

Università degli Studi di Padova



Dipartimento di Biologia

Corso di Laurea Magistrale in Biotecnologie Industriali

**BIOCOMPATIBILITÀ, CITOTOSSICITÀ E ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE DI
NANOPARTICELLE DI ACIDO POLILIPOICO.**

Relatore: Prof. Emanuele Papini
Dipartimento di Scienze Biomediche
Università degli Studi di Padova

Correlatore: Dott.ssa Regina Tavano
Dipartimento di Scienze Biomediche
Università degli Studi di Padova

Controrelatore: Prof. Alessandro Moretto
Dipartimento di Scienze Chimiche
Università degli Studi di Padova

Laureanda: Sara Scarpa

Anno Accademico: anno 2015/2016

INDICE

Sommario	1
Introduzione	3
1. Biocompatibilità e Nanotossicologia.....	3
1.1. La definizione di biocompatibilità	3
1.2. I biomateriali più comuni	4
1.3. Analisi di biosicurezza	5
1.4. I nanomateriali.....	6
1.5. Il destino delle nanoparticelle e i meccanismi di endocitosi	8
1.6. Il meccanismo di autofagia	11
1.7. Tecniche di rivestimento della superficie delle nanoparticelle	12
1.8. Analisi della nanotossicità.....	14
2. Nanoparticelle contenenti acido lipoico	17
2.1. La scoperta dell'acido lipoico e delle sue proprietà	17
2.2. Lo stress ossidativo e l'azione degli antiossidanti	19
2.3. Nanomateriali già sviluppati allo scopo di sfruttare le proprietà dell'acido lipoico	23
2.4. Le nanoparticelle utilizzate in questo progetto di tesi	24
2.5. I peptidi cell-penetrating	25
2.6. Possibile applicazione delle nanoparticelle di acido polilipoico.....	28
Scopo della tesi	29
Materiali e Metodi	31
1. Nanoparticelle.....	31
1.1. Sintesi delle nanoparticelle di acido polilipoico	31
1.2. Caratteristiche delle nanoparticelle utilizzate.....	32
2. Analisi cell-free dell'attività antiossidante	33
2.1. Saggio DPPH.....	33
2.2. Saggio ABTS.....	34
3. Cellule.....	35
3.1. Isolamento di monociti da buffy-coat tramite centrifugazione su gradiente ed eventuale differenziamento in macrofagi	35
3.2. Isolamento di neutrofili	36
3.3. Purificazione dei leucociti totali.....	37

3.4. Colture cellulari di HeLa e raw.....	37
4. Analisi della captazione cellulare	38
4.1. Test di fagocitosi delle nanoparticelle ed analisi della fluorescenza tramite FACS	38
4.2. Analisi al microscopio confocale della fagocitosi delle nanoparticelle da parte di macrofagi	38
5. Studi di tossicità in vitro	39
5.1. Cinetica di coagulazione	39
5.2. Test di emolisi.....	39
5.3. Test di formazione della corona.....	40
5.4. Test di attivazione del complemento	41
5.5. Gel di poliacrilammide al 12%	41
5.6. Silver staining	42
5.7. Western Blot	43
5.8. Saggio MTS per l'analisi della vitalità cellulare	44
5.9. Test clonogenico	44
5.10. Analisi dell'espressione di marker di superficie.....	45
5.11. ELISA per IL-1 β (eBioscience).....	45
5.12. ELISA per IL-6 (Peprotech)	46
6. Analisi dell'attività antiossidante in un sistema cellulare.....	48
6.1. Saggio con fluoresceina	48
6.2. Saggio con citocromo c	48
7. Studi di biodistribuzione delle nanoparticelle in vivo	49
7.1. Iniezione delle nanoparticelle di acido polilipoico in ratto	49
7.2. Rilevazione della fluorescenza associata alle nanoparticelle negli organi prelevati	49
7.3. Analisi confocale degli organi prelevati	50
Risultati e discussioni	51
1. Analisi cell-free dell'attività antiossidante	51
1.1. Saggio DPPH	51
1.2. Saggio ABTS	55
2. Analisi della captazione cellulare	59
2.1. Test di fagocitosi delle nanoparticelle ed analisi della fluorescenza tramite FACS	59

2.2. Analisi al microscopio confocale della fagocitosi delle nanoparticelle da parte dei macrofagi	63
3. Studi di tossicità in vitro	65
3.1. Cinetica di coagulazione	65
3.2. Test di emolisi	67
3.3. Test di formazione della corona	68
3.4. Test di attivazione del complemento.....	71
3.5. Saggio MTS per l'analisi della vitalità cellulare.....	74
3.6. Test clonogenico	75
3.7. Analisi dell'espressione di marker di superficie	77
3.8. ELISA per IL-1 β e IL-6	79
4. Analisi dell'attività antiossidante in un sistema cellulare	85
4.1. Saggio con fluoresceina	85
4.2. Saggio con citocromo c	87
5. Studi di biodistribuzione delle nanoparticelle in vivo.....	89
5.1. Rilevazione della fluorescenza associata alle nanoparticelle negli organi prelevati.....	89
5.2. Analisi confocale degli organi prelevati.....	90
Conclusione.....	93
Bibliografia	95

SOMMARIO

Le proprietà antiossidanti dell'acido lipoico sono conosciute da tempo e vengono sfruttate per la cura di molteplici malattie, tra le quali il danno da riperfusion che avviene in seguito allo stress ossidativo prodotto da un danno ischemico a livello del miocardio. Costruire delle nanoparticelle a base di acido lipoico potrebbe migliorare il delivery del farmaco e aumentare le capacità antiossidanti dello stesso; tuttavia la struttura stessa di un nanomateriale comporta necessariamente uno studio attento della sua tossicità e della sua biocompatibilità consentendo di escludere o di approvare la sua applicazione clinica.

In questo lavoro si sono volute testare una nuova classe di nanoparticelle: le nanoparticelle di acido polilipoico.

Per dimostrare la loro biocompatibilità si sono eseguiti diversi test in vitro quali: saggi MTS, test clonogenici, saggi ELISA, test di emolisi, cinetiche di coagulazione, test di captazione in diversi tipi cellulari, test di attivazione del complemento, test di formazione della corona e analisi dell'espressione di marker di superficie.

Accanto a questi, sono stati anche approntati dei test in vivo su ratti per analizzare la biodistribuzione del materiale dopo iniezione.

Infine, per confermare la conservazione dell'attività antiossidante dell'acido lipoico nella nanostruttura, si sono eseguiti test di scavenging dei radicali sia cell-free che in sistema cellulare.

Tutti i dati ottenuti hanno consentito di verificare che il materiale è inerte e non tossico, di valutare la risposta infiammatoria acuta attivata dal nanosistema, di capire cosa si assorbe sulla superficie delle nanoparticelle, di confermare la loro attività antiossidante e di verificare la loro localizzazione in organi target.

