

Biocompatibilità dei materiali polimerici

Valentina Vaghi¹, Lorenzo Lunelli^{1,2}, Cecilia Pederzoli¹, Cristina Potrich^{1,2}

¹Fondazione Bruno Kessler, Laboratorio di Sequenziamento e di Analisi Strutturale di Biomolecole per la Salute, via Sommarive 18, 38123 Povo (Trento), Italia
cpotrich@fbk.eu; lunelli@fbk.eu; pederzo@fbk.eu

²CNR - Consiglio Nazionale delle Ricerche, Istituto di Biofisica
via alla Cascata 56/C, 38123 Povo (Trento), Italia

1. Introduzione

Negli ultimi decenni si è assistito allo sviluppo esponenziale di micro- e nanotecnologie che hanno contribuito a un sostanziale aumento della qualità ed efficacia della ricerca biomedica e scientifica. Alla base della realizzazione dei sensori miniaturizzati utilizzati nei sistemi diagnostici più avanzati e dei nuovi dispositivi per la ricerca biomedica c'è il concetto di biocompatibilità, esplicitamente introdotto negli anni '70 dello scorso secolo nel contesto dell'utilizzo degli impianti medici e delle proprietà che un materiale utilizzato per la realizzazione di questi impianti dovrebbe possedere. Una definizione di biocompatibilità ampiamente citata è stata formulata nel 1986 a una conferenza sui biomateriali (*Consensus conference on biomaterials*, Chester, UK - 1986) come: "l'abilità di un materiale utilizzato per una data applicazione di agire determinando una risposta appropriata nell'ospite"^a [1].

Lo sviluppo di materiali per applicazioni biomediche, o biomateriali, non può naturalmente prescindere da un'approfondita valutazione della biocompatibilità dei biomateriali stessi. In altre parole, ricorrendo a una definizione più recente e maggiormente articolata rispetto alla precedente e che pone l'accento sulle reazioni biologiche indotte dall'impianto, la biocompatibilità è data "dalla capacità di un biomateriale di compiere la sua funzione rispetto a una terapia medica, senza provocare effetti indesiderati nell'individuo sottoposto alla terapia, ma piuttosto generando le risposte cellulari o tissutali più appropriate nella situazione specifica e ottimizzando le prestazioni clinicamente rilevanti"^b [2].

Nel prosieguo di questo capitolo saranno introdotti i concetti generali che stanno alla base della biocompatibilità e, dopo un breve cenno alle diverse classi di biomateriali, ci si focalizzerà sul comportamento dei polimeri sia in ambito biomedicale che sulle loro potenzialità nella realizzazione di microdispositivi o, più in generale, nel contesto di un loro utilizzo "in vitro".

2. Biomateriali

Un biomateriale, secondo una definizione recente è: "una sostanza che, grazie a una opportuna ingegnerizzazione, viene usata per dirigere il corso di una procedura terapeutica o

^a "the ability of a material to perform with an appropriate host response in a specific application"

^b "...refers to the ability of a biomaterial to perform its desired function with respect to a medical therapy, without eliciting any undesirable local or systemic effects in the recipient or beneficiary of that therapy, but generating the most appropriate beneficial cellular or tissue response in that specific situation, and optimising the clinically relevant performance of that therapy."

diagnostica, controllando le sue interazioni con i componenti dei sistemi viventi, nell'ambito sia della medicina umana che veterinaria"^c [3].

In tabella 1 sono riportati alcuni esempi dell'utilizzo di biomateriali in risposta a specifici problemi di tipo medico. L'ambiente in cui opera un biomateriale è quindi quello fisiologico, caratterizzato cioè da una notevole attività chimica e da un elevato intervallo di sollecitazioni meccaniche. I biomateriali sono in diretto contatto con i fluidi biologici, ovvero con acqua, con ioni in soluzione e con enzimi, proteine e cellule. Le condizioni chimico-fisiche (pH, temperatura) sono tuttavia pressoché costanti nel tempo e influenzano la progettazione del biomateriale e la durata del biomateriale stesso.

Tabella 1 - Alcuni esempi di biomateriali usati in risposta a specifici problemi medici.

Problema	Esempio
Sostituzione di organi danneggiati da patologie, da traumi, dal tempo	Protesi d'anca, dializzatore renale
Assistenza, guarigione	Suture, lastre e viti
Aumentare la funzione d'organo	Pacemaker, lente intraoculare
Correzione handicap funzionale	Pacemaker
Aiuto al trattamento	Sonde, drenaggio
Aiuto diagnostico	Sonde, cateteri
Correzione handicap estetico	Mammoplastica, chirurgia plastica

L'identificazione delle caratteristiche di un biomateriale è cambiata nel tempo e si è evoluta secondo quattro fasi principali (Figura 1): per i biomateriali di prima generazione il requisito fondamentale è di essere bioinerte, cioè possedere una combinazione adeguata di proprietà fisiche uguali a quelle del tessuto sostituito, con una tossicità minima. Al contrario, i biomateriali di seconda generazione sono materiali o bioattivi o riassorbibili. Un biomateriale viene definito bioattivo quando è in grado di provocare azioni e reazioni controllate nell'ambiente fisiologico. Un biomateriale viene definito riassorbibile quando si degrada chimicamente e si riassorbe in maniera controllata senza lasciare traccia, in modo da essere sostituito dal tessuto che lo ospita. I biomateriali di terza generazione rappresentano il presente dei biomateriali, e sono biomateriali sia bioattivi che riassorbibili. È stata introdotta recentemente una quarta generazione di biomateriali, i cosiddetti materiali biomimetici, che rappresentano il futuro dei biomateriali. I materiali biomimetici sono spesso definiti intelligenti, in quanto immunologicamente inerti e in grado non solo di sostituire il tessuto originario, ma anche di scambiare segnali con le cellule dell'ospite. I materiali biomimetici traggono ispirazione e modello dalla natura e a questo riguardo tra i processi naturali più studiati ci sono i processi che portano alla formazione dei tessuti biomineralizzati. Processi biomimetici che simulano quelli propri della biomineralizzazione sono stati utilizzati con successo per preparare materiali, quali ossidi di ferro, apatite,

^c "A biomaterial is a substance that has been engineered to take a form which, alone or as part of a complex system, is used to direct, by control of interactions with components of living systems, the course of any therapeutic or diagnostic procedure, in human or veterinary medicine."

solfuro di cadmio, che trovano impiego in diversi settori tecnologici [4]. Esiste poi una categoria di biomateriali anch'essi ispirati dalla natura, i cosiddetti materiali bioispirati, che presentano caratteristiche potenzialmente molto utili in diversi campi. Attualmente le principali applicazioni riguardano i materiali ad altissima resistenza basati sulla struttura della seta delle ragnatele, i materiali autopulenti basati sulla struttura delle foglie del loto e i materiali ad altissima adesività basati sulla struttura delle zampe di animali quali il gecko. Per esempio, la nanotopografia delle zampe del gecko viene replicata in strutture elastomeriche biocompatibili e biodegradabili da usare come suture, punti o colle altamente adesive che riducono l'incidenza dei traumi dovuti alle incisioni chirurgiche e alle linee di sutura [5].

