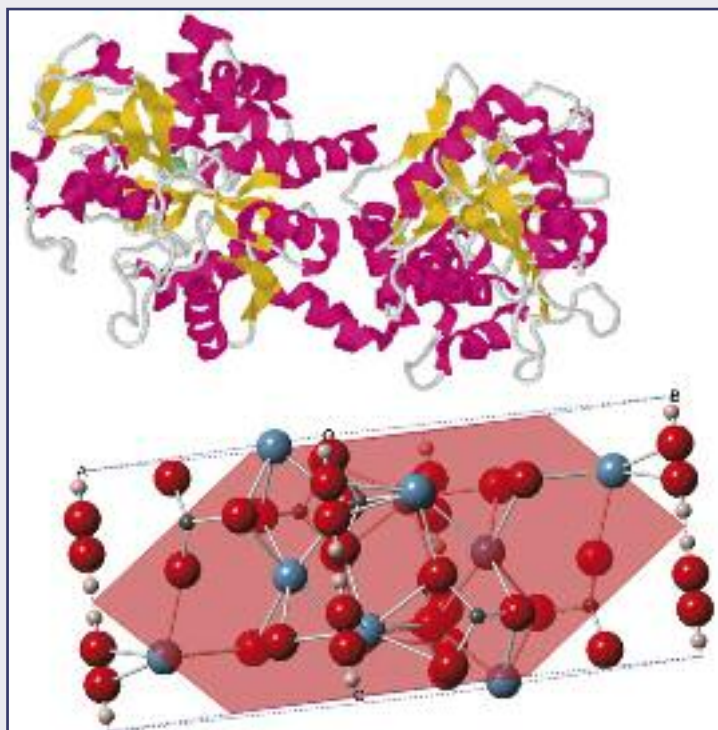




Michele Iafisco^{1,2}, Sergio Bonora³, Michele Di Foggia³,
Maria Prat², Norberto Roveri¹

¹Dipartimento di Chimica 'G. Ciamician'
Università di Bologna

²Dipartimento di Scienze Mediche
Università del Piemonte Orientale

³Dipartimento di Biochimica 'G. Moruzzi'
Università di Bologna
michele.iafisco@med.unipmn.it

FUNZIONALIZZAZIONE DI NANOCRISTALLI BIOMIMETICI DI IDROSSIAPATITE CON LATTOFERRINA PER APPLICAZIONI BIOMEDICHE

La lattoferrina, una proteina con importanti proprietà biologiche, è stata adsorbita su nanocristalli di idrossiapatite biomimetica a due diversi pH (7,4 e 9,0) per aumentarne le loro proprietà di osteointegrazione e osteoconduzione. L'interazione è stata studiata attraverso tecniche spettroscopiche e calorimetriche.

L'interazione tra proteine e materiali inorganici è un fenomeno fondamentale dalle molte applicazioni in svariati campi scientifici, quali medicina, farmacia, nanotecnologia, sensoristica e bioingegneria [1]. Nel campo dei biomateriali l'interesse in questo ambito è dovuto principalmente alla tendenza delle proteine a depositarsi sulle superfici dei dispositivi medici ed al ruolo giocato da questo deposito proteico nella successiva interazione con le cellule. L'organizzazione di questo "biofilm" è strettamente correlata con le particolari proprietà delle superfici così come con le caratteristiche delle proteine presenti nell'ambiente dell'impianto. Le proprietà delle proteine ed il loro comportamento all'interfaccia materiale-tessuto biologico devono quindi essere ben compresi, poiché la conseguente risposta cellulare

(meccanismi di difesa e riparo) determinerà la biocompatibilità del materiale [2]. Questi studi sono di particolare importanza anche per quanto riguarda l'impatto di materiali estranei sui processi biologici; infatti la conoscenza di tale interazione è essenziale per capire i meccanismi con cui si manifestano eventuali tossicità e cancerogenità, poiché le proprietà ad esse correlate sono fortemente influenzate dall'adsorbimento sulla superficie di molecole e macromolecole, come proteine, lipidi di membrana e acidi nucleici [3]. Nel campo delle nanotecnologie invece, l'interazione delle proteine con le superfici inorganiche può essere utile nella costruzione di sensori, attivatori e materiali funzionalizzati [4, 5].

