

Capitolo 1: Introduzione

1.1 I Biomateriali

Si definisce biomateriale un materiale concepito per interfacciarsi con i sistemi biologici per valutare, dare supporto o sostituire un qualsiasi tessuto, organo o funzione del corpo (II International Consensus Conference on Biomaterials, Chester, Gran Bretagna, 1991).

I biomateriali hanno risposto al bisogno dell'uomo di sostituire od integrare tessuti ed organi, non più attivi dal punto di vista funzionale o metabolico, danneggiati da eventi patologici o traumatici.

Possono essere utilizzati sia in impianti permanenti o protesi, sia in dispositivi a contatto con il corpo umano per un periodo di tempo limitato (ad esempio i dispositivi monouso utilizzati durante gli interventi chirurgici).

Negli ultimi decenni si è sviluppato, in particolare, un crescente interesse nel settore dell'Ingegneria Tissutale. Il termine *Tissue Engineering* è stato ufficialmente coniato al National Workshop a Lake Tahoe nel 1988 ed è stato definito come: "Campo multidisciplinare in evoluzione, che si avvale dei principi della scienza della vita e dell'ingegneria per realizzare tessuti biologici contenenti cellule viventi e funzionali per la rigenerazione, il mantenimento o il miglioramento delle prestazioni dei tessuti".

I materiali impiegati in campo medico devono rispondere innanzitutto a requisiti di biofunzionalità e biocompatibilità. La biofunzionalità si riferisce alle proprietà che un dispositivo deve avere per riprodurre una determinata funzione dal punto di vista fisico e meccanico; la biocompatibilità, invece, alla capacità del dispositivo di continuare a svolgere quella determinata funzione durante tutta la vita utile dell'impianto ed è strettamente connessa, quindi, alle interazioni tra i biomateriali ed i tessuti con cui viene a contatto.

Come materiali utilizzabili per questi scopi, sono stati studiati numerosi polimeri naturali (ad esempio collagene, cellulosa), artificiali (modificati chimicamente dall'uomo) e sintetici (ottenuti per sintesi chimica).

I maggiori vantaggi che i polimeri sintetici offrono rispetto ad altre classi di materiali sono: buona biocompatibilità; possibilità di modificarne ampiamente composizione e proprietà fisico-meccaniche; facile processabilità e lavorabilità anche in forme e strutture complesse; possibilità di modificarne chimicamente e/o fisicamente la superficie; capacità di immobilizzare cellule o biomolecole al loro interno o sulla superficie. Gli svantaggi principali riguardano la presenza di sostanze tossiche che possono essere rilasciate nell'organismo (monomeri, catalizzatori, additivi, ecc.) e la facilità di assorbimento di acqua e biomolecole dall'ambiente circostante (anche nelle applicazioni in cui non è richiesto); in alcuni casi possiedono proprietà meccaniche inadeguate e mostrano difficoltà di sterilizzazione.

Nella tabella 1.1.a sono elencati i polimeri sintetici maggiormente impiegati in campo medico e loro principali applicazioni.

Tabella 1.1.a: Principali polimeri usati in campo medico e rispettive applicazioni.

POLIMERO	SIGLA	PRINCIPALI APPLICAZIONI
Acido poliglicolico	PGA	Strutture biodegradabili, placche e chiodi intramidollari, placche di frattura degradabili.
Acido polilattico	PLLA	Placche e chiodi intramidollari, legamento artificiale, placche di frattura degradabili, somministrazione controllata di farmaci.
Copolimeri butadiene-stirene	BS	Articoli monouso, imballaggi
Copolimeri stirene-acrilonitrile	SAN	Aspiratori per sangue, componenti per emodializzatori.
Poliacrilonitrile	PAN	Membrane per emodialisi
Poliammidi	PA	Suture
Policarbonato	PC	Membrane per ossigenatori ed emodialisi, linee ematiche.
Poliidrossietilmetacrilato	PHEMA	Legamenti artificiali, lenti a contatto
Polietilene	PE, LDPE	Film, imballaggi, cateteri, tubi connettori, somministrazione controllata di farmaci.
Polietilene (PM >2.0000.000)	UHMWPE	Superfici articolari, fibre per compositi, placche ortopediche, rivestimenti steli femorali.
Polieterotereftalato	PET	Protesi vascolari, anelli di sutura, suture, componenti di protesi valvolari, componenti di assistenza cardiaca, passaggi transcutanei,
Polimetilmetacrilato	PMMA	Cemento osseo, lenti a contatto e intraoculari, membrane per emodialisi, materiali dentali.
Polipropilene	PP	Imballaggi sterili, connettori, siringhe, membrane per ossigenatori, fili di sutura, anse di supporto lenti intraoculari.
Polisolfone	PS	Membrane per ossigenatori ed emodialisi
Politetrafluoroetilene	PTFE	Protesi vascolari, componenti di protesi valvolari, legamenti artificiali, rivestimenti.
Poliuretani	PUR	Cateteri, cannule, tubi endotracheali, protesi valvolari, membrane per emodialisi, sacche ventricolari, rivestimenti emocompatibili, dispositivi di assistenza cardiaca, somministrazione controllata di farmaci, protesi vascolari
Polivinilcloruro	PVC	Sacche per sangue, tubi endotracheali, guanti monouso, cateteri, accessori monouso.
Siliconi		Cateteri, drenaggi, membrane, pelle artificiale, impianti per chirurgia plastica, protesi vascolari e tracheali, rivestimenti, infusori, componenti di protesi valvolari.

I biomateriali sono importanti anche perché possono essere usati come modello artificiale semplice e ben definito dal punto di vista chimico-fisico, della *matrice extracellulare (ECM)* e di conseguenza sono utili nello studio e nella comprensione dei meccanismi delle interazioni che controllano l'adesione cellulare, la proliferazione, la differenziazione, la migrazione etc. La matrice extracellulare è un gel di proteine (o meglio glicoproteine) e polisaccaridi in forma ionica, che agisce come supporto fisico per cellule e tessuti. Nella maggior parte degli animali la proteina più abbondante è il collagene. Altri componenti della ECM sono proteine quali fibrinogeno e elastina, minerali quali idrossiapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) e fluidi come il plasma.

1.1.1 Interazioni materiale - cellule

L' interazione materiale-cellule può essere modulata attraverso due strategie fondamentali.

La prima consiste nel creare una superficie inerte che non comporti l'adsorbimento di proteine e l'adesione di cellule, in modo da prevenire l'attivazione del sistema immunitario nonché la coagulazione del sangue, la trombosi, la deposizione di matrice extracellulare ed altre interazioni tra materiale ed ambiente circostante.

Materiali così realizzati sono usati nella fabbricazione di protesi¹, lenti a contatto^{2,3}, valvole cardiache, cateteri per emodialisi o come veicoli per il rilascio controllato di farmaci^{1, 4, 5, 6, 7}.

