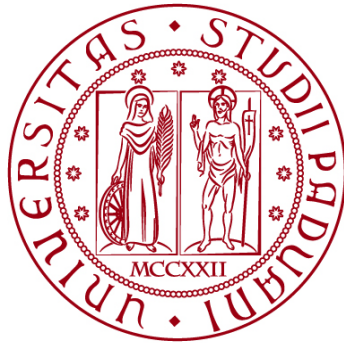


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biotecnologie



ELABORATO DI LAUREA

**ACIDO IALURONICO IN INVERTEBRATI: DALLA
GENOMICA A POSSIBILI APPLICAZIONI
BIOTECNOLOGICHE**

Tutor: Prof. Rosani Umberto

Dipartimento di Biologia

Laureanda: Tronchin Elisa

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

INDICE:

ABSTRACT

INTRODUZIONE.....	1
1. Acido ialuronico negli organismi vertebrati.....	2
1.1. Struttura proprietà chimico-fisiche e funzioni	2
1.2. Sintesi e degradazione dell'acido ialuronico.....	3
2. Acido ialuronico in organismi invertebrati.....	6
2.1. HA in <i>Mytilus galloprovincialis</i>	7
2.2. Confronto tra l'acido ialuronico in <i>M. galloprovincialis</i> e l'HA ottenuto da cordone ombelicale umano.....	11
2.3. Cosa ha messo in evidenza lo studio.....	13
3. Applicazioni	
3.1. Una pellicola ispirata al mitilo per l'adesione al tessuto buccale e un efficiente somministrazione orale del farmaco.....	15
3.2. Nanostrutture derivate dall'acido ialuronico ispirate al mitilo, utili per targeting e penetrazione di tumori.....	17
3.3. Scaffold compositi di collagene e acido ialuronico ispirato alle cozze con eccellente proprietà antiossidanti e il rilascio prolungato di un fattore di crescita per migliorare la guarigione delle ferite diabetiche.....	18
CONCLUSIONI.....	20
BIBLIOGRAFIA	

ABSTRACT

L'acido ialuronico è un glicosamminoglicano generalmente presente negli organismi vertebrati. Si tratta di una molecola che per le sue capacità chimico-fisiche svolge un ruolo fondamentale all'interno dell'organismo, infatti, è una componente della matrice extracellulare coinvolta nei meccanismi di protezione, di resistenza agli urti, coinvolta nel mantenimento dell'omeostasi, grazie alla sua capacità di trattenere l'acqua. Inoltre, si tratta di una molecola coinvolta anche nei processi d'infiammazione e di segnalazione intercellulare.

Studiando questa molecola e gli altri glicosamminoglicani è stato scoperto che, a differenza di quanto si pensava, non erano presenti solo e unicamente all'interno dei vertebrati ma sono state ritrovate negli organismi invertebrati. Per quanto riguarda l'acido ialuronico la molecola purificata da questi organismi è simile a quella dei vertebrati, e anche se differisce per alcune caratteristiche è stato dimostrato che è in grado di interagire con alcune strutture e recettori e molecole in modo simile a quella umano.

La scoperta della presenza di questa molecola, simile in quanto struttura e funzione ha quella umana ha portato allo studio e allo sviluppo nuovi modelli che possono essere applicati a diversi ambiti della vita quotidiana, come ad esempio nell'ambito medico-farmaceutico.

INTRODUZIONE

I glicosamminoglicani (GAG) sono complessi polisaccaridi, formati da unità disaccaridiche che si ripetono secondo un ordine determinato. Queste molecole presentano la capacità di legarsi facilmente all'acqua creando delle molecole idratate, conferendo ai tessuti che le contengono la capacità di idratarsi abbondantemente. Queste molecole sono storicamente associate agli organismi vertebrati nei quali sono una componente fondamentale della sostanza amorfa e della matrice extracellulare. Inoltre, in questi organismi coprono un ruolo importante durante la crescita cellulare, la differenziazione, la morfogenesi, la migrazione cellulare e durante le infezioni batteriche e virali. La maggior parte dei GAGs presenti all'interno degli organismi vertebrati includono: Condroitin solfato (CS), Dermatan solfato (DS), Eparina ed Eparan solfato (HS) e acido ialuronico (HA). Nonostante siano generalmente associate agli organismi vertebrati, la presenza di queste molecole è stata riscontrata anche in alcuni tipi di microrganismi e di organismi invertebrati suggerendo una possibile funzione conservata all'interno del regno animale. Tra questi glicosamminoglicani una molecola particolarmente importante è l'acido ialuronico.

L'acido ialuronico è un glicosamminoglicano lineare isolato per la prima volta a partire dal corpo vitreo dell'occhio di bovino nel 1934 da Karl Meyer e John Palmer. Si tratta di una molecola ubiquitaria in tutti i vertebrati, la quale rappresenta una componente fondamentale della matrice extracellulare dei tessuti connettivi adulti assieme alle glicoproteine, ai proteoglicani e al collagene. In questi organismi risulta particolarmente abbondante in diversi tessuti, quali: le cartilagini, la pelle, il cervello, il corpo vitreo, il cordone ombelicale e il liquido sinoviale. Si tratta di una molecola composta da unità disaccaridiche ripetute di **acido D-glucorico e N-acetil- D-glucosamina**, la quale presenta differenti funzioni all'interno dell'organismo, in particolare, ha un importante ruolo strutturale e di protezione, ma funge allo stesso tempo di molecola segnale che regola diversi meccanismi cellulari, tra cui l'adesione, la proliferazione cellulare e la migrazione, ma ha anche un ruolo legato alla risposta infiammatoria. L'acido ialuronico, come gli altri GAGs, è generalmente associata agli organismi vertebrati è stata ritrovata e isolata anche in altri organismi. Si tratta di una componente che è stata infatti isolata in diversi microrganismi, in questi casi spesso si presenta come costituente della capsula propriamente detta, alla quale fornisce la resistenza all'essiccamento, favorendo l'adesione del microrganismo e fungendo come riserva di nutrienti e fattore di virulenza. Ma è stata isolata anche in organismi invertebrati, in questi la distribuzione dell'acido ialuronico risulta inferiore rispetto ai vertebrati, viene isolata e identificata per la prima volta in un mollusco bivalve, *Mytilus galloprovincialis*.

1 Acido Ialuronico negli organismi vertebrati

1.1 Struttura proprietà chimico-fisiche e funzioni

L'acido ialuronico è un glicosamminoglicano generalmente presente negli organismi invertebrati in isoforme diverse, che variano per la lunghezza della catena stessa, e possono arrivare ad avere un peso molecolare che varia dai 1×10^5 fino a 2×10^7 Da, caratterizzate dalla presenza di gruppi carbossilici (COO-, della molecola di acido glucuronico), i quali conferiscono alla molecola una carica negativa e che la rendono una molecola altamente idrofila in grado di interagire con l'acqua formando una rete viscosa.

