**, modello Branson 1200, Branson Ultrasonics Corporation (Danbury, CT, USA);

**Agitatore magnetico**, Microstirrer, VELP® Scientifica (Usmate Velate, Italia);

**Bilancia**, modello Mettler AE240, Mettler Toledo (Columbus, OH, USA);

**Campana a vuoto**, Kartell LABWARE (Noviglio, Milano, Italia);

**Piastra riscaldante**, Boekel Scientific (Philadelphia, USA);

**Fourier Transform Infrared Spectrometer**, FT/IR-4700, JASCO Europe Srl (Lecco, Italia).

## 2.4 Metodi

### 2.4.1 Sintesi peptidica su fase solida

La sintesi peptidica su fase solida (SPPS) è una tecnica di produzione peptidica introdotta da Bruce Merrifield nel 1963 e prevede l'assemblaggio degli aminoacidi (AA) a partire da quello C-terminale (ultimo nella struttura primaria) verso quello N-terminale (primo nella struttura primaria del peptide) su una "resina", ovvero un supporto polimerico solido [46]. Si utilizza un sintetizzatore automatico, Syro I in questo caso. Si hanno quindi una fase solida insolubile e una fase liquida in cui sono disciolti reagenti e AA. La resina utilizzata in questo progetto è la Rink-Ammide MBHA (Fig. 2.7).

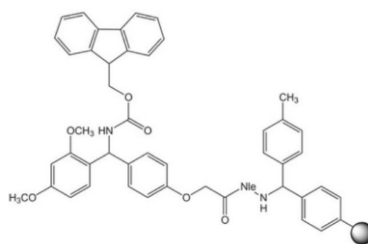


Fig. 2.7: formula chimica della resina Rink-Amide MBHA

La struttura di base di ogni aminoacido è la medesima, fatta eccezione per il gruppo radicale in catena laterale che varia per ogni AA (Fig. 2.8).

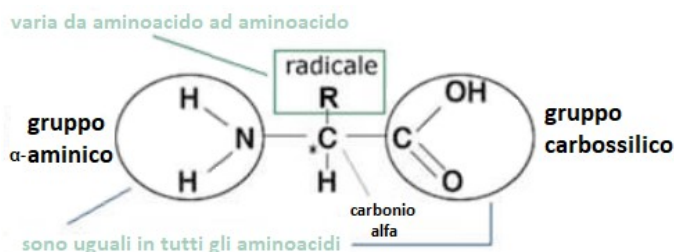


Fig. 2.8: struttura base di ogni aminoacido

Inizialmente, nel reattore contenente la resina rigonfiata in dimetilformamide (DMF) viene inserito solo l'AA C-terminale del peptide, anch'esso disciolto in DMF in questo lavoro (tranne la Fenilalanina che è stata sciolta in NMP). Lo scopo è creare un legame covalente tra il gruppo carbossilico dell'AA e la resina. Per evitare reazioni indesiderate, il gruppo  $\alpha$ -amminico dell'AA ed eventualmente anche il gruppo in catena laterale (se reattivo) sono protetti tramite l'utilizzo di un gruppo protettore che, per il terminale  $\alpha$ -amminico, è il gruppo (N<sup>α</sup>-9-fluorenilmetilossicarbonile Fmoc) (Fig. 2.9). Si può anche scegliere di inserire un *linker* per separare la resina dall'amminoacido C-terminale. Esso modificherà la struttura C-terminale del peptide dopo lo sblocco dalla resina. In questo lavoro non è stata effettuata tale scelta.

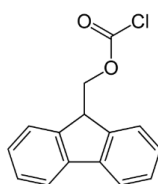


Fig. 2.9: struttura del gruppo Fmoc

La protezione del gruppo  $\alpha$ -amminico è temporanea, infatti il gruppo protettore può essere specificamente rimosso dopo l'avvenuto *coupling*. Invece, la protezione dei gruppi in catena laterale è permanente per tutto il processo di sintesi. Quindi, una volta legato l'AA C-terminale alla resina si deprotegge il suo gruppo  $\alpha$ -amminico e si inserisce nel reattore l'AA successivo

(il penultimo della struttura primaria) con il gruppo  $\alpha$ -amminico, ed eventualmente il radicale in catena laterale, protetti con il gruppo carbossilico libero che potrà andare a reagire col gruppo  $\alpha$ -aminico dell'AA precedente, ora non più protetto, creando il legame peptidico. È possibile eseguire la deprotezione Fmoc del gruppo  $\alpha$ -amminico tramite l'iniezione nel reattore di una soluzione di piperidina in DMF, mentre è necessario l'utilizzo di reagenti specifici per attivare il gruppo carbossilico del nuovo AA aggiunto ed in questo lavoro si sono utilizzate una soluzione di HBTU/Oxyma Pure/DMF e una di DIPEA in NMP a tale scopo. I reagenti in eccesso, dopo l'avvenuto *coupling*, vengono filtrati e rimossi dal reattore. Si procede quindi con cicli di deprotezione, attivazione e *coupling* fino a completare la struttura del peptide desiderato, terminando con la deprotezione Fmoc del gruppo  $\alpha$ -amminico dell'ultimo AA legato alla catena (Fig. 2.10).

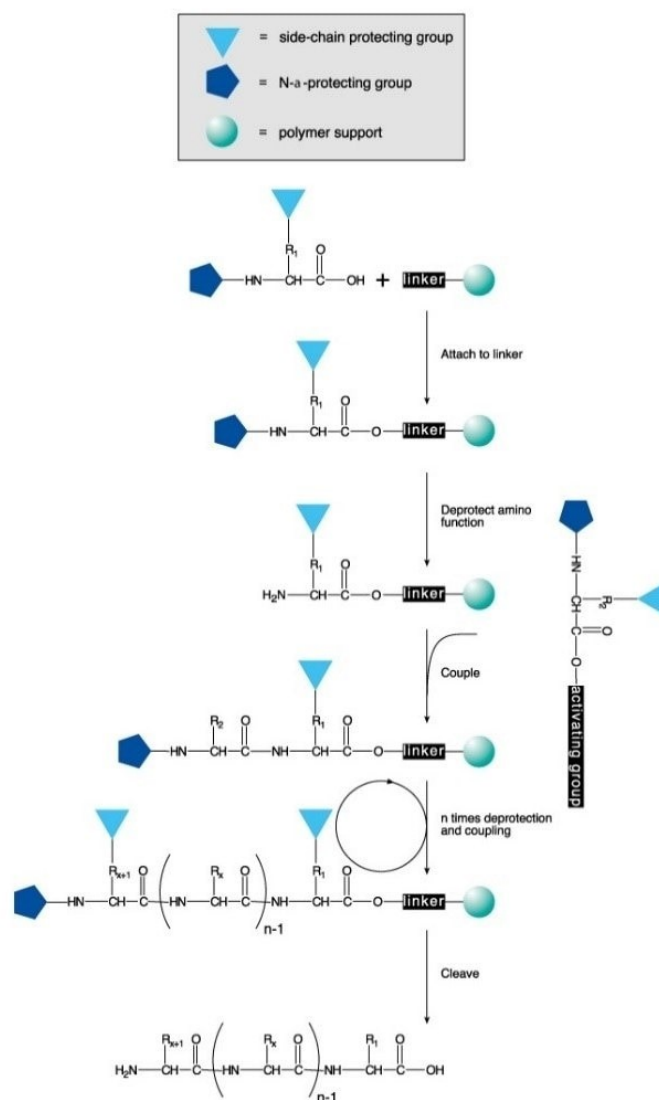


Fig. 2.10: schema della sintesi peptidica su fase solida.

La deprotezione dei gruppi in catena laterale e lo sblocco del peptide dalla resina vanno eseguiti successivamente in ambiente acido, con una soluzione contenente acqua MilliQ, acido trifluoroacetico (TFA) e trietilsilano (TES). Quest'ultimo impedisce che i carbocationi che si generano durante lo sblocco si leghino al peptide. Per migliorare la resa di reazione dei vari *coupling* si procede programmando un *coupling* doppio per ogni AA. Questo perché all'aumentare della lunghezza delle catene aumenta la probabilità di fallimento dei *coupling* successivi, con bassa resa di reazione. Ciò è dovuto al fatto che gli AA precedenti potrebbero non essersi legati correttamente alla catena in formazione. Il peptide ottenuto tramite l'utilizzo del sintetizzatore si definisce grezzo, e verrà sottoposto a successivi cicli di purificazione tramite tecniche cromatografiche. Il peptide puro produce un singolo picco simmetrico in analisi HPLC. La spettrometria di massa viene utilizzata per confermare la presenza di peptide puro e di eventuali sottoprodotti indesiderati [46].

Sia prima di effettuare il test della Piperidina, descritto nel paragrafo successivo, sia terminati tutti i cicli della sintesi peptidica si procede essiccando il contenuto del reattore. Per farlo si effettua un lavaggio usando DCM del reattore posizionato su una beuta in cui viene creato il vuoto per far passare tutti i liquidi attraverso il filtro e farli sgocciolare appunto nella beuta. Il reattore così lavato viene poi coperto con carta filtro e messo in campana da vuoto per un'ora.

### 2.4.1.1 Test della piperidina

Si tratta di un test effettuato per quantificare la resa di reazione di un *coupling* nella sintesi su fase solida. Si basa sulla quantificazione spettrometrica a 301 nm di N-(9-fluorenilmetil) piperidina, prodotto risultante dalla deprotezione Fmoc (Fig. 2.11).

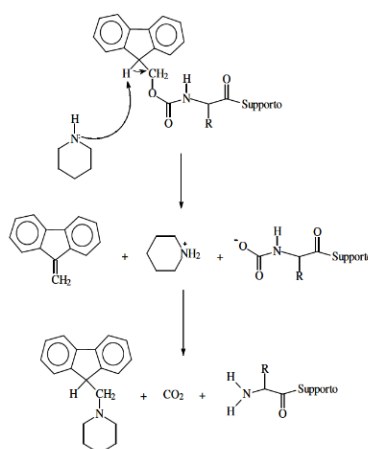


Fig. 2.11: meccanismo di deprotezione Fmoc

Prima di effettuare il test si secca il contenuto del reattore tramite il procedimento illustrato nel paragrafo precedente. Si effettua il test dopo il primo ciclo, quello che prevede il *coupling* tra la resina e la Serina. Si vuole una resa di reazione superiore al 98% per iniziare la sintesi con un alto grado di funzionalizzazione della resina perché, come detto, la resa di reazione cala con l'aumentare dei cicli. Si preparano due soluzioni da 50 mL ciascuna in due matracci. La prima, definita "bianco" si usa come controllo ed è composta da 0.5 mL di Piperidina diluita al 20% in DMF portata poi a volume con DMF. La seconda si crea facendo reagire da 4 a 8 mg di resina secca con 0.5 mL di piperidina diluita al 20% in DMF per 15 minuti. Si arresta la reazione diluendo con DMF fino ad un volume di 50 mL. Si utilizzano 2 cuvette per l'analisi nello spettrofotometro: inizialmente entrambe vengono riempite di bianco per azzerare lo strumento, successivamente se ne lava una e la si riempie con il campione e si effettua l'analisi prendendo l'assorbanza a 301 nm.

$$\text{Sostituzione Sperimentale} = \frac{\text{Abs } 301 \text{ nm} \cdot V[\text{mL}]}{\epsilon \cdot \text{peso resina [g]}}$$

dove  $\text{Abs}_{301 \text{ nm}}$  è l'assorbanza ottenuta,  $V$  è il volume della soluzione utilizzata e  $\epsilon$  è il coefficiente di estinzione molare che in questo caso vale  $7800 [\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}]$ .

$$\% \text{ resa di reazione} = \frac{\text{sostituzione sperimentale}}{\text{nuova sostituzione}} \times 100$$

$$\text{In cui nuova } \text{nuova sostituzione} = \frac{1000}{\text{PM resina} + \text{PM AA aggiunti} + \text{PM gruppi protettori}}$$

Dopo il test il reattore viene reinserito nel sintetizzatore, e si rigonfia il contenuto usando DMF per 10 minuti. Si può poi procedere con tutti gli altri cicli della sintesi.

#### 2.4.1.2 Deprotezione delle catene laterali e sblocco dalla resina

Terminati tutti i cicli della sintesi e seccato il contenuto del reattore è necessario procedere con la deprotezione delle catene laterali e con lo sblocco del peptide grezzo dalla resina. Essi si possono eseguire contemporaneamente, in quanto si utilizza lo stesso procedimento che prevede di aggiungere nel reattore un volume totale di 5 mL composto al 2.5% da acqua MilliQ, al 2.5% da trietilsilano (TES) ed al 95% da acido trifluoroacetico (TFA). La reazione viene lasciata procedere per 90 minuti agitando manualmente il reattore e viene poi interrotta effettuando dei lavaggi con TFA su una beuta in cui si crea il vuoto. Questa volta è il peptide sbloccato e deprotetto ad essere filtrato e a rimanere in soluzione nella beuta. Viene quindi travasato in un pallone e concentrato a piccolo volume utilizzando l'evaporatore rotante. Esso viene poi precipitato tramite etere etilico sotto agitazione magnetica e successivamente

trasferito in un gooch 4 per essere filtrato. Il gooch 4 viene coperto da carta filtro e seccato in campana a vuoto per 1 ora.

## 2.4.2 Cromatografia HPLC

La High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) viene impiegata per analizzare il peptide grezzo e quello puro. Per effettuare l'analisi **HPLC semipreparativa** il peptide grezzo viene disciolto in MilliQ in concentrazione 1 mg/mL e si procede all'ossidazione della Serina N-terminale del peptide tramite l'aggiunta di Periodato di Sodio (concentrazione 2.5 mM). La reazione avviene in 4 minuti a temperatura ambiente e si ottiene così il peptide con gruppo aldeide N-terminale (Fig. 2.12) che potrà legarsi ai gruppi amminici del chitosano formando una base di Schiff (C=N) che verrà poi ridotta utilizzando  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  ottenendo una ammina secondaria, molto più stabile.

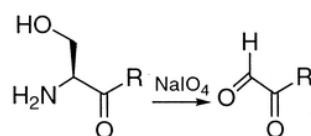


Fig. 2.12: Ossidazione della Serina N-terminale tramite utilizzo di  $\text{NaIO}_4$  per ottenere un gruppo aldeide N-terminale. R:il resto del peptide [47]

L'HPLC semipreparativa comprende un sistema di pompe, una colonna cromatografica e un rivelatore UV/Vis e viene impiegata per la purificazione del peptide grezzo, che avviene tramite separazione manuale delle componenti della soluzione contenente il peptide, basandosi sui valori di assorbanza, registrati nel tempo, del composto all'interno della colonna cromatografica. Per l'analisi si utilizzano due eluenti: l'eluente A composto dallo 0.05% di TFA in MilliQ e l'eluente B, fase organica, composta dallo 0.05% di TFA in Acetonitrile. Il gas viene eliminato dai due eluenti tramite un flusso di 30 ml/min elio.

La soluzione contenente il peptide (volume di circa 40 mL per semipreparativa) viene aspirata ed il peptide e tutti gli eventuali prodotti secondari (catene di AA non correttamente create ecc.) si legano tramite interazioni idrofobiche alla colonna che è un supporto funzionalizzato con catene idrocarburiche alifatiche. Per far separare i composti dalla colonna si fanno fluire i due eluenti per un tempo prestabilito. Il flusso è mantenuto costante a 4 mL/min, ciò che varia nel tempo sono le percentuali di eluente A e B poiché ciascun peptide interagisce in modo diverso con la colonna e quindi eluisce a una diversa concentrazione di solvente organico. Per questo motivo, il gradiente inizia con una bassa percentuale di eluente B, per poi aumentare gradualmente per consentire la separazione di peptidi distinti nel

campione. Impostato il gradiente a concentrazione crescente di B, il flusso scorrerà attraverso la colonna e la fase eluita potrà essere rilevata a 214 nm, lunghezza d'onda di assorbimento del legame peptidico. Aiutandosi con un registratore con pennino che trascrive su carta l'assorbanza nel tempo è possibile separare manualmente le varie componenti della fase eluita, dividendole in diverse provette. Selezionate le provette che dovrebbero contenere il peptide puro in base ad assorbanza e tempo di ritenzione in colonna si procede con l'HPLC analitica di esse.

L'**HPLC analitica** funziona allo stesso modo di quella semipreparativa. Lo strumento è dotato di un autocampionatore che contiene le *vials* in cui viene messo il campione da analizzare e un ago che ne aspira il contenuto. Lo strumento utilizzato in questo lavoro consente di aspirare ed analizzare fino a 250  $\mu\text{L}$  di campione. Gli eluenti sono gli stessi, ma la colonna ha un diametro minore. Il flusso viene tenuto a 1 ml/min. Il peptide puro deve restituire un unico picco di assorbanza simmetrico (e senza altri picchi minori in testa ed in coda) al tempo di ritenzione tipico del peptide.

### 2.4.3 Spettrometria di massa

Sul peptide grezzo e su quello puro viene effettuata una analisi spettrometrica di massa. La spettrometria di massa (SM) è una tecnica analitica che viene impiegata per valutare il peso molecolare di un campione. Le tecniche di SM più utilizzate sono la MALDI (matrix-assisted laser desorption ionization) e la ESI (electron spray ionization). In questo progetto è stata utilizzata la MALDI, che si basa sulla produzione di ioni a carica singola e non richiede precedenti analisi cromatografiche sul campione. Lo strumento utilizzato prevede di disporre sull'apposita piastra 1  $\mu\text{L}$  di campione da analizzare sul quale viene poi posto 1  $\mu\text{L}$  di un composto organico definito "matrice" il cui scopo è assorbire l'energia generata da un laser. La matrice utilizzata in questo lavoro è una soluzione composta al 50% da acqua MilliQ e al 50% da Metanolo in cui viene aggiunto lo 0.1% di TFA e 10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  di acido  $\alpha$ -ciano-4-idrossicinnamico (CHCA). Il campione coperto dalla matrice viene lasciato asciugare prima dell'inizio dell'analisi. All'interno dello strumento un laser ionizza in maniera soft il campione, evitando grandi perdite di campione. La ionizzazione crea, come detto, ioni positivi a carica singola che vengono accelerati da un potenziale elettrico all'interno di un tubo di accelerazione. Gli ioni si separano gli uni dagli altri in base al loro diverso rapporto massa su carica ( $m/z$ ). Viene rilevato, per ogni ione, il tempo di volo (Time Of Flight, TOF), ovvero il tempo che impiega a percorrere il tubo di accelerazione. Ad ogni TOF corrisponde un diverso rapporto  $m/z$ . È così possibile capire quali componenti sono presenti all'interno del campione, in base

alle informazioni sui TOF. Viene dunque generato uno spettro, denominato “impronta digitale di massa del peptide” in cui si hanno vari picchi in corrispondenza dei pesi molecolari dei componenti presenti all’interno del campione, tanto più alti quanto maggiore è la presenza di quel componente nel campione.

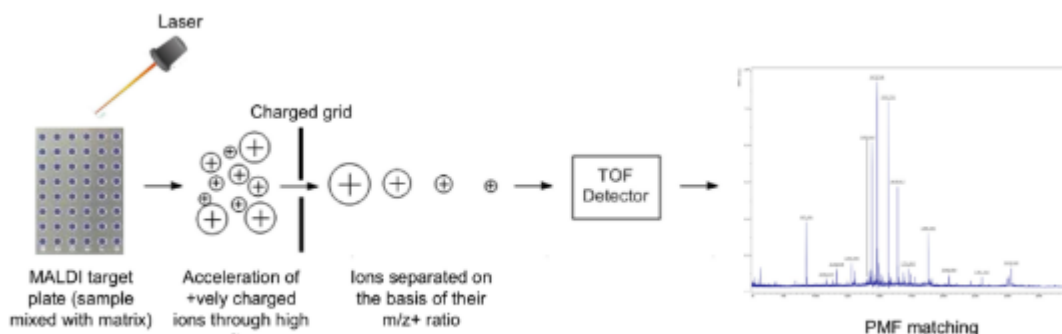


Fig. 2.13: principio di funzionamento MALDI

#### 2.4.4 Funzionalizzazione del chitosano

Per eseguire la funzionalizzazione del chitosano con il peptide GBMP1a aldeide puro si è utilizzata una procedura già presente in letteratura [48,49], che ha portato ad ottimi risultati. Viene ora riportato il metodo di funzionalizzazione mentre i dati relativi alle quantità di reagenti e materiali utilizzati verranno esplicitati nel capitolo successivo.

