

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO IN BIOTECNOLOGIE MEDICHE

Tecnologie Biomediche
MED/33- Malattie dell'apparato locomotore

Ciclo XX

BIOMIMETICA
PER L'INGEGNERIA TISSUTALE DELL'OSSO

Tesi di Dottorato

Presentata da:

Dr.ssa Valentina Devescovi

Coordinatore

Chiar.ma Prof.ssa Marialuisa Zerbini

Relatore

Chiar.mo Prof. Armando Giunti

Correlatore

Dr. Nicola Baldini

Dr.ssa Gabriela Ciapetti

Anno Accademico 2006-2007

INDICE

INTRODUZIONE.....	pag. 5
Ingegneria tissutale.....	pag. 5
Ingegneria tissutale in ortopedia.....	pag. 6
<i>Biomateriali e scaffolds.....</i>	<i>pag. 10</i>
<i>Cellule.....</i>	<i>pag. 14</i>
Biomimetica.....	pag. 17
Biomimetica per l'ingegneria tissutale dell'osso.....	pag. 19
<i>Modifiche nanostrutturali di superficie con rivestimento di peptidi.....</i>	<i>pag. 21</i>
<i>Modifiche nanostrutturali di superficie indotte da irraggiamento.....</i>	<i>pag. 23</i>
Il tessuto osseo.....	pag. 24
<i>Fisiologia del tessuto osseo.....</i>	<i>pag. 28</i>
<i>Il processo riparativo dell'osso.....</i>	<i>pag. 32</i>
OBBIETTIVO DELLO STUDIO.....	pag. 35
MATERIALE E METODO.....	pag. 37
Colture cellulari.....	pag. 37
<i>Colture primarie di cellule mesenchimali stromali (MSC).....</i>	<i>pag. 37</i>
Caratterizzazione di colture di MSC.....	pag. 38
<i>Test di vitalità cellulare.....</i>	<i>pag. 38</i>
<i>Test di clonogenicità (Colony Forming Units, CFU).....</i>	<i>pag. 38</i>
<i>Analisi citochimica della fosfatasi alcalina (ALP).....</i>	<i>pag. 39</i>
<i>Quantificazione cellulare della fosfatasi alcalina (ALP).....</i>	<i>pag. 39</i>
<i>Mineralizzazione e colorazione dei noduli minerali.....</i>	<i>pag. 40</i>

Colorazioni per l'analisi della morfologia cellulare.....	pag. 41
<i>Colorazione con arancio di acridina.....</i>	pag. 41
<i>Colorazione con falloidina rodaminata (o FITC).....</i>	pag. 41
Analisi dei dati.....	pag. 42
<i>Analisi d'immagine.....</i>	pag. 42
<i>Statistica.....</i>	pag. 42
STUDIO IN VITRO.....	pag. 43
Policaprolattone con modifiche biomimetiche.....	pag. 44
<i>Preparazione di superfici di PCL: irraggiamento e adsorbimento di peptidi.....</i>	pag. 44
<i>Saggi biologici dell'interazione di precursori midollari ossei con superfici di PCL.....</i>	pag. 45
<i>Risultati.....</i>	pag. 55
Superfici funzionalizzate con Self Assembled Monolayers (SAMs).....	pag. 57
<i>Preparazione di peptidi per SAMs.....</i>	pag. 58
<i>Superfici per colture cellulari funzionalizzate con SAMs.....</i>	pag. 59
<i>Saggio biologico con osteoblasti umani.....</i>	pag. 60
<i>Risultati.....</i>	pag. 61
Superfici di titanio funzionalizzate con SAMs.....	pag. 65
<i>Saggi biologici con cellule stromali di midollo su superfici TiO₂-peptX.....</i>	pag. 66
<i>Risultati.....</i>	pag. 67
Superfici di titanio funzionalizzate con peptidi adesivi.....	pag. 72
<i>Preparazione delle superfici di titanio con peptidi.....</i>	pag. 72
<i>Saggi biologici con cellule stromali di midollo su superfici Ti- funzionalizzato</i>	pag. 74

***Risultati*.....pag. 80**
Discussione.....pag. 83
Bibiografia.....pag. 89

INTRODUZIONE

Ingegneria tissutale

Durante il 1st Tissue Engineering (TE) Symposium, tenutosi nel 1988 in California, si assiste al primo tentativo ufficiale di definire l'ingegneria tissutale come 'l'applicazione dei principi e dei metodi dell'ingegneria e delle scienze della vita per comprendere a fondo la relazione che esiste tra struttura e funzione nei tessuti viventi normali e patologici, per lo sviluppo di sostituti biologici che possano ripristinare, mantenere e migliorare la funzione tissutale' (Fox and Skalak, 1988). La necessità era quella di inquadrare una nuova tendenza della ricerca medica e coordinare i molti progressi già raggiunti nelle più distanti aree scientifiche, per trasferirne i frutti alla pratica clinica. Questa grande operazione che vide scienze come l'ingegneria, la chimica, la fisica, la biologia, le biotecnologie e la medicina confrontarsi ed impegnarsi in approccio multidisciplinare all'ingegneria dei tessuti, forse è il punto che meglio segna il passaggio ad una nuova era di ricerca. La strategia nuova dell'ingegneria tissutale consisteva nell'avvalersi di cellule viventi (e/o loro prodotti) e di supporti innovativi, per sviluppare sostituti tissutali bioattivi in alternativa agli impianti inerti.

In un primo momento furono condotti studi per creare sistemi che riproducessero fedelmente i tessuti e gli organi naturali nella forma, nelle proprietà e nella funzione. In poco tempo fu evidente che la complessità dei tessuti biologici in termini di composizione macromolecolare, organizzazione ultrastrutturale e interazioni tra cellule e ambiente, rendevano difficile il passaggio dei costrutti ingegnerizzati dall'ambito sperimentale a quello clinico.

Durante quel periodo è stata approfondita la conoscenza sulle potenzialità dell'utilizzo di cellule, fattori e *scaffolds* biocompatibili per la ricostruzione tissutale, ma non è stata posta alcuna attenzione al mimare la 'non omogeneità' dei tessuti

nativi, cioè quella combinazione di elementi cellulari, molecole tessuto specifiche, micro- e macro struttura che determinano le peculiari proprietà chimiche, fisiche e meccaniche del tessuto necessarie allo svolgimento della propria funzione.

Sul finire della prima decade di studi è stato chiaro che l'ingegneria tissutale non aveva ancora risposto alle grandi aspettative di fornire nuove modalità terapeutiche per i trattamenti clinici con tessuti ingegnerizzati o sostituzioni d'organo con cellule viventi. Quindi si doveva andare oltre. Così nel 1998 la comunità scientifica decise di adottare un nuovo paradigma per enfatizzare l'importanza della biomeccanica nel design e nello sviluppo di impianti *cell-* e *matrix-based* per la riparazione dei tessuti molli e di quelli duri. In questo senso si può parlare di un'evoluzione della TE, in ingegneria tissutale funzionale (FTE), il cui obiettivo era focalizzarsi sull'importanza di ristabilire la funzione del tessuto o organo, identificando le esigenze meccaniche e strutturali critiche *in situ*, del tessuto da ripristinare. Questo è stato il secondo grande passo alla luce dell'esperienza collettiva della TE della prima decade. Questo tipo di approccio ha avuto riscontro in particolare per quei tessuti che sono soggetti a sopportare ingenti carichi o ripetute sollecitazioni, come quello muscolo-scheletrico o cardiaco (Ingber et al, 2006).

Gli studi nell'ambito dell'ingegneria tissutale, settore tuttora in grande espansione, hanno aggiunto agli sforzi per lo sviluppo di una sempre maggiore varietà di costrutti ingegnerizzati, la considerazione delle qualità funzionali e meccaniche che questi devono possedere per adempiere le funzioni e soddisfare gli intenti perseguiti: primo fra tutti superare i limiti dei trattamenti convenzionali di trapianto d'organo e impianto protesico.

Ingegneria tissutale in ortopedia

In campo ortopedico interventi di ricostruzione del tessuto osseo si rendono necessari in caso di ampie perdite di sostanza, conseguenti a gravi malformazioni congenite, eventi traumatici, ipoplasie, necrosi ischemiche, lesioni neoplastiche primarie (osteosarcomi, tumori ossei benigni) o secondarie (metastasi). Inoltre tecniche di

ingegneria tissutale possono essere vantaggiose per l'artrodesi vertebrale, la ricostruzione maxillo-facciale e anche in caso di mobilizzazione di impianti ortopedici (Logeart-Avramoglou et al., 2005).

Attualmente il trattamento chirurgico per perdite ossee estese si avvale di due alternative: l'**innesto di tessuto autologo** e l'ingegneria tissutale. Il primo, definito come 'gold standard' per la rigenerazione, rappresenta una soluzione sicura per la compatibilità e l'assenza di risposta immunitaria, ma anche disagiata per il paziente per la necessità di un secondo intervento e per il rischio di morbidità associato al prelievo. Inoltre è spesso difficile sopperire alla quantità di tessuto necessaria alla sostituzione della porzione mancante, o la qualità dell'osso recuperato non consente buoni risultati al reimpianto.

Grazie all'esistenza di banche dell'osso da tempo, è disponibile anche l'**innesto di tessuto allogenico**, che tuttavia ha mostrato essere spesso soggetto a scarso rimodellamento e insufficiente rivascolarizzazione, funzionando quindi da mero supporto; non sono da sottovalutare anche problematiche quali il rigetto e il rischio di infezioni legato all'impianto di tessuti di origine omologa.

Un'alternativa promettente agli approcci tradizionali è costituita dall'**ingegneria tissutale**, le cui potenzialità hanno determinato, come già detto, un notevole impulso alla ricerca negli ultimi anni. Per la riparazione tissutale in questo senso, si possono distinguere due percorsi alternativi: la *tissue engineering* e la *in situ tissue regeneration*. Il primo prevede la semina e il differenziamento *ex-vivo* di cellule osteoprogenitrici autologhe su supporti tridimensionali modificati e riassorbibili (*scaffolds*); i costrutti così ingegnerizzati, una volta reimpiantati nel paziente, dovrebbero essere gradualmente riassorbiti e sostituiti da tessuti vitali grazie all'apporto vascolare e nervoso. Le applicazioni cliniche già in uso comprendono cartilagine, cute e sistema vascolare. Il secondo approccio associa agli *scaffolds* materiali in forma di polveri, soluzioni o microparticelle caricate (*doped*) capaci di promuovere la riparazione locale. Molecole o fattori che attivano la proliferazione cellulare, come le Bone morphogenetic proteins (BMPs), possono essere coniugate chimicamente al materiale e rilasciate nei tessuti a velocità controllata, per diffusione

o frammentazione del supporto. Tali materiali 'bioattivi' sono in grado di indurre localmente cellule dell'ospite a rilasciare fattori di crescita, che a loro volta stimolano cellule coinvolte nella rigenerazione del tessuto *in situ*.

Gli elementi *scaffolds*/cellule/fattori sono quindi alla base delle tecniche di ingegneria tissutale e secondo il loro utilizzo alcuni autori (Burg et al., 2000) distinguono sistemi acellulari, sistemi cellulari e terapie con fattori o geni.

Nei sistemi acellulari (*matrix based approaches*) la chimica e la struttura dello *scaffold* gioca un ruolo predominante per la corretta riparazione. In merito al tessuto scheletrico, dovendo i sostituti mimare il supporto stromale ad una rigenerazione ossea, pori e interconnessioni debbono necessariamente essere di dimensioni tali da consentire vitalità e funzioni di cellule ossee, cellule vascolari e tessuto osteoide. I supporti debbono essere inoltre biodegradabili nei tempi appropriati, cioè in parallelo alla rigenerazione ossea *in situ*, ma non generare prodotti tossici o indurre basso pH.

Per realizzare sistemi cellulari (*cell-based therapies*) sono necessarie le fasi che vanno dalla raccolta di cellule dal sito donatore, la semina sul supporto, l'induzione della proliferazione e del differenziamento cellulare e infine il trapianto del costrutto così ingegnerizzato. Al fine di ottenere un'efficace e stabile riparazione occorre ottenere un numero adeguato di cellule o tessuto per riempire il difetto, nonché mantenere il corretto fenotipo cellulare, evitando il de-differenziamento come può succedere per i condrociti coltivati *in vitro*. Le cellule, quindi, dovrebbero organizzarsi in tridimensionale e produrre matrice extracellulare, in modo da ottenere in tempi adeguati una piena integrazione locale con il tessuto ospite e la vascolarizzazione del tessuto neoformato.

Una innovativa risorsa sono le *factor-based therapies*, che consistono nell'introdurre nel sistema *scaffold*/cellule uno stimolo osteoinduttivo. Il primo esempio è stato l'uso della Bone demineralized matrix (DBM) e successivamente delle Bone morphogenetic proteins purificate (in particolare BMP-2, -4 e -7 appartenenti alla superfamiglia del TGF- β). Questi fattori di crescita, tuttora oggetto di studio ma già applicati anche in clinica, sembrano validi induttori della rigenerazione. Attualmente però l'unico fattore di crescita approvato dal FDA statunitense è la BMP-2 applicata

nella fusione lombare anteriore entro uno specifico ‘*device*’. Gli aspetti complessi di questa tecnica comprendono la difficoltà di legare in modo funzionale i fattori a molecole di trasporto o ai supporti, ma anche quella di modulare in maniera efficace l’emivita e il rilascio graduale.

Un esempio di *gene therapies* prevede l’uso di vettori virali, come gli adenovirus, contenenti cDNA per BMP-2 ricombinante: le cellule ingegnerizzate diventano quindi semplici *carrier* dei geni appropriati e producono il fattore osteoinduttivo. (Rose and Oreffo, 2002). Questo approccio comporta inevitabilmente un alto rischio di trasmissione di vettori patogeni.

Più sicuro diventa allora l’uso dei concentrati piastrinici autologhi, che apportano in buona quantità i fattori di crescita (e non solo) del paziente stesso. La difficoltà di questi sistemi è valutarne l’efficacia *in vivo* sul processo di riparazione, in quanto non si conosce l’emivita dei fattori così introdotti.

L’ingegneria tissutale si propone oggi di utilizzare biomateriali con sempre più elevata capacità di integrazione, con proprietà meccaniche molto simili all’osso nativo e con cinetiche di riassorbimento controllate. Un secondo obiettivo importante è il potenziamento dell’espansione cellulare *in vitro* in condizioni di sicurezza (*safety*), tale da poter diminuire l’entità del prelievo di tessuto dal paziente donatore. Per l’impiego in clinica è auspicabile la disponibilità di materiali modellabili in fase pre-operatoria o durante la seduta operatoria, secondo le necessità anatomiche dell’intervento.

Biomateriali e scaffolds

Gli *scaffolds* per l’ingegneria tissutale dell’osso sono strutture altamente sofisticate studiate per favorire inizialmente l’attacco, l’adesione e la distensione (*spreading*) cellulare, ed in seguito la deposizione di nuovo tessuto osseo, che nel tempo possa rimpiazzare l’impianto artificiale.

Inizialmente lo scopo principale nella costruzione di impianti ortopedici, era l'utilizzo di materiali biologicamente inerti per minimizzare la risposta immunitaria dell'organismo ospite. Negli ultimi venti anni questo paradigma si è spostato da materiale bioinerte a bioattivo. Un materiale bioattivo ideale come sostituto osseo, oltre a possedere requisiti basilari, deve richiamare gli elementi osteogenici (osteoinduttività) e sostenere la rigenerazione del tessuto (osteoconduttività). Ciò significa che nell'ambiente fisiologico la presenza dell'impianto e la sua degradazione devono indurre e mantenere condizioni che influenzino positivamente la sopravvivenza, la proliferazione cellulare e la deposizione della matrice extracellulare (Alsberg et al., 2003).

Alle proprietà fondamentali di un biomateriale, quali biocompatibilità, biodegradabilità (se la sostituzione non è permanente) e processabilità (lavorazione e possibilità di sterilizzazione), devono essere affiancate precise caratteristiche chimiche (composizione) e fisiche (proprietà meccaniche, topografia di superficie, porosità). Nella scelta del materiale e nel *design* della struttura dello *scaffold* deve essere valutata la natura del difetto scheletrico, che può interessare l'osso trabecolare o compatto. La diversità di esigenza della porzione ossea da sostituire è determinata dal tipo di forze meccaniche cui è sottoposta. E' a livello macroscopico, infatti, che le proprietà strutturali determinano le risposte meccaniche, quali elasticità e resistenza alla compressione, tipiche dell'osso compatto, o capacità di sostenere e trasmettere forze di carico, proprie di quello spugnoso (Chen et al., 2002). In particolare in uno *scaffold* tridimensionale, per combinare efficaci proprietà fisiche nella micro- e nella macro-struttura, è necessaria la presenza di un'elevata porosità interna. La porosità e la struttura costituiscono parametri importanti nella valutazione di un supporto, in quanto da questi dipende la possibilità che il sostituto osseo neo-impiantato venga vascolarizzato ed eventualmente innervato. Il grado di porosità varia in relazione all'applicazione di interesse: la dimensione dei pori ottimale per i tessuti duri si aggira intorno ai 100-400 μ m (Atala et al., 1997; Hutmacher, 2001). E' inoltre importante che la porosità del materiale sia elevata e uniformemente distribuita (>90%; Vogt et al., 2002). Tuttavia, è da considerare che la presenza di pori ed

interconnessioni incide significativamente sull'integrità meccanica della struttura. Per questo è necessario un compromesso fra la porosità e la sua funzione biologica.

I primi interventi sostitutivi dell'osso con materiali sintetici utilizzavano materiali già disponibili, come il polimetilmetacrilato (PMMA) impiegato durante la seconda guerra mondiale. Finché non sono state approfondite le conoscenze sul sistema immunitario, non è stato evidente il fatto che molti di questi fossero tossici per l'organismo umano. Negli anni '60-'70 è stata sviluppata la 'prima generazione di materiali' con lo scopo di ottenere una buona combinazione di proprietà fisiche, simili a quelle del tessuto da sostituire, e una risposta tossica minima. Ma già nel 1980 esistevano più di 50 tipi di protesi per uso clinico, realizzate con almeno 40 differenti materiali; in una nazione come gli USA gli impianti di protesi erano 2-3 milioni l'anno. Con il proseguire degli studi nel settore, all'inerzia dei biomateriali si è sostituita la ricerca di un'interazione positiva con cellule e tessuti per promuovere l'integrazione e la fissazione dell'impianto: questo passo sancisce la nascita dei 'materiali di seconda generazione', come i vetri bioattivi di Hench e le idrossiapatiti sintetiche (Thompson and Hench, 1998). Un ulteriore avanzamento è stato ottenuto grazie ai materiali riassorbibili con frammentazione chimica controllata. Un esempio noto sono i fili di sutura a base di acido polilattico (PLA), poliglicolico (PGA) ed i loro copolimeri, che vengono degradati a H₂O e CO₂. Tali materiali sintetici, tuttavia, non possiedono la capacità dei tessuti viventi di rispondere attivamente a variazioni biochimiche o di carico: l'analisi di sopravvivenza di protesi scheletriche o cardiache (valvole) ha rilevato un fallimento di circa 1/3 degli impianti entro 10-15 anni. La 'terza generazione' di biomateriali è stata concepita per indurre specifiche risposte cellulari: per questo sono stati denominati *smart materials*. Lo sviluppo di materiali 'intelligenti' è conseguenza di un'approfondita conoscenza del meccanismo molecolare di risposta alle caratteristiche di superficie del substrato da parte delle cellule ossee. Il legame di specifiche molecole (bioligandi) o le modifiche della microtopografia superficiale sono tra le strategie utilizzate per favorire le prime fasi di adesione cellula-impianto, al fine di condizionare la morfologia cellulare e la trasmissione del segnale.

Gli *scaffolds* per tessuto osseo possono essere costituiti da materiali naturali come collagene, fibrina, acido ialuronico e membrane biologiche, che hanno struttura simile ai tessuti originali. Nonostante questo, tali materiali risultano spesso di difficile preparazione e modellazione nei formati necessari, nonché possibili veicoli di malattie o infezioni; inoltre anche le proprietà meccaniche sono difficilmente quelle richieste. Recentemente sono stati messi a punto supporti biodegradabili (schiume, 'idrogel' iniettabili, sospensioni di collagene occasionalmente combinato con acido ialuronico) temporanei, per il rilascio controllato di fattori osteogenici che favoriscono il processo di rigenerazione *in situ*.

Elementi come il calcio e il fosfato, i componenti minerali fisiologici dell'osso, si ritrovano nelle ceramiche di origine naturale e non, reperibili in formulazioni (come idrossiapatite, β -tricalcio fosfato e calciofosfato bifasico) e forme diverse (blocchi, cementi, rivestimenti di impianti metallici). Questi materiali sono strutturalmente molto simili all'osso e parzialmente modulabili nella porosità. L'idrossiapatite (HA) ha dimostrato essere un materiale intrinsecamente osteoconduttivo: i fattori di crescita sono naturalmente attirati e adsorbiti *in vivo* entro le cavità della struttura porosa (Ripamonti et al., 2001). Tuttavia i tempi di degradazione sono lunghi, anche dell'ordine di anni, e la scarsa resistenza meccanica al carico e all'impatto, fa considerare le ceramiche relativamente 'fragili'.

Di largo uso sono adesso i materiali di sintesi, progettati in modo da riassumere molte delle caratteristiche necessarie allo svolgimento della funzione di sostituti ossei.

Il cemento osseo sintetico a base di calcio-fosfato ha suscitato notevole interesse. Si tratta di un materiale che si adatta al riempimento di cavità complesse, essendo iniettabile a 37°C; possiede macro-, micro-, e nano-porosità e si presta a legare fattori o peptidi.

I polimeri sintetici sono, invece, altamente modulabili nella forma e nella struttura chimica. La loro facile processabilità li rende ottenibili in varie forme, a cui coniugare biomolecole con diverse modalità. La velocità di degradazione nel tempo è calcolabile matematicamente (Hutmacher, 2000), ma durante tale processo vengono rilasciati monomeri acidi che possono ridurre il pH locale e, quindi, stimolare una

risposta infiammatoria. Anche la differente degradazione delle regioni cristalline e di quelle amorfe del polimero può provocare la formazione di microparticelle, indurre reazioni infiammatorie da corpo estraneo e riassorbimento osseo (Vert et al., 1994).

I poliesteri alifatici sono i polimeri più usati nell'ingegneria del tessuto muscolo-scheletrico (osso, cartilagine, menisco): l'acido poliglicolico (PGA), l'acido polilattico (PLLA), i loro copolimeri (PLGA), e il poli- ϵ -caprolattone (PCL) fanno parte di questa famiglia. La degradazione avviene in tempi veloci (settimane) per PGA e PLLA e lenti (mesi) per PCL; i primi sono degradati per scissione idrolitica dei legami con produzione di acido lattico e glicolico, che vengono infine rimossi attraverso i processi metabolici.

Le polianidridi, proposte per il rilascio controllato di farmaci, si degradano per erosione superficiale ed idrolisi. Tra queste, la poly(anhydride-*co*-imide) è indicata per la sostituzione dell'osso sottoposto a carico, mentre il poli(propilene-fumarato) (PPF) che ha proprietà simili a quelle dell'osso trabecolare, è utilizzato come riempitivo per difetti scheletrici (Gunatillake et al., 2003).

Una promettente alternativa sono i compositi: polimeri addizionati di particelle, fibre, tubi di ceramica e/o carbone anche con nanodimensioni (es. nanotubi, <100 nm); il risultato è un ibrido con buone caratteristiche fisiche e meccaniche. In effetti anche il tessuto osseo è un tessuto composito, costituito da una matrice polimerica (collagene, 30% in peso) rinforzata con particelle di ceramica (idrossiapatite, 70% in peso).

I materiali metallici risultano particolarmente adatti alla costruzione di strutture capaci di sopportare carichi senza il rischio di grandi deformazioni elastiche; per questo sono adatti alla sostituzione di tessuti duri come ossa e denti. La biocompatibilità è legata al potere corrosivo dei fluidi biologici nei loro confronti; la corrosione può determinare il rilascio di ioni metallici *in situ* e nel tempo il loro accumulo in altri distretti dell'organismo. Tuttavia i metalli (e le leghe) già utilizzati come biomateriali per la fabbricazione di protesi o mezzi di osteosintesi sono: ferro, cromo, cobalto, nichel, titanio, tantalio, molibdeno e tungsteno. In particolare, per le caratteristiche di biocompatibilità, resistenza alla corrosione e per le eccellenti

proprietà meccaniche il titanio e le leghe di titanio sono da tempo materiali di elezione in chirurgia orale, maxillo-facciale e ortopedica.

Cellule

Qualunque sia il materiale di base, il sostituto osseo deve interagire con l'ambiente e le cellule sia *in vitro* che *in vivo*. Come già riportato, lo *scaffold* migliore è quello capace di stimolare l'adesione, la proliferazione e il differenziamento cellulare favorendo così la rigenerazione e l'integrazione nel tessuto osseo preesistente. Gli interventi riparativi mediante *tissue engineering* si avvalgono dell'uso di cellule, precedentemente isolate, che vengono seminate sullo *scaffold* prima del suo impianto nel paziente (sistemi cellulari).

Le cellule candidate a questo impiego sono cellule mature o cellule staminali embrionali (ES), germinali (EG) e adulte (come le BMSC). Le cellule mature isolate da biopsie tissutali possono essere reimpiantate nello stesso donatore evitando reazioni di rigetto e trasmissione di malattie, ma non sono le migliori data la bassa capacità replicativa. Le staminali, al contrario, sono cellule indifferenziate capaci di rigenerarsi per tempi prolungati. Quelle embrionali teoricamente possiedono un illimitato potere proliferativo in coltura ma sollevano, come è ben noto, problematiche di natura etica. Le cellule staminali adulte hanno mostrato una sorprendente versatilità ed un discreto potenziale proliferativo; per questo sono adatte per la rigenerazione tissutale, anche se la 'spinta' replicativa decresce quando sono mantenute in coltura *in vitro* (25-40 passaggi).

Le cellule staminali adulte del compartimento osseo sono chiamate osteoprogenitori, cioè i precursori delle cellule mature, che ancora sono presenti nei tessuti midollari. Il midollo osseo adulto contiene, oltre a staminali emopoietiche, cellule staminali non-emopoietiche di tipo mesenchimale (Bone marrow stromal cells o BMSC).

Le staminali mesenchimali sono dotate di capacità di automantenimento e di multipotenzialità, cioè capacità di differenziarsi in osteoblasti, condrociti, adipociti, miociti e fibroblasti (Triffit, 1996). Questa potenzialità rende ragione del ruolo critico

e importante svolto da questa popolazione cellulare nell'organogenesi, nel rimodellamento e riparazione dei tessuti. Un limite al loro utilizzo è che gli osteoprogenitori rappresentano solo lo 0,001% delle cellule nucleate nel midollo osseo di un adulto sano; una frazione inferiore di quasi due ordini di grandezza, rispetto alle staminali ematopoietiche. Inoltre non sono facilmente accessibili: per ottenerle è necessario un aspirato midollare (solitamente da cresta iliaca), intervento disagiata e a rischio di complicanze per il paziente. Ciò nonostante questa popolazione di precursori mesenchimali è considerata una promettente fonte di cellule per applicazioni in ingegneria tissutale, grazie alla caratteristica pluripotenza, cioè la proprietà di differenziare in cellule dei tessuti sopra citati, sotto un opportuno stimolo.

Nel caso del tessuto osseo, dopo il prelievo e l'isolamento, le BMSC possono essere selezionate per aderenza al substrato di coltura ed espanse *in vitro* in appropriate condizioni. Terreni addizionati con Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2) e desametasone ne inducono il *commitment* in senso osteogenico. Il differenziamento in osteoblasti maturi, la secrezione della matrice extracellulare e la sua mineralizzazione si ottengono con l'aggiunta al mezzo di coltura rispettivamente di acido ascorbico (necessario per il cross-linking delle molecole di collagene) e β -glicerofosfato (Frank et al., 2002; Ashton et al., 1985). In tali condizioni è possibile ottenere *in vitro* la deposizione di noduli minerali di calcio-fosfato (Pittenger et al., 1999). Nel corso della coltura differenziante, la caratterizzazione del fenotipo osteoblastico viene eseguita verificando l'espressione dei *markers* molecolari associati alla maturità cellulare e monitorando, al livello biochimico, la sintesi e/o il rilascio di molecole chiave nelle fasi del differenziamento.

Marcatori osteoblastici precoci sono Runx2, l'enzima fosfatasi alcalina (ALP) e il collagene di tipo I. Durante gli stadi tardivi vengono espresse sialoproteine, osteocalcina, osteopontina, e osteonectina.

Le sialoproteine sono necessarie per la formazione dei primi siti di nucleazione dei noduli minerali, nelle fasi precoci della mineralizzazione (Bianco et al., 1993). Elevati livelli *in vitro* di mRNA di bone sialoproteins (BSPs) sono infatti associati

alla capacità di produzione di osso (Satomura et al., 2000) e la loro espressione è up-regolata dagli stessi ormoni e citochine che promuovono la deposizione di osso (Ganss et al., 1999).

L'osteopontina (OP) svolge una funzione importante nel rimodellamento osseo (Denhart et al., 1998); ridotti livelli di mRNA di OP in cellule BMSC sono correlati alla sottoproduzione di osso, come nell'osteoporosi (Zhang et al., 1995).