INTRODUZIONE

1. Biocompatibilità e Nanotossicologia

1.1. La definizione di biocompatibilità

Quando si parla di nanomateriali, in particolare con possibili applicazioni mediche, biocompatibilità e nanotossicologia sono due aspetti chiave dell'argomento.

La biocompatibilità è un termine che solitamente viene usato nelle scienze dei biomateriali ma che spesso è difficile da definire data la moltitudine di materiali esistenti: si potrebbe riassumere come la capacità di un materiale di esistere in contatto con i tessuti dell'organismo umano senza creare un danno.

Questo aspetto riguardante la sicurezza dei materiali è emerso negli anni Quaranta del Novecento, quando i primi dispositivi impiantati nell'essere umano hanno dimostrato quanto sia necessario che gli impianti siano chimicamente inerti. Eventi come la corrosione, la degradazione, la presenza di additivi o di contaminanti che possono avere un'attività biologica locale o sistemica sono da evitare.

Da qui, gli impianti costruiti hanno sempre dovuto rispettare requisiti quali il non essere tossici, immunogenici, carcinogenici, trombogenici, irritanti.

Si è poi capito che un materiale darà una risposta biologica non solo in dipendenza dai suoi componenti chimici ma anche in base al sito di localizzazione dello stesso e che inoltre una così semplice stigmatizzazione dei requisiti generali non è in grado di coprire la moltitudine di possibili applicazioni dei biomateriali: potrebbe infatti accadere che per le funzioni in cui è richiesto, un biomateriale debba necessariamente interagire con il sito in cui viene impiantato o che si reputi necessaria la sua degradazione nel tempo.

Alla luce di tutto ciò, si è compreso che, per determinare la biocompatibilità di un materiale, è necessario capire quale meccanismo chimico, biochimico, fisiologico o fisico abbia inizio nell'organismo e perché, e quali siano le conseguenze della sua interazione con uno specifico tessuto. ^[1] In tabella 1 vengono riassunte tutte le maggiori variabili che potrebbero influenzare la risposta dell'ospite. In tabella 2 invece si evidenzia la risposta dell'ospite al biomateriale.

Bulk material composition, micro- (or nano)-structure, morphology
Crystallinity and crystallography
Elastic constants
Water content, hydrophobic-hydrophilic balance
Macro-, micro-, nano-porosity
Surface chemical composition, chemical gradients, surface molecular mobility
Surface topography
Surface energy
Surface electrical/electronic properties
Corrosion parameters, ion release profile, metal ion toxicity (for metallic materials)
Degradation profile, degradation product form and toxicity (for polymeric materials)
Leachables, additives, catalysts, contaminants and their toxicity (for polymeric materials)
Dissolution/degradation profile, degradation product toxicity (for ceramic materials)
Wear debris release profile

Tabella 1. Parametri del biomateriale che potrebbero influenzare la risposta dell'ospite. ^[1]

Protein adsorption and desorption characteristics
Generalised cytotoxic effects
Neutrophil activation
Macrophage activation, foreign body giant cell production, granulation tissue formation
Fibroblast behaviour and fibrosis
Microvascular changes
Tissue/organ specific cell responses (e.g. osteoclasts and osteoblasts for bone, endothelial proliferation)
Activation of clotting cascade
Platelet adhesion, activation, aggregation
Complement activation
Antibody production, immune cell responses
Acute hypersensitivity/anaphylaxis
Delayed hypersensitivity
Mutagenic responses, genotoxicity
Reproductive toxicity
Tumour formation

Tabella 2. Risposta comune dell'ospite al biomateriale. ^[1]

1.2. I biomateriali più comuni

Tra i biomateriali per un uso a lungo termine vi sono le leghe di titanio e cromo-cobalto crosslinkate con polietilene, ossido di alluminio e polimetilmetacrilato per la formazione di articolazioni artificiali; siliconi e acrilici per le lenti intraoculari; i dispositivi in titanio per la cura delle alterazioni nelle frequenze cardiache; i siliconi per la ricostruzione dei tessuti molli; leghe in titanio e cromo-cobalto per la costruzione di valvole cardiache; gli stent intravascolari in lega titanio-nichel o cromo-cobalto; i graft vascolari di politetrafluoroetilene o polietilene tereftalato. In tutti questi esempi, oltre alla necessità di utilizzare un materiale inerte nel tempo è necessario che esso mantenga determinate proprietà fisiche e meccaniche.

Tra i biomateriali per un uso a breve termine vi sono gli acidi polilattici e poliglicolici per le suture riassorbibili in cui, contrariamente ai materiali elencati sopra, si richiede un'interazione non tossica con l'organismo per l'eliminazione del materiale. ^[1]

Tessuti o organi umani non costituiscono un biomateriale, tuttavia rientrano in tale categoria anche gli scaffold per la crescita di tessuto ingegnerizzato. Ad esempio, nelle colture di cardiomiociti si utilizza uno scaffold termoresponsivo che consente la crescita a confluenza delle cellule e la raccolta delle stesse dopo un cambio di temperatura e quindi dell'energia di superficie del materiale. Le cellule poi possono essere utilizzate per la cura del tessuto necrotico che segue un infarto e anche se lo scaffold non viene direttamente utilizzato nell'impianto, viene comunque considerato un biomateriale.

Una nuova classe di biomateriali sono i vettori virali e non (matrici di materiale polimerico degradabile) per la terapia genica, ossia la cura di malattie derivanti dall'assenza di un gene o dal malfunzionamento dello stesso, e che comporta l'introduzione del gene implicato o la rimozione di quello anomalo.

Altra nuova classe sono anche i biosensori e le colture create sfruttando la microfluidica o i microarray.

Quindi quando si parla di biomateriali non si possono solo considerare i materiali tangibili, solidi e prodotti con un approccio top-down, ma bisogna considerare anche nanoparticelle, idrogel, agenti solubili di contrasto, sistemi biologici auto-assemblanti, cellule e virus. ^[2]

Ecco allora che la definizione di biocompatibilità diventa più complessa e quindi l'analisi della tossicità non può più essere generica, ma deve considerare ogni singolo materiale per l'unicità con cui viene prodotto. Questo è tanto più vero quando si parla di nanomateriali.

1.3. Analisi di biosicurezza

Per il motivo appena descritto, le linee guida da rispettare per catalogare un materiale come sicuro per la salute umana vengono spesso revisionate e aggiornate alla luce del progresso scientifico. Per l'*FDA (Food and Drug Administration)* un materiale per considerarsi "bio" ed avere quindi un'applicazione biomedica deve sottostare ad un'attenta analisi volta a rivelare il rischio associato a quel determinato materiale. Tra i test convalidanti ci sono: test di citotossicità, di sensibilizzazione, di emocompatibilità, di pirogenicità, di genotossicità, di carcinogenicità, di tossicità nello sviluppo e nella riproduzione, verifica della degradazione del materiale e della stabilità chimica e della presenza di contaminanti. ^[3]

La biocompatibilità quindi, in termini generici, non riguarda solo l'intrinseca tossicità del materiale ma anche il comportamento cellulare in contatto con tale materiale. Si può quindi parlare di risposta dell'ospite all'impianto e di risposta dell'impianto nell'ospite.