Si procede pesando la massa di peptide ottenuto e si prepara la stessa quantità sia di chitosano che di Sodio Cianoboridruro ( $\text{NaBH}_3\text{CN}$ ). Il peptide viene disciolto in acqua MilliQ in concentrazione 1mg/mL mentre il chitosano viene disciolto in acido acetico 0.2M. Quando entrambe le soluzioni sono pronte si aggiunge etanolo a temperatura ambiente a quella contenente il chitosano e la si porta a pH 5.1. Successivamente la si pone in agitazione magnetica e si aggiunge la soluzione contenente il peptide. Si procede aggiungendo  $\text{NaBH}_3\text{CN}$ , il cui scopo è quello di ridurre l'immina o base di Schiff ( $\text{C}=\text{N}$ ) che si ottiene dal legame tra gruppo aldeide del peptide e gruppo amminico del chitosano con perdita reversibile di una molecola di  $\text{H}_2\text{O}$ .  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  stabilizza l'immina eliminando la reversibilità, ottenendo così una ammina secondaria, fondamentale nel processo di funzionalizzazione del collagene (Fig. 2.14).

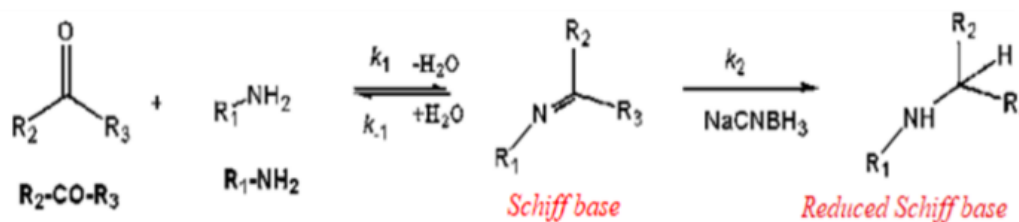


Fig. 2.14: formazione della base di Schiff e sua riduzione tramite utilizzo di  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  per ottenere una ammina secondaria

Si lascia in agitazione magnetica per 24h per poi procedere a modificare il pH della soluzione a 7. Si aggiunge poi alla soluzione EtOH a  $4^\circ\text{C}$  in quantità pari al volume totale della soluzione acquosa. Si lascia in agitazione magnetica per 10 minuti, quindi a  $4^\circ\text{C}$  per una notte. Al termine di questo procedimento si versa la soluzione in un gooch 3 posto su una beuta da vuoto: tutti i solventi vengono filtrati e raccolti nella beuta mentre il chitosano, ora funzionalizzato, rimane nel gooch. Infine, il gooch viene lasciato 1h in campana a vuoto per far seccare il chitosano funzionalizzato.

## 2.4.5 Funzionalizzazione delle membrane

Il metodo di funzionalizzazione delle membrane in collagene con chitosano o chit-GBMP1  $\alpha$  è diviso in 2 fasi ovvero reazione di attivazione e reazione di funzionalizzazione.

**Reazione di attivazione:** viene effettuata per ottenere un estere semistabile reattivo alle ammine a partire da un gruppo carbossilico del collagene. Ottenerlo è fondamentale per creare il legame ammidico con i gruppi amminici ( $\text{NH}_2$ ) del chitosano puro o con i gruppi  $\text{NH}_2$  residui del chitosano funzionalizzato con GBMP1 $\alpha$  aldeide, ovvero quelli che non hanno creato legami con il peptide (Fig.2.15). Il chitosano funzionalizzato presenta inoltre, come detto, ammine secondarie, anch'esse in grado di reagire con il collagene attivato.

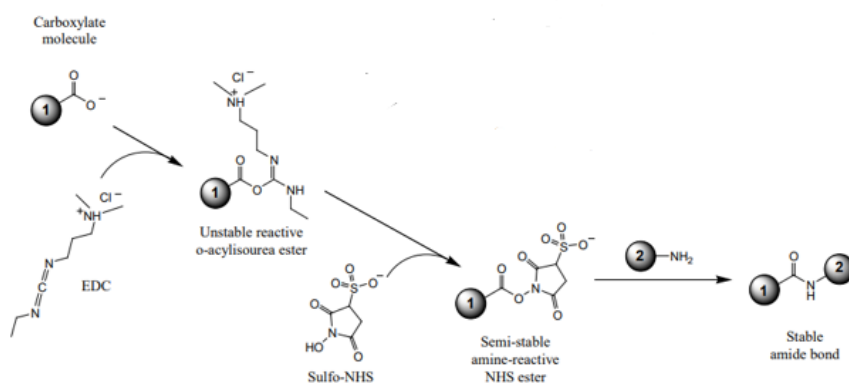


Fig. 2.15: meccanismo di azione di EDC/sulfo-NHS per la creazione di un estere reattivo stabile in grado di reagire coi gruppi amminici di un altro composto. In questa figura, 1: collagene, 2: chitosano

**Reazione di funzionalizzazione:** fase in cui i gruppi reattivi del collagene attivati vengono fatti reagire con il chitosano per la funzionalizzazione.

In seguito ai risultati ottenuti nella fase preliminare illustrati nel capitolo successivo, si è scelto il seguente protocollo di funzionalizzazione delle membrane OsseoGuard® con chitosano e chitosano funzionalizzato con il peptide GMBP1a:

- **reazione di attivazione:** la membrana viene immersa in una soluzione di EDC/NHS 30mM in Acetone/MilliQ in rapporto di volume 13:7 e lasciata a 0°C per 90 min.
- **reazione di funzionalizzazione:** viene aggiunta una soluzione di chitosano a concentrazione 10 g/L in 0.2 M AcOH/H<sub>2</sub>O. Reazione a temperatura ambiente per 24h. La quantità di soluzione di funzionalizzazione che si utilizza è pari al 50% della quantità di soluzione attivante utilizzata.

#### **2.4.5.1 Lavaggi delle membrane**

Terminata la reazione di funzionalizzazione si procede con dei lavaggi delle membrane per eliminare tutto ciò che non si è correttamente legato e i prodotti secondari della reazione di ancoraggio. Sono stati effettuati come segue (quantità variabili a seconda dell'applicazione):

- 2 lavaggi in MilliQ della durata di un'ora;
- 1 lavaggio in MilliQ *overnight*.

#### **2.4.6 Spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier (FT-IR)**

L'analisi FT-IR è stata eseguita dalla Dott.ssa Antonella Pasquato del Dipartimento di Ingegneria Industriale dell'Università di Padova per quanto riguarda la fase preliminare del progetto e dalla Dott.ssa Giovanna Iucci del Dipartimento di Scienze dell'Università Roma Tre per le analisi sui campioni funzionalizzati con il metodo definitivo.

La spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier (FT-IR) è una tecnica spettroscopica di assorbimento normalmente utilizzata nel campo della caratterizzazione dei materiali per lo studio dei legami chimici. Valuta l'assorbimento di radiazione IR di un campione. Lo spettro di assorbimento IR risultante consente di identificare la composizione chimica del campione in quanto ogni struttura molecolare ne produce uno diverso. Si ottiene quindi una sorta di "impronta digitale" del materiale analizzato, che dà informazioni su quali strutture molecolari lo compongono.

La strumentazione per FTIR comprende una sorgente che emette radiazione elettromagnetica nell'infrarosso, un interferometro di Michelson costituito da tre specchi (uno semiriflettente, uno fisso e uno mobile), un *detector* ed un *computer* che esegue la trasformata di Fourier del segnale digitalizzato. Una sorgente a incandescenza emette una radiazione in campo infrarosso che giunge allo specchio semiriflettente che divide il fascio in due metà, una indirizzata allo specchio fisso e l'altra allo specchio mobile. Lo specchio mobile, spostandosi, introduce una differenza di cammino ottico tra i due raggi. I due raggi vengono riflessi e tornano allo specchio semiriflettente dove interferiscono tra loro sia in modo costruttivo che in modo distruttivo. Ne emerge un fascio unico composto da un insieme complesso di modulazioni di frequenze. Così facendo l'interferometro permette la scansione di tutte le frequenze presenti nella radiazione IR generata dalla sorgente. Il fascio viene indirizzato al campione e può attraversarlo (analisi in trasmissione) o essere riflesso dalla sua superficie (analisi in riflessione). Avviene così l'assorbimento di energia alle diverse frequenze da parte del campione. Il fascio in uscita dal campione viene indirizzato al detector e il segnale rilevato viene campionato a intervalli ben definiti, per ognuno dei quali è nota la posizione dello specchio mobile. Questo è l'interferogramma e rappresenta l'intensità del segnale rilevato nel dominio del tempo. Gli si applica la trasformata di Fourier per ottenere un grafico della trasmittanza (o della sua assorbanza) in funzione del numero d'onda.

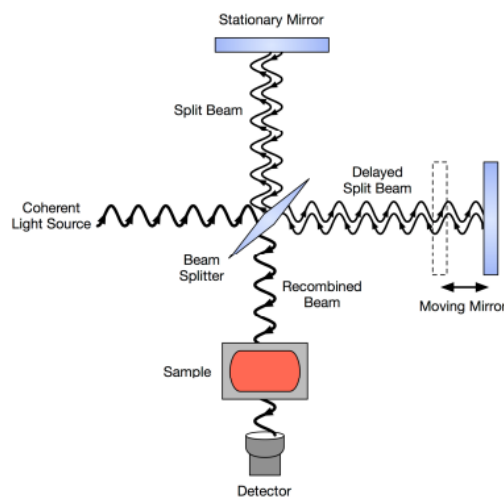


Fig. 2.16: schema di funzionamento dell'analisi FT-IR

La radiazione infrarossa è la parte dello spettro elettromagnetico che si trova tra la regione visibile e quella delle microonde, si suddivide in near IR (lunghezza d'onda 800 – 2500 nm), medium IR (2500 nm – 25  $\mu\text{m}$ ) e far IR (25  $\mu\text{m}$  – 500  $\mu\text{m}$ ). Per l'analisi di polimeri e peptidi la zona di maggiore utilizzo è quella del medium IR. L'assorbimento di radiazione IR genera due tipologie di moti vibrazionali a livello atomico nel campione: lo *stretching*, risultante da una continua modifica della distanza di legame tra due atomi ed il *bending*, derivante dalla

variazione dell'angolo di legame tra gli atomi interessati. La quantità di energia necessaria a produrre uno dei moti vibrazionali è direttamente proporzionale alla forza e alla polarità dei legami tra gli atomi della molecola analizzata. Ogni picco nello spettro IR corrisponde, di conseguenza, all'assorbimento di energia da parte di un particolare legame in vibrazione. I gruppi peptidici possono dare fino a nove bande caratteristiche, dette amide A, B, I, II, III, IV, V, VI e VII, caratterizzate ognuna da uno specifico *range* di lunghezze d'onda. Ad esempio, la banda amide I ( $1660\text{ cm}^{-1}$ ) è associata allo *stretching* del legame C=O. L'esatta posizione del picco è determinata dalla conformazione e dalla distribuzione di legami a idrogeno. La banda amide II ( $1550\text{-}1510\text{ cm}^{-1}$ ) deriva dalla vibrazione del legame N-H. Analizzando lo spettro e le bande che lo compongono è quindi possibile risalire alla composizione del campione in base a quali gruppi funzionali contiene.

Un microscopio Nicolet Continuum FT-IR (Thermo Scientific, USA) con un  $15 \times$  Thermo-Electron. L'obiettivo Infinity Replachromat è stato utilizzato per l'acquisizione di spettri FT-IR. Il sistema  $\mu$  - FT-IR era equipaggiato con un rivelatore di tellururo di mercurio-cadmio (MCT) di tipo A raffreddato con azoto liquido e un tavolino motorizzato X-Y-Z con passi incrementali di 1 mm. Gli spettri sono stati raccolti in Totale attenuato Modalità di riflettanza utilizzando un elemento ATR ( $45^\circ$  al germanio a riflessione singola TIP ATR TM) nel regione di  $600\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$  (MID-IR) con una risoluzione spettrale di  $1\text{ cm}^{-1}$ .

### 2.4.7 Spettroscopia fotoelettronica a raggi X (XPS)

L'analisi XPS è stata eseguita dalla Prof.ssa Giovanna Iucci del Dipartimento di Scienze dell'Università Roma Tre.

La X-ray photo-electron spectroscopy (XPS) è una tecnica spettroscopica per analisi chimiche per la caratterizzazione di superfici: permette di determinare gli elementi chimici che le compongono, le loro quantità ed il loro stato chimico. L'XPS si basa sull'irraggiamento del campione con raggi X e l'analisi degli elettroni emessi dal materiale a seguito della sua interazione con i raggi (effetto fotoelettrico). Le sorgenti di raggi X sono degli anodi metallici che vengono bombardati da elettroni ad alta energia. I raggi X vengono rilasciati a causa della ionizzazione del livello interno dell'atomo di metallo. Il campione viene irraggiato dai raggi X ed emette degli elettroni ("elettroni foto-emessi").

L'energia cinetica di un elettrone ottenuto per effetto fotoelettrico è uguale all'energia dei fotoni incidenti ( $h\nu$ ) meno l'energia di legame dell'elettrone nell'atomo (BE) meno la funzione lavoro del materiale ( $\Phi$ ):  $EK = h\nu - BE - \Phi$ . Misurando la EK dell'elettrone espulso è possibile risalire alla sua energia di legame, la quale è indicativa dell'elemento chimico coinvolto.

Lo spettro degli elettroni foto-emessi è costituito da una serie di picchi. Sull'asse delle ascisse è rappresentata l'energia di legame in eV mentre sull'asse delle ordinate si trova l'intensità del segnale. L'ampiezza dei picchi è determinata da tre elementi: l'apertura energetica della radiazione X, il tempo di vita medio dello stato eccitato e la risoluzione dell'analizzatore; l'intensità dei picchi è correlabile al numero di fotoemissioni rilevate ad uno specifico livello di energia di legame. Analizzando posizione ed intensità dei picchi è possibile determinare quali elementi sono presenti sulla superficie del campione ed in che quantità.

La strumentazione XPS è composta da (Fig. 2.17):

- sorgente a raggi X;
- camera in acciaio ad alto vuoto;
- lente per attirare gli elettroni;
- analizzatore di energia per gli elettroni emessi;
- rivelatore in grado di determinare intensità dei fotoelettroni emessi.

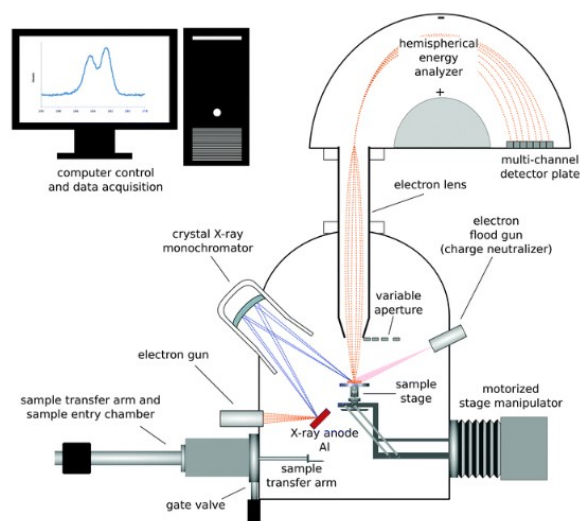


Fig. 2.17: schema di funzionamento dell'analisi XPS

Le analisi XPS sono state eseguite con uno strumento artigianale costituito da camere ad ultra alto vuoto (UHV) utilizzate sia per la preparazione sia per le analisi del campione e separate da una valvola. In particolare, la camera di analisi è equipaggiata con un manipolatore a sei gradi di libertà e un analizzatore di elettroni emisferico con raggio medio di 150 mm, costituito, inoltre, da un sistema di uscita a cinque lenti combinato con un rivelatore a 16 canali che fornisce una risoluzione dello strumento di 1 eV misurata a livello core Ag 3d<sub>5/2</sub>.

I campioni sono stati introdotti nella camera di preparazione e sono stati lasciati essiccare per tutta la notte ad una pressione di 10<sup>-8</sup> Torr prima di essere introdotti nella camera di campionamento ad una pressione nel range di 10<sup>-8</sup> - 10<sup>-9</sup> Torr. La radiazione X utilizzata è una

radiazione non monocromatizzata Mg K $\alpha$  (1253.6 eV). La calibrazione della scala energetica è stata effettuata con riferimento allo spettro C1s del livello core dei carboni alifatici (285.0 eV).

### 2.4.8 Microscopia a due fotoni (TPM)

Le misure di microscopia a due fotoni sono state eseguite presso la Fondazione Ricerca Biomedica Avanzata VIMM di Padova.

La microscopia a due fotoni (TPM, Two-Photon Fluorescence Microscopy) è una tecnica di *imaging* per cellule e tessuti e consente lo studio tridimensionale non invasivo di campioni biologici con elevata risoluzione spaziale. Si sfrutta l'emissione in fluorescenza dei campioni da analizzare.

Alla base di questa tecnologia vi sono i processi di eccitazione ed emissione. L'eccitazione si verifica quando la luce viene assorbita da una molecola del campione e cambia la sua condizione dallo stato fondamentale ad uno stato eccitato ad energia più elevata. L'emissione avviene quando la molecola ritorna al suo stato di energia fondamentale attraverso processi vibrazionali emettendo un fotone a una lunghezza d'onda maggiore della luce incidente.

Nella microscopia a due fotoni una molecola (spesso si tratta di un fluoroforo) viene eccitata dall'assorbimento simultaneo di due fotoni. Le lunghezze d'onda di eccitazione dei due fotoni (nel vicino infrarosso) sono più lunghe di quella della luce emessa risultante e la loro energia è inferiore. Il primo fotone eccita la molecola ad uno stato virtuale intermedio mentre il secondo la porta allo stato eccitato finale. Affinché avvenga l'assorbimento simultaneo dei due fotoni, la loro energia combinata deve essere maggiore del divario tra l'energia degli stati base ed eccitato della molecola. L'uso di questa tecnica permette di raggiungere risoluzioni assiali molto ridotte e l'immagine ottenuta viene chiamata "sezione ottica", in riferimento al fatto che è possibile indagare il campione analizzando separatamente varie sezioni della sua profondità.

Il metodo riduce il rischio di *foto-bleaching* e fototossicità che possono limitare l'applicazione della microscopia a fluorescenza convenzionale e riduce il foto-danneggiamento del campione producendo immagini con un contrasto più elevato. Nella microscopia a due fotoni le lunghezze d'onda di eccitazione dei due fotoni sono meno dannose per il campione e forniscono una penetrazione più profonda dei tessuti, in media da cinque a venti volte più profonda rispetto alla microscopia a fluorescenza convenzionale. Si ha anche una penetrazione più profonda a causa di una ridotta dispersione della luce. Un vantaggio dell'area concentrata del laser è che le immagini risultanti presentano meno sfocature, evitando quindi difficoltà di interpretazione.

In Fig. 2.18 è mostrato lo schema di funzionamento di un microscopio a due fotoni.

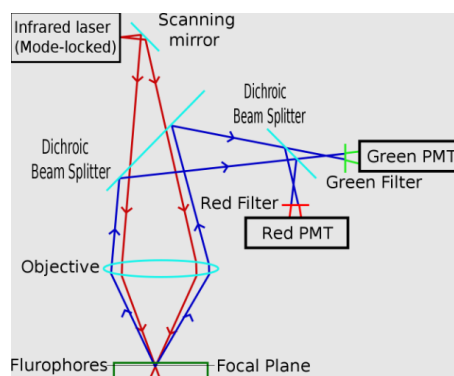


Fig. 2.18: schema di funzionamento della microscopia a due fotoni

La strumentazione comprende:

- una sorgente di luce di eccitazione;
- un microscopio a fluorescenza a scansione;
- un rivelatore ad alta sensibilità.

Si produce fluorescenza nell'area in cui il raggio laser è strettamente focalizzato: del segnale di fluorescenza totale emesso, l'80% deriva da una regione spessa  $1\mu\text{m}$  attorno al punto focale. I fotoni emessi vengono rilevati dai fotorilevatori ed il segnale prodotto viene mappato sui singoli pixel dell'immagine tramite un *computer*.

In questo specifico lavoro, vista l'assenza di cellule all'interno dei campioni, si è effettuata l'analisi senza l'utilizzo di cromofori. La lunghezza d'onda di emissione valutata è  $800\text{ nm}$ , le immagini sono state prese alla seconda armonica con una frequenza di  $0.2\text{ frame/s}$ . L'ingrandimento dell'obiettivo utilizzato è  $25\times$  e sono state analizzate le immagini ad un ingrandimento elettronico dei detector di  $0.6\times$ ,  $1\times$  e  $2\times$ .

## 2.4.9 Saggi biologici

I saggi biologici svolti in questo lavoro sono stati effettuati in collaborazione con la Dr.ssa Paola Brun presso il Dipartimento di Medicina Molecolare dell'Università degli Studi di Padova. Sono stati svolti: saggio di proliferazione cellulare, saggio di espressione genica (geni SPP1 e Runx2), saggio di calcificazione tramite *alizarin staining*.

