

IDROGELI A BASE PEPTIDICA: NUOVI BIOMATERIALI PER L'INGEGNERIA TISSUTALE

Laura Chronopoulou

Dipartimento di Chimica, Università La Sapienza, Roma

In questa lezione sono stati presentati alcuni concetti di base e alcuni trend della ricerca sugli idrogeli compositi per applicazioni nel campo dell'ingegneria tissutale.

Un materiale composito è un materiale eterogeneo costituito da due o più componenti con caratteristiche chimico-fisiche differenti, che, una volta combinate, formano un materiale con caratteristiche nuove e possibilmente migliorate. Alcuni esempi molto noti di materiali compositi sono l'asfalto, il cemento, la vetroresina, ma anche materiali presenti in natura come il legno, costituito da fibre di cellulosa disperse in una fase di lignina, e le ossa stesse.

Gli idrogeli sono invece sistemi colloidali costituiti da due componenti: una componente solida, quale per esempio un reticolo polimerico, e una componente liquida che, nel caso degli idrogeli, è l'acqua. Se l'organizzazione strutturale della componente solida si basa su interazioni di tipo non covalente, cioè interazioni di tipo fisico, l'idrogel che ne deriva viene definito un gel fisico; oppure, se tra le componenti solide del gel vi sono legami chimici, il gel si definisce un gel chimico. Le particolarità e le potenzialità applicative degli idrogeli, soprattutto nell'ambito delle biotecnologie, derivano dal loro altissimo contenuto di acqua, che può infatti costituire più del 90% dell'idrogel. L'elevato contenuto di acqua conferisce a questi materiali innanzitutto una buona biocompatibilità e li rende molto simili ai tessuti biologici.

Gli idrogeli sono presenti anche in natura, per esempio l'agar agar o alcuni polisaccaridi. Il meccanismo classico di gelazione prevede il *crosslinking* di catene polimeriche, tuttavia di recente è emersa la possibilità di ottenere dei geli anche a partire da piccole molecole, chiamate idrogelatori, in grado, in virtù delle loro proprietà chimico-fisiche, di autoassemblarsi intrappolando al loro interno grandi quantità di acqua (1).

Gli idrogeli sono biocompatibili e, se pensiamo a gel a base polisaccaridica o peptidica, essi sono anche biodegradabili. Le catene polimeriche presenti nei gel formano reticoli tridimensionali che possono mimare l'organizzazione e anche alcune funzioni della matrice extracellulare. Gli idrogeli inoltre sono caratterizzati dalle loro proprietà meccaniche e sono dei materiali viscoelastici. Tuttavia, spesso le proprietà meccaniche dei gel risultano essere insufficienti per alcune applicazioni ma tali proprietà meccaniche possono essere migliorate, utilizzando diverse strategie. Si può agire per esempio sulla concentrazione polimerica. È intuitivo come aumentando tale concentrazione aumenti anche la forza del gel. Si può inoltre agire sulla porosità o aumentare il grado di reticolazione, entro certi limiti. Un'ulteriore strategia è l'utilizzo di *filler*, materiali che dispersi all'interno del gel lo rinforzano meccanicamente, dando origine a tutti gli effetti a materiali di tipo composito. La preparazione di idrogel compositi è utile per poter conferire al gel anche altre proprietà. Esistono diversi tipi di filler che possono essere utilizzati e probabilmente i più interessanti a oggi sono i materiali nanostrutturati.

Questi sono materiali che hanno almeno una dimensione nella scala dei nanometri, che è la stessa scala dimensionale delle macromolecole biologiche. È ormai stato ampiamente dimostrato come i nanomateriali, in virtù delle loro dimensioni, siano in grado di interagire con i sistemi biologici.

Per quanto riguarda la realizzazione di idrogeli compositi con materiali nanostrutturati, questi possono avere tre tipi di composizione diversi: nel primo caso il composito è formato da micro o

nanogel che stabilizzano nanoparticelle di vario tipo. Nel secondo caso si può avere un idrogel al cui interno sono disperse le nanoparticelle, che interagiscono con la matrice del gel attraverso interazioni di tipo non covalente. Nel terzo caso invece le nanoparticelle sono legate mediante legami chimici di tipo covalente alla componente solida del gel (2).

È essenziale che le nanoparticelle vengano disperse il più omogeneamente possibile all'interno del gel, perché le proprietà del materiale composito risultino omogenee. A questo scopo finora sono state usate 5 principali strategie sintetiche. Nel primo caso si ha la formazione dell'idrogel nella sospensione delle nanoparticelle. Nel secondo caso le nanoparticelle vengono inserite all'interno dell'idrogel dopo la sua formazione. Nel terzo caso le nanoparticelle si formano a partire da precursori all'interno di un gel preformato. Nel quarto caso le nanoparticelle vengono utilizzate per reticolare i precursori dell'idrogel e far avvenire la gelazione. Infine è stata riportata la formazione del gel a partire da nanoparticelle, polimeri e gelatori distinti che sono responsabili della gelazione (2).