L'idrossiapatite sintetica $[\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}]$ (HA), che mima le caratteristiche chimico-fisiche della componente inorganica delle ossa e dei denti, è

Questo articolo è dedicato al prof Alberto Ripamonti per il suo 80° compleanno

stata ampiamente studiata per le sue importanti applicazioni biomedicali, come sostitutivi ossei, scaffolds cellulari in ingegneria tissutale, rivestimenti per protesi metalliche e trasportatori di farmaci e proteine [6]. La fase minerale delle ossa è fatta di cristalli nanometrici di idrossiapatite carbonatata di lunghezza di circa 100 nm, larghezza di 20-30 nm e spessore di circa 3-6 nm [7]. Per essere biomimetica, l'idrossiapatite deve essere sintetizzata con dimensioni simili a quella biogenica e perciò in scala nanometrica, deve avere la stessa morfologia, essere poco cristallina e avere la presenza di ioni carbonato nel reticolo cristallino [8].

La lattoferrina (LF) è una proteina non-eme che lega il ferro e che fa parte della famiglia delle transferrine. La LF si trova nelle secrezioni delle mucose, come ad esempio saliva, lacrime, secrezioni nasali e bronchiali, bile, fluidi gastrointestinali, urina e per la maggior parte nel latte, dov'è la seconda proteina più abbondante dopo la caseina. La LF si trova in proporzioni considerevoli anche in fluidi come il plasma del sangue e il liquido amniotico. La LF possiede una grande affinità per il ferro ed è l'unica transferrina in grado di legare questo metallo in un grande intervallo di pH, compresi quelli estremamente acidi [9]. La carica netta positiva della LF e la sua distribuzione in vari tessuti ne fanno una proteina multifunzionale. È coinvolta in numerose funzioni fisiologiche che includono: regolazione dell'assorbimento del ferro, risposta immunitaria; proprietà antiossidanti, anticarcinogeniche e antinfiammatorie e protezione contro infezioni da microbi. L'attività antimicrobica della LF è per lo più dovuta a due meccanismi. Il primo è il sequestro di ferro nei siti di infezione, fatto che priva i microorganismi di questo nutriente, creando un effetto batteriostatico. L'altro meccanismo è un'interazione diretta della molecola di LF con l'agente infettivo [10]. Recentemente è stato verificato che la LF è un fattore di crescita degli osteoblasti; la mitogenesi degli osteoblasti aumenta significativamente e in maniera dipendente dalla sua dose a partire da concentrazioni di 0,1 $\mu\text{g/mL}$. Inoltre, la LF agisce come fattore di sopravvivenza degli osteoblasti, diminuendone l'apoptosi a concentrazioni mag-

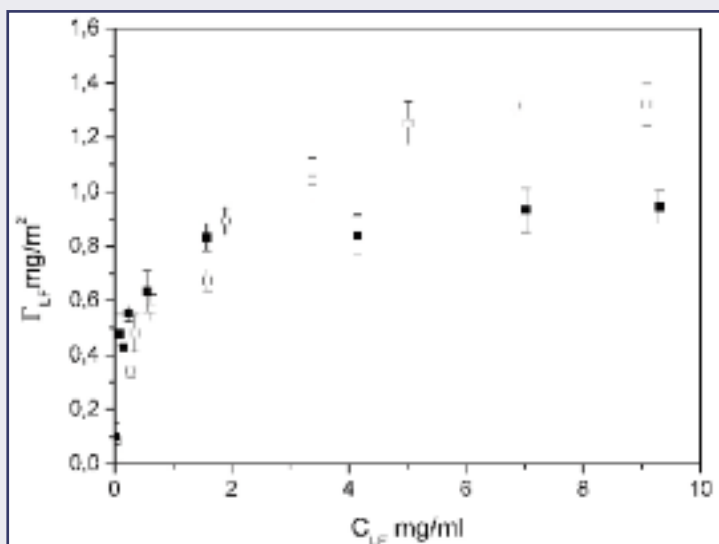


Fig. 2 - Curve di adsorbimento isoterme della lattoferrina sui nanocristalli di idrossiapatite a pH 7,4 (■) e a pH 9,0 (□)