L'HA presenta delle proprietà chimico-fisiche che lo differenziano dagli altri glicosamminoglicani. Si tratta di una molecola che presenta una notevole capacità di idratazione, la quale dopo l'assorbimento dell'acqua può gonfiarsi di diverse volte rispetto al suo volume iniziale, questo accade perché se posta all'interno di una soluzione acquosa, è in grado di formare una struttura a doppia elica stabilizzata da legami a idrogeno intermolecolari, tra l'acetammide del GlcNAc e il gruppo carbossilico dei GLcA, e attraverso interazioni tra patch idrofobici. In particolare, nelle soluzioni altamente concentrate di HA, le molecole sono in grado di formare una struttura reticolare caratterizzata da una elevata elasticità e viscosità, che risulta visibile nel momento in cui viene applicata una forza sul reticolo che porta ad un allineamento delle molecole con il parziale mantenimento delle interazioni intermolecolari. Si tratta quindi di un reticolo tridimensionale dotato di notevole viscoelasticità. Per questa sua capacità di trattenere l'acqua e per la sua resistenza l'acido ialuronico ha il compito di idratare la matrice extracellulare e di regolare l'omeostasi cellulare dei tessuti in cui è presente garantendo la resistenza alle forze di compressione. Per la sua proprietà chimico fisiche (struttura, dimensione e carica) l'HA presenta una bassa capacità di diffusione, per questo motivo una volta prodotta si "deposita" all'esterno delle cellule che la sintetizzano formando una specie di rivestimento, che va ad influire anche sulla distribuzione tissutale di nutrienti e piccoli elettroliti, che vanno ad interagire con il glicosamminoglicano, ma anche le macromolecole e le proteine sono parzialmente escluse e hanno capacità di diffusione bassa a causa dell'effetto di "setaccio" molecolare svolto dal glicosamminoglicano dovuto alla struttura reticolare.

L'HA non presenta solo proprietà e funzioni legate alla sua struttura e alla sua natura chimico-fisica, ma è in grado di interagire con alcune macromolecole e proteine andando a regolare alcuni processi fisiologici come l'adesione, la migrazione e la proliferazione cellulare. Questo suggerisce che è coinvolto nei processi di morfogenesi e riparazione delle ferite. Un esempio è il recettore per l'acido ialuronico CD44, questo interagisce con HA attivando una cascata segnale che regola l'espressione di geni collegati alla crescita e sopravvivenza cellulare,

induce il riarrangiamento del citoscheletro e l'arruffamento della membrana che portano all'attivazione della migrazione cellulare.

Negli organismi vertebrati, non solo la molecola funzionale di HA ha una rilevanza biologica, ma anche i suoi frammenti che derivano dalla degradazione da parte dalle ialuronidasi sono in grado di diffondere attraverso i tessuti e interagire con i recettori per l'acido ialuronico delle cellule periferiche sotto la forma di segnali intercellulari.

Queste funzioni possono essere controllate e regolate andando a modulare: la concentrazione della molecola, la lunghezza della catena, il tasso di turnover delle molecole e lo stato di associazione con le biomolecole.

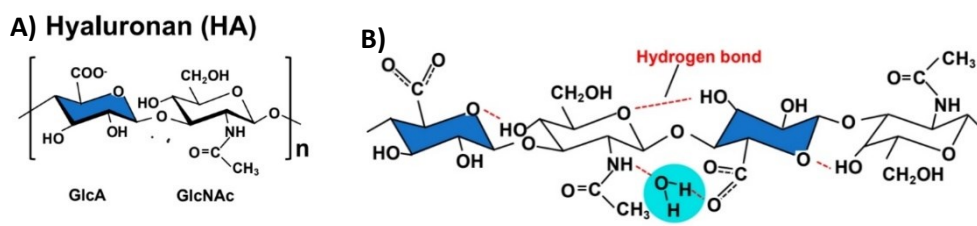


Figura 1: A) Rappresenta la struttura molecolare delle unità disaccaridiche di HA
 B) Rappresenta la struttura secondaria dell'HA tetrasaccaride con l'acqua
 Fonte: Kobayashi T, Chanmee T, Itano N. *Hyaluronan: Metabolism and Function. Biomolecules. 2020 Nov 7*

1.2 Sintesi e degradazione dell'acido ialuronico

Un ruolo particolarmente importante nel controllo e regolazione dell'acido ialuronico e delle sue funzioni è quello svolto dalla sintesi e degradazione della molecola. Questi meccanismi sono essenziali per regolare l'equilibrio tra molecola prodotta e degradata e di conseguenza modulare la concentrazione di acido ialuronico e dei suoi frammenti, ma anche il tasso di turnover delle varie molecole.

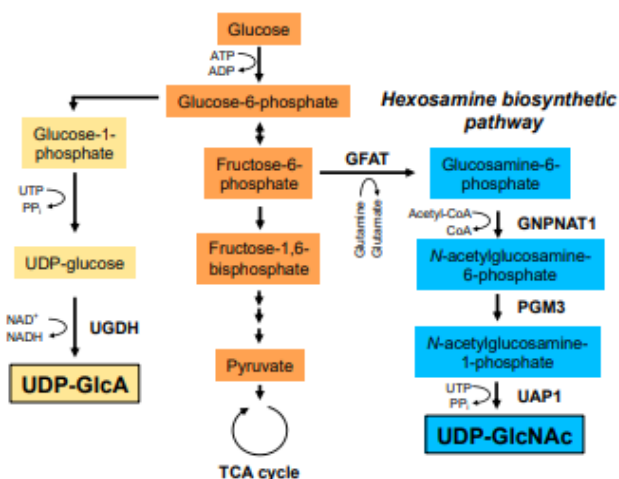


Figura 2: Patway biosintetico della produzione di UDP-GlcA e UDP-GlcNAc
 Fonte: Kobayashi T, Chanmee T, Itano N. *Hyaluronan: Metabolism and Function. Biomolecules. 2020 Nov 7*

Negli organismi vertebrati la sintesi delle molecole di acido ialuronico avviene in modo diverso rispetto a quello degli altri glicosamminoglicani. Questo processo è operato da una famiglia di proteine transmembrana, che presentano una forma simile ad un canale. Queste sintetizzano la nuova molecola e rilasciano direttamente la molecola all'esterno delle cellule. Queste proteine sono quindi composte da cluster di amminoacidi idrofobici che si inseriscono all'interno del doppio strato fosfolipidico e da una parte centrale di amminoacidi che relativamente idrofili che possiedono l'attività catalitica per trasferire i substrati UDP-GlcNAc e UDP-GlcA alla catena nascente. Sono state identificate tre isoforme differenti di Hyluronic Acid Synthetase (HAS): HAS1, HAS2 e HAS3. Queste tre isoforme sono differenti tra loro in termini di attività, velocità di allungamento e stabilità del prodotto. I geni che controllano queste proteine sono espressi in modo diverso durante la morfogenesi cellulare e producono enzimi con attività differenti che risultano complementari tra loro. Ognuno di questi enzimi regola è regolato in modo rigoroso e produce una catena di acido ialuronico con caratteristiche differenti; HAS3 produce molecole più corte (1×10^5 to 1×10^6 Da), mentre al HAS1 e HAS2 producono molecole più lunghe (2×10^6 Da), oltre alla lunghezza varia anche la velocità di sintesi, la HAS1 risulta più lenta rispetto alle altre.

La degradazione di queste molecole va a determinarne il turnover. Si tratta di un meccanismo rapido, l'emivita dell'acido ialuronico è intorno alle 12-24h nella pelle e di pochi minuti nel flusso sanguineo. L'HA nel sangue è catabolizzato nei linfonodi e nel fegato, mentre a livello dei tessuti viene catabolizzato all'esterno delle cellule da enzimi chiamati ialuronidasi, dalle specie reattive dell'ossigeno (ROS), dai superossidi, dal nitrato ossido e dal perossido nitrito generato durante il processo di infiammazione. Le ialuronidasi sono enzimi legati alla superficie cellulare in grado di interagire con molecole di HA legandolo e internalizzandolo nella cellula attraverso vescicole. In questa sede la molecola viene tagliata in frammenti lunghi circa 20 kDa, che sono successivamente digeriti nuovamente fino ad ottenere dei tetrasaccaridi.

Oltre all'equilibrio tra la sintesi e la degradazione delle molecole un ruolo importante dimensione delle molecole di acido ialuronico presente. È stato dimostrato che le molecole di HA dimensioni differenti svolgono funzioni diverse e talvolta opposte. Per esempio, le molecole di grandi dimensioni hanno effetti antinfiammatori andando a controllare il reclutamento delle cellule infiammatorie, mentre quelli a basso peso molecolare svolgono un ruolo pro-infiammatorio promuovendo l'angiogenesi e il rimodellamento tissutale nella riparazione delle ferite.