La sinergia tra idrogeli e materiali nanostrutturati può apportare nuove e interessanti proprietà ai materiali compositi che ne derivano. Vediamo ora quali sono i tipi di nanomateriali utilizzati in combinazione con gli idrogeli per applicazioni di tipo biotecnologico. Iniziamo con le nanoparticelle metalliche. Le più utilizzate sono le nanoparticelle di argento, per le loro note proprietà antibatteriche. Anche le nanoparticelle di oro (Au) sono molto studiate, nonostante abbiano un costo elevato, perché permettono di ottenere materiali conduttori. Inoltre se il materiale composito contenente Au viene irraggiato utilizzando una radiazione che abbia la lunghezza d'onda corrispondente al picco plasmonico dell'Au, questa radiazione viene assorbita dall'Au riscaldando localmente il materiale e questo riscaldamento può essere controllato e sfruttato per esempio per innescare il rilascio di molecole bioattive contenute nel gel. Vengono utilizzate, in misura minore, anche nanoparticelle di altri metalli. Sono inoltre molto utilizzate le nanoparticelle di ossidi metallici, in particolare gli ossidi di Fe per le loro proprietà magnetiche, anch'esse utili in medicina. Per quanto riguarda le nanoparticelle non metalliche, i materiali più studiati sono quelli a base di carbonio e silicio, inclusi l'ossido di grafene e i nanotubi di carbonio (C), che, nonostante non siano degradabili, sono tuttavia oggetto di studio per le loro proprietà meccaniche, elettriche, termiche e ottiche. Infine tra i nanomateriali più utilizzati e che pongono minori problemi riguardo a sicurezza, biocompatibilità e biodegradazione, vi sono i nanomateriali polimerici, tra cui troviamo le micelle e i liposomi, che sono entrambi formati da molecole anfipatiche. Altri tipi di nanomateriali sono i nanogel, i dendrimeri, le particelle *core-shell* e quelle con strutture iperramificate.

Nel caso di uno *scaffold* iniettabile la soluzione dei precursori dello *scaffold* viene mischiata a opportune molecole e/o cellule e iniettata nel tessuto bersaglio. *In vivo* i precursori sono in grado di autoassemblarsi, in risposta alle condizioni chimico-fisiche che incontrano in questo ambiente, quale il pH, la forza ionica, l'azione di enzimi endogeni o altro, generando l'architettura dello *scaffold*. Lo *scaffold* a questo punto deve indurre la riparazione del tessuto interagendo con le cellule impiantate oppure stimolando la migrazione e il differenziamento di cellule endogene. Lo *scaffold* inoltre deve supportare l'integrazione, la proliferazione e il differenziamento della tipologia cellulare bersaglio. Gli idrogeli compositi sono studiati per essere utilizzati come *scaffold* in questo tipo di applicazioni.

Le proprietà meccaniche degli *scaffold* a base di idrogeli sono in genere inferiori a quelle dei tessuti, per cui è importante trovare strategie valide per produrre idrogeli sufficientemente forti e resistenti da impiegare nelle applicazioni di ingegneria tissutale. La presenza di una microstruttura fibrosa in genere permette ai tessuti di possedere sufficiente forza, rigidità e resistenza. L'introduzione di nanofibre all'interno degli idrogel potrebbe mimare efficacemente il microambiente cellulare. In uno studio recente sono stati impiegati due polimeri naturali ampiamente disponibili, la gelatina e l'alginato, per produrre idrogeli compositi multistrato (3).

Inizialmente sono state prodotte delle nanofibre di gelatina tramite la tecnica dell'*elettrospinning* in cui un getto polimerico viene filato all'interno di un campo elettrico elevato. Con questa tecnica sono stati preparati diversi strati di fibre con orientamenti definiti e questi strati sono stati impilati e reticolati tramite reticolazione chimica con EDC (1-Etil-3-(3-dimetilamminopropil)carbodiimmide) e NHS (N-idrossisuccinimide). Gli strati di nanofibre reticolate di gelatina sono stati quindi posti in una soluzione acquosa di alginato. L'alginato è in grado di gelare in presenza di ioni calcio, per cui solo quando alla soluzione di alginato, contenente anche le fibre di gelatina, viene fornito CaCl_2 (cloruro di calcio) si forma il gel, che viene a sua volta reticolato.

