

MINISTERO DELL'ISTRUZIONE DELL'UNIVERSITÀ E DELLA RICERCA
Dipartimento per la formazione superiore e per la ricerca
Direzione Generale per il coordinamento, la promozione e la
valorizzazione della Ricerca
BANDO "AIM" (ATTRACTION AND INTERNATIONAL MOBILITY)

CODICE PROPOSTA: AIM1840348-1

S.S.D.: BIO/16

S.C.: 05/H1

Attività N. 1

1. Area di specializzazione prevalente tra quelle relative alla SNSI

Salute

2. Sintetica descrizione dello stato dell'arte e delle collaborazioni eventualmente già in essere

Metà della spesa sanitaria negli Stati Uniti d'America e nell'Unione Europea dipende dai trapianti di organi e dalla degenerazione funzionale dei tessuti (Karp et al. 2007). I costi dei trapianti ammontano a circa 8 milioni di dollari americani, mentre i giorni di degenza e trattamento in ospedale hanno una spesa media tra i 40 ed i 90 milioni (giorni/anno) di dollari americani. In Italia, la spesa media per i trapianti ha un costo pari a circa 500 mila euro esclusi i costi di degenza post-operatori. La regione Abruzzo è in linea con questi costi.

Tutto ciò ha portato l'ingegneria tissutale e la medicina rigenerativa ad avere un ruolo rilevante in campo biomedico e nella rigenerazione dei tessuti.

Un passo in avanti in questo settore è legato allo sviluppo di biomateriali polimerici naturali e sintetici per la preparazione di scaffolds biocompatibili, biodegradabili, con proprietà biomeccaniche, biofisiche e funzionali simili ai tessuti da rigenerare (Garg and Goyal, 2014). Queste strutture, favorendo il trasporto di micronutrienti, l'adesione, la proliferazione, il commissionamento, il differenziamento delle cellule staminali mesenchimali implicate nella neogenesi e rigenerazione tissutale (Schumann et al. 2007), migliorano e ripristinano il funzionamento di organi e tessuti alterati, che normalmente vengono trapiantati.

Gli scaffolds possono essere modificati con nanoparticelle ibride e composti biologicamente attivi, proteggendo i tessuti dalla colonizzazione da parte di microrganismi patogeni produttori di biofilm (Koo et al. 2017), o possono co-veicolare farmaci e materiale genetico (Fresta et al. Ns. rif. IPT-12906; 02/03/2018; AdR/ev; Brevetto N° 10201500060754). Queste proprietà rendono gli scaffolds e le nanoparticelle ibride attrattive per la rigenerazione di tessuti ossei e molli.

Il Dipartimento di Farmacia, forte della collaborazione internazionale con le Università di Helsinki, di Regensburg e dell'OHIO, propone di ideare/realizzare scaffolds a base di biomateriali innovativi integrati con nanosistemi ibridi per la rigenerazione dei tessuti e relative applicazioni in campo biomedico. Queste tematiche di ricerca hanno permesso di ottenere il cofinanziamento di diversi progetti:

- a. Finalizzato, Ministero della Salute, GR-2016-02363070; FIRB – MIUR, RBAP1095CR_001;*
- b. Contratto di ricerca BioGaia AB, 2018;*
- c. Dottorato di Ricerca "Innovativo a caratterizzazione industriale" 2017/2018, DOT13A8025;*
- d. Dottorato di ricerca europeo FIRB – MIUR 2012, RBAP1095CR_001.*

La collaborazione scientifica con il Prof. Helder A. Santos, Università di Helsinki, riguarda lo sviluppo di nanoparticelle ibride e scaffolds biocompatibili e multifunzionali nelle applicazioni biomediche e nella medicina rigenerativa. Questa collaborazione ha portato al cofinanziamento del progetto DOT13A802, ed alla pubblicazione di 1 lavoro di ricerca (Balasubramanian et al. 2018). Inoltre, la collaborazione fa parte dei programmi di scambio bilaterale (Erasmus), che prevedono le attività di ricerca per la mobilità di docenti e studenti (Programma Erasmus).