L'osteonectina (ON), glicoproteina *linker* tra il collagene e la parte minerale della matrice ossea, è stata considerata un valido marker osteoblastico fin dalla sua descrizione (Termine et al., 1981). ON è implicata nella mineralizzazione dell'osso; alte concentrazioni di ione calcio aumentano la sua espressione così come quella di altri marcatori terminali degli osteoblasti, favorendo la deposizione di matrice minerale.

La possibilità di espandere *in vitro* cellule del midollo osseo arricchite nella loro porzione mesenchimale e capaci di differenziare in cellule ossee, risulta quindi un valido modello sperimentale di coltura *ex vivo*, per lo studio della fisiologia del tessuto osseo, nonché un notevole vantaggio per la terapia di malattie scheletriche che non traggono giovamento dai trattamenti convenzionali (Kadiyala et al., 1996; Krebsbach et al., 1998). Alcuni studi hanno evidenziato come il trattamento del midollo osseo, per concentrare la componente di cellule staminali, abbia già un utile impiego clinico nella cura di difetti ossei, quali ritardo di consolidamento, pseudoartrosi e artrodesi (Connolly, 1995). Per ottenere risultati più soddisfacenti è stato proposto l'uso di anticorpi monoclonali, in grado di selezionare gli osteoprogenitori tra le cellule midollari (Joyner et al., 1997).

Numerosi lavori riportano la possibilità di purificare ed espandere *in vitro* cellule midollari di ratto, topo, cane e uomo e la capacità di tali cellule di favorire la formazione di nuovo tessuto osseo quando impiantate ectopicamente insieme ad idrossiapatite o altri carrier (Goshima et al., 1991; Gundle et al., 1995; Kon et al., 2000). Alcune sperimentazioni di riparazione di difetti ossei *in vivo* con scaffold caricati con BMSC, hanno mostrato che l'osso rigenerato riempie circa il 40-47% della lacuna. Una possibile spiegazione attribuisce questa percentuale, non

particolarmente elevata, alla difficile vascolarizzazione del tessuto neoformato. Ciò nonostante si osserva che ossa lunghe ‘riparate’ con sistemi cellulari hanno proprietà meccaniche, come rigidità e resistenza alla torsione, migliori dei sistemi *cell-free* (Bruder and Fox, 1999).

In futuro è ipotizzabile l’utilizzo di cellule ingegnerizzate anche per malattie quali l’osteoporosi e l’artrosi, nelle quali è stata rilevata non tanto un’alterazione del numero totale di cellule staminali osteoprogenitrici, ma una riduzione dell’attività proliferativa (Oreffo et al., 1998).

Biomimetica

La natura è una fonte di ispirazione per la scienza dei materiali e le discipline ad essa associate come la chimica, la fisica, la biologia e l’ingegneria. In tutti gli organismi, dai più elementari ai molto complessi, si può osservare una molteplicità di esempi di materiali, architetture, sistemi e funzioni.

L’approfondimento dello studio dei modelli naturali e i progressi in ambito scientifico hanno contribuito negli ultimi anni alla creazione di nuovi materiali con svariate applicazioni che spaziano dall’alta tecnologia alla vita quotidiana. Alcuni esempi sono le note fibre sintetiche come il nylon, che ricorda la seta naturale, o il velcro, ispirato alla forma uncinata di semi vegetali; oppure i più recenti rivestimenti di superficie, già usati in ingegneria aerospaziale per ridurre l’attrito idrodinamico, la cui struttura imita quella dell’epidermide di grandi pesci (Sanchez et al., 2005).

Le *performances* altamente sofisticate che caratterizzano i materiali biologici, sono il risultato di una stringente selezione, operata nel lungo corso dell’evoluzione, del materiale disponibile più adatto a svolgere una determinata funzione. La pressione evolutiva favorisce un numero limitato di componenti o principi in modo che, nello stesso organismo, pochi elementi possano ricoprire differenti ruoli. Un esempio è il collagene di tipo I, che presenta una diversa morfologia a seconda della funzione che svolge nei vari tessuti. Questa proteina, infatti, mostra la bassa rigidità e l’elevata

deformazione tipica dell'elastomero nei tendini, esibisce proprietà ottiche come la trasparenza nella cornea e conferisce durezza e resistenza all'osso, dove è associato a cristalli di idrossiapatite. Anche identici principi di organizzazione del *self-assembly* da fase liquida a cristallina, sono stati dimostrati per una quantità di macromolecole diverse localizzate all'interno della cellula (acidi, proteine, polisaccaridi) o al di fuori di essa (matrice extracellulare). Su questo modello è stata sviluppata una recente tecnica chimica di cristallizzazione minerale *in vitro*, usando come templatato le fasi 'ordinate' di acidi nucleici e proteine.

Le strutture biologiche sono complessi altamente integrati, dove i componenti vengono assemblati seguendo definiti *pattern* e in cui è stato raggiunto il giusto compromesso tra struttura e funzione. In molti biosistemi tale alto livello di integrazione associa tre aspetti principali: la miniaturizzazione, cioè il massimo delle funzioni nel minimo volume, l'ibridazione, tra componenti organiche ed inorganiche ottimizzando funzioni e potenzialità, e una organizzazione di tipo gerarchico. La gerarchia strutturale, che si ripete identica dalla scala nanometrica a quella millimetrica, è una caratteristica delle strutture biologiche che offre la capacità di rispondere ad 'esigenze' chimiche e fisiche ad ognuno di questi livelli.

L'analisi dei modelli presenti in natura e l'applicazione delle più raffinate tecnologie odierne offrono la possibilità di ottenere materiali innovativi a partire dai più disparati elementi a disposizione ed il vantaggio di poterlo fare in breve tempo.

Gli sforzi per meglio comprendere e controllare processi di autoassemblaggio, di separazione di fase e la chiralità nei sistemi complessi, possibilmente in relazione agli stimoli o all'ambiente esterno, resta una delle maggiori e più promettenti sfide per la creazione di materiali 'bio-ispirati'. La vera conquista richiede, però, l'approfondimento dei principi di base della costruzione degli elementi negli organismi viventi e lo studio delle proprietà fisiche e chimiche alle 'interfacce' per controllare la forma, la taglia e la compattazione dei componenti.

Sembra evidente che un approccio biomimetico alla scienza dei materiali non possa essere limitato solo al 'copiare' gli elementi della natura, ma che piuttosto debba decifrare il 'linguaggio della forma' (chimica della forma) della materia.

Biomimetica per l'ingegneria tissutale dell'osso

Il consolidamento di un'interfaccia meccanicamente stabile, attraverso l'integrazione completa tra la superficie del dispositivo ed il tessuto osseo preesistente, è un passo essenziale per il successo di un impianto ortopedico (Anselme, 2000).

E' quindi l'adesione cellulare alla superficie il punto da cui inizia il processo di integrazione. Recenti tecniche d'indagine, come la microscopia a forza atomica, hanno permesso una fine analisi delle forze implicate nel meccanismo di adesione cellulare al substrato; è la qualità dell'interazione recettore-ligando di superficie a determinare la forza del legame fra materiale e cellule, l'organizzazione del citoscheletro, la distensione (*spreading*) e la conseguente migrazione di queste, sopra e/o attraverso lo scaffold.

Lo studio del meccanismo e l'identificazione dei fattori coinvolti nell'adesione cellulare ha assunto un ruolo centrale per lo sviluppo di biomateriali innovativi, su cui sperimentare modifiche di superficie che consentano una modulazione, al livello molecolare, del legame con le cellule. Una superficie modificata (biomimetica) può rappresentare una sorta di matrice extracellulare artificiale in grado di fornire gli stimoli biologici adatti a guidare la formazione di nuovo tessuto: il segnale può favorire genericamente l'adesione, ma anche essere selettivo per alcuni tipi cellulari e quindi indurre una risposta specifica.

Il *design* di superfici sempre più simili a quelle del microambiente fisiologico del tessuto osseo (osteomimetiche) mira ad aumentare l'osteconduttività di *scaffolds* per l'ingegneria tissutale dell'osso, sostenendo le fasi precoci della cascata di eventi che portano alla rigenerazione tissutale (Heungsoo et al., 2003).

La neoformazione di osso è il risultato di una serie di azioni che ha inizio con il reclutamento delle cellule osteoprogenitrici. Nelle prime fasi di adesione al substrato le cellule osteogeniche secernono nell'ambiente circostante specifiche proteine (cruciali negli *steps* dell'adesione) che si aggregano in una specie di scaffold naturale, la matrice extracellulare (ECM). Aderendo a tale supporto le cellule proliferano, si differenziano e si organizzano per la formazione del neo-tessuto. La regolazione dei

processi di proliferazione e differenziamento cellulare è mediata sia da segnali molecolari coinvolti nella comunicazione cellula-ECM e cellula-cellula, sia da fattori di crescita circolanti che interagiscono con i recettori di membrana (Lanza et al., 1997). I segnali chimici, fisici o meccanici presenti nell'ambiente e trasmessi attraverso la membrana all'apparato trascrizionale, modulano l'espressione genica e si traducono in una determinata risposta della cellula allo stimolo esterno. È stato osservato che caratteristiche di una superficie, come la topografia e la composizione chimica, possono influenzare l'assorbimento e la conformazione della matrice extracellulare e quindi interagire nell'adesione (Boyan et al., 1996).

L'adesione cellulare è un processo che si compie in due fasi: nella prima, definita di *attachment*, si ha la formazione dei legami iniziali (legami ionici e forze di Van der Waals) tra cellule e substrato; in una successiva fase, di adesione vera e propria, vengono coinvolte le proteine della ECM e del citoscheletro.

In vitro l'adesione cellula-substrato avviene al livello dei contatti focali. Tali molecole di adesione sono proteine trans-membrana e costituiscono un 'ponte' tra l'actina del citoscheletro e la ECM, per la trasmissione di segnali associati alla motilità cellulare (Anselme, 2000). I principali responsabili dell'adesione identificati nelle cellule ossee sono le integrine. Le integrine sono composte da due subunità glicoproteiche transmembrana associate non covalentemente, chiamate α e β . Dal punto di vista strutturale la famiglia è composta da 22 eterodimeri $\alpha\beta$, di cui sono note 8 isoforme della catena α e 16 di quella β (Gronthos et al., 1997). La diversità di struttura è associata alla funzione ed all'affinità per diversi ligandi. Per l'adesione cellulare iniziale degli osteoblasti al substrato è stato proposto il recettore del collagene, l'integrina $\alpha_2\beta_1$; per lo *spreading*, l'organizzazione del citoscheletro e una possibile migrazione, il recettore della vitronectina, $\alpha_v\beta_3$ (Rezania and Healy, 1999). I contatti focali possiedono una natura transiente: si organizzano e disorganizzano sulla membrana, a seconda della diversità di composizione chimica (Healy et al., 1996) e morfologia di superficie (Chesmel et al., 1995). È stato osservato che su materiali lisci i contatti focali sono uniformemente distribuiti su tutta la superficie di

contatto; su superfici rugose, sono visibili solo all'estremità dell'estensione cellulare di adesione al substrato (Kieswetter et al., 1996).

La maggior parte delle proteine che costituiscono la matrice extracellulare, presenta domini composti da specifici amminoacidi che legano direttamente i recettori dei contatti focali. Molte delle proteine della ECM (fibronectina, osteopontina, vitronectina, collagene, laminina) hanno proprietà adesive e/o chemotattiche, dovute alla presenza di una sequenza conservata dei tre amminoacidi Arg-Gly-Asp, detta motivo RGD (Schaffner and Dard, 2003).

Modifiche nanostrutturali di superficie con rivestimento di peptidi

Il rivestimento superficiale di biomateriali con proteine della matrice extracellulare ha lo scopo di riprodurre artificialmente il microambiente del tessuto osseo. L'individuazione di sequenze consenso nei domini proteici ha permesso la progettazione di superfici funzionali con elevata specificità di legame, e l'utilizzo di frammenti proteici invece delle proteine native. Questo è un vantaggio in quanto queste ultime tendono spesso ad assumere una conformazione casuale dovuta alla carica, all'idrofobicità e alla topografia superficiale, rendendo così stericamente inaccessibili ai recettori i siti di legame. Inoltre le catene proteiche complete sono più soggette a degradazione proteolitica *in vivo*, il che ne limita l'uso in applicazioni a lungo termine. I piccoli peptidi, grazie alle ridotte dimensioni, possono essere immobilizzati sulla superficie con una densità maggiore; per di più risultano stabili nel tempo e resistenti alle procedure di sterilizzazione, alle variazioni di pH e ai trattamenti con il calore (Hersel et al., 2003).

Per la funzionalizzazione di superficie la sequenza più usata è H-Arg-Gly-Asp-OH (RGD) presente, come già detto, in molte delle proteine della matrice e conservata in diversi organismi eucarioti, batteri e virus. Alcune sue varianti sono i motivi RGDS (Arg-Gly-Asp-Ser), GRGD (Gly-Arg-Gly-Asp) e GRGDSP (Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro). Sono state ottenute anche superfici biomimetiche con il dominio di legame dell'eparina alle bone sialoproteins: la sequenza FHRRIKA (Phe-His-Arg-Arg-Ile-

Lys-Ala) (Healy et al., 1999). Più recente è la sintesi di peptidi autoassemblanti (SAMs, Self Assembled Monolayers) in strutture proteiche, la cui architettura ricorda strutture biologiche altamente organizzate, come le membrane cellulari (Wang et al., 2004).

Per favorire l'adesione, lo *spreading* e la proliferazione cellulare è necessario considerare non solo la specificità, ma anche la densità del 'segnale' peptidico. Non eccedere nella deposizione dei siti di legame, permetterà di sostenere anche le fasi successive all'adesione, non solo quelle precoci. E' necessaria, quindi, la corretta densità di peptidi da coniugare alla superficie, per ottenere l'effetto desiderato. E' stato osservato che una densità minima di 1×10^{-15} mol/cm² di RGD, che significa uno spazio di circa 140nm fra i peptidi, è sufficiente per lo *spreading* cellulare; una densità di 1×10^{-14} mol/cm², invece è capace di promuovere la formazione dei contatti focali (Cook et al., 1997).

Le superfici rese funzionali da rivestimento peptidico sono caratterizzate con l'analisi delle cinetiche di assorbimento e rilascio *in situ* dei peptidi, che viene condotta mediante *Quartz crystal microbalance* con *dissipation monitoring* (QCM-D).

Modifiche nanostrutturali di superficie indotte da irraggiamento

I biomateriali che presentano un'elevata energia di superficie sono biologicamente attivi e promuovono l'adesione delle cellule, mentre quelli con bassa energia superficiale tendono a produrre, *in vivo*, una capsula di tessuto amorfo di tipo cicatriziale.

Caratteristiche come l'energia libera di superficie e la bagnabilità (*wettability*) di un biomateriale possono essere indotte o aumentate con la tecnica di *radio frequency glow discharge*, che impiega masse di gas nobile per irradiarne la superficie. I gas utilizzati possono essere quelli reattivi, come l'ossigeno, l'azoto, l'elio o non reattivi come l'argon. Le superfici, che vengono 'bombardate' da radicali liberi, elettroni, ioni e fotoni, acquisiscono l'energia che questi rilasciano. Il trattamento, oltre ad allontanare i contaminanti organici e rendere gli impianti sterili, ne aumenta

sensibilmente l'idrofilicità a causa di ossidazioni, cambiamenti elettrostatici e nella morfologia superficiale (Hudis, 1974). L'incremento della *wettability* superficiale è una delle più interessanti modificazioni, poiché la maggior parte dei polimeri è di natura idrofobica (cioè, secondo la definizione di Vogler, con angolo di contatto $> 65^\circ\text{C}$): l'acquisizione di cariche di superficie può, allora, indurre il materiale ad assorbire uno strato di proteine, glucidi, lipidi e sali che ne aumentano la ricettività all'adesione cellulare (Gombotz and Hoffman, 1987). La tecnica inoltre permette di modificare l'inerzia superficiale dei polimeri, in funzione del legame di molecole bioattive come anticorpi, farmaci, proteine o porzioni di esse, come le sequenze RGD. In relazione al tipo e intensità dell'irraggiamento si ottengono superfici con un ampio range di idrofilicità. Le modifiche indotte possono interessare proprietà strutturali su scala micrometrica (l'energia libera di superficie) o su scala nanometrica [FIG6M], come l'alterazione di specifici gruppi chimici che cambiano la struttura dei monomeri rendendoli acidi o basici, o la variazione della morfologia di superficie (*roughness*).

La caratterizzazione di modifiche superficiali indotte da ioni, può essere realizzata con spettroscopia fotoelettronica a raggi x (XPS), analisi che ne rivela la composizione atomica e strutturale. La *wettability* viene misurata calcolando i cambiamenti dei contributi dispersivi e polari dell'energia libera di superficie (misurazione dell'angolo di contatto), mentre la topografia e la *roughness* sono osservate in microscopia a forza atomica (AFM).

Il tessuto osseo

Il tessuto osseo fa parte, insieme alla cartilagine, dei tessuti connettivi specializzati per la funzione di protezione e sostegno. Esso origina dal mesenchima come gli altri connettivi, ed è costituito da cellule, fibre e una matrice complessa, in cui si distinguono una parte organica ed una inorganica.

La peculiarità del tessuto osseo è quella di essere calcificato. Nella porzione inorganica della sostanza intercellulare vengono depositati cristalli minerali costituiti prevalentemente da sali di calcio e fosfato, sottoforma di calcio-idrossiapatite $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, e in quantità minore da carbonato di calcio e altri minerali.

All'interno della matrice extracellulare sono disperse fibre organiche altamente ordinate, costituite per il 90% da collagene (di questo, il 97% è di tipo I e il 3% di tipo V) e per la restante parte da numerose proteine non collageniche (osteocalcina, osteonectina, osteopontina, fibronectina, trombospondina, sialoproteine, proteoglicani, biglicani, albumine ed immunoglobuline) e acqua (Amizuka, 2004).

La presenza di minerale conferisce al tessuto spiccate proprietà meccaniche come durezza e resistenza al carico; la composizione e la distribuzione delle componenti proteiche della matrice, elasticità e resistenza alle fratture. In particolare il collagene I vanta una peculiare struttura terziaria caratterizzata dall'avvolgimento elicoidale di tre catene polipeptidiche uguali in cui sono ripetute sequenze di amminoacidi in genere poco frequenti nelle proteine (prolina, glicina, idrossiprolina e idrossilisina); è proprio tale struttura a conferire le proprietà elastiche alla molecola e quindi all'osso (Marks and Hermey, 2001).

Il tessuto osseo, inoltre, rappresenta il principale deposito di ione calcio per le necessità metaboliche dell'intero organismo: la deposizione di calcio nell'osso e la sua mobilizzazione, finemente controllate da meccanismi endocrini, contribuiscono alla regolazione dei livelli plasmatici dello ione.

Dal punto di vista macroscopico si distinguono due tipologie di osso: spugnoso (o trabecolare) e compatto. L'osso spugnoso è adatto a resistere a sollecitazioni di tipo compressivo e per questo si trova principalmente nelle ossa brevi, in quelle piatte e nelle epifisi delle ossa lunghe. La struttura spongiforme è caratterizzata dalla presenza di trabecole variamente orientate ed intersecate in una rete tridimensionale, nelle cui cavità è contenuto il midollo osseo. L'osso compatto deve il nome alla rigidità che lo caratterizza e lo rende resistente alla compressione, tensione e torsione; si trova nelle diafisi delle ossa lunghe e riveste il tessuto spugnoso delle ossa brevi e piatte. La sua unità principale, l'osteone, è costituita da lamelle concentriche

formatesi dall'ordinata deposizione di fibre collagene intorno al canale di Havers, che contiene i vasi sanguigni. Intorno vi sono canali più piccoli detti laterali: nel loro insieme i canali laterali e quelli haversiani formano un sistema continuo di cavità che permette gli scambi tra sangue e cellule ossee.

Il tessuto osseo compatto e spugnoso sono costituiti dagli stessi elementi cellulari e dalle stesse proteine della matrice, pur svolgendo funzioni strutturali e metaboliche diverse. Circa l'80%-90% del tessuto compatto è calcificato, mentre quello spugnoso lo è per il 5-25%. Questo fa sì che il primo abbia prevalentemente una funzione meccanica ed il secondo metabolica.

Dal punto di vista istologico l'osso è rivestito esternamente da una lamina connettivale chiamata periostio, assente in corrispondenza delle cartilagini articolari e delle zone di inserzione di tendini e legamenti.

Nonostante l'apparente staticità e l'effettiva rigidità, il tessuto osseo è estremamente dinamico: durante le fasi della vita è costantemente soggetto a cicli di riassorbimento e deposizione, mirati a soddisfare le esigenze metaboliche e funzionali dell'accrescimento o ad adeguare la struttura dello scheletro alle sollecitazioni meccaniche cui è sottoposto.

L'insieme dei processi di rimozione e formazione di nuovo tessuto è denominato rimodellamento osseo. Ciò si verifica grazie ad una stretta correlazione funzionale tra le cellule ossee e numerosi i fattori che ne coordinano l'attività, per la regolazione e il mantenimento dell'omeostasi scheletrica.

Cellule del tessuto osseo

La componente cellulare del tessuto osseo è costituita da: cellule osteoprogenitrici, osteoblasti, osteociti e osteoclasti. Le cellule ossee regolano sinergicamente il continuo rimodellamento, la riparazione e la rigenerazione tissutale. Essenziale è anche il contributo delle cellule endoteliali nel provvedere, con l'angiogenesi, all'apporto di nutrienti e ossigeno necessari al metabolismo e all'allontanamento dei prodotti del catabolismo cellulare.

Le cellule osteoprogenitrici (preosteoblasti), gli osteoblasti e gli osteociti sono fasi funzionali consecutive dello stesso tipo cellulare, a sua volta derivato dal differenziamento in senso osteogenico della cellula mesenchimale pluripotente dei tessuti connettivi. Gli osteoclasti, invece, derivano da precursori (preosteoclasti) differenziati dalle cellule staminali del midollo osseo ematopoietico e immigrati nel tessuto osseo dal sangue.

I **preosteoblasti** hanno forma piatta ed allungata, con citoplasma scarso e basofilo ed un nucleo eucromatico con un grande nucleolo. Tali cellule si collocano sulle superfici libere delle ossa, al livello dello strato più interno del periostio apposto all'osso, lo strato osteogenico di Ollier, riccamente vascolarizzato. Sono altresì localizzate al livello del tessuto connettivo lasso che riveste le cavità interne dell'osso, chiamato endostio, in vicinanza dei capillari sanguigni. Le cellule osteoprogenitrici sono dotate di capacità proliferativa che si manifesta in modo particolare durante l'accrescimento corporeo, ma che si mantiene anche durante la vita adulta. Il differenziamento delle cellule preosteoblastiche in osteoblasti maturi avviene grazie allo stimolo di numerosi fattori, principalmente il paratormone (PTH), l'ormone della crescita (GH) e il transforming growth factor-beta (TGF- β).

Gli **osteoblasti** sono le cellule responsabili della sintesi della matrice extracellulare dell'osso e della sua mineralizzazione. Hanno forma globosa o poliedrica e tendono a giustapporsi le une alle altre a formare lamine epitelioidi a ridosso delle superfici ossee in via di formazione. Gli osteoblasti hanno dimensioni rilevanti (circa 20 μ m), un nucleo rotondeggiante eucromatico con un grande nucleolo ed un citoplasma abbondante e basofilo. Istochimicamente queste cellule si distinguono dalla positività alla reazione per l'enzima fosfatasi alcalina (ALP). Al microscopio elettronico presentano un ergastoplasma sviluppato e un grande apparato di Golgi. Nel citoplasma periferico possono essere presenti dei corpi delimitati da membrana detti globuli calcificanti, di 0,2-0,5 μ m di diametro, contenenti una matrice a medio arresto elettronico in cui sono localizzati enzimi glicoproteici come l'ALP e la pirofosfatasi. Questi non vanno confusi con i *calcifying globules* che si trovano nella matrice ossea mineralizzata e che rappresentano i nuclei iniziali di aggregazione dei cristalli. Gli

osteoblasti sono uniti tra loro e con gli osteociti limitrofi, tramite le giunzioni serrate (*gap junctions*) attraverso le quali scambiano molecole segnale per la coordinazione dell'attività metabolica e la deposizione di matrice ossea.

Gli **osteociti** sono le cellule tipiche dell'osso maturo responsabili del suo mantenimento, ma anche capaci di 'innesicare' il rimaneggiamento. Sono cellule terminali con un'autonomia di vita finita, regolata da meccanismi endocrini. L'osteocita è una cellula stellata con un corpo cellulare a forma di lente biconvessa e con numerosi prolungamenti citoplasmatici. Alle estremità, i prolungamenti sono connessi con quelli degli osteociti vicini mediante giunzioni serrate, per mezzo delle quali avvengono gli scambi intercellulari di metaboliti e molecole segnale citoplasmatici. Tra la membrana plasmatica del corpo cellulare e dei prolungamenti, e la matrice mineralizzata rimane uno spazio sottile occupato da tessuto osseo che non mineralizza. Attraverso il tessuto osteoide delle lacune e dei canalicoli ossei, ampiamente comunicanti, l'acqua e le sostanze disciolte riescono a raggiungere anche gli osteociti più distanti dai vasi sanguigni. Quando l'osteocita giunge al termine del suo ciclo vitale, ritrae i propri prolungamenti e degenera.

Gli **osteoclasti** sono cellule preposte al riassorbimento osseo. Come già riportato non sono cellule autoctone del tessuto osseo, in quanto non appartengono alla linea che deriva dalle cellule osteoprogenitrici. I preosteoclasti, infatti, originano nel midollo osseo ematopoietico dalla stessa linea differenziativa dei monociti. I precursori sono trasportati dal torrente circolatorio fino alle sedi in cui avvengono i processi di riassorbimento osseo. Ivi giunti, migrano nel tessuto e si fondono insieme originando gli osteoclasti attivi; questi elementi sinciziali sono capaci di dissolvere la componente minerale dell'osso e di digerire enzimaticamente quella organica. Gli osteoclasti maturi sono cellule giganti (100-200 μ m) e plurinucleate in quanto, appunto, originate dalla fusione di singoli precursori mononucleati. In una singola cellula possono essere presenti fino a 50 nuclei, con cromatina lassa e nucleolo ben evidente; il citoplasma è acidofilo. L'osteoclasto attivato aderisce alla matrice mineralizzata in via di riassorbimento ed è solitamente accolto in una cavità, detta lacuna di Howship, che si forma a seguito dell'azione erosiva della cellula sull'osso.

Sul versante della cellula che si appone all'osso, è visibile il tipico orletto increspato (o a spazzola) che appare come un ispessimento della superficie cellulare con una sottile striatura perpendicolare alla superficie stessa. Con metodi istochimici, a livello dell'orletto si può rilevare la presenza dell'enzima anidrasi carbonica e di pompe a protoni.

Fisiologia del tessuto osseo

Durante la formazione del tessuto osseo sono vari i fattori di crescita morfogenetici e *pathways* a regolazione ormonale, che agiscono su fattori trascrizionali responsabili di indurre il fenotipo osteogenico. Sono stati identificati due segnali chiave nel processo di osteogenesi: il fattore di trascrizione Runx2, necessario per la formazione embrionale dell'osso, ed il Wnt *pathway* implicato nella regolazione della morfologia, proliferazione e motilità cellulare e quindi nello sviluppo della struttura scheletrica.

Al vertice della cascata di eventi che guida il processo di differenziamento della cellula mesenchimale pluripotente a osteoblasto maturo (Komori, 2003 e 2005), c'è il gene Runx2, noto anche come Cbfa1 (Core-binding transcription factor 1). La sua espressione, inizialmente condivisa dal precursore bipotente di osteoblasti e condrociti, viene mantenuta solo nel percorso osteogenico (Owen and Karsenty, 1998)[FIG 9 M o 1.3.1 S], sotto il controllo regolatorio della Bone morphogenetic protein 7 (BMP-7) e della vitamina D3 (Viereck et al., 2002; Tou et al., 2003). Runx2 è chiamato anche osteoblast specific factor 2, perché si lega ad un elemento *cis-acting* specifico per gli osteoblasti nel promoter dell'osteocalcina. A valle di Runx2 si trova osterix (Osx), un altro importante fattore trascrizionale che compare in una fase successiva. Osx è necessario per il differenziamento del preosteoblasto in osteoblasto funzionale, il quale esprimerà alti livelli di ALP, collagene di tipo I, *bone sialoproteins* e osteocalcina (Nakashima et al., 2002). L'espressione di Osx e degli altri *markers* del fenotipo osteoblastico ora citati possono essere stimulate dalla *bone morphogenetic protein 2* (BMP-2) (Kadowaki et al., 2004).