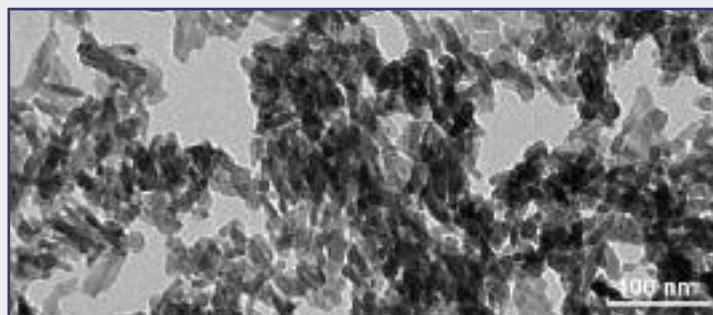


Fig. 1 - Immagine di microscopia a trasmissione elettronica (TEM) dei nanocristalli di idrossiapatite sintetica utilizzati in questo lavoro

giori di 1 $\mu\text{g/mL}$. Inoltre, essa regola l'attività degli osteoclasti, infatti ne riduce la formazione a concentrazioni maggiori di 1 $\mu\text{g/mL}$. Questi dati dimostrano che *in vivo* la lattoferrina ha un effetto anabolico per l'osso, come conseguenza della sua potente azione proliferativa e anti-apoptica sugli osteoblasti, e della sua capacità di inibire l'osteoclastogenesi. La LF potrebbe perciò avere un ruolo fisiologico nella crescita delle ossa e un ruolo potenzialmente terapeutico nell'osteoporosi [11].

Lo scopo di questo lavoro è studiare l'interazione della LF con la superficie di nanocristalli biomimetici di idrossiapatite a due differenti valori di pH (7,4 e 9,0). Inoltre usando le tecniche di spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FT-IR) e spettroscopia Raman a trasformata di Fourier (FT-Raman) è stato messo in evidenza che il substrato inorganico influenza soltanto in maniera parziale la conformazione della proteina.

Per raggiungere questo scopo sono stati sintetizzati nanocristalli di HA simili a quelli biogenici aventi un rapporto Ca/P di 1,67 e una morfologia a piattine di dimensioni di circa 15 nm (Fig. 1). Il rapporto Ca/P superficiale, determinato attraverso misure di spettroscopia fotoelettronica indotta da raggi X (XPS), è risultato essere significativamente più basso (1,45) rispetto a quello in *bulk* a causa del disordine superficiale tipico dei nanocristalli biomimetici poco cristallini [12]. L'area superficiale specifica, determinata attraverso la procedura BET, è risultata essere di $125 \pm 7 \text{ m}^2/\text{g}$.

I risultati dell'adsorbimento della LF su HA a pH 7,4 e a pH 9,0 sono riportati come curve di adsorbimento in Fig. 2, dove la quantità di proteina adsorbita Γ_L (mg/m²) è messa in funzione della concentrazione di proteina dopo l'adsorbimento C_L (mg/mL). Le curve sono caratterizzate da un'alta pendenza iniziale che sta ad indicare un'alta affinità della proteina per la superficie di HA. Con l'aumentare della concentrazione di LF aumenta la ricopertura superficiale fino al raggiungimento del plateau, il cui valore corrisponde alla massima quantità di LF adsorbita superficialmente. Questo valore corrisponde a circa 0,9 mg/m² e 1,3 mg/m², rispettivamente a pH 7,4 e 9,0. I profili delle due curve appaiono diversi: a pH 7,4 quando è raggiunto il plateau, probabilmente si è depositato un monostrato di LF, invece lungo la curva a pH 9,0 può essere apprezzato un "kink" ($\Gamma = 0,7 \text{ mg/m}^2$), consistente con un probabile adsorbimento bimodale di LF. In quest'ultimo caso con molta probabilità, quando è raggiunto il plateau, sui nanocristalli si è depositato un doppio strato di LF. Le due curve di adsorbimento isoterme sperimentali sono state confrontate con le curve di adsorbimento secondo i modelli di Langmuir,