La collaborazione scientifica con il Prof. Helmut Schweikl, Università di Regensburg, ha permesso di finanziare un Dottorato di Ricerca Europeo, consentendo allo studente di acquisire nuove competenze nello studio della risposta molecolare e biologica di cellule mesenchimali ai biomateriali, ed ha prodotto 3 lavori scientifici (Schweikl et al. 2017, 2017; Gallorini et al. 2015) e numerose comunicazioni a congressi internazionali (International Association of Dental Research).

La collaborazione scientifica con il Prof. Paul Stoodley, Università dell'OHIO, infine ha portato ad ospitare presso i suoi

laboratori due giovani ricercatori, che hanno acquisito e trasferito al Dipartimento di Farmacia nuove competenze sulla Microscopia Confocale Laser a Scansione (CLSM) ed analisi reologica di biomateriali, ed alla pubblicazione di 3 lavori di ricerca (Grande et al. 2017, 2015, 2014).

3. Descrizione delle attività previste

Il Dipartimento di Farmacia avrà come obiettivo lo sviluppo di biomateriali innovativi integrati con nanosistemi ibridi per la realizzazione di scaffolds funzionali e la loro valutazione in modelli sperimentali in vitro and in vivo da utilizzare nella rigenerazione dei tessuti e nelle applicazioni in campo biomedico. In particolare, sarà valutata la biocompatibilità, la capacità di rigenerare il tessuto osseo ed i tessuti molli, la risposta infiammatoria, immunitaria, e batterica, prevedendo le seguenti attività.

Attività 1: Preparazione e caratterizzazione

Gli scaffolds saranno realizzati utilizzando 3 metodiche: i) elettrofilatura; ii) sistema microfluidico; iii) stampanti tridimensionali. Queste metodologie permetteranno di ottenere scaffolds contenenti nanoparticelle ibride caricate con farmaci e composti biologicamente attivi.

La struttura degli scaffolds sarà fondamentale per: i) depositare la matrice extracellulare (ECM); ii) caricare nanoparticelle ibride, complessi metallici e macromolecolari, farmaci e composti biologicamente attivi; iii) favorire i processi d'iterazione sito-specifico con i tessuti ed elettrostatici con le particelle. L'acquisizione di queste competenze sarà garantita dalla mobilità in attrazione di un ricercatore con elevata esperienza sia sulla sintesi dei biomateriali e sia sulla fabbricazione e caratterizzazione di scaffolds e nanoparticelle ibride per il drug delivery, competenze presenti nei laboratori del Prof. Santos (Università di Helsinki).

Le nanoparticelle ibride saranno preparate utilizzando le metodiche: i) thin layer evaporation, ii) estrusione, iii) omogenizzazione ad alta pressione, iv) liofilizzazione, v) dialisi inversa, v) sistema microfluidico. La scelta del metodo sarà determinata dalle caratteristiche dei biomateriali usati per preparare le nanoparticelle e dalle proprietà degli scaffolds. Il ricercatore in attrazione trasferirà competenze riguardanti il sistema microfluidico per realizzare gli scaffolds e le nanoparticelle ibride per il drug delivery dall'Università di Helsinki al Dipartimento di Farmacia.

La superficie degli scaffolds sarà funzionalizzata con complessi metallici e macromolecolari, utilizzando polimeri carichi positivamente permettendo di mantenere l'attività anti-batterica delle nanoparticelle sia prima sia dopo adesione e crescita delle cellule staminali mesenchimali e stromali.