Subito dopo l'impianto, le interazioni tra il sangue e il materiale impiantato avvengono attraverso l'assorbimento sulla superficie del materiale di proteine e lo sviluppo di una matrice che avvolge il materiale stesso. L'assorbimento delle proteine e la formazione della matrice (a predominanza di fibrine) hanno effetti correlati come l'attivazione del sistema di coagulazione, del complemento, del sistema fibrinolitico e delle piastrine. Questo complesso di proteine che si assorbono e si desorbono dalla superficie in base alla loro costante di dissociazione prende il nome di effetto Vroman, e sfrutta interazioni del tipo van der Waals, idrofobiche, elettrostatiche e legami ad idrogeno. La tipologia di proteine che si assorbono sulla superficie, che dipende dalle proprietà di superficie del materiale, avrà conseguenze importanti nel determinare il tipo di risposta del tessuto.

Solitamente, una risposta infiammatoria acuta è accompagnata dall'attivazione dei polimorfomonucleati, dalla degranulazione dei mastociti con rilascio di istamina, interleuchina 4 e 13 e dal reclutamento dei fagociti.

Una risposta infiammatoria cronica è invece di più lunga durata e prevede l'attivazione della risposta cellulare di monociti e linfociti.

Il reclutamento di questi tipi cellulari è dovuto al riconoscimento, da parte di loro specifici recettori, di determinate proteine assorbite sulla superficie del materiale; come ad esempio il riconoscimento di fibronectina, fibrinogeno, IgG e il frammento

C3b da parte delle integrine espresse dai macrofagi. È inoltre di rilevante importanza l'assorbimento di fattori del complemento che si è dimostrato essere legati a severi effetti avversi. [4, 5]

Dal momento che l'assorbimento di specifiche proteine dei fluidi corporei avviene solo sulla superficie del materiale, tale parametro diventa di enorme importanza. Ecco perché le nanodimensioni o il rivestimento dei materiali con particolari polimeri potrebbero avere effetti diversi nell'interazione materiale-ospite.

1.4. I nanomateriali

Si definiscono nanomateriali, secondo la Commissione Europea, “i materiali naturali, incidentali o sintetizzati contenenti particelle, in uno stato non legato, o come un aggregato o come un agglomerato ed in cui, per il 50% o più delle particelle, una o più dimensioni esterne siano nel range da 1 a 100nm”. [6]

Quindi rientrano nella categoria dei nanomateriali tutti quei materiali prodotti naturalmente come materiale derivato da eruzione, nanofossili, agenti microbici, i derivati da sottoprodotto di altri processi come il carbon black e lo smog, e tutto il mondo delle nanoparticelle fabbricate con gli scopi più diversi.

Già nel 1959 si era compresa la potenzialità di questi nanomateriali: la dimensione è, infatti, un elemento chiave quando si parla sia di tossicità che di proprietà del materiale. Alcuni studi sull'ossido di titanio hanno dimostrato che diminuendo le dimensioni delle nanoparticelle aumenta la tossicità polmonare. Inoltre anche la combinazione di due o più metalli, che singolarmente non presentano alti livelli di tossicità, può provocare un aumento delle reazioni avverse. Questo perché passando dal materiale bulk al nanomateriale, tutte le proprietà osservate nel primo cambiano nel secondo e tra queste interessanti e nuove proprietà vi sono: la natura superparamagnetica delle nanoparticelle di ossido di ferro, l'alta fluorescenza dei quantum dots, la risonanza plasmonica delle nanoparticelle di oro e argento e l'aumentata rigidità dei nanotubi di carbonio.

Per questo motivo, quando si analizzano le caratteristiche e le applicazioni di materiali “nano” si parla di nanotossicologia, ossia di una branca delle bio-nanoscienze, per ben distinguere le caratteristiche bulk da quelle nano. La nanotossicologia era inizialmente una disciplina di nicchia e che riguardava soprattutto lo studio degli effetti dovuti all'inalazione di particolato e fibre; ora è invece un'importante disciplina che comprende studi in vitro, in vivo, e di tossicologia ambientale e umana.

I fattori importanti che caratterizzano i nanomateriali sono le dimensioni e la composizione chimica.

La riduzione delle dimensioni a livello nano comporta un aumento della superficie e del rapporto superficie/volume; ciò ha come effetto un aumento delle molecole che possono interagire con la superficie aumentandone la reattività ma anche un aumento dei componenti chimici sulla superficie, rispetto allo stesso materiale di dimensioni maggiori, che può aumentare la tossicità delle nanoparticelle.

Alcuni studi hanno dimostrato che minore è la dimensione dei materiali, maggiore è la loro capacità di diffondere ai tessuti e agli organi come sangue, intestino, sistema linfatico, polmoni, reni. [7, 8, 9] In tabella 3 si riassumono questi aspetti appena evidenziati confrontando le dimensioni dei materiali.

	Nanoparticles (<100 nm)	Larger particles (>500 nm)
General characteristics		
Ratio: number/surface area per volume	High	Low
Agglomeration in air, liquids	Likely (dependent on medium: surface)	Less likely
Deposition in respiratory tract	Diffusion: throughout resp. tract	Sedimentation, impaction, interception; throughout resp. tract
Protein/lipid adsorption <i>in vitro</i>	Yes; important for biokinetics	Less effective
Translocation to secondary target organs		
Clearance	Yes	Generally not (to liver under 'overload')
Mucociliary	Probably yes	Efficient
Alv. macrophages	Poor	Efficient
Epithelial cells	Yes	Mainly under overload
Lymphatic circulation	Yes	Under overload
Blood circulation	Yes	Under overload
Sensory neurons (uptake + transport)	Yes	No
Protein/lipid adsorption <i>in vivo</i>	Yes	Some
Cell entry/uptake		
Mitochondria	Yes (caveolae; clathrin; lip. rafts; diffusion)	Primarily phagocytic cells
Nucleus	Yes (<40 nm)	No
Direct effects (caveat: chemistry and dose!)		
At secondary target organs	Yes	No
At portal of entry (resp. tract)	Yes	Yes
Inflammation	Yes	Yes
Oxidative stress	Yes	Yes
Activation of signalling pathways	Yes	Yes
Primary genotoxicity	Some	No
Carcinogenicity	Yes	Yes

Tabella 3. Caratteristiche, biodistribuzione ed effetti di nanoparticelle (con dimensioni minori di 100nm) e particelle più grandi (con diametro maggiore di 500nm).^[10]

Oltre alla dimensione, anche ciò di cui sono costituite e in particolare le proprietà chimiche del materiale, come presenza di metalli, tendenza ad aggregare, solubilità, reattività chimica, struttura cristallina e potenziale Z, possono determinare differenti effetti nell'organismo. ^[10]

Tutti questi fattori messi assieme daranno quindi l'effetto biologico finale; ecco perché lo studio della tossicità legata ai nanomateriali è complesso ed ogni nuova nanoparticella che differisca da una già studiata solo per una o poche caratteristiche elencate costituisce un nuovo oggetto di studio e di analisi. Non si può quindi prevedere un comportamento generale, ma ogni materiale andrà analizzato per la sua unicità.