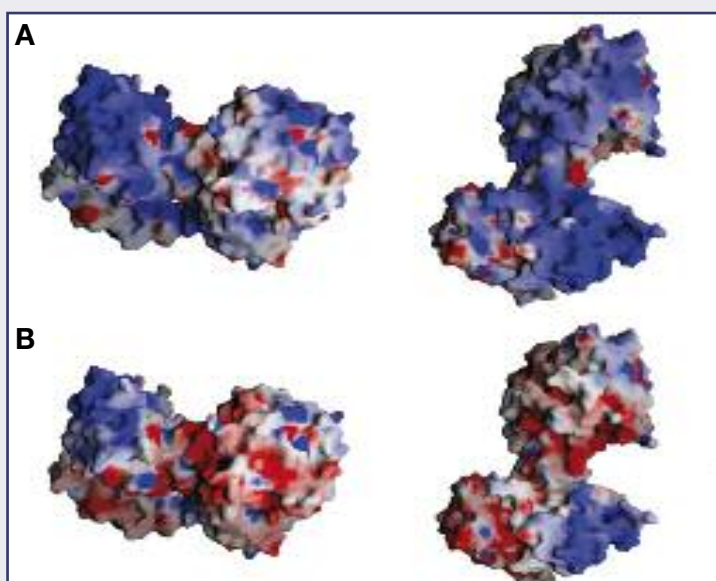


Fig. 3 - Rappresentazione grafica della distribuzione delle cariche superficiali della lattoferrina a pH 7,4 (A) e a pH 9,0 (B). I valori di potenziale elettrostatico sono rappresentati in scala da +10 kT/e (blu), 0 kT/e (bianco) a -10 kT/e (rosso)

Freundlich e Langmuir-Freundlich. In entrambi i casi il modello di Langmuir-Freundlich dà la migliore corrispondenza poiché implica che i siti della superficie dell'HA siano energeticamente eterogenei, cosa che è ampiamente plausibile data la superficie non omogenea dei nanocristalli poco cristallini [12]. Il modello di Freundlich invece ha una cattiva corrispondenza nel caso dell'adsorbimento a pH 7,4 e una buona nell'altro. Secondo questo modello, infatti, la superficie adsorbente è considerata essere energeticamente eterogenea come nel modello di Langmuir-Freundlich, ma esso non limita l'adsorbimento ad un monostrato. Questo fatto suggerisce che probabilmente a pH 7,4 si forma un monostrato di LF, mentre a pH 9,0 i nanocristalli sono coperti da un doppio strato di LF. Oltre a confrontare le curve sono stati calcolati i parametri di adsorbimento secondo i modelli teorici applicati. In particolare è stata calcolata la costante di affinità del modello di Langmuir-Freundlich (K_{LF}) che può essere interpretata come una misura dell'affinità della proteina verso la superficie dell'HA. Questa è risultata essere significativamente più grande per la proteina a pH 7,4 rispetto a pH 9,0. Ciò può essere spiegato dal fatto che il punto isoelettrico della LF è circa 8,5 e quindi a pH inferiori la proteina ha una carica netta positiva mentre per pH superiori è negativa e il potenziale Z calcolato per l'HA è risultato essere leggermente negativo.