L'altra strategia, più avanzata, è quella che ha lo scopo di creare materiali che promuovano, possibilmente in maniera controllata, l'adesione cellulare. In particolare la tendenza attuale è volta alla creazione di ' organi bioartificiali ibridi ' nei quali la componente artificiale ha una struttura tridimensionale in grado di promuovere l'accrescimento e la diversificazione delle cellule. Il supporto artificiale, inoltre, si dovrebbe preferibilmente riorganizzare ed essere riassorbito simultaneamente alla crescita cellulare e quindi gradualmente sostituito dai nuovi tessuti.

Da questo punto di vista il materiale bioartificiale non può essere considerato come un sostituto duraturo di un tessuto, ma come una struttura temporanea che ne promuove la rigenerazione.

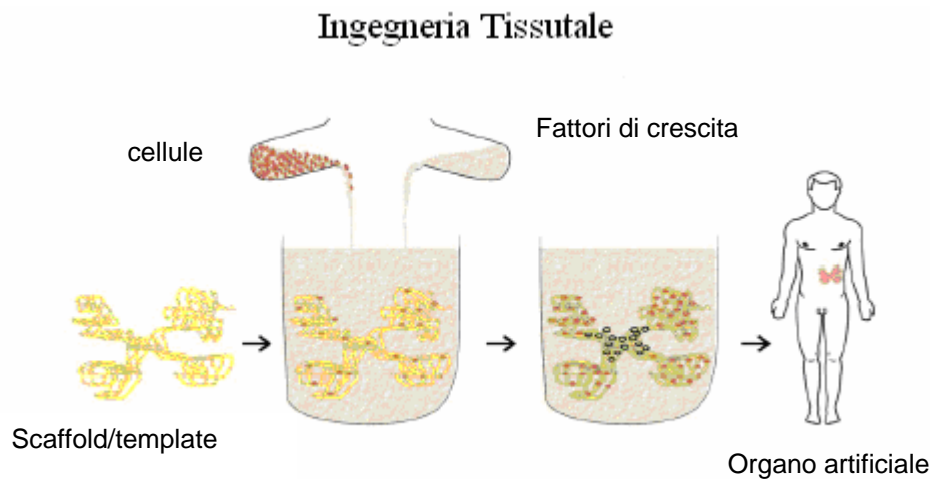


Figura 1.1.1.1: Tissue Engineering scaffold. Uno scaffold realizzato in materiale sintetico costituisce il supporto per una cultura cellulare/tissutale. Lo scaffold dovrebbe promuovere il ricostituirsi dei tessuti che successivamente vengono introdotti in vivo.

1.1.2 Meccanismi molecolari di adesione cellulare su materiali artificiali

L'adesione cellulare sui materiali bioartificiali può progredire attraverso due meccanismi.

Legame cellula – materiale non mediato da recettori

Questo meccanismo prevede che l'interazione cellula – materiale avvenga tramite legami secondari (legami a idrogeno, elettrostatici, polari e interazioni ioniche) tra molecole appartenenti alla membrana cellulare e gruppi funzionali del polimero. Questo tipo di interazione non può però garantire la trasmissione di adeguati segnali dall'ambiente extracellulare alle cellule e di conseguenza non assicura la sopravvivenza delle cellule “ancoraggio dipendenti” (ovvero quelle cellule che per sopravvivere e proliferare necessitano di aderire ad un substrato) . Nel caso in cui le cellule siano incapaci di sintetizzare e depositare le proprie molecole della ECM in tempi relativamente brevi (24-48 ore dopo che sono state seminate) o non possiedano alcune di queste molecole legate alla membrana cellulare, subiscono apoptosi ^{8, 9, 10, 11}

Legame cellula – molecole della ECM (o loro parti) mediato da recettori

In questo caso l'adesione cellulare avviene tramite meccanismi analoghi a quelli che si verificano negli organismi viventi, dove le cellule interagiscono

con l'ambiente esterno attraverso le *proteine transmembrana* le quali trasferiscono sia informazioni che molecole dall'esterno delle cellule al loro interno. Molte di queste proteine sono *recettori* e formano legami extracellulari con i *ligandi*.

Quando un recettore si lega al suo rispettivo ligando (tipicamente una proteina od un peptide) avviene generalmente un cambiamento conformazionale nel recettore e questo causa una serie di reazioni enzimatiche a cascata che comportano un'amplificazione del segnale, detta *trasduzione del segnale*. Tale meccanismo influenza la regolazione dei geni e può comportare lo spostamento del recettore dalla superficie all'interno della cellula. Funzioni cellulari quali sopravvivenza, proliferazione, migrazione e differenziazione, sono governati dall'integrazione di differenti segnali derivanti da differenti molecole.

I ligandi extracellulari che hanno una rilevante importanza nell'ambito dei biomateriali, possono essere di due tipi:

- ligandi appartenenti ai fattori di crescita (*growth factors*)
- ligandi appartenenti alla ECM

I fattori di crescita sono generalmente peptidi o proteine solubili dal peso molecolare variabile tra 5000 e 50000.

Le molecole della ECM hanno solitamente un peso molecolare superiore a 100000 e contengono numerosi domini e regioni che possiedono differenti funzioni, incluse le interazioni con i recettori, con i fattori di accrescimento e con altre molecole della ECM.

Negli ultimi anni sono state studiate le strutture, le funzioni e le proprietà di numerose molecole della ECM e mappati i legami che esse formano con i recettori in piccoli domini (3-20 residui amminoacidici) e che si ripetono in differenti proteine. La più nota e studiata fra questi è la sequenza RGD (arginina, glicina, acido aspartico, $M_w \sim 400$) venne identificata per la prima volta nella fibronectina¹² ed è stata identificata come la sequenza minima necessaria per promuovere l'adesione cellulare. Successivamente sono stati identificati e studiati molti altri peptidi tramite i quali recettori e ligandi interagiscono. Nella maggior parte dei casi questi peptidi si legano a recettori chiamati *integrine*^{13, 14, 15}.

Attualmente la tendenza più seguita è volta a creare materiali artificiali che contengano questi recettori o meglio parti di essi (peptidi) e che sono quindi in grado di mimare quello che è l'ambiente naturale delle cellule: per tale motivo i materiali di questo tipo sono chiamati *biomimetici*.