### Coltura cellulare

I saggi biologici sono stati effettuati utilizzando una coltura cellulare di osteoblasti umani isolati da osso mandibolare prelevato da un individuo sano adulto durante una operazione chirurgica. Gli osteoblasti sono stati coltivati a  $37^\circ\text{C}$  in un'atmosfera al  $5\%$  di  $\text{CO}_2$  in *flasks* per coltura cellulare contenenti terreno completo composto da DMEM (Dulbecco Modified Eagle

Medium) arricchito con il 10% (v/v) di siero bovino fetale (FBS, fetal bovine serum) inattivato al calore, 10 U/mL di streptomina e penicillina, 1% (v/v) di amminoacidi non essenziali, 1% (v/v) di sodio piruvato e 1U/ml di insulina, tutto fornito da Gibco. Raggiunta la confluenza cellulare gli osteoblasti sono stati staccati tramite incubazione con tripsina-EDTA ed incubati nel terreno completo con l'aggiunta di 5 µg/mL di acido ascorbico, desametasone 10nM e β-glicerofosfato 10mM al fine di ottenere la differenziazione cellulare. Dopo ulteriori 6 giorni di coltura, le cellule sono state staccate mediante tripsina EDTA, seminate nei pozzetti contenenti i campioni da analizzare ed incubate a 37°C per tempi diversi, in base al tipo di test da eseguire.

#### **2.4.9.1 Proliferaazione cellulare**

Viene studiata la proliferazione cellulare per valutare la capacità dei materiali, nello specifico delle membrane funzionalizzate, di favorire la riproduzione e moltiplicazione delle cellule seminate su di esse. È necessaria una buona adesione cellulare al materiale per avere proliferazione. In questo lavoro le cellule utilizzate sono gli osteoblasti umani. Essi vengono inizialmente incubati a 37°C per 10 minuti con 25 µmol di carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE), una sonda fluorescente in grado di permeare nelle cellule, la quale viene spartita equamente tra le cellule figlie durante il processo di divisione cellulare. Questa reazione viene interrotta tramite l'aggiunta di cinque volumi di PBS freddo e successiva centrifugazione. Gli osteoblasti vengono quindi seminati ed incubati sulle superfici da testare a 37°C. Viene stabilito un tempo di incubazione (7 giorni in questo caso specifico) terminato il quale le cellule vengono staccate mediante trattamento con Tripsina per poi essere lavate e centrifugate. La ripartizione della fluorescenza tra le cellule figlie è indice della proliferazione cellulare e viene valutata tramite analisi FACS (*Fluorescence activated cell sorting*) che fa uso di un citofluorimetro ottico a flusso che permette di contare il numero di cellule e la distribuzione di fluorescenza.

#### **2.4.9.2 Espressione genica q-PCR**

L'analisi della variazione dell'espressione genica negli osteoblasti indotta dalle interazioni con le membrane è stata effettuata tramite la tecnica Quantitative-Polymerase Chain Reaction (q-PCR), una normalizzazione della PCR che consente l'amplificazione dei geni e l'analisi quantitativa del cDNA (il DNA codificante che si ottiene dalla retrotrascrizione dell'mRNA estratto dalle cellule). L'mRNA trascritto si può correlare all'espressione proteica. In questo progetto si è effettuata la quantificazione dei geni codificanti due sequenze proteiche

fondamentali per l'osteogenesi: *secreted phosphoprotein 1* (SSP1) alias "osteopontina" e *Runt-related transcription factor 2* (Runx2), codificate dagli omonimi geni.

Il procedimento è il seguente: si estrae l'RNA dalle cellule seminate sulle membrane da cui si ottiene, tramite retrotrascrizione, il cDNA che viene poi amplificato e quantificato tramite q-PCR.

Gli osteoblasti vengono seminati sulle membrane e si lasciano trascorrere 24 ore a 37°C, per poi essere raccolti. Dopo aver eliminato il DNA contaminante tramite trattamento per 15 minuti a temperatura ambiente con DNase, si estrae l'RNA dagli osteoblasti con il E.Z.N.A total Kit I, fornito da Omega Bio.tek, Inc. Partendo da questo si genera il cDNA tramite l'utilizzo di *random primers* ad innesco universale e dell'enzima del virus della leucemia murina (MuLV, Applied Biosystem, Carlsbad, CA). I livelli degli mRNA specifici trascritti vengono determinati tramite la reazione di amplificazione real time q-PCR, usando il termociclatore ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystem, Carlsbad, CA) e la miscela di reazione Syber Green PCR Master Mix (Applied Biosystem, Carlsbad, CA). Syber Green emette segnale di fluorescenza solo dopo l'amplificazione del cDNA e una volta che si è intercalato ad esso; la quantità di fluorescenza emessa viene letta dai raggi laser del termociclatore ed è direttamente proporzionale alla quantità di mRNA presente nel campione.

La q-PCR è costituita da tre reazioni principali:

- Separazione o denaturazione: la miscela viene portata ad alte temperature (95-99°C) per separare la doppia elica di cDNA;
- Appaiamento o *annealing*: la temperatura viene abbassata a 60°C per permettere l'appaiamento dei primer alle sequenze complementari sul cDNA;
- Allungamento o estensione: la temperatura viene alzata (65-72°C) per permettere l'allungamento degli amplificanti.

Per ogni gene di interesse è stata creata una curva standard mediante amplificazione di una quantità nota del corrispondente cDNA. L'espressione genica è stata quindi normalizzata all'espressione di un gene endogeno, la gliceraldeide-3-fosfatodeidrogenasi (GA3PDH).

### **2.4.9.3 Analisi di mineralizzazione**

Il saggio Alizarin Red S staining viene utilizzato per valutare la deposizione di calcio. Alizarina è un colorante di colore rosso che reagisce con il calcio in un processo di chelazione che porta alla formazione del complesso Alizarin Red S-calcio.

Dopo 7 giorni di incubazione nei pozzetti contenenti i campioni la coltura cellulare viene lavata 2 volte con PBS e poi fissata con paraformaldeide (PFA) 4% per 10 minuti a temperatura

ambiente. Si eseguono altri lavaggi con PBS, dopo i quali gli osteoblasti vengono incubati con una soluzione 40mM Alizarin Red S (Sigma-Aldrich) a temperatura ambiente per 30 minuti in agitazione. Successivamente, le cellule vengono lavate nuovamente. I campioni vengono analizzati al microscopio ottico con lo scopo di visualizzare i depositi di calcio colorati in rosso dall'alizarina.

Per poter quantificare i depositi di calcio, la coltura cellulare viene incubata a -20° C per 30 minuti, viene poi aggiunta una soluzione di AcOH al 10% v/v e segue un'incubazione di 30 minuti a temperatura ambiente sotto agitazione. Al termine di ciò gli osteoblasti vengono agitati tramite vortex per 30 secondi ed incubati a 85 °C per 10 minuti. La reazione di lisi viene bloccata con 5 minuti in ghiaccio. In seguito ad una centrifuga a 20.000 rpm per 15 minuti, viene registrata l'assorbanza del surnatante a 450 nm tramite un lettore per micropiastre (Thermos). Viene generata in parallelo una curva standard con concentrazioni note di Alizarin Red S, utilizzata per calcolare la concentrazione di alizarina nei diversi campioni e quindi definire la quantità di calcio in ciascun campione.

#### **2.4.9.4 Saggio antibatterico**

##### **Ceppo batterico e coltura**

L'azione antibatterica è stata saggiata utilizzando *Staphylococcus aureus* (ceppo NCTC 8530 acquistato da ATCC, LGC Standards; Milano), batterio Gram positivo. Le colture di *S. aureus* sono state mantenute in terreno liquido *Trypticase soy* (TS; acquistato da Fisher Scientific; Milano) a temperatura ambiente. Al momento dell'esperimento sono stati allestiti inoculi freschi di *S. aureus* introducendo 100 µl di coltura in 10 ml di terreno TS. Gli inoculi sono poi stati fatti crescere per 16 ore a 37°C sotto costante agitazione (150 rpm) al fine di favorire l'aerazione della coltura. La concentrazione della sospensione batterica è stata quindi valutata mediante lettura spettrofotometrica, aggiustata a 0,5 McFarland ed infine diluita in terreno TS fresco al fine di ottenere colture con concentrazione pari a  $1 \times 10^6$  unità formanti colonia (CFU) per ml.

##### **Valutazione dell'attività antibatterica**

Le colture batteriche allestite come sopra descritto sono state incubate con le matrici oppure su supporto plastico come controllo positivo di coltura. Le colture sono quindi state incubate a 37°C per 24 ore. Al termine dell'incubazione, le colture sono state trasferite in tubi sterili e opportunamente diluite in terreno TS fresco. 100 µl delle diluizioni sono stati trasferiti in piastre

Petri contenenti 10 ml di terreno TS addizionato di agar (Fisher Scientific) 1,5% p/vol. Le colture batteriche sono quindi state disperse sulla superficie della piastra agar mediante l'uso di biglie di vetro sterili.

Le piastre sono infine state incubate a 37°C per 16 ore. Al termine dell'incubazione, le colonie batteriche sono state contate nelle piastre aventi colonie in numero compreso tra 30 e 300. Il risultato ottenuto è quindi stato corretto per il fattore di diluizione.

#### **2.4.10 Analisi meccanica a trazione**

L'analisi di trazione monoassiale a rottura su provini ad osso di cane è stata eseguita in collaborazione con la Dott.ssa Martina Todesco del gruppo di ricerca del Prof. A. Bagno del dipartimento di Ingegneria Industriale dell'Università di Padova. È stata utilizzata la macchina per prove di trazione biassiale TRAMA della ditta IRS Ingegneria Ricerca Sistemi.

I provini hanno dimensioni di larghezza e lunghezza della zona utile corrispondenti a 2 mm x 5 mm. Prima di effettuare la prova, viene misurato lo spessore di ciascun provino nella zona utile tramite l'utilizzo di uno spessimetro (Mitutoyo Absolute, RS Italy).

Il provino da analizzare viene agganciato ai morsetti dei due attuatori utilizzati e viene interposta della carta abrasiva tra morsetti e provino per impedire slittamenti durante l'analisi. Prima dell'inizio dell'analisi effettiva viene effettuato un pretensionamento del provino con 0.1 N di forza. Raggiunto questo valore di forza può partire l'analisi. Viene dato in input alla macchina il valore di spostamento totale degli attuatori desiderato in mm (che si divide equamente tra i due attuatori) e la velocità di spostamento. Il sistema rileva per ogni istante della prova il valore di forza (in Newton) alla quale è sottoposto il campione (registrata ugualmente dai due attuatori) fino a quando non si giunge al valore di spostamento impostato. Si ottiene quindi, ad analisi terminata, il grafico forza-spostamento relativo alla prova. Da questo si può quindi risalire al corrispondente grafico tensione-deformazione:

$$\delta = \frac{F}{A} = \frac{\frac{F_1+F_2}{2}}{w*d} \text{ [Mpa]}$$

dove si indica con  $\delta$  il valore di tensione, con F la forza totale, con  $F_1$  ed  $F_2$  la forza registrata dai due attuatori, con w la larghezza del provino (sempre 2 mm) e con d lo spessore del provino.

$$\epsilon = \frac{L-L_0}{L_0} = \frac{s_1+s_2}{L_0}$$

Dove si indica con  $\epsilon$  la deformazione, con L la lunghezza del provino ad ogni istante, con  $L_0$  la lunghezza iniziale del campione (sempre 5 mm) e con  $s_1$  e  $s_2$  gli spostamenti dei due attuatori.

Dal grafico tensione-deformazione si possono ricavare i valori di tensione e deformazione a rottura ed il modulo di Young (pendenza della retta interpolante i punti del grafico corrispondenti a deformazione 1% e 10%).

In questo lavoro è stato impostato un valore di spostamento di 5 mm ed una velocità di spostamento degli attuatori di 0.2 mm/s.

## **2.5 Analisi statistica**

I dati ottenuti dai saggi biologici e meccanici sono stati analizzati ed elaborati con Prism (GraphPad Software 9). I risultati di proliferazione cellulare, espressione genica ed Alizarin Red S sono stati confrontati utilizzando il test di analisi della varianza unidirezionale (one way ANOVA). È stato eseguito il test di confronto multiplo di Tukey per confrontare tra loro tutte le condizioni. Il livello di significatività applicato è del 5%.

## CAPITOLO 3

### PARTE SPERIMENTALE

#### 3.1 Sintesi del peptide

È stata effettuata la sintesi su fase solida del peptide SxGBMP1a usando la chimica Fmoc, impiegando il sintetizzatore Syro I. La resina utilizzata come supporto solido è la Rink Amide MBHA (sostituzione 0.62 mmol/g) e la scala di sintesi è 0.125 mmol; sono stati utilizzati, pertanto, 220 mg di resina.

La sequenza peptidica è:

H-Ser-x-Pro-Phe-Pro-Leu-Ala-Asp-His-Leu-Asn-Ser-Thr-Asn-His-Ala-Ile-Val-Gln-Thr-Leu-Val-Asn-Ser-NH<sub>2</sub>

Amminoacidi utilizzati e relativi pesi:

- Fmoc-Ala-OH = 0.916 g
- Fmoc-Asp (OtBu) = 0.670 g
- Fmoc-Phe = 0.631 g
- Fmoc-His (Trt) = 1.824 g
- Fmoc-Ile = 0.575 g
- Fmoc-Leu = 1.505 g
- Fmoc-Asn (Trt) = 2.546 g
- Fmoc-Pro = 0.993 g
- Fmoc-Gln (Trt) = 0.996 g
- Fmoc-Ser (tBu) = 1.633 g
- Fmoc-Thr (tBu) = 1.170 g
- Fmoc-Val = 0.999 g
- Fmoc-7-aminoheptanoico = 0.598 g

OtBu, Trt e tBu sono i gruppi protettori dei gruppi funzionali in catena laterale degli AA.

Ogni AA è stato disciolto in DMF per raggiungere una concentrazione molare pari a 0.63M. Per migliorare la resa di reazione di ogni *coupling* sono stati utilizzati 5 equivalenti di ogni AA e della soluzione attivante HBTU e 10 equivalenti di DIPEA.

È stata preparata una soluzione 0.45M di HBTU/Oxima Pure/DMF, una soluzione 40% piperidina/DMF e una soluzione 1.8N DIPEA/NMP.

La sintesi consiste in 24 cicli di *coupling* doppi, di cui il primo tra resina e AA C-terminale, la Serina. È stato inserito uno STOP al termine del primo ciclo per interrompere la sintesi per poter effettuare il test alla piperidina. Seguendo il metodo illustrato nel capitolo precedente si

è ottenuta una resa di reazione del 98.3%. Essendo questo risultato soddisfacente, si è proceduto con la sintesi facendo avvenire tutti i cicli successivi senza più alcuna interruzione. Dopo l'ultimo ciclo è stato aggiunto un ciclo di Fmoc deprotection per eliminare il gruppo protettore del gruppo  $\alpha$ -amminico della Serina N-terminale.

Terminata la sintesi il contenuto del reattore è stato lavato 3 volte con DCM su una beuta da vuoto. Il reattore è poi stato lasciato 1h in campana a vuoto per farne seccare il contenuto.

Peso teorico di resina + peptide con catene laterali protette = 549 mg.

Peso ottenuto di resina + peptide con catene laterali protette = 533 mg.

### **3.1.1 Sblocco del peptide dalla resina e deprotezione delle catene laterali**

Entrambe le operazioni sono state eseguite contemporaneamente seguendo il metodo illustrato nel capitolo precedente. Per farlo sono stati inseriti nel reattore, nell'ordine:

- 0.125 mL di Acqua MilliQ;
- 0.125 mL di TES;
- 4.75 mL di TFA.

La reazione di sblocco è durata 90 minuti. Successivamente il contenuto del reattore è stato lavato 3 volte con TFA e filtrato in una beuta in cui è stato creato il vuoto. Così facendo il peptide grezzo, con catene laterali sbloccate e staccato dalla resina grazie alla reazione appena descritta, è stato filtrato e raccolto; nel reattore è rimasta la resina. Il liquido contenente il peptide è stato travasato dalla beuta in un pallone di vetro. È stato utilizzato l'evaporatore rotante per far ridurre la soluzione a piccolo volume. Il peptide grezzo così ottenuto è stato fatto precipitare tramite l'aggiunta di etere freddo sotto agitazione magnetica poi filtrato in un gooch 4. Il peptide grezzo sbloccato è stato lasciato 1h in campana da vuoto.

Sono stati ottenuti 250 mg di SxGBMP1a grezzo.

### **3.1.2 Caratterizzazione del peptide**

È stata eseguita un'analisi spettrometrica di massa MALDI di controllo, come primo metodo di verifica per assicurarsi che il peptide voluto sia tra i prodotti della sintesi. Il peso molecolare di SxGBMP1a senza gruppi protettori teorico è 2601.943 Da. Si riporta in Fig. 3.1 il risultato ottenuto dall'analisi, che conferma in primo luogo l'effettiva presenza del peptide voluto.

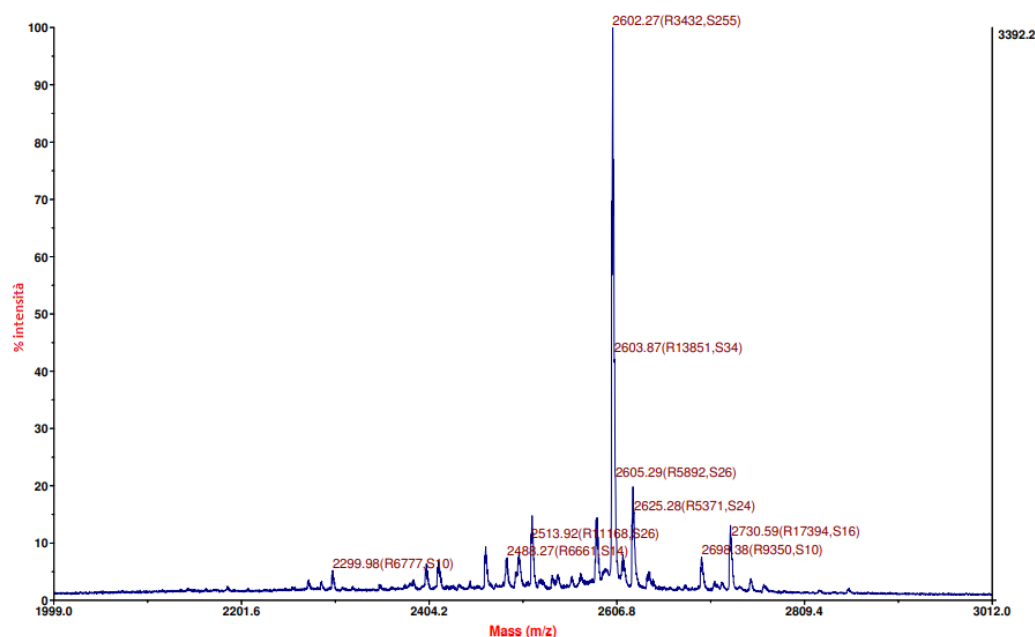


Fig. 3.1: risultato della spettrometria di massa del peptide grezzo SxGBMP1 $\alpha$

I picchi di intensità inferiore si riferiscono alle componenti da cui andrà purificato il peptide, come catene corte, AA che non hanno reagito correttamente ecc.

È stata poi effettuata un'analisi HPLC del peptide grezzo, come ulteriore verifica. È stata utilizzata la colonna cromatografica Atlantis dC18 (5  $\mu$ m, 100 Å, 4.6 x 250 mm, Waters) con un gradiente dal 24% al 39% di eluente B in 30 minuti a flusso in colonna di 1 mL/min. Sono stati iniettati 100  $\mu$ L di peptide grezzo disciolto in MilliQ in rapporto peso/volume 1:1. Il detector è stato impostato a 214 nm. Il risultato ottenuto è il seguente:

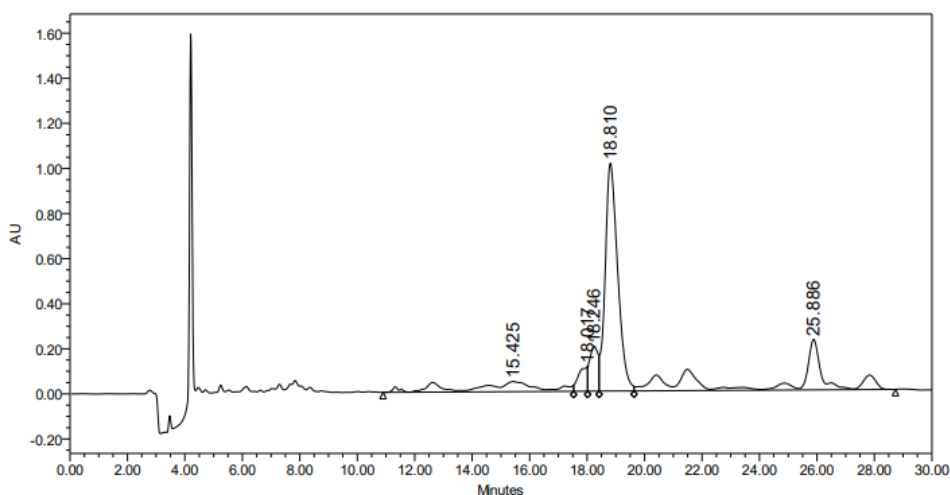


Fig. 3.1: HPLC analitica del peptide SxGBMP1a grezzo, colonna Atlantis dC18, volume di iniezione: 100  $\mu$ L, flusso: 1 mL/min, eluente A: 0.05% TFA in MilliQ, eluente B: 0.05% in Acetonitrile, gradiente: da 24% a 39% di B in 30 minuti,  $\lambda$ : 214 nm. Sull'asse delle ordinate sono riportati i valori di assorbanza.

