



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA



DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN BIOINGEGNERIA

**ENDOTELIZZAZIONE DI PERICARDIO BOVINO DECELLULARIZZATO
E FUNZIONALIZZATO COVALENTEMENTE CON REDV PER
APPLICAZIONI CARDIOVASCOLARI**

Relatore: *Prof.ssa Monica Dettin*

Laureanda: Rebecca Rabinelli

Correlatori: *Dott.ssa Saima Imran*
Prof.re Gino Gerosa

ANNO ACCADEMICO 2021 – 2022

Data di laurea 20 Ottobre 2022

Alla mia famiglia

INDICE:

CAPITOLO 1: INTRODUZIONE.....	2
1.1 MALATTIE CARDIOVASCOLARI.....	2
1.1.1 ANGINA PECTORIS.....	2
1.1.2 INFARTO MIOCARDICO.....	2
1.1.3 TERAPIA PER INFARTO MIOCARDICO.....	3
1.2 MALATTIE CELEBROVASCOLARI: ICTUS ISCHEMICO E ICTUS EMORRAGICO....	4
1.3 MALATTIE VALVOLARI.....	5
1.4 PERICARDIO.....	11
1.5 COLTURE CELLULARI.....	13
1.6 IL SANGUE.....	22
1.7 ENDOTELIO.....	23
1.8 LA COAGULAZIONE.....	25
1.9 BIOMATERIALI.....	32
1.10 INTERAZIONI DEL SANGUE CON UNA SUPERFICIE SINTETICA.....	36
1.11 DECELLULARIZZAZIONE DEI TESSUTI.....	38
1.12 METODI DI FUNZIONALIZZAZIONE.....	42
1.13 SEQUENZE PEPTIDICHE IMPIEGATE NELLA FUNZIONALIZZAZIONE DEGLI SCAFFOLD.....	44
1.14 PEPTIDE MIMICRY.....	46
1.15 SEQUENZE ADESIVE.....	47
1.16 REDV.....	48
1.17 SCOPO DELLA TESI.....	50
CAPITOLO 2: MATERIALI E METODI.....	53
2.3 METODI.....	57
2.3.1 Sintesi peptidica su fase solida (SPPS).....	57
2.3.2 Purificazione e caratterizzazione cromatografica.....	65
2.3.2 Spettrometria di massa.....	68
2.3.3 Spettroscopia di assorbimento UV/VIS.....	71
2.3.5 Funzionalizzazione degli scaffold biologici con sequenze peptidiche.....	72
2.1 Protocollo di decellularizzazione TERGICOL.....	73
CAPITOLO 3 : PARTE SPERIMENTALE.....	77
3.1 Sintesi peptidica.....	77

3.1.1 Sintesi del peptide SxxREDV	77
3.1.2 Caratterizzazione del peptide grezzo	78
3.1.3 Ossidazione della Serina N-terminale.....	79
3.1.4 Caratterizzazione del peptide REDV-aldeide	80
3.2 Decellularizzazione del pericardio bovino (DBP) mediante il protocollo TERGICOL	81
3.2.1 Funzionalizzazione covalente del DBP.....	83
3.3 Preparazione soluzione di funzionalizzazione per il pericardio bovino decellularizzato.	84
3.4 Saggi biologici	86
3.5 Test della resazurina.....	87
3.6 Adesione e vitalità cellulare.....	92
3.6.1 Test Live and Dead per la vitalità cellulare	92
3.7 Estrazione del DNA	95
CONCLUSIONI.....	97

ABSTRACT

Tra i tessuti biologici che l'evoluzione ci ha consegnato, l'endotelio sano rappresenta la superficie antitrombotica ed emocompatibile per eccellenza. Tra i biomateriali sviluppati per un contatto prolungato con il sangue non ne esiste alcuno in grado di presentare una superficie totalmente antitrombotica e perfettamente emocompatibile. Lo studio e l'utilizzo dei meccanismi biologici alla base dell'emocompatibilità è un ambito di frontiera per la messa a punto di biomateriali sempre più performanti. La presente tesi nasce all'interno di un progetto scientifico che valuta la modifica di una matrice biologica decellularizzata (pericardio bovino, DBP), con sequenze di sintesi per promuovere l'endotelizzazione assicurando al tessuto così ingegnerizzato l'anti-trombogenicità e l'emocompatibilità. Il pericardio è stato funzionalizzato in modo covalente con un peptide (REDV) in grado di promuovere l'adesione delle cellule endoteliali (HUVEC) in modo specifico evitando al contempo di incentivare l'adesione di piastrine o di cellule muscolari. In una prima parte del progetto era stato dimostrato che la funzionalizzazione del pericardio bovino con soluzioni a concentrazioni di lavoro di 10^{-5} M di peptide REDV aldeide effettivamente contribuiva a ottenere un layer di cellule endoteliali in tempi più rapidi rispetto al controllo. In tale studio è stato inoltre dimostrato che la funzionalizzazione covalente del DBP con REDV aldeide non comporta cambiamenti significativi nelle caratteristiche geometriche e nelle proprietà meccaniche del DBP. Il passo successivo della ricerca è stato indirizzato a comprendere se concentrazioni di peptide ancorato più elevate potessero ulteriormente incrementare e velocizzare la formazione dello strato di cellule endoteliali. Inizialmente, mediante uno studio con il microscopio a due fotoni e l'utilizzo di un peptide marcato con gruppo fluorescente, è stato dimostrato che l'impiego di concentrazioni peptidiche operative più alte (10^{-3} M e 10^{-4} M) assicura quantità maggiori di peptide ancorato rispetto a quanto ottenuto con la soluzione operativa 10^{-5} M. Scopo di questo lavoro di tesi è stato valutare il gradimento delle cellule endoteliali verso DBP funzionalizzato con soluzioni di peptide alle concentrazioni di 10^{-3} M e 10^{-4} M. I risultati dell'adesione e della proliferazione delle cellule HUVEC a queste matrici ingegnerizzate non hanno confermato i buoni dati ottenuti dallo studio precedente (concentrazioni operative 10^{-5} M): le cellule sui campioni trattati risultano infatti in quantità inferiore rispetto al controllo. In conclusione quindi il presente studio ha permesso di identificare nella concentrazione 10^{-5} M di REDV aldeide la condizione operativa per ottenere una concentrazione bioattiva di peptide ancorato utile ad assicurare una veloce endotelizzazione.

CAPITOLO 1: INTRODUZIONE

1.1 MALATTIE CARDIOVASCOLARI

Le malattie cardiovascolari comprendono un insieme di patologie che rappresentano le principali cause di invalidità e mortalità in Italia: sono infatti responsabili del 34,8% della totalità dei decessi (31,7% negli uomini e 37,7% nelle donne). All'interno di tale classificazione ritroviamo le malattie ischemiche del cuore, come l'infarto acuto del miocardio e l'angina pectoris, e le malattie cerebrovascolari, come l'ictus ischemico ed emorragico. [1] In particolare, secondo i dati Istat 2018, la cardiopatia ischemica è responsabile del 9,9% della totalità delle morti (10,8% negli uomini e 9% nelle donne), mentre gli accidenti cerebrovascolari dell'8,8% (7,3% negli uomini e 10,1% nelle donne). Le malattie cardiovascolari sono correlate non solo a fattori di rischio non modificabili quali età, sesso e familiarità, ma anche a fattori di rischio trattabili, riconducibili invece a particolari stili di vita come fumo, alcol, scorretta alimentazione e sedentarietà che sono spesso causa anche di ulteriori patologie quali diabete, obesità, ipercolesterolemia e ipertensione arteriosa: questo le rende anche malattie in gran parte prevenibili. [1]

1.1.1 ANGINA PECTORIS

L'angina pectoris è una sindrome che è causata da un ridotto apporto di sangue e di ossigeno al cuore, provocati da un restringimento di uno o più dei vasi arteriosi che portano sangue e nutrimento al cuore: le arterie coronarie. Questi restringimenti prendono il nome di stenosi e assumono un'importanza significativa quando superano il 70% del vaso sanguigno: esse sono a loro volta provocate da un accumulo di lipidi all'interno delle pareti delle coronarie, fenomeno che prende il nome di aterosclerosi. Tale sindrome si manifesta con un dolore oppressivo al petto o irradiato lungo la schiena, il braccio sinistro, il collo e la mandibola e in aggiunta ad esso si possono associare una serie di reazioni neurovegetative, come sudorazione fredda e nausea. Possono svolgere inoltre il ruolo di "sentinella" per un possibile infarto miocardico. [1]

1.1.2 INFARTO MIOCARDICO

L'infarto miocardico implica la morte di una porzione del muscolo cardiaco, il miocardio, causata da un mancato apporto di sangue in una sua determinata porzione per un certo periodo di tempo, che prende il nome di ischemia prolungata. La principale causa della maggior parte degli infarti è la formazione, lungo le pareti del vaso di interesse, di un coagulo di sangue costituito da una massa solida formata da fibrina, piastrine, globuli rossi e globuli bianchi e che prende il nome di trombo. Tale massa va ad ostruire una o più arterie coronarie responsabili dell'irrorazione del muscolo

cardiaco, comportando quindi l'interruzione del flusso di sangue e, di conseguenza, l'apporto di ossigeno e sostanze nutritive da esso veicolati. La mancata rimozione del coagulo determina quindi la morte della porzione di miocardio irrorata dall'arteria e quindi il verificarsi dell'infarto. Un ulteriore evento che può verificarsi all'interno di un'arteria coronaria è la trombosi, ovvero l'improvvisa rottura di una placca aterosclerotica, che rappresenta un'alterazione della parete arteriosa dovuta ad un accumulo di grassi, proteine e tessuto fibroso, che si sviluppa lentamente all'interno di una coronaria. Ulteriori cause che possono condurre, più raramente, al verificarsi di un infarto sono: una dissezione o un'embolia coronarica, oppure uno spasmo delle coronarie anche sane, condizioni di grave anemia, insufficienza respiratoria, grave abbassamento della pressione, aritmie importanti. I più colpiti da tale patologia sono gli uomini con una maggior frequenza rispetto alle donne nelle età più giovani; queste ultime sono tuttavia colpite con maggiore frequenza in età avanzata, con l'avvento della menopausa e quindi un'alterazione della produzione ormonale che era stata fino a quel momento motivo di minor rischio, e la malattia si manifesta in modo più severo. Le complicanze maggiori che possono verificarsi durante la fase acuta dell'infarto, sono lo scompenso cardiaco, quindi il deficit della funzione di pompa del cuore e l'insorgenza di pericolose aritmie quali la tachicardia ventricolare e la fibrillazione ventricolare che possono causare arresto cardiaco: motivo per cui il paziente viene sottoposto a monitoraggio continuo dell'elettrocardiogramma. [1]

1.1.3 TERAPIA PER INFARTO MIOCARDICO

L'angioplastica coronarica rappresenta il trattamento principale per l'infarto del miocardio: essa consiste nel dilatare l'arteria coronaria occlusa dal trombo, attraverso un opportuno "palloncino" e nel posizionare nella coronaria riaperta uno o più *stent*. Lo *stent* è una retina metallica, che serve a "puntellare" la parete dell'arteria, tale retina può essere medicata con alcuni farmaci, (*stent medicato*), che tendono ad ostacolare l'iperproliferazione dell'endotelio vascolare e di evitare quindi che si formi, nel punto in cui l'arteria è stata dilatata, una sorta di cicatrice che potrebbe comportare nuovamente l'ostruzione del vaso. Nel caso in cui non sia possibile praticare la procedura dell'angioplastica, un'alternativa può essere trattare il paziente con una specifica terapia farmacologica. Tale terapia prende il nome di terapia trombolitica perché la funzione dei farmaci, somministrati per via endovenosa, è quella di sciogliere il trombo. In alcuni casi specifici, nei pazienti in cui la malattia è molto estesa e coinvolge più rami coronarici, o l'anatomia è poco favorevole al trattamento percutaneo, l'infarto miocardico può richiedere un intervento chirurgico di bypass aorto-coronarico: un condotto creato con il prelievo della vena safena o l'utilizzo dell'arteria mammaria del paziente. In ogni caso, ai pazienti vittime di infarto, vengono somministrate terapie

farmacologiche che hanno lo scopo di minimizzare le complicanze ed evitare la comparsa di un nuovo infarto. I farmaci utilizzati per tali scopi sono classificati come:

- Farmaci antiaggreganti piastrinici: sono molto importanti nella prevenzione di un nuovo infarto perché inibiscono la formazione del cosiddetto “tappo piastrinico” formato appunto dall’accumularsi delle piastrine, che ricoprono un ruolo fondamentale nella formazione del trombo.
- Farmaci che riducono la colesterolemia: il ruolo principale è quello di riportare alla norma i valori di colesterolo e nello stabilizzare la placca aterosclerotica, riducendo in questo modo il rischio di una sua rottura e del verificarsi della successiva trombosi.
- Beta-bloccanti: hanno la funzione di abbassare la frequenza cardiaca e la forza di contrazione del cuore, così da ridurre il lavoro globale dello stesso.
- ACE inibitori e sartani: tali farmaci hanno il doppio ruolo di agire sia sull’abbassamento della pressione che di proteggere dallo “sfiancamento” del cuore, condizione che si può verificare soprattutto nel caso di infarto di grandi dimensioni.

E’ ovviamente indispensabile la prevenzione, effettuando un trattamento dei fattori di rischio quali ad esempio ipertensione arteriosa e diabete mellito e adottando uno stile di vita sano.

1.2 MALATTIE CELEBROVASCOLARI: ICTUS ISCHEMICO E ICTUS EMORRAGICO

Con il termine ictus si indica l’evento che consiste nell’interruzione dell’apporto di sangue ossigenato, oppure nella fuori uscita di sangue in un’area dell’encefalo che determina la morte delle cellule nervose di quell’area. Questo comporta la perdita delle funzioni neurologiche controllate da quella specifica regione, che possono riguardare il movimento di un arto piuttosto che il linguaggio, la vista, l’udito, l’equilibrio. E’ una patologia che insorge in maniera improvvisa: anche una persona che si trova in uno stato di pieno benessere può accusare sintomi tipici che possono essere transitori, restare costanti o peggiorare nel corso del tempo. La definizione di ictus comprende:

- Ictus ischemico: rappresenta l’80% degli ictus che si registrano e si verifica quando ad essere colpita è un’arteria che irrorava l’encefalo. Essa viene ostruita dalla formazione di una placca aterosclerotica e/o da un coagulo di sangue che ha origine sopra la placca stessa, trattasi in questo caso di ictus trombotico. oppure da un coagulo di sangue che proviene dal cuore o da un altro distretto vascolare, trattasi in questo caso invece di ictus tromboembolico.
- Ictus emorragico: la prima forma costituisce circa il 15-20% della totalità degli ictus registrati e ha origine quando un’arteria situata nell’encefalo arriva a rottura, provocando

un'emorragia intracerebrale non traumatica; la seconda forma invece rappresenta circa il 3-5% della totalità degli ictus e ha origine nello spazio sub-aracnoideo, dove con il termine aracnoide si indica la membrana protettiva del cervello; la causa di questa forma gravissima di ictus, viene quasi sempre ricondotta all'ipertensione [2]

In Italia l'ictus rappresenta la seconda causa di morte, dopo le malattie ischemiche del cuore; è infatti responsabile del 9-10% di tutti i decessi e costituisce la prima causa di invalidità. Sono circa 90.000 ricoveri dovuti all'ictus cerebrale, che ogni anno si registrano nel nostro Paese: di questi il 20% sono recidive. Circa il 20-30% delle persone colpite da ictus cerebrale muore entro un mese dal verificarsi dell'evento, mentre il 40-50% entro il primo anno. Riesce a guarire completamente soltanto il 25% dei pazienti sopravvissuti ad un ictus, il restante 75% infatti sopravvive convivendo con una qualche forma di disabilità, che nella quasi metà dei casi rappresenta un deficit così grave da portare alla perdita dell'autosufficienza della persona.

L'ictus colpisce frequentemente i pazienti dopo i 55 anni, e la sua prevalenza raddoppia successivamente ad ogni decade; sono le persone con più di 65 anni ad essere soggette al 75% degli ictus e la prevalenza di tale patologia nelle persone di età 65-84 anni è del 6,5% (negli uomini 7,4%, nelle donne 5,9%). Si stima che in futuro andrà incontro ad un ictus circa un terzo delle persone che presenta un attacco ischemico transitorio (TIA). Quest'ultimo si differenzia dall'ictus ischemico per la minore durata dei sintomi: è inferiore alle 24 ore, anche se nella maggior parte dei casi il TIA dura dai 5 ai 30 minuti. In Italia il numero dei ricoveri per TIA attualmente supera i 30.000 l'anno, tuttavia nel corso degli ultimi anni si è osservata una riduzione dell'incidenza e della mortalità degli eventi cerebrovascolari, con una diminuzione del numero dei ricoveri da ictus e TIA, che può essere attribuita miglioramento dell'efficacia delle misure preventive, terapeutiche e assistenziali di tali patologie e dei correlati fattori di rischio [2].

1.3 MALATTIE VALVOLARI

Il cuore è un organo organizzato in quattro camere: due superiori, gli atri, e due inferiori, i ventricoli ed è dotato di 4 valvole cardiache, le quali svolgono la funzione di regolare il flusso in entrata e in uscita fra i vari compartimenti in cui è suddiviso l'organo. Due delle quattro valvole, quella mitrale e quella tricuspide, separano rispettivamente l'atrio sinistro dal ventricolo sinistro e l'atrio destro dal ventricolo destro. Le restanti due valvole, la valvola aortica e quella polmonare, regolano invece rispettivamente il flusso di sangue tra ventricolo sinistro ed arteria aorta e tra ventricolo destro e arteria polmonare. Durante la fase di rilassamento dei ventricoli, le valvole si aprono per permettere il passaggio del sangue dagli atri ai ventricoli stessi. Durante la fase di contrazione di questi ultimi

invece l'apertura delle valvole avviene per consentire il flusso di sangue dai ventricoli al circolo sistemico o al circolo polmonare. Una delle principali funzioni delle valvole è quella di permettere al sangue di fluire in una sola direzione e impedire quindi il reflusso: per garantire ciò, si chiudono non appena è avvenuto il passaggio di sangue nella corretta direzione. Come tutte le strutture del nostro organismo quando compiono correttamente la loro funzione, ciò si riflette in una situazione fisiologica; nel momento in cui invece non riescono a svolgere il proprio ruolo, si entra nella condizione patologica che varia a seconda del tipo di mal funzionamento che le colpisce. Con l'avanzare dell'età, infatti il tessuto valvolare può deteriorarsi e calcificare: questo comporta un'apertura non più ottimale della valvola e quindi un restringimento progressivo dell'orifizio messo a disposizione per il passaggio del flusso di sangue; si tratta in questo caso di stenosi valvolare. A seconda di quale sia la valvola colpita si tratta di stenosi mitralica o tricuspide, oppure stenosi aortica o polmonare. Vi è una relazione tra area dell'orifizio, velocità e tipologia di flusso assunti dal sangue a seguito delle condizioni della regione di passaggio e quindi portata finale del sangue che riesce a fluire. Un'altra condizione patologica può essere identificata nella mancata chiusura completa delle valvole, a seguito di un loro sfiancamento o perdita di tono: la conseguenza è che l'orifizio che consente il flusso di sangue non sia mai completamente chiuso e che quindi non venga garantito il blocco del flusso, ma vi sia una quantità di sangue residua che riesce a fluire in direzione contraria a quella indicata. Si tratta in questo caso di insufficienza valvolare e si ha un'insufficienza aortica o polmonare, oppure insufficienza mitralica o tricuspide, a seconda della valvola interessata. Tali patologie possono essere congenite oppure svilupparsi nel corso della vita a seguito di altre malattie. La comparsa di un infarto, l'ipertensione arteriosa o lo scompenso cardiaco possono infatti danneggiare il cuore e comportare una sua progressiva dilatazione che, a sua volta, implica una dilatazione e distorsione delle valvole stesse che, non riuscendo a garantire una chiusura completa lasciano fluire all'indietro una quantità di sangue, si tratta appunto di insufficienza valvolare. Anche la comparsa di batteri in circolo, che può avvenire attraverso una puntura endovenosa, le infezioni della cute o delle mucose, possono causare un'infezione delle valvole cardiache, che prende il nome di endocardite infettiva. Questa riguarda più frequentemente valvole già danneggiate, ad esempio a causa di una valvulopatia congenita o acquisita, e può provocare gravi danni se non viene riconosciuta tempestivamente. Il trattamento prevede, in questi casi, l'utilizzo di antibiotici ed il ricorso alla chirurgia nei casi più gravi. Le malattie autoimmuni, come ad esempio il lupus, l'uso di alcuni farmaci tra cui i farmaci anoressizzanti, le malattie metaboliche e la radioterapia, possono rappresentare altre cause di danneggiamento delle valvole [3].

Malattie delle valvole cardiache: stenosi e insufficienza o rigurgito aortico

- Stenosi (principalmente aortica): si tratta dell'incapacità della valvola di aprirsi completamente, ostruendo quindi il flusso di sangue che dovrebbe uscire dal ventricolo. Se consideriamo la stenosi aortica, che è la più frequente, si tratta di vincolo sinistro. I lembi valvolari che dovrebbero aprirsi per differenza di pressione, si irrigidiscono, non sono più in grado di aprirsi completamente. Diminuisce quindi l'area, cioè il pertugio attraverso cui il sangue può fluire e aumenta la resistenza: il cuore per compensare l'ostruzione lavora di più, aumentando il *pre-load*, cerca di non diminuire la portata.

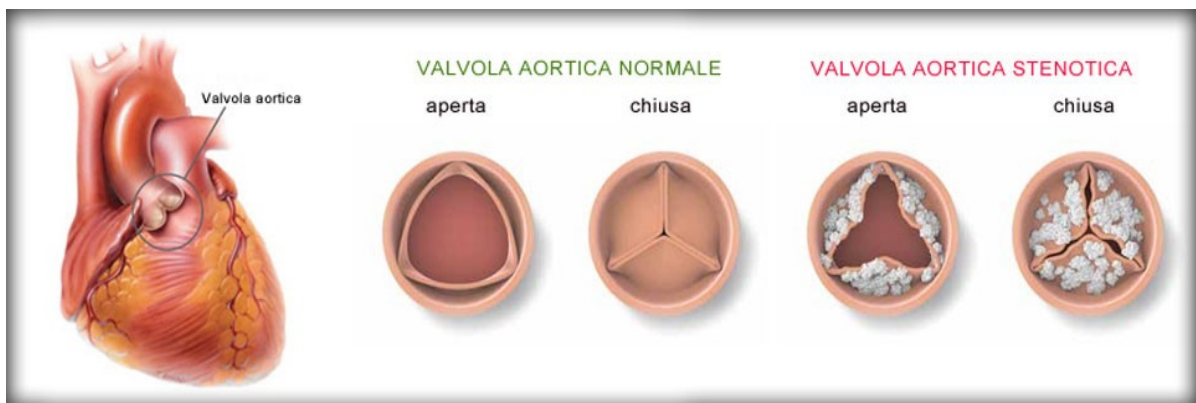


Figura 1: stenosi valvolare

- Insufficienza o rigurgito aortico: vi è l'incapacità di chiudersi delle valvole, quindi ha origine un flusso retrogrado del sangue che torna indietro perché la valvola non si chiude ermeticamente. La valvola quindi non svolge la sua funzione perché il sangue scorre all'indietro.

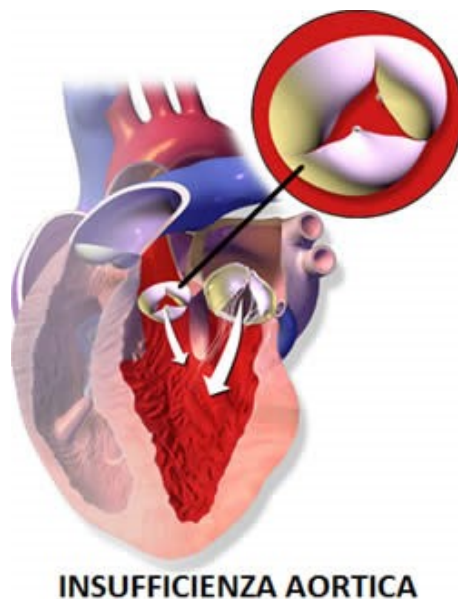


Figura 2: esempio di insufficienza valvolare: insufficienza aortica

Qualunque sia la causa della malattia valvolare, che sia l'incompleta apertura o chiusura, può portare ad una disfunzione del muscolo cardiaco e una potenziale insufficienza cardiaca. L'effetto di questa malattia è quello di appesantire il cuore, che aumenta il ritmo di lavoro per mantenere lo *stroke volume*, questo può portare all'ipertrofia del ventricolo sinistro.

La malattia meno severa in certi casi può essere trattata con una terapia farmacologica: attraverso il trattamento con i farmaci quali diuretici, ACE-inibitori, antiaritmici, vasodilatatori, antiaggreganti e anticoagulanti, è infatti possibile intervenire sui sintomi causati dalle malattie delle valvole cardiache ed è possibile prevenire, ove necessario, la malattia trombo-embolica. Tuttavia nei pazienti in cui il difetto valvolare si presenta in modo più importante, può essere necessario il ricorso alla terapia chirurgica: essa consiste nel riparare o nel sostituire le valvole mal funzionanti con valvole "meccaniche" o "biologiche". Tale situazione interessa maggiormente la valvola aortica che è anche la valvola più soggetta ad ammalarsi dal momento che lo spessore della parte sinistra del cuore è mediamente più alto perché deve sostenere la maggior parte della pressione del sangue, dato che è la valvola destinata a distribuire il sangue a tutti gli altri vasi. I primi interventi di *replacement*, di sostituzione delle valvole cardiache sono riconducibili agli anni 60 e tali interventi sono stati permessi grazie all'invenzione della circolazione extracorporea. Al mondo, ad oggi, sono stati eseguiti 300 000 interventi di sostituzione valvolare ogni anno: questo ha comportato un eccellente miglioramento della qualità della vita di migliaia di persone. La sostituzione delle valvole cardiache offre un eccellente miglioramento della qualità della vita per migliaia di pazienti e può essere considerata una delle maggiori realizzazioni dell'ingegneria biomedica. Generalmente, quando possibile si preferisce riparare la valvola cardiaca per preservare i tessuti biologici del paziente. Tale procedura prende il nome di valvulo-plastica: un piccolo catetere contenente un palloncino espandibile, viene inserito nel cuore e all'interno della valvola serrata, poi il palloncino viene gonfiato e fatto espandere al fine di separare i lembi e forzare meccanicamente la valvola ad aprirsi. Al contrario, in un paziente con una controindicazione all'intervento chirurgico tradizionale, ma con una patologia di insufficienza valvolare e quindi una valvola mitrale eccessivamente dilatata, si può intervenire andando ad applicare, per via endovascolare, un dispositivo che prende il nome di MitraClip e ha la funzione di restringerne l'orifizio. Viene tentata la riparazione "*repair*" per poter posticipare l'intervento di sostituzione valvolare "*replacement*", tuttavia quando il tessuto è troppo danneggiato diventa necessario introdurre una valvola sostitutiva. In tale ambito chirurgico, negli ultimi anni, sono stati effettuati incredibili passi avanti: è infatti diventato possibile intervenire su una valvola aortica stenotica, anche per via endovascolare, attraverso un intervento che prende il nome di *Transcatheter Aortic Valve Implantation* (TAVI). Tale procedura prevede che la valvola malfunzionante venga dapprima dilatata e poi su di essa venga applicata una protesi

valvolare: diventa applicabile soprattutto per quei pazienti anziani o per tutti coloro che non sono in grado di sostenere un intervento chirurgico a cuore aperto [3].

Protesi valvolari cardiache

Esistono due tipologie di valvole cardiache artificiali: le valvole cardiache meccaniche (MHV) e le valvole cardiache di derivazione biologica o bioprotesiche (BHV). Le valvole meccaniche sono dispositivi realizzati interamente con biomateriali sintetici, tra cui il titanio, il cobalto, il teflon, il carbonio pirolitico. Le componenti principali delle valvole meccaniche sono: la cerniera, lo *stent*, l'anello di sutura che permette al chirurgo di cucire la valvola stessa e il foglietto, che prende il nome di *leaflet*. Nel 50% dei pazienti si utilizzano valvole meccaniche, che impongono la terapia anticoagulante a vita con farmaci emorragici, motivo per cui i medici nel caso in cui sia possibile preferiscono l'utilizzo delle valvole bioprotesiche [4].

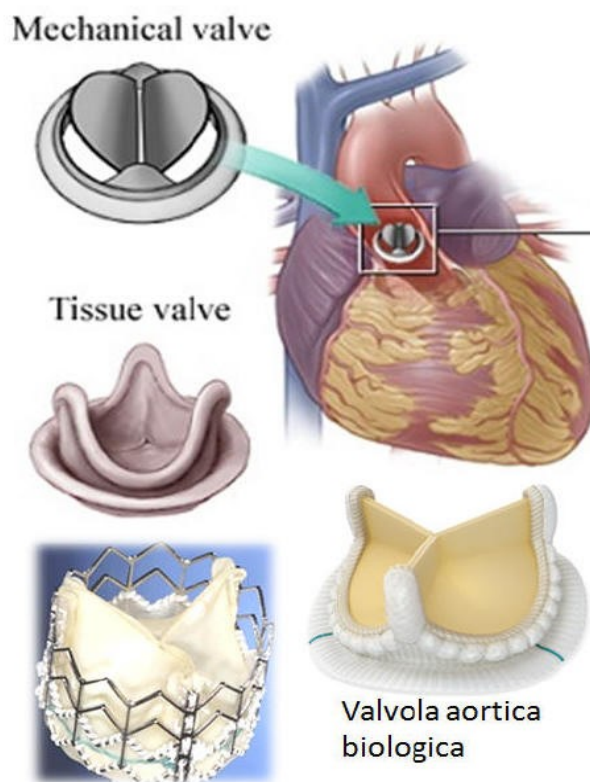


Figura 3: tipologie di protesi valvolari

Valvole cardiache meccaniche

Le valvole cardiache meccaniche (MHV) vengono realizzate con materiali artificiali che presentano requisiti di particolare resistenza e biocompatibilità, ma che richiedono la somministrazione del warfarin, un farmaco impiegato nella terapia anticoagulante a vita.

A seconda della loro struttura, vi sono diversi modelli:

- La valvola a sfera con gabbia: è composta da una sfera che costituisce l'elemento occlusivo che appunto oscillando garantisce l'apertura e la chiusura dell'orifizio; tale sfera è circondata da una gabbia in plexiglas. Sono valvole durature ma la loro ostruzione centrale genera una differenza di carico importante fra le condizioni di apertura e chiusura della valvola che comporta una maggiore caduta di pressione attraverso la valvola in posizione aperta. Si generano quindi maggiori sollecitazioni meccaniche alla valvola stessa, che comportano un'emodinamica diversa e quindi elevati stress meccanici; inoltre il loro profilo abbastanza ampio aumenta la possibilità di interferenza con strutture anatomiche dopo l'impianto.
- Valvola a disco con gabbia: vi è una gabbia metallica che contiene un otturatore polimerico che oscilla a causa della differenza di pressione.
- Valvola a disco inclinabile: rappresenta un importante passo avanti perché le valvole a sfera con gabbia sono più lente nella risposta dinamica al flusso pulsante rispetto all'emodinamica naturale dell'organismo e hanno caratteristiche emodinamiche deboli. La risposta dinamica di apertura e chiusura della valvola cardiaca deve essere compatibile con il battito cardiaco medio: l'elemento occlusore quindi non deve avere un'inerzia troppo elevata tale da non riuscire a seguire il battito cardiaco. Il disco, in tale contesto, ha un profilo inferiore rispetto alla sfera e ruota, non oscilla: ruotando apre e chiude l'orifizio assumendo un profilo alare che prevede lo scorrimento del sangue sopra e sotto ad esso, riducendo in questo modo le anomalie del flusso sanguigno e comportando una minore ostruzione di volume di sangue. Tuttavia presentano ancora problematiche legate al fatto che non vi sia una tenuta perfetta fra l'anello valvolare e il tessuto miocardico e questo fa sì che il sangue riesca a passare anche nelle zone periferiche della valvola e si generi anche un retroflusso. Schemi di flusso attorno ad una valvola a disco inclinabile generati da metodi computazionali evidenziano l'inversione del vettore velocità nella regione posteriore del disco e le velocità più elevate nella zona periferica. I successivi *follow-up* hanno comunque evidenziato che la formazione di trombi su queste valvole che possono comportare la perdita di alcuni parti e dare origine ad emboli: è quindi comunque necessaria la terapia anticoagulante a vita [4].

Valvole cardiache bioprotesiche

Le valvole bioprotesiche vengono realizzate con materiali prelevati da tessuti naturali di origine bovina o suina e non comportano l'impiego di una terapia anticoagulante; di contro hanno una durata inferiore a quelle meccaniche, di circa 10-15 anni, motivo per cui vengono utilizzate nei pazienti più anziani, che hanno una speranza di vita inferiore e quindi una minore probabilità di

esecuzione di un secondo intervento al fine della loro sostituzione. Spesso non si preleva la valvola intera ma il tessuto di pericardio che assomiglia al tessuto valvolare. Entrambe le tipologie di protesi valvolari sono organismi non viventi, rimangono quindi avitali, questo comporta che non si integrino con l'organismo del ricevente. Il salto della chirurgia sarebbe quello di creare una valvola che sia in grado di integrarsi con l'organismo ricevente: tale dispositivo potrebbe essere fondamentale nel caso di pazienti pediatrici, in questi casi infatti la valvola dovrà svolgere la propria funzione anche quando il cuore cresce, si vorrebbe ottenere una valvola che sia in grado di integrarsi alla perfezione e che non sia distinguibile dal resto [4].

1.4 PERICARDIO

Il pericardio è un organo membranoso costituito da epitelio sostenuto da tessuto connettivo lasso. Presenta una forma a sacco che gli consente di rivestire il cuore e l'origine dei grandi vasi e quindi di svolgere una funzione protettiva e di limitare le deformazioni dei grandi vasi che hanno origine durante la contrazione del muscolo cardiaco. Le aperture che caratterizzano la struttura del pericardio sono 8:

- 4 per le vene polmonari: due a destra e due a sinistra
- 2 per le vene cave: una superiore e una inferiore
- 1 per l'aorta
- 1 per l'arteria polmonare comune.

La sua struttura è organizzata in due porzioni tra loro intimamente connesse: la porzione esterna fibrosa, che lateralmente è in contatto con le due pleure e in basso è aderente al diaframma; l'altra porzione è invece quella interna, che prende il nome di pericardio sieroso. In quest'ultimo si possono distinguere due sottili foglietti: uno parietale, che riveste la superficie interna del pericardio fibroso, e uno viscerale, o epicardio, che costituisce la continuazione del precedente e riveste la superficie esterna del cuore. Tra i due foglietti è compreso uno spazio che contiene pochi centimetri cubi di liquor pericardico, un liquido sieroso citrino che percorre continuamente l'epitelio, così da mantenere umide le superfici esposte. Esso in primo luogo svolge il ruolo di prevenire una sovra espansione del cuore durante la fase di diastole e, in secondo luogo, attraverso una serie di sistemi, impedisce che venga raggiunto un eccessivo livello di attrito tra il cuore e le strutture che entrano in contatto con esso.[5]

Pericardio fibroso

Il pericardio fibroso entra in contatto diretto con le pleure parietali e viscerali, ed in particolare, con le strutture peduncolari dei polmoni: bronchi principali, arterie e vene polmonari. L'organo timico e il tessuto connettivo che riempie il mediastino anteriore lo separano dallo sterno. Inferiormente si

continua con il centro frenico diaframmatico che costituisce un elemento di fissità indiretto per il cuore e lateralmente invece si rapporta con le facce mediastiniche delle pleure polmonari. Essendo composto da tessuto connettivo piuttosto rigido, svolge principalmente la funzione di impedire le sotto espansioni e le sovra espansioni.