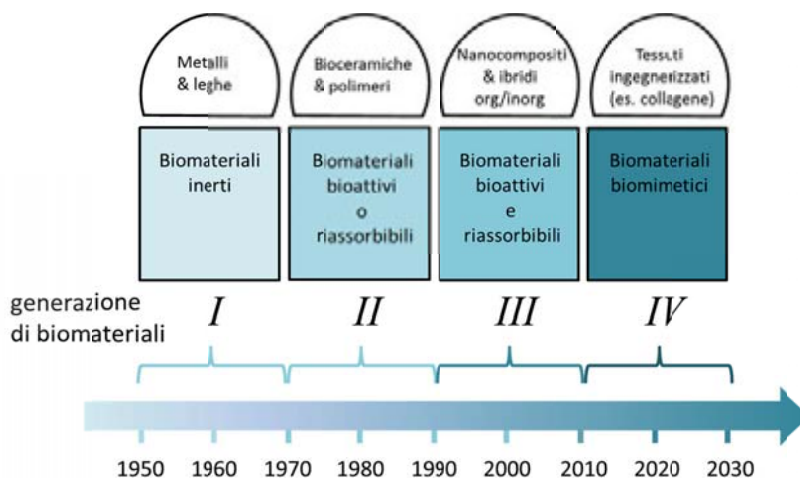


Figura 1 - Suddivisione dei materiali biocompatibili a seconda della loro comparsa temporale

2.1 Classificazione dei biomateriali

I biomateriali possono essere classificati secondo diversi criteri, per esempio in base alla loro funzione, secondo il tipo di tessuto che si intende sostituire con quello specifico biomateriale, oppure in funzione della loro natura chimica. Per quanto riguarda la natura chimica dei biomateriali, essi si possono dividere in: materiali metallici, polimerici, ceramici e compositi, o materiali di derivazione biologica.

L'individuazione di biomateriali artificiali per una determinata applicazione è un processo che parte dalla caratterizzazione del materiale biologico da sostituire, in particolare dalla caratterizzazione delle sue principali proprietà fisiche e biologiche. Segue poi una fase di studio e *design* che, se avviene in modo ottimale, porterà a un biomateriale con proprietà simili o possibilmente migliori rispetto a quelle del materiale biologico da sostituire. Con questo procedimento è stata identificata una serie di materiali con elevata biocompatibilità e proprietà meccaniche simili a quelle dei materiali biologici da sostituire. Fanno parte di questa categoria i materiali metallici (titanio e sue leghe, oro, argento, acciaio e leghe di cromo e cobalto) utilizzati per la realizzazione di impianti dentali, nelle articolazioni, nella fabbricazione di fili per sutura e nella costruzione di placche e viti per l'impiego in campo ortopedico. Si tratta di materiali caratterizzati da un'alta resistenza strutturale unita a un'elevata duttilità. La biocompatibilità dei materiali metallici è particolarmente legata alla

capacità di resistere all'aggressione da parte dei fluidi biologici, per questo vengono spesso protetti con un rivestimento ceramico o polimerico.

I materiali polimerici sono, al contrario, meno resistenti, si deformano nel tempo e possono anche degradarsi. Presentano, tuttavia, maggiore facilità di realizzazione e più alta resilienza. Date queste loro caratteristiche meccaniche, sono utilizzati direttamente come biomateriali, per esempio in sostituzione di tessuti molli, come vasi sanguigni o come superfici articolari nelle protesi ortopediche o ancora per lenti a contatto e intraoculari. I materiali polimerici sono inoltre ampiamente utilizzati in dispositivi medicali, come per esempio cateteri, cannule e drenaggi o come membrane per la somministrazione di farmaci. L'impiego di questi materiali nella realizzazione di protesi cardiovascolari o, in generale, di apparati che vengano a contatto con il sangue è risultata più complessa. In questo caso va infatti dedicata particolare attenzione all'interfaccia polimero-sangue per evitare che si producano trombi, cioè il materiale deve essere non-trombogenico. I trombi sono dovuti a effetti anomali di coagulazione del sangue quando viene a contatto con lo strato di proteine che si deposita rapidamente sulla superficie del polimero. Quando il materiale non mostra problemi di compatibilità con il sangue, si parla di materiale emocompatibile.

I materiali ceramici presentano un'alta biocompatibilità e comprendono un ampio gruppo di materiali solidi con caratteristiche di elevata resistenza alla compressione e alla corrosione e relativa inerzia chimica. Materiali appartenenti a questa categoria sono l'ossido di alluminio, i fosfati di calcio (idrossiapatite) e i biovetri. I materiali ceramici sono tuttavia dotati di una bassa resilienza e sono piuttosto fragili. In generale, trovano applicazione in campo ortopedico e nella realizzazione di protesi dentarie.

I materiali compositi, come per esempio metalli rivestiti di materiali ceramici, mostrano anch'essi una buona biocompatibilità e inerzia chimica, che, sommate a buone caratteristiche meccaniche e alla resistenza alla corrosione, li rendono adatti per protesi valvolari cardiache e protesi al ginocchio. Tuttavia, questi materiali presentano scarsa coesione tra i componenti e sono difficili da lavorare.

Infine, i materiali biologici come vene e valvole cardiache, offrono un'ottima biocompatibilità benché siano scarsamente affidabili dal punto di vista meccanico e siano difficili da maneggiare e da conservare. Nonostante questi svantaggi, vengono utilizzati con successo per protesi vascolari e per rivestimenti in genere.

3. Materiali polimerici

Come accennato nel paragrafo precedente, i polimeri sono ampiamente usati nei dispositivi biomedici, per esempio in oftalmologia e negli impianti ortopedici, dentali, tissutali e cardiovascolari. I polimeri rappresentano la più ampia classe di biomateriali e possono essere derivati da fonti naturali, anche se sono ottenuti sempre di più da processi di sintesi chimica. La grande varietà di polimeri naturali rilevanti nel campo dei biomateriali include materiali vegetali, come cellulosa, alginato di sodio, gomma naturale, e materiali di origine animale, come valvole cardiache, collagene, glicosamminoglicani (GAGs), eparina e acido ialuronico. Accanto ai polimeri naturali c'è una grandissima disponibilità di polimeri sintetici, che vanno da materiali idrofobici che non assorbono acqua, come gomma di silicone (SR), polietilene (PE), polipropilene (PP), polietilentereftalato (PET), politetrafluoroetilene (PTFE) e polimetilmetacrilato (PMMA), a materiali più polari, come

polivinilcloruro (PVC), acido poli D,L-lattico-co-glicolico (PLGA) e nylon, fino a materiali che assorbono l'acqua, come il polietilenglicole (PEG o PEO). Alcuni polimeri sintetici sono idroliticamente instabili e si degradano nel corpo, mentre altri possono rimanere essenzialmente invariati per l'intera vita di un individuo.