Secondo questo schema sono stati preparati diversi compositi con microstrutture diverse dovute al diverso allineamento delle fibre nei vari strati. L'allineamento delle fibre in uno strato può essere del tutto casuale, oppure le fibre possono essere allineate con diverse angolazioni. I vari strati, a loro volta, possono essere impilati imponendo lo stesso allineamento delle fibre, oppure con diverse angolazioni. Gli autori hanno studiato come questa microstruttura influenzi le proprietà meccaniche del materiale. Hanno sottoposto i vari materiali a diversi tipi di fratture e hanno misurato alcuni parametri quale la forza di rottura, cioè il limite di sollecitazione esterna che può essere applicata, oltre il quale il materiale si rompe. Quindi maggiore è la forza di rottura maggiore è la resistenza del materiale. I risultati dimostrano come la microstruttura del materiale sia in effetti decisiva nel determinarne la resistenza. In particolare, il materiale che si è dimostrato più resistente possiede un allineamento delle fibre ben definito, parallelo alla direzione della sollecitazione. Per quanto riguarda i materiali multistrato, bisogna tenere conto che spesso nelle applicazioni il materiale deve resistere a sollecitazioni multidirezionali.

Tra i materiali più utilizzati per preparare idrogeli ci sono gli idrogelatori di tipo peptidico. I principali vantaggi dell'utilizzo di peptidi per creare materiali avanzati sono innanzitutto la loro biodegradabilità e biocompatibilità. Inoltre, i peptidi sono facilmente funzionalizzabili e possono assumere strutture secondarie ordinate, quali alfa eliche e foglietti beta, che sono efficacemente riconosciute dai sistemi cellulari. Inoltre, le attuali tecniche di sintesi peptidica in fase solida consentono di ottenere qualsiasi tipo di sequenza di interesse e con rese elevate. Anche sequenze peptidiche molto corte, di 2 o 3 residui, opportunamente funzionalizzate, possono autoassemblarsi intrappolando grandi quantità di acqua a dare idrogeli.

In un recente studio è stato preparato un idrogel composito utilizzando un tripeptide aromatico e nanotubi di C (4). I nanotubi di C sono materiali molto interessanti per diverse applicazioni tecnologiche e in questo caso per le loro proprietà meccaniche. È interessante notare che da soli i nanotubi si aggregano in soluzione acquosa, mentre in presenza del tripeptide vengono dispersi. Dalle immagini SEM (*Scanning Electron Microscopy*), dei gel compositi è evidente come i nanotubi formano dei collegamenti tra le fibre peptidiche. Questa microstruttura ha delle conseguenze molto interessanti sulle proprietà del gel. Sono stati infatti eseguiti dei test in cui i gel sono stati sottoposti a stress crescenti fino alla loro rottura. Nel campione di gel tal quale, aumentando lo stress esercitato a un certo punto il gel si rompe, ciò è testimoniato dal crollo del modulo elastico e del modulo viscoso. A questo punto il valore del modulo viscoso supera quello del modulo elastico e ciò, a livello fisico, indica che siamo in presenza di una soluzione. Il comportamento del composito è differente. Innanzitutto partiamo da valori del modulo elastico più alti, che vuol dire che il gel ha proprietà meccaniche migliorate grazie alla presenza dei nanotubi di C. Sottoposto a sollecitazioni via via crescenti il gel resiste molto di più. A un certo punto si rompe ma a quel punto recupera in gran parte, quindi ha la capacità di rigenerarsi.

Parliamo ora più in particolare di applicazioni nella rigenerazione ossea. Sappiamo bene come l'osso sia una struttura piuttosto complessa costituita principalmente da collagene e cristalli di idrossiapatite e da diversi tipi di cellule. In sostanza l'osso è a tutti gli effetti un materiale composito.

Oggi la frontiera della medicina è la rigenerazione dei tessuti, cioè la strategia, altamente innovativa, in presenza di un danno a un tessuto, di agire non per riparare il danno ma per stimolare la capacità dei tessuti di autorigenerarsi. Questa è una strategia potente ma complessa, che si avvale di 3 elementi chiave (lo *scaffold*, le cellule e i fattori di crescita).

Diversi materiali possono essere usati per costruire gli *scaffold*. Il chitosano per esempio è un materiale molto studiato (5). Il chitosano è un polisaccaride che deriva dalla deacetilazione della chitina, il componente dell'esoscheletro dei crostacei, che è uno dei materiali più disponibili in natura a basso costo ed è un materiale che produce idrogeli.

Le principali tecniche per produrre *scaffold* di chitosano sono basate sulla liofilizzazione e gelazione e il *salt leaching*, ma anche l'*elettrospinning* e la stampa 3D, che permettono di preparare *scaffold* costituiti da fibre e controllarne l'orientamento e l'impacchettamento.