Studi *in vitro* degli ultimi anni, hanno dimostrato come il *pathway* di segnalazione Wnt sia critico per il differenziamento di cellule progenitrici in osteoblasti. L'inibizione del segnale, infatti, le può indurre ad entrare nel ciclo cellulare e così prevenire l'osteogenesi (Gregory et al., 2005). L'azione di *signalling* di Wnt si esplica in varie tappe di processo osteogenico. Le proteine Wnts, secrete dalle stesse cellule, legano complessi recettoriali di membrana associati alle proteine G (Fz e LRP5/6); l'attivazione del recettore induce il reclutamento e la stabilizzazione di fattori citoplasmatici, come la β -catenina, che traslocati nel nucleo regolano la trascrizione di geni del differenziamento. La β -catenina riveste un ruolo centrale di mediatore, per la trasmissione del segnale differenziativo indotto da Runx2. Studi *in vivo* sulla perdita di attività della molecola hanno osservato una severa osteopenia, dovuta ad un rilevante aumento degli osteoclasti, mentre la sua attivazione costitutiva risulta in un drammatico aumento della deposizione di osso. *In vitro*, osteoblasti privi di β -catenina esibiscono squilibri nella maturazione e mineralizzazione, con un'elevata espressione del receptor activator of nuclear *factor* *kB-Ligand* (RANK-L), che è un fattore di crescita degli osteoclasti (Holmen et al., 2005). E' stato dimostrato, inoltre, come la β -catenina agisca al livello di questo *pathway* in sinergia con la BMP-2, stimolando l'attività dell'ALP e l'espressione degli altri marcatori osteoblastici. Nei preosteoblasti la BMP-2 aumenta la presenza di β -catenina nel nucleo e induce l'espressione di varie proteine della famiglia Wnt (Mbalaviele et al., 2005). Quello delle Wnts è quindi un *loop* autocrino fondamentale per il controllo biologico dello sviluppo in senso osteoblastico.

Tra i fattori regolatori solubili prodotti dagli osteoblasti, forse il più studiato è il transforming growth factor-beta (TGF- β), che appartiene alla stessa famiglia delle BMPs. Questo fattore di crescita, con azione paracrina ed autocrina, ne regola altri che favoriscono lo sviluppo del fenotipo ed il metabolismo degli osteoblasti maturi. Il TGF- β viene secreto in forma di precursore inattivo e reso funzionale in seguito, da proteasi extracellulari. Gli osteoblasti sintetizzano anche gli Insuline-like growth factors (IGFs), proteine con una spiccata azione stimolatoria sulla propria attività

cellulare. Un ruolo importante è svolto anche da ormoni come il PTH, che svolge una duplice azione di formazione e riassorbimento osseo. PTH è in grado di attivare il sistema osteoprotegerina (OPG)/RANK-L, sostenendo l'azione antiriassorbitiva di OPG e stimolando la funzione osteoblastica (attività anabolizzante) in colture d'organo (Howard et al., 1981).

Gli osteoblasti sono, inoltre, responsabili della produzione dei costituenti della matrice organica extracellulare, quali il collagene di tipo I e le proteine non collageniche. Una volta che la matrice extracellulare viene secreta va incontro a mineralizzazione: l'accumulo del minerale è rapido, raggiungendo il 70% della densità in pochi giorni (mineralizzazione primaria). Tuttavia la deposizione di piccoli cristalli minerali continua lentamente per mesi (mineralizzazione secondaria). Gli osteoblasti, richiamati nei siti di formazione ossea da citochine e fattori di crescita, dopo la secrezione della matrice rimangono inglobati in essa, prendendo il nome di osteociti. Il corpo degli osteociti rimane racchiuso in una nicchia scavata nella sostanza intercellulare, la lacuna ossea, la cui forma ricalca quella della cellula mentre i prolungamenti sono accolti all'interno di sottili canali scavati nel tessuto, chiamati canalicoli ossei.

Gli osteoblasti sono coinvolti anche nel processo di rimaneggiamento osseo. Sono infatti in grado di innescare il riassorbimento della matrice ossea sia indirettamente, in quanto producono attivatori degli osteoclasti come RANK-L e M-CSF (*Monocyte colony stimulating factor*), sia in modo diretto secernendo enzimi proteolitici che ne scindono la componente organica. Tra questi vi è la collagenasi, secreta in forma inattiva (procollagenasi) e resa operativa nell'ambiente extracellulare dopo il clivaggio proteolitico da parte della plasmina. La collagenasi agisce rimuovendo lo strato di tessuto osteoide non mineralizzato che riveste la superficie dell'osso, consentendo agli osteoclasti di aderire alla matrice minerale e dissolverla. Il riassorbimento della matrice da parte di questi ultimi, inizia con la dissoluzione della componente minerale dovuta all'acidificazione del microambiente nella zona di adesione all'osso. Al livello della zona sigillata l'anidrasi carbonica degli osteoclasti, genera acido carbonico a partire da CO_2 e H_2O ; le pompe di membrana sull'orletto

increspato trasportano attivamente i protoni (della dissociazione di acidi organici come carbonico, citrico e lattico..) nell'ambiente extracellulare. L'abbassamento del pH che ne consegue, porta alla dissoluzione dei cristalli di apatite. Nel contempo gli osteoclasti esocitano il contenuto degli enzimi lisosomiali all'esterno: a basso pH le idrolasi lisosomiali si attivano e digeriscono anche i componenti organici della matrice ossea. L'azione litica degli osteoclasti si manifesta con la formazione della lacuna di Howship. Una volta formata la lacuna gli osteoclasti si staccano dalla matrice e, con moto ameboide, si spostano sulla porzione di osso adiacente a quella riassorbita, iniziando la formazione di una nuova lacuna.

La funzione osteoclastica è finemente regolata da fattori locali e ormonali. In particolare, queste sono le uniche cellule dell'osso che possiedono il recettore per la calcitonina, ormone prodotto dalle cellule parafollicolari (cellule C) della tiroide e antagonista del paratormone. La calcitonina è un inibitore del riassorbimento osseo in quanto è capace di indurre il distacco degli osteoclasti dall'osso, la scomparsa dell'orletto a spazzola e la riduzione del metabolismo cellulare. Il recettore per la molecola è espresso già nei precursori circolanti degli osteoclasti, tanto che viene utilizzato come discriminante per l'identificazione di questo tipo cellulare. Tuttavia i preosteoclasti non esprimono il recettore per il paratormone, la cui azione osteolitica sembra esplicarsi attraverso gli osteoblasti. Stimolati dall'ormone, questi ultimi si ritiene che liberino fattori solubili detti *Osteoclast Activating Factors* (OAF), i quali attivano gli osteoclasti ad iniziare il riassorbimento. La natura chimica degli OAF non è ancora del tutto nota: probabilmente alcuni di questi appartengono alla famiglia delle BMPs (la BMP-2 è un potente attivatore osteoclastico *in vitro*). Questa ipotesi sembra avvalorata dai risultati sperimentali *in vitro* che dimostrano come fattori quali il paratormone, la vitamina D e alcune citochine siano incapaci di stimolare gli osteoclasti a riassorbire l'osso, a meno che non siano mantenuti in coltura con gli osteoblasti (Formigli et al., 1995). Un OAF identificato recentemente è RANK-L, appartenente al sistema di recettori e ligandi OPG/RANK-L/RANK e oggi ritenuto fondamentale nella regolazione del processo di osteoclastogenesi. RANK-L lega il recettore RANK espresso sulle membrane cellulari dei precursori osteoclastici,

promuovendone il differenziamento e la maturazione. OPG, prodotta dagli osteoblasti, svolge il ruolo di recettore solubile di RANK-L inibendo l'osteoclastogenesi (Kostenuik and Shalhoub, 2001). Sono stati evidenziati anche altri ormoni e fattori locali in grado di influenzare l'osteoclastogenesi e l'attività degli osteoclasti maturi, interferendo con il sistema OPG/RANK-L/RANK (Takai et al., 1998). Tra questi, il già menzionato PTH legandosi ai recettori degli osteoblasti determina un incremento della sintesi di RANK-L e la conseguente maturazione delle cellule preosteoclastiche in osteoclasti maturi.

Il processo riparativo dell'osso

La riparazione endogena di lacune ossee è un evento fisiologico. Il tessuto osseo è in continuo rimodellamento: l'osteogenesi avviene durante la vita fetale dell'individuo e consiste essenzialmente nella trasformazione di parti primitivamente costituite da tessuto connettivo (ossificazione connettivale o membranosa) o da tessuto cartilagineo (ossificazione condrale).

Nell'ossificazione membranosa si osserva, in corrispondenza del centro di ossificazione, un aumento della vascolarizzazione ed un accumulo di cellule mesenchimali in prossimità dei capillari. Da esse originano gli osteoblasti che dopo aver secreto matrice e sui cui depositano sali di calcio, rimangono imprigionati nella sostanza fondamentale trasformandosi in osteociti. Altre cellule mesenchimali evolvono in cellule del midollo osseo, che si differenziano durante la vita dell'individuo.

L'ossificazione pericondrale è molto simile a quella connettivale e spesso i due fenomeni si verificano contemporaneamente in un segmento osseo in formazione. L'ossificazione endocondrale porta alla costruzione di tessuto osseo attorno a quello cartilagineo preesistente, come nei segmenti diafisari delle ossa lunghe. La cartilagine attorno alla quale si forma il nuovo tessuto osseo viene poi progressivamente disgregata ad opera di cellule dette condroclasti. Gli spazi rimasti vuoti a seguito

dell'erosione della cartilagine vengono successivamente occupati dalle cellule staminali che daranno origine al midollo osseo, dotato di attività ematopoietica.

In seguito a questi processi si forma tessuto osseo fibroso a fibre intrecciate (non lamellare). L'osso fibroso viene progressivamente sostituito con tessuto osseo secondario, ottenuto mediante l'erosione di quello primario e la deposizione di nuovo materiale grazie all'azione erosiva congiunta di osteoclasti ed osteoblasti. Tale processo continua anche nell'individuo adulto dove il rimodellamento porta ad un perfezionamento strutturale del tessuto in base alle tensioni ed ai carichi cui è sottoposto.

Nei processi riparativi si ripete la sequenza di eventi della normale istogenesi dell'osso. Nell'ossificazione intramembranosa si possono distinguere due fasi osteogeniche distinte: l'osteogenesi statica, diretta principalmente da fattori induttivi come l'endotelina I e l'*Epidermal Growth Factor* e l'osteogenesi dinamica, diretta soprattutto da segnali meccanici (Marotti et al., 2004). Quella statica è un processo meccanico-dipendente di neo-osteogenesi che avviene o in un tessuto di natura mesenchimale o in un callo fibroso, privo di osso preesistente e quindi di osteociti che possano fungere da meccanorecettori. L'osteogenesi dinamica invece ha luogo su superfici ossee preesistenti, dove fattori meccanici innescano ed influenzano la deposizione ossea da parte degli osteoblasti. Nell'osteogenesi meccanico-dipendente svolgono un ruolo fondamentale le citochine ed i fattori di crescita, di origine vascolare ed ematica.

Il processo di riparazione delle fratture è un modello guida utile per cercare di sviluppare una terapia razionale per la rigenerazione dell'osso. La riparazione di una frattura avviene inizialmente con la formazione di un ematoma, conseguente al trauma, dovuto alla rottura dei vasi. Successivamente si formano nuovi vasi a partire da quelli preesistenti (angiogenesi) e vengono reclutate cellule dell'infiammazione, fibroblasti e cellule staminali. Le cellule infiammatorie liberano fattori di crescita e citochine che svolgono un ruolo importante nella riparazione. Si forma così tessuto di granulazione, gradualmente rimpiazzato da fibrocartilagine e un callo esterno mediante ossificazione intramembranosa; solo in seguito viene mineralizzato il callo

interno. Infine, come nel rimodellamento osseo fisiologico, il callo dovuto alla frattura è rimpiazzato con osso secondario lamellare ed il supporto vascolare ritorna normale. Il ruolo dell'ematoma è fondamentale per la riparazione ossea poiché permette l'innescò della rigenerazione, dall'esterno dell'osso verso la zona midollare. E' stato infatti osservato come la rimozione dell'ematoma diminuisca significativamente la riparazione, mentre il suo trapianto accelera la deposizione di osso nuovo (Mizuno et al., 1990; Grundnes and Reikeras, 1993).

FIG 4: Fasi della riparazione di una frattura: (a) formazione dell'ematoma, (b) formazione di osso spugnoso nelle zone vicine ai vasi neoformati e di fibrocartilagine in quelli più distanti, (c) sostituzione della fibrocartilagine con il callo osseo, (d) rimodellamento finale.

OBBIETTIVO DELLO STUDIO

La ricostruzione del tessuto osseo è necessaria nel caso di ampie perdite di sostanza conseguenti a gravi malformazioni, traumi o neoplasie. In campo ortopedico i trattamenti chirurgici di uso corrente sono il trapianto di osso autologo o allogenico oppure l'impianto protesico. Un'alternativa a questi approcci tradizionali è rappresentata dall'ingegneria tissutale, che si avvale dell'uso di cellule viventi (e/o loro prodotti) e di biomateriali innovativi per sviluppare sostituti tissutali 'bioattivi' in alternativa agli impianti artificiali. I notevoli progressi compiuti negli ultimi anni in ambito biologico, con la scoperta delle potenzialità di utilizzo delle cellule staminali, e in quello dell'ingegneria biomedica, con la realizzazione di materiali con caratteristiche sempre più simili ai tessuti biologici, hanno permesso lo sviluppo di tecnologie mirate al miglioramento della rigenerazione tissutale *in vivo*. Questo significa non solo ripristinare l'integrità e, dove possibile, la funzione del tessuto originario, ma anche stimolare attivamente la rigenerazione *in situ*, cioè la produzione *in vivo* di nuovo tessuto che replichi e sostituisca quello perduto. Un sostituto osseo di nuova generazione viene quindi pensato non solo come supporto (*scaffold*) alla neo-formazione di tessuto *in situ*, ma anche come veicolo di uno stimolo biomolecolare che induca la rigenerazione. In questo senso si è sempre più rafforzato il contributo della biomimetica alla progettazione di dispositivi per l'ingegneria tissutale dell'osso, col fine di riprodurre l'architettura dei substrati fisiologici, come la matrice extracellulare (ECM), e i segnali di riconoscimento molecolare che conducono all'integrazione dell'impianto nel tessuto pre-esistente. Le strategie biomimetiche mirano ad aumentare l'attività biologica della superficie dei biomateriali, con modifiche di tipo fisico (topografia) o chimico (segnali adesivi), in modo da favorire l'adesione cellulare al substrato e indurre la colonizzazione dello *scaffold*.

In questo studio si è valutato l'effetto di modificazioni biomimetiche operate sulla superficie di materiali già in uso come sostituti ossei, quali policaprolattone (PCL) e titanio, sull'interazione con cellule midollari (modello sperimentale *in vitro*). In

particolare è stata valutata la tecnica dell'irraggiamento con ioni, che apporta modifiche della nanostruttura superficiale, e la funzionalizzazione con specifici peptidi adesivi e monostrati autoassemblanti (SAMs), come mezzi per migliorare le fasi precoci (adesione, *spreading*, organizzazione del citoscheletro) e tardive (differenziamento in senso osteoblastico) dell'interazione cellule/substrato.

MATERIALE E METODO

Colture cellulari

Le modificazioni biomimetiche di superficie dei biomateriali sono state valutate utilizzando come modello cellulare, colture primarie di cellule mesenchimali stromali (MSC) isolate da midollo osseo.

Colture primarie di cellule mesenchimali stromali (MSC)

La fonte di cellule stromali è il midollo osseo ottenuto dalla fresatura del canale femorale, effettuata durante impianto di protesi d'anca. Le cellule sono ottenute separando la porzione di cellule mononucleate del midollo su gradiente e selezionando la popolazione di MSC per aderenza al substrato di coltura.

Per l'isolamento, l'espansione e la caratterizzazione *in vitro* della popolazione di MSC viene seguito il protocollo sperimentale riportato di seguito.

Il midollo viene raccolto in sede operatoria in terreno di coltura addizionato con 100U/ml di eparina e poi stratificato su gradiente di Ficoll Istopaque 1077 (Sigma). L'anello di cellule midollari mononucleate così isolato, viene lavato due volte con tampone fosfato (PBS) e le cellule risospese in terreno di coltura α -MEM (Sigma) al 10% FBS (Biowitaker) e 1% penicillina-streptomina (Gibco). Dopo la conta con camera di Bürker e tripan blue le mononucleate sono seminate ad una densità di 250×10^3 cells/cm² e mantenute a 37°C, in atmosfera umidificata al 98% e al 5% di CO₂. Trascorse 96 ore dalla semina il mezzo di coltura viene sostituito con terreno differenziante: α -MEM al 10% FBS e 1% pen-strep, acido ascorbico 2P 50µg/ml, e desametasone 10⁻⁸M allo scopo di favorire il differenziamento in senso osteoblastico. Quando le cellule raggiungono la confluenza vengono allestite nuove colture secondo le esigenze dei test di caratterizzazione del fenotipo.

Caratterizzazione di colture di MSC

Raggiunta la confluenza le cellule vengono staccate con tripsina-EDTA e contate con camera di Bürker e tripan blue; una parte viene seminata nuovamente per l'espansione della coltura *in vitro*, l'altra per i test di caratterizzazione fenotipica.

Test di vitalità cellulare

Per monitorare l'andamento della coltura cellulare in termini di vitalità, a cadenza settimanale viene effettuato il test dell'Alamar blue (Biosource International). L'Alamar viene addizionato direttamente al terreno di coltura in proporzione 1:10 v/v e lasciato 3 ore e mezzo a 37°C; al termine dell'incubazione il surnatante viene trasferito in un'apposita piastra di lettura e la fluorescenza quantificata mediante lettore Cytofluor 2350 (Millipore Corporation) alle lunghezze d'onda di 530 nm di eccitazione e 590 di emissione. Le cellule non subiscono nessuna alterazione in contatto con il reagente, quindi dopo un lavaggio in PBS possono proseguire la coltura con terreno fresco. L'Alamar viene modificato dagli enzimi della catena di ossidoriduzione mitocondriale assumendo, in forma ridotta, il colore rosa e la capacità di emettere fluorescenza una volta eccitato dalla luce di lunghezza d'onda pari a 530 nm. La variazione di colore, dal blu iniziale al rosa finale, è direttamente proporzionale all'quantità di reagente trasformato e fornisce una stima del numero di cellule vitali sottoposte al saggio.

Test di clonogenicità (Colony Forming Units, CFU)

La capacità di formare colonie, che è indice del potenziale proliferativo cellulare, viene testata seminando le cellule in condizioni di elevata diluizione (140 cells/cm²), in presenza di desametasone (10⁻⁸M).

Dopo 13 giorni di coltura le cellule vengono lavate con tampone fosfato (PBS) e fissate con paraformaldeide 3,7% per 15 minuti a temperatura ambiente. Dopo un

ulteriore lavaggio con PBS le cellule vengono incubate con una soluzione 0,1% di cristal violetto in H₂O bidistillata per 30 minuti a temperatura ambiente. Il cristal violetto è un colorante basico che lega le membrane contrastandole in blu. Alla fine dello *staining* le colonie sono osservate e contate (una CFU per essere tale deve essere formata da almeno 20 cellule) al microscopio ottico a luce bianca.

La formazione di colonie è un indice dello stadio differenziativo della coltura: cellule più differenziate perdono in parte la capacità replicativa e quindi formano un minor numero di CFU. Un saggio del fenotipo osteoblastico può essere condotto valutando il numero di colonie esprimenti la fosfatasi alcalina.

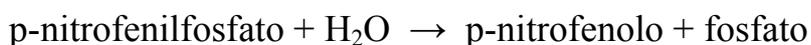
Analisi citochimica della fosfatasi alcalina (ALP)

Per questo test le cellule vengono seminate alla densità di circa 15000 /cm² su supporti di vetro (chamberslides) e lasciate aderire. Dopo 24ore vengono lavate con PBS e fissate con una miscela di acetone, acido citrico, e paraformaldeide per 30 secondi; quindi sono lavate in H₂O bidistillata ed incubate per 15 minuti a temperatura ambiente, al buio, con opportuna miscela di colorazione per ALP fornita dal Kit Alkaline Phosphatase, Leukocyte (Sigma), a base di naftolo AS-BI fosfato. Dopo l'incubazione, si effettua un lavaggio con PBS e si osserva il vetrino al microscopio ottico per verificare se le cellule hanno assunto la colorazione rossa, indice di produzione dell'enzima. Tale colorazione però è raramente omogenea perché le cellule non si trovano tutte allo stesso stadio di maturazione, mostrando quindi un diverso contenuto di ALP. Se nella coltura sottoposta a colorazione si verifica un'espressione dell'enzima da parte di più del 50% delle cellule, il campione è considerato positivo ovvero costituito da cellule MSC; in caso contrario non viene utilizzato per testare biomateriali *in vitro*.

Quantificazione cellulare della fosfatasi alcalina (ALP)

La valutazione del contenuto cellulare di ALP viene determinata staccando le cellule con tripsina-EDTA e lisando il pellet ottenuto dalla concentrazione in 0,001% SDS, per 10 minuti a 37°C; segue una sonicazione (power 10) per 5 minuti. Il lisato viene incubato in proporzione 1:1 con una soluzione di substrato p-nitrofenilfosfato 16 mM (Sigma Diagnostics) per 15 minuti a 37°C.

L'attività dell'enzima ALP trasforma il substrato secondo la reazione:



inducendo il viraggio del colore della soluzione verso il giallo.

L'assorbanza viene letta a 405 nm allo spettrofotometro (Spectra III, Tecan); il valore ricavato è direttamente proporzionale all'attività dell'enzima ALP nel campione. La concentrazione della proteina viene estrapolata mediante regressione lineare tramite una curva con diluizioni scalari di p-nitrofenolo in tampone glicina. L'espressione dell'enzima può essere espressa e quindi rapportata al contenuto di proteine totali presenti nella cellula (Metodo BCA) o allo stesso numero di cellule.

Con la stessa tecnica è possibile misurare il rilascio di ALP, quindi solubile, nel sovrantante delle colture.

Mineralizzazione e colorazione dei noduli minerali

Per la coltura mineralizzante le cellule vengono seminate a circa una densità di 20000 cells/cm² e mantenute in terreno differenziante completo, con l'aggiunta di 10mM β-glicerofosfato, come fonte di fosfato inorganico. Dopo 14 giorni la coltura viene lavata con PBS e fissata con paraformaldeide 3,7% per 15 minuti; in seguito ad un ulteriore lavaggio con tampone fosfato, le cellule vengono incubate con una soluzione 2% (pH 4,6) di rosso di alizarina per 1 ora. Allo scadere di questo tempo le cellule fissate sono state nuovamente lavate con PBS e osservate al microscopio ottico, per individuare, se presenti, i precipitati di calcio-fosfato, cioè i nuclei di mineralizzazione contrastati in rosso.

Colorazioni per l'analisi della morfologia cellulare

Colorazione con arancio di acridina

Le cellule vengono fissate con paraformaldeide 3,7% in PBS per 20 minuti a temperatura ambiente; dopo 2 lavaggi in PBS si lasciano incubare 15 secondi con una soluzione permeabilizzante (1M HCl, Triton X-100, NaCl); subito dopo viene addizionata la seconda miscela (0,1 M acido nitrico, 0,2 M Na₂HPO₄, NaCl, EDTA) contenente arancio di acridina (6µg/ml, Chroma-Gesellschaft), e lasciata 5 minuti a temperatura ambiente, a contatto con le cellule. Al termine dell'incubazione si lava con PBS e si osserva al microscopio a fluorescenza (Nikon Eclipse, E 800M). L'arancio di acridina intercalando gli acidi nucleici, interagisce sia con il DNA che con l'RNA; eccitato ad una determinata lunghezza d'onda permette di distinguere il nucleo (verde) dal citoplasma (arancio), se nella condizione che vi sia intensa attività ribosomiale e dunque abbondante quantità di RNA messaggero.

Colorazione con falloidina rodaminata (o FITC)

Per poter osservare l'organizzazione del citoscheletro nelle prime fasi di adesione cellulare al substrato viene usata la falloidina che è un potente inibitore dell'actina, elemento strutturale dei microfilamenti. Le cellule vengono fissate con paraformaldeide 3,7% in PBS per 20 minuti a temperatura ambiente; poi permeabilizzate con Triton X-100 (0,5% W/v in PBS) per 10 minuti ed infine lavate nuovamente con PBS. A questo punto vengono marcate con falloidina-TRITC (o FITC) (Molecular Probes, Eugene) alla concentrazione di lavoro 3 µg/ml per 30 minuti al buio. Infine le cellule marcate vengono lavate con PBS ed osservate al microscopio a fluorescenza (Nikon Eclipse, E 800M) a lunghezza di emissione 518 nm (a lunghezza di eccitazione 494 nm).

La preparazione dei vari materiali sottoposti allo studio è riportata nei paragrafi relativi ai saggi biologici *in vitro*.

Analisi dei dati

Analisi d'immagine

La colorazione con falloidina-TRITC (o FITC) è stata sottoposta ad analisi d'immagine, scegliendo tre aree random di ogni campione, preferibilmente con cellule non a confluenza. Il software utilizzato è LUCIA Measurement (versione 4.60). Le immagini catturate sono state analizzate valutando la variazione di intensità di colore basata sul segnale di fluorescenza. Il software calcola il numero di cellule distese (cell number/spreading) dividendo l'area occupata dalla fluorescenza per l'area totale inquadrata (con l'obiettivo 20x risulta $170,6 \mu\text{m}^2$).

Statistica

I dati sono stati analizzati usando l'analisi di varianza (ANOVA) con confronto fra gruppi Scheffè post hoc (software StatView, versione 5.0). e considerando come significativo $p \leq 0,01$.

STUDIO IN VITRO

Policaprolattone con modifiche biomimetiche

Una delle tecniche di ingegneria tissutale per la riparazione dell'osso si basa sull'uso di biomateriali in aggiunta a cellule del tessuto nativo. Fra i polimeri riassorbibili suggeriti per la *tissue engineering* il poli- ϵ -caprolattone (PCL), già noto per le eccellenti proprietà, è stato scelto come potenziale sostituto osseo, da qui la necessità di misurare l'adesione e la crescita di cellule ossee. Inoltre sono stati testati due trattamenti, irraggiamento ed adsorbimento di sequenze peptidiche, volti a modificare alcune caratteristiche di superficie del polimero per aumentarne la bioattività e migliorarne l'interazione con i sistemi biologici. Per il saggio *in vitro* del materiale è stata utilizzata sia la popolazione mista di cellule mononucleate midollari che deriva dalla separazione su gradiente, che la popolazione selezionata per aderenza alla plastica di cellule mesenchimali stromali

Preparazione di superfici di PCL: irraggiamento e adsorbimento di peptidi

I campioni di poli- ϵ -caprolattone, di forma quadrata e con area di circa $0,5 \text{ cm}^2$, sono stati preparati presso il Dipartimento di Scienze Chimiche dell'Università di Catania secondo la seguente procedura. Il PCL in polvere (Aldrich) è stato disciolto in cloroformio a concentrazione 3% w/v; la soluzione è stata poi depositata (a velocità di 3000 rpm per 60 secondi a temperatura ambiente) sulla superficie di wafers siliconici *p-doped* nella forma di film di rivestimento, con spessore di circa $100 (\pm 20) \text{ nm}$. Il trattamento di irraggiamento del polimero è stato condotto a temperatura ambiente usando ioni di elio (He^+) a 50 keV di intensità, mediante strumentazione Danfysik. L'applicazione del fascio ionico è stata monitorata e settata ad un flusso di 1×10^{15} ioni/ cm^2 e ad una densità di corrente di $1,5 \mu\text{A}/\text{cm}^2$. Dopo l'irraggiamento i campioni sono stati stabilizzati a temperatura ambiente per circa una settimana, prima della caratterizzazione fisico-chimica e dell'adsorbimento peptidico. In seguito la

superficie irradiata è stata caratterizzata in termini di bagnabilità e rugosità usando rispettivamente misurazioni dell'energia libera superficiale (SFE) e microscopia a forza atomica (AFM).

L'adsorbimento peptidico alla superficie polimerica è stato condotto immergendo i campioni in una soluzione 2.9 mM dei peptidi RGD o GRGD (Sigma) in acqua MilliQ a pH 5.35 (± 0.02), ed incubando per 1 ora a temperatura ambiente.

Per i saggi *in vitro* i campioni di PCL, così ottenuti, sono stati denominati:

- PCL non trattato: **PCL-ut** (film base di polimero, usato come controllo)
- PCL irradiato : **PCL- He**
- PCL irradiato + RGD : **PCL- He- RGD**
- PCL irradiato + GRGD : **PCL- He- GRGD**

Saggi biologici dell'interazione di precursori midollari ossei con superfici di PCL

Le cellule utilizzate nella sperimentazione *in vitro* sono state ottenute dal midollo osseo del canale femorale di conigli New Zealand. In laboratorio l'aspirato midollare è stato stratificato su gradiente di Ficoll (secondo il protocollo di isolamento di MSC da midollo osseo) per isolare la frazione cellulare mononucleata, costituita da un *pool* delle popolazioni dell'ambiente midollare. Le cellule di questa popolazione mista utilizzate subito dopo la separazione su gradiente per la semina sui materiali, sono state definite, ai fini dello studio, '*whole bone marrow cells*' (WBMC). Le WBMC espanse in coltura in terreno osteogenico, hanno dato origine alla seconda popolazione utilizzata come modello cellulare, le '*marrow stromal cells*' (MSC). Queste cellule differiscono dalla popolazione mista perché isolate per aderenza al substrato di coltura e già commissionate in senso osteoblastico.

I campioni di PCL, prima dei saggi biologici, sono stati sterilizzati in soluzione di 1% antibiotico:antimicotico per due ore, alle quali sono seguiti due lavaggi in H₂O

bidistillata. Prima della semina è stato operato anche il precondizionamento delle superfici polimeriche in terreno α -MEM (Sigma) senza siero, per 1 ora e mezzo.

Le cellule WBMC sono state contate e seminate a densità di 2×10^5 sulla superficie dei campioni di PCL. Ad una parte delle colture sui materiali è stato addizionato desametasone 10^{-8} M. La popolazione di MSC è stata ottenuta mantenendo in coltura il *pool* di mononucleate in terreno completo, fino al raggiungimento della confluenza; dopo il distacco con tripsina-EDTA e conta in camera di Bürker le cellule sono state seminate a densità di 2×10^4 su ogni campione. Per ogni condizione sono stati allestiti controlli su polistirene (TCPS).

