

Titolo divulgativo:

Una medicazione antibiotica “intelligente” per la cura di ferite croniche

Sottotitolo scientifico:

Biomateriali antibiotici come nuovi dispositivi per rapid infection mapping e trattamento di lesioni cutanee cronicizzate

Responsabile

Alessandra Tolomelli (*Dipartimento di Chimica “Giacomo Ciamician”, Università di Bologna*)

Gruppo di studio:

Lucia Ferrazzano, Chiara Palladino (*Dipartimento di Chimica “Giacomo Ciamician”, Università di Bologna*)

Monica Sandri, Elisabetta Campodoni, Sara Bernardoni (*ISTEC-CNR, Faenza*)

Giovanna Angela Gentilomi, Francesca Bonvicini (*Dipartimento di Farmacia e Biotecnologie, Università di Bologna*)

Pasquale Longobardi (*Centro Iperbarico di Ravenna*)

La cura di lesioni cutanee cronicizzate infette tramite una corretta gestione della terapia antibiotica è una importante problematica che riguarda moltissimi soggetti nella nostra società. Questa patologia si verifica infatti in pazienti anziani e allettati, che hanno sviluppato piaghe da decubito, ed in pazienti affetti da diabete mellito, che hanno gravi lesioni cutanee che possono portare alla cancrena e alla necessità di amputazione (patologia del piede diabetico infetto).¹ Il diabete tipo 2 non insulino-dipendente colpisce il 4.8% della popolazione italiana, circa 4 milioni di individui, ed è quindi una delle patologie di maggior impatto socio-sanitario. Al momento della diagnosi, il 18% dei pazienti presenta una patologia del piede, percentuale che raddoppia a distanza di 10 anni dalla diagnosi. Ad oggi, il 50% delle amputazioni chirurgiche interessano soggetti affetti da diabete. Per quanto riguarda invece l'incidenza statistica delle lesioni da decubito in soggetti anziani con deficit funzionale, ad oggi circa 2 milioni di individui, si stima che questo problema riguardi l'8% dei pazienti negli ospedali, il 10% nelle residenze e il 21% dei malati a domicilio. Da questi dati si evince immediatamente l'impatto di questa problematica sulla qualità di vita di alcuni milioni di pazienti e delle loro famiglie.

Le lesioni croniche sono sempre associate alla contaminazione batterica, sia nelle aree superficiali che in quelle profonde della ferita.² Se queste infezioni non vengono immediatamente individuate, mappate e trattate, possono crearsi microcolonie che, grazie alla formazione di biofilm protettivi, modificano la loro sensibilità agli antibiotici e si estendono all'ambiente circostante la lesione, compromettendo definitivamente il processo di guarigione. In questi casi l'aggressione dell'infezione batterica tramite terapia antibiotica sistemica non è una soluzione consigliabile, in quanto i pazienti sono spesso affetti da comorbidità che causano condizioni cliniche critiche. Inoltre, è necessario prevenire l'abuso di questi farmaci per ridurre il conseguente sviluppo di antibiotico-resistenze.³ Infatti, l'uso di antibiotici classici per applicazione topica spesso non è sufficiente per un'efficace azione battericida, in quanto il principio attivo risulta diluito dagli essudati e rimosso durante la medicazione. Addirittura, la necessità di alte dosi e ripetute applicazioni può essere causa di reazioni di sensibilizzazione allergica e del generarsi di batteri resistenti, che possono poi diffondersi in ambito nosocomiale.⁴ In aggiunta, il ripetuto intervento necessario per la sostituzione di garze o cerotti protettivi può essere di per sé causa di aggravamento dello stato della ferita, dovuto a traumi da strappo delle superfici adesive dei cerotti o alle inevitabili aderenze delle garze ai tessuti infetti esposti.