Pericardio sieroso

Il pericardio sieroso, invece, si sviluppa internamente a quello fibroso ed entra in contatto più diretto con le strutture viscerali. I due foglietti, viscerale e parietale, si riflettono a livello della base del cuore e in tali punti di riflessione danno origine a due importanti seni:

- Seno trasverso del pericardio o Seno di Theile: punto di riflessione posteriormente all'aorta, arteria polmonare e anteriormente alla vena cava superiore.
- Seno obliquo del pericardio o Seno di Haller: punto di riflessione tra le vene polmonari destra e sinistra.

Il pericardio inoltre è fissato alle strutture anatomiche circostanti mediante tre legamenti:

- Legamenti vertebropericardici: costituiti dalla continuità tra la tonaca avventizia dei vasi cervicali, con i quali troviamo il rapporto con il pericardio viscerale, e la fascia paravertebrale tra T4 e T5.
- Legamenti frenopericardici: sono suddivisi in anteriore e laterali. Costituiti dall'inserzione del pericardio a livello del centro frenico.
- Legamenti sternopericardici: sono suddivisi in superiore se il legamento si inserisce a livello della faccia dorsale del manubrio sternale, o inferiore se il legamento si inserisce a livello del processo xifoideo sternale.

Vascolarizzazione arteriosa

La maggior parte dei tessuti del pericardio è irrorata dalle arterie pericardiofreniche, che derivano dalle arterie toraciche interne. La parte restante è invece irrorata da piccoli rami coronarici, rami bronchiali, muscolofrenici ed esofagei. I rami coronarici irrorano invece la componente dell'epicardio, quindi in particolar modo, il foglietto viscerale.

Vascolarizzazione venosa

La maggior parte dei tessuti del pericardio è drenata dalle vene pericardiofreniche, che a loro volta confluiscono a livello delle vene brachiocefaliche o a livello delle vene toraciche interne. La restante parte è drenata da vasi minori.

Il pericardio risulta quindi essere composto da zone differenti, per ciascuna delle quali la matrice stessa risulta essere strutturata in modo diverso, questo si rifletterà in una diversa orientazione delle fibre di collagene a seconda delle regioni considerate: il pericardio esibisce quindi proprietà

meccaniche diverse a seconda della direzione secondo la quale esse vengono misurate, viene quindi classificato come un materiale non isotropo [5].

La matrice risulta essere organizzata in modo diverso nelle diverse regioni componendo il pericardio, quindi il materiale è sicuramente non isotropo cioè presenta proprietà meccaniche diverse a seconda della direzione secondo la quale le misuriamo questo è dovuto al fatto che le fibre di collagene sono orientate in modo diverso nelle regioni del pericardio. Generalmente, la non isotropia è un fenomeno caratteristico ai tessuti biologici.

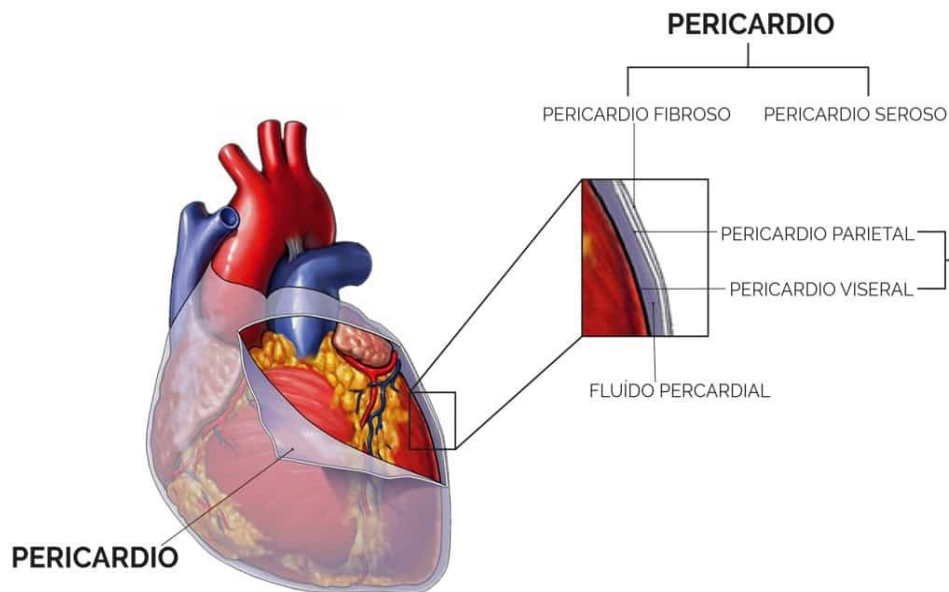


Figura 4: distinzione fra pericardio fibroso e sieroso e fra il foglietto parietale e il foglietto viscerale

1.5 COLTURE CELLULARI

I modelli in vitro

Le colture cellulari in vitro sono costituite da cellule che vengono isolate dal loro ambiente naturale e successivamente coltivate all'interno di un sistema definito; rappresentano lo strumento fondamentale per studi biochimici, microbiologici, farmacologici in quanto il loro maggiore vantaggio è quello di consentire lo studio della funzione cellulare in maniera indipendente dal contesto ambientale. Sono quindi utili per la produzione di fattori di crescita, anticorpi monoclonali, vaccini e proteine ricombinanti in generale. Nel 1951 venne messa in coltura la prima linea cellulare stabilizzata di origine tumorale: la linea HeLa (dal nome della prima paziente). La capsula petri è un recipiente utilizzato per confinare le cellule, una volta che sono state isolate: costituisce lo strumento in grado di mantenere al suo interno un ambiente ben definito e che simula le condizioni presenti all'interno dell'organismo, al fine di garantire la crescita delle cellule. [6]

Vantaggi nell'utilizzo delle colture cellulari:

- Larga disponibilità delle differenti tipologie cellulari
- Disponibilità commerciale di terreni di coltura e dei fattori di crescita
- Documentazione sulle modalità di isolamento e conservazione cellulare
- Possibilità di controllo delle variabili ambientali quali ad esempio temperatura e pH
- Semplicità nella possibilità di replicare gli esperimenti
- Possibilità di dimensionare gli esperimenti con finalità biotecnologiche
- Riduzione della sperimentazione *in vivo*, in particolare del numero degli animali impiegati nella ricerca attraverso l'applicazione del principio delle 3R: *Replacement, Reduction, Refinement*
- plasticità dei modelli
- Caratterizzazione ed omogeneità

Svantaggi nell'utilizzo delle colture cellulari:

- Sistemi semplificati rispetto ad un organismo integrato
- Perdita di funzioni organo-specifiche e di alcune attività enzimatiche
- Accelerazione del ciclo cellulare
- Alterazioni morfologiche e delle proprietà antigeniche
- Metodi molto specializzati e laboriosi
- Costo dei materiali richiesti per la coltura (ad esempio siero, fattori di crescita)
- Difficoltà di correlare le concentrazioni *in vitro* con quelle *in vivo*

Tipi di Colture cellulari

Colture a termine o colture primarie

La coltura da espianti viene definita “coltura a termine” per indicare che le cellule isolate dallo specifico tessuto sono in grado di compiere un numero finito di divisioni cellulari *in vitro* per poi andare incontro a degenerazione e successivamente alla morte

Tipologie di Colture cellulari: aderenti, semi-aderenti e in sospensione

Generalmente le cellule, una volta seminate, tendono ad aderire alla superficie dello strumento utilizzato per la coltura, moltiplicandosi e dando origine ad un monostrato poiché risentono dell'inibizione da contatto, quindi una volta coperta l'intera superficie, la loro proliferazione viene inibita. Tra le cellule aderenti rientrano le cellule poligonali e cellule epiteliali, e le cellule fusiformi, quali fibroblasti. Il fenomeno dell'adesione è un processo attivo che richiede l'interazione

dei recettori di membrana, le integrine, con le proteine adesive, quali la fibronectina, che vengono adsorbite sulla piastra di coltura. Le cellule in sospensione, invece, normalmente non necessitano di aderire ad una superficie per proliferare ma crescono in sospensione: tra le cellule che assumono questa tipologia di comportamento rientrano ad esempio le cellule del sangue.

Colture cellulari:

- Batteri (procarioti)
- Leviti (eucarioti inferiori)
- Colture primarie di cellule animali o di uomo
- Linee cellulari di animali o di uomo

Colture di cellule aderenti

Le cellule aderenti vengono poste in una piastra o in fiasca e proliferano fino ad occupare l'intera area disponibile. Distinguiamo piastre e fiasche più piccole che offrono un'area superficiale di circa 25 cm² e piastre o fiasche di dimensioni maggiori di circa 75 cm². Le piastre per colture cellulari aderenti sono in polistirene ma vengono sottoposte a trattamenti per renderle idrofile e quindi cariche negativamente. In questo modo il polistirene lega stabilmente la fibronectina e vitronectina presenti nel siero che permettono l'adesione di diversi tipi di cellule, la loro crescita e successivamente si arriva quindi ad una coltura confluenta: a confluenza la crescita si arresta e le cellule devono essere trasferite in nuove piastre, come mostrato in figura 5.

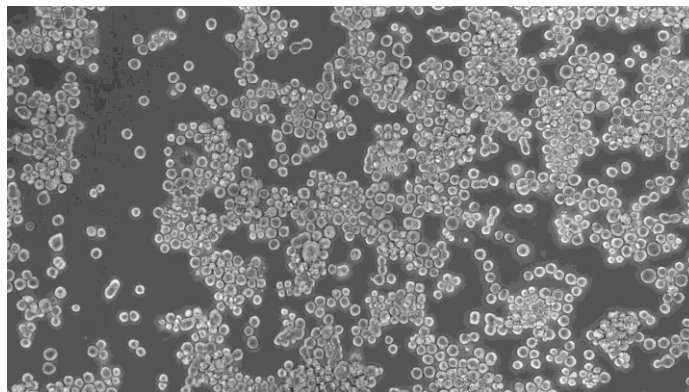


Figura 5: coltura cellulare quasi giunta a confluenza completa

Tra i fabbisogni nutrizionali e/o ambientali di una coltura cellulare rientrano:

- Terreni
- Reagenti
- Siero
- Ph
- Temperatura

- Umidità relativa
- O₂ e %CO₂

Le diverse tipologie di terreni di coltura utilizzati differiscono tra loro per il contenuto in acqua e sali e per la concentrazione di glucosio. La composizione del terreno al momento dell'uso viene completata con amminoacidi, vitamine, sali, e ulteriori componenti tra cui glucosio, rosso fenolo, penicillina, streptomina, siero, sodio piruvato.

Siero

Il siero è una formulazione aspecifica di fattori di crescita, offre sostegno alla crescita per molti tipi cellulari, aumenta la capacità tampone, protegge dai danni meccanici, facilita l'adesione delle cellule. Si distinguono siero bovino e siero di cavallo. Prima del suo utilizzo, il siero viene disattivato in stufa a 56°C per 30' al fine di eliminare il sistema del complemento, che potrebbe interferire con la crescita delle cellule.

Terreno

I terreni sono provvisti dell'indicatore rosso fenolo: con il proliferare delle cellule il terreno tenderà al giallo a causa dell'acidificazione prodotta dalla CO₂ derivante dal metabolismo cellulare. Il colore viola che corrisponde ad un pH maggiore di 7.6 indica che le cellule non sono metabolicamente attive o che la regolazione della CO₂ è errata.

Crescita e temperatura

Le cellule possono sopportare l'ipotermia, anche perché vengono conservate congelate, ma la loro attività metabolica viene notevolmente disturbata. Non possono sopportare l'ipertermia, anche piccoli aumenti di temperatura per brevi periodi possono farle morire. Una temperatura di 43°C per pochi minuti provoca la morte per apoptosi.

Crescita e umidità relativa

L'umidità relativa RH è un parametro che è portato ad un livello elevato (RH >98%) senza necessariamente venire controllato. L'energia fornita dall'incubatore serve sia a mantenere la temperatura che a far evaporare l'acqua dall'apposito vassoio per portare il livello di umidità relativa alla giusta percentuale.

L'obiettivo è di limitare l'evaporazione dell'acqua contenuta nei terreni di coltura al fine di non causare un aumento della pressione osmotica.

Prevenzione della contaminazione

Sono possibili differenti tipi di contaminazione: i principali tipi di contaminanti microbici sono batteri e funghi, microplasma e virus.

La contaminazione può avvenire a causa di un errore da parte dell'operatore, per l'utilizzo di terreni contaminati, a causa di un mal funzionamento della cappa a flusso laminare, a causa dell'utilizzo di un incubatore contaminato o di conservazione delle cellule in azoto liquido contaminato. [5] Tra le precauzioni per la prevenzione delle contaminazioni si riconoscono:

- I terreni e le soluzioni che si usano devono essere tutti sterili
- Aggiungere penicillina-streptomicina per scongiurare il pericolo di contaminazioni da batteri; anfotericina B (se non tossica per le cellule) contro i miceti.
- Destinare il laboratorio solo alle colture cellulari
- Operare sempre sotto cappa a flusso laminare
- Utilizzare solo materiale sterile (di vetro o di plastica)
- Utilizzare sempre pipettatori elettrici
- Pulire bene la cappa a inizio e fine lavoro
- Controllare periodicamente i filtri della cappa
- Mantenere con attenzione ben pulito l'incubatore a 37°C

Per staccare le cellule dalla piastra nella quale sono state coltivate al fine del loro utilizzo per gli scopi sperimentali, si utilizza una soluzione composta da EDTA e tripsina:

- EDTA svolge il ruolo di chelare il Ca^{++} ed il Mg^{++} indispensabili per l'adesione
- Tripsina: svolge la funzione di degradare le proteine della matrice che mantengono le cellule aderenti.

Le cellule staccate devono essere riseminate in numero adeguato: non crescono in modo efficiente e vanno incontro a morte se seminate al di sotto di una certa densità. Per il conteggio delle cellule si utilizza la camera di Burker.

Colture continue o linee cellulari

Sono cellule in cui delle mutazioni spontanee o indotte hanno annullato il programma genetico della senescenza: possono quindi essere coltivate *in vitro* per un tempo indefinito.

Evoluzione di una linea cellulare in coltura

All'inizio una cultura primaria, quando viene prelevata dall'organismo di origine, affronta una fase primaria caratterizzata da un tempo di applicazione lento, nel quale le cellule devono adattarsi lentamente al nuovo ambiente in cui si trovano e danno inizio alla fase di duplicazione, crescendo di numero in maniera esponenziale. Durante questa fase, un evento caratteristico è la creazione di subcolture, le quali costituiscono comunque una buona rappresentazione del tessuto originario. Dopo una fase più o meno lunga, che comprende dai 5 ai 10 cicli cellulari, le cellule vanno incontro a senescenza, fase caratterizzata dalla perdita della loro capacità proliferativa e dalla morte cellulare. Nel caso in cui non si desidera che la linea cellulare diventi inutilizzabile, occorre che le cellule di interesse vengano nuovamente prelevate dal tessuto e che il ciclo venga ripetuto. Un'altra alternativa può essere rappresentata dal creare una linea stabilizzata o immortalizzata, che possiede invece la capacità di replicarsi in maniera illimitata. I vantaggi riscontrabili dall'impiego di tale alternativa consistono in una maggiore riproducibilità della sperimentazione dovuta al fatto che la linea cellulare, a differenza delle cub-colture, è sempre la stessa e in un maggiore risparmio in termini economici e di risorse perché non è necessario avere sempre a disposizione il campione di origine della linea cellulare. Durante la crescita, le cellule sono soggette ad una selezione in base al loro grado di proliferazione: aumenta il numero delle cellule proliferanti, resta stazionario il numero di cellule in grado di sopravvivere, ma non di duplicarsi, mentre le altre tipologie cellulari non avranno i requisiti per resistere. Questo comporta che nel tempo ci sia un'evoluzione nelle proporzioni delle diverse tipologie cellulari, fino a raggiungere un equilibrio che si differenzia dalla situazione iniziale di partenza. Quando la proliferazione cellulare ha esaurito il mezzo di coltura, diventa necessario provvedere ad una subcoltura in un nuovo recipiente con terreno fresco. [6]

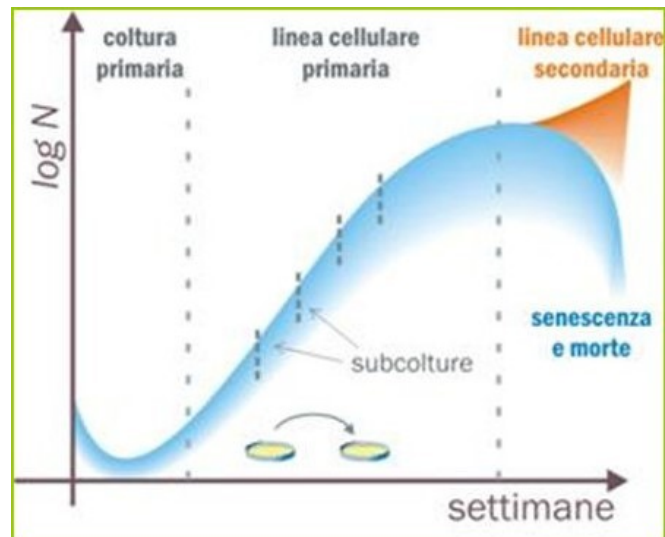


Figura 6: Tra la semina e la ripresa della crescita c'è un intervallo. Il grafico mostra l'evoluzione del logaritmo del numero di cellule N nel tempo. La coltura primaria è caratterizzata da un tempo di rescita relativamente lento, che aumenta in maniera considerevole nei successivi passaggi di coltura. Nella parte finale del grafico le cellule vanno incontro alla fase di senescenza con tempi di duplicazione progressivamente più lunghi, fino a quando non giungono alla morte. Tale esito può essere evitato nel caso in cui non si intervenga con una trasformazione, che dà origine ad una linea cellulare immortalizzata in grado di replicarsi indefinitamente.

Colture primarie

- Prelievo delle cellule da un campione biologico, che può essere un organo, un embrione o uova
- Dissezione meccanica
- Trattamento con un enzima, di solito la tripsina, in grado di eliminare i contatti tra le cellule, al termine del quale si ottengono cellule separate le une dalle altre
- utilizzo di un inibitore per bloccare la digestione enzimatica
- Controllo della vitalità cellulare attraverso l'utilizzo di opportune sostanze, come ad esempio il trypan blue
- Le colture cellulari possono essere seminate in una piastra Petri usando un terreno di coltura, quindi in adesione oppure in sospensione

Crescita di cellule animali in coltura

Un frammento di tessuto viene disperso in una sospensione di singole cellule, le cellule presenti nella sospensione cellulare vengono seminate in una piastra di coltura arricchite da un mezzo liquido che rappresenta il mezzo nutriente. Tale coltura prende il nome di coltura primaria: le cellule aderiscono alla superficie della piastra e crescono fino a ricoprirne la superficie. Una volta

che l'intera superficie è stata occupata, le cellule possono essere rimosse dalla piastra di coltura e seminate a densità minore in una nuova piastra sempre arricchita con il mezzo nutriente per dare origine ad una coltura secondaria. [6]

Condizioni di coltura

Sterilità

L'ingresso indesiderato di microorganismi nel terreno di coltura è dannoso in quanto questi competono con le cellule in coltura (che generalmente hanno un ritmo di crescita inferiore) e possono secernere sostanze tossiche. Tipici sono i batteri, i micoplasmi, lieviti, muffe. In caso di infezione batterica, *il medium* vira in fretta (acidifica, da rosa passa a giallo) e si intorbidisce. Le infezioni da micoplasmi sono più subdole in quanto il microorganismo è meno visibile e richiede un paio di settimane per formare colonie visibili. Questo pericolo determina la prassi di aggiungere antibiotico nel terreno (ad esempio streptomina). Al fine di mantenere la sterilità per la coltura cellulare, un laboratorio di biologia cellulare deve essere esclusivo; occorre lavorare sotto cappe a flusso laminare, alle quali vanno sostituiti periodicamente i filtri. Per la sterilizzazione dei materiali:

- Devono essere sterili o autoclavati a 121 °C
- Filtrare tutte le soluzioni organiche con filtri 0.22 µm

Temperatura e pH

Le cellule di mammifero crescono a 37 °C, sature di umidità (95%), in un mezzo tamponato a pH 7.3. Il sistema di tampone più comunemente utilizzato è il bicarbonato/acido carbonico. Il pH viene monitorato aggiungendo un indicatore nel medium di coltura come il rosso fenolo (normalmente la coltura ha la classica colorazione rosata, gialla a pH acido, rosso-viola a pH basico).

Scambio di gas

5% CO₂ (normossia), deve essere sempre garantito

5% O₂ (ipossia), eventualmente

Tipologia di supporti per le colture: piastre petri, fiasche e piastre multipozzetto

Composizione del mezzo di coltura:

- Base (Dulbecco's Modified Minimal Essential Medium (DMEM))
- Amminoacidi essenziali
- Vitamine del gruppo B

- Sali inorganici (NA⁺, K⁺, Mg⁺⁺, Ca⁺⁺, Cl⁻)
- Glucosio, glutammia
- Antibiotici (opzionale)
- Siero: fetale bovino 5-20% o un sostituto chimicamente definito

Il siero è di origine animale.

L'uso del siero è controverso. Generalmente si preferisce il siero fetale in quanto contiene meno anticorpi.

Vantaggi

- Introduce fattori di crescita ed ormoni
- Veicola lipidi, ferro e molecole organiche
- Favorisce interazione cellula-substrato
- Contiene inibitori della tripsina

Svantaggi

- Possibile tossicità degli anticorpi
- Variabilità da lotto a lotto
- Fattori di crescita che favoriscono i fibroblasti rispetto ad altri tipi cellulari

Terreni con sieri chimicamente definiti

L'uso dei terreni privi di siero animale nasce dal bisogno di avere condizioni controllate, riproducibili e specifiche per il tipo cellulare in esame. Devono comunque contenere, fattori di adesione, ormoni, fattori di crescita, nutrienti e proteine.

Vantaggi

- Maggiore riproducibilità
- Standardizzazione anche fra laboratori diversi
- Può favorire sub-popolazioni specifiche (non sono fibroblasti)

Svantaggi

- Crescita più lenta
- Alcuni additivi sono costosi o labili
- I terreni sono specifici per un tipo cellulare

1.6 IL SANGUE

Il sangue è una miscela complessa di plasma e di cellule che contiene una vasta gamma di proteine, lipidi, ioni, eritrociti, leucociti e piastrine. Le varie componenti del sangue possono essere separate mediante centrifugazione, questo perché le cellule possiedono una densità maggiore delle piastrine che a loro volta hanno una densità maggiore del plasma. La composizione del sangue è quindi caratterizzata da un 40% di eritrociti e globuli rossi, da un 4% di leucociti e piastrine e da un 55% di plasma. Le cellule staminali ematopoietiche hanno la capacità di differenziarsi in tutti i tipi di cellule presenti nel sangue: il processo di emopoiesi è quello attraverso il quale avviene la produzione delle diverse componenti del sangue a livello del midollo nell'osso spugnoso. I globuli bianchi o leucociti si differenziano in leucociti linfatici che si formano nel sistema linfatico e in leucociti non linfatici, i quali invece hanno origine nel midollo osseo, vengono poi rilasciati nel sangue e successivamente sono trasportati nei tessuti. In seguito al passaggio nei tessuti prendono il nome di macrofagi tissutali e svolgono il ruolo di essere in prima linea nella difesa del corpo umano. Essendo dei macrofagi eseguono la fagocitosi: hanno la funzione di ripulire la ferita dai patogeni e dagli agenti estranei così da evitare l'infezione. Mantengono lo stesso comportamento con qualsiasi corpo estraneo, quindi anche un potenziale impianto protesico: tentano la sua distruzione, ma nel momento in cui non riescono a portare a termine tale processo a causa delle dimensioni o del fatto che pur fagocitandolo, non riescono poi a degradarlo, in quanto non hanno enzimi in grado di farlo, non sono dotati di capacità biochimica di degradare il *non-self* sintetico. Non riuscendo quindi nella distruzione del dispositivo, i macrofagi uccidono sé stessi con le sostanze che avevano lo scopo di degradare il dispositivo e si frammentano. Frammentandosi rilasciano sostanze che attraggono i fibroblasti: cellule che hanno la capacità di formare tessuto fibroso, processo al termine del quale si ha la formazione della capsula fibrotica [7].

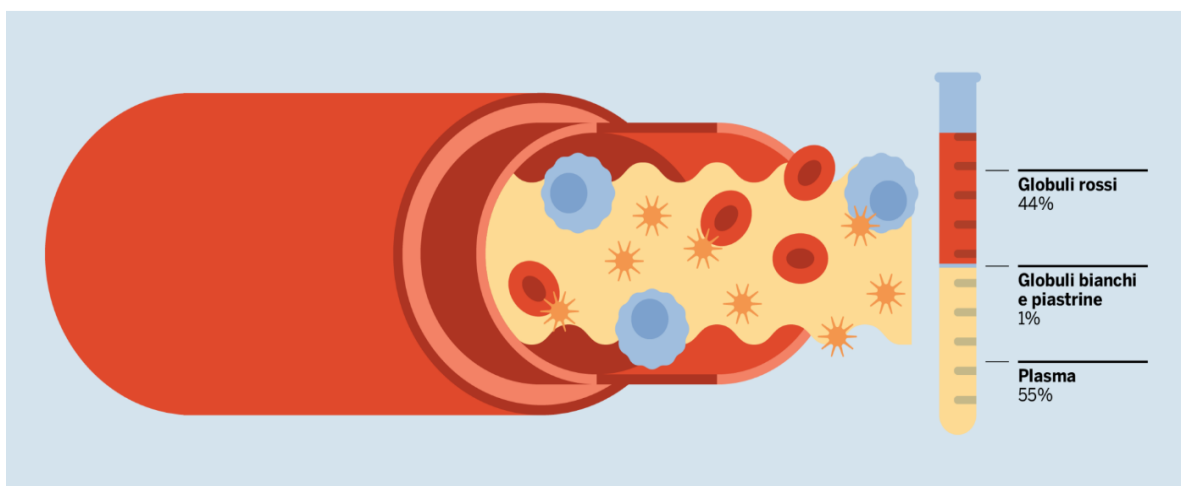


Figura 7: suddivisione delle componenti sanguigne

1.7 ENDOTELIO

Con il termine endotelio si indica la componente epiteliale di rivestimento delle cavità del sistema circolatorio, quindi vasi sanguigni, vasi linfatici e superficie della cavità cardiaca. L'endotelio vascolare quindi costituisce una sorta di organo diffuso presente all'interno dell'organismo, con uno sviluppo di superficie pari in un individuo adulto all'estensione di un campo di calcio, circa. La struttura dell'endotelio vascolare inizialmente è stata considerata come una superficie inerte, dotata della capacità di impedire la coagulazione del sangue, tuttavia tale considerazione dell'endotelio è mutata negli ultimi anni. Si è infatti scoperto che rispondere rapidamente a segnali che regolano il tono vascolare, e va anche incontro a complessi eventi di riprogrammazione genetica, a seguito di segnali pro-anti/infiammatori [8]. L'endotelio svolge quindi un ruolo centrale e attivo nella regolazione dei processi emostatici e trombotici e nella regolazione dell'immunità e dell'infiammazione. Alcuni autori hanno infatti riscontrato che una disfunzione endoteliale può portare infatti allo sviluppo di processi infiammatori patologici e a conseguenti malattie cardiovascolari [9].

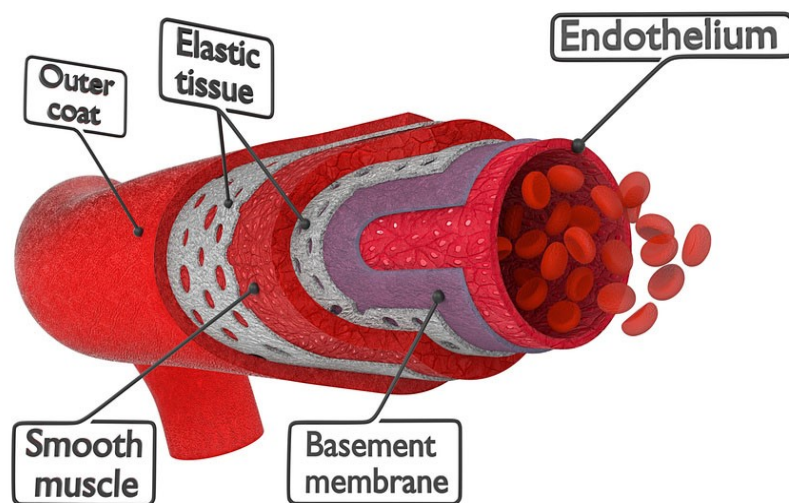


Figura 8: struttura caratteristica di un generico vaso sanguigno

Istologia dell'endotelio

La struttura morfologica dell'endotelio è quella tipica di un epitelio pavimentoso semplice. Uno strato unico di cellule appiattite e allungate secondo l'asse del vaso costituisce il rivestimento e i margini delle cellule endoteliali sono meno spessi della zona centrale, in cui è localizzato il nucleo, e aderiscono gli uni agli altri attraverso giunzioni specifiche. Nelle arterie e nelle vene, l'endotelio rappresenta lo strato di rivestimento più interno, sostenuto da uno strato intermedio di tessuto muscolare liscio, associato a fibre elastiche, e da uno strato esterno di tessuto connettivo. La parete

dei capillari, al contrario, è costituita da un ridotto numero di cellule endoteliali, due o tre cellule all'incirca e, nei capillari di minor calibro, anche una singola cellula può essere sufficiente a delimitarne l'intera circonferenza. La caratteristica funzionale dell'epitelio pavimentoso semplice è quella di favorire gli scambi tramite le membrane cellulari, grazie al fatto di possedere uno spessore estremamente ridotto. Infatti è proprio attraverso la membrana che l'endotelio, sfruttando il fenomeno della diffusione semplice, permette gli scambi gassosi tra alveoli e capillari polmonari e tra i capillari polmonari e le cellule dell'organismo. È sempre grazie alle cellule endoteliali che sfruttando il meccanismo di diffusione, avviene lo scambio di ormoni e altre sostanze tra il torrente circolatorio e i tessuti. Invece il trasferimento di molecole in soluzione all'interno e all'esterno del capillare è consentito dai processi di trasporto citoplasmatico, che viene invece mediato da vescicole e prende il nome di pinocitosi [7].

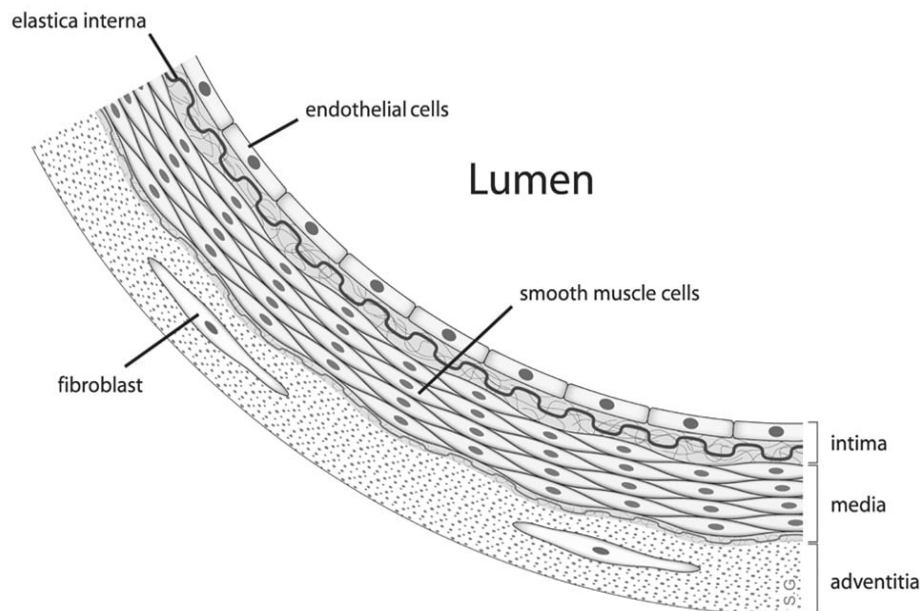


Figura 9: struttura dell'endotelio

Ontogenesi dell'endotelio

L'endotelio non ha origine dai tre foglietti embrionali (ectoderma, entoderma e mesoderma), come gli altri tessuti epiteliali, ma deriva dal mesenchima embrionale, che rappresenta un tessuto morfologicamente simile a quello connettivo, dal quale hanno origine anche le cellule del sistema circolatorio. Nei primi stadi di sviluppo embrionale, le cellule mesenchimali si appiattiscono e si organizzano intorno alle zone in cui il materiale di riserva comincia a fluire verso le varie regioni embrionali. In questo modo si formano dei canali molto sottili e continui che daranno origine ai primi vasi sanguigni. Successivamente per gemmazione dalle pareti dei vasi principali, si originano

i vasi minori: questo fenomeno permane per tutta la vita dell'adulto e ricopre un ruolo fondamentale all'interno dei processi di cicatrizzazione e rigenerazione di tessuti e organi [7].

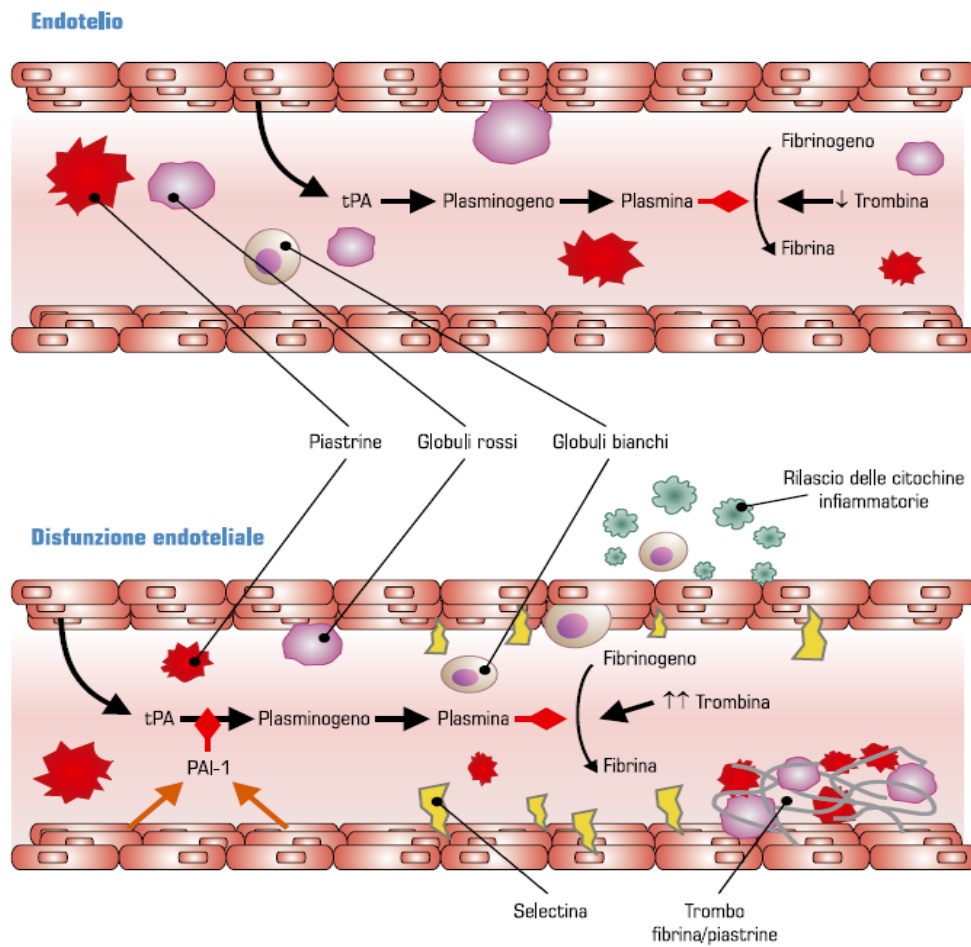


Figura 10: la figura evidenzia schematicamente la risposta endoteliale a stimoli infiammatori e i processi infiammatorio e trombotico che si instaurano nella disfunzione endoteliale.