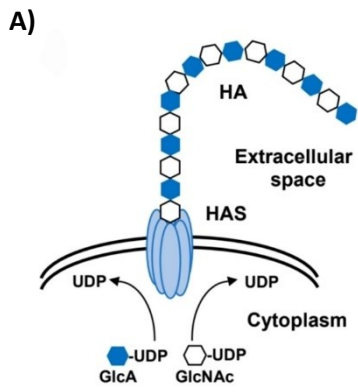
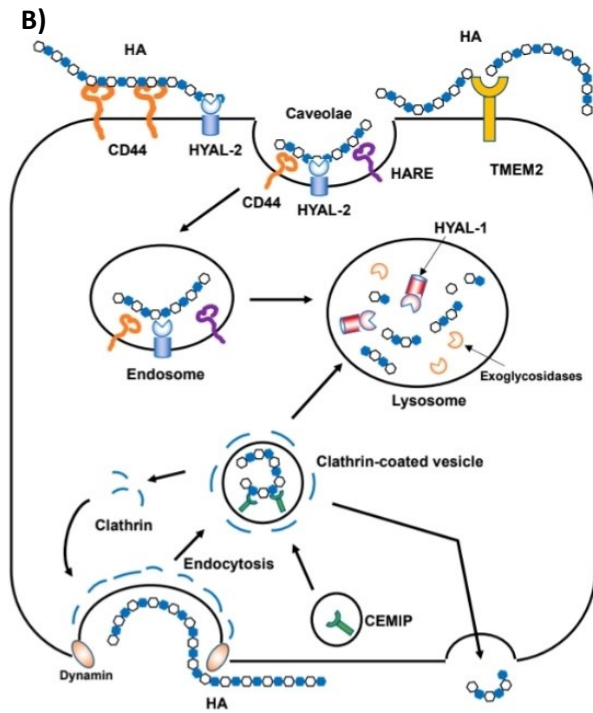


Figura 3: A) Illustrazione della sintesi e secrezione dell'HA B) Illustrazione schematica del meccanismo di degradazione dell'acido ialuronico

Fonte: Kobayashi T, Chanmee T, Itano N. Hyaluronan: Metabolism and Function. *Biomolecules*. 2020 Nov 7



2 Acido ialuronico in organismi invertebrati

Nell' articolo *Evolution of glycosaminoglycans* di S. Yamana, K. Sugahara e S.Özbek pubblicato nel 2011, viene analizzata la presenza di glicosamminoglicani all'interno di organismi invertebrati, che tipo di molecole sono presenti e studiando la loro struttura e funzione anche in relazione ai GAGs individuati in organismi vertebrati. In questo studio viene discussa l'analisi dei glicosamminoglicani in undici differenti *phyla* di invertebrati, focalizzandosi sulla struttura delle molecole e sulla loro funzione fisiologica. Gli 11 *phyla* analizzati sono Porifera, Platyhemites, Cnidaria, Nematoda, Echinodermata, Anellida, Tunicata, Mollusca, Chelicerata, Crustacea e Hexapoda. L'analisi effettuata mette in luce che, diversamente da quanto si pensava, anche negli organismi invertebrati è presente la componente di GAGs. Queste presentano delle strutture molto simili a quelli degli invertebrati, infatti, molti risultano presenti e conservati anche in organismi più complessi come i mammiferi. Partendo da questa informazione, si deduce che queste particolari molecole svolgono un ruolo importante che è stato conservato durante l'evoluzione.

Durante lo studio, non solo è stata dimostrata la presenza e analizzate le caratteristiche chimico-fisiche di queste molecole ma è stata anche valutata la loro distribuzione all'interno dei vari organismi. In particolare, viene riscontrato che alcuni glicosamminoglicani sono distribuiti in modo differente all'interno dei vari organismi studiati. Alcune molecole con HS risultano essere ampiamente distribuite tra i vari organismi a partire da quelli primitivi fino all'uomo, al contrario molecole come il CS e il DS risultano invece essere più limitate e presumibilmente legate a funzioni specifiche, presenti sono in determinate specie o *phyla*. Un caso particolare è HA, il quale dallo studio non risulta presente in nessun phylum di invertebrati ad eccezione di uno, i molluschi.

Il phylum dei molluschi è una dei più complessi dal punto di vista della composizione della componente dei glicosamminoglicani. Infatti, presenta una grande eterogeneità di GAGs riscontrati, le cui diversità cellulari talvolta risultano essere maggiori rispetto a quelle dei mammiferi. Tra queste è presente, ad esempio, il CS over-solfato riscontrato nei calamari che viene utilizzato per studiare l'attività biologica dei GAGs altamente solfati, oppure, è stato identificato HS altamente solfato, ritrovato in alcuni molluschi che presenta caratteristiche simili con quello umano ed è utilizzabile come marcatore unico per la regione legante l'antitrombina dell'eparina e dell'eparan solfato. A differenza degli altri *phyla*, in questo viene riscontrata per la prima volta negli invertebrati la presenza di acido ialuronico, il quale viene prodotto dal mollusco bivalve *Mytilus galloprovincialis*. Lo studio su questo organismo ha permesso la sua estrazione, purificazione e caratterizzazione, anche rispetto ad altri tipi di acido ialuronico come ad esempio quello nei mammiferi. Questa molecola risulta complessa da identificare in quanto presenta una struttura simile a quella del CS e di conseguenza sono difficili da distinguere.

Viene indentificato con l'utilizzo di tecniche moderne (come NMR e HPLC e l'elettroforesi capillare), grazie alle quali viene chiaramente identificato il peso molecolare che risulta inferiore rispetto a quelli dei mammiferi.

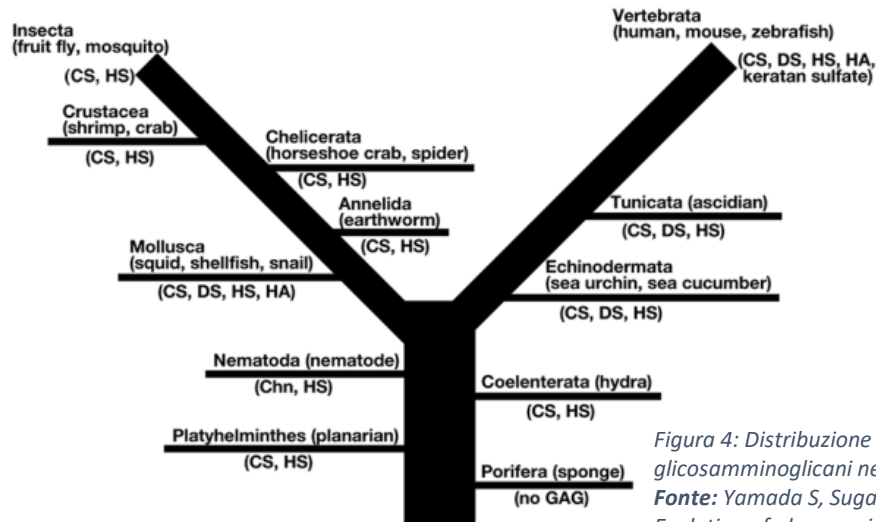


Figura 4: Distribuzione dei glicosamminoglicani nel regno animale
 Fonte: Yamada S, Sugahara K, Ozbek S. *Evolution of glycosaminoglycans: Comparative biochemical study. Commun Integr Biol.* 2011 Mar

2.1 HA in *Mytilus galloprovincialis*.

Come in precedenza affermato, i glicosamminoglicani sono distribuiti anche nel mondo degli invertebrati, tutti ad eccezione dell'acido ialuronico, il quale non è stato caratterizzato in questi organismi nonostante presenti diverse funzioni e proprietà biologiche fondamentali.