L'affinità tra proteine e substrati inorganici può essere dovuta all'instaurarsi di vari tipi di interazioni tra le quali: legami chimici di tipo covalente ed elettrostatico, interazioni di van der Waals, idrofobiche o idrofiliche. La relativa predominanza di uno di questi è strettamente legata alla struttura della proteina e alle caratteristiche chimico-fisiche della superficie inorganica. Probabilmente si può assumere che la principale interazione che si verifica in questo caso è quella di tipo elettrostatico. L'analisi del potenziale superficiale elettrostatico della LF a pH 7,4 e pH 9,0 (Fig. 3) ha permesso di studiare l'interazione in termini di interazioni elettrostatiche. Essenzialmente, il potenziale superficiale della LF a pH 7,4 è prettamente

basico e permette una forte interazione con la superficie negativa dell'HA mentre sfavorisce l'interazione proteina-proteina. Al contrario, il potenziale superficiale della LF a pH 9,0 è un *mix* di zone positive e negative che favorisce l'interazione proteina-proteina e riduce l'interazione con l'HA.

Attraverso il modello di Langmuir è stata calcolata la sezione superficiale della proteina in contatto con la superficie dell'HA, che è risultata essere di $14,1 \text{ \AA}^2$. La LF ha una forma bi-lobata e le sue dimensioni sono di $152 \times 95 \times 56 \text{ \AA}^3$ [13]; quindi il valore calcolato di sezione superficiale della proteina permette di ipotizzare che durante l'adsorbimento essa si orienta preferibilmente in posizione "end on". Questa ipotesi è perfettamente consistente con le morfologie della proteina e dei nanocristalli.

I nanocristalli, una volta funzionalizzati con la LF, sono stati sottoposti a lavaggio con acqua ultrapura per eliminare la parte di proteina fisioadsorbita da quella chemioadsorbita. Per calcolare la quantità di proteina adsorbita sull'HA dopo il lavaggio, è stata condotta un'analisi termogravimetrica (TGA) sui solidi liofilizzati. La quantità di LF è stata calcolata sulla base della perdita di peso tra il coniugato HA-LF e la sola HA in un intervallo tra 120 e 700 °C. La percentuale in peso della LF adsorbita sull'HA è risultata essere più alta a pH 7,4 che a pH 9,0, in accordo con la K_{LF} calcolata secondo il modello teorico e in disaccordo con le curve di adsorbimento isoteramico. I valori ottenuti tramite TGA hanno poi permesso di ipotizzare che il lavaggio non influenza il monostrato di proteina a pH 7,4 mentre modifica il secondo strato di proteina formatosi a pH 9,0 rimuovendolo completamente.

La spettroscopia FT-Raman ha permesso di stabilire che la struttura secondaria della LF adsorbita sull'HA viene poco modificata rispetto a quella nativa. In particolare soltanto una piccola frazione di α eliche si converte in *turn*, mentre la quantità di foglietti β resta in pratica inalterato. Questi effetti sono comunque più evidenti a pH 7,4 e possono essere correlati ad un maggiore impaccamento delle proteine a questo pH. È interessante notare che, nonostante il picco dell'ammide I si sposti dopo l'adsorbimento da 1661 a 1668 cm^{-1} (Fig. 4A), le larghezze a metà altezza delle bande aumentano, denotando una maggiore dispersione delle strutture. Questo aspetto è più evidente a pH 7,4 (7 cm^{-1} rispetto a 5 cm^{-1} a pH 9,0) confermando un maggior grado di "unfolding" in questa condizione. Negli spettri FT-IR, le bande dell'ammide I e II (Fig. 4B), diagnostiche della struttura secondaria [14], non cambiano la loro posizione, confermando che le modificazioni strutturali sono di piccola entità.