1.8 LA COAGULAZIONE

La coagulazione del sangue è una parte essenziale del meccanismo di riparazione vascolare, l'integrità tissutale dei vasi sanguigni è infatti fondamentale e va mantenuta. Nel momento in cui si verifica una lesione, quindi una perdita di continuità dei tessuti, nel sito intervengono immediatamente le piastrine formando un tappo piastrinico, generando un *plug* primario di piastrine, che impedisce un'ulteriore perdita di sangue. Tuttavia questo *plug* primario di piastrine non è stabile, ma rappresenta soltanto una soluzione che si produce rapidamente per impedire un'ulteriore fuori uscita di sangue. Ha inoltre il ruolo di attivare un complesso sistema di proteine che prende il nome di cascata coagulativa o sistema di coagulazione che induce invece un coagulo di sangue stabile, che evita il sanguinamento dal sito della lesione. Nella fase successiva si recupera

l'integrità tissutale, si riparano quindi gli strati cellulari danneggiati e si ha la formazione completa del coagulo di sangue che verrà poi rimosso attraverso il processo di fibrinolisi, rottura della fibrilla. All'interno del nostro organismo vi è un delicato bilanciamento del processo di coagulazione che prevede un controllo finemente regolato fra coagulazione e anticoagulazione. Se abbiamo una prevalenza di anticoagulazione andiamo incontro ad una perdita di sangue eccessiva e quindi ad un'emorragia, in questo caso una terapia anticoagulante può essere utile nella modifica dell'emostasi. Al contrario se prevale la coagulazione si va incontro a rischio di trombosi, infarto miocardico e ictus. Il delicato bilanciamento del meccanismo della coagulazione non deve quindi essere compromesso nemmeno dalla presenza di un dispositivo a contatto con il sangue; tuttavia le superfici a contatto con il flusso sanguigno presentano un comportamento trombogenico, disturbano quindi l'equilibrio, spostandolo verso la coagulazione e di conseguenza favoriscono la formazione di trombi, innescata da due vie differenti [7].

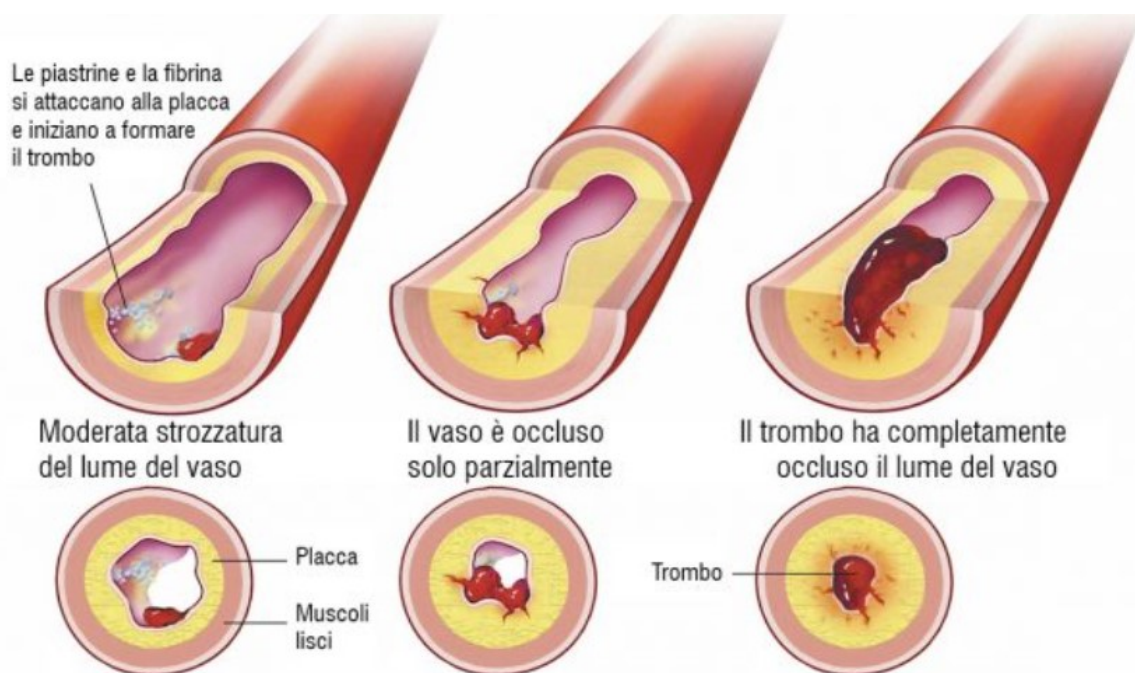


Figura 11: meccanismo che porta alla formazione di un trombo

La formazione di trombi si origina per due vie: una via intrinseca ed una via estrinseca. Entrambe le due vie convergono in un percorso comune che ha come enzima centrale la trombina che catalizza la formazione di fibrina dal plasma fibrogene proteico che determina un coagulo sanguigno stabile. La trombina catalizza la reazione di conversione di fibrinogeno, presente come soluto, in fibrina, avvolge il tappo piastrinico e lo stabilizza. La rete fibrinica ha infatti la caratteristica di imbrigliare tutto, anche i globuli rossi, così da far diventare il tappo un coagulo. Occorre distinguere i globuli rossi dalla formazione di fibrina. La rete di fibrina viene incrociata, tenuta assieme dal fattore XIIIa

che permette di ottenere un più stabile valore di coagulo. Durante la formazione del coagulo vengono inglobati piastrine, globuli bianchi e globuli rossi, che corrispondono alle cellule del sangue intrappolate e questa è la ragione per l'aspetto rossastro di coaguli di sangue. Successivamente dopo che il danno ai vasi e ai tessuti è stato riparato, il coagulo sarà degradato da un processo che prende il nome di fibrinolisi, in cui il plasminogeno zimogeno viene scisso, forma la plasmina che degrada la fibrina. La trombina è formata attraverso il complesso protrombinasi che ha luogo attraverso la scissione della protrombina nel fattore FXa e FVa: entrambe le vie, estrinseche ed intrinseche, determinano l'attivazione del fattore FXa e l'assemblaggio del processo protrombinasi. Dal momento che entrambi i percorsi convergono, in quest'ultima fase della coagulazione, questo viene definito come percorso comune. L'enzima centrale nella coagulazione del sangue è la trombina, che digerisce il fibrinogeno e induce la formazione di fibre di fibrina e una rete di fibrina stabilizzando il trombo e il coagulo. [7]

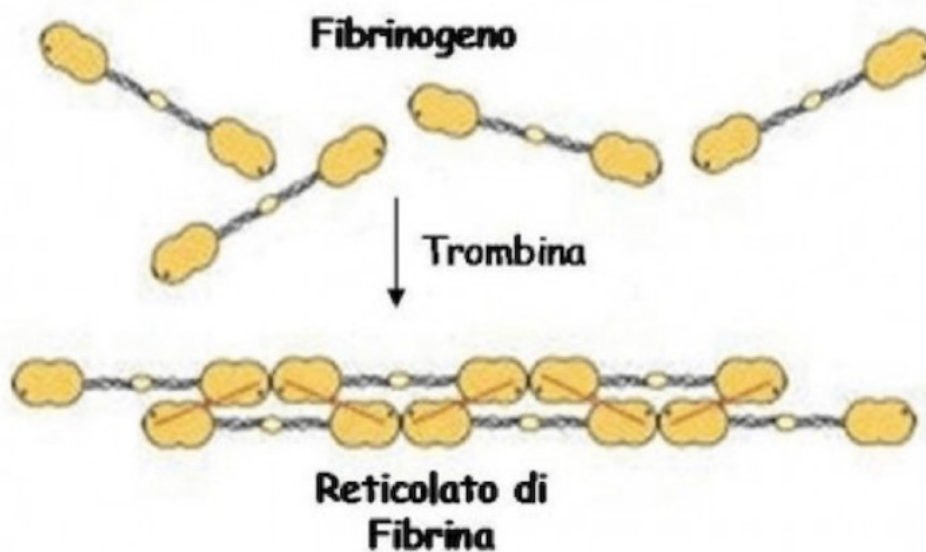


Figura 12: il fibrinogeno attivato forma sottili filamenti di fibrina che si uniscono a formare un reticolo stabile, il coagulo

L'attivazione della trombina dipende dalla presenza di Ca^{2+} e di carica negativa superficiale fosfolipidica. La dipendenza della formazione della trombina dagli ioni calcio viene sfruttata per l'anticoagulazione del sangue: questo viene spesso raccolto nel citrato e EDTA, entrambi chelanti degli ioni calcio e quindi bloccanti la coagulazione del sangue, in questo modo il sangue può essere conservato in laboratorio prima di essere utilizzato. L'attività della protrombinasi si basa sulle superfici dei fosfolipidi che sono arricchiti nella fosfatidil serina caricata negativamente. Per esempio i piridossalfosfati (PL) possono essere la membrana plasmatica delle piastrine attivate a cui

aderiscono le superfici. La trombina può iniziare la formazione di trombina aggiuntiva attivando il fattore FVIII o FXI, in una sovra regolazione del feedback del percorso intrinseco, in questo modo tracce di trombina possono essere amplificate in un'esplosione di trombina. Una volta raggiunta la concentrazione soglia di trombina per la formazione di un coagulo di sangue stabile, al quale seguirà una risposta di coagulazione completa che porterà alla formazione di un *blood clot*.

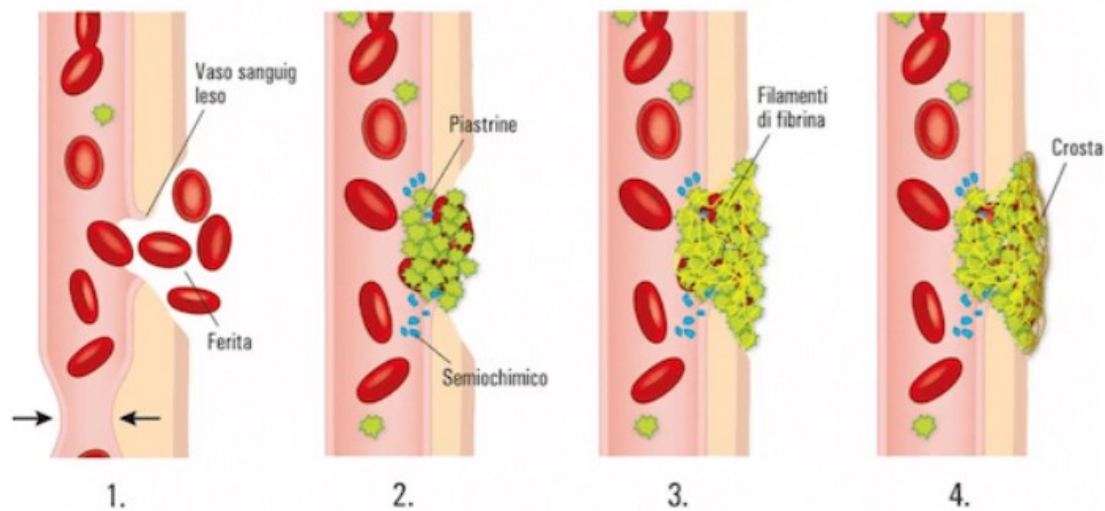


Figura 13: procedura completa dell'emostasi: dall'aggregazione piastrinica (2) alla formazione del reticolo di fibrina (3) e della crosta (4) che segue la retrazione

Ovviamente l'inattivazione della trombina è importante tanto quanto la sua attivazione. La trombina attiva può essere inattivata legandola all'antitrombina (AT), formando in questo modo un complesso irreversibile destinato alla degradazione. L'antitrombina (AT) può anche inattivare il fattore FXa da un meccanismo molto simile, il farmaco anticoagulante eparina che fa anche esso uso di questo meccanismo di inattivazione della trombina e imita i glicosamminoglicani presenti sulle cellule endoteliali della parete del vaso interno. E' un farmaco anticoagulante, comunemente usato, perché interviene sul controllo dei disturbi di trombosi e disturbi della coagulazione.

Percorso per via intrinseca: descrive il percorso di coagulazione del sangue che ha origine per attivazione da contatto: è proprio infatti a seguito del contatto che si instaura fra il sangue e la superficie sintetica che si innescano una serie di eventi, i quali si traducono nella formazione di trombi. Le superfici cariche negativamente, in particolare sono substrati particolarmente buoni per l'attivazione per contatto. Per tale motivo l'importanza fisiologica dell'attivazione per contatto rimane una materia di speculazione dal momento che le superfici di carica negativa *in vivo* sono molto rare, soprattutto quelle a contatto con il sangue. La via intrinseca è una catena di zimogeni che si scindono e si attivano successivamente e a vicenda in ordine preciso. Al termine del percorso il formato FIXa insieme a FVIIIa formerà il complesso TENASI che a sua volta catalizza la formazione di FXa. Quest ultimo enzima è un punto di convergenza nella coagulazione: da questo

punto in poi si attiva la via intrinseca che termina con la conseguente formazione di un coagulo di sangue. Quindi nel percorso intrinseco vi è un'attivazione sequenziale di fattori non attivi, quindi una sequenza di chimogeni che ordina una cascata di eventi biochimici. Inizia quindi con l'attivazione per contatto del chimogeno e si conclude con l'attivazione del fattore X, dal quale ha poi inizio il percorso comune.

Percorso per via estrinseca: guidato dal fattore tissutale tromboplastina (TF) che è una proteina di membrana presente sulla superficie delle cellule dopo che è stato inferto un danno tissutale, ad esempio nella zona della parete del vaso. Se manca la continuità delle pareti endoteliali sono esposte le cellule muscolari che hanno il fattore che induce la coagulazione, vi è quindi l'esposizione di altre cellule al flusso di sangue. Il TF non è espresso dalle cellule esposte al flusso sanguigno ma è presente nelle cellule del sub endotelio (le cellule muscolari lisce). Ovviamente quando lo è un dispositivo medico impiantato nel paziente, si verificheranno danni ai tessuti estesi e verrà attivato questo percorso di coagulazione. Tuttavia questo è desiderabile per la guarigione della ferita, ma questa risposta può rappresentare una complicanza per i dispositivi a contatto con il sangue, perché l'avvio della coagulazione induce un percorso di guarigione e non vogliamo che il sangue coaguli sul dispositivo per un percorso estrinseco. TF formerà un complesso con FVII: TFFVII, che può essere attivato in TFFVIIa o dalla stessa TFFVIIa. Piccole quantità di questo complesso attivato sono costantemente presenti in circolazione e così via anche la sovra regolazione del *feedback* è il meccanismo più importante per l'attivazione TF FVII. Il fattore che si forma TF FVIIa attraverso il percorso estrinseco è inibito rapidamente ed efficacemente dal fattore tissutale inibitore della via (TFPI). Questo significa che il complesso può attivare FX su FXa, si traduce nella formazione di trombina e coagulo del sangue, come descritto nella sezione del percorso comune. Quindi si ipotizza che la via estrinseca sia principalmente coinvolta nell'innescare della coagulazione e che tramite la sovra regolazione del *feedback* del percorso intrinseco vengano raggiunti l'esplosione di trombina e la formazione di trombi.

Essendo l'endotelio il materiale per eccellenza non trombogenico, durante un flusso sanguigno in condizioni fisiologiche le piastrine rimbalzano nelle pareti endoteliali; quando invece le piastrine, durante il loro flusso, entrano in contatto la matrice sotto l'endotelio, esposta a causa di una qualche lesione, cominciano a legarsi a quella superficie e legandosi, cambiano forma e a poco a poco si allegano a formare un tappo, esito appunto dell'aggregazione di più piastrine che si raggruppano collettivamente. E' fondamentale la reciproca attivazione per contatto con aggregazione. Le terapie anticoagulanti e antiaggreganti, utilizzate per contrastare tali fenomeni agiscono in due momenti diversi della formazione dei trombi: la terapia anticoagulante impedisce la stabilizzazione del tappo

piastrinico, agisce perciò a valle della cascata coagulativa, le terapie antiaggreganti impediscono invece alle piastrine di aggregarsi, a monte.

Adesione e attivazione piastrinica: le piastrine sono responsabili del tappo iniziale nei vasi danneggiati, poi portano alla formazione di trombi nello stesso sito. Le piastrine non sono presenti in grandi quantità ma si legano immediatamente quando “vedono” qualcosa di diverso dall’endotelio sano, che sia esso sub endotelio o una superficie *non-self* sintetica. Di norma quindi le piastrine seguono il flusso assieme al sangue fino a quando non incontrano un sito del vaso danneggiato, in cui è esposta la matrice extracellulare sottostante. L’endotelio è l’unica superficie perfettamente non trombogena, non può esserci collagene, perché esso è una delle componenti della matrice che si trova sotto l’endotelio. Nel momento in cui vi sono il collagene o il fattore di Van Willebrand (VWF) esposti, le piastrine li riconoscono e vi si legano perché contengono sulla loro superficie dei recettori per queste proteine. Il legame reversibile di VWF alla glicoproteina della membrana piastrinica GP1BV IX o integrina rallenterà le piastrine stesse facendole fermare sulla parete del vaso danneggiato: ora le piastrine possono legarsi al collagene tramite recettori GPVI e integrina alfa2beta1 ($\alpha_2\beta_1$).

Quindi grazie al riconoscimento fra integrina alfa2beta1 che rappresenta il recettore per il collagene presente nelle piastrine e il fattore GPVI che è il principale recettore per le piastrine presente nel collagene, le piastrine si legano alla superficie e questo corrisponde ad una loro conseguente attivazione. La superficie delle piastrine attivate si arricchisce di carica negativa, a causa della traslocazione attiva della fosfatidilserina dal lembo interno della membrana al foglietto esterno. La superficie carica negativamente è un ottimo substrato per la propagazione della risposta della coagulazione: la formazione e l’attività dei complessi proteici che formano FXa e trombina sono fortemente dipendenti da questa superficie lipidica caricata negativamente per un’attività efficiente. Il legame e la conseguente attivazione sono legati anche al cambiamento di morfologia: infatti di norma la superficie delle piastrine è sferica, ma quando si legano a qualcosa cambiano forma proprio a seguito del contatto con la superficie, si appiattiranno per occupare più superficie, chiudere in modo rapido il varco e risparmiare più sangue, quindi potremo risalire alla propensione trombogena partendo dalla forma. Dopo la loro attivazione le piastrine potranno secernere diversi attivatori chimici (come ad esempio ADP) che indurranno ulteriormente adesione piastrinica. Basta che una o poche piastrine si leghino alla superficie diversa dall’endotelio sano che però rilasciando un fattore all’esterno comandino l’intervento di altre piastrine che produce un’aggregazione piastrinica. Oltre a legarsi agli strati sub endoteliali in caso di danno ai vasi, le piastrine si legano anche a superfici sintetiche. Il legame e la successiva attivazione delle piastrine sono accompagnati da un marcato cambiamento della morfologia, facilmente monitorabile tramite microscopia

elettronica. Le piastrine hanno una morfologia rotonda, tuttavia subito dopo il legame con la superficie si formano degli “spike” come delle estrusioni dal corpo cellulare principale, risultando in una cellula a forma dendritica. L’adesione e l’attivazione delle piastrine sulle superfici sintetiche dovrebbe essere evitata, quando abbiamo delle piastrine a contatto con la superficie non vorremmo che queste aderiscano ad essa. Altrimenti le piastrine inizieranno a diffondersi, occupando più superficie, fino al completo raggiungimento della morfologia diffusa associata alla piena attivazione delle piastrine. Dimostrato che le piastrine del sangue attivate sono piccole strutture vescicolari proposte per svolgere un ruolo nella coagulazione e nell’arteriosclerosi, sono micro-vescicole altamente trombogeniche. I ricercatori sostengono che queste vescicole si formino solo a contatto con superfici sintetiche estranee, nel sangue e nei prodotti sanguigni a scopo trasfusionale sono presenti queste vescicole. La trombina può attivare le piastrine aumentando la quantità di superficie disponibile caricata negativamente con conseguente formazione e propagazione rapida del coagulo: ciò significa che una combinazione di adesione e attivazione piastrinica accoppiata con una generazione di trombi indurrà una formazione di coagulo sui dispositivi a contatto con il sangue [7].

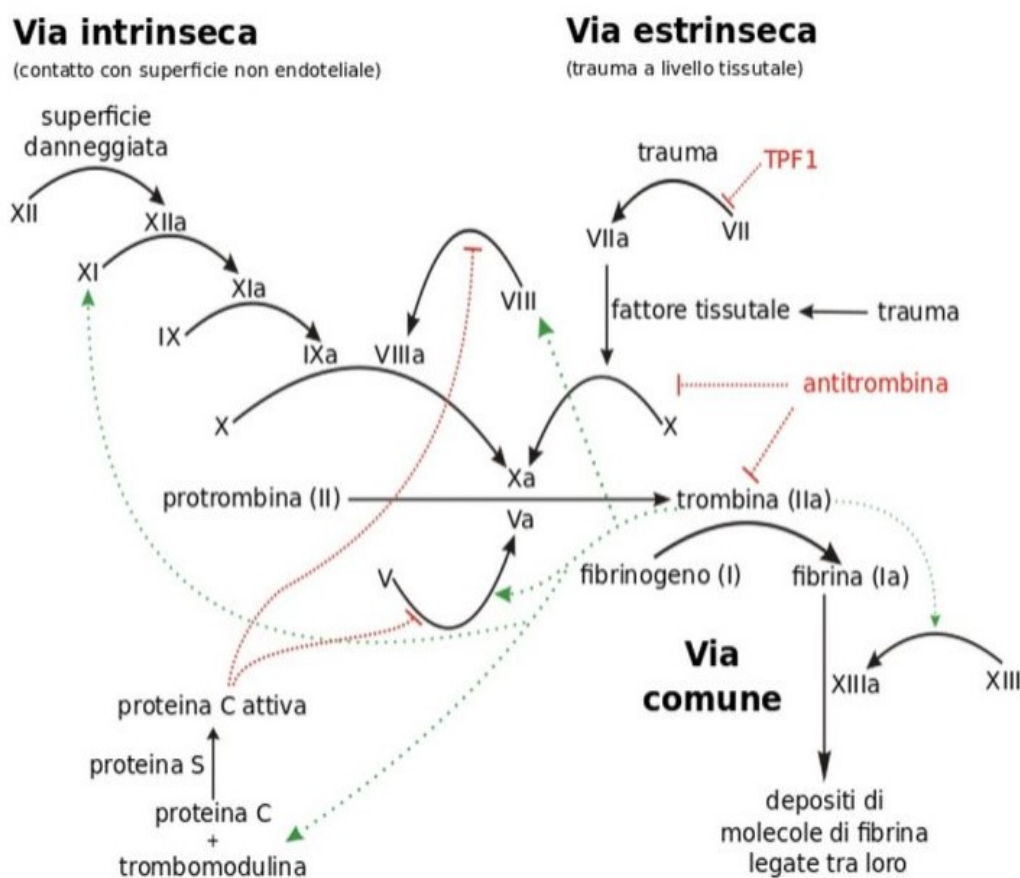


Figura 14: confronto fra la via intrinseca e la via estrinseca

1.9 BIOMATERIALI

Con il termine Biomateriale si indica una sostanza o una combinazione di sostanze, di origine naturale o sintetica, ma comunque non vivente, utilizzata nei dispositivi biomedici che ha un contatto con i tessuti viventi: in questo modo sono stati inclusi nella definizione anche tessuti ed organi ma non viventi, quindi decellularizzati. [4] I biomateriali possono essere classificati in tre generazioni:

- Materiali di prima generazione: prendono il nome di materiali bioinerti, l'obiettivo della loro applicazione è quello di minimizzare l'interazione tra la superficie e l'ambiente biologico.
- Materiali di seconda generazione: si tratta in questo caso di materiali bioattivi, il cui obiettivo è quello di integrarsi con l'organismo e generare delle reazioni controllate da parte dello stesso.
- Materiali di terza generazione: comprende i materiali bioattivi e biomimetici. Il loro scopo è quello di interagire con il corpo e il tessuto in modo favorevole e l'idea per favorire il processo di integrazione è quella di legare alla superficie del biomateriale delle molecole o dei peptidi in grado di creare legami con la superficie dello stesso, che favoriscano un qualsiasi effetto di supporto alla funzione che quello specifico biomateriale deve svolgere, come ad esempio l'adesione e la crescita delle cellule.

La compatibilità è un concetto essenziale quando si considerano applicazioni biomedicali, a prescindere da quale sia la specifica funzione per la quale tali applicazioni sono state sviluppate. Essa comprende l'aspetto morfologico che riguarda la geometria e la massa dell'applicazione, l'aspetto funzionale, la protesi realizzata deve infatti svolgere una funzione quanto più simile possibile a quella dell'organo o il tessuto che deve sostituire; in ultimo l'aspetto biologico: tali dispositivi infatti una volta in contatto con l'organismo possono indurre delle alterazioni che coinvolgono sia il tessuto organico che il materiale. Tale fenomeno di reciproca interazione tra dispositivo ed organismo è un fenomeno dinamico che evolve nel tempo. La compatibilità quindi darà poi origine all'affidabilità del dispositivo stesso che varia a seconda del tempo di applicazione del dispositivo, se temporaneo o permanente, del luogo di applicazione del dispositivo, se intra o extra corporeo e della funzione del dispositivo, se esso sia vitale o meno. Dunque, oltre alla compatibilità, riveste un ruolo di vitale importanza anche la biocompatibilità, che indica l'abilità di un materiale di esistere in un ambiente *in vivo* per un periodo accettabile di tempo senza affetti negativi sull'ospite: è la capacità di un materiale di determinare da parte del sistema vivente una reazione positiva per un certo periodo di tempo. I vari livelli di biocompatibilità sono indicati da

numerose regolamentazioni: per la verifica della compatibilità del biomateriale si ricorre alla consultazione delle 33 parti contenute nella normativa ISO10993 [4]. Tali normative danno anche informazioni utili per comprendere quali siano i tipi di test e di esperimenti da effettuare per valutare la citotossicità del biomateriale. Innanzitutto è necessario tenere presente che ogni biomateriale è caratterizzato, a livello concettuale, da due parti: il *bulk* che sta ad indicare la massa del nostro materiale, quindi la parte più interna di esso, e la superficie del biomateriale che indica invece la porzione di area più esterna del biomateriale, e corrisponde all'incirca ad un *layer* composto da pochi atomi, circa 1-2/10 nm, di cui le proprietà fisiche e in particolar modo il suo stato elettronico e la posizione degli ioni sono significativamente differenti dalle proprietà che contraddistinguono il *bulk*. Entrambe hanno delle specifiche proprietà: le proprietà del *bulk*, sono riconducibili alle proprietà meccaniche del biomateriale, sono quindi indicative della funzione e della durata del biomateriale stesso, mentre le proprietà della superficie sono in continuo cambiamento e possono differenziarsi anche molto da quelle del *bulk*; rivestono tuttavia un ruolo di elevata importanza per le interazioni che si generano con il tessuto dell'organismo ospite, infatti la chimica e la struttura superficiale influenzano la risposta biologica. Risulta quindi evidente che controllare le interazioni all'interfaccia tra biomateriale e organismo vivente si rivela essere un'azione particolarmente difficile. Quindi capire come modificare e caratterizzare la superficie di un biomateriale è importante al fine di poter ottenere una superficie impiantabile con caratteristiche funzionali orientate alla migliore integrazione del biomateriale con l'organismo vivente. L'ambiente superficiale è inoltre un ambiente molto reattivo, luogo di molteplici interazioni fra le quali in particolare individuiamo: la reazione di infiammazione, la reazione da corpo estraneo e la risposta immunitaria. Il fenomeno di adsorbimento delle proteine riveste un ruolo centrale nella successiva adesione e crescita delle cellule nel biomateriale perché quest'ultimo è influenzato e mediato da proteine come fibronectina, laminina e vitronectina [4].

Le proteine di adesione e i fattori di crescita sono composti da catene di amminoacidi più o meno lunghe, questa caratteristica può far sì che le proteine presentano alcuni limiti, quali:

- Instabilità: dovuta alla delicatezza della struttura tridimensionale della proteina che si denatura con facilità
- Insolubilità
- Elevato costo: il costo medio di una proteina ricombinante è di circa 15 000 dollari per mg
- Scarsa disponibilità

Dal momento che alcuni tratti della sequenza proteica presentano una specifica funzione, essi possono essere utilizzati al posto delle proteine per una serie di vantaggi: hanno un minor costo, sono disponibili in grandi quantità con un elevato grado di purezza e meno attivo alla stessa

concentrazione della proteina. Inoltre non vanno incontro a problemi di denaturazione, hanno una maggiore stabilità durante la fase di modifica del materiale ed anche per quanto riguarda la temperatura, il ph e lo stoccaggio. Inoltre i peptidi possono essere funzionalizzati e si evitano problemi di contaminazione.

Tecniche per legare i peptidi ad un biomateriale.

I peptidi possono essere legati stabilmente ad un biomateriale attraverso:

- Coniugazione enzimatica: si utilizzano enzimi specifici per promuovere la reazione, come ad esempio transglutaminasi, enzima in grado di far reagire un'ammina con un'aldeide.
- Coniugazione chimica: vengono utilizzate diverse reazioni chimiche e sostanze, quali: ammine reattive, tioli attivi, ciclo addizioni, formazione di Oxime e Hydrazoni e polimerizzazione
- Fotoconiugazione: in presenza di una radiazione ultravioletta ed un iniziatore, si ha una reazione radicalica che permette di creare un legame covalente.

Per incrementare la performance clinica degli impianti occorre oltrepassare i concetti che caratterizzano la prima e la seconda generazione di biomateriali, finalizzati ad avere un comportamento inerte, e a svolgere un ruolo di “rimpiazzo” del tessuto malato. L'idea fondamentale che guida la terza generazione dei biomateriali è quella di “ricreare” il tessuto stesso, di guidare attraverso opportuni supporti e stimoli la rigenerazione. L'obiettivo ultimo è che il tessuto mancante deve essere ricreato come era in precedenza, come tessuto biologico. Per realizzare tale scopo è necessario che la superficie del biomateriale, una volta inserita all'interno dell'organismo, abbia un comportamento bioattivo, che incentivi un'interazione positiva con le componenti cellulari desiderate. Affinché si osservi bioattività, è necessario che le cellule interagiscano con le biomolecole legate alla superficie per un intervallo temporale adeguato, sufficientemente elevato. Inoltre svolge un ruolo essenziale anche la concentrazione di tale peptide: se quest'ultima è troppo elevata si hanno effetti tossici sul tessuto, viceversa se essa non è abbastanza, si riscontra una mancanza di efficacia [4]. A seguito dell'inserimento del biomateriale nell'ambiente biologico, il primo evento che si verifica è l'adsorbimento di proteine che gioca un ruolo fondamentale nel determinare cosa avviene all'interfaccia tessuto impianto.

Proprietà che deve possedere la proteina che determina o meno l'interazione con la superficie:

- Dimensione della proteina: maggiore è la larghezza e la lunghezza della proteina e maggiore è la possibilità che essa ha di legarsi alla superficie
- Carica adsorbita alla superficie: più le molecole sono vicine al loro punto isoelettrico, più vengono adsorbite facilmente dalla superficie

- Struttura: stabilità e *unfoalding*, termine utilizzato per indicare la capacità della proteina di denaturarsi rapidamente, meno è stabile la proteina e meno crosslinking ha e quindi riesce ad aderire alla superficie più velocemente.

Quindi riassumendo:

- Maggiore è la lunghezza delle molecole quindi maggiore è il loro numero di amminoacidi e maggiore è la capacità che hanno di legarsi alla superficie
- Più una superficie è idrofobica, più tenderà ad adsorbire le proteine: questo perché la struttura primaria di una proteina è composta da amminoacidi, nel momento in cui si avvicina alla superficie la proteina si trova nella sua struttura terziaria, che è rappresentata da una struttura globulare che presenta gli amminoacidi idrofili posizionati verso l'esterno e quelli idrofobici verso l'interno, quindi a contatto con una superficie idrofobica la struttura della proteina tenderà a denaturarsi e ad aprirsi per consentire alla parte idrofobica di formare dei legami e quindi distendersi sulla superficie stessa.