Gli scaffolds e le nanoparticelle ibride saranno caratterizzati sotto il profilo chimico-fisico, biomeccanico e biofisico utilizzando lo scattering dinamico di luce, l'analisi reologica, la microscopia elettronica a scansione (SEM) e trasmissione (TEM), la diffrattometria laser ai raggi X, l'analisi elementare. L'efficienza d'intrappolamento ed il rilascio dei farmaci/composti biologicamente attivi dagli scaffolds e dalle nanoparticelle ibride saranno studiati mediante cromatografia liquida ad alta prestazione. Le ultrastrutture degli scaffolds saranno studiate mediante microscopia confocale e a fluorescenza, mentre quelle delle nanoparticelle mediante risonanza magnetica nucleare.

Attività 2: Biocompatibilità in vitro ed in vivo ed effetto rigenerativo

La biocompatibilità dei biomateriali degli scaffolds e delle nanoparticelle ibride e la risposta molecolare saranno valutate in vitro utilizzando cellule staminali mesenchimali isolate della polpa (DPSCs) dentale e odontoblasti. Queste competenze saranno acquisite attraverso la mobilità in uscita verso l'Università di Regensburg di un ricercatore, che acquisirà e trasferirà al Dipartimento di Farmacia conoscenze sull'organogenesi e sulle varie fasi dello sviluppo di apparati, sistemi ed organi e dei relativi aspetti funzionali nei vari periodi della vita. La capacità di adesione cellulare sarà valutata mediante SEM, mentre l'ultrastruttura dopo internalizzazione cellulare delle nanoparticelle ibride mediante TEM. La capacità di differenziamento osteogenico con gli scaffolds e le nanoparticelle ibride sarà valutata misurando l'espressione di geni e proteine, coinvolti nel differenziamento e nella deposizione di ECM tramite colorazioni specifiche. La biocompatibilità in vivo dei biopolimeri, degli scaffolds e delle nanoparticelle ibride, la capacità di modulare il processo di rigenerazione e ripristinare l'attività dei tessuti ossei saranno testate su modelli di ratto e di coniglio.

Attività 3: Risposta cellulare allo stress ossidativo e infiammatorio

La risposta allo stress ossidativo sarà valutata sia con gli scaffolds caricati con nanoparticelle ibride sia con le sole nanoparticelle. I saggi di attività metabolica e di citotossicità saranno utilizzati per: i) valutare la biocompatibilità dei materiali; ii) dosare le specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto con sonde citofluorimetriche; iii) misurare il potenziale di membrana, la massa mitocondriale e l'acidità del compartimento lisosomiale in risposta a queste specie reattive. Sarà anche valutata l'attività degli enzimi coinvolti nella risposta infiammatoria, l'espressione di proteine e fattori di trascrizione indotta dallo stress ossidativo, il rilascio di citochine pro-infiammatorie.

Il ricercatore in mobilità verso l'Università di Regensburg acquisirà e trasferirà competenze per lo sviluppo in vitro di modelli di co-cultura di cellule DPSCs e macrofagi per misurare la risposta infiammatoria nel tessuto impiantato con gli scaffolds e le nanoparticelle e per confrontare la risposta infiammatoria ed il differenziamento delle cellule mesenchimali (parametri riportati nell'Attività 2).

Attività 4: Effetto antimicrobico ed anti-biofilm

*Gli scaffolds e le nanoparticelle ibride potrebbero rappresentare una strategia per contrastare lo sviluppo di biofilm microbici e limitare il fenomeno dell'antibiotico-resistenza. Saranno valutate le concentrazioni minime inibenti e battericide dei biomateriali verso ceppi di riferimento internazionale (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus spp*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Propionibacterium acnes*) allo scopo di determinare la loro concentrazione più efficace e non tossica nei confronti delle cellule eucariotiche. Gli stessi saggi saranno eseguiti con scaffolds con o senza nanoparticelle ibride. In seguito, sarà valutata la potenziale attività antimicrobica e/o antibiofilm degli scaffolds e/o delle nanoparticelle ibride su ceppi di *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus spp* e *Pseudomonas aeruginosa* isolati da pazienti con patologie dell'apparato osseo e sul ceppo di riferimento internazionale *Propionibacterium acnes* ATCC*