L'acido ialuronico viene estratto, purificato e caratterizzato per la prima volta nel mollusco bivalve *Mytilus galloprovincialis*, l'intero studio è stato pubblicato in un articolo del settembre 2002 di N. Volpi e F. Maccari, *Purification and characterization of Hyluronic acid from the mollusc bivalve Mytilus galloprovincialis*. Nell'articolo viene interamente descritta la procedura di estrazione e purificazione, e la caratterizzazione del composto identifica. Questo viene poi utilizzato per una successiva analisi delle caratteristiche chimico-fisiche effettuando un confronto con HA derivato dal cordone ombelicale umano.

Procedure di purificazione, estrazione e caratterizzazione utilizzate

La procedura si divide in una prima fase di estrazione dei polisaccaridi a partire dal corpo di *M. galloprovincialis*. Per prima cosa vengono estratte e purificati i polisaccaridi, procedendo poi con una fase di isolamento del composto d'interesse e la successiva caratterizzazione, per identificare in modo univoco la presenza dell'acido ialuronico, e le sue caratteristiche.

Estrazione e purificazione: L'estrazione avviene a partire da esemplari adulti di mitilo raccolte dalle rocce del mare Adriatico vicino a Cattolica (RM, Italia), i quali

vengono mantenuti in laboratorio. Dopo essere stati raccolti i molluschi vengono uccisi e privati del guscio, il corpo viene prima sgrassato con acetone e poi successivamente centrifugato e asciugato 60°C per circa 24h. Il pellet così ottenuto viene solubilizzato, 1g/20 ml, con un buffer sodio acetato 100mM a pH 5.5 contenete EDTA e cisteina. A questa soluzione viene aggiunta la papaina (in quantità proporzionale al peso) e incubata ancora per 24h a 60°C in agitazione. Una volta conclusa l'incubazione, la soluzione viene fatta bollire per 10 min e successivamente centrifugata per 15 min, per poi aggiungere tre volumi di etanolo che vanno a saturare il sodio acetato, il composto così ottenuto è mantenuto per 24h a +4°C. Il precipitato che si ottiene viene recuperato con la centrifugazione e successivamente asciugato per 6h a 60°C, quello che si ottiene può essere successivamente disciolto in 10mL di una soluzione 0.05M di NaCl e centrifugato. Il campione può essere quindi estratto attraverso l'uso di una colonnina a scambio ionico, che consente di eluire i polisaccaridi. Alle frazioni raccolte vengono poi aggiunte due unità di etanolo per riuscire a dividere frazioni contenenti i singoli polisaccaridi, i quali vengono analizzati con Assay di acido urico e l'elettroforesi su gel di agarosio. Successivamente vengono fatti precipitare a 4°C e centrifugati per recuperare il pellet che viene fatto asciugare e solubilizzato in acqua distillata per una successiva analisi.

Le frazioni estratte dalle colonnine a scambio ionico e analizzate con Assay di acido urico, consentono di rilevare una forte assorbanza a 210 nm per le frazioni dalla 8-19 e per quelle dalla 30-48, che assieme al test per il carbazolo confermano la presenza di polisaccaridi contenenti acido urico in due picchi di assorbimento UV.

Elettroforesi su gel di Agarosio: L'elettroforesi viene effettuata su un gel di Agarosio a concentrazione 0.5% in un tampone di barrio 0.04M a pH 5.8. La corsa viene effettuata per 150 min a 50 mA, in un tampone 0.05M di 1,2-diaminopropene. La piastra ottenuta viene poi messa a bagno in bromuro di cetiltrimetilammonio per 6 h. Il gel ottenuto è successivamente colorato con blu di toluidina e Stains-All, il primo consente di colorare i GAGs solfatati che mostrano forte proprietà metacromatiche, questi vengono completamente colorati con entrambi i coloranti e mostrano un colore viola, mentre l'acido ialuronico non viene colorato con il blu di toluidina ma risulta sensibile al colorante Stains-All con il quale assume un forte colore blu.

Le singole frazioni ottenute e analizzate con questa tecnica mettono a luce che:

- Nelle frazioni 8-19 nessuna banda con il blu di toluidina e una banda dopo Stains-All, quindi sono individuati solo polisaccaridi non solfatati
- Nelle frazioni dal 37 al 58 una banda con il Stanins All e nessuna con il blu di toluidina, quindi sono presenti sono polisaccaridi non solfatati
- Nelle frazioni dal 59-61 2 bande con toluidine blue, sono presenti polisaccaridi solfatati

- Nelle frazioni dal 20-36 nessuna banda, non risulta la presenza di polisaccarici

Una volta analizzati i gel, vengono considerate le frazioni che mostrano la presenza di polisaccaridi vengono raccolte. Le frazioni 8-19 chiamandole peak I, quelle 37 al 58 peak II e quelle dal 59-61 peak III.

Ulteriori analisi su gel di agarosio hanno confermato la presenza delle bande nei tre peaks, che mettono in evidenza la presenza di polisaccaridi non solfati nei peaks I e II, mentre una forte metacromasia nel III se colorano con il blue di toluidina e quindi la presenza di polisaccaridi solfati.

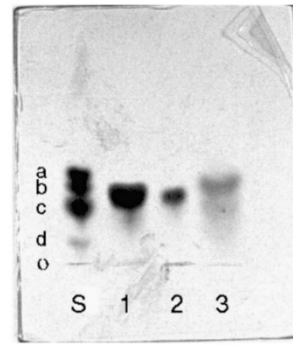


Figura 5: Gel di agarosio colorato con Stains All. (1) frazioni dalla 8-19, (2) frazione dalla 37-58 e (3) frazioni dalla 59-61. Con le lettere è indicato: (a) CS, (b) DS, (c) Eparina e ES, (d) eparina
 Fonte: Volpi N, Maccari F. *Purification and characterization of hyaluronic acid from the mollusc bivalve *Mytilus galloprovincialis**. *Biochimie*. 2003 Jun

Caratterizzazione dell'HA da *M. galloprovincialis*

L'identificazione del composto comporta l'utilizzo di tecniche differenti, tra queste troviamo e tecniche di spettrometria di massa e cromatografiche, ma anche tecniche che comportano l'utilizzo di enzimi.

- Determinazione dell'Acido ialuronico disaccaride: Il disaccaride di HA non solfato viene eluito attraverso un trattamento con condroitin ABC liasi e separato da quello non saturato attraverso un forte anion-exchange (SAX)-HPLC, il quale analizza il disaccaride separandolo e individuandolo a una lunghezza d'onda di 232 nm. Questo può anche essere determinato attraverso l'uso di elettroforesi capillare che utilizza un rilevatore UV impostato a 230 nm. Le rilevazioni e le analisi sono state eseguite su un tubo capillare di silice fusa non rivestita a 25°C utilizzando la normale polarità di 20kV. Il tampone operativo era composto da idrogeno fosfato disodico (40 mM), tetraborato di sodio (10 mM), e SDS (40mM) tamponati a pH 9 mediante l'aggiunta di HCl (1M). Con questa tecnica vengono quindi trattati i peak I e II, che contenevano i polisaccaridi non solfati. La procedura inizia con l'utilizzo dell'enzima Condrotin ABC liasi, il quale consente di separare il disaccaride di acido ialuronico dalla condroitina. La molecola ottenuta può essere analizzata attraverso elettroforesi capillare, l'elettroferogramma ottenuto dimostra che è presente un'unica specie di acido ialuronico disaccaride, il quale può essere identificato andando a valutare il suo tempo di migrazione.
- Identificazione di tetrasaccaridi ed esasaccaridi di HA: La loro identificazione avviene dopo il trattamento con ialuronidasi operato dal sistema SAX-HPLC usando un gradiente lineare da NaCl 50mM a NaCl

1.2M da un pH 4 a 0 in circa 60min (1.5 mL al min). L'eluato è controllato a 232 nm.