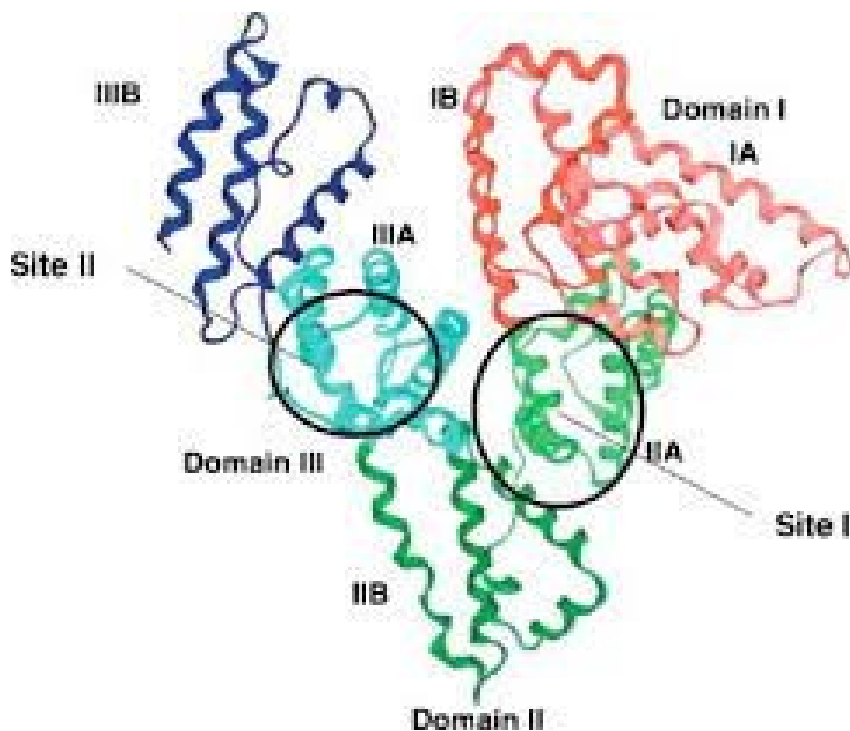


Figura 15: struttura della proteina, caratterizzata da domini differenti, che saranno in grado di creare legami differenti con diverse regioni della superficie che caratterizza il dispositivo

1.10 INTERAZIONI DEL SANGUE CON UNA SUPERFICIE SINTETICA

Al primo contatto del sangue con la superficie impiantata si verifica un rapido adsorbimento delle proteine: le prime che vengono adsorbite sono le proteine più piccole e che si trovano ad una concentrazione maggiore, anche se hanno una scarsa affinità con la superficie stessa. La proteina a contatto con la superficie e legandosi ad essa, instaura degli effetti termodinamici, che prendono il nome di effetto Vroman: l'adsorbimento delle proteine non è un processo statico, ma la composizione dello strato proteico adsorbito evolverà nel tempo. Le proteine che hanno aderito inizialmente verranno quindi sostituite da proteine più grandi e in genere presenti in concentrazione minore nel sangue, eventualmente anche più lente nel trasporto, che tuttavia presentano un'affinità maggiore con lo specifico tipo di superficie. Si verifica quindi una rimozione delle proteine precedentemente adsorbite e il loro successivo subentro. Il meccanismo di adsorbimento proteico sulle superfici sintetiche è molto dibattuto e dipende dalle proprietà e dalle caratteristiche chimico-fisiche della superficie che possono essere controllate durante la sintesi della superficie stessa. Le lavorazioni della superficie possono interessare la topografia superficiale della stessa, quindi la sua idrofilia e la sua carica superficiale. Al fine dell'adsorbimento proteico, la proteina stessa va incontro ad un processo che prende il nome di *unfolding*, noto anche come "denaturazione"; tale processo prevede che le proteine adsorbite si denaturino parzialmente o completamente, perdano quindi la loro conformazione iniziale, strutturandosi in un certo modo e di conseguenza mutino anche la loro attività biologica. Tuttavia le proteine, per essere adsorbite, devono prima giungere a contatto con la superficie di interesse; il loro percorso e quindi trasporto verso tale superficie è regolato dalla prima legge di Fick sulla diffusione: in condizioni stazionarie, il flusso tende ad annullare il gradiente di concentrazione $J = -D \cdot \Delta c$, dove Δc è il gradiente di concentrazione, D rappresenta il coefficiente diffusivo che secondo l'equazione di Stoke-Einstein assume la seguente forma $D = k \cdot T / 6 \cdot \pi \cdot \mu \cdot r$, ovvero il coefficiente diffusivo è inversamente proporzionale al raggio della particella di tessuto assunta sferica, e alla viscosità del solvente. Il trasporto è anche regolato dalla seconda legge di Fick $\delta c / \delta t = D \cdot \nabla^2 c$. tale legge è tempo-dipendente, indica quindi come si comporta un certo soluto all'interno di un solvente in condizioni non stazionarie. In termini di trasporto diffusivo sono favorite quindi le proteine più piccole e più concentrate. Una volta concluso quindi il processo diffusivo di trasporto di materia, le proteine vengono adsorbite, come affermato precedentemente si verifica quindi *l'unfolding*. Se si sceglie di rappresentare la proteina con una collana, questa avrà una certa conformazione e assumerà un'altra conformazione al fini di minimizzare le interazioni con il solvente. Inizierà quindi a perdere la sua conformazione iniziale, in virtù della possibilità di generare un maggiore numero di legami con la superficie e stabilizzare il

legame stesso. All'interno del sangue che è il fluido contenitore delle proteine, si instaurerà un rapporto di competizione tra le proteine stesse, inizierà uno scambio competitivo tra proteine per una certa superficie che dipenderà dall'ordine di arrivo delle proteine e dalla loro affinità con la superficie stessa, quindi da entrambe le caratteristiche, della proteina e della superficie.

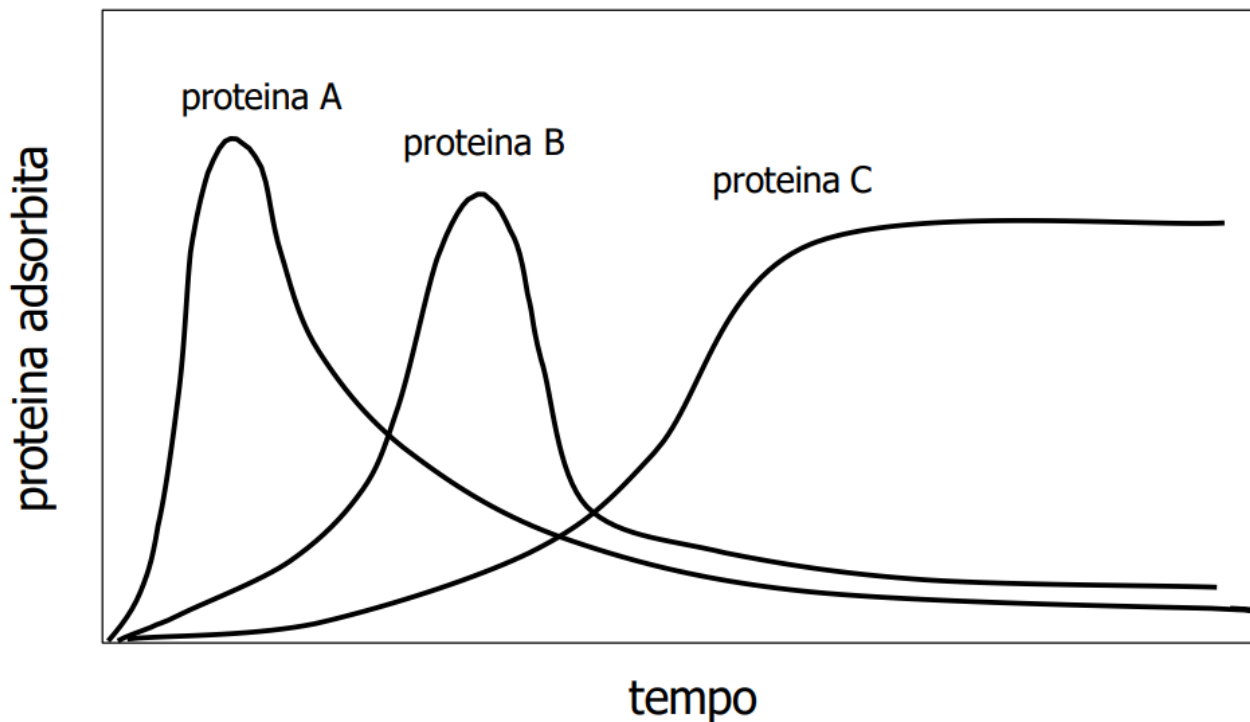


Figura 16: Rappresentazione schematica del processo di scambio sequenziale di proteine in superficie (Effetto Vroman)

Commento dell'Effetto Vroman raffigurato in Figura 16: prima di arrivare ad una condizione di stazionarietà, occorre del tempo. Osservando il grafico si nota che in un primo momento la concentrazione della proteina A aumenta, la proteina B invece è meno favorita rispetto alla proteina A in termini di trasporto di materia, tuttavia se la proteina B ha un'affinità maggiore con la superficie rispetto ad A, inizierà a rimuovere la proteina A e prendere il suo posto. La proteina C arriva per ultima in quanto è la più sfavorita in termini di trasporto di materia ma è più favorita in termini termodinamici, presenta quindi una maggiore affinità con la superficie di interesse rispetto alle altre due proteine. Il fatto che le proteine A e B non vengano completamente allontanate, implica che la massima quantità di C adsorbita rimanga inferiore alla massima quantità di B e di A. Inoltre il picco della concentrazione di C è inferiore al picco della concentrazione di A e di B, in quanto non vi è più disponibilità di siti di superficie a cui le proteine possono ancorarsi perché i siti di aggancio presenti non sono infiniti, e alcuni restano comunque occupati dalle proteine A e B, che non vengono completamente rimosse. Quando le concentrazioni delle proteine restano costanti, si

parla di stato pseudo stazionario, ovvero di equilibrio dinamico: le proteine C possono scambiarsi tra loro, le proteine C in superficie vengono sostituite con le proteine C in soluzione e lo stesso evento si verifica per le proteine A e per le proteine B.

E' importante ricordare che la natura della superficie può cambiare a seguito dell'adsorbimento delle proteine, in quanto può cambiare la carica superficiale o le stesse modificazioni superficiali possono essere ricoperte dalle proteine adsorbite. Si può quindi affermare che la superficie di un impianto raramente entra in contatto con cellule e tessuti perché è lo strato di proteine adsorbite sulla superficie stessa che entra in contatto con cellule e tessuti e ne determina quindi il comportamento. Quindi la risposta del sangue in termini di coagulazione, infiammazione, attivazione del complemento, verso le superfici è controllata dalla natura delle proteine adsorbite: indirizzare l'adsorbimento delle proteine è considerato quindi uno strumento prezioso per controllare la compatibilità sanguigna delle superfici. L'intento sarebbe quindi di governare il layer proteico adsorbito in funzione dei tipi di interazione che si vogliono creare tra superficie e il sangue con le sue componenti. Inoltre sono stati effettuati molti tentativi per produrre una superficie completamente repellente alle proteine o per manipolare l'adsorbimento delle proteine in modo tale da ottenere l'interazione cellula-superficie desiderata, tuttavia non si è ancora riusciti ad emulare le proprietà dell'endotelio sano, nonostante il tentativo di dirigere l'adsorbimento proteico.

1.11 DECELLULARIZZAZIONE DEI TESSUTI

Procedure di decellularizzazione

Esistono una vasta gamma di tecniche meccaniche e chimiche per operare la decellularizzazione e per ogni specifico tessuto e/o organo vengono utilizzati i protocolli più adatti. Il protocollo ottimale rimuove tutte le porzioni del nucleo e le porzioni cellulari, inclusi gli antigeni che nel momento del contatto con il corpo ricevente, sono responsabili della reazione immunitaria; si vogliono invece conservare le proprietà della matrice.

Tecniche chimiche

- impiego di detergenti ionici, quali SDS-sodio dodecil solfato, sodio deossicolato, che svolgono la funzione di solubilizzare le membrane, inclusa quella del nucleo, delle cellule ed effettuare la lisi. Ulteriori detergenti non ionici sono il Triton-X-100, che attualmente però è stato ritirato dal commercio: era responsabile dell'alterazione dello strato lipidico delle membrane e della rottura del legame tra le proteine e il DNA.
- Impiego di enzimi quali dispasi, lipasi, tripsina, nucleasi. Dispasi e lipasi tuttavia sono enzimi che intervengono anche sulla matrice extracellulare: se la loro concentrazione non

raggiunge quantità troppo elevate, fanno sì che le cellule non riescano più a stabilire interazioni con la matrice e vadano incontro a morte; successivamente a seguito di opportuni lavaggi si ottiene la decellularizzazione del tessuto. Le nucleasi, sono invece responsabili dell'azione sugli acidi nucleici (DNA).

- Utilizzo di agenti chelanti come ad esempio l'EDTA. In questo modo si va a bloccare l'interazione che si instaura tra le cellule e la matrice: questo implica la morte cellulare perchè tale interazione è fondamentale per la sopravvivenza delle cellule
- Impiego di agenti che hanno la capacità di indurre la lisi cellulare tramite il processo di deidratazione: si tratta degli alcol, tra cui etanolo e metanolo che fanno scoppiare la cellula
- Tramite l'utilizzo di cicli di soluzioni ipertoniche e ipotoniche, si ottiene uno sbilanciamento dell'equilibrio osmotico tra l'interno e l'esterno della cellula che conduce alla lisi cellulare.

Tecniche meccaniche

Finalizzate anche esse alla distruzione cellulare:

- Tramite cicli di congelamento e scongelamento: i cristalli di acqua che hanno origine all'interno della cellula, implicano la sua esplosione
- Attraverso l'applicazione di una pressione idrostatica
- Tramite sonicazione: vengono emesse ad un ritmo molto frequente delle vibrazioni che comportano la rottura dei legami tra le proteine

Tecniche di veicolazione degli agenti decellularizzanti al fine di operare la rimozione cellulare:

- Agitazione: vi è un sistema decellularizzante all'interno del quale sono inseriti il tessuto e/o l'organo da decellularizzare; tale sistema permette il movimento dell'agente decellularizzante in modo da garantire che questo raggiunga in maniera omogenea le diverse porzioni del tessuto e/o organo.
- Utilizzo della rete vascolare del tessuto o dell'organo stesso: vengono canulati un grosso vaso o più vasi, al fine di promuovere la distribuzione dell'agente decellularizzante in modo omogeneo e con un flusso costante; tale metodo è impiegato soprattutto per la decellularizzazione degli organi interi.

Al fine del raggiungimento di una corretta decellularizzazione degli organi e/o tessuti non si utilizza mai una singola tecnica ma avviene piuttosto una combinazione di tecniche meccaniche e chimiche. L'utilizzo di soluzioni contenenti gli agenti decellularizzanti rientrano tra i metodi più promettenti e più utilizzati e l'impiego della rete vascolare è un ottimo sistema per la loro promozione, perché

garantisce omogeneità di distribuzione e un miglior risultato finale per quanto riguarda lo *scaffold* ottenuto [10]. La valutazione dell'avvenuta decellularizzazione, per verificare che il DNA sia stato rimosso correttamente, si effettua valutando i seguenti parametri:

- Immunogenicità: la riduzione dell'immunogenicità dello *scaffold* è uno dei requisiti maggiormente critici per la decellularizzazione ed è rappresentata da alcuni componenti che includono materiali genetici residui come DNA, RNA, e antigeni e che sono in grado di indurre una risposta immunogenica. Devono essere garantite le seguenti caratteristiche:
 - Il contenuto di dsDNA per peso di ECM secca deve essere inferiore a 50ng/mg dsDNA
 - La lunghezza dei frammenti di DNA deve essere minore di 200 paia di basi
 - Non vi deve essere materiale nucleare visibile

Prima di operare l'impianto *in vivo* si effettua una quantificazione del DNA attraverso l'impiego di kit specifici kit che siano in grado di fornire la quantità di DNA in termini di mg su peso del tessuto; esistono altre proteine notoriamente immunogeniche tra diverse specie [4].

A seguito dell'impianto *in vivo* vengono invece effettuate opportune analisi istologiche con l'obiettivo di valutare la risposta immunitaria.

- Proprietà meccaniche

Al fine di assicurare una corretta funzionalità dell'applicazione, è di fondamentale importanza il mantenimento delle proprietà meccaniche caratteristiche del tessuto nativo. Tra queste individuiamo: il modulo elastico, il modulo viscoso, la resistenza alla trazione e la resistenza allo snervamento. Queste proprietà sono determinate principalmente dalle proteine strutturali dell'ECM, tra cui il collagene, la laminina, la fibronectina e l'elastina. Un altro aspetto fondamentale è rappresentato dal mantenimento della tridimensionalità della matrice extracellulare: la decellularizzazione del tessuto infatti, come precedentemente visto, vede l'uso di sistemi detergenti o di altri fattori che possono causare la denaturazione delle proteine, implicando quindi una variazione della stiffness o delle proprietà meccaniche del tessuto. A tale scopo è quindi necessario bilanciare il trattamento decellularizzante e l'ottenimento di uno *scaffold* con le proprietà meccaniche desiderate.

Prima dell'impianto è necessario svolgere:

- Le prove meccaniche, al fine di valutare le proprietà meccaniche del tessuto
- Le analisi istologiche: evidenziando in modalità differenti, diverse regioni, quali cellule e matrici, per poter comprendere quali parti sono state preservate e quali no
- Le analisi di microscopia o elettronica o a fluorescenza

La microscopia elettronica consente di effettuare un'analisi a livello nanometrico del campione, ed è quindi in grado di rilevare in maniera accurata il *networking* della matrice.

I due principali approcci esistenti sono:

- La microscopia elettronica a scansione (SEM): si valuta come è organizzata, da un punto di vista nanometrico, la superficie del campione; la superficie interna diventa visibile nel caso in cui si operi una rottura del campione tramite criopreparazione dello stesso.
- microscopia elettronica a trasmissione (TEM): consente la visione dell'organizzazione intracellulare o extracellulare perché viene effettuata su opportune sezioni molto sottili.

Caratteristiche dei tessuti decellularizzati

- Sono poco immunogenici, perché la caratteristica di immunogenicità di un tessuto è data dalla presenza delle cellule: dal momento che avviene la loro rimozione, consegue una riduzione della risposta immunitaria al trapianto
- Rappresentano una matrice in grado di mantenere l'architettura del tessuto e sono totalmente naturali, quindi lo *scaffold* che ne deriva è biocompatibile e biodegradabile; anche per questo motivo esistono già applicazioni cliniche che prevedono il loro utilizzo
- Sono in grado di consentire il “*cell homing*”: offrono alle cellule la possibilità di riconoscere il proprio ambiente e comportarsi come farebbero nel tessuto nativo. Con lo scopo di fornire un esempio pratico, consideriamo le cellule staminali del muscolo scheletrico, che prendono il nome di cellule satellite. Esse sono definite oltre che per le loro potenzialità staminali, anche per la loro posizione in una zona precisa: si collocano tra la membrana basale della miofibrilla e il primo strato di ECM, che è la lamina basale, e ciò consente loro di essere definite cellule satellite. Infatti nel caso in cui la cellula si trovi in un'altra zona, non può essere definita cellula satellite. Nei tessuti decellularizzati le cellule sono in grado di riposizionarsi nella regione anatomica della cellula satellite: l'ambiente riesce quindi nella funzione di garantire il corretto “*homing cellulare*”.
- Non danno origine ad una risposta infiammatoria all'impianto prolungata e non fisiologica: requisito importante perché invece spesso accade che se l'infiammazione acuta continua per un periodo temporale superiore alle due settimane, quindi non fisiologico, si può andare incontro alla degradazione del costrutto.
- Hanno la caratteristica di essere “pro-angiogenici”: sono in grado di promuovere la formazione di nuovi vasi sanguigni. Ciò li rende degli ottimi *scaffold*, in quanto uno dei maggiori limiti dell'impianto di costrutti tridimensionali negli organismi è la mancanza di formazione di nuovi vasi, che risultano essere fondamentali al fine di evitare la necrosi del tessuto.

Il ruolo degli ingegneri è quello di fare in modo che ci sia un'interazione accettabile fra il dispositivo e il tessuto. I principali obiettivi sono:

- Evitare l'emolisi: la rottura meccanica o chimica dei globuli rossi, che rilascerebbero emoglobina, la quale a sua volta diminuirebbe la capacità di trasporto di alcune sostanze nel sangue
- Evitare la corrosione: nel caso in cui si abbia una superficie sintetica metallica si vuole evitare la corrosione, e se avviene deve comunque garantire un rilascio di ioni che sia sotto una certa quantità soglia
- In particolare, per quanto riguarda le applicazioni cardiovascolari, quali ad esempio valvole cardiache, si desidera evitare alterazioni significative dal punto di vista emodinamico, dal momento che la valvola genera dei vortici con presenza di flussi retrogradi che possono comportare lesioni meccaniche nei tessuti adiacenti
- Evitare effetti trombotici: dal momento che la terapia anticoagulante a vita è impegnativa e ricca di effetti collaterali per il paziente, l'ingegnere ha il compito di comprendere quali siano i meccanismi che regolano la trombosi e sulla base di questi provare ad evitarla. Una tecnica potrebbe essere quella di lavorare sulla composizione della superficie oltre che sulla geometria del dispositivo: quindi applicare molecole che siano in grado di favorire lo scorrimento del sangue.

La matrice decellularizzata è una matrice biologica che possiede già molti requisiti, tra cui una struttura tridimensionale, motivi adesivi di crescita, e proprietà biomeccaniche per il tipo di tessuto che deve formare, allo stesso tempo tuttavia subisce delle modifiche: l'intento è quello di lasciare invariata tutta la componente della matrice formata da biomolecole, glicosamminoglicani (GAGs) e proteine. Nel percorso che caratterizza il metodo usato per la decellularizzazione, parte della matrice viene persa o comunque modificata perché si opera con metodi fisici e chimici e vengono impiegati detergenti che in parte modificano la matrice stessa. La matrice decellularizzata modificata risulta essere quindi più povera della matrice originale, in particolare si riscontra una perdita abbastanza ingente di glicosamminoglicani [11].

1.12 METODI DI FUNZIONALIZZAZIONE

Esistono diversi metodi per funzionalizzare un biomateriale: l'adsorbimento fisico, il legame covalente oppure effettuare il *delivery* delle biomolecole attraverso *biocarrier* riassorbibili.

- Adsorbimento fisico: sfrutta l'interazione fisico – chimica tra le biomolecole e la superficie che viene raggiunta lasciando una soluzione contenente biomolecole in contatto con la superficie dell'impianto. Le molecole biologicamente attive sono posizionate sulla

superficie e legate ad essa tramite interazioni fisico-chimiche. La forza principale che governa l'adsorbimento fisico include interazioni elettrostatiche, forze di Van Der Waals, legame idrogeno o interazioni idrofobiche. Tra i vantaggi di tale metodo si individuano il fatto di essere non distruttivo, economico e facilmente accessibile. Tra gli svantaggi, invece, il controllo limitato dell'orientamento delle biomolecole adsorbite: esse possono adsorbire sul substrato, possono orientarsi in modo casuale portando al loro cambiamento conformazionale e alla loro conseguente perdita di funzionalità. Non vi è controllo nemmeno sulla quantità delle molecole attive, ed esiste la possibile reversibilità dall'ancoraggio

- Rilascio tramite *biocarrier*: tale metodo prevede che le biomolecole siano incorporate in un biomateriale, che generalmente è costituito da un polimero, che consente il loro trasporto e il conseguente rilascio secondo una cinetica variabile, a seconda delle caratteristiche del biomateriale e del metodo usato per l'inclusione. Il carrier viene utilizzato per coprire una superficie ed è in grado di trasportare e rilasciare le biomolecole, che possono essere disciolte o legate chimicamente ad esso, nell'interfaccia tra biomateriali e tessuto. I potenziali *carrier* devono presentare specifici requisiti, tra cui essere biocompatibili, biodegradabili, biorisorbibili, non ostacolare o mascherare l'attività biologica delle molecole trasportate e aderire al materiale senza comprometterne l'utilizzo in chirurgia. Alcuni esempi di materiali polimerici utilizzati come *carrier* sono: acido polilattico (PLA), acido poliglicolico (PGA), acido ialuronico e materiali a base di alginato. Tra i vantaggi di tale metodo ritroviamo il fatto che il materiale utilizzato come *carrier* può promuovere l'integrazione con il tessuto e che il rilascio della molecola è regolato dalla velocità di degradazione del *carrier*. Tra gli svantaggi invece si riscontrano un'alterazione delle caratteristiche originali topografiche della superficie.
- Legame covalente: la tecnica di adsorbimento chimico è ampiamente utilizzata per immobilizzare le biomolecole nella superficie di vari biomateriali attraverso la realizzazione di un legame covalente. Tale metodo richiede un legame covalente caratteristico o al limite la creazione di un'attrazione elettrostatica tra il substrato e le molecole bioattive; rende inoltre possibile l'utilizzo di gruppi reattivi già esistenti o che possono essere introdotti nella superficie del materiale con la proporzione di una molecola per ogni gruppo reattivo. Può essere inoltre realizzato in maniera diretta o indiretta, attraverso l'introduzione di una molecola che svolge la funzione di spaziatore. In assenza di precise indicazioni che includono direttive su dove e tra quali elementi creare i legami, i peptidi e/o le proteine si legano ai gruppi funzionali presenti nella superficie del biomateriale in maniera del tutto

casuale: non vi è infatti un modo per scegliere quale gruppo funzionale viene utilizzato dalla singola molecola per la realizzazione del legame covalente. Il risultato che si ottiene sulla superficie del biomateriale è un orientamento non uniforme delle biomolecole, le quali a loro volta esporranno i siti di legame ai recettori cellulari in un modo più o meno favorevole. Al contrario le tecniche di funzionalizzazione specifica che permettono il legame di molecole sfruttando lo stesso gruppo funzionale, sono le seguenti:

- Foto-attivazione: introduzione nella sequenza di amminoacidi di un gruppo che è stato attivato tramite l'esposizione ai raggi UV, questo assicura la selettività della reazione chimica e l'omogeneità dell'ancoraggio
- Protezione selettiva e reversibile: questa tecnica prevede la protezione di gruppi potenzialmente reattivi ad eccezione di uno opportunamente scelto, così da raggiungere un ancoraggio uniforme alla superficie. Per ripristinare la funzionalità biologica delle molecole è necessario rimuovere il gruppo protettivo introdotto e rilasciare i gruppi originali reattivi.

I vantaggi della funzionalizzazione covalente sono i seguenti: garantisce una maggiore stabilità rispetto all'adsorbimento fisico perché il legame covalente è forte, si ha un controllo sulla concentrazione e sull'orientamento delle molecole; tra gli svantaggi rientra invece il suo costo elevato [12].

1.13 SEQUENZE PEPTIDICHE IMPIEGATE NELLA FUNZIONALIZZAZIONE DEGLI SCAFFOLD

L'utilizzo di sequenze peptidiche bioattive per la funzionalizzazione dei biomateriali, consente di apportare delle modifiche alla superficie del biomateriale: tali modifiche possono risultare fondamentali per l'adesione, la proliferazione e la crescita cellulare.

I biomateriali utilizzati per l'impianto, in primo luogo devono fornire un supporto strutturale ai tessuti danneggiati, e in secondo luogo devono riuscire ad integrarsi con i tessuti e promuovere la rigenerazione. Al fine di stimolare l'adeguato sviluppo dei tessuti all' interfaccia impianto-tessuto, risulta essere fondamentale la capacità di un biomateriale di supportare l'adesione cellulare; quest'ultima proprietà è però necessaria anche per i materiali che fungono da vettori per le cellule riparative ai siti della ferita. L'adesione cellulare ad uno *scaffold* di biomateriali è infatti un primo passo che riveste un ruolo centrale nell'ambito della rigenerazione di sostituti tissutali *in vitro*. Per ottenere una formulazione di biomateriali più innovativi, la modifica delle superfici dei biomateriali

con fattori pro-adesivi rappresenta una strategia fondamentale, visto il ruolo centrale svolto dalle interazioni cellula-materiale.

Sono note diverse interazioni molecolari che hanno lo scopo di mediare l'adesione cellulare, tuttavia la ricerca si focalizza sull'impiego di peptidi adesivi che utilizzano e attivano i recettori di adesione dell'integrina sulla superficie cellulare.

Le integrine sono dei recettori della membrana eterodimerici che si legano alle proteine all'interno della matrice extracellulare (ECM) tra cui fibronectina, laminina, e vari collagene; sono costituite da una subunità α e una subunità β e l'accoppiamento di queste unità è in grado di fornire la specificità per il ligando. Per esempio la coppia di subunità $\alpha_2\beta_1$ si lega ai membri della famiglia del collagene, $\alpha_5\beta_1$ si lega alla fibronectina e a $\alpha_v\beta_3$ si lega ad un determinato numero di ligandi tra cui fibronectina, vitronectina e fibrinogeno.

Negli ultimi anni, vi è stata una collaborazione fra scienziati e ricercatori di ambiti differenti, quali ingegneria chimica, fisica, biologia, ingegneria delle superfici e medicina, con l'obiettivo di funzionalizzare i polimeri al fine di incentivare delle interazioni specifiche con la superficie cellulare. Nella fase iniziale, per funzionalizzare i biomateriali polimerici si sono utilizzate le proteine adesive dell'ECM come fibronectina, collagene o laminina. L'impiego di tali proteine presentava però alcuni svantaggi dal punto di vista delle applicazioni mediche: le proteine infatti dovevano essere dapprima isolate da altri organismi e poi purificate. Potevano quindi comportare risposte indesiderate e aumentare i rischi di infezione. In aggiunta a questo, esiste il problema che le proteine sono soggette a degradazione proteolitica e a denaturazione. Inoltre un ulteriore fattore da tenere in considerazione è che l'infezione e l'infiammazione possono addirittura accelerare la degradazione delle proteine, quindi soltanto una parte delle proteine ha un corretto orientamento per l'adesione cellulare a causa dell'orientamento stocastico della superficie. La *texture* della superficie è determinata da: carica superficiale, bagnabilità e topografia e può influenzare l'orientamento delle proteine. Le superfici idrofobiche tendono infatti a rendere massima l'interazione con le catene laterali degli amminoacidi idrofobici: questo comporta la denaturazione delle proteine o per lo meno una differente presentazione dei motivi di legame cellulare. Un ulteriore parametro da tenere in considerazione quando si decide di funzionalizzare un opportuno biomateriale sono le condizioni di funzionalizzazione dello stesso: infatti da un lato la popolazione cellulare deve interagire con le biomolecole per un periodo sufficiente ad attivare gli eventi che dipendono dal livello cellulare e dall'altro la concentrazione delle biomolecole deve essere contenuta all'interno di un range ottimale caratteristico della singola biomolecola e quest'ultima deve essere esposta alle cellule con un adeguato orientamento [12].

1.14 PEPTIDE MIMICRY

La maggior parte delle problematiche precedentemente esposte si può superare attraverso l'utilizzo di piccoli peptidi immobilizzati. Questi ultimi infatti presentano una maggiore stabilità verso le condizioni di sterilizzazione, il trattamento termico e le variazioni del pH, possono essere stabilizzati conformazionalmente e si possono ottenere ad un costo più contenuto e ad un più elevato grado di omogeneità. I peptidi hanno inoltre la capacità di indirizzare in modo selettivo una particolare tipologia di recettori di adesione cellulare. A volte i peptidi lineari sono soggetti ad una lenta degradazione enzimatica (anche *in vivo*) ma in alternativa possono essere impiegati piccoli peptidi ciclici, che presentano invece una maggiore stabilità.

Con il termine peptide mimicry o peptidomimetica, si intende quindi una strategia che permette di utilizzare al posto della proteina intera un frammento della stessa; il frammento che costituisce il peptide e viene veicolato sulla superficie del materiale deve essere biologicamente attivo, ovvero deve essere in grado di attivare una risposta cellulare in termini di adesione, proliferazione, differenziamento o qualche altro tipo di effetto benefico.

I peptido-mimetici possono essere definiti come tutti gli analoghi peptidi studiati per potenziare l'attività biologica o stabilizzare la sequenza nei confronti della degradazione enzimatica. Le principali modifiche sono rappresentate da cambiamenti nei terminali amminici o carbossilici, l'inserimento di AA a configurazione invertita, l'aggiunta di gruppi isosterici o beta-amminoacidi, la sostituzione della struttura secondaria della proteina, la lipidizzazione e la coniugazione con i polimeri.

I peptidi possono essere legati stabilmente ad un materiale attraverso una coniugazione chimica, foto-coniugazione o coniugazione enzimatica. Nella coniugazione chimica vengono utilizzate diverse reazioni chimiche e sostanze, quali ammine reattive, tioli attivi, ciclo addizioni, formazione di ossime o idrazoni e polimerizzazione. Nella foto-coniugazione in presenza di radiazione ultravioletta e un iniziatore si ha una reazione radicalica che permette di legare covalentemente ad esempio lo zolfo al doppio legame, come nel caso della foto coniugazione tiolo-alchene.

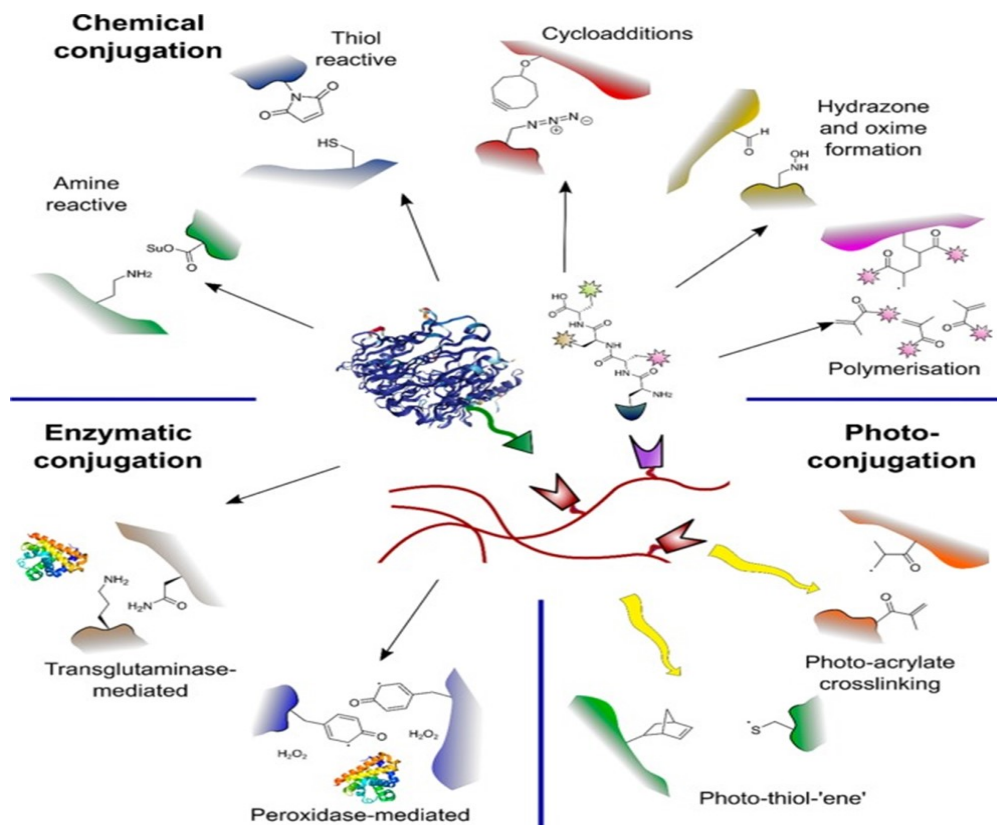


Figura 17: esempi delle principali reazioni di coniugazione

Nello sviluppo di un materiale biomimetico i parametri che risultano particolarmente importanti sono la densità peptidica/proteica cioè la concentrazione di proteina o di peptide per cm^2 : tale requisito è di fondamentale rilevanza perché in ambiente biologico esistono delle finestre di concentrazione individuabili sperimentalmente in cui il sistema funziona, e la biomolecola è in grado di garantire l'effetto desiderato. Un ulteriore parametro da tenere in considerazione è la distribuzione spaziale e l'orientamento delle biomolecole: nella maggior parte dei casi si studia un orientamento ordinato della proteina sulla superficie. Inoltre anche la distanza tra la sequenza bioattiva e la superficie: è importante per l'interazione con le cellule introdurre uno spaziatore che svolga la funzione di distanziare la sequenza peptidica dalla superficie.

1.15 SEQUENZE ADESIVE

L'immobilizzazione di brevi sequenze di peptidi sintetici di ispirazione naturale che sono in grado di imitare i siti di adesione delle proteine naturali, è una strategia che è stata introdotta nelle applicazioni di ingegneria tissutale. Diversi peptidi bioattivi, inclusi YIGSR, CAG, RGD e REDV possono essere specificatamente riconosciuti dalle cellule endoteliali. [13]

La sequenza RGD, individuata nella fibronectina come sequenza minima adesiva cellulare, è nota per la sua capacità di legarsi a diverse integrine. RGD rappresenta infatti il peptide adesivo più utilizzato nella modifica dei biomateriali e può anche promuovere l'incentivazione dell'adesione di un'elevata tipologia di cellule e di piastrine. Tuttavia si evidenzia il fatto che la concentrazione di RGD legato che ottimizza l'adesione dei fibroblasti è diversa dalla concentrazione che di RGD che invece promuove la proliferazione dei fibroblasti. Questo approccio è applicabile ad ogni biomolecola: occorre quindi trovare il giusto intervallo all'interno della finestra delle varie concentrazioni che consentono di ottenere l'attività desiderata e trovare la concentrazione ottimale per lo scopo trattato. Idealmente poi si vorrebbe giungere alla scoperta di nuovi peptidi che presentino un legame selettivo per ogni tipologia di cellula. Nel seguente studio le cellule di nostro interesse sono le cellule endoteliali, ed è opportuno trovare una sequenza peptidica che non sia coinvolta nell'aggregazione del coagulo come invece è la sequenza RGD.

