
Nome e cognome dell'allieva borsista: Vittoria Savio

Struttura ospitante: Dipartimento di Medicina Sperimentale - Sezione Microbiologia e Microbiologia Clinica

Tutor: Prof.ssa Giovanna Donnarumma

L'attività di Training on the job è stata da me svolta presso il Dipartimento di Medicina Sperimentale, sezione di Microbiologia e Microbiologia clinica, con la supervisione della Prof.ssa Giovanna Donnarumma. La struttura coinvolge diverse figure professionali che operano in un clima collaborativo e di continuo confronto. L'Unità di ricerca, costituita da docenti di I e II fascia, ricercatori, dottorandi, specializzandi, tecnici e amministrativi ha a disposizione laboratori opportunamente equipaggiati con strumentazioni tradizionali e innovative per tutte le esigenze di ricerca. La struttura opera in diversi ambiti ed è coinvolta in numerose collaborazioni con Enti pubblici e privati sia Nazionali che Internazionali. L'Unità operativa porta avanti varie linee di ricerca, prima tra tutte l'interazione "microrganismo (batteri, virus e lieviti) ospite", valutando i meccanismi molecolari coinvolti nei processi di adesione, invasione e proliferazione cellulare, espressione di molecole pro-infiammatorie, antinfiammatorie e immunomodulanti e analisi dell'attivazione dei pattern di trascrizione.

Durante l'esperienza di laboratorio ho potuto approfondire conoscenze e maturato competenze in materia di colture cellulari, saggi di attività antibatterica e antivirale, saggi di citotossicità in vitro e tecniche di biologia molecolare.

In questo contesto, scopo del mio progetto è stato lo studio di una nuova linea di prodotti per la cura della cute, in *tessuto non tessuto*, realizzati utilizzando nanofibrille di chitina, (CN).

Le medicazioni avanzate rappresentano una classe di dispositivi medici sempre più richiesta dal mercato per il loro potere traspirante e la capacità di accelerare il riparo delle ferite senza provocare la formazione di cheloidi o di cicatrici ipertrofiche. Negli ultimi anni, accanto al mercato delle medicazioni avanzate, si è dimostrato sempre più in espansione quello dei dispositivi dermocosmetici in tessuto o non tessuto per la cura delle alterazioni cutanee. Il vantaggio offerto da tali dispositivi è che sono in grado di veicolare una grande quantità di principio attivo poiché la loro struttura non trattiene per assorbimento gli ingredienti attivi ma li cede gradualmente, determinando un intenso assorbimento per osmosi naturale. Se da una parte questi dispositivi apportano dei grandi benefici, dall'altra la loro ampia diffusione crea un problema ambientale, dato che vengono prodotti a partire da una materia prima derivata dal petrolio, in esaurimento, e non biodegradabile o biodegradabile a lungo termine. Le CN, invece, derivano da un materiale naturale (scarti dell'industria della lavorazione del pesce) attraverso un processo di produzione realizzato da una azienda cosmetica italiana, caratterizzato da una metodologia sicura e non inquinante. Ciò porterebbe alla sostituzione degli attuali dispositivi in gran parte ancora realizzati in poliesteri non biodegradabili, con un nuovo prodotto del tutto naturale e biodegradabile, riducendo la pressione sull'utilizzo di materie prime fossili, le emissioni di gas serra e rafforzando la crescita di un mercato eco-innovativo in via di formazione. Le nanofibrille di chitina rappresentano un importante *carrier* capace di favorire la penetrazione transcutanea di numerose sostanze. Le CN complessate con varie sostanze svolgono una più intensa ed efficace attività biologica e potenziano la loro biodisponibilità. La scelta di sostanze ad attività vasocostrittrice, immunomodulante, antinfiammatoria e antiossidante è stata oggetto di studio del presente progetto. In particolare, è stato valutato *in vitro* il potere citotossico, antinfiammatorio e di coinvolgimento nella rigenerazione tessutale di CN complessate con lignina. Inoltre, è stata analizzata la capacità di questi complessi di interferire con la formazione di biofilm.

