

Politecnico di Torino

Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica

A.A. 2020/2021

Sessione di Laurea luglio 2021

Caratterizzazione dell'adsorbimento di fibronectina e competizione con albumina su superfici in titanio per impianti ossei

Relatore:

Spriano Silvia

Co-relatori:

Barberi Jacopo

Napione Lucia

Candidato:

Mitillo Riccardo

Abstract

In campo medico, la risposta del corpo umano ai materiali impiantati è guidata dalle prime reazioni che intercorrono sulla superficie dell'impianto e che riguardano l'adsorbimento di proteine dai fluidi biologici come il sangue. Per i biomateriali impiantati in vivo, il layer proteico che si adsorbe sulla superficie dell'impianto costituisce l'interfaccia informazionale tra la cellula e il biomateriale ed è responsabile dell'attivazione di pathway metabolici che possono portare ad una buona integrazione o a reazioni avverse che sfociano in infiammazione cronica e fallimento dell'impianto. Fra le proteine che intervengono in questo processo, la fibronectina svolge un ruolo fondamentale nel guidare l'adesione cellulare grazie al legame che forma con le integrine di membrana. L'albumina è la proteina più abbondante nel plasma sanguigno, con proprietà di antiadesione cellulare utili nel modulare la risposta infiammatoria. Tra i materiali impiantati per sostituzione ossea, il titanio ha assunto particolare importanza. La grande biocompatibilità, dovuta alla formazione spontanea in aria e in ambiente acquoso di uno strato di ossido superficiale passivante, rende questo materiale la scelta d'elezione per gualsiasi dispositivo medico impiantabile per il quale siano necessarie le proprietà meccaniche di un metallo e sono richieste biostabilità e assenza di rischi biologici. Per queste ragioni in questo studio si è voluto caratterizzare l'adsorbimento di queste due proteine a concentrazioni simil fisiologiche su tre superfici: titanio puro, lega Ti-6Al-4V, lega Ti-6Al-4V trattata chimicamente per far crescere uno strato d'ossido nanoporoso sulla superficie per facilitare l'osteointegrazione e ridurre la facilità di formazione del biofilm. In particolare, si è indagato l'adsorbimento di fibronectina tramite diverse tecniche che permettono di valutare: la presenza della proteina (XPS, ATR-FTIR, SERS e misure in fluorescenza di proteine marcate); la stabilità del legame con la superficie e la conformazione assunta dalla proteina adsorbita (misure del potenziale zeta); la distribuzione della proteina sulla superficie e formazione di layer continui o cluster superficiali (KPFM). Le misure di potenziale zeta e in fluorescenza sono state poi usate per valutare la competizione tra la fibronectina e l'albumina nel processo di adsorbimento. Sono stati eseguiti un adsorbimento seguenziale di proteine (prima una poi l'altra e viceversa) e un adsorbimento competitivo contemporaneo. Infine, è stato condotto uno studio di bioattività in vitro sulla lega di titanio trattata chimicamente, di cui si conosce già la bioattività (precipitazione in vitro di idrossiapatite) da studi precedenti, cercando di mimare al meglio l'ambiente fisiologico tramite l'aggiunta di albumina alla soluzione che simula i componenti inorganici del plasma umano. I campioni sono stati osservati al FESEM-EDS per individuare l'eventuale presenza di idrossiapatite. I risultati mostrano come l'adsorbimento dipenda dal tipo di substrato, con la lega trattata chimicamente che adsorbe più proteina, e gli adsorbimenti sequenziali sembrerebbero risultare dominati dalla prima proteina che viene a contatto con la superficie, sia essa fibronectina o albumina, e che limita successivi adsorbimenti. Inoltre, la presenza di albumina in soluzione sembra inibire la crescita del deposito di apatite sul campione.

Indice

1.1. Gli amminoacidi 1 1.2. Il legame peptidico 4 1.3. Livelli strutturali delle proteine 8 1.3.1. Struttura primaria 8 1.3.2. Struttura secondaria 8 1.3.3. Struttura terziaria 11 1.3.4. Struttura quaternaria 13 1.3.5. Classificazione strutturale delle proteine 14 1.4. Fibronectina 15 1.4.1. Fibronectina 15 1.4.2. Albumina 21 2. ADSORBIMETO PROTEICO SU SUPERFICI SOLIDE 26 2.1. Definizione 26 2.2. Ruolo biologico e ingegneristico 27 2.3.1. Influenza delle proprietà superficiali del substrato 29 2.3.2. Influenza delle proprietà delle proteine sull'adsorbimento 33	1. LE	PROTEINE						
1.2. II legame peptidico 4 1.3. Livelli strutturali delle proteine 8 1.3.1. Struttura primaria 8 1.3.2. Struttura secondaria 8 1.3.3. Struttura terziaria 11 1.3.4. Struttura quaternaria 13 1.3.5. Classificazione strutturale delle proteine 14 1.4. Fibronectina e albumina 15 1.4.1. Fibronectina 15 1.4.2. Albumina 21 2. ADSORBIMETO PROTEICO SU SUPERFICI SOLIDE 26 2.1. Definizione 26 2.2. Ruolo biologico e ingegneristico 26 2.3. Caratteristiche dell'adsorbimento 27 2.3.1. Influenza delle proprietà superficiali del substrato 22 2.3.2. Influenza delle proprietà delle proteine sull'adsorbimento 33	1.1.	Gli a	Gli amminoacidi1					
1.3. Livelli strutturali delle proteine 8 1.3.1. Struttura primaria 8 1.3.2. Struttura secondaria 8 1.3.3. Struttura terziaria 11 1.3.4. Struttura quaternaria 13 1.3.5. Classificazione strutturale delle proteine 14 1.4. Fibronectina e albumina 15 1.4.1. Fibronectina 15 1.4.2. Albumina 21 2. ADSORBI METO PROTEICO SU SUPERFICI SOLIDE 26 2.1. Definizione 26 2.2. Ruolo biologico e ingegneristico 26 2.3. Caratteristiche dell'adsorbimento 27 2.3.1. Influenza delle proprietà superficiali del substrato 29 2.3.2. Influenza delle proprietà delle proteine sull'adsorbimento 33	1.2.	II leg	l legame peptidico					
1.3.1. Struttura primaria 8 1.3.2. Struttura secondaria 8 1.3.3. Struttura terziaria 11 1.3.4. Struttura quaternaria 13 1.3.5. Classificazione strutturale delle proteine 14 1.4. Fibronectina e albumina 15 1.4.1. Fibronectina 15 1.4.2. Albumina 21 2. ADSORBI METO PROTEICO SU SUPERFICI SOLIDE 26 2.1. Definizione 26 2.2. Ruolo biologico e ingegneristico 26 2.3. Caratteristiche dell'adsorbimento 27 2.3.1. Influenza delle proprietà superficiali del substrato 29 2.3.2. Influenza delle proprietà delle proteine sull'adsorbimento proteico 32 2.3.3. Influenza delle proprietà delle proteine sull'adsorbimento 33	1.3.	Livel	lli strutturali delle proteine	8				
1.3.2. Struttura secondaria 8 1.3.3. Struttura terziaria 11 1.3.4. Struttura quaternaria 13 1.3.5. Classificazione strutturale delle proteine 14 1.4. Fibronectina e albumina 15 1.4.1. Fibronectina 15 1.4.2. Albumina 21 2. ADSORBIMETO PROTEICO SU SUPERFICI SOLIDE 26 2.1. Definizione 26 2.2. Ruolo biologico e ingegneristico 26 2.3. Caratteristiche dell'adsorbimento 27 2.3.1. Influenza delle proprietà superficiali del substrato 29 2.3.2. Influenza delle proprietà delle proteine sull'adsorbimento 33	1.3	3.1.	Struttura primaria	8				
1.3.3. Struttura terziaria 11 1.3.4. Struttura quaternaria 13 1.3.5. Classificazione strutturale delle proteine 14 1.4. Fibronectina e albumina 15 1.4.1. Fibronectina 15 1.4.2. Albumina 15 1.4.2. Albumina 21 2. ADSORBI METO PROTEICO SU SUPERFICI SOLIDE 26 2.1. Definizione 26 2.2. Ruolo biologico e ingegneristico 26 2.3. Caratteristiche dell'adsorbimento 27 2.3.1. Influenza delle proprietà superficiali del substrato 29 2.3.2. Influenza delle proprietà delle proteine sull'adsorbimento 33	1.3	3.2.	Struttura secondaria	8				
1.3.4. Struttura quaternaria 13 1.3.5. Classificazione strutturale delle proteine 14 1.4. Fibronectina e albumina 15 1.4.1. Fibronectina 15 1.4.2. Albumina 21 2. ADSORBIMETO PROTEICO SU SUPERFICI SOLIDE 26 2.1. Definizio ne 26 2.2. Ruolo biologico e ingegneristico 26 2.3. Caratteristiche dell'adsorbimento 27 2.3.1. Influenza delle proprietà superficiali del substrato 29 2.3.2. Influenza delle proprietà delle proteine sull'adsorbimento 33 2.3.3. Influenza delle proprietà delle proteine sull'adsorbimento 33	1.3	3.3.	Struttura terziaria1	L1				
1.3.5. Classificazione strutturale delle proteine 14 1.4. Fibronectina e albumina 15 1.4.1. Fibronectina 15 1.4.2. Albumina 21 2. ADSORBIMETO PROTEICO SU SUPERFICI SOLIDE 26 2.1. Definizio ne 26 2.2. Ruolo biologico e ingegneristico 26 2.3. Caratteristiche dell'adsorbimento 27 2.3.1. Influenza delle proprietà superficiali del substrato 29 2.3.2. Influenza dei parametri esterni sull'adsorbimento proteico 32 2.3.3. Influenza delle proprietà delle proteine sull'adsorbimento 33	1.3	3.4.	Struttura quaternaria1	L3				
1.4. Fibronectina e albumina 15 1.4.1. Fibronectina 15 1.4.2. Albumina 21 2. ADSORBIMETO PROTEICO SU SUPERFICI SOLIDE 26 2.1. Definizio ne 26 2.2. Ruolo biologico e ingegneristico 26 2.3. Caratteristiche dell'adsorbimento 27 2.3.1. Influenza delle proprietà superficiali del substrato 29 2.3.2. Influenza dei parametri esterni sull'adsorbimento proteico 32 2.3.3. Influenza delle proprietà delle proteine sull'adsorbimento 33	1.3	3.5.	Classificazione strutturale delle proteine1	14				
1.4.1.Fibronectina151.4.2.Albumina212.ADSORBI METO PROTEICO SU SUPERFICI SOLIDE262.1.Definizione262.2.Ruolo biologico e ingegneristico262.3.Caratteristiche dell'adsorbimento272.3.1.Influenza delle proprietà superficiali del substrato292.3.2.Influenza dei parametri esterni sull'adsorbimento proteico322.3.3.Influenza delle proprietà delle proteine sull'adsorbimento33	1.4.	Fibro	onectina e albumina1	٤5				
1.4.2.Albumina212.ADSORBIMETO PROTEICO SU SUPERFICI SOLIDE262.1.Definizio ne262.2.Ruolo biologico e ingegneristico262.3.Caratteristiche dell'adsorbimento272.3.1.Influenza delle proprietà superficiali del substrato292.3.2.Influenza dei parametri esterni sull'adsorbimento proteico322.3.3.Influenza delle proprietà delle proteine sull'adsorbimento33	1.4	4.1.	Fibronectina1	٤5				
2. ADSORBIMETO PROTEICO SU SUPERFICI SOLIDE 26 2.1. Definizio ne 26 2.2. Ruolo biologico e ingegneristico 26 2.3. Caratteristiche dell'adsorbimento 27 2.3.1. Influenza delle proprietà superficiali del substrato 29 2.3.2. Influenza dei parametri esterni sull'adsorbimento proteico 32 2.3.3. Influenza delle proprietà delle proteine sull'adsorbimento 33	1.4	4.2.	Albumina2	21				
2.1. Definizio ne 26 2.2. Ruolo biologico e ingegneristico 26 2.3. Caratteristiche dell'adsorbimento 27 2.3.1. Influenza delle proprietà superficiali del substrato 29 2.3.2. Influenza dei parametri esterni sull'adsorbimento proteico 32 2.3.3. Influenza delle proprietà delle proteine sull'adsorbimento 33	2. AD	SORBI	METO PROTEICO SU SUPERFICI SOLIDE	26				
2.2. Ruolo biologico e ingegneristico 26 2.3. Caratteristiche dell'adsorbimento 27 2.3.1. Influenza delle proprietà superficiali del substrato 29 2.3.2. Influenza dei parametri esterni sull'adsorbimento proteico 32 2.3.3. Influenza delle proprietà delle proteine sull'adsorbimento 33	2.1.	Defi	nizio ne	26				
 2.3. Caratteristiche dell'adsorbimento	2.2.	Ruol	lo biologico e ingegneristico2	26				
 2.3.1. Influenza delle proprietà superficiali del substrato	2.3.	Cara	atteristiche dell'adsorbimento2	27				
 2.3.2. Influenza dei parametri esterni sull'adsorbimento proteico	2.3	3.1.	Influenza delle proprietà superficiali del substrato2	<u>29</u>				
2.3.3. Influenza delle proprietà delle proteine sull'adsorbimento	2.3	3.2.	Influenza dei parametri esterni sull'adsorbimento proteico	32				
	2.3	3.3.	Influenza delle proprietà delle proteine sull'adsorbimento	33				
2.3.4. Comportamento della singola proteina	2.3	3.4.	Comportamento della singola proteina	35				
3. MATERIALI E PROTEINE DI INTERESSE: Il titanio e le sue leghe, l'adsorbimento di albumina e fibropectina	3. MA	ATERIA	LI E PROTEINE DI INTERESSE: Il titanio e le sue leghe, l'adsorbimento di albumina e	11				
3.1 Titanio nuro e leghe di titanio 41	3 1	Titar	nio nuro e leghe di titanio	*± 11				
3.2 Applicazioni biomedicali: uso del titanio e delle sue leghe	3.1.	.1. Intanio puro e legne di titanio						
3.3 Comportamento in ambiente biologico	3.2.	Com	nortamento in ambiente biologico	12				
3.4 Adsorbimento di albumina e fibronectina su superfici in titanio	3.7	Adeashimento di albumina a fibro postina di successfici in titaria						
4 TEST DI BIOATTIVITA' IN VITRO 64	. J. ч.							
5 MATERIALLE METODI	5 MA							
5.1 Preparazione dei campioni: taglio e lucidatura	5.1							
5.2 Lavaggio	5.2	Lava		58				
5.3 Trattamento chimico	5.3	Tratt	tamento chimico	59				
5.4 Protocollo di adsorbimento proteico 71	54	Prot	ocollo di adsorbimento proteico	71				
5.5. Protocollo per lo studio di bioattività in soluzione proteica 73	5,5	Prote	ocollo per lo studio di bioattività in soluzione proteica	73				
5.6. Spettroscopia fotoelettronica a raggi X (XPS)	5.6	Snet	troscopia fotoelettronica a raggi X (XPS)	74				

5.7.	Mi	icroscopia a forza atomica (AFM) e Kelvin Probe Force Microscopy (KPFM)	76				
5.8.	Mi	Misure in fluorescenza					
5.	8.1.	Acquisizione di immagine in fluorescenza tramite ChemiDoc MP Imaging Sy	′stem80				
5.	8.2.	Microscopia in fluorescenza	81				
5.9.	Mi	isure di potenziale ζ della proteina in soluzione	81				
5.10		Misure di potenziale ζ di superfici solide	85				
5.11		Misure di bagnabilità					
5.12		Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier a riflettanza totale attenuta 89	(ATR-FTIR)				
5.13		Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS)	91				
5.14		Osservazioni FESEM-EDS dei campioni di bioattività	95				
6. RI	6. RISULTATI E DISCUSSIONE						
6.1.	Ca	aratterizzazione dell'adsorbimento di fibronectina					
6.	1.1.	Quantifica della proteina adsorbita					
6.	1.2.	Distribuzione della proteina in superficie					
6.	1.3.	Interazioni della proteina col substrato e modifiche conformazionali					
6.2.	Со	ompetizione nell'adsorbimento di fibronectina e albumina					
6.	2.1.	Adsorbimento di albumina					
6.	2.2.	Adsorbimento competitivo					
6.3.	An	ngolo di contatto					
6.4.	Stu	udio di bioattività in vitro	151				
7. CC	ONCL	USIONI					
BIBLIO	GRAF	IA					

1. LE PROTEINE

Le proteine sono macromolecole biologiche di cui gli amminoacidi costituiscono le unità fondamentali, uniti tramite particolari legami chimici detti legami peptidici¹. Rappresentano circa il 50% della massa secca dei tessuti dei vertebrati, e ne sono infatti il composto organico più abbondante². Hanno un ruolo importantissimo in molti processi vitali, in base alla funzione che svolgono possono essere identificate come:

- enzimi, agiscono da catalizzatori;
- proteine di trasporto, trasportano o conservano altre molecole come ossigeno;
- proteine strutturali, forniscono supporto meccanico;
- anticorpi, forniscono protezione immunitaria;
- proteine contrattili, generano movimento;
- canali ionici, pompe di trasporto, permettono la trasmissione di impulsi;
- fattori di crescita, controllano la crescita e il differenziamento.

In questa prima parte si vuole fornire una descrizione concisa delle proteine, senza la pretesa di raggiungere una trattazione fine di tuti gli aspetti che le interessano. Partendo dal principio, si considerano quindi quelli che sono i costituenti, "mattoni" fondamentali delle proteine: gli amminoacidi. Un altro modo comunemente usato per identificare un insieme ristretto di amminoacidi è la parola peptide. La proteina, polimero formato da successione di peptidi, viene perciò anche detta polipeptide o catena polipeptidica³, anche se comunemente viene effettuata una distinzione in base alla lunghezza della catena, prevedendo la denominazione di proteina per i complessi più grandi. Non è raro, perciò, sentir parlare ad esempio di catene polipeptidiche che si ripetono in una proteina.

1.1. Gli amminoacidi

Gli amminoacidi che compongono le proteine sono costituiti da un atomo di carbonio centrale (C), detto carbonio α , a cui sono legati un gruppo carbossilico (-COOH), un gruppo amminico (-NH₂), un atomo di idrogeno (H) e una catena laterale identificata dal gruppo R come mostrato in Figura 1. L'atomo di carbonio α viene detto stereocentro.



Figura 1: struttura di un amminoacido

Data la disposizione a tetraedro dei gruppi intorno l'atomo C, gli α -amminoacidi sono molecole chirali, cioè non sovrapponibili alla propria immagine speculare, proprietà che le rende prive di piani di simmetria (ad eccezione della glicina che ha due atomi di H legati al C stereocentrico). Per rappresentare gli amminoacidi si ricorre spesso alle proiezioni di Fischer, sul piano viene disposto il gruppo carbossilico in alto e la catena laterale R in basso. Completando la disposizione dei gruppi intorno al C, se il gruppo amminico risulta a sinistra all'amminoacido viene attribuita la configurazione L^{1,4} (Figura 2).



Figura 2: rappresentazione di Fischer di due generici amminoacidi L e D

In natura esistono 20 amminoacidi diversi, e la catena laterale R si diversifica per dimensioni, carica, capacità di formare legami H e reattività chimica. Gli amminoacidi possono essere classificati in cinque classi principali sulla base delle proprietà dei gruppi R, utilizzando in particolare la loro polarità, cioè la loro tendenza ad interagire con l'acqua a pH fisiologico. Il gruppo R può essere alifatico non polare, aromatico, polare non carico, carico positivamente o carico negativamente (Figura 3).

Amminoacido				gruppo R	Amminoacid	0		gruppo R
	alanina	ala	А	alifatico, non polare	asparagina	asn	Ν	polare, non carico
	glicina	GLY	G	alifatico, non polare	cisteina	cys	С	polare, non carico
	isoleucina	ile	Т	alifatico, non polare	glutammina	gln	Q	polare, non carico
	leucina	leu	L	alifatico, non polare	serina	ser	S	polare, non carico
	metionina	met	Μ	alifatico, non polare	treonina	thr	Т	polare, non carico
	prolina	pro	Ρ	alifatico, non polare	arginina	arg	R	carico positivamente
	valina	val	V	alifatico, non polare	istidina	his	н	carico positivamente
	fenilalanina	phe	F	aromatico	lisina	lys	К	carico positivamente
	triptofano	try	W	aromatico	acido aspartico	asp	D	carico negativamente
	tirosina	tyr	Y	aromatico	acido glutammico	glu	Е	carico negativamente

Figura 3: nome, codice a tre e una lettera degli amminoacidi, raggruppatiper le caratteristiche chimiche del gruppo R: giallo per alifatico, non polare; verde per aromatico; azzurro per polare, non carico; blu per carico positivamente; rosso per carico neaativamente

Gli amminoacidi in soluzione a pH neutro sono in genere ioni dipolari (o zwitterioni). Gli zwitterioni sono molecole che hanno al contempo regioni di carica positiva e negativa⁴. Nella forma dipolare il gruppo amminico è protonato ($-NH_3^+$), mentre il gruppo carbossilico è dissociato ($-COO^-$). Lo stato di ionizzazione di un amminoacido varia con il pH (Figura 4):

-in soluzione acida (ad esempio, pH intorno a 1), il gruppo carbossilico non è ionizzato (-COOH) mentre quello amminico è ionizzato $(-NH_{3}^{+});$ -aumentando il pH, il gruppo carbossilico è il primo a cedere un protone poiché ha valore della costante di dissociazione acida (pKa) intorno а 2; -la forma dipolare persiste fino a pH intorno a 9, quando il gruppo amminico ionizzato inizia a cedere un protone.

La struttura ionica dipolare degli amminoacidi giustifica sia le proprietà fisiche, che si determinano nello stato solido cristallino (alti punti di fusione e solubilità in acqua, ma non nei solventi apolari), che le proprietà chimiche, che si identificano nel loro comportamento anfotero. Infatti, gli amminoacidi possono reagire sia con acidi che con basi: in una soluzione basica si comportano come acidi, cedendo un protone H⁺ e trasformandosi in anione con carica elettrica *-e*; in una soluzione acida si comportano da basi, accettando un protone e trasformandosi in un catione con carica elettrica *+e* (*e* rappresenta la carica fondamentale dell'elettrone).

È evidente quindi che la carica di un amminoacido è funzione del pH della soluzione:

-ad alti valori di pH, la carica è negativa e l'amminoacido è presente nella forma anionica, ovvero deprotonata;

-a bassi valori di pH, la carica è positiva e l'amminoacido è presente nella forma cationica, ovvero protonata.

Ad un dato valore di pH, detto punto isoelettrico (IEP dall'inglese isoelectric point), l'amminoacido ha una forma ionica dipolare e carica complessivamente uguale a zero. A valori di pH inferiori al IEP l'amminoacido si presenta nella forma protonata (carica positiva), mentre a valori superiori nella forma deprotonata (carica negativa). Allo stesso modo le proteine, ad un determinato valore di pH, avranno un equilibrio tra le cariche positive e negative dovute alla presenza del residuo carbossi-terminale, ammino-terminale e catene laterali ionizzabili dei singoli amminoacidi che le compongono. Quel valore di pH determina il punto isoelettrico della proteina, al quale la carica globale della biomolecola in soluzione può considerarsi nulla^{1,4}.



Figura 4: forma protonata, zwitterionica e deprotonata di un amminoacido, dipendenza dal pH⁵

1.2. Il legame peptidico

Il legame peptidico si forma quando il gruppo α -carbossilico di un amminoacido reagisce con il gruppo α -amminico di un altro amminoacido. È un legame covalente che nasce da una reazione di condensazione, perciò la formazione del legame peptidico prevede la perdita di una molecola d'acqua³ (Figura 5). L'equilibrio della reazione è spostato verso l'idrolisi, perciò la sintesi di legami peptidici richiede l'immissione di energia libera nel sistema. Tuttavia, i legami peptidici sono cineticamente stabili¹. L'unione di più amminoacidi tramite legami peptidici permette la formazione della catena polipeptidica che costituisce la proteina, con i singoli amminoacidi che vengono chiamati residui.

Una catena polipeptidica è polare perché le sue estremità sono differenti: ad una estremità vi è il gruppo α -amminico, all'altra un gruppo α -carbossilico. Per convenzione il terminale amminico viene considerato l'inizio della catena polipeptidica e quindi la sequenza di amminoacidi si scrive a partire dal residuo ammino-terminale². Una catena polipeptidica consiste di una parte che si ripete regolarmente (catena principale o scheletro covalente) e di una parte variabile che comprende le catene laterali caratteristiche di ciascun amminoacido. La catena principale è ricca di gruppi che possono formare legami a idrogeno (ogni residuo contiene un gruppo carbonilico –C=O ed un gruppo -NH⁻ che interagiscono tra loro e con i gruppi funzionali delle catene laterali per stabilizzare particolari strutture).



Figura 5: formazione di un legame peptidico tra due amminoacidi con perdita di una molecola d'acqua¹

Il legame peptidico è rigido e planare⁴. Considerando una coppia di amminoacidi uniti da legame peptidico, vengono a trovarsi sei atomi sullo stesso piano: l'atomo di carbonio α ed il gruppo

carbonilico di un amminoacido ed il gruppo -NH e l'atomo di carbonio α del secondo amminoacido. Inoltre, il legame è privo di carica e può assumere due configurazioni: trans se i due atomi di carbonio α si trovano in posizione opposta rispetto al legame peptidico, cis se i due atomi di carbonio α si trovano dalla stessa parte rispetto al legame peptidico. Tutti i legami peptidici nelle proteine sono nella configurazione trans¹. In questo modo sono minimizzate le interferenze steriche tra i gruppi uniti agli atomi di carbonio α e le proteine possono organizzarsi in strutture globulari molto compatte.

Il legame peptidico ha inoltre caratteristiche di doppio legame. La rotazione intorno al legame, infatti, non è permessa e questo restringe le conformazioni possibili dello scheletro covalente e determina la planarità del legame. Al contrario, i legami tra il carbonio α ed il carbonio del carbonile e quello tra il carbonio α e l'atomo di azoto consentono rotazioni che permettono alle proteine di ripiegarsi in modi diversi. In Figura 6 sono rappresentati gli angoli di legame del legame peptidico. L'angolo di rotazione attorno al legame tra l'azoto e l'atomo di carbonio α è detto phi(ϕ), mentre quello tra il carbonio α e l'atomo di carbonio carbonilico è detto psi(ψ).



Figura 6: rappresentazione degli angoli di legame nel legame peptidico. φ rotazione attorno al legame tra N e C- α ; ψ rotazione attorno al legame tra C carbonilico e C- α^{1}

Non tutte le combinazioni di $\phi \in \psi$ sono permesse, molte sono precluse da ingombri sterici. I valori permessi sono riportati in un grafico detto grafico di Ramachandram. In Figura 7 viene riportato il

grafico con indicazione delle strutture secondarie derivanti dalle varie combinazioni di angoli, di cui si parlerà in seguito.



Figura 7: grafico di Ramachandram con indicazione delle strutture secondarie⁶

1.3. Livelli strutturali delle proteine

1.3.1. Struttura primaria

Una proteina ha una sequenza di amminoacidi precisamente definita ed unica detta struttura primaria. Questa è determinata geneticamente, infatti dalla sequenza di nucleotidi del DNA si ottiene una sequenza di nucleotidi complementare nell' RNA grazie all'opera di trascrizione, che a sua volta determina la sequenza amminoacidica della proteina dopo la traduzione. In particolare, ciascun amminoacido è codificato da una o più sequenze specifiche di tre nucleotidi. La struttura primaria determina la struttura tridimensionale delle proteine; conoscerla è fondamentale nello studio delle patologie, infatti i requisiti strutturali che permettono ad una proteina di adempiere al proprio ruolo fisiologico sono molto stringenti. Alterazioni nella sequenza degli amminoacidi possono produrre anomalie funzionali e insorgenza di malattie^{1,2}.

1.3.2. Struttura secondaria

Brevi sequenze di amminoacidi di una proteina possono organizzarsi in una struttura che si ripete regolarmente ed in modo ricorrente nello spazio lungo la catena polipeptidica dando vita alla struttura secondaria. In questa struttura si riconoscono diverse disposizioni tridimensionali degli amminoacidi:

- α-elica
- foglietto-β (β-sheet)
- Random coil

ed altre strutture a cui ci si riferisce come strutture supersecondarie, che permettono il ripiegarsi della proteina e danno vita a un gran numero di configurazioni:

- Ripiegamenti β (β-turn)
- Ansa Ω

α-elica

L' α -elica si presenta come una struttura a forma di bastoncino in cui la parte interna è formata dalla catena polipeptidica principale, mentre le catene laterali si estendono verso l'esterno con un andamento a spirale. L' α -elica è stabilizzata da legami idrogeno tra i gruppi -NH ed i gruppi -CO: il gruppo -CO di ciascun amminoacido è unito da legame idrogeno al gruppo -NH dell'amminoacido che si trova quattro residui più avanti nella sequenza. Ciascun residuo è spostato rispetto al precedente di 1.5 Å lungo l'asse dell'elica. Per ogni giro dell'elica ci sono 3.6 residui amminoacidici⁴ (Figura 8). L'elica ha un passo di 5.4 Å. Il senso di avvitamento dell'elica può essere destrogiro (orario) o levogiro (antiorario). L'elica destrogira è molto più favorita dal punto di vista energetico poiché presenta meno

impedimenti sterici tra le catene laterali e la catena principale, infatti tutte le α -eliche nelle proteine sono destrogire¹.

Foglietto-β

La struttura a foglietto- β è una struttura planare che si instaura quando nella catena polipeptidica ci sono porzioni che si legano a quelle vicine tramite legami a idrogeno, che interessano i gruppi -NH e -CO di amminoacidi che si ritrovano affiancati su uno stesso piano². Catene adiacenti di una struttura β possono avere la stessa direzione (foglietto β parallelo) o direzione opposta (foglietto β antiparallelo) mentre i gruppi R dei vari amminoacidi si trovano alternativamente sopra e sotto al piano (Figura 9). Una catena polipeptidica a foglietto- β è quasi completamente estesa invece di essere strettamente avvolta, come accade nell' α -elica. La distanza tra amminoacidi adiacenti nel foglietto β è 3.5 Å, invece degli 1.5 Å dell' α -elica¹. I foglietti β più comuni comprendono tipicamente 4 o 5 catene, ma possono contenere anche più di 10 catene; essi possono essere paralleli, antiparalleli o misti.



Figura 8: rappresentazione di una α -elica¹



Figura 9: strutture foglietto- β , (a) foglietto antiparallelo e (b) foglietto parallelo, con indicazione della direzione Ntemrinale \rightarrow C-terminale. Atomi di C: pallini neri; atomi di O: pallini rossi; atomi di N: pallini blu; atomi di H: pallini bianchi⁷

Random coil

La struttura random coil, detta anche a gomitolo statistico, è una struttura non ripetitiva e non organizzata. Questo però non significa che la catena segua un orientamento completamente casuale, ma che tende ad adottare la disposizione spaziale degli amminoacidi che la compongono più favorevole dal punto di vista termodinamico². Questa struttura è tipica di proteine sottoposte all'effetto di agenti denaturanti che hanno perso quindi la funzionalità biologica.

Ripiegamenti β e anse Ω

Per permettere alle proteine di assumere forme globulari e compatte come avviene nella maggior parte dei casi, la catena principale deve effettuare numerosi cambiamenti di direzione. Molte di queste inversioni di direzione sono dovute a ripiegamenti β stabilizzati da legami a idrogeno. Ipotizzando di assegnare ad un amminoacido con un numero i, il gruppo -CO del residuo i-esimo crea un legame a idrogeno con il gruppo -NH del residuo i+3, come mostrato in Figura 10. In altri casi le inversioni di struttura avvengono mediante anse Ω . Le inversioni e le anse si trovano sempre nella parte più esterna delle proteine e quindi partecipano spesso alle interazioni delle proteine con altre molecole¹.



Figura 10: rappresentazione di ripiegamento β^4

1.3.3. Struttura terziaria

La conformazione tridimensionale assunta da una proteina definisce la sua struttura terziaria ed è indispensabile per l'attività biologica della proteina stessa. Mentre la struttura secondaria si riferisce alla disposizione spaziale di residui amminoacidici adiacenti in un segmento di polipeptide, la struttura terziaria tiene conto delle relazioni a lungo raggio nella sequenza amminoacidica. Gli amminoacidi lontani e che fanno parte anche di strutture secondarie diverse possono quindi interagire nella struttura terziaria. Le forze responsabili del mantenimento di questa struttura sono di diversa natura (Figura 11):

- Attrazioni e repulsioni elettrostatiche: queste interazioni si hanno quando gruppi elettricamente carichi entrano in contatto tra loro (ad esempio un gruppo -NH₃⁺ di un amminoacido con un gruppo -COO⁻ di un altro amminoacido). Si possono formare legami ionici in grado di avvicinare residui anche lontani nella sequenza della catena polipeptidica, questo nel caso in cui le cariche siano discordi. Se invece i gruppi portano la stessa carica l'effetto è quello della repulsione tra i vari domini
- Ponti H: questi ponti non sono gli stessi che stabilizzano le strutture secondarie. Ad esempio,
 l'ossigeno carbonilico di un gruppo carbossilico libero dell'acido glutammico può attrarre
 l'idrogeno del gruppo -OH della serina, treonina o tirosina²
- Ponti disolfuro: nel caso in cui i gruppi -SH di due cisteine della catena si trovino a distanza ravvicinata, si forma un legame covalente che può unire residui anche distanti della catena.
 Questo tipo di legame è comune e si ritrova ad esempio nella fibronectina^{8,9} e nell'albumina¹⁰

- Interazioni idrofobiche delle catene laterali: quando amminoacidi che presentano catene laterali apolari sono in soluzione, queste tendono ad allontanarsi dal solvente acquoso causando l'avvolgimento della catena, in modo tale da esporre verso l'esterno (quindi a contatto con l'acqua) le catene leterali idrofiliche. Questo causa una concentrazione di residui idrofobici nella parte interna, più ripiegata e protetta della proteina. Nel caso delle proteine di membrana, l'ambiente esterno è caratterizzato dalla presenza di molecole non polari e l'avvolgimento della proteina favorisce l'esposizione dei residui idrofobici verso l'esterno concentrando quelli idrofilici internamente alla propria struttura^{1,2}
- Forze di Van der Waals: queste forze sono originate dai dipoli elettrici che si formano nelle nubi elettroniche di atomi sufficientemente vicini, a causa di fluttuazioni delle nubi elettroniche stesse che provocano asimmetrie temporanee nella distribuzione della carica elettrica (atomi non legati covalentemente tra loro). L'interazione è debole ed è caratteristica di ogni atomo a seconda del proprio raggio



Figura 11: forze che agiscono sul mantenimento della struttura terziaria di una proteina. I-attrazioni elettrostatiche. II- ponti H. III- interazioni di gruppi apolari. IV-ponte disolfuro. V-orientamento verso l'esterno (della proteina) di un gruppo idrofilico²

Quando le interazioni vengono meno, in presenza di elevate temperature, di pH non ottimale o di detergenti, la struttura tridimensionale viene persa, così la proteina va incontro a denaturazione, perdendo la sua attività biologica. La denaturazione a volte è un processo reversibile e, allontanando

l'agente denaturante, la proteina riprende spontaneamente la sua conformazione tridimensionale dettata dalla struttura primaria¹.

1.3.4. Struttura quaternaria

Le proteine che contengono più di una catena polipeptidica hanno un ulteriore livello di organizzazione strutturale^{1–3}. In queste proteine ciascuna catena polipeptidica viene detta subunità. La struttura quaternaria si riferisce alla disposizione nello spazio di queste subunità e dalla natura delle interazioni che le tengono unite. La struttura quaternaria più semplice formata da due subunità uguali è detta dimero. Sono molto comuni anche strutture quaternarie più complicate dove possono essere presenti più di un tipo di subunità e in numero variabile. L'emoglobina (proteina che trasporta ossigeno nel sangue), ad esempio, è costituita da due subunità α e due subunità β , la molecola dell'emoglobina è un tetramero $\alpha 2\beta 2$ (Figura 12). Piccoli cambiamenti nella struttura dell'emoglobina permettono alla proteina di trasportare l'ossigeno con la massima efficienza dai polmoni agli altri tessuti¹.



Figura 12: rappresentazione dell'emoglobina e delle sue quattro subunità, due subunità α e due β . 'Heme group' rappresenta il gruppo eme, una struttura non proteica con un atomo di ferro al proprio centro³

1.3.5. Classificazione strutturale delle proteine

Le proteine possono essere classificate in due gruppi principali, proteine globulari o fibrose³. Nelle globulari le catene polipeptidiche sono ripiegate e assumono una forma compatta, sferica o globulare appunto. Sono solubili in acqua e contengono più di una struttura secondaria. Le interazioni sono dovute a ponti disolfuro, alla polarità o meno dei gruppi R, e alla capacità di formare legami a idrogeno. Assolvono funzioni biologiche e possono essere enzimi, ormoni, proteine di trasporto come albumina ed emoglobina, proteine regolatrici, anticorpi¹.

Le proteine fibrose invece hanno catene polipeptidiche disposte in lunghi fasci o in foglietti. In genere presentano un unico tipo di struttura secondaria ed una struttura terziaria semplice. Sono insolubili in acqua per la presenza di elevate concentrazioni di amminoacidi idrofobici e si associano in complessi sopramolecolari in modo da nascondere al solvente le superfici idrofobiche. Per le loro caratteristiche sono adatte a ruoli strutturali, determinano la resistenza, la forma e la protezione esterna delle cellule dei vertebrati; alcune sono coinvolte nella generazione del movimento per le loro proprietà contrattili. Ne sono esempi il collagene, la cheratina, la miosina e il fibrinogeno¹.

1.4. Fibronectina e albumina

Ai fini di entrare più nello specifico del lavoro di questa tesi, la prossima parte vuole descrivere le due proteine oggetto di studio. La scelta di queste proteine, come spiegato in seguito, è giustificata dall'importanza biologica e funzionale che rivestono, che le rende di grande interesse anche nella progettazione di nuovi approcci terapeutici. Inoltre, è stato scelto di utilizzarle alle concentrazioni tipiche del plasma sanguigno umano (0,2 mg/mL per la fibronectina e 20 mg/mL per l'albumina), per poter mimare in modo più efficiente l'ambiente in vivo.

1.4.1. Fibronectina

La fibronectina (FN) è un componente della matrice extracellulare e un'importante glicoproteina adesiva che, legando i recettori dell'integrina e non integrina della superficie cellulare, agisce come un attore chiave della comunicazione tra l'ambiente intra ed extracellulare, modulando la trasduzione del segnale all'interno delle cellule e controllandone così il comportamento.

Esiste in due forme principali: la fibronectina solubile, che è un componente principale del plasma sanguigno (concentrazione circa 300 µg/mL) ed è sintetizzata dagli epatociti e la fibronectina cellulare non solubile che è sintetizzata da diversi tipi cellulari, tra cui i fibroblasti, per essere poi assemblata nella matrice extracellulare⁸. La FN è codificata da un singolo gene, ma lo splicing alternativo del premRNA consente la formazione di più isoforme (fino a 20 varianti nella FN umana) che hanno ruoli critici nell'adesione, migrazione, crescita e differenziazione cellulare; influenza diversi processi tra cui infiammazione, guarigione delle ferite, metastasi maligne, adesione di microrganismi e trombosi ed è di fondamentale importanza nello sviluppo dei vertebrati, come dimostrato dalla letalità embrionale precoce dei topi con inattivazione mirata del gene FN⁹.

Lo studio di questa proteina ha permesso di sviluppare strumenti quali peptidi sintetici basati su specifiche regioni della fibronectina che alterano processi come il legame dei linfociti nel tessuto sinoviale dell'artrite reumatoide, l'arteriopatia coronarica in modelli animali di trapianto cardiaco e l'aggregazione piastrinica nei pazienti. Questo permetterebbe di fornire nuove importanti possibilità terapeutiche mirate alla regolazione dell'espressione e della funzione della FN, comprese le interazioni recettoriali, rivolte a una varietà di condizioni cliniche tra cui anomalie dello sviluppo, riparazione delle ferite, condizioni infiammatorie, coagulazione del sangue e tumorigenicità¹¹.

Strutturalmente, la FN è una glicoproteina dimerica ad alto peso molecolare (circa 440 kDa), composta da due subunità quasi identiche (circa 250 kDa) legate in modo covalente da legami disolfuro vicino alla loro porzione C-terminale. Ogni subunità è costituita da tre tipi di unità ripetitive (chiamate

ripetizioni FN): tipo I (rettangoli viola), tipo II (esagoni verdi) e tipo III (ovali rossi) (Figura 13). FN contiene 12 ripetizioni di tipo I, due ripetizioni di tipo II e 15-17 ripetizioni di tipo III, che insieme rappresentano circa il 90% della sequenza. Le ripetizioni di tipo I hanno una lunghezza di circa 40 residui amminoacidici strutturati come foglietti-ß impilati, legati da un legame disolfuro, e che presentano un nucleo idrofobo costituito da residui aromatici; le ripetizioni di tipo II comprendono un tratto di circa 60 amminoacidi costituite da foglietti-ß antiparalleli perpendicolari legati tra loro da due legami disolfuro intracatena; infine, le ripetizioni di tipo III sono lunghe circa 90 residui, non possiedono legami disolfuro e i foglietti-ß antiparalleli sono legati insieme con anelli flessibili e stabilizzati tramite legame a idrogeno. In quanto tali, le ripetizioni di tipo III sono le più sensibili al possibile dispiegamento della proteina^{8,9}.

Queste unità ripetitive contengono regioni o domini che interagiscono con una varietà di altre molecole. Ad esempio, la parte N-terminale contiene ripetizioni di tipo I che si legano alla fibrina. Anche una regione che si lega al collagene e alla gelatina (collagene denaturato) si trova vicino al dominio N-terminale. La parte centrale della catena contiene ripetizioni di tipo III, che includono l'importante dominio di legame cellulare caratterizzato dalla sequenza amminoacidica arg-gly-asp (RGD) (ovale rosso numero 10 in Figura 13) e la sequenza sinergica pro-his-ser-arg-asn (PHSRN) (ovale rosso numero 9 in Figura 13), che migliora l'adesione cellulare¹¹. La delucidazione dei siti di legame dell'integrina (proteina di membrana delle cellule) e di altri domini funzionalmente importanti all'interno della molecola di FN è stata notevolmente facilitata dalla scoperta che tutte le FN vengono scisse solo in regioni specifiche quando sottoposte a digestione proteolitica limitata. Anche una proteasi in grado di scindere le proteine in molti siti (come la pronasi) inizialmente scinderà la FN e lo farà solo in posizioni altamente specifiche, probabilmente non piegate e non protette. Le attività di legame della FN sono spesso preservate dopo tale proteolisi e possono essere identificate all'interno di frammenti particolari.