Gli *scaffold* devono possedere diverse proprietà. Queste proprietà possono essere modulate attraverso l'aggiunta di altri polimeri o materiali ceramici al chitosano. La porosità è necessaria per l'infiltrazione delle cellule all'interno dello *scaffold*, la loro adesione e la secrezione di matrice extracellulare. L'adesione cellulare dipende dalle dimensioni dei pori dello *scaffold* e le cellule sono in grado di discriminare tra sottili variazioni della matrice extracellulare, che ne influenzano il comportamento. L'impianto *in vivo* di uno *scaffold* risulta nell'assorbimento di acqua da parte dello *scaffold* dai tessuti circostanti, con un rigonfiamento dello *scaffold* e un aumento delle dimensioni dei pori. Un rigonfiamento eccessivo può però portare al distacco dello *scaffold* dal sito di impianto. Un rigonfiamento insufficiente impedisce invece l'interazione con le cellule. Il rapido assorbimento di proteine sullo *scaffold* può essere necessario per l'interazione del biomateriale con le cellule. Le proteine adsorbite possono infatti influenzare l'adesione cellulare e altri comportamenti. La biomineralizzazione si riferisce alla deposizione di ioni e minerali sulla superficie degli *scaffold* esposti ai fluidi biologici. La deposizione di CaP (fosfato di calcio) stimola l'attività degli osteoblasti. La capacità di biomineralizzazione di uno *scaffold* viene misurata esponendolo a fluidi biologici simulati e valutando la formazione di CaP. I compositi a base di chitosano hanno mostrato una maggiore biomineralizzazione rispetto al solo chitosano. L'inserimento di nanoparticelle aumenta l'area superficiale fornendo un maggior numero di centri di nucleazione per la formazione di idrossiapatite. La biodegradazione si riferisce ai processi chimici che intervengono per rompere il biomateriale *in vivo*. I materiali impiantati dovrebbero essere degradati nel tempo in sincronia con la formazione di nuovo osso. Il chitosano è degradato principalmente dal lisozima. Gli *scaffold* per la rigenerazione ossea devono possedere proprietà meccaniche adeguate per il loro utilizzo, che corrispondano a quelle del tessuto in cui vengono impiantati. Le proprietà meccaniche dell'osso naturale dipendono dal tipo di tessuto, quale l'osso corticale piuttosto che l'osso spugnoso. Diversi studi hanno evidenziato uno stretto rapporto tra rigidità dello *scaffold* e comportamento cellulare. Per esempio ne viene influenzato il differenziamento delle cellule staminali mesenchimali. Le proprietà meccaniche del chitosano possono essere classificate come medio-basse, tuttavia l'uso di altri polimeri o nanoparticelle può migliorarle. Diversi *scaffold* compositi a base di chitosano sono stati utilizzati anche in studi *in vivo* in modelli animali.

Nelle applicazioni *in vivo* bisogna tenere conto dei numerosi meccanismi biologici che possono modificare la struttura dei biomateriali e quindi comprometterne le applicazioni (6). Per esempio si può avere la degradazione del biomateriale in seguito all'azione di enzimi endogeni. La biodegradazione, sebbene auspicabile, non deve avvenire in tempi troppo brevi. Inoltre, sul biomateriale possono adsorbirsi proteine solubili o vi si può depositare nuova matrice extracellulare, tutti fattori che vanno studiati attentamente e considerati sin dalla progettazione del biomateriale stesso. Di fondamentale importanza per lo sviluppo di future applicazioni cliniche è la valutazione di risposte infiammatorie e/o immunitarie del sistema ospite in seguito all'interazione con il biomateriale.

Bibliografia

1. Yang Z, Xu B. Using enzymes to control molecular hydrogelation. *Advanced Materials* 2006;18,3043-046.
2. Thoniyot P, Tan MJ, Karim AA, Young DJ, Loh XJ. Nanoparticle–Hydrogel composites: concept, design, and applications of these promising, multi-functional materials. *Advanced Science* 2015;2:1400010-23.
3. Tonsomboon K, Butcher AL, Oyen ML. Strong and tough nanofibrous hydrogel composites based on biomimetic principles. *Materials Science and Engineering C* 2017;72:220-7.
4. Iglesias D, Melle-Franco M, Kurbasic M, Melchionna M, Abrami M, Grassi M, Prato M, Marchesan S. Oxidized nanocarbons-tripeptide supramolecular hydrogels: shape matters! *ACS Nano* 2018;12:5530-8.
5. Saravanan S, Leena RS, Selvamurugan N. Chitosan based biocomposite scaffolds for bone tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules* 2016;93:1354-65.
6. Collier JH. Modular self-assembling biomaterials for directing cellular responses. *Soft Matter* 2008; 4:2310-5.