La vitalità delle colture cellulari su materiali e controlli è stata monitorata a 1, 7, 14, 21 e 28 giorni dalla semina, con test di Alamar blue. Agli stessi tempi è stata valutata, con saggi biochimici, l'espressione di *markers* del differenziamento osteoblastico quali il rilascio dell'enzima fosfatasi alcalina (ALP) e di ione calcio.

La morfologia cellulare è stata osservata in microscopia a fluorescenza mediante arancio di acridina (AO) e colorazione del citoscheletro con falloidina-TRITC. La marcatura dell'actina in associazione con il fluorocromo Hoechst 3532 ha permesso una stima della distensione cellulare e del grado di colonizzazione della superficie del materiale. Inoltre è stata condotta un'analisi morfologica in microscopia elettronica a scansione, sia a tempi brevi che a tempi più prolungati di coltura.

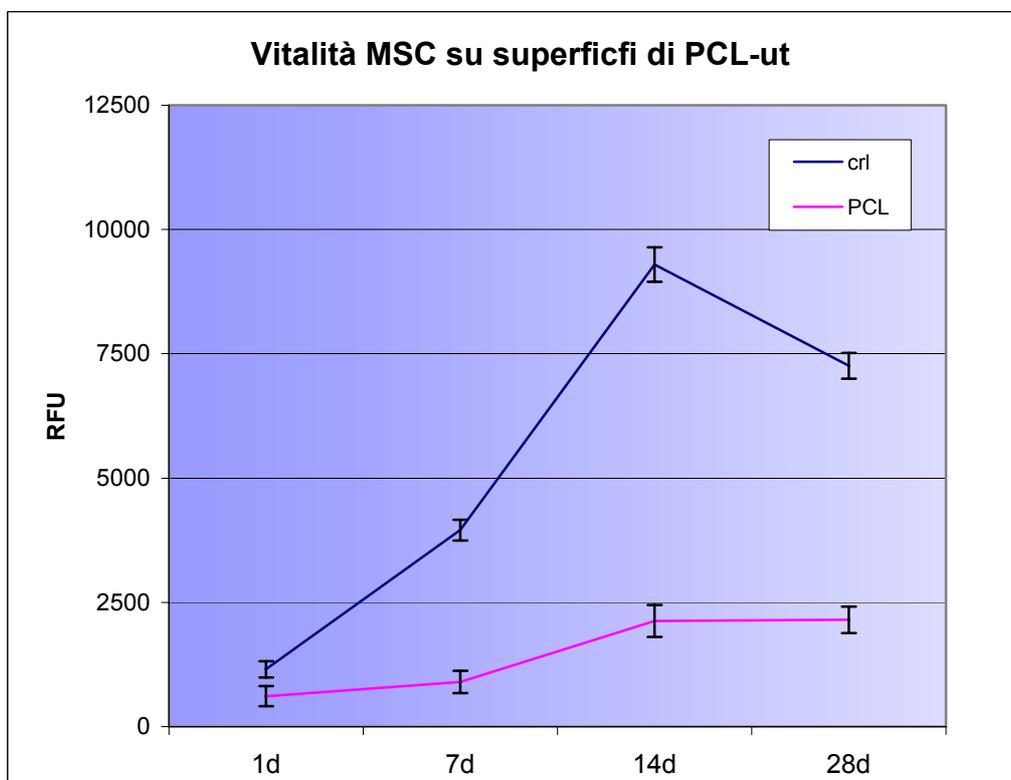
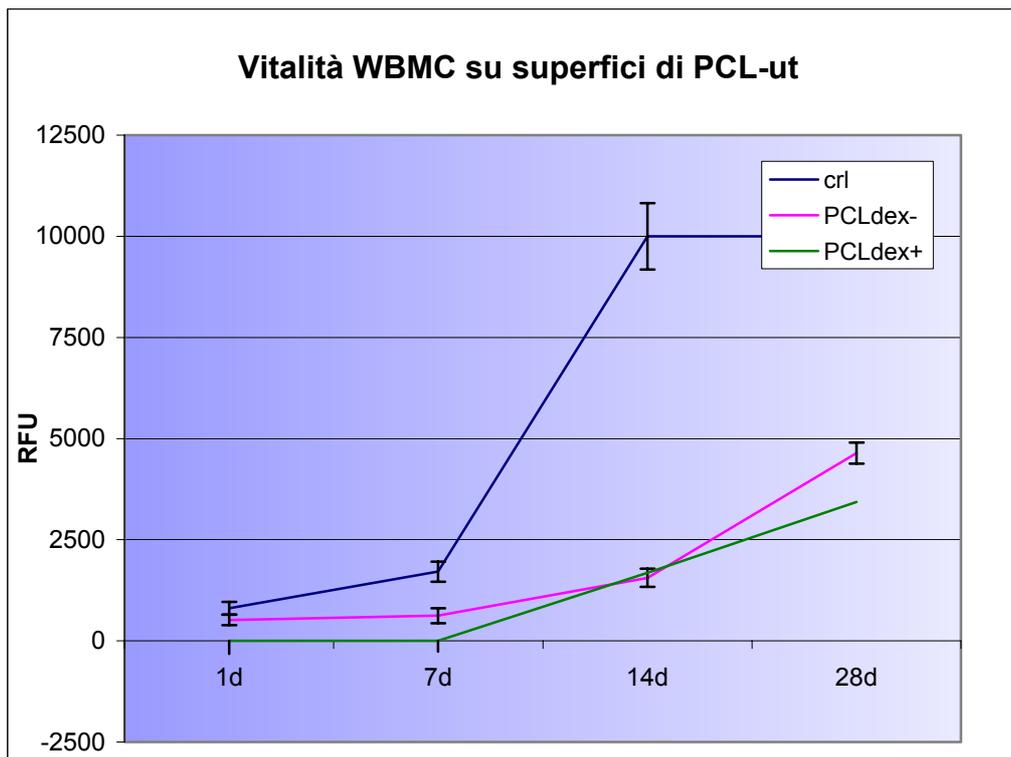
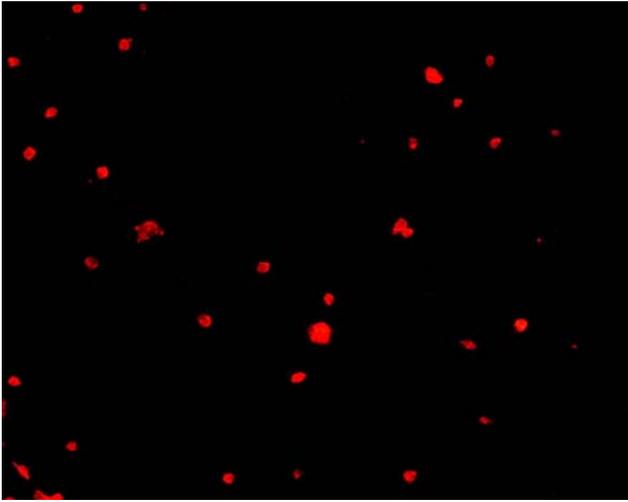
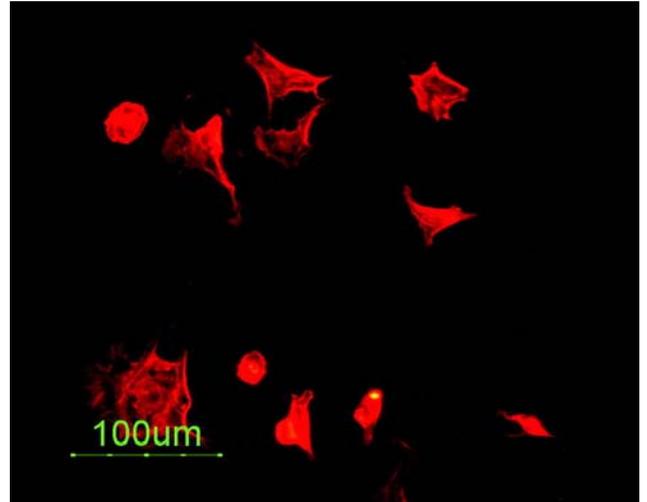


Grafico 1. Vitalità cellulare (Alamar blue, RFU) PCL: PCL-ut; CRL: TCPS

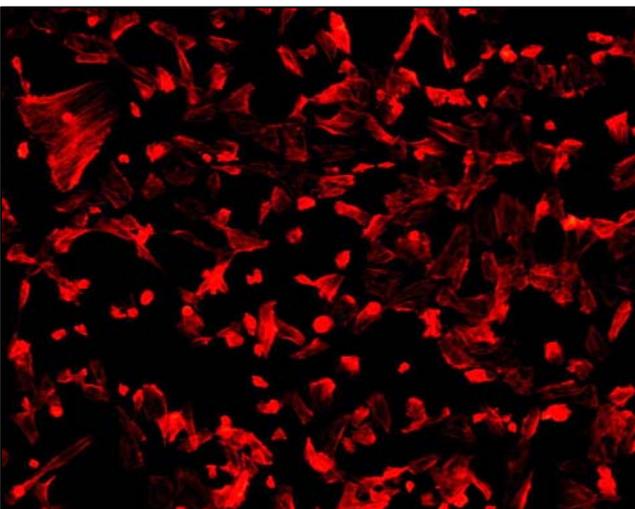
a. WBMC su PCL-ut (10x)



b. MSC su PCL-ut (20x)



c. WBMC su TCPS (10x)



d. MSC su TCPS (20x)

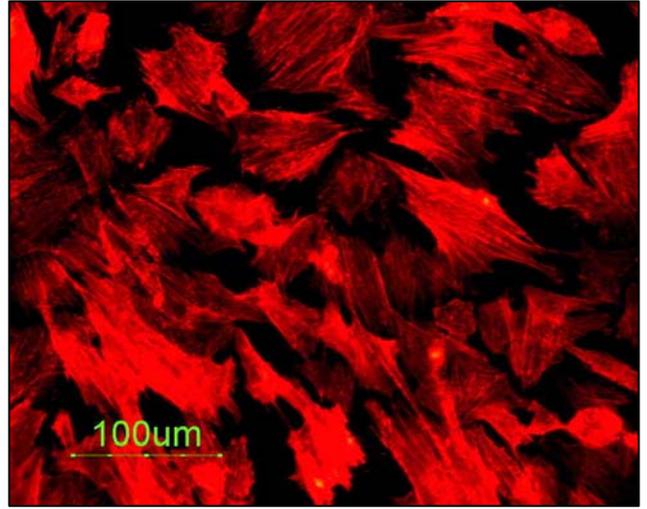


Fig 1. (a-d). Morfologia a 7 giorni. Marcatura del citoscheletro con Falloidina-FITC (rosso)

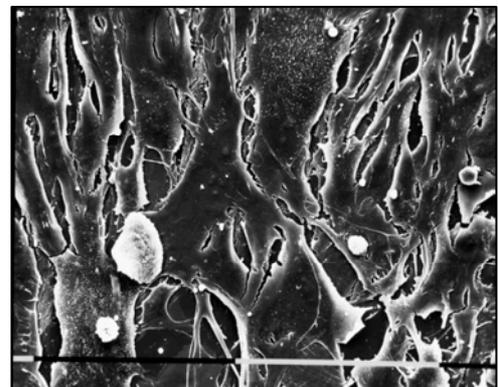
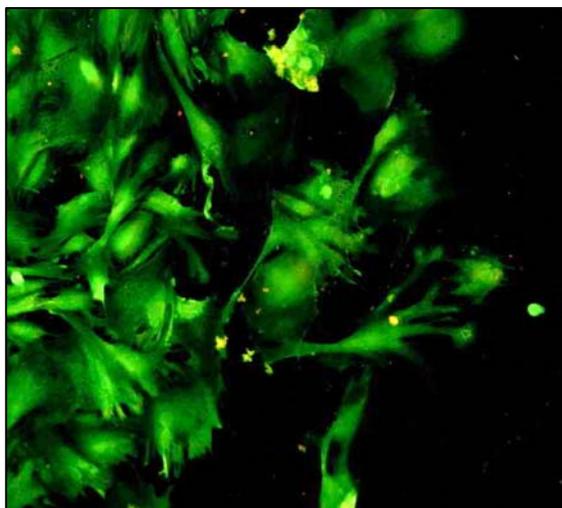
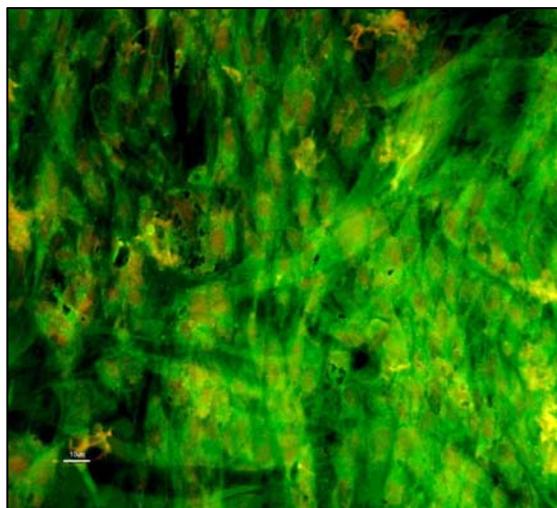


Fig 2. SEM su colture WBMC (sx) e MSC (dx) a 7 giorni.

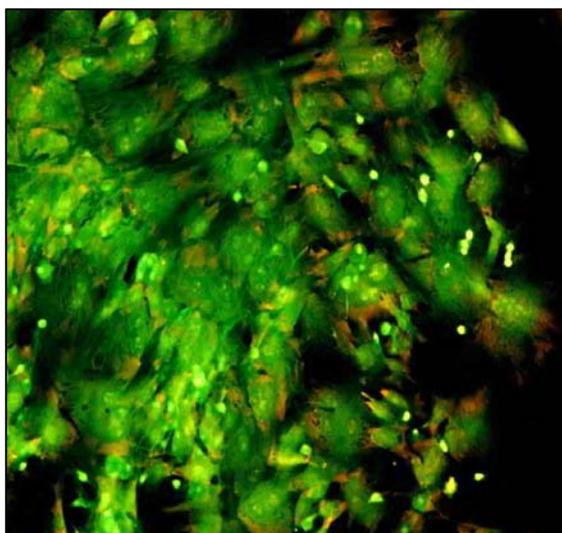
a. WBMC su PCL-ut (10x)



b. MSC su PCL-ut (10x)



c. WBMC su TCPS (10x)



d. MSC su TCPS (10x)

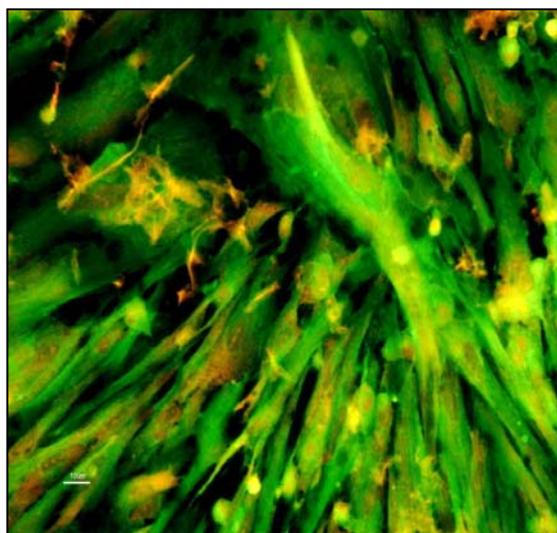


Fig 3. (a-d). Morfologia a 28 giorni. Arancio di acridina.

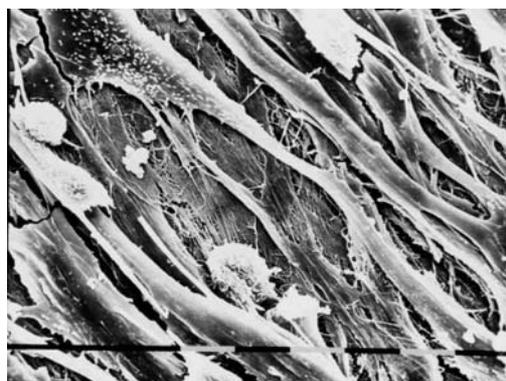


Fig 4. SEM su colture WBMC (sx) e MSC (dx) a 28 giorni.

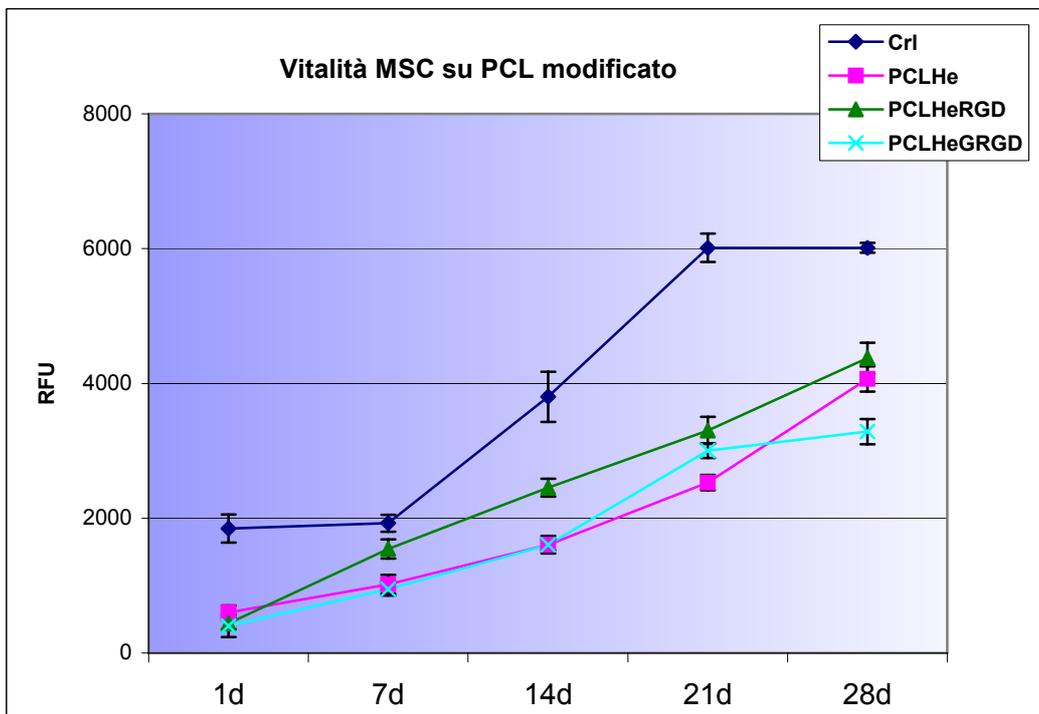
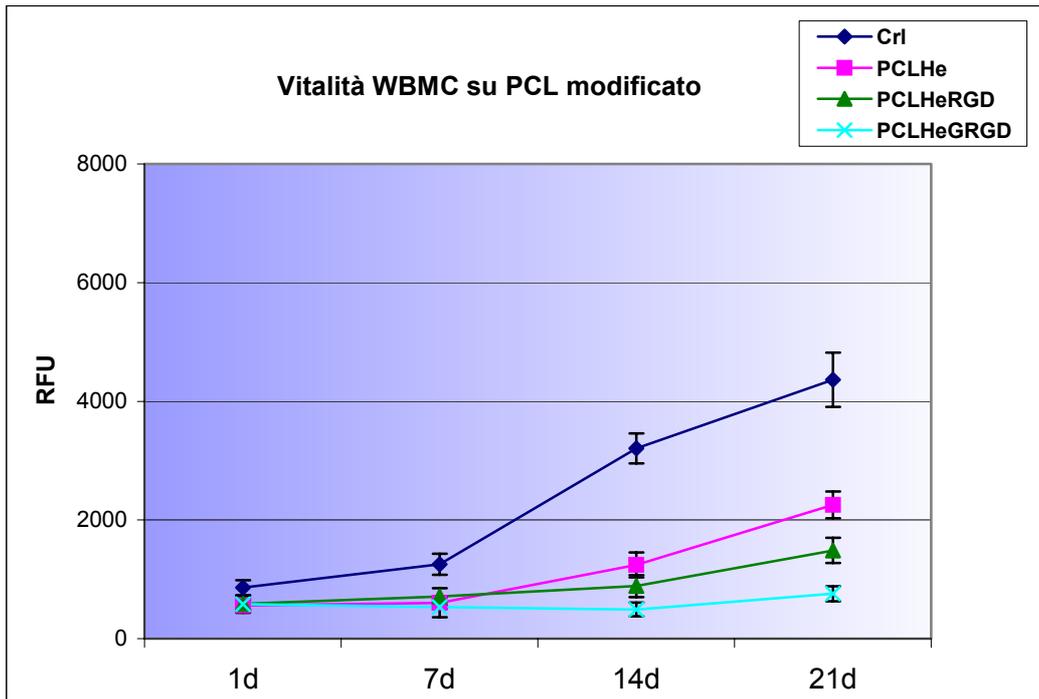
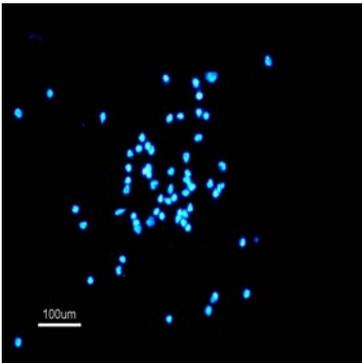


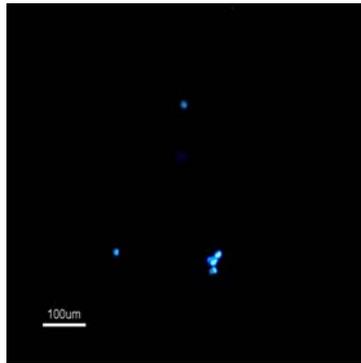
Grafico 2. Vitalità cellulare (Alamar blue, RFU)

PCL-He: PCL irradiato; PCL-HeRGD: PCLirr+RGD; PCL-HeGRGD: PCLirr+GRGD; CRL: TCPS

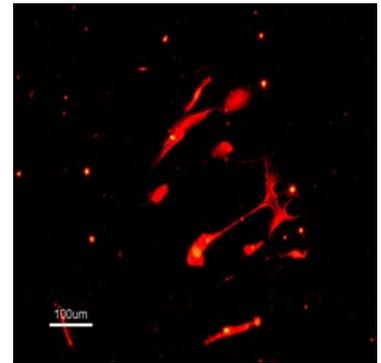
WBMC su PCL-He



WBMC su PCL-HeRGD



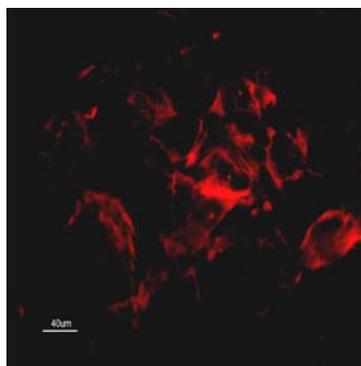
WBMC su PCL-HeGRGD



MSC su PCL-He



MSC su PCL-HeRGD



MSC su PCL-HeGRGD

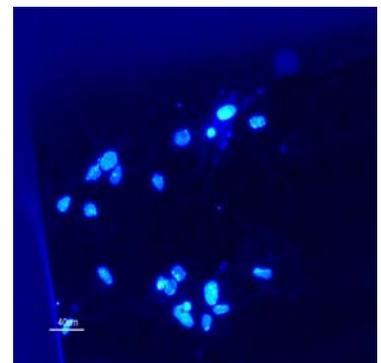
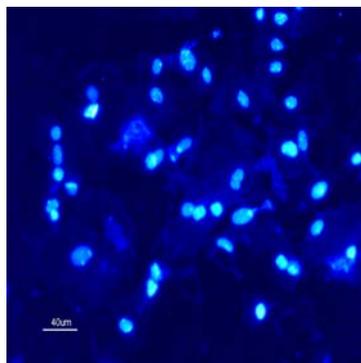
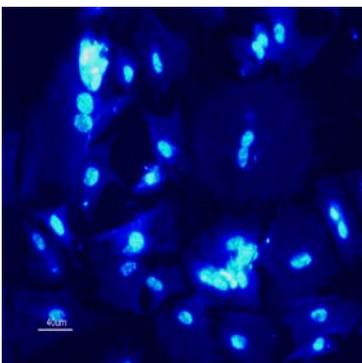
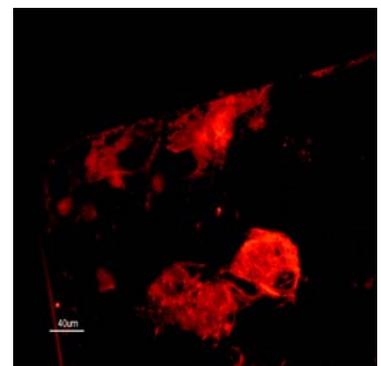
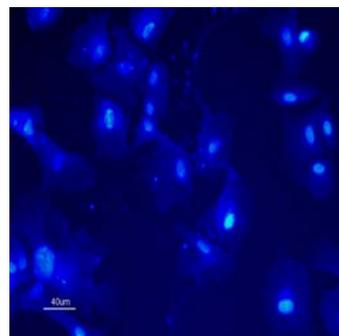
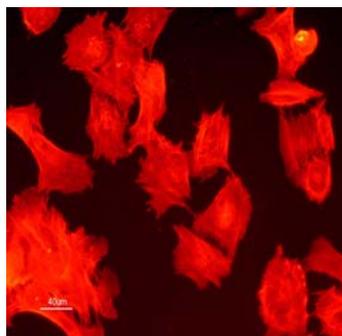


Fig 5. Morfologia a 7 giorni (20x). Falloidina-FITC (rosso) e Hoechst 3238 (blue)

MSC su TCPS (20x)



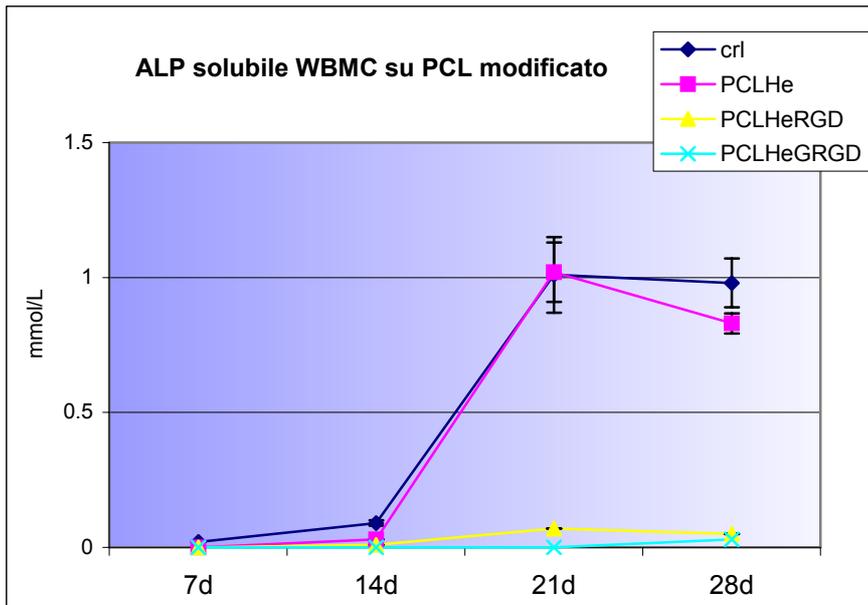
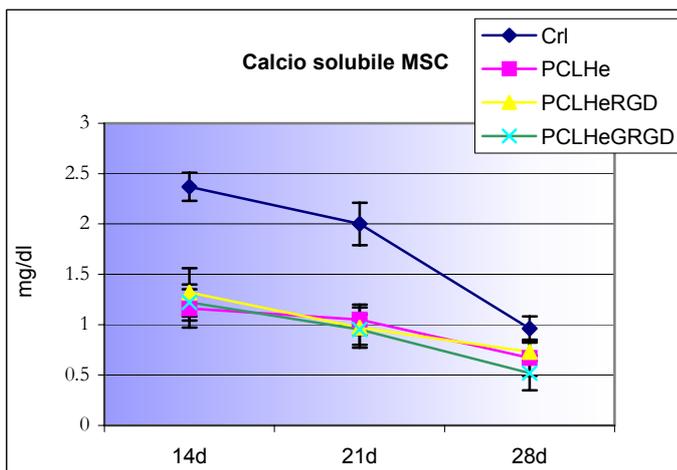
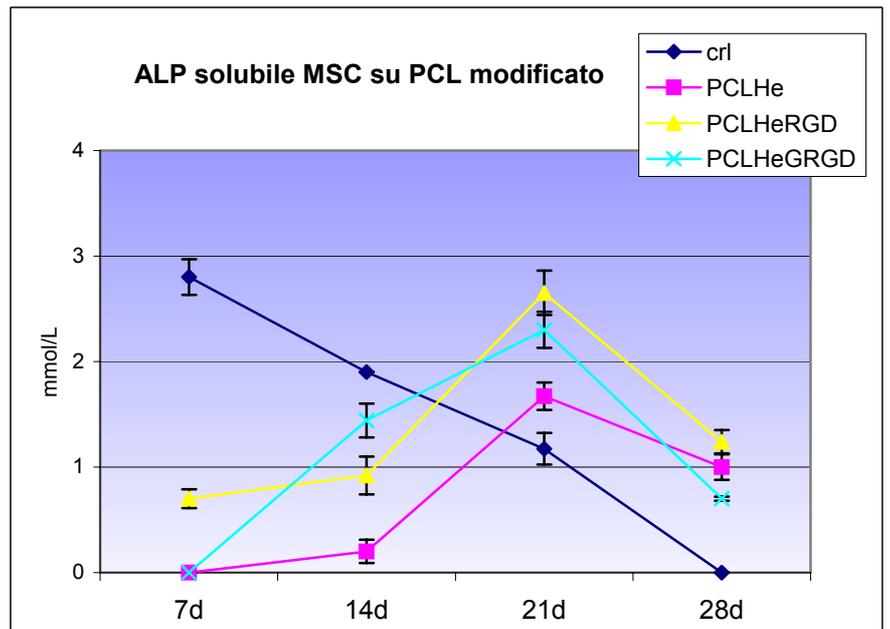
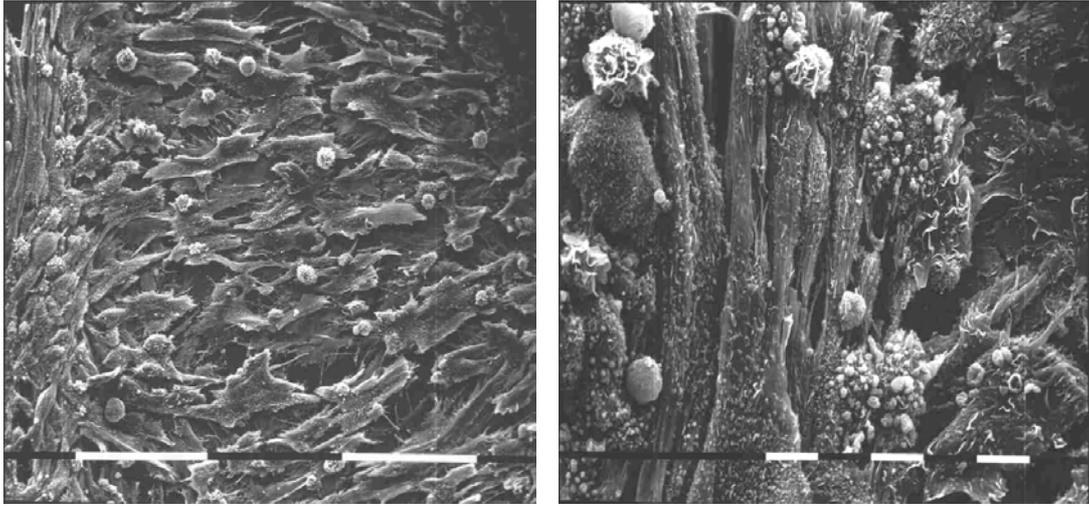


Grafico 3. Dosaggio di fosfatasi alcalina in colture di WBMC e MSC e di calcio in colture di MSC.