Il punto isoelettrico della proteina è riportato intorno al valore 5-6^{12,13}.



Figura 13 struttura della fibronectina, ripetizioni FN: tipo I (rettangoli viola), tipo II (esagoni verdi) e tipo III (ovali rossi), regioni coinvolte nello splicing alternativo della FN (ovali EDA, EDB, V)⁹

Come detto, la FN è codificata da un singolo gene ed esistono esoni ripetuti che corrispondono altamente alle unità amminoacidiche strutturali di tipo I, II e III ripetute. Lo splicing alternativo del gene FN consente la generazione di più isoforme della proteina, con 20 isoforme possibili nell'uomo. Tuttavia, lo splicing si verifica solo in tre regioni del gene. Due esoni corrispondenti alle ripetizioni di tipo III, noti come EIIIA o EDA (dominio extra) e EIIIB o EDB (Figura 13), sono giuntati per essere totalmente inclusi o totalmente esclusi. Una terza regione, la variabile (V) o IIICS (segmento di collegamento di tipo III), situata vicino all'estremità C-terminale della molecola, può essere giuntata in

più punti, dando origine a cinque potenziali varianti nell'uomo. Lo splicing alternativo del pre-mRNA FN varia a seconda del tipo di cellula.

La FN è prodotta da un'ampia varietà di cellule. Quella trovato nel plasma (pFN) è in gran parte prodotta dagli epatociti ed è presente in forma solubile. Questa forma di FN manca di un'espressione significativa della regione EIIIA o EIIIB sopra descritta e sono presenti quantità variabili di forme di giunzione alternative dalla regione V. Altre forme di FN prodotte da numerose cellule, inclusi fibroblasti, cellule epiteliali e macrofagi, sono chiamate FN cellulare (cFN) e contengono quantità variabili delle regioni EIIIA ed EIIIB, nonché isoforme della regione V. Oltre ai cambiamenti nella composizione basati sullo splicing alternativo dell'mRNA, la FN può subire diversi cambiamenti intracellulari mentre passa dal reticolo endoplasmatico ruvido attraverso il Golgi alla superficie cellulare. Questi cambiamenti includono la glicosolazione, la fosforilazione e la solfatazione, nonché il legame disolfuro intracatena. Una volta secreti, sia pFN che cFN possono essere incorporati nella matrice extracellulare. Questo processo coinvolge il legame disolfuro intercatena, che contribuisce alla formazione di fibrille, e il frammento ammino-terminale da 70 kDa di FN è essenziale per questo processo.

Le interazioni tra FN e recettori delle integrine attivati sulle cellule sono essenziali per l'assemblaggio della matrice. Il ruolo delle interazioni FN-integrina nell'assemblaggio della matrice è complicato in quanto il legame di FN ai recettori dell'integrina da solo non è sufficiente, ma sono essenziali anche gli eventi successivi che coinvolgono la coda citoplasmatica dell'unità β dei recettori dell'integrina e un citoscheletro di actina intatto. Poiché la formazione di fibrille FN ha ruoli ben noti in una varietà di processi, tra cui la riparazione della ferita e la tumorigenesi, la definizione di come la FN è incorporata nella matrice rappresenta una potenziale via per l'intervento terapeutico.

Un'altra importante osservazione in termini di forma matriciale di FN è data dalla capacità di un frammento della prima ripetizione di tipo III di legarsi alla proteina stessa e provocare la reticolazione disolfuro spontanea della molecola in multimeri, che assomigliano a fibrille di matrice. Questa forma multimero di FN è nota come superfibronectina e migliora notevolmente l'adesione cellulare e riduce la migrazione cellulare. Questa è un'altra dimostrazione della capacità di influenzare la propria struttura con conseguenze funzionali⁹.

Sebbene la FN plasmatica che circola nel sangue sia in una forma chiusa, non attiva, la maggior parte delle attività della FN nel corpo sono state attribuite alla forma insolubile di FN che esiste come parte della matrice extracellulare (Figura 14).



Figura 14 matrice a base di fibronectina, immagine di immunofluorescenza ottenuta con anti- Anticorpi FN⁹

La creazione e la deposizione di fibrille FN insolubili nell'ECM è un processo mediato da cellule strettamente regolamentato chiamato fibrillogenesi o assemblaggio di matrice di fibronectina. Un passaggio critico in questo processo è l'autoassociazione della proteina in aggregati e fibrille, che è diretta da più siti di legame che sono stati identificati lungo la molecola. Alcuni di questi siti di autointerazione sono esposti e disponibili per il legame, mentre altri sono chiusi e diventano accessibili solo dopo cambiamenti conformazionali, ad esempio, mediante stiramento meccanico della molecola FN guidato dalle cellule⁹.

Data l'influenza della FN sull'adesione cellulare, la migrazione, la differenziazione e la proliferazione, la capacità di modulare la funzione e/o l'espressione della FN ha implicazioni per la gestione di una varietà di problemi clinici, tra cui infiammazione cronica, infezioni, riparazione delle ferite, neoplasie e metastasi, e coagulazione/trombosi. Diverse condizioni sono state associate a un aumento dell'espressione di FN, tra cui una varietà di malattie polmonari interstiziali, sclerosi lomerulare, ferite, artrite reumatoide e tumori maligni¹¹. Esistono molti approcci alla modulazione della funzione o dell'espressione FN, ma forse il progresso maggiore è stato fatto nell'uso di peptidi sintetici derivati da sequenze all'interno di regioni della molecola con funzioni note. Ad esempio, i peptidi RGD ciclici sono stati utilizzati per modulare la migrazione cellulare e le metastasi tumorali in vivo e per interferire con l'aggregazione piastrinica. I peptidi CS-1 derivati da sequenze nella regione IIICS sono stati utilizzati per bloccare l'attaccamento dei linfociti nei tessuti dell'artrite reumatoide e per attenuare i cambiamenti infiammatori cronici nell'artrite indotta da batteri e coronarica arteriopatia associata a trapianto cardiaco¹¹.

Dagli studi effettuati da Parisi et al. ¹⁴, il rivestimento di substrati con quantità crescente di FN, porta ad un'evidente promozione dell'adesione cellulare e della diffusione in termini di grado e velocità. Si è osservato che migliorare l'idrofilia delle superfici dell'impianto in titanio mediante trattamento termico in forno programmabile a 300 °C per due ore è un'opzione praticabile per promuovere l'adsorbimento di FN dal siero plasmatico, migliorando così l'eventuale adesione degli osteoblasti. Nel caso in cui ci si trovi in presenza di un coagulo, l'abbondanza di FN nel coagulo stesso è strettamente correlata al reclutamento dei fibroidi durante la guarigione della ferita. Allo stesso modo, attraverso aptameri (acidi nucleici in grado di legare una proteina) selezionati per riconoscere e legare FN, è possibile migliorare la capacità migratoria degli osteoblasti in una matrice a base di acido ialuronico e promuovere la capacità proliferativa delle cellule sul chitosano⁸. Pertanto, legare FN su biomateriali può consentire la creazione di percorsi dinamici che costringono le cellule a muoversi lungo il substrato di interesse.

In conclusione, date le numerose e diverse funzioni di questa proteina, strumenti come peptidi, anticorpi e altri agenti che modulano selettivamente la funzione della FN, l'espressione di FN o l'incorporazione di FN nella matrice, hanno un grande potenziale nella gestione di un'ampia gamma di condizioni cliniche.

1.4.2. Albumina

La parola albumina deriva dal latino albus, bianco. Risale al riconoscimento che l'albume di un uovo, che appare bianco dopo la coagulazione, è in gran parte di natura proteica. Le proteine sieriche dell'albumina sono tra le più studiate ed applicate in biochimica. Queste proteine possiedono un alto contenuto elicoidale e un alto contenuto di cisteina e hanno pesi molecolari approssimativi di 65 kDa¹⁵.

Essendo la proteina più abbondante nel sistema circolatorio e con concentrazioni ematiche tipiche di 50 mg/mL, l'albumina contribuisce per l'80% alla pressione arteriosa osmotica colloidale. Inoltre, l'albumina è la principale responsabile del mantenimento del pH del sangue. Si trova in ogni tessuto e secrezione corporea, con la proteina extracellulare che comprende il 60% dell'albumina totale. Nei mammiferi l'albumina è sintetizzata dal fegato e possiede un'emivita circolante di 19 giorni. Forse, la proprietà più eccezionale dell'albumina è la sua capacità di legare in modo reversibile un'incredibile varietà di ligandi. Infatti, l'albumina sierica svolge un ruolo chiave nel trasporto di un gran numero di metaboliti, ligandi endogeni, acidi grassi, bilirubina, ormoni, anestetici e farmaci di uso comune, che possono essere somministrati ai bersagli cellulari appropriati. Ad esempio, è stato riscontrato che più del 50% di un anestetico generale somministrato clinicamente sarà legato all'HSA (albumina sierica umana)¹⁶. Ma l'albumina svolge anche molte altre funzioni, come sequestrare i radicali liberi dell'ossigeno e inattivare vari metaboliti lipofili tossici (come la bilirubina). Inoltre, forma addotti covalenti con piridossil fosfato, cisteina, glutatione e vari metalli; partecipa come vettore chiave o serbatoio di ossido nitrico, che è stato implicato in una serie di importanti processi fisiologici, inclusa la neurotrasmissione Senza dubbio, l'albumina è la proteina di trasporto più multifunzionale conosciuta fino ad oggi.

Le sequenze di tutte le albumine sono caratterizzate da una disposizione unica di doppi anelli disolfuro che si ripetono come una serie di terzine. Le albumine dei mammiferi hanno nove di tali anelli formati da 17 disolfuri. Dalle osservazioni di questi loop e di altre omologie, si è dedotto che l'albumina fosse il prodotto di tre domini omologhi (I, II, III). La struttura dell'albumina è prevalentemente α -elicoidale. Approssimativamente, il 67% dell'albumina umana (HSA) è elicoidale, con i restanti polipeptidi che si trovano in regioni estese o flessibili tra i sottodomini (Figura 15)¹⁷.



Figura 15: rappresentazione dell'albumina sierica umana che illustra la topologia complessiva e la struttura secondaria. Le posizioni dei 17 disolfuri e della catena laterale di Cys-34 sono mostrate in rosso. Le posizioni dei due principali siti di legame di HSA sono illustrate con l'acido ligando 2,3,5triiodobenzoico, mostrato in bianco.¹⁷

Come detto l'albumina sierica è la proteina più abbondante nel sistema circolatorio. A pH neutro, la struttura cristallina della proteina rivela una molecola a forma di cuore organizzata in tre domini strutturali simili, ciascuno suddiviso in due sottodomini. Le albumine di diverse specie di mammiferi mostrano molte somiglianze nelle proprietà fisico-chimiche. Ci sono 332 (57%) residui invarianti nelle sequenze di albumine di mammiferi, e il 76% delle identità di sequenza è stato notato tra albumina sierica bovina (BSA) e albumina sierica umana (HSA). Queste due albumine sono indistinguibili da alcuni criteri fisici e simili tenendo conto di altri, ad esempio come proprietà di idrofobicità superficiale e comportamento di partizionamento in alcuni sistemi acquosi a due fasi¹⁸. In particolare, la HSA e la BSA presentano strutture strettamente omologhe stabilizzate da un pattern ripetitivo dei 17 ponti disolfuro, sia a livello di struttura terziaria che secondaria e hanno lo stesso punto isoelettrico (riportato intorno a 4,6-4,9)¹⁰. La HSA ha un solo triptofano (Trp214), localizzato nel dominio II, ed è noto che subisce diverse transizioni strutturali pH-dipendenti e cambiamenti conformazionali con diverso coinvolgimento dei domini¹⁰.

Di seguito verranno descritte l'albumina umana e quella bovina, la seconda in quanto la proteina di interesse negli studi effettuati di caratterizzazione di questa tesi, usata spesso in ambito laboratoriale per la sua disponibilità. In Figura 16 è mostrata l'omologia della struttura tridimensionale delle due proteine.



Figura 16: struttura tridimensionale della HSA (A) e BSA (B). I residui di triptofano sono colorati in verde¹⁹

HSA

L'albumina umana è una singola catena polipeptidica non glicosilata di 585 aminoacidi con un peso molecolare di 66.439 Da. Sintetizzata prevalentemente nel fegato, l'albumina svolge una serie di importanti funzioni, tra cui il mantenimento della pressione oncotica, il trasporto e la distribuzione di una varietà di ligandi endogeni ed esogeni e contribuisce al mantenimento del pH plasmatico. Una persona di 70 kg ha una quantità di albumina totale di circa 360 g, l'albumina intravascolare di circa 120 g è in costante scambio con quella extravascolare. L'albumina umana è la proteina plasmatica più abbondante con una concentrazione plasmatica media di 42 mg/mL e un'emivita circolatoria di 19 giorni. La lunga emivita circolatoria dell'albumina è alla base di una serie di strategie di estensione dell'emivita. È un componente di numerose secrezioni, tra cui latte, saliva, sudore e lacrime. Si accumula nei tessuti infiammati e maligni, una proprietà che può essere migliorata con l'aggiunta di specifici ligandi mirati²⁰. Data l'abbondanza di albumina, la stabilità, la lunga emivita circolatoria e la capacità di legame intrinseca, l'albumina è un importante fattore determinante nella farmacocinetica ed è un'eccellente piattaforma di somministrazione dei farmaci, come mostrato in Figura 17.



Figura 17: proprietà biochimiche e biofisiche dell'albumina per la somministrazione di farmaci. Le proprietà fisiche, biochimiche e biofarmaceutiche intrinseche dell'albumina assicurano collettivamente che l'albumina sia un'eccellente piattaforma per la somministrazione di farmaci. I 17 legami disolfuro sono indicati in rosso mentre il tiolo libero in Cys34 all'interno di DI è mostrato in ciano²⁰

Sulla base di un'analisi della struttura primaria dell'albumina umana, la molecola è formata da tre domini omologhi, (DI-DII-DIII in Figura 17) che a loro volta comprendono due sottodomini elicoidali separati. Come detto, l'albumina è una proteina a forma di cuore con il 67% di α -eliche a e nessun foglietto- β , ha 17 legami disolfuro e un tiolo libero da una cisteina spaiata (Cys34) in DI. Di conseguenza, l'albumina umana è molto stabile ai cambiamenti di pH, all'esposizione al calore e ai solventi denaturanti. In risposta a variazioni nel pH, l'albumina subisce una serie di cambiamenti strutturali. L'unico cambiamento fisiologicamente rilevante si verifica al di sopra del pH 8, quando l'albumina subisce un'isomerizzazione nota come transizione da N a B con cambiamenti significativi nel legame del ligando associati ad alterazioni alla struttura di DII e in misura minore DI, con poco o nessun cambiamento di DIII. Dato l'alto livello di amminoacidi carichi dell'albumina, 83 basici (lisina e arginina) e 98 acidi (acido glutammico e acido aspartico) è molto solubile in soluzioni acquose a pH neutro.

A causa della sua abbondanza e delle proprietà intrinseche, l'albumina possiede una straordinaria capacità di legare i ligandi che la rende la più importante proteina trasportatrice nel corpo umano per i ligandi sia endogeni che esogeni, consentendo ad alcuni farmaci di essere disponibili in quantità oltre la loro naturale solubilità plasmatica, diminuendo la loro tossicità, abbassando i tassi di eliminazione e aumentando l'emivita circolatoria. I ligandi legati all'albumina comprendono fino a 35 differenti proteine e peptidi e un'ampia gamma di piccole molecole e ioni metallici di transizione²⁰.

L'albumina sierica bovina è la controparte bovina dell'albumina umana, che in una varietà di condizioni mostra la tendenza all'autoassemblaggio in grandi aggregati macromolecolari. È composta anch'essa da un'unica catena polipeptidica, organizzata in tre domini (I, II e III), ciascuno formato da sei eliche contenente due sottodomini, A e B (Figura 18). L'analisi della struttura cristallina di BSA indica che il legame specifico dei ligandi da parte delle proteine ha origine dalla presenza di due siti di legame principali e strutturalmente selettivi, vale a dire, il sito I e il sito II, che si trovano nelle cavità idrofobiche nei sottodomini IIA e IIIA, rispettivamente. L'affinità di legame offerta dal sito I è principalmente attraverso interazioni idrofobiche, mentre il sito II coinvolge una combinazione di interazioni idrofobiche, di legami idrogeno ed elettrostatiche²¹. A temperatura ambiente, la sua struttura secondaria è prevalentemente elicoidale. I 17 ponti disolfuro assicurano una certa rigidità all'interno di ciascun sottodominio, ma consentono modifiche significative nella forma e nelle dimensioni dell'albumina sierica in risposta a variazioni di pH e altre influenze. La BSA subisce un'isomerizzazione conformazionale reversibile in funzione del pH, passando ad una forma meno compatta intorno a pH 4, mentre mostra pochi cambiamenti in un intervallo di valori di pH tra 6,5 e 5, quest'ultimo valore è vicino al punto isoelettrico della proteina (riportato intorno a 4,6-4,9)¹⁰.



Figura 18: struttura cristallina della BSA con indicate le posizioni dei siti di legame idrofobici (sito I e sito II)²¹

BSA

2. ADSORBIMETO PROTEICO SU SUPERFICI SOLIDE

2.1. Definizione

L'adsorbimento proteico si riferisce al processo attraverso il quale delle proteine in soluzione, una volta entrate in contatto con la superficie di un substrato solido, tendono a legarsi a questo in maniera più o meno forte a seconda di caratteristiche della proteina o delle proteine presenti, della soluzione e del substrato. A differenza dell'assorbimento dove la diffusione interessa anche strati interni del substrato, l'adsorbimento è quindi un fenomeno superficiale. Il processo occorre sin dai primi istanti in cui un materiale entra in contatto con soluzioni di proteine ed è di carattere dinamico, infatti la quantità di proteina può variare nel tempo sia a causa di riarrangiamenti strutturali a cui va incontro la biomolecola che si lega sia, in soluzioni multicomponente, a fenomeni che portano ad una graduale sostituzione di proteine che vengono pre-adsorbite e successivamente rimpiazzate da altre, magari aventi affinità maggiori con la superficie. Lo studio di questo fenomeno è di vitale importanza per comprendere elementi quali la biocompatibilità di impianti, la risposta a corpo estraneo di un organismo o migliorare l'efficienza di test diagnostici che si basano su specifici legami tra molecole e recettori; per questo è ampiamente studiato e caratterizzato ormai da decenni, con la ricerca che si è spinta ad individuare i meccanismi che lo regolano sino al livello strutturale e conformazionale delle proteine²². Sebbene molto sia stato compreso, rimane molto ancora da investigare e il campo è ancora di interesse attivo.

2.2. Ruolo biologico e ingegneristico

Come già accennato l'interesse verso l'adsorbimento proteico è spinto fortemente dalla volontà di comprendere e quindi poter ottimizzare tutta una serie di reazioni, soprattutto a livello biologico, che si sanno essere guidate in prima istanza dall'efficienza con cui una o più proteine riescono a legarsi ad un substrato. Con efficienza ci si può riferire alla quantità, al tipo di proteina in una soluzione multicomponente, al grado di denaturazione a seguito di cambiamenti conformazionali che possono interessare le molecole del layer proteico in superficie che si viene a creare, a seconda dello studio in esame. Infatti, è possibile trovare esempi in letteratura dove uno studio di questi argomenti viene approfondito per legare in maniera più stabile possibile una proteina (ad esempio per promuovere una vascolarizzazione²³), mentre in altri casi la ricerca è finalizzata a creare superfici che non incentivino l'adsorbimento (per scongiurare fenomeni quali la trombosi in impianti vascolari²⁴).

In particolare, per quel che succede ai biomateriali impiantati in vivo, una volta che ci si ritrova all'interno del tessuto la superficie del materiale si interfaccia con i fluidi biologici, come ad esempio il

sangue. A questo punto l'adsorbimento di proteine comincia ad avere luogo, e permette alle cellule dell'organismo ospite di interagire con il materiale, grazie a specifici recettori di membrana che riconoscono siti di legami delle proteine che vengono adsorbite. Una spiegazione più approfondita dei fenomeni occorrenti sulla superficie del biomateriale è fornita successivamente (par. 3.3). Poter regolare questo layer proteico formatosi sul materiale può essere quindi fondamentale, perché costituisce l'interfaccia informazionale che la cellula ha con l'impianto ed è responsabile dell'attivazione di pathway metabolici che possono portare ad una buona integrazione o a reazioni avverse che sfociano in infiammazioni e in un'ultima istanza al fallimento dell'impianto.²⁵

L'adsorbimento proteico ha applicazione anche nel campo della diagnostica o sensoristica, dove si può avere interesse a legare con una certa orientazione un anticorpo su una superficie per dei saggi cromatografici²⁶ o si cerca di scongiurare un adsorbimento non specifico che rovinerebbe le prestazioni di un sensore o di un chip per le proteine. Allo stesso modo in terapie di drug delivery ma anche nella produzione farmaceutica comprendere a fondo i meccanismi che regolano questo fenomeno permetterebbe di ottimizzare la funzionalità di proteine terapeutiche che necessitano di legarsi durante il processo produttivo con substrati, senza che ne venga alterata l'attività²⁷. Nel campo della biomimetica un esempio applicativo potrebbe essere riuscire a creare membrane lipidiche per lo studio in vitro di processi cellulari che interessano proteine di membrana²⁸. Le applicazioni che una piena comprensione e padronanza di questo fenomeno possono portare sono quindi molteplici e giustificano la gran mole di lavoro che continua ad essere fatta nella ricerca in questo campo.

2.3. Caratteristiche dell'adsorbimento

L'adsorbimento proteico sulle superfici è stato studiato su un grande numero di substrati, tra cui metalli, ceramici e vetri bioattivi per citarne alcuni. Questo ha senza dubbio aiutato a caratterizzarne i parametri che lo regolano, ed in particolare si è visto che dipende da proprietà relative alla proteina, proprietà della soluzione o del medium e proprietà relative allo specifico substrato che viene interessato dal fenomeno. Alcune variabili includono dimensione/forma della proteina, concentrazione, punto isoelettrico e idratazione, micro e nanostruttura del substrato, carica superficiale e comportamento idrofobico, pH della soluzione, forza ionica e temperatura, adsorbimento competitivo con altre proteine e ioni e movimento del solvente rispetto al substrato. Inoltre, le proteine comunemente subiscono un certo grado di denaturazione nello stato adsorbito (Figura 19).



Figura 19: fattori che influenzano l'adsorbimento proteico²⁹

Considerando come esempio di interfaccia una superficie inerte chimicamente con bassa solubilità in soluzione acquosa, l'adsorbimento è un processo esotermico (cioè con rilascio spontaneo di calore)

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S$$

Dove ΔG è la variazione di energia libera di Gibbs, ΔH descrive la variazione di entalpia (generazione o rottura di legami), T è la temperatura che moltiplica ΔS , la variazione di entropia. Nella maggior parte dei casi una variazione di entropia del sistema (composto da: la soluzione, la superficie e le proteine che adsorbono dalla soluzione) guida il processo. Questo è dovuto al rilascio di molecole d'acqua liberate dalla superficie adsorbente e all'aumento della mobilità interna delle proteine adsorbite che possono andare incontro a riarrangiamenti strutturali. Queste cambiano la loro conformazione durante il processo di adsorbimento, andando quindi ad aumentare l'esposizione di residui idrofobici verso la superficie e la loro entropia molecolare interna. Inoltre, il grado di denaturazione aumenta aumentando il tempo di contatto con la superficie. Oltre alla variazione di entropia, altri importanti fattori dell'adsorbimento sono le forze attrattive coulombiane tra la proteina e la superficie e una volta che un'interazione fisica tra la superficie e la proteina è stabilità, interazioni a corto raggio di Van der Waals aiutano ad ancorare la proteina alla superficie³⁰. Le proteine, infatti, sono costituite da diversi domini che portano ognuno una carica, e nel loro insieme forniscono la carica complessiva alla molecola. Questa può variare a seconda delle condizioni della soluzione quali il pH, la temperatura e la proteina di specie ioniche in soluzione ed ha un'influenza importante sulla capacità della proteina

di legarsi al substrato. Se questo presenta carica di segno opposto, la proteina riuscirà ad interagire più fortemente con il materiale e l'adsorbimento ne sarà incoraggiato.

2.3.1. Influenza delle proprietà superficiali del substrato

La superficie stessa del materiale è un determinante della quantità, del tipo, della conformazione e della funzione delle proteine che vi adsorbono. Prima che le proteine si adsorbano sulla superficie, le molecole d'acqua dell'ambiente biologico interagiscono con il materiale. Nel caso di materiali idrofobici, si forma un "guscio" di molecole d'acqua in cui queste molecole interagiscono tra loro più che con la superficie idrofobica. Queste molecole d'acqua che circondano la superficie rappresent ano uno scenario abbastanza ordinato con un livello di entropia ridotto; la rottura di questo strato con le proteine è energeticamente favorevole a causa di un concomitante aumento dell'entropia. L'aumento dell'entropia è la principale forza dietro l'adsorbimento delle proteine sulla superficie di materiali idrofobici. Al contrario, poiché più molecole d'acqua possono formare legami idrogeno direttamente sulle superfici idrofile, la competizione tra molecole d'acqua e proteine si traduce in una diminuzione dell'adsorbimento delle proteine³¹.

Inoltre, le superfici dei materiali possono avere una distribuzione di carica. Poiché cariche simili tendono a respingersi a vicenda, cariche opposte promuovono l'adsorbimento e il legame ionico delle proteine su tali substrati. Ad esempio, poiché la maggior parte delle proteine del siero del sangue è carica negativamente, una carica negativa netta su una superficie del materiale può ridurre l'adsorbimento di queste proteine. Questo risultato, tuttavia, è complicato dal fatto che le proteine contengono amminoacidi che sono a loro volta caricati positivamente o negativamente; per questo motivo, anche se una proteina ha una carica netta negativa, potrebbero esserci domini carichi positivamente che interagiscono con la superficie. Anche la polarità della superficie influenza l'adsorbimento proteico. In uno studio Anand et al. ³² sostengono che le superfici apolari facilitano i riorientamenti conformazionali che portano a forti interazioni tra proteine e proteine-superficie. Questo a conferma della scoperta sperimentale piuttosto generale che nella maggior parte dei casi l'affinità delle proteine alle superfici aumenta su substrati idrofobici (apolari) e diminuisce su substrati idrofili (polari).

Un parametro molto utilizzato per caratterizzare le superfici è il potenziale ζ, detto anche potenziale elettrocinetico, che descrive il comportamento delle cariche alle interfacce di superfici. Considerando una soluzione, questa avrà una certa distribuzione di carica, dovuta alla presenza di specie ioniche la cui concentrazione ne determina il pH. Quando gli ioni non si trovano uniformemente distribuiti nel volume della soluzione, ad esempio per effetto di campi elettrici esterni, questo può portare ad una

carica variabile nella fase liquida. Inoltre, i materiali possono possedere una carica superficiale, determinata ad esempio dalla presenza di gruppi chimici che dissociandosi portano alla nascita di lacune elettroniche o concentrazione di elettroni. Quando la superficie di un materiale entra in contatto con una soluzione acquosa, all'interfaccia con la soluzione si viene a creare una distribuzione di carica che è differente dalla distribuzione di carica nella fase liquida, dovuta al fatto che la superficie stessa è portatrice di una carica. In questo contesto si ha la nascita di un potenziale di superficie, che decade all'aumentare della distanza dalla superficie stessa. La situazione è descritta dal modello del doppio strato di carica dove sono presenti uno strato stazionario (anche detto Stern-Graham layer), dove i controioni in soluzione compensano la carica superficiale. Il potenziale zeta è il potenziale che si ha al confine tra lo stato stazionario e quello diffusivo, come mostrato in Figura 20. La conoscenza di questo dato è utile in quanto permette di valutare il punto isoelettrico dello strato proteico adsorbito in superficie, la carica di quest'ultima in funzione del pH, e indirettamente la natura dei gruppi funzionali esposti all'interfaccia solido-liquido, la reattività della superficie in soluzione e il processo di adsorbimento³³.



Figura 20: rappresentazione del modello del doppio strato di carica³⁴

Anche le caratteristiche topografiche di una superficie possono influenzare fortemente l'adsorbimento delle proteine. Una maggiore rugosità superficiale fornisce più area per l'adsorbimento proteico sulla

superficie del biomateriale; questo evento può portare ad un netto aumento dell'adsorbimento. A livello nanometrico la presenza di pori se confrontabile con quella delle proteine in maniera tale che queste possano entrarvi, promuove la formazione di aggregati proteici perché i pori nanometrici generano le condizioni per la nucleazione delle proteine al loro interno35. Anche la curvatura delle superfici è stata valutata, Roach et al. studiando l'adsorbimento di albumina e fibrinogeno su sfere di silicio tra 15-165 nm, hanno notato come la struttura dell'albumina, proteina globulare, viene stabilizzata dall'elevata curvatura della superficie. D'altra parte, il fibrinogeno, una proteina con forma più allungata, viene distorto avvolgendosi attorno alla curvatura della superficie, inducendo la perdita della struttura secondaria³⁶.

Infine, le proprietà chimiche della superficie di un materiale possono influenzare fortemente l'adsorbimento delle proteine. È stata studiata l'influenza di un certo numero di gruppi funzionali superficiali sul processo di adsorbimento (Figura 21). I gruppi metilici -CH3, non polari e idrofobici, si legano strettamente al fibrinogeno (una proteina coinvolta nella coagulazione del sangue) e all'immunoglobina IgG, una famiglia di proteine anticorpali coinvolte nella risposta immunitaria. A conferma di questo, in vivo, il gruppo -CH3 induce un elevato reclutamento di cellule infiammatorie sulla superficie del materiale, probabilmente proprio a causa dell'elevato adsorbimento di IgG. I gruppi idrossilici -OH aumentano l'idrofilia della superficie di un materiale e, quindi, riducono l'affinità delle proteine plasmatiche presenti. Questi gruppi inducono cambiamenti conformazionali nella fibronectina, che espone i domini deputati all'adesione focale (stretti collegamenti meccanici) delle cellule. I gruppi amminici -NH₂ sono polari e, quindi, idrofili; questi gruppi sono anche caricati positivamente nel siero del sangue e nella maggior parte delle altre soluzioni in cui il solvente è l'acqua. I gruppi carbossilici -COH sono caricati negativamente nel siero del sangue e in altre soluzioni proteiche acquose, sono idrofili e interagiscono preferenzialmente con fibronectina e albumina³⁷.

Functional group	Properties	Effect on proteins and cells
-CH ₃	Neutral; hydrophobic	Has high affinity/binding with fibrinogen; binds
		strongly with IgG; promotes increased leukocyte
		adhesion and phagocyte migration
-OH	Neutral; hydrophilic	Has decreased affinity for plasma proteins; induces exposure of cell adhesive domains on fibronectin;
NIL	Positive: hydrophilic	Historia affinity for fibronacting promotes increased
	rosave, nyuropinite	myoblast proliferation; promotes differentiation of osteoblasts; promotes increased endothelial cell proliferation
-COOH	Negative; hydrophilic	Has increased affinity for fibronectin and albumin

Figura 21: effetti dei gruppi funzionali superficiali sull'adsorbimento proteico e adesione cellulare³¹

2.3.2. Influenza dei parametri esterni sull'adsorbimento proteico

Le condizioni nelle quali avviene l'adsorbimento sono decisive per l'adsorbimento stesso. I parametri esterni sono la temperatura, il pH, la forza ionica e composizione della soluzione. La temperatura ha un effetto sullo stato di equilibrio e la cinetica di adsorbimento della proteina³⁸. Generalmente, il processo di adsorbimento è favorito da un aumento di temperatura che provoca una maggiore diffusività della proteina verso la superficie adsorbente. In realtà l'influenza della temperatura è determinata dalla termodinamica di ogni specifico processo di adsorbimento. Ad esempio, nel lavoro di Arnebrant et al.³⁹ l'influenza della temperatura nella cinetica dell'adsorbimento proteico della α-lattoalbumina mostra una maggior quantità di proteina adsorbita e velocità con cui avviene il processo all'aumentare della temperatura, risultato dovuto a cambiamenti conformazionali della proteina nella soluzione a partire da circa 55° C. Sempre nello stesso studio, la β-lattoglobulina mostra un adsorbimento invariante a temperature vicine a quella di denaturazione della proteina (79° C), oltre la quale poi la quantità adsorbita aumenta drasticamente. Questo comportamento si pensa essere dovuto all'aggregazione superficiale della proteina causata dalle interconnessioni con i gruppi tiolo che si formano a partire da circa 76° C. In questi due esempi si evince come la temperatura possa influenzare differentemente la cinetica dell'adsorbimento a seconda dello specifico processo in esame.

Un altro parametro usato per descrivere le condizioni ambientali è il pH della soluzione. Il pH determina lo stato elettrostatico delle proteine: quando il pH è uguale al punto isoelettrico di una proteina il numero di cariche negative e positive sono bilanciate risultando in una molecola neutra, a bassi pH le proteine sono cariche positivamente mentre ad alti pH le proteine sono cariche negativamente. Le velocità di adsorbimento sono maggiori quando le proteine e il substrato sono carichi in maniera opposta dato che le attrazioni elettrostatiche accelerano la migrazione verso la superficie. Allo stesso tempo, le repulsioni elettrostatiche tra le proteine sono minimizzate nell'intorno del punto isoelettrico, permettendo maggiore capacità di impacchettamento sulla superficie. Si è infatti osservato che la massa di proteina adsorbita è maggiore nell'intorno del punto isoelettrico.

Tra i parametri esterni che influenzano l'adsorbimento proteico vi è la concentrazione di ioni disciolti in soluzione espressa con il termine di forza ionica (indicata con I) ed è espressa dall'equazione:

$$I = \frac{1}{2} \sum c_i z_i^2$$

dove c_i è la concentrazione molare dello ione i-esimo e z_i la sua carica.

Tanto più una soluzione è concentrata, tanto più gli ioni in essa presenti sono soggetti ad interazioni reciproche ed hanno quindi minore libertà individuale. All'interno di un insieme di cariche, la distanza spaziale entro la quale cariche elettriche mobili schermano il campo elettrico è definita lunghezza di
Debye. La forza ionica determina la lunghezza di Debye, correlandola con la distanza di smorzamento di un potenziale elettrico di una particella carica in un elettrolita. Considerando una soluzione elettrolitica, la lunghezza di Debye di un elettrolita monovalente è usualmente indicata con κ^{-1} ed è data dalla formula:

$$\kappa^{-1} = \sqrt{\left(\frac{kT\varepsilon_0\varepsilon}{2N_ae^2I}\right)}$$

Dove κ^{-1} è la lunghezza di Debye, k la costante di Boltzmann, T la temperatura, ε_0 e ε sono rispettivamente la permittività del vuoto e costante dielettrica della soluzione, N_a il numero di Avogadro, e la carica unitaria, I è la forza ionica⁴⁰.

Maggiore è la forza ionica più piccole saranno le interazioni elettrostatiche tra le cariche in funzione della distanza reciproca. Come conseguenza l'adsorbimento di proteine cariche o di domini di proteine verso substrati carichi in maniera opposta è limitato mentre l'adsorbimento a substrati carichi in maniera simile può godere di una riduzione dell'effetto di repulsione tra proteina e superficie.

2.3.3. Influenza delle proprietà delle proteine sull'adsorbimento

Considerando le proteine, i primi aspetti in grado di influenzare l'adsorbimento sono legati alle caratteristiche spaziali (grandezza e forma) delle molecole. Queste informazioni risiedono nella struttura primaria della proteina. Essa, infatti, descrive la successione di amminoacidi di cui è composta e pertanto permette di conoscere la grandezza finale della proteina, che può variare da pochi nanometri a decine di nanometri. La composizione in amminoacidi influenza anche le forze intramolecolari, che definiscono la conformazione delle proteine, il loro punto isoelettrico e la loro forma globale, che può essere simmetrica per proteine globulari (come albumina o insulina) o asimmetrica per proteine allungate e a forma di Y (come fibronectina e IgG). Forma e dimensioni della proteina determinano il coefficiente di diffusione D (espresso in m²/s) che definisce il tempo necessario alle proteine per raggiungere la superficie. Questa grandezza tiene conto della velocità con la quale una molecola diffonde in un mezzo, ed è inversamente proporzionale alla grandezza della molecola stessa, come risulta dalla formula:

$$D = \frac{kT}{6\pi r\mu}$$

Dove μ è la viscosità del mezzo, e *r* è il raggio della particella⁴¹. Per cui proteine più piccole possono raggiungere la superficie più velocemente rispetto a proteine più grandi ed essere adsorbite per prime.

Una volta raggiunta la superficie, l'adsorbimento può essere casuale o diretto in una posizione specifica, a seconda delle interazioni intermolecolari tra le biomolecole e delle interazioni tra le biomolecole e le superfici sottostanti (Figura 22 A). L'orientamento delle proteine adsorbite può essere in piano (ad esempio, direzioni x, y) o, nel caso in cui le biomolecole siano anisotropiche e formino aggregati a lungo raggio nella direzione perpendicolare alla superficie, fuori piano (direzioni x, y, z) (Figura 22 B). Le interazioni tra le biomolecole e la superficie, le interazioni intermolecolari tra le biomolecole stesse e l'anisotropia delle biomolecole (forma e presenza di diversi domini molecolari) sono fattori che contribuiscono alla densità di impaccamento, orientamento e quantità adsorbita, nonché, nel caso delle proteine bioattive, la loro attività biologica. In particolare, con l'aumento della copertura superficiale, le interazioni proteina-proteina possono modificare la cinetica di adsorbimento al substrato, portando a una cooperazione positiva o negativa⁴², di cui si discuterà al paragrafo '2.3.4-effetti cooperativi' più avanti. .



Figura 22: rappresentazione schematica dell'adsorbimento molecolare su superfici e di importanti parametri da considerare.
(A)Adsorbimento casuale o guidato da interazioni molecolari di proteine in una posizione specifica sulla superficie;
(B)adsorbimento di biomolecole anisotropiche sul piano di superficie (x, y) o fuori dal piano (x, y, z); (C) cambiamenti conformazionali di proteine 'hard' e 'soft' adsorbite su substrati con diversa bagnabilità en funzionalizzazione covalente si to-specifica ⁴².

2.3.4. Comportamento della singola proteina

Orientamento della proteina

Le proteine, essendo formate da diversi domini che possono presentare caratteristiche di carica distinte, mostrano affinità differenti per diverse regioni con la superficie adsorbente. Quando sono libere di interagire con la superficie senza risentire di interazioni con altre proteine, adottano un orientamento su quest'ultima dovuto alle caratteristiche della proteina e del substrato, riconducibile al minimo di energia libera risultante dalle forze attrattive coulombiane e le interazioni di Van der Waals, i ponti idrogeno, e il guadagno di entropia delle molecole di solvente o controioni di rilascio dalla superficie. Questa favorevole condizione energetica può essere disturbata nel momento in cui proteine che si adsorbono alla superficie dovessero interagire con quelle pre-adsorbite. Quando la vicinanza tra due proteine è tale che domini di una risentono della carica dei domini dell'altra, come in condizioni di alta densità superficiale, le proteine adottano un nuovo orientamento che permette di minimizzare le forze repulsive reciproche⁴³. Studi dimostrano che all'aumentare della concentrazione proteica in soluzione, sia l'albumina⁴⁴ che la fibronectina⁴⁵ vanno incontro ad una diminuzione della forza di adesione al substrato. Quindi le proteine adsorbite cambiano il loro orientamento in base alla densità superficiale riducendo le forze attrattive con la superficie, e al contempo diminuendo le forze repulsive con le proteine adiacenti (Figura 23).



Figura 23: rappresentazione schematica dei cambiamenti di orientamento delle proteine adsorbite in superficie. In alto: una rappresentazione della β-lattoglobulina raffigura la distribuzione di amminoacidi caricati positivamente (sfere rosse) e negativamente (sfere blu). Al centro: a densità superficiali basse, l'orientamento delle proteine è determinato esclusivamente dalle interazioni tra proteine e superficie. In basso: ad alte densità di superficie, l'aumento delle interazioni proteina-proteina può innescare cambiamenti di orientamento che portano a una diminuzione delle interazioni proteinasuperficie⁴³.

Cambiamenti conformazionali

Molte proteine, una volta adsorbite su una superficie solida, subiscono dei cambiamenti conformazionali⁴³. Le proteine che inizialmente arrivano alla superficie lo fanno nella loro forma nativa, che hanno in soluzione. Le interazioni che seguono per massimizzare l'area di contatto con la superficie sono guidate da un aumento di entropia, che porta nel tempo a riorganizzazioni strutturali delle proteine. Queste richiedono una serie di rotazioni angolari che necessitano di tempo, perciò l'affinità con la superficie può variare fortemente a secondo del periodo di adsorbimento, portando alla formazione di layer proteici sempre più fortemente legati alla superficie e resistenti all'eluizione. Una

classificazione delle proteine rispetto al loro comportamento interfacciale considerando principalmente la stabilità strutturale è stata fornita da Norde e Anusiem⁴⁶. Gli autori hanno diviso le proteine in due classi, 'hard' e 'soft'. Le proteine 'hard' hanno pochi riarrangiamenti strutturali che contribuiscono minimamente al processo di adsorbimento. Queste proteine preferiscono superfici idrofobiche, ma possono essere adsorbite anche dalle idrofiliche se attratte elettrostaticamente. Da questo punto di vista piccole e rigide proteine come lisozima e β-lattoglobulina sono chiamate 'hard', suggerendo una bassa tendenza generale verso alterazioni strutturali durante l'adsorbimento e sulla superficie una volta adsorbite. Proteine di media grandezza come la maggior parte delle proteine del plasma come albumina, transferrina, immunoglobuline, sono solitamente capaci di andare incontro a riorientamenti conformazionali dopo il contatto con la superficie⁴². Queste proteine, dette 'soft', hanno stabilità strutturali minori e possono essere adsorbite anche in condizioni più particolari, sia su superfici idrofobiche che idrofiliche (Figura 22 C).