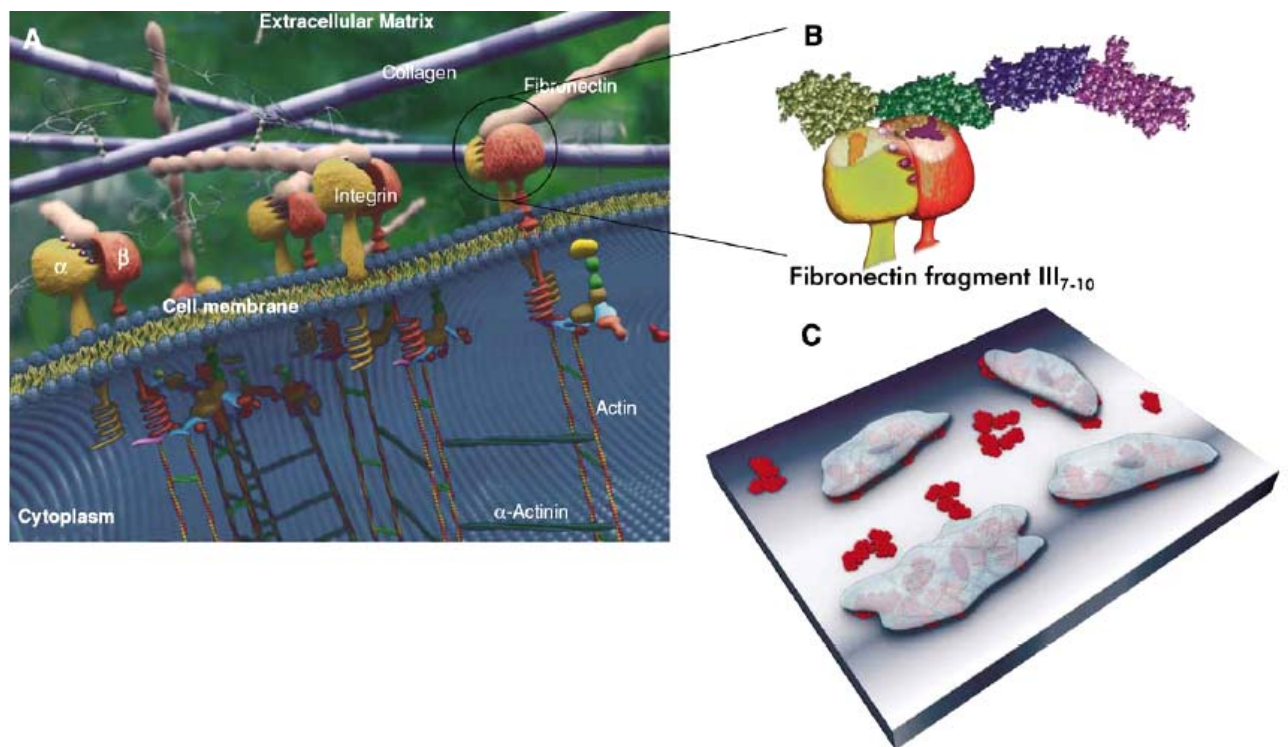


Fig. 1.1.2.1: Interazione Integrina – Fibronectina:

(A) Le integrine sono composte da due subunità α e β e legano da un lato (e in uno specifico dominio di legame della proteina) una cellula attraverso le proteine della ECM quali fibronectina, e dall'altro alle proteine del citoscheletro come la talina e l' α -actina.

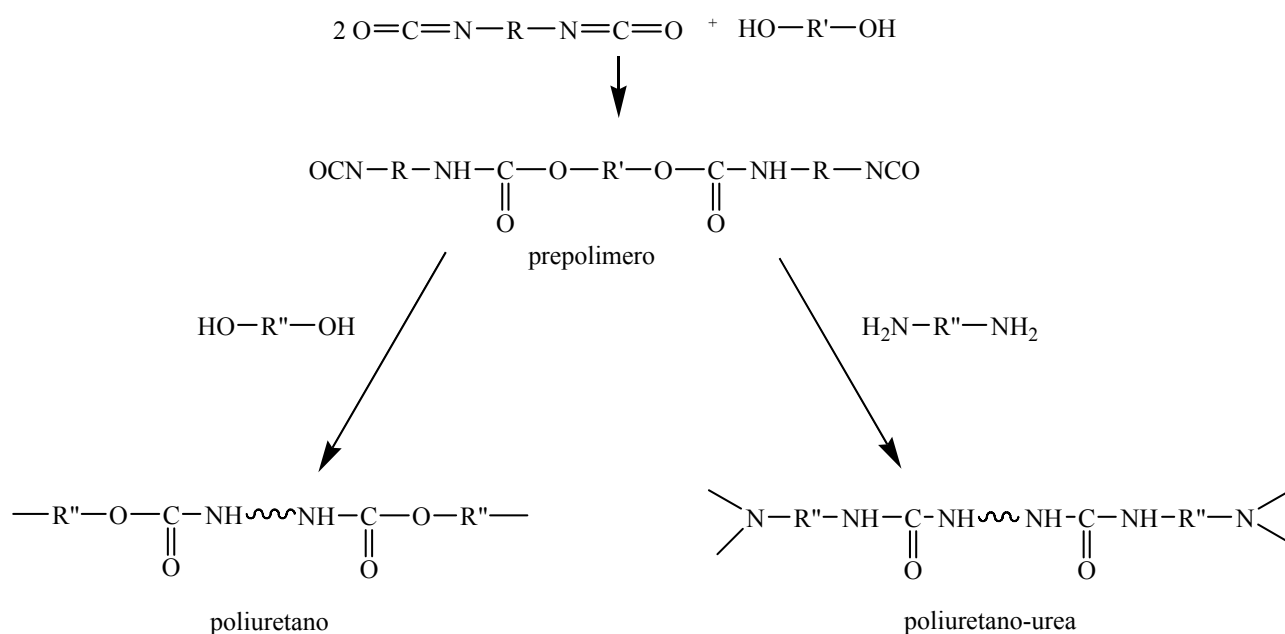
(B) Le integrine si legano ai domini di adesione delle proteine della ECM identificando specifici siti di tali domini. In questa figura viene mostrato un modello per il legame della sequenza GRGDS della fibronectina con il corrispondente sito PHSRN di un'integrina.

(C) In un materiale biomimetico piccoli peptidi che mimano parte delle proteine della ECM (come RGD, mostrato in rosso) sono legati dalle integrine attraverso una "interazione specifica" e possono influenzare l'adesione cellulare sul materiale. Le cellule aderiscono e proliferano sulle superfici biomimetiche e le superfici modificate con questi peptidi possono indurre la formazione di tessuti differenti, a seconda del tipo di cellule seminate sul materiale.

1.2 Poliuretani per uso biomedico

I poliuretani costituiscono un'importante sottoclasse nella famiglia degli elastomeri termoplastici. Contengono un legame uretanico (analogo al gruppo carbammato) e sono costituiti da blocchi di segmenti "soft" (ovvero flessibili) e "hard" (rigidi).

I segmenti *soft* generalmente presentano una bassa temperatura di transizione vetrosa (T_g) e sono costituiti da polieteri, poliesteri o polioli. I segmenti *hard* normalmente presentano un'alta T_g e sono formati da diisocianati legati all'estensore di catena. Come estensori di catena vengono comunemente utilizzati dioli o diammine a basso PM e si ottengono rispettivamente poliuretani e poliuretani-urea.



I poliuretani possono avere, a seconda della loro composizione, proprietà fisiche notevolmente differenti: ciò è dovuto alla possibilità di variare la natura chimica e il peso molecolare dei vari componenti, nonché alla proporzione con i quali questi vengono fatti reagire. Si realizzano materiali rigidi e molto fragili così come altri morbidi, amorfi e viscosi.

Comunemente questi polimeri mostrano separazione di fase fra i due segmenti: la struttura è costituita da domini *hard* dispersi in una matrice *soft*. Si ritiene che proprio questa caratteristica strutturale sia responsabile delle peculiari proprietà fisiche e meccaniche che contribuiscono al rendere questi materiali particolarmente biocompatibili¹⁶.