WBMC su TCPS



WBMC su PCL-He

WBMC su PCL-HeRGD

WBMC su PCL-HeGRGD

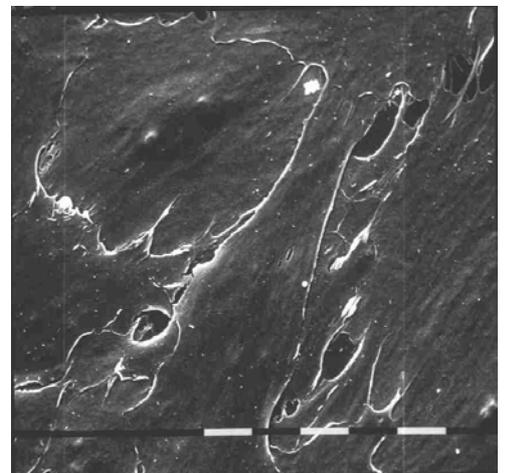
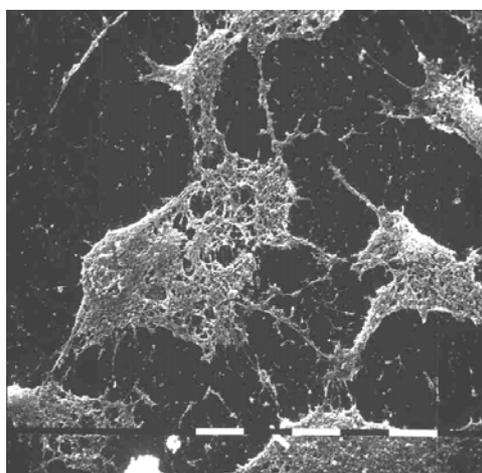
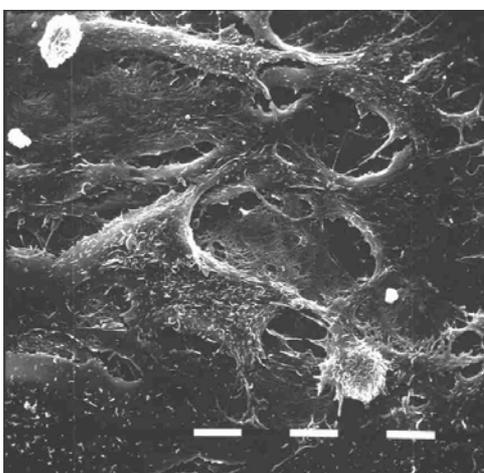
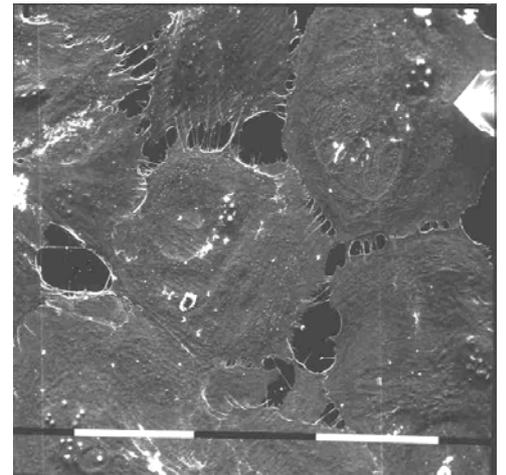
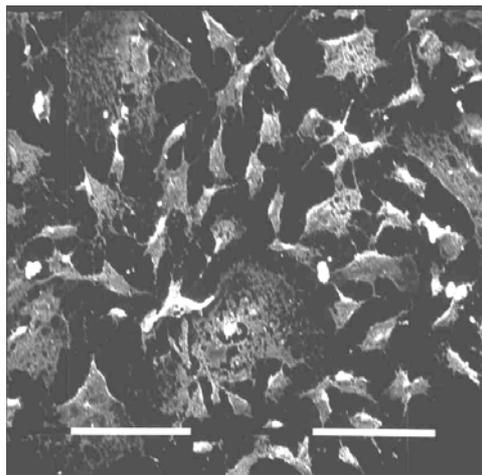
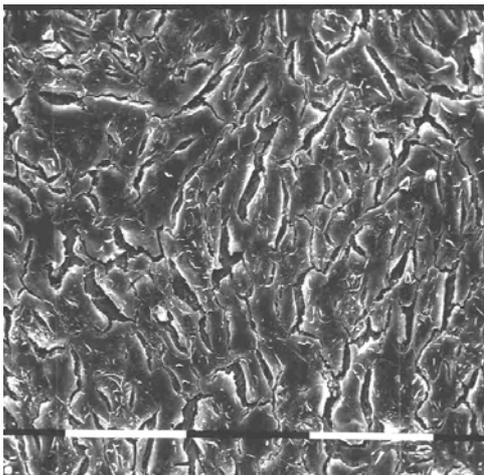


Fig 6. SEM su colture WBMC su PCL modificato a 28 giorni.

MSC su PCL-He

MSC su PCL-HeRGD

MSC su PCL-HeGRGD

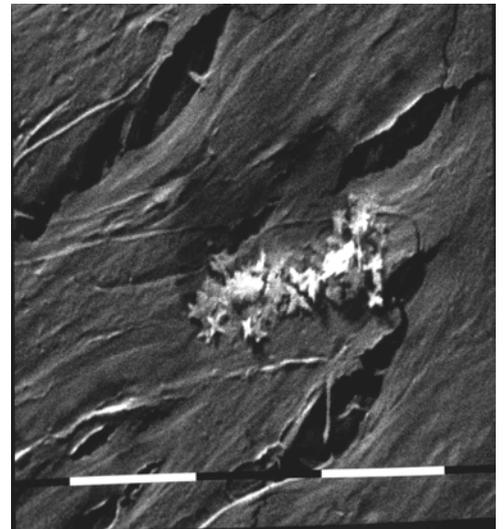
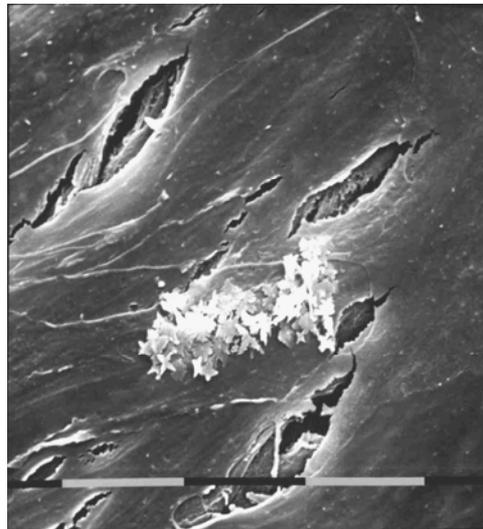
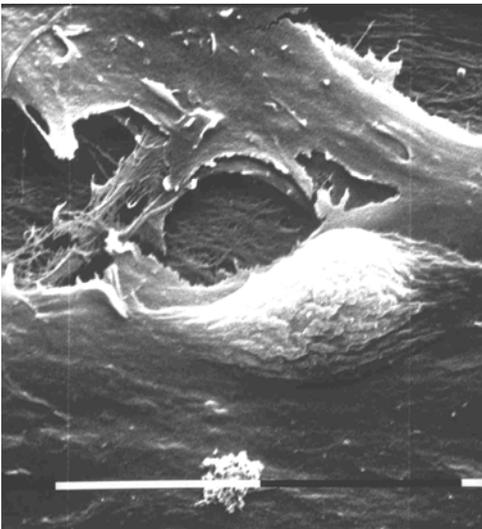
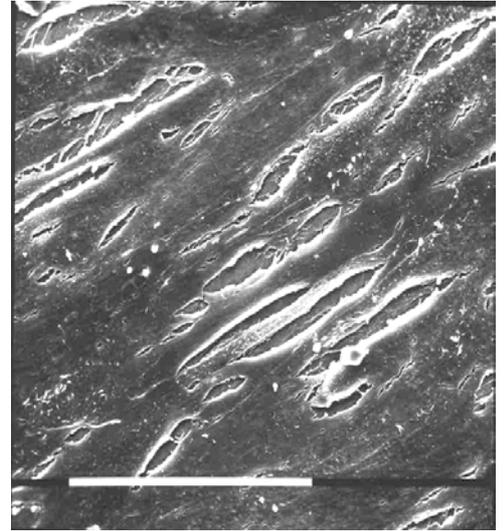
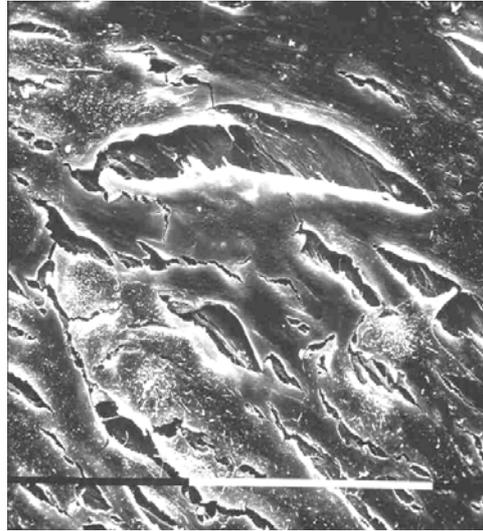
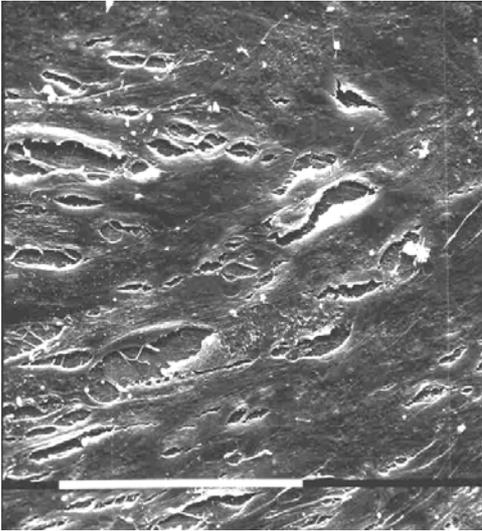


Fig 7. SEM su colture MSC su PCL modificato a 28 giorni. Nelle foto in basso sono visibili depositi minerali di calcio fosfato.

Risultati

La popolazione di cellule midollari in toto (WBMC) non ha mostrato un incremento della colonizzazione di superficie nei campioni di PCL non trattato rispetto alla popolazione selezionata in coltura. Dopo 7 giorni di coltura le due condizioni sembrano ancora equivalenti in termini di proliferazione, anche se le MSC adese al polimero iniziano a mostrare una migliore distensione. Le differenze iniziano ad emergere a 2 settimane: la marcatura con AO ha evidenziato la formazione di un multistrato confluyente di cellule MSC su PCL, mentre le colture di WBMC appaiono ancora ad uno stadio di semi-confluenza. Anche l'aggiunta di desametasone ad una parte delle colture di WBMC non sembra aver influito sulla crescita cellulare. Ciononostante sono state riscontrate similitudini, in quanto per entrambe le condizioni non è stato possibile rilevare un rilascio apprezzabile dell'enzima ALP, né la formazione di depositi minerali. Tuttavia, al SEM, si è osservata in tutte le colture la deposizione di un consistente strato di matrice extracellulare sottostante il monostrato di cellule.

Il comportamento delle due popolazioni cellulari mostra invece nette differenze, in risposta alle modificazioni di superficie del polimero. Se per le colture di WBMC si rileva un'omogeneità di crescita su tutte le superfici fino almeno a 2 settimane di coltura, le MSC mostrano rispondere positivamente ai diversi trattamenti già a tempi precoci. La proliferazione delle MSC su PCL è in generale migliore di quella delle WBMC anche a tempi di coltura prolungati. In particolare le cellule 'selezionate' sembrano essere maggiormente favorite dalla presenza di peptidi, piuttosto che da modificazioni indotte dal semplice irraggiamento. L'indagine morfologica in microscopia a fluorescenza mostra una chiara differenza già nelle primissime (24ore) interazioni di superficie con i materiali: la distensione cellulare e l'evidenza di *stress fibers*, che sono un requisito essenziale per un buon *spreading*, sono rilevabili solo nelle colture di MSC. Differenze tra le due popolazioni si notano anche nell'espressione dei *markers* del differenziamento e principalmente riguardo al dosaggio dell'enzima ALP: seppur con variazioni, alla terza settimana si rilevano alti

livelli dell'enzima in tutte le colture di MSC cresciute sui materiali, con valori maggiori per PCL-He-RGD e GRGD. Il saggio biochimico del rilascio di ione calcio nell'ambiente extracellulare, che è indice di maturazione cellulare, non permette di trarre conclusioni sulla potenzialità delle colture di deporre cristalli minerali. Tuttavia le immagini al SEM nella fase finale delle colture di MSC su PCL, indipendentemente dal trattamento, mostrano depositi simili a siti di nucleazione minerale. Nelle colture 'miste', al contrario, non si rileva un'influenza sul differenziamento da parte di 'segnali' peptidici, mentre l'irraggiamento di superficie con elio sembra l'unico dei trattamenti a poter favorire la sintesi di ALP.

Alcune strategie di ingegneria tissutale dell'osso si avvalgono dell'uso di cellule autologhe per la semina su *scaffold* riassorbibili prima dell'impianto o mirano a favorire il reclutamento da parte del supporto, di cellule dell'ospite *in situ*.

La scelta dell'utilizzo di cellule 'intere' (WBMC), cioè non 'selezionate' in coltura, per testare superfici di un biomateriale come il PCL ha voluto mimare il processo che avviene all'interfaccia scaffold/tessuto *in vivo*, in seguito all'impianto di uno scaffold polimerico. Nel caso di trapianto autologo, è noto che limitare la manipolazione di materiale biologico *ex vivo* riduce sensibilmente il rischio di infezione per il paziente. Dai risultati ottenuti sembra però che l'utilizzo di una preparazione cellulare mista, come il midollo osseo intero o la sua frazione mononucleata, per allestire un costrutto scaffold/cellule non migliori la rigenerazione tissutale. Infatti il contributo delle cellule del microambiente midollare (come monociti, macrofagi, etc..) nel fornire stimoli paracrini agli osteoprogenitori, non sembra promuoverne particolarmente il differenziamento osteogenico, almeno *in vitro*. Al contrario le cellule osteoprogenitrici selezionate mostrano una maggiore attività replicativa e sono più responsive a stimoli esterni, fisici (topografia di superficie) o chimici (segnali consenso per l'adesione), atti a favorire le prime fasi del processo differenziativo; per questo sono ritenute quelle che dirigono attivamente la rigenerazione tissutale.

La risposta dei due modelli cellulari alle modifiche del biomateriale sembra suggerire che nel *design* di superfici biomimetiche si debbano considerare a fondo le caratteristiche delle popolazioni che si troveranno ad interagire con l'impianto *in*

vivo; in questo modo, forse, si possono indirizzare ‘segnali’ mirati al giusto target cellulare e quindi migliorare le interazioni all’interfaccia impianto/tessuto.

Il tentativo di simulare *in vitro* la complessità dell’ambiente fisiologico, trova il suo limite proprio nella complessa interconnessione di fattori fisici, chimici, meccanici etc.. che caratterizzano i sistemi biologici, ma offre comunque la possibilità di creare modelli di studio da poter, in seguito, traslare *in vivo*.

In conclusione lo studio *in vitro* dell’interazione di cellule del tessuto osseo con polimeri come il PCL, ha confermato la validità di questo substrato per applicazioni di ingegneria tissutale. Tuttavia prima dell’applicazione clinica di materiali ingegnerizzati, l’efficacia del costrutto cellule/scaffold deve essere verificata *in vivo* (seconda fase dello studio).

Superfici funzionalizzate con *Self Assembled Monolayers* (SAMs)

I monostrati autoassemblanti sono strutture proteiche con grande versatilità, motivo per cui hanno suscitato notevole interesse in campo scientifico. Il monostrato è formato da sequenze peptidiche oligomeriche che hanno la capacità, in opportune soluzioni saline, di organizzarsi in strutture tridimensionali ordinate (foglietti β -sheet o strutture ad alfa-elica). Questi SAMs replicano le strutture biologiche della cellula, come le varie proteine filamentose che costituiscono la matrice extracellulare (ECM), tra cui il collagene, e forniscono quindi un substrato ben accettato dalle cellule e in grado di trasmettere segnali alle stesse. Da un punto di vista chimico, l'immersione di un sottile film d'oro (tipicamente 40 nm di spessore su un supporto di vetro o silicio) in una soluzione di alcanetiolo ($R(CH_2)_{11-18}SH$) dà origine ai SAMs. L'atomo di zolfo si adsorbe sull'oro, rilascia un atomo di idrogeno e forma un forte legame zolfo-oro. Questo processo permette la sintesi di strutture macroscopiche, cioè strutture che comprendono aree dell'ordine di centimetri quadrati di molecole ordinate (circa 5×10^{14} molecole per cm^2). Queste strutture contengono molti gruppi laterali organici (tioli) attaccati covalentemente a una struttura portante che è il film di oro. I SAMs sono quindi materiali nanostrutturati di circa 2 nm, che permettono di posizionare gruppi funzionali con precisione a livello atomico (Whitesides 2003). Data la possibilità di disegnare una specifica sequenza peptidica che acquisisca la sua struttura secondaria solo con stringenti condizioni ambientali, l'utilizzo di peptidi autoassemblanti può avere enormi potenzialità. Inoltre modifiche della sequenza peptidica possono tradursi in una variazione strutturale e/o nell'acquisizione di determinate caratteristiche chimico-fisiche da parte del monostrato, con influenze sulla bioattività del materiale sul quale è depositato. Per queste ragioni i SAMs sono studiati per l'impiego come substrati e/o come mezzo per migliorare la superficie di *scaffolds* per l'ingegneria tissutale. La valutazione della loro interazione con i sistemi biologici va, quindi, approfondita con studi in modelli sperimentali che possano saggiarne le potenzialità di impianto.

Questo studio *in vitro* è stato volto all'analisi della risposta di cellule ossee a superfici bidimensionali rivestite da un monostrato di peptidi autoassemblanti (SAMs). In una prima fase sono stati esaminati peptidi in soluzione assemblati in laboratorio prima dei saggi biologici *in vitro*; nella seconda i SAMs sono stati assemblati su superfici di titanio e successivamente saggiati in modelli cellulari *in vitro*.

Preparazione di peptidi per SAMs

Le sequenze peptidiche sono state progettate presso il Dipartimento dei Processi Chimici dell'Università di Padova, dove ne è stata curata la sintesi, la purificazione e la caratterizzazione.

I peptidi sono stati realizzati come ammidi C-terminali, con il gruppo N-terminale lasciato libero al fine di ottenere una carica netta non nulla e quindi una maggiore solubilità. Partendo dalla breve sequenza autoassemblante EAK16, già nota in letteratura come sequenza 'base' (pept1) ne sono state ottenute altre per sostituzione aminoacidica (pept2), dello spaziatore (pept5 e 6) e per inserimento del tripeptide RGD (pept7); anche la sequenza pept8, che presenta il motivo RGD, ne è un'ulteriore evoluzione ma non autoassemblante (e per questo definita *scrambled*).

Il protocollo di preparazione dei peptidi è stato eseguito secondo lo schema:

- crescita della sequenza per sintesi peptidica su fase solida con tecnica Fmoc;
- deprotezione delle catene laterali e sblocco del peptide dal supporto solido;
- purificazione in cromatografia su fase inversa e/o a scambio ionico;
- caratterizzazione delle frazioni purificate mediante: HPLC analitico su fase inversa, elettroforesi capillare e analisi spettrometrica di massa.

Per valutare chimicamente l'ottimizzazione delle sequenze modificate sono stati considerati il tipo di residuo prescelto per la sostituzione, da cui dipendono i legami ionici tra i vari foglietti β -sheet, e la percentuale di residui idrofobici alifatici e aromatici. I peptidi opportunamente purificati sono stati caratterizzati dal punto di

vista conformazionale tramite risonanza magnetica nucleare (NMR) e indagini di dicroismo circolare (DC) in acqua. L'analisi del grado di strutturazione in β -sheet e le misure delle sequenze in forma assemblata sono state condotte secondo il protocollo riportato da Zhang (1993).

Superfici per colture cellulari funzionalizzate con SAMs

I peptidi sintetizzati sono stati conservati come liofilizzati a -20°C in tubi di polipropilene (indicati sono anche il polietilene ed il vetro silanizzato) fino al momento dell'uso. Prima della solubilizzazione i contenitori sono stati riportati a temperatura ambiente, per minimizzare la condensazione di acqua sulla superficie del liofilizzato all'apertura. In teoria la maggior parte dei peptidi risultano stabili per lunghi periodi di tempo, in soluzione acquosa a pH neutro. Tuttavia, dato che la contaminazione con microrganismi o ioni metallici può causare la rottura del legame peptidico, sono state allestite aliquote di soluzione concentrata da utilizzare al bisogno.

Per la preparazione della soluzione madre i liofilizzati sono stati ricostituiti in H_2O MilliQ ad una concentrazione di 5mg/ml e le aliquote mantenute a -20°C .

Al momento dell'utilizzo la soluzione madre è stata diluita in tampone fosfato (PBS 150 mM NaCl, 10 mM Na_2PO_4 , pH 7.4) e dispensata sulla superficie di *chamberslides* per colture cellulari, a concentrazione finale di $60\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Dopo il *coating* le *chamberslides* sono state mantenute a 60°C per 4-5 ore, in modo che il materiale si assemblasse sul fondo in uno strato omogeneo.

I peptidi assemblati in laboratorio e sottoposti al saggio biologico sono stati:

Pept1: H-(Ala-Glu-Ala-Glu-Ala-Lys-Ala-Lys)₂-NH₂

Pept7: H-Arg-Gly-Asp (Ala-Glu-Ala-Glu-Ala-Lys-Ala-Lys)₂-NH₂

Pept8: H-Arg-Gly-Asp-Ala-Ala-Lys-Ala-Glu-Ala-Glu-Ala-Ala-Glu-Lys-Ala-Lys-Ala-Glu-Lys-NH₂

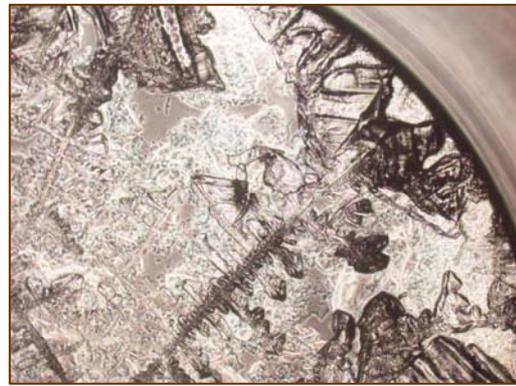
RGD: Arg-Gly-Asp (sequenza di controllo)

La stratificazione ‘manuale’ dei monostrati in laboratorio si è rivelata difficoltosa. Sono stati fatti diversi tentativi, deponendo le soluzioni peptidiche su vari substrati per colture cellulari quali vetro, Permanox[®], plastica per colture cellulari (TCPS): solo quest’ultimo ha mostrato di essere adatto a sostenere una buona strutturazione dei materiali.

La verifica del corretto assemblaggio dello strato peptidico, dove possibile, è stata effettuata osservando la superficie del pozzetto in microscopia ottica. Il monostrato pept1 e 7, se correttamente ottenuto, mostra una struttura ordinata (Fig1 a-b); per il pept8, data la natura disordinata, non è stato possibile rilevare alcuna struttura.



Fig1. a. pept1(4x)



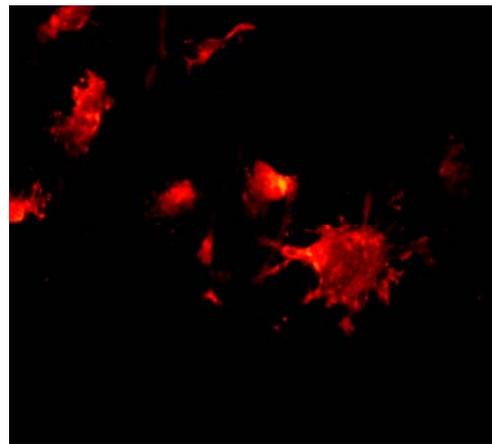
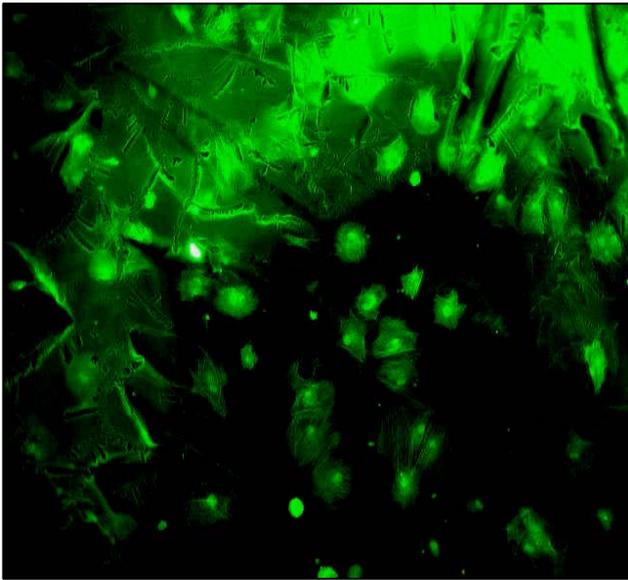
b. pept7 (4x)

Saggio biologico con osteoblasti umani

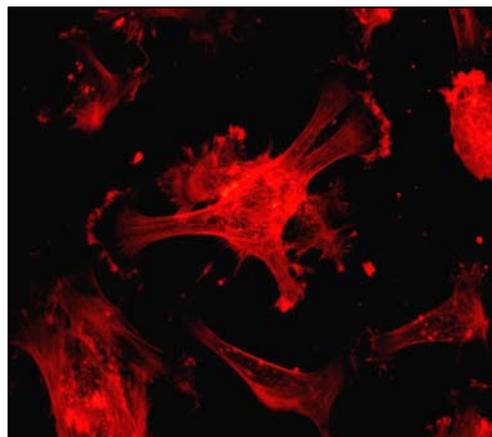
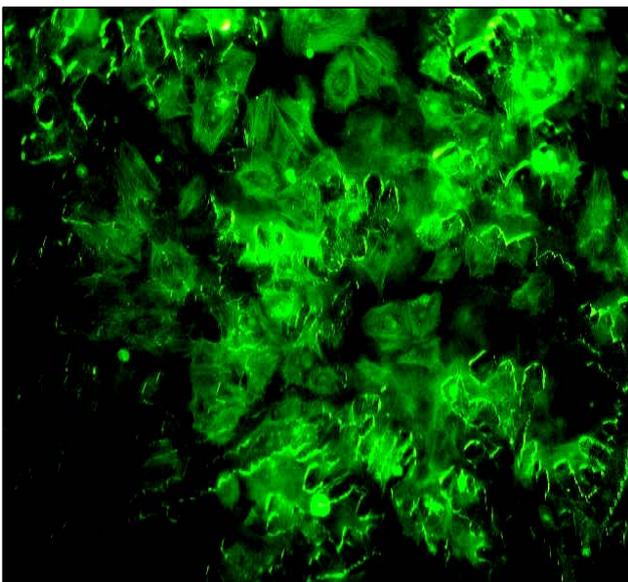
Prima della semina delle cellule, i materiali stratificati sono stati sterilizzati in 1% antibiotico:antimicotico per due ore, cui sono seguiti due lavaggi con H₂O bidistillata. Osteoblasti umani (HOB), mantenuti in coltura in terreno D-MEM (Sigma) completo, ed espansi per ottenere un numero di cellule adeguato, sono stati staccati con tripsina-EDTA, contati in camera Bürker e seminati alla densità di 10³ cellule sui monostrati stratificati nei pozzetti di coltura. Sono stati seminati anche pozzetti precedentemente rivestiti con fibronectina (FN, Chemicon International), come controllo positivo per l’adesione cellulare. Il *coating* è stato realizzato con una soluzione di FN in fisiologica (concentrazione finale 10µg/cm²), per 5-20 minuti a temperatura ambiente. Come controllo sono state seminate cellule su polistirene per colture cellulari (TCPS).