Sia i polimeri naturali che quelli sintetici sono molecole a lunga catena formate da un grande numero di singole unità ripetute, chiamate monomeri. Data la grande varietà di polimeri di sintesi, è possibile selezionare il biomateriale con le proprietà che maggiormente si avvicinano a quelle richieste per una specifica applicazione oltre che progettare polimeri nuovi. È tuttavia opportuno considerare che le proprietà fisiche dei polimeri tendono a essere più complesse di quelle dei monomeri di cui sono costituiti. In particolare, il loro peso molecolare elevato determina caratteristiche fisiche uniche, tra cui la resistenza, la viscoelasticità e la tendenza a formare vetri e strutture semicristalline invece che cristalli.

Le caratteristiche fisiche dei polimeri che li rendono particolarmente interessanti come biomateriali sono, tra l'altro, il fatto di essere facilmente deformabili, cosa che per esempio li rende adatti alla lavorazione per stampaggio; i polimeri inoltre presentano una bassa densità (sono materiali leggeri), hanno elevata resistenza a corrosione e ad attacchi chimici, mostrano buone caratteristiche di isolamento elettrico e termico, sono intrinsecamente flessibili, hanno bassa rigidità ed elevata resistenza alla deformazione per unità di peso. Per queste caratteristiche sono inoltre adatti alla realizzazione a un costo accettabile di materiali microstrutturati, come per esempio scaffold tridimensionali e microfluidica complessa, e di materiali nanostrutturati, come nanofibre e nanoparticelle, e nella realizzazione di nanofluidica.

3.1 I materiali polimerici in medicina

Numerosi polimeri vengono attualmente impiegati nei dispositivi medici. Anche in questo paragrafo, dopo un richiamo introduttivo sui vantaggi presentati dai polimeri come biomateriali (nonché delle loro problematiche), i polimeri saranno descritti principalmente seguendo una classificazione di tipo chimico.

Come accennato in precedenza, i biomateriali polimerici sono caratterizzati da una grande facilità di fabbricazione, che permette di ottenere strutture complesse alle scale più diverse (fino al livello nanometrico, come per esempio nelle tecniche di *molecular imprinting*), un vantaggio che ne permette un ampio utilizzo nei dispositivi impiantabili, per esempio come cementi per uso ortopedico e dentistico, o nella sostituzione di giunture articolari come protesi d'anca, o ancora nelle protesi al seno e nella ricostruzione di cartilagini, per graft arteriosi e cateteri. Trovano anche un ampio impiego medicale nella realizzazione di lenti a contatto e di dispositivi quali sacche per il contenimento di fluidi, tubi di uso biomedico (trasfusioni, dialisi, alimentazione). È necessario, infine, citare l'uso dei biomateriali polimerici nella realizzazione di nanoparticelle, utili per la somministrazione localizzata di farmaci e per incrementare i tempi di permanenza in circolo dei farmaci stessi.

Considerando invece le problematiche presentate dai biomateriali polimerici, è necessario accennare alla possibilità di un deterioramento del materiale dovuto a diversi effetti. Una prima causa è da ricercarsi nel fatto che, per esempio, la catena polimerica può frammentarsi o degenerare per inversione della reazione di polimerizzazione con cui era

stata sintetizzata. Possono inoltre avere luogo fenomeni di crosslinking tra diverse catene, che possono influenzare le proprietà meccaniche per cui il polimero era stato selezionato.

Bisogna inoltre considerare che gli impianti devono essere sterilizzati prima del loro uso, una procedura ottenuta sia innalzando la temperatura (a secco fino anche a 190°C, sotto pressione in autoclave fino a circa 130°C), che utilizzando agenti chimici (gas di ossido di etilene o propilene) o radiazioni ionizzanti (raggi γ). La procedura adottata dipende dalla tipologia di polimero, in quanto ognuna può produrre effetti diversi e introdurre in misura diversa difetti nella struttura del polimero.

Un'altra importante sorgente di deterioramento dei materiali polimerici è rappresentata dall'esposizione all'ambiente biologico che inevitabilmente reagisce verso l'introduzione dell'impianto e in ogni caso rappresenta un ambiente ricco di molecole (ioni, ossigeno) in grado di iniziare fenomeni di deterioramento del polimero, innescando, di conseguenza, una più forte risposta dell'ospite.

Tra i polimeri di uso comune in biomedicina si possono citare:

Nylon: è igroscopico, la sua tenacia diminuisce una volta a contatto con acqua ed enzimi proteolitici in grado di attaccare i gruppi amidici che lo costituiscono;

Polietilene: è utilizzato nella sua forma ad alta densità per tubi e cateteri e nella sua forma a densità ultra alta per le protesi alle giunture (es. anca e ginocchio);

Polipropilene: è in grado di resistere molto bene a stress flessurali e di fessurazione, viene quindi impiegato per esempio per la realizzazione di giunti per le protesi delle dita;

Poliacrilati: sono utilizzati ampiamente per la realizzazione di cementi ossei per la fissazione di protesi e di lenti a contatto (polimetilmetacrilato (PMMA) per le lenti a contatto rigide e poliidrossietilmetacrilato (HEMA, un idrogel) per le lenti a contatto morbide);

Fluorocarburi: l'esempio più noto di questa classe è conosciuto sotto il nome commerciale di Teflon[®], è altamente cristallino e ad alta densità. Viene utilizzato sotto forma di fibre per produrre graft arteriosi;

Elastomeri: a questa classe appartengono, per esempio, i polidimetilsilossani (PDMS), che si differenziano dagli altri polimeri citati perché sono costituiti da uno scheletro silicio-ossigeno al posto del carbonio. Si tratta di materiali con scarsa resistenza meccanica, ma molto versatili per la loro eccellente flessibilità e stabilità. Possono essere migliorati inserendo particelle di silice (SiO₂) nella matrice. Sono usati per protesi al seno, valvole cardiache e per ricostruire cartilagini. In questa classe si trovano anche le gomme naturali e i poliuretani, usati spesso per ricoprire gli impianti biomedicali.

3.2 Biocompatibilità dei materiali polimerici

Gli effetti dell'introduzione di un materiale artificiale nell'ambiente biologico (corpo del paziente) si possono riassumere considerando che i tessuti biologici sono *viventi* e sono costituiti da una fitta rete strutturale *interconnessa* da fluidi ionici. Inoltre, i tessuti biologici sono da considerarsi strutturalmente dei *compositi*, cioè non sono omogenei, ma piuttosto formati da diversi tipi di sostanze con proprietà differenti (proteine strutturali, polisaccaridi, tessuti mineralizzati, tessuti elastici). L'impianto biomedicale viene quindi inserito in un sistema complesso e la struttura che entra in contatto diretto con questo sistema complesso è costituita dalla superficie dell'impianto stesso.