Il picco al minuto 18.8 è quello relativo al peptide (tempo di ritenzione di SxGBMP1a), gli altri si riferiscono a prodotti secondari presenti nel campione.

Ottenuti questi risultati si è svolta la reazione di ossidazione della Serina N-terminale con lo scopo di ottenere un gruppo aldeide N-terminale. Pertanto, partendo dal peptide SxGBMP1a si è ottenuto il peptide GBMP1a aldeide. La reazione effettuata è quella descritta nel capitolo precedente: il peptide grezzo viene disciolto in MilliQ in rapporto mg/mL 1:1 e si aggiunge Periodato di Sodio fino a raggiungere una soluzione 2.5 mM. La reazione avviene in 4 minuti a temperatura ambiente e si ottiene così il peptide con gruppo aldeide N-terminale.

### 3.1.3 Purificazione del peptide

Per la purificazione del peptide si è utilizzata la HPLC semipreparativa con la colonna cromatografica Atlantis dC18 OBD Preparative Column (10  $\mu$ m, 100 Å, 10 x 250 mm, Waters), con un gradiente dal 25% al 35% di eluente B in 40 minuti a flusso in colonna di 4 mL/min. Sono stati analizzati 40 mg di peptide grezzo alla volta, disciolti in MilliQ in rapporto peso/volume 1:1. Il detector è stato impostato a 214 nm. Di seguito viene riportato quanto ottenuto per un ciclo (Fig. 3.3):

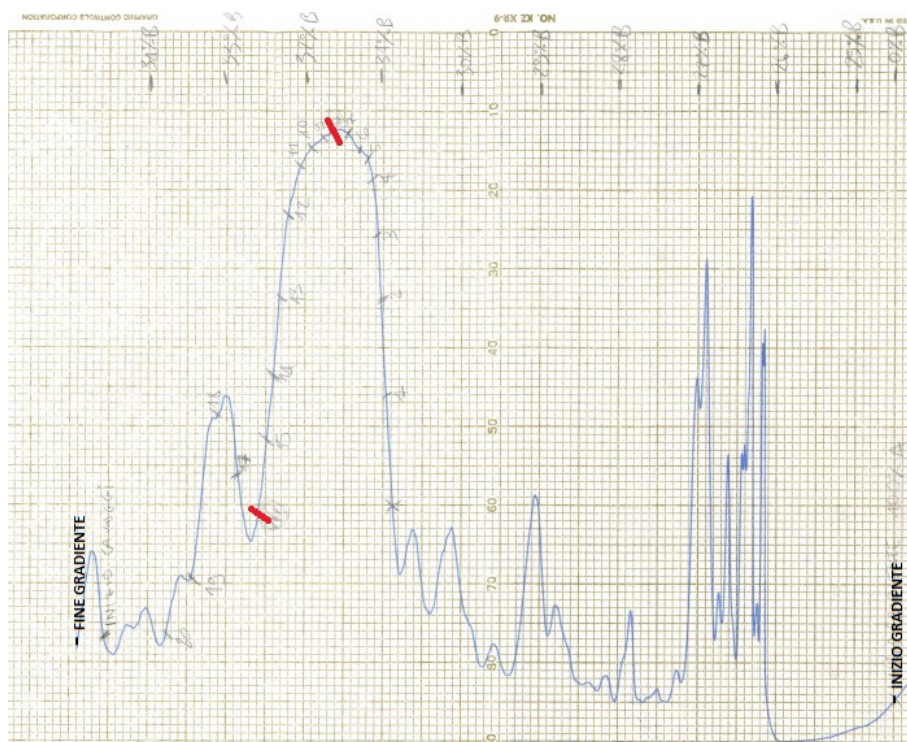


Fig. 3.3: cromatografia semipreparativa del peptide GBMP1a aldeide ottenuta nelle seguenti condizioni: colonna Atlantis dC18 OBD Preparative Column, volume iniettato: 40 mL, flusso: 4 mL/min, eluente A: 0.05% TFA in MilliQ, eluente B: 0.05% in Acetonitrile, gradiente: da 25% a 35% di B in 40 minuti,  $\lambda$ : 214 nm. Velocità di scorrimento della carta: 0.5 cm/min. Le frazioni contenenti GBMP1a aldeide sono comprese tra i segni in rosso.

Come mostrato in Fig. 3.3 la soluzione contenente il peptide è stata frazionata manualmente in diverse provette, man mano che fluiva in uscita dalla colonna, in base ai picchi di assorbanza.

Per effettuare la ricerca del peptide puro si sono effettuate analisi HPLC del contenuto delle varie provette. Il contenuto delle provette identificate come contenenti il peptide puro è stato ghiacciato tramite l'utilizzo di azoto liquido e quindi liofilizzato.

Sono poi state nuovamente effettuate le analisi MALDI e HPLC analitica del peptide puro, con gli stessi metodi e strumenti precedentemente illustrati. Va sottolineato il fatto che per quanto riguarda l'analisi MALDI, per il peptide aldeide è atteso un peso molecolare inferiore a quello del grezzo di circa 31 Da mentre in HPLC analitica è atteso un tempo di ritenzione superiore a quello del grezzo di circa 4 minuti. Sono stati ottenuti i seguenti risultati, che confermano quanto detto (Fig. 3.4 e 3.5):

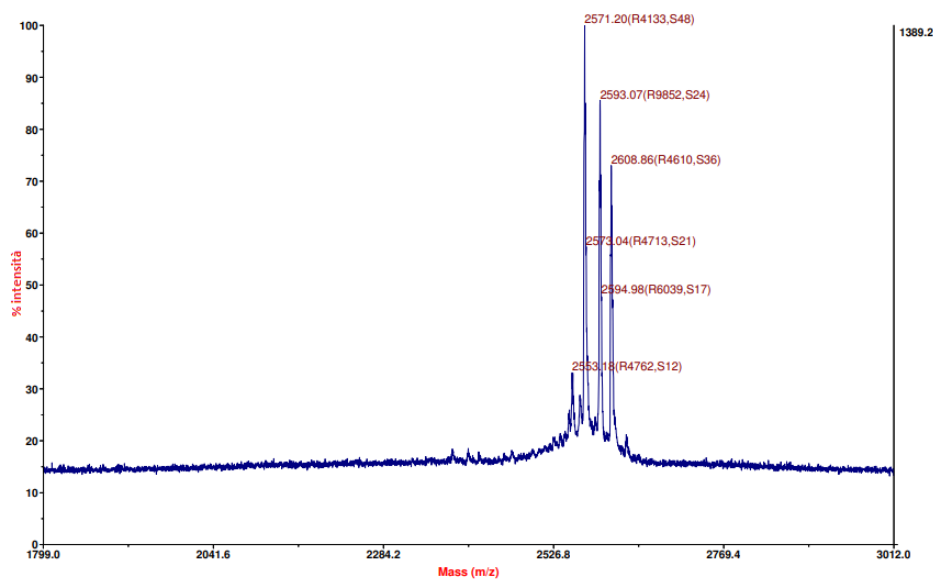


Fig. 3.4: risultato spettrometria di massa peptide puro

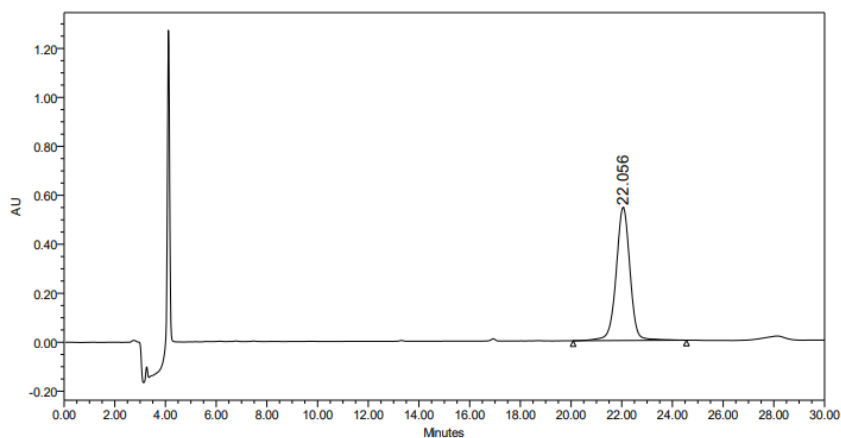


Fig. 3.5: HPLC analitica GBMP1a aldeide puro

In totale sono stati ottenuti 33.53 mg di GBMP1a aldeide puro.

### **3.2 Funzionalizzazione del chitosano**

Il metodo utilizzato è quello descritto nel capitolo precedente quindi in questo paragrafo verranno esclusivamente esplicitate le quantità di reagenti e materiali utilizzate. A seguito della purificazione del peptide, come detto, sono stati ottenuti 33.53 mg di GBMP1a aldeide puro. Pertanto, si è utilizzata la stessa quantità sia di chitosano che di NaBH<sub>3</sub>CN ed il peptide è stato sciolto in 33.53 mL di MilliQ. La quantità di AcOH 0.2M utilizzata per sciogliere il chitosano è di 2150.6 µL. La quantità di etanolo a T ambiente aggiunta a questa soluzione è di 1248.4 µL. Ne consegue che la quantità di etanolo a 4 °C utilizzata dopo aver portato la soluzione a pH 7 è di 39.929 mL.

Dal processo di funzionalizzazione sono stati ottenuti 56.4 mg di chitosano funzionalizzato con GBMP1a.

### **3.3 Funzionalizzazione delle membrane, fase preliminare, prima applicazione**

Inizialmente, per poter effettuare una scelta su quale fosse il miglior metodo di funzionalizzazione del collagene, sono stati applicati diversi protocolli per poterne testare e valutare i risultati tramite diverse analisi, e per poterli comparare tra loro. Durante la fase di ricerca del metodo migliore, per la funzionalizzazione del collagene si è utilizzato esclusivamente chitosano puro, senza mai ricorrere al chitosano funzionalizzato con GBMP1a in quanto quest'ultimo, essendo disponibile in quantità estremamente limitata, andava preservato ed utilizzato esclusivamente per la funzionalizzazione definitiva del collagene. Nello specifico, sono stati testati in totale 4 diversi metodi di funzionalizzazione della membrana in collagene con chitosano puro, effettuando talvolta più applicazioni diverse per lo stesso metodo variando quantità e concentrazioni dei reagenti. Le quantità di reagenti utilizzate per la prima applicazione di ogni metodo sono state stabilite da un'analisi comparata della letteratura, per poi venire modificate per le applicazioni successive sulla base dei risultati ottenuti.

Per effettuare i primi test per la scelta del miglior metodo di funzionalizzazione del collagene, sono stati funzionalizzati, con chitosano puro, 4 quadratini di lato 0.5 cm di membrana OsseoGuard® ritagliati a mano, uno per ognuno dei seguenti 4 metodi.

Nei paragrafi successivi vengono riportati i 4 metodi di funzionalizzazione testati nella fase preliminare.

### **3.3.1 Metodo 1 – prima applicazione**

Attivazione: la membrana è stata immersa in 2 mL di una soluzione di EDC/NHS 30 mM in 50% EtOH/MilliQ e lasciata a 0° per 150 minuti.

Funzionalizzazione: è stato eliminato 1 mL della soluzione attivante ed è stato aggiunto 1 mL di una soluzione 1.5% chitosano (15 g/L) in 0.2 M AcOH/MilliQ. Reazione di 24h a T ambiente.

### **3.3.2 Metodo 2 – prima applicazione**

Attivazione: la membrana è stata immersa in 2 mL di una soluzione di EDC/NHS 30 mM in 50% EtOH/MilliQ e lasciata a 0° per 150 minuti.

Funzionalizzazione: è stato eliminato 1 mL della soluzione attivante ed è stato aggiunto 1 mL di una soluzione 1.5% chitosano (15 g/L) in 0.2 M AcOH/MilliQ. Reazione di 24h a 40°C.

### **3.3.3 Metodo 3 – prima applicazione**

Attivazione: la membrana è stata immersa in 2 mL di una soluzione di EDC/NHS 75 mM in 50% EtOH/MilliQ e lasciata a 0° per 90 minuti.

Funzionalizzazione: è stato eliminato 1 mL della soluzione attivante ed è stato aggiunto 1 mL di una soluzione 1.5% chitosano (15 g/L) in 0.2 M AcOH/MilliQ. Reazione di 24h a T ambiente.

### **3.3.4 Metodo 4 – prima applicazione**

Attivazione: la membrana è stata immersa in 2 mL di una soluzione di EDC/NHS 30 mM in Acetone/MilliQ in rapporto di volume 13:7 e lasciata a 0° per 90 minuti.

Funzionalizzazione: è stato eliminato 1 mL della soluzione attivante ed è stato aggiunto 1 mL di una soluzione 1.5% chitosano (15 g/L) in 0.2 M AcOH/MilliQ. Reazione di 24h a T ambiente.

### **3.3.5 Lavaggi – prima applicazione**

I quadratini di collagene funzionalizzato sono stati immersi ciascuno in 10 mL di MilliQ dove sono stati lasciati per 1h. Passato questo tempo è stata eliminata tutta la MilliQ e sostituita con altri 10 mL di nuova MilliQ. È stata fatta trascorrere 1h. Ancora una volta è stata eliminata tutta la MilliQ ed è stata rimpiazzata con 15 mL di nuova MilliQ. È stata fatta trascorrere una notte prima di eliminare tutta la MilliQ.

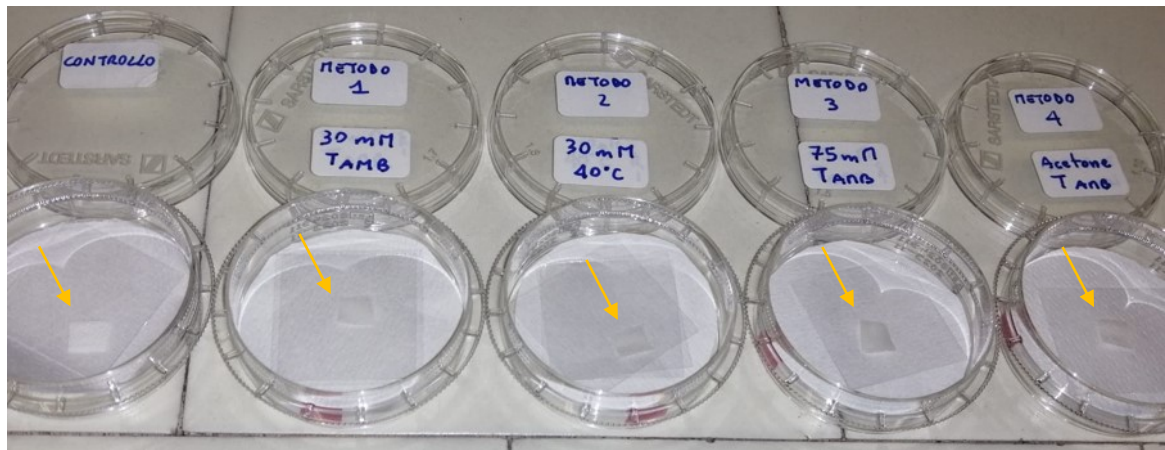


Fig. 3.6: Quadrantini di collagene ritagliati a mano e funzionalizzati con i 4 diversi metodi + controllo

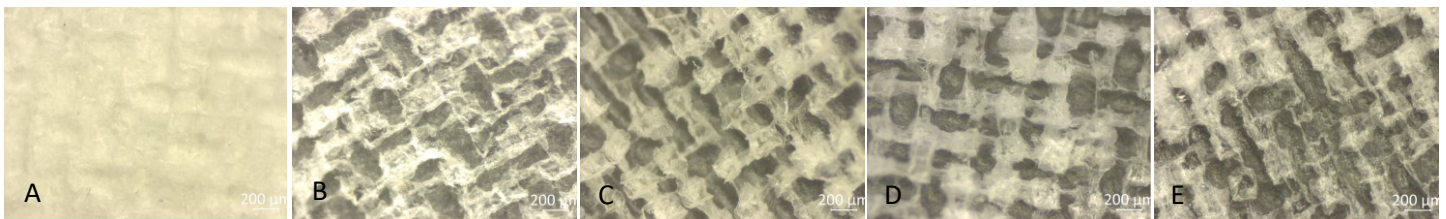


Fig. 3.7: immagini al microscopio ottico dei campioni funzionalizzati. A) controllo, B) metodo 1, C) metodo 2, D) metodo 3, E) metodo 4, scale bar: 200 µm

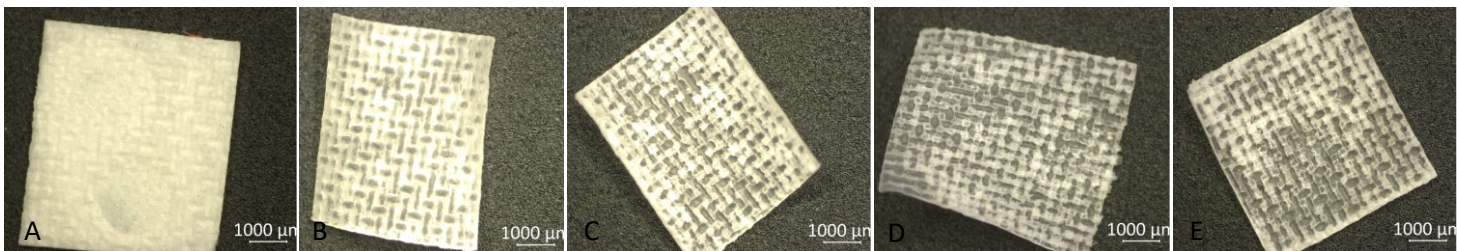


Fig. 3.7: immagini al microscopio ottico dei campioni funzionalizzati. A) controllo, B) metodo 1, C) metodo 2, D) metodo 3, E) metodo 4, scale bar: 1000 µm

### 3.3.6 Analisi FT-IR, fase preliminare

Sui 4 campioni funzionalizzati con i 4 metodi appena descritti è stata effettuata un'analisi FT-IR per verificare che fosse avvenuto il legame del chitosano col collagene e per comparare tra loro i risultati ottenuti con i diversi metodi. Per avere dei riferimenti sono stati analizzati anche un quadratino di lato 0.5 cm di membrana OsseoGuard® non funzionalizzata (di seguito denominato "controllo") e una spugna di chitosano puro, ottenuta liofilizzando la soluzione 1.5% chitosano in 0.2 M AcOH/MilliQ. I campioni sono stati asciugati con aria prima di essere analizzati. Vengono ora presentati i risultati di questa analisi (Fig. 3.6).

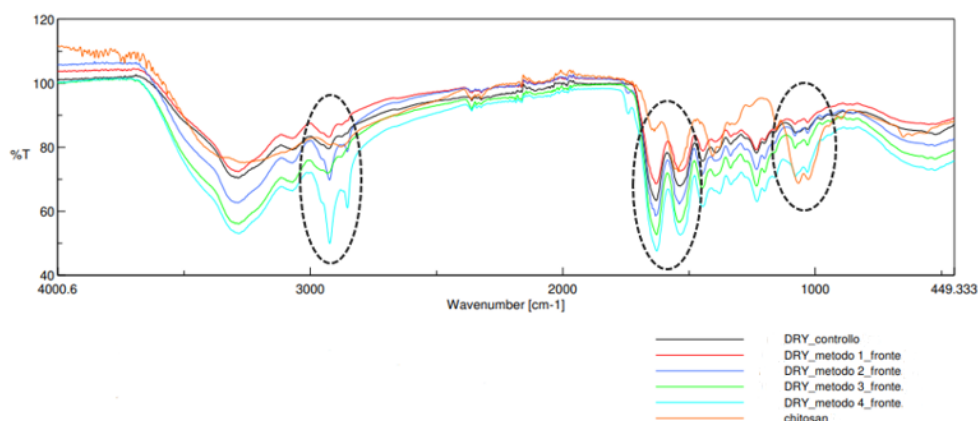


Fig. 3.6: Spettri FT-IR dei campioni funzionalizzati coi 4 metodi, campione di controllo e spugna di chitosano puro. Asse x: numero d'onda, asse y: trasmittanza. Con la linea tratteggiata sono state evidenziate le zone del grafico maggiormente rilevanti ai fini della scelta del metodo definitivo di funzionalizzazione.