Il polisaccaride viene quindi degradato a tetrasaccaride ed esesaccaride. Sull'HA viene, inoltre, fatta agire una Ialuronidasi di mammifero, andando a valutare se questa ha agito studiando le molecole ottenute.

- Cromatografia ad esclusione dimensionale ad alte prestazioni: La cromatografia ad esclusione dimensionale ad alte prestazioni (HPSEC) è eseguita utilizzando una colonna BioSepSEC-S4000. Il peso molecolare è stato calcolato dal Software GPC di Jasco Borwin, attraverso l'utilizzo di una curva calibrata costruita a partire da molecole di HA già conosciute. Successivamente viene determinata la massa dell'acido ialuronico ottenuto da mitilo, la qual è ottenuta attraverso analisi con HPSEC, è stato trovato essere di circa 200 kDa, inferiore rispetto a quello presente nei mammiferi.
- Spettrografia C-NMR: Gli spettri C-NMR ottenuti da *M. galloprovincialis* sono poi raccolti da uno spettrometro Bruker AMX400WB operante a 100.61 MHz, e analizzati in relazione a spettri già conosciuti. Il campione è stato pre-liofilizzato tre volte con D₂O e infine preparato dissolvendo 5 mg in 0.6 ml di D₂O ad alto livello di denaturazione. Lo spettro è stato registrato ad una temperatura di 33°C e a pH 6.5. (gli spostamenti chimici dello spettro sono citati rispetto al 4,4-dimetil-4-silapentan-1-solfonato di sodio estramo (0,0 ppm).

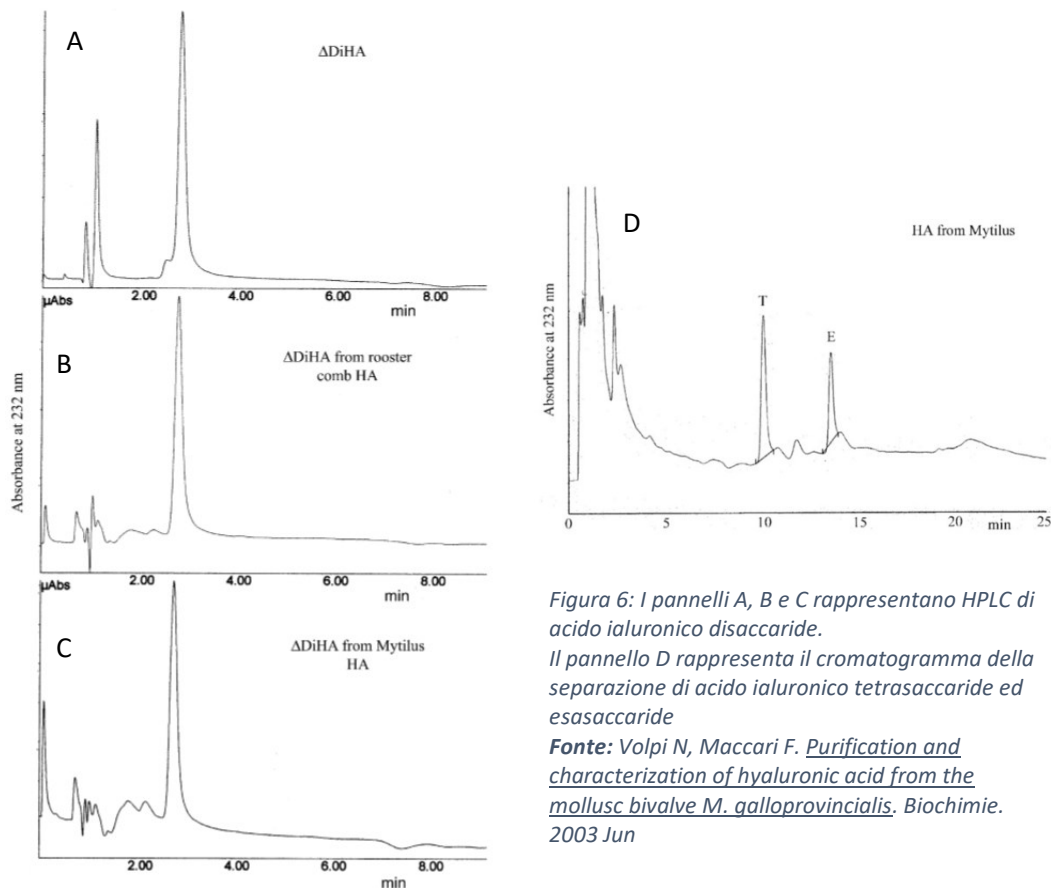


Figura 6: I pannelli A, B e C rappresentano HPLC di acido ialuronico disaccaride.

Il pannello D rappresenta il cromatogramma della separazione di acido ialuronico tetrasaccaride ed esasaccaride

Fonte: Volpi N, Maccari F. Purification and characterization of hyaluronic acid from the mollusc bivalve *M. galloprovincialis*. *Biochimie*. 2003 Jun

2.2 Confronto tra l'acido ialuronico in *M. galloprovincialis* e l'HA ottenuto da cordone ombelicale umano.

L'HA derivato da mitilo, dopo essere stato purificato e caratterizzato, vengono studiate le sue proprietà biologiche. Per farlo viene eseguito uno studio che confronta l'acido ialuronico di mitilo con l'acido ialuronico derivato dal cordone ombelicale umano. Come già detto questi composti sono simili ma non uguali, la differenza più evidente è il peso molecolare differente. Quello umano presenta un peso maggiore. Viene quindi studiata la capacità di interagire con altre molecole come l'aggremano derivato dalla cartilagine di bovino andando a studiare la sua capacità di interazione con l'aggremano, la sua viscosità e come interviene nella proliferazione cellulare.

- Interazione dell'HA di mitilo con aggremano: L'HA di mitilo e quello derivato dal cordone ombelicale umano, sono dissolti in un buffer di sodio acetato 0.5M, ad un pH 6.8 e successivamente aggiunti alla soluzione di prova nello stesso tampone con un rapporto tra il peso dell'HA e quello dell'aggremano di 1:100 (per l'acido ialuronico di mitilo anche con rapporto 5:100 e 10:100 rispetto all'aggremano). La soluzione viene fatta riposare a 4 °C per 12h, l'entità dell'aggregazione è stata misurata mediante cromatografia su sepharosio CL-2b monitorando le frazioni con il test dell'acido urico. La colonna di sepharose CL-B2 era 1*70 cm e le frazioni di 1 ml sono raccolte con un flusso di 3 ml/h.
- Misurazione della viscosità: I campioni sono stati centrifugati per eliminare tutte le bolle d'aria. Sono utilizzati 10 mL di PBS contenete HA di mitilo o di cordone ombelicale ai quali viene aggiunto un ugual volume contenete aggremano, questi sono mischiati ed equilibrati a 37°C per circa 6h, la viscosità è misurata attraverso un viscosimetro di Ubbelohde. La viscosità specifica è calcolata sottraendo la viscosità del PBS da quella ottenuta con il campione in soluzione.
- Misurazione della proliferazione cellulare: I fibroblasti del derma sono isolati a partire da biopsie della pelle e fatti crescere in DMEM con l'aggiunta di 10% FCS e antibiotico, incubati a 37°C in un ambiente umido. La misurazione della crescita cellulare dei fibroblasti avviene in presenza di una quantità crescente di Acido ialuronico di mitilo e del cordone ombelicale umano utilizzando il sistema di proliferazione cellulare Eliza e un lettore di micropiastre modello 550 di Bio-Rad.