Per cercare di creare ordine all'interno di questo scenario, i nanomateriali vengono distinti in materiali "soft" e "hard" in base alla loro composizione chimica.

I materiali soft sono costituiti solitamente da lipidi o polimeri e vengono ampiamente utilizzati in campo medico in quanto si possono ottenere diverse possibilità di azione come l'aumento del tempo di circolazione nel sangue, il rilascio del farmaco pH-dipendente, la possibilità di incorporare ligandi o catene PEG; mentre i

materiali hard sono costituiti solitamente da metalli, ossidi di metalli, semiconduttori, carbonio e ceramiche e trovano moltissime applicazioni scientifiche grazie alle loro proprietà chimiche e fisiche, ma quasi nessuna applicabilità medica. ^[9] In tabella 4 si evidenzia la sostanziale differenza tra materiali soft e hard per quanto riguarda la loro applicabilità per scopi clinici.

	soft NMs			hard NMs			
	liposomes	polymers	other	IONPs	silver	gold	other
refs	13, 15	20–22	13	25–27	30	31	13
clinical use	10	14	8	4	0	1	0
phase III	3	8	2	2	1	0	0
phase II	18	21	9	1	2	1	0
phase I	19	11	10	1	0	1	1

Tabella 4. Materiali soft e hard clinicamente approvati. Si nota come quasi tutti i materiali hard proposti vengano infine rifiutati e non trovino applicabilità. ^[9]

Dal momento quindi che l'utilizzo delle nanoparticelle in medicina per applicazioni quali imaging, ipertermia, delivery di geni o farmaci sta avendo grande espansione è necessario capire quale sia il destino delle nanoparticelle all'interno di un organismo e la reazione dello stesso a questo materiale.

1.5. Il destino delle nanoparticelle e i meccanismi di endocitosi

Una volta somministrate, le nanoparticelle entrano nel flusso sanguigno e raggiungono facilmente organi come fegato e milza dove sono trattenute dal sistema reticolo endoteliale; poche nanoparticelle riescono a raggiungere tessuti protetti da barriere come il cervello, i testicoli o il feto.

L'ingresso nelle cellule dipende molto dalle caratteristiche fisiche e chimiche delle nanoparticelle: essendo il doppio strato lipidico carico negativamente, nanoparticelle cariche positivamente saranno internalizzate molto più velocemente. Alcuni studi ^[11] hanno dimostrato che nanomateriali cationici risultano essere più tossici e dannosi di materiali neutri o anionici poiché producono un danno alla membrana cellulare e al compartimento lisosomiale.

L'endocitosi è la via primaria attraverso cui le nanoparticelle entrano nelle cellule. ^[11] L'endocitosi comprende meccanismi sia fagocitici che non, che spesso hanno come fine l'internalizzazione nei lisosomi. La presenza di questo compartimento acido può portare alla degradazione del nanomateriale con il possibile rilascio per esempio di ioni metallici, o con il suo accumulo in caso di materiale persistente.

La fagocitosi è un processo di captazione attivo e dipendente da recettore che prevede l'estroflessione di filamenti di actina, che riconoscono opsonine legate al materiale esogeno, e la sua internalizzazione attraverso vescicole fagocitiche. Le vescicole poi si fondono con i lisosomi a creare il fagolisosoma e il materiale viene degradato da enzimi idrolitici.

Questo processo avviene in cellule specializzate come macrofagi, monociti e neutrofilo e ha il compito di eliminare patogeni o altro materiale riconosciuto dalle proteine del siero.

L'endocitosi non fagocitica avviene nella maggior parte delle cellule attraverso meccanismi diversi quali l'endocitosi mediata da clatrina, l'endocitosi mediata da caveolina, l'endocitosi indipendente da clatrina e caveolina, e la macropinosi. L'endocitosi mediata da clatrina prevede l'invaginazione di regioni della membrana plasmatica aventi un'alta densità di clatrina (proteina citosolica) e la formazione di vescicole che si fondono con il lisosoma per la degradazione del materiale endocitato.

L'endocitosi mediata da caveolina prevede la formazione di un'invaginazione a forma di fiasca e arricchita in caveolina a dare una vescicola che si fonde con l'endosoma a dare un caveosoma. Il materiale rilasciato in questo caso non viene trasportato al lisosoma, ma al complesso Reticolo Endoteliale-Golgi e quindi questa via di captazione viene spesso studiata per il design di nanomateriali a scopi medici in modo da evitare la degradazione lisosomiale.

La macropinosi e l'endocitosi indipendente da clatrina e caveolina sono meccanismi ad oggi ancora poco compresi. Sembra che la macropinosi sia un metodo di internalizzazione dipendente dai filamenti di actina in grado di endocitare materiale con dimensioni maggiori di $1\mu\text{m}$ attraverso la formazione di un'increspatura (dall'inglese "ruffle") della membrana plasmatica a creare una vescicola che poi si fonderà con il lisosoma. ^[12] In figura 1 si rappresentano le vie endocitiche appena descritte.

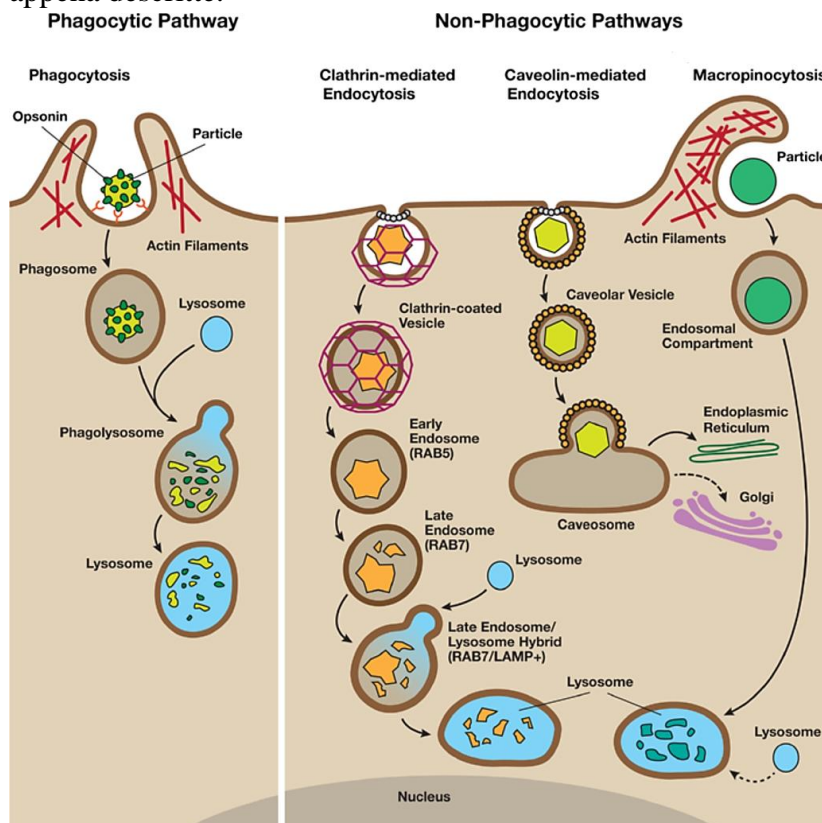


Figura 1. Vie di endocitosi e destino del materiale endocitato. ^[12]

Tuttavia, i meccanismi e i pathway intracellulari sono molto complessi e spesso risulta difficile comprendere quale meccanismo si attivi con un determinato tipo di nanomateriale e ciò quindi rende l'identificazione del rischio molto difficile.