Struttura del layer proteico

Quando le proteine adsorbono su una superficie possono formare un monostrato o un multistrato, a seconda delle condizioni in cui avviene l'adsorbimento. I multistrati si formano in specifiche condizioni che promuovono l'aggregazione di proteine o reprimono le repulsioni tra le proteine. Ad esempio, è stato osservato da Sousa et al. che aumentando la concentrazione in soluzione (100µg/mL) di fibronectina questa adsorbe come multistrato su superfici in ossido di titanio⁴⁵. Per la BSA, Yang et al. hanno osservato come l'adsorbimento su ossido di titanio portasse ad un maggior spessore del layer proteico quando il processo procedeva più velocemente (per effetto di topografia superficiale). La cinetica di adsorbimento e il grado di cambiamenti conformazionali della proteina adsorbita risultano legati, infatti un adsorbimento più veloce porta ad una minore interazione e spreading della proteina sulla superficie, a causa del rapido incremento della densità di molecole sulla superficie che limita cineticamente i cambiamenti conformazionali delle proteine. Ciò porta alla formazione di un layer proteico più spesso⁴⁷. I monostrati si formano invece quando le attrazioni sono deboli o repulsive, che è il caso delle proteine con stessa carica. Il pH, come già detto, influisce sulla formazione del layer proteico e il grado di impacchettamento delle proteine, che è più efficiente nell'intorno del punto isoelettrico. Come detto, la concentrazione proteica influisce anche sulla forza di adesione del layer proteico. Se infatti questa non è elevata la proteina può andare incontro ai riarrangiamenti che permettono di legare la proteina in maniera più forte alla superficie, se invece la concentrazione è elevata, l'interazione tra le proteine impedisce i cambiamenti conformazionali e di orientamento che legano maggiormente la proteina al substrato per la mancanza di siti superficiali dovuta ad un livello di saturazione più alto⁴³.

Interazioni laterali

Le interazioni laterali tra le proteine sono fortemente influenzate dal pH della soluzione. La possibilità di interagire infatti è legata alla carica portata da ogni molecola ed in condizioni diverse da quelle del punto isoelettrico le proteine si trovano ad avere una carica netta di segno uguale che causa repulsione tra le stesse. Allo stesso tempo a pH pari a quello del punto isoelettrico si osserva un adsorbimento con densità superficiale maggiore, perché repulsioni di questo tipo sono scongiurate da una carica globalmente neutra della proteina. Alcuni studi riportano una saturazione 5 volte maggiore quando l'albumina bovina viene fatta adsorbire sul silicio in condizioni di pH uguali al punto isoelettrico (4.9) rispetto a condizioni di pH uguali a 3^{48 49}. Anche la forza ionica gioca un ruolo nella densità di adsorbimento delle proteine al substrato, essendo legata alla lunghezza di Deybe. Come visto in precedenza, se questa distanza è sufficientemente piccola per l'alta presenza di specie cariche in soluzione, proteine che vengono adsorbite in uno stato di carica non neutra possono diminuire la loro distanza reciproca. Nel caso di soluzioni multiproteina, le interazioni laterali coinvolgono diverse specie proteiche. Le proteine più piccole diffondono più velocemente rispetto alle più grandi e sono le specie dominanti nella prima fase dell'adsorbimento. Le proteine più grandi tipicamente si legano più fortemente alla superficie grazie a una maggiore area di contatto e possono anche sostituire altre proteine preadsorbite mentre si spandono sulla superficie. Come conseguenza la massa totale di proteine adsorbite varia nel tempo ed anche il tipo di proteina presente in superficie⁵⁰. Questo è chiamato effetto Vroman, illustrato graficamente in Figura 24.



Figura 24: schema dell'adsorbimento sequenziale delle proteine come descritto dall'effetto Vroman. Ipotizzando un adsorbimento da soluzione multiproteina, inizialmente molte molecole proteiche di varie conformazioni vengono adsorbite sulla superficie del biomateriale. Sulla parte sinistra di tutti e tre i piani ci sono due proteine A (verdi) di diverse conformazioni, che cambiano nel tempo. Al centro della figura, diverse proteine B (gialle) con più legami sono sostituite nel tempo da una proteina C (rossa) più grande e ad alta affinità con la superficie che è arrivata successivamente sul substrato.⁵⁰

Effetti cooperativi

Durante l'adsorbimento, con l'aumento della copertura superficiale, le interazioni proteina-proteina possono modificare la cinetica del processo, portando a una cooperazione positiva o negativa⁴². Proteine pre-adsorbite guidano l'adsorbimento di altre che diffondono vicino la superficie, e possono portare ad aumento o una diminuzione dei tassi di adsorbimento previsti. La cooperazione positiva permette di raggiungere una distribuzione di carica uniforme sulla superficie grazie all'effetto del campo elettrostatico che circonda la proteina adsorbita e che è in grado di guidare la proteina in soluzione, che si muove in direzione verticale verso la superficie e orizzontale per effetto delle interazioni con le altre proteine già adsorbite (Figura 25). Fino a quando la superficie non è satura o contiene zone vuote le proteine adsorbono in maniera non cooperativa⁴³.



Figura 25: rappresentazione schematica del meccanismo di adsorbimento delle proteine non cooperative (pathway 1) e cooperativo (pathway 2). Durante l'adsorbimento cooperativo le proteine vengono attratte verticalmente verso la superficie e allo stesso tempo respinte orizzontalmente dalle proteine vicine.⁴³

Aggregazione di proteine

Durante il processo di adsorbimento le proteine possono andare incontro alla formazione di aggregati in soluzione e di cluster sulla superficie. La BSA tende ad esempio ad aggregare in soluzione⁴³. La formazione di questi cluster può essere vitale per il controllo e la trasduzione di segnali nei processi metabolici. È stato osservato che la fibronectina possa formare cluster sulla superficie di ossido di titanio, e coalescere all'aumentare della concentrazione e del tempo di incubazione del materiale in soluzione⁵¹. I cluster proteici possono evolvere direttamente sulla superficie mediati da forti interazioni tra le proteine o possono depositarsi dalla soluzione sulla superficie e successivamente espandersi. Questo fenomeno è fortemente influenzato dalla chimica della superficie: più veloce su superfici idrofobiche, più lento su superfici idrofiliche.

3. MATERIALI E PROTEINE DI INTERESSE: Il titanio e le sue leghe, l'adsorbimento di albumina e fibronectina

3.1. Titanio puro e leghe di titanio

Il titanio è un metallo ed elemento allotropico, il che significa che può esistere in più di una forma cristallografica. Questa caratteristica permette alle leghe formate da titanio di avere microstrutture diverse. La temperatura alla quale si verifica la trasformazione allotropica del metallo è 882°C. Al di sotto di questa temperatura, il titanio mostra una struttura cristallina esagonale compatta (HCP), nota come fase α , mentre a temperatura più alta ha una struttura cubica a corpo centrato (BCC), detta fase β . Quest'ultima rimane stabile fino al punto di fusione a 1670 ° C. Queste due strutture cristalline sono la base per denominare le tre classi generalmente accettate di leghe di titanio: alfa (indicate in seguito α), alfa-beta (α + β) e beta (β). Legando il titanio metallico con altri elementi, entrambe le strutture cristalline possono essere stabilizzate selettivamente a temperatura ambiente, rendendo così possibile la produzione di leghe stabili α , α + β e β . Gli elementi leganti comuni usati per stabilizzare la fase α includono niobio, molibdeno, tantalio, cromo, ferro e vanadio⁵². Infine, le leghe che combinano elementi stabilizzanti dei due tipi sono classificate come leghe α + β . La composizione chimica di alcune leghe di titanio di uso frequente è presentata nella tabella in Figura 26: composizione chimica e standard normativi per alcune leghe di titanio usate nel campo biomaterialeFigura 26.

Grade Name and Type	UNS Number	ASTM Standard	ISO Standard	Chemical Composition Nominal Weight %
Ti CP-1 (Alpha)	R50250	ASTM F 67	ISO 5832-2	C 0.10 max Fe 0.20 max H 0.015 max N 0.03 max O 0.18 max Ti rem
Ti CP-2 (Alpha)	R50400	ASTM F 67	ISO 5832-2	C 0.10 max Fe 0.30 max H 0.015 max N 0.03 max O 0.25 max Ti rem
Ti CP-3 (Alpha)	R50550	ASTM F 67	ISO 5832-2	C 0.10 max Fe 0.30 max H 0.015 max N 0.05 max O 0.35 max Ti rem
Ti CP-4 (Alpha)	R50700	ASTM F 67	ISO 5832-2	C 0.10 max Fe 0.50 max H 0.015 max N 0.05 max O 0.40 max Ti rem
Ti-3Al-2.5V (Alpha/Beta)	R56320	ASTM B 348 F-04.12.06		Al 3.0 C 0.05 max Fe 0.13 H 0.015 max N 0.01 O 0.10 Ti rem V 2.5
Ti-5Al-2.5Fe (Alpha/Beta)			ISO 5832-10	Al 5.0 C 0.05 max Fe 2.5 H 0.015 max N 0.05 max O 0.25 Ti rem
Ti-6Al-4V (Alpha/Beta)	R56400	ASTM F 1472	ISO 5832-3	Al 6.0 C 0.10 max Fe 0.20 H 0.015 max N 0.03 O 0.20 max Ti rem V 4.0
Ti-6Al-4V ELI (Alpha/Beta)	R56401	ASTM F 136	ISO 5832-3	Al 6.0 C 0.10 max Fe 0.20 H 0.015 max N 0.03 O 0.13 max Ti rem V 4.0
Ti-6Al-7Nb (Alpha/Beta)	R56700	ASTM F 1295	ISO 5832-11	Al 6.0 C 0.08 max Fe 0.15 H 0.009 max Nb 7.0 N 0.03 O 0.20 max Ta 0.5 max Ti rem
Ti-15Mo (Beta)	R58150	ASTM F 2066		C 0.05 max Fe 0.1 H 0.015 max Mo 15.0 N 0.01 O 0.15 Ti rem
Ti-13Nb-13Zr (Beta)	R58130	ASTM F 1713		C 0.08 max Fe 0.1 H 0.02 max Nb 13.0 N 0.01 O 0.1 Ti rem Zr 13.0
Ti-16Nb-10Hf (Beta)				C 0.05 max Fe 0.05 H 0.015 max Hf 9.5 Nb 16.0 N 0.002 O 0.1 Ti rem
Ti-15Mo-2.8Nb-0.2Si (Beta)			755	C 0.02 max Fe 0.2 H 0.02 max Mo 15.0 N 0.01 O 0.18 Ti rem Nb 2.8 Si 0.2
Ti-12Mo-6Zr-2Fe (Beta)	R58120	ASTM F 1813		C 0.02 max Fe 2.0 H 0.02 max Mo 12.0 N 0.01 O 0.18 Ti rem Zr 6.0
Ti-12Mo-5Zr-5Sn (Beta)				C 0.02 max Fe 0.2 H 0.02 max Mo 12.0 N 0.01 O 0.18 Ti rem Zr 5.0 Sn 5.0
Ti-15Mo-5Zr-3Al (Beta)				Al 3.0 C 0.02 max Fe 0.2 H 0.02 max Mo 15.0 N 0.01 O 0.18 Ti rem Zr 5.0
Ti-30Ta (Beta)				C 0.05 max Fe 0.1 H 0.015 max N 0.01 O 0.15 Ti rem Ta 30.0
Ti-45Nb (Beta)	R58450	AMS 4982		C 0.04 max Fe 0.1 H 0.003 max Nb 45.5 N 0.01 O 0.1 Ti rem

Figura 26: composizione chimica e standard normativi per alcune leghe di titanio usate nel campo biomateriale⁵²

Una classificazione delle leghe in titanio commercialmente molto usata prevede nella pratica di raggruppare nei gradi 1-4 della denominazione cp (commercialmente puro) il titanio non legato. Questa tipologia di titanio è la più debole ma quella che mostra maggior resistenza alla corrosione, il limite di snervamento varia da 170 a 480 MPa a seconda della presenza di elementi interstiziali e presenza di impurità, con la resistenza del metallo che aumenta all'aumentare della concentrazione di ossigeno, azoto e ferro⁵³. Altre leghe appartengono alla classificazione α oltre al Ti cp, e sono quelle che possiedono nella composizione principalmente elementi stabilizzatori α . Tra questi ci sono i metalli dei gruppi IIIA e IVA (Al e Ga) e gli interstiziali C, N e O. Esempi di questa lega sono Ti-8AL-1Mo-1V e Ti-6Al-2Nb-1Ta-0.8Mo. Tali leghe mostrano un'elevata resistenza al fenomeno di creep e sono quindi adatte per il servizio ad alta temperatura rispetto alle leghe $\alpha + \beta$ e β . Inoltre, poiché la fase α non è

soggetta a transizione duttile-fragile, queste leghe sono adatte anche per applicazioni a temperature molto basse⁵⁴. Una problematica è che la tenacia e la duttilità sono compromesse a temperature criogeniche a meno che il contenuto di elementi interstiziali sia ridotto. Per ovviare a tale problema sono state progettate leghe in titanio con ridotto contenuto di elementi interstiziali che vengono denominate ELI (extra low interstitial), ed un esempio di questa lega è Ti-5Al-2.5SnELI. Per quanto riguarda le proprietà meccaniche e metallurgiche, le leghe α presentano un livello ragionevole di resistenza meccanica, alto modulo elastico, buona tenacità alla frattura e bassa deformazione plastica, dovuta alla struttura cristallina HCP.

Le leghe di β -titanio si ottengono aggiungendo al titanio una quantità elevata di elementi β stabilizzanti, che diminuiscono la temperatura della trasformazione allotropica (transizione α/β) del titanio. Gli elementi β -stabilizzanti includono gli elementi di transizione (V, Ta, Nb, Mo, Mg, Cu, Cr e Fe) e i metalli nobili. Esempi di queste leghe sono Ti-15Mo, Ti-13Nb-13Zr. Le leghe di β -titanio sono molto fragili a temperature criogeniche e non sono destinate ad essere applicate ad alte temperature, poiché mostrano una bassa resistenza al creep. In genere queste leghe vengono utilizzate per fabbricare componenti in titanio adatti a lavorare a temperature moderate⁵³. Risultano di interesse nel settore biomedico per il basso modulo elastico che permette di ridurre l'effetto dello stress shielding, ossia la schermatura del carico da parte dell'impianto (rigido) verso l'osso circostante. La loro sperimentazione clinica però è piuttoso ridotta.

Infine, le leghe $\alpha + \beta$ includono leghe con abbastanza stabilizzanti $\alpha \in \beta$ da espandere il campo $\alpha + \beta$ a temperatura ambiente. La combinazione di fase ($\alpha \in \beta$) consente di ottenere un equilibrio ottimale delle proprietà, cosicché le caratteristiche di entrambe le fasi $\alpha \in \beta$ possono essere adattate applicando adeguati trattamenti termici e lavorazioni termomeccaniche ed è possibile ottenere un assortimento significativo di microstrutture. La lega Ti-6Al-4V è un esempio di lega di tipo $\alpha + \beta$. A causa della sua grande disponibilità, ottima lavorabilità e buon comportamento meccanico alle basse temperature, tale lega è la composizione più comune tra le leghe di titanio e sulla base di queste caratteristiche è ancora largamente applicata come biomateriale, principalmente nei dispositivi di impianto ortopedico⁵⁴. La Figura 27 mostra le tipiche microstrutture equiassiali e trasformate che si trovano nei prodotti semilavorati in lega di titanio α , $\alpha+\beta \in \beta$.



Figura 27: microstrutture tipiche per leghe di titanio α , α - β e β : (a) una fase α equiassiale in titanio non legato; (b) equiassiale $a + \beta$; (c) aciculare $\alpha + \beta$ in Ti-6AI-4V; (d) equiassiale β in Ti-13V-11Cr-3AI.⁵²

In campo biomedico, essendo usate principalmente nella sostituzione di tessuti duri come ossa, alle leghe in titanio sono richieste determinate proprietà meccaniche: un basso modulo elastico combinato a resistenza alla rottura, alla fatica e una buona lavorabilità. Queste caratteristiche sono direttamente correlate alla composizione e principalmente alla lavorazione termomeccanica. Alcune proprietà meccaniche di materiali selezionati a base di titanio applicati come biomateriali sono mostrate nella tabella in Figura 28.

Material	Tensile	Yield	Elongation	Elastic
	strength	strength	(%)	modulus
	(MPa)	(MPa)		(GPa)
α type				
Pure Ti grade 1	240	170	24	102.7
Pure Ti grade 2	345	275	20	102.7
Pure Ti grade 3	450	380	18	103.4
Pure Ti grade 4	550	485	15	104.1
$\alpha + \beta$ type				
Ti-6Al-4V	895–930	825-869	6-10	110–114
Ti-6Al-4V ELI	860–965	795–875	10-15	101-110
Ti-6Al-7Nb	900-1050	880–950	8.1–15	114
Ti-5Al-2.5Fe	1020	895	15	112
β type				
Ti-13Nb-13Zr	973–1037	836–908	10–16	79–84
Ti-12Mo-6Zr-2Fe	1060-1100	1000-1060	18–22	74–85
Ti-15Mo	874	544	21	78
Ti-15Mo-5Zr-3Al	852-1100	838-1060	18–25	80
Ti-15Mo-2.8Nb-0.2Si	979–999	945–987	16-18	83
Ti-35.3Nb-5.1Ta-7.1Zr	596.7	547.1	19	55
Ti-29Nb-13Ta-4.6Zr	911	864	13.2	80

Figura 28: proprietà meccaniche di materiali a base di titanio⁵⁴

3.2. Applicazioni biomedicali: uso del titanio e delle sue leghe

Come accennato in precedenza, le leghe di titanio vengono largamente utilizzate per impianti che sostituiscono i tessuti duri. Gli esempi includono articolazioni artificiali dell'anca, articolazioni artificiali del ginocchio, placche ossee, viti per la fissazione di fratture, ma anche protesi valvolari cardiache, pacemaker e cuori artificiali⁵⁵. La lega Ti-6Al-4V è stata a lungo una delle principali leghe di titanio medicale. Tuttavia, per le applicazioni di impianti permanenti, ha un possibile effetto tossico derivante dal rilascio di vanadio e alluminio. Per questo motivo, per le applicazioni a lungo termine sono state introdotte leghe prive di vanadio e alluminio, basate sugli impianti Ti-6Al-4V. Queste nuove leghe includono Ti6Al-7Nb, Ti-13Nb13Zr e Ti-12Mo6Zr^{54,55}. Sebbene possano insorgere problematiche di questo tipo, il titanio rimane un materiale d'elezione nelle applicazioni medicali soprattutto per l'eccellente biocompatibilità associata ai suoi ossidi, che ne rivestono la superficie spontaneamente nell'aria così come in fluidi biologici quali il sangue. Le principali proprietà fisiche del titanio responsabili di questa biocompatibilità sono: basso livello di conduttività elettrica, alta resistenza alla corrosione, lo stato di stabilità termodinamica a valori di pH fisiologici, bassa tendenza alla formazione di ioni in ambienti acquosi e un punto isoelettrico dell'ossido del valore 5–6. Inoltre, la superficie porta una leggera carica negativa a pH fisiologico⁵⁵.

Le prime applicazioni del titanio come materiale per dispositivi medici, chirurgici e dentali si basavano sui progressi del secondo dopoguerra nei processi di produzione del metallo per i reguisiti aerospaziali e militari. Pertanto, i primi biomateriali in titanio derivavano dalla "svendita" di volumi da quell'industria. Come detto una proprietà caratterizzante il titanio e le sue leghe è la formazione spontanea nell'aria e nel sangue di un film di passivazione di biossido altamente biocompatibile, fornendo superfici in grado di supportare la crescita diretta dei tessuti locali e la resistenza alla corrosione contro gli ambienti fluidi aggressivi, che è utile nelle applicazioni di impianto a lungo termine. Inoltre, altre caratteristiche che lo rendono di grande interesse sono la capacità di essere fabbricato in superfici strutturate ottimizzate in morfologia e porosità, un miglior comportamento rispetto alle leghe di acciaio inossidabile e cobalto-cromo nei casi in cui siano richieste la risonanza magnetica nucleare e la tomografia computerizzata, leggerezza (il titanio pesa il 40% in meno dell'acciaio, rendendolo un valido materiale per strumenti chirurgici) e assenza di reazioni allergiche nei pazienti.⁵⁶ Il titanio è anche uno degli elementi usati per creare leghe a memoria di forma e pseudoelastiche (nitinol), capaci di cambiare forma a seconda della temperatura o di avere grande deformazione elastica, molto usate ad esempio per stent e strumenti chirurgici per facilitare le operazioni nel campo operatorio. Esempi di strumenti e dispositivi in titanio e nelle sue leghe sono riportati nelle immagini in Figura 29.

Figura 29: esempi di stent (a) e strumenti chirurgici in nitinol: distanziatore per tessuto adiposo (b), fissatori ortopedici per unire parti di osso (c,e), distanziatori (d). Grazie alle proprietà delle leghe a memoria di forma, questi dispositivi mantengono una forma esercitando compressione o stiramento dei tessuti, facilitando le operazione del chirurgo; esempi di protesi e parti di protesi in titanio, per articolazione di ginocchio (f) e anca (g); esempi di vite(h), staffe(i) e fissatori intramidollari (l) in titanio per chirurgia ortopedica⁵⁴

Le leghe di titanio attualmente più usate in campo biomedico sono:

•ASTM F67 (Titanio semi-puro: 98,9 - 99,6 % titanio)

- ASTM F136 (Ti-6Al-4V)
- Timetal[®] 367 (Ti-6Al-7Nb)

Solo la seconda e la terza hanno vaste applicazioni in campo ortopedico. La prima viene più comunemente utilizzata in impianti dentali, oppure come rivestimento, a causa delle inferiori proprietà meccaniche.

Le applicazioni più comuni del titanio riguardano l'ortopedia con la sostituzione ossea di articolazioni e parti di ossa, la traumatologia dove si utilizzano fissatori esterni, interni e intramidollari. Il titanio e le sue leghe sono utilizzati anche per dispositivi odontoiatrici come impianti, corone, ponti e componenti di protesi di impianti dentali. Le problematiche relative all'uso del titanio e Ti-6Al-4V in una protesi ortopedica sono una bassa resistenza al taglio e una bassa resistenza all'usura. Altrettanto importante è la mancata corrispondenza del modulo di Young tra l'impianto in titanio (103–120 GPa) e l'osso (10- 30 GPa), che è sfavorevole per la guarigione e il rimodellamento osseo. Per risolvere queste problematiche si è cercato di sviluppare nuove leghe, tuttavia, esiste un compromesso tra il modulo elastico e altre proprietà meccaniche. Quando il modulo elastico si riduce, diminuisce anche la resistenza della lega di titanio. Al contrario, quando la resistenza aumenta, aumenta anche il modulo elastico. Ad ogni modo, a meno che non siano richieste proprietà specifiche e uniche, il titanio rimane il materiale di prima scelta per qualsiasi dispositivo medico impiantabile per il quale sono ritenute necessarie le proprietà meccaniche di un metallo e dove sono richieste biostabilità e assenza di rischi biologici. Un esempio lo si trova nello sviluppo di impianti dentali osteointegrati. Attualmente l'impianto dentale più comunemente utilizzato ha una forma a vite ed è realizzato in Ti-cp o Ti-6Al-4V, come mostrato in Figura **30**⁵⁵.



Figura 30: esempi di impianti dentali in titanio⁵⁵

3.3. Comportamento in ambiente biologico

Come già detto, il titanio metallico reagisce rapidamente con l'ossigeno e l'acqua permettendo la formazione di uno strato di TiO₂ semiconduttore, trasparente alla luce visibile, con spessore 3-5 nm in condizioni ambiente. L'ossido anfotero e meccanicamente rigido lega l'acqua strutturale negli strati atomici più esterni, formando siti O⁻, OH e OH²⁺ e possiede una debole carica negativa a pH fisiologico, con punto isoelettrico di valori intorno a 5-6. L'ossido è idrofilo con energia libera Ys = 44-54 mJ / cm² in condizioni ambientali⁵⁷. Questa è la normale superficie del titanio su cui l'acqua, gli ioni e le proteine si adsorbono al contatto con i fluidi corporei. Una volta adsorbite le biomolecole, le cellule cominciano ad interagire con il materiale, permettendo lo sviluppo di una matrice e di una organizzazione strutturale per la crescita tissutale. Le diverse fasi delle interazioni chimiche e biochimiche che si verificano durante l'esposizione della superficie dell'ossido di titanio all'ambiente biologico (illustrate in Figura 31) sono:

- idrossilazione e idratazione del film di ossido di titanio a contatto con fluido acquoso (a)
- adsorbimento di cationi e anioni dai componenti elettrolitici del fluido corporeo, in particolare calcio e fosfato (b)
- adsorbimento di biomolecole (proteine, glicoproteine, glicolipidi, lipoproteine, proteoglicani, polisaccaridi), attaccamento delle piastrine, formazione della rete di fibrina a contatto con il sangue (c)
- crescita dello strato di ossido/idrossido (strato esterno poroso, gelatinoso) e precipitazione di fosfati di calcio contenenti anche altre specie (magnesio, carbonato, fluoruro, ecc.) presenti nel fluido. Reazioni di scambio e riorganizzazione all'interno del film proteico ("biofilm") (d)
- formazione di un'architettura di interfaccia nel corso dell'attività cellulare: deposizione di matrici, formazione di reti di collagene, mineralizzazione (e)



Figura 31: rappresentazione degli eventi che si verificano all'interfaccia tra ossido di titanio e ambiente biologico. Le dimensioni delle caratteristiche non sono in scala. Le pellicole di ossido vengono mostrate come strutture ordinate per comodità, ma sono spesso amorfe o solo parzialmente cristalline.⁵⁷

3.4. Adsorbimento di albumina e fibronectina su superfici in titanio

Lo studio dell'adsorbimento proteico su superfici in titanio è oggetto di interesse da decenni, in virtù dell'uso di questo materiale negli impianti a lungo termine che interagiscono con l'ambiente biologico. Poter comprendere gli eventi dei primi momenti in cui la superficie del biomateriale entra in contatto con i fluidi biologici consente di avere conoscenza della quantità e conformazione delle proteine che, rivestendo l'impianto, guidano la successiva risposta cellulare e interazione con i tessuti circostanti, determinando in ultima analisi la buona integrazione o il fallimento dell'impianto. Per questo in letteratura si trovano un gran numero di studi sull'adsorbimento proteico su superfici in titanio che cercano di identificare quali siano i parametri e le forze che maggiormente guidano il processo. Nel caso specifico, molto interesse è stato dedicato all'albumina e alla fibronectina, in quanto la prima merita attenzione per essere la proteina più abbondante nel plasma sanguigno, ricoprendo circa la metà della quantità di tutte le proteine che lo compongono, e la seconda è tra le proteine di elezione per quanto riguarda l'obiettivo di guidare l'adesione cellulare. Negli studi presentati in questa parte si cerca di quantificare in quale misura alcuni parametri incidano sull'adsorbimento rispetto ad altri. Tra i parametri che vengono valutati risaltano:

- l'interazione elettrostatica,
- la concentrazione della specie proteica in soluzione,
- la topografia superficiale del metallo,
- la carica e la presenza di specie chimiche in superficie come gruppi basici o acidi,
- la bagnabilità
- la competizione tra proteine

Analizzare quanto uno specifico parametro influisca sull'adsorbimento proteico non è semplice in quanto, spesso, isolarne l'effetto risulta complesso. Ad esempio, trattamenti di passivazione volti a modificare la topografia superficiale dello strato di ossido di titanio sono talvolta legati a modifiche nella presenza dei gruppi chimici in superficie, o un aumento della rugosità può essere associato ad un aumento dell'idrofobicità del substrato. La sottostante divisione in sottoparagrafi dell'analisi della letteratura non deve intendersi perciò come categorica, bensì relativa a dove si è trovato che gli autori stessi ponessero maggiormente l'accento nei loro studi, relativamente ai parametri maggiormente influenzanti l'adsorbimento.

Dipendenza da effetti elettrostatici

Per quanto riguarda l'interazione elettrostatica, a pH fisiologico l'ossido di titanio risulta essere carico negativamente. Se le proteine portano, complessivamente, carica opposta, questa guida l'adsorbimento sulla superficie ⁵⁸, ma il carattere anionico dell'ossido attira anche una varietà di

cationi, che successivamente permettono alla superficie di legarsi elettrostaticamente alle proteine anche se queste hanno carica simile alla superficie ⁵⁹. Come tale, è stato in parte suggerito che l'adsorbimento delle proteine su TiO_2 fosse attribuito ai ponti salini o all'interazione elettrostatica.

Prendendo in esame l'albumina, le interazioni elettrostatiche costituiscono un meccanismo fondamentale nell'adsorbimento della proteina al titanio. Nello studio di Klinger et al. 60 si è valutato come l'interazione di cationi bivalenti come calcio e magnesio influenzino l'adsorbimento, giungendo alla conclusione che in condizioni fisiologiche (pH=7.0) l'albumina carica negativamente si leghi alla superficie di ossido di titanio, anch'essa negativa, attraverso siti elettrostatici offerti dalla presenza di ioni quali Ca²⁺in grado di agire come ponti. Anche secondo Zeng et al. ⁶¹ l'effetto di maggiori interazioni elettrostatiche porta ad un maggior adsorbimento di albumina su substrati in Ca₃(PO₄)₂ (fosfato di calcio) rispetto che in Ti, con la proteina che subisce anche più cambiamenti conformazionali interagendo con il bioceramico (Ca-P) rispetto che con il metallo. In vivo viene ipotizzato che la presenza di ossido faccia avvicinare il comportamento del Ti a guello del Ca-P con conseguente adsorbimento più efficiente. Wassel e Embery⁶² hanno verificato come l'adsorbimento di albumina aumentasse al diminuire del pH della soluzione, ipotizzando come a valori di pH elevati lo stato carico della proteina e della superficie renda maggiore lo strato di idratazione di entrambe, impedendo che si formino interazioni a corto raggio. Quando il valore di pH scende, e le cariche nette diminuiscono, una minor idratazione permette alle interazioni a corto raggio di entrare in gioco, favorendo l'adsorbimento. È stato osservato anche come la presenza di calcio aumentasse l'adsorbimento mentre quella del fosfato lo riducesse, indicando l'importanza da effetti elettrostatici. Inoltre, hanno notato come a concentrazioni minori, l'albumina apparisse più fortemente legata al substrato, grazie alla possibilità della proteina di essere libera da interazioni con altre proteine e offrire più siti di legame con quest'ultimo.

Studiando l'effetto di un potenziale elettrico indotto su superfici di titanio puro (99,99%) nell'adsorbimento di albumina sierica bovina Liamas et al. ⁶³ hanno verificato come sia le caratteristiche della superficie che l'ambiente elettrochimico mostrano un impatto significativo sull'adsorbimento delle proteine su titanio. Il potenziale catodico ha provocato il desorbimento di BSA a causa delle repulsioni elettrostatiche causate da una quantità eccessiva di elettroni sulla superficie del titanio e, quindi, una carica superficiale negativa complessiva. Al contrario, sotto il potenziale anodico l'adsorbimento di BSA è stato facilitato da interazioni elettrostatiche attraenti solo quando la superficie non è già satura di proteine.

Per testare l'effetto della carica superficiale sull'adsorbimento Isoshima et al. hanno usato un coating di ioni di litio su dischi in titanio di grado 2 commercialmente puro, aventi superfici micro-ruvide

mordenzate con acido. La carica elettropositiva è stata fornita immergendo il substrato in una soluzione LiOH a concentrazioni di 0,05, 0,1, 0,25, 0,5 e 1,0 M. L'adsorbimento di albumina e laminina aumenta con la concentrazione del trattamento con LiOH. È interessante notare che il più alto livello di adsorbimento superficiale della fibronectina è invece stato osservato sul titanio trattato con Li 0,25 M, indicando che esiste una concentrazione ottimale di rivestimento Li⁺ per varie proteine. L'aumento dell'idrofilia conseguente il trattamento LiOH in questo studio può essere dovuto all'aumento dell'energia superficiale o all'aumento della carica superficiale, la quale risulta giocare un ruolo importante nell'immobilizzazione delle proteine di adesione cellulare (tra cui la fibronectina nello studio), di interesse per il comportamento in vivo. Inoltre, l'immobilizzazione delle proteine è migliorata anche conseguentemente ad un aumento dei gruppi OH sulla superficie¹³.

Fattori ambientali e modifiche superficiali

Lo studio di fattori ambientali come il pH e la temperatura è stato considerato da un lavoro Kopac et al. ⁶⁴. Gli autori hanno verificato che su polvere di TiO₂ la velocità e l'ammontare dell'adsorbimento di albumina aumentano abbassando il pH e aumentando la temperatura. Il massimo è stato raggiunto a pH 4 e 40°C. Questo risultato potrebbe essere dovuto al cambiamento della struttura dei pori di TiO₂ o ad effetti ionici delle specie usate per abbassare il pH della soluzione che agiscono in maniera da favorire l'adsorbimento. Sempre Kopac et al.⁶⁵ hanno dimostrato come la capacità di adsorbimento dell'albumina sia aumentata con l'aumentare dell'area superficiale dello strato di TiO₂ a seguito di calcinatura a 100 e 200 °C per 24 ore del titanio. Inoltre, da misure di potenziale zeta hanno dedotto che l'interazione tra la proteina e la superficie fosse superiore nel caso del trattamento a temperatura più elevata che presentava maggior incremento dell'area superficiale.

Altri parametri di interesse, come accennato, riguardano la topografia delle superfici dei substrati, come ad esempio la rugosità. La capacità della rugosità di influenzare l'adsorbimento non è la stessa a livello nanometrico e micrometrico. Come dimostrato da Cai et al. ⁶⁶, su film di titanio aventi differenti rugosità nanometriche da 2 a 21 nm nessuna differenza statisticamente significativa della quantità adsorbita di fibrinogeno e albumina è stata trovata per le diverse topografie. Secondo gli autori la rugosità su scala nanometrica ha pochi effetti sulla quantità o sulla struttura della proteina adsorbita, e quindi la topografia della superficie del titanio ha un'influenza distinta sui comportamenti di adsorbimento delle proteine a seconda che ci si trovi su scala nanometrica. Nello stesso ambito Liu et al.⁶⁷ hanno studiato l'effetto di mesopori sull'adsorbimento di albumina su ossido di titanio, considerando l'effetto della grandezza dei pori e della loro chimica. I risultati mostrano che i mesopori più grandi della dimensione idrodinamica corrisponde in questo caso al diametro equivalente di una sfera che diffonde alla stessa velocità della proteina studiata. Quando i mesopori

sono più grandi, da 17,1 nm a 28,0 nm, due molecole di BSA vengono adsorbite simultaneamente in ciascun mesoporo. In contrasto con la comprensione generale che i mesopori di grandi dimensioni hanno una scarsa stabilità di adsorbimento delle proteine, la BSA adsorbita nella fibra di titanio mesoporosa mostra un'elevata stabilità alla lisciviazione. Ciò è dovuto agli effetti sinergici della dimensione dei pori e della chimica dei pori, che sono confermati dalla misurazione calorimetrica del calore di adsorbimento e dall'analisi della densità del gruppo idrossilico all'interno dei pori. A conferma dell'importanza della chimica superficiale, Feng et al. ⁶⁸ hanno cercato di promuovere l'adsorbimento di albumina sul titanio attraverso trattamenti termici in atmosfere ossidanti che hanno portato alla presenza di gruppi ossidrilici acidi e basici sulla superficie. Il trattamento conferiva alle superfici una maggior energia superficiale e area superficiale, con più siti di legame per gruppi ossidrilici che promuovono l'adsorbimento per via chimica dell'albumina, portando a un cambiamento conformazionale della proteina adsorbita.

Yang et al.47 hanno investigato l'influenza di parametri topografici superficiali oltre la rugosità sull'adsorbimento proteico su superfici in titanio. Per farlo hanno fabbricato film sottili di titanio le cui superfici ossidate hanno composizioni chimiche quasi identiche come verificato dalla spettroscopia fotoelettronica a raggi X (XPS), ma topografie nanometriche molto diverse con bassi valori di rugosità che vanno da 0,2 a 2,7 nm. Il problema affrontato riguarda la descrizione morfologica delle superfici nanostrutturate. Sebbene vi siano molti parametri statistici che possono essere utilizzati per descrivere una superficie ruvida, nessuno di questi parametri fornisce una descrizione completa della topografia dell'intera superficie. Ad esempio, la rugosità superficiale ampiamente utilizzata, che può essere calcolata dalle immagini di microscopia a forza atomica (AFM), descrive il momento del secondo ordine della distribuzione dell'altezza della superficie e, quindi, una misura delle fluttuazioni dei valori di altezza della superficie intorno all'altezza media. Pertanto, superfici con topografie molto diverse possono avere valori di rugosità superficiale identici. Per l'albumina, è stato riscontrato che l'adsorbimento procede più velocemente su superfici con rugosità maggiore e che determina uno spessore maggiore del film proteico alla saturazione, oltre che una significativa denaturazione e modifiche strutturali delle proteine. Ciò indica che l'adsorbimento di BSA su queste superfici di ossido di titanio è per lo più governato dal numero di siti di adsorbimento disponibili e che esiste un'interazione tra la cinetica di adsorbimento e il grado di cambiamenti conformazionali delle proteine indotti dal processo stesso. Inoltre, poiché un adsorbimento più veloce in generale si traduce in una minore diffusione della proteina sulla superficie, in media si forma un film più spesso. Secondo gli autori, questo effetto può essere particolarmente pronunciato per la BSA, che è ben nota per subire una forte denaturazione durante l'adsorbimento. Nella ricerca di altri parametri topografici all'infuori della rugosità che possano descrivere la superficie e influenzare l'adsorbimento Rockwell et al. hanno

studiato l'adsorbimento di albumina su superfici in titanio con porosità variabile, notando un aumento di proteina adsorbita con l'aumentare dell'area superficiale, che però aumentava del 15% a fronte del 50% di proteina adsorbita. La spiegazione proposta prende in considerazione la curvatura media della superficie su scala nanometrica, ricavata dall'elaborazione del profilo topografico di superficie, che se elevata causa minore denaturazione permettendo alla proteina di impacchettarsi più efficacemente ⁶⁹.

In letteratura sono presenti anche studi che prendono in esame morfologie superficiali molto particolari. Ad esempio, è stato studiato l'adsorbimento proteico su superfici in TiO₂ e superfici modificate con la creazione di nanotubi. Al fine di controllare la morfologia superficiale dei substrati di TiO₂, array di nanotubi di TiO₂ di diversi diametri sono stati sintetizzati mediante la tecnica di anodizzazione elettrochimica. I nanotubi erano altamente ordinati e allineati verticalmente. Sono stati fabbricati di tre dimensioni (diametri interni di 32 ± 4 nm, 47 ± 6 nm e 80 ± 7 nm e diametri esterni di 50 ± 6 nm, 75 ± 7 nm e 100 ± 10 nm). Tutti gli array di nanotubi erano superidrofilici, mostrando un angolo di contatto con l'acqua <5 °. La presenza di nanotubi ha influito sulla conformazione delle proteine adsorbita. L'albumina adottava conformazioni significativamente diverse rispetto al substrato non trattato di TiO₂, con perdita di α -eliche e presenza di strutture meno ordinate ⁷⁰.

Studiando superfici a diversa rugosità Sousa et al.⁴⁴ hanno creato due substrati di ossido di titanio, uno depositato su silicio e un altro ottenuto per immersione in soluzione di H₂O₂ 10 mM per 48 ore. Quando trattato con perossido di idrogeno, è stato osservato un aumento della rugosità superficiale su scala nanometrica, che ha portato a una superficie più uniforme. Questo effetto è probabilmente correlato al forte effetto ossidante di H_2O_2 . L'energia libera superficiale aumenta dopo il trattamento con H_2O_2 a causa dell'esistenza di più siti reattivi esposti sullo strato di ossido, che conferiscono un contributo maggiore della componente polare a causa della presenza di specie ioniche. Considerando che la polarità è un indicatore di idrofilicità, il substrato con deposito su silicio di TiO2 è risultato quello più idrofobico (con valori di angolo di contatto con acqua di circa 84° contro i 71° del titanio trattato con H₂O₂). Sebbene la quantità di albumina adsorbita fosse maggiore sulla superficie più idrofobica, su quella più idrofilica le molecole mostravano una aderenza maggiore, come indicato dal lavoro di adesione e dagli studi di desorbimento. La forza di adesione però diminuiva con l'aumentare della concentrazione di albumina in soluzione. Per spiegare questo, bisogna tenere a mente che il meccanismo di adsorbimento di proteine 'soft' come l'albumina è guidato principalmente da riarrangiamenti strutturali che permettono alle biomolecole di superare le condizioni sfavorevoli date dalle repulsioni elettrostatiche della superficie. A concentrazioni proteiche più elevate, molecole con diversi gradi di dispiegamento coesistono all'interfaccia del materiale, rendendo più difficile o impossibile superare le condizioni sfavorevoli all'adsorbimento. Inoltre, è stato osservato che l'albumina adsorbisse come multilayer sulla superficie a tutte le concentrazioni dello studio (0.2-0.4-1.0-4.0-10.0 mg/mL). Le stesse superfici sono state utilizzate per studiare l'adsorbimento di fibronectina. Si è verificato come la proteina rendesse entrambe le superfici più idrofiliche e come avesse più affinità per il substrato trattato con H_2O_2 che risultava essere più idrofilico. Anche la forza di adesione su questa superficie era maggiore e la proteina una volta adsorbita tendeva a scambiarsi meno con altre in soluzione. Con concentrazioni maggiori di proteina in soluzione però la forza di adesione diminuiva, comportamento simile all'albumina attribuito al fatto che la fibronectina si comporta come proteina 'soft' e in casi di minor concentrazione riesce ad affrontare riarrangiamenti strutturali per favorire l'adsorbimento su superficie che altrimenti sarebbero elettrostaticamente sfavorevoli. Nel plasma è stato invece osservato un comportamento opposto, con la fibronectina più fortemente ancorata in soluzioni di plasma non diluite rispetto che diluite. Questo è dovuto alle interazioni con le altre specie proteiche in soluzione e all'interscambiabilità della fibronectina con altre proteine meno affini alla superficie. L'adsorbimento dal plasma di fibronectina ha anche rivelato maggior affinità per l'ossido depositato più idrofobico. Inoltre, è stata avanzata l'ipotesi che data la quantità di proteina adsorbita questa potesse aver formato multilayer nell'orientamento side-on (disposizione orizzontale della proteina sulla superficie) per concentrazioni proteiche maggiori di 100 µg/mL (adsorbimento di un'ora), dato che il riferimento considerato dagli autori per uno monostrato di proteina in questo orientamento è 1750 $\mu g/m^2$ e la misura ha fornito 2870 ± 1.95 $\mu g/m^2$ ⁴⁵. Sempre lavorando con gli stessi substrati Sousa et al. hanno visto come dopo trenta minuti la fibronectina si adsorba secondo aggregati in isole o cluster (concentrazione proteica in soluzione per adsorbimento fino a 75 µg/mL). I risultati ottenuti dalla microscopia a forza atomica (AFM) suggeriscono infatti che le molecole di fibronectina adsorbite non formino uno strato continuo sulla superficie di TiO₂, ma piuttosto un rivestimento eterogeneo coalescendo all'aumentare del tempo di incubazione e concentrazione della proteina in soluzione. Dall'analisi della sezione trasversale tramite AFM è stato osservato che l'altezza dei globuli di proteina aumenta con il tempo di incubazione, mentre il diametro rimane costante, suggerendo che le molecole possano adsorbire sopra la proteina preesistente, formando multistrati. Inoltre studiando l'interscambiabilità delle proteine adsorbite con altre in soluzione hanno osservato come questa dipenda più dalla natura dei due substrati che dal tempo o dalla natura della proteina, con il trattato più idrofobico che mostrava più reversibilità al legame di fibronectina, sia in presenza della stessa proteina che utilizzando albumina allo scopo 51.