La prima banda particolarmente rilevante evidenziata dall'analisi è quella a lunghezza d'onda compresa tra circa 1063 e 1025  $\text{cm}^{-1}$ : si può notare come la banda sia molto elevata nel chitosano puro e bassa nel controllo; si tratta del numero d'onda caratteristico del legame -C-O-C molto presente nella struttura del chitosano. I campioni funzionalizzati con i metodi 3 e 4 mostrano un contributo molto maggiore rispetto al controllo in corrispondenza di quel numero d'onda.

Il campione funzionalizzato con il metodo 2 mostra la stessa assorbanza del campione di controllo mentre quello funzionalizzato con il metodo 1 mostra una assorbanza minore. Ciò significa che i metodi di funzionalizzazione 3 e 4 hanno incrementato la quantità di legami -C-O-C nei campioni funzionalizzati rispetto al controllo e questo sta ad indicare la presenza di chitosano legato alla superficie del collagene.

Una conferma di ciò la si può ottenere osservando la banda a numero d'onda  $\sim 1535 \text{ cm}^{-1}$  e quella a numero d'onda  $\sim 1627 \text{ cm}^{-1}$ . Il primo segnale corrisponde alla banda amide II del collagene, legata a due contributi di pari entità dati dallo stiramento del legame C-N e dalla deformazione del legame N-H. Si può notare che anche il chitosano mostra un picco in corrispondenza di questo numero d'onda in quanto contiene anch'esso una elevata quantità di legami N-H. Il secondo corrisponde alla banda amide I del collagene dovuta all'80% allo stiramento del legame C=O e al 20% dallo stiramento del legame C-N. In questo caso il chitosano presenta un picco di assorbanza notevolmente inferiore, in quanto contiene una bassa quantità di gruppi acetilici (legami C=O) interni alla sua struttura. Si può osservare come, in entrambi i casi, i campioni funzionalizzati con i metodi 2, 3 e 4 mostrino picchi di assorbanza maggiori in corrispondenza delle due lunghezze d'onda considerate, in maniera molto più

evidente nel caso dei campioni relativi ai metodi 3 e 4. Tutto ciò indica, ancora una volta, la presenza del chitosano sui campioni funzionalizzati.

La stessa considerazione può essere fatta osservando le bande di assorbimento comprese tra  $\sim 3071$  e  $2874\text{ cm}^{-1}$ , corrispondenti allo stiramento dei legami -CH. Non sono state considerate le bande a numeri d'onda inferiore ai  $3000\text{ cm}^{-1}$  in quanto potrebbero essere dovuti alla presenza di gruppi OH relativi ad una non perfetta asciugatura dei campioni.

In conclusione, i metodi di funzionalizzazione 3 e 4 sono stati selezionati come migliori rispetto ai metodi 2 e 3 per la funzionalizzazione del collagene con chitosano puro.

### **3.4 Funzionalizzazione del collagene, fase preliminare, seconda applicazione**

Per poter effettuare i test successivi, a seguito dei risultati ottenuti dalla prima analisi, si è scelto di funzionalizzare la membrana di collagene solo con i metodi 3 e 4. Sono stati ricavati dalla membrana, tramite punzonatura, 2 dischetti di diametro 1.55 cm, posizionati all'interno di 2 pozzetti in una piastra da 24 e sono stati funzionalizzati con i metodi selezionati, applicando però alcune variazioni, come di seguito riportato.

#### **3.4.1 Metodo 3 – seconda applicazione**

Attivazione: la membrana è stata immersa in 1 mL di una soluzione di EDC/NHS 75 mM in 50% EtOH/MilliQ e lasciata a  $0^\circ$  per 90 minuti.

Funzionalizzazione: sono stati aggiunti 0.5 mL di una soluzione 1% chitosano (10 g/L) in 0.2 M AcOH/MilliQ. Reazione di 24h a T ambiente.

#### **3.4.2 Metodo 4 – seconda applicazione**

Attivazione: la membrana è stata immersa in 1 mL di una soluzione di EDC/NHS 30 mM in Acetone/MilliQ in rapporto di volume 13:7 e lasciata a  $0^\circ$  per 90 minuti.

Funzionalizzazione: sono stati aggiunti 0.5 mL di una soluzione 1% chitosano (10 g/L) in 0.2 M AcOH/MilliQ. Reazione di 24h a T ambiente.

#### **3.4.3 Lavaggi – seconda applicazione**

Al termine della reazione di funzionalizzazione sono stati eliminati i solventi da entrambi i pozzetti che sono poi stati riempiti con 2.8 mL di MilliQ lasciata in essi per 1h. Passato questo tempo è stata eliminata tutta la MilliQ e sostituita con altri 2.8 mL di nuova MilliQ. È stata fatta

trascorrere 1h. Ancora una volta è stata eliminata tutta la MilliQ ed è stata rimpiazzata, per la terza volta, con 2.8 mL di nuova MilliQ. È stata fatta trascorrere una notte prima di eliminare l'acqua MilliQ.

### 3.4.4 Proliferazione cellulare, fase preliminare

È stato eseguito un test di proliferazione cellulare a 7 giorni con osteoblasti umani su 1 solo campione funzionalizzato con metodo 3, 1 solo campione funzionalizzato con metodo 4 ed 1 solo campione di controllo (membrana OsseoGuard® non trattata). Il test risulta pertanto non statisticamente rilevante ma in grado di fornire una indicazione su quale metodo di funzionalizzazione tra il 3 ed il 4 sia da preferirsi. I risultati ottenuti sono i seguenti (Tab.1):

	%FLUORESCENZA 1 <sup>a</sup> LETTURA	% FLUORESCENZA 2 <sup>a</sup> LETTURA
CONTROLLO	19.6	16.5
METODO 3	25.47	26
METODO 4	27.8	27.31

Tab.1: risultati test di proliferazione cellulare

Sono state eseguite due diverse letture del valore di fluorescenza dopo 7 giorni. Maggiore è il valore della percentuale di fluorescenza e più hanno proliferato le cellule. In base a questo risultato si è stabilito di adottare il metodo 4 come metodo ufficiale di funzionalizzazione delle membrane OsseoGuard® per questo lavoro.

### 3.5 Funzionalizzazione delle membrane

Sono stati ricavati dalle matrici OsseoGuard® i seguenti campioni (Fig. 3.7):

- 20 provini ad osso di cane tramite l'utilizzo di un apposito stampo;
- 13 quadrati di lato 0.5 cm ritagliati a mano;
- 18 cerchi di diametro 0.64 cm tramite l'uso di un punzone;
- 18 cerchi di diametro 1.55 cm tramite l'uso di un punzone;

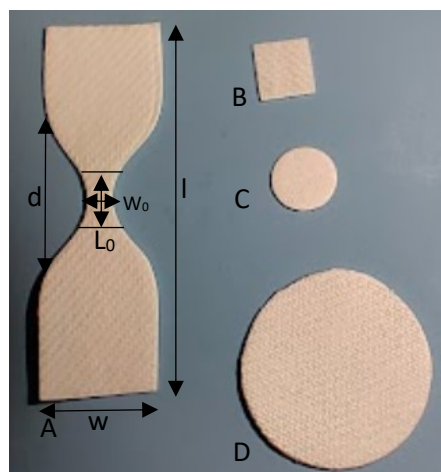


Fig. 3.7: forme campioni per funzionalizzazione. A) provino ad osso di cane. Misure: l: 3.5 cm, w: 1 cm, d: 1.3 cm,  $W_0$ : 0.2 cm,  $L_0$ : 0.5 cm, B) quadrato di lato 0.5 cm, C) cerchio diametro 0.64 cm, D) cerchio diametro 1.55 cm.

Come precedentemente detto, si è scelto il metodo 4 di funzionalizzazione.

Per la funzionalizzazione dei campioni circolari di diametro 1.55 cm nei pozzetti da 24 sono stati utilizzati 0.6 mL di soluzione attivante e 0.3 mL di soluzione con chitosano o chitosano-GBMP1 $\alpha$  per ciascun pozzetto.

Per la funzionalizzazione dei campioni circolari di diametro 0.64 cm nei pozzetti da 96 sono stati utilizzati 0.2 mL di soluzione attivante e 0.1 mL di soluzione con chitosano o chitosano-GBMP1 $\alpha$  per ciascun pozzetto.

I campioni quadrati di lato 0.5 cm ed i campioni ad osso di cane sono stati funzionalizzati tutti assieme all'interno di una falcon da 15 mL, utilizzando 5.5 mL di soluzione attivante e 2.75 mL di soluzione di chitosano (procedimento eseguito per entrambi i tipi di chitosano).

In Tab. 3.1 vengono riassunti tipologie e quantità dei campioni prodotti con relativi scopi di utilizzo:

Tipologia di campione	quantità	Funzionalizzati con chitosano	Funzionalizzati con chit- GBMP1 $\alpha$	Non funzionalizzati (controllo)	Solo idarati con sol. attivante	scopo
Circolare diametro 1.55 cm	18	6	6	6	0	<ul style="list-style-type: none"> <li>• espressione genica: 3 per tipo</li> <li>• mineralizzazione: 3 per tipo</li> </ul>
Circolare diametro 0.64 cm	18	6	6	6	0	<ul style="list-style-type: none"> <li>• proliferazione: 3 per tipo</li> <li>• saggio antibatterico: 3 per tipo</li> </ul>
Osso di cane	20	5	5	5	5	Test meccanico trazione monoassiale
Quadrati di lato 0.5 cm	13	4	4	4	0	<ul style="list-style-type: none"> <li>• FT-IR + XPS: 3 per tipo</li> <li>• due fotoni: 1 per tipo</li> </ul>

Tab. 3.1: schema riassuntivo delle tipologie e quantità dei campioni prodotti e relativi scopi di utilizzo.

In aggiunta ai campioni sopra citati è stato prodotto un quadrato di lato 0.5 cm che è stato semplicemente bagnato con una soluzione Acetone/MilliQ in rapporto di volume 13:7 per 90 minuti. Verrà successivamente chiamato “controllo +Ace” ed analizzato al due fotoni per valutare l’effetto della soluzione attivante sulle membrane.

I lavaggi di ciascun campione sono stati effettuati in acqua MilliQ in volume pari alla somma dei volumi di soluzione attivante e soluzione di chitosano usati per funzionalizzarlo.

In Fig. 3.8 sono mostrati esempi di tutti i tipi di campioni creati e funzionalizzati.

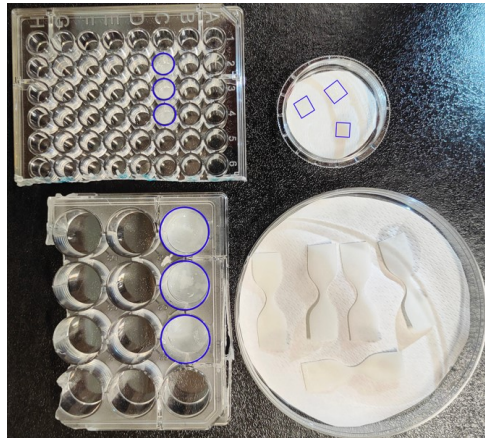


Fig. 3.8: immagine sperimentale che mostra alcuni dei campioni ottenuti, illustrando tutte le forme e dimensioni di campioni creati. Nell’immagine sono presenti solo campioni funzionalizzati con chitosano. Non si rilevano differenze visibili ad occhio nudo con i campioni funzionalizzati con chit-BMP.

## CAPITOLO 4

### RISULTATI E DISCUSSIONI

#### 4.1 Microscopia ottica

In Fig. 4.1 vengono riportate le immagini della membrana OsseoGuard® non trattata usata come riferimento per confronto, e delle membrane funzionalizzate con chitosano e con chitosano+GBMP1 $\alpha$  ottenute tramite microscopia ottica.

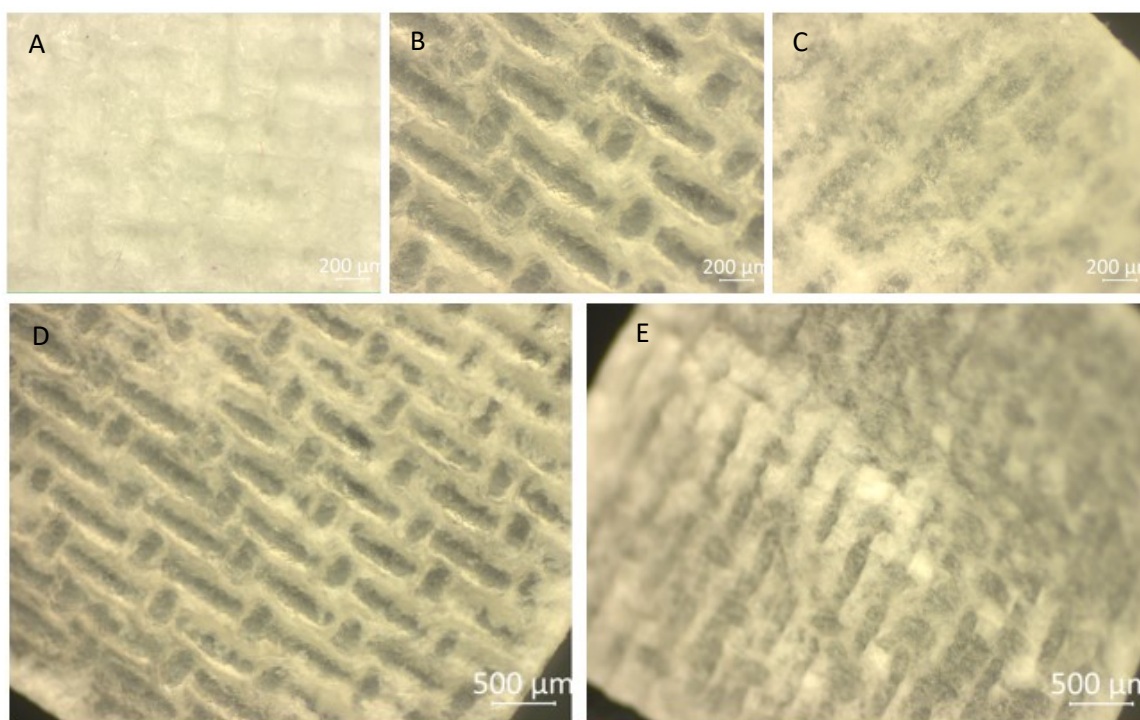


Fig. 4.1: immagini al microscopio ottico dei campioni di controllo e funzionalizzati. A) membrana OsseoGuard® non trattata, B) membrana OsseoGuard® funzionalizzata con chitosano, C) membrana OsseoGuard® funzionalizzata con chit+GBMP1 $\alpha$ . Ingrandimento di ciascuna immagine: 50X. D) membrana OsseoGuard® funzionalizzata con chitosano, E) membrana OsseoGuard® funzionalizzata con chit+GBMP1 $\alpha$ . Ingrandimento di ciascuna immagine: 25X.

Nelle immagini della membrana funzionalizzata con solo chitosano risulta chiara la presenza del polisaccaride. Risultano ancora ben distinguibili le zone in rilievo della sua superficie, il cui pattern è ben visibile anche sul campione di controllo. Si può osservare una notevole differenza tra le immagini relative alla funzionalizzazione con solo chitosano e quelle relative alla funzionalizzazione con chit+GBMP1 $\alpha$ . Nello specifico la quantità di materiale legato alla

superficie del campione sembra maggiore per il *patch* funzionalizzato con chit+GBMP1 $\alpha$ . Lo strato si mostra omogeneo e continuo sulla sua superficie e, conseguentemente, il *pattern* risulta assai meno evidente.

## 4.2 Spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier (FT-IR)

In Fig. 4.2 vengono riportati i risultati dell'analisi FT-IR eseguita su campioni quadrati di lato 0.5 cm di membrana OsseoGuard® non trattata (campioni di controllo) e membrana OsseoGuard® funzionalizzata con solo chitosano e con chit+GBMP1 $\alpha$ .

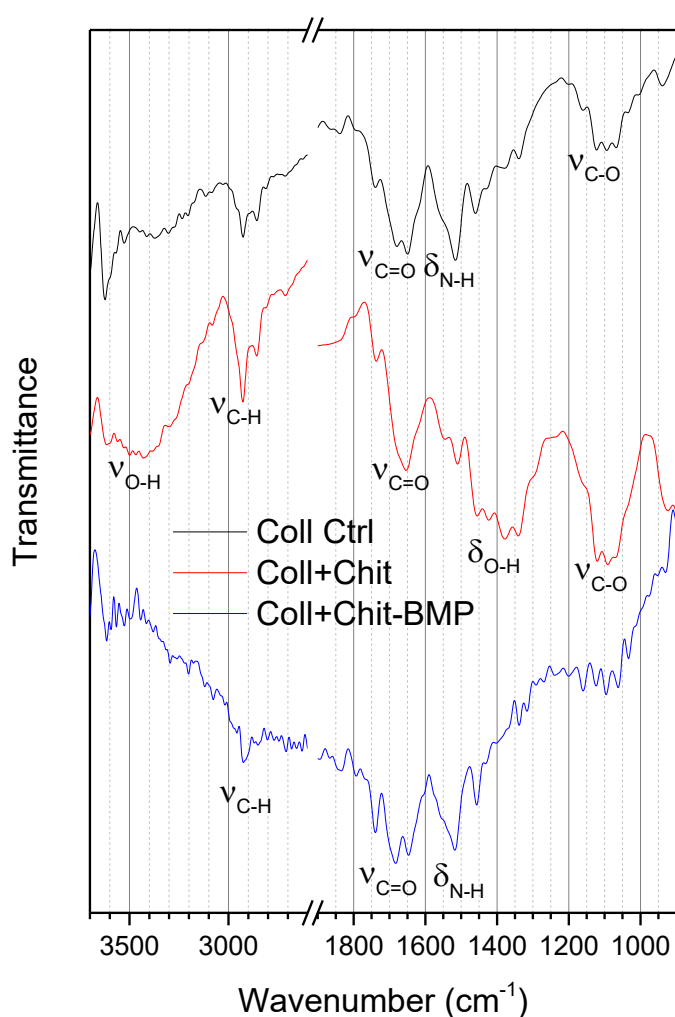


Fig. 4.2: spettri FTIR nelle regioni 3600-2600 e 1900-900 cm<sup>-1</sup> di membrane OsseoGuard® non trattate (linea nera, campione Coll Ctrl), di membrane OsseoGuard® funzionalizzate con chitosano (linea rossa, campione Coll+Chit) e di membrane OsseoGuard® funzionalizzate con chit+GBMP1 $\alpha$  (linea blu, campione Coll+Chit-BMP).

Il picco principale dello spettro infrarosso delle membrane OsseoGuard® non trattate è, come previsto, quello relativo al legame peptidico: la banda ammidica I ( $\nu_{C=O}$ ) situata a  $1650\text{ cm}^{-1}$  e la banda ammidica II ( $\delta_{N-H}$ ) a  $1517\text{ cm}^{-1}$ . I picchi di *stretching* del legame C-H ( $\nu_{C-H}$ ) si trovano a  $2930$  e  $2860\text{ cm}^{-1}$ , come previsto per le catene alifatiche. Si possono anche rilevare picchi relativi ai residui di prolina e idrossiprolina presenti nel *backbone* del collagene: la banda di *stretching* del legame O-H ( $\nu_{O-H}$ ) è a circa  $3350\text{ cm}^{-1}$ , il picco di *stretching* del legame C-O ( $\nu_{C-O}$ ) a circa  $1100\text{ cm}^{-1}$  e i picchi legati alla flessione del legame O-H ( $\delta_{O-H}$ ) tra  $1450$  e  $1350\text{ cm}^{-1}$ ; lo *stretching* del legame C=O correlato all'acido carbossilico appare come una spalla a  $1740\text{ cm}^{-1}$  sul lato ad alta frequenza del picco principale relativo al legame peptidico.

L'immobilizzazione del chitosano sulla membrana in collagene produce, come previsto, un aumento dell'intensità dei picchi relativi al gruppo C-O-H (dominanti nello spettro del chitosano) rispetto ai picchi relativi alla funzione ammidica del *backbone* del collagene. In particolare, si osserva un aumento dell'intensità delle bande di *stretching* e *bending* del legame O-H e dei picchi di *stretching* del legame C-O.