Le nanoparticelle, però, non interagiscono solo con le cellule degli organi in cui si distribuiscono, ma possono interagire anche con il sangue producendo aggregazione ed emolisi. ^[13]

Il sangue è infatti il primo tessuto con cui vengono a contatto e quindi è molto importante capire anche quale sia la risposta biologica a questo livello. Quando le nanoparticelle sono nel sangue, attraggono velocemente molte proteine sulla superficie; questa interazione provoca cambiamenti nelle proprietà del nanomateriale come stato di aggregazione, carica superficiale, chimica di superficie, capacità di targeting, che conducono a un cambio nella funzione. Gli elementi assorbiti possono poi interagire tra loro cambiando la conformazione proteica, l'affinità di legame, la funzione; questa modifica delle proprietà delle nanoparticelle e dei componenti del sangue genera un sistema complesso di interazione biologica.

Quella che si forma è dunque una "corona" proteica che può portare all'aumento delle dimensioni della nanoparticella di 3-35nm e che influenza l'interazione cellulare, l'uptake, la biodistribuzione e l'immunogenicità. ^[14] La nanoparticella, così come era stata pensata e prodotta (identità sintetica), cessa di esistere poiché il ricoprimento con proteine plasmatiche le fa assumere una nuova identità (biologica). Questa nuova identità, inoltre, non solo potrebbe modificare lo stato fisico delle nanoparticelle ma potrebbe influenzare anche una diversa risposta fisiologica a seconda della tipologia di proteine assorbite, come rappresentato in figura 2.

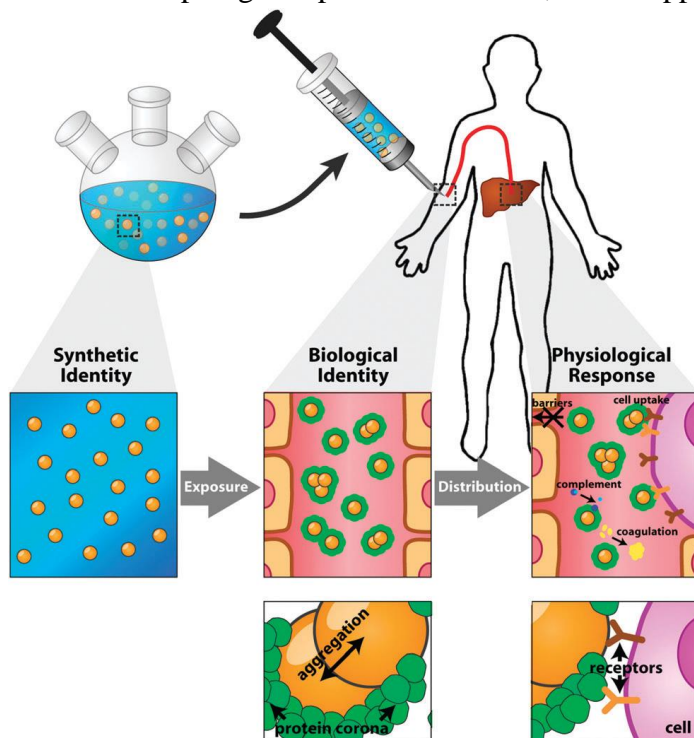


Figura 2. Identità sintetica e biologica delle nanoparticelle. ^[14]

I possibili effetti di questo complesso insieme di interazioni tra le nanoparticelle e i componenti dell'organismo sono riassunti in tabella 5, in cui si sottolinea ancora una volta quanto complessa sia l'analisi della tossicità correlata ai nanomateriali e quanto sia impossibile prevederne l'esito.

Experimental NM effects	Possible pathophysiological outcomes
ROS generation	Protein, DNA and membrane injury, oxidative stress
Oxidative stress	Phase II enzyme induction, inflammation , mitochondrial perturbation
Mitochondrial perturbation	Inner membrane damage , permeability transition (PT) pore opening , energy failure , apoptosis , apo-necrosis, cytotoxicity
Inflammation	Tissue infiltration with inflammatory cells , fibrosis , granulomas , atherogenesis , acute phase protein expression (e.g., C-reactive protein)
Uptake by reticulo-endothelial system	Asymptomatic sequestration and storage in liver , spleen, lymph nodes , possible organ enlargement and dysfunction
Protein denaturation, degradation	Loss of enzyme activity , auto-antigenicity
Nuclear uptake	DNA damage, nucleoprotein clumping , autoantigens
Uptake in neuronal tissue	Brain and peripheral nervous system injury
Perturbation of phagocytic function, "particle overload," mediator release	Chronic inflammation , fibrosis , granulomas , interference in clearance of infectious agents
Endothelial dysfunction, effects on blood clotting	Atherogenesis , thrombosis , stroke, myocardial infarction
Generation of neoantigens, breakdown in immune tolerance	Autoimmunity, adjuvant effects
Altered cell cycle regulation	Proliferation, cell cycle arrest, senescence
DNA damage	Mutagenesis, metaplasia, carcinogenesis

Tabella 5. Possibili risvolti patologici dell'interazione con nanomateriali. [8]

1.6. Il meccanismo di autofagia

Secondo un recente studio [15], sembrerebbe che un ruolo determinante nella tossicità dei nanomateriali sia imputabile all'autofagia. L'autofagia è un processo catabolico in cui i componenti cellulari vengono veicolati ai lisosomi per la degradazione e che è stato descritto per la prima volta nel 1963 [16]. Ad oggi si conoscono tre tipi di autofagia: la micro-autofagia (invaginazione della membrana lisosomiale per la degradazione di componenti citosoliche), l'autofagia mediata da molecole chaperone (per la degradazione di proteine non foldate) e la macro-autofagia in cui vi è la creazione di un autofagosoma inglobante il materiale citoplasmatico, che si fonde poi con un lisosoma a creare un autolisosoma per la degradazione e il riciclo dei nutrienti e il mantenimento dell'omeostasi energetica.