Risultati

Per l'HA di Mitilo è stata testata la capacità di interagire con aggregato della cartilagine bovina, per formare un aggregato ad alto peso molecolare e il risultato ottenuto è confrontato con quello che si ottiene utilizzando acido ialuronico all'acido ialuronico bovino. Attraverso le analisi compiute, e descritte nel capitolo precedente non è stata individuata una interazione rilevante tra aggregato e l'acido ialuronico di mitilo, mentre viene rilevato un picco nell'interazione con quello di bovino. La seconda analisi va ad analizzare la viscosità del composto, la quale nel caso dell'HA derivato da mitilo risulta minore rispetto a quello umano. L'aggiunta di aggregato nell'acido ialuronico derivato dal cordone ombelicale aumenta la viscosità dell'HA ialuronico umano, analizzando la l'HA derivato da mitilo, questo mostrava un effetto minore, la viscosità aumenta in modo contenuto, questo fenomeno è probabilmente dovuto al minor peso molecolare che va ad influire sulla capacità di aggregarsi con altre molecole, influenzando anche la viscoelasticità del composto.

Per quanto riguarda la proliferazione cellulare, l'analisi dimostra che entrambi i composti hanno la stessa capacità di inibire la proliferazione cellulare, questo è probabilmente dovuto alla capacità della molecola di interagire con altre proteine e recettori presenti sulla superficie di membrana delle cellule, come il recettore CD44 e di conseguenza andare a regolare la proliferazione.

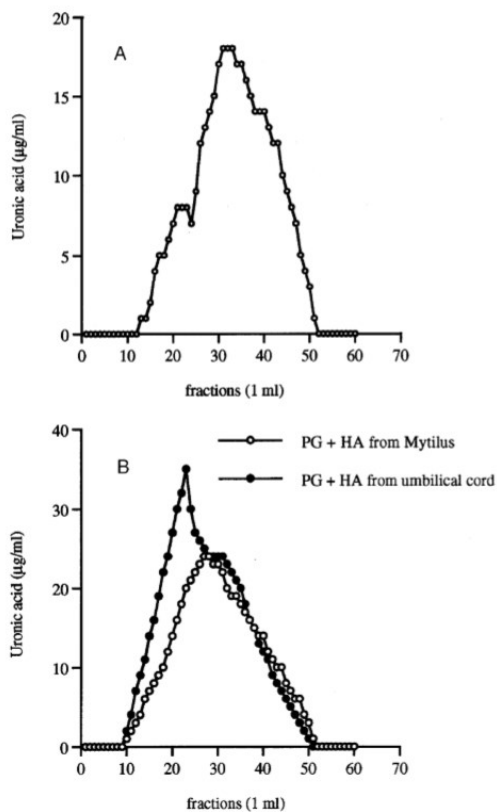


Figura 7: Cromatografia dell'aggregato da cartilagine bovina (A) senza e (B) con precedente incubazione con HA del cordone ombelicale e quello ricavato da mitilo su colonna di sepharose CL-2B
Fonte: Volpi N, Maccari F. *Purification and characterization of hyaluronic acid from the mollusc bivalve *M. galloprovincialis*. Biochimie. 2003 Jun*

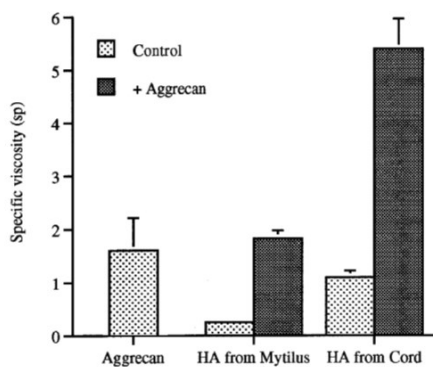


Figura 8: Viscosità specifica dell'acido ialuronico di mitilo e HA derivato da cordone ombelicale umano in presenza e in assenza di aggrecano
Fonte: Volpi N, Maccari F. *Purification and characterization of hyaluronic acid from the mollusc bivalve *M. galloprovincialis**. *Biochimie*. 2003 Jun

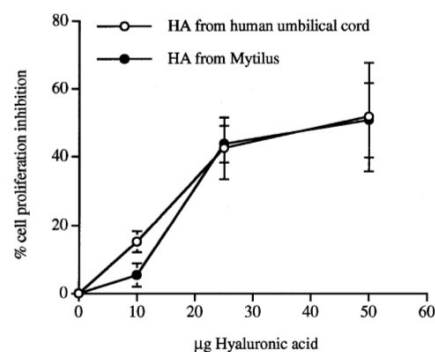


Figura 9: Inibizione della proliferazione dei fibroblasti umani all'aumentare della concentrazione di HA
Fonte: Volpi N, Maccari F. *Purification and characterization of hyaluronic acid from the mollusc bivalve *M. galloprovincialis**. *Biochimie*. 2003 Jun

2.3 Cosa ha messo in evidenza lo studio

L'HA estratto dal corpo del *M. galloprovincialis*, è stato estratto e caratterizzato attraverso gel elettroforesi, metodi enzimatici e C-NMR. Su 6.1 mg/g di peso secco del mollusco HA rappresenta una percentuale di circa il 97%. I metodi utilizzati sono i classici usati per purificare e caratterizzare i polisaccaridi dai vari tessuti e fonti. Questo dimostra che il composto non può essere degradato per purificazione e CE e le altre analisi dimostrano che non è un derivato del DS.

L'HA purificato da mitilo ha una massa molecolare molto bassa circa 200 kDa rispetto a quella dei vertebrati e che è di circa 1.000-10.000 kDa. Per questa particolare proprietà presenta una viscosità specifica bassa che influenza il legame con l'aggrecano (viscosità correlata alla massa), quindi non è in grado di formare aggregati ad alto peso molecolare. Viene però dimostrata la modulazione della proliferazione dei fibroblasti all'interno di vari embrioni, ovvero, topo, coniglio pollo. Questo accade perché va ad interagire con alcuni recettori come il CD44, anche se si presenta a masse cellulari diverse. Stessa capacità di inibire la proliferazione dei fibroblasti umani.

Partendo dalle informazioni ottenute possono essere formulate delle ipotesi sul suo ruolo fisiologico svolto da queste molecole:

- Capacità di regolare le funzioni cellulari: proliferazione e migrazione cellulare interagendo con particolari recettori, che attivano particolari meccanismi.

- Espansione della matrice extracellulare e il suo arricchimento con acido ialuronico è possibile in processi come lo sviluppo embrionale, nelle reazioni immunitarie, nell'infiammazione.
- Ha un basso peso molecolare e può potenziare le reazioni infiammatorie nei tessuti e come per i prodotti di degradazione

3. Applicazioni

Gli studi effettuati su *M. galloprovincialis* e più in generale sui mitili, hanno portato a individuare e identificare i glicosamminoglicani presenti in questi organismi, tra i quali è presente l'acido ialuronico, come visto nei capitoli precedenti, presenta delle differenze e delle similitudini in termini di struttura e attività con l'acido ialuronico umano. Come già visto sembra essere in grado di interagire con alcune molecole e recettori dell'organismo, come il recettore CD44 e di intervenire in alcuni processi fondamentali come la migrazione, la proliferazione, l'adesione cellulare e pare possa essere coinvolta in processi come quello infiammatorio, per la sua similarità (dimensione e peso molecolare) con i frammenti derivati dalla degradazione degli acidi nucleici.

Lo studio sui molluschi ha messo in evidenza che nonostante si tratti di un organismo filogeneticamente distante dai mammiferi presenta delle affinità con questi, e delle molecole che sono in grado di interagire con altre molecole umane e di regolare alcuni processi, ma anche la presenza di nuove molecole con particolari capacità adesive utilizzate in particolari sistemi e associate ad altre molecole come il l'acido ialuronico, possono essere applicate nello studio di processi fisiologici e nello sviluppo di nuove terapie. Per le informazioni derivate da questi studi i molluschi e le particolari molecole, glicosamminoglicani e proteine, che essi contengono hanno permesso di sviluppare nuovi modelli ispirati a questi organismi. Una possibile ambito di applicazione di questi nuovi modelli è quello medico, in questo ambito vengono sfruttate le capacità di adesione, di proliferazione cellulare, di rigenerazione delle ferite e di diffusione tra i tessuti permettendo di sviluppare sistemi per migliorare il trasporto e l'effetto dei farmaci, lo sviluppo di terapie antitumorali e la formazione di scaffold che permettono una migliore rigenerazione tissutale.

