



**UNIVERSITÀ DI PISA**

Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali

Corso di Laurea in Scienza dei Materiali

Tesi di Laurea

**PROGETTAZIONE E STUDIO DELLE  
CARATTERISTICHE DI AUTO-ORGANIZZAZIONE DI  
CORTI OLIGOPEPTIDI**

Andrea Desii

Relatore: Prof. Roberto Solaro

Controrelatore: Prof. Francesco Fusco

Anno Accademico 2007/2008



## RIASSUNTO

Il presente lavoro di tesi è stato finalizzato allo studio delle proprietà di auto-organizzazione di corti oligopeptidi ad alternanza di carica come modello delle interazioni tra polipeptidi e per il loro eventuale impiego nella produzione di materiali biomedici per ingegneria tissutale. A tale scopo sono stati selezionati 12 oligopeptidi con un numero di residui variabile tra 4 e 7. Ognuno di questi oligopeptidi era caratterizzato dalla presenza di residui acidi (acido glutammico o acido aspartico) e basici (lisina o arginina) alternati nella sequenza di aminoacidi a residui neutri. In tutti i casi, le estremità C-terminali ed N-terminali erano bloccate rispettivamente da funzionalità ammidiche e acetammidiche, in modo da evitare l'influenza dei gruppi carbossilici ed amminici terminali sulle proprietà degli oligopeptidi.

La valutazione preliminare della citotossicità degli oligopeptidi è stata effettuata secondo la norma ASTM ISO 10993-5 incubando fibroblasti embrionali murini in terreno di coltura standard contenente peptidi a diverse concentrazioni. I risultati ottenuti hanno mostrato che le molecole in esame sono non tossiche o poco tossiche almeno fino a concentrazioni di 20–30 g/L e quindi sono idonee ad applicazioni in campo biomedico.

La concentrazione di aggregazione critica (CAC) costituisce una misura della tendenza degli oligopeptidi ad auto-organizzarsi in soluzione. Pertanto la CAC è stata valutata mediante misure sia di diffusione della luce che di microviscosità. La dipendenza dell'intensità della luce diffusa da parte di soluzioni acquose acide di oligopeptide aventi concentrazioni comprese tra 20  $\mu\text{M}$  e 20 mM ha evidenziato per due oligopeptidi, RWDW ed RVDV, un brusco aumento di intensità rispettivamente a concentrazioni 0,4 mM e 3 mM. Analogamente è stato osservato un aumento significativo della viscosità di soluzioni di RWDW in tampone fosfato 50 mM a pH 3,5 a concentrazione superiore alla CAC. È stato inoltre verificato che sopra la CAC la viscosità della soluzione aumenta rapidamente nel tempo per raggiungere un valore stazionario dopo circa 2 ore. Questo andamento conferma che i processi di auto-organizzazione degli oligopeptidi sono particolarmente lenti e richiedono tempi dell'ordine delle ore per raggiungere l'equilibrio. Lo studio morfologico degli aggregati presenti in soluzione è stato eseguito attraverso scansioni con il microscopio a forza atomica (AFM) su campioni oligopeptidici depositati su mica da soluzioni in tampone fosfato a pH acido. Nel caso di RWDW le immagini AFM hanno evidenziato l'assenza di aggregati per concentrazioni inferiori alla CAC mentre attorno alla CAC compaiono lunghe fibrille ben separate e per concentrazioni più

alte si osserva un fitto intreccio di fibre. Un comportamento analogo è stato osservato nel caso di RVDV ed in misura minore di RADA. Nessuno degli altri oligopeptidi ha mostrato la formazione di strutture fibrillari. Misure AFM effettuate in condizioni simili su grafite pirolitica hanno fornito risultati analoghi, dimostrando che la formazione degli aggregati osservati non è dovuta ad interazioni ioniche con il substrato.

Sebbene il numero di oligopeptidi studiati sia troppo basso per potere proporre delle relazioni struttura-proprietà generalizzate, i risultati ottenuti dimostrano chiaramente che sia la tossicità che la tendenza all'auto-organizzazione dipendono in maniera rilevante da tipo e concatenamento degli amminoacidi.

Nel caso di RWDW è stata osservata la formazione di idrogeli dopo neutralizzazione ed aggiunta di ioni  $\text{Ca}^{2+}$ . Scansioni AFM hanno confermato che gli idrogeli erano costituiti da fibre intrecciate simili per dimensioni a quelle osservate sulla mica. Test di proliferazione cellulare effettuati mediante inoculo di cellule di epatoblastoma umano negli idrogeli hanno fornito risultati di proliferazione e di vitalità diversi in dipendenza delle modalità adottate per l'inclusione delle cellule all'interno degli idrogeli. Nonostante il carattere preliminare di questa indagine, i dati ottenuti suggeriscono un possibile impiego dell'oligopeptide RWDW nella preparazione di idrogeli iniettabili per applicazioni di ingegneria tissutale.