Le interazioni proteina-superficie sono quindi di fatto responsabili della presenza o mancanza di biocompatibilità dei materiali utilizzati per dispositivi medici. Quando un materiale solido (un catetere, uno *stent* cardiaco, un tessuto o un substrato ingegnerizzato) entra in contatto con un fluido che contiene proteine solubili (sangue, liquido interstiziale, terreno di colture cellulari), le proteine sono rapidamente adsorbite sulla superficie del materiale, saturandola in pochi secondi o minuti. Perciò, quando le cellule si avvicinano alla superficie del biomateriale, non entrano in contatto diretto con la struttura molecolare della sua superficie, bensì con la struttura molecolare dello strato di proteine adsorbite. Le cellule interagiscono con questo ambiente attraverso i loro recettori di membrana che si possono legare a specifici antigeni esposti dalle proteine adsorbite. L'interazione recettore-ligando produce un segnale trasmesso attraverso la membrana cellulare, stimolando un processo intracellulare che determina la risposta della cellula. Per questa ragione, il primo e fondamentale strumento per controllare la risposta cellulare a un biomateriale è quello di controllare la quantità, il tipo, l'orientamento e la conformazione delle proteine adsorbite sulla sua superficie.

Per aumentarne la biocompatibilità e il campo di applicazione, i materiali polimerici possono essere modificati trattandone la superficie, in modo tale da migliorarne le prestazioni in ambiente biologico senza alterarne le proprietà fisiche. Le modifiche superficiali riguardano gli aspetti fisico-chimici delle interazioni tra il polimero e l'ambiente fisiologico a livello molecolare, cellulare e dell'intero tessuto. Le modifiche superficiali più comuni per garantire la biocompatibilità dei materiali polimerici sono quelle volte a ridurre l'adesione batterica e a promuovere l'adesione cellulare.

3.3 Adesione batterica sui materiali polimerici

Uno dei problemi maggiori legati ai materiali polimerici per uso biomedicale è l'adesione di batteri e microorganismi alla loro superficie. Questi microorganismi formano pellicole anche molto spesse, il cosiddetto biofilm, in grado di compromettere la funzionalità del biomateriale e di nuocere alla salute dell'individuo che porta l'impianto. La buona biocompatibilità di questi materiali, infatti, è tale sia per l'individuo che per i microorganismi. Un biofilm è costituito da un insieme di microorganismi inclusi in una matrice generalmente polisaccaridica adesa a una superficie. Gli ambienti adatti alla colonizzazione e alla formazione di biofilm sono praticamente illimitati. Per esempio, cocci gram-positivi e *Pseudomonas aeruginosa* proliferano sulle lenti a contatto dando luogo a congiuntiviti anche gravi; *Escherichia coli* e altri batteri gram-negativi sono spesso presenti sui cateteri urinari; flora batterica e fungina mista si trova sia su dispositivi per dialisi che endotracheali; *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* colonizzano valvole cardiache meccaniche e dispositivi ortopedici e protesi varie. La presenza di biofilm dà luogo a infezioni anche gravi, che possono peggiorare ulteriormente sia per la presenza di batteri resistenti agli antibiotici (un problema grave relativo soprattutto all'ambiente ospedaliero) sia perché il sistema immunitario degli individui sottoposti a impianto biomedicale è spesso fortemente compromesso. Alcuni esempi di batteri che proliferano su materiali polimerici comunemente usati per impianti biomedicali sono mostrati in Figura 2.

Nel corso degli anni sono stati messi a punto diversi metodi per inibire l'adsorbimento di proteine e l'adesione di biofilm alle superfici polimeriche. I metodi comunemente utilizzati possono essere raggruppati in metodi chimici, meccanici ed elettrostatici.

I metodi chimici sono quelli maggiormente studiati e includono: 1) modifica chimica della superficie con agenti di rivestimento repellenti per proteine e batteri; 2) trattamento delle superfici con sali di ammonio quaternario; 3) incorporazione e rilascio di antibiotici dalla superficie; 4) utilizzo di metalli nobili, specialmente argento, sulla superficie come rivestimenti antimicrobici.

Gli agenti più comuni di rivestimento che impediscono l'adesione di proteine e batteri sono i polimeri idrofilici di varia natura: lineari, ramificati, omopolimeri o copolimeri. Essi vengono immobilizzati in modo non covalente sulla superficie, anche se più frequentemente i materiali polimerici vengono modificati con "strati a spazzola" (polimeri a elevata densità) direttamente legati in modo covalente a specifici gruppi reattivi presenti sulla superficie.

L'ammonio quaternario (QA) e i suoi derivati sono agenti antimicrobici molto noti e ampiamente usati in applicazioni industriali, nel trattamento delle acque, nei prodotti farmaceutici e cosmetici. Quando sono immobilizzati sulle superfici mostrano attività antimicrobica (danneggiamento della membrana batterica) dovuta alle loro caratteristiche cationiche e surfattanti. Tuttavia questi composti presentano un'attività citotossica non trascurabile che li rende inadatti al contatto diretto con tessuti e cellule. Per questo motivo sono soprattutto utilizzati per la realizzazione di materiale tessile ospedaliero.

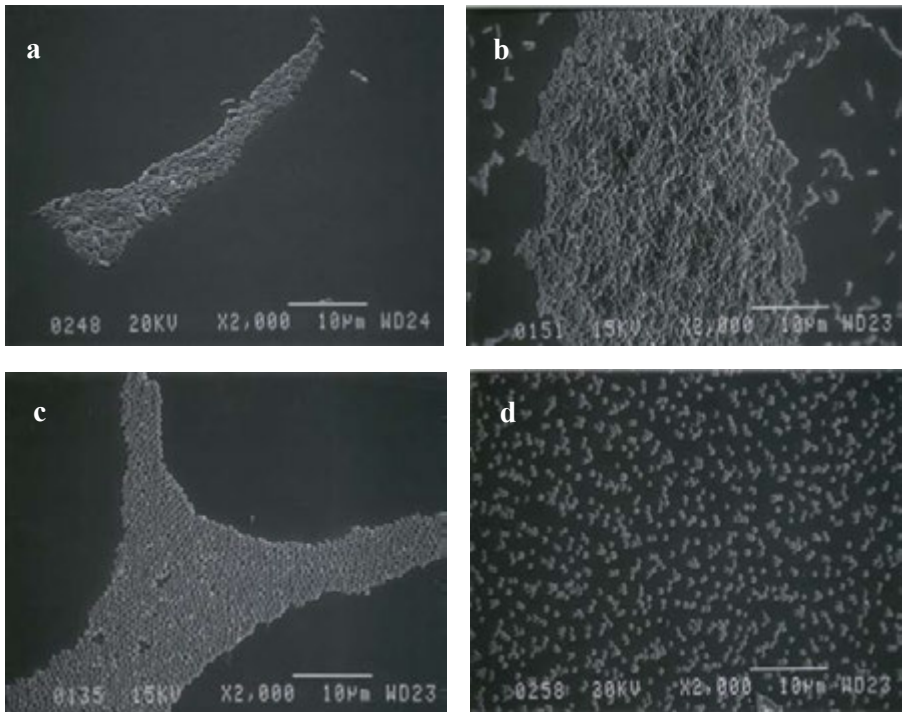


Figura 2 - Immagini al microscopio elettronico a scansione di batteri adesi a materiali polimerici per applicazioni biomedicali. a) *Escherichia coli* su PMMA; b) *Escherichia coli* su PVC; c) *Staphylococcus aureus* su PMMA; d) *Staphylococcus aureus* su PVC