Al fine di valutare l'effetto citotossico sono stati allestiti saggi di citotossicità (MTT) su cheratinociti umani di linea (HaCat) trattati o meno con i complessi d'interesse. Per l'analisi del potere antinfiammatorio, utilizzando lo stesso modello sperimentale, è stata analizzata mediante Real time PCR l'espressione dei mediatori dell'infiammazione e sono stati valutati i livelli di espressione di molecole coinvolte nei processi di rigenerazione tissutale. Infine per gli studi d'interferenza con la formazione di biofilm, sono stati programmati esperimenti di formazione e/o disgregazione del biofilm di *Pseudomonas aeruginosa*. Per tutti gli esperimenti i complessi sono stati utilizzati sia come sostanze grezze che come garze idrosolubili dopo opportuni trattamenti preliminari per ottenere una concentrazione di lignina pari a 0,1 mg/mL per tutti i campioni esaminati.

Saggio MTT

La tossicità dei complessi d'interesse è stata valutata mediante saggio MTT. Cellule HaCat sono state piastrate in apposite multiwell in terreno DMEM supplementato con 10% (v/v) di siero fetale bovino, 100 UI/ml di penicillina e 100 µg/ml di streptomycin e lasciate in incubazione a 37 °C in atmosfera modificata al 5% di CO₂ fino a completa adesione. Quando il monostrato cellulare è giunto ad un'adeguata confluenza, il terreno è stato aspirato e sostituito con DMEM semplice in modo da arrestare la crescita e rendere sincrona la coltura cellulare. A questo tempo sono stati aggiunti i complessi a varie concentrazioni e dopo 72 h di incubazione è stato effettuato il saggio MTT. Gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato per verificare la ripetibilità del dato. Il saggio si basa sulla capacità dell'enzima succinato deidrogenasi mitocondriale, presente nelle cellule vitali, di trasformare il sale giallo di tetrazolio in cristalli insolubili purpurei di formazano che sono poi solubilizzati in seguito all'aggiunta di dimetilsolfossido (DMSO). La vitalità cellulare viene quantizzata tramite una lettura spettrofotometrica alla lunghezza d'onda di 570 nm. I valori di assorbanza sono proporzionali alla quantità di formazano prodotta e quindi all'attività metabolica e alla vitalità cellulare. Questo test permette di valutare la tossicità di una sostanza attraverso il confronto tra gli indici di vitalità cellulare ottenuti dalle cellule trattate rispetto ai controlli. I risultati del saggio hanno consentito di ottenere i valori delle concentrazioni non citotossiche che sono poi state utilizzate per gli esperimenti successivi.

Attività antinfiammatoria

Per l'analisi dell'attività antinfiammatoria, cellule HaCat sono state piastrate in multiwell in terreno DMEM supplementato con 10% (v/v) di siero fetale bovino, 100 UI/ml di penicillina e 100 µg/mL di streptomycin, lasciate in incubazione a 37 °C in atmosfera modificata al 5% di CO₂ ed utilizzate ad una confluenza dell'80%. I monostrati semiconfluenti sono stati trattati o meno con i complessi d'interesse per 6 e 24 h, in presenza o meno di lipopolisaccaride (LPS), noto stimolo infiammatorio. Ai tempi indicati, è stato estratto l'mRNA e mediante Real time PCR sono stati valutati i livelli d'espressione sia di citochine pro-infiammatorie, quali interleuchina 8 (IL-8), interleuchina 1 alfa (IL-1 α), e Tumor Necrosis factor alfa (TNF- α) sia di molecole coinvolte nei processi di rigenerazione tissutale quali metalloproteasi 2 e 9 (MMP-2 E MMP-9) e della β -defensina 2 (hBD-2). I risultati ottenuti indicano che i complessi riducono significativamente l'espressione delle citochine pro-infiammatorie indotte da LPS già a 6 h d'incubazione. Inoltre incrementano l'espressione di hBD-2, MMP-2 e MMP-9, in modo dose-dipendente. In conclusione i complessi testati mostrano sia proprietà antinfiammatorie che la capacità di partecipare attivamente ai processi di riparo del danno tissutale.