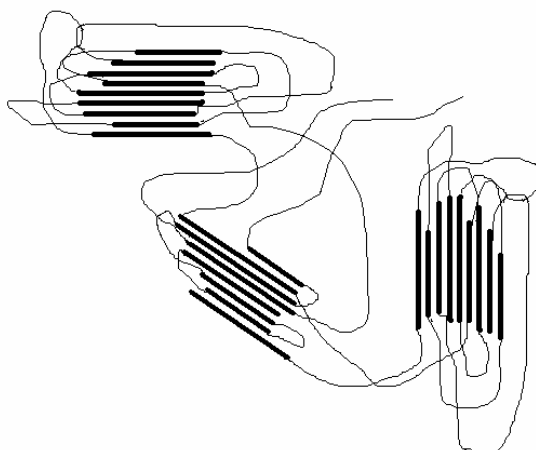


Figura 1.2.1: domini hard dispersi in matrice soft

A seconda del tipo di monomeri selezionati si possono inoltre ottenere polimeri con legami chimici degradabili in ambiente fisiologico. La modulabilità delle proprietà meccaniche e la biodegradabilità rendono i poliuretani ottimi candidati per applicazioni nel *soft tissue engineering*¹⁷. Requisito fondamentale per tali applicazioni è che si abbiano prodotti di degradazione non tossici.

1.2.1 Polioli

I polioli utilizzati nella sintesi dei poliuretani hanno generalmente un peso molecolare compreso tra 400 e 6000 e con funzionalità (numero dei gruppi ossidrilici reattivi per molecola) comprese tra 2 ed 8. Possono essere polietere (polioli-polietere) poliesteri (polioli-poliestere) e policarbonati; sono disponibili a diverse lunghezze di catena e a disposizione atomica da lineare a variamente ramificata.

Poliuretani degradabili sono spesso ottenuti utilizzando come segmenti *soft* polimeri idrolizzabili come polilattidi e soprattutto poliesteri. Questi ultimi sono insolubili in acqua ma degradabili per attacco idrolitico al legame estereo. In vivo questo tipo di degradazione può avvenire ad opera di particolari enzimi quali, ad esempio, l' α -chimotripsina. I meccanismi e i tempi di degradazione sono funzione di vari parametri, quali il peso molecolare (maggiore è la lunghezza del segmento soft e maggiore è il grado di idrolisi) il grado di cristallinità, la temperatura di transizione vetrosa e l'idrofilia dei monomeri.

I più comuni polioli usati nella sintesi di poliuretani sono riportati nella tabella 1.2.1.a.

Tabella 1.2.1.a: comuni polioli usati nella sintesi di poliuretani

$\text{HO}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-\text{H}$	Polietilen ossido (PEO)
$\text{HO}-(\text{CH}_2-\overset{\text{CH}_3}{\text{CH}_2}-\text{O})_n-\text{H}$	Polipropilen ossido (PPO)
$\text{HO} \left[(\text{CH}_2)_5-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O} \right]_n (\text{CH}_2)_6 \left[\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-(\text{CH}_2)_5 \right]_n \text{OH}$	Policaprolatton diolo (PCL)
$\text{HO} \left[\text{CH}_2-\overset{\text{CH}_3}{\underset{\text{CH}_3}{\text{C}}} \right]_n \text{OH}$	Poliisobuten diolo
$\text{HO}-(\text{CH}_2)_6 \left[\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-(\text{CH}_2)_6 \right]_n \text{OH}$	Poliesametilencarbonato diolo
$\text{HO}-(\text{CH}_2)_4 \left[\overset{\text{CH}_3}{\underset{\text{CH}_3}{\text{Si}}}-\text{O} \right]_n \overset{\text{CH}_3}{\underset{\text{CH}_3}{\text{Si}}}-(\text{CH}_2)_4\text{OH}$	Polidimetil silil ossano idrossibutil terminato (PDMS)
$\text{HO} \left[\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-(\text{CH}_2)_4-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O} \right]_n \text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$	Polietilen adipato

1.2.2 Estensori di catena

Gli estensori di catena sono usati per accrescere la lunghezza dei segmenti hard, aumentare la percentuale dei legami ad idrogeno e soprattutto per incrementare il peso molecolare del polimero.

Come estensori di catena sono utilizzati dioli e diammine.

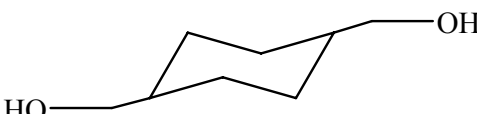
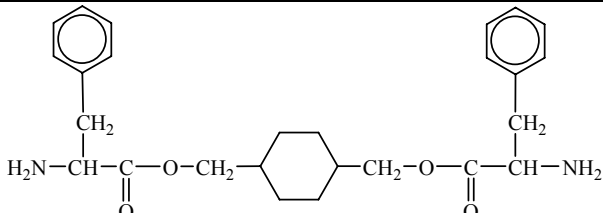
Le diammine reagiscono più rapidamente rispetto ai dioli ma il loro utilizzo è limitato a determinate specie poiché molte risultano essere cancerogene. Al fine di ottenere poliuretani suscettibili ad attacco enzimatico diretto *in vitro*, Skarja e Woodhouse hanno riportato la sintesi di un estensore a base di fenilalanina^{18, 19}.

E' noto infatti che legami ammidici, in particolari quelli adiacenti a residui contenenti gruppi aromatici, sono idrolizzati da enzimi quali α -chimotripsina.

I poliuretani sintetizzati usando come estensori glicol, sono più flessibili e meno resistenti rispetto ai corrispondenti poliuretani-urea.

I più comuni estensori di catena sono riportanti nella tabella 1.2.2.a.

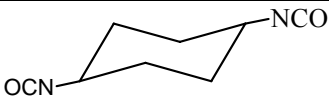
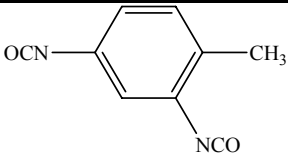
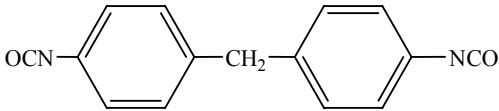
Tabella 1.2.2.a: comuni estensori di catena usati nella sintesi di poliuretani

$\text{HO}-(\text{CH}_2)_4-\text{OH}$	1,4- butandiolo
$\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}_2$	1,4-butandiammina
$\text{HO}-(\text{CH}_2)_2-\text{OH}$	etilenglicol
$\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}_2$	etilendiammina
$\text{HO}-(\text{CH}_2)_6-\text{OH}$	esandiolo
	cicloesandimetano
	Phe-diester