D'altra parte, quando alla membrana OsseoGuard® viene ancorato il chitosano funzionalizzato con GBMP1 $\alpha$  l'intensità dei picchi correlati al chitosano diminuisce fortemente rispetto all'intensità dei picchi dell'ammidica I e dell'ammidica II del backbone del peptide.

Ciò trova preciso riscontro in letteratura [31]:

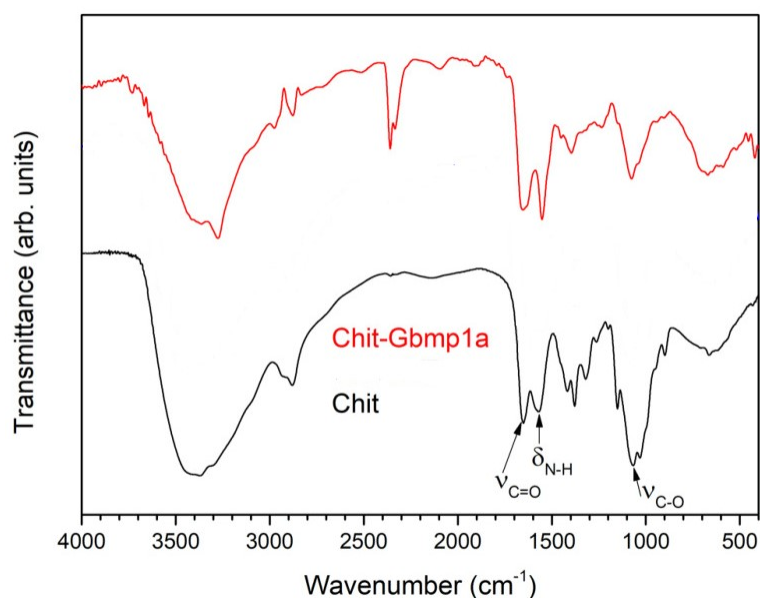


Fig. 4.3: spettri FT-IR di chitosano e chit+GBMP1 $\alpha$  [31]

Si può infatti notare che nel caso di chit+GBMP1 $\alpha$  la banda relativa allo stretching del legame C-O ( $\nu_{C-O}$  a  $\sim 1100\text{ cm}^{-1}$ ) risulta notevolmente attenuata rispetto alla banda corrispondente nello spettro del solo chitosano. Lo stesso si può dire per quanto riguarda la banda situata a  $\sim 1400$

cm<sup>-1</sup> che corrisponde allo *stretching* del legame C-N. Queste variazioni indicate in letteratura sono le medesime che sono state riscontrate nei campioni di membrana OsseoGuard® funzionalizzata con chit+GBMP1α (Fig. 4.2).

Sulla base di questi risultati è quindi possibile affermare che entrambe le funzionalizzazioni, sia quella con solo chitosano che quella con chit+GBMP1α, sono effettivamente avvenute con successo. Ulteriore conferma di ciò è stata comunque fornita dai risultati dell'analisi XPS mostrati nel paragrafo successivo.

### 4.3 Spettroscopia fotoelettronica a raggi X (XPS)

Le misurazioni XPS di tutti i campioni sono state ricavate dai fotoelettroni provenienti dai livelli core C1s, N1s, O1s e S2p. I rapporti atomici sono stati calcolati come rapporti tra le intensità di picco divisi per il fattore di sensibilità di Scofield. Gli spettri C1s, N1s, O1s e S2p sono stati analizzati utilizzando i profili gaussiani per il *fitting*. Nel momento in cui sono stati individuati diversi elementi nello spettro, è stato utilizzato lo stesso FWHM per tutte le bande di fotoemissione individuali. Vengono mostrati in Fig. 4.4 e Tab. 4.1 i risultati ottenuti.

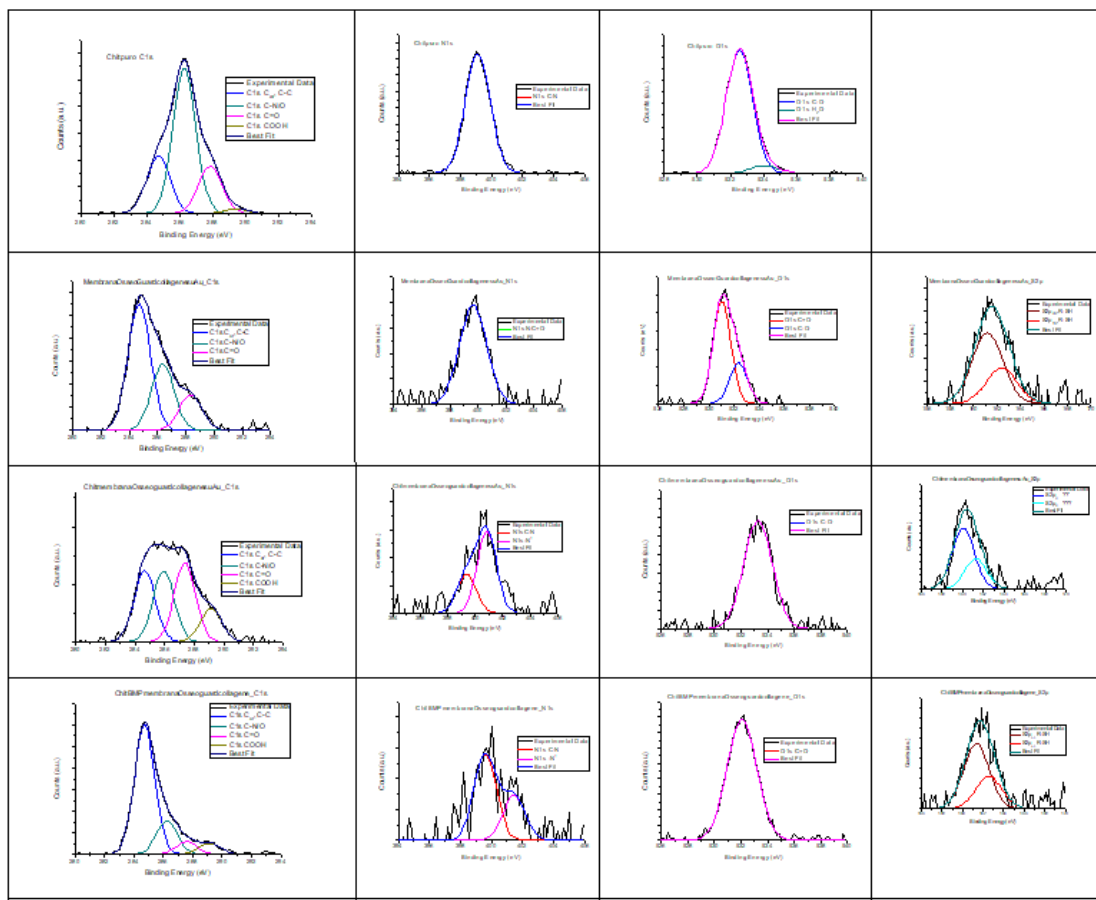


Fig. 4.4: Spettri XPS di chitosano puro, membrana OsseoGuard® non trattata e membrane OsseoGuard® funzionalizzate con chitosano e con chit+GBMP1α.

Sample	Signal	Assignment	BE (eV)	FWHM	Internal Atomic ratios (%)	Atomic ratios (%)
<b>Chit</b>	C1s	C <sub>ar</sub> ,C-C	284.7	1.66	23	13.9
		C-N/O	286.3		57	35.0
		C=O	287.8		18	11.4
		COOH	289.4		2	1.07
	N1s	C-N	399.1	1.89	100	6.04
	O1s	C-O	532.5	1.89	94	30.7
H <sub>2</sub> O		534.1	6		1.89	
<b>MembranaOsseoguard</b>	C1s	C <sub>ar</sub> ,C-C	284.7	1.89	56	37.2
		C-N/O	286.1		29	19.5
		C=O	288.3		15	10.4
	N1s	N-C=O	399.7	2.28	100	9.0
	O1s	C=O	531.0	1.66	72	11.8
		C-O	532.3		28	4.7
S2p	R-SH	161.2	3.12	100	7.5	
<b>Chit-Osseoguard</b>	C1s	C <sub>ar</sub> ,C-C	284.7	1.70	28	18.4
		C-N/O	285.9		28	18.3
		C=O	287.4		31	20.6
		COOH	289.1		13	8.7
	N1s	C-N	399.4	1.65	32	2.3
		-N <sup>+</sup>	400.8		68	4.9
O1s	C-O	533.3	2.54	100	18.4	
S2p	???	160.0	2.52	100	8.4	
<b>Chit-BMP-Osseoguard</b>	C1s	C <sub>ar</sub> ,C-C	284.7	1.63	69	52.9
		C-N/O	286.2		18	13.8
		C=O	287.6		7	5.12
		COOH	289.2		6	4.31
	N1s	C-N	399.6	1.69	66	1.44
		-N <sup>+</sup>	401.5		34	0.74
O1s	C=O	532.1	2.62	100	17.3	
S2p	R-SH	161.4	2.91	100	4.35	

Tab.4.1: Risultati analisi XPS di chitosano puro, membrana OsseoGuard® non trattata e membrane OsseoGuard® funzionalizzate con chitosano e con chit+GBMP1 $\alpha$

Con riferimento alla Tab. 4.1, nello spettro C1s del chitosano puro, il picco principale (286.3 eV) è relativo ai carboni C-O come atteso; gli altri contributi sono legati ai carboni C=O (287.8 eV) dovuti alla deacetilazione incompleta della chitina, ed ai carboni C-C (284.7 eV) probabilmente dovuti ad una contaminazione della superficie. Lo spettro O1s è anch'esso dominato dal segnale corrispondente agli ossigeni C-O del chitosano (532.5 eV). Lo spettro N1s è formato da un singolo contributo avente BE (399.1 eV) corrispondente al gruppo amminico.

Gli spettri della membrana OsseoGuard®, costituita prevalentemente da collagene, sono quelli tipici di un campione proteico. Lo spettro C1s è costituito da 3 contributi, corrispondenti ai carboni C-C (284.7 eV), ai carboni N-C=O (286.1 eV) tipici del legame peptidico ed ai carboni C=O (288.3 eV); gli ultimi due segnali sono tipici del *backbone* del collagene. La posizione del segnale N1s (399.7 eV) che consiste in un solo picco è tipico del gruppo amminico come atteso. Lo spettro O1s consiste in contributi; il contributo principale (531 eV) si riferisce agli ossigeni del gruppo carbossilico C=O del backbone del collagene, il secondo contributo (532.3 eV) si riferisce agli ossigeni del legame singolo C-O. Il segnale S2p a 161.2 eV è caratteristico del gruppo tiolico, ed è presente nelle membrane forse dovuto a qualche trattamento a noi non noto. Si noti che il contenuto di ossigeno è inferiore ed il contenuto di azoto è superiore nelle membrane OsseoGuard® rispetto al chitosano puro, come ci si aspetta.

Il segnale C1s mostra una intensità dei primi due contributi (C-C e C-N/O) intermedia tra i valori misurati per il chitosano e per la membrana OsseoGuard®. C'è un incremento nell'intensità dei contributi relativi ai carboni C=O e COOH, quest'ultimo dovuto all'utilizzo dell'AcOH nel processo di funzionalizzazione che potrebbe essere presente nel campione in tracce. Il segnale N1s rivela la parziale protonazione degli atomi di azoto derivante dal trattamento con AcOH, utilizzato nel processo di funzionalizzazione. Il segnale O1s appare abbastanza largo e probabilmente consiste di più di un componente. Il segnale S2p è caratteristico di gruppi contenenti zolfo e potrebbe anche essere dovuto a tracce di sulfo-NHS utilizzato per la funzionalizzazione.

Nella banda C1s della membrana funzionalizzata con chit+GBMP1 $\alpha$  il contributo relativo ai carboni alifatici C-C è la componente dominante; sono presenti, inoltre, contributi dovuti ai C coinvolti nei legami C-N, C=O e COOH come ci si aspetta per proteine e peptidi. La presenza di COOH è inoltre imputabile, come nel caso precedente, a tracce di AcOH utilizzato durante il processo di funzionalizzazione. Lo spettro N1s è dovuto a componenti relative ad azoto di tipo amminico e azoto protonato derivante dal trattamento con AcOH. Lo spettro O1s è dovuto

agli ossigeni C=O del backbone del peptide. Il segnale S2p è caratteristico del gruppo tiolico e si riferisce presumibilmente a tracce del sulfo-NHS utilizzato per la funzionalizzazione.

Per verificare l'avvenuta funzionalizzazione delle membrane OsseoGuard® con chitosano e con chit+GBMP1 $\alpha$  si è inizialmente calcolato il rapporto N/C per tutti i campioni, come rapporto delle sommatorie degli atomic ratios (%) di N1s e C1s, presenti in Tab. 4.1.

Si ottiene quanto mostrato in Tab. 4.2:

	N/C
OSSEOGUARD®	0.134
MEMBRANA + CHITOSANO	0.109
MEMBRANA + CHITOSANO + GBMP1 $\alpha$	0.029

Tab. 4.2: rapporto N/C di tutte le membrane

Il rapporto N/C del chitosano puro è inferiore a quello del collagene, come si può dedurre dall'abbondanza percentuale di N su unità ripetitive dei due polimeri per pari peso molecolare. Pertanto, ci si aspetta che nelle membrane funzionalizzate con chitosano il rapporto N/C si riduca. I valori riportati in Tab. 4.2 confermano il dato atteso. La differenza tra valori N/C di membrana+chitosano+GBMP1 $\alpha$  e membrana+chitosano dipende dalla quantità di chitosano che si è fissata sul collagene.

Si è poi andati a valutare il rapporto O/C per tutte e 3 le membrane, come rapporto tra le sommatorie degli atomic ratios (%) di O1s e C1s, presenti in Tab. 4.1. I risultati vengono illustrati in Tab. 4.3:

	O/C
OSSEOGUARD®	0.246
MEMBRANA + CHITOSANO	0.279
MEMBRANA + CHITOSANO + GBMP1 $\alpha$	0.227

Tab. 4.3: rapporto O/C di tutte le membrane

Il rapporto O/C del chitosano è superiore a quello del collagene quindi il rapporto O/C delle membrane funzionalizzate con solo chitosano dovrebbe aumentare rispetto al collagene. La

funzionalizzazione con chit+GBMP1 $\alpha$ , dal momento che la quantità di carbonio presente in esso è superiore a quella dell'ossigeno, dovrebbe ridurre il rapporto O/C.

I valori calcolati confermano queste previsioni.

Infine, è stato calcolato il rapporto N/O per tutte e 3 le membrane, come rapporto tra le sommatorie degli atomic ratios (%) di N1s e O1s, presenti in Tab. 4.1. I risultati vengono illustrati in Tab. 4.4:

	N/O
OSSEOGUARD®	0.54
MEMBRANA + CHITOSANO	0.39
MEMBRANA + CHITOSANO + GBMP1 $\alpha$	0.12

Tab. 4.4: rapporto N/O di tutte le membrane

Come detto le funzionalizzazioni dovrebbero far diminuire la percentuale di azoto nei campioni, facendo aumentare quella di ossigeno (nel caso di funzionalizzazione con solo chitosano) o facendola lievemente calare (nel caso di funzionalizzazione con chit+GBMP1 $\alpha$ ). Pertanto, ci si aspetta che il rapporto N/O diminuisca nelle membrane funzionalizzate ed i valori calcolati lo confermano.

In conclusione, si può affermare che l'analisi XPS conferma l'avvenuta funzionalizzazione delle membrane OsseoGuard® con chitosano e con chit+GBMP1 $\alpha$ .

#### 4.4 Microscopia a due fotoni (TPM)

L'analisi di microscopia a due fotoni ha evidenziato, a seguito di una indagine strato per strato di tutto lo spessore dei campioni, che variazioni significative si riscontrano solo a livello dello strato superficiale.

Nella Fig.4.5 vengono mostrati gli strati superficiali dei 4 campioni (membrana OsseoGuard® non trattata usata come riferimento, membrana OsseoGuard® sottoposta a sola reazione di attivazione, membrana OsseoGuard® funzionalizzata con chitosano e membrana OsseoGuard® funzionalizzata con chitosano+GBMP1 $\alpha$  analizzati al microscopio a due fotoni.

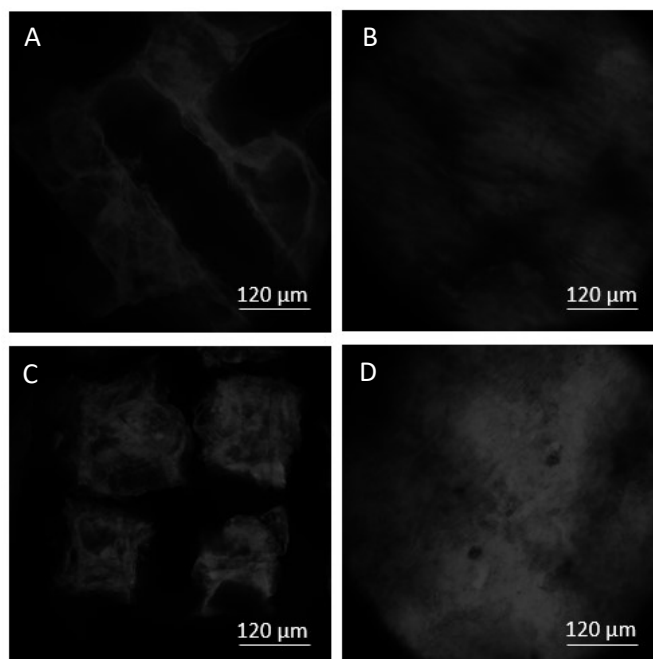


Fig. 4.5: analisi della superficie dei 4 campioni al microscopio a due fotoni. A) membrana non trattata, B) membrana sottoposta a sola reazione di attivazione, C) membrana funzionalizzata con chitosano, D) membrana funzionalizzata con chit+GBMP1 $\alpha$ . Ingrandimento: 25x.

Nell'immagine A si può osservare chiaramente la superficie patternizzata della membrana OsseoGuard® non trattata, così come viene prodotta industrialmente, e come è stato già evidenziato dall'analisi di microscopia ottica. Dall'immagine B si evince che la reazione di attivazione va ad incidere sulla superficie delle membrane, rendendo scarsamente visibili le zone in rilievo che ben si vedono sulla membrana non trattata. Nell'immagine C, che mostra la superficie del campione funzionalizzato con chitosano, si può osservare chiaramente la presenza del chitosano legato alle zone in rilievo della superficie della membrana, che tornano quindi ad essere visibili, come mostrato anche nella Fig. 4.6:

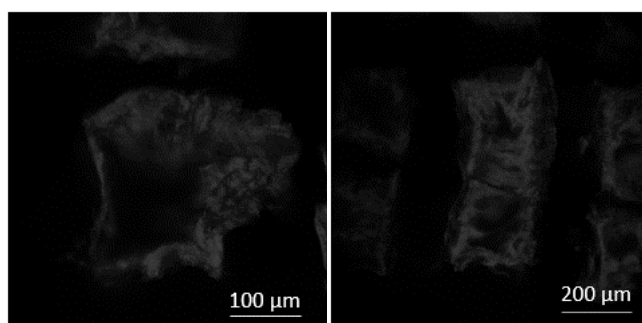


Fig. 4.6: analisi della superficie del campione funzionalizzato con chitosano al microscopio a due fotoni. Ingrandimento: 25x.

Queste immagini mostrano come il chitosano sia legato alle zone in rilievo della superficie della membrana, da cui poi si espande in maniera piuttosto randomica andandosi talvolta a fondere col chitosano legato a zone in rilievo adiacenti. Rimangono comunque distinguibili le zone di rilievo e di avvallamento del *pattern*. È stata analizzata tutta la superficie della membrana, osservando che la distribuzione del chitosano è uniforme e non vi sono zone prive di esso o con una presenza particolarmente abbondante rispetto al resto del campione.

L'immagine D della Fig. 4.5 mostra la superficie della membrana funzionalizzata con chit+GBMP1 $\alpha$ . Il pattern caratteristico della membrana non trattata non è più visibile come attestato anche dal dettaglio mostrato in Fig. 4.7:

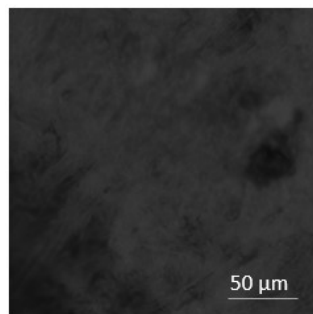


Fig. 4.7: analisi della superficie del campione funzionalizzato con chitosano+GBMP1 $\alpha$  al microscopio a due fotoni. Ingrandimento: 25X.