Tramite gli spettri Raman si possono fare alcune considerazioni interessanti sui residui amminoacidici aromatici presenti nella LF, in particolare sulle tirosine e sui triptofani. Il rapporto delle intensità tra le due bande della tirosina a 850 e 830 cm^{-1} (I_{850}/I_{830}) è indice della forza del legame ad idrogeno dell'OH fenolico. Prima dell'adsorbimento, questo rapporto è di $0,5$ e indica che le tirosine sono inglobate all'interno della proteina e sono principalmente H donatori a pH 7,4, mentre a pH 9,0 il rapporto I_{850}/I_{830} è di $0,9$, indicando che sono prevalentemente poco H accettori. Dopo l'adsorbimento a pH 7,4 questo valore aumenta a $0,7$, suggerendo che le tirosine sono più esposte e quindi sono più H accettori. Al con-

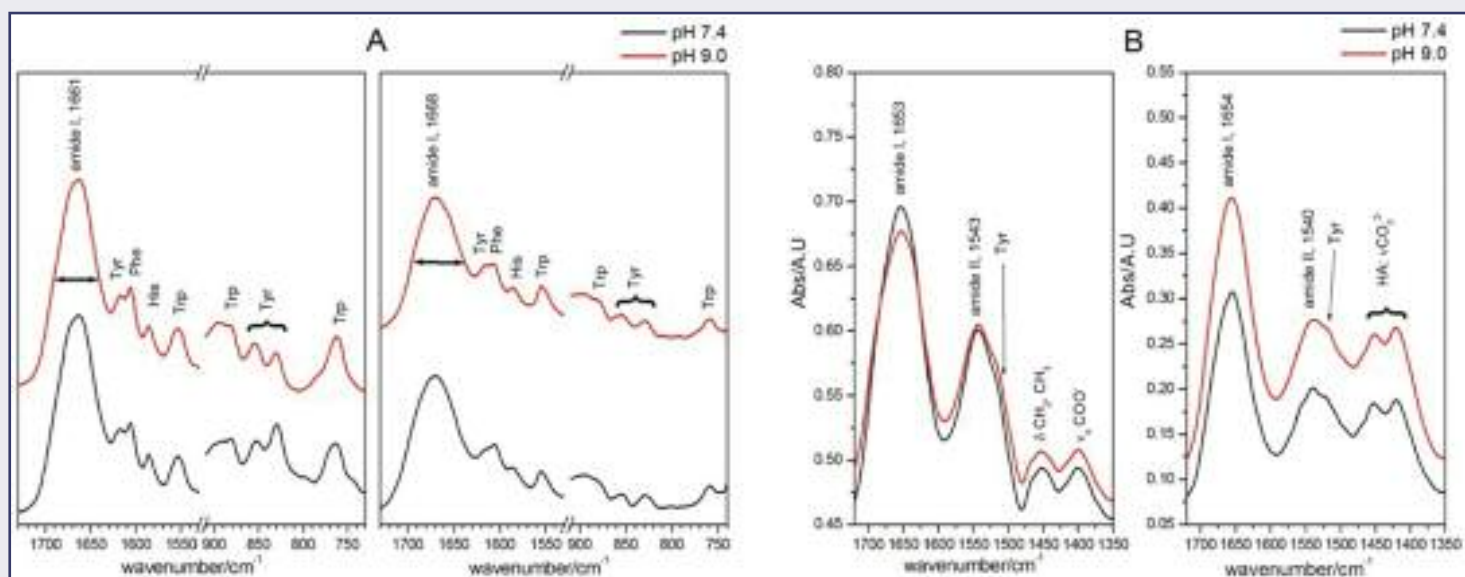


Fig. 4 - Spettri FT-Raman (A) prima (sx) e dopo (dx) l'adsorbimento su nanocristalli di idrossiapatite a pH 7,4 e a pH 9,0; è indicata la larghezza a metà altezza della banda ammidio I di LF a pH (in cui si osserva un maggiore allargamento di banda dopo l'adsorbimento). Spettri FT-IR (B) prima (sx) e dopo (dx) l'adsorbimento su nanocristalli di idrossiapatite a pH 7,4 e a pH 9,0; dopo l'adsorbimento le bande dello ione carbonato di HA coprono alcune bande di LF nella zona 1500-1400 cm^{-1}

trario a pH 9,0 il rapporto I_{850}/I_{830} resta invariato. La stessa tendenza si evince per i triptofani il cui rapporto di intensità tra le bande a 880 e 760 cm^{-1} (I_{880}/I_{760}) è indice del legame a idrogeno. Dopo l'adsorbimento sull'HA questo rapporto decresce da 1,0 a 0,5 ad entrambi i pH, indicando un'aumentata esposizione di questi residui ed un aumento del carattere H accettore di questi amminoacidi.