Formazione del biofilm ed effetto delle sostanze sul biofilm di *Pseudomonas aeruginosa*

Il biofilm è un aggregato di cellule microbiche associate ad una superficie ed incluse in una matrice polimerica extracellulare autoprodotta. In questi esperimenti è stato valutato se le sostanze in esame hanno la capacità di interferire con la formazione del biofilm di *Pseudomonas aeruginosa*. La

procedura consta di tre diversi saggi: INIBIZIONE che ha lo scopo di valutare l'eventuale capacità da parte della sostanza, aggiunta contemporaneamente alla sospensione batterica, di inibire la formazione del biofilm; DISGREGAZIONE che ha lo scopo di valutare l'eventuale capacità da parte della sostanza, aggiunta successivamente alla sospensione batterica, di disgregare il biofilm preformato; PREVENZIONE che ha lo scopo di valutare l'eventuale capacità da parte della sostanza, aggiunta prima della sospensione batterica, di prevenire la formazione del biofilm.

Saggio di inibizione: 100 μL di una sospensione batterica ($1 \cdot 10^7$ CFU/mL) sono stati inoculati nei pozzetti di una multiwell da 96 a cui sono stati aggiunti 100 μL di sostanza diluita in LB broth ad una concentrazione di 128 $\mu\text{g/mL}$. La piastra è stata incubata overnight a 37°C.

Saggio di disgregazione: la sospensione batterica alla concentrazione di $1 \cdot 10^7$ CFU/mL è stata aggiunta ai pozzetti e incubata per 24 h a 37°C in modo da promuovere la formazione di biofilm. Al termine del periodo di incubazione le cellule planctoniche sono state rimosse dai pozzetti e la piastra è stata lavata con 100 μL di PBS. Successivamente ai pozzetti sono stati aggiunti 100 μL di sostanza diluita in LB broth ad una concentrazione finale di 128 $\mu\text{g/mL}$ e la piastra è stata ulteriormente incubata per 24 h a 37°C.

Saggio di prevenzione: sono stati aggiunti 100 μL delle sostanze diluite in LB broth e la piastra è stata incubata overnight a 37°C. Successivamente le sostanze sono state rimosse e la piastra è stata lavata con PBS sterile. Ai pozzetti è stata aggiunta la sospensione batterica e la piastra è stata incubata per 24 h a 37°C.

Per ciascuno dei tre saggi, alla fine del periodo di incubazione, si è proceduto alla rimozione delle cellule planctoniche e alla colorazione del biofilm con cristalvioletto all'1% per 30 minuti. Successivamente, i pozzetti sono stati lavati e sono stati aggiunti 100 μL di etanolo, allo scopo di solubilizzare il biofilm. Il contenuto di ogni pozzetto è stato trasferito in una nuova multiwell da 96 e si è proceduto alla lettura spettrofotometrica. I risultati ottenuti tramite lettura spettrofotometrica a 570-655 nm mostrano che le sostanze non sono in grado di agire sulla formazione del biofilm in nessuno dei tre saggi.

Il presente lavoro dimostra come l'innovazione in un settore industriale spesso può avere ricadute positive in altri settori. Questi effetti di ricaduta dell'innovazione nel settore dei prodotti biodegradabili e derivati da materie prime rinnovabili pongono sfide e opportunità per una serie di settori di produzione (tessile, farmaceutico, alimentare, energetico); con il trasferimento dell'innovazione in altri mercati merceologici si andrebbe a sostituire una grande quantità di materiale che oggi viene prodotto utilizzando i derivati del petrolio.

IL TUTOR

Prof. Giovanna Donnarumma

L'ALLIEVA BORSISTA

Vittoria Savio