Questo fenomeno avviene a livello basale nella maggior parte dei tipi cellulari, allo scopo di rimuovere organelli danneggiati, proteine ubiquitinate e patogeni, ma può essere indotto in condizioni di stress come inedia, deplezione di fattori di crescita, stress ossidativo e infezioni.

Sembrerebbe che la captazione cellulare delle nanoparticelle possa portare a un sequestro autofagico delle stesse e ad una conseguente disfunzione del processo di autofagia con conseguente aumento della permeabilità di membrana dei lisosomi e

rilascio di enzimi idrolitici, come rappresentato in figura 3. In alternativa, può avvenire una diretta induzione dell'autofagia da parte dello stress ossidativo prodotto dal nanomateriale o un blocco del flusso autofagico, in cui i nanosistemi impediscono la fusione tra autofagosoma e lisosoma o danneggiano il citoscheletro impedendo il traffico cellulare e portando ad un accumulo di vacuoli autofagici e lisosomiali. L'effetto finale globale è l'aumento di permeabilità della membrana mitocondriale, l'induzione di uno stress ossidativo, l'accumulo di organelli danneggiati e la produzione di danni al DNA che possono poi comportare lo sviluppo di cellule tumorali che traggono nutrienti dal processo autofagico consentendo loro di proliferare. [7, 8, 9, 12]

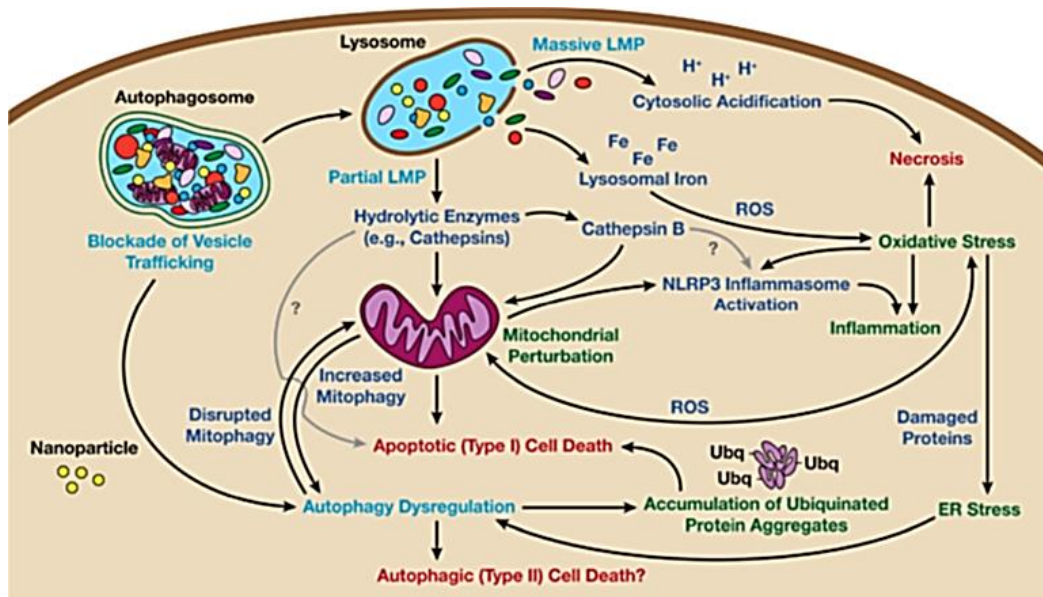


Figura 3. Schema della tossicità associata all'autofagia indotta dalle nanoparticelle. In azzurro gli iniziatori delle disfunzioni autofagiche e lisosomiali; in blu gli effettori tossici, in verde le conseguenze degli effettori tossici; in rosso lo scenario finale.^[12]

1.7. Tecniche di rivestimento della superficie delle nanoparticelle

Alla luce di quanto finora discusso, il rivestimento delle nanoparticelle con del materiale polimerico può andare a contrastare uno o più dei meccanismi appena descritti. Si può infatti diminuire la captazione da parte del sistema reticolo endoteliale, diminuire la reattività di superficie, diminuire l'aggregazione, modificare la carica superficiale, diminuire il legame di determinate proteine, favorire il targeting, modificare la biodistribuzione, diminuire l'opsonizzazione, favorire la captazione clatrina-dipendente.

Negli ultimi trent'anni, il rivestimento della superficie delle nanoparticelle è stato fatto utilizzando polimeri idrofilici non ionici e/o surfactanti. In particolare il PEG (poli-etilenglicole) è il polimero più utilizzato da quando nel 1977 Abuchowski e collaboratori scoprirono che, coniugando questo polimero con la catalasi bovina, si aveva una diminuzione dell'immunogenicità associata all'enzima e un aumento del tempo di circolazione nel sangue dello stesso. ^[17]

La particolarità del PEG è la sua capacità di formare uno strato flessibile sulla superficie delle nanoparticelle prevenendo l'assorbimento delle opsonine attraverso un impedimento sterico; viene spesso descritto con un modello a fungo o a spazzola a seconda della sua densità, come rappresentato in figura 4.

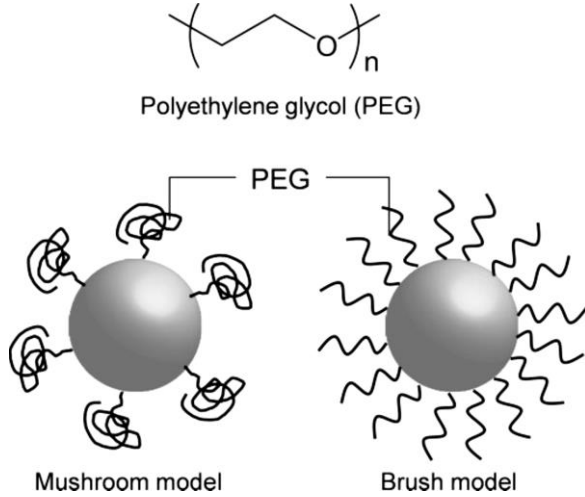


Figura 4. Modelli di nanoparticelle pegilate e struttura del PEG. [18]

Lo scopo della struttura assunta è massimizzare la superficie di rivestimento. Il PEG viene largamente utilizzato per ricoprire liposomi, nanoparticelle polimeriche e micelle, ma sembra interferire con la captazione cellulare e quindi con l'effetto terapeutico di un possibile "nanofarmaco". [19]

Inoltre, sembrerebbe che il delivery di un nanomateriale ricoperto di PEG porti all'attivazione di una risposta immunitaria T-indipendente con produzione di IgM specifiche per il polimero che comportano un'attivazione del complemento e l'impossibilità di effettuare una seconda iniezione con lo stesso materiale. [20]

Per questo sono stati sviluppati polimeri alternativi. [18]

Tra le alternative più studiate vi sono le poli-ossoazoline (o POZ) che sono utilizzate come rivestimento idrofilico similmente a quanto avviene per PEG oppure vengono accoppiate a poli-caprolattone o ad acido poli-aspartico per formare micelle polimeriche. Le POZ vengono sfruttate anche per la preparazione dei liposomi, mostrano proprietà di schermo simili al PEG e si sono dimostrate versatili nella manipolazione sintetica e citocompatibili (Figura 5-a).