11827. I ceppi saranno precedentemente caratterizzati per la resistenza ai farmaci antimicrobici e la capacità di sviluppare biofilm in vitro. L'attività antimicrobica/anti-biofilm sarà valutata mediante: i) conta delle unità formanti colonia; ii) SEM; iii) microscopia CLSM., Sarà valutata l'efficacia di tali sistemi su microrganismi, che penetrano negli osteoblasti con un protocollo sperimentale sviluppato dal Prof. Stoodley (Dusane et al. 2017) poiché lo *Staphylococcus aureus* è in grado di invadere e proliferare all'interno degli osteoblasti. Il ricercatore in mobilità verso l'Università dell'OHIO acquisirà e trasferirà questa tecnica presso il Dipartimento di Farmacia. Questo ricercatore, che avrà le competenze sullo studio delle basi cellulari e molecolari della patogenicità microbica, sulle interazioni microrganismo-ospite, trasferirà dai laboratori del Prof. Stoodley al Dipartimento di Farmacia, le metodiche di microscopia CLSM accoppiata ad analisi d'immagine con i software COMSTAT, Imaris e Matlab, e nuove metodiche di colorazione e rilievo biofisico dei biofilm microbici (Dusane et al. 2017). Il ricercatore in mobilità trasferirà anche dall'Università dell'OHIO le competenze per la valutazione delle proprietà biomeccaniche (reologia, fluorescenza) dei biofilm batterici, ottenuti da ceppi microbici fluorescenti, prima e dopo trattamento con gli scaffolds e/o le nanoparticelle.

4. Aspetti di coerenza della richiesta con l'area di specializzazione prevalente

Il progetto di ricerca si colloca nell'Area delle tecnologie produttive della Salute e tra le finalità delle Red Biotech, che trasforma la ricerca di eccellenza in nuovi prodotti tecnologici per la cura e la salute dei pazienti. In sinergia con la SNSI s'intende formare e attrarre ricercatori esperti, che sappiano cogliere le sfide dinamiche della ricerca scientifica e del trasferimento tecnologico nel settore della medicina rigenerativa e dei biomateriali. L'interesse per questo settore è confermato dalla decisione Europea di finanziare progetti H2020 in entrambi questi campi di applicazione. Il settore Salute è, inoltre, uno dei 5 domini tecnologici d'interesse strategico, individuati dal Piano operativo FSE Abruzzo 2016-2020, ed è allineato alle politiche e strategie di sviluppo Regionale per l'innovazione scientifica e lo sviluppo tecnologico inserendosi nel piano strategico PNR ed in quello di sviluppo PON R&I 2014-2020. Lo sviluppo di questo settore sarà favorito dalla presenza sul territorio regionale di aziende, come Assut Europe e Dompé, e dalla scelta della Regione Abruzzo di sottoscrivere con alcune imprese del territorio la "Carta per l'industria sostenibile", che prevede una serie di azioni (programmi FESR e FSE 2014/2020) a favore delle aziende ed istituzioni che hanno aderito ai principi della Carta. Le collaborazioni con le Università di Helsinki, di Regensburg e dell'OHIO consentiranno (Attività 1-4) ai ricercatori di trasferire ed implementare le loro conoscenze riguardo la sintesi, la caratterizzazione e l'applicazione dei biomateriali, degli scaffolds e delle nanoparticelle ibride da utilizzare nella rigenerazione dei tessuti molli ed ossei. Per questo motivo e facendo riferimento alla Sezione 5, il Dipartimento di Farmacia intende reclutare nel Piano Operativo per le attività di Attrazione e Mobilità, ed in particolare nel settore Salute, numero 2 Ricercatori della linea 1 e numero 1 Ricercatore della linea 2.