Attualmente, l'approccio più comune è la detersione chirurgica o meccanica del tessuto necrotico, seguita dall'uso di medicazioni che inducano la riepitelizzazione dell'area danneggiata, ma è necessario progettare dispositivi medici di semplice utilizzo che permettano la rapida e precoce individuazione e mappatura dell'infezione e che precedano la colonizzazione batterica intervenendo già nella fase di contaminazione.

Il progetto si è posto come obiettivo lo sviluppo di un dispositivo medico semplice per il trattamento e l'individuazione, anche in fase prematura, di ferite croniche infette. È stata intrapresa la costruzione di un biomateriale non adesivo, da materiali di recupero dell'industria alimentare, e di un peptide antimicrobico (AMP) coniugato a una molecola visibile nel vicino infrarosso (Tag-NIR). La realizzazione di questo progetto ha coinvolto l'istituto di Scienza e Tecnologia dei Materiali Ceramici di Faenza (CNR-ISTEC) per lo studio del biomateriale e l'Università di Bologna per lo sviluppo del peptide funzionalizzato e per i primi saggi di attività antibiotica. La prospettiva futura è il coinvolgimento del Centro Iperbarico di Ravenna, per uno studio osservazionale volto alla valutazione dell'efficacia del dispositivo su ceppi batterici isolati da pazienti affetti da ferite croniche di difficile guarigione che stanno seguendo terapia con ossigeno iperbarico.

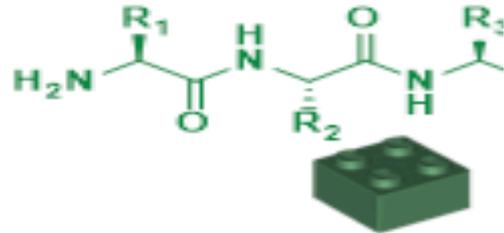
Per quanto riguarda la progettazione della molecola con attività antibiotica, l'attenzione si è focalizzata sui peptidi antimicrobici (AMPs), che sono diventati negli ultimi anni buoni candidati come efficaci alternative agli antibiotici tradizionali. Essi sono naturalmente prodotti da tutti gli organismi viventi, inclusi procarioti ed esseri umani, per fronteggiare la minaccia di agenti microbici contribuendo alla risposta antibatterica specifica e non-specifica,⁵ ma in tempi più recenti sono stati prodotti numerosi analoghi di sintesi. Sebbene non siano ancora sul mercato, circa 40 esempi di AMPs hanno già raggiunto avanzate fasi cliniche proponendosi come promettenti alternative per lo sviluppo di nuovi antibiotici.⁶ Si tratta di polipeptidi carichi positivamente per via della presenza di istidine, arginine e lisine. Essi assistono i neutrofilo nel tentativo di eradicare le cellule batteriche agendo attraverso svariati meccanismi tra cui, nel caso di ferite superficiali, la stimolazione della riparazione tissutale e dell'angiogenesi. Essendo carichi positivamente, perturbano la carica negativa delle membrane cellulari batteriche alterando le loro normali funzioni come la divisione e costruzione delle pareti cellulari. È stato individuato come peptide modello il trimero Arg-Trp(tBu)₃-Arg nella forma di ammidi omobenzilica, un derivato che ha dimostrato grande efficacia a largo spettro (range MIC 2-4 µg/ml). La sintesi di questo frammento è stata realizzata seguendo le tecniche di Green Solid Phase Peptide Synthesis (GSPPS) sviluppate nel laboratorio di ricerca, che prevedono l'utilizzo di reagenti e procedure sostenibili per l'ambiente. Il peptide è stato successivamente coniugato con una molecola capace di assorbire nel vicino infrarosso (Tag NIR), tramite una late-stage-functionalization catalizzata da Palladio (Figura 1). Le attività svolte per l'ottimizzazione della sintesi del peptide antibiotico e la ricerca bibliografica necessaria per selezionare le condizioni di lavoro più sostenibili hanno offerto la possibilità di scrivere un articolo panoramico sullo stato dell'arte nella sintesi sostenibile di peptidi.⁷