Un'altra classe di polimeri sono i poli-amminoacidi come la poli-idrossietil-L-asparagina (o PHEA). Anche questi materiali vengono sfruttati per le loro capacità di schermo e di aumento nel tempo di circolazione nel sangue ma, a differenza del PEG, vengono velocemente degradati dalle proteasi riducendo il rischio del loro accumulo e della relativa tossicità (Figura 5-a).

La N-(2-idrossipropil)metacrilammide (o HPMA) è stata ampiamente studiata come trasportatore macromolecolare di farmaci dal momento che risulta essere biocompatibile e idrofilica, aumenta il tempo di circolazione nel sangue, e presenta la possibilità di modifiche strutturali (Figura 5-a).

Le poli-betaine sono molecole zwitterioniche che sono in grado di interagire elettrostaticamente con le molecole d'acqua riducendo l'assorbimento non specifico

delle proteine, l'adesione dei batteri e la formazione di un biofilm sulle superfici. Inoltre presentano diversi gruppi funzionalizzabili (Figura 5-b).

I poli-gliceroli sono polieteri lineari o ramificati idrofilici alifatici che presentano diversi gruppi funzionalizzabili e hanno proprietà simili al PEG come l'aumento del tempo di circolazione e l'impedimento all'assorbimento proteico (Figura 5-c).

I polisaccaridi come chitosano, destrano ed eparina conferiscono alle nanoparticelle un guscio idrofilico, biodegradabile, poco immunogenico e funzionalizzabile. Questi materiali hanno dimostrato un aumento nel tempo di circolazione e un aumento nell'accumulo del farmaco nei tumori; in particolare il chitosano, che avendo una carica netta positiva, è in grado di aumentare l'interazione nanoparticella-cellula in condizioni debolmente acide come quelle di particolari tumori (Figura 5-d).^[18]

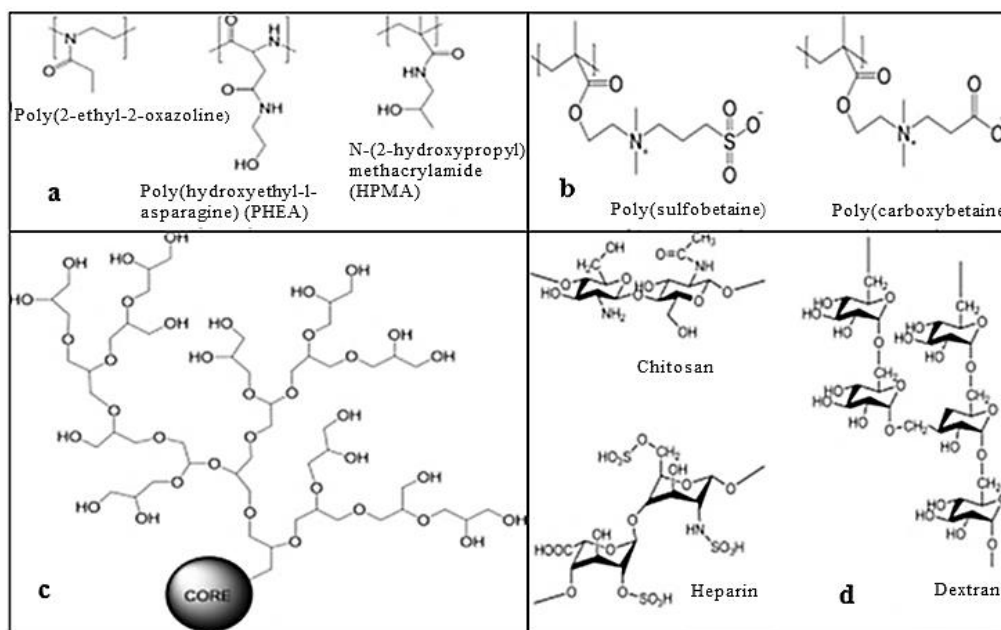


Figura 5. Polimeri alternativi al PEG.^[18]

1.8. Analisi della nanotossicità

Un numero in continuo aumento di nanomateriali ingegnerizzati e con le proprietà più differenti è già nel mercato e ci si aspetta che tale numero aumenti di anno in anno. Per cui, assicurare la sicurezza e la salute umana attraverso uno screening rapido ed efficace dei materiali è una necessità urgente. Ad oggi, organizzazioni come l'ISO (*International Organization for Standardization*), l'OECD (*Organisation for Economic Co-operation and Development*), l'EPA (*US Environmental Protection Agency*) e il NIST (*US National Institute of Standards and Technology*) sono deputate a questo scopo. Per esempio, l'ISO stabilisce una commissione per sviluppare gli standard riguardo terminologia, nomenclatura, metrologia e strumentazione mentre l'OECD si propone di comprendere le proprietà e i potenziali rischi dei nanomateriali.

Inoltre, l'IANH (*International Alliance for Nano-Environmental Health and Safety Harmonization*) si occupa della validazione e standardizzazione dei metodi di analisi e nella verifica della loro robustezza nel confronto tra diversi laboratori. Lo

scopo è quello di ottenere un sistema di test affidabili per valutare la nanotossicologia.

Nonostante questi progetti internazionali, molti studi sui nanosistemi non possono essere comparati e i risultati ottenuti sono contraddittori o inconcludenti. [21] Questo perché molto spesso le differenze riguardano la preparazione dei nanomateriali, il trattamento di cellule in coltura, la durata dell'incubazione e lo svolgimento del saggio: c'è quindi la necessità di armonizzare gli esperimenti tra di loro.

Quando si testa un nanosistema è necessario prima di tutto analizzare la distribuzione delle dimensioni (attraverso dynamic light scattering) e il potenziale Z.

In secondo luogo è necessario comprendere se le particelle tenderanno a formare aggregati o agglomerati e capire se saranno stabili nel tempo.

Quando poi si passa alle analisi in vitro, diversi sono i test disponibili e gli scopi per i quali vengono utilizzati. In tabella 6 vengono riassunti i principali test utilizzati e che consentono il confronto dei risultati tra laboratori differenti e tra dosi diverse di nanomateriale.