1.2.3 Isocianati

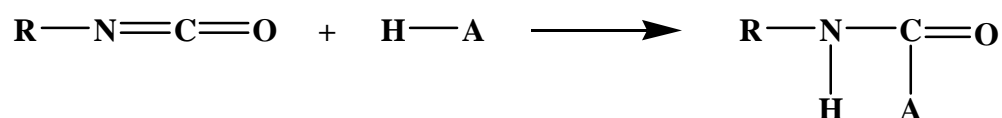
Tradizionalmente i poliuretani sono stati sintetizzati con precursori tossici, in particolare con diisocianati aromatici quali TDI (toluendiisocianato) e MDI (metilen di-p-fenil diisocianato). Rispetto ai diisocianati alifatici questi forniscono poliuretani che possiedono migliori proprietà meccaniche ma possono liberare prodotti di degradazione potenzialmente cancerogeni^{20, 21}. Dalla fine degli anni '80 sono stati presi in esame alcuni diisocianati alifatici che possano essere adatti per applicazioni in campo medicale. In particolare Bruin²² e collaboratori hanno riportato la sintesi di poliesteri-uretani in cui è stato utilizzato etil-2,6-diisocianatoesanoato (LDI) un diisocianato preparato convertendo i gruppi amminici dell' L-lisina etil estere in isocianati attraverso fosgenazione. E' stato provato che se il diisocianato viene liberato per idrolisi del legame uretanico, esso reagisce con l'acqua per dare, come prodotto finale, L-lisina ed etanolo, molecole sicuramente non tossiche e/o cancerogene. Più recentemente è stato preso in esame l' 1,4-butandiisocianato (BDI)²³. Si suppone infatti che dalla sua idrolisi si ottenga la corrispondente ammina (1,4-butandiammina, detta anche putrescina) una poliammina presente nell'organismo umano, essenziale per la crescita e differenziazione cellulare²⁴. E' stato inoltre osservato che i poliuretani derivanti da diisocianati alifatici sono idrolizzati più velocemente rispetto a quelli sintetizzati con diisocianati aromatici²⁵. I più comuni diisocianati usati nella sintesi di poliuretani sono riportanti nella tabella 1.2.3.a.

Tabella 1.2.3.a: comuni diisocianati usati nella sintesi di poliuretani

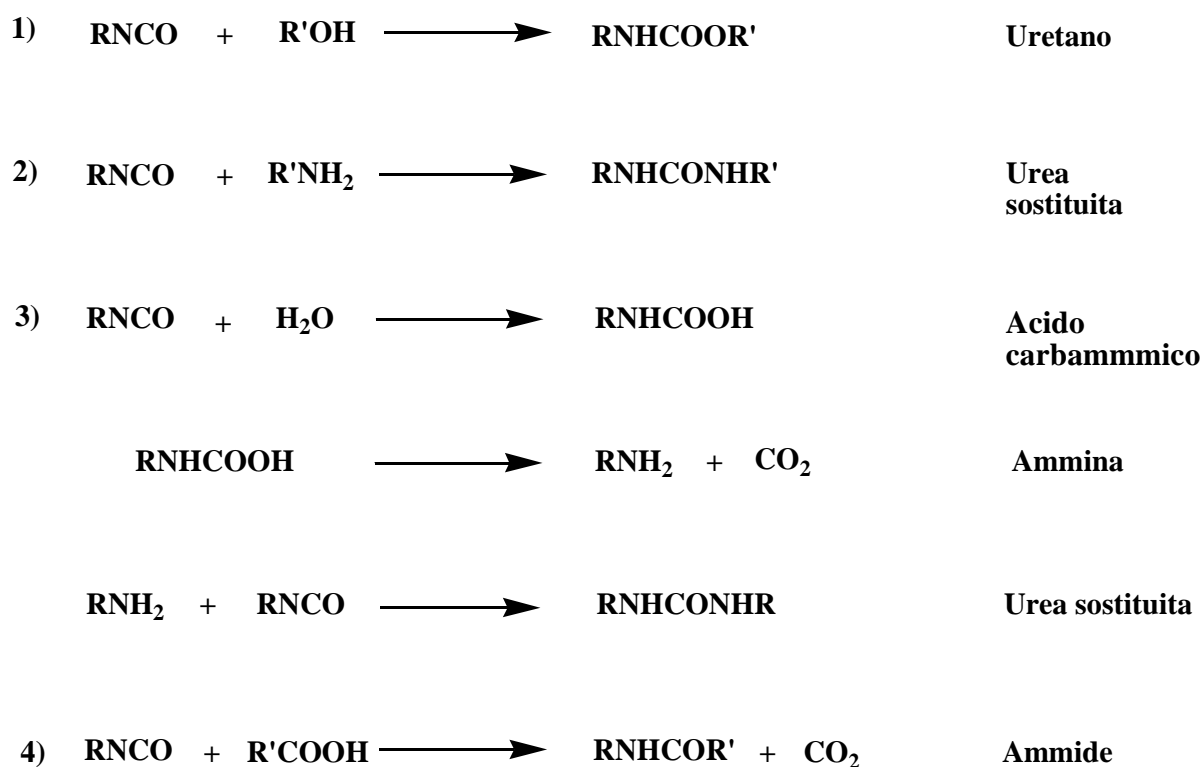
$\text{OCN}-(\text{CH}_2)_4-\underset{\text{COOEt}}{\text{CH}}-\text{NCO}$	etil-2,6-diisocianato esanoato (LDI)
$\text{OCN}-(\text{CH}_2)_4-\text{NCO}$	1,4-butandiisocianato (BDI)
$\text{OCN}-(\text{CH}_2)_6-\text{NCO}$	esametilendiisocianato (HDI)
	cicloesandiisocianato (CHDI)
	toluendiisocianato (TDI)
	metilen di-p-fenil diisocianato (MDI)

1.2.3.1 Cenni sulla chimica degli isocianati

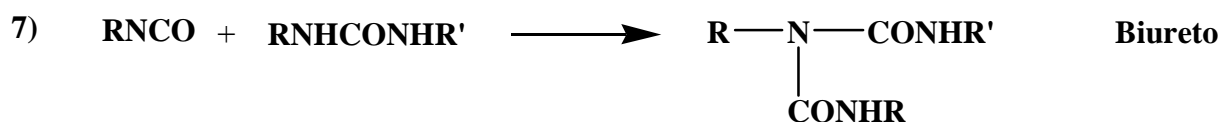
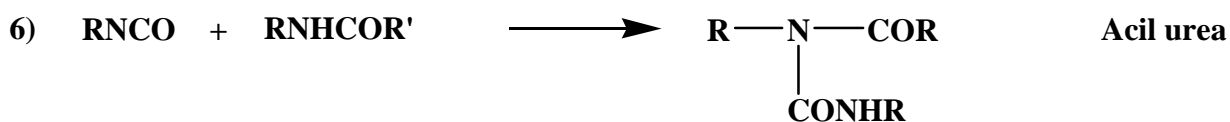
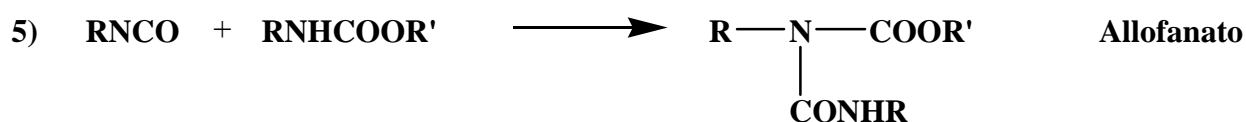
La reazione tra un isocianati con un composto contenente idrogeni attivi (HA) coinvolge formalmente un'addizione al doppio legame N=C del gruppo isocianato:



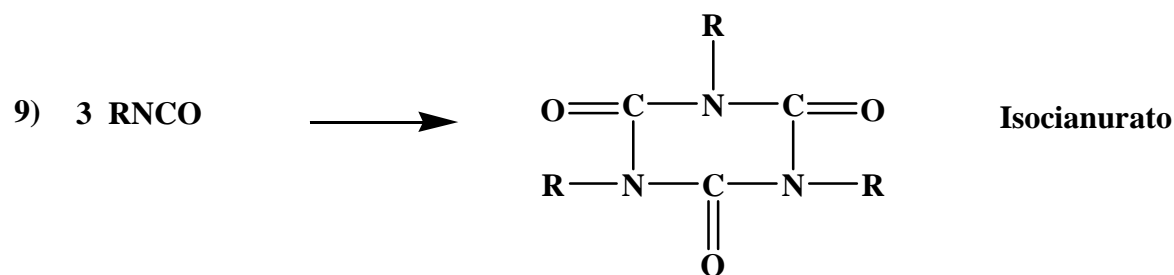
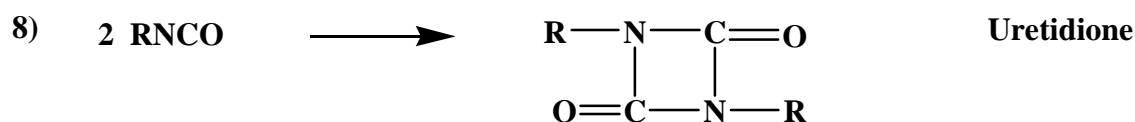
Nella maggior parte dei casi il prodotto di addizione è stabile, talvolta è solo moderatamente stabile per cui può decomporsi nei composti di partenza o evolvere in altri prodotti. Le reazioni più interessanti sono:



L'uretano, l'urea sostituita e l'ammide possono reagire con il gruppo isocianato secondo le reazioni:



Oltre che con composti contenenti idrogeni attivi, gli isocianati possono reagire con se stessi originando dimeri e trimeri:



Nelle reazioni 1-7 le reattività relative dei componenti contenenti idrogeni attivi sono, nell'ordine:

-NH₂ alifatico > -NH₂ aromatico > -OH primario > -OH secondario >
 -OH terziario > -OH aromatico > -COOH > RNHCONHR > RNHCOR >
 RNHCOOR

Le reazioni 1-7 possono essere condotte sia in assenza che in presenza di catalizzatori, quali ammine terziarie e sali di Stagno.

1.2.4 Catalizzatori

Esistono due classi principali di catalizzatori utilizzati nella produzione di poliuretani.

Una classe è costituita dalle ammine ed è principalmente usate nella fabbricazione di schiume.

Esistono inoltre catalizzatori organometallici, utilizzati per accelerare la formazione del legame uretanici. I più comuni catalizzatori organometallici sono stagno dibutil dilaurato e stagno ottanoato.

In particolare poliuretani utilizzati in campo biomedico sono normalmente sintetizzati usando stagno ottanoato, $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{CH}(\text{C}_2\text{H}_5)\text{COO}]_2\text{Sn}$, accettato dalla Food and Drug Administration come additivo nei cibi²⁶. Questo catalizzatore è inoltre in grado di promuovere la reazione degli isocianati con i dioli rispetto a quella con l'acqua.

1.2.5 Metodo di sintesi di elastomeri termoplastici poliuretanic

Si ottengono polimeri lineari da reagenti bifunzionali attraverso le reazioni 1) e 2) riportate nel paragrafo precedente.

Sono da evitare: la reazione 3), quindi occorre operare in condizioni anidre, e le reazioni 5), 6) e 7) che porterebbero alla formazione di prodotti reticolati.

La sintesi dei polimeri è stata da noi realizzata seguendo il metodo standard di sintesi in due stadi²⁷. Il primo stadio consiste nella formazione del prepolimero per reazione del macrodiolo con il diisocianato. Nel secondo stadio il prepolimero viene trasformato nel prodotto finale per reazione con l'estensore di catena.

Il prodotto finale è un polimero a struttura prevalentemente lineare, le cui catene risultano costituite dalla successione di lunghi segmenti flessibili e corti segmenti rigidi fra loro incompatibili. I segmenti rigidi a temperatura ambiente si aggregano tra di loro dando origine ad un reticolo labile alla temperatura di trasformazione ed in grado di funzionare in modo simile ai ponti intercatena delle gomme vulcanizzate²⁸.

In questo studio sono stati sintetizzati poliuretani usando diisocianati alifatici non tossici (prevalentemente LDI, ma anche HDI e BDI), come segmento soft PCL diolo e copolimeri a blocchi PCL-PEG-PCL e come estensori CDM e Phe-diestere.

In un precedente lavoro²⁹ sono stati sintetizzati e studiati poliuretani analoghi a quelli qui presi in esame (in particolare utilizzando LDI come diisocianato). Test di biodegradazione eseguiti su tali polimeri sia in soluzione tampone che in ambiente enzimatico hanno mostrato buoni risultati. In particolare le analisi hanno esibito un'elevata perdita in peso nel caso di poliuretani sintetizzati con Phe-diestere come estensore e utilizzando α -chimotripsina, ottenendo così

risultati in accordo con le previsioni. Questi polimeri risultavano però essere a basso peso molecolare per cui si è voluto ottimizzare la procedura di polimerizzazione al fine di incrementare la lunghezza delle catene e di ottenere così poliuretani aventi migliori proprietà, soprattutto dal punto di vista meccanico. Tali polimeri sono stati poi caratterizzati con differenti tecniche e sottoposti a prove di adesione/proliferazione cellulare per valutarne l'effettiva applicabilità nel soft tissue engineering.

1.2.6 Modifica di poliuretani

In letteratura sono presenti vari studi in cui poliuretani sono stati modificati al fine di migliorarne determinate caratteristiche, in particolare per quanto concerne la biocompatibilità/emocompatibilità. Questi polimeri sono ampiamente utilizzati nella realizzazione di protesi vascolari, cuori artificiali, cateteri, ma ,come molti altri materiali sintetici, risultano essere trombogenici. Numerose strategie di modifica sono state quindi prese in esame al fine di incrementarne l'emocompatibilità, ad esempio introducendo molecole quali eparina³⁰ e trombomodulina³¹.

Per differenti applicazioni è invece necessario migliorare l'adesione cellulare su tali materiali, in particolare può essere utile compiere opportune modifiche al fine di avere risposte diverse al variare dei ceppi cellulari presi in esame. Come precedentemente riportato, a tal fine possono essere inseriti componenti della matrice extracellulare, quali peptidi, proteine, fattori di crescita³². L'utilizzo di peptidi piuttosto che proteine è preferibile perché queste ultime, essendo estratte da tessuti animali, possono causare risposte infiammatorie quando impiantate.