L'attività antimicrobica del peptide AMP e dei suoi derivati è stata verificata ad ogni step per controllare che eventuali modifiche strutturali non portino alla riduzione o perdita di efficacia della molecola finale, che deve essere mantenuta fino alla molecola target, ovvero AMP-Tag-NIR.

conjugate with site-
specific linker



cleavable structure



incorporation of side chains

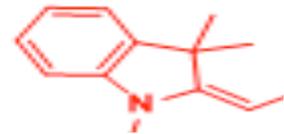


Figura 1. Progettazione del peptide antimicrobico legato al residuo NIR (AMP-TagNIR)

Per quanto riguarda il biomateriale, al fine di sviluppare un materiale che possieda le caratteristiche necessarie per poter essere utilizzato come wound dressing (biocompatibile, capace di assorbire gli essudati della ferita, di adattarsi ad essa, in grado di rilasciare in maniera controllata un agente antibatterico) sono stati studiati diversi polimeri naturali quali gelatina, alginato e chitosano, tutti riportati in letteratura per il loro utilizzo in campo biomedico, utilizzandoli sia singolarmente che blendati tra loro e trattati con diversi metodi di reticolazione, introducendo differenti quantitativi di elementi plastificanti. Si è deciso di utilizzare chitosano e alginato rispettivamente come polimeri cationico e anionico, per le loro proprietà, oltre che di elevata biocompatibilità e biodegradabilità, antibatteriche (chitosano) e di assorbimento di essudati (alginato).

Le membrane realizzate sono state quindi caratterizzate secondo la loro capacità di assorbire acqua (swelling properties), la loro degradazione in acqua e le loro proprietà meccaniche (in particolare resistenza a trazione). L'abilità di assorbire gli essudati della ferita è una caratteristica importante per un materiale per poter essere impiegato come "wound dressing" (rivestimento della ferita). Tutti i campioni hanno ottime capacità di assorbimento dei fluidi, influenzata dalla quantità di glicerolo presente nel materiale. Inoltre, per determinare la resistenza del materiale se sottoposto ad uno stress di tipo tensivo, sono state fatte prove di stress-strain e si può notare come la presenza di glicerolo come plasticizzante consenta di ottenere membrane molto più elastiche e in grado di allungarsi. Sono state costruite strutture multistrato, in cui ogni layer è costituito da diversi blend di biopolimeri più o meno reticolati. Queste membrane multilayer sono state studiate per capire la capacità di rilasciare la molecola NIR adsorbita al suo interno in maniera controllata.

Si è quindi pensato di costruire una struttura multistrato, in cui ogni layer sia costituito da diversi blend di chitosano e glicerolo più o meno reticolati con acido tannico, come riportato in Figura 2. L'idea è quella di avere uno strato meno reticolato a contatto con la ferita per poter sfruttare l'azione antibatterica di chitosano e acido tannico e allo stesso tempo controllare il rilascio

dell'AMP-TagNIR che si trova nel secondo strato, non reticolato. Il terzo e ultimo strato invece è quello più reticolato, e dunque rappresenta lo strato più resistente e duraturo che protegge la ferita dall'azione ulteriore di agenti esterni.