In questo caso, il pattern originale della membrana non è più visibile in quanto il chitosano funzionalizzato con il peptide GBMP1 $\alpha$ , a differenza del chitosano puro, crea uno strato continuo più spesso che copre interamente tutta la superficie della membrana, rendendo impossibile distinguere zone di avvallamento e zone in rilievo. Si può osservare unicamente lo strato superficiale di chit+GBMP1 $\alpha$  che ricopre la membrana. Analizzando tutta la superficie del campione si è visto che tale strato è continuo, omogeneo ed uniforme.

## 4.5 Saggi biologici

### 4.5.1 Proliferazione cellulare

In Fig. 4.8 sono riportati i risultati del saggio di proliferazione cellulare mediante sonda fluorescente CFSE dopo 7 giorni dalla semina degli osteoblasti sui campioni (vedi paragrafo 2.4.9.1).

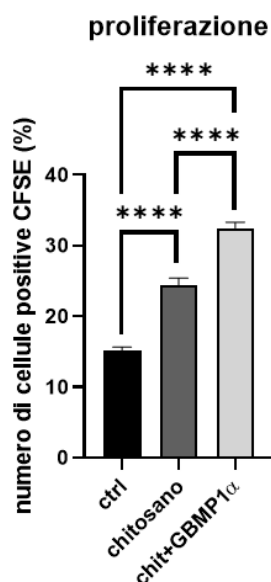


Fig. 4.8: risultati dell'analisi statistica effettuata sui dati di proliferazione cellulare a 7 giorni dalla semina di osteoblasti umani su membrana OsseoGuard® non trattata (ctrl), membrana OsseoGuard® funzionalizzata con chitosano (chitosano) e membrana OsseoGuard® funzionalizzata con chit+GBMP1α (chit+GBMP1α). Sull'asse delle ordinate vi è la % di fluorescenza CFSE, la sonda utilizzata per l'analisi. \*\*\*\* indica  $P < 0,0001$ .

Questi risultati mostrano un notevole incremento per quanto riguarda la proliferazione cellulare sulle membrane OsseoGuard® funzionalizzate con chit+GBMP1α sia rispetto alle membrane di controllo sia rispetto a quelle funzionalizzate con solo chitosano. La proliferazione cellulare sulle membrane funzionalizzate con chit+GBMP1α risulta essere più del doppio rispetto a quella sulle membrane di controllo non trattate (incremento del 115%) e superiore del 33% rispetto a quelle funzionalizzate col solo chitosano. Anche la proliferazione cellulare sulle membrane trattate col solo chitosano è significativamente maggiore rispetto a quella sulle membrane di controllo (incremento del 62%).

In conclusione, i risultati mostrano prestazioni molto superiori delle membrane funzionalizzate con chit+GBMP1α rispetto a quelle funzionalizzate con solo chitosano e rispetto al controllo per quanto riguarda la proliferazione cellulare. Tuttavia, entrambi i metodi di funzionalizzazione portano a notevoli miglioramenti rispetto alle membrane non trattate.

#### 4.5.2 Espressione genica

Vengono di seguito riportati i risultati dei saggi di espressione genica dopo 24h dalla semina degli osteoblasti sui campioni dei geni SPP1 e Runx2 codificanti *secreted phosphoprotein 1* (SPP1) alias “osteopontina” e *Runt-related transcription factor 2* (Runx2). Per farlo è stata eseguita l'estrazione e l'amplificazione dell'RNA tramite qPCR (vedi paragrafo 2.4.9.2).

### 4.5.2.1 Espressione genica di SPP1

In Fig. 4.9 sono riportati i risultati relativi all'espressione del gene SPP1, l'osteopontina, proteina coinvolta nell'omeostasi ossea e nell'adesione degli osteoblasti mediante legame con specifiche integrine. Gli istogrammi mostrano l'incremento dell'espressione del gene SPP1 delle membrane funzionalizzate con solo chitosano e con chit+GBMP1 $\alpha$  rispetto alle membrane OsseoGuard® non trattate (ctrl) per le quali il valore dell'espressione di questo gene è stato posto pari a 1.

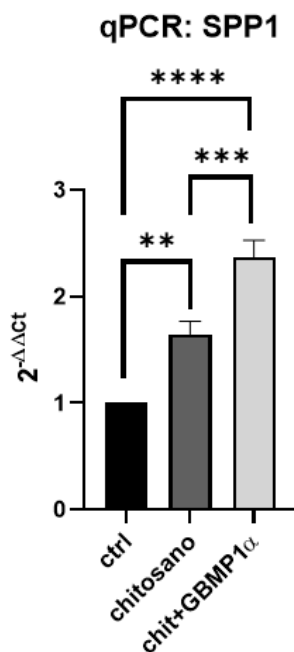


Fig. 4.9: risultati dell'analisi statistica effettuata sui dati di espressione del gene SPP1 a 24H dalla semina di osteoblasti su membrana OsseoGuard® non trattata (ctrl), membrana OsseoGuard® funzionalizzata con chitosano (chitosano) e membrana OsseoGuard® funzionalizzata con chit+GBMP1 $\alpha$  (chit+GBMP1 $\alpha$ ). Sull'asse delle ordinate vi è l'incremento di espressione genica rispetto a quella dei campioni di controllo posta pari a 1. \*\* indica P=0.0012, \*\*\* indica P=0.0006, \*\*\*\* indica P<0,0001.

Si osserva che l'espressione del gene SPP1 viene notevolmente incrementata da entrambe le funzionalizzazioni delle membrane, anche se in maniera decisamente più significativa dalla funzionalizzazione con chit+GBMP1 $\alpha$  rispetto a quella con solo chitosano. Infatti, vi è significatività di differenza di espressione del gene SPP1 anche tra i due tipi di funzionalizzazione. Nello specifico, rispetto all'espressione del gene SPP1 registrata sulle membrane non trattate, quella registrata sulle membrane funzionalizzate con chit+GBMP1 $\alpha$  è circa 2,4 volte superiore mentre quella registrata sulle membrane funzionalizzate con solo chitosano è 1.65 volte superiore.

Ciò dimostra la notevole efficacia di entrambe le tecniche di funzionalizzazione (ma prevalentemente di quella con chit+GBMP1 $\alpha$ ) di promuovere ed incrementare l'espressione del gene SPP1 degli osteoblasti seminati sulle membrane funzionalizzate.

#### 4.4.2.2 Espressione genica di Runx2

In Fig. 4.10 sono riportati i risultati relativi all'espressione del gene Runx2, codificante la proteina *Runt-related transcription factor 2* (Runx2), che agisce come fattore di trascrizione per incrementare l'espressione genica di osteocalcina (OCN) e sialoproteina ossea (SBN), entrambe coinvolte nel differenziamento cellulare. Gli istogrammi mostrano l'incremento dell'espressione del gene Runx2 delle membrane funzionalizzate con solo chitosano e con chit+GBMP1 $\alpha$  rispetto alle membrane OsseoGuard® non trattate ("ctrl") per le quali il valore dell'espressione di questo gene è stato posto pari a 1.

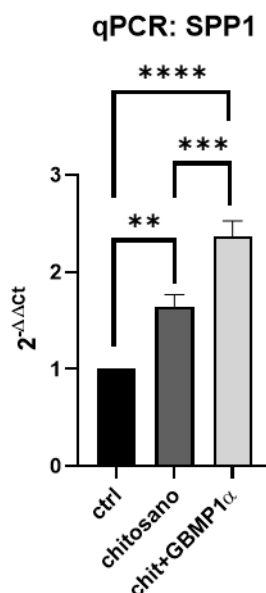


Fig. 4.10: risultati dell'analisi statistica effettuata sui dati di espressione del gene Runx2 a 24H dalla semina di osteoblasti su membrana OsseoGuard® non trattata (ctrl), membrana OsseoGuard® funzionalizzata con chitosano (chitosano) e membrana OsseoGuard® funzionalizzata con chit+GBMP1 $\alpha$  (chit+GBMP1 $\alpha$ ). Sull'asse delle ordinate vi è l'incremento di espressione genica rispetto a quella dei campioni di controllo posta pari a 1. \*\*\* indica P=0.0001, \*\*\*\* indica P<0,0001.

Si osserva che l'espressione del gene Runx2 viene notevolmente incrementata da entrambe le funzionalizzazioni delle membrane, anche se in maniera più significativa dalla funzionalizzazione con chit+GBMP1 $\alpha$  rispetto a quella con solo chitosano. Infatti, vi è differenza di espressione del gene Runx2 significativa anche tra i due tipi di funzionalizzazione. Nello specifico, rispetto all'espressione del gene Runx2 registrata sulle membrane non trattate,

quella registrata sulle membrane funzionalizzate con chit+GBMP1 $\alpha$  è circa 2.9 volte superiore mentre quella registrata sulle membrane funzionalizzate con solo chitosano è circa 1.8 volte superiore.

Ciò dimostra la notevole efficacia di entrambe le tecniche di funzionalizzazione (ma prevalentemente di quella con chit+GBMP1 $\alpha$ ) di promuovere ed incrementare l'espressione del gene Runx2 degli osteoblasti seminati sulle membrane funzionalizzate.

### 4.5.3 Mineralizzazione

Con questa analisi si valuta la deposizione dei sali di calcio tramite test all'alizarina seguendo il protocollo riportato nel paragrafo 2.4.9.3. Ciò permette di valutare la capacità dei vari *patch* di stimolare e mantenere il fenotipo osteoblastico delle cellule in coltura.

Dopo 7 giorni di coltivazione degli osteoblasti sui campioni sono state rilevate, tramite spettrofotometria, le densità ottiche (OD) di alizarina in ogni pozzetto. Come detto nel paragrafo sopraccitato, la densità ottica di alizarina è direttamente proporzionale ai livelli di calcio prodotti dalla coltura cellulare.

I risultati sono illustrati in Fig. 4.11.

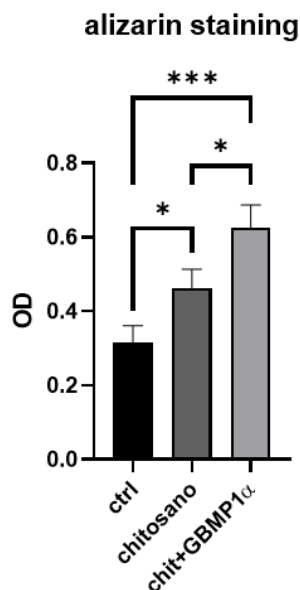


Fig. 4.11: risultati dell'analisi statistica effettuata sui dati di mineralizzazione a 7 giorni dalla semina di osteoblasti umani su membrana OsseoGuard® non trattata (ctrl), membrana OsseoGuard® funzionalizzata con chitosano (chitosano) e membrana OsseoGuard® funzionalizzata con chit+GBMP1 $\alpha$  (chit+GBMP1 $\alpha$ ). Sull'asse delle ordinate vi è la densità ottica (OD) di alizarina rilevata. \* indica P=0,032 tra ctrl e chitosano e P=0,0204 tra chitosano e chit+GBMP1 $\alpha$ ; \*\*\* indica P=0.0008.

Si nota una differenza significativa di densità ottica di alizarina rilevata sia sui campioni funzionalizzati con solo chitosano che sui campioni funzionalizzati con chit+GBMP1 $\alpha$  rispetto alle membrane non trattate.

I risultati mostrano una differenza molto significativa di OD di alizarina rilevata anche tra i campioni funzionalizzati con i due diversi metodi. Infatti, i valori ottenuti sulle membrane funzionalizzate con chit+GBMP1 $\alpha$  sono significativamente maggiori rispetto a quelli ottenuti sulle membrane funzionalizzate con il solo chitosano. Nello specifico, i valori ottenuti sulle membrane funzionalizzate con chit+GBMP1 $\alpha$  sono circa 2 volte superiori a quelli ottenuti sulle membrane non trattate, mentre quelli ottenuti sulle membrane funzionalizzate con il solo chitosano sono circa 1,5 volte superiori a quelli ottenuti sulle membrane non trattate.

Ciò dimostra la notevole efficacia di entrambe le tecniche di funzionalizzazione (ma prevalentemente di quella con chit+GBMP1 $\alpha$ ) di incrementare la deposizione di calcio, e quindi la mineralizzazione, da parte degli osteoblasti seminati sulle membrane funzionalizzate.

#### **4.5.4 Valutazione delle proprietà antibatteriche**

Con questa analisi si valutano le proprietà antibatteriche dei campioni seguendo il protocollo riportato nel paragrafo 2.4.9.4. Nello specifico si procede ad una conta delle colonie batteriche presenti dopo 24 ore sui campioni funzionalizzati, su quelli di controllo e sulla plastica della piastra con pozzetti. Quest'ultima viene utilizzata come controllo positivo, al fine di poter valutare anche la capacità antibatterica delle membrane OsseoGuard® non trattate rispetto a quella di un materiale noto.

Dopo 24h di incubazione di *Staphylococcus aureus* sui campioni e a seguito di tutti i successivi passaggi descritti nel paragrafo sopracitato, sono state contate, tramite spettrofotometria, le colonie batteriche sopravvissute in ogni pozzetto.

I risultati sono illustrati in Fig. 4.12.

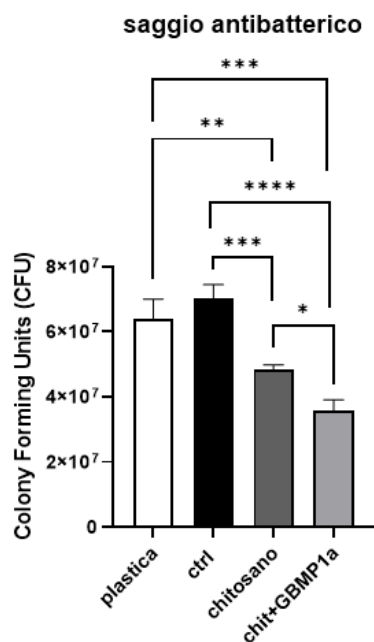


Fig. 4.12: risultati dell'analisi statistica effettuata sui risultati del saggio antibatterico a 24h dall'incubazione di *Staffilococcus aureus* su plastica, membrana OsseoGuard® non trattata (ctrl), membrana OsseoGuard® funzionalizzata con chitosano (chitosano) e membrana OsseoGuard® funzionalizzata con chit+GBMP1α (chit+GBMP1α).

\* indica  $p=0.02$ ; \*\* indica  $p=0.007$ ; \*\*\* indica  $p=0.0001$ ; \*\*\*\* indica  $p<0.0001$ .

Il primo risultato interessante che si può osservare è che non vi è differenza statistica tra le proprietà antibatteriche del supporto plastico e delle membrane OsseoGuard® non trattate (ctrl). Pertanto, la proprietà battericida dei due diversi materiali è la medesima.

Per quanto riguarda, invece, entrambe le funzionalizzazioni, possiamo osservare come queste vadano ad incrementare in maniera estremamente significativa la proprietà antibatterica delle membrane OsseoGuard®. Tuttavia, anche in questo caso si può notare come la funzionalizzazione con chit+GBMP1α fornisca un risultato significativamente migliore rispetto alla funzionalizzazione con solo chitosano. Nello specifico, il numero di colonie di *S. aureus* rilevate post incubazione di 24h sui campioni di controllo è circa doppio rispetto a quelle rilevate sui campioni funzionalizzati con chit+GBMP1α, mentre risulta essere solo 1,45 volte superiore rispetto al numero di colonie rilevate sui campioni funzionalizzati con solo chitosano.

Questi risultati confermano quanto presente in letteratura: il chitosano ed il peptide GBMP1α sono dotati di notevoli capacità antibatteriche, che vengono dunque conferite ai materiali con essi funzionalizzati [48].

È possibile infine notare come anche la stessa capacità antibatterica del chitosano venga notevolmente incrementata a seguito della sua funzionalizzazione con il peptide.

## 4.6 Test meccanici

I campioni di controllo trattati con soluzione attivante (EDC/sulfo-NHS 30 mM in acetone/MilliQ v:v 13:7), quelli funzionalizzati con chitosano e quelli funzionalizzati con chit+GBMP1 $\alpha$  mostrano un comportamento meccanico analogo a quello tipico del collagene idratato, che differisce da quello dei campioni di controllo non trattati, tipico del collagene non idratato, come mostrato in Fig. 4.13.

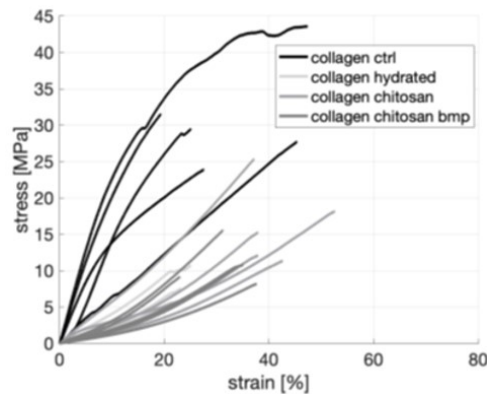


Fig. 4.13: curve tensione-deformazione ottenute dai test a rottura a trazione monoassiale sui provini ad osso di cane di membrana OsseoGuard® non trattata (collagen ctrl), membrana OsseoGuard® idratata con soluzione attivante EDC/sulfo-NHS 30 mM in Acetone/MilliQ 13:7 (collagen hydrated), OsseoGuard® funzionalizzata con chitosano (collagen chitosan) e OsseoGuard® funzionalizzata con chit+GBMP1 $\alpha$  (collagen chitosan BMP).

Prima di effettuare le analisi sono stati misurati gli spessori di tutti i provini come descritto nel capitolo precedente, mentre dalle curve tensione deformazione sono stati estrapolati i dati di deformazione a rottura (*failure strain*, FS) come valore di deformazione del provino nell'istante immediatamente precedente la rottura, tensione di rottura (*ultimate tensile strenght*, UTS) come valore massimo di tensione registrato nell'analisi di ogni provino e modulo di Young (E) come pendenza della retta congiungente i punti a deformazione 1% e 10% per ogni provino. In Fig. 4.14 vengono mostrati i risultati dell'analisi statistica effettuati sui dati così ottenuti.

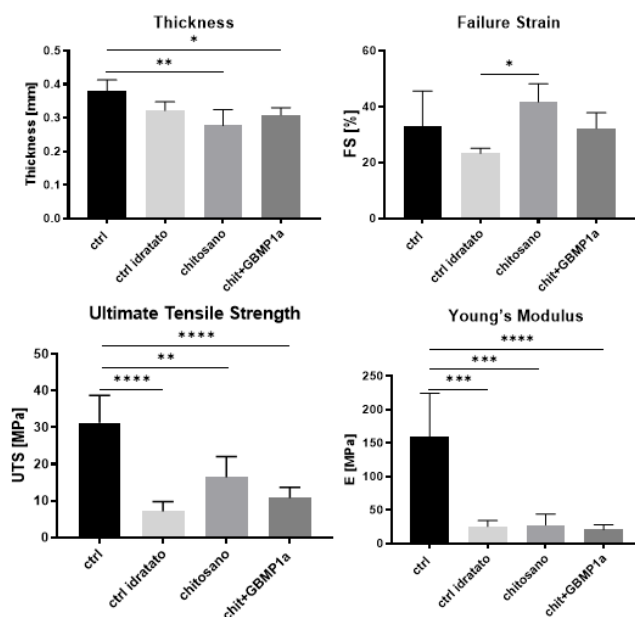


Fig. 4.14: risultati dell'analisi statistica effettuata sui valori di spessore, deformazione a rottura, tensione di rottura e modulo di Young ottenuti a seguito dell'analisi di trazione monoassiale a rottura effettuata sui provini ad osso di cane di membrana OsseoGuard® non trattata (ctrl), membrana OsseoGuard® idratata con soluzione attivante EDC/sulfo-NHS 30 mM in Acetone/MilliQ 13:7 (ctrl idratato), OsseoGuard® funzionalizzata con chitosano (chitosano) e OsseoGuard® funzionalizzata con chit+GBMP1α (chit+GBMP1α). Grafico *thickness*: \* indica P=0.0191, \*\* indica P=0.0011; grafico *failure strain*: \* indica P=0.0163; grafico UTS: \*\* indica P=0.0021, \*\*\*\* indica P<0.0001; grafico E: \*\*\* indica P=0.0002 tra ctrl e ctrl idratato e P=0.0001 tra ctrl e chitosano, \*\*\*\* indica P<0.0001.