Il confronto tra albumina e fibronectina nell'ambito dell'adsorbimento superficiale pone spesso l'accento sulla topografia della superficie. Deligianni et al hanno valutato l'effetto della rugosità superficiale nell'adsorbimento di albumina e fibronectina su superfici di Ti-6Al-4V. La preparazione dei campioni ha portato ad avere superfici con tre diversi valori di rugosità (R: 0,320, 0,490 e 0,874 μm).

Nello studio si è osservato come l'albumina prediliga superficie più lisce a differenza della fibronectina che ha un comportamento opposto. Questo perché l'aumento della rugosità dà superfici più idrofiliche 71 su cui l'albumina tende ad adsorbire meno а differenza della fibronectina Kusakawa et al.¹² hanno confrontato l'adsorbimento su titanio e ZrO2 di fibronectina ed albumina. La quantità di proteina adsorbita sul titanio si è rivelata essere maggiore in ogni caso. La rugosità maggiore a livello nanometrico ha guidato questo risultato sul titanio. Tra le due proteine, adsorbimenti con stessa concentrazione di 0,5 mg/mL hanno dato maggiori risultati per la fibronectina, mentre l'albumina adsorbiva più velocemente. Le superfici di titanio o ZrO2 erano significativamente più ruvide dopo l'assorbimento di fibronectina che dopo l'adsorbimento di albumina. Un maggior adsorbimento di fibronectina rispetto all'albumina è stato riscontrato anche da Yang et al.⁷² misurando l'adsorbimento da soluzioni monoproteina con concentrazioni proteiche dello stesso valore (1 mg/mL) su dischi in Ti che hanno subito un trattamento di passivazione.

Studiando gli effetti della topografia, Sela et al.⁷³ hanno trattato dischi in Ti6Al4V in tre modi differenti: torniti meccanicamente, doppio attacco acido, attacco acido e sabbiatura. È stato riscontrato che le superfici sottoposte ad attacco acido e sabbiatura avevano valori di rugosità più elevati e uno strato di TiO₂ più spesso rispetto alle altre. Inoltre, hanno mostrato un'elevata differenziazione della superficie, indicando un elevato aumento dell'area superficiale. L'adsorbimento delle proteine dal plasma su queste superfici era sia qualitativamente che quantitativamente più intenso rispetto alle superfici lavorate e mordenzate con acido. Questo è stato dimostrato per ciascuna proteina esaminata, tra cui albumina e fibronectina. Quest'ultima, inoltre, veniva adsorbita più di ogni altra proteina dal plasma (confrontando l'adsorbimento di albumina, fibronectina, fibrinogeno e immunoglobulina G).

Bagnabilità superficiale ed effetti sull'adsorbimento

È stato ipotizzato che il legame delle proteine su superfici in titanio sia il risultato di un'interazione idrofobica, influenzata dalla bagnabilità superficiale dell'impianto. Le superfici in titanio sono costituite da componenti idrofiliche (polari) e idrofobiche (non polari), con il rapporto medio polare / non polare di 0,21 \pm 0,07 che è considerato giocare un ruolo nell'adsorbimento delle proteine ⁷⁴.

In alcuni casi la concentrazione è stata rivolta ad indagare quali parametri potessero guidare l'adsorbimento selettivo di proteine da soluzioni multicomponente o dal siero. Toffoli et al.¹⁴ hanno utilizzato dischi in titanio cp grado 4 lavorati tramite fresatura e sottoposti ad attacco acido per ottenere superfici liscie e microrugose. Inoltre, hanno studiato l'effetto di un trattamento termico a 300°C per 2 ore per aumentarne l'idrofilicità senza modificare la topografia. I risultati di questo studio hanno mostrato che l'idrofilicità indotta termicamente controlla l'adsorbimento selettivo di proteine specifiche dal siero. In particolare, una maggiore bagnabilità sembra promuovere l'adsorbimento di

fibrinogeno e fibronectina, con effetto sull'adesione e la diffusione degli osteoblasti. L'adsorbimento di BSA o fibronectina sierica umana (HSF) pura, ciascuna disciolta in una soluzione salina a 200µg /mL, era invece comparabile su superfici in titanio sia normali che a idrofilia aumentata, per profili sia lisci che rugosi. Generalmente, anche se la cinetica di adsorbimento di BSA era più veloce di HSF in punti temporali molto precoci (5-15-30 minuti), HSF è stata adsorbita in modo più lineare per un'ora mentre l'adsorbimento di BSA ha raggiunto un plateau nello stesso periodo. Questa osservazione suggerisce una maggiore affinità del titanio per HSF e porta gli autori a ipotizzare che l'HSF sarebbe ulteriormente adsorbita anche dopo le tre ore di incubazione effettuate. Inoltre, i dischi più idrofilici hanno trattenuto più proteine di quelli non trattati a seguito di un lavaggio abbondante dopo incubazione in soluzione complessa di proteine del siero umano, probabilmente a causa di forze d'adesione maggiori o cambiamenti conformazionali indotti dal processo di adsorbimento. In conclusione, l'aspetto di maggior interesse è che l'idrofilia indotta termicamente favorisce l'adsorbimento della fibronectina plasmatica e del fibrinogeno dal siero, con evidenti effetti sulla risposta degli osteoblasti.

Anche Parisi et al.⁷⁵ hanno investigato il ruolo dell'idrofilicità nel promuovere l'adsorbimento proteico selettivo da miscele proteiche su substrati di titanio trattati in modo da avere diverse idrofilicità. L'idrofilicità della superficie del titanio (angolo di contatto con acqua circa 55 gradi) promuove l'adsorbimento di HSF rispetto all'adsorbimento competitivo di HSA se le due proteine sono conpresenti in una miscela complessa alla loro concentrazione sierica relativa (0,2 mg/mL per fibronectina e 20 mg/mL per albumina). Secondo gli autori, l'affinità delle superfici idrofiliche per HSF appare forte, tenendo conto che HSF è 100 volte meno concentrata di HSA. Quando sono state applicate soluzioni pure di proteine, non sono state rilevate differenze nella quantità di HSF o HSA adsorbite tra i campioni idrofili e idrofobici, indicando un ruolo chiave dell'idrofilia nel controllo dell'adsorbimento selettivo da miscele complesse.

In uno studio Kohavi et al. ⁷⁶ hanno usato dischi in lega Ti-6Al-4V con diverse topografie superficiali ottenute da lavorazione meccanica, attacco acido, attacco acido e sabbiatura per studiare l'effetto della topografia superficiale, della bagnabilità superficiale e interazioni elettrostatiche. Hanno dimostrato come migliorare l'idrofilia delle superfici pre-immergendole per due ore in soluzioni di diversi elettroliti corrisponda ad un miglior adsorbimento sia per l'albumina che per la fibronectina. Nel caso dell'albumina l'adsorbimento era migliorato anche dalle interazioni elettrostatiche per la presenza di ioni calcio e magnesio in soluzione e sulle superfici con maggior rugosità e area superficiale ottenute per attacco acido e sabbiatura. La fibronectina invece risentiva positivamente dell'effetto dell'aumentata bagnabilità e della topografia superficiale come per l'albumina, ma a differenza di quest'ultima nessun cambiamento significativo era dato dalla presenza di ioni calcio e magnesio in soluzione e sulto dalla presenza di ioni calcio e magnesio in soluzione era dato dalla presenza di ioni calcio e magnesio in soluzione era dato dalla presenza di ioni calcio e magnesio in soluzione era dato dalla presenza di ioni calcio e magnesio in soluzione.

Per quanto riguardo lo studio dell'adsorbimento di fibronectina, spesso si è cercato di valutare la quantità e conformazione che la proteina assumesse sulle superfici in titanio in virtù di ottimizzare le interazioni del materiale con le cellule dell'ambiente biologico destinato all'impianto. MacDonald et al.⁷⁷ hanno osservato come la fibronectina quando adsorbita su superfici in titanio commercialmente puro (Ti cp) assuma una struttura globulare di 16,5 ± 1,0 nm di lunghezza, 2,5 ± 0,5 nm di altezza e 9,6 ± 1,2 nm di diametro complessivo. In presenza di fibronectina, la superficie appariva più idrofobica a causa delle frazioni proteiche esposte, passando da angoli di contatto con acqua di circa 35-40 gradi per il titanio a circa 55 dopo l'adsorbimento con fibronectina. A concentrazioni di 1µg/mL, la fibronectina sembrava formare una sottile matrice reticolata che poteva essere sollevata dalla superficie attraverso la punta dell'AFM.

Sempre MacDonald et al. hanno investigato l'adsorbimento di fibronectina su particelle di polvere di ossido di titanio (TiO₂), trattate per modificarne la bagnabilità con butanolo. Hanno osservato come aumentando l'idrofobicità della superficie (angolo di contatto circa 80 gradi) aumentasse anche l'adsorbimento di fibronectina, e che questa conferisse alla superficie una volta adsorbita maggior idrofobicità e incremento del valore negativo di potenziale zeta, ipotizzando un cambiamento strutturale della proteina in soluzione che favorisse l'interazione dei domini idrofobici con la superficie. Gli autori suggeriscono come oltre le proprietà della soluzione (la forza ionica) anche l'idrofobicità della superficie sia in grado di guidare il dispiegamento della proteina e facilitare l'interazione dei siti idrofobici di questa con la superficie. Inoltre, la natura idrofobica delle particelle di TiO₂ modificate potenzierebbe la capacità di allontanare le molecole d'acqua che circondano le catene proteiche ripiegate, facilitando così la possibilità di dispiegarsi e legarsi. Secondo gli autori sebbene le interazioni tra cariche siano importanti, e il meccanismo che permette alle proteine di legarsi ad un substrato avente la stessa carica netta superficiale della proteina sia tramite ponti salini dati dalla presenza di elettroliti in soluzione, la disidratazione della superficie dovuta alle interazioni idrofobiche tra la proteina e la superficie stessa domina le interazioni elettrostatiche all'interfaccia solido/liquido. L'esperimento è stato condotto a pH fisiologico (pH=7,4) e temperatura ambiente ⁷⁸.

Concentrazione proteica e verifica dei cambiamenti conformazionali

Yang et al.⁷⁴ hanno studiato la dipendenza sull'adsorbimento di fibronectina sierica bovina (BSF) dalla concentrazione proteica in soluzione e dal tempo di incubazione su dischi in titanio cp2 lucidati fino ad ottenere rugosità superficiale di $0.37\pm/0.01$ µm e sottoposti a trattamento di passivazione con acido nitrico. È stato osservato che il massimo adsorbimento della fibronectina sulle superfici di Ti si verifica dopo 180 minuti di incubazione raggiungendo uno stato stazionario e che l'adsorbimento dipende in modo significativo dalla concentrazione iniziale e dal tempo di incubazione, raggiungendo un massimo per 1 mg/mL. Inoltre, è stato osservato che una concentrazione ottimale di fibronectina adsorbita

aumenta significativamente l'adesione cellulare, in quanto la conformazione che assume la proteina è dipendente dalla sua concentrazione. Il miglior risultato è stato ottenuto dopo 15 minuti di incubazione con una concentrazione di 1 mg/mL.

Strehele et al.⁷⁹ hanno usato la spettroscopia Raman per indagare cambiamenti conformazionali delle proteine a causa dell'adsorbimento su nanoparticelle in TiO₂. Per la fibronectina è stato notato un aumento nella struttura secondaria del foglietto- β . I cambiamenti osservati tra l'area del picco Raman, riconducibile alla deformazione dei CH₃/CH₂, in relazione all'area del picco Raman della banda amidica I indicano che le catene laterali della proteina sono coinvolte nel processo di adsorbimento su superfici inorganiche, e che una struttura a foglietto- β sia vantaggiosa rispetto ad una ad α -elica in quanto il 50% delle catene laterali si trovano lungo la stessa direzione e sono più disponibili all'adsorbimento. Inoltre, è stato verificato che l'adsorbimento avviene per mezzo dei gruppi carbossilici delle catene laterali amminoacidiche.

In conclusione, le caratteristiche del substrato e della soluzione proteica possono variare molto e far variare di conseguenza il risultato dell'adsorbimento proteico sulle superfici. Interazioni elettrostatiche e idrofobiche guidano l'adsorbimento, e le proteine mostrano di andare incontro a cambiamenti conformazionali che sono dipendenti anche dalla concentrazione delle specie proteiche in soluzione. La topografia superficiale del substrato, con influenze distinte a livello micro e nanometrico, deve essere considerata in virtù di più parametri che descrivono anche la morfologia della superficie (ad esempio presenza di nanotubi, curvatura superficiale), e tramite i valori di rugosità è legata anche alla bagnabilità della superficie, che mostra effetti distinti a seconda che l'adsorbimento avvenga in soluzioni monoproteina o multiproteina. In generale dai confronti tra fibronectina e albumina nell'adsorbimento su superfici in titanio, la prima appare avere una affinità maggiore, anche quando le condizioni della soluzione adsorbente rispecchiano le concentrazioni relative delle proteine nel plasma, e quindi vedendo la fibronectina con una concentrazione molto inferiore rispetto all'albumina. Nella seguente tabella vengono illustrati schematicamente gli articoli considerati per l'analisi della letteratura, con le informazioni principali dedotte da ognuno.

Proteina	Materiale	Tecniche	Informazioni salienti	ref	anno
HSA	Polvere di TiO ₂	Saggio colorimetrico, misura della densità ottica con spettrofotometria	Le interazioni elettrostatiche costituiscono un meccanismo fondamentale nell'adsorbimento di HSA al Ti. Cationi bivalenti come calcio e magnesio influenza no adsorbimento	60	1996
BSA	Polvere di TiO ₂	Saggio colorimetrico, Microelettroforesi per mobilità elettroforetica e calcolo potenziale zeta	Adsorbimento aumenta al diminuire del pH, indicando effetti di idratazione. Aumenta in presenza di calcio e diminuisce col fosfato, indicando dipendenza da effetti elettrostatici. Minore la concentrazione di BSA, più fortemente risulta legata	62	1996
BSA	Film di Ti-cp	FTIR-ATR	Dipendenza adsorbimento da interazioni elettrostatiche, che portano a cambiamenti conformazionali della proteina	61	1999
BSA - BSF	Dischi TI-6Al-4V lucidati con diversa rugosità superficiale	XPS, radiolabeling	BSA adsorbita preferenzialmente sulla superficie più liscia. La rugosità dà superfici più idrofiliche che adsorbono meno albumina. La fibronectina è adsorbita di più su quelle più rugose	71	2001
BSA - BSF	Dischi Ti- cp2 trattati con passivazione	Saggio colorimetrico, SEM	Dipendenza adsorbimento da affinità della proteina al substrato (fibronectina maggior adsorbimento di albumina). La fibronectina influenza positivamente adesione cellulare	72	2002
BSA	Ti-cp sottoposto a trattamenti termici in atmosfere ossidanti	XPS	Dipendenza adsorbimento da chimica superficiale, energia superficiale e area superficiale, cambiamenti conformazionali della proteina adsorbita	68	2002
BSA - siero	Due ossidi di titanio, depositato su Si e ottenuto per immersione in H ₂ O ₂	Radiolabeling, XPS, AFM, angolo di contatto	Rugosità, bagnabilità, energia superficiale e concentrazione proteica influiscono sull'adsorbimento e sulla conformazione della proteina	44	2004

BSA - BSF	Dischi Ti-6Al-4V con tre morfologie superficiali	spettrometria di massa, microscopia confocale a scansione laser, XPS, ELISA	Adsorbimento dipende dalla morfologia superficiale e affinità della proteina al substrato	73	2006
BSA	Film di Ti-cp con rugositità nanometriche da 2 a 21 nm	AFM, XPS, Angolo di contatto, saggio colorimetrico	La topografia della superficie del titanio su scala nanometrica e micrometrica ha influenza distinta sull'adsorbimento delle proteine	66	2006
BSA	Polvere TiO ₂	Analisi spettrofotometrica, misura mobilità elettroforetica e potenziale zeta	Dipendenza adsorbimento da variazioni di pH e temperatura	64	2008
BSA	TiO ₂ calcinato a 100 e 200 gradi per 24h	Analisi spettrofotometrica, misura potenziale zeta	Dipendenza adsorbimento da morfologia e area superficiale	65	2009
BSA	Rivestimento in Ti con porosità variabile	analisi con microsonda elettronica (EMPA) con spettroscopia dispersiva della lunghezza d'onda	Caratteristiche topografiche della superficie influenza no l'adsorbimento, dipendenza dalla curvatura superficiale	69	2011
HSA - HSF	Dischi in lega Ti- 6Al-4V con diverse topografie superficiali	ELISA, angolo di contatto, SEM, AFM	Per HSA, adsorbimento migliorato dalla bagnabilità, la presenza di Ca e Mg nella soluzione bagnante e rugosità superficiale. Per HSF, la bagnabilità e rugosità superficiale migliorano l'assorbimento	76	2012
BSA	TiO ₂ mesoporoso	FTIR, XRD, SEM, microcalorimetria isotermica, misure termogravimetriche esperimenti di liscivazione	Effetto sinergico della chimica e grandezza dei mesopori influenzano l'adsorbimento proteico	67	2016
BSA - HSF	Ti e ZrO2	QCM	Affinità della proteina al substrato influenza la cinetica di adsorbimento	12	2017
BSA - BSF	Dischi in Ti-cp2	XPS, SEM, potenziale zeta, saggio colorimetrico	Carica superficiale influenza l'adsorbimento proteico, può essere ottimizzata per adsorbimenti selettivi	13	2019

BSA - HSF	Dischi TiCP4	Saggio colorimetrico, SDS-page, WB	L'idrofilia indotta termicamente controlla l'adsorbimento selettivo di proteine specifiche dal siero, con effetto sull'adesione e la diffusione degli osteoblasti	14	2019
BSA	Ti-cp (99.99%)	microbilancia elettrochimica a cristalli di quarzo (EQCM)	Sia le caratteristiche della superficie che l'ambiente elettrochimico hanno un impatto significativo sull'adsorbimento delle proteine su Ti	63	2019
HSA - HSF	Dischi in Ti con differenti trattamenti meccanici e chimici	Saggio colorimetrico, angolo di contatto, SEM	La bagnabilità della superficie promuove l'adsorbimento selettivo di proteine da miscele complesse	75	2020
BSA	TiO ₂ e TiO ₂ con nanotubi	Saggio colorimetrico, SEM, XPS, QCM, XRD, AFM, FT-IRRAS	Topografia della superficie influenza adsorbimento e conformazione delle proteine adsorbite	70	2020
BSA	Film sottili di titanio puro depositati su silicone	Ellissometria, XPS, AFM	La rugosità superficiale influenza l'adsorbimento, la cinetica di adsorbimento è legata al grado di cambiamenti conformazionali delle proteine indotti dall'adsorbimento	47	2021
HSF	Dischi in Ti-cp	Angolo di contatto, AFM	Dipendenza dell'adsorbimento da concentrazione proteica in soluzione, adsorbimento porta a cambiamenti conformazionali della proteina adsorbita	77	1997
HSF	Polvere di TiO ₂	ESCA, FTIR, angolo di contatto, mobilità elettroforetica e potenziale zeta	Interazioni idrofobiche e elettrostatiche guidano adsorbimento proteico e conformazione della proteina	78	2001
BSF	Dischi TiCP2 lucidati e trattamento passivazione con acido nitrico	Saggio colorimetrico, SEM	L'adsorbimento della fibronectina sulle superfici di Ti dipende in modo significativo dalla concentrazione iniziale e dal tempo di incubazione	74	2003
HSF	Nanoparticelle TiO ₂	Spettroscopia Raman	Chimica superficiale influenza adsorbimento, cambiamenti nella struttura secondaria si verificano durante l'adsorbimento delle proteine	79	2004

HSF	Due ossidi di titanio, depositato su Si e ottenuto per immersione in H ₂ O ₂	XPS, angolo di contatto, radiolabelling	Dipendenza adsorbimento da bagnabilità, morfologia del substrato e concentrazione proteica. HSF adsorbe come un multistrato in posizione side-on per concentrazioni > 100µg/mL	45	2005
HSF	Due ossidi di titanio, depositato su Si e ottenuto per immersione in H ₂ O ₂	XPS, FTIR, AFM, ELISA, radiolabeling, elipsometria	Dipendenza adsorbimento da morfologia e bagnabilità substrato, tempo di incubazione e concentrazione proteica. HSF adsorbe spontaneamente sulle superfici di TiO ₂ come aggregati	51	2007

4. TEST DI BIOATTIVITA' IN VITRO

I test di bioattività in vitro vengono effettuati immergendo il materiale oggetto di studio in soluzioni che riproducono le concentrazioni ioniche dei componenti inorganici del plasma sanguigno umano (simulated body fluid, SBF, solution) e studiando l'eventuale formazione del deposito di apatite sulla superficie del campione. Le apatiti sono una famiglia di composti che ricalcano la formula chimica della fluoroapatite (FA): Ca₁₀(PO₄)₆F₂, che ne rappresenta il capostipite. Si tratta di sali doppi, dove il Ca può essere sostituito da altri metalli bivalenti (Ba, Sr, Pb, ecc.), il P può essere sostituito da altri elementi quali As, V, Cr e il F può essere sostituito da altri alogeni o ioni monovalenti, come Cl, OH, Br, I, ecc.⁸⁰

È prevista una standardizzazione dei test di bioattività secondo la norma ISO 23317:2014 in cui è descritta anche la preparazione del SBF⁸¹. Ad ogni modo, la maggior parte degli studi sulla bioattività si rifà al protocollo di Kokubo et al⁸² per preparare la soluzione SBF, e lo stesso procedimento è stato attuato anche nel presente lavoro di tesi. Una descrizione più approfondita è fornita nella parte relativa alla preparazione del SBF nel capitolo 'materiali e metodi'. Per comprendere l'importanza di questo tipo di test, bisogna tenere a mente che una delle strategie perchè un materiale sia adatto a promuovere l'osteointegrazione è che questo una volta impiantato in vivo favorisca il deposito di fosfato di calcio sulla sua superficie⁸³. Questo composto chimico è legato alla componente inorganica e mineralizzata delle ossa, detta idrossiapatite, la cui composizione chimica è $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ ⁸⁰. Questo processo viene simulato in vitro e più rapida è la cinetica di bioattività di un materiale, più velocemente si formerà sulla sua superficie uno strato di simil-apatite quando immerso in SBF⁸¹. Una volta formato il deposito, le tecniche maggiormente utilizzate per identificarlo e studiarlo sono la difrattometria a raggi X (XRD), la spettroscopia fotoelettronica a raggi X (XPS), la spettroscopia a infrarossi a trasformata di Fuorier in riflettanza totale attenuata (ATR-FTIR) e la microscopia a scansione elettronica (SEM). L'apatite che si forma sulla superficie del campione per immersione in SBF è simile a quella che si ritrova come componente del tessuto osseo in termini di carenza di calcio (Ca), rapporto atomico Ca/P (leggermente inferiore a quello stechiometrico dell'idrossiapatite, che equivale a 1,67), presenza di alcune impurità (come Mg²⁺, Na⁺, Cl⁻, HCO3⁻) e basso livello di cristallinità⁸¹.

I substrati che interessano gli studi di bioattività in vitro sono di diversa natura. Per esempio: titanio ⁸³⁻⁸⁹, acciaio⁹⁰, niobio ⁸⁸, vetri bioattivi ⁹⁰⁻⁹², compositi a base di PMMA^{93,94}, collagene⁹⁵. Oltre che materiali di diversa natura vengono anche valutate modifiche superficiali che agiscono ad esempio sulla porosità ⁸⁵ o la funzionalizzazione con coating di interesse come chitosano ⁹⁰ o amminopropiltrietossisilano

In alcuni studi si valuta la deposizione di apatite in SBF in presenza di proteine per simulare più

realisticamente l'ambiente in vivo. La strategia è utilizzata sia nel caso di studi con particelle di substrato in soluzione ^{91,92,95} che nel caso di substrati a forma di dischi o comunque piani^{83–89,89,90,93}. Le quantità di proteina disciolte in SBF dipendono dall'obiettivo dello studio, spesso infatti questo vuole indagare a quale concentrazione si ha un effetto più marcato di inibizione o meno della deposizione di apatite in presenza di una determinata specie proteica. In alcuni studi si utilizza una variante dell'SBF, chiamato SBFA, preparato disciogliendo albumina nella soluzione SBF. Un valore ricorrente della concentrazione dell'albumina utilizzata per la preparazione di tale soluzione è di 4 mg/mL ^{84,86,93,94}. Nel presente lavoro di tesi si è scelto di disciogliere albumina in SBF mantenendo la stessa concentrazione degli studi effettuati di adsorbimento (20 mg/mL), con la volontà di riprodurre la concentrazione plasmatica in vivo della proteina.

La ISO 23317:2014 fornisce lo standard per la quantità di SBF in cui immergere il campione, secondo la formula:

$$v_s = 100mm * S_a$$

dove:

 v_s è il volume di SBF in mm³ S_a mm² è l'area superficiale apparente del campione in con specificazione per materiali porosi, il volume di SBF dovrebbe essere maggiorato rispetto al v_s calcolato⁸¹.

Dall'analisi della letteratura su studi di bioattività effettuati aggiungendo proteine al SBF, si evince come uno studio di questo tipo duri nei casi più frequenti almeno 7 giorni ^{83–85,87,91,93}, in alcuni studi si arriva fino a 14^{92,94} a 21⁸⁸ e 28⁸⁹. In ogni caso la norma ISO 23317:2014 specifica che una volta che l'SBF viene usato per l'immersione dei campioni a 36,5° C (temperatura fisiologica nel corpo umano), il periodo di immersione non vada oltre le 4 settimane⁸¹, perché i materiali che fungono da legante osseo di solito formano uno strato di apatite entro questo lasso di tempo. I refresh della soluzione, o ricambio del SBF in cui è immerso il campione con della soluzione "fresca", vengono effettuati per simulare il ricambio di fluidi fisiologici che avviene in vivo e per evitare che le concentrazioni ioniche del SBF subiscano alterazioni e non siano più coerenti con quelle dell'ambiente in vivo, quindi per favorire le condizioni di sovrasaturazione della soluzione e indurre la formazione del rivestimento. Negli studi analizzati l'operazione è ripetuta generalmente ogni 24/48 ore.

Serro et al. hanno studiato la formazione di deposito di fosfato di calcio in substrati di titanio facendo adsorbire fibronectina⁸³ e albumina^{84,86} prima dell'incubazione in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, soluzione simile alla SBF contenente concentrazioni di ioni quasi uguali a quelle del plasma sanguigno umano) e aggiungendo la proteina nella soluzione di HBSS senza adsorbirla in precedenza sui substrati,

per osservare la capacità o meno della proteina in soluzione o adsorbita di aumentare o diminuire la formazione del deposito in vitro. I test non seguono sempre rigorosamente lo stesso protocollo, con incubazioni che vanno fino a 7 giorni ^{83,84} per FN e BSA sia adsorbita che in soluzione e fino a 23 ⁸⁶ nel caso di albumina in soluzione senza adsorbimento superficiale. In questi studi si ricorre principalmente all'utilizzo di SEM per osservazione dei campioni e XPS per la verifica delle specie chimiche presenti dopo i test di bioattività, oltre che misure di angolo di contatto, sia dinamiche che statiche, per caratterizzare la cinetica di adsorbimento delle proteine e di deposito di apatite. Lo studio sulla fibronectina ha dimostrato come questa riesca a inibire il fenomeno di deposito a concentrazioni di 0.05 mg/mL e che l'inibizione sia più forte per la proteina in soluzione che preadsorbita (adsorbimento con soluzione di FN con concentrazione 0,05 mg/mL per 5 ore) ⁸³. La presenza di BSA in HBSS (concentrazione 4 mg/mL) ha inibito la crescita di uno strato di fosfato di calcio, ma non ha impedito la deposizione ionica^{84,86}. Allo stesso modo, se la superficie di titanio era pre-coperta da albumina (adsorbimento con soluzione di BSA 4 mg/mL in 0.15M NaCl per 2h), la deposizione di fosfato di calcio durante l'immersione in HBSS veniva notevolmente inibita, sebbene alcuni Ca e P potessero essere rilevati sulla superficie grazie alle misure XPS⁸⁴.

Nell'ambito di questa tesi, lo studio di bioattività con proteine è stato effettuato con la BSA, aggiungendola alla soluzione di SBF durante l'incubazione, ed ha riguardato il substrato in lega di titanio Ti-6Al-4V trattato chimicamente, descritto in seguito, di cui si conosce già la potenziale bioattività⁹⁶ (Figura 32).



Figura 32: spettri EDS e immagine SEM del deposito di apatite formato dopo uno studio di bioattività in vitro di 15 giorni con SBF su lega Ti-6Al-4V sottoposta al trattamento chimico descritto in questa tesi. (a) spettro EDS sull'intera immagine, (b) immagine SEM, (c) spettro EDS sulle particelle di deposito⁹⁶

5. MATERIALI E METODI

5.1. Preparazione dei campioni: taglio e lucidatura

I campioni in titanio usati per lo studio in questa tesi si dividono in tre tipi di substrati: titanio commercialmente puro di grado 2 (Ti-cp, ASTM B348, Gr2, Titanium Consulting and Trading), lega di titanio Ti-6Al-4V (Ti6Al4V ASTM B348, Gr5, Titanium Consulting and Trading) e lega di titanio Ti-6Al-4V trattata chimicamente per sviluppare uno strato nanoporoso di ossido superficiale. Il materiale si presentava come dischi di diametro 10 mm e spessore 2 mm o in barre di diametro 10 mm. Quando fornito nella forma di barre per prima cosa si è proceduto al taglio per ottenere i dischi della misura indicata. Allo scopo è stata utilizzata una troncatrice automatica con lama abrasiva (IsoMet High Speed Pro, Buelher) rappresentata in Figura 33.



Figura 33: troncatrice automatica IsoMet High Speed Pro, Buelher⁹⁷

A questo punto la superficie dei campioni appariva con i difetti tipici della lavorazione di taglio, rigature e bave. Su tutti i tipi di campioni si è passati quindi alla lucidatura per mezzo di una macchina lucidatrice (LaboPol-2, Struers) (Figura 34), la quale dispone di un piatto rotante su cui posizionare la carta abrasiva di forma circolare e un rubinetto che permette di bagnare con acqua la carta e il campione durante la lucidatura. In questo modo è facilitata la dispersione del calore che si genera dal fenomeno di attrito tra carta e campione e ridotto il grip tra i due, permettendo una lavorazione più efficiente. Talvolta è stata utilizzata una testa rotante che permette di lucidare più campioni contemporaneamente grazie a dei fori circolari dove può essere posizionato un cilindro portacampioni, con degli incavi di forma e dimensione pari a quella dei dischi da lavorare, che venivano fissati per apposizione di un leggero strato di colla. Nella maggior parte dei casi si è lavorato manualmente, mantenendo il campione in posizione sulla carta per mezzo della pressione esercitata con un dito, cercando di lavorare la superficie in maniera tale da risultare piatta, senza consumare una parte di questa più di un'altra. Tutti i campioni sono stati lucidati su una sola delle due superfici del disco, utilizzando velocità di rotazione del piatto rotante di 250 giri/min. I campioni non destinati al trattamento chimico, quindi quelli in Ti cp2 e parte di quelli in lega Ti-6Al-4V, sono stati lucidati con carte abrasive in carburo di silicio (SiC) con grana sempre più fine. L'ordine del numero di grana seguito, dalla più grezza alla più fine, è stato: 320, 600, 800, 1000, 2500, 4000. Ogni campione è stato lucidato seguendo gli stessi passaggi, e cioè mantenendo la posizione sul piatto rotante fino a quando era possibile individuare solchi nella stessa direzione che ricoprivano l'intera superficie, successivamente ruotato di 90° e di nuovo lavorato fino a quando fossero presenti solchi unicamente nella nuova direzione. Per le lavorazioni a grana più fine, ci si è assicurati di una corretta riuscita dell'operazione sfruttando un microscopio ottico con ingrandimenti 5x e 20x. Nel caso dei campioni destinati al trattamento chimico si sono seguite le stesse procedure ma con un numero inferiore di carte. In questo caso è stata utilizzata la carta con numero di grana 320 e successivamente con numero 400. I campioni così lavorati presentavano una superficie grezza e una lucidata. Per tutto il lavoro svolto in questa tesi è stata usata solo la superficie lucidata.



Figura 34: lucidatrice LaboPol-2, Struers

5.2. Lavaggio

Dopo l'opera di lucidatura e prima di qualsiasi altro step, i campioni sono stati lavati in un lavaggio a ultrasuoni per mezzo di una macchina per la sonicazione (Sonica Utrasonic Cleaner 2200 S3, Soltec) (Figura 35). I campioni sono sati posizionati in un beker rivolgendo la superficie lucidata verso l'alto. Il primo passaggio prevedeva un lavaggio di 5 minuti in acetone (C₃H₆O), il secondo ed il terzo un lavaggio di 10 min a 40° C in acqua ultrapura (Milli-Q). Una volta posizionati i campioni nel beker e prima di avviare il lavaggio, il beker veniva coperto con un foglio di alluminio per evitare contaminazioni. Successivamente i campioni sono stati posti sotto cappa a flusso laminare su della carta assorbente,
con la superficie lucidata rivolta ancora verso l'alto, per essere asciugati scongiurando anche in questo caso contaminazioni.



Figura 35: macchina usata per il lavaggio dei campioni, Sonica Utrasonic Cleaner 2200 S3, Soltec 98

5.3. Trattamento chimico

Per ottenere una superficie bioattiva di ossido di titanio con caratteristiche definite, è stato effettuato un trattamento chimico sui campioni in lega Ti-6Al-4V sottoposti a lucidatura con carta abrasiva sino a numero di grana 400. Il trattamento è coperto da brevetto (EP2214732, 2013)⁹⁹ e prevede dapprima un attacco acido in acido fluoridrico (HF) diluito per rimuovere lo strato di ossido nativo, seguito da un'ossidazione controllata in perossido di idrogeno (H₂O₂). La superficie che si ottiene è caratterizzata da una complessa topografia superficiale. Questo trattamento induce una superficie microrugosa, dovuta alla dissoluzione preferenziale della fase α della lega bifasica Ti-6Al-4V da parte dell'HF. L'ossido naturale viene prima rimosso mediante l'attacco acido e la lega di titanio nuda viene quindi esposta all'azione del perossido di idrogeno, che provoca una riossidazione della superficie metallica su scala nanometrica. La superficie trattata presenta un aspetto microruvido e un pattern nanoporoso, come mostrato dall'immagine ottenuta al FESEM in Figura 36, con una rugosità su scala nanometrica (R_a) di circa 10 nm. Questo si ritiene promuovere la risposta cellulare degli osteoblasti e la precipitazione di idrossiapatite in vivo. Lo spessore dello strato di ossido ottenuto è dell'ordine di poche centinaia di nanometri (200-350 nm) ⁹⁶.



Figura 36: ingrandimento FESEM della superficie trattata⁹⁶

La superficie trattata è inoltre ricca di gruppi idrossilici. Questa caratteristica è estremamente importante per la bioattività inorganica (precipitazione di apatite in vitro e in vivo) e anche per ulteriori procedure di funzionalizzazione (innesto di biomolecole). Il controllo di tutti i parametri durante il trattamento permette di ottimizzare il risultato e di ottenere una superficie che sia priva di fessurazioni o cricche superficiali e dotata di una adeguata e salda adesione al substrato di titanio metallico sottostante.

Il fine del trattamento è quindi quello di produrre spugne nanoporose di ossido di titanio che aumentino la bioattività superficiale, allo scopo di creare superfici in titanio multifunzionali per l'integrazione ossea. Gli autori del brevetto hanno effettuato il trattamento anche su Ti cp2 ed hanno osservato come questo sia potenzialmente in grado di influenzare la risposta degli osteoblasti (tramite nanotopografia), di indurre la precipitazione di apatite (tramite nanotopografia e idrossilazione), di garantire una buona resistenza alla corrosione (tramite passivazione superficiale) e ridurre al minimo l'adesione dei batteri (modulando la microporosità) e la reazione infiammatoria (tramite idrossilazione superficiale)¹⁰⁰. Inoltre, hanno verificato come lo strato di ossido sulla lega trattata sia più spesso e con un grado di idrossilazione e reattività maggiore rispetto a quello del titanio puro trattato^{96,100}. Un esempio di alcuni dischi in lega dopo il trattamento è riportato in Figura 37. Nel proseguo della trattazione, il campione in titanio commercialmente puro verrà riferito come TiCP, quello in lega di Ti-6Al-4V come Ti64 e quello derivante dal trattamento chimico come Ti64CT.



Figura 37: dischi in Ti-6Al-4V dopo trattamento chimico

5.4. Protocollo di adsorbimento proteico

L'adsorbimento di albumina (BSA, bovine serum albumin, Sigma Aldrich) e fibronectina (BFN, bovine plasma fibronectic, Sigma Aldrich) è stato eseguito mimando la concentrazione fisiologica di 20 mg/mL per la prima e 0,2 mg/mL per la seconda ⁷⁵, in soluzioni di tampone fosfato salino (phosphate buffered saline, PBS), a pH 7.4. Il PBS è stato preparato disciogliendo una compressa di preparato (Phospate Buffered Saline, Sigma Aldrich) in 200 mL di acqua MilliQ in un beker a temperatura ambiente, con l'aiuto di uno stirrer magnetico. Per gli adsorbimenti si è proceduto a sistemare i campioni in una piastra petri nel seguente modo. Nella piastra, è stato sistemato un cordoncino di carta assorbente bagnata con acqua lungo la circonferenza interna, allo scopo di mantenere l'ambiente umido e non far evaporare la goccia di soluzione proteica durante l'incubazione. Su entrambi i componenti della piastra, fondo e coperchio, è stato apposto uno strato di parafilm lungo il bordo, in modo tale da aumentarne leggermente lo spessore e rendere la chiusura più ermetica possibile (Figura 38). Con questo protocollo si è sempre osservata una conservazione della goccia di soluzione proteica, quindi lo scopo di prevenirne l'evaporazione era raggiunto. Una volta preparata la piastra, i campioni venivano posizionati al suo interno. A questo punto, a seconda di quale esperimento di adsorbimento andava condotto, era preparata la soluzione proteica. Gli adsorbimenti prevedevano tre tipi di soluzioni, per cinque protocolli. Una soluzione di BSA, una di BFN e una di BSA+BFN per effettuare:

- adsorbimento monoproteina BSA
- adsorbimento monoproteina BFN
- adsorbimento sequenziale prima BSA poi BFN
- adsorbimento sequenziale prima BFN poi BSA
- -coadsorbimento di soluzione multiproteina BSA e BFN

71



Figura 38: esempio di preparazione di una piastra petri per adsorbimento proteico sui campioni in titanio. la goccia non ricopre l'intera superficie perchè la foto è relativa all'adsorbimento effettuato per la misura KPFM

Come detto, le soluzioni monoproteina si sono preparate disciogliendo la giusta quantità di proteina in PBS per raggiungere la concentrazione desiderata. Per facilitare questa operazione, si è utilizzato uno stirrer megnetico, facendo sempre attenzione ad impostare velocità che non favorissero la formazione di bolle d'aria. La soluzione multiproteina si è preparata partendo da una soluzione a giusta concentrazione di BFN e aggiungendo la corretta quantità di BSA. A questo punto si è proceduto con i diversi adsorbimenti. Posizionati i campioni nella piastra petri, è stata depositata una goccia da 125 µL della soluzione proteica di interesse, che ricoprisse l'intera superficie del campione. La piastra petri è stata chiusa e posizionata in incubatore a 37°C per due ore. Trascorso questo tempo, i campioni sono stati lavati tramite tre immersioni in acqua MilliQ e lasciati asciugare su carta assorbente sotto cappa a flusso laminare. Nel caso degli adsorbimenti sequenziali, la procedura è stata poi ripetuta con la seconda proteina. Una volta asciutti i campioni, sono stati posizionati in piastre multipozzetto ricoperte in carta d'alluminio, e conservati in frigorifero per le prove di caratterizzazione.

Per le misure in modalità Kelvin probe al microscopio a forza atomica (descritte in seguito) è stata depositata una goccia di soluzione di BFN di 50 µL su tre campioni: uno di TiCP, uno di Ti64 e uno di Ti64CT, cercando di mantenere la goccia confinata in una parte della superficie. Una volta trascorse le due ore di incubazione a 37° C, la goccia è stata fatta scivolare dal campione dalla parte bagnata durante l'adsorbimento, ed è stato inciso con un bisturi un piccolo solco per poter ritrovare agevolmente il confine tra la parte su cui è stata adsorbita la proteina e la parte non interessata dal processo. Successivamente il campione è stato lavato e lasciato asciugare come descritto in precedenza, e conservato in frigorifero fino al momento della misura.