Considerazioni differenti devono essere fatte nel caso in cui le modifiche siano compiute utilizzando poliamminoacidi basici quali polilisina, poliistidina e poliarginina: questi, a pH fisiologico, presentano i gruppi amminici delle catene laterali protonati. Quando tali macromolecole sono immobilizzate sulla superficie del polimero, si viene a formare un materiale che presenta cariche positive: queste interagiscono, a livello di legami di natura elettrostatica, con le membrane cellulari, le quali hanno una superficie recante cariche negative, incrementando in tal modo l'adesione cellulare^{33,34}.

Le modifiche dei poliuretani possono essere condotte mediante due strategie: modifica del bulk e modifica superficiale.

1.2.6.1 MODIFICA DEL BULK

La chimica dei poliuretani può essere variata fundamentalmente tramite due tecniche .

Il polimero può essere derivatizzato al fine di introdurre gruppi funzionali: ad es. in letteratura sono presenti studi in cui questa strategia è stata utilizzata per inserire gruppi ionici quali solfonati, carbossili, ammine terziarie¹⁶. In questo modo è possibile variare la natura chimico-fisica e le conseguenti interazioni superficiali del materiale.

L'altra possibilità è quella di usare differenti polioli, diisocianati o estensori di catena che incorporino particolari gruppi funzionali o molecole biologicamente attive³⁵. In questo lavoro di tesi sono stati sintetizzati una serie di estensori di catena nei quali sono stati inseriti, o ai quali possono essere legati, peptidi di particolare interesse biologico. In particolare sono state sintetizzate diammine nelle quali è stata introdotta la sequenza RGD e queste sono state utilizzate nella sintesi di poliuretani-uree. E' stata inoltre realizzata la sintesi di dioli funzionalizzati, anch'essi utilizzabili come estensori di catena.

1.2.4.2 MODIFICA SUPERFICIALE

Rispetto alla modifica del bulk, uno dei maggiori vantaggi della modifica superficiale è la possibilità di mantenere inalterate le caratteristiche meccaniche, le quali sono intimamente dipendenti dalla composizione chimica del polimero, mentre sono variate le caratteristiche interfacciali del materiale. Inoltre con questo tipo di modifica possono essere introdotti indifferentemente piccole molecole (ad es. peptidi) così come macromolecole (principalmente proteine e poliamminoacidi).

Generalmente mediante questa strategia si creano sulla superficie gruppi carbossilici o amminici che successivamente sono fatti reagire con proteine o peptidi, con conseguente formazione di un legame ammidico^{36,37}.

Attualmente modifiche superficiali vengono effettuate soprattutto tramite trattamento al plasma. Il plasma è definito come il quarto stato della materia ed è composto da gas parzialmente ionizzati costituito da elettroni, ioni, radicali liberi, fotoni, atomi e molecole nel loro stato fondamentale o eccitato. Attraverso esposizione al plasma, sulla superficie del polimero si vengono a formare radicali che possono reagire con monomeri in fase gassosa o liquida per dare le così dette "polimerizzazioni al plasma". Si vengono in questo modo a depositare sulla superficie del poliuretano film polimerici superficiali dallo spessore che può variare da diverse decine a varie migliaia di angstrom. Bisogna però notare che i film polimerici così formati sono chimicamente e fisicamente differenti dai polimeri convenzionali. La polimerizzazione al

plasma è essenzialmente un processo atomico e i polimeri risultano essere altamente ramificati e reticolati. Il vantaggio principale di questo tipo di polimerizzazione rispetto alle convenzionali, consiste nel fatto che avviene a temperature moderate.

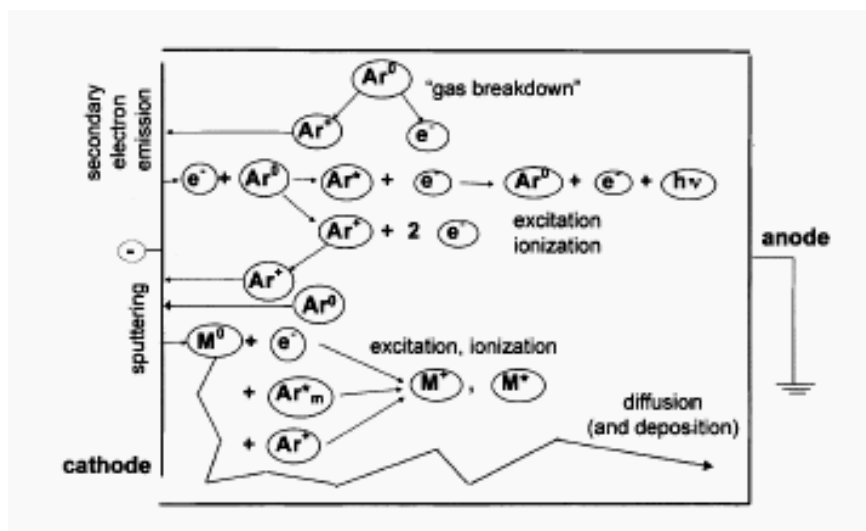


Fig. 1.2.4.2.1: Schema dei processi elementari che avvengono in un plasma a scarica a bagliore. Quando una differenza di potenziale è applicata tra due elettrodi, il gas (ad es. argon) viene ionizzato. Gli elettroni emessi danno luogo a collisioni che causano eccitazioni (generalmente seguiti da emissione, è per questo che viene chiamato “scarica a bagliore”) e ionizzazione (che crea nuovi elettroni e ioni per cui il plasma è un sistema che si autosostiene). Si vengono così a formare specie radicaliche reattive.

In questo lavoro di tesi film di poliuretano sono stati aggraffati con uno strato di acido poliacrilico, mediante trattamento al plasma. I gruppi carbossilici che si sono venuti così a creare sulla superficie, sono stati fatti reagire per formare legami ammidici con i gruppi amminici appartenenti a poli-L-lisina e gelatina.

Bibliografia:

¹ 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 **35**: 513-523 (1997).

² SMETANA K JR, VACÍK J.: *Anionic polymers for implantation* Ann N Y Acad Sci **831**: 95-100 (1997).

³ HAN YK, KWON JW, KIM JS, CHO CS, WEE WR, LEE JH: *In vitro and in vivo study of lens refilling with poloxamer hydrogel*. Br J Ophthalmol **87**: 1399-1402 (2003).

⁴ KIM JH, KIM SC: *PEO-grafting on PU/PS IPNs for enhanced blood compatibility-effect of pendant length and grafting density*. Biomaterials **23**: 2015-2025 (2002).