Questo studio non solo accresce la conoscenza sui meccanismi di adsorbimento delle proteine su matrici inorganiche nanostrutturate, ma potrebbe anche favorire lo sviluppo di un biomateriale impiantabile per l'ingegneria ossea e rigenerativa. Infatti l'idrossiapatite funzionalizzata con la lattoferrina potrebbe essere impiantata ed agire come "scaffold" per le cellule e nello stesso tempo la LF potrebbe promuovere la crescita ossea

ed agire da agente antinfiammatorio. In questo modo i nanocristalli di HA potrebbero aumentare le loro proprietà osteointegrative e osteoinduttive e stimolare specifiche risposte cellulari a livello molecolare.

Ringraziamenti: Questa ricerca è stata finanziata da MiPAAF (Ministero delle Politiche Agricole, Alimentari e Forestali) "FINALE-QUALIFU" Progetto D.M. 2087/7303/09. Si ringrazia il Consorzio Interuniversitario di Ricerca in Chimica dei Metalli nei Sistemi Biologici (C.I.R.C.M.S.B) e il progetto di ricerca "Nanoparticelle multifunzionali per la terapia dei carcinomi: studi in vitro e in vivo in modelli sperimentali" finanziata dalla Regione Piemonte (Ricerca Sanitaria Finalizzata 2009). M.I. è un assegnista della Regione Piemonte.

Bibliografia

- [1] R.A. Latour, *Biointerphases*, 2008, **3**, FC2.
- [2] K.C. Dee *et al.*, *An introduction to tissue-biomaterial interactions*, Wiley-Liss, Hoboken, 2003.
- [3] P. Sabatino *et al.*, *J. Colloid Interface Sci.*, 2007, **314**, 389.
- [4] M. Iafisco *et al.*, *Langmuir*, 2008, **24**, 4924.
- [5] M. Iafisco *et al.*, *Colloids Surf. B: Biointerf.*, 2010, **81**, 274.
- [6] M. Iafisco *et al.*, *J. Mater. Chem.*, 2009, **19**, 8385.
- [7] N. Roveri *et al.*, *Expert Opin. Drug Deliv.*, 2008, **8**, 861.
- [8] M. Iafisco *et al.*, *Adv. Eng. Mater.*, 2010, **12**, B218.
- [9] S.A. González-Chávez *et al.*, *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2009, **33**, 301.e1.
- [10] H. Jenssen, R.E.W. Hancock, *Biochimie*, 2009, **91**, 19.
- [11] S. Bharadwaj *et al.*, *Osteoporos. Int.*, 2009, **20**, 1603.
- [12] Y. Sakhno *et al.*, *J. Phys. Chem. C*, 2010, **114**, 16640.
- [13] F. Pan *et al.*, *Biointerphases*, 2008, **3**, FB36.
- [14] A. Tinti *et al.*, *J. Raman Spectros.*, 2008, **39**, 250.

ABSTRACT

Functionalization of Biomimetic Hydroxyapatite Nanocrystals for Biomedical Applications

Lactoferrin, a protein with several biomedical properties, has been adsorbed onto hydroxyapatite nanocrystals at two different pH values (7.4 and 9.0) in view of its possible use in osteointegration and osteoinduction. The interaction was herein investigated by spectroscopic and thermal techniques. Nanocrystals do not affect appreciably the conformation of the adsorbed protein. Using FT-Raman and FT-IR, we found that, after adsorption, the protein was only slightly unfolded with a small fraction of the α -helix structure being converted into turn.