Il protocollo seguito per l'adsorbimento con le proteine per le misure in fluorescenza è descritto in seguito, nel paragrafo dedicato.

5.5. Protocollo per lo studio di bioattività in soluzione proteica

Per lo studio di bioattività in presenza di proteine, è stato scelto il substrato Ti64CT di cui, come detto, si conosce già la capacità di indurre la precipitazione di idrossiapatite se immerso in SBF. Sono quindi stati preparati 24 campioni, per tempi di incubazione a 37°C di 1-3-7-14 giorni. Gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato, utilizzando due soluzioni: SBF e una soluzione di SBF con disciolta la BSA (SBF+BSA). Nel caso di incubazione di 14 giorni, al settimo giorno è stato effettuato un refresh della soluzione a 7 giorni. La preparazione del SBF è stata effettuata seguendo il protocollo di Kokubo¹⁰¹. Sono stati pesati i seguenti reagenti in barchette da pesata distinte per 1000 mL di soluzione:

Numero reagente	Tipo reagente	Quantità
1	NaCl	8.035 g
2	NaHCO ₃	0.355 g
3	КСІ	0.225 g
4	K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	0.231 g
5	MgCl ₂ .6H ₂ O	0.311 g
6	Soluzione HCl 1M	39 mL
7	CaCl ₂	0.292 g
8	Na ₂ SO ₄	0.072 g
9	TRIS	6.118 g
10	Soluzione HCl 1 M	0-5 mL

Per prima cosa sono stati misurati 700 mL di acqua MilliQ con un cilindro e versati in una bottiglia di plastica collocata su una piastra riscaldante e portati a 36,6 ± 1,5°C. Successivamente sono stati disciolti i reagenti numerati in tabella da 1 a 8, uno alla volta, aggiungendoli lentamente e rispettando l'ordine. Per assicurarsi di discioglierli completamente si è usato uno stirrer magnetico, e le vaschette di pesata sono state sciacquate con poca acqua MilliQ versata poi nel beker della soluzione, per cercare di recuperare tutto il reagente pesato. Ogni reagente è stato aggiunto solo a completa dissoluzione di quello precedente. A questo punto la soluzione è stata portata a 900 mL aggiungendo acqua MilliQ. Ne è stato misurato il pH tramite il pHmetro, e si è cominciato a disciogliere tris(idrossimetil)amminometano cloridrato (TRIS in tabella), continuando a misurare il pH e osservando che la temperatura si mantenesse a $36,5 \pm 1,5$ °C. Una volta che il pH ha raggiunto il valore 7,30 ± 0,05 e la temperatura $36,5 \pm 1,5$ °C, si è aggiunto TRIS fino a pH 7,45 ± 0,01. Si è poi aggiunta goccia a goccia

la soluzione di HCl 1M per abbassare il pH fino a 7,42 \pm 0,01. A questo punto si è ridisciolta TRIS per tornare al pH di 7,45 \pm 0,01. Il processo si è ripetuto fino a disciogliere tutta la TRIS. Infine, si è portato il pH a 7,40 \pm 0,01 alla temperatura di 36,5 \pm 0,1°C aggiungendo goccia a goccia HCl 1M. A questo punto si è rimosso il pHmetro, sciacquato con acqua Milliq raccolta nella soluzione, che è stata poi versata in un matraccio calibrato da 1000 mL. La bottiglia dove è stata preparata la soluzione è stata sciacquata con acqua MilliQ raccolta nel matraccio. Una volta che la soluzione nel matraccio ha raggiunto la temperatura di 20 \pm 0,1 °C, è stata portata a 1000 mL aggiungendo acqua MilliQ. La soluzione di SBF, così preparata, può essere conservata in frigorifero in bottiglia di plastica a 5-10°C, non oltre 30 giorni.

Per preparare la soluzione di SBF+BSA, è stata aggiunta BSA alla soluzione di SBF in modo da avere una concentrazione proteica di 20 mg/mL, e disciolta tramite stirrer magnetico a temperatura ambiente. A questo punto i campioni di Ti64CT sono stati posizionati in bottigliette in grado di schermare la luce, con la superficie trattata verso l'alto. Poi ogni bottiglietta è stata riempita con 25 mL di soluzione (SBF o SBF+BSA), utilizzando una siringa con filtro micrometrico (0.2 µm) per scongiurare la contaminazione batterica, e posizionata in incubatrice a 37° C per il tempo stabilito. Al termine di questo tempo, i campioni sono stati estratti, sciacquati per immersione per tre volte in acqua MilliQ e lasciati asciugare su carta assorbente sotto cappa a flusso laminare. Sono stati poi raccolti in piastra multipozzetto e conservati in frigorifero fino alla loro osservazione al FESEM. Le soluzioni di bioattività sono state conservate in congelatore per gli studi di rilascio di titanio, vanadio e alluminio.

5.6. Spettroscopia fotoelettronica a raggi X (XPS)

Questa tecnica viene utilizzata per conoscere la composizione chimica della superficie del campione in esame. È basata sull'effetto fotoelettrico, secondo il quale un elettrone può essere strappato dall'atomo a cui appartiene se irraggiato con una radiazione sufficientemente energetica. Il campione viene quindi irraggiato con una radiazione X monocromatica, sufficiente a causare l'emissione di un elettrone con un'energia cinetica kE pari a:

$$kE = hv - BE - \phi$$

Con hv energia del fotone incidente, BE energia di legame e ϕ definita funzione lavoro del materiale. Solo gli elettroni appartenenti ai primi nanometri superficiali riescono a fuoriuscire dal materiale, mentre quelli più interni dissipano l'energia prima di raggiungere la superficie. Infatti, la misura deve essere condotta in vuoto spinto per evitare la perdita di energia cinetica degli elettroni per mezzo di urti con altre particelle. Gli elettroni emessi vengono contati e ne viene analizzata l'energia per costruire uno spettro. Le energie di legame elettroniche sono identificative di ciascun elemento, perciò lo spettro di fotoemissione risultante sarà specifico di ogni elemento. In Figura 39 è rappresentato uno schema di funzionamento della misura tramite XPS.



Figura 39: schema del funzionamento di una misura tramite XPS e dello spettro ottenuto¹⁰²

Sono stati analizzati con questa tecnica i campioni sia dopo il processo di adsorbimento con fibronectina, per poter determinare la presenza di proteina e la quantità adsorbita, che dopo la misura di potenziale zeta, per poter valutare la quantità di proteina rimasta legata alla superficie dopo la misura. L'analisi dei campioni ha utilizzato le modalità survey e high resolution. Con la prima si identificano e quantificano gli elementi presenti in superficie attraverso una scansione a bassa risoluzione su un ampio spettro di energie. Grazie alla seconda si ottengono scansioni ad alta risoluzione nell'intorno di determinati picchi (C1s, N1s e O1s nel caso dello studio riportato in questa tesi) dalla cui convoluzione è possibile ricavare informazioni quali il contributo dato da legami C-C, C-N, COO⁻ di interesse nell'analisi delle proteine.

La misura è stata condotta esternamente in collaborazione con il professor Seiji Jamaguchi, presso la Chubu Univesity (Katsugai, Nagoya, Giappone). È stato utilizzato lo strumento PHI 50 0 0 Versaprobe II (ULVAC-PHI, Inc., Kanagawa, Japan). L'angolo di take-off dell'XPS è stato fissato a 45 gradi in modo da poter rilevare i fotoelettroni ad una profondità da 1 a 5 nm dalla superficie. Lo strumento utilizza una sorgente di raggi X in Al-K con una risoluzione energetica inferiore a 0.5 eV con un intervallo di passo di 0.1 eV. La calibrazione degli spettri misurati è stata eseguita facendo riferimento al picco C1s dei gruppi CH2 del composto sul substrato che si verifica ad energia di legame di 284.8 eV. Per la deconvoluzione, operata tramite casaXPS, sono stati usati come parametri^{103,104}:

Picco C1s centrato a 248.8 eV

- Background di tipo Shirley per il picco C1s e lineare per il picco N1s
- Forma dei picchi gaussiana-lorenziana (al 30% lorenziana)
- Parametro full width half maximum 1.4±0.2 eV

5.7. Microscopia a forza atomica (AFM) e Kelvin Probe Force Microscopy (KPFM)

Le misure di microscopia atomica superficiale permettono di caratterizzare la topografia della superficie di un campione, nella modalità Kelvin Probe invece viene registrato un potenziale di superficie dell'area esaminata. In un AFM viene utilizzato un cantilever con una punta affilata alla sua estremità che serve per scansionare la superficie del campione. La modalità di lavoro utilizzata per la scansione tradizionale AFM è stata la tapping mode. Nella modalità tapping mode, il cantilever oscilla a valori vicini alla sua freguenza di risonanza e le interazioni tra la punta e la superficie del campione provocano cambiamenti nella frequenza di oscillazione del cantilever. Questa modalità permette di ridurre l'usura della punta se confrontata con la modalità a contatto continuo con la superficie, dove la punta viene trascinata sulla superficie. Per la scansione in modalità Kelvin probe è stata utilizzata la lift mode (con punta sollevata rispetto al campione da esaminare mantenuta ad una altezza costante). Lo strumento lavora percorrendo un tratto in modalità tapping mode acquisendo l'immagine AFM, poi passa alla modalità lift mode e ripercorre lo stesso tratto in modalità lift mode nella direzione opposta per l'acquisizione Kelvin probe. In Figura 40 è mostrato schematicamente il setup della misura, con il cantilever e la sua punta rivolta verso la superficie da analizzare, la quale è posizionata su un piano a controllo piezoelettrico (permette un controllo molto fine dello spostamento), e un sistema di rilevamento della posizione del cantilever formato da un laser che colpisce il cantilever e viene riflesso verso un sensore (fotodiodo). In questo modo il segnale originato dal sensore viene rielaborato per costruire una mappa topografica della superficie, che interessa l'area esaminata dalla punta del cantilever. Nella modalità Kelvin probe, tra la punta e la superficie sono applicate una tensione alternata e una tensione continua, quest'ultima controllata in modo da minimizzare le forze elettrostatiche tra punta e superficie. Il voltaggio in continua viene quindi regolato per non avere differenza di potenziale tra la superficie e la punta del cantilever, e quello che si ottiene è una mappatura della tensione applicata alla punta nell'area analizzata. Il potenziale di superficie è quindi determinato dal valore della tensione continua applicata durante la misura.



Figura 40: schema del setup della misura AFM¹⁰⁵

La misura è stata effettuata con un Innova AFM (Bruker) (Figura 41); il cantilever utilizzato è un modello SCM-PIT-V2 (Bruker) di dimensioni 2,8x225x35 µm con coating di platino e iridio. Un dettaglio della misura nel quale si nota il laser colpire la superficie riflettente del cantilever è mostrato in Figura 41 (immagine a destra). Durante l'acquisizione è stata ottimizzata l'area di misura, la velocità di scansione e la tensione applicata per ottenere le immagini più significative possibili. L'area da scansionare è stata scelta facendo riferimento al bordo della goccia depositata durante l'adsorbimento, che era stato segnato tramite incisione con un bisturi per avere un riferimento visivo. Si è quindi indagata l'area a cavallo tra la superficie che ha subito il trattamento di adsorbimento proteico e quella lasciata libera, per poi acquisire immagini all'interno dell'area contenente la proteina, per valutare l'ipotetica formazione di un layer continuo o meno. Le immagini ottenute di topografia e potenziale di superficie sono state elaborate grazie al software Gwyddion.



Figura 41: a sinistra lo strumento Innova AFM (Bruker)¹⁰⁶, a destra il dettaglio della misura effettuata su un substrato in Ti64CT

5.8. Misure in fluorescenza

Alcune misure effettuate nell'ambito di questa tesi hanno utilizzato delle proteine fluorescenti. Queste sono proteine modificate a cui è legato un fluoroforo. Se irradiato con una sorgente luminosa ad una specifica lunghezza d'onda, il fluoroforo è in grado di eccitarsi e rilasciare un segnale caratteristico ad un'altra grandezza d'onda. Negli adsorbimenti effettuati con queste proteine sono state utilizzate albumina legata a rodamina per adsorbimenti di singola proteina (Rhodamine BSA, Cytoskeleton), albumina legata al fluoroforo alexa 488 (Albumin from Bovine Serum (BSA), Alexa Fluor™ 488 conjugate, Thermo Fisher Scientific) negli adsorbimenti sequenziali e coadsorbimenti, e fibronectina legata a rodamina (Rhodamine Fibronectin, Cytoskeleton). Data la minor disponibilità di queste proteine, il protocollo di adsorbimento è stato modificato. Dopo la solita procedura di lavaggio, i campioni sono stati disposti in delle piastre multipozzetto. Ogni pozzetto è stato poi riempito con 1 mL di PBS per circa due minuti (in maniera tale da sommergere completamente il campione), successivamente il PBS è stato aspirato e il campione lasciato asciugare all'aria. Questa è una procedura di condizionamento della superficie volta a favorire lo spandimento della goccia della soluzione proteica durante l'adsorbimento, dato il ridotto volume utilizzato della goccia stessa. I campioni sono stati poi sistemati in una camera umida, contenente un cordoncino bagnato con acqua di carta assorbente lungo il perimetro interno e del parafilm sul fondo per evitare che i campioni scivolassero perdendo la posizione assegnata. Per ogni adsorbimento sono stati usati quattro campioni per substrato, tre su cui effettivamente veniva depositata la goccia di soluzione proteica e uno di controllo su cui era depositata una goccia di PBS. Le soluzioni di proteine sono state preparate alla

78

concentrazione solita di 20 mg/mL per la BSA e 0.2 mg/mL per la BFN, disciogliendo la giusta quantità di proteina fluorescente in PBS. Per il coadsorbimento, la soluzione multiproteina è stata preparata mischiando 10 µL di soluzione contente BSA e 10 µL di soluzione contenente BFN. Per l'adsorbimento, una goccia di 10 µL di soluzione proteica è stata depositata sulla superficie del campione e per facilitarne lo spandimento ed evitare l'evaporazione del PBS è stato posizionato un vetrino sopra, con l'accortezza che si formasse un film liquido continuo tra superficie del campione e vetrino, senza la presenza di bolle d'aria. Una foto della camera così preparata per l'adsorbimento è riportata in (Figura 42). La camera è stata poi chiusa dal coperchio e posizionata in incubatrice a 37°C per due ore. Trascorso questo tempo, la soluzione è risultata non essere evaporata tra la superfice del campione e del vetrino, validando il procedimento effettuato.



Figura 42: preparazione della camera umida per gli adsorbimenti di proteine fluorescenti

Una volta terminato l'adsorbimento, i vetrini sui campioni sono stati rimossi. Sono stati poi preparati tre contenitori di PBS, e ogni campione è stato immerso per tre volte in ciascuno, lasciando cadere la goccia di soluzione residua rimanente sul campione su della carta assorbente al termine dell'immersione in ogni contenitore. Successivamente i campioni sono stati posizionati in una piastra multipozzetto (con la superficie relativa all'adsorbimento rivolta verso l'alto). Ogni pozzetto è stato riempito con 1 mL di PBS facendo attenzione con la pipetta a non versare soluzione direttamente sulla superficie del campione. Trascorsi due minuti la soluzione di PBS è stata aspirata da ogni pozzetto e il processo ripetuto per altre due volte. Questo protocollo di lavaggio, differente rispetto a quello degli

adsorbimenti riguardanti le proteine non fluorescenti, è stato messo a puntoperché il segnale che si ottiene dalle misure in fluorescenza è particolarmente sensibile a eventuali residui di proteina non adesi.. A questo punto sui campioni è stata depositata una goccia di montante (Fluoroshield, Sigma) usato per preservare le caratteristiche dei fluorofori legati alle proteine. Su questa goccia è stato poi posizionato un nuovo vetrino, e i campioni sono stati disposti su un foglio di plastica trasparente per essere immediatamente analizzati. Oltre ai campioni, sul foglio di plastica sono stati posizionati anche dei vetrini quadrati su cui è stata depositata una goccia di soluzione proteica a concentrazione nota di 2 mg/mL e 0.2 mg/mL per l'albumina e 0.2 mg/mL e 0.02 mg/mL per la fibronectina. Su questa goccia era poi depositato un vetrino come per la superficie dei campioni. Questo per avere un riferimento del tipo e dell'intensità del segnale in fluorescenza della proteina nella misura descritta successivamente.

5.8.1. Acquisizione di immagine in fluorescenza tramite ChemiDoc MP Imaging System

Una volta sistemati i campioni su un foglio di plastica come descritto in precedenza, questi venivano posizionati nello strumento ChemiDoc MP Imaging System (BIO-RAD) come mostrato in Figura 43.



Figura 43: sulla sinistra strumento ChemiDoc MP Imaging System (BIO-RAD)23, sulla destra dettaglio della disposizione dei campioni nella camera dello strumento

La peculiarità di questo strumento è che permette di avere un campo di acquisizione di 21x16.8 cm, e quindi di ottenere un'immagine che comprenda tutti i campioni contemporaneamente. Questo permette di eseguire un'analisi comparativa dell'intensità del segnale fluorescente proveniente dalla superficie dei diversi campioni sottoposti alle stesse condizioni di misura. Lo strumento è in grado di irradiare il campo di misura con sorgenti luminose a diversa lunghezza d'onda, impostabile a seconda del tipo di fluoroforo che si intende eccitare, e di acquisire il segnale proveniente dai campioni attraverso filtri che permettono di identificare la radiazione specifica rilasciata dai fluorofori eccitati. All'utente è fornita un'immagine colorimetrica del campo di misura, con i pixel di intensità di colore

diverso in base all'intensità di segnale rilevato in quel punto. I tempi di acquisizione e la lunghezza d'onda della sorgente irradiante sono perciò stati settati a seconda della misura da effettuare, e i dati sono stati successivamente rielaborati tramite un software (Image Lab Software). Tramite questi dati è stato possibile ottenere grafici che descrivessero l'intensità del segnale proveniente dai diversi campioni analizzati. Questo permette di avere un'idea della quantità di proteina adsorbita da un campione rispetto ad un altro campione di diverso substrato per quella specifica misura.

5.8.2. Microscopia in fluorescenza

I campioni su cui è stato effettuato l'adsorbimento con proteine fluorescenti sono stati osservati poi singolarmente al microscopio LSM 900 (ZEISS) (Figura 44), con ingrandimenti 50x, 100x, 200x. Il microscopio è dotato filtri in fluorescenza, per eccitare e rilevare la presenza di proteine fluorescenti sul campione (grazie alla presenza dei fluorofori legati alla proteina). Il segnale rilevato dalla superficie viene poi rielaborato da un software del pc collegato allo strumento, cosicché è stato possibile acquisire delle immagini sia nel visibile che nei canali per osservazione delle proteine fluorescenti, e aggiungere il riferimento di scala. Le osservazioni sono state condotte cercando di far trascorrere meno tempo possibile dal processo di adsorbimento, in maniera tale che il montante depositato tra superficie del campione e vetrino non si fosse asciugato e il fluoroforo deteriorato.



Figura 44: microscopio LSM 900 (ZEISS)¹⁰⁷

5.9. Misure di potenziale ζ della proteina in soluzione

Per comprendere come viene effettuata questa misura, bisogna rifarsi al modello del EDL descritto in precedenza nel paragrafo 2.3.1. Quando una particella carica come una proteina viene dispersa in una soluzione contenete ioni, questi si dispongono attorno alla sua superficie attratti elettrostaticamente. Si viene a formare un primo strato di ioni adsorbiti detto Stern layer, composto prevalentemente di ioni di carica opposta a quella della superficie della particella. Oltre questo strato, l'effetto

elettrostatico dovuto alla carica superficiale della particella decresce all'aumentare della distanza dalla particella stessa. Oltre lo strato di Stern, si forma quindi uno strato diffuso di ioni di carica opposta a quella della particella che assieme allo strato di Stern formano l'EDL. La composizione dello strato diffuso è dinamica e varia nel tempo a causa di fattori quali ad esempio pH, forza ionica, concentrazione. Quando un campo elettrico è applicato alla dispersione di particelle, queste si muovono verso l'elettrodo di carica opposta alla loro (questo è il principio dell'elettroforesi). Tra lo strato di Stern e quello diffuso vi è un piano ipotetico che rappresenta l'interfaccia tra la particella in movimento e gli ioni ad essa legati e lo strato di ioni dispersi in soluzione durante l'elettroforesi. Questo piano viene definito slipping/shear plane, ed è il piano dove viene misurato il potenziale zeta. In Figura 45 viene rappresentata la situazione di una particella carica sottoposta ad elettroforesi e degli strati elettrici che la circondano.



Figura 45: rappresentazione dell'EDL formato attorno ad una particella carica negativamente. Nell'immediata prossimità della superficie è presente lo strato di Stern, composto di ioni con carica opposta alla particella e fortemente adesi a questa. Più esternamente è presente lo strato diffusivo dove sono presenti ioni di ogni tipo di carica. Durante l'elettroforesi la particella con l'EDL formato attorno ad essa si muove verso l'elettrodo che la attrae elettrostaticamente (positivo in questo caso), e lo slipping/shear plane diviene l'interfaccia tra la particella in movimento e la soluzione in cui è dispersa. Il potenziale ζ è il potenziale elettrocinetico misurato in corrispondenza di questo piano.¹⁰⁸

Il potenziale ζ è dedotto dalla misura della mobilità elettroforetica della particella carica in dispersione sottoposta ad un campo elettrico applicato. La mobilità elettroforetica μ_{ϵ} di una particella è calcolata come:

$$\mu_{\varepsilon} = \frac{V}{E}$$

Dove V è la velocità della particella e E l'intensità del campo elettrico. Il potenziale ζ è poi calcolato conoscendo μ_{ϵ} e utilizzando l'equazione di Henry:

$$\mu_{\varepsilon} = \frac{2\varepsilon_r \varepsilon_0 \zeta f(K_a)}{3\eta}$$

Dove $\varepsilon_r e \varepsilon_0$ sono la costante dielettrica del mezzo e del vuoto, ζ è il potenziale zeta, f(K_a) è la funzione di Henry e η la viscosità del mezzo. Per effettuare la misura si è applicata l'approssimazione di Smoluchowski e quindi sono state considerate le particelle come sfere in soluzione con spessore dell'EDL minore del raggio della particella. In questo caso nell'equazione di Henry f(Ka) assume valore 1,5 e si ottiene l'equazione di Helmotz-Smoluchowski: $\mu_{\varepsilon} = \frac{\varepsilon_r \varepsilon_0 \zeta}{\eta}$

Nelle misure di dynamic light scattering (DLS) la particella si muove per mezzo di un campo elettrico applicato e al contempo è colpita da un raggio laser incidente. Dato che la particella è in movimento la luce diffusa ha frequenze differenti rispetto a quelle del laser originario, e grazie all'effetto Doppler si sa che la variazione di frequenza è proporzionale alla velocità delle particelle. Schematicamente lo strumento è formato da una sorgente laser che viene divisa in due parti, una passa attraverso il campione con la dispersione da esaminare e un'altra viene usata come riferimento. La luce diffusa dal campione in esame e il riferimento vengono rilevate, combinate otticamente, per poter determinare lo scostamento di frequenza derivante dall'effetto Doppler (Doppler shift). In questo modo, come detto, è possibile calcolare la velocità delle particelle (legata al Doppler shift), la mobilità elettroforetica e il potenziale ζ (Figura 46).



Figura 46: schema del funzionamento di uno strumento per la misura di potenziale ζ in sistemi colloidali¹⁰⁸

Nel presente lavoro di tesi la misura del potenziale ζ della fibronectina in soluzione e in funzione del pH è stata effettuata tramite lo strumento Litesizer 500 (Anton Parr) rappresentato in Figura 47 (sinistra).



Figura 47: analizzatore di particelle Litesizer 500 (Anton Paar) sulla sinistra e cuvette per la misura elettroforetica a destra¹⁰⁹

Per effettuare la misura sono state utilizzate delle cuvette al cui interno è stata inserita la soluzione da analizzare (Figura 47, destra). Come si vede in figura, queste avevano due elettrodi per poter applicare il campo elettrico alla soluzione. Per la misura è stata preparata una soluzione di fibronectina 0,01 mg/mL, aggiungendo una soluzione di KCI 0,001 M alla soluzione di proteina in PBS alla concentrazione 0,2 mg/mL. Per poter costruire la curva del potenziale ζ della proteina in soluzione in funzione del pH, sono state effettuate nove misure ai seguenti valori di pH: 2.5 - 3 - 3.5 - 4 - 5 - 6 - 7 - 8 - 9. Il pH della soluzione da analizzare è stato fatto variare aggiungendo goccia a goccia NaOH 0,05 M per le titolazioni basiche e HCl 0,05 M per le titolazioni acide. Ad ogni goccia aggiunta è stato misurato il valore di pH tramite pHmetro finchè non si fosse raggiunto il valore desiderato, e a quel punto la soluzione è stata trasferita nella cuvette e avviata la misura. Per ogni operazione di misura lo strumento opera tre misurazioni, e ne restituisce la media. I dati di potenziale ζ in funzione del pH sono stati poi rielaborati tramite Excel per ricavarne un grafico.

5.10. Misure di potenziale ζ di superfici solide

Come detto precedentemente, il potenziale ζ, detto anche potenziale elettrocinetico, descrive il comportamento delle cariche alle interfacce di superfici. Per determinare il potenziale ζ di superfici solida e la fase liquida sono in movimento relativo tra loro. Quando la soluzione acquosa e la superficie solida sono a contatto tra loro, la carica della superficie è compensata dalla presenza di controioni in soluzione. Quando si ha un flusso della soluzione, le forze di taglio che agiscono sui controioni compensano la carica superficiale e muovono questi ioni nella direzione del flusso. Prendendo in considerazione il modello EDL, gli effetti elettrocinetici nascono dal fatto che quando una soluzione fluisce lungo una superficie, lo strato stazionario di carica non viene interessato dalla corrente mentre quello diffusivo sì. Se una soluzione elettrolitica viene fatta scorrere lungo un capillare per mezzo di una differenza di pressione, è possibile misurare una differenza di potenziale o una corrente tra due elettrodi posti all'ingresso e all'uscita del capillare dove scorre la soluzione (Figura 48).



Figura 48: rappresentazione della misura di un potenziale elettrico o di una corrente elettrica per effetto del flusso di una soluzione elettrolitica in un capillare. a) la soluzione e la superficie solida non sono in moto relativo. b) il flusso provo ca il movimento degli ioni dello strato diffusivo del modello EDL. c) misura di un potenziale tramite un circuito ad alta impedenza tra due elettrodi posti all'estremità del capillare. d) misura di una corrente tramite un circuito a bassa impedenza tra due elettrodi posti all'estremità del capillare.

Nel caso delle misure effettuate per questo lavoro di tesi, il capillare era formato dalle superfici di due campioni montati nella cella di misura in modo da essere paralleli tra loro. Per il calcolo del potenziale ζ viene usata l'equazione di Helmotz-Smoluchowski:

$$\zeta = \frac{dI_{str}}{d\Delta p} * \frac{\eta}{\varepsilon * \varepsilon_0} * \frac{L}{A}$$

Dove I_{str} è la corrente di flusso, Δp è la differenza di pressione nella cella, η è la viscosità della soluzione elettrolitica, $\epsilon * \epsilon_0$ è il coefficiente dielettrico della soluzione elettrolitica, L è la lunghezza del canale rettangolare formato dalle due superfici piane, A è l'area formata dalla distanza tra le due e la loro larghezza. La misura dipende dalla conoscenza dei parametri geometrici della cella, larghezza e lunghezza (che vengono impostati a priori) e distanza delle due superfici che viene calcolata dalla misura della portata volumetrica della soluzione e dalla differenza di pressione generata. La soluzione elettrolitica è una soluzione 0,001 M di KCI. Una raffigurazione della cella di misura è rappresentata in Figura 49.



Figura 49: componenti della cella di misura per le misure di potenziale ζ di superfici solide

I campioni si posizionano sui supporti blu, di modo che quando la cella è montata le facce siano parallele tra loro. Il 'gap' della cella è aggiustabile, e durante il settaggio della misura viene fissato tra 100-110 μ m. Lo strumento misura la conducibilità della soluzione. Per le misure effettuate, durante il settaggio questa non doveva superare i 18 mS/m. Per effettuare la misura è stato utilizzato lo strumento SurPASS electrokinetic analyzer (Anton Paar) mostrato in Figura 50.



Figura 50: SurPASS electrokinetic analyzer (Anton Paar)

La soluzione elettrolitica viene preparata in un beker, sulla sinistra in Figura 50, disciogliendo 45 mg di KCl in 600 mL d'acqua MilliQ. Uno stirrer magnetico permette di agitare la soluzione e disciogliere l'elettrolita più facilmente. Nel beker sono presenti il pHmetro e la sonda di conducibilità. Una volta che la cella è stata montata, il circuito riempito con l'elettrolita e il gap aggiustato, viene effettuata l'operazione detta 'flow check', grazie alla quale si sceglie la condizione ottimale di flusso dell'elettrolita (100 mL/min) impostando la pressione applicata nella cella. Lo strumento fa gradualmente variare il pH della soluzione elettrolitica durante la misura utilizzando due soluzioni: HCl 0.05 M per la titolazione acida e NaOH 0,05 M per la titolazione basica. A questo punto in base al tipo di curva che si vuole ottenere dalla misura (acida o basica) si inserisce la cannuccia relativa alla soluzione di HCl o NaOH, (le due bottiglie posizionate dietro il beker contenente la soluzione di KCl in Figura 50). Una volta partito il programma di misura, lo strumento costruisce una curva del potenziale ζ in funzione del pH, e per ogni punto di pH programmato (15 totali) opera quattro misure. Per come è stata descritta la misura, la curva acida e la curva basica vengono effettuate distintamente. Ed infatti, con la prima vengono generalmente coperti valori di pH da circa 2 a circa 5, con la seconda da circa 5 a circa 9. Pertanto, per ottenere una curva completa, vengono usati quattro campioni di uno stesso substrato, due per la parte acida e due per quella basica. Usando la stessa coppia di campioni per entrambe le misure, la seconda prova sarebbe influenzata dalle reazioni che occorrono sulla superficie

per le variazioni di pH della prima. I dati vengono poi esportati su Excel, grazie al quale è stata disegnata un'unica curva relativa al potenziale ζ in funzione del pH (da circa 2 a circa 9).

5.11. Misure di bagnabilità

Per avere un'indicazione della bagnabilità di una superficie è utile valutare l'angolo di contatto formato da una goccia d'acqua depositata sulla superficie stessa. Quando una goccia viene depositata su una superficie, la forma che assume è data da un equilibrio che viene raggiunto tra la tensione interfacciale della fase liquida e quella gassosa (γ_{LG}), la tensione interfacciale tra la fase solida e quella liquida (γ_{SL}), e la tensione interfacciale tra quella solida e gassosa (γ_{SG}), come mostrato in Figura 51. L'angolo di contatto è descritto dall'angolo formato tra la direzione della tensione solido-liquido e la direzione della tensione liquido-gas, con vertice situato nel punto di intersezione delle tre tensioni.



Figura 51: definizione grafica di angolo di contatto di una goccia depositata su una superficie, con indicazione delle tensioni interfacciali liquido-gas (y_{LG}), solido-gas (y_{SG}), solido-liquido (y_{SL})¹¹¹

La convenzione definisce idrofobiche le superfici che presentano angolo di contatto maggiore di 90°, ed idrofiliche quelle che presentano angolo di contatto minore di 90°. Nel presente lavoro di tesi, l'angolo di contatto è stato misurato tramite lo strumento KRÜSS DSA 100 (KRÜSS GmbH). Il campione è stato sistemato su un piano, il quale aveva di fronte una telecamera. Dallo schermo del pc collegato allo strumento si poteva valutare l'immagine ripresa, e tramite delle manopole dello strumento aggiustare la messa a fuoco. A questo punto è stata depositata con l'ausilio di una siringa una goccia d'acqua sul campione, verificato che la messa a fuoco fosse adeguata, e catturata un'immagine. Il software del pc collegato allo strumento forniva il valore dell'angolo di contatto con la rappresentazione grafica della forma della goccia e della tangente ad essa. Tutti i tipi di substrato, conseguentemente ad ogni protocollo di adsorbimento (tranne quello relativo al Kelvin Probe e alle proteine fluorescenti) sono stati interessati dalla misura. Per ogni tipologia di substrato e adsorbimento si disponeva di quattro campioni. Data la ridotta superficie del campione è stato possibile effettuare un numero limitato di misure per ciascuno, perché la goccia se depositata in una zona già bagnata in precedenza va incontro a fenomeni di coalescenza e si spande sul campione.

Generalmente sono state effettuate tre misure per campione. I risultati sono stati elaborati con Excel per avere la media e deviazione standard della misura, e tramite il test dell'anova per valutarne la significatività statistica.

5.12. Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier a riflettanza totale attenuta (ATR-FTIR)

La tecnica della ATR-FTIR sfrutta una sorgente di radiazione infrarossa (IR) che investe il campione e che viene poi rilevata da un detector. La luce infrarossa interagisce con le molecole presenti sulla superficie del campione in esame, le quali sono in grado di assorbire la radiazione a specifiche frequenze relative alle vibrazioni dei legami tra gli atomi. Un modo vibrazionale si dice attivo (cioè assorbe la luce infrarossa) se causa un cambiamento di dipolo della molecola durante il corso della vibrazione. Pertanto, quando una molecola ha un centro di simmetria, tutte le vibrazioni che sono simmetriche rispetto al centro sono inattive nell'infrarosso, mentre le vibrazioni asimmetriche vengono rilevate¹¹². Questa tecnica permette quindi di associare ai gruppi funzionali presenti nelle proteine caratteristiche bande di assorbimento nell'infrarosso, corrispondenti alle vibrazioni fondamentali dei gruppi funzionali stessi. Grazie al fenomeno della riflessione totale, rappresentato in Figura 52, è possibile creare un'onda evanescente che penetra nei primi micrometri della superficie del campione. In particolare, nelle misure effettuate in questo lavoro, una lampada IR produce un fascio non monocromatico con diverse intensità, che passa attraverso una punta in selenio/germanio posizionata a contatto con la superficie del campione. Il contatto è controllato dallo strumento tramite una misura di pressione, la punta in germanio e il substrato da analizzare vengono avvicinati fino a quando non vengono raggiunti 15 mPa, successivamente viene acquisito lo spettro. Il detector, costituito da tellurio-cromo-molibdeno (TCM), viene raffreddato prima della misura con azoto liguido, con lo scopo di aumentarne la sensibilità. Lo spettro è stato acquisito tra 1000-4000 cm⁻¹ con una risoluzione di 4 cm⁻¹, eseguendo 64 scansioni per ogni spettro. Nella punta in germanio si verifica il fenomeno della riflessione totale del fascio IR e in corrispondenza del punto di contatto col campione un'onda evanescente lo attraversa nei primi micrometri della superficie. Il sensore per ATR in germanio deve avere due caratteristiche fondamentali:

- deve essere otticamente trasparente alla frequenza dell'energia, in modo che il materiale del sensore non assorba la radiazione o ne assorba poca
- deve avere un indice di rifrazione più elevato di quello del mezzo che lo circonda, così che il dispositivo per ATR agisca come una guida d'onda, riflettendo internamente l'energia luminosa.

89



Figura 52: fenomeno della riflessione totale nel sensore ATR (azzurro) e formazione dell'onda evanescente che attraversa il campione (verde)¹¹³

Quello che viene acquisito è un interferogramma nel dominio del tempo, che viene trasformato matematicamente per passare dal dominio del tempo a quello della frequenza. Il principio di funzionamento generale è spiegato dall'interferometro di Michelson (Figura 53). In questo interferometro la sorgente di radiazione viene divisa e una parte viene riflessa da uno specchio fisso, mentre un'altra parte viene riflessa da uno specchio mobile. Il secondo, muovendosi appunto, genera interferenze costruttive e distruttive con il fascio riflesso dallo specchio fisso, permettendo l'acquisizione di un interferogramma. Dopo l'applicazione della trasformata di Fourier, lo spettro che si ottiene ha in ordinata l'assorbanza (o trasmittanza) e in ascissa il numero d'onda (wavenumber), una misura della frequenza della radiazione espressa in cm⁻¹.



Figura 53: schema di un interferometro di Michelson, in alto lo specchio fisso e a destro quello mobile¹¹⁴

Prima di fare la misura, è necessario acquisire uno spettro senza che la punta del ATR sia a contatto col campione. In questo modo si acquisisce un 'background' dell'aria, che sarà poi sottratto allo spettro della misura vera e propria per eliminare gli artefatti da contaminazioni ambientali. I due gas che

usualmente vengono rivelati sono il vapore acqueo e CO₂, ma possono essere presenti anche contaminazioni di diverso tipo, come ad esempio dei prodotti usati per pulire il sensore ATR¹¹⁴. Esempi di spettri di contaminanti sulla superficie del sensore ATR e nell'aria sono riportati in Figura 54.



Figura 54: sulla sinistra spettri di alcuni contaminanti tipici da laboratorio, sulla destra del vapore acqueo e della anidrid e carbonica

Lo strumento utilizzato per effettuare questo tipo di misura è stato lo spettrometro Nicolet iN10 Infrared Microscope (Thermo Fischer Scientific), mostrato in Figura 55. La misura è stata effettuata presso l'Istituto Nazionale di Ricerca Metrologica (INRiM, Strada delle Cacce 91, 10137, Torino).



Figura 55: spettrometro Nicolet iN10 Infrared Microscope (Thermo Fischer Scientific)¹¹⁵

5.13. Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS)

La spettroscopia Raman è una tecnica che sfrutta l'interazione della luce con le molecole del campione da analizzare. A differenza della FTIR che si basa su una misura di assorbanza della radiazione, la spettroscopia Raman si basa sulla diffusione (scattering) dei fotoni. Un'altra differenza sta nel fatto che mentre nella FTIR la radiazione infrarossa provoca una variazione dei momenti di dipolo dei legami, nella spettroscopia Raman la luce induce una deformazione della nube elettronica della molecola colpita, provocando variazioni nella polarizzabilità dei legami. Questo permette di rendere "visibili" legami che con la tecnica FTIR sarebbero di difficile rilevazione, come legami omonucleari tra atomi quali carbonio-carbonio, zolfo-zolfo o azoto-azoto. Quando le molecole vengono colpite da un fascio di fotoni, la maggior parte di questi viene dispersa con la stessa energia incidente con la quale hanno colpito la molecola. In questo caso si parla di diffusione elastica o diffusione di Rayleigh. In casi molto più rari, circa un fotone su dieci milioni, il fotone diffuso ha un'energia che si discosta da quella del fotone incidente, e in questi casi si parla di diffusione anelastica. Questo accade perché quando la molecola interagisce con un fotone sale ad un livello energetico virtuale superiore, che presto viene perso ricadendo ad un livello inferiore ma non uguale a quello di partenza. Quando l'energia del fotone diffuso è minore di quella del fotone incidente, si parla di diffusione Stokes. Quando l'energia del fotone diffuso è maggiore di quella del fotone incidente, si parla di diffusione anti-Stokes. Questo è possibile che si verifichi in quanto la molecola colpita dal fotone incidente può trovarsi in uno stato vibrazionale già eccitato, e nel ricadere ad un livello energetico inferiore "fornisce" al fotone diffuso l'energia di quello incidente e del gap dello stato eccitato di partenza. Una spiegazione grafica di questi salti energetici alla base dell'effetto Raman è fornita in Figura 56.





Figura 56: schema dei livelli energetici nella diffusione elastica e anelastica di fotoni incidenti¹¹⁶

Nella spettroscopia Raman, un fascio laser viene quindi indirizzato verso il campione, le cui molecole, investite da fotoni incidenti, diffondo fotoni per mezzo di interazioni elastiche o anelastiche. Questi

livello elettronico fondamentale

fotoni diffusi sono raccolti da un rilevatore, il quale ha un filtro per intercettare solo i fotoni derivanti da diffusione anelastica, di interesse per l'effetto Raman. A questo punto dal rilevatore i fotoni sono diretti verso il grafting, una "setaccio" in grado di dividere i fotoni per frequenza e permettere quindi di costruire l'intero spettro. Lo scostamento della frequenza dei fotoni diffusi, detto Raman shift, è usato per costruire lo spettro caratteristico della specie chimica in esame (Figura 57).



Figura 57: esempio di diffusione anelastica, effetto Stokes; il fotone diffuso, a energia minore dell'incidente, genera un picco caratteristico nello spettro Raman¹¹⁷

Prima di effettuare la misura, viene controllato che il laser sia a fuoco, e che l'allineamento dell'ottica sia ottimale. Infatti, la rilevazione dell'effetto Raman non è semplice per sua stessa natura (come detto pochissimi fotoni incidenti non subiscono un'interazione elastica), e un controllo fine di questi parametri è necessario. Per aumentare di molto la sensibilità della misura, si può sfruttare la risonanza plasmonica generata da nanoparticelle depositate sulla superficie di interesse. Queste nanoparticelle, se colpite da un fascio laser ad una determinata freguenza (con energie dei fotoni comparabili agli assorbimenti plasmonici delle nanoparticelle), possono generare un plasmone di risonanza. Due sono gli effetti che contribuiscono al meccanismo dell'aumento del segnale Raman: un effetto elettromagnetico e uno chimico, con il primo che ha un peso maggiore rispetto al secondo. Se la molecola da rilevare si viene a trovare vicino a delle nanoparticelle che, grazie al fascio di fotoni alla giusta frequenza, producono risonanza plasmonica, nell'intorno delle nanoparticelle si crea una nuvola elettronica che oscilla molto. A questo punto la molecola viene investita da un campo elettrico intensificato che è in grado di amplificare il segnale, poiché l'intensità del segnale Raman è proporzionale alla radice dell'ampiezza del campo magnetico incidente¹¹⁸. Questa tecnica è chiamata Surface Enhanced Raman Spectometry (SERS). L'aumento di segnale da singola molecola utilizzando la SERS rispetto alla spettroscopia Raman è riportato essere di diversi ordini di grandezza, fino a 10^14¹¹⁸. Per fare questo c'è bisogno di una superficie plasmonicamente attiva e nanostrutturata. Nello studio di questa tesi, sui campioni è stata depositata una goccia di 10 µL di sospensione di nanoparticelle di argento (AgNPs), lasciata poi asciugare. Una volta asciutta si è proceduti alla misura, cosicché è stato possibile sfruttare l'effetto della risonanza plasmonica delle nanoparticelle d'argento. In Figura 58 sono mostrate immagini SEM di nanoparticelle depositate su substrati per misure SERS.