L'adesione precoce delle cellule ai materiali è stata verificata a 4 ore dalla semina in microscopia a fluorescenza, mediante marcatura dell'actina del citoscheletro con falloidina-FITC e TRITC; a tempi di coltura più prolungati (48 ore) la stessa colorazione ha permesso l'analisi della morfologia e della distensione cellulare.

Fig 2. (a-i) Morfologia a 4 ore. Marcatura del citoscheletro falloidina-FITC (verde) e TRITC (rosso).

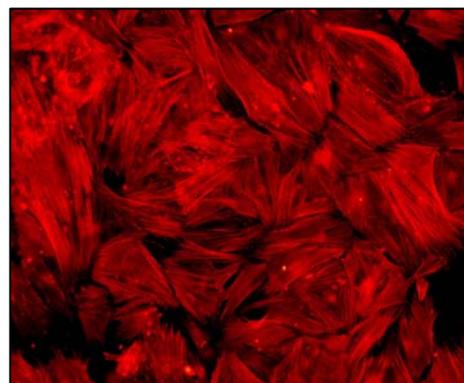


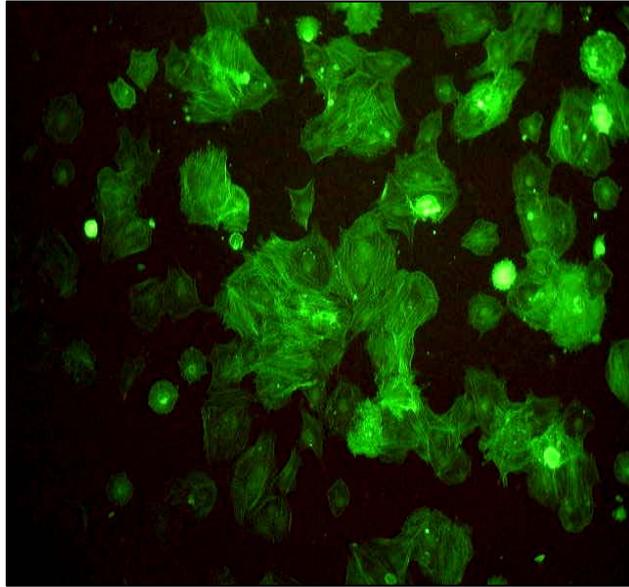
a. pept1 (10x), b. pept1 (20x)



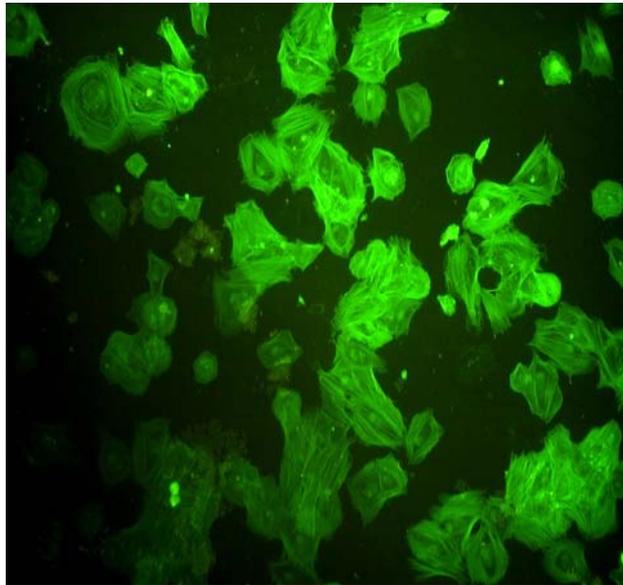
c. pept7 (10x), d. pept7 (20x)

e. FN (20x)



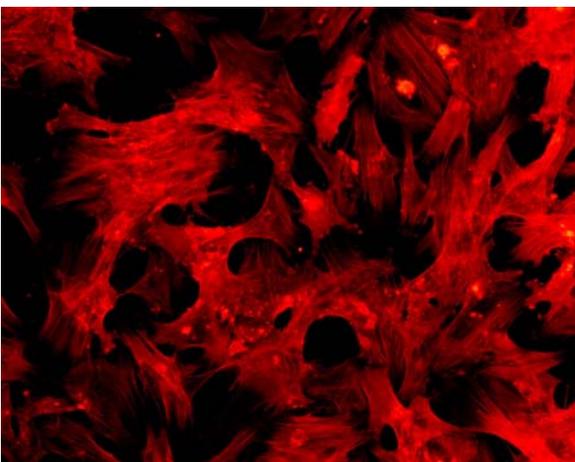


f. pept8 (10x)

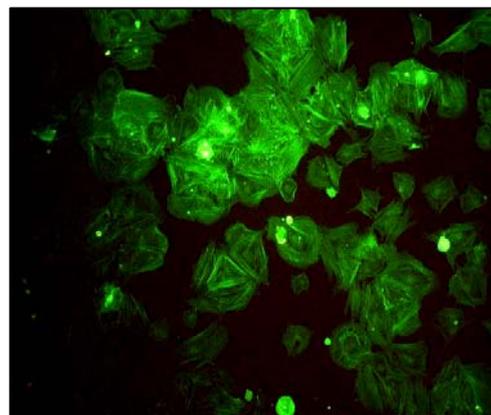


g. RGD (10x)

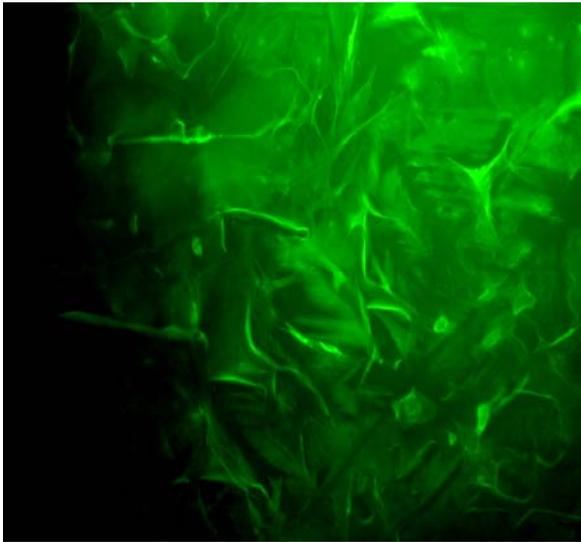
h. CTR (20x)



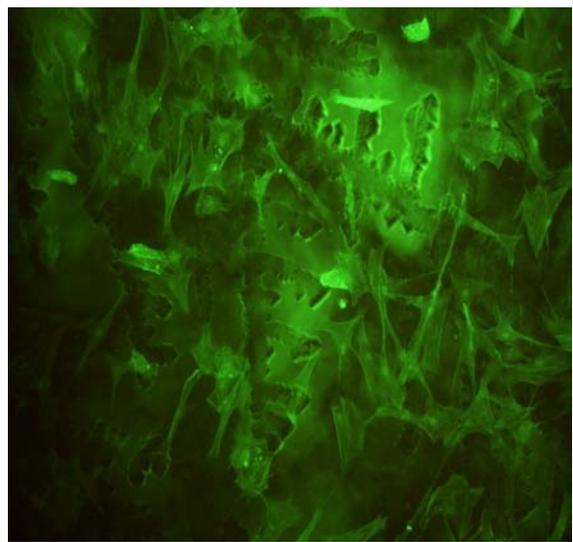
i. CTR (10x)



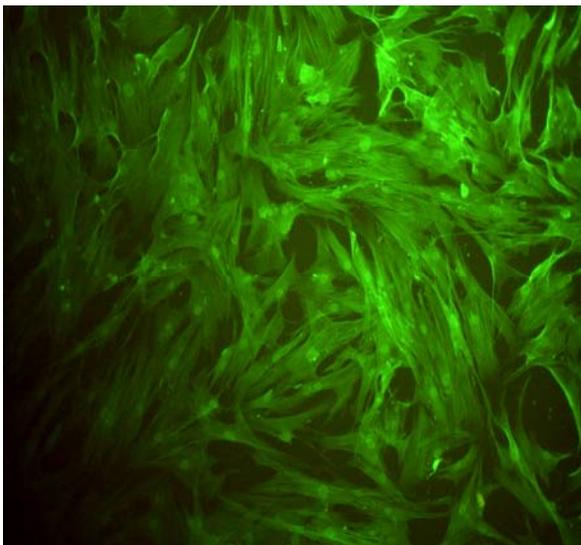
a. pept1 (10x)



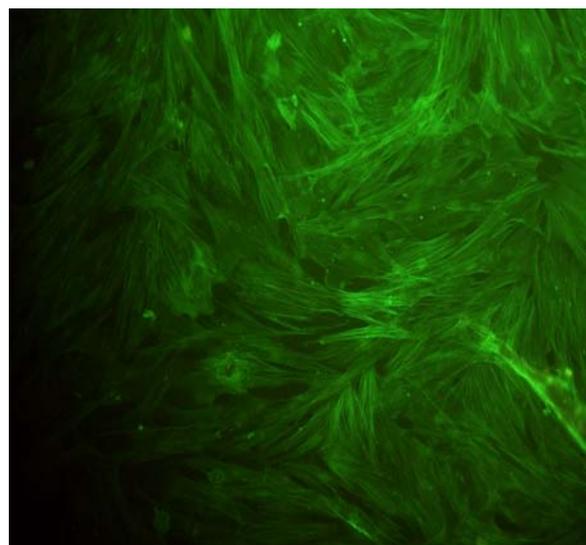
b. pept7 (10x)



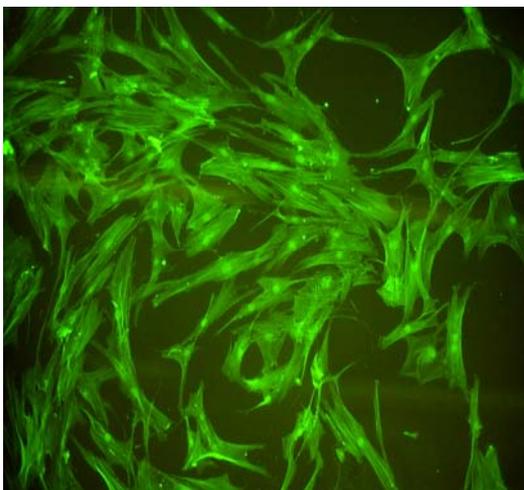
c. pept 8 (10x)



d. RGD (10x)



e. CTR (10x)



f. FN (10x)

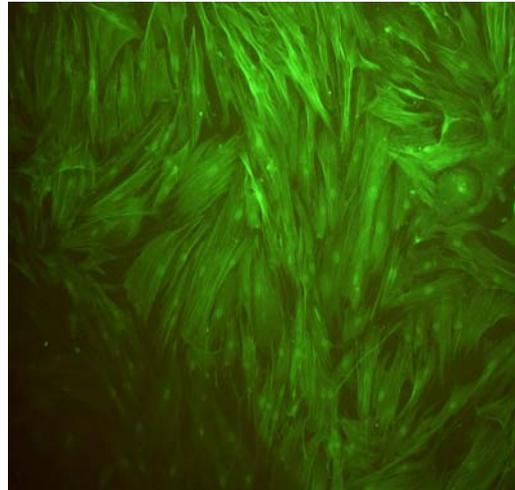


Fig 3. (a- f) Morfologia a 48 ore. Marcatura dell'actina citoscheletrica con falloidina-FITC

Risultati

L'osservazione al microscopio a fluorescenza rivela come a 4 ore gli osteoblasti seminati su pept1 abbiano una morfologia non uniforme, tondeggiante in alcune aree e più allungato in altre. La densità cellulare su questo materiale appare nettamente inferiore a quella rilevata sugli altri dove le cellule sono più numerose e distese, in particolare su pept8 e su RGD. Le cellule coltivate sul substrato pept7 mostrano tentativi di distensione e l'accenno di pseudo-lamellipodi (Fig 2b). Il quadro migliore rimane quello presentato dalla coltura di controllo su fibronectina, con cellule grandi, poligonali, e citoscheletro visibilmente ben organizzato. A 48 ore gli HOB mostrano in tutte le condizioni una morfologia cellulare allungata, di tipo fibroblastico e uno *spreading* nettamente superiore. Si mantengono le stesse differenze fra i materiali osservate in precedenza, anche se la colorazione aspecifica del monostrato pept1 e 7 con il fluorocromo FITC ha reso difficoltosa l'osservazione delle cellule. I risultati migliori sono nuovamente quelli ottenuti dalle colture su pept8 e RGD, dove le cellule hanno proliferato e colonizzato quasi tutta la superficie a disposizione, e mostrano un aspetto molto simile a quello osservato sul controllo fibronectina.

Per l'assemblaggio *in vitro* dei monostrati peptidici sono state saggiate in laboratorio diverse superfici per colture cellulari quali vetro, Permanox[®] e polistirene (TCPS). La sperimentazione di differenti substrati è stata necessaria per verificare se la natura della superficie potesse influenzare il processo di assemblaggio e quindi la struttura finale dei SAMs. In effetti è stato osservato che il *coating* su vetro genera strati non omogenei, rendendo visibile il rivestimento solo in alcune aree del pozzetto; anche il Permanox[®] si è rivelato un materiale non particolarmente consono ad una copertura di superficie uniforme. Il TCPS, al contrario, si è rivelato il supporto più adatto a generare un monostrato peptidico ordinato, con una struttura macroscopica conforme ai parametri di riferimento.

Questi primi risultati, seppur preliminari, rivelano che sequenze peptidiche autoassemblanti diverse possono modulare adesione e proliferazione di osteoblasti in coltura *in vitro*. La sequenza capostipite pept1 ha mostrato di non favorire

particolarmente l'attacco e la distensione cellulare, specialmente a tempi precoci, ai quali si osservano poche cellule adese e con morfologia irregolare. L'aggiunta del peptide RGD alla catena proteica base mostra, già ad una prima valutazione qualitativa, un'influenza positiva sulla morfologia cellulare. Cellule mantenute su monostrati RGD-*added* mostrano, fin dalle prime fasi, distensione del citoscheletro e l'evidenza di *stress fibers*, segni tipici dell'adesione a substrati ottimali come la fibronectina. Il tripeptide RGD si conferma avere un ruolo di elezione nel mediare le fasi precoci di adesione delle cellule ossee, e quindi può essere utilizzato per migliorare le *performances* biologiche delle sequenze che si organizzano in monostrati.

Inoltre da questi primi esperimenti condotti sui monostrati peptidici da assemblare 'manualmente', è emerso quanto sia determinante la superficie di deposizione del materiale e come da questa ne dipenda la corretta strutturazione. La formazione di uno strato ordinato di peptidi è, infatti, un prerequisito essenziale per l'acquisizione della struttura necessaria allo svolgimento della funzione per cui è stata progettata. È stato già riportato che variazioni della sequenza proteica di riferimento, possono mutare l'attività biologica dei SAMs. Modifiche apportate alla catena peptidica possono generare influenze sulla sua conformazione, in termini di composizione della struttura secondaria (*β-sheet*, *β-turn*, *α-elica*) e di organizzazione (ordinata, non ordinata) delle componenti idrofobiche e idrofiliche. È pertanto fondamentale indagare a fondo (prima *in vitro*) quali condizioni ambientali e accorgimenti tecnici siano necessari perché questi sofisticati materiali possano 'esprimere' pienamente le proprie funzioni.

Superfici di titanio funzionalizzate con SAMs

E' già stato sottolineato che i monostrati autoassemblanti consentono la preparazione di superfici che espongono gruppi funzionali diversi, allo scopo di influenzare l'adesione cellulare. L'utilizzo dei SAMs per aumentare la bioattività superficiale di materiali per l'ingegneria tissutale può essere una strategia biomimetica con grandi potenzialità. Biomateriali come il titanio, noto in clinica ortopedica per la singolare resistenza ma anche per la buona compatibilità biologica, possono migliorare ulteriormente le loro proprietà di osteointegrazione favorendo, come già detto, le fasi precoci di interazione con i tessuti ospiti. (Variola et al., 2008)

I campioni di titanio funzionalizzati con SAMs (sintesi secondo il protocollo di preparazione SAMs, vedi sopra) sono stati preparati presso il Dipartimento di Fisica dell'Università di Roma Tre, con dimensioni tali da poter essere inseriti nelle piastre di coltura.

Una sospensione di titanio è stata depositata per evaporazione su wafer di silicio (spessore di 2000 Å): indagini in spettroscopia XPS hanno dimostrato che la superficie così ottenuta risulta totalmente ossidata a TiO₂ (titanio grado 2) e rivestita da uno strato di gruppi ossidrilici (Ti-OH). Questi gruppi sono probabilmente i responsabili della successiva adesione della sequenza peptidica a TiO₂.

La funzionalizzazione di superficie con SAMs è stata condotta secondo il protocollo (Schmidt et al., 2001):

- incubazione dei substrati di TiO₂ in una soluzione 1 mM del peptide (NaCl 10 mM, HCl fino a pH 4) per circa 16 ore;
- lavaggio per tre volte con soluzione NaCl 10 mM, una con H₂O bidistillata;
- asciugatura sotto vuoto.

Sono stati sottoposti al saggio biologico 4 tipi di peptidi: la sequenza base pept1 e le varianti pept2, pept5 e pept6, derivate per sostituzione di residui aminoacidici in

posizioni diverse come riportato sotto. Come controllo è stata usata una superficie di TiO₂ senza peptidi adesi.

Pept1: H-(Ala-Glu-Ala-Glu-Ala-Lys-Ala-Lys)₂-NH₂

Pept2: H-(Ala-Asp-Ala-Asp-Ala-Lys-Ala-Lys)₂-NH₂

Pept5: H-(Abu-Glu-Abu-Glu-Abu-Lys-Abu-Lys)₂-NH₂

Pept6: H-(Tyr-Glu-Tyr-Glu-Tyr-Lys-Tyr-Lys)₂-NH₂

Saggi biologici con cellule stromali di midollo su superfici TiO₂-peptX

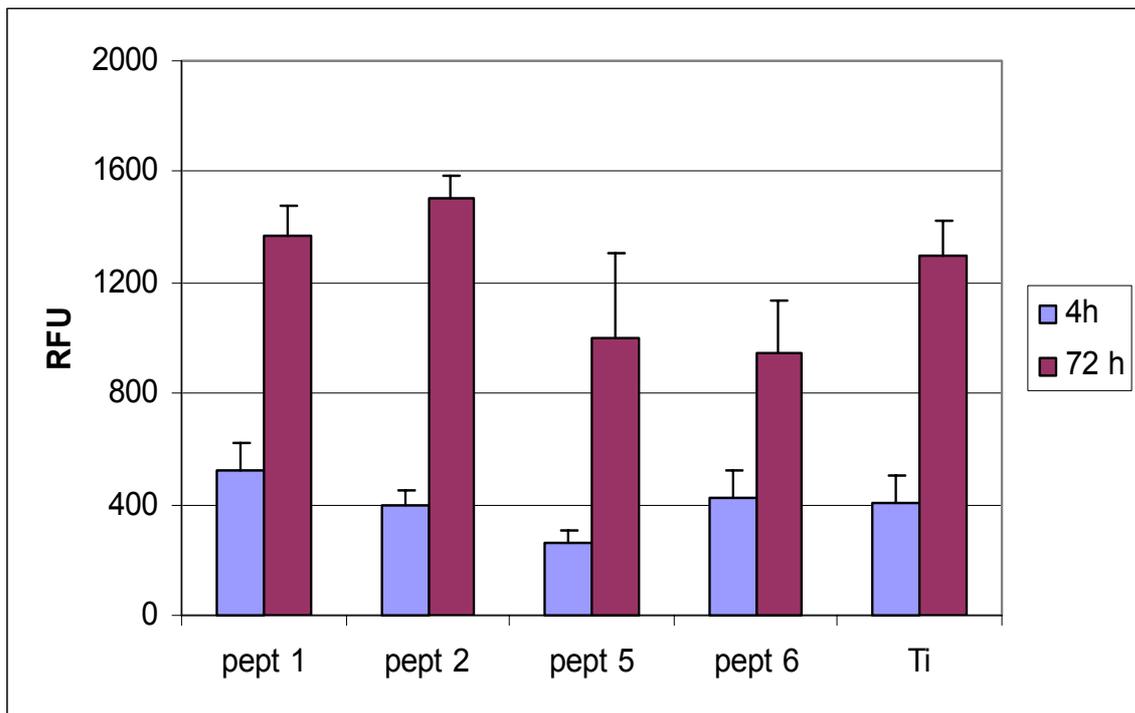
Prima della semina tutti i campioni sono stati sterilizzati con etanolo al 70% per 10 minuti, poi lavati in acqua bidistillata e sottoposti a raggi UV per 10 minuti.

Sulle superfici dei materiali non è stato effettuato alcun trattamento di pre-condizionamento con terreno o siero, allo scopo di consentire l'interazione diretta tra gruppi chimici esposti dai peptidi e superficie cellulare.

Per il saggi biologici sono state utilizzate cellule stromali di midollo osseo (MSC). Le MSC sono state prima espanse *in vitro* per ottenere un numero di cellule elevato, e poi seminate in medium osteogenico a densità prefissata (1×10^4 cells/cm²) in un volume di 30µl, sulle superfici con i diversi peptidi (ca. 1 cm²).

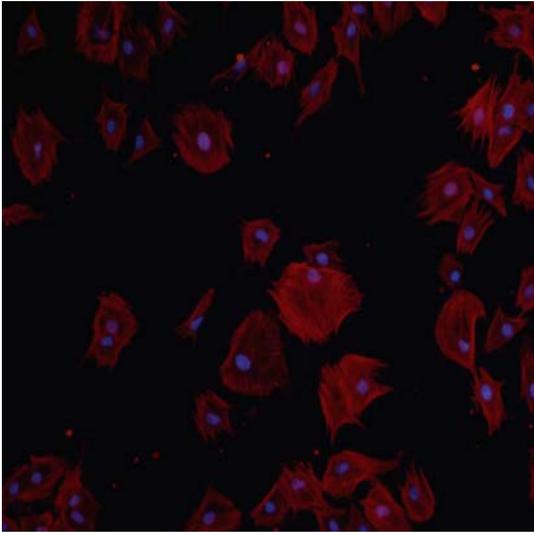
La fase di adesione (precoce) delle cellule ai peptidi è stata verificata a 4 ore; mentre la successiva proliferazione a 72 ore dalla semina.

Il test biochimico dell'Alamar blu è stato usato ad entrambi i tempi per monitorare la vitalità cellulare. Agli stessi tempi le cellule sono state marcate con fluorocromi: mediante colorazione dei nuclei con Hoechst 33258 è stato misurato il numero di cellule adese alla superficie, mentre colorando il citoscheletro con falloidina rodaminata e utilizzando l'analisi di immagine è stata quantificata la distensione delle MSC.

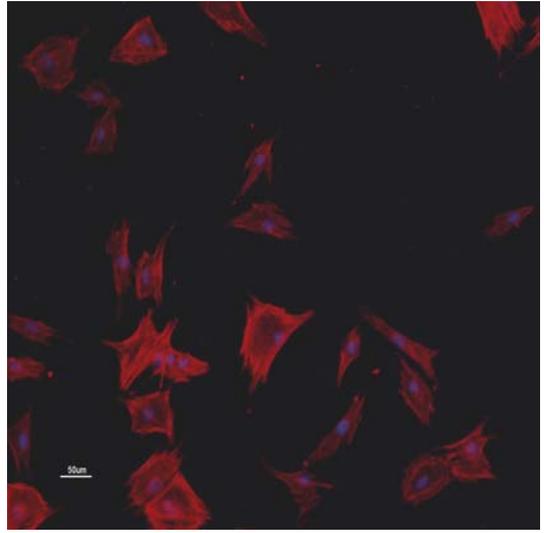


Grafco 1. Vitalità delle MSC a 4 e 72 ore.

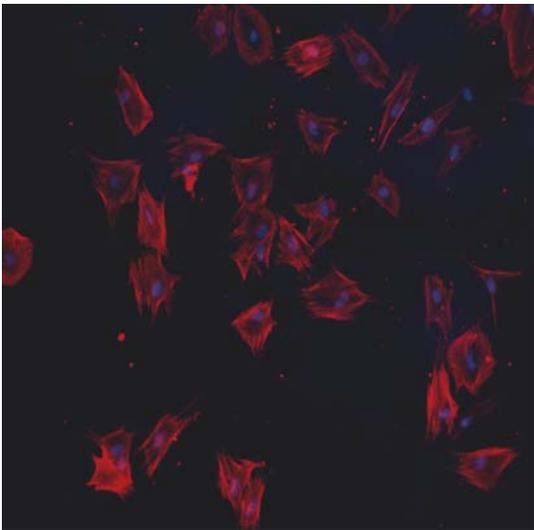
Alamar test (RFU=Relative Fluorescence Units; n=8)



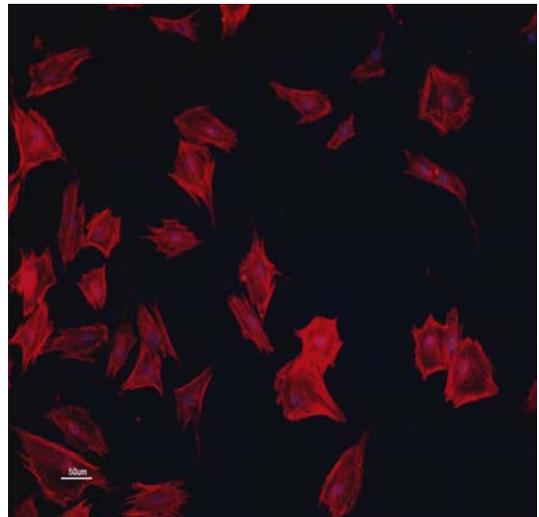
a. pept1 (10x)



c. pept5 (10x)



b. pept2 (10x)



d. pept6 (10x)

Fig 4. (a-d) Morfologia a 4 ore.
Nucleo colorato con Hoechst 33258 (blu) e citoscheletro con falloidina-TRITC (rosso).

Risultati

Come si può vedere dai valori del test di Alamar blue, le MSC a 4 ore dalla semina sono vitali su tutti i campioni. In particolare, la superficie con pept1 mostra l'adesione di un numero di cellule maggiore rispetto alle altre, anche se la differenza non è significativa. A 72 ore, a seguito della proliferazione, sono le superfici pept1 e pept2 a mostrare il maggior numero di cellule vitali, con valori molto simili a quelli della superficie di titanio non trattato, considerato come controllo. La misura della distensione cellulare eseguita con analisi d'immagine mostra un quadro analogo ai risultati ottenuti con il test biochimico e una crescente colonizzazione delle superfici, sia rivestite con peptidi che non trattate (Ti ctr), passando dalle 4 alle 72 ore.

In conclusione le MSC umane aderiscono in buon numero ai peptidi autoassemblati su titanio, senza necessità di pre-condizionamento con medium o siero, e quindi di mediazione di molecole proteiche. Inoltre, le MSC sono in grado di proliferare e di raggiungere in alcune zone una disposizione semi-confluente, a tempi più prolungati di coltura.

I risultati di questo studio mostrano quindi che anche i peptidi 1, 2, 5 e 6 sono in grado di funzionare come substrati per l'adesione e proliferazione dei precursori osteogenetici umani, e quindi possono essere sviluppati come supporti osteoconduttivi. Di conseguenza, una volta verificata questa attività fondamentale per l'integrazione di superfici biomimetiche nei tessuti, i peptidi autoassemblanti possono essere modulati mediante sostituzioni aminoacidiche 'mirate' così da acquisire ulteriori proprietà positive per il processo di rigenerazione dell'osso.

Inoltre, dall'esperienza acquisita si può confermare che la sperimentazione *in vitro* di superfici funzionalizzate deve essere preceduta da accurate analisi di caratterizzazione del monostrato, in modo che sia verificata la struttura acquisita e garantita la ripetibilità dei saggi biologici.

Superfici di titanio funzionalizzate con peptidi adesivi

La modificazione di superficie dei biomateriali usati come scaffolds in ingegneria tissutale è, come riportato in precedenza, un metodo promettente per incrementare la multifunzionalità e le proprietà biologiche del sostituto osseo. I trattamenti biomimetici di superficie mediante l'attacco di segnali biomolecolari, come le sequenze di adesione delle proteine della matrice extracellulare, aumentano la bioattività del materiale e l'affinità per cellule specifiche.