Queste tecnologie sono state studiate e i modelli sviluppati sono stati utilizzati in ambito medico con differenti applicazioni.

3.1 Una pellicola ispirata al mitilo per l'adesione al tessuto buccale e un efficiente somministrazione orale del farmaco

La somministrazione a livello della mucosa buccale dei farmaci si presenta come una tecnica non invasiva, indolore e conveniente rispetto ad altre vie di somministrazione (ad esempio la via parenterale o quella orale). Evitando la degradazione a livello gastro-intestinale e gli effetti del metabolismo di prima fase epatico, la somministrazione attraverso le mucose della bocca migliorerebbe notevolmente le esperienze di pazienti e gli esiti della malattia. La più grande sfida da affrontare per dispensare un farmaco attraverso questa via è la permanenza del farmaco a livello della mucosa, per risultare efficace il farmaco deve rimanere a contatto con la mucosa un tempo abbastanza lungo. Questo è un fattore critico in quanto la permanenza risulta influenzata dalla salivazione, dalla deglutizione e dai

movimenti della bocca, di conseguenza risulta difficile ottenere un farmaco che presenti una resistenza sufficiente a questi eventi. A questo problema se ne aggiunge un secondo, ovvero, è necessario ottenere una formulazione in grado di diffondersi attraverso le mucose.

I mitili presentano della grande capacità di adesione, di conseguenza rappresenta un eventuale modello e fonte di ispirazione per sviluppare queste tecnologie. La capacità adesiva è dovuta alla presenza di proteine adesive nei mitili, le quali sono ricche dell'amminoacido catecolico 3,4-diidrossifenilalanina (DOPA), i quali sono in grado di formare legami covalenti o non covalenti. Questi composti sono stati l'ispirazione per creare adesivi funzionali partendo da polimeri muco adesivi come per esempio l'acido ialuronico.

Partendo da questi studi viene creato un hydrogel catecolo-chitosano per le somministrazioni buccali dei farmaci. Il problema di questo hydrogel si trova nel trasporto del farmaco, che risulta particolarmente lento e non duraturo nel tempo, poiché favorisce un rilascio prolungato per sole tre ore. Per ovviare al problema si associa il sistema alle nanoparticelle (NP), le quali premettono di migliorare il tempo di diffusione attraverso la barriera del muco e possono essere utilizzate per produrre un rilascio controllato e prolungato del farmaco. Per garantire l'assorbimento del farmaco la superficie delle particelle è modificata con PEG il quale migliora l'assorbimento e il trasporto.

Viene quindi proposto un sistema che combina il polimero muco adesivo PVA e l'adesivo delle cozze (DOPA) formando una pellicola PVA-DOPA, sottile e utilizzabile in modo sito-specifico. Il prototipo è stato testato su modelli suini ex vivo e su modelli in vivo come topi e ratti, dimostrando che la forza di adesione modulabile e un tasso di erosione proporzionale alla quantità di DOPA utilizzata. Questo sistema consente sia la formazione di legami fisici che covalenti tra il film e il muco.

Vengono creati tre polimeri differenti, PGE, PVA e PDA, i quali sono utilizzati per rivestire le NPs da incorporare nel composto PVA-DOPA creando un sistema di somministrazione buccale del farmaco.

Questo sistema viene valutato sistematicamente, andando a osservare come si comportano le differenti particelle. Si è visto che le NPs modificate con il PDA aumentano la penetrazione attraverso le mucose, mentre le PVA-DOPA con incorporate le PLGA-PDA NPs mostrano la migliore biodisponibilità e una superiore funzionalità terapeutica. In generale questi sistemi con NPs incorporate permettono un rilascio controllato del farmaco e migliorano la permeabilità della mucosa, mentre il film è presenta una resistenza prolungata e una maggiore muco adesione.

3.2 Nanostrutture derivate dall'acido ialuronico ispirate al mitilo, utili per targeting e penetrazione di tumori

Sono state sviluppate strategie di targeting dei tumori che consentono di fornire anticorpi antitumorali in modo selettivo alla regione del tumore. In questa strategia risulta importante il contatto con il tessuto tumorale e affinché questo avvenga è necessario che dopo l'ingresso nel flusso sanguigno sia evitato che le molecole utilizzate per il targeting non vengano eliminate attraverso la filtrazione renale e il sistema dei fagociti mononucleati. Affinché il target avvenga in modo efficace viene utilizzata una permeabilità e ritenzione potenziata (ERP), la quale consente a molecole con determinate caratteristiche chimico-fisiche di penetrare nella regione del tumore con maggiore efficienza. Questi effetti di stravasamento e la penetrazione dei nano vettori può essere modulata variando la dimensione delle particelle oppure andando a modulare la permeabilità dei vasi tumorali. Per le caratteristiche fisiopatologiche i vasi tumorali si presentano come eterogenei ed irregolari, di conseguenza, per una efficiente penetrazione dovrebbero essere regolate anche l'aumento della pressione interstiziale, la densità dello stroma e l'esistenza dei macrofagi associati ai tumori. A questo si aggiungono le caratteristiche chimico-fisiche come la dimensione, la carica superficiale, la presenza di eventuali ligandi delle particelle che si intende far penetrare.

Recentemente partendo da queste conoscenze sono stati sviluppati diverse tecniche di targeting del tumore, tra cui alcune ispirate ai modelli forniti dai molluschi in cui la dopamina è introdotta in nanoparticelle di acido ialuronico, per migliorare la penetrazione e l'internalizzazione nella cellula. La polidopamina può essere formata per auto polimerizzazione della dopamina, che viene utilizzata come rivestimento facile e versatile grazie alla modifica della superficie per migliorarne l'adesione. Il rivestimento di poli dopamina delle NP è coniugato a polimeri idrofili come l'acido ialuronico.

Nello studio l'acido ialuronico anfifilicoceramide-dopamina (HACE-d) è stato sintetizzato, e sono state fabbricate nano particelle HACE-d caricate di floretina, ovvero, uno dei di-idrocalconi che può inibire l'assorbimento cellulare del glucosio tramite il trasportatore (GLUT) e che presenta proprietà antiossidanti, di conseguenza è utilizzato come antitumorale. Per la sua interazione con il trasportatore GLUT e il recettore CD44, risulta essere un efficiente sistema per valutare il tumore e l'efficienza di targeting. Le NP sviluppate per il targeting sono quindi basate sulla penetrazione e sul legame dell'acido ialuronico con il recettore CD44 e sull'adesione cellulare e le proprietà della dopamina.

L'efficacia del sistema è valutata in modelli di coltura cellulare bidimensionali e tridimensionali e la biodistribuzione in vivo delle NP è stata studiata attraverso imaging ottico.

3.3 Scaffold compositi di collagene e acido ialuronico ispirato alle cozze con eccellente proprietà antiossidanti e il rilascio prolungato di un fattore di crescita per migliorare la guarigione delle ferite diabetiche

Una delle principali complicazioni del diabete include la formazione di ferite, che possono progredire fino a diventare delle ulcere, le quali in alcuni casi progrediscono fino a rendere necessaria amputazione e allo sviluppo di una disabilità permanente. Il processo di formazione della ferita coinvolge quattro meccanismi differenti che comprendono: l'emostasi, la risposta infiammatoria, la rigenerazione tissutale e il rimodellamento tissutale. È stato inoltre dimostrato che l'aumento dei prodotti finali della glicolisi dovuti alla elevata presenza di glucosio nel flusso sanguigno sia la principale causa della formazione di traumi dovuti al diabete, dovuti ad un aumento stress ossidativo. Questo accade nella fase infiammatoria delle ferite, in cui i macrofagi producono ROS e citochine che influiscono in modo critico sullo sviluppo delle ferite.