Ad esempio all'interno delle sequenze adesive utilizzate nell'ambito dei biomateriali per la promozione del processo di angiogenesi, rientra la sequenza isoleucina-lisina-alanina-valina (IKVAV), che deriva dalla catena alfa della laminina. [14, 15]

La sequenza tirosina-isoleucina-glicina-serina-arginina (YIGSR) è invece un peptide sintetico derivato dalla laminina in grado di indurre l'adesione di cellule endoteliali (ECs, *endothelial cells*) ed anche di promuovere la formazione di reti tubulari.[27, 28]. Tale sequenza YIGSR media anche l'adesione e la migrazione di diversi tipi di cellule tra cui le cellule endoteliali (ECs), i fibroblasti e le cellule del muscolo liscio (SMCs, *smooth muscle cells*).

Per ottenere la funzionalizzazione di dispositivi che presentano un contatto diretto con il sangue, una caratteristica essenziale è che la superficie impiantata sia antitrombotica: tale requisito riesce ad essere soddisfatto se si riesce a stimolare la produzione di endotelio. A tale scopo, per la funzionalizzazione del tessuto decellularizzato, si prediligono le sequenze peptidiche caratterizzate da una maggiore specificità per le cellule endoteliali, tra cui la sequenza REDV.

1.16 REDV

Il tetrapeptide arginina-acido glutammico-acido aspartico-valina (REDV) è un peptide di adesione identificato per la prima volta nel 1986. Il peptide è contenuto in una regione altamente idrofila del segmento di connessione di tipo IIICS (CS5) della fibronectina plasmatica umana. La proprietà che contraddistingue questa sequenza peptidica è quella di essere altamente specifica per le cellule endoteliali e queste interazioni vengono mediate dall'integrina $\alpha_4\beta_1$.

La sequenza REDV, negli ultimi anni, è stata studiata per attuare la modifica superficiale dei biomateriali destinati ad essere in contatto con il sangue. Il peptide ha infatti la capacità di far aderire e proliferare selettivamente le cellule endoteliali (ECs) mentre inibisce l'adesione delle cellule muscolari lisce (SMCs) dei fibroblasti e delle piastrine. [16] Inizialmente il funzionamento dell'REDV è stato verificato sui materiali sintetici. [17, 18] Questa sequenza, incorporata nelle proteine bioartificiali è stato in grado di promuovere l'adesione delle cellule endoteliali della vena ombelicale umana (HUVECs, *human umbilical vein endothelial cells*).

Ad oggi, i tentativi di utilizzo del tetrapeptide REDV per la funzionalizzazione delle matrici extracellulari decellularizzate sono pochi: tra questi si individuano lo studio di Aubin *et al. in vitro* (dPVCs, *decellularized ovine pulmonary heart valve cusps*) e *in vivo* (dAoGs, *decellularized aortic grafts*) e lo studio di Dal Sasso *et al. in vitro* (DBP, *decellularized bovine pericardia* e DAo *decellularized porcine aortas*). Questi studi prevedevano la funzionalizzazione degli *scaffold* biologici con la sequenza peptidica REDV al fine di promuovere l'endotelizzazione.

Nello studio di Aubin *et al.* La tecnica utilizzata usata per funzionalizzare il tessuto decellularizzato con il tetrapeptide REDV è stata l'adsorbimento fisico. Quest'ultimo metodo di funzionalizzazione presenta come principale vantaggio la semplicità, tuttavia comporta anche lo svantaggio di fornire un orientamento casuale del peptide bioattivo e di consentire la reversibilità della funzionalizzazione. Il de-adsorbimento del peptide adesivo può quindi comportare una possibile inibizione dell'adesione cellulare. Per quanto concerne l'endotelizzazione *in vivo*, tale studio non ha portato risultati significativi dal punto di vista statistico: la ragione della non significatività dei risultati ottenuti può essere dovuta alla strategia di funzionalizzazione utilizzata.[19]

D'altra parte la strategia di funzionalizzazione covalente può essere una tecnica di immobilizzazione della sequenza in grado di garantire irreversibilità e stabilità, in modo tale da controllare l'orientamento del peptide, l'esposizione ai recettori cellulari e soprattutto evitare il rischio di de-adsorbimento: per tali motivi si preferisce un'immobilizzazione covalente del peptide allo *scaffold* biologico. La sequenza peptidica legata alla superficie mediante tale strategia, può favorire l'adesione delle cellule endoteliali e incrementare l'emocompatibilità del materiale. Tale tecnica è stata messa in atto da Eleonora Dal Sasso *et al.* L'obiettivo è stato quello di valutare se e successivamente in quali condizioni l'immobilizzare covalentemente *in vitro* di matrici di pericardio bovino decellularizzato e radici aortiche porcine decellularizzate con il tetrapeptide REDV (a concentrazioni 10^{-6} M e 10^{-5} M) sia in grado di produrre un'endotelizzazione più rapida. I risultati di questo studio hanno dimostrato che l'ancoraggio covalente di REDV allo *scaffold* pericardico e aortico decellularizzati, effettuato in soluzione acquosa senza cross-linking del collagene, accelera l'adesione e la proliferazione cellulare (HUVECs) e di conseguenza

l'endotelizzazione rispetto al controllo che era rappresentato da (DBP e DAos non funzionalizzati), in particolare nel caso della concentrazione più elevata (10^{-5} M). [13]

I risultati ottenuti indicano indirettamente l'importanza della strategia di funzionalizzazione nell'ottenere degli *scaffold* biologici bioattivi.

1.17 SCOPO DELLA TESI

Nell'ambito della rigenerazione tissutale e nell'utilizzo di tessuti decellularizzati per l'implantologia, in particolare nelle applicazioni cardiovascolari, la mancanza di un rivestimento endoteliale stabile rappresenta la principale causa della comparsa di problematiche legate all'emocompatibilità, quali la formazione di trombi. La strategia per evitare tali problematiche risulta essere quella di incentivare l'endotelizzazione, operando una specifica funzionalizzazione della matrice decellularizzata al fine di promuovere l'adesione selettiva delle cellule endoteliali (HUVEC). I tessuti decellularizzati vengono quindi funzionalizzati con opportune biomolecole al fine di permettere l'adesione di uno strato superficiale di cellule endoteliali: l'obiettivo è ricreare una superficie antitrombotica per antonomasia. Il miglior modo per rendere la superficie antitrombotica è ricoprire il lume del vaso con un monostrato di cellule endoteliali che rappresenta una superficie adatta al contatto con il sangue, l'unica superficie non trombogena che eviti la creazione di aggregazioni o trombi e tutti i rischi che essa comporta. Per attirare le cellule endoteliali del cordone ombelicale (HUVEC), viene utilizzata la sequenza REDV che è un tetrapeptide composto da 4 amminoacidi: arginina, acido aspartico, acido glutammico e valina. Tale sequenza adesiva è selettiva per le cellule endoteliali, ma non lo è per le cellule muscolari lisce, per le piastrine e per i fibroblasti. Questo è un aspetto di grande rilevanza perché utilizzare una sequenza che non favorisca l'adesione delle piastrine assume una connotazione positiva dal momento che introduce la possibilità di realizzare sostituti cardiovascolari che non comportino interazioni tra la parete del dispositivo e le piastrine che possano originare trombi. Vi è la necessità di legare in modo stabile la sequenza adesiva alla matrice biologica, l'ancoraggio riveste infatti un ruolo di primaria importanza perché un peptide adesivo che si trovi libero in soluzione genera un effetto opposto a quello desiderato: può portare quindi ad una inibizione dell'adesione cellulare [12]. Nel precedente studio di Dal Sasso *et al. in vitro* (DBP, *decellularized bovine pericardium* e DAo *decellularized porcine aortas*), il tessuto di pericardio bovino decellularizzato (DBP) è stato funzionalizzato selettivamente con il tetrapeptide REDV con soluzioni a concentrazioni di lavoro di 10^{-5} M e 10^{-6} M. Utilizzando tali concentrazioni del peptide, le cellule vitali e la produzione di MTS erano statisticamente più elevate nei tessuti funzionalizzati rispetto al controllo. L'immobilizzazione selettiva di REDV si è quindi rivelata efficace nell'accelerare l'adesione delle EC, promuovendone

la proliferazione nei tessuti decellularizzati funzionalizzati destinati all'impiego nell'ambito di applicazioni a contatto con il sangue.[13]

Lo scopo di questo lavoro di tesi è stato quello di operare la funzionalizzazione del tessuto di pericardio bovino decellularizzato con soluzioni di funzionalizzazione ad una concentrazione di peptide REDV aldeide più elevata, rispettivamente 10^{-3} M e 10^{-4} M, al fine di rilevare se maggiori concentrazioni del peptide favoriscano un aumento dell'adesione delle cellule HUVEC. Dal precedente lavoro di tesi "Funzionalizzazione covalente di matrici biologiche per promuovere l'endotelizzazione" (Laureanda: Doina Belei; Relatore: Monica Dettin; Tesi di Laurea in Bioingegneria Università di Padova), è stato infatti dimostrato che aumentando la concentrazione del peptide in soluzione, aumenta la quantità di peptide effettivamente legato alla superficie del tessuto. E' quindi possibile regolare la resa di funzionalizzazione facendo variare la concentrazione iniziale del peptide, come indicato nella Tabella 1 che riporta la quantità di peptide effettivamente legata al tessuto di DBP.

<i>Concentrazione di funzionalizzazione [M], pH 7.4</i>	<i>Densità superficiale [pMoli/cm²]</i>	
	<i>Serosa</i>	<i>Fibrosa</i>
10^{-3} M REDV (TAMRA) aldeide	42.4	23.8
10^{-4} M REDV (TAMRA) aldeide	22.98	20.74

Tabella 1: densità superficiale del peptide REDV aldeide sul DBP alle concentrazioni 10^{-4} M e 10^{-3} M a pH 7.4

Sia la funzionalizzazione a concentrazione 10^{-3} M che a concentrazione 10^{-4} M hanno permesso di ottenere una densità superficiale della serosa maggiore rispetto alla fibrosa. Considerando entrambe le concentrazioni, l'intensità del segnale e la quantità di peptide legato allo scaffold risultano maggiori rispetto a quanto ottenuto alle concentrazioni 10^{-6} M e 10^{-5} M, come evidenziato dai risultati ottenuti nel lavoro di Dal Sasso *et al. in vitro* (DBP, *decellularized bovine pericardia* e DAo *decellularized porcine aortas*), e riportati in Tabella 2 [13].

DBP

Functionalization concentration [M]	Surface density [mol/cm ²]	
	Serosa	Fibrosa
10 ⁻⁵ REDV	1.17 ± 0.37 × 10 ⁻¹³	1.01 ± 0.50 × 10 ⁻¹³
10 ⁻⁶ REDV	8.14 ± 1.77 × 10 ⁻¹⁶	1.00 ± 0.62 × 10 ⁻¹⁵

Tabella 2: densità superficiale del peptide REDV aldeide sul DBP alle concentrazioni 10⁻⁵ M e 10⁻⁶ M a pH 7.4

L'obiettivo del seguente lavoro di tesi è quello di determinare sperimentalmente la finestra di concentrazione ottimale per il peptide REDV aldeide affinché esso sia in grado di garantire la specifica attività biologica: è infatti fondamentale ricordare che la concentrazione del peptide REDV deve essere contenuta all'interno di un intervallo ottimale caratteristico per lo specifico effetto che si vuole promuovere.

CAPITOLO 2: MATERIALI E METODI

2.1 MATERIALI

Vengono di seguito presentati i principali materiali utilizzati nel lavoro di tesi

2.1.1 Reagenti e solventi

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

- Amminoacidi Fmoc-protetti
- Acetonitrile
- Cloridrato di idrossilammina
- N,N-Dimetilformammide (DMF)
- 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio esafluorofosfato (HBTU)
- Etil ciano(idrossiammino)acetato (Oxyma Pure)
- Resina Rink Amide MBHA

Reagenti forniti da *Honeywell* (North Carolina, USA):

- Metanolo

Reagenti forniti da *Sigma-Aldrich Chemie GmbH* (Steinheim, Germany):

- Imidazolo
- Periodato di sodio
- Trietilammina (TEA)

Reagenti forniti da *Biosolve* (Valkenswaard, Holland):

- Acido trifluoroacetico (TFA)
- Dietiletere
- N-etil-diisopropilammina (DIPEA)
- Piperdina

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

- N-metil-2-pirrolidone (NMP)

Reagenti forniti da *Novabiochem* (Darmstadt, Germany):

- 5-(6)carbositetrametilrodamina (TAMRA)

Reagenti forniti da *Merck KGaA* (Darmstadt, Germany):

- Trietossisilano (TES)
- Sodio cianoboroidruo

Reagenti forniti da *Sigma-Aldrich* (St. Louis, MO, USA):

- Diclorometano (DCM)
- Tampone fosfato salino (PBS)

2.1.2 Sequenze peptidiche utilizzate

Il peptide utilizzato per la realizzazione del seguente lavoro di tesi è: SxxREDV, e la sequenza di amminoacidi da cui è composto è la seguente: H-Ser-x-x-Arg-Glu-Asp-Val-NH₂;

Dove, x = acido 7-amminoeptanoico

PM= 857.987 Da

Tale peptide SxxREDV è stato sintetizzato durante questo lavoro di tesi.

2.2 STRUMENTI

Vengono indicati i principali strumenti utilizzati.

2.2.1 Sintetizzatore per sintesi peptidica su fase solida

Al fine di realizzare la sintesi del peptide SxxREDV si è impiegato il sintetizzatore automatico modello Syro I prodotto dalla *MultiSynTech* (Witten, Germania).

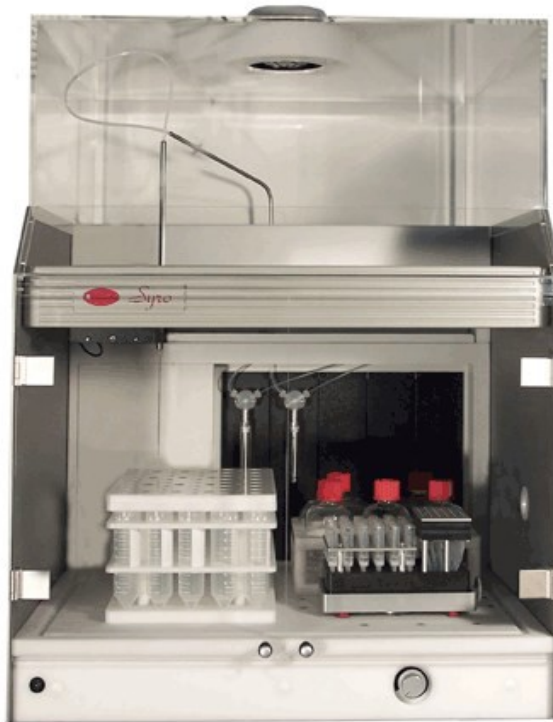


Figura 18: Sintetizzatore Syro I

2.2.2 Spettrofotometro per il test alla piperidina

Per eseguire il test alla piperidina è stato utilizzato lo spettrofotometro UV/Vis modello Lambda 2 (*Perkin Elmer*, Waltham, Massachusetts, USA).



Figura 19: spettrometro UV/Vis Lambda 2

2.2.3 MALDI-TOF per analisi di massa

Le analisi di massa per l'identificazione del peptide sono state effettuate presso il Dipartimento di Scienze Chimiche dell'Università degli studi di Padova (Prof. C. Zonta), con lo strumento MALDI-TOF 4800 Plus (*AB SCIEX*).

2.2.4 HPLC per analisi cromatografica

Al fine di performare la purificazione e l'analisi del peptide sono stati utilizzati i seguenti sistemi cromatografici:

Per l'analisi RP-HPLC semipreparativa, il sistema è costituito da:

- Sistema di pompaggio multisolvente HPLC modello Waters 600 Controller (*Waters Corporation*, Milford, Massachusetts, USA);
- Rilevatore UV/VIS multicanale a lunghezza d'onda programmabile modello Waters 2487 (*Waters Corporation*, Milford, Massachusetts, USA);
- Registratore su carta modello BD40/BD41 Recorder (distribuito dalla *Carlo Erba Strumentazione* e prodotto dalla *Kipp & Zonen*, Delft, Olanda).

Per l'analisi RP-HPLC analitica, il sistema è invece composta da:

- Sistema di pompaggio multisolvente HPLC modello Waters 600E Controller (*Waters Corporation*, Milford, Massachusetts, USA);
- Autocampionatore modello Waters 717 (*Waters Corporation*, Milford, Massachusetts, USA);
- Rilevatore UV/VIS multicanale a lunghezza d'onda programmabile modello 996 PDA (*Waters Corporation*, Milford, Massachusetts, USA);
- Software Empower Pro, sviluppato da *Waters Corporation* (Milford, Massachusetts, USA), utilizzato per gestire il sistema e i dati cromatografici.

Per l'esecuzione delle analisi cromatografiche vengono utilizzati due eluenti diversi:

- Eluente A: 0.05% TFA in H₂O MilliQ;
- Eluente B: 0.05% TFA in acetonitrile CH₃CN

Per le analisi cromatografiche vengono impiegate colonne costituite da gel di silice funzionalizzata, che presentano catene idrocarburiche lineari di atomi di carbonio (fase stazionaria apolare), con caratteristiche diverse:

- Colonna Zorbax 300SB C18 semipreparativa (5 µm, 300 Å, 9,4 × 250 mm) (*Agilent*, Santa Clara, California, USA);
- Colonna Vydac 218TP C18 analitica (5 µm, 300 Å, 4,6 × 250 mm) (*Grace*, Columbia, Maryland, USA)

2.2.5 Ulteriore strumentazione

Di seguito viene elencata ulteriore strumentazione utilizzata durante il lavoro di tesi :

- Bilancia analitica modello Mettler AE240 (*Mettler Toledo*, Columbus, Ohio, USA);
- Agitatore magnetico modello Microstirrer (*Velp Scientifica*, Usmate Velate, Italia);
- Distillatore d'acqua da laboratorio modello Stuart D4000 (*Norrscope*, Chelmsford, Essex, Regno Unito);
- Sistema di purificazione dell'acqua modello Milli-Q Integral for UltraPure Water (*Merck Millipore*, Burlington, Massachusetts, USA);
- Bagno ad ultrasuoni modello Branson 1200 (*Branson Ultrasonics Corp.*, Danbury, Connecticut, USA);
- Evaporatore rotante Laborota 4000-Efficient (*Heidolph Instruments*, Schwabach, Germania);

- Liofilizzatore FreeZone 2.5 Liter Benchtop (*Labconco*, Kansas city, Missouri, USA).
- Il lettore di micropiastre multimodale modello Tecan Spark Control Method Editor (Tecan, Männedorf, Switzerland), restituisce un file Excel (Microsoft, Redmond, USA) contenente i valori dell'assorbanza di ogni pozzetto della piastra.
- Cappa a sicurezza biologica modello Thermo Scientific MSC-Advantage
- Incubatore Heraeus Kendro HeraCell 5% CO₂, 95 % O₂, 37 ° C
- Microscopio Evos XL Core (PeptoTech ,Cranbury, New Jersey)
- pH-metro modello sensionIONTM +pH3, prodotto da HACH (Padova, Italia)

2.3 METODI

Le procedure sperimentali impiegate durante questo lavoro di tesi sono di seguito elencate.

2.3.1 Sintesi peptidica su fase solida (SPPS)

2.3.1.1 Procedura generale

Il peptide impiegato per la funzionalizzazione del DBP è stato sintetizzato presso il laboratorio di Bioingegneria Chimica del Dipartimento di Ingegneria Industriale, mediante la tecnica Solid-Phase Peptide Synthesis (SPPS), attraverso l'utilizzo della chimica Fmoc.

La sintesi peptidica su fase solida (SSPS), è una tecnica di sintesi peptidica definita nel 1963 da Bruce Merrifield: è largamente utilizzata in quanto risulta essere vantaggiosa perché la creazione di peptidi su piccola/media scala; può infatti essere definita come un processo che vede la costruzione di peptidi per successiva aggiunta degli amminoacidi protetti che ne compongono la sequenza e che vengono legati ad un polimero insolubile, tramite il loro C-terminale [20].

La sintesi su fase solida è composta principalmente da 5 passaggi:

1. Assemblaggio della catena di amminoacidi su un supporto, che è la resina
2. Sblocco della resina e rimozione dei gruppi protettori in catena laterale
3. Purificazione da eventuali sottoprodotti
4. Eventuali modifiche chimiche post sintesi
5. Caratterizzazione peptidica

Partendo da un supporto solido insolubile, definito resina, vengono legati, uno ad uno, gli amminoacidi nella direzione orientata dall'estremità C-terminale all'estremità N-terminale: in questo modo avviene la sintesi della catena peptidica. Grazie a questo metodo si può effettuare la sintesi in un unico reattore perché la resina consente, attraverso semplici filtraggi, di isolare il

peptide in crescita dalla restante soluzione di reazione: questo garantisce uno spreco di materiale inferiore e una riduzione dei tempi necessari per la realizzazione della sintesi del peptide.

Il metodo di sintesi prevede che il gruppo carbossilico di un amminoacido, che ha il gruppo amminico protetto reversibilmente, venga legato alla resina attraverso un opportuno *linker*: l'esecuzione corretta di questa prima fase, che prende il nome di *loading*, viene valutata attraverso il test della piperidina. Quando il primo amminoacido è stato ancorato, viene rimossa la protezione del gruppo amminico e si esegue la condensazione con il terminale carbossilico, che è stato preventivamente attivato, con l'amminoacido successivo, che a sua volta presenta il terminale amminico protetto: ciò comporta la conseguente formazione di un nuovo legame peptidico.

Il peptide in crescita resta ancorato al supporto, mentre i prodotti secondari sono eliminati attraverso cicli di lavaggio e filtrazione. Tale procedimento si ripete per tutti gli amminoacidi che compongono la catena peptidica desiderata. Quindi gli elementi fondamentali di tale procedura di sintesi sono individuati in una serie di cicli di de-protezione e condensazione, che prende il nome di *coupling*. Al fine di garantire la creazione del legame peptidico tra il gruppo amminico di un amminoacido e il gruppo carbossilico del successivo, dato che gli α -amminoacidi sono molecole bifunzionali e alcuni anche trifunzionali, è necessario, proteggere i gruppi reattivi in catena laterale con dei gruppi protettori. Tale tipologia di protezione prende il nome di "protezione ortogonale": una caratteristica essenziale di questi gruppi protettori deve essere quella di restare stabili durante le operazioni di de-protezione del terminale α -amminico della catena principale, altrimenti non svolgerebbero la loro funzione. Durante questa procedura di sintesi possono formarsi sottoprodotti differenti composti da sequenze peptidiche troncate o incomplete, caratterizzate dalla mancanza di uno o più residui amminoacidici; purificare il prodotto desiderato da queste impurezze potrebbe essere complicato data la somiglianza: è quindi necessario effettuare dei test al fine di verificare l'andamento della reazione. Prima della rimozione dei gruppi protettori in catena laterale e della "separazione" del peptide dalla resina, di norma viene eseguito il test alla ninidrina, per verificare la resa finale delle reazioni di *coupling*.

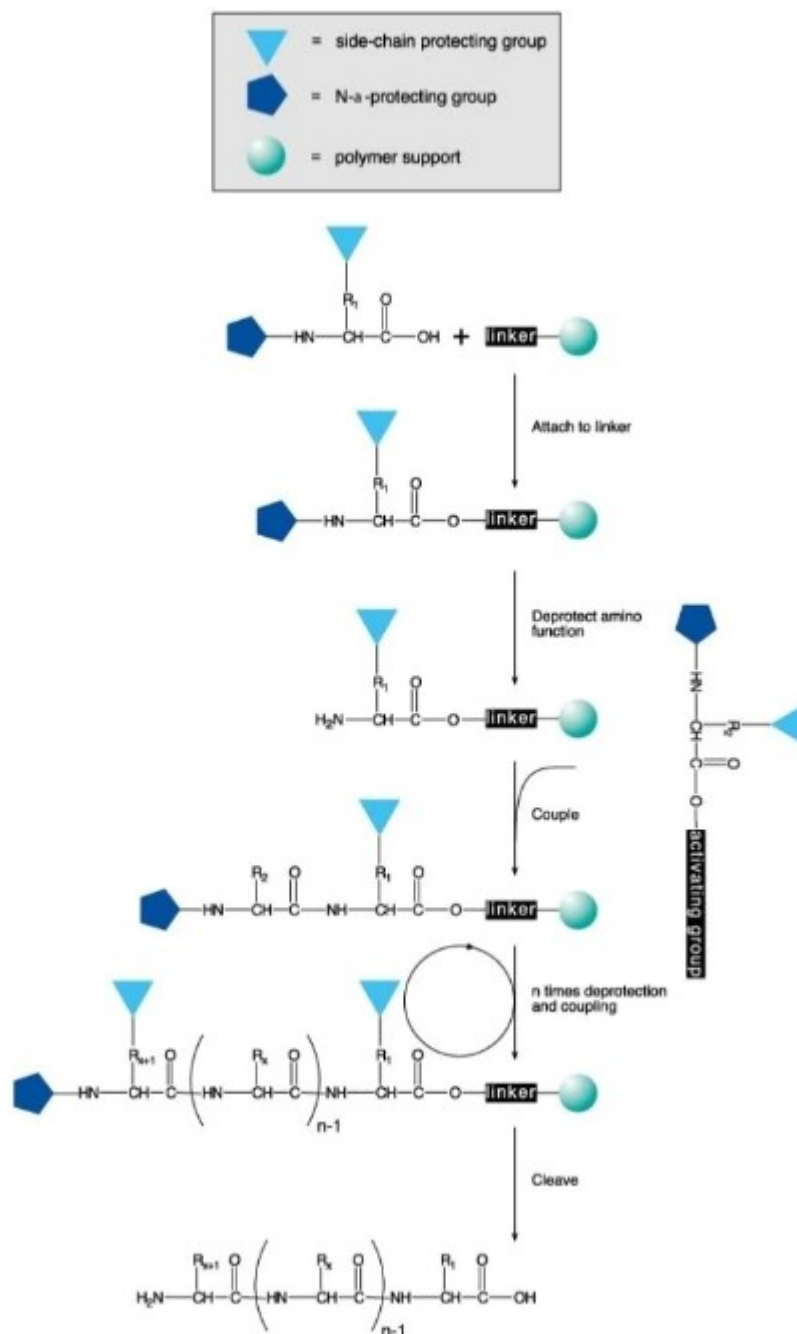


Figura 20: schema della sintesi peptidica su fase solida

Resina

Le tipologie di supporti solidi in commercio sono diverse, tra i più utilizzati troviamo le resine polimeriche o poliacrilammidiche che hanno la capacità di gonfiarsi quando interagiscono con i supporti polari come N,N-dimetilformammide (DMF), N-metil-2-pirrolidone (NMP) e diclorometano(DCM). La chimica che caratterizza la sintesi e il peptide ottenuto successivamente allo sblocco (*cleavage*) sono determinati a seconda della specifica resina utilizzata.

Le resine impiegate per la sintesi peptidica possono essere già funzionalizzate con il primo amminoacido, protetto in catena laterale e al gruppo amidico e resine con un'ampia varietà di *linker*.

In questo lavoro di tesi, la resina utilizzata per la SPPS del tetrapeptide SxxREDV è la resina Rink Amide MBHA che è ottenuta mediante l'aggancio tra il Rink Amide linker (Fmoc-2,4-dimetossi-4'-benzidrilamina) e la resina MBHA (aminometilica) attraverso la Norleucina (Nle). Si può evidenziare che la funzionalità amminica si libera in seguito allo sblocco del gruppo protettore (Fmoc) e permette la reazione con il gruppo carbossilico dell'amminoacido da condensare. In seguito allo sblocco in ambiente acido, il peptide possiede una funzionalità ammidica all'estremità C-terminale. Per la sintesi del tetrapeptide SxxREDV sono stati utilizzati 240 mg di resina (grado di funzionalizzazione =0.52 mmol/g , scala di sintesi 0.125 mmoli).

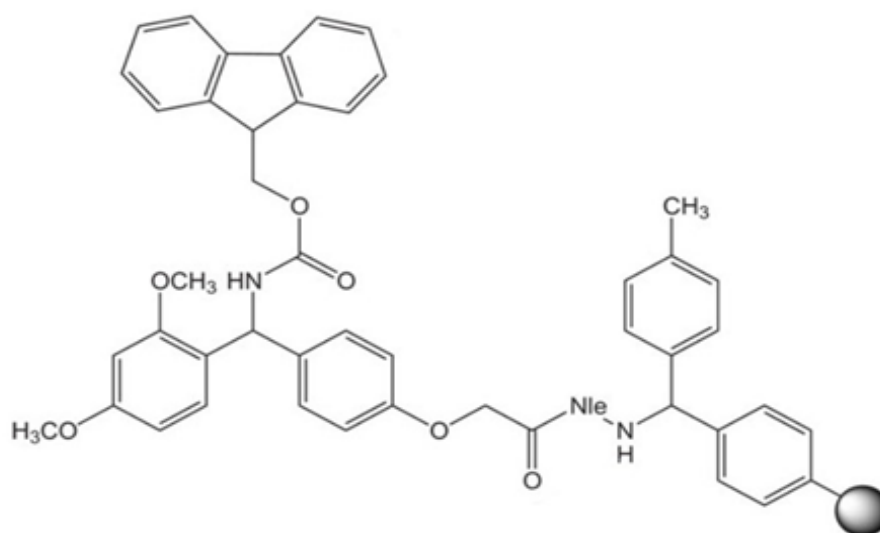


Figura 21: struttura della resina Rink Amide MBHA

Deprotezione del gruppo Fmoc

La più nota combinazione “ortogonale” dei gruppi protettori è rappresentata da Fmoc/tBu. La prima volta in cui venne utilizzato il termine “ortogonale” fu nel 1977 da Barany e Merrifield allo scopo di descrivere “le classi dei gruppi protettori che vengono rimossi da diversi meccanismi chimici”. Questi possono quindi essere rimossi in un ordine qualsiasi e alla presenza delle altre classi. Lo schema di protezione ortogonale permette di ottenere delle condizioni di reazione complessivamente blande e la sintesi dei peptidi parzialmente protetti. Grazie allo sviluppo della combinazione ortogonale Fmoc è diventato il più importante gruppo protettore del terminale amminico.[21]

Nella chimica Fmoc si utilizzano amminoacidi con il terminale aminico protetto 9-fluoroenilmetossicarbonile e con i gruppi reattivi delle catene laterali protetti con i gruppi acidolabili. Il gruppo Fmoc (figura 22) viene rimosso con una soluzione di piperidina in DMF; il legame tra la resina e il peptide è rimosso tramite il trattamento con acido trifluoroacetico (TFA): condizione che consente di attuare anche lo sblocco dei gruppi protettori delle catene laterali.

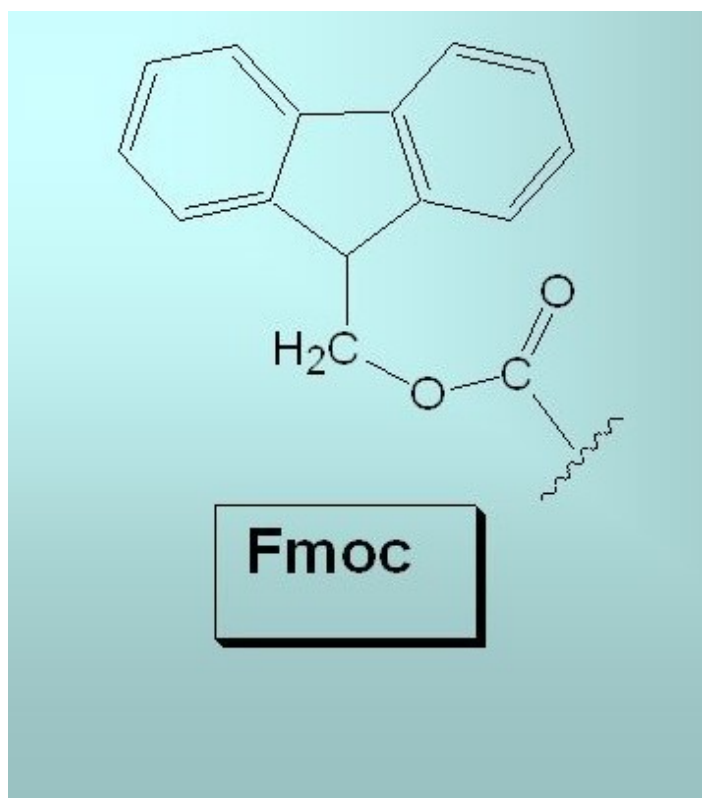


Figura 22: *Struttura chimica del gruppo protettore Fmoc*

Attivazione del gruppo carbossilico

Nelle reazioni di coniugazione che avvengono durante la sintesi di un peptide, costituiscono requisiti fondamentali non solo l'accessibilità e la reattività della funzione amminica libera, ma anche la reattività del gruppo carbossilico dell'amminoacido che deve legarsi alla catena peptidica in formazione. Tale gruppo deve essere attivato, quindi reso maggiormente elettrofilo.

Si cerca di ottenere rese di *coupling* molto elevate, cercando però di non favorire possibili reazioni secondarie [22], attraverso il gruppo attivante adeguato.

Per procedere all'attivazione del gruppo carbossilico vengono usati i seguenti reagenti, le cui strutture sono rappresentate in figura 23:

- 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio esafluorofosfato (HBTU) agente attivante vero e proprio

- Oxima Pure agente impiegato per prevenire la racemizzazione e per scoraggiare le eventuali reazioni secondarie, aumentando l'efficienza e la velocità di reazione. Viene utilizzato come alternativa, non esplosiva del reagente 1-idrossibenzotriazolo idrato (HOBt)
- N-etil-diisopropilammina (DIPEA) è un'ammina terziaria utilizzata per creare un ambiente leggermente basico e impedire la protonazione del gruppo amminico.

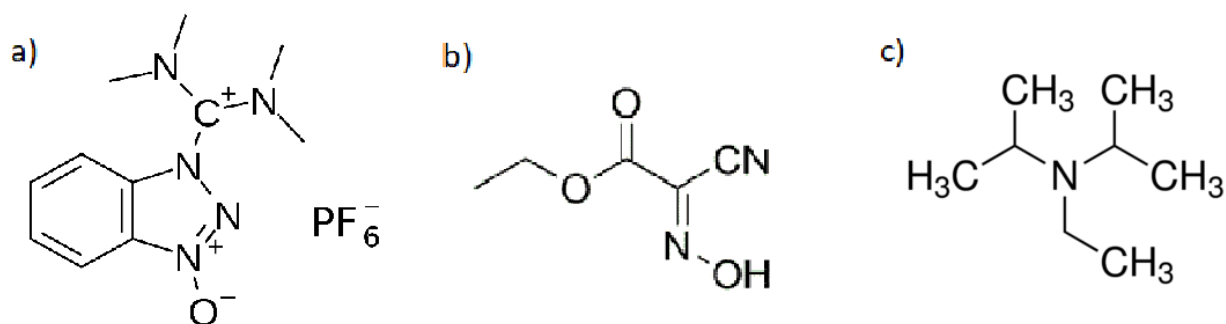


Figura 23: composizione chimica dei reagenti: a) HBTU, b) Oxima Pure, c) DIPEA

La procedura di attivazione del gruppo carbossilico è automatizzata. Il nuovo amminoacido attivato deve essere condensato (*coupling* singolo) con il gruppo amminico del ultimo amminoacido legato alla catena in crescita sulla resina, nelle seguenti condizioni: 1 mL di soluzione 0.62 M dello Fmoc-amminoacido in DMF; 1.4 mL di soluzione in 0.45 M di HBTU/Oxyma Pure in DMF; 0.695 mL di soluzione 1.8 M di DIPEA in NMP.

La reazione ha una durata di esattamente 45 minuti (alternando 15 secondi di agitazione vortex ogni 3 minuti di reazione).