In questo studio sono state sottoposte ad indagine superfici di titanio funzionalizzato in modo covalente con i peptidi HVP (*Human Vitronectin Peptide*) e la sequenza RGD. Cellule stromali di midollo osseo sono state usate come modello *in vitro* per verificare se a seguito di tale funzionalizzazione risultava aumentata l'adesione cellulare alla superficie, e per valutare l'effetto di questa strategia biomimetica sulla proliferazione e sul differenziamento cellulare in senso osteoblastico.

Preparazione delle superfici di titanio con peptidi

I campioni di titanio sono stati preparati presso il Dipartimento dei Processi Chimici dell'Università di Padova.

Una volta ottenuti nella forma di dischetti (Ti grado 2, diametro 1,5cm e altezza 2,5 mm), sono stati sottoposti a sabbiatura (corundum 350 μm per 10 secondi), a cui ha fatto seguito un trattamento acido con 7% HCl e 27% H₂SO₄, per 9 minuti al punto di ebollizione della miscela e 60 minuti a temperatura ambiente. Al termine della procedura i campioni sono stati puliti con lavaggi in bagno ad ultrasuoni. Tale trattamento permette di ottenere una superficie analoga a quella delle viti implantari commerciali.

Per la funzionalizzazione i dischetti di titanio (Ti) sono stati sottoposti ai trattamenti che seguono.

- *Ossidazione*: in soluzione $\text{HCl}:\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O} = 1:1:3$ all'ebollizione, 6 minuti; 3 lavaggi in H_2O MilliQ; 3 lavaggi in H_2O MilliQ sonicando; 3 lavaggi in etanolo sonicando; asciugatura sottovuoto.

I campioni così trattati sono indicati con **Ox** (superficie di controllo).

- *Trattamento con $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$* : i campioni Ox sono stati trattati con soluzione $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2 = 1:1$, 2 ore, temperatura ambiente in agitazione; 3 lavaggi in H_2O MilliQ; 3 lavaggi in H_2O MilliQ sonicando; 3 lavaggi in etanolo e toluene; asciugatura sottovuoto.
- *Silanizzazione*: i campioni trattati con soluzione $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ sono stati fatti reagire in soluzione 10% 3-amminopropiltri-etossisilano in toluene, 4 ore a riflusso; 3 lavaggi in toluene; asciugatura sottovuoto.

I campioni così trattati sono indicati con **Sil** (superficie di controllo).

- *Funzionalizzazione aspecifica*: i campioni Sil sono stati trattati con aldeide glutarica (soluzione 1% in tampone fosfato 0,1 M, pH7), per 4 ore a temperatura ambiente; 3 lavaggi in tampone; 3 lavaggi in etanolo; disseccamento sottovuoto. Quindi si trattano con una soluzione 1mg/ml di peptide deprotetto (HVP o sequenza RGD) per 1 notte; 3 lavaggi in tampone; 3 lavaggi in etanolo; 3 lavaggi in H_2O MilliQ, asciugatura sottovuoto.

I campioni così trattati sono indicati con **HVP-Asp** o **RGD-Asp**.

- *Funzionalizzazione specifica*: i campioni Sil sono stati trattati con anidride glutarica (2 mg) e DIEA (1 ml) in NMP (20 ml), per 4 ore a temperatura ambiente; 3 lavaggi in NMP; 3 lavaggi in etanolo; disseccamento sottovuoto. Quindi si trattano con una soluzione 1 mM di peptide (HVP o sequenza RGD, ammido terminale recante i protettori alle catene laterali) in NMP, 0,5 M HBTU/HOBt in DMF e DIEA per 1 notte; 3 lavaggi in NMP; 3 lavaggi in etanolo, asciugatura sottovuoto.

I campioni così trattati sono indicati con **HVP-Sp** o **RGD-Sp**.

- *Funzionalizzazione via arilazide (N₃):* i campioni Ox sono stati trattati con soluzione 1mg/ml in H₂O MilliQ, del peptide HVP recante il marcatore per fotoaffinità; asciugatura sottovuoto; irradiazione a 366, a distanza di 1 cm per 1 ora, temperatura ambiente; 3 lavaggi in H₂O MilliQ; 3 lavaggi in acetonitrile; asciugatura sottovuoto.

I campioni così ottenuti sono indicati con **HVP-N₃ 1:1**. Analogamente altri dischetti sono stati trattati con soluzioni più diluite di peptide recante il marcatore di fotoaffinità, e indicati con **HVP-N₃ 1:10**, **HVP-N₃ 1:100**, **HVP-N₃ 1:1000**.

Le superfici sottoposte solo a silanizzazione (Sil) e ossidazione (Ox) rappresentano il controllo del tipo di funzionalizzazione apportata alla superficie, essendo il substrato sopra al quale sono stati coniugati i peptidi. La superficie silanizzata è stata la base per la funzionalizzazione specifica ed aspecifica, mentre la superficie ossidata è stata quella poi sottoposta a funzionalizzazione via arilazide.

I peptidi adesivi sono stati ancorati alla superficie di titanio in modo covalente. HVP riproduce un nona-peptide della vitronectina umana, che promuove l'adesione degli osteoblasti in modo specifico, mentre RGD, preparato come sequenza lineare di 25 residui contenente tre motivi RGD, che viene riconosciuto dalle integrine di membrana.

Saggi biologici con cellule stromali di midollo su superfici Ti- funzionalizzato

Prima della semina tutti i campioni sono stati sterilizzati con una soluzione all'1% di antibiotico:antimicotico per 2 ore, e poi lavati in acqua bidistillata. Sulla superficie dei materiali non è stato effettuato alcun trattamento di pre-condizionamento con

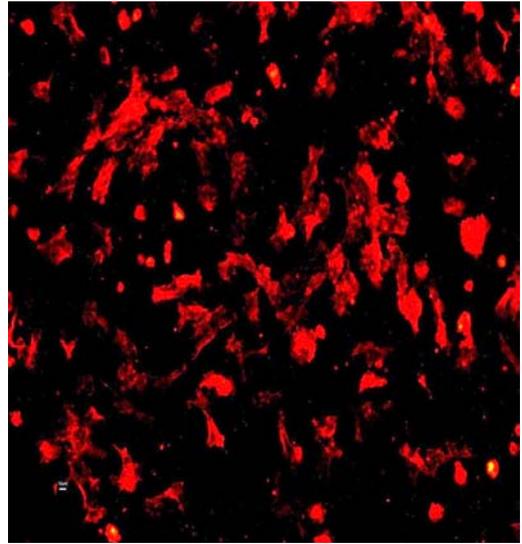
terreno contenente siero, allo scopo di consentire l'interazione diretta tra i peptidi e la superficie cellulare.

Le cellule stromali umane utilizzate nello studio *in vitro* sono state ottenute e processate secondo il protocollo di isolamento MSC da midollo.

La popolazione è stata espansa in coltura in terreno completo, al raggiungimento della confluenza le MSC sono state staccate con tripsina-EDTA e contate in camera di Burker. Le cellule sono state seminate ad una densità di 3×10^4 cellule per campione, depositando una goccia (30 μ l) di sospensione cellulare sulla superficie funzionalizzata e lasciate aderire per due ore. Con le stesse modalità sono stati allestiti i controlli su polistirene. La semina a goccia è stata effettuata per tutti i campioni in terreno non addizionato di siero (*serum free*), al fine di osservare un'effetto delle superfici funzionalizzate sull'adesione non mediato da proteine. Allo scadere delle due ore necessarie per l'adesione alle superfici è stato aggiunto ad una metà delle colture il terreno *serum free* e all'altra terreno completo (controllo di coltura standard).

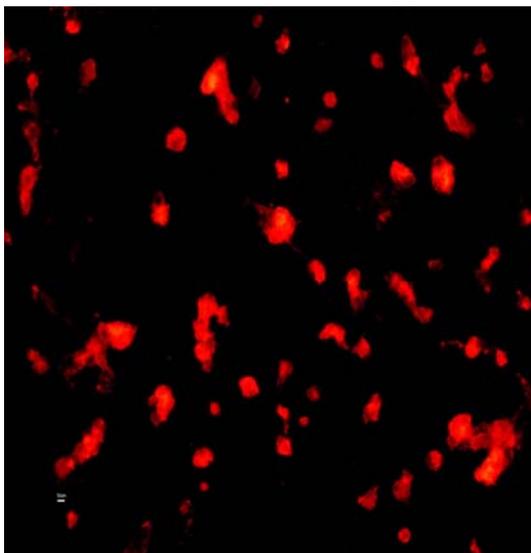
A sei ore dalla semina la vitalità cellulare è stata misurata con test di Alamar blue; l'adesione è stata saggiata in microscopia a fluorescenza osservando la distensione del citoscheletro, colorato con falloidina rodaminata, e la formazione di contatti focali marcati con anticorpo anti-vinculina. A 72 ore di coltura è stato valutato lo *spreading* delle MSC sulle superfici colorando il nucleo cellulare con il fluorocromo Hoechst 33258 ed il citoscheletro con falloidina-TRITC.

Le colture sono quindi state mantenute in mezzo completo fino a due settimane, monitorando vitalità e l'espressione di alcuni *markers* del differenziamento cellulare.

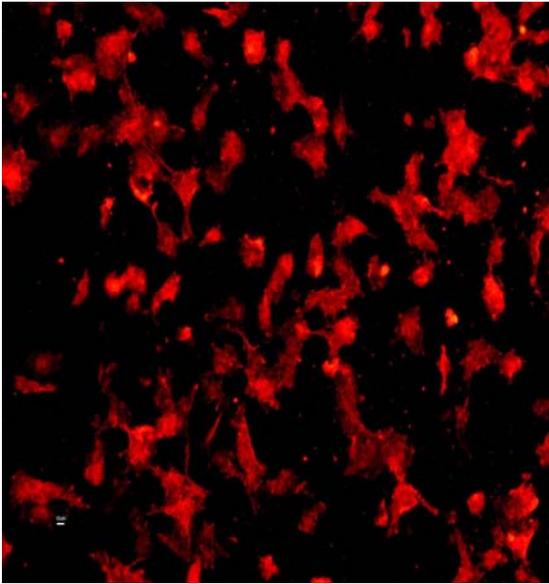


b. Ti Sil CTR (10x)

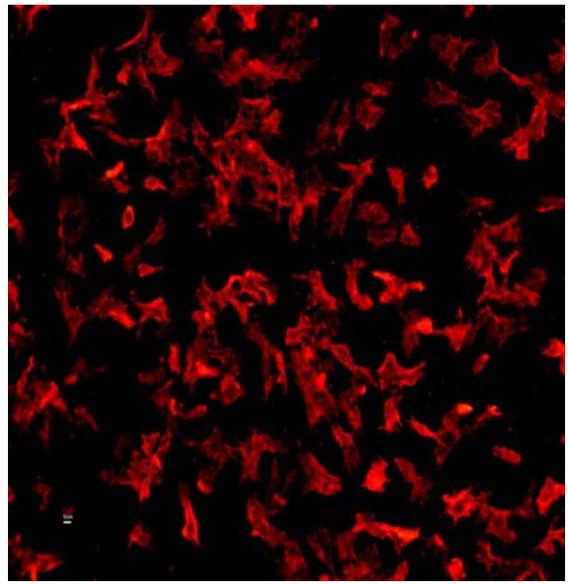
Fig 1. (a-h) Morfologia Fig 1. (a-h) Morfologia a 6 ore. Marcatura del citoscheletro con fallodina-TRITC



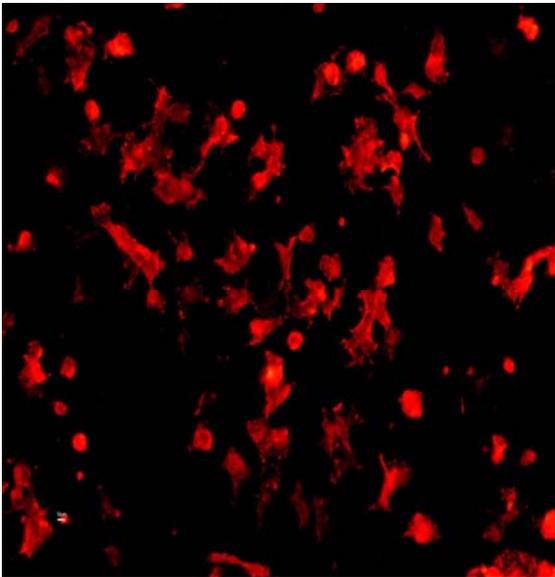
a. Ti Ox CTR (10x)



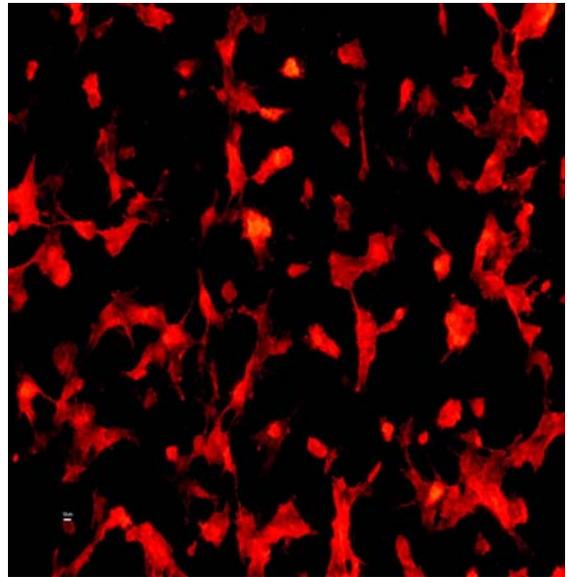
c. HVP- Asp (10x)



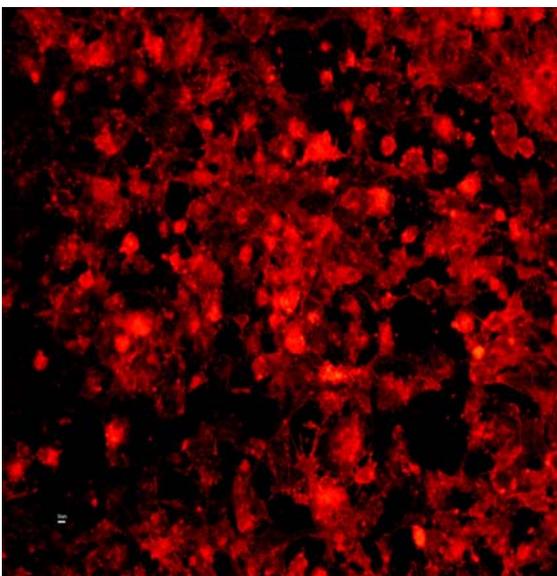
d. HVP- Sp (10x)



e. HVP- 1:1 (10x)



f. HVP- 1:1000 (10x)



g. RGD- Asp (10x)



h. RGD- Sp (10x)

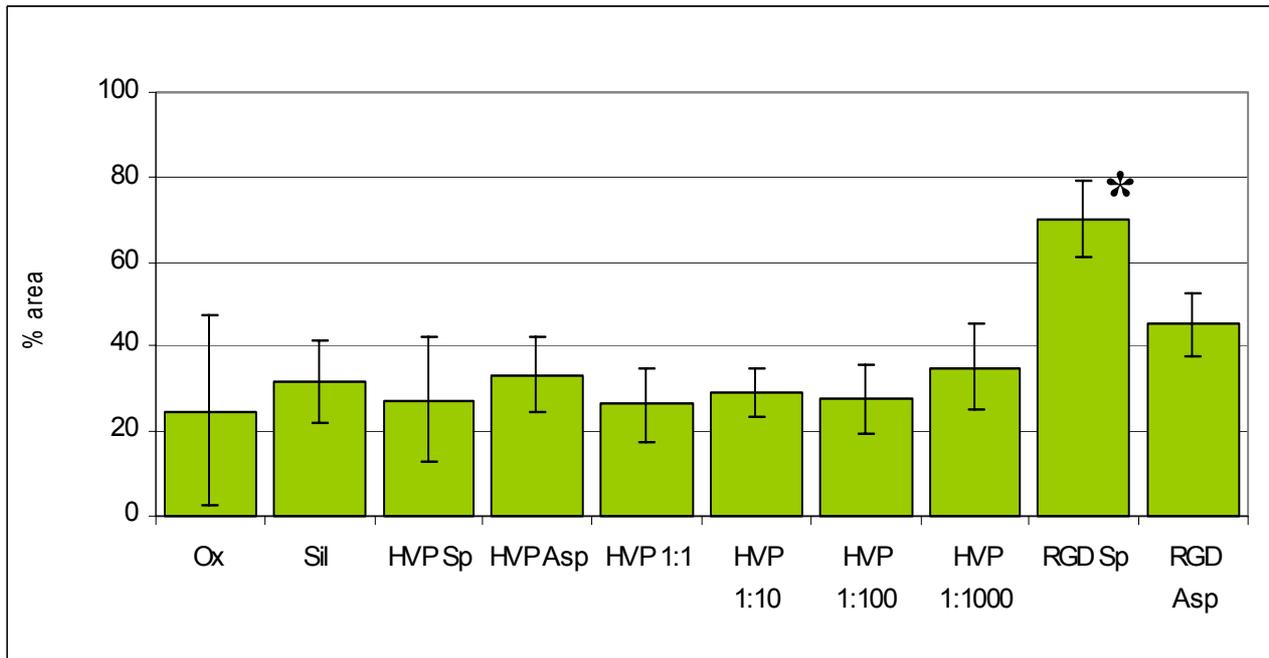


Grafico 1. Adesione MSC 6 ore (Analisi d'immagine software Lucia measurement)

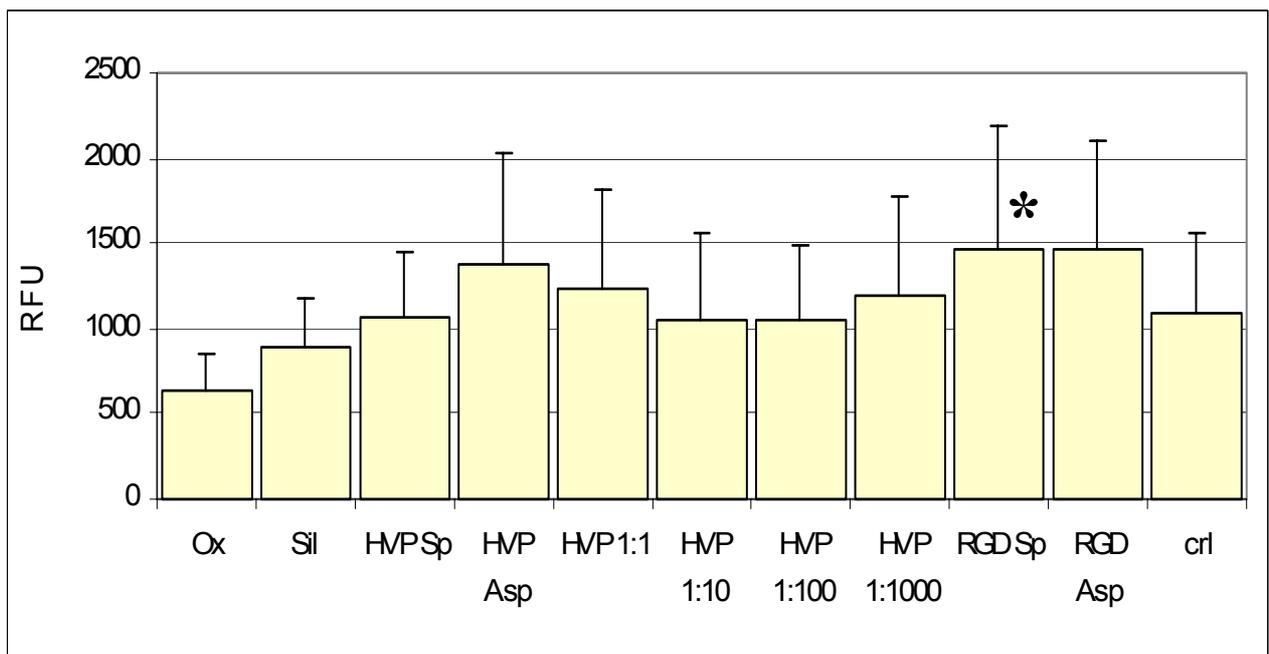


Grafico 2. Vitalità cellulare di MSC a 6 ore di coltura (RFU)

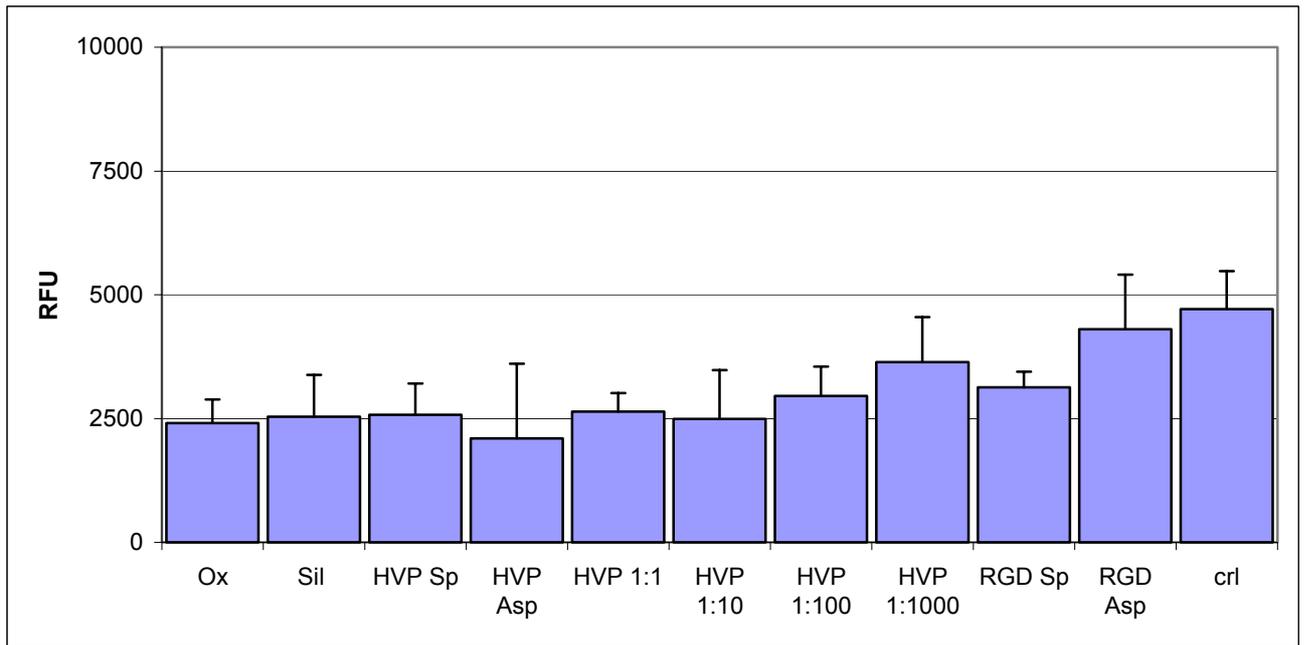


Grafico 3. Vitalità cellulare di MSC a 7 giorni di coltura (RFU)

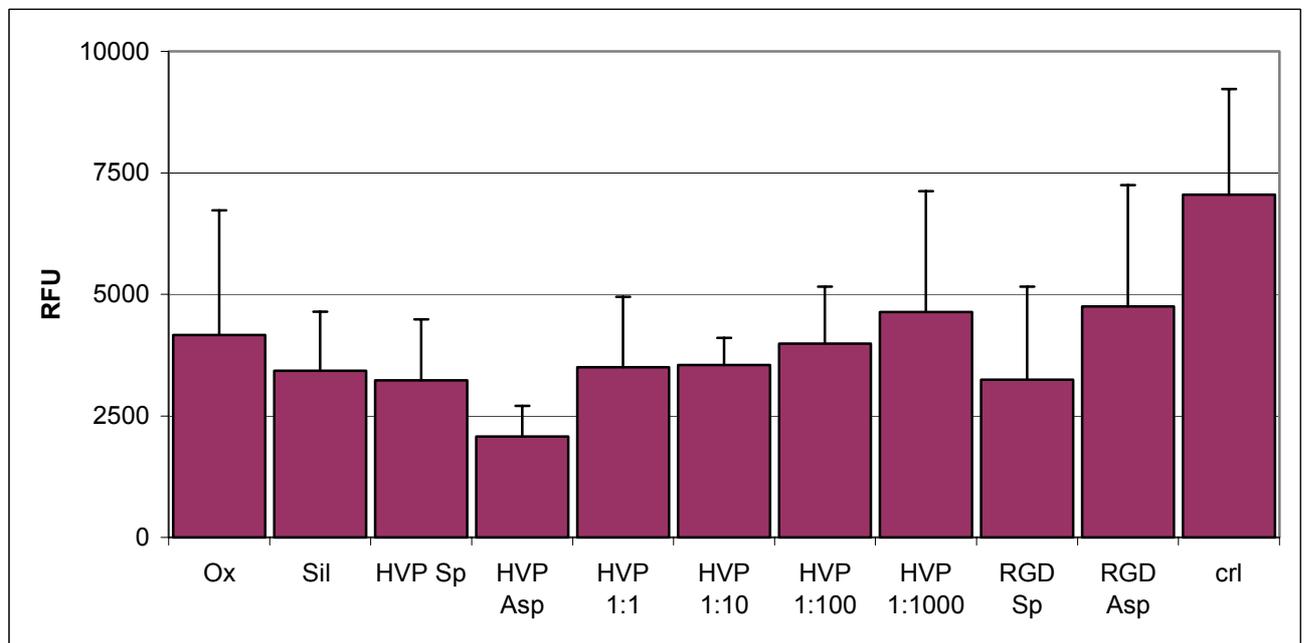


Grafico 4. Vitalità cellulare di MSC a 14 giorni di coltura (RFU)

Risultati

I risultati dello studio dell'interazione di cellule stromali con superfici di titanio funzionalizzate denotano che la presenza dei peptidi HVP e RGD può migliorare le fasi precoci di adesione alla superficie, rispetto a superfici di controllo (titanio senza peptidi, Sil o Ox). A sei ore dalla semina la colorazione con falloidina rodaminata ha permesso di osservare una maggiore distensione del citoscheletro cellulare sui substrati funzionalizzati; in assenza di peptidi le cellule sono apparse tondeggianti e prive delle caratteristiche morfologiche di una buona adesione.

Il quadro delle colture sui materiali varia a seconda del tipo di peptide e della modalità di coniugazione alla superficie di titanio. HVP sembra avere un effetto positivo sulla fase precoce di *attachment* cellulare quando è coniugato in modo aspecifico (Asp) e via arilazide (nella diluizione 1:1000), come rilevato dall'analisi morfologica e dal test biochimico di vitalità. Il segnale RGD rimane comunque quello che induce una migliore adesione per numero cellulare e qualità della distensione. Superfici funzionalizzate con RGD, in modo sia specifico che aspecifico, sono substrati che permettono alle cellule di aderire precocemente in modo superiore rispetto agli altri substrati trattati ed al controllo su polistirene (controllo TCPS). I valori di vitalità delle colture su titanio-RGD sono i più elevati a sei ore, e dall'analisi quantitativa dell'area di adesione (Grafico 1) l'unico trattamento di superficie che mostra una differenza significativa verso il controllo è RGD-Sp. Anche la coniugazione di RGD in maniera aspecifica induce una adesione di MSC soddisfacente.

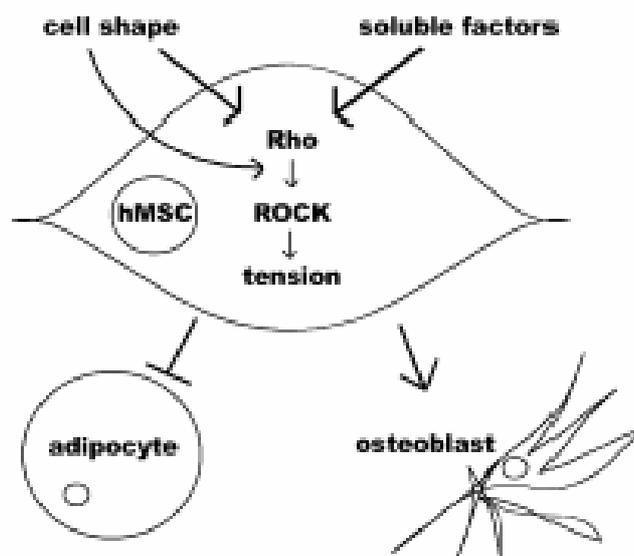
L'azione di miglioramento dell'adesione ottenuta attraverso funzionalizzazione con RGD (Sp e Asp) e HVP 1:1000, efficaci nelle fasi iniziali dell'interazione cellula-superficie (adesione e *spreading*), si mantiene anche a 7 giorni, seppure in assenza di significatività statistica rispetto ai controlli. Decresce invece l'efficacia del gruppo HVP legato in modo aspecifico. A 14 giorni sono ancora le superfici RGD Asp e HVP 1:1000 a consentire la migliore colonizzazione da parte delle cellule stromali.