I rivestimenti di poli dopamina (pDA) ispirato ai mitili sono una nuova tecnologia emergente che consente di alterare i materiali di superficie cambiandone le proprietà. Queste particelle sono ampiamente utilizzate in ingegneria biomedica in quanto consentono di modulare l'attività cellulare, l'auto-adesività e le proprietà antiossidanti. Inoltre, è stato testato che le particelle presentano una buona biocompatibilità, con una bassa citotossicità e buona stabilità in vivo.

Nello studio analizzato vengono sviluppate pDA-NPs per trattare con successo una infiammazione acuta. In un ambiente alcalino, la dopamina si auto polimerizza ossidativamente in pDA-NPs in grado di aderire alla superficie di diverse materiali e sostanze, con la formazione di legami covalenti e ad idrogeno, infatti, grazie ai gruppi funzionali, la Poli dopamina è in grado di immobilizzare molecole bioattive, per esempio è stato dimostrato che uno scaffold di spugna ricca di pDA-modified collagene con rilascio prolungato di plasma e piastrine promuove la riparazione della pelle.

Per le ferite croniche da diabete sono stati sviluppati diversi rivestimenti in grado di diminuire il danno ossidativo. In questo caso il collagene e l'acido ialuronico sono stati utilizzati come materia prima per creare Hydrogel per il trattamento di diverse malattie, in quanto presentano una eccellente biocompatibilità e biodegradabilità ma sono caratterizzati da una bassa immunogenicità. L'acido ialuronico si trova comunemente nei tessuti ed è stato ampiamente sviluppato nella guarigione delle ferite per accelerare la riparazione delle ferite, a causa del suo effetto idratante ed antinfiammatorio, con una buona biocompatibilità e biodegradabilità.

Nella ricerca è stata sviluppata uno scaffold composito di acido ialuronico e collagene di pDA modificato caricato del fattore di crescita epidermico (EGF), il quale presenta caratteristiche per promuovere la proliferazione cellulare e "scavaging" di ROS e guarigione delle ferite. EGF è ampiamente utilizzato per

l'ingegneria tissutale e in particolare la sua efficacia nella guarigione delle ferite croniche ed è stata ampiamente dimostrata. La produzione degli scaffold inizia con omogenizzazione dell'acido ialuronico con atelocollagene di tipo I (immunogenicità minore) in proporzioni uguali, ciò che si ottiene è poi liofilizzato e utilizzata per formare un reticolo con la soluzione EDC-NHS. Una volta creato lo scaffold viene studiata la sua degradazione e la sua capacità di ritenzione dell'umidità a concentrazioni diverse di polidopamina. A questo si aggiunge lo studio della capacità antiossidante e la capacità di regolazione della risposta infiammatoria. Infine, la citochina EGF è stata iniettata e immobilizzata in CHS-pDA, dimostrando con un l'esperimento la riparazione del difetto della pelle a tutto spessore, nei ratti diabetici. Viene inoltre dimostrando che lo scaffold di acido ialuronico e collagene può essere un candidato per applicazioni di ingegneria tissutale clinica per promuovere la riparazione della ferita cronica.

Conclusioni

L'acido ialuronico, come gli altri glicosamminoglicani, sono molecole che svolgono funzioni fondamentali. Si tratta di molecole che intervengono nella protezione della cellula agli urti e nell'idratazione cellulare, oltre alle funzioni strutturali intervengono anche in meccanismi come la proliferazione cellulare, la migrazione e l'adesione cellulare, andando anche ad intervenire in processi come l'infiammazione e lo sviluppo di neoplasie.

Il riscontro di queste molecole anche negli organismi invertebrati, mette in luce le funzioni conservate durante l'evoluzione e che sono comuni anche in organismi evolutivamente distanti tra loro, ma permette studiare nuove funzioni, talvolta strettamente associate all'organismo in cui la molecola è isolata spesso dovute alla ambiente in cui vivono, un esempio, sono le proprietà adesive dei molluschi bivalvi come i mitili, che sono associate all'ambiente in cui vivono e alle loro ottimali condizioni di crescita.

La scoperta di queste molecole simili a quelle dei mammiferi ma che presentano alcune differenze strutturali e diverse proprietà chimico fisiche possono essere utilizzate per andare a modulare determinate attività fisiologiche e prendendo esempio dai sistemi da cui vengono ricavate, i quali possono essere utilizzate come modello, possono essere utilizzate per creare nuovi composti svolgono funzioni differenti in base agli organismi. Queste come abbiamo visto possono essere applicate in ambito medico-farmaceutico come per il targeting di tumori o il trasporto di farmaci. Si tratta di sistemi innovativi in via di sviluppo, che risultano utili non solo per la possibilità di applicarli in ambiti differenti, ma anche perché presentano una buona biodegradabilità, una buona biodisponibilità, una buona capacità di adesione e con buone capacità di penetrazione all'interno dei tessuti. Di conseguenza lo studio dei molluschi e degli invertebrati in generale, porta all'apertura di nuove possibilità di sviluppo di sistemi innovativi.

BIBLIOGRAFIA

1. Kobayashi T, Chanmee T, Itano N. Hyaluronan: Metabolism and Function. *Biomolecules*. 2020 Nov 7;10(11):1525. doi: 10.3390/biom10111525. PMID: 33171800; PMCID: PMC7695009
2. Abatangelo G, Vindigni V, Avruscio G, Pandis L, Brun P. Hyaluronic Acid: Redefining Its Role. *Cells*. 2020 Jul 21;9(7):1743. doi: 10.3390/cells9071743. PMID: 32708202; PMCID: PMC7409253.
3. Volpi N, Maccari F. Purification and characterization of hyaluronic acid from the mollusc bivalve *Mytilus galloprovincialis*. *Biochimie*. 2003 Jun;85(6):619-25. doi: 10.1016/s0300-9084(03)00083-x. PMID: 12829379.
4. Yamada S, Sugahara K, Ozbek S. Evolution of glycosaminoglycans: Comparative biochemical study. *Commun Integr Biol*. 2011 Mar;4(2):150-8. doi: 10.4161/cib.4.2.14547. PMID: 21655428; PMCID: PMC3104567.
5. Hu S, Pei X, Duan L, Zhu Z, Liu Y, Chen J, Chen T, Ji P, Wan Q, Wang J. A mussel-inspired film for adhesion to wet buccal tissue and efficient buccal drug delivery. *Nat Commun*. 2021 Mar 16;12(1):1689. doi: 10.1038/s41467-021-21989-5. PMID: 33727548; PMCID: PMC7966365.
6. Lee SY, Park JH, Ko SH, Shim JS, Kim DD, Cho HJ. Mussel-Inspired Hyaluronic Acid Derivative Nanostructures for Improved Tumor Targeting and Penetration. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2017 Jul 12;9(27):22308-22320. doi: 10.1021/acsami.7b06582. Epub 2017 Jun 28. PMID: 28621523.
7. Wang Y, Chen L, Ren DY, Feng ZX, Zhang LY, Zhong YF, Jin MY, Xu FW, Feng CY, Du YZ, Tan WQ. Mussel-inspired collagen-hyaluronic acid composite scaffold with excellent antioxidant properties and sustained release of a growth factor for enhancing diabetic wound healing. *Mater Today Bio*. 2022 Jun 10;15:100320. doi: 10.1016/j.mtbio.2022.100320. PMID: 35757026; PMCID: PMC9218585.