Successivamente sono eseguiti 5 cicli di lavaggi, impiegando 3 mL di DMF ciascuno.

La sintesi in questo caso è stata condotta con *coupling* doppio così da migliorare la resa finale della sintesi.

Test sulla resa di funzionalizzazione della resina

Per quantificare la funzionalizzazione della resina con il primo amminoacido, protetto al terminale α -amminico e in catena laterale, si utilizza il “test della piperidina”.

Questo test viene di solito eseguito al termine del primo ciclo (*loading*), in cui avviene la reazione di condensazione tra il supporto solido e il primo amminoacido. La sintesi si interrompe in quanto è necessario determinare la percentuale di resa della reazione in modo da assicurarsi l'effettivo avvenimento della reazione di condensazione.

La deprotezione del gruppo amminico legato al supporto solido genera l'N-(9-fluorenilmetil) piperidina, che assorbe a 301 nm ($\epsilon = 7800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Nella figura 24 è illustrato il meccanismo di sblocco del gruppo Fmoc dall'amminoacido su resina.

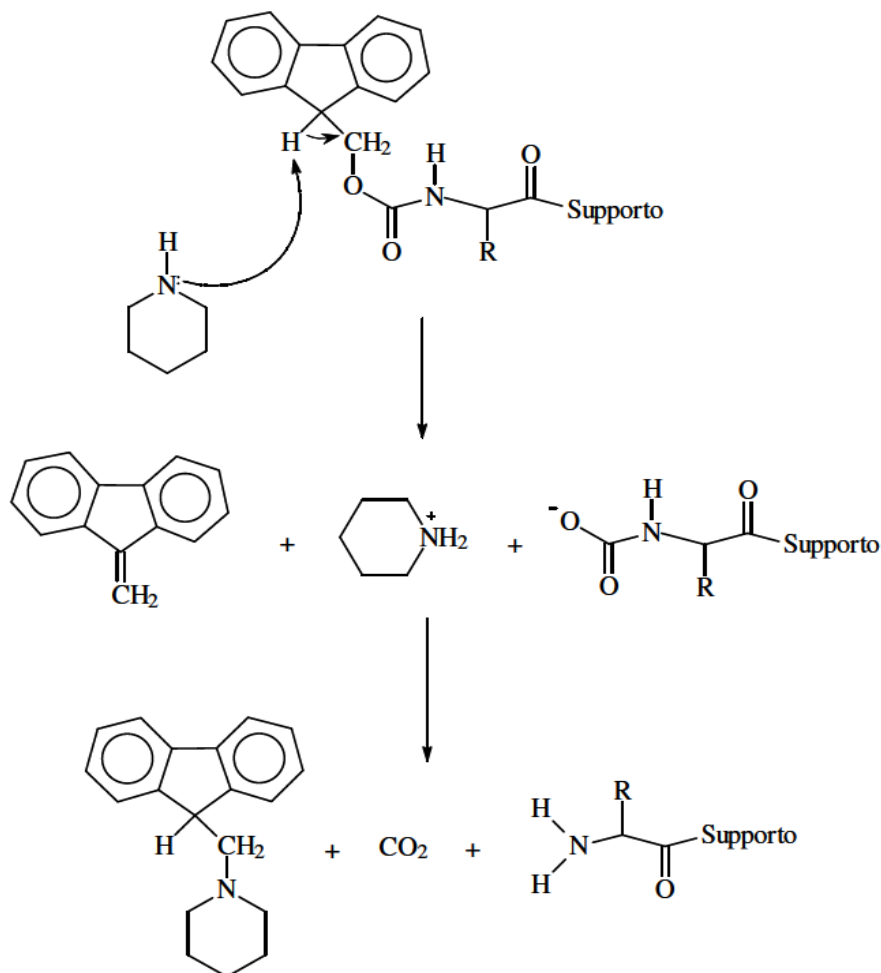


Figura 24: deprotezione con piperidina del gruppo Fmoc dal residuo amminoacido su resina durante il "test alla piperidina"

Si preleva il reattore con la resina funzionalizzata, vengono eseguiti più lavaggi con il DCM. Successivamente la resina viene seccata in una campana da vuoto per circa un'ora. Una volta seccata la resina, si preleva un campione di resina funzionalizzata del peso di circa 4÷ 8 mg. Nella provetta con il peptide in crescita su resina, seccato e pesato si aggiunge 0.5 mL di soluzione al 20% di piperidina in DMF. Tale soluzione deve essere poi lasciata a reagire per 15 minuti, agitando ogni tanto manualmente per garantire che il reagente interagisca con l'intero campione.

Questa reazione permette la deprotezione del gruppo amminico del residuo amminoacidico legato alla resina generando l'N-(9-fluorenilmetil) piperidina. Terminati i 15 minuti, si diluisce la soluzione con DMF fino al raggiungimento del volume di 50, per bloccare la reazione. Successivamente si mescola e si lascia a riposo per consentire alla resina di depositarsi sul fondo.

Lo spettrofotometro UV-Vis viene azzerato a 301 nm utilizzando due cuvette contenenti il 'bianco' (0,5 mL di soluzione al 20% di piperidina in DMF portata a volume di 50 mL con DMF), si sostituisce il contenuto di una delle due cuvette con il campione da analizzare e si legge il valore di assorbanza. La sostituzione sperimentale è calcolata usando la seguente formula:

$$S_{sp} = (Abs_{301} \times V_{sol}) / (\epsilon \times peso)$$

Dove:

- Abs_{301} è l'assorbanza determinata sperimentalmente;
- V_{sol} [mL] è il volume della soluzione usata per la lettura (50 mL);
- $\epsilon = 7800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ è il coefficiente di estinzione molare, il cui valore dipende dal solvente utilizzato;
- $peso$ [g] è il peso in grammi del campione di peptide su resina su cui si è fatta l'analisi.

La sostituzione teorica la si calcola invece nel modo seguente:

$$S_{teorica} = 1000 / PM_{pep_crescita}$$

Dove:

- $PM_{pep_crescita}$ [g/mol] = PM_{resina} [g/mol] + $PM_{residui_amm}$ [g/mol] è il peso molecolare del peptide in crescita ovvero la somma tra il peso della resina (che si ottiene una volta noto il valore della sostituzione della resina indicato sulla confezione) e il peso del residuo amminoacidico legato alla resina.

La percentuale di resa della reazione di funzionalizzazione si ottiene da:

$$\%Resa = (S_{sperimentale} / S_{teorica}) \times 100$$

Generalmente una resa viene considerata buona se la percentuale risulta maggiore del 98%. Se la resa risulta minore si può procedere con un ulteriore ciclo di *coupling* del primo amminoacido per aumentare la resa prima di proseguire con la condensazione degli amminoacidi successivi.

Sblocco del peptide dalla resina e rimozione dei gruppi protettori in catena laterale

Al termine della sintesi peptidica, è necessario liberare il peptide dalla resina e dai gruppi protettori, mediante la procedura dello sblocco. Bisogna fare attenzione se all'interno della sintesi peptidica si utilizzano delle resine acido-labili, perché si può ottenere lo sblocco simultaneo del peptide dalla resina e la liberazione delle catene laterali dai gruppi protettori.

Il processo di deprotezione in ambiente acido può generare specie altamente reattive (es. carbocationi) che possono comportare delle modificazioni covalenti di alcuni amminoacidi. Al fine di ridurre le reazioni collaterali si ricorre, durante lo sblocco con TFA, all'utilizzo di reagenti nucleofili detti *scavengers*, simili chimicamente alle specie da proteggere.

La scelta della miscela di sblocco, del tipo di *scavengers* ed il tempo richiesto dalla deprotezione, dipendono dalla natura e dal numero dei gruppi protettori utilizzati in catena laterale.

Per lo sblocco del peptide utilizzato in questa tesi è stato seguito il protocollo che si suddivide nelle seguenti fasi:

Conclusa la sintesi si sblocca con procedura automatizzata il gruppo Fmoc all'estremità N-terminale della catena, in corrispondenza dell'ultimo amminoacido legato durante la sintesi.

- 1) Il reattore contenente il peptide ancorato alla resina e protetto in catena laterale viene lavato con diclorometano (DCM) e successivamente viene messo a seccare sottovuoto fino a raggiungere un peso costante (in genere per la durata di 2 ore).
- 2) Il reattore contenente il peptide su resina essiccato si posiziona sopra una beuta da vuoto e vengono aggiunti nell'ordine:
 - 125 μ L di acqua milliQ;
 - 0,125 μ L di trietilsilano (TES) (*scavenger*);
 - 4,75 mL di acido trifluoroacetico (TFA)
- 3) Si lascia sotto agitazione magnetica per circa 2 ore a temperatura ambiente;
- 4) La resina viene separata per filtrazione su *gooch* G3 e la soluzione contenente il peptide viene concentrata a piccolo volume mediante l'utilizzo di un evaporatore rotante;
- 5) Si aggiunge velocemente etere dietilico freddo ($\sim 4^{\circ}\text{C}$) per far precipitare il peptide grezzo, lo si filtra tramite *gooch* G4, ed infine lo si secca sottovuoto.

2.3.2 Purificazione e caratterizzazione cromatografica

Per realizzare la purificazione dei peptidi viene utilizzata la tecnica cromatografica Reverse Phase - High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC), schematizzata in figura 25. Inizialmente fu utilizzata come tecnica preparativa, in seguito poi si affermò anche come tecnica analitica, e viene utilizzata in particolare per la separazione di composti non volatili termicamente labili come sono i peptidi.

L'HPLC a fase inversa (RP-HPLC) possiede una fase stazionaria con caratteristiche apolari, e una fase mobile acquosa che può essere addizionata con solventi organici (acetonitrile e isopropanolo).

L'analisi cromatografica si può effettuare in modalità isocratica o in gradiente. Nell'ultimo caso, un aumento graduale di concentrazione di solvente organico rispetto all'acqua incrementa l'idrofobicità della fase mobile e determina la competizione tra questa e la fase stazionaria, con conseguente deasorbimento dell'analita ad una data percentuale di solvente organico e successiva eluizione.

I peptidi si separano meglio quando si trovano in un ambiente acido, di conseguenza la maggior parte delle fasi mobili contiene ridotte concentrazioni di acido trifluoroacetico (TFA). In questo lavoro di tesi si è utilizzato 0.05 % per la preparazione degli eluenti. Il TFA agisce come coppia ionica consentendo l'aumento della ritenzione e favorendo la solubilità dei peptidi. Gli eluenti utilizzati per le analisi sono: 0.05 % TFA in H_2O MilliQ (eluente A), e 0.05% di TFA in acetonitrile (eluente B).

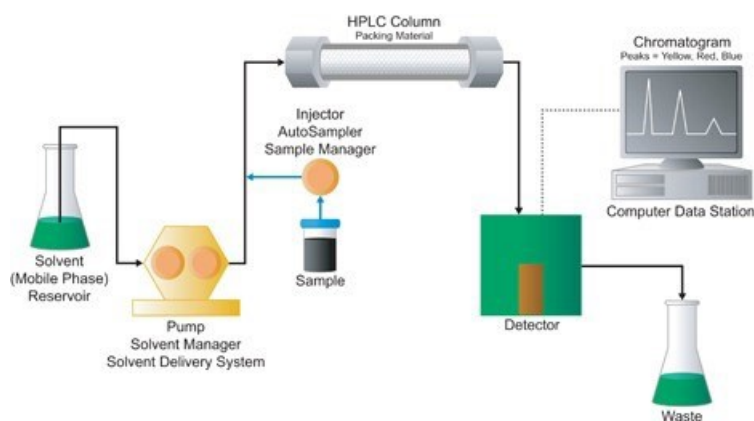


Figura 25: schema di funzionamento dell'analisi cromatografica

Le parti che compongono HPLC sono:

- serbatoi che contengono i solventi, che rappresentano la fase mobile
- pompa ad alta pressione per generare e controllare la portata desiderata della fase mobile
- un iniettore che inserisce il campione all'interno del flusso della fase mobile così da garantire il trasporto del campione all'interno della colonna
- una colonna contenente il materiale impaccato, che rappresenta la fase stazionaria e consente la separazione
- un rilevatore per l'identificazione dei diversi composti che eluiscono dalla colonna
- un computer che elabora il segnale elettrico che viene emesso dal rilevatore restituendo un cromatogramma

La cromatografia “semipreparativa” si riferisce al processo di isolamento di un composto contenuto all’interno di una miscela.

Il campione per la purificazione cromatografica si prepara nel seguente modo: prima di eseguire l’analisi, per il peptide grezzo SxxREDV viene effettuata la reazione di ossidazione della serina con il periodato di sodio, viene pesato e sciolto in acqua MilliQ. La soluzione così preparata viene iniettata in testa alla colonna cromatografica, utilizzando una via solvente-soluzione separata nella cromatografia semipreparativa. In seguito all’eluizione del peptide utilizzando una via eluente dalla colonna semipreparativa, vengono eseguite le corse analitiche sulle varie frazioni raccolte. La cromatografia analitica ha lo scopo di caratterizzare il campione in esame, ovvero arrivare alla sua identificazione, e alla quantificazione del suo grado di purezza. Una volta determinate le condizioni cromatografiche, quindi colonna, fase mobile e gradiente, un dato strettamente indicativo dell’identità del composto è rappresentato dal tempo di ritenzione in colonna.

Inoltre, dal momento che la quantità di campione contenuto nella miscela totale è proporzionale in maniera diretta all’area sottesa dal picco della sostanza, si può ottenere la quantificazione del grado di omogeneità del prodotto ottenuto in seguito alla purificazione, mediante l’integrazione del tracciato cromatografico. In questo lavoro è stata utilizzata la modalità di eluizione in gradiente. La tipologia delle colonne utilizzate è strettamente correlata all’efficienza della separazione in colonna. Le caratteristiche che fanno la differenza sono la loro lunghezza, la dimensione delle particelle utilizzate come rivestimento e la porosità di tali particelle.

Per la caratterizzazione del peptide SxxREDV sono state utilizzate le colonne a gel di silice funzionalizzata:

- Colonna Zorbax 300SB C18 semipreparativa (5 μm , 300 \AA , 9,4 \times 250 mm);
- Colonna Vydac 218TP C18 analitica (5 μm , 300 \AA , 4,6 \times 250 mm).

Come solventi sono stati utilizzati 0.05% TFA in H₂O MilliQ (eluente A) e 0.05% TFA in acetonitrile (CH₃CN) (eluente B), opportunamente degassati con elio.

Il rivelatore è stato impostato alla lunghezza d’onda di 214 nm che corrisponde al massimo di assorbimento del legame peptidico.

Ossidazione della Serina N-terminale

Il peptide SxxREDV prima della purificazione tramite RP-HPLC, è stato sottoposto alla reazione di ossidazione con l’obiettivo di convertire la serina N-terminale in un gruppo OHC-CO- (detto α -oxo aldehyde). Questo gruppo aldeide è utile al fine di ancorare il peptide allo *scaffold* utilizzato,

attraverso una reazione specifica con gruppi amminici di quest'ultimo. L'aldeide è stato ottenuto tramite l'*oxidative cleavage* del residuo amminoacidico Serina mediante una reazione con periodato di sodio (NaIO_4), come riportato in figura 26.

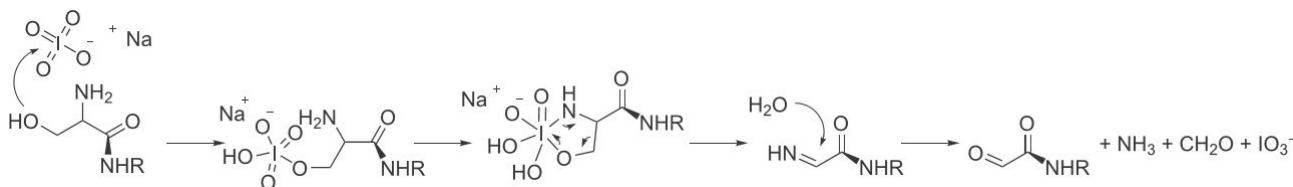


Figura 26: rappresentazione dettagliata della reazione di ossidazione tramite NaIO_4 di una serina N-terminale

Come si può osservare in figura 27, dopo la reazione di ossidazione si nota una diminuzione del peso molecolare del peptide pari a circa 31 Da.

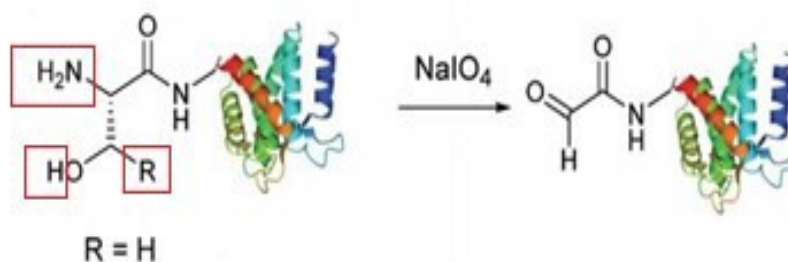


Figura 27: rappresentazione schematica dell'*oxidative cleavage* della serina N-terminale di un peptide/proteina a formare una α -oxo aldehyde

La reazione di ossidazione presenta il vantaggio dovuto alla sua rapidità, tuttavia è necessario eseguirla mantenendo il controllo del pH e del tempo di reazione, con l'obiettivo di evitare un'ulteriore ossidazione del peptide. [23]

2.3.2 Spettrometria di massa

La caratterizzazione dei peptidi viene eseguita sia tramite RP-HPLC analitico che tramite l'analisi di massa. Le analisi di massa sono state eseguite presso il dipartimento di Scienze Chimiche dell'Università di Padova con l'utilizzo dello strumento MALDI-TOF.

Il deasorbimento/ionizzazione laser che vengono effettuate dalla matrice MALDI è una tecnica fondamentale nella spettrometria di massa.

La spettrometria di massa (MS) è un metodo di analisi distruttiva, che permette di misurare la massa molecolare. MALDI-TOF è vantaggiosa in quanto permette di raggiungere dei risultati buoni con una piccolissima quantità di campione da analizzare.

Lo spettrofotometro di massa è costituito da una serie componenti:

- Una camera di ionizzazione: nella quale avviene la ionizzazione dell'analita e suo passaggio allo stato gassoso.
- Un analizzatore. Nelle nostre analisi è stato utilizzato il TOF (*time of flight*- a tempo di volo), gli ioni vengono separati in base al rapporto massa/ carica.
- Un detector la cui funzione è di rilevare gli ioni
- Un computer che elabora il segnale proveniente dal detector, fornendo la rappresentazione lo spettro di massa del composto.

La figura 28 rappresenta lo schema dello spettrofotometro di massa.

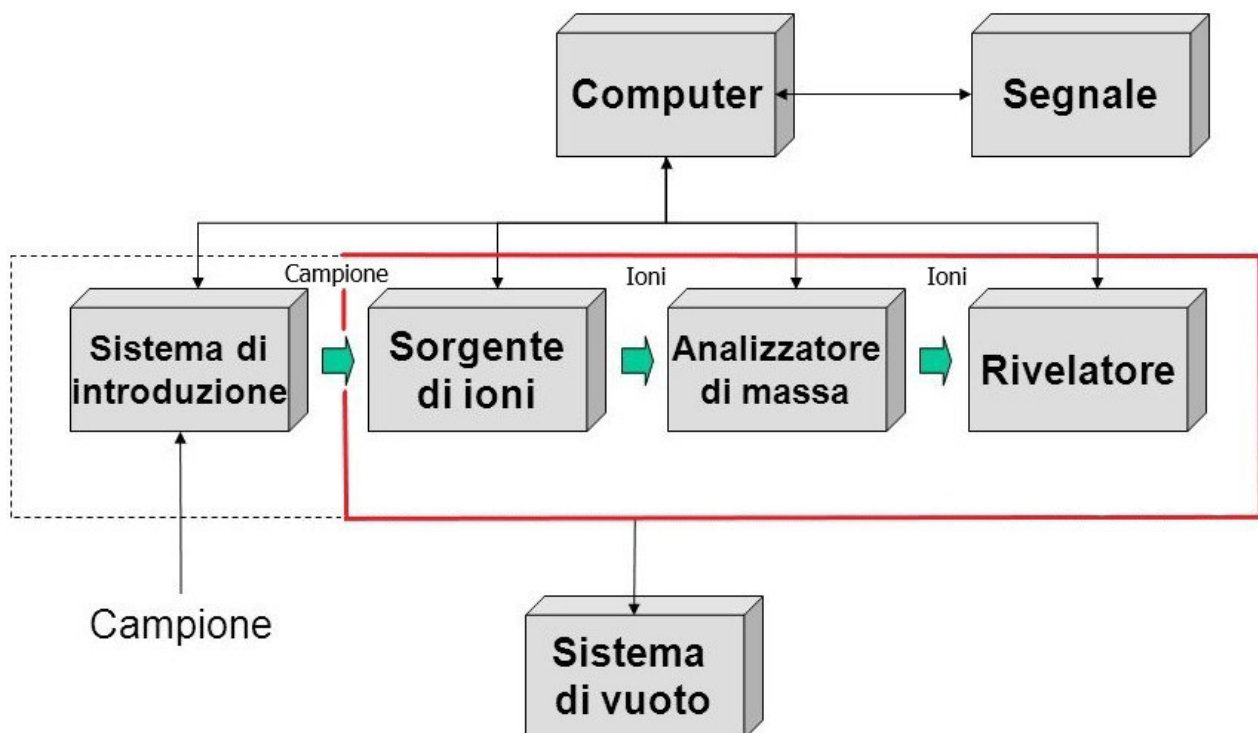


Figura 28: funzionamento dello spettrofotometro di massa

Il campione viene ionizzato all'interno della camera di ionizzazione, tale processo si realizza per impatto con un fascio che può essere di ioni, di elettroni, di atomi o fotoni.

Nel presente elaborato è stata utilizzata la tecnica di ionizzazione MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) [24]. Il campione e la matrice vengono depositati su un supporto metallico inerte (MALDI spot) e si aspetta per circa 15 minuti che i campioni si seccino. La matrice utilizzata per l'analisi è di fondamentale importanza e per questo deve possedere una serie di caratteristiche chimico-fisiche: deve possedere un carattere acido per poter fungere da fonte di protoni e permettere la ionizzazione del campione; deve disporre di gruppi polari ed essere idrosolubile inoltre deve avere un forte assorbimento ottico. La scelta della matrice va fatta in base al campione da analizzare, per il tetrapeptide SxxREDV è stata utilizzata la matrice a base di acetonitrile (50:50) acqua MilliQ, 0.1% TFA, 10 μ g/ μ L acido α -ciano-4-idrossicinnamico ed essa ha la capacità di assorbire la luce alla lunghezza d'onda emessa dal laser. Il campione immerso nella matrice viene bombardato da un fascio di laser. L'energia del laser è sufficiente per formare ioni quasi-molecolari MH⁺ ma si possono anche formare cluster analita-matrice protonati o addotti con eventuali cationi presenti nella matrice. Il laser colpisce le molecole di matrice che, assorbendo la luce ultravioletta, passano ad uno stato eccitato e provocano un veloce riscaldamento della regione interessata; si ha quindi l'espulsione di aggregati di analita solvatato dalle molecole di matrice e una desolvatazione con conseguente trasferimento di un protone (reazione acido-base tra le molecole di analita e della matrice).

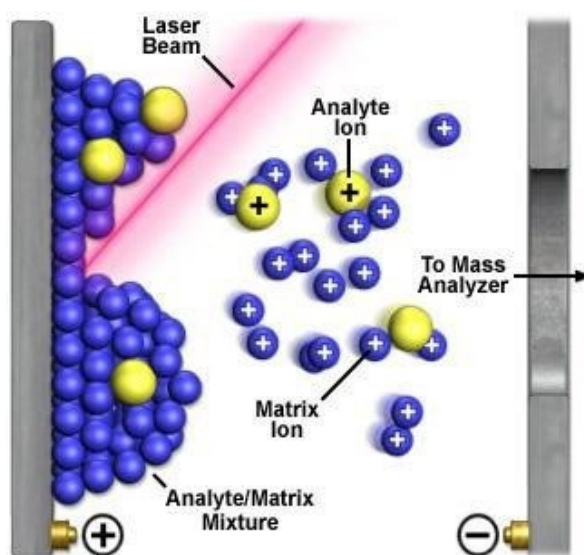


Figura 29: schematizzazione della ionizzazione in una sorgente di tipo MALDI

Il rivelatore ha la capacità di convertire il flusso di elettroni in un flusso di corrente. I segnali ottenuti in uscita dal rivelatore vengono elaborati con lo scopo di rappresentare a video lo spettro di massa, quindi una serie di picchi di intensità variabile a seconda della quantità degli ioni analizzati: sull'asse delle ascisse si rappresenta il rapporto m/z , mentre sull'asse delle ordinate si riporta i

valori di abbondanza relativa degli ioni analizzati. Le intensità dei picchi sono espresse in valori percentuali del picco più intenso, denominato “picco base”, a cui si assegna arbitrariamente il valore 100.

2.3.3 Spettroscopia di assorbimento UV/VIS

La spettroscopia UV/Vis rappresenta una tecnica analitica classica tra le più utilizzate in chimica.

Nelle misurazioni analitiche più comuni la maggior parte delle molecole assorbono le radiazioni luminose nelle regioni dello spettro elettromagnetico appartenente all'intervallo di lunghezze d'onda comprese tra la radiazione UV (200 nm e 350 nm) e quella del visibile (350 nm e 700 nm).

L'assorbimento delle radiazioni luminose dalle molecole è in grado di generare le transizioni energetiche degli elettroni esterni da un orbitale molecolare di livello energetico più basso ad un livello energetico più alto. Si verifica l'assorbimento delle radiazioni se il fotone della radiazione incidente possiede un'energia sufficientemente elevata affinché si verifichi la transizione elettronica, ovvero un'energia maggiore della differenza di energia tra i due orbitali (*band gap*)[25].

Lo spettrofotometro determina l'assorbanza del campione ad una determinata lunghezza d'onda ed è costituito dalla sorgente di radiazioni nello spettro UV/Vis; tipicamente una lampada a tungsteno per la regione visibile, una lampada ad idrogeno o deuterio per la regione dell'ultravioletto; un monocromatore che è un selezionatore delle frequenze che permette di limitare le radiazioni emesse ad un intervallo molto ristretto centrato nella lunghezza d'onda di interesse; due cuvette: la prima contiene la soluzione composta dal campione da analizzare sciolto in un solvente e la seconda contiene il solvente detto “bianco”. Il sistema viene completato con il rivelatore (che è in grado di rilevare la luce e convertirla in corrente) e infine il registratore computerizzato che acquisisce ed elabora i dati calcolando l'assorbanza, eliminando le bande di assorbimento del solvente e fornendo lo spettro della sostanza campione.

L'assorbanza è definita come:

$$A = -\log_{10}(I/I_0)$$

Dove:

- I_0 rappresenta l'intensità di luce ad una fissata lunghezza d'onda che passa attraverso la cuvetta “bianco”
- I rappresenta l'intensità della luce ad una specifica lunghezza d'onda che passa attraverso la cuvetta contenente il campione di sostanza da analizzare.

Utilizzando la legge di Lambert-Beer, è possibile descrivere i rapporti tra l'assorbanza misurata, la lunghezza del cammino ottico e concentrazione del campione.

$$A = \epsilon_{\lambda} * b * c$$

Dove:

- A è la differenza tra il valore dell'assorbanza della soluzione con il campione e di quella del bianco
- c è la concentrazione molare della specie in grado di assorbire [M]
- b è il cammino ottico in [cm]
- ϵ_{λ} è il coefficiente di estinzione molare della sostanza ad una particolare lunghezza d'onda [$M^{-1} cm^{-1}$].

La lunghezza d'onda appropriata viene selezionata sulla base dello spettro della sostanza oggetto di analisi; per avere massima sensibilità nella misurazione è consigliabile effettuare la lettura posizionandosi alla lunghezza d'onda dove si ha il massimo.

2.3.5 Funzionalizzazione degli scaffold biologici con sequenze peptidiche

La procedura di funzionalizzazione covalente del pericardio bovino decellularizzato prevede la creazione di legami covalenti specifici tra i gruppi amminici che sono collocati sulla superficie dello scaffold e il gruppo aldeidico presente invece nel terminale della sequenza peptidica che deve essere immobilizzato. La formazione del legame covalente tra il peptide e lo scaffold porta alla creazione delle basi di *Schiff* e di legami imminici, con la conseguente liberazione di una molecola d'acqua. Questa reazione ha la caratteristica di essere reversibile, quindi il legame chimico che si forma con lo *scaffold* non è caratterizzato da un elevato grado di stabilità. Con lo scopo di rendere tale legame chimico più stabile, viene utilizzato come agente riducente il sodio cianoboroidruro che ha l'obiettivo di ridurre le immine ad ammine.

L'intero processo di funzionalizzazione è principalmente costituito da due passaggi fondamentali, rappresentati graficamente in figura 30:

- Formazione delle basi di *Schiff*
- Riduzione con sodio cianoboroidruro

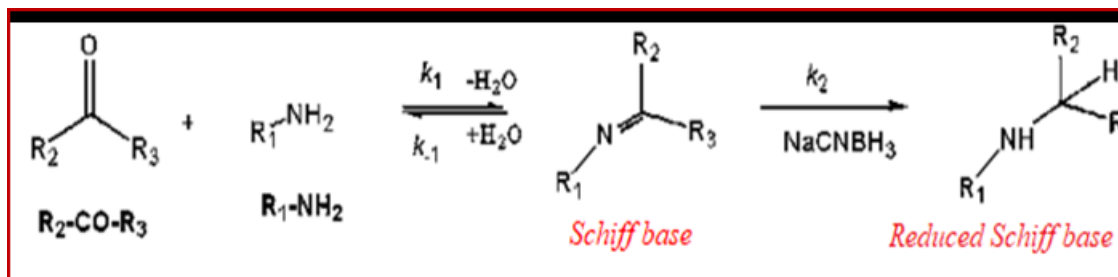


Figura 30: passaggi del processo di funzionalizzazione

2.1 Protocollo di decellularizzazione TERGICOL

Il pericardio bovino utilizzato come *scaffold* è stato prelevato da 3 bovini differenti presso il macello locale Bugin. Nel momento successivo all'asportazione i tessuti sono stati posti in soluzione fisiologica 0.9 % NaCl ed immediatamente trasportati in laboratorio. Dapprima sono stati rimossi i residui adiposi superficiali, utilizzando opportuni strumenti quali forbicine e pinzette e servendosi della soluzione fisiologica. Sono stati poi eseguiti dei lavaggi preliminari dei tessuti in soluzione fisiologica 0.9 % NaCl in acqua distillata. Successivamente il processo di decellularizzazione del tessuto è stato eseguito applicando il metodo TERGICOL (TERGItoL/COLato di sodio), che viene impiegato in sostituzione al precedente metodo TRICOL [26]. Nello specifico il detergente Tergitol ha il ruolo di sostituire il Triton-X-100 del metodo precedente TRICOL. Tale sostituzione è stata eseguita in quanto l'agenzia europea per le sostanze chimiche ha bandito, a partire dal 4 Gennaio 2021, il commercio e l'utilizzo del Triton X-100 a causa della sua tossicità nei confronti dell'ambiente.

Il metodo di decellularizzazione TERGICOL ha la capacità di rimuovere in maniera adeguata le componenti cellulari, i residui della membrana plasmatica xenogenici e nucleici, conservando allo stesso tempo intatta la struttura della matrice extracellulare.

Le soluzioni necessarie da preparare prima della realizzazione del protocollo sono le seguenti:

- Buffer A: 50 mM acido etilendiamminotetraacetico (EDTA), è un agente chelante ed ha quindi la capacità di favorire il distacco delle cellule dalla ECM, 100 mM sodio ascorbato in PBS, che promuove la motilità cellulare. La soluzione contenente entrambi gli agenti si porta a un pH fisiologico di 7.4 e viene conservata al buio a 4°C. Al fine di evitare l'ossidazione del sodio ascorbato, la soluzione prima dell'utilizzo viene flussata con azoto;
- PBS 1x (*phosphate buffer saline*).

Per il protocollo TERGICOL vengono utilizzate due soluzioni di inibitori di proteasi:

- inibitore di proteasi A 400 mM fenilmetilsulfonil fluoride (PMSF); 1 M N-Etilmaleimide (NEM) in dimetilsolfossido (DMSO);
- Inibitore di proteasi B 1 M benzamidina; 200 mM iodoacetammide in DMSO.

Il ruolo delle molecole identificate come “inibitori di proteasi” è da un lato, quello di inibire le proteasi cellulari che, durante il processo di decellularizzazione, vengono rilasciate a seguito della lisi cellulare e dall’altro, quello di preservare la matrice dalla degradazione delle proteine.

Il metodo di decellularizzazione TERGICOL ha durata di 5 giorni e si compone delle seguenti fasi:

- 1° step: inibitori della proteasi (8h a 4°C) (10% buffer A, 10% DMSO, 0.5% v/v inibitore di proteasi A e 0.5% inibitore di proteasi B in acqua MilliQ): come primo solvente viene aggiunto il DMSO perché aiuta la dissoluzione degli inibitori
- 2° step: si esegue il lavaggio con soluzione ipotonica (8h-overnight, sotto agitazione, a 4°C): 10% buffer A in acqua MilliQ;
- 3°step: si utilizzano gli inibitori di proteasi (8h a 4°C)(10% buffer A, 1% v/v Tergitol, 0.5% inibitore di proteasi A e 0.5% inibitore di proteasi B in acqua MilliQ) (v/v)
- 4° step: lavaggio (8h, sotto agitazione, a 4°C)(10% buffer A, 0.1% Tergitol in acqua MilliQ)
- 5° step: si esegue il lavaggio con soluzione ipertonica (8h, sotto agitazione, a 4°C)(10% buffer A, 0.5 M NaCl, 0.1% Tergitol in PBS. Il lavaggio viene eseguito 2 volte)
- 6 ° step: si esegue il lavaggio 1 (1,5h, sotto agitazione, a temperatura ambiente) (10% buffer A, 0.1% Tergitol in acqua MilliQ. Il lavaggio viene eseguito 2 volte)
- 7° step: si esegue il lavaggio2 (1,5h, sotto agitazione, a temperatura ambiente) (10% buffer A, 0.1% Tergitol in PBS. Il lavaggio viene eseguito 2 volte)
- 8° step: con aggiunta di Sodio Colato (16h, sotto agitazione, a temperatura ambiente al buio, pH 7.4)(10% buffer A, 10 mM Sodio Colato in PBS). Questo step viene ripetuto per 2 volte, una prima volta della durata di 2h, una seconda volta della durata *overnight*;
- 9° step: si esegue il lavaggio (1,5h, sotto agitazione, a temperatura ambiente): in PBS. Il lavaggio viene eseguito 2 volte, la prima volta a temperatura ambiente e la seconda volta a 4°C;
- 10° step: lavaggio (30min, sotto agitazione, a 4°C)(soluzione fisiologica 0.9% NaCl)
- 11° step: lavaggio (1h, sotto agitazione, a 4°C) (soluzione fisiologica 0.9% NaCl, 10% isopropanolo. Il processo va ripetuto 2 volte)

- 12° step: lavaggio (1.5h, sotto agitazione, a 4°C) (in soluzione fisiologica 0,9% NaCl. Il lavaggio viene 2 volte; il primo lavaggio ha la durata di 30 minuti mentre il secondo ha la durata di 1h)

Il trattamento enzimatico del tessuto viene praticato mediante l'utilizzo della benzonase: un'endonucleasi aspecifica che svolge il ruolo di scindere gli acidi nucleici.