Saggio	Scopo	Breve descrizione
Saggio con sale di tetrazolio	Saggio proliferativo	Misura della vitalità cellulare in base alla capacità di metabolizzare il sale.
Alamar Blue	Saggio proliferativo	Misura del potenziale redox cellulare in base alla capacità di trasformare l'indicatore in una molecola fluorescente.
Incorporazione della [3H] timidina nel DNA	Saggio proliferativo	Misura della proliferazione in base alla quantità di timidina radioattiva incorporata.
Saggio clonogenico	Saggio proliferativo	Misura delle capacità di sopravvivenza in base al numero di colonie formate dopo semina a bassa densità.
DNA laddering	Saggio di apoptosi	Analisi della frammentazione del DNA attraverso gel elettroforesi.
Saggio della caspasi	Saggio di apoptosi	Misura dell'attività della caspasi-3 a seguito del taglio di un substrato coniugato a cromoforo o a fluoroforo.
Saggio Comet	Saggio di apoptosi	Analisi del danno a DNA su singola cellula dopo deposizione della stessa su gel di agarosio e corsa elettroforetica.
Saggio TUNEL	Saggio di apoptosi	Analisi della frammentazione del DNA per incorporazione di nucleotidi biotinilati coniugati alla bromodeossiuridina.
Anessina V	Saggio di apoptosi	Evidenziazione di cellule apoptotiche dopo legame alla fosfatidilcolina.
Saggio neutral red	Saggio di necrosi	Analisi della diminuita capacità di captazione in cellule morenti.
Saggio trypan blue	Saggio di necrosi	Evidenziazione dell'assenza di integrità di membrana nelle cellule morte.
LDH	Saggio di necrosi	Analisi del rilascio della deidrogenasi in cellule litiche in base alla sua capacità di convertire il sale di tetrazolio giallo in formazano rosso.
Saggio DCFH	Saggio di stress ossidativo	Analisi della presenza di ROS in base alla loro capacità di convertire la DCFH in fluoresceina.
EPR	Saggio di stress ossidativo	Analisi della presenza di radicali idrossido e superossido.

Perossidazione lipidica	Saggio di stress ossidativo	Analisi colorimetrica della presenza di malondialdeide dopo reazione con acido tiobarbiturico.
Livelli GSH	Saggio di stress ossidativo	Analisi HPLC o analisi colorimetrica con substrato che reagisce con GSH.
ELISA	Saggio infiammatorio	Analisi della produzione di chemochine.
Calceina AM	Saggio di vitalità cellulare	Analisi integrità di membrana attraverso probe non fluorescente che viene trasformato in sonda fluorescente dopo attività dell'esterasi intracellulare.
Ioduro di propidio	Saggio di vitalità cellulare	Analisi permeabilità di membrana delle cellule morienti attraverso probe fluorescente che si intercala al DNA.
Acridine orange	Saggio di apoptosi /necrosi	Analisi della vitalità cellulare attraverso probe fluorescente che intercala il DNA e l'RNA.
Microscopia a trasmissione elettronica	Saggio di localizzazione cellulare	Analisi della localizzazione cellulare tramite probe fluorescenti
Captazione cellulare	Saggio di uptake cellulare	Analisi della quantità di nanoparticelle captate tramite labelling fluorescente o radioattivo.
Stima della quantità di emoglobina	Saggio di emolisi	Analisi dell'effetto litico sui globuli rossi in base alla quantità di emoglobina rilasciata.

Tabella 6. Adattamento da ^[8] e ^[21].

Quello rappresentato è solo un breve elenco di tutti i possibili test presenti in letteratura. È chiaro quindi che nei prossimi anni l'indirizzo dovrà essere quello di realizzare una strategia di test (ossia delle linee guida comuni) con un approccio sistematico e stringente, in modo tale da ottenere un'analisi conclusiva e convincente sulla nanotossicità e quindi un successivo utilizzo sicuro dei nanomateriali nelle scienze della vita. ^[22]

2. Nanoparticelle contenenti acido lipoico

Le nanostrutture utilizzate in questo lavoro di tesi sono un nuovo tipo di nanoparticelle, sintetizzate nel laboratorio del Prof. Fabrizio Mancin del Dipartimento di Scienze Chimiche dell'Università degli Studi di Padova, basate sulla polimerizzazione dell'acido polilipoico.

In letteratura si può trovare una vastità di articoli in cui l'acido lipoico viene utilizzato per le più disparate applicazioni, sfruttando le sue molteplici proprietà come l'attività antiossidante, le capacità chelanti e la solubilità sia in solvente organico che acquoso.

2.1. La scoperta dell'acido lipoico e delle sue proprietà

L'acido lipoico venne isolato per la prima volta nel 1937 da Snell e collaboratori che lo considerarono inizialmente come un fattore di crescita estratto da patata in grado di far crescere i lattobacilli. ^[23]

Solo nel 1951 venne purificato e descritto da Reed. Nel protocollo veniva descritto come ottenere 30mg di un cristallo giallo pallido, molto probabilmente acido lipoico, a partire da 10 tonnellate di fegato bovino. ^[24]

L'acido lipoico venne classificato come vitamina ma solo successivamente, nel 1979, si scoprì che era sintetizzato da animali e uomini. ^[25, 26]

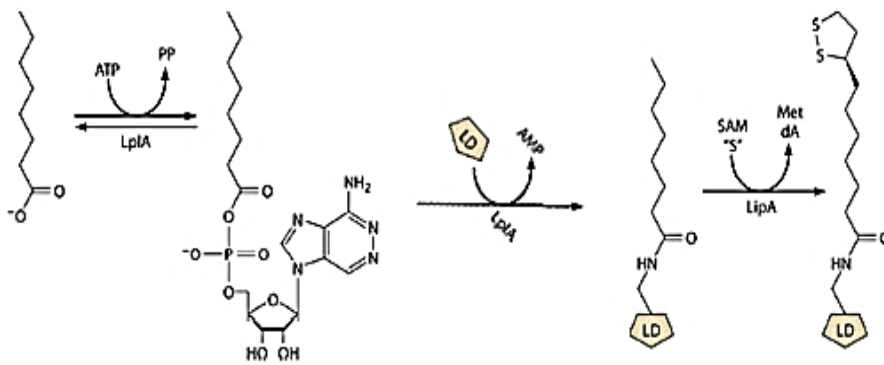
Nel 1974 ^[27] era già noto il suo ruolo come cofattore in complessi multienzimatici che catalizzano la decarbossilazione ossidativa dell' α -chetoglutarato in succinil-CoA per merito dell' α -chetoglutarato deidrogenasi e del piruvato in acetil-CoA per merito della piruvato deidrogenasi ^[28].

Tuttavia il processo di biosintesi è stato scoperto solo negli ultimi dieci anni ^[29]: in studi su *Escherichia coli* si è capito che l'acido lipoico non esiste in forma libera ma legato all'amino-gruppo in ϵ di un residuo conservato di lisina (LD) all'interno di un complesso target. In particolare, nel batterio oggetto di studio, si sono identificate due vie per l'attacco dell'acido lipoico al residuo di lisina: l'acido lipoico può essere ottenuto dall'ambiente esterno e legato tramite ligasi (LplA) al dominio LD dopo attivazione con ATP; oppure può essere prodotto come un sottoprodotto della biosintesi degli acidi grassi (e quindi essere coniugato a una proteina carrier) e solo successivamente trasferito al dominio LD.