Uno dei metodi chimici più studiati per impedire la formazione di biofilm sui materiali polimerici consiste nel rivestimento della superficie con agenti antimicrobici quali antibiotici, biocidi e ioni (per esempio ioni d'argento). Tutti questi composti interferiscono

con l'attacco e l'espansione del biofilm ancora allo stadio immaturo. Uno svantaggio di tale approccio deriva tuttavia dal fatto che le superfici coperte con agenti antimicrobici non sono stabili nel tempo; infatti, a contatto con i fluidi biologici l'agente antimicrobico viene rimosso in breve. Un metodo per contrastare questo problema consiste nella modifica covalente delle superfici con polimeri a catena lunga e flessibile alla cui estremità sono coniugati agenti antimicrobici (Figura 3a). Oltre all'azione antimicrobica, la presenza dei polimeri a catena lunga consente di disperdere le cellule batteriche, che, quindi, non riescono ad aderire alla superficie del biomateriale. Un'altra strategia per aumentare la stabilità nel tempo dell'azione antimicrobica consiste nel rivestire le superfici del biomateriale con agenti che consentano il rilascio graduale delle molecole antibiotiche secondo la cinetica di degradazione del rivestimento (Figura 3b). Questa strategia è molto usata in ambito ortopedico. Per esempio, l'applicazione di poli D,L-lattato o PDLA contenente gentamicina sulla superficie di impianti ortopedici ha ridotto drasticamente il rischio di infezione e accorciato i tempi di convalescenza rispetto alla somministrazione sistemica di gentamicina.

Un altro metodo efficace nel garantire la biocompatibilità e ridurre significativamente la formazione di biofilm sulle superfici polimeriche degli impianti biomedicali è l'utilizzo di argento e microparticelle di argento per ricoprire le superfici a contatto con i fluidi biologici. Infine, un lavoro recente mostra l'utilizzo di nanoparticelle contenenti ioni d'argento rilasciati gradualmente sulla superficie di cateteri ed estremamente efficaci come antimicrobici [6].

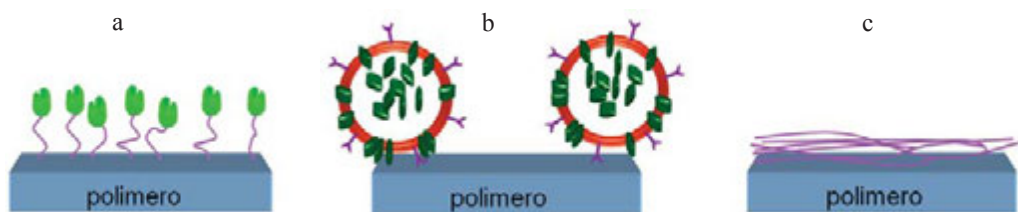


Figura 3 - Schema delle modifiche superficiali dei materiali polimerici per mantenere la biocompatibilità del materiale e scoraggiare l'adesione di proteine e la formazione di biofilm: a) modifica covalente delle superfici con polimeri a catena lunga e flessibile alla cui estremità sono coniugati agenti antimicrobici; b) rivestimento delle superfici del biomateriale con agenti che consentano il rilascio graduale delle molecole antibiotiche; c) modifica delle caratteristiche meccaniche della superficie (idrofobicità e rugosità)

La formazione di biofilm su superfici polimeriche può essere inibita, oltre che con metodi chimici, anche controllando le caratteristiche meccaniche della superficie, in particolare modificando l'idrofobicità e la rugosità superficiali (Figura 3c). È noto infatti che i microrganismi aderiscono più rapidamente a superfici idrofobiche non polari e a superfici rugose. La modifica della carica superficiale dei materiali polimerici è particolarmente efficace nel prevenire la formazione dei biofilm. Le interazioni che avvengono alla superficie del biomateriale sono infatti dovute soprattutto a effetti elettrostatici e alle forze di van der Waals. L'idrofobicità e la carica delle catene polimeriche possono essere modificate utilizzando diversi composti chimici e agenti antimicrobici.

3.4 Modifiche dei polimeri per indurre l'adesione cellulare

Uno stesso materiale polimerico usato per impianti biomedicali deve scoraggiare l'adesione di proteine e biofilm, come discusso nel paragrafo precedente, ma deve anche incoraggiare l'adesione, la migrazione e la proliferazione cellulare, specialmente se è prevista l'integrazione permanente dell'impianto nel corpo dell'individuo. I polimeri sono una delle classi di biomateriali più facilmente modificabili con gruppi reattivi che possono legare covalentemente biomolecole. I polimeri possono inoltre essere facilmente fabbricati in varie forme (strati sottili, membrane, tubi, fibre, particelle, capsule e strutture porose) e la loro composizione può variare ampiamente permettendo una modulazione fine delle loro caratteristiche fisiche.

Le interazioni tra una cellula e un biomateriale sono generalmente mediate da un fattore biologico, come proteine o peptidi in grado di riconoscere specifici recettori di adesione presenti sulla membrana cellulare. L'immobilizzazione di tali fattori biologici (o ligandi) sulle superfici polimeriche può avvenire sia con orientamento casuale che con orientamento ordinato in cluster. Quest'ultima strategia di immobilizzazione risulta maggiormente efficace, poiché le cellule mostrano un'elevata densità di recettori in prossimità di specifiche aree chiamate "adesioni focali". La concentrazione di ligandi sulla superficie potrebbe quindi aumentare il grado e la forza dell'interazione [7].

Esistono diversi esempi di proteine legate covalentemente alla superficie dei polimeri per favorire l'adesione cellulare. In particolare è stato dimostrato che le cellule epiteliali della cornea sono in grado di aderire e proliferare su idrogeli di polivinilalcol (PVA) solo quando vi sono legati il collagene e la fibronectina. Un altro esempio riguarda i dispositivi vascolari di politetrafluoroetilene impiantati *in vivo*; quando vengono pretrattati con fibronectina tali dispositivi subiscono più facilmente la colonizzazione di cellule endoteliali (endotelizzazione).

L'adesione cellulare sui materiali polimerici viene favorita non solo mediante immobilizzazione di proteine intere, ma anche di piccole sequenze peptidiche (Figura 4).