Le colture di cellule stromali mantenute sulle superfici funzionalizzate con i peptidi, hanno mostrato in generale una migliore *performance* di adesione rispetto a colture condotte su titanio non funzionalizzato. In particolare è stato osservato che superfici adese con gli stessi peptidi, ma coniugati con procedure differenti e/o a varie concentrazioni, hanno effetti diversi sull'adesione cellulare. La diversità di azione di ogni 'preparazione' può essere dovuta ad una diversa conformazione sterica assunta dal peptide in seguito alla coniugazione o alla densità delle sequenze sulla superficie. Infatti è già stato citato che per strategie biomimetiche con l'utilizzo di peptidi è necessario considerare non solo la specificità ma anche la densità del 'segnale'. La concentrazione dei siti di legame peptidici in superficie influisce sull'adesione cellulare: una disposizione dei peptidi con la giusta 'spaziatura' riesce a sostenere sia le fasi precoci dell'adesione che quelle successive di migrazione e proliferazione. Per questo motivo le superfici che vengono migliorate con modifiche biomimetiche che utilizzano peptidi, vanno accuratamente saggiate con metodi di indagine fisica e chimica prima di essere sottoposte a saggi con modelli cellulari *in vitro*; verificando la corretta presentazione e orientamento dei peptidi adesi è possibile valutarne accuratamente l'effetto biologico.

Nel caso dei peptidi presi in esame, il legame per le cellule stromali viene contratto attraverso meccanismi differenti: l'interazione con il motivo RGD avviene attraverso i recettori di membrana quali sono le integrine, mentre il nona-peptide della vitronectina (HVP) media l'interazione tra i proteoglicani tipo eparan-solfato della membrana cellulare e il sito di legame dell'eparina sulla matrice extracellulare.

Dai risultati ottenuti dal saggio *in vitro*, il peptide RGD si riconferma la sequenza segnale di elezione per generare superfici attive biologicamente migliorando notevolmente l'adesione e lo *spreading* cellulare; l'HVP invece ha mostrato un comportamento variabile, ma in alcune preparazioni ha stimolato un inizio di organizzazione del citoscheletro cellulare. Questo effetto si può attribuire al tipo ed alla specificità del legame cellula/sequenza peptidica, che è quella che determina la qualità dell'interazione cellula/materiale e condiziona la colonizzazione di superficie

di quest'ultimo. Il presente lavoro conferma che l'attacco covalente di peptidi adesivi risulta una buona strategia per produrre superfici biomimetiche con un'augmentata capacità di promuovere l'adesione di cellule stromali ossee.



Discussione

Per lungo tempo i materiali per applicazione clinica sono stati derivati da altre aree della scienza e tecnologia, spesso senza un sostanziale ‘rimaneggiamento’ per l’uso medico. Il permanere di problemi di biocompatibilità, proprietà meccaniche e degradazione di tali materiali, ha portato alla progettazione di nuovi materiali.

La scienza moderna dei biomateriali è caratterizzata da un’enfasi crescente riguardo all’identificazione di parametri critici per la funzionalità, nonché alle interazioni cellula/matrice e al *signalling* intra- e inter-cellulare. Uno dei motivi fondamentali degli insuccessi è la scarsa interazione di superficie tra biomateriali e tessuti ospiti. E’ noto che l’introduzione di un impianto in un organismo vivente causa reazioni specifiche nell’ambiente biologico. Le biomolecole e le cellule, insieme alle proprietà intrinseche del biomateriale scelto determinano la ‘biocompatibilità’ e la longevità dell’impianto. Dato che l’interazione di queste biomolecole e cellule con la superficie del materiale è un elemento vitale nella valutazione del materiale, i biomaterialisti hanno riesaminato i fenomeni di reazione delle cellule dell’ospite per disegnare materiali che facilitassero interazioni positive e aumentassero la rigenerazione tissutale. A questo scopo tende l’ingegneria tissutale, che applica metodi derivati

dall'ingegneria e dalla biologia per creare costrutti artificiali che riescano a indurre rigenerazione tissutale.

La biomimetica, cioè la modifica del materiale per interagire selettivamente con uno specifico tipo di cellula attraverso fenomeni biomolecolari di riconoscimento, è una delle tattiche dominanti nell'ambito dell'ingegneria tissutale. Per ingegnerizzare la superficie dei polimeri o si modulano le caratteristiche quali composizione chimica, bagnabilità, carica di superficie, rugosità, etc, oppure si immobilizzano biomolecole per indurre risposte cellulari specifiche.

L'irraggiamento con ioni diversi (elio, argon, ossigeno, aria etc.) attraverso *plasma treatment*, che introduce gruppi polari come idrossili, carbossili, amino-gruppi e gruppi solfato è una tecnica spesso usata per migliorare l'idrofilia di superfici polimeriche. Infatti soprattutto i poliesteri, che comprendono polimeri estremamente utili nel campo medicale, quali acido polilattico, acido poliglicolico e policaprolattone, espongono una superficie idrofobica che limita l'adesione delle cellule. Nella parte di studio eseguito dall'unità di Catania è stato verificato che l'irraggiamento con elio ha arricchito la superficie del policaprolattone di gruppi OH: tali gruppi sono disponibili al legame con la superficie cellulare. Inoltre l'aumentata idrofilicità modifica anche la conformazione delle proteine del siero che si depositano sulla superficie, quali fibronectina e vitronectina, che espongono meglio i siti di legame per le cellule. In parallelo è stato anche notato un aumento della rugosità del PCL irradiato rispetto al non trattato: anche questo può essere motivo di una diversa risposta delle cellule alle due superfici. Sia l'idrofilicità che la rugosità infatti aumentano la capacità di migrazione cellulare, fase indispensabile alla proliferazione (Lampin et al., 1997). L'elevata quantità di matrice extracellulare osservata sulle superfici polimeriche è secreta dalle cellule stesse, come risposta alla 'giusta' conformazione delle proteine adesive.

Per quanto riguarda i peptidi per il legame cellulare (*cell binding*) i risultati dello studio confermano che la sequenza RGD, presente nelle proteine della matrice quali fibronectina, vitronectina, collagene tipo I, osteopontina e sialoproteina dell'osso, è efficace nel mediare il legame con la superficie cellulare. Anche la sequenza GRGD

mostra questa proprietà, anche se in misura leggermente minore rispetto a RGD. La differenza più marcata esercitata dalle due sequenze si ritrova nella morfologia delle MSC a seguito della distensione cellulare (*spreading*).

Sulla base dei dati dello studio è possibile concludere che la aumentata idrofilicità indotta dall'irraggiamento con elio sulla superficie di PCL è sufficiente per migliorare l'adesione delle MSC rispetto al PCL non trattato, probabilmente promuovendo l'adsorbimento di proteine con una corretta conformazione, e l'aggiunta di peptidi di legame per le cellule non migliora sensibilmente tale comportamento.

Quanto alla risposta biologica alle superfici, due popolazioni sono state derivate dal midollo e seminate: la popolazione intera (WBMC) comprende tutte le cellule mononucleate dopo separazione su gradiente di densità, mentre l'altra (MSC) risulta più purificata perché isolata per aderenza su plastica. Dopo coltura in terreno osteogenico le differenze più significative riguardano la maggiore spinta proliferativa delle MSC, che a 4 settimane assumono una morfologia allungata e simil-osteoblastica, ricoprendo la superficie dei polimeri con un consistente strato di ECM su cui si distendono le cellule confluenti. Anche la popolazione WBMC giunge a confluenza, ma con tempi più rallentati, spinta proliferativa minore e confluenza in pluristrato piuttosto che su ECM. Anche la morfologia delle due popolazioni è diversa, essendo le WBMC in complesso più rotondeggianti e con contatti focali più evidenti, mentre le MSC sono di aspetto fibroblastoide e tendono a correre in fasci 'curvati'. Dato che la forma che assume la cellula adesa al substrato influenza non solo la proliferazione, ma anche il successivo differenziamento, le differenze morfologiche riscontrate sui diversi substrati non hanno un valore puramente qualitativo, ma possono fornire informazioni utili.

L'autoassemblaggio molecolare di peptidi (SAMs) fornisce delle superfici organiche 'modello' che permettono il controllo a livello molecolare delle proprietà chimico-fisiche di interfacce organiche come bagnabilità, tipo e densità di diversi gruppi funzionali che vengono presentati all'interfaccia SAM-acqua. La classe di biomateriali basata su peptidi sintetici è composta di *scaffold* auto-complementari in

cui amminoacidi con carica positiva e residui con carica negativa vengono separati da residui idrofobici. Tali matrici possono essere fabbricate in varie forme quali stringhe, foglietti o nastri, aventi differenti spessori. La concentrazione peptidica e quella salina come anche l'apparato di *processing* determinano la geometria finale e le dimensioni delle matrici macroscopiche (Zhang et al., 1993).

Nei primi esperimenti eseguiti con cellule osteoblastiche mature, abbiamo confermato che il protocollo di preparazione dei SAMs, e il substrato di 'appoggio' degli stessi giocano un ruolo fondamentale nella corretta stratificazione e successivamente interazione con le cellule. Le preparazioni su superfici per colture cellulari non hanno portato a risultati di assemblaggio ripetibili e quindi a variazioni troppo ampie nella risposta cellulare.

La seconda generazione di SAMs su film di titanio ossidato è stata preparata nei laboratori chimici, con successiva verifica dell'avvenuta deposizione e caratterizzazione del tipo di assemblaggio. Il limite, esistente fino ad alcuni anni fa (2004), di non poter assemblare i peptidi su biomateriali di uso comune, ma solo su oro e argento, è stato brillantemente superato, così da rendere i SAMs potenzialmente disponibili per la creazione di superfici 'bioattive' per l'impianto ortopedico. Tra i peptidi testati sono quelli con conformazione predominante a β -elica, cioè il pept 1, corrispondente alla sequenza nota in letteratura, e il pept 2, che inducono adesione precoce e successivamente permettono la proliferazione cellulare. La presenza, seppure in bassa percentuale (10% circa) di α -elica, presente nel pept 5, riduce l'efficienza del SAM come sito di legame per MSC. I SAMs sono quindi uno strumento di elevata modularità e sintesi relativamente semplice, ma le sequenze sviluppate e i pattern di assemblaggio vanno accuratamente saggiati in sistemi biologici che devono riconoscere in questi substrati sintetici una conformazione simil-ECM.

Ancora basandosi sul riscontro che l'adsorbimento di proteine della matrice cellulare alle superfici influenza il comportamento di adesione cellulare, vari tentativi vengono fatti per il rivestimento di queste con specifiche proteine o sequenze peptidiche, allo scopo di migliorare l'interazione con le cellule. Come già detto, l'immobilizzazione

della sequenza RGD sui materiali porta a una migliore crescita ossea nei costrutti impiantati e un' aumentata formazione di osso in vivo (AJ Garcia et al., 2005). Anche peptidi diversi dalla nota sequenza RGD possono legare in maniera efficiente le cellule: tra queste un peptide derivato dalla vitronectina (*Human Vitronectin Peptide*, HVP) sembra favorire l' attacco degli osteoblasti (Dettin et al., 2005).

Nel nostro studio le sequenze RGD e HVP sono state coniugate alla superficie di titanio con meccanismi chimico-fisico diversi, che condizionano la densità dei peptidi e l' esposizione dei siti attivi. In particolare è stato osservato che superfici adese con gli stessi peptidi, ma coniugati con procedure differenti e/o a varie concentrazioni, hanno effetti diversi sull' adesione cellulare. La diversità di azione di ogni 'preparazione' può essere dovuta ad una diversa conformazione sterica assunta dal peptide in seguito alla coniugazione o alla densità delle sequenze sulla superficie. Infatti è già stato citato che per strategie biomimetiche con l' utilizzo di peptidi è necessario considerare non solo la specificità ma anche la densità del 'segnale'. La concentrazione dei siti di legame peptidici in superficie influisce sull' adesione cellulare: una disposizione dei peptidi con la giusta 'spaziatura' riesce a sostenere sia le fasi precoci dell' adesione che quelle successive di migrazione e proliferazione (Sawyer et al., 2007). Per questo motivo le superfici che vengono migliorate con modifiche biomimetiche che utilizzano peptidi, vanno accuratamente saggiate con metodi di indagine fisica e chimica prima di essere sottoposte a saggi con modelli cellulari *in vitro*; verificando la corretta presentazione e orientamento dei peptidi adesi è possibile valutarne accuratamente l' effetto biologico. Nel caso dei peptidi presi in esame, il legame per le cellule stromali viene contratto attraverso meccanismi differenti: l' interazione con il motivo RGD avviene attraverso i recettori di membrana quali sono le integrine, mentre il nonapeptide della vitronectina (HVP) media l' interazione tra i proteoglicani tipo eparan-solfato della membrana cellulare e il sito di legame dell' eparina sulla matrice extracellulare.

Dai risultati ottenuti dal saggio in vitro, il peptide RGD si riconferma la sequenza segnale di elezione per generare superfici attive biologicamente migliorando notevolmente l' adesione e lo *spreading* cellulare; l' HVP invece ha mostrato un

comportamento variabile, ma in alcune preparazioni ha stimolato una evidente organizzazione del citoscheletro cellulare. Questo effetto si può attribuire al tipo, alla specificità del legame cellula/sequenza peptidica e alla forza di tale interazione: tutti fattori che determinano la qualità dell'interazione cellula/materiale e condizionano la colonizzazione di superficie di quest'ultimo. E' stato infatti dimostrato che un grado 'intermedio' di adesione della cellula al substrato è auspicabile, in quanto permette la successiva migrazione della cellula (previa organizzazione del citoscheletro) che deve essere in grado di muoversi per potersi dividere (Berry et al., 2004). I dati raccolti confermano che l'attacco covalente al titanio di peptidi adesivi per le cellule (*cell binding peptides*) risulta una buona strategia per produrre superfici biomimetiche con un'augmentata capacità di promuovere l'adesione di cellule stromali ossee.

In conclusione, in questi ultimi anni si è arrivati a riconoscere nella matrice extracellulare che sottende ogni cellula un sistema non di semplice supporto ma di estrema importanza nella trasmissione di segnali alle cellule. Queste infatti non solo sono sensibili alla resistenza meccanica dell'ECM, a cui rispondono con tensioni generate attraverso il citoscheletro e trasmesse dalle integrine, ma anche a lievi cambiamenti topografici nella organizzazione fibrillare e nella composizione chimica della ECM, che si traducono in stimoli di crescita, differenziamento o motilità direzionale. Queste recenti conoscenze vengono impiegate per riprodurre con le moderne tecnologie substrati simil-ECM a livello micro e nano, in grado di generare segnali informativi alle cellule così da indirizzarle alla rigenerazione.

E' una sfida scientifica stimolante che parte dal riscontro di un successo solo parziale degli impianti di oggi, e grazie alla fusione di fisica, ingegneria, chimica e biologia (molecolare) esplora materiali e superfici 'bioispirati' che siano precocemente riconosciuti e meglio integrati dai tessuti viventi.

Bibliografia

- Alsberg E, Kong HJ, Hirano Y, Smith MK, Albeiruti A, Mooney DJ. *Regulating bone formation via controlled scaffold degradation*. EMBO J 2003, 20: 2254-72.
- Amizuka N. *Bone quality in the respect of bone matrix*. Clin Calcium 2004, 14:589-93.
- Anselme K, *Osteoblast adhesion on biomaterials*. Biomaterials 2000, 21:667-682.
- Anselme K, Bigerelle M, Noel B, Dufresne E, Judas D, Iost A, Hardouin P. *Qualitative and quantitative study on human osteoblast adhesion on biomaterials with various surface roughnesses*. J Biomed Mater Res 2000; 49(2):155-66.
- Ashton BA, Abdullah F, Cave J, Williamson M, Sykes BC, Couch M, Poser JW. *Characterization of cells with high alkaline phosphatase activity derived from human bone and marrow: preliminary assessment of their osteogenicity*. Bone 6: 313-319, 1985.
- Atala A, Mooney DJ, Vacanti LP, Langer R. *Synthetic biodegradable scaffolds*. Birkhauser, Boston MA, 1997.
- Berry CC, Campbell G, Spadicino A, Robertson M, Curtis AS. *The influence of microscale topography on fibroblast attachment and motility*. Biomaterials, 2004; 25: 5781-8.
- Bianco P, Riminucci M, Silvestrini G, Bonucci E, Termine JD, Fisher LW, Robey PG. *Localization of bone sialoprotein (BSP) to Golgi and post-Golgi secretory structures in osteoblasts and to discrete sites in early bone matrix*. J Histochem Cytochem 1993, 41:193-203.

- Boyan BD, Hummert TW, Dean DD, Schwarz Z. *Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response*. Biomaterials 1996, 18: 969-978.
- Bruder SP, Fox BS. *Tissue engineering of bone: cell based strategies*. Clin Orthop Rel Res 1999, 367S:S68-S83.
- Burg KJL, Porter S, Kellam JF. *Biomaterial development for bone tissue engineering*. Biomaterials 2000; 21: 2347-2359.
- Chen G, Ushida T, Tateishi T. *Scaffold design for tissue engineering*. Macromol Biosci 2002, 2:9 : 69-70.
- Chesmel KD, Clark CC, Brighton CT, Black J. *Cellular responses to chemical and morphologic aspects of biomaterial surfaces. The biosynthetic and migratory response of bone cell populations*. J Biomed Mater Res 1995, 29(9):1101-10.
- Connolly JF. *Injectable bone marrow preparations to stimulate osteogenic repair*. Clin Orthop, 1995; 313:8-18.
- Cook AD, Hrkach JS, Gao NN, Johnson IM, Pajvani UB, Cannizzaro SM, Langer R. *Characterization and development of RGD-peptide-modified poly(lactic acid-co-lysine) as an interactive, resorbable biomaterial*. J Biomed Mater Res 1997, 35(4):513-23.
- Dettin M, Conconi MT, Gambaretto R, Bagno A, Di Bello C, Menti AM, Grandi C, Parnigotto PP. *Effect of synthetic peptides on osteoblast adhesion*. Biomaterials, 2005; 26: 4507-15.
- Formigli L, Orlandini SZ, Benvenuti S, Masi L, Pinto A, Gattei V, Bernabei PA,

- Robey PG, Collin-Osdoboy P, Brandi ML. *In vitro structural and functional relationships between preosteoclastic and bone endothelial cells: a juxtacrine model for migration and adhesion of osteoclast precursors*. J Cell Physiol 1995, 162:199-204.
- Fox CF, Skalak R, eds. *Tissue Engineering*. New York: Alan R. Liss, Inc., 1988 (1st Tissue Engineering Symposium Proceedings Book).
 - Frank O, Heim M, Jakob M, Barbero A, Schäfer D, Bendik I, Dick W, Heberer M, Martin I. *Real-time quantitative RT-PCR analysis of human bone marrow stromal cells during osteogenic differentiation in vitro*. J Cell Biochem 2002, 85:737-746.
 - Ganss B, Kim RH, Sodek J. *Bone sialoprotein*. Crit Rev Oral Biol Med 1999, 10:79-98.
 - Garcia AJ, Reyes CD. *Bio-adhesive surfaces to promote osteoblast differentiation and bone formation*. J Dent Res, 2005; 84: 407-13.
 - Gombotz W, Hoffman A. *Gas discharge techniques for biomaterial modification*. CRC Crit Rev Biocompatibility 1987, 4: 1-24.
 - Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI. *The osteogenic potential of culture-expanded rat marrow mesenchymal cells assayed in vivo in calcium phosphate ceramic blocks*. Clin Orthop, 1991; 262:298-311.
 - Gregory CA, Gunn WG, Reyes E, Smolarz AJ, Munoz J, Spees JL, Prockop DJ. *How Wnt signalling affects bone repair by mesenchymal stem cells from the bone marrow*. Ann NY Acad Sci 2005, 1049:97-106.
 - Gronthos S, Steward K, Graves SE, Hay S, Simmons PJ. *Integrin expression and*

- function on human osteoblast-like cells. J Bone Miner Res 1997, 12: 1189-97.*
- Grundnes O, Reikeras O. *The importance of the hematoma for fracture healing in rats. Acta Orthop Scand, 1993; 64:340-342.*
 - Gunatillake PA, Adhikari R. *Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. Eur Cell Mater 2003, 20: 1-16.*
 - Gundle R, Joyner CJ, Triffitt JT. *Human bone tissue formation in diffusion chamber culture in vivo by bone-derived cells and marrow stromal fibroblastic cells. Bone, 1995; 16:597-601.*
 - Healy KE, Thomas CH, Reznia A, Kim JE, McKeown PJ, Lom B, Hockberger PE. *Kinetics of bone cell organization and mineralization on materials with patterned surface chemistry. Biomaterials 1996, 17(2):195-208.*
 - Healy KE, Reznia A, Style A. *Designing biomaterials to direct biological response. Ann N Y Acad Sci 1999, 875: 24-35.*
 - Hersel U, Dahmen C, Kessler H. *RGD modified polymers: biomaterials for stimulating cell adhesion and beyond. Biomaterials 2003, 24: 4385-4415.*
 - Heungsoo S, Seongbong J, Antonios G, Mikos AG. *Biomimetic materials for tissue engineering. Biomaterials 2003, 24: 4353-4364.*
 - Holmen SL, Zylstra CR, Mukherjee A, Sigler RE, Faugere MC, Bouxsein ML, Deng L, Clemens TL, Williams BO. *Essential role of beta-catenin in postnatal bone acquisition. J Biol Chem, 2005; 280(22)2162-68.*
 - Howard GA, Bottemiller BL, Turner RT, Rader JJ, Baylink DJ. *Parathyroid*

hormone stimulates bone formation and resorption in organ culture: evidence for a coupling mechanism. Proc Natl Acad Sci USA, 1981; 78(5):3204-08.

- Hudis M. *Techniques and application of plasma chemistry.* JR Hollahan and AT Bell, eds. John Wiley & Sons, NY, 113-148, 1974.
- Hutmacher DW. *Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage.* Biomaterials 2000, 21: 2529-43.
- Hutmacher DW. *Scaffolds design and fabrication technologies for engineering tissues. State of the arts and future prospectives.* J Biomater Sci Polymer Ed 2001, 12: 107-24.
- Ingber DE, Mow VC, Butler D, Niklason L, Huard J, Mao J, Yannas I, Kaplan D, Vunjak-Novakovic G. *Tissue Engineering and Developmental Biology: going Biomimetic.* Tissue Eng, 2006; 12(12):3265-83.
- Joyner CJ, Bennet A, Triffitt JT. *Identification and enrichment of human osteoprogenitor cells by using differentiation stage-specific monoclonal antibodies.* Bone, 1997; 21:1-6.
- Kadiyala S, Kraus KH, Bruder SP. *Canine mesenchymal stem cell-based therapy for the regeneration of bone.* Trans Tissue Eng Soc, 1996; 1-20.
- Kadowaki A, Tsukazaki T, Hirata K, Shibata Y, Okubo Y, Bessho K, Komori T, Yoshida N, Yamaguchi A. *Isolation and characterization of a mesenchymal cell line that differentiates into osteoblasts in response to BMP2 from calvariae of GFP transgenic mice.* Bone, 2004; 34: 993-1003.
- Kieswetter K, Schwartz Z, Hummert TW, Cochran DL, Simpson J, Dean DD,

- Boyan BD: *Surface roughness modulates the local production of growth factors and cytokines by osteoblast-like MG-63 cells*. J Biomed Mater Res 1996, 32(1):55-63.
- Komori T. *Requisite roles of Runx2 and Cbfb in skeletal development*. J Bone Miner Metab, 2005; 21:193-7.
 - Komori T. *Regulation of skeletal development by the Runx family of transcription factors*. J Cell Biochem 2005, Mar 22.
 - Kon E, Muraglia A, Corsi A, Bianco P, Marcacci M, Martin I, Boyde A, Ruspantini I, Chistolini P, Rocca M, Giardino R, Cancedda R, Quarto R. *Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bones*. J Biomed Mater Res, 2000; 49: 328-37.
 - Kostenuik PJ, Shalhoub V. *Osteoprotegerin: a physiological inhibitor of bone resorption*. Curr Pharm Des 2001, 7:613-35.
 - Krebsbach PH, Mangani MH, Satomura K, Kuznetsov SA, Robey PG. *Repair of craniotomy defects using bone marrow stromal cells*. Transplantation, 1998; 66: 1272-78.
 - Lampin M, Warocquier-Clerout R, Legris C, Degrange M, Sigot-Luizard MF. *Correlation between substratum roughness and wettability, cell adhesion, and cell migration*. J Biomed Mater Res, 1997; 36: 99-108.
 - Lanza RP, Langer R, Chick WL. *Principles of Tissue Engineering*. Academic Press, San Diego, CA, USA, 1997.
 - Logeart-Avramoglou D, Anagnostou F, Bizios R, Petite H. *Engineering of bone:*

challenges and obstacles. J Cell Mol Med, 2005; 9:72-84.

- Marks SC, Jr. Hermey DC. *The structure and development of bone*; in: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA. Eds. Principles of Bone Biology. Academic Press, San Diego, 2001; 3-14.
- Marotti G. *Static and dynamic osteogenesis in the process of bone repair.* Giornale Italiano di Ortopedia e Traumatologia, 2004; XXX (1):S1-S5.
- Mbalaviele G, Sheikh S, Staine JP, Salazar VS, Cheng SL, Chen D, Civitelli R. *Beta-catenin and BMP-2 synergize to promote osteoblast differentiation and new bone formation.* J Cell Biochem 2005, 94(2):403-18.
- Mizuno K, Mineo K, Tachibana T, Sumi M, Matsubara T, Hirohata K. *The osteogenic potential of fracture hematoma.* J Bone Joint Surg, 1990;72:822-29.
- Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, de Crombrughe B. *The novel zinc finger-containing factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation.* Cell 2002, 1:17-29.
- Oreffo ROC, Bord S, Triffitt JT. *Skeletal progenitor cells and ageing human population.* Clin Sci, 1998; 94:549-55.
- Owen MJ, Karsenty G. *New developments in bone formation.* Curr Opin Nephrol Hypertens 1998, 7:18-27.
- Pallson BO, Bhatia SN. *Tissue Engineering.* 1sted. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ, 2003.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman

MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells*. Science 1999, 284:143-7.

- Rezania A, Healy KE. *Biomimetic peptide surfaces that regulate adhesion, spreading, cytoskeletal organization and mineralization of the matrix deposited by osteoblast-like cells*. Biotechnol Prog 1999, 15(1):19-32.
- Ripamonti U, Croocks J, Rueger DC. *Induction of bone formation by recombinant human osteogenic protein-1 and sintered porous hydroxyapatite in adult primates*. Plast Reconstr Surg 2001, 107:977-88.
- Rose FRA, Oreffo ROC. *Bone tissue engineering: hope vs hype*. Bioch Bioph Res Comm 2002, 292: 1-7.
- Sanchez C, Arribart H, Giraud Guille MM. *Biomimetism and bioinspiration as tools for the design of innovative materials and systems*. Nat Mater, 2005; 4:277-88.
- Satomura K, Krebsbach P, Bianco P, Gehron RP. *Osteogenic imprinting upstream of marrow stromal cell differentiation*. J Cell Biochem 2000, 78:391-403.
- Sawyer AA, Hennessy KM, Bellis SL. *The effect of adsorbed serum proteins, RGD and proteoglycan-binding peptides on the adhesion of mesenchymal stem cells to hydroxyapatite*. Biomaterials, 2007; 28: 383-92.
- Schaffner P, Dard MM. *Structure and function of RGD peptides involved in bone biology*. Cell Mol Life Sci 2003, 60(1):119-32.
- Takai H, Kanematsu M, Yano K. *Transforming growth factor- β stimulates the production of osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor by bone marrow stromal cells*. J Biol Chem 1998, 273:27091-96.

- Thompson ID, Hench LL. *Mechanical properties of bioactive glasses, glass-ceramics and composites*. Proc Inst Mech Eng (H) 1998, 212:127-36.
- Tou L, Quibria N, Alexander JM. *Transcriptional regulation of the human Runx2/Cbfa1 gene promoter by morphogenetic protein 7*. Mol Cell Endocrinol, 2003; 205:121-9.
- Triffitt JT. *The stem cells of the osteoblast*. In Biliiekian J, Raisz L , Rodan G Eds. Principles of Bone Biology. San Diego, CA, Academic, 1996; 39-50.
- Vacanti CA, Mikos AG, eds., *Tissue Engineering*. Larchmont (NY): Mary Ann Liebert Inc., 1995.
- Variola F, Yi JH, Richert L, Wuest JD, Rosei F, Nanci A. *Tailoring the surface properties of Ti6Al4V by controlled chemical oxidation*. Biomaterials, 2008; 29:1285-98.
- Viereck V, Siggelkow H, Tauber S, Raddatz D, Schutze N, Hufner M. *Differential regulation of Cbfa1/runx2 and osteocalcin gene expression by vitamin D3, dexamethasone and local growth factors in primary human osteoblasts*. J Cell Biochem, 2002; 86:348-56.
- Vogt S, Larcher Y, Beer B, Wilke I, Schnabelrauch M. *Fabrication of highly porous materials based on functionalized oligolactides and preliminary results on their use in bone tissue engineering*. Europ Cells and Mat, 2002; 4:30-38.
- Wang MS, Palmer LB, Schwartz JD, Razatos A. *Evaluating protein attraction and adhesion to biomaterial with the atomic force microscope*. Langmuir, 2004; 20: 7753-7759.

- Whitesides GM. *The 'right' size in nanobiotechnology*. Nature Biotechnol, 2003; 21: 1161-65.
- Zhang S, Holmes T, Lockchin C, Rich A. *Spontaneous assembly of a self-complementary oligopeptide to form a stable macroscopic membrane*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993; 90: 3334-38.