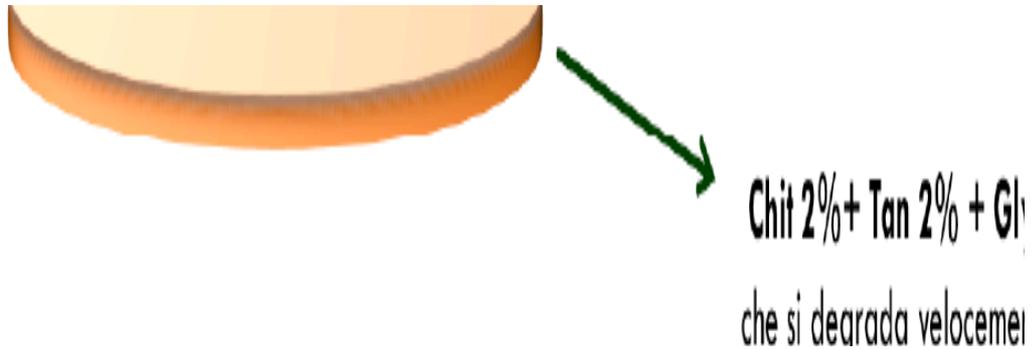


Figura 2. Composizione sistema multilayer

Si è quindi valutata la capacità del materiale di rilasciare una molecola adsorbita al suo interno in maniera controllata, utilizzando il Tag-NIR. Un layer, corrispondente allo strato centrale del multilayer sopra riportato, è stato preparato solubilizzando un 1% di Tag-NIR (m/m rispetto alla quantità di chitosano), precedentemente disperso in una parte di acqua (Figura 3).