Dall'analisi risulta che non vi sono differenze statisticamente rilevanti tra gli spessori di tutte le membrane trattate. Lo spessore dei campioni di controllo non trattati è maggiore in maniera non statisticamente rilevante di quello dei campioni di controllo idratati (sottoposti alla sola reazione di attivazione). Si ha però una differenza significativa tra gli spessori dei campioni di controllo non trattati e delle membrane funzionalizzate con chitosano e chit+GBMP1α, dove lo spessore dei primi è notevolmente maggiore rispetto a quello degli altri. Lo spessore dei campioni di controllo idratati è lievemente maggiore rispetto a quello dei campioni funzionalizzati. Ciò mostra che la reazione di attivazione riduce lo spessore delle membrane ma in maniera non statisticamente rilevante rispetto ai campioni non trattati mentre la reazione di funzionalizzazione sembra contribuire ulteriormente all'assottigliamento delle membrane, rendendole statisticamente meno spesse rispetto a quelle non trattate. Lo spessore delle membrane funzionalizzate con chit+GBMP1α è leggermente superiore rispetto a quello delle membrane funzionalizzate col solo chitosano, presumibilmente per via dell'ingombro sterico del peptide.

L'unica differenza significativa per quanto riguarda la deformazione a rottura si riscontra tra membrane funzionalizzate con chitosano e membrane di controllo idratate, dove la FS delle prime è notevolmente maggiore. Si nota che le membrane funzionalizzate con chitosano mostrano la FS maggiore in assoluto, presumibilmente per via dell'impaccamento delle catene del chitosano e dei legami tra esse, che rendono possibile una maggiore deformazione della membrana prima di giungere a rottura. Si può inoltre notare che la sola idratazione peggiora la deformazione a rottura rispetto alle membrane non trattate mentre l'aggiunta di chitosano torna a far aumentare il valore di questo parametro per il motivo illustrato. La presenza del peptide limita il grado di impaccamento del chitosano, rendendo minore il suo effetto sulla deformazione a rottura.

Le stesse considerazioni possono essere fatte per quanto riguarda la tensione di rottura: la presenza di chitosano rende sempre maggiore il valore di questo parametro rispetto alla sola idratazione mentre l'aggiunta del peptide rende peggiore il valore di questo dato rispetto alla sola presenza di chitosano, per i motivi precedentemente illustrati. Comunque, la differenza di UTS tra controllo idratato, membrane funzionalizzate con chitosano e membrane funzionalizzate con chit+GBMP1 $\alpha$  non è significativa. Questo dato riferito ai campioni non trattati è significativamente maggiore rispetto a quello di tutti i campioni trattati, segno che l'idratazione influenza notevolmente questo parametro.

Non vi sono differenze rilevanti per quanto riguarda il modulo di Young di tutti i campioni trattati, che è significativamente molto minore rispetto a quello dei campioni di controllo non trattati. Anche qui si nota l'impatto dell'idratazione.

In Tab. 4.5 sono mostrati i valori numerici dei parametri appena discussi.

sample	thickness	FS	UTS	E
collagen	0.38 $\pm$ 0.03	32.99 $\pm$ 12.63	31.22 $\pm$ 7.45	159.3 $\pm$ 65.03
Collagen hydrated	0.32 $\pm$ 0.03	23.25 $\pm$ 1.87	7.16 $\pm$ 2.62	25.47 $\pm$ 8.9
Collagen chitosan	0.28 $\pm$ 0.05	41.68 $\pm$ 6.49	16.4 $\pm$ 5.67	27.5 $\pm$ 16.45
Collagen chitosan BMP	0.31 $\pm$ 0.02	32.22 $\pm$ 5.62	10.82 $\pm$ 2.83	20.65 $\pm$ 7.52

Tab. 4.5: valori di spessore, deformazione a rottura, tensione di rottura e modulo di Young ottenuti a seguito dell'analisi di trazione monoassiale a rottura effettuata sui provini ad osso di cane di membrana OsseoGuard® non trattata (collagen ctrl), membrana OsseoGuard® idratata con soluzione attivante EDC/sulfo-NHS 30 mM in Acetone/MilliQ 13:7 (collagen hydrated), OsseoGuard® funzionalizzata con chitosano (collagen chitosan) e OsseoGuard® funzionalizzata con chit+GBMP1 $\alpha$  (collagen chitosan BMP).

## CAPITOLO 5

### CONCLUSIONI

A seguito del lavoro sperimentale svolto in questo progetto di tesi si possono trarre le seguenti conclusioni.

In primo luogo, le analisi FT-IR e XPS hanno confermato l'avvenuta funzionalizzazione delle membrane OsseoGuard® con chitosano e con chit+GBMP1 $\alpha$ . Le analisi al microscopio ottico ed al microscopio ottico a due fotoni hanno confermato la presenza di chitosano o chit+GBMP1 $\alpha$  sulla superficie delle membrane, creando uno strato al di sopra di essa. Inoltre, l'analisi al microscopio ottico a due fotoni ha dimostrato che le uniche differenze significative tra le membrane funzionalizzate, quelle non trattate e quelle sottoposte a sola reazione di attivazioni risiedono esclusivamente sulla superficie dei campioni.

In secondo luogo, i campioni sono stati caratterizzati mediante saggi biologici con l'utilizzo di osteoblasti umani estratti da mandibola: il saggio di proliferazione cellulare a 7 giorni ha mostrato un notevolissimo incremento della proliferazione cellulare con entrambe le funzionalizzazioni, ma in maniera assai più rilevante con quella con chit+GBMP1 $\alpha$  che rende possibile una proliferazione cellulare superiore al doppio rispetto a quella ottenuta con le membrane non trattate.

Il saggio di espressione genica a 24h dei geni SPP1 e Runx2 ha fornito gli stessi risultati: l'espressione dei due geni aumenta notevolmente con entrambe le funzionalizzazioni, ma sempre decisamente di più con quella con chit+GBMP1 $\alpha$ . Nello specifico con questa funzionalizzazione l'espressione di SPP1 è superiore al doppio rispetto a quella che si ottiene con le membrane non trattate mentre l'espressione di Runx2 è quasi tripla rispetto a quella ottenuta con i campioni di controllo.

Il saggio di mineralizzazione a 7 giorni ha mostrato un notevole incremento della deposizione di calcio (rilevata tramite colorazione con alizarina) ottenibile con le membrane funzionalizzate nei due modi, ma ancora una volta la funzionalizzazione con chit+GBMP1 $\alpha$  dà risultati decisamente migliori: la mineralizzazione ottenuta con questa funzionalizzazione è due volte e mezzo superiore rispetto a quella ottenibile con le membrane OsseoGuard® non trattate.

Il saggio antibatterico ha dimostrato come le membrane funzionalizzate in entrambi i modi abbiano proprietà antibatteriche superiori rispetto alle membrane non trattate e ancora una volta il risultato migliore si ottiene con la funzionalizzazione con chit+GBMP1 $\alpha$  che riduce la presenza dello *Staphylococcus Aureus* rispetto alle membrane non trattate.

Infine, il test meccanico di trazione monoassiale su provini ad osso di cane eseguito su membrane non trattate, membrane funzionalizzate e membrane sottoposte esclusivamente a reazione di attivazione ha mostrato che le funzionalizzazioni non modificano in maniera significativa le proprietà meccaniche delle membrane.

A fronte di tutto ciò è possibile affermare che la bioattività delle membrane OsseoGuard® è stata effettivamente migliorata con entrambe le funzionalizzazioni. Sotto ogni punto di vista, comunque, la funzionalizzazione con chit+GBMP1 $\alpha$  è decisamente quella più efficace.

## REFERENZE

- [1] R. Gupta, N. Gupta, K. K. Weber, *Dental Implants*, StatPearls Publishing, Jan. 2022.
- [2] R. Florencio-Silva, G. Rodrigues da Silva Sasso, E. Sasso-Cerri, M. J. Simões, and P. S. Cerri, *Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells*, BioMed Research international, 2015.
- [3] B. M. Manzini, L.M. Ribeiro Machado, P. Y. Noritomi, J. V. Lopes DA Silva, *Advances in Bone tissue engineering: A fundamental review*, Journal of Biosciences, 2021, pp.46-17.
- [4] D. Lopes, C. Martins-Cruz, M. B. Oliveira, and J. F. Mano, *Bone Physiology as Inspiration for Tissue Regenerative Therapies*, Biomaterials, Dec 2018, pp. 240–275.
- [5] N.A.Sims, J.H.Gooi, *Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption*, Seminars in Cell & Developmental Biology, Oct 2008, pp. 444-451.
- [6] M.Capulli, R.Paone, N.Rucci, *Osteoblast and osteocyte: Games without frontiers*, Archives of Biochemistry and Biophysics, Nov 2014, pp. 3-12.
- [7] A.D.Theocharis, S.Skandalis, C.G.Nikos, K.Karamanos, *Extracellular matrix structure*, Advanced Drug Delivery Reviews, Feb 2016, pp. 4-27.
- [8] C. Di Bello, A.Bagno, “*Biomateriali: dalla scienza dei materiali alle applicazioni cliniche*”, Bologna, 2016.
- [9] A. Sorushanova, L. M. Delgado, Z. Wu, N. Shologu, A. Kshirsagar, R. Raghunath, A. M. Mullen, Y. Bayon, A. Pandit, M. Raghunath, D. I. Zeugolis, *The Collagen Suprafamily: From Biosynthesis to Advanced Biomaterial Development*, Advanced Materials, Jan.2019.
- [10] E.F.Morgan, G.U.Unnikrisnan, A.I.Hussein, *Bone Mechanical Properties in Healthy and Diseased States*, Annual Review Biomedical Engineering, Jun 2018, pp. 119–143.
- [11] J. S. Kenkre, J. Bassett, *The bone remodelling cycle*, Annals of Clinical Biochemistry, May 2018, pp.308-327.
- [12] A. Wubneh, E. K. Tsekoura, C. Ayranci, H. Uludağ, *Current state of fabrication technologies and materials for bone tissue engineering*, Acta Biomaterialia, Oct. 2018, pp.1-30.
- [13] D.S.Koussoulakou, L.H.Margaritis, S. L. Koussoulakos, *A Curriculum Vitae of Teeth: Evolution, Generation, Regeneration*, Internationale Journal of Biological Sciences, Feb 2009, pp.226-243.
- [14] V.M.Zohrabian, Colin S.Poon, James J.Abrahams, *Embryology and Anatomy of the Jaw and Dentition*, Seminars in Ultrasound, CT and MRI, Oct 2015, pp.397-406.

- [15] T de Jong, A D Bakker , V Everts, T H Smit, *The intricate anatomy of the periodontal ligament and its development: Lessons for periodontal regeneration*, Journal of Periodontal Research, Dec. 2017, pp. 965-974.
- [16] H E Schroeder , M A Listgarten, *The gingival tissues: the architecture of periodontal protection*, Periodontology 2000, Feb. 1997,pp.91-120.
- [17] S. Abdulghani and G. R. Mitchell, *Biomaterials for In Situ Tissue Regeneration: A Review*, Biomolecules. 2019 Nov; pp.11-750.
- [18] F. Berthiaume, T.J. Maguire, M. L. Yarmush, *Tissue Engineering and Regenerative Medicine: History, Progress, and Challenges*, Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering, pp.403-430, March 2011.
- [19] A. Shafiee, A. Atala, *Tissue Engineering: Toward a New Era of Medicine*, Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering, 2017, pp.29–40.
- [20] L.Roseti, V. Parisi, M. Petretta, C. Cavallo, G. Desando, I.Bartolotti, B. Grigolo, *Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the art and new perspectives*, Materials Science and Engineering: C, Sep. 2017, pp.1246-1262.
- [21] W. Zakrzewski, M. Dobrzyński, M. Szymonowicz, Z. Rybak, *Stem cells: past, present, and future*, Stem Cell Research & Therapy, 2019, pp.10-68.
- [22] P.Sharma, P. Kumar, R Sharma, V. Dhar Bhatt, P.S. Dhot, *Tissue Engineering; Current Status & Futuristic Scope*, Journal of Medicine and Life. 2019 Jul-Sep; pp.225–229.
- [23] S. Samavedi, L. K. Poindexter, M. Van Dyke, A. S. Goldstein, *Synthetic biomaterials for regenerative medicine applications*, in Regenerative medicine applications in organ transplantation. Elsevier, 2014, pp. 81–99.
- [24] X. Zhang, X. Chen, H. Hong, R. Hu, J. Liu, and C. Liu, *Decellularized extracellular matrix scaffolds: Recent trends and emerging strategies in tissue engineering*, Bioactive Materials, Apr. 2022, pp.15–31.
- [25] A. Muxika , A. Etxabide, J. Uranga, P. Guerrero, K. de la Caba, *Chitosan as a bioactive polymer: Processing, properties and applications*, International Journal of Biological Macromolecules, Dec. 2017, pp. 1358-1368.
- [26] I. Younes, M. Rinaudo, *Chitin and Chitosan Preparation from Marine Sources. Structure, Properties and Applications*, Marine Drugs, Mar. 2015, pp.1133-1174.
- [27] M. Rodríguez-Vázquez, B. Vega-Ruiz, R. Ramos-Zúñiga, D. A. Saldaña-Koppel, L. F. Quiñones-Olvera, *Chitosan and Its Potential Use as a Scaffold for Tissue Engineering in Regenerative Medicine*, BioMed Research International, Oct. 2015.

- [28] R. Visser, G.A. Rico-Llanos, H. Pulkkinen, J. Becerra, *Peptides for bone tissue engineering*, Journal of Controlled Release, Dec. 2016, pp. 122-135.
- [29] G. Xiao, R. Gopalakrishnan, D. Jiang, E. Reith, M.D. Benson, R.T. Franceschi, *Bonemorphogenetic proteins, extracellular matrix, and mitogen-activated protein kinase signaling pathways are required for osteoblast-specific gene expression and differentiation in MC3T3-E1 cells*, Journal of Bone and Mineral Research, Jan. 2002, pp. 101-110.
- [30] A. Saito, Y. Suzuki, S. Ogata, C. Ohtsuki, M. Tanihara, *Activation of osteo-progenitor cells by a novel synthetic peptide derived from the bone morphogenetic protein-2 knuckle epitope*, Biochimica et Biophysica Acta, Sep. 2003, pp. 60-67.
- [31] P. Brun, A. Zamuner, L. Cassari, G. D'Auria, L. Falcigno, S. Franchi, G. Contini, M. Marsotto, C. Battocchio,<sup>7</sup> G. Iucci, M. Dettin, *Chitosan Covalently Functionalized with Peptides Mapped on Vitronectin and BMP-2 for Bone Tissue Engineering*, Nanomaterials, Nov. 2021.
- [32] A. Bagno, C. Di Bello: *Surface treatments and roughness properties of Ti-based biomaterials*. Journal of Material Science, Materials in Medicine, Sep. 2004, pp.935-949.
- [33] B. M. Holzapfel, M. Rudert, D. W. Hutmacher, *Scaffold-based Bone Tissue Engineering*, Orthopade, Aug 2017, pp.701-710.
- [34] H. D. Kim, S. Amirthalingam, S. L. Kim, S. S. Lee, J. Rangasamy, N. S. Hwang, *Biomimetic Materials and Fabrication Approaches for Bone Tissue Engineering*, Advanced Healthcare Materials, Dec. 2017.
- [35] J. Venkatesan, S. Kim, *Chitosan composites for bone tissue engineering--an overview*, Marine Drugs, Aug. 2010, pp. 2252-66.
- [36] P. Brun, A. Zamuner, C. Battocchio, L. Cassari, M. Todesco, V. Graziani, G. Iucci, M. Marsotto, L. Tortora, V. Secchi, M. Dettin, *Bio-Functionalized Chitosan for Bone Tissue Engineering*, International Journal of Molecular Science, May 2021.
- [37] G. I. Benic, C. H. F. Hämmerle, *Horizontal bone augmentation by means of guided bone regeneration*, Periodontology 2000, Oct. 2014, pp. 3-40.
- [38] L. Larsson, A. M. Decker, L. Nibali, S. P. Pilipchuk, T. Berglundh, W. V. Giannobile, *Regenerative Medicine for Periodontal and Peri-implant Diseases*, Journal of Dental Research, Mar. 2016, pp. 255-266.
- [39] Z. Sheikh, J. Qureshi, A. M. Alshahrani, H. Nassar, Y. Ikeda, M. Glogauer, B. Ganss, *Collagen based barrier membranes for periodontal guided bone regeneration applications*, Odontology, Jan 2017, pp. 1-12.

- [40] B. Wessing, S. Lettner, W. Zechner, *Guided Bone Regeneration with Collagen Membranes and Particulate Graft Materials: A Systematic Review and Meta-Analysis*, International Journal of Oral and Maxillofacial Implants, Jan 2018, pp. 87-100.
- [41] I. A. Urban, A. Monje, *Guided Bone Regeneration in Alveolar Bone Reconstruction*, Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America, May 2019, pp. 331-338.
- [42] I. A. Urban, A. Monje, S. Jaime, L. Lozada, H. Wang, *Long-term Evaluation of Peri-implant Bone Level after Reconstruction of Severely Atrophic Edentulous Maxilla via Vertical and Horizontal Guided Bone Regeneration in Combination with Sinus Augmentation: A Case Series with 1 to 15 Years of Loading*, Clinical Implant Dentistry and Related Research, May 2016.
- [43] A. Cucchi, E. Vignudelli, A. Napolitano, C. Marchetti, G. Corinaldesi, *Evaluation of complication rates and vertical bone gain after guided bone regeneration with non-resorbable membranes versus titanium meshes and resorbable membranes. A randomized clinical trial*, Clinical Implant Dentistry and Related Research, Oct. 2017, pp. 821-832.
- [44] I. A. Urban, E. Montero, A. Monje, I. Sanz-Sánchez, *Effectiveness of vertical ridge augmentation interventions: A systematic review and meta-analysis*, Journal of Clinical Periodontology, Jun 2019, pp. 319-339.
- [45] S. Fickl, K. Fischer, N. Petersen, A. Happe, M. Schlee, U. Schlagenhauf, M. Kebschull, *Dimensional Evaluation of Different Ridge Preservation Techniques: A Randomized Clinical Study*, international Journal of Periodontics and Restorative Dentistry, May 2017, pp. 403-410.
- [46] V. Mäde, S. Els-Heindl, A. G. Beck-Sickinger, *Automated solid-phase peptide synthesis to obtain therapeutic peptides*, Beilstein Journal of Organic Chemistry, 2014, pp. 1197-1212.
- [47] T. Kawakami, K. Akaji, S. Aimoto, *Peptide bond formation mediated by 4,5-dimethoxy-2-mercaptobenzylamine after periodate oxidation of the N-terminal serine residue*, Organic letters, May 2001, pp.1403-1405.
- [48] P. Brun, A. Zamuner, L. Cassari, G. D'Auria, L. Falcigno, S. Franchi, G. Contini, M. Marsotto, C. Battocchio, G. Iucci, M. Dettin, *Chitosan Covalently Functionalized with Peptides Mapped on Vitronectin and BMP-2 for Bone Tissue Engineering*, Nanomaterials (Basel), Nov 2021; pp.2784.
- [49] V. Secchi, S. Franchi, D. Ciccarelli, M. Dettin, A. Zamuner, A. Serio, G. Iucci, C. Battocchio, *Biofunctionalization of TiO<sub>2</sub> Surfaces with Self-Assembling Layers of Oligopeptides Covalently Grafted to Chitosan*, ACS Biomaterials science & engineering, May 2019, pp. 2190-2199

## Ringraziamenti

Per terminare vorrei ringraziare immensamente la Professoressa Monica Dettin per avermi dato l'opportunità di lavorare a questo progetto presso il suo laboratorio, facendomi scoprire il mondo della ricerca; un grazie per tutta la fiducia e la pazienza dimostrate nei miei confronti e per tutte le conoscenze teoriche e pratiche che mi ha trasmesso, arricchendomi notevolmente.

Un ringraziamento speciale ai Dottori Alissa Di Giulian, Vittoria Facchin e Francesco Tolomei per avermi insegnato tutto sul lavoro in laboratorio, dall'utilizzo degli strumenti e delle procedure da seguire fino ai consigli pratici che non sono mai mancati. Grazie davvero!

Ringrazio inoltre la Professoressa Paola Brun per lo svolgimento di tutti i saggi biologici e per la disponibilità sempre mostratami e le Dottoresse Antonella Pasquato e Martina Todesco per il loro fondamentale aiuto fornitomi per le prove di FT-IR, microscopia ottica e test meccanici.

Un sentito ringraziamento ai Dottori Annj Zamuner, Elena Zeni e Leonardo Cassari per i loro consigli pratici e l'assistenza che non mi hanno mai fatto mancare in caso di necessità.

Ringrazio di cuore tutti i miei amici, che in questi anni ci sono sempre stati per me, regalandomi sempre un sorriso anche nei momenti più difficili.

Infine, il ringraziamento più grande va ai miei genitori, Antonella e Claudio, a Gloria e a tutta la mia famiglia. Grazie per non avermi mai fatto mancare nulla, per aver sempre creduto in me, per avermi sempre spronato ad andare avanti e a dare il massimo sempre durante tutto il mio percorso di studi fin qui.