Viene preparato il buffer di equilibratura costituito da:

1. Tris-HCl (PM=121.14 g/mol) 50 mM
2. MgCl₂ (PM=95.21g/mol) 1 mM in acqua MilliQ

Per preparare 1 L di buffer di equilibratura si utilizzano: 6.057 g di tris HCl, 0.09521g di MgCl₂, si aggiungono 1000 mL di acqua MilliQ. Successivamente si misura il pH e il buffer deve essere portato ad un pH di circa 8-8.5 con l'utilizzo di HCl perché la benzonase lavora bene ad un pH basico. Il buffer di equilibratura va filtrato in condizioni di sterilità con un filtro (GVS, Filter Technology, USA) da 0,20 µm.

I tessuti vanno posti preventivamente a 37°C per 24h con la soluzione in cui andrà diluita la Benzonase. In seguito, i campioni vengono sottoposti ad un trattamento con una soluzione di Benzonase; la quantità di tale enzima viene calcolata mediante la seguente formula: $ut=pt^2$; $x=ut250$

Dove:

- ut: rappresenta le unità totali di benzonase
- pt: peso totale in mg di tessuto da trattare
- x: i µL finali di benzonase da utilizzare

Il trattamento dei campioni con buffer di equilibratura + benzonase viene effettuato in agitazione al buio a 37°C per 24h. Questo passaggio viene ripetuto due volte al fine di assicurare una massima digestione degli acidi nucleici. Successivamente al trattamento con benzonase vengono eseguiti due lavaggi, ciascuno da 30 minuti, con la soluzione fisiologica.

Sterilizzazione dei tessuti

Lo step successivo al trattamento enzimatico è quello che prevede la sterilizzazione del tessuto, allo scopo di evitare la crescita di batteri e/o funghi: il tessuto viene trattato con un cocktail di antibiotici e antimicotici preparato nel seguente modo:

- Amfotericina b 10% v/v

- Vancomicina 0.125 % v/v
- Gentamicina 0.08 % v/v
- Cefoxitina 0.24 % v/v

Il tessuto viene mantenuto in questa soluzione per 24 h, a 37° C; al termine delle quali sono eseguiti 2 lavaggi da 30 minuti in soluzione fisiologica. Se il tessuto NON deve essere funzionalizzato si sottopone al trattamento con l'acido peracetico (3h a 37°C, pH 7.4) a concentrazione 0.1 % in PBS. L'ultimo passaggio ha doppia funzione: agisce come antisettico e disinfettante oltre a questo ha un effetto di rimozione degli acidi nucleici residui. Per questo motivo va adottato nella fase finale del trattamento di rimozione cellulare.

Il tessuto va conservato a 4°C immerso in una soluzione contenente pen-strep 3%, amfotericina b 0.25 % in fisiologica, tale soluzione deve essere sterile.

CAPITOLO 3 : PARTE SPERIMENTALE

3.1 Sintesi peptidica

3.1.1 Sintesi del peptide SxxREDV

Il peptide SxxREDV è caratterizzato dalla sequenza amminoacidica:



Dove, x=acido 7-amminoeptanoico (utilizzato come spaziatore)

(PM = 857,99 Da)

Il peptide SxxREDV è stato sintetizzato mediante il processo di sintesi su fase solida (SPPS) utilizzando il sintetizzatore automatico Syro I e la chimica Fmoc.

Sintesi:

Sono state preparate le soluzioni 0.62 M in DMF di tutti gli amminoacidi (AA):

- Fmoc-Asp(OtBu)-OH;
- Fmoc-Glu(OtBu)-OH;
- Fmoc-Arg(Pbf)-OH;
- Fmoc-Ser(tBu)-OH;
- Fmoc-Val-OH
- Fmoc-acido 7-amminoeptanoico;

Le soluzioni impiegate nella sintesi sono:

- Soluzione a 40% di piperidina in DMF necessaria all'inizio di ogni ciclo di *coupling* per la deprotezione del gruppo Fmoc
- Soluzione attivante HBTU/Oxyma Pure 0.45 M in DMF
- Soluzione DIPEA 1.8 M in NMP

Il supporto solido utilizzato per questa sintesi è la resina *Rink Amide MBHA* con sostituzione pari a 0.52 mmol/g. Dato che si volevano ottenere 0.125 mmol di siti attivi, è stata calcolata la quantità di resina necessaria per la sintesi utilizzando la seguente formula:

$$m_{\text{resina}} = (n_{\text{peptide}} / \text{sost}_{\text{resina}}) = (0,125 \text{ mmol}) / (0,52 \text{ mmol/g}) = 0,240 \text{ g}$$

Dove m= quantità della resina; n = quantità di siti attivi

Quindi per la sintesi peptidica sono stati pesati 240 mg di resina e successivamente collocati in un apposito reattore.

Al termine della preparazione di tutte le soluzioni e dello scioglimento di tutti gli amminoacidi (AA) è stata avviata la sintesi. Il processo totale prevede 7 cicli: uno per ciascuno degli amminoacidi AA, e tutte le reazioni di condensazione sono state effettuate con un doppio *coupling*. Finito il primo ciclo è stata bloccata la sintesi per effettuare il test alla piperidina e determinare la resa della reazione di *loading*.

Loading del primo amminoacido:

È stata preparata la soluzione 0.62 M di Fmoc-Val-OH in DMF. La resina è stata trattata con il DMF in modo che essa si potesse gonfiare. La funzionalizzazione della resina si esegue tramite doppio *coupling* con l'amminoacido Fmoc-Val-OH.

La resina funzionalizzata con il primo amminoacido viene lavata con DMF e DCM e posta a stato seccare sotto vuoto per circa un'ora.

Test alla piperidina

Una volta seccata la resina funzionalizzata si esegue il test alla piperidina con l'utilizzo dello spettrofotometro UV/Vis.

Sblocco dei gruppi in catena laterale e *cleavage* del peptide dalla resina:

Sono stati eseguiti contemporaneamente sia la rimozione dei gruppi protettori in catena laterale che lo sblocco del peptide dalla resina trattando il reattore con 5 mL di una soluzione composta da:

- 125 μ L di acqua MilliQ;
- 125 μ L di TES
- 4.75 mL di TFA.

La soluzione è stata lasciata reagire per 1 h e 30 minuti a temperatura ambiente, agitando manualmente il reattore ogni tanto. La resina è stata filtrata e lavata con TFA ed i lavaggi sono stati concentrati a piccolo volume. Il peptide è stato precipitato con l'utilizzo di etere dietilico a 4°C, ed è stato filtrato con un *Gooch 4* e messo a seccare sottovuoto per 1 ora per poi essere sciolto in acqua MilliQ. La quantità ottenuta di peptide grezzo ottenuto è pari a 86.55 mg (resa dell'80% rispetto al teorico).

3.1.2 Caratterizzazione del peptide grezzo

L'analisi cromatografica RP-HPLC analitica viene utilizzata per determinare la composizione e il grado di purezza del peptide sintetizzato in precedenza. Per attuare la caratterizzazione del peptide grezzo sono stati sciolti 0.88 mg di peptide in 880 μ L di acqua MilliQ.

La soluzione è stata filtrata ed è stata sottoposta all'analisi RP-HPLC analitica nelle seguenti condizioni:

- Colonna: Vydac 218TP C18 (5 μm , 300 \AA , 4,6 \times 250 mm);
- Volume di iniezione: 200 μL ;
- Flusso: 1 mL/min;
- Lettura dell'assorbanza a 214 nm (λ);
- Eluente A: 0.05% TFA in H₂O MilliQ;
- Eluente B: 0.05% TFA in CH₃CN;
- Gradiente: dal 10% di B al 30% di B in 20 minuti

Nella Figura 31 è riportato il cromatogramma del peptide grezzo.

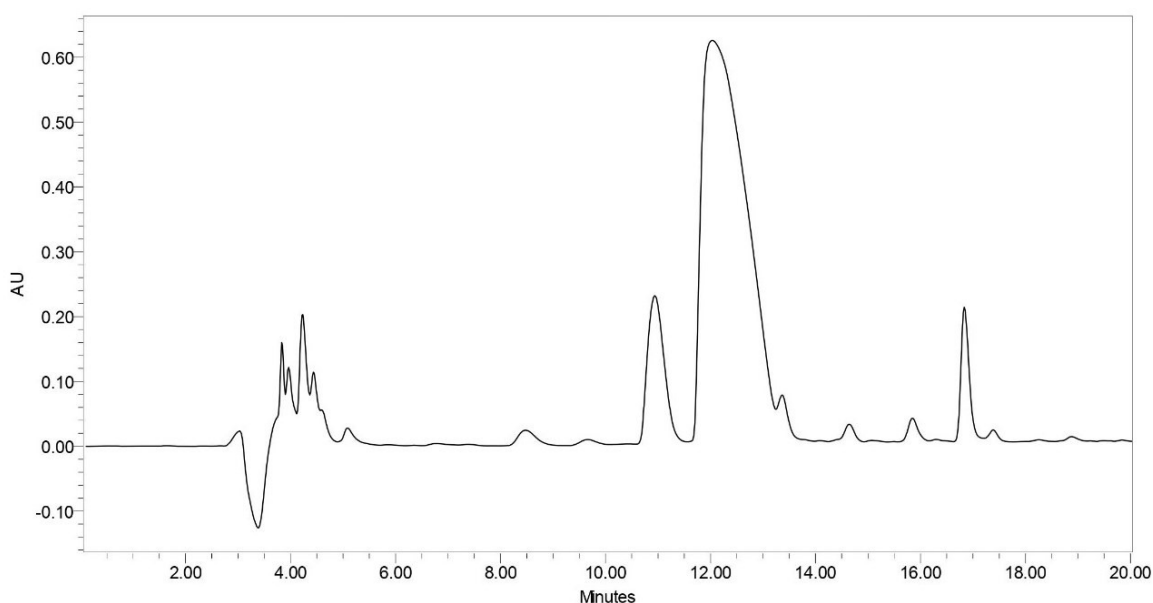


Figura 31: cromatogramma del peptide grezzo

3.1.3 Ossidazione della Serina N-terminale

Trenta mg di peptide SxxREDV sono stati sciolti in 15.789 mL di acqua MilliQ al fine di ottenere una concentrazione peptidica di 1.9 mg/mL; sono stati aggiunti 8.42 mg di periodato di sodio (PMPeriodato di sodio=213.89 g/mol) così da raggiungere una concentrazione finale 2.5 mM. La soluzione è stata lasciata sotto agitazione magnetica per circa 4 minuti a temperatura ambiente. La soluzione prima di essere purificata tramite RP-HPLC “semipreparativa”, viene filtrata con un filtro PVDF 0.45 μm . La reazione di ossidazione è stata eseguita per 3 volte, con tre aliquote di peso simile.

3.1.4 Caratterizzazione del peptide REDV-aldeide

Al fine di riuscire a separare il peptide dai sottoprodotti di sintesi e dalle impurezze, sono state eseguite tre corse cromatografiche RP-HPLC “semipreparative”. Per le prime due analisi sono stati pesati 29.51 mg di peptide grezzo mentre per l’ultima sono stati pesati 24.88 mg. Per ciascuna “semipreparativa” il peptide è stato sciolto in acqua MilliQ, successivamente è stata effettuata la reazione di ossidazione con l’aggiunta del periodato di sodio. Prima dell’aspirazione la soluzione è stata filtrata.

Tutte le cromatografie “semipreparative” sono state condotte nelle medesime condizioni operative:

- Colonna: Zorbax 300SB C18 (5 μ m, 300 Å, 9,4 \times 250 mm);
- Flusso: 4 mL/min;
- Lettura dell’assorbanza a 214 nm (λ);
- Fondoscala: 4.00 ABS;
- painVelocità della carta: 0,5 cm/min;
- Eluente A: 0.05% TFA in H2O MilliQ;
- Eluente B: 0.05% TFA in CH3CN;
- Gradiente: da 10% di B al 30% di B in 40 minuti.

Nella figura 32 è riportato il cromatogramma analitico del peptide purificato

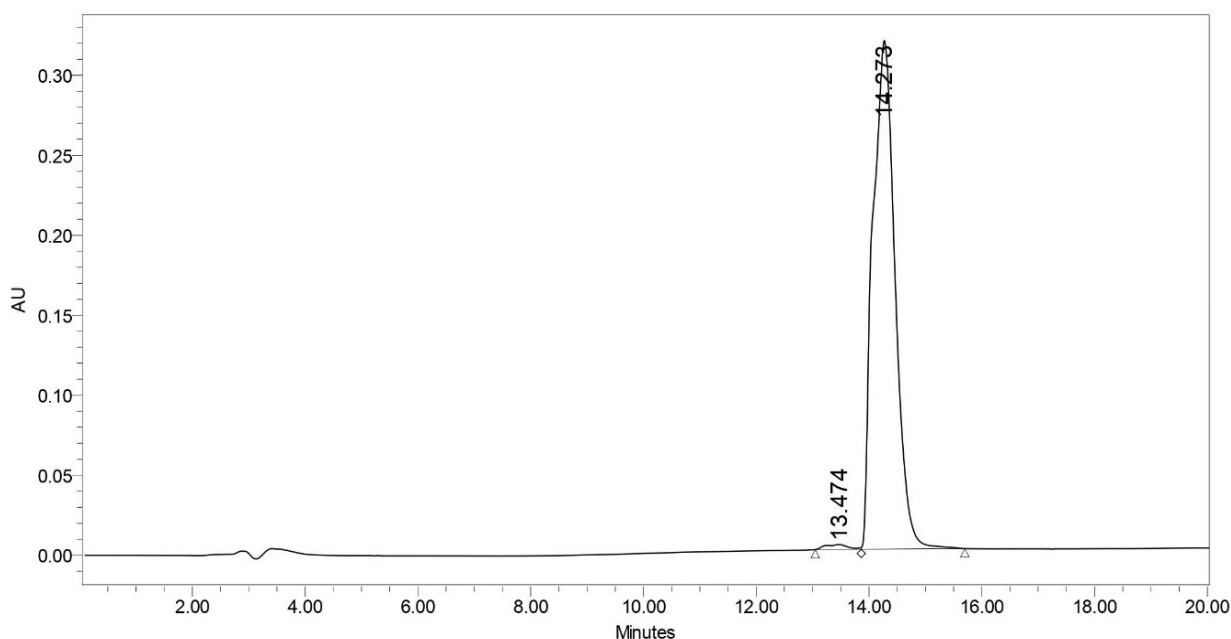


Figura 32: Analisi RP-HPLC analitica della frazione 15 raccolta dalla semipreparativa 3 in Figura 3.3. Colonna: Vydac 218TP C18; eluente A: 0,05% TFA in H2O MilliQ; eluente B: 0,05% TFA in CH3CN; flusso: 1 mL/min; volume di iniezione:30 μ L; gradiente: da 10% a 30% di eluente B in 20 minuti; lettura dell’assorbanza a 214 nm.

Nella figura 33 è riportato lo spettro di massa del peptide REDV aldeide.

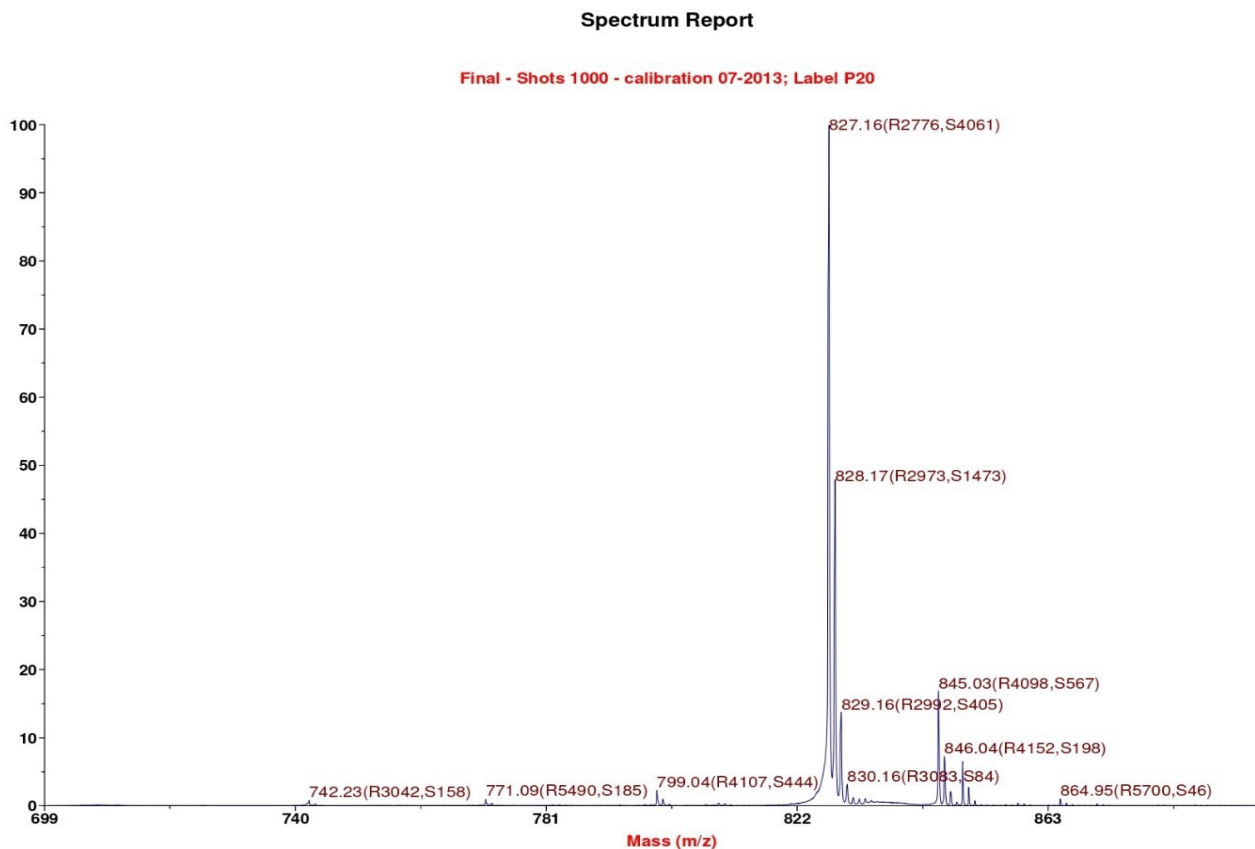


Figura 33: Spettro di massa MALDI-TOF del peptide REDV aldeide (massa sperimentale: 827.16 Da, massa teorica: 826.99)

3.2 Decellularizzazione del pericardio bovino (DBP) mediante il protocollo TERGICOL

Il metodo di decellularizzazione utilizzato per rimuovere le componenti cellulari e nucleari in questo lavoro di tesi è detto TERGICOL.

Il pericardio bovino (NBP, *native bovine pericardium*) utilizzato come *scaffold* in questo progetto di tesi è stato prelevato da alcuni vitelli durante il processo di macellazione. Il tessuto nativo di pericardio è stato ripulito dai residui adiposi superficiali, è stato tagliato in *patch* circolari con diametro di dimensione 0,8 cm attraverso l'utilizzo di un *punch* circolare di 0,8 cm. I campioni sono stati posti nella soluzione fisiologica composta da NaCl (0.9%) in acqua distillata. Il processo di decellularizzazione prevede la rimozione delle componenti cellulari conservando intatta la struttura 3-D della matrice extracellulare.

La nomenclatura del protocollo TERGICOL deriva dal nome dai due detergenti utilizzati, il Tergitol (non ionico) ed il sodio colato (ionico). Al fine di raggiungere un'efficace rimozione di tutte le

componenti cellulari, viene eseguito il trattamento con inibitori di proteasi, una successione che alterna fasi con soluzioni ipotoniche e ipertoniche. Questo metodo come ultimo step prevede il trattamento con la Benzonase, un'endonucleasi utilizzata per rimuovere i frammenti nucleari residui all'interno del tessuto.[27]

Il tessuto decellularizzato essendo privo della componente cellulare assume una colorazione bianca-trasparente.

Tuttavia il metodo di decellularizzazione TERGICOL presenta due svantaggi:

- è un processo lungo anche se non particolarmente complicato;
- non rimuove del tutto l'antigene alfa gal, che rappresenta un epitopo presente solo nei mammiferi non primati e assente invece nell'uomo: generalmente quindi, se impiantato negli esseri umani, è il responsabile del rigetto del tessuto.



Figura 34: pericardio bovino decellularizzato

3.2.1 Funzionalizzazione covalente del DBP

Il peptide utilizzato per la funzionalizzazione covalente è REDV-aldeide. Il peptide purificato e liofilizzato, è stato sciolto in PBS 1x a concentrazione iniziale 10^{-3} M (la soluzione madre) ed è stato aggiunto l'agente riducente, il cianoboroidruro di sodio ($NaBH_3CN$, Merck Millipore), per 1 mg di peptide sono stati aggiunti 2.19 mg di agente riducente. La soluzione madre è stata diluita 1:10 in PBS 1x per ottenere la concentrazione minore di 10^{-4} M, al fine di effettuare la procedura di funzionalizzazione dei campioni. I campioni di pericardio bovino decellularizzati sono stati funzionalizzati a due concentrazioni 10^{-4} M e 10^{-3} M.

La chimica di reazione implica che il gruppo aldeidico appartenente alla sequenza peptidica reagisca con le ammine primarie delle molecole biologiche presenti nel tessuto decellularizzato e che, mediante la reazione di condensazione, si formano le basi di Schiff (immine). Queste ultime vengono stabilizzate ad ammine grazie all'azione dell'agente riducente cianoboroidruro di sodio.

Funzionalizzazione covalente del pericardio bovino

I *patch* di tessuto di dimensione circolare pari a 0,8 cm di diametro sono stati posizionati negli *inserts* (prima della sterilizzazione del tessuto) e poi inseriti nelle piastre *multiwell* da 96. Al fine di ricoprire completamente il tessuto con la soluzione di funzionalizzazione, per ogni pozzetto sono stati aggiunti 200 μ L di soluzione di reazione (contenente la sequenza peptidica e l'agente riducente) alle concentrazioni 10^{-4} M e 10^{-3} M. I tessuti poi sono stati lasciati reagire nella soluzione di funzionalizzazione per 24 ore a temperatura ambiente. Come soluzione di controllo sui DBP non funzionalizzati è stato usato il PBS 1x al posto della soluzione di reazione.

Trascorse le 24 h, i tessuti sono stati opportunamente lavati in PBS 1x. In particolare sono stati effettuati due lavaggi da 30 minuti e un overnight a 4°C sempre in agitazione.

I campioni di DBP sono stati conservati in una soluzione di penicilina-streptomicina al 1% (v/v) e amfotericina b a 0.25 % v/v in PBS 1x a 4°C fino al loro utilizzo.

3.3 Preparazione soluzione di funzionalizzazione per il pericardio bovino decellularizzato.

È stata eseguita la funzionalizzazione covalente con il peptide REDV-aldeide sui campioni di DBP alle due concentrazioni 10^{-4} M e 10^{-3} M, come controllo si è considerato rappresentato dal DBP in PBS. I tessuti di pericardio bovino decellularizzati per essere conservati sono stati immersi in un tampone fosfato salino (PBS, *phosphate-buffered saline*) arricchito con antibiotici e antimicotici. Prima della funzionalizzazione la soluzione è stata aspirata e i campioni sono stati sottoposti al lavaggio con PBS a pH 6 per 30 minuti.

Si preparano due soluzioni di funzionalizzazione del peptide a due concentrazioni diverse: 10^{-3} M e 10^{-4} M. Prepariamo un volume maggiore di soluzione 10^{-3} M (soluzione madre), in modo da ottenere da esso la soluzione a concentrazione 10^{-4} M. Quindi 20,5 mg di peptide REDV-aldeide sono stati sciolti in 24,75 mL di PBS. La soluzione a 10^{-4} M, è stata ricavata diluendo la soluzione madre 1:10 con PBS 1x. Per la preparazione della soluzione a concentrazione 10^{-3} il peptide liofilizzato e purificato SxxREDV, di peso molecolare pari a 826.99, viene sciolto in PBS 1 a pH fisiologico 7.4. Viene poi aggiunto l'agente riducente sodium cyanoborohydride (NaBH_3CN): per 1 mg di peptide devono essere aggiunti 2.19 mg di riducente. Quindi per 20,5 mg di peptide sono stati aggiunti 44,8 mg di agente riducente. Il peptide e l'agente riducente vengono messi in agitazione magnetica finché arrivano a scioglimento. La soluzione di funzionalizzazione prima di essere utilizzata deve essere filtrata sotto cappa biologica con filtro da 0,2 μm . In totale, sono stati funzionalizzati 21 *patches* di pericardio bovino decellularizzato (DPB) con la soluzione 10^{-3} M e 21 *patches* con soluzione 10^{-4} M. Per l'esecuzione del test della Resazurina sono stati utilizzati per entrambe le concentrazioni 4 *patches* differenti per ognuno dei 3 time point: 1, 7 e 14 giorni. Per l'esecuzione del test *live and dead*, sono stati impiegati 3 *patches* per entrambe le concentrazioni per ognuno dei 3 time point: 1, 7 e 14 giorni, come indicato in figura.

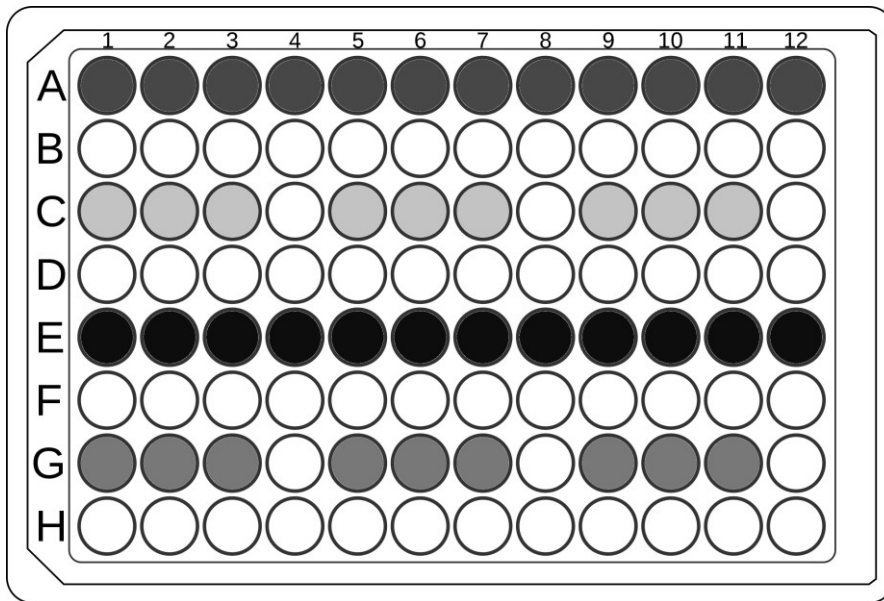


Figura 35: nella riga A sono contenuti i 12 patches di pericardio bovino decellularizzato e funzionalizzato con peptide REDV alla concentrazione 10^{-3} M, utilizzati per l'esecuzione del test della Resazurina, 4 patches per ciascuno dei tre time point: 1, 7 e 14 giorni. Nella riga C sono contenuti i 9 patches di pericardio bovino decellularizzato e funzionalizzato con peptide REDV alla concentrazione 10^{-3} M utilizzati per l'esecuzione del test "live and dead", 3 patches per ciascuno dei tre time point: 1, 7 e 14 giorni. Nella riga E sono contenuti i 12 patches di pericardio bovino decellularizzato e funzionalizzato con peptide REDV alla concentrazione 10^{-4} M, utilizzati per l'esecuzione del test della Resazurina, 4 patches per ciascuno dei tre time point: 1, 7 e 14 giorni. Nella riga G sono contenuti i 9 patches di pericardio bovino decellularizzato e funzionalizzato con peptide REDV alla concentrazione 10^{-4} M, utilizzati per l'esecuzione del test "live and dead", 3 patches per ciascuno dei tre time point: 1, 7 e 14 giorni

Il pericardio funzionalizzato è stato posto per 24 h in soluzione funzionalizzata a temperatura ambiente, coperta con carta stagnola. Dopo le 24 h i campioni sono stati sottoposti a lavaggi con PBS 1x ad un pH di 7.4. I lavaggi sono stati eseguiti nel seguente modo: 2 volte per 30 minuti a temperatura ambiente e un lavaggio overnight a $+4^{\circ}$ sotto agitazione. In seguito al lavaggio è stato rimosso il PBS dai patches, ai quali è stato aggiunto il *medium* cellulare per 24 ore. Successivamente è stato rimosso anche il *medium* cellulare ed è stata effettuata la semina cellulare, aggiungendo su ognuno dei patches 200 μ L di soluzione contenente le cellule. La stessa quantità di soluzione contenente le cellule, quindi 200 μ L, è stata aggiunta anche in 9 well della piastra, al fine di realizzare anche un controllo positivo, composto da sole cellule coltivate su plastica, che verrà indicato con la sigla "ctrl". Sono stati realizzati 18 patches di controllo composto da tessuto di pericardio bovino decellularizzato (DPB) al quale sono stati aggiunti 200 μ L di soluzione contenente lo stesso numero di cellule, che indicheremo con "ctrl+cell": 12 patches di "ctrl+cell" sono stati impiegati per la realizzazione del test della Resazurina, 4 patches per ognuno dei tre time-

point differenti: 1, 7 e 14 giorni. Mentre 6 patches di “ctrl+cell” sono stati impiegati nel test live and dead, 2 patches per ogni time-point: 1, 7 e 14 giorni, come indicato in figura.

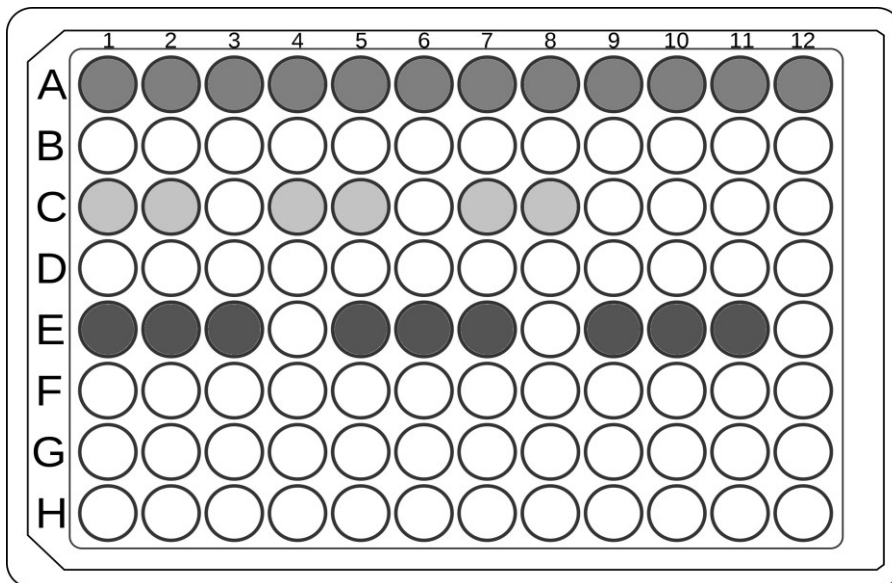


Figura 36: immagine rappresentativa della piastra utilizzata per il controllo: nella riga A vi sono i 12 patches di tessuto di pericardio bovino decellularizzato con aggiunte le cellule (DPB + cell), utilizzati per eseguire il test della resazurina, 4 patches per ognuno dei tre time point differenti: 1 giorno, 7 giorni, 14 giorni. Nella riga C ci sono i 6 patches di tessuto di pericardio bovino decellularizzato con aggiunte le cellule (DPB + cell), utilizzati per eseguire il test “live and dead”. Nella riga E ci sono i controlli positivi: sole cellule seminate su plastica (ctrl), 3 well per ognuno dei tre time point differenti: 1 giorno, 7 giorni e 14 giorni.

3.4 Saggi biologici

Si è proceduto alla valutazione dell’adesione cellulare mediante un test di vitalità, effettuato secondo i requisiti indicati nella norma ISO 10993.

I saggi biologici sul pericardio bovino decellularizzato documentati in tale lavoro di tesi sono stati eseguiti presso i laboratori de “La Torre della Ricerca Città della Speranza” sotto la supervisione e l’aiuto della Dott.ssa Saima Imran (Gruppo di ricerca del Prof. Gino Gerosa).

Le cellule utilizzate nel presente lavoro di tesi sono state le HUVECs (Human Umbilical Vein Endothelial Cells), che sono state ricavate dall’endotelio delle vene del cordone ombelicale. I motivi che hanno portato al loro utilizzo sono la loro disponibilità economica, la semplicità con la quale riescono ad essere isolate dai cordoni ombelicali e il fatto che possano essere facilmente espanse in laboratorio.

Le HUVECs sono state seminate ad una densità superficiale di 15000 cellule/cm² sui DBP funzionalizzati, sui controlli di DPB non funzionalizzati e sulla sola plastica; sono state poi coltivate in condizioni statiche con terreno di crescita specifico per le *endothelial cells* (EC).

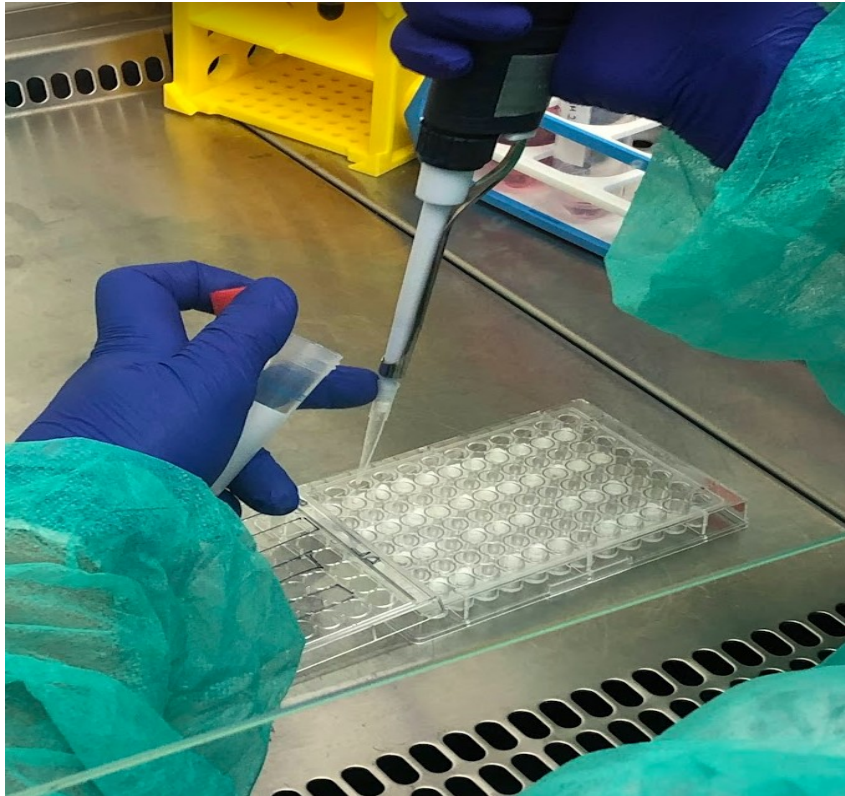


Figura 37: esecuzione saggi biologici

3.5 Test della resazurina

La vitalità cellulare è stata valutata mediante l'esecuzione del test della resazurina presso i laboratori de “La Torre della Ricerca Città della Speranza” sotto la supervisione e l'aiuto della Dott.ssa Saima Imran (Gruppo di ricerca del Prof. Gino Gerosa). Le letture sono state effettuate a tre *time point* differenti: 1, 7 e 14 giorni dalla semina ed è stata misurata l'assorbanza delle cellule nelle diverse tipologie di campioni analizzati. Il saggio di vitalità cellulare AlamarBlue funziona come un indicatore di salute delle cellule utilizzando il potere riducente delle cellule viventi e serve per misurare quantitativamente la proliferazione di diverse linee cellulari umane e animali, batteri, piante e funghi, e consente di stabilire la citotossicità relativa di agenti di diversa natura. Il principio su cui si basa il saggio è che quando le cellule sono vitali mantengono un ambiente riducente nel citosol. La resazurina, il principio attivo del reagente AlamarBlue, è un composto non tossico, permeabile alla membrana cellulare, di colore blu e praticamente non fluorescente. Una volta

entrata nelle cellule, la resazurina è ridotta a resofurina, un composto di colore rosso ed altamente fluorescente.