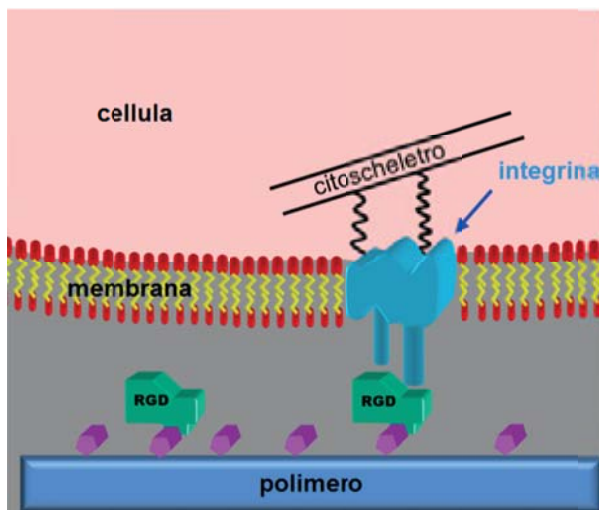


Figura 4 - Modifica dei materiali polimerici con peptidi RGD per favorire l'adesione cellulare

L'immobilizzazione di peptidi diversi può portare all'adesione cellulare ad ampio spettro oppure indirizzata a specifici tipi di cellule. Per esempio, tra i peptidi, per legare cellule ad ampio spettro c'è la sequenza Arg-Gly-Asp (Arginina, Glicina e Acido Aspartico) o peptide RGD, che si trova in molte proteine di adesione e interagisce con numerosi recettori integrinici su una varietà di tipi cellulari. Anche la sequenza Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg (YIGSR), un peptide derivato dalla laminina, è in grado di promuovere l'adesione cellulare, legandosi a un recettore non-integrinico presente su molti tipi cellulari. Per quanto riguarda peptidi specifici per determinati tipi cellulari si ricordano il peptide Ile-Lys-Val-Ala-Val (IKVAV) derivato dalla laminina, per promuovere l'adesione dei neuroni tramite recettori non integrinici e il peptide Arg-Glu-Asp-Val (REDV), derivato dalla fibronectina, che promuove l'adesione di cellule endoteliali, mentre non consente l'adesione di altre cellule vascolari o derivate dalla parete dei vasi, quali piastrine, fibroblasti, o cellule muscolari lisce. È stato utilizzato con successo per favorire l'endotelizzazione di dispositivi vascolari.

3.5 Altre molecole immobilizzate sulle superfici polimeriche per conferire biofunzionalità

Le superfici dei materiali polimerici possono essere modificate anche immobilizzando altre molecole oltre ai peptidi, in particolare molecole saccaridiche per conferire funzionalità biologiche [8]. Quelle ricercate per le superfici dei biomateriali sono svariate, ma più frequentemente si ricerca il controllo delle interazioni cellulari mediante l'immobilizzazione di fattori di crescita. Queste molecole, dopo essere state immobilizzate sulle superfici, conservano la loro abilità di fornire segnali biologici che inducono specifici comportamenti cellulari, come l'induzione della crescita dei neuriti negli assoni [9], lo stimolo all'angiogenesi [10] o il differenziamento di cellule staminali mesenchimali in osteoblasti [11].

Sulla superficie dei polimeri possono essere immobilizzate anche molecole in grado di prendere parte alle reazioni enzimatiche all'interfaccia tra la superficie e l'ambiente biologico. Per esempio, McClung e collaboratori [12] hanno immobilizzato delle lisine sul poliuretano, fatto adsorbire il plasminogeno e dimostrato che i gruppi aminici delle lisine interagiscono durante il processo di coagulazione con l'attivatore tissutale del plasminogeno (t-PA), per aumentare la dissoluzione dei coaguli di fibrina e prevenire la formazione di trombi.

Le molecole biologicamente attive più comuni che si possono immobilizzare o includere nelle superfici polimeriche, per conferire biofunzionalità specifiche, possono essere riassunte nelle seguenti classi:

Proteine/peptidi: enzimi, antibiotici (v. paragrafo 3.3), antigeni, molecole di adesione cellulare (v. paragrafo 3.4), proteine passivanti;

Zuccheri: oligosaccaridi, polisaccaridi (v. esempio citato sopra)

Farmaci: agenti antitrombotici, anticancro, antibiotici, contraccettivi, antagonisti recettoriali

Ligandi: recettori di ormoni, recettori della superficie cellulare, avidina, biotina

Altro: coniugati o miscele delle molecole sopra menzionate con proprietà combinate.

4. I materiali polimerici per applicazioni biologiche *in vitro*

Oltre a essere usati come dispositivi direttamente impiantabili nel corpo di un individuo, i materiali polimerici sono ampiamente utilizzati nei cosiddetti dispositivi medici per uso extracorporeo. Questa distinzione è chiarita esaurientemente nel volume “Dispositivi medici: aspetti regolatori e operativi” del Ministero della Salute [13], che raccoglie le direttive europee in materia e le normative vigenti, distinguendo bene tra i dispositivi medici (e i dispositivi impiantabili attivi) e i dispositivi medico-diagnostici *in vitro*. Per dispositivi medici si intende una vasta categoria di prodotti (strumenti, apparecchi, impianti, sostanze, software o altro) destinati a essere impiegati nell'uomo o sull'uomo a scopo di diagnosi, prevenzione, controllo o terapia, attenuazione o compensazione di ferite o handicap, ma anche di studio, sostituzione o modifica dell'anatomia o di un processo fisiologico, o di controllo del concepimento.

Nello stesso volume vengono definiti i dispositivi medico-diagnostici *in vitro* richiamando l'articolo 1 della direttiva 98/79/CE e del D.Lgs. 332/2000, attuativo della stessa. Per dispositivo medico-diagnostico *in vitro* si intende: “qualsiasi dispositivo medico composto da un reagente, da un prodotto reattivo, da un calibratore, da un materiale di controllo, da un kit, da uno strumento, da un apparecchio, un'attrezzatura o un sistema, utilizzato da solo o in combinazione, destinato dal fabbricante a essere impiegato *in vitro* per l'esame di campioni provenienti dal corpo umano, inclusi sangue e tessuti donati, unicamente o principalmente allo scopo di fornire informazioni su uno stato fisiologico o patologico, o su una anomalia congenita, o informazioni che consentono la determinazione della sicurezza e della compatibilità con potenziali soggetti riceventi, o che consentono il controllo delle misure terapeutiche”. Si tratta quindi di prodotti destinati a essere impiegati *in vitro* per l'esame di campioni provenienti dal corpo umano, allo scopo di fornire indicazioni analitiche di interesse chimico-clinico.