Figura 58: (A) aggregati di nanoparticelle d'argento e (B) cluster di nanoparticelle d'oro su substrati per misure SERS (immagini SEM)¹¹⁸

Lo strumento utilizzato per le indagini SERS in questo lavoro è il DXR-Xi Raman spectrometer (Thermo Fisher Scientific) (Figura 59), il quale ha analizzato un'area di 500x500 µm con una risoluzione di 25 µm. La sorgente laser aveva frequenza di 532 nm, potenza 1 mW, frequenza di campionamento 0,01 Hz con 10 acquisizioni per ogni pixel dell'immagine dell'area esaminata. È stato usato un obiettivo 10x con un'apertura rettangolare di 50 µm. Lo strumento viene calibrato settimanalmente attraverso un tool di calibrazione controllato tramite software che corregge la scala di frequenza utilizzando le righe di emissione dello spettro del neon e, come controllo, verifica i picchi Raman multipli del polistirene. Una sorgente di luce bianca viene utilizzata per la calibrazione del detector. La risoluzione del grafting è 5 cm⁻¹ (densità grafting 900 linee/mm) e l'incertezza associata all'intensità è dimostrata essere inferiore al 5%, utilizzando lo standard di polistirene. La misura è stata effettuata presso l'Istituto Nazionale di Ricerca Metrologica (INRiMStrada delle Cacce 91, 10137, Torino).



Figura 59: DXR-Xi Raman spectrometer (Thermo Fisher Scientific) utilizzato per l'acquisizione di spettri SERS¹¹⁹

5.14. Osservazioni FESEM-EDS dei campioni di bioattività

Le tecniche di microscopia elettronica utilizzano l'interazione tra un fascio di elettroni e la superficie da analizzare per generare immagini topografiche del campione in esame. Il fascio di elettroni è generalmente focalizzato da una serie di lenti per permettere la scansione di aree del campione. Grazie al rilevamento dei raggi X emessi dal campione durante la misura, è anche possibile ricavare uno spettro che descrive la composizione chimica della superficie del campione. Quando il fascio di elettroni colpisce la superficie del campione, possono generalmente avvenire due tipi di interazione, una elastica e una anelastica. In quella anelastica vengono emessi elettroni secondari, a bassa energia rispetto al fascio che colpisce il campione, dagli strati più superficiali del campione (primi nanometri). Nell'interazione elastica, l'elettrone incidente colpisce un nucleo atomico del campione o un elettrone del campione con energia comparabile alla propria. In questo caso vengono emessi elettroni retrodiffusi o back scattered. Questi elettroni, a contenuto energetico maggiore, provengono da strati più profondi del campione. Nella camera dove vengono alloggiati i campioni per l'osservazione, sono presenti un detector per elettroni secondari e un detector per elettroni back scattered. Nella camera si opera in condizioni di vuoto spinto (10⁻⁵ Pa) e i campioni di materiali conduttivo devono avere un collegamento a terra per evitare accumuli di carica superficiale che inficerebbero l'osservazione. In Figura 60 è mostrata la generazione degli elettroni secondari e retrodiffusi.



Figura 60: rappresentazione della formazione di elettroni secondari (SE1) e retrodiffusi o back scattered electrons (BSE) (SE2, SE3)¹²⁰

Nella microscopia FESEM, la sorgente di elettroni è costituita da un field electron gun (FEG), che sfrutta un gradiente di potenziale elettrico per emettere il fascio di elettroni. Nel FEG utilizzato, è presente un singolo filamento di esaboruro di lantanio con una punta che rappresenta la sorgente di elettroni costituenti il fascio. Il principio di generazione del fascio di elettroni prevede la presenza di due anodi, che fungono da lente elettrostatica. Il primo anodo estrae gli elettroni dal filamento e il secondo li accelera. Rispetto alla sorgente termo ionica di SEM tradizionale, grazie al FEG è possibile raggiungere risoluzioni più elevate. La sorgente di elettroni di un FEG deve essere mantenuta in vuoto molto spinto (10⁻⁹ torr) per mantenere la stabilità elettronica del fascio e scongiurare contaminazioni catodiche. Una rappresentazione di questo funzionamento è fornita in figura Figura 61 c.



Figura 61: (a)esempio di punta di filamento in tungsteno da cui viene prodotto il fascio di elettroni, (b) ingrandimento della punta, (c) schema del funzionamento del FEG ¹²⁰

Grazie alla spettroscopia EDS (energy dispersive X-ray spectroscopy) è possibile conoscere la composizione elementale della superficie del campione. Quando i campioni vengono colpiti dal fascio di elettroni possono produrre dei raggi X caratteristici. Siccome ogni elemento ha uno spettro di emissione nei raggi X differente da un altro, andando a rilevare le emissioni di raggi X è possibile costruire uno spettro che indichi la presenza di determinate specie atomiche del campione. Il raggio X prodotto è il risultato dell'interazione del fascio di elettroni primario con il nucleo degli atomi del campione. Il fascio eccita un elettrone del nucleo dell'atomo, che viene espulso e crea una lacuna elettronica. Un elettrone degli strati più esterni a livello energetico maggiore colma la lacuna e nel farlo rilascia dell'energia sotto forma di raggio X. Anche in questo caso l'interazione è generata da strati abbastanza profondi, dell'ordine del µm.

Per le osservazioni condotte in questo lavoro di tesi è stato utilizzato un SEM-FEG Supra 40 (ZEISS) equipaggiato con un detector per l'analisi EDS (Figura 62 sinistra).



Figura 62: sulla sinistra SEM-FEG Supra 40 (ZEISS), sulla destra dettaglio dei campioni in posizione prima della chiusura della camera

I campioni sono stati posizionati su stub tramite nastro adesivo conduttivo, usato per le ragioni spiegate di messa a terra, e alloggiati su un disco che permette di collocare fino a nove campioni. Una fotografia della camera aperta e dei campioni in posizione è riportata in Figura 62 (parte destra).

Le osservazioni di topografia FESEM sono state condotte ad ingrandimenti di 500x, 1000x, 1000x 20000x e 60000x, con voltaggio impostato di 2kV. Le misure EDS sono state condotte a 15 kV ad ingrandimenti 1000x e 10000x.

6. RISULTATI E DISCUSSIONE

6.1. Caratterizzazione dell'adsorbimento di fibronectina

In questa prima parte di presentazione dei risultati verrà discusso l'adsorbimento di fibronectina sui substrati. Per primi verranno mostrati i dati relativi alla quantifica della proteina adsorbita (survey XPS, misure in fluorescenza), poi verrà analizzata la distribuzione della proteina sulla superficie (KPFM, microscopia in fluorescenza) e per ultimo verranno valutate le interazioni e modifiche conformazionali a cui va incontro la proteina una volta adsorbita (potenziale ζ , high resolution XPS, SERS, ATR-FTIR).

6.1.1. Quantifica della proteina adsorbita

Tramite la tecnica del XPS è possibile valutare la presenza di elementi chimici sulla superficie del campione. L'XPS è infatti in grado di fornire uno spettro caratteristico di ogni elemento. Si è scelto quindi di indagare la composizione della superficie dei substrati prima e dopo l'adsorbimento proteico, in maniera tale da poter stabilire la presenza di proteina dagli elementi rilevati in superficie. L'analisi XPS in modalità survey fornisce uno spettro energetico molto ampio dal quale è possibile valutare la presenza di proteina grazie alla percentuale di specie atomiche rilevate come C e N⁷¹. Il valore di C è però influenzato dalle contaminazioni atmosferiche, perciò il dato che più è riferibile alla fibronectina legata alla superficie è quello di N, elemento che si sa non essere presente nella composizione originale dei substrati. In Tabella 1 sono riportate le percentuali relative alla composizione atomica superficiale dei substrati tal quali e successivamente all'adsorbimento di fibronectina.

	С	0	Ν	Ti	Al	V	altri
TiCP	28.19	52.12	4.07	15.51			0.11
TICP BFN	58.14	26.54	12.57	1.82			0.93
Ti64	23.55	51.84	3.39	16.36	3.62	1.19	0.05
Ti64 BFN	54.18	30.53	10.26	2.59		0.40	2.03
Ti64CT	12.73	60.78	2.52	20.29	3.70		
Ti64CT BFN	54.82	27.70	13.66	3.80		0.01	

Tabella 1: percentuale atomica della specie presenti in superficie per i diversi substrati prima e dopo adsorbimento di fibronectina

Dopo l'adsorbimento di BFN, il valore percentuale di C per tutti e tre i substrati aumenta così come quello di N. Il valore di O invece diminuisce, a causa della presenza di un layer di proteina che è in grado di mascherare l'ossido di titanio superficiale (nativo o dovuto al trattamento chimico). L'XPS, infatti, riesce a penetrare solo pochi nanometri e l'adsorbimento di fibronectina è sufficiente a ridurre il segnale proveniente dal substrato, quindi la quantità di O diminuisce. Per la stessa ragione diminuiscono anche le percentuali atomiche di Ti, Al, e V per quanto riguarda il Ti64 e il Ti64CT. Per il Ti64CT in realtà la percentuale di V era già prossima allo zero in quanto questo elemento entra meno, rispetto alla lega tal quale, nella composizione dello strato di ossido superficiale in seguito al trattamento chimico che subisce. I dati confermano la presenza di proteina sui substrati a causa dell'aumento della percentuale atomica di N, che supera la soglia critica del 9% riferita in letteratura alla presenza di un layer proteico sulla superficie¹²¹. Da questi dati non è possibile però stabilire quantitativamente quale sia la superficie ad adsorbire più proteina, a causa della ridotta differenza tra le concentrazioni di N per i tre substrati.

È possibile ottenere un'informazione al riguardo dalla misura effettuata in fluorescenza, grazie ad uno strumento di imaging con analisi quantitativa del segnale in fluorescenza (Chemidoc). Questo strumento permette, grazie ad adsorbimenti effettuati con fibronectina legata a rodamina, di acquisire il segnale generato dai fluorofori legati alla proteina e quantificare la presenza di proteina stessa in base all'intensità del colore dei pixel dell'immagine acquisita. Grazie al campo di acquisizione di grandi dimensioni, è possibile fare una misura che contemporaneamente interessi tutti i substrati e permetta di confrontarli perché soggetti alle stesse condizioni di misura. I risultati derivanti dalla misura sono presentati in Figura 63.



Figura 63: grafico relativo all'intensità del segnale in fluorescenza rilevato sulla superficie dei campioni dopo adsorbimento di fibronectina marcata con rodamina (indicazione del risultato del test dell'anova nella parte superiore)

Appare evidente dal grafico come il Ti64CT dia un segnale maggiore rispetto al TiCP e al Ti64. Questo risultato risulta essere statisticamente significativo dal test Anova effettuato, mentre lo stesso non può essere detto per quanto riguarda il confronto tra il dato del TiCP e Ti64. La maggior quantità di proteina adsorbita dal Ti64CT può essere giustificata dalla chimica superficiale di questo substrato, in grado di interagire con la proteina grazie ad interazioni elettrostatiche e legami H. La superficie è infatti ricca di gruppi OH acidi, che a pH 7.4 si presentano nella forma deprotonata O⁻, in grado di legare i gruppi NH³⁺ della proteina ¹²², sia, in misura minore, di gruppi OH basici¹²³ che si presentano in forma protonata OH₂⁺ che possono interagire con i gruppi COO⁻. Inoltre, il maggior adsorbimento può essere correlato alla maggiore rugosità dello strato d'ossido che offre più superficie per l'adsorbimento¹²⁴, alla maggiore idrofilicità ed energia superficiale¹²⁵, come mostrato dai grafici in Figura 64 relativi ad uno studio precedente di caratterizzazione dei substrati. Altro aspetto importante, che può giocare un ruolo nell'adsorbimento proteico, è l'elevato numero di molecole d'acqua che sono presenti sulla superficie del campione Ti64CT come fisisorbite (senza essere dissociate in gruppi OH), come si evince dai dati XPS.



Figura 64: sulla destra misura di angolo di contatto con acqua relativa ai tre substrati, sulla destra energia superficiale con indicazione del contributo polare (yp) e dispersivo (yd) per i tre substrati

La bagnabilità della superficie è spesso presa in considerazione in letteratura nella valutazione dell'adsorbimento proteico. Spesso le proteine mostrano di adsorbire su superfici grazie ad interazioni idrofobiche che possono portare a cambiamenti conformazionali della biomolecola, esponendo verso il substrato domini idrofobici. Allo stesso tempo, non tutte le proteine si comportano allo stesso modo, ed è stato visto come la fibronectina prediliga superfici più idrofiliche per il titanio rispetto all'albumina, anche in adsorbimenti da soluzioni proteiche complesse, potendo identificare un ruolo nell'idrofilicità del substrato per l'adsorbimento selettivo di proteine dal plasma^{75,14}. Il grado di

idratazione della superficie è stato ipotizzato influire sull'adsorbimento, con l'albumina che si è osservato non riuscire ad interagire con la superficie per mezzo di forze attrattive a corto raggio a causa della presenza di strati idratati sia sulla superficie che sulla proteina⁶². In altri casi si è osservato che la fibronectina, a seguito di trattamenti superficiali che rendessero la superficie più idrofobica, sembrava riuscire a dispiegare con più facilità domini della proteina circondati da molecole d'acqua in soluzione e ad interagire con la superficie⁷⁸.

6.1.2. Distribuzione della proteina in superficie

Per indagare la distribuzione della proteina sul substrato, è stata eseguita un'indagine sfruttando la microscopia a forza atomica in modalità Kelvin probe. Grazie a questa tecnica, è possibile ottenere delle immagini colorimetriche descrittive rispettivamente della topografia o del potenziale di superficie, e proprio tramite quest'ultime può essere individuata la presenza di un layer proteico sulla base delle diverse caratteristiche composizionali dell'area esaminata.



Figura 65: immagini topografiche (colonna sinistra), di potenziale superficiale (colonna centrale) di dimensioni 100x100 μm delle aree di bordo della goccia depositata per l'adsorbimento di fibronectina sui tre substrati. Sulla destra grafico del potenziale di superficie relativo alla linea bianca disegnata nell'immagine di potenziale

Le immagini in Figura 65 mostrano la scansione di aree di campioni relative ai tre substrati di dimensioni 100x100 μ m. Queste sono state acquisite facendo riferimento al bordo di una goccia di soluzione proteica depositata per far avvenire l'adsorbimento in modo selettivo su una parte della superficie. Nella parte sinistra è riportata l'immagine topografica acquisita con l'AFM in modalità

tapping mode, mentre nella parte centrale è riportata l'immagine acquisita in KPFM in modalità lift mode. Dalle immagini di topografia è possibile notare gli effetti della lucidatura su TiCP e Ti64 mentre sul Ti64CT si osserva l'effetto del trattamento chimico che crea un pattern microrugoso mettendo in rilievo le fasi β del materiale corrose meno di quelle α . Nel complesso le immagini di topografia non forniscono informazioni riguardo la presenza di un layer proteico a questa scala. Discorso differente invece per le immagini di potenziale, dove per tutti e tre i substrati è possibile identificare un confine tra la goccia depositata per l'adsorbimento (sinistra) e il substrato non interessato dal processo (destra). La differenza di potenziale tra le aree con e senza proteina adsorbita è messa in evidenza dai grafici della colonna destra di Figura 65. In questi grafici è riportato il valore di potenziale seguendo una linea tracciata nell'immagine acquisita in modalità Kelvin probe (linea bianca) ed è chiaro come i livelli di potenziale differiscano guando si passa dalla zona interessata dall'adsorbimento a guella non interessata, con differenza dell'ordine di 50 mV per il TiCP, mentre di circa 100 mV per il Ti64 e il Ti64CT. Questi diversi valori di differenza nel valore di potenziale possono essere ricondotti a due cause: alla diversa natura dello strato di ossido superficiale formatosi sul titanio¹²⁶ o alle cariche esposte dalla proteina di diversa natura. Nel caso del TiCP il confine relativo alla goccia di soluzione depositata per l'adsorbimento appare meno evidente, a causa di effetti di deposito del bordo della goccia. Nell'immagine di potenziale relativa al Ti64CT si rilevano degli effetti topografici in corrispondenza dei grani di fase β , ma rimane comunque ben visibile la differenza di potenziale tra le due aree.





Nelle immagini in Figura 66 sono valutate aree interne alla porzione dove è stata depositata la goccia di soluzione proteica per l'adsorbimento. Le immagini sono relative ad aree sui campioni di 2x2 µm. Ciò che appare dalle immagini relative al TiCP e Ti64 in topografia è la presenza di strutture di forma globulare, che dall'immagine di potenziale non vengono evidenziate. Questo indicherebbe che non ci sono differenze di chimica superficiale tra gli agglomerati e il resto della superficie: si tratta quindi in ogni caso di un layer proteico che assume morfologia diversa in alcuni punti. Nelle immagini di potenziale di TiCP e Ti64 il rivestimento di proteina appare uniforme, con un range di potenziale di 15 mV per il TiCP e circa 20 mV per il Ti64, come confermato anche dai grafici della colonna di destra dove è riportato il valore di potenziale ottenuto dalle immagini in modalità Kelvin probe seguendo la linea bianca tracciata. Queste variazioni di potenziale sono paragonabili al rumore della misura, quindi non significative. Sembrerebbe che quindi la fibronectina formi uno strato continuo sul materiale, ma che
sia presente anche sotto forma di aggregati. Questo potrebbe essere spiegato dal meccanismo suggerito in letteratura di un adsorbimento inizialmente casuale, e successivamente il verificarsi di fenomeni di coalescenza della proteina adsorbita a formare cluster superficiali^{51,127}. L'immagine topografica relativa al Ti64CT evidenzia invece un grano di fase β , circondato da grani α , ricoperti entrambi dalla struttura nanoporosa e da un layer proteico. Il potenziale graficato seguendo la linea bianca tracciata nell'immagine in modalità Kelvin probe ha un'ampiezza maggiore rispetto a quello dei substrati precedenti, ed è evidente come sia influenzato dalle caratteristiche topografiche. Ciò che possiamo asserire in base ai dati ottenuti, è che non c'è evidenza di un diverso adsorbimento proteico da parte delle due fasi cristalline del titanio.

Successivamente vengono riportate le immagini acquisite tramite microscopia in fluorescenza. Grazie a questa tecnica è possibile visualizzare la proteina marcata che se eccitata alla giusta lunghezza d'onda emette segnale ad una specifica lunghezza d'onda. Utilizzando i canali adeguati a identificare il fluoroforo di interesse, si è indagata la copertura più o meno uniforme e la formazione di strutture particolari della proteina adsorbita.



Figura 67: microscopia in fluorescenza dopo adsorbimento di fibronectina su diversi substrati (50x): A: TiCP; B: Ti64; C: Ti64CT

Le immagini in Figura 67 mostrano il confronto tra i tre tipi di substrato ad ingrandimenti 50x. L'immagine A è relativa al substrato TiCP, e per quanto debole il segnale è possibile individuare la fibronectina in strutture globulari, così come per l'immagine B relativa al Ti64. Per quanto riguarda l'immagine C relativa al Ti64CT è possibile evidenziare come risulti più marcato il segnale nell'area esaminata, dato dalla fluorescenza della rodamina legata alla fibronectina. Come osservato dalle misure di quantifica ottenute in fluorescenza, questo substrato è in grado di adsorbire più proteina del TiCP e del Ti64, e fornire un segnale che può essere quindi meglio visualizzato tramite microscopia. Questo conferma l'influenza delle caratteristiche di chimica e morfologia superficiale descritte, comprese l'idrofilicità ed energia superficiale maggiore che rendono più affine la proteina a questo substrato.



Figura 68: microscopia in fluorescenza dopo adsorbimento di fibronectina su diversi substrati (100x): A: TiCP; B: Ti64; C: Ti64CT

Le immagini ad ingrandimenti 100x in Figura 68 e 200x in Figura 69 confermano l'informazione derivante da quelle a 50x. Tra i diversi substrati si nota un'organizzazione differente della proteina sulla superficie. Per quanto riguarda il TiCP e il Ti64 la fibronectina forma delle strutture che sono più facilmente individuabili su questi substrati rispetto che sul Ti64CT. In particolare, si vede come la fibronectina assuma sulla superficie una struttura filamentosa sul TiCP e la presenza di una struttura globulare sul Ti64. Diversi studi dimostrano come la disposizione di fibronectina dipenda dalla natura del substrato, ed in particolare dalla bagnabilità^{128,129} (la proteina si adsorbe come isole su substrati a bassa bagnabilità e come reticoli su substrati ad alta bagnabilità) e come il tempo del processo di adsorbimento sia determinante per indurre l'aggregazione della proteina e la formazione di strutture più reticolate e complesse¹²⁷. La difficoltà maggiore nell'individuare queste strutture sul Ti64CT potrebbe essere dovuta alla maggiore affinità che la proteina mostra con la superficie di questo substrato, che guida un adsorbimento più uniforme sulla superficie scoraggiando la formazione di aggregati.



Figura 69: microscopia in fluorescenza dopo adsorbimento di fibronectina su diversi substrati (200x): A: TiCP; B: Ti64; C: Ti64CT

6.1.3. Interazioni della proteina col substrato e modifiche conformazionali

Per avere informazioni relative alle interazioni tra la proteina e la superficie e come l'adsorbimento possa guidare cambiamenti conformazionali della proteina adsorbita è utile valutare il potenziale ζ di superficie del layer proteico formatosi sui substrati. Al fine di comprendere più efficacemente le informazioni derivanti dalla curva di potenziale ζ , i campioni sottoposti alla misura del range acido sono poi stati analizzati all'XPS. Infatti, dalla conoscenza della composizione elementale sulle superficie dopo la misura di potenziale ζ , si può stabilire se questa provochi il distacco della proteina. Comparando i risultati dei tre substrati, è possibile individuare anche quello che lega la proteina in maniera chimicamente più stabile anche in condizioni variabili di pH, come può avvenire nella sede di impianto durante la fase infiammatoria.

	С	0	N	Ti	Al	V	altri
TiCP BFN	58.14	26.54	12.57	1.82			0.93
TiCP BFN_z	55,29	35,56	6,85	2,29			0.01
Ti64 BFN	54.49	24.81	9.88	2.30	1.43	0.49	1.61
Ti64 BFN_z	49,07	28,05	6,92	3,89	3,95	0,50	7,62
Ti64CT BFN	54.82	27.70	13.66	3.80		0.01	
Ti64CTBFN_z	56,90	29,07	11,68	2,29			0,07

Tabella 2: percentuali atomiche delle specie presenti in superficie sui tre substrati prima (-BFN) e dopo (-BFN_z) la misura di potenziale ζ (range acido)

In Tabella 3 sono considerati solo i dati relativi all'azoto, in quanto quelli relativi a C e O sono influenzati da contaminazioni derivanti dal processo di misura:

Tabella 3: percentuali atomiche di N sui tre substrati prima e dopo la misura di potenziale ζ , con indicazione della variazione percentuale del valore percentuale di N

	N prima pot_z	N dopo pot_z	Variazione %
Ti BFN	12,57	6,85	45,5
Ti64 BFN	9,88	6,92	30,0
Ti64CT BFN	13,66	11,68	14,5

Da questi dati è possibile notare come il contenuto atomico percentuale di N sulla superficie vari meno per il substrato Ti64CT rispetto agli altri due. Questo substrato quindi non solo adsorbe una quantità maggiore di proteina, ma resiste anche meglio al distacco della proteina adsorbita in seguito alla procedura di misura del potenziale ζ di superficie. Tale caratteristica è attribuibile alla porosità dello strato di ossido superficiale e alla maggior densità di gruppi OH che forniscono più siti di legame per la proteina rispetto all'ossido superficiale del TiCP eTi64. Da questa analisi non possiamo escludere perciò che le curve relative al TiCP e Ti64 siano influenzate dal parziale distacco della proteina e che in certi range di pH (molto acido e molto basico) il dato di potenziale interessi non solo il layer proteico adsorbito quanto anche in parte il substrato tal quale, che viene in parte esposto alla soluzione di elettrolita della misura. Per il Ti64CT, invece, la soglia di 9%, che corrisponde ad un layer continuo di proteina superficiale, è raggiunta anche dopo che il campione è stato sottoposto alla misura di potenziale ζ. Per cui, i risultati ottenuti sono attribuibili alla proteina e non anche al substrato sottostante.





Dal confronto del substrato in TiCP con TiCP dopo adsorbimento di BFN (TiCP BFN) e la curva relativa alla fibronectina (BFN) in Figura 70 si possono fare le seguenti considerazioni.

Per prima cosa il IEP del titanio tal quale ha valori molto prossimi a 4, mentre dopo l'adsorbimento di fibronectina il IEP si sposta a circa 4.6 che è un valore vicino a quello della proteina nativa in soluzione,

misurato a pH 4.8 (vicino al valore da letteratura di 5-6^{12,13}). Questa informazione è indicativa del fatto che la superficie, dopo adsorbimento, differisce da quella del substrato tal quale, per la presenza della proteina adsorbita. La presenza di un IEP prossimo a 4 per il metallo tal quale è indice, come atteso, della assenza sulla sua superficie di gruppi funzionali con comportamento acido/base a contatto con una soluzione: le superfici chimicamente inerti presentano infatti IEP=4. Si può anche ipotizzare che la proteina adsorbita abbia un IEP leggermente più acido di quella in soluzione, anche se si tratta di una differenza piccola, al limite di significatività strumentale.

Inoltre, la pendenza della curva della proteina adsorbita mostra un aumento nel range che va da 5 a 4, nella regione acida, rispetto alla curva del substrato tal quale e rispetto a quella della proteina in soluzione. Questo fenomeno può avere due spiegazioni diverse. Secondo una prima ipotesi, una maggiore pendenza della curva di potenziale zeta può essere considerato un indice di maggiore idrofobicità, nel nostro caso, ipoteticamente, sia del substrato a seguito del processo di adsorbimento, rispetto a quanto non fosse prima, sia della proteina adsorbita rispetto a quella in soluzione. Secondo questa ipotesi (che è però stata formulata per le superfici idrofobiche e prive di gruppi funzionali), la carica superficiale cresce rapidamente (elevata pendenza), aumentando il numero di specie cariche in soluzione (ossia H_3O^+ o OH^- spostandosi rispettivamente nel range acido o basico), perché queste vengono facilmente adsorbite su una superficie idrofobica che non ha affinità per le molecole d'acqua: si tratta quindi di un fenomeno che non coinvolge cariche esposte dalla superficie di per sé, ma la sostituzione di molecole d'acqua adsorbite con ioni. Nel caso in cui ad una tale superficie venga aggiunto un solo tipo di gruppo funzionale, si osserverà una pendenza minore, dovuta alla maggiore idrofilia della superficie che adsorbe con più forza le molecole d'acqua e le sostituisce meno facilmente con gli ioni in soluzione anche se questi crescono in concentrazione (nell'elettrolita) per via del cambiamento di pH. Questo risultato non è supportato dalle misure di angolo di contatto effettuate sui materiali in studio in questa tesi, dove il titanio tal quale appare più idrofobico rispetto al titanio su cui è avvenuto adsorbimento. Bisogna tener presente che la spiegazione della diversa pendenza delle curve di potenziale zeta può essere diversa nel caso di superfici con una chimica complessa che, come nel caso delle proteine adsorbite, presentano una componente organica idrofobica e diversi gruppi funzionali polari ed idrofilici (amminici e carbossilici). In questo caso, ciò che gio ca un ruolo prevalente è il rapporto fra le specie con diversa carica esposte dalla superficie. Una maggiore pendenza della curva (spostandosi ad esempio verso il range basico) può essere correlata ad un rapido incremento di carica superficiale negativa dovuto ad un elevato numero di gruppi carbossilici (acidi) che sono esposti sulla superficie, verso la soluzione. Questa spiegazione sarebbe in linea con lo spostamento (seppur piccolo), in direzione acida, del IEP registrato sulla superficie con la proteina adsorbita rispetto a quella in soluzione: entrambi i fenomeni correlano con una maggiore esposizione di gruppi carbossilici da

113

parte della proteina. Lo spostamento può essere piccolo perché, in questo caso, non cambia significativamente la forza acida di tali gruppi, ma piuttosto il loro numero esposto verso la soluzione.

Un parziale distacco della proteina dalla superficie, a seguito della misura a pH acidi, come evidenziato dai dati XPS, è confermato dalla curva ottenuta tramite potenziale zeta. In concomitanza di questo distacco, si nota l'aumento delle deviazioni standard nelle misure di potenziale ζ a partire da pH circa 4.5, per il fatto che la superficie subisce modifiche durante la misura dovute alla parziale perdita della proteina adsorbita.

Nella regione acida la proteina adsorbita al substrato dà un plateau con onset circa a pH 3.5 con valori costanti di potenziale intorno a 47 mV, mentre la proteina in soluzione allo stesso valore di pH mostra un plateau con onset simile e valore costante a 20 mV. I gruppi amminici protonati danno contributo positivo alla carica netta globale della proteina ed a questi valori di pH non sono neutralizzati da altri gruppi con carica opposta. Il diverso valore di potenziale zeta su cui si collocano i due plateau è strettamente collegato alla diversa pendenza delle curve prima discusso.

Nella regione basica le curve del substrato tal quale e quella della proteina adsorbita raggiungono un plateau intorno a 7 con valori simili tra 55-60 mV mentre la proteina in soluzione ha un andamento leggermente irregolare, con una stabilizzazione della pendenza che sembra intercorrere da pH 6 verso valori più basici con valori tra 15-20 mV. L'aumento del valore negativo di potenziale ζ è suggerito essere dovuto all'orientamento tridimensionale che la proteina assume una volta legata al substrato¹³⁰, esponendo verso la soluzione regioni cariche negativamente più di quanto non faccia nella forma nativa in soluzione: questa spiegazione è in accordo con quanto discusso prima sulla pendenza delle curve.

Bisogna sempre ricordare che i dati XPS indicano come circa metà della proteina si sia staccata dopo la misura nel range acido. Le considerazioni fatte per l'andamento della curva nei range acido e basico potrebbero perciò non essere del tutto attribuibili alla sola proteina adsorbita, ma anche, in parte, al substrato sottostante.

114



Figura 71: curve di potenziale ζ relative al substrato Ti64 tal quale, dopo adsorbimento di BFN e curva della BFN in soluzione

Nel caso della lega Ti64 (Figura 71) l'irregolarità della curva del substrato nella zona acida è dovuta alla conducibilità del substrato e fenomeni corrosivi sulla superficie: la determinazione di IEP per il solo substrato non può essere precisa e si colloca fra 4 e 4.9. Il IEP della proteina, come già detto, è 4.9, mentre, una volta adsorbita, la proteina mostra IEP intorno a 4.6. Si tratta di differenze minime, vicine al limite di significatività della misura, che però potrebbero far pensare che la proteina adsorbita abbia un IEP leggermente più acido di quella in soluzione, analogamente a quanto visto prima. Nella parte acida la proteina adsorbita raggiunge un plateau intorno a 3,5 come per la proteina in soluzione, ma quella adsorbita ha valori di circa 45 mV mentre la proteina in soluzione di 20 mV. Nella parte basica i valori di potenziale ζ sono negativi per tutte e tre le curve, con la proteina in soluzione che risulta debolmente negativa, quella adsorbita che dà valori più negativi e il substrato tal quale che ha valori ancor più negativi.

Dai dati XPS circa un terzo della proteina si stacca dal substrato dopo la misura acida. Anche in questo caso quindi il fatto che si vada incontro al distacco della proteina potrebbe significare che l'andamento della curva di potenziale per la proteina adsorbita nei range acidi e basici sia attribuibile, in parte, al substrato sottostante.



Figura 72: curve di potenziale ζ relative al substrato Ti64CT tal quale, dopo adsorbimento di BFN e curva della BFN in soluzione

La curva del Ti64CT in Figura 72 risulta negativa in tutto il range della misura. Questo è dovuto alla alta concentrazione di gruppi OH superficiali e al loro comportamento acido¹²². Il plateau che si ha nella parte basica, da valori di pH di circa 5.2 a salire, indica che a pH di 7.4, al quale è stato effettuato l'adsorbimento proteico questi gruppi OH della superficie risultano nella forma deprotonata e apportano carica globalmente negativa alla superficie con valore intorno a -34 mV.

Una volta adsorbita la proteina, il IEP sale da meno di 3, per il substrato tal quale, a circa 4.3, vicino a quello della proteina in soluzione, misurato intorno a 4.8; rispetto a quanto osservato prima sugli altri substrati, il cambiamento del punto isoelettrico è più marcato.

Le deviazioni standard contenute della curva della proteina adsorbita in tutto il range della misura, e i dati XPS successivi alla misura del potenziale ζ , suggeriscono come l'adsorbimento possa essere caratterizzato dalla stabilità della proteina legata al substrato.

La comparsa di un plateau, per la curva della proteina adsorbita, nella regione basica, a valori di pH circa 5, rispetto a quella in soluzione, dove avviene per valori intorno a 6, indica come questa possa andare incontro a cambiamenti conformazionali. Infatti, tale dato è influenzato dalla pKa dei residui carbossilici il cui valore, a sua volta, è influenzato dall'intorno chimico degli amminoacidi stessi all'interno della struttura della proteina ¹³¹. È stato osservato come una diversa disposizione spaziale degli amminoacidi della fibronectina porti ad un cambiamento del valore di pKa dei residui carbossilici¹³².

La pendenza della curva della proteina adsorbita, nel range acido, è maggiore rispetto a quella del substrato tal quale e non dissimile dalle curve precedenti; in questo caso, la misura di angolo di contatto con acqua evidenzia effettivamente una maggiore idrofobicità della superficie dopo adsorbimento: vale, a questo proposito, quanto discusso prima e la difficoltà di confrontare, dal punto di vista della bagnabilità, una superficie del tutto inorganica e che presenta un solo gruppo funzionale (prima dell'adsorbimento) con una che ha adsorbito una molecola organica complessa e presenta diversi gruppi funzionali.

Sia il substrato che la proteina hanno carica superficiale netta negativa a pH 7.4, corrispondente a quello dell'adsorbimento. Questo suggerisce come il processo di adsorbimento sia guidato da interazioni elettrostatiche tra gruppi carichi positivamente come NH³⁺ (sulla proteina) e gruppi OH dissociati (sulla superficie), che portano poi ad orientare i gruppi COOH/COO⁻ della proteina verso la soluzione.



Figura 73: curve di potenziale ζ dei substrati dopo adsorbimento BFN e della BFN in soluzione

I grafici in Figura 73 mostrano le curve ottenute dai substrati dopo l'adsorbimento di fibronectina e la curva della proteina in soluzione. Dal confronto qui proposto, si evince come la tipologia di substrato influenzi il layer di proteina adsorbita che si forma. Il IEP delle curve dopo l'adsorbimento si attesta a valori di pH che vanno da 4.3 a 4.6, avvicinandosi, senza però coincidere, con quello della proteina in

soluzione misurato intorno a 4.8. La curva sul Ti64CT ha valori di deviazioni standard relativi alla misura più contenuti rispetto agli adsorbimenti sugli altri substrati, indicando stabilità della proteina adsorbita, come rilevato anche dall'indagine XPS che indica come la proteina non si stacchi durante la misura di potenziale ζ in modo da poter compromettere la copertura superficiale, cosa che accade per il TiCP e Ti64. Le curve su TiCP e Ti6Al4V dopo adsorbimento sostanzialmente coincidono, mentre la curva di Ti64CT risulta peculiare sia per IEP, sia per onset del plateu in campo basico: si può ipotizzare che questo derivi da una marcata differenza di organizzazione spaziale e conformazione della proteina.

Per studiare la conformazione della proteina adsorbita si sono usate anche tecniche di spettroscopia Raman e FTIR che potessero individuare la presenza di specifici legami chimici, caratteristici di strutture secondarie della proteina. In uno studio precedente sulla BSA, la deconvoluzione dello spettro ottenuto dalle misure SERS e ATR-FTIR ha permesso di stabilire con precisione il contributo derivante da particolari strutture secondarie, come α eliche, rispetto ad altre, come foglietti β . Si è cercato di effettuare lo stesso lavoro per l'adsorbimento di fibronectina, ma gli spettri sono risultati meno definiti per le basse concentrazioni di proteina rispetto al caso dell'albumina (la concentrazione della fibronectina usata è cento volte inferiore rispetto a quella usata per l'albumina, così come, per altro, avviene nel plasma sanguigno), rendendo incerta la deconvoluzione per l'attribuzione dei picchi alle diverse strutture secondarie. Nei risultati ottenuti è stato comunque possibile individuare la presenza di specifici legami, riconducibili alla proteina adsorbita in superficie. La tecnica SERS permette di amplificare il segnale Raman della proteina raccolto dalla superficie indagata. Questo è stato necessario in virtù della bassa concentrazione di proteina usata per l'adsorbimento. Si sono quindi depositate sul substrato delle nanoparticelle d'argento. In questo modo, è possibile creare una superficie plasmonicamente attiva che, se colpita da una sorgente laser alla giusta lunghezza d'onda, è in grado di creare un campo elettrico che, se nelle vicinanze della proteina, amplifica il segnale Raman della fibronectina e permette di acquisire lo spettro.



Figura 74: spettri SERS relativi al TiCP e Ti64 dopo adsorbimento di fibronectina e deposito di una sospensione di nanoparticelle d'argento

In Figura 74 è rappresentato lo spettro SERS ottenuto per i substrati TiCP e Ti64 conseguentemente l'adsorbimento. Dalla letteratura la banda dell'ammide I è ricercata per affermare la presenza di proteina, ed a questa vengono assegnati diversi valori a seconda della particolare struttura secondaria che assume. Ad esempio 1653 cm⁻¹ (random coil)¹³³, 1659 cm⁻¹ (α eliche)¹³⁴, 1666 cm⁻¹ (foglietti β)¹³⁵, 1673 cm⁻¹ (foglietti β)¹³⁴. In Figura 74, il picco a 1678 cm⁻¹ è attribuibile all'ammide I, questo valore in particolare alle strutture foglietti β caratteristiche della fibronectina^{79,134}. Il picco a 1604 cm⁻¹ è riconducibile alla presenza di fenilalanina e tirosina (vibrazione di stretching C=C aromatici)^{79,133,134}. Il picco a 1457 cm⁻¹ viene riportato come caratteristico delle deformazione dei gruppi CH2/CH3^{79,133,134,136,137}, significativo della presenza di molecole organiche sulla superficie di entrambi i campioni. Nella zona intorno a 2900 cm⁻¹ dello spettro un picco dovuto alla vibrazione per lo stretching del legame C-H delle catene laterali alifatiche (banda riferimento 2860-2940 cm⁻¹)¹³⁴ anche questo indicativo della presenza di materiale organico. Da questi spettri si può quindi concludere come la fibronectina sia stata adsorbita sulle superfici e tramite questa tecnica sia possibile individuarla, a causa di picchi che compaiono nello spettro caratteristici di legami chimici presenti nella fibronectina.



Figura 75: spettri SERS relativi al Ti64CT prima e dopo adsorbimento di fibronectina. Nel caso della curva dopo adsorbimento proteico

In Figura 75 viene riportato lo spettro SERS ottenuto per il Ti64CT prima e dopo adsorbimento di BFN. I picchi evidenziati possono essere attribuiti proprio alla banda dell'ammide I per quanto riguarda il valore 1663 cm⁻¹ (stretching del legame C=O)¹³⁶ e 1626 cm^{-1 137}, confermando la presenza di proteina in superficie.

Nella regione spettrale tra 1200 e 1700 cm⁻¹ si possono individuare due bande molto allargate. Esse sono dovute ad effetti fisici interferenti dovuti alla sorgente laser scelta con frequenza di 532 nm che eccita eccessivamente le proteine e determina l'autofluorescenza del film proteico depositato con l'adsorbimento. Il fatto che le bande caratteristiche dell'ammide I cadano proprio in questa regione supporta tale ipotesi, come è possibile notare dal riquadro in evidenza nel grafico dove sono evidenziati i picchi a 1663 cm⁻¹ e 1626 cm⁻¹, riconducibili alla banda ammide I della proteina. Nella zona intorno a 2900 cm⁻¹ 1 dello spettro un picco dovuto alla vibrazione per lo stretching del legame C-H delle catene laterali alifatiche (banda riferimento 2860-2940cm⁻¹)¹³⁴ è indicativo della presenza di materiale organico sulla superficie. I picchi a 2100 cm⁻¹ e 200 cm⁻¹ sono invece relativi alla presenza delle particelle d'argento usate per creare una superficie plasmonicamente attiva.

Il risultato ottenuto dalla SERS conferma quindi la presenza di fibronectina sui substrati, indicata dai picchi relativi a legami chimici caratteristici della proteina che sono stati riscontrati sulle superfici conseguentemente all'adsorbimento. Purtroppo, la quantità ridotta di proteina sulla superficie non ha permesso di approfondire lo studio della conformazione assunta dalla proteina adsorbita tramite la deconvoluzione degli spettri. Come spiegato in precedenza questa tecnica ha dato risultati

soddisfacenti in uno studio sull'albumina, la quale però è stata utilizzata con concentrazioni cento volte maggiori.

Un'altra tecnica in grado di discriminare la presenza di fibronectina grazie all'acquisizione di uno spettro caratteristico dei legami chimici presenti nell'area esaminata è ATR-FTIR.



Figura 76: spettri ATR-FTIR relativi ai substrati TiCP e Ti64 dopo adsorbimento di BFN

Negli spettri in Figura 76 relativi all'adsorbimento su Ti64 (linea rossa) e TiCP (linea rosa) non è possibile riuscire ad individuare un picco che possa essere riconducibile alla presenza della proteina. Probabilmente la concentrazione usata durante l'adsorbimento di FN [0.2 mg/ml] è insufficiente per poterla rilevare con questa tecnica. Nel caso del CT (pur avendo attuato lo stesso protocollo di adsorbimento) la quantità di proteina adsorbita è maggiore, come suggerito dalla quantifica in fluorescenza, permettendone la rilevazione.



Figura 77: spettro ATR-FTIR del Ti64CT prima e dopo adsorbimento di BFN

In Figura 77 sono riportati gli spettri relativi alla misura su Ti64CT con e senza adsorbimento di fibronectina tramite la tecnica ATR-FTIR. Da letteratura la banda caratteristica dell'ammide I si trova tra 1610 e 1700 cm⁻¹ mentre per l'ammide II tra 1530-1550 cm^{-1 138-144}. Per la fibronectina il valore 1630 cm⁻¹ è indicativo di strutture β -sheet^{138,140,141}.