-
- ⁵ BERNACCA GM, STRAUB I, WHEATLEY DJ: Mechanical and morphological study of biostable polyurethane heart valve leaflets explanted from sheep. *J Biomed Mater Res* **61**: 138-145 (2002).
- ⁶ AHMED F, HATEGAN A, DISCHER DE, DISCHER BM: *Block copolymer assemblies with cross-link stabilization: from single-component monolayers to bilayer blends with PEO-PLA*. *Langmuir* **19**: 6505-6511 (2003).
- ⁷ PHOTOS PJ, BAČÁKOVÁ L, DISCHER B, BATES FS, DISCHER DE: *Polymer vesicles in vivo: correlations with PEG molecular weight*. *J Control Release* **90**: 323-334 (2003).
- ⁸ HUANG S, CHEN CS, INGBER DE: *Control of cyclin D1, p27(Kip1), and cell cycle progression in human capillary endothelial cells by cell shape and cytoskeletal tension*. *Mol Biol Cell* **9**: 3179-3193 (1998).
- ⁹ GARCIA AJ, VEGA MD, BOETTIGER D: *Modulation of cell proliferation and differentiation through substratedependent changes in fibronectin conformation*. *Mol Biol Cell* **10**: 785-798 (1999).
- ¹⁰ GROTH T, ALTANKOV G, KOSTADINOVA A, KRASTEVA N, ALBRECHT W, PAUL D: *Altered vitronectin receptor (αv integrin) function in fibroblasts adhering on hydrophobic glass*. *J Biomed Mater Res* **44**: 341-351 (1999).
- ¹¹ MOISEEVA EP: *Adhesion receptors of vascular smooth muscle cells and their functions*. *Cardiovasc Res* **52**: 372-386 (2001).
- ¹² RUOSLAHTI, E. AND PIERSCHBACHER, M. D., *New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins*. *Science*, 1987, **238** (491-497).
- ¹³ RUOSLAHTI, E., *RGD and other recognition sequences for integrins* *A. Rev. Cell. Dev. Biol.*, **12**, 697 (1996).
- ¹⁴ EDELMAN, J. M., DIMILLA, P. A. AND ALBELDA, S. M., in *The Integrin Cell Adhesion Molecules, Principles of Cell Adhesio.*, ed. P. Richardson and M. Steiner CRC Press, New York, 1995.
- ¹⁵ RUOSLAHTI, E., *Integrins* *J. Clin. Invest.*, 1991, **87**, 1-5.
- ¹⁶ G. A. SKARJA, K.A. WOODHOUSE, S.L. COOPER , *Polurethanes in biomedical application* CRC Press, Boca Raton, FL (1988)
- ¹⁷ E.A. SKJARA, K.A. WOODHOUSE, *Structure-property relationships of degradable polyurethane elastomers containing an amino acid-based chain extender* *J. Appl. Polym. Sci.* **75**, 1522 (2000)
- ¹⁸ G. A. SKARJA, K. A. WOODHOUSE, *Structure-Property Relationships of Degradable Polyurethane Elastomers Containing an Amino Acid-Based Chain Extender* *J. Biomater. Sci. Polym. Edn.* **9**, 271 (1998)

-
- ¹⁹ G. A. SKARJA AND K. A. WOODHOUSE, *Elastomeric biodegradable polyurethane blends for soft tissue applications* J. Biomater. Sci. Polym. Edn. **12**, 851 (2001)
- ²⁰ R. YODA, *Elastomers for biomedical applications*, J. Biomater. Sci. , Polymer Edn, **6**, 561 (1998)
- ²¹ GOGOLEWSKI S, PENNINGS AJ (1982) *Biodegradable materials of polylactides, 4 Porous biomedical materials based on mixtures of polylactides and polyurethanes*. Makromol Chem Rapid Commun **3**: 839-845.
- ²² P. BRUIN, G.J. VEENSTRA, NIJENHUIS, A.J. PENNINGS, *Design and synthesis of biodegradable poly(ester urethane) elastomer networks composed of non-toxic building blocks*. Makromol Chem Rapid Commun **9**, 589 (1998)
- ²³ C.J. SPAANS, J.H. DE GROOT, F.G. DEKENS, A.J. *High molecular weight polyurethane urea based on 1,4-butanediisocyanate* Polym Bull **41**,131 (1998)
- ²⁴ C.W. TABOR, H. TABOR *Polyammines* Ann. Rev.Biochem. **53**, 749 (1984)
- ²⁵ HAUNG, S. J., MACRI, C., ROBY, M., BENEDICT, C. AND CAMERON, J. A., *ACS Symp. Ser.*, 1981, **172**, 471.
- ²⁶ KIM SY, HAN YK, KIM YK, HONG SI (1992) *Multifunctional initiation of lactide polymerization by stannous octoate/pentaerythritol*. Makromol Chem **193**: 1623-1631.
- ²⁷ J. H. SAUNDERS , K.C. FRISH, *Polyurethanes: Chemistry and Technology, Part II*. Chap IX, p.299, Interscience Publishers, New York (1967)
- ²⁸ AIM, *Macromolecole Scienza e Tecnologia*, Vol. I, Cap.III, p. 572, Pacini Editore, Pisa (1982)
- ²⁹ G. CIARDELLI, A. RECHICHI, P. CERRAI, M. TRICOLI, N. BARBANI, P. GIUSTI *Segmented polyurethanes for medical application: synthesis, characterization and in vitro enzymatic degradation studies*. Macromolecular Symposia **218** 261 (2004)
- ³⁰ K. D. PARK, A. Z. PIAO, H. JACOBS, T. OKANO AND S. W. KIM, *J. Polym. Sci. Polym. Chem.* **29**, 1725 (1991). *
- ³¹ A. KISHIDA, Y. UENO, N. FUKUDOME, E. YASHIMA, I. MARUYAMA AND M. AKASHI, *Immobilization of human thrombomodulin onto poly(ether urethane urea) for developing antithrombogenic blood-contacting materials*, *Biomaterials* **15**, 848 (1994).
- ³² KIYOSHI DOI, TAKEHISA MATSUDA *Enhanced vascularization in a microporous polyurethane graft impregnated with basic fibroblast growth factor and heparin*, *J. Biomed. Mater. Res.* **34**, 361 (1997).
- ³³ EPHRAIM YAVIN, ZIVA YAVIN *Attachment and culture of dissociated cells from rat embryo cerebral hemispheres on polylysine-coated surface*. *The journal of cell biology*, **62**, 540-546 (1974).

³⁴ WALLACE L. McKEEHAN, RICHARD G. HAM, Stimulation of clonal growth of normal fibroblasts with substrata coated with basic polymers, *The journal of cell biology*, **71**, 727-734 (1976).

³⁵ HO-WOOK JUN and JENNIFER WEST, *Development of a YIGSR-peptide-modified polyurethaneurea to enhance endothelialization*. *J. Biomater. Sci. Polymer Edn*, Vol. 15, No. 1, pp. 73–94 (2004)

³⁶ INN-KYU KANG, OH HYEONG KWON, YOUNG MOO LEE, YONG KIEL SUNG, *Preparation and surface characterization of functional group-grafted and heparin-immobilized polyurethanes by plasma glow discharge*. *Biomaterials* **17** 841-847 (1996)

³⁷ JUNG-SOOK BAE, EUN-JIN SEO, INN-KYU KANG *Synthesis and characterization of heparinized polyurethanes using plasma glow discharge*. *Biomaterials* **20** 529-537 (1999)