Nella classe dei dispositivi medico-diagnostici *in vitro* ricadono anche le applicazioni dei materiali polimerici per l'ottenimento di dispositivi mirati all'innovazione di consolidate pratiche sperimentali in un laboratorio biologico. La varietà di materiali polimerici impiegati per la produzione di dispositivi microfluidici è molto ampia. I polimeri comunemente usati a tale scopo includono: polidimetilsilossano (PDMS) [14], polimetilmetacrilato, policarbonato (PC), polietilentereftalato (PET), poliuretano, polivinilcloruro (PVC) e poliestere [15]. Tra i materiali polimerici utilizzati per realizzare piattaforme microfluidiche in grado di ospitare reazioni di biologia molecolare utili nelle analisi diagnostiche o nella ricerca di base, il PDMS, è diventato il più popolare negli ultimi anni. Questo fatto è dovuto a una serie di vantaggi presentati da tale polimero: semplicità di lavorazione, biocompatibilità, assenza di tossicità, eccellente trasparenza ottica, permeabilità agli scambi gassosi e, non ultimo, possibilità di realizzare dispositivi del tipo “Lab-on-a-chip” (LOC), un termine che indica un dispositivo che integra in un singolo chip e automatizza funzioni multiple che usualmente vengono svolte in laboratorio da un operatore). Nonostante tutti questi vantaggi, la forte idrofobicità delle superfici di PDMS è un ostacolo al suo utilizzo immediato in dispositivi microfluidici e richiede in ogni caso un trattamento superficiale. Uno dei problemi maggiori da affrontare nell'utilizzo di microdispositivi in PDMS è l'adsorbimento di proteine o analiti sulla superficie idrofobica, che determina basse prestazioni del dispositivo e sostanziale perdita di campione da

analizzare. Il PDMS infatti è formato da unità ripetute $-\text{OSi}(\text{CH}_3)_2-$ che rendono estremamente flessibili le sue catene, ma nel contempo rendono la superficie idrofobica per la presenza dei gruppi CH_3 .

Un esempio dell'utilizzo del PDMS chimicamente modificato sono i microdispositivi per semplificare le procedure di purificazione degli acidi nucleici: in questi dispositivi si favorisce l'adsorbimento degli acidi nucleici, DNA o RNA di diversa natura (microRNA e RNA virale), sulla superficie del PDMS opportunamente funzionalizzato [16-18]. Uno studio recente [17] dimostra come, modulando chimicamente la superficie di un microdispositivo in PDMS con una miscela di amminosilano (a carica positiva) e PEG silani (a carica neutra) con catena di lunghezza diversa, sia possibile modulare la superficie del polimero in termini di carica superficiale e rugosità. Tale operazione è in grado di rendere la superficie del polimero opportunamente adesiva per la cattura di microRNA (piccole molecole di RNA di 18-22 nucleotidi di interesse come biomarcatori dello stato fisiologico e patologico di un individuo) da campioni biologici quali siero e plasma umano. Una strategia analoga è stata inoltre utilizzata per la purificazione e l'analisi dell'RNA genomico del virus dell'epatite C [18]. Questi studi si sono dimostrati interessanti per le applicazioni di microdispositivi in PDMS, poiché, dopo la cattura sulla superficie del microdispositivo, gli acidi nucleici risultano disponibili per le classiche reazioni di biologia molecolare di amplificazione genica (retrotrascrizione e amplificazione mediante la reazione a catena della polimerasi o PCR) che avvengono all'interno del medesimo dispositivo. In questo modo viene realizzato un dispositivo che è in grado di: i) separare gli acidi nucleici (DNA, microRNA, RNA virale) dalle componenti cellulari che possono inibire le reazioni successive; ii) ottenere DNA a partire dall'RNA adeso alle superfici (retrotrascrizione), introducendo nella cameretta del dispositivo enzimi opportuni; iii) amplificare in modo esponenziale il DNA ottenuto al passo i) o ii) tramite PCR. La reazione di PCR moltiplica esponenzialmente il DNA presente inizialmente attraverso una successione di cicli di reazione (tipicamente 20-50), duplicandolo a ogni ciclo grazie alle capacità di riconoscimento specifico delle coppie di basi (A-T e G-C) che è intrinseco alla struttura a doppia elica del DNA [19]. Funzionalizzando in maniera opportuna le superfici del PDMS è quindi possibile eseguire semplici analisi genetiche, come per esempio identificare marcatori specifici per malattie ereditarie oppure determinare la presenza di determinati microRNA collegati alla presenza di tumore o altre patologie in un campione di sangue o in un tessuto biologico (Figura 5). Questo dimostra come il PDMS sia un materiale polimerico altamente compatibile con le reazioni di biologia molecolare, dotato di una sufficiente conduzione del calore necessario per far avvenire le reazioni (che richiedono cicli termici con variazioni di temperatura di decine di gradi in pochi secondi) e basso adsorbimento aspecifico dei reagenti impiegati per la retrotrascrizione e l'amplificazione, caratteristica che unita alla semplicità di fabbricazione lo rende particolarmente interessante per lo sviluppo di LOC a basso costo.

Come accennato in precedenza, esistono altri polimeri oltre il PDMS molto usati nei microdispositivi e LOC. I più utilizzati sono le cicloolefine (COC), il polimetilmetacrilato (PMMA) e l'SU-8 (un fotoresist negativo a base epossidica). Rispetto al PDMS tutti questi polimeri hanno il vantaggio di essere facilmente prodotti in forme anche micro e nanostrutturate mediante stampaggio o litografia, tecniche scalabili verso una produzione di grosse quantità. Purtroppo, le superfici di questi polimeri non sempre sono direttamente

compatibili con le reazioni che il dispositivo ospiterà e necessitano quindi di ulteriori trattamenti superficiali [20-22].

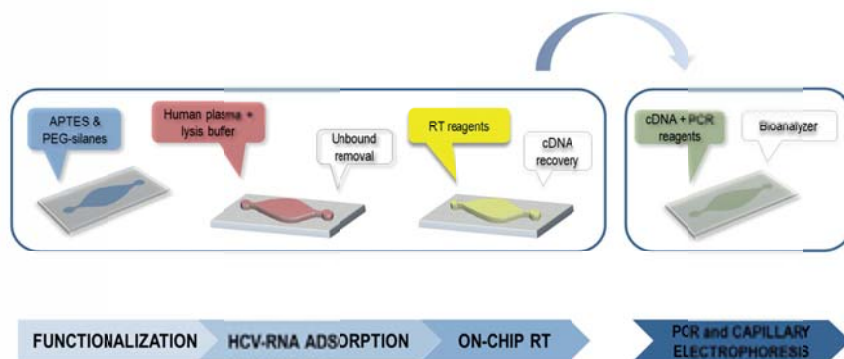


Figura 5 - Esempio di funzionalizzazione superficiale di un microdispositivo in PDMS usato per la purificazione dell'RNA genomico del virus dell'epatite C presente nel plasma umano L'RNA viene adsorbito dalle pareti del chip funzionalizzato e usato come stampo per essere retro-trascritto in cDNA (DNA complementare). Il cDNA risultante viene spostato in un secondo microdispositivo dove vengono aggiunti i reagenti della PCR che amplificheranno il DNA relativo a una sequenza specifica del virus dell'epatite C. Il prodotto della PCR viene poi analizzato mediante elettroforesi capillare