La forma dello spettro, in particolare di quello in assenza di BFN, con due picchi a 1430 e 1615 cm⁻¹ è molto simile a quella dovuta ai gruppi OH legati in superficie allo strato di ossido di titanio¹⁴⁵. Il fatto che dopo l'adsorbimento uno dei picchi scompaia e rimanga quello intorno a 1630 cm⁻¹ potrebbe confermare che il contributo sia dato dalla BFN e non più dai gruppi OH legati alla superficie. In realtà la natura degli OH che danno contributo a 1430 cm⁻¹ è diversa da quella degli OH che danno contributo a 1630 cm⁻¹ e diversa da quella degli OH che danno contributo a 1630 cm⁻¹ è diversa da quella degli OH che danno contributo a 1630 cm⁻¹ da 1615 cm⁻¹ senza proteina a 1630 cm⁻¹ con la proteina è dovuto alla somma del contributo del picco dell'amide I della proteina e degli OH in superficie.

Nell'ingrandimento in Figura 77 viene riportato lo spettro circa tra 1300-1700 cm⁻¹. Nella linea rossa (indicante adsorbimento di fibronectina) un picco a 1550 cm⁻¹ che non si nota per la linea verde (substrato tal quale) è caratteristico dell'ammide II^{138–140,142–144}. Il picco indicato a 1518 cm⁻¹ visibile solo sul substrato con proteina è caratteristico dell'amminoacido tirosina¹⁴⁶. Dallo spettro acquisito è quindi possibile stabilire come i picchi ottenuti per il campione sottoposto all'adsorbimento siano dovuti alla presenza di fibronectina sulla superficie.

Indicazioni sul tipo di interazione tra la proteina e il substrato possono essere ottenute dalla deconvoluzione dei picchi dello spettro XPS in modalità high resolution. In questo caso la misura XPS ha una risoluzione molto maggiore e permette di stabilire il contributo delle specie atomiche a seconda dei gruppi a cui prendono parte. In particolare, per il picco relativo al C, grazie alla deconvoluzione è stata determinata la presenza dei gruppi C-C, COO⁻ e CN, mentre per il picco relativo a N sono stati trovati contributi relativi ai gruppi NH₂, NH₃⁺ e CN. In questo modo è possibile stabilire quali sono i gruppi funzionali presenti maggiormente nella proteina e che questa viene adsorbita sulla superficie in forma ionica.

In Tabella 4 sono riportati i valori energetici (eV) dei picchi relativi ai gruppi chimici C-C, COO⁻, C-N, NH₂, NH₃⁺, CN, confrontati con i valori di riferimento da letteratura.

	С-С	C-N	CO0 ⁻	CN	NH_2	NH_3^+
riferimento	284.80	286-287	288.20	398.80	400.00	401.50
TICP BFN	284.73	286.08	287.91	398.22	399.79	401.44
Ti64 BFN	284.76	286.08	287.97	398.62	399.81	401.00
Ti64CT BFN	284.71	286.06	287.87	398.26	399.77	401.28

Tabella 4: valori energetici (eV) dei picchi relativi ai gruppi chimici sui tre substrati dopo adsorbimento di fibronectina

In Tabella 5 è riportato il rapporto tra la componente percentuale atomica corrispettiva dei vari picchi dello spettro, confrontate con un valore di riferimento della fibronectina¹⁴⁷.

Tabella 5: rapporto tra componente percentuale atomica corrispettiva dei vari picchi dello spettro per i tre substrati dopo adsorbimento di fibronectina

	N/C	N/CN+COO ⁻	CN/COO ⁻	NH3 ⁺ /N
riferimento	0.27	0.48	1.40	
TICP BFN	0.21	0.44	1.03	0.02
Ti64 BFN	0.20	0.38	1.03	0.05
Ti64CT BFN	0.25	0.47	1.07	0.04

Da questi dati è possibile stabilire che la fibronectina sia presente sulla superficie dei substrati, avvicinandosi i valori relativi ai rapporti dei substrati dopo l'adsorbimento a quello della fibronectina di riferimento, in particolare nei rapporti N/C e N/CN+COO⁻ confermando che la proteina è adsorbita chimicamente intatta.

In Figura 78 sono mostrate le deconvoluzioni degli spettri che hanno permesso di identificare i valori dei contributi in Tabella 4.



Figura 78:spettri e deconvoluzioni dei picchi C1s (rosso C-C, blu CN, verde COO-) e N1s (rosso NH2, blu CN, verde NH3+) relativi ai substrati TiCP, Ti64 e Ti64CT dopo adsorbimento di fibronectina

Generalmente il valore del picco relativo a C-C è preso come riferimento e secondo questo valore viene calibrato lo spettro. Questo perché tale legame è molto stabile e non varia a seconda del diverso intorno chimico a cui è soggetto.

Di interesse è il valore del contributo COO⁻ per il picco relativo al C1s. Questo valore energetico per il picco presente in tutti e tre i substrati (287.91 eV per TiCP, 287.68 eV per Ti64, 287.87 eV per Ti64CT), suggerisce un meccanismo di adsorbimento simile, in cui la proteina presenta i gruppi COO- in forma dissociata. Da letteratura infatti, il picco di COO- della fibronectina è riportato a valori più elevati (288.20 eV)148, indicando quindi un effetto dell'interazione della proteina con la superficie sulla chimica dei gruppi carbossilici. Un'ipotesi possibile è l'interazione tra i gruppi COO- e gli OH basici, quindi non deprotonati, dello strato di ossido di titanio, attraverso legami H secondo la reazione 149:

$>Ti-OH + R-COO-+ \rightarrow >Ti-OH - OOC-R$

La presenza di gruppi NH3+ suggerisce che il legame con la proteina possa avvenire anche attraverso legami idrogeno e interazioni elettrostatiche con questi gruppi¹⁴⁹, in particolare, su Ti64CT, ciò è atteso per via degli OH superficiali che hanno natura più acida¹²², e l'adsorbimento potrebbe avvenire secondo la reazione:

 $>Ti_2=O^- + R-NH3^+ \rightarrow >Ti2=O^- +NH3-R$

Nonostante il meccanismo di interazione con i gruppi COO⁻ della fibronectina sia lo stesso per tutti e tre i substrati, la maggior idrossilazione della superficie del Ti64CT, con conseguente maggior densità di gruppi OH, spiega il più elevato risultato in termini quantitativi dell'adsorbimento di fibronectina su questo substrato rispetto a TiCP e Ti64, avendo più siti di legame per le proteine.

6.2. Competizione nell'adsorbimento di fibronectina e albumina

L'adsorbimento proteico in vivo è determinato dalla presenza di più specie di proteine nei fluidi biologici. Nello studio effettuato si è scelto di far competere la fibronectina con l'albumina, che si sa essere la proteina più abbondante del plasma sanguigno. Nell'adsorbimento proteico da soluzioni multicomponente inizialmente le proteine di dimensione minore raggiungono per prime il substrato a causa di una maggiore diffusività e adsorbono sulla superficie. È il caso, ad esempio, dell'albumina nei confronti della fibronectina, che ha dimensioni maggiori. Successivamente però, maggiori affinità di una proteina che può arrivare sulla superficie in un secondo momento possono portare al desorbimento della prima proteina adsorbita e graduale sostituzione con quella a maggiore affinità ¹⁵⁰. In questo studio si è voluto indagare l'effetto di un pre-adsorbimento di albumina o fibronectina sull'adsorbimento dell'altra proteina e l'adsorbimento contemporaneo da una soluzione che le contenesse entrambe, alle concentrazioni sempre usate nel lavoro di 20 mg/mL per l'albumina e 0.2 mg/mL per la fibronectina.

Sono state utilizzate le tecniche di misura del potenziale ζ di superficie per indagare le interazioni del layer proteico formatosi con la superficie e la quantifica in fluorescenza ha permesso di rilevare la presenza di entrambe le specie proteiche per i vari adsorbimenti effettuati, e quale dei tre substrati ne adsorbisse in quantità maggiori. Osservazioni di microscopia in fluorescenza hanno permesso poi di indagare se la competizione tra le proteine modificasse la capacità della fibronectina di essere adsorbita rispetto a quanto trovato per l'adsorbimento di singola proteina.

6.2.1. Adsorbimento di albumina

Di seguito vengono riportati i grafici relativi al potenziale ζ dei substrati conseguentemente all'adsorbimento di albumina, per avere un riferimento in più nell'interpretazione successiva delle curve di potenziale ζ relative agli adsorbimenti sequenziali e contemporaneo delle due proteine.



Figura 79: curve di potenziale ζ relative al substrato TiCP tal quale, dopo adsorbimento di BSA (TiCP BSA) e curva della BSA in soluzione

In questo caso l'adsorbimento di albumina è stato effettuato su titanio puro. Come si vede dal grafico in Figura 79, il punto isoelettrico del substrato tal quale è intorno al pH 4.1. Quello del substrato dopo l'adsorbimento proteico si attesta intorno a 4.8, molto vicino al valore misurato per la proteina in soluzione intorno a 4.7. La pendenza della curva della proteina adsorbita è maggiore rispetto a quella del substrato tal quale, analogamente a quanto visto per la fibronectina. Anche in questo caso, come per la fibronectina, l'aumento delle deviazioni standard nel range acido possono essere riconducibili al distacco della proteina che porta la curva ad avere un andamento non rappresentativo della sola proteina adsorbita sulla superficie, ma anche del substrato sottostante.



Figura 80: curve di potenziale ζ relative al substrato Ti64 tal quale, dopo adsorbimento di BSA (Ti64 BSA) e curva della BSA in soluzione

In Figura 80 è riportato il grafico del potenziale ζ relativo all'adsorbimento di BSA su Ti64. Questo substrato crea problemi nella misura di potenziale in campo acido e nell'intorno di IEP, come detto in precedenza, per la conducibilità del metallo e le reazioni di corrosione che si verificano durante la misura. È stato verificato come la proteina tenda a staccarsi dal substrato durante la misura del potenziale, come era suggerito dall'alto valore delle deviazioni standard nel range di pH acido inferiore a 5. La presenza di proteina adsorbita modifica la curva ottenuta rispetto a quella del substrato tal quale, indicando che la superficie ha diversa natura a seguito dell'adsorbimento, ma il distacco della proteina durante la misura non permette di fare considerazioni ulteriori, non potendo essere confidenti del fatto che la curva sia descrittiva della sola proteina adsorbita.



Figura 81: curve di potenziale ζ relative al substrato Ti64CT tal quale, dopo adsorbimento di BSA (Ti64CT BSA) e curva della BSA in soluzione

La curva del potenziale ζ relativa all'adsorbimento di BSA su Ti64CT è riportata in Figura 81. La cosa che si nota molta bene è come il IEP del substrato dopo l'adsorbimento si avvicini a quello della proteina in soluzione. Considerando i valori di deviazione standard della misura (circa 3 mV), il valore del IEP del substrato con la proteina adsorbita e della proteina in soluzione potrebbero essere sovrapponibili. La curva del substrato tal quale cambia profondamente una volta che il processo di adsorbimento ha avuto luogo, e la nuova curva ottenuta con la proteina adsorbita rispecchia maggiormente quella della proteina in soluzione. Nonostante questo, i plateaux della parte acida e basica differiscono per la curva relativa alla proteina adsorbita e quella della proteina in soluzione. In particolare, nella parte acida la proteina adsorbita non dà un plateau come quella in soluzione intorno a pH 3. Nella parte basica, invece, il plateau della proteina adsorbita ha onset a valori di pH più bassi rispetto a quella in soluzione (a valori di pH intorno a 5.3). Come detto nell'analisi dell'adsorbimento di fibronectina su questo substrato, questo suggerisce come la proteina vada incontro a cambiamenti conformazionali una volta adsorbita, in quanto la modifica dei plateaux è dovuta a cambiamenti nelle pKa dei residui carbossilici dovuti a nuove disposizioni spaziali degli amminoacidi.



Figura 82: curve di potenziale ζ dei substrati dopo adsorbimento di BSA e della BSA in soluzione

Le curve in Figura 82 sono relative ai substrati dopo l'adsorbimento di albumina e alla proteina in soluzione. Come visto dai grafici in precedenza, le curve delle proteine adsorbite differiscono da quelle dei substrati tal quali indicando la presenza di proteina adsorbita. Dal confronto qui proposto, si evince come la tipologia di substrato influenzi il layer di proteina adsorbita che si forma. Il IEP delle curve dopo l'adsorbimento si attesta a valori di pH che vanno da 4.5 a 5, avvicinandosi a quello della proteina misurato intorno a 4.6. la curva che più segue quella della proteina in soluzione è quella relativa all'adsorbimento sul Ti64CT, il quale ha anche valori di deviazioni standard relativi alla misura più contenuti rispetto agli adsorbimenti sugli altri substrati, indicando stabilità dell'adsorbimento.



Figura 83: grafici di potenziale ζ relativi ai tre substrati prima e dopo adsorbimento di albumina (colonna sinistra), fibronectina (colonna centrale) e confronto tra substrato tal quale e dopo adsorbimento di albumina e fibronectina (colonna destra)

Nei grafici in Figura 83 sono riportati gli adsorbimenti di albumina, fibronectina e il confronto tra i due adsorbimenti relativamente al substrato tal quale. Quel che deve apparire da uno sguardo d'insieme è come grazie alla misura del potenziale ζ sia possibile discriminare la presenza di proteina sulla superficie a seguito del processo di adsorbimento, che in generale modifica il punto isoelettrico della superficie e la forma della curva ottenuta rispetto a quella del substrato tal quale. Inoltre, grazie ai dati relativi alla misura XPS dopo il potenziale ζ , si possono ricondurre gli aumenti del valore delle deviazioni standard della misura di potenziale ζ nel campo acido a reazioni che portano al distacco della proteina adsorbita dalla superficie. In questo senso, a dare i migliori risultati con deviazioni standard più contenute nelle misure, è l'adsorbimento che avviene sul substrato Ti64CT, indicando una maggiore stabilità del processo nel confronto con gli altri due substrati.

6.2.2. Adsorbimento competitivo



Figura 84: curve di potenziale ζ relative al substrato TiCP dopo gli adsorbimenti da soluzioni singola proteina, adsorbimenti sequenziali e contemporaneo; le deviazioni standard delle misure sono riportate nel grafico in basso. Gli adsorbimenti sono indicati come: prima fibronectina poi albumina BFN-BSA; prima albumina poi fibronectina BSA-BFN; adsorbimento contemporaneo BSA+BFN, adsorbimento di fibronectina BFN, adsorbimento di albumina BSA.

Nel grafico in Figura 84 sono riportati gli adsorbimenti effettuati su TiCP. Gli adsorbimenti sequenziali sono indicati sul grafico come segue: prima fibronectina poi albumina BFN-BSA; prima albumina poi fibronectina BSA-BFN; adsorbimento contemporaneo BSA+BFN. Per confronto sono riportati anche gli adsorbimenti di fibronectina (indicato con BFN in legenda) e albumina (BSA). Nei grafici successivi gli indici utilizzati rispecchiano sempre questo schema.

Per prima cosa si osserva che le curve relative a BSA e FBN sono molto simili, ma si discostano per IEP. Nell'interpretazione dei dati, quindi, ci si concentrerà sulla posizione del IEP per evidenziare analogie e differenze. Dato il numero di gruppi funzionali presenti e le forti similitudini fra le due proteine, risulta poco fondato fare altre considerazioni.

Si evidenzia l'elevata deviazione standard della maggior parte delle curve intorno a pH 4.

Dal grafico si nota come l'IEP delle curve degli adsorbimenti sequenziali siano vicini ai valori degli adsorbimenti effettuati con la prima proteina. Quindi l'IEP dell'adsorbimento sequenziale prima fibronectina poi albumina è più vicino a quello dell'adsorbimento relativo alla fibronectina, mentre l'IEP dell'adsorbimento sequenziale prima albumina poi fibronectina è più vicino a quello dell'adsorbimento relativo all'albumina. Il coadsorbimento ha un IEP intermedio e risulta difficile individuare un andamento delle curve degli altri adsorbimenti che lo rispecchi in maniera più precisa rispetto ad un'altra. Questo potrebbe indicare come la prima proteina adsorbita inibisca l'adsorbimento della seconda negli adsorbimenti sequenziali, mentre per l'adsorbimento contemporaneo il layer che si forma è frutto della presenza di entrambe le proteine, il che fornisce una curva con caratteristiche intermedie relative al contributo sia di albumina che di fibronectina.



Figura 85: curve di potenziale ζ relative al substrato Ti64 dopo gli adsorbimenti da soluzioni singola proteina, adsorbimenti sequenziali e contemporaneo; le deviazioni standard delle misure sono riportate nel grafico in basso. Gli adsorbimenti sono indicati come: prima fibronectina poi albumina BFN-BSA; prima albumina poi fibronectina BSA-BFN; adsorbimento contemporaneo BSA+BFN, adsorbimento di fibronectina BFN, adsorbimento di albumina BSA.

Nel grafico in Figura 85 sono riportati gli adsorbimenti effettuati su Ti64: anche in questo caso spiccano le elevate deviazioni standard nel range acido. Anche da questo grafico si nota come l'IEP delle curve degli adsorbimenti sequenziali siano vicini ai valori degli adsorbimenti effettuati con la prima proteina. Quindi l'IEP dell'adsorbimento sequenziale prima fibronectina poi albumina è più vicino a quello dell'adsorbimento relativo alla fibronectina, mentre l'IEP dell'adsorbimento sequenziale prima albumina poi fibronectina è più vicino a quello dell'adsorbimento relativo all'albumina. Il coadsorbimento ha un IEP intermedio rispetto alle altre curve e considerando la vicinanza delle curve e le deviazioni standard è difficile anche in questo caso avanzare ulteriori ipotesi. Come per il substrato precedente, l'adsorbimento di una proteina sembra scoraggiare il successivo adsorbimento negli esperimenti sequenziali, e il coadsorbimento fornisce una curva che può essere interpretata dal contributo di entrambe le proteine nella composizione del layer adsorbito.



Ti64CT

Figura 86: curve di potenziale ζ relative al substrato Ti64CT dopo gli adsorbimenti da soluzioni singola proteina, adsorbimenti sequenziali e contemporaneo; le deviazioni standard delle misure sono riportate nel grafico in basso. Gli adsorbimenti sono indicati come: prima fibronectina poi albumina BFN-BSA; prima albumina poi fibronectina BSA-BFN; adsorbimento contemporaneo BSA+BFN, adsorbimento di fibronectina BFN, adsorbimento di albumina BSA.

Nel grafico in Figura 86 sono riportati gli adsorbimenti effettuati su Ti64CT: si nota che le deviazioni standard sono complessivamente molto inferiori rispetto alle precedenti. In questo caso i vari IEP delle curve di adsorbimento sequenziale e di adsorbimento delle singole proteine sono molto vicini tra loro.

Il valore di IEP del coadsorbimento invece si discosta più da tutti gli altri. La pendenza della curva del coadsorbimento è maggiore rispetto alle altre, e questo potrebbe suggerire un'idrofobicità maggiore che, in effetti, è stata riscontrata dalle misure di angolo di contatto. Allo stesso tempo le deviazioni standard della misura aumentano in corrispondenza del tratto in cui la curva si discosta da quella degli altri adsorbimenti il che potrebbe spiegare il diverso andamento della curva riscontrato rispetto alle altre. Questo substrato è quello in grado di adsorbire un maggior quantitativo di proteina (sia BSA sia BFN), e le curve dei vari adsorbimenti sono molto simili tra loro, suggerendo un meccanismo di interazione simile sia per la fibronectina che per l'albumina.

La somiglianza delle curve di adsorbimento sequenziale prima fibronectina poi albumina con quelle di adsorbimento della fibronectina è giustificata dall'osservazione in letteratura che l'albumina adsorbita su fibronectina preadsorbita si lega poco e debolmente¹⁵¹. Allo stesso modo le curve di adsorbimento sequenziale prima albumina poi fibronectina si somigliano con quelle dell'adsorbimento di albumina. Questo potrebbe essere dato dall'elevata concentrazione dell'albumina rispetto alla fibronectina, la quale pur adsorbendo non riesce a competere con il quantitativo di albumina adsorbita in superficie precedentemente¹⁵². In generale dalle curve ottenute si evidenzia come la prima proteina adsorbita tenda a scoraggiare la seconda nel processo di adsorbimento degli esperimenti sequenziali. Per i coadsorbimenti invece probabilmente entrambe le proteine entrano nella formazione del layer proteico e forniscono caratteristiche intermedie al risultato della misura, se confrontato con gli altri adsorbimenti.

Successivamente vengono mostrate le immagini acquisite da microscopia in fluorescenza relativamente agli adsorbimenti sequenziali e contemporaneo. In questo caso si è cercato di individuare come le proteine si disponessero sulla superficie dei substrati, se la copertura fosse più o meno uniforme, e l'eventuale formazione di aggregati come era stato osservato per la fibronectina nell'adsorbimento da singola proteina. Per gli adsorbimenti sequenziali e contemporaneo sono stati usati due diversi fluorofori legati alle proteine. In questo modo l'albumina poteva essere osservata nel canale corrispondente al colore verde mentre la fibronectina al rosso.

Queste immagini riflettono ciò che è stato osservato per l'adsorbimento da singola proteina per quanto riguarda la fibronectina. Sul substrato Ti64CT (da Figura 93 a Figura 95) è presente segnale di colore verde (indicante l'albumina marcata) e rosso (indicante la fibronectina marcata) in maniera omogenea rispetto ai substrati TiCP e Ti64. Su questi ultimi due substrati è possibile individuare più frequentemente la fibronectina negli aggregati già osservati per l'adsorbimento da singola proteina, come globuli e filamenti, per tutti i tipi di adsorbimento effettuati (da Figura 87 a Figura 92). Nonostante i fluorofori con cui sono state marcate le proteine diano emissione in zone diverse dello spettro, in concomitanza di grandi agglomerati proteici è stata verifica la presenza di un segnale interferente da parte della fibronectina nel canale del verde, relativo all'albumina.



Figura 87: immagine da microscopia in fluorescenza 200x. Substrato TiCP dopo adsorbimento sequenziale prima BSA poi BFN. Ingrandimento 200x. A – immagine da normale ottica, B – immagine da sovrapposizione di tutti i canali, C – immagine dal canale di riferimento per la BFN marcata (rosso), D – immagine dal canale di riferimento per la BSA marcata (verde)



Figura 88 : immagine da microscopia in fluorescenza 200x. Substrato TiCP dopo adsorbimento sequenziale prima BFN poi BSA. Ingrandimento 200x. A – immagine da normale ottica, B – immagine da sovrapposizione di tutti i canali, C – immagine dal canale di riferimento per la BFN marcata (rosso), D – immagine dal canale di riferimento per la BSA marcata (verde)



Figura 89: immagine da microscopia in fluorescenza 200x. Substrato TiCP dopo adsorbimento contemporaneo BSA e BFN. Ingrandimento 200x. A – immagine da normale ottica, B – immagine da sovrapposizione di tutti i canali, C – immagine dal canale di riferimento per la BFN marcata (rosso), D – immagine dal canale di riferimento per la BSA marcata (verde)



Figura 90: immagine da microscopia in fluorescenza 200x. Substrato Ti64 dopo adsorbimento sequenziale prima BSA poi BFN. Ingrandimento 200x. A – immagine da normale ottica, B – immagine da sovrapposizione di tutti i canali, C – immagine dal canale di riferimento per la BFN marcata (rosso), D – immagine dal canale di riferimento per la BSA marcata (verde)


Figura 91: immagine da microscopia in fluorescenza 200x. Substrato Ti64 dopo adsorbimento sequenziale prima BFN poi BSA. Ingrandimento 200x. A – immagine da normale ottica, B – immagine da sovrapposizione di tutti i canali, C – immagine dal canale di riferimento per la BFN marcata (rosso), D – immagine dal canale di riferimento per la BSA marcata (verde)



Figura 92: immagine da microscopia in fluorescenza 200x. Substrato Ti64 dopo adsorbimento contemporaneo BSA e BFN. Ingrandimento 200x. A – immagine da normale ottica, B – immagine da sovrapposizione di tutti i canali, C – immagine dal canale di riferimento per la BFN marcata (rosso), D – immagine dal canale di riferimento per la BSA marcata (verde)



Figura 93: immagine da microscopia in fluorescenza 200x. Substrato Ti64CT dopo adsorbimento se quenziale prima BSA poi BFN. Ingrandimento 200x. A – immagine da normale ottica, B – immagine da sovrapposizione di tutti i canali, C – immagine dal canale di riferimento per la BFN marcata (rosso), D – immagine dal canale di riferimento per la BSA marcata (verde)



Figura 94: immagine da microscopia in fluorescenza 200x. Substrato Ti64CT dopo adsorbimento sequenziale prima BFN poi BSA. Ingrandimento 200x. A – immagine da normale ottica, B – immagine da sovrapposizione di tutti i canali, C – immagine dal canale di riferimento per la BFN marcata (rosso), D – immagine dal canale di riferimento per la BSA marcata (verde)



Figura 95: immagine da microscopia in fluorescenza 200x. Substrato Ti64CT dopo adsorbimento contemporaneo BSA e BFN. Ingrandimento 200x. A – immagine da normale ottica, B – immagine da sovrapposizione di tutti i canali, C – immagine dal canale di riferimento per la BFN marcata (rosso), D – immagine dal canale di riferimento per la BSA marcata (verde)

Per avere un'idea più precisa della quantità di proteina adsorbita dai substrati è stata effettuata la quantifica in fluorescenza come operato per l'adsorbimento di sola fibronectina. Il risultato relativo agli adsorbimenti sequenziali nel canale di osservazione dell'albumina marcata è fornito in Figura 96, mentre quello relativo agli adsorbimenti sequenziali nel canale di osservazione della fibronectina marcata è fornito in Figura 97.







Figura 97: grafico relativo all'intensità del segnale acquisito tramite lo strumento chemidoc per la quantifica di proteina adsorbita, canale della BFN, adsorbimenti sequenziai per i tre substrati (blu BFN poi BSA, arancione BSA poi BFN)

La prima considerazione che si può fare riguardo questi grafici è che il Ti64CT fornisce di gran lunga il segnale maggiore. Questo è ancora una volta indicativo di maggior quantitativo di proteina adsorbita in superficie. In secondo luogo, facendo riferimento al test dell'Anova effettuato, risultano significative le differenze relative agli adsorbimenti sul substrato Ti64CT. L'adsorbimento della prima proteina influenza il successivo adsorbimento della seconda, sia per l'albumina che per la fibronectina, nonostante la differenza di concentrazione molto elevata tra le due. Relativamente al Ti64CT, la prima proteina adsorbita è sempre presente in concentrazioni più elevate sulla superficie, confermando le ipotesi fatte dai grafici del potenziale zeta. Per gli altri substrati, il risultato non è abbastanza significativo per fare altre considerazioni.

Per quanto riguarda l'adsorbimento contemporaneo non è stato possibile quantificare un segnale che si possa ritenere specifico per la BFN, probabilmente a causa della presenza a basse concentrazioni rispetto alla BSA.

6.3. Angolo di contatto

Al fine di caratterizzare nella maniera più ampia possibile l'adsorbimento proteico sui substrati studiati, sono state eseguite delle misure di angolo di contatto per mezzo di deposizione di una goccia d'acqua. In questo modo è stato possibile valutare la natura più o meno idrofobica delle superfici tal quali e a seguito dei vari processi di adsorbimento proteico. In Tabella 6 sono riportati i dati di angolo di contatto per le misure effettuate, mentre in Figura 98 il dato è riportato graficato per ogni substrato e adsorbimento proteico. È stato anche effettuato il test dell'anova per verificare quali misure potessero essere considerate significative. Il risultato di tale test è mostrato in Figura 99.

rubellu 0. Illisule ul uligolo ul contutto	Tabella	6:	misure	di	angolo a	li	contatto
--	---------	----	--------	----	----------	----	----------

	Θ	st dev V
TiCP	49,18	3,61
TiCP BFN	25,39	13,54
TICP BSA	16,46	9,13
TICP BFN-BSA	14,13	0,56
TICP BSA-BFN	25,48	9,10
TiCP BSA+BFN	48,38	4,61
Ti64	53,46	2,68
Ti64 BFN	9,17	7,40
Ti64 BSA	19,78	5,58
Ti64 BFN-BSA	9,30	6,66
Ti64 BSA-BFN	38,75	6,78
Ti64 BFN+BSA	51,97	5,29
Ti64CT	28,39	4,23
Ti64CT BFN	35,97	1,72
Ti64CT BSA	0,00	0,00
Ti64CT BFN-BSA	17,66	14,05
Ti64CT BSA-BFN	24,80	16,06
Ti64CT BSA+BFN	63,87	9,01



Figura 98: grafico relativo alla misura di angolo di contatto per i tre substrati tal quali e per ogni adsorbimento proteico effettuato



Figura 99: risultato del test dell'anova effettuato: * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001; **** p < 0.001

In letteratura superfici di materiali rivestite di albumina riportano angoli di contatto di 55° per titanio⁸⁶, 50° per substrati polimerici¹⁵³, 50° per superfici in ossido di titanio¹⁵⁴, 60° su vetro¹⁵⁵. La fibronectina ha valori simili, 55° su titanio⁷⁷, e sul polistirene è stato riportato un angolo di 40°¹⁵⁶.

I dati ottenuti dalle misure di questo lavoro indicano, attraverso il test Anova, che la presenza di proteina sui substrati sia un fattore statisticamente significativo (p<0,05). In presenza di proteine sulla superficie, il TiCP e il Ti64 sono resi più idrofilici. Per quanto riguarda il Ti64CT, in accordo con il fatto che la superficie risulta piuttosto idrofilica prima dell'adsorbimento, la presenza di fibronectina rende la superficie più idrofobica. La fibronectina adsorbita sul Ti64CT è più idrofobica rispetto a quella adsorbita su Ti64 (p<0,05), questo potrebbe essere dato da un orientamento diverso della proteina favorito dalla diversa tipologia di substrato, con il Ti64CT che risulta essere il substrato più idrofilico e polare prima del processo di adsorbimento. Una volta adsorbita la proteina potrebbe quindi esporre domini idrofobici verso l'esterno. La presenza di albumina rende invece la superficie Ti64CT altamente idrofilica (angolo di contatto nullo): questo fenomeno è di interesse, ma resta ancora da chiarire per quanto riguarda il meccanismo.

I coadsorbimenti portano ad angoli di contatto più elevati rispetto agli altri protocolli di adsorbimento per tutti e tre i substrati, con differenze statisticamente significative (considerando lo stesso tipo di substrato). Per quanto riguarda la lega Ti64, la fibronectina adsorbita da sola risulta significativamente più idrofilica che se non adsorbita successivamente all'albumina (p<0,05). Lo stesso comportamento si ha, sullo stesso substrato, per l'albumina adsorbita successivamente alla fibronectina, nei confronti della fibronectina adsorbita successivamente all'albumina (p<0,05).

Questi dati confermano come l'interazione della proteina con il substrato possa portare a diversi orientamenti che espongono preferenzialmente verso la soluzione domini più o meno idrofobici a seconda delle caratteristiche del substrato su cui la proteina adsorbe (polarità, energia superficiale, carica). Anche la presenza di proteina preadsorbita può portare a questo risultato nei confronti di una seconda proteina che adsorbe sulla superficie: se la prima proteina adsorbita rende il substrato più idrofilico, la seconda proteina, viceversa, si orienterà esponendo all'esterno preferenzialmente domini idrofobici. Questa regola generale (valida ad esempio per Ti64) non emerge sempre chiaramente anche per via delle elevate deviazioni standard che si osservano su alcune misure.

La competizione tra le proteine durante il processo di adsorbimento sembra portare ad una configurazione più idrofobica delle proteine adsorbite al substrato, in particolare nel coadsorbimento sul Ti64CT (essendo questo substrato particolarmente idrofilico) che risulta avere, dopo coadsorbimento, angoli di contatto maggiori rispetto a Ti64 e TiCP dopo lo stesso protocollo di

coadsorbimento (p<0,05). Non si può, poi, escludere che anche l'interazione in soluzione tra specie proteiche differenti influisca sul coadsorbimento.

6.4. Studio di bioattività in vitro

Nello studio di bioattività si è indagata la deposizione di idrossiapatite sul substrato Ti64CT immerso in SBF, o in SBF con BSA alla concentrazione di 20 mg/mL, per mimare l'ambiente fisiologico in vivo. Per questo substrato il meccanismo di bioattività è basato sulla presenza di una carica superficiale negativa fornita dai gruppi OH di natura acida. Inizialmente vi è l'adsorbimento di ioni Ca²⁺ dovuto alla carica negativa superficiale, conseguenza della deprotonazione dei gruppi OH di natura acida a pH fisiologico¹²². Successivamente si verifica l'incorporazione di HPO₄²⁻ e cristallizzazione di idrossiapatite. L'identificazione di ioni Ca²⁺ e PO₄³⁻ sulla superficie indica l'inizio del processo di deposizione di idrossiapatite. Con il tempo si verifica la nucleazione del deposito che cresce in dimensioni sulla superficie del substrato. Il rapporto Ca/P della idrossiapatite che inizialmente si forma è minore rispetto a quello che viene raggiunto quando si definisce matura (1,67)¹⁵⁷.

Tabella 7: percentuali atomiche dei campioni dopo immersione in SBF per 1,3,7,14 giorni (area dell'analisi EDS circa 200x200 μ m). La riga 0 giorni indica il campione di riferimento non sottoposto al soaking

SBF									
	% atomica								
giorni	C	N	0	Al	Р	Са	Ti	V	altri
0	4.95	0	54.65	4.12	0	0.03	35.20	1.05	0
1	6,31	18,68	37,7	3,46	0,14	0,35	32,3	1,07	0
3	5,65	0	55,58	3,62	0,19	0,38	33,23	0,94	0,41
7	3,96	0	55,6	3,83	0,23	0,37	34,82	1,18	0,01
14	8,19	13,98	39,13	3,63	0,14	0,2	33,67	1,05	0,01

Tabella 8: percentuale atomica dei campioni dopo immersione in SBF+BSA per 1,3,7,14 giorni (area dell'analisi EDS circa	
200x200 μm). La riga 0 giorni indica il campione di riferimento non sottoposto al soaking	

SBF+BSA									
	% atomica								
giorni	С	N	0	Al	Р	Са	Ti	V	altri
0	4.95	0	54.65	4.12	0	0.03	35.20	1.05	0
1	7,47	0	55,17	3,42	0	0,24	32,3	0,8	0,6
3	5,66	12,17	44,76	3,59	0,14	0,21	32,46	1,01	0
7	6,09	10,45	45,83	3,55	0,22	0,34	32,4	1,12	0
14	12,73	21,96	30,41	3,44	0,26	0,31	30,01	0,87	0,01

Tabella 9: rapporto Ca/P dei campioni immersi in SBF e SBF+BSA per 1,3,7,14 giorni

	Ca/P				
giorni	SBF	SBF+BSA			
1	2.50	/			
3	2.00	1.5			
7	1.61	1.54			
14	1.43	1.19			

In Tabella 7 e Tabella 8 sono riportati i valori delle percentuali atomiche ottenute dall'EDS su aree di campioni di circa 200x200 μm. Dai dati emerge come la presenza di BSA in SBF limiti il deposito di ioni Ca²⁺ e PO₄³⁻ nei primi tre giorni di immersione, mentre per le immersioni di sette e quattordici giorni i dati sono confrontabili con le immersioni in SBF. Inoltre, l'aumento di C e N sulla superficie dei campioni immersi in SBF+BSA dopo sette e in particolare quattordici giorni rispetto ai campioni immersi in solo SBF potrebbe indicare come venga depositata anche la proteina in superficie. Il rapporto Ca/P riportato in Tabella 9 mostra come dopo sette giorni, sia in SBF che in SBF+BSA, ci si avvicini al rapporto identificativo di deposizione matura di idrossiapatite. Sembra quindi che la proteina inibisca il deposito soprattutto in una fase iniziale, ma che poi il substrato Ti64CT sia comunque in grado di indurre la formazione di idrossiapatite, a distanza di più giorni.



Figura 100: spettro EDS acquisito sul campione di controllo non sottoposto ad immersione in SBF

In Figura 100 è riportato lo spettro EDS ricavato dalla superficie del campione di controllo non sottoposto all'immersione in SBF. È possibile notare come in questo caso le percentuali atomiche dei Ca e P siano prossime allo zero per il Ca (0,03%) e nulle per il P.

Dalle immagini FESEM i campioni sottoposti ad un giorno di incubazione sia in SBF che in SBF+BSA non presentano deposito di idrossiapatite. Quello che è possibile individuare è la struttura tipica dello strato di ossido superficiale del Ti64CT, con la fase β che appare in risalto in quanto corrosa meno della α , e la spugna nanoporosa di ossido che ricopre l'intera superficie (Figura 101).



Figura 101: immagine FESEM 20000x di campione Ti64CT dopo un giorno di immersione in SBF (A) e SBF+BSA(B)

Dopo tre giorni di incubazione, si osservano precipitati dell'ordine di un paio µm sui campioni immersi in SBF, mentre per i campioni immersi in SBF+BSA non è stato riscontrato lo stesso risultato. In Figura 102 viene mostrata l'immagine FESEM del precipitato sul campione immerso in SBF per tre giorni, e il relativo spettro EDS che conferma la deposizione di idrossiapatite, grazie al dato relativo alla percentuale atomica di Ca e P.



Figura 102: immagine FESEM di precipitato di idrossiapatite su campione di Ti64CT dopo tre giorni di immersione in SBF con spettro EDS e percentuale atomica di Ca e P dell'area indicata

Dopo tre giorni di immersione in SBF+BSA sono stati riscontrati precipitati dell'ordine di poche centinaia di nm (Figura 103), quindi di dimensioni più piccole di quelli riscontrati nella immersione in solo SBF. I contenuti percentuali di Ca e P in questo caso sono più bassi rispetto a quelli del deposito formatosi in SBF.



Figura 103: immagine FESEM di precipitato di idrossiapatite su campione di Ti64CT dopo tre giorni di immersione in SBF+BSA con spettro EDS e percentuale atomica di Ca e P dell'area indicata

Dopo sette giorni di immersione in SBF si possono osservare precipitati dell'ordine del µm in numero maggiore sulla superficie (Figura 104). Il rapporto atomico percentuale Ca/P di questi precipitati è di 1.51, non ancora quindi al livello indicato per precipitati di idrossiapatite maturi (1.67). Per i campioni immersi in SBF+BSA, si sono riscontrati precipitati in numero e grandezza minore (Figura 105 e Figura 106).



Figura 104: immagine FESEM di precipitato di idrossiapatite su campione di Ti64CT dopo sette giorni di immersione in SBF con spettro EDS e percentuale atomica di Ca e P dell'area indicata



Figura 105: immagine FESEM di precipitato di idrossiapatite su campione di Ti64CT dopo sette giorni di immersione in SBF+BSA



Figura 106: spettro EDS eseguito su campione Ti64CT dopo sette giorni di immersione in SBF+BSA (area esaminata circa 20x20 μm)

I risultati più interessanti si sono riscontrati per i tempi di immersione di quattordici giorni. Per i campioni sottoposti ad immersione in SBF si sono rilevati agglomerati di idrossiapatite di decine di μm (Figura 107), e formazioni di placche che a seguito di disidratazione si rompono in diverse parti (Figura 108).



Figura 107: depositi di idrossiapatite di diversi µm sui campioni immersi in SBF per quattordici giorni ingrandimento 20000x



Figura 108: immagine FESEM di precipitato di idrossiapatite su campione di Ti64CT dopo quattordici giorni di immersione in SBF con spettro EDS e percentuale atomica di Ca e P dell'area indicata

In Figura 108 è riportata lo spettro EDS della misura effettuata su uno di questi agglomerati che rivela un elevato quantitativo percentuale di Ca e P rispetto alle misure riportate precedentemente. Per i campioni sottoposti ad immersione in SBF+BSA per quattordici giorni, è stata rilevata la presenza di precipitati di diversi µm, come testimoniato dall'immagine in Figura 109.



Figura 109: immagine FESEM di campione dopo immersione di quattordici giorni in SBF+BSA

Su questi campioni è stata anche rilevata la presenza di idrossiapatite con rapporto Ca/P di 1.39, indicando che la formazione di idrossiapatite non ha raggiunto ancora lo stato di maturazione (Figura 110).



Figura 110: spettro EDS e percentuali atomiche di Ca e P rilevate su deposito di idrossiapatite su campione Ti64CT dopo immersione in SBF+BSA per quattordici giorni

Dalle osservazioni sui campioni immersi in SBF e SBF+BSA è emerso come la capacità del Ti64CT di indurre deposito di idrossiapatite si verifica per entrambe le soluzioni utilizzate. Dalle immagini acquisite al FESEM si evince come soprattutto nei primi sette giorni la presenza di albumina sembri influenzare il processo di deposito, con agglomerati in numero maggiore e di dimensioni più grandi sui campioni immersi in sola SBF.

Alcuni studi hanno dimostrato come la presenza di albumina in soluzione (concentrazione di 4 mg/mL) riesca ad inibire la formazione di uno strato di fosfato di calcio su superfici in titanio durante i test di bioattività, nonostante rimanga possibile identificare la presenza di ioni Ca²⁺ e PO₄³⁻ sulla superficie indicando che la deposizione ionica riesce comunque ad avere luogo ^{84,86}. Per il Ti64CT il risultato ottenuto sembra in accordo con questa osservazione soprattutto nei primi giorni di immersione. Per periodi più lunghi però il substrato si è rivelato in grado di indurre il deposito di idrossiapatite in maniera confrontabile sia se immerso in SBF che se immerso in SBF+BSA. A questo proposito bisogna anche tener presente che il test di soaking in SBF (con o senza albumina) risulta sicuramente utile per valutare la bioattività di una superficie, ma non ha la pretesa di simulare la cinetica della precipitazione di idrossiapatite in vivo, dove l'ambiente chimico circostante è sicuramente più complesso.

7. CONCLUSIONI

Lo studio dell'adsorbimento proteico è di primaria importanza nel campo dei biomateriali per la sostituzione ossea. Quando un materiale è impiantato nel corpo ed entra in contatto con i fluidi biologici come il sangue, l'adsorbimento di proteine sulla superficie dell'impianto occorre sin dai primi istanti. Questo processo guida poi l'interazione del materiale con i tessuti del corpo. Il layer proteico che si forma in superficie costituisce, infatti, l'interfaccia informazione che le cellule hanno con l'impianto, le quali sono in grado di legarsi alle proteine tramite specifici recettori di membrana. Per questo, fattori come la quantità di proteina adsorbita, la conformazione che questa assume una volta legata al substrato, la sua distribuzione sulla superficie, sono elementi di primaria importanza per promuovere una risposta efficace da parte dell'organismo al materiale impiantato.

Nello studio proposto in questa tesi, si è indagato l'adsorbimento di fibronectina, proteina di elezione nel guidare l'adesione cellulare grazie alla sequenza RGD che interagisce con le integrine di membrana cellulari. È stato, infatti, dimostrato, in letteratura, come la presenza di questa proteina induca una miglior risposta osteoblastica in materiali utilizzati per impianti ossei^{72,74}. L'adsorbimento di fibronectina è stato valutato anche in competizione con la proteina più abbondante nel plasma umano e con proprietà di antiadesione cellulare, l'albumina. Per cercare di ricreare l'ambiente fisiologico, si sono utilizzate concentrazioni di 0.2 mg/mL per la BFN e di 20 mg/mL per la BSA.

I substrati scelti per questo studio sono a base di titanio. In particolare, TiCP, Ti-6Al-4V e la lega Ti-6Al-4V trattata chimicamente per ottenere uno strato nanoporoso d'ossido superficiale di 200-300 nm in grado di promuovere l'osteointegrazione e ridurre la formazione del biofilm, che porta a reazioni avverse da parte dell'organismo.

Dai risultati ottenuti per la caratterizzazione dell'adsorbimento di BFN è emerso come l'adsorbimento di questa proteina avvenga su tutti e tre i substrati, e in particolare dall'indagine XPS la proteina sembra adsorbire come un layer continuo, superando la soglia del 9% di N indicata come necessaria a formare uno strato continuo sulla superficie¹²¹. Grazie alle misure di quantifica effettuate con le proteine legate a fluorofori in fluorescenza, si è visto che il Ti64CT è capace di adsorbire un maggior quantitativo di proteina, e grazie alle misure XPS delle specie atomiche residue successive alle misure di potenziale ζ è stato possibile dedurre come questa venga adsorbita in maniera più salda su questo substrato rispetto ai substrati TiCP e Ti64. Inoltre, dal confronto tra le immagini di topografia AFM e di potenziale KPFM è emerso come la proteina riesca ad adsorbire sulla superficie Ti64CT formando un layer continuo, mentre sui substrati in TiCP e Ti64 forma con più frequenza degli agglomerati con morfologia di globuli e filamenti; questi aggregati non sono facilmente identificabili sul Ti64CT, nonostante questo substrato adsorba più fibronectina. In letteratura è suggerito un meccanismo di adsorbimento

inizialmente casuale della fibronectina, che successivamente va incontro a fenomeni di coalescenza superficiale dipendenti dalla natura del substrato, la concentrazione proteica in soluzione e il tempo di adsorbimento^{51,127}. Le caratteristiche del Ti64CT, più poroso, idrofilico e con maggior energia superficiale e ricco di gruppi OH di natura acida a pH fisiologico, spiegano la maggior interazione che questo substrato ha con la proteina, soprattutto grazie alla maggior area superficiale e siti di legame con la biomolecola. Probabilmente grazie a questa maggiore affinità la molecola è portata ad adsorbire in maniera più uniforme sulla superficie Ti64CT piuttosto che ad organizzarsi nelle morfologie prima identificate sul TiCP e Ti64.

Le interazioni che la molecola instaura con le superfici sembrano essere guidate dallo stesso meccanismo di reazione dei gruppi COOH/COO⁻ della proteina e OH dello stato di ossido superficiale. Il maggior quantitativo di proteina adsorbita sul Ti64CT potrebbe anche essere frutto del contributo del meccanismo di reazione tra i gruppi NH₃⁺ della proteina e gli OH deprotonati, ipotesi che viene avanzata dopo l'analisi della deconvoluzione dei picchi high resolution XPS, in cui per il Ti64CT si nota un contributo elevato del gruppo NH₃⁺ nel picco di N.

Dalle misure di potenziale ζ è emerso come le maggiori deviazioni standard coincidano con le misure effettuate sui substrati su cui si è appurato il distacco della proteina, quindi TiCP e Ti64, mentre per il Ti64CT le deviazioni standard delle misure effettuate per costruire la curva rimangono più contenute, indicando stabilità nell'adsorbimento. Dopo gli adsorbimenti per tutti e tre i substrati si può comunque evidenziare lo spostamento del punto isoelettrico del substrato tal quale ad un valore più prossimo a quello della proteina in soluzione, indicando che il processo ha avuto luogo. Maggiori considerazioni possono essere fatte per il Ti64CT, su cui si sa che la proteina non va incontro ad un distacco tanto quanto per gli altri substrati, e rimane in quantità tali da ipotizzare la copertura continua della superficie. I plateuax presenti nella curva di potenziale per la proteina in soluzione e quella adsorbita su Ti64CT hanno onset differenti, e questo potrebbe essere indicativo di un cambiamento conformazione nella struttura della proteina. I plateaux nella curva di potenziale ζ si verificano quando i gruppi carbossilici della proteina si trovano tutti nella forma protonata (zona basica) o deprotonata (zona acida) e dipendono dal valore della pKa di questi gruppi. Infatti, una modifica della pKa dei residui carbossilici degli amminoacidi che costituiscono la proteina potrebbe spiegare la diversa forza acida e basica nel complesso della biomolecola, e si sa come questo valore sia influenzato dalla posizione e intorno chimico degli amminoacidi stessi, che quindi potrebbero aver assunto posizioni differenti causando cambiamenti nel valore di pKa e conseguentemente nel valore di onset dei plateaux della curva di potenziale. Su tutti i substrati in studio, inoltre, si registra, dopo adsorbimento della proteina, una maggiore esposizione verso la soluzione dei gruppi COOH della stessa.

Le misure di angolo di contatto evidenziano come l'adsorbimento delle proteine singole su Ti64 e Ti (assimilabili a superfici idrofobiche, senza gruppi funzionali polari) porti ad una orientazione della molecola con esposizione verso l'esterno dei suoi domini idrofilici. Viceversa, l'adsorbimento di fibronectina su Ti64CT (superficie idrofilica con OH acidi) porta ad un'orientazione della molecola con maggiore esposizione dei domini idrofobici verso l'esterno. Per quanto riguarda gli adsorbimenti sequenziali sembra di individuare, in molti casi, la stessa regola generale che mette in relazione l'idrofobicità del substrato con un'orientazione idrofilica della proteina adsorbita e viceversa: esistono però delle eccezioni (sia per le proteine singole sia per gli adsorbimenti sequenziali) e dei dati statisticamente dubbi. Il coadsorbimento delle due proteine porta in linea di massima, con particolare evidenza su Ti64CT, ad un'orientazione delle molecole con esposizione verso l'esterno dei domini idrofobici: resta da chiarire se questo dipenda dalle caratteristiche delle diverse superfici o da interazioni fra le proteine in soluzione.

La competizione nell'adsorbimento tra fibronectina e albumina ha portato ad ipotizzare come, negli adsorbimenti sequenziali effettuati, la prima proteina sembri influenzare l'adsorbimento, scoraggiandolo, della seconda. Le curve di potenziale ζ degli adsorbimenti sequenziali effettuati su tutti e tre i substrati seguono infatti l'andamento e il IEP della curva relativa all'adsorbimento della prima proteina effettuata; questo fenomeno è confermato dall'analisi quantitativa di proteina adsorbita mediante fluorescenza. Per l'adsorbimento contemporaneo, invece, le curve ottenute sembrano seguire un comportamento intermedio, indicando come entrambe le proteine prendano parte alla formazione del layer proteico. La vicinanza tra le curve dei grafici analizzati, considerando anche le deviazioni standard della misura, rendono difficile avanzare ulteriori ipotesi. Che le proteine vengano adsorbite è stato verificato anche tramite le misure di quantifica in fluorescenza, dove si è osservato segnale sia per la fibronectina marcata che per l'albumina marcata per gli adsorbimenti sequenziali. Il segnale maggiore è stato dato dal Ti64CT, a conferma della capacità di adsorbire più proteina, albumina o fibronectina che sia. Inoltre, la prima proteina adsorbita condiziona, riducendolo, l'adsorbimento della seconda proteina, nonostante la differenza importante di concentrazione usata per le due proteine (un ordine di grandezza inferiore per BFN rispetto a BSA). Per il coadsorbimento, invece, i dati non forniscono una visione del tutto chiara: l'albumina sembrerebbe legarsi ai substrati mentre non si è riusciti ad avere un segnale che fosse risultato specifico della fibronectina, probabilmente se ne lega poca per permetterne la rilevazione. La capacità di formare aggregati con morfologia globulare e filamentosa da parte della fibronectina, sia per gli adsorbimenti sequenziali che contemporaneo, è stata verificata anche in questo caso con maggior frequenza sui substrati TiCP e Ti64 grazie alla microscopia in fluorescenza.

In conclusione, quindi, il substrato Ti64CT è in grado di legare più fibronectina e in maniera più salda rispetto agli altri due, e sembra portare a cambiamenti conformazionali della proteina adsorbita. Nel caso di adsorbimenti sequenziali di proteina, la prima scoraggia la successiva adesione della seconda, mentre un adsorbimento contemporaneo sembrerebbe portare a adsorbimento di entrambe, secondo quanto si evince dalle misure di potenziale ζ , senza possibilità di formulare considerazioni ulteriori. La capacità della fibronectina di formare aggregati è scoraggiata su Ti64CT, sia in occasione degli adsorbimenti da singola proteina, che sequenziali o contemporaneo con albumina. Su questo substrato, è probabile che la proteina leghi con più affinità e ricopra in maniera più efficace la superficie.

Lo studio di bioattività con immersione di substrati in Ti64CT in SBF o SBF+BSA è stato effettuato per verificare come la presenza di proteina, in analogia con quanto avviene in un ambiente biologico, potesse influenzare la formazione di deposito di apatite. Da letteratura, la proteina scoraggia la formazione di deposito di idrossiapatite e la maturazione di idrossiapatite nei test in vitro in cui è aggiunta alla soluzione di SBF^{84,86}. Nel caso in studio, si è osservato come la proteina non riesca ad inibire la deposizione di ioni calcio e fosfato, ma ritardi il processo di maturazione del deposito di idrossiapatite, soprattutto nella prima settimana di incubazione. Dopo 14 giorni, i substrati mostrano depositi di diversi micrometri in SBF ed anche in SBF+BSA. Questo indica come il substrato riesca ad indurre efficacemente la formazione di idrossiapatite dopo due settimane sia in presenza che in assenza di albumina a concentrazione fisiologica in SBF.

In questo lavoro si è caratterizzato l'adsorbimento proteico attraverso un set innovativo di tecniche che si sono rilevate adatte a identificare e studiare lo stato della proteina adsorbita in superficie. In futuro, potrebbe essere interessante valutare la risposta cellulare su substrati in titanio conseguentemente l'adsorbimento di diverse proteine, e come un adsorbimento sequenziale e competitivo influenzi la risposta cellulare, in seguito al diverso layer proteico depositato.

BIBLIOGRAFIA

- 1. Corso di 'Bioingegneria Chimica' 2019/2020 Politecnico di Torino.
- 2. Blanco, G. & Blanco, A. Chapter 3 Proteins. in Medical biochemistry (2017).
- 3. Griffiths, A. J. F., Wessler, S. R., Carroll, S. B. & Doebley, J. Chapter 9 Proteins and Their Synthesis. in *Introduction to genetic analysis* (W. H. Freeman, 2015).
- Godbey, W. T. Chapter 2 Proteins. in *An Introduction to Biotechnology* (ed. Godbey,
 W. T.) 9–33 (Woodhead Publishing, 2014). doi:10.1016/B978-1-907568-28-2.00002-2.
- organic chemistry Ionization of amino acids. *Chemistry Stack Exchange* https://chemistry.stackexchange.com/questions/58123/ionization-of-amino-acids.
- 6. File:Ramachandran's Diagram.jpg. Wikipedia.
- Probits. bchemity: STRUTTURA E FUNZIONE DELLE PROTEINE. *bchemity* http://bchemity.blogspot.com/2017/11/struttura-e-funzione-delle-proteine.html(2017).
- 8. Parisi, L. *et al.* A glance on the role of fibronectin in controlling cell response at biomaterial interface. *Jpn Dent Sci Rev* **56**, 50–55 (2020).
- 9. Pankov, R. & Yamada, K. M. Fibronectin at a glance. J Cell Sci 115, 3861–3863 (2002).
- Vetri, V., Librizzi, F., Leone, M. & Militello, V. Thermal aggregation of bovine serum albumin at different pH: comparison with human serum albumin. *Eur Biophys J* 36, 717–725 (2007).
- 11. Romberger, D. J. Fibronectin. Int J Biochem Cell Biol 29, 939-943 (1997).
- Kusakawa, Y., Yoshida, E. & Hayakawa, T. Protein Adsorption to Titanium and Zirconia Using a Quartz Crystal Microbalance Method. *BioMed Research International* 2017, e1521593 (2017).
- 13. Isoshima, K. *et al.* The change of surface charge by lithium ion coating enhances protein adsorption on titanium. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*100, 103393 (2019).

- Toffoli, A. *et al.* Thermal treatment to increase titanium wettability induces selective proteins adsorption from blood serum thus affecting osteoblasts adhesion. *Materials Science and Engineering: C* 107, 110250 (2020).
- Carter, D. C. *et al.* Three-dimensional structure of human serum albumin. *Science* 244, 1195–1198 (1989).
- El Kadi, N. *et al.* Unfolding and Refolding of Bovine Serum Albumin at Acid pH: Ultrasound and Structural Studies. *Biophys J* 91, 3397–3404 (2006).
- Carter, D. C. & Ho, J. X. Structure of serum albumin. *Adv Protein Chem* 45, 153–203 (1994).
- Michnik, A., Michalik, K., Kluczewska, A. & Drzazga, Z. ComparativeDSC study of human and bovine serum albumin. *J Therm Anal Calorim* 84, 113–117 (2006).
- Zhang, X. *et al.* Investigation of the Interaction of Naringin Palmitate with Bovine Serum Albumin: Spectroscopic Analysis and Molecular Docking. *PLOS ONE* 8, e59106 (2013).
- Sleep, D. Albumin and its application in drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv* 12, 793–812 (2015).
- 21. Cai, H.-H. *et al.* Probing site-selective binding of rhodamine B to bovine serum albumin. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **372**, 35–40 (2010).
- Hlady, V. & Buijs, J. Protein adsorption on solid surfaces. *Current Opinion in Biotechnology* 7, 72–77 (1996).
- 23. Xu, K. *et al.* Enhanced vascularization of PCL porous scaffolds through VEGF-Fc modification. *J. Mater. Chem. B* **6**, 4474–4485 (2018).
- 24. Walker, R. K. & Krishnaswamy, S. The activation of prothrombin by the prothrombinase complex. The contribution of the substrate-membrane interaction to catalysis. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 27441–27450 (1994).

- Anderson, J. M. In Vitro and In Vivo Monocyte, Macrophage, Foreign Body Giant Cell, and Lymphocyte Interactions with Biomaterials. in *Biological Interactions on Materials Surfaces* (eds. Puleo, D. A. & Bizios, R.) 225–244 (Springer US, 2009). doi:10.1007/978-0-387-98161-1_11.
- 26. Trilling, A. K., Harmsen, M. M., Ruigrok, V. J. B., Zuilhof, H. & Beekwilder, J. The effect of uniform capture molecule orientation on biosensor sensitivity: Dependence on analyte properties. *Biosensors and Bioelectronics* **40**, 219–226 (2013).
- Pinholt, C., Hartvig, R. A., Medlicott, N. J. & Jorgensen, L. The importance of interfaces in protein drug delivery – why is protein adsorption of interest in pharmaceutical formulations? *Expert Opinion on Drug Delivery* 8, 949–964 (2011).
- Lundgren, A. *et al.* Affinity Purification and Single-Molecule Analysis of Integral Membrane Proteins from Crude Cell-Membrane Preparations. *Nano Lett.* 18, 381–385 (2018).
- Wang, K., Zhou, C., Hong, Y. & Zhang, X. A review of protein adsorption on bioceramics. *Interface Focus* 2, 259–277 (2012).
- 30. Tengvall, P. 4.6 Protein Interactions With Biomaterials ☆. in Comprehensive
 Biomaterials II 70–84 (Elsevier, 2017). doi:10.1016/B978-0-12-803581-8.10110-9.
- Schmidt, D. R., Waldeck, H. & Kao, W. J. Protein Adsorption to Biomaterials. in Biological Interactions on Materials Surfaces (eds. Puleo, D. A. & Bizios, R.) 1–18 (Springer US, 2009). doi:10.1007/978-0-387-98161-1 1.
- Anand, G., Sharma, S., Dutta, A. K., Kumar, S. K. & Belfort, G. Conformational Transitions of Adsorbed Proteins on Surfaces of Varying Polarity. *Langmuir* 26, 10803– 10811 (2010).
- Ferraris, S., Cazzola, M., Peretti, V., Stella, B. & Spriano, S. Zeta Potential Measurements on Solid Surfaces for in Vitro Biomaterials Testing: Surface Charge,

Reactivity Upon Contact With Fluids and Protein Absorption. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **6**, 60 (2018).

- 34. Metwally, S. & Stachewicz, U. Surface potential and charges impact on cell responses on biomaterials interfaces for medical applications. *Materials Science and Engineering: C* 104, 109883 (2019).
- Scopelliti, P. E. *et al.* The Effect of Surface Nanometre-Scale Morphology on Protein Adsorption. *PLOS ONE* 5, e11862 (2010).
- Roach, P., Farrar, D. & Perry, C. C. Surface Tailoring for Controlled Protein Adsorption: Effect of Topography at the Nanometer Scale and Chemistry. *J. Am. Chem. Soc.* 128, 3939–3945 (2006).
- Tang, L., Thevenot, P. & Hu, W. Surface Chemistry Influences Implant Biocompatibility. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 8, 270–280 (2008).
- Wahlgren, M. Protein adsorption to solid surfaces. *Trends in Biotechnology* 9, 201–208 (1991).
- Arnebrant, T., Barton, K. & Nylander, T. Adsorption of α-lactalbumin and βlactoglobulin on metal surfaces versus temperature. *Journal of Colloid and Interface Science* 119, 383–390 (1987).
- 40. Debye length. Wikipedia (2021).
- 41. Diffusività di materia. Wikipedia (2021).
- 42. Migliorini, E., Weidenhaupt, M. & Picart, C. Practical guide to characterize biomolecule adsorption on solid surfaces (Review). *Biointerphases* **13**, 06D303 (2018).
- 43. Rabe, M., Verdes, D. & Seeger, S. Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces. *Adv Colloid Interface Sci* **162**, 87–106 (2011).

- Sousa, S. R., Moradas-Ferreira, P., Saramago, B., Viseu Melo, L. & Barbosa, M. A.
 Human Serum Albumin Adsorption on TiO2 from Single Protein Solutions and from Plasma. *Langmuir* 20, 9745–9754 (2004).
- Sr, S., P, M.-F. & Ma, B. TiO2 type influences fibronectin adsorption. J Mater Sci Mater Med 16, 1173–1178 (2005).
- Norde, W. & Anusiem, A. C. I. Adsorption, desorption and re-adsorption of proteins on solid surfaces. *Colloids and Surfaces* 66, 73–80 (1992).
- 47. Yang, Y. *et al.* Protein Adsorption at Nanorough Titanium Oxide Surfaces: The Importance of Surface Statistical Parameters beyond Surface Roughness. *Nanomaterials* 11, 357 (2021).
- Su, T. J., Lu, J. R., Thomas, R. K. & Cui, Z. F. Effect of pH on the Adsorption of Bovine Serum Albumin at the Silica/Water Interface Studied by Neutron Reflection. *J. Phys. Chem. B* 103, 3727–3736 (1999).
- Su, T. J., Lu, Thomas, R. K., Cui, Z. F. & Penfold, J. The Conformational Structure of Bovine Serum Albumin Layers Adsorbed at the Silica–Water Interface. *J. Phys. Chem. B* 102, 8100–8108 (1998).
- Schmidt, D. R., Waldeck, H. & Kao, W. J. Protein Adsorption to Biomaterials. in Biological Interactions on Materials Surfaces (eds. Puleo, D. A. & Bizios, R.) 1–18 (Springer US, 2009). doi:10.1007/978-0-387-98161-1 1.
- Sousa, S. R., Brás, M. M., Moradas-Ferreira, P. & Barbosa, M. A. Dynamics of Fibronectin Adsorption on TiO2 Surfaces. *Langmuir* 23, 7046–7054 (2007).
- 52. Freese, H. L., Volas, M. G. & Wood, J. R. Metallurgy and Technological Properties of Titanium and Titanium Alloys. in *Titanium in Medicine: Material Science, Surface Science, Engineering, Biological Responses and Medical Applications* (eds. Brunette, D.

M., Tengvall, P., Textor, M. & Thomsen, P.) 25–51 (Springer, 2001). doi:10.1007/978-3-642-56486-4 3.

- 53. Donachie, M. J. *Titanium: A Technical Guide, Chapter 3, pp 13-21 2nd Edition.* (ASM international, 2000).
- Jackson, M. J. *et al.* Titanium and Titanium Alloy Applications in Medicine. in *Surgical Tools and Medical Devices* (eds. Ahmed, W. & Jackson, M. J.) 475–517 (Springer International Publishing, 2016). doi:10.1007/978-3-319-33489-9_15.
- Elias, C. N., Lima, J. H. C., Valiev, R. & Meyers, M. A. Biomedical applications of titanium and its alloys. *JOM* 60, 46–49 (2008).
- 56. Brunette, D. M., Tengvall, P., Textor, M. & Thomsen, P. *Titanium in Medicine:* Material Science, Surface Science, Engineering, Biological Responses and Medical Applications. (Springer Science & Business Media, 2012).
- Textor, M., Sittig, C., Frauchiger, V., Tosatti, S. & Brunette, D. M. Properties and Biological Significance of Natural Oxide Films on Titanium and Its Alloys. in *Titanium in Medicine: Material Science, Surface Science, Engineering, Biological Responses and Medical Applications* (eds. Brunette, D. M., Tengvall, P., Textor, M. & Thomsen, P.) 171–230 (Springer, 2001). doi:10.1007/978-3-642-56486-4_7.
- Williams, R. L. & Williams, D. F. Albumin adsorption on metal surfaces. *Biomaterials* 9, 206–212 (1988).
- 59. Ellingsen, J. E. A study on the mechanism of protein adsorption to TiO2. *Biomaterials*12, 593–596 (1991).
- Klinger, A., Steinberg, D., Kohavi, D. & Sela, M. N. Mechanism of adsorption of human albumin to titanium in vitro. *Journal of Biomedical Materials Research* 36, 387–392 (1997).

- Zeng, H., Chittur, K. K. & Lacefield, W. R. Analysis of bovine serum albumin adsorption on calcium phosphate and titanium surfaces. *Biomaterials* 20, 377–384 (1999).
- 62. Wassell, D. T. H. & Embery, G. Adsorption of bovine serum albumin on to titanium powder. *Biomaterials* 17, 859–864 (1996).
- Liamas, E., T. Thomas, O. R., Igual Muñoz, A. & J. Zhang, Z. Effect of the electrochemical characteristics of titanium on the adsorption kinetics of albumin. *RSC Advances* 9, 34265–34273 (2019).
- Kopac, T., Bozgeyik, K. & Yener, J. Effect of pH and temperature on the adsorption of bovine serum albumin onto titanium dioxide. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 322, 19–28 (2008).
- Kopac, T. & Bozgeyik, K. Effect of surface area enhancement on the adsorption of bovine serum albumin onto titanium dioxide. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 76, 265–271 (2010).
- 66. Cai, K., Bossert, J. & Jandt, K. D. Does the nanometre scale topography of titanium influence protein adsorption and cell proliferation? *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 49, 136–144 (2006).
- Liu, C. *et al.* Bovine Serum Albumin Adsorption in Mesoporous Titanium Dioxide: Pore Size and Pore Chemistry Effect. *Langmuir* 32, 3995–4003 (2016).
- 68. Feng, B. *et al.* Surface characterization of titanium and adsorption of bovine serum albumin. *Materials Characterization* **49**, 129–137 (2002).
- Rockwell, G. P., Lohstreter, L. B. & Dahn, J. R. Fibrinogen and albumin adsorption on titanium nanoroughness gradients. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 91, 90–96 (2012).

- 70. Jia, E., Zhao, X., Lin, Y. & Su, Z. Protein adsorption on titanium substrates and its effects on platelet adhesion. *Applied Surface Science* **529**, 146986 (2020).
- Deligianni, D. D. *et al.* Effect of surface roughness of the titanium alloy Ti-6Al-4V on human bone marrow cell response and on protein adsorption. *Biomaterials* 22, 1241– 1251 (2001).
- Yang, Y., Cavin, R. & Ong, J. L. Protein adsorption on titanium surfaces and their effect on osteoblast attachment. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 67A, 344– 349 (2003).
- 73. Sela, M. N., Badihi, L., Rosen, G., Steinberg, D. & Kohavi, D. Adsorption of human plasma proteins to modified titanium surfaces. *Clinical Oral Implants Research* 18, 630–638 (2007).
- Yang, Y., Glover, R. & Ong, J. L. Fibronectin adsorption on titanium surfaces and its effect on osteoblast precursor cell attachment. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 30, 291–297 (2003).
- Parisi, L. *et al.* Titanium dental implants hydrophilicity promotes preferential serum fibronectin over albumin competitive adsorption modulating early cell response.
 Materials Science and Engineering: C 117, 111307 (2020).
- Kohavi, D., Hauslich, L. B., Rosen, G., Steinberg, D. & Sela, M. N. Wettability versus electrostatic forces in fibronectin and albumin adsorption to titanium surfaces. *Clinical Oral Implants Research* 24, 1002–1008 (2013).
- 77. MacDonald, D. E., Markovic, B., Allen, M., Somasundaran, P. & Boskey, A. L. Surface analysis of human plasma fibronectin adsorbed to commercially pure titanium materials. *Journal of Biomedical Materials Research* 41, 120–130 (1998).

- 78. MacDonald, D. E., Deo, N., Markovic, B., Stranick, M. & Somasundaran, P. Adsorption and dissolution behavior of human plasma fibronectin on thermally and chemically modified titanium dioxide particles. *Biomaterials* 23, 1269–1279 (2002).
- Strehle, M. A. *et al.* A Raman spectroscopic study of the adsorption of fibronectin and fibrinogen on titanium dioxide nanoparticles. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 6, 5232–5236 (2004).
- 80. Corso di 'Materiali per la bioingegneria' 2019/2020 Politecnico di Torino.
- 81. 14:00-17:00. ISO 23317:2014. ISO https://www.iso.org/cms/render/live/en/sites/isoorg/contents/data/standard/06/50/65054. html.
- Kokubo, T., Kushitani, H., Sakka, S., Kitsugi, T. & Yamamuro, T. Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W3. *Journal of Biomedical Materials Research* 24, 721–734 (1990).
- Serro, A. P. V. A. do, Fernandes, A. C. & Saramago, B. de J. V. Calcium phosphate deposition on titanium surfaces in the presence of fibronectin. *Journal of Biomedical Materials Research* 49, 345–352 (2000).
- 84. do Serro, A. P. V. A., Fernandes, A. C., de Jesus, B. & Saramago, V. The influence of proteins on calcium phosphate deposition over titanium implants studied by dynamic contact angle analysis and XPS. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 10, 95–104 (1997).
- 85. Gao, L. *et al.* Micro/nanostructural porous surface on titanium and bioactivity. *Journal* of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials **89B**, 335–341 (2009).
- Serro, A. P., Fernandes, A. C., Saramago, B., Lima, J. & Barbosa, M. A. Apatite deposition on titanium surfaces — the role of albumin adsorption. *Biomaterials* 18, 963– 968 (1997).

- Vanzillotta, P. S., Sader, M. S., Bastos, I. N. & Soares, G. de A. Improvement of in vitro titanium bioactivity by three different surface treatments. *Dental Materials* 22, 275–282 (2006).
- 88. Wang, X. J. *et al.* In vitro bioactivity evaluation of titanium and niobium metals with different surface morphologies. *Acta Biomaterialia* **4**, 1530–1535 (2008).
- Coelho, M. F. C. *et al.* Biomimetic coating on titanium: evaluation of bioactivity and corrosion. *Mater. Res. Express* 6, 1265g5 (2020).
- Wagener, V., Boccaccini, A. R. & Virtanen, S. Protein-adsorption and Ca-phosphate formation on chitosan-bioactive glass composite coatings. *Applied Surface Science* 416, 454–460 (2017).
- 91. Lu, H. H., Pollack, S. R. & Ducheyne, P. 45S5 Bioactive glass surface charge variations and the formation of a surface calcium phosphate layer in a solution containing fibronectin. *Journal of Biomedical Materials Research* 54, 454–461 (2001).
- 92. Magyari, K. *et al.* Bioactivity evolution of the surface functionalized bioactive glasses. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 103, 261–272 (2015).
- Leite Ferreira, B. J. M., Duarte, M. G. G. M., Gil, M. H., Fernandes, M. H. V. & Correia, R. N. Influence of Albumin on Mineralization of PMMA-Based/Glass
 Composites. *Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials* 10, 92–98 (2012).
- Lopes, P. P. *et al.* In vitro bioactivity of PMMA-based composite in simulated plasma with albumin. *Matéria (Rio de Janeiro)* 12, 128–133 (2007).
- 95. Combes, C., Rey, C. & Freche, M. In vitro crystallization of octacalcium phosphate on type I collagen: influence of serum albumin. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 10, 153–160 (1999).

- Ferraris, S. *et al.* Surface modification of Ti–6Al–4V alloy for biomineralization and specific biological response: Part I, inorganic modification. *J Mater Sci: Mater Med* 22, 533–545 (2011).
- 97. IsoMet High Speed Pro Precision Cutting Saw | Buehler. *Buehler, an ITW Company* https://www.buehler.com/isoMet-high-speed-pro.php.
- Lavatrice a Ultrasuoni 2200 S3 | Soltec Ultrasonic cleaners. http://www.soltec.it/d1/it/ultrasoniccleaner/18.
- Spriano, S., Ferraris, S. & Vernè, E. Multifunctional Titanium Surfaces for Bone Integration, European Patent 2214732 (2013).
- 100. Ferraris, S. *et al.* Multifunctional commercially pure titanium for the improvement of bone integration: Multiscale topography, wettability, corrosion resistance and biological functionalization. *Materials Science and Engineering: C* 60, 384–393 (2016).
- 101. Kokubo & Takadama. Biomaterials 27. in 2907–2915 (2006).
- 102. X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS). Chemistry LibreTexts https://chem.libretexts.org/Courses/Franklin_and_Marshall_College/Introduction_to_Ma terials_Characterization__CHM_412_Collaborative_Text/Spectroscopy/Xray_Photoelectron_Spectroscopy_(XPS) (2019).
- 103. Frateur, I. *et al.* Adsorption of BSA on passivated chromium studied by a flow-cell EQCM and XPS. *Electrochimica Acta* 52, 7660–7669 (2007).
- 104. Pradier, C. M., Kármán, F., Telegdi, J., Kálmán, E. & Marcus, P. Adsorption of Bovine Serum Albumin on Chromium and Molybdenum Surfaces Investigated by Fourier-Transform Infrared Reflection–Absorption Spectroscopy (FT-IRRAS) and X-ray Photoelectron Spectroscopy. J. Phys. Chem. B 107, 6766–6773 (2003).
- 105. Sadewasser, S. & Glatzel, T. Kelvin probe force microscopy, cap. 1. vol. 8 (Springer, 2012).
- 106. Innova AFM. https://www.bruker.com/en/products-and-solutions/microscopes/materialsafm/innova-afm.html.
- 107. LSM 900 for Materials. https://www.zeiss.com/microscopy/int/products/confocalmicroscopes/lsm-900-for-materials-non-contact-surface-topography-in-3d.html.
- 108. Bhattacharjee, S. DLS and zeta potential What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release* **235**, 337–351 (2016).
- 109. Particle size analyzer: Litesizer :: Anton-Paar.com. *Anton Paar* https://www.antonpaar.com/corp-en/products/details/litesizer/.
- 110. Luxbacher, T. *The ZETA Guide Principles of the streaming potential technique*. (Anton Paar GmbH, 2014).
- 111. Angolo di contatto. Wikipedia (2020).
- 112. Berthomieu, C. & Hienerwadel, R. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. *Photosynth Res* 101, 157–170 (2009).
- 113. reserved, M.-T. I. I. all rights. Riflettanza totale attenuata (ATR). https://www.mt.com/it/it/home/products/L1_AutochemProducts/ReactIR/attenuatedtotal-reflectance-atr.html.
- 114. Ramer, G. & Lendl, B. Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared Spectroscopy. in *Encyclopedia of Analytical Chemistry* (American Cancer Society, 2013). doi:10.1002/9780470027318.a9287.
- 115. NicoletTM iNTM10 Infrared Microscope.

https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/IQLAADGAAGFAHDMAPD.

116. File:Schema livelli scattering Raman.pdf - Wikipedia. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Schema livelli scattering Raman.pdf.

- 117. reserved, M.-T. I. I. all rights. Spettroscopia Raman. https://www.mt.com/it/it/home/applications/L1_AutoChem_Applications/Raman-Spectroscopy.html.
- 118. Cialla, D. *et al.* Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS): progress and trends.*Anal Bioanal Chem* 403, 27–54 (2012).
- 119. DXR3xi Raman Imaging Microscope IT.

//www.thermofisher.com/uk/en/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotopeanalysis/molecular-spectroscopy/raman-spectroscopy/dxrxi-raman-imagingmicroscope.html.

- 120. Abd Mutalib, M., Rahman, M. A., Othman, M. H. D., Ismail, A. F. & Jaafar, J. Chapter
 9 Scanning Electron Microscopy (SEM) and Energy-Dispersive X-Ray (EDX)
 Spectroscopy. in *Membrane Characterization* (eds. Hilal, N., Ismail, A. F., Matsuura, T.
 & Oatley-Radcliffe, D.) 161–179 (Elsevier, 2017). doi:10.1016/B978-0-444-637765.00009-7.
- 121. Foster, R. N., Harrison, E. T. & Castner, D. G. ToF-SIMS and XPS Characterization of Protein Films Adsorbed onto Bare and Sodium Styrenesulfonate-Grafted Gold Substrates. *Langmuir* **32**, 3207–3216 (2016).
- 122. Ferraris, S. *et al.* Bioactive materials: In vitro investigation of different mechanisms of hydroxyapatite precipitation. *Acta Biomaterialia* **102**, 468–480 (2020).
- 123. Imamura, K., Shimomura, M., Nagai, S., Akamatsu, M. & Nakanishi, K. Adsorption characteristics of various proteins to a titanium surface. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 106, 273–278 (2008).
- 124. Kopf, B. S., Ruch, S., Berner, S., Spencer, N. D. & Maniura-Weber, K. The role of nanostructures and hydrophilicity in osseointegration: In-vitro protein-adsorption and

blood-interaction studies. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **103**, 2661–2672 (2015).

- 125. Barberi, J. & Spriano, S. Titanium and Protein Adsorption: An Overview of Mechanisms and Effects of Surface Features. *Materials* 14, 1590 (2021).
- 126. Kashiwaya, S. et al. The Work Function of TiO2. Surfaces 1, 73-89 (2018).
- 127. Pellenc, D., Berry, H. & Gallet, O. Adsorption-induced fibronectin aggregation and fibrillogenesis. *Journal of Colloid and Interface Science* **298**, 132–144 (2006).
- 128. Busscher, H., Stokroos, I. & Schakenraad, J. Two Dimensional, Spatial Arrangement of Fibronectin Adsorbed to Biomaterials with Different Wettabilities. *Cells and Materials* 1, (1991).
- Renner, L., Pompe, T., Salchert, K. & Werner, C. Fibronectin Displacement at Polymer Surfaces. *Langmuir* 21, 4571–4577 (2005).
- 130. MacDonald, D. E., Markovic, B., Boskey, A. L. & Somasundaran, P. Physico-chemical properties of human plasma fibronectin binding to well characterized titanium dioxide. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 11, 131–139 (1998).
- Milletti, F., Storchi, L. & Cruciani, G. Predicting protein pKa by environment similarity. *Proteins* 76, 484–495 (2009).
- 132. Koide, A., Jordan, M. R., Horner, S. R., Batori, V. & Koide, S. Stabilization of a Fibronectin Type III Domain by the Removal of Unfavorable Electrostatic Interactions on the Protein Surface [†]. *Biochemistry* 40, 10326–10333 (2001).
- 133. Risi, R. *et al.* X-ray radiation-induced effects in human mammary epithelial cells investigated by Raman microspectroscopy. in (eds. Popp, J., Drexler, W., Tuchin, V. V. & Matthews, D. L.) 84272E (2012). doi:10.1117/12.921389.
- 134. Kengne-Momo, R. P. *et al.* Protein Interactions Investigated by the Raman Spectroscopy for Biosensor Applications. *International Journal of Spectroscopy* **2012**, 1–7 (2012).

- 135. Verma, S. P. & Sonwalkar, N. Structural Changes in Plasma Membranes Prepared from Irradiated Chinese Hamster V79 Cells as Revealed by Raman Spectroscopy. *Radiation Research* 126, 27 (1991).
- 136. Li, Q., Hao, C. & Xu, Z. Diagnosis of Breast Cancer Tissues Using 785 nm Miniature Raman Spectrometer and Pattern Regression. *Sensors* 17, 627 (2017).
- 137. Samara National Research University *et al.* Raman spectra analysis of human blood protein fractions using the projection on latent structures method. in *Computer Optics and Nanophotonics* 64–68 (Samara University, 2017). doi:10.18287/1613-0073-2017-1900-64-68.
- 138. Cheng, S.-S., Chittur, K. K., Sukenik, C. N., Culp, L. A. & Lewandowska, K. The Conformation of Fibronectin on Self-Assembled Monolayers with Different Surface Composition: An FTIR/ATR Study. *Journal of Colloid and Interface Science* 162, 135– 143 (1994).
- 139. Liu, S. *et al.* Immobilization of Fibronectin-Loaded Polyelectrolyte Nanoparticles on Cardiovascular Material Surface to Improve the Biocompatibility. *BioMed Research International* 2019, e5478369 (2019).
- 140. Baujard-Lamotte, L., Noinville, S., Goubard, F., Marque, P. & Pauthe, E. Kinetics of conformational changes of fibronectin adsorbed onto model surfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 63, 129–137 (2008).
- 141. Gand, A. *et al.* Fibronectin-based multilayer thin films. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 156, 313–319 (2017).
- 142. Liverani, L., Killian, M. S. & Boccaccini, A. R. Fibronectin Functionalized Electrospun Fibers by Using Benign Solvents: Best Way to Achieve Effective Functionalization. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 7, (2019).

- 143. Kuroda, K. & Okido, M. Osteoconductivity of Protein Adsorbed Titanium Implants Using Hydrothermal Treatment. *Materials Science Forum* 879, 1049–1052 (2017).
- 144. Kuczyńska, D., Kwaśniak, P., Pisarek, M., Borowicz, P. & Garbacz, H. Influence of surface pattern on the biological properties of Ti grade 2. *Materials Characterization* 135, 337–347 (2018).
- 145. Li, Y., Bian, Y., Qin, H., Zhang, Y. & Bian, Z. Photocatalytic reduction behavior of hexavalent chromium on hydroxyl modified titanium dioxide. *Applied Catalysis B: Environmental* 206, 293–299 (2017).
- 146. Xu, Y. *et al.* The role of protein characteristics in the formation and fluorescence of Au nanoclusters. *Nanoscale* **6**, 1515–1524 (2014).
- 147. Galtayries, A., Warocquier-Clérout, R., Nagel, M.-D. & Marcus, P. Fibronectin adsorption on Fe–Cr alloy studied by XPS. *Surface and Interface Analysis* 38, 186–190 (2006).
- 148. Zhang, L., Chatterjee, A., Ebrahimi, M. & Leung, K. T. Hydrogen-bond mediated transitional adlayer of glycine on Si(111)7×7 at room temperature. *The Journal of Chemical Physics* 130, 121103 (2009).
- 149. Oliva, F. Y., Avalle, L. B., Cámara, O. R. & De Pauli, C. P. Adsorption of human serum albumin (HSA) onto colloidal TiO2 particles, Part I. *Journal of Colloid and Interface Science* 261, 299–311 (2003).
- 150. Felgueiras, H. P. *et al.* Competitive Adsorption of Plasma Proteins Using a Quartz Crystal Microbalance. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 8, 13207–13217 (2016).
- 151. Hindié, M. *et al.* Pre-osteoblasts on poly(l-lactic acid) and silicon oxide: Influence of fibronectin and albumin adsorption. *Acta Biomaterialia* **7**, 387–394 (2011).

- 152. Pegueroles, M., Tonda-Turo, C., Planell, J. A., Gil, F.-J. & Aparicio, C. Adsorption of Fibronectin, Fibrinogen, and Albumin on TiO2 : Time-Resolved Kinetics, Structural Changes, and Competition Study. *Biointerphases* 7, 48 (2012).
- 153. Absolom, D. R., Van Oss, C. J., Zingg, W. & Neumann, A. W. Determination of surface tensions of proteins II. Surface tension of serum albumin, altered at the protein-air interface. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure* 670, 74–78 (1981).
- 154. Serro, A. P. V. A. do, Fernandes, A. C., Saramago, B. de J. V. & Norde, W. Bovine serum albumin adsorption on titania surfaces and its relation to wettability aspects. *Journal of Biomedical Materials Research* 46, 376–381 (1999).
- 155. Sweryda-Krawiec, B., Devaraj, H., Jacob, G. & Hickman, J. J. A New Interpretation of Serum Albumin Surface Passivation. *Langmuir* 20, 2054–2056 (2004).
- 156. Ballester-Beltrán, J. *et al.* Role of superhydrophobicity in the biological activity of fibronectin at the cell-material interface. *Soft Matter* **7**, 10803 (2011).
- 157. Baino, F., Marshall, M., Kirk, N. & Vitale-Brovarone, C. Design, selection and characterization of novel glasses and glass-ceramics for use in prosthetic applications. *Ceramics International* 42, 1482–1491 (2016).