R-loaded prototypes

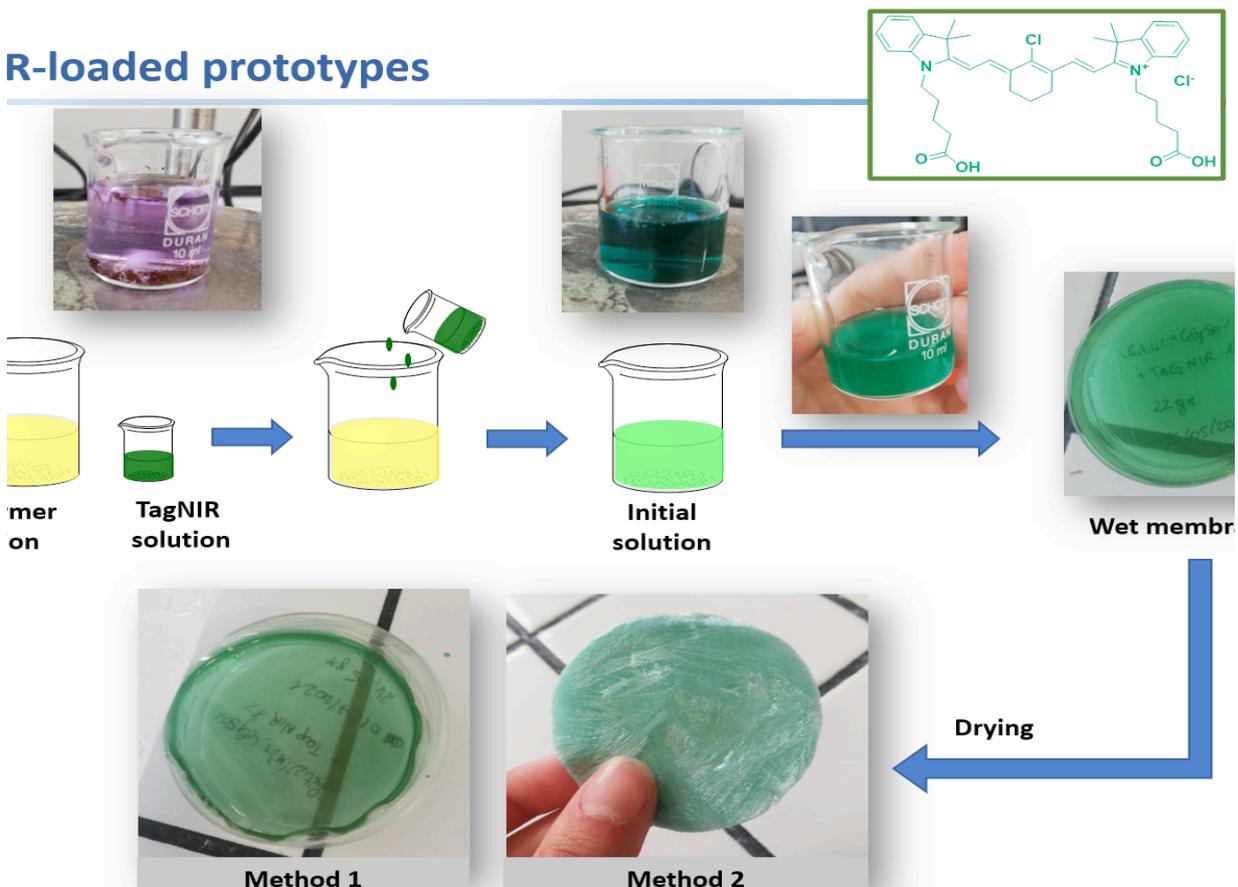


Figura 3. Metodo di preparazione delle membrane contenenti TagNIR1% (1)

Per entrambi i materiali il rilascio del Tag NIR è stato testato sia in PBS (pH=7.2) sia in tampone citrato-fosfato (pH= 8), che meglio simula gli essudati di una lesione cronicizzata. Il rilascio è stato significativamente migliore in tampone a pH=8 e questo è positivo per i nostri scopi in quanto si traduce in un rilascio controllato solo sul sito di infezione e modulato dal pH dell'essudato.

In conclusione il blend sviluppato, possiede le caratteristiche di biocompatibilità, capacità di assorbire gli essudati della ferita e adattabilità alle superfici, che lo rendono indicato per l'utilizzo come wound dressing. Il materiale si dimostra anche capace di rilasciare in maniera controllata il Tag-NIR adsorbito al suo interno, selettivamente sul sito dell'infezione rispondendo a uno stimolo di pH. In questo progetto è stato quindi sviluppato un nuovo dispositivo che coniuga capacità terapeutica, rigenerativa e diagnostica in grado di mappare la distribuzione batterica nel sito infetto e di seguirne l'evoluzione nel tempo, essendo in grado di rilasciare gradualmente un antibiotico, facente parte della classe dei peptidi antimicrobici (AMP) che ha dimostrato grande efficacia contro i ceppi batterici tipici di queste infezioni.

- 1 Olsson M., Jarbrink K., Divakar U., Bajpai R., Upton Z., Schmidtchen A., Car J. (2019) The humanistic and economic burden of chronic wounds: A systematic review, *Wound Repair And Regeneration* 2, 114-125.
- 2 Johnson T.R., Gomez, B.I., McIntyre, M.K., Dubick, M.A., Christy, R.J., Nicholson, S.E. Burmeister, D.M. (2018) The Cutaneous Microbiome and Wounds: New Molecular Targets to Promote Wound Healing, *International Journal Of Molecular Sciences* 19: 2699, DOI: 10.3390/ijms19092699
- 3 Brockhurst, M. A., Harrison F., Veening J. W., Harrison E., Blackwell G., Iqbal Z., Maclean C. (2019) Assessing evolutionary risks of resistance for new antimicrobial therapies, *Nature Ecology & Evolution* 3, 515–517.
- 4 Bloomgarden Z.T., Drexler A., Farley S., (2015) New approaches to wound healing for diabetes, *Journal of Diabetes*, 7, 435-436.
- 5 Safder I., Islam A. (2017). Antimicrobial peptides: therapeutic potential as an alternative to conventional antibiotics. *JIPBS*, 4: 25-32.
- 6 Mahlapuu M., Hajansson J., Ringstad L., Bjorn C. (2016). Antimicrobial peptides: an emerging category of therapeutic agents. *Front. Cell. Inf. Microb.* 6: 194.
- 7 Ferrazzano L., Catani M., Cavazzini A., Martelli G., Corbisiero D., Cantelmi P., Fantoni T., Mattellone A., De Luca C., Felletti S., Cabri W., Tolomelli A. (2022) Sustainability in peptide chemistry: current synthesis and purification technologies and future challenges, *Green Chem.*, 24, 975-1020.