Riferimenti bibliografici

- [1] D.F. Williams Definitions in biomaterials. Progress in biomedical engineering, 4 (p. 72) Elsevier, Amsterdam (1987)
- [2] D.F. Williams On the mechanisms of biocompatibility Biomaterials 29(20) 2941–2953 (2008)
- [3] D.F. Williams On the nature of biomaterials. Biomaterials 30,5897–5909 (2009)
- [4] B.C. Bunker, P.C. Rieke, B.J. Tarasevich, A.A. Campbell, G.E. Fryxell, G. Graff, L. Song, J. Liu, J. Virden, G. Mc Vay Science 264, 48-55 (1994)
- [5] W.K. Cho, M.J. Maio Nunes Pereira, N. Lang, K. Lee, S. Mureli, A. Zumbuehl, C. Sundback, P.T. Masiakos, D.J.D. Carter, J. Borenstein, L. Ferreira, R. Langer, J.M. Karp Gecko-Inspired Tape-Based Adhesives S.K. Bhatia (ed.) Engineering Biomaterials for Regenerative Medicine: Novel Technologies for Clinical Applications, Springer Science+Business Media, New York (2012)
- [6] M. Agarwala, B. Choudhury, R.N.S. Yadav Comparative Study of Antibiofilm Activity of Copper Oxide and Iron Oxide Nanoparticles Against Multidrug Resistant Biofilm Forming Uropathogens Indian J Microbiol 54(3), 365–368 (2014)
- [7] D.J. Irvine, A.M. Mayes, L.G. Griffith Nanoscale clustering of RGD peptides at surfaces using Comb polymers 1. Synthesis and characterization of Comb thin films Biomacromolecules 2(1) 85-94 (2001)
- [8] K.-C. Chang, D.A. Hammer Adhesive Dynamics Simulations of Sialyl-Lewisx/E-selectin-Mediated Rolling in a Cell-Free System Biophys J. 79, 1891–1902 (2000)
- [9] S.E. Sakiyama-Elbert, A. Panitch, J.A. Hubbell Development of growth factor fusion proteins for cell triggered drug delivery The FASEB Journal Express article 10.1096/fj00-0564fje (2001)

- [10] A.H. Zisch, U. Schenk, J.C. Schense, S.E. Sakiyama-Elbert, J.A. Hubbell Covalently conjugated VEGF–fibrin matrices for endothelialization *J.Control Release* 72, 101–113 (2001)
- [11] M.P. Lutolf, F.E. Weber, H.G. Schmoekel, J.C. Schense, T. Kohler, R. Müller, J.A. Hubbell Repair of bone defects using synthetic mimetics of collagenous extracellular matrices *Nat Biotechnol.* 21, 513-518 (2003)
- [12] W.G. McClung, D.L. Clapper, S.-P. Hu, J.L. Brash Lysine-derivatized polyurethane as a clot lysing surface: conversion of adsorbed plasminogen to plasmin and clot lysis in vitro *Biomaterials* 22, 1919-1924 (2001)
- [13] Ministero della Salute Dispositivi medici: aspetti regolatori ed operativi (2010)
- [14] J. Cooper McDonald, D.C. Duffy, J.R. Anderson, D.T. Chiu, H. Wu, O.J.A. Schueller, G.M. Whitesides Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane) *Electrophoresis* 21, 27-40 (2000)
- [15] H. Shadpour, H. Musyimi, J. Chen, S.A. Soper Physiochemical properties of various polymer substrates and their effects on microchip electrophoresis performance. *J. Chromatogr A*, 1111: 238–251 (2006)
- [16] L. Pasquardini, C. Potrich, M. Quaglio, A. Lamberti, S. Guastella, L. Lunelli, M. Cocuzza, L. Vanzetti, C.F. Pirri, C. Pederzoli Solid phase DNA extraction on PDMS and direct amplification *Lab Chip.* 11(23), 4029-35 (2011)
- [17] C. Potrich, V. Vaghi, L. Lunelli, L. Pasquardini, G.C. Santini, C. Ottone, M. Quaglio, M. Cocuzza, C.F. Pirri, M. Ferracin, M. Negrini, P. Tiberio, V. De Sanctis, R. Bertorelli, C. Pederzoli OncomiR detection in circulating body fluids: a PDMS microdevice perspective *Lab Chip.* 14(20), 4067-75 (2014)
- [18] V. Vaghi, C. Potrich, L. Pasquardini, L. Lunelli, L. Vanzetti, E. Ebranati, A. Lai, G. Zehender, D. Mombello, M. Cocuzza, C.F. Pirri, C. Pederzoli On-chip purification and detection of hepatitis C virus RNA from human plasma *Biophys Chem.* 208,54- (2016)
- [19] K. Mullis, F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, H. Erlich Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 51 Pt 1, 263-73 (1986)
- [20] H.-K. Koponen, I. Saarikoski, T. Korhonen, M. Paakko, R. Kuisma, T.T. Pakkanen, M. Suvanto, T.A. Pakkanen Modification of cycloolefin copolymer and poly(vinyl chloride) surfaces by superimposition of nano- and microstructures *Appl Surf Sci.* 253, 5208–5213 (2007)
- [21] J.J. Shah, J. Geist, L.E. Locascio, M. Gaitan, M.V. Rao, W.N. Vreeland Surface modification of poly(methylmethacrylate) for improved adsorption of wall coating polymers for microchip electrophoresis *Electrophoresis* 27, 3788–3796 (2006)
- [22] A. Deepu, V.V. Sai, S.A. Mukherji Simple surface modification techniques for immobilization of biomolecules on SU-8 *J. Mater. Sci: Mater. Med.* Dec;20 Suppl 1, S25-8 (2009)

Riferimenti bibliografici per approfondire

- J.B. Park, R.S. Lakes Biomaterials. Springer Books ISBN: 978-0-387-37879-4 (Print) 978-0-387-37880-0 (Online) (2007)
- B.D. Ratner, A.S. Hoffman, F.J. Schoen, J.E. Lemons Biomaterials Science: an introduction to materials in medicine 2nd ed. Academic Press, New York (2004)
- J.J. Swartjes, P.K. Sharma, T.G. van Kooten, H.C. van der Mei, M. Mahmoudi, H.J. Busscher, ET. Rochford Current Developments in Antimicrobial Surface Coatings for Biomedical Applications *Curr. Med. Chem.* 22(18) 2116-29 (2015)
- J. Hasan, R.J. Crawford, E.P. Ivanova Antibacterial surfaces: the quest for a new generation of biomaterials *Trends Biotechnol.* 31(5), 295-304 (2013)
- A. Tathe, M. Ghodke, A.P. Nikalje A Brief Review: Biomaterials and Their Application *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* Vol 2, Suppl 4, 1923 (2010)
- P. Yadav, H. Yadav, V.G. Shah, G. Shah, G. Dhaka Biomedical Biopolymers, their Origin and Evolution in Biomedical Sciences: A Systematic Review *J. Clin. Diagn. Res.* 9(9), ZE21-ZE25 (2015)