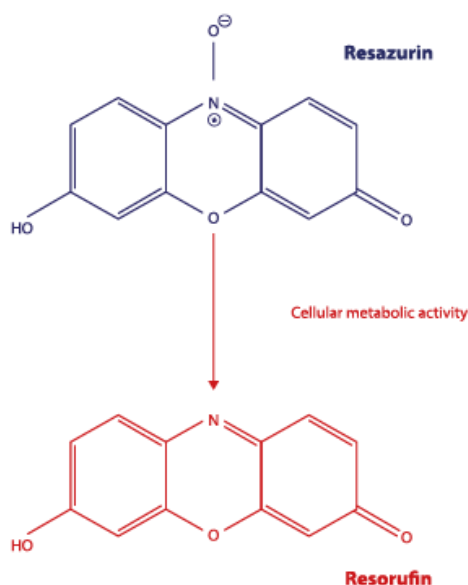


Figura 38: esempio di conversione di Resazurina in Resofurina

Le cellule vitali convertono continuamente resazurina in resofurina, aumentando la fluorescenza complessiva e il colore del mezzo in cui si trovano.

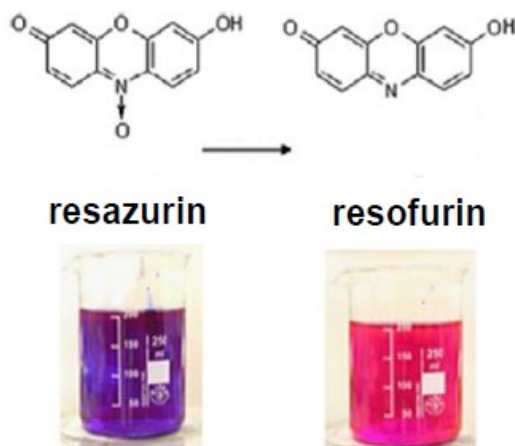


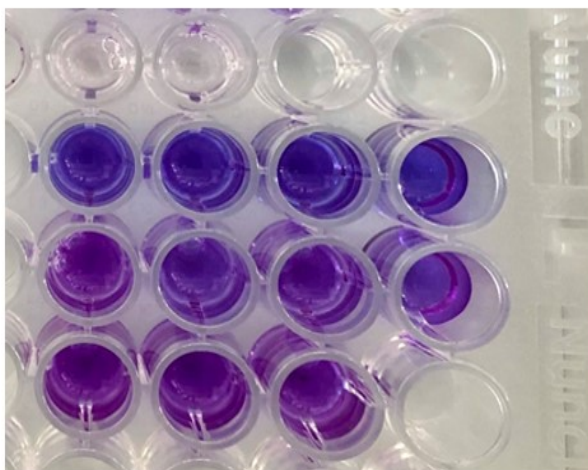
Figura 39: conversione di Resazurina in Resofurina e cambio di colore

Nel test della Resazurina normalmente si legge la fluorescenza, tuttavia nel presente lavoro di tesi, si è impostata la lunghezza d'onda pari a 595 nm (colore blu) al fine di effettuare la lettura dell'assorbanza, a causa di un mal funzionamento della macchina. Le misure rileveranno i valori di Optical Density (O.D.).



Figura 40: lettore di micropiastra a fluorescenza

La figura 41 mostra la preparazione delle piastre prima del loro inserimento all'interno del lettore per la lettura dei valori di O.D.

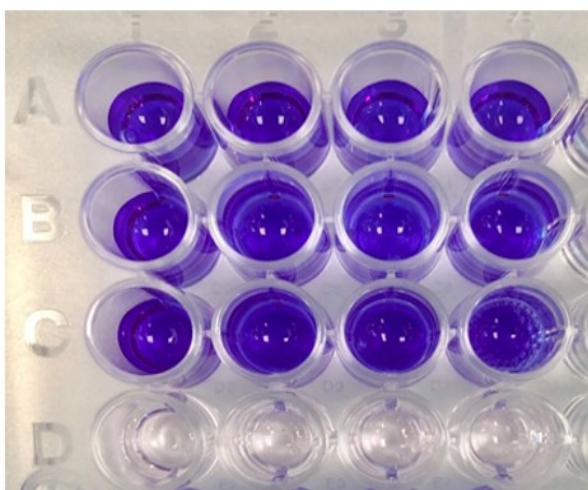


Media cellulare

Soluzione di resazurina

Ctrl: DPB + cellule

Ctrl positivo: cellule su plastica



DPB + REDV 10^{-3}

DPB + REDV 10^{-4}

Soluzione di resazurina

media cellulare

Figura 41: esecuzione del test della resazurina al time point di 14 giorni dopo 2 ore di incubazione della piastra: si può osservare un colore più tendente al viola nel controllo positivo e nel controllo di DPB + cellule rispetto al DPB + REDV 10^{-3} M e al DPB + REDV 10^{-4} M

Si osserva quindi che:

- Valori più bassi di O.D. indicano che una maggiore quantità di resazurina si è ridotta in resofurin, che visivamente si traduce in un colore più tendente al viola, ed è indice di una maggiore vitalità cellulare. Al contrario valori più alti di O.D. indicano che la quantità di resazurina che si è ridotta in resofurin è minore: ciò corrisponde ad un colore più tendente più al blu ed è indice di una minore quantità di cellule vive, se confrontate con i campioni di controllo.
- Nei campioni che presentano un valore di O.D. minore e un colore più tendente al violetto piuttosto che al blu, avremo un maggiore numero di cellule vive: ciò si riscontra quindi nei campioni del controllo formato da pericardio bovino decellularizzato non funzionalizzato e in cui è avvenuta la semina delle cellule HUVECs.

La tabella 3 riporta nelle prime colonne i valori di media e nelle seconde i valori di *standard deviation* per le 4 diverse condizioni di lavoro dei campioni: DBP funzionalizzato con il peptide REDV alla concentrazione di 10^{-3} M, DBP funzionalizzato con il peptide REDV alla concentrazione 10^{-4} M, il solo DBP decellularizzato ma non funzionalizzato e il controllo positivo delle sole cellule seminate su plastica. Nelle 3 righe sono invece riportati i tre time point differenti a cui sono state effettuate le misure: 1 giorno, 7 giorni, 14 giorni.

	REDV 10^{-3} M		REDV 10^{-4} M		ctrl + cells		only cells	
1g	1,12	0,1879	1,30975	0,065869	1,11375	0,093093	1,379333	0,24559
7g	1,6725	0,153677	2,0755	0,407115	1,437333	0,194042	1,280667	0,101913
14g	1,30525	0,323801	1,79225	0,16676	1,035417	0,238362	1,143	0,070515

Tabella 3: tabella che riporta i valori di media e standard deviation delle misure di O.D. effettuate nei tre differenti time point

lettura dell'assorbanza a 595nm

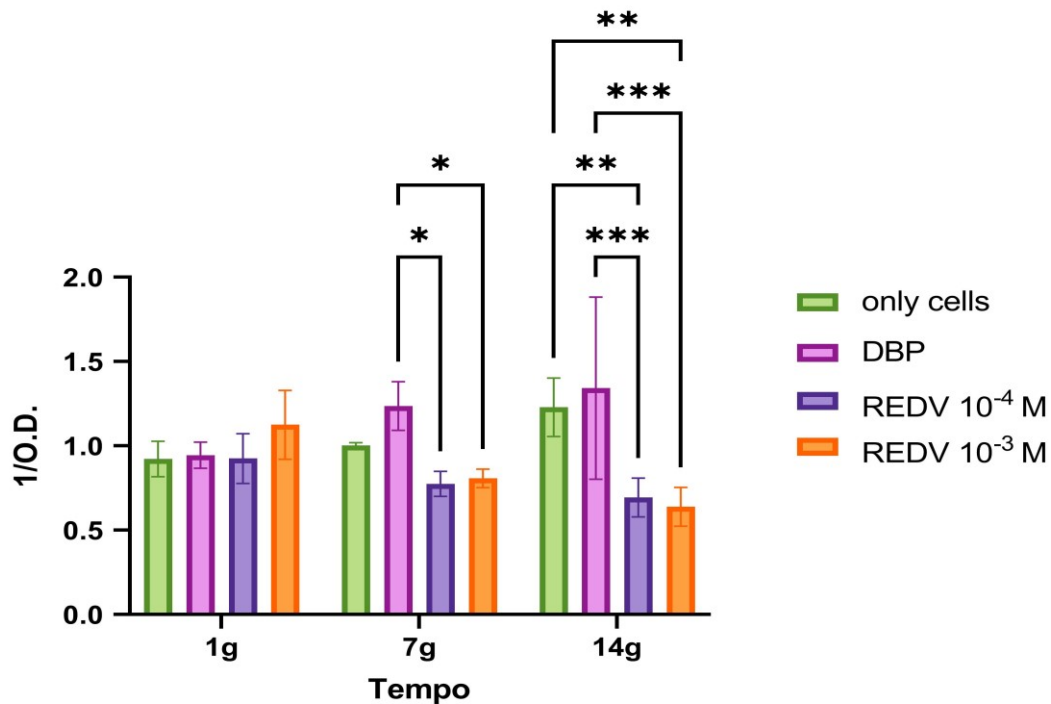


Figura 42: lettura dell'assorbanza a 595 nm

Analisi statistiche

I dati ottenuti come risultato dalle prove biologiche sono stati analizzati ed elaborati con Prism (GraphPad Software 8). Tutti risultati si riportano come media \pm deviazione standard. I dati sono stati confrontati statisticamente applicando il test T e l'analisi della varianza (ANOVA), nello specifico con l'ANOVA unidirezionale ordinaria con il test di confronto Bartlett's. È stato fissato un livello significativo pari a 5%.

I risultati dell'analisi statistica sui parametri di interesse indicando le differenze statistiche rilevanti ed il valore è specificato da:

- “*” per un p-value < 0.05
- “**” per un p-value < 0.01
- “***” per un p-value < 0.001
- “****” per un p-value < 0.0001

3.6 Adesione e vitalità cellulare

L'adesione e la vitalità cellulare sono state valutate mediante la colorazione fluorescente *live and dead* a tre time point differenti: 1, 7 e 14 giorni. I campioni sono stati analizzati mediante il microscopio OLYMPUS IX71, presso i laboratori de “La Torre della Ricerca Città della Speranza”, sotto la supervisione e l'aiuto della Dott.ssa Saima Imran (Gruppo di ricerca del Prof. Gino Gerosa), acquisendo le Region of Interest (ROI) maggiormente significative per ogni campione. Al fine di rendere migliore la morfologia del tessuto acquisito le immagini sono state elaborate utilizzando il software Fiji.

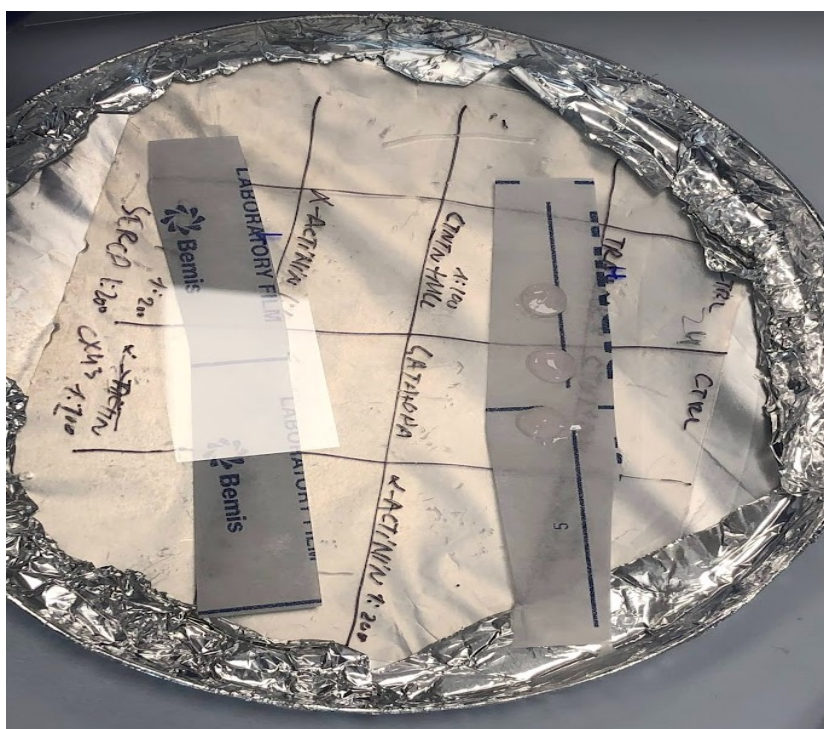


Figura 43: preparazione dei patches di pericardio per essere osservati al microscopio SEM

3.6.1 Test Live and Dead per la vitalità cellulare

Kit live and dead: le cellule marcate in rosso rappresentano le cellule morte, le cellule marcate in verde indicano le cellule vive.

Il kit utilizzato prevede l'impiego di due composti:

- la calceina: è un substrato che fluoresce nel verde e viene metabolizzato all'interno delle cellule, implica quindi che la cellula sia viva
- Lo ioduro di propidio, un intercalante del DNA che fluoresce nel rosso: esso viene accumulato nei nuclei delle cellule morte, infatti affinché una sostanza possa entrare nel nucleo, la cellula deve consentirne l'accesso, deve essere quindi priva di vita. Durante la

coltura, il colorante dei glicosamminoglicani aumenta di intensità perché le cellule con il passare del tempo depositano GAGs.

La calceina AM (acetometossicalceina), permeabile alla membrana cellulare in quanto liposolubile, viene scissa dalle esterasi nelle cellule vive per dare una fluorescenza verde citoplasmatica. Mentre, l'etidio bromuro (omodimero-1) è impermeabile alla membrana cellulare e colora con fluorescenza rossa gli acidi nucleici delle cellule la cui integrità di membrana è stata compromessa.

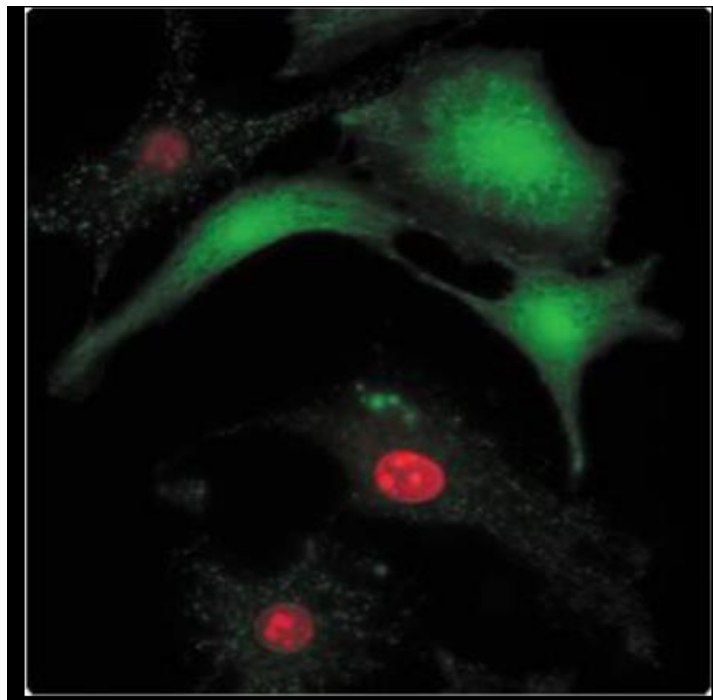


Figura 44: principio di funzionamento del test del live and dead

Di seguito sono riportate le immagini ricavate dall'analisi al microscopio dei campioni di DBP nelle diverse condizioni di trattamento: DBP + REDV 10^{-3} M, DBP + REDV 10^{-4} M, ctrl + cells, analizzati nei tre diversi time point: 1, 7, 14 giorni. Il canale "green" evidenzia le cellule in verde, quindi quella sopravvissute, il canale "red" evidenzia le cellule in rosso, quindi quelle non sopravvissute e il canale "merged" opera la fusione dei due canali allo scopo di fornire una visione globale e identificare anche la localizzazione spaziale delle cellule nelle diverse condizioni.

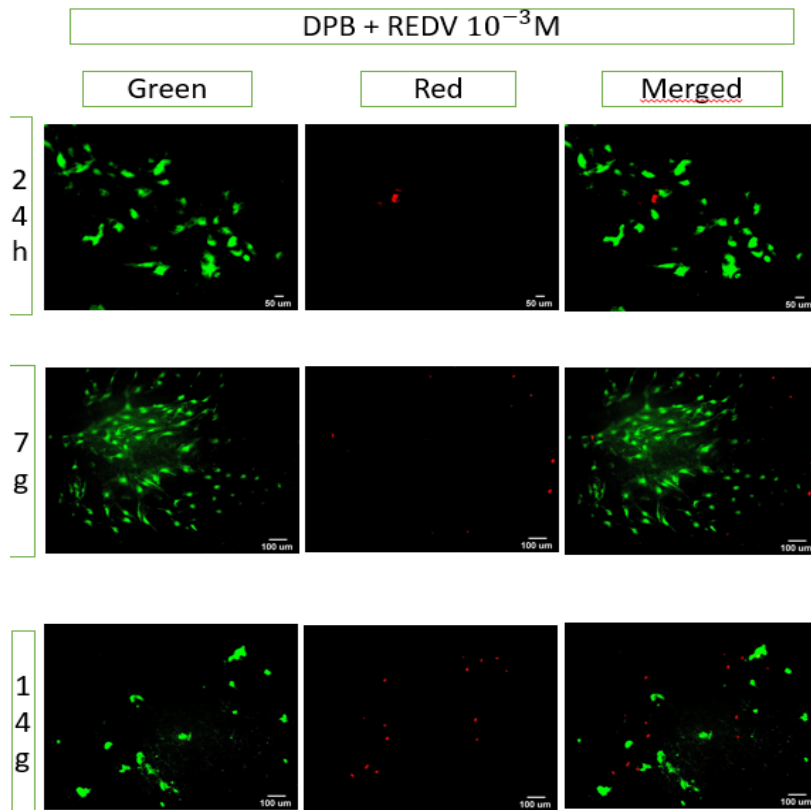


Figura 45: risultati del test live and dead

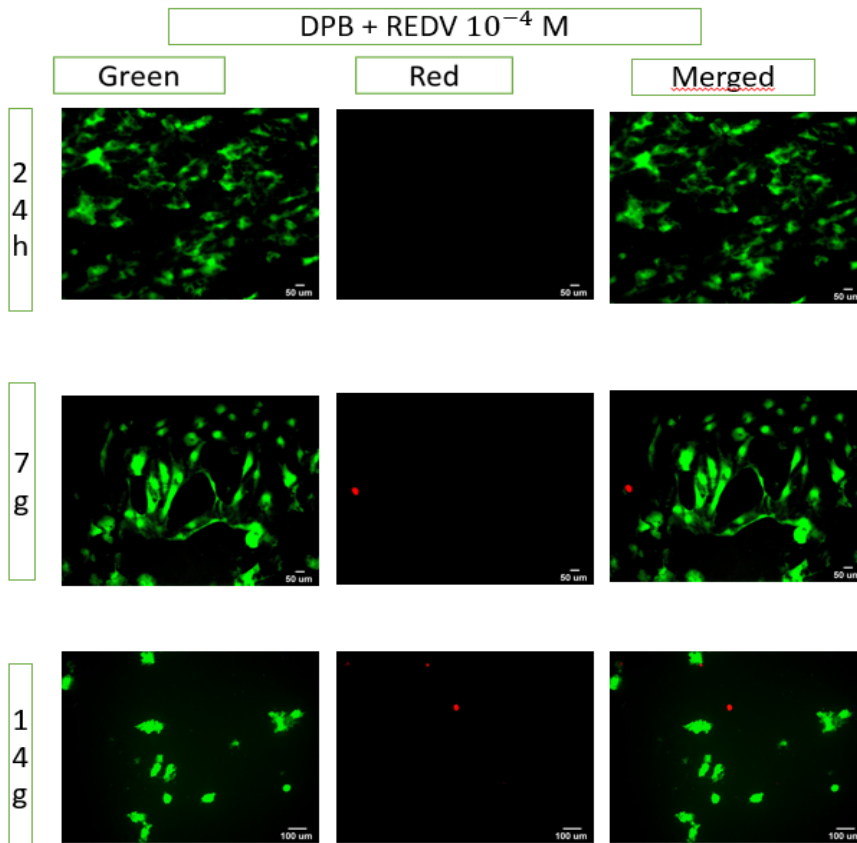


Figura 46: risultati del test live and dead campioni REDV 10^{-4} M

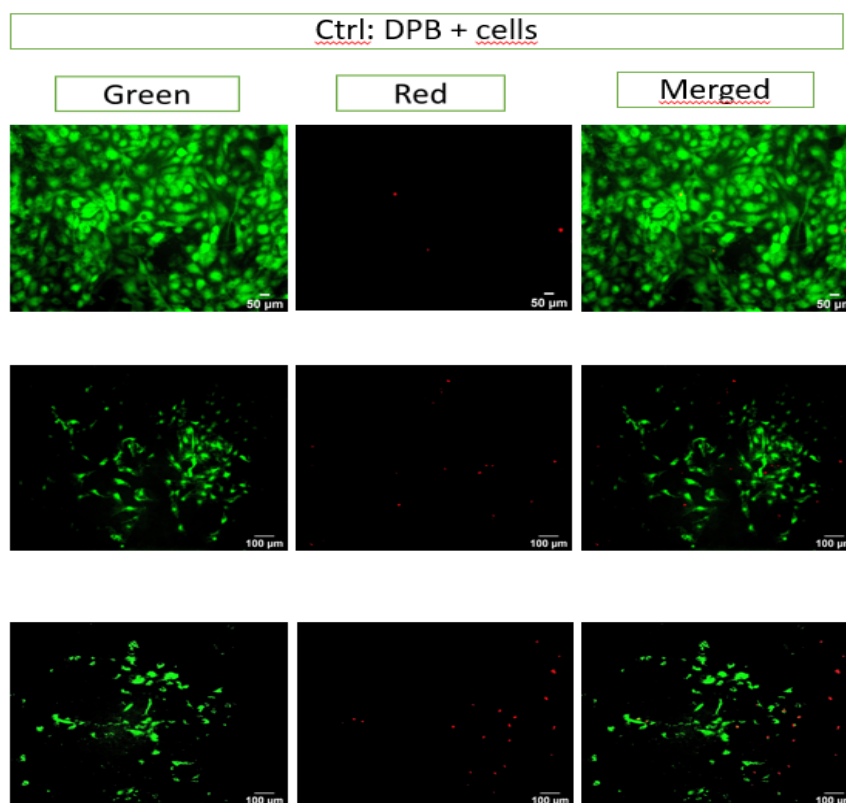


Figura 47: risultati del test live and dead del controllo composto da DPB + cells

3.7 Estrazione del DNA

I campioni utilizzati per l'esecuzione del test *live and dead* ai diversi time-point (1, 7, 14 giorni) sono stati conservati a -20°C e successivamente sono stati sottoposti al test per l'estrazione del DNA secondo il protocollo "Quick Start Protocol DNEASY Blood & Tissue Kit", presso i laboratori de "La Torre della Ricerca Città della Speranza", sotto la supervisione della Dott.ssa Saima Imran. La tabella 47 riporta i valori di media nella prima colonna e di standard deviation nella seconda colonna di ng di DNA estratti dai campioni nelle diverse condizioni di lavoro: REDV 10^{-3} M, REDV 10^{-4} M e ctrl + cells, ai tre diversi time point: 1 giorno, 7 giorni 14 giorni.

	REDV 10^{-3} M		REDV 10^{-4} M		ctrl + cells	
1g	311,82	29,02711	200,2125	58,4481	356,25	50,55054
7g	161,2875	52,59212	137,1429	25,14245	272,5	22,0794
14g	333	68,24588	305	31,22499	250	27,92848

Figura 48: la tabella riporta di valori di ng di DNA estratti dai campioni nelle diverse condizioni di lavoro: REDV 10^{-3} M , REDV 10^{-4} M , ctrl + cell, e only cells, ai tre diversi time point: 1 gioni, 7 giorni, 14 giorni.

La quantità di DNA rilevata nei campioni è fornita in ng ed è indicativa del materiale genetico contenuto all'interno dei campioni, ma non consente di ricavare informazioni riguardo lo stato delle cellule. Tale informazione può essere utile per interpretare i risultati ottenuti: si riscontrano infatti quantità di DNA elevate in campioni che in risposta al test *live and dead* non ospitano un elevato numero di cellule sopravvissute.

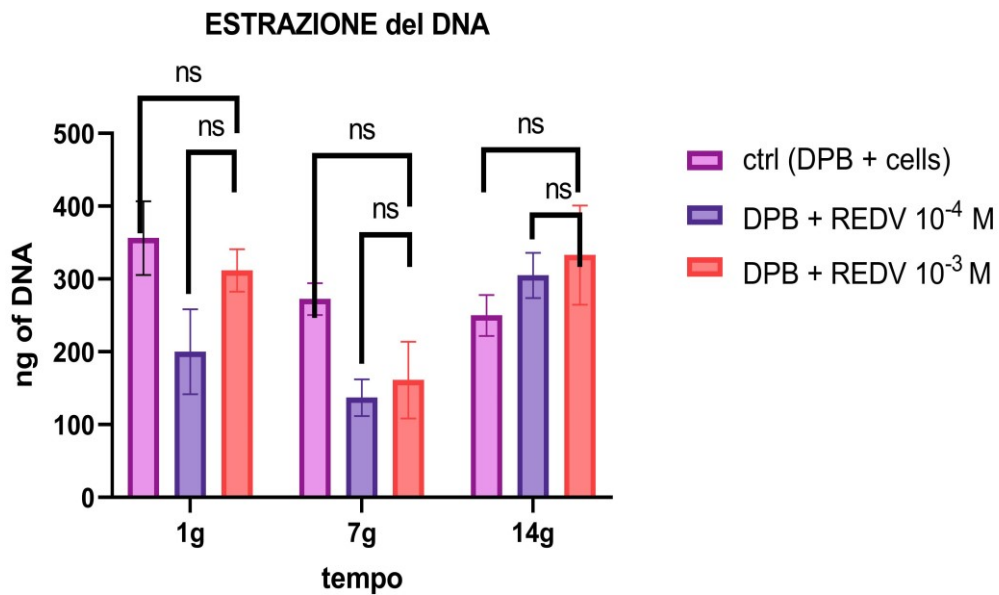


Figura 49: estrazione DNA

CONCLUSIONI

Non esiste ad oggi un biomateriale perfettamente emocompatibile. Tra i tessuti biologici che l'evoluzione ci ha consegnato, l'endotelio sano rappresenta la superficie antitrombotica e emocompatibile per eccellenza. Nella ricerca che mima i processi biologici che assicurano l'emocompatibilità per ottenere biomateriali di ultima generazione, si colloca il presente lavoro di tesi che è prosecuzione e approfondimento di un progetto precedente. L'idea è quella di utilizzare un peptide adesivo specifico per le cellule endoteliali (REDV), di realizzare il suo ancoraggio specifico e selettivo a un biomateriale per incentivare la formazione di un monostrato di cellule endoteliali che assicuri al biomateriale ingegnerizzato l'emocompatibilità e proprietà anti-trombotiche. Come biomateriale abbiamo valutato una matrice biologica decellularizzata: il pericardio bovino. Nella prima fase questo studio [13] ha dimostrato che la funzionalizzazione del pericardio bovino con soluzioni 10^{-5} M di peptide REDV aldeide era in grado di assicurare una endotelizzazione più veloce rispetto al controllo (pericardio decellularizzato ma non funzionalizzato). Il proseguo della ricerca, che si sovrappone allo scopo di questo lavoro di tesi, intendeva valutare concentrazioni crescenti della soluzione peptidica di funzionalizzazione per meglio individuare la finestra di concentrazioni superficiali bioattive nella speranza di poter incrementare l'effetto biologico osservato. La funzionalizzazione del pericardio bovino decellularizzato è stata ottenuta con soluzioni di peptidi REDV aldeide alle concentrazioni 10^{-4} M e 10^{-3} M. I risultati dell'adesione e della proliferazione delle cellule HUVEC non confermano i buoni dati ottenuti dallo studio precedente (concentrazioni operative 10^{-5} M): le cellule sui campioni trattati risultano in quantità inferiore rispetto al controllo. In conclusione il presente studio ha permesso di identificare nella concentrazione 10^{-5} M di REDV aldeide la condizione operativa per ottenere una concentrazione bioattiva di peptide ancorato utile ad assicurare una veloce endotelizzazione.

BIBLIOGRAFIA:

1. Giuseppe Biondi Zoccai. *Malattie cardiovascolari approccio clinico e scientifico*. Cap. 3 Prevenzione Cardiovascolare. Minerva Medica, 2021
2. Virgilio Gallai e Maurizio Paciaroni. *Trattato italiano delle malattie cerebrovascolari*. Centro Scientifico Editore, 2007
3. Giuseppe Biondi Zoccai. *Malattie cardiovascolari approccio clinico e scientifico*. Cap. 25 Prevenzione Cardiovascolare. Minerva Medica, 2021
4. Carlo di Bello e Andrea Bagno, *Biomateriali dalla scienza dei materiali alle applicazioni cliniche*. Pàtron editore.
5. M. S. Sacks, C. J. C. Chuong, e R. More, «Collagen Fiber Architecture of Bovine Pericardium», *ASAIO Journal*, vol. 40, n. 3, pagg. M632–M637, lug. 1994, doi: 10.1097/00002480-199407000-00075.
6. G. Luigi Mariottini. *Introduzione alle colture cellulari*. Tecniche Nuove, 2010
7. Kenneth S. Saladin e Raffaele De Caro (Curatore) *Anatomia umana* Piccin-Nuova Libreria, 2017
8. Alberto Mantovani *Enciclopedia treccani: Enciclopedia della Scienza e della Tecnica* (2008)
9. Luca Masotti. *Fisiopatologia endoteliale, glicosaminoglicani e glicocalice*. Clinical Management Issues
10. T. Gilbert, T. Sellaro, e S. Badylak, «Decellularization of tissues and organs», *Biomaterials*, mar. 2006, doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.02.014.
11. S. Manteroed altri: *Fondamenti di ingegneria dei tessuti per la medicina rigenerativa*, PatronEditore, 2009
12. Matteo Santin, Gary J Phillips. *Biomimetic, Bioresponsive, and Bioactive Materials: an introduction to integrating Materials with Tissues* 2012 Wiley
13. E. Dal Sasso *et al.*, «Covalent functionalization of decellularized tissues accelerates endothelialization», *Bioactive Materials*, vol. 6, n. 11, pagg. 3851–3864, nov. 2021, doi: 10.1016/j.bioactmat.2021.04.003.
14. D. S. Grant *et al.*, «Interaction of endothelial cells with a laminin A chain peptide (SIKVAV) in vitro and induction of angiogenic behavior in vivo», *J. Cell. Physiol.*, vol. 153, n. 3, pagg. 614–625, dic. 1992, doi: 10.1002/jcp.1041530324.
15. S. Ali, J. E. Saik, D. J. Gould, M. E. Dickinson, e J. L. West, «Immobilization of Cell-Adhesive Laminin Peptides in Degradable PEGDA Hydrogels Influences Endothelial Cell

- Tubulogenesis», *BioResearch Open Access*, vol. 2, n. 4, pagg. 241–249, ago. 2013, doi: 10.1089/biores.2013.0021
16. S. P. Massia e J. A. Hubbell, «Vascular endothelial cell adhesion and spreading promoted by the peptide REDV of the IIIICS region of plasma fibronectin is mediated by integrin alpha 4 beta 1», *J Biol Chem*, vol. 267, n. 20, pagg. 14019–14026, lug. 1992.
 17. J. A. Hubbell, S. P. Massia, N. P. Desai, e P. D. Drumheller, «Endothelial Cell-Selective Materials for Tissue Engineering in the Vascular Graft Via a New Receptor», *Nat Biotechnol*, vol. 9, n. 6, pagg. 568–572, giu. 1991, doi: 10.1038/nbt0691-568.
 18. S. Yu *et al.*, «Preparation of an Arg-Glu-Asp-Val Peptide Density Gradient on Hyaluronic Acid-Coated Poly(ϵ -caprolactone) Film and Its Influence on the Selective Adhesion and Directional Migration of Endothelial Cells», *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 8, n. 43, pagg. 29280–29288, nov. 2016, doi: 10.1021/acsami.6b09375.
 19. H. Aubin *et al.*, «Customized Interface Biofunctionalization of Decellularized Extracellular Matrix: Toward Enhanced Endothelialization», *Tissue Engineering Part C: Methods*, vol. 22, n. 5, pagg. 496–508, mag. 2016, doi: 10.1089/ten.tec.2015.0556.
 20. B. Merrifield, «Solid Phase Synthesis», *Science*, vol. 232, n. 4748, pagg. 341–347, apr. 1986, doi: 10.1126/science.3961484.
 21. M. Mergler, J.P. Durieux, e Bachem AG, *The Bachem practice of SPPS*.
 22. Grant G.A, *Synthetic peptides A User's Guide Iled*, Oxford University Press, 2002.
 23. R. J. Spears e M. A. Fascione, «Site-selective incorporation and ligation of protein aldehydes», *Org. Biomol. Chem.*, vol. 14, n. 32, pagg. 7622–7638, 2016, doi: 10.1039/C6OB00778C.
 24. R. C. Beavis e B. T. Chait, «High-accuracy molecular mass determination of proteins using matrix-assisted laser desorption mass spectrometry», *Anal. Chem.*, vol. 62, n. 17, pagg. 1836–1840, set. 1990, doi: 10.1021/ac00216a020
 25. G. Avanzolini e E. Magosso, «I sensori per misure biomediche,» in *Strumentazione biomedica. Progetto e impiego dei sistemi di misura*, Bologna, Pàtron Editore, 2015, pp. 100-107, 331-338].
 26. N. Li, Y. Li, D. Gong, C. Xia, X. Liu, e Z. Xu, «Efficient decellularization for bovine pericardium with extracellular matrix preservation and good biocompatibility», *Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery*, vol. 26, n. 5, pagg. 768–776, mag. 2018, doi: 10.1093/icvts/ivx416.

27. A. Cigliano *et al.*, «Fine Structure of Glycosaminoglycans from Fresh and Decellularized Porcine Cardiac Valves and Pericardium», *Biochemistry Research International*, vol. 2012, pagg. 1–10, 2012, doi: 10.1155/2012/979351

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio la professoressa Monica Dettin che mi ha dato innanzitutto la possibilità di svolgere questo progetto di tesi, offrendomi aiuto e supporto. Ringrazio Leonardo, per essere stato la guida iniziale del Progetto e avermi portato per la prima volta la macello. Ringrazio Saima, la cui guida è stata per me fondamentale, senza la quale non sarei riuscita ad essere qui oggi. Ringrazio tutto il team di ragazzi che ha lavorato e lavora nel laboratorio, perchè anche se la mia presenza non è stata una costante, sono stati compagni di risate, oltre che fonte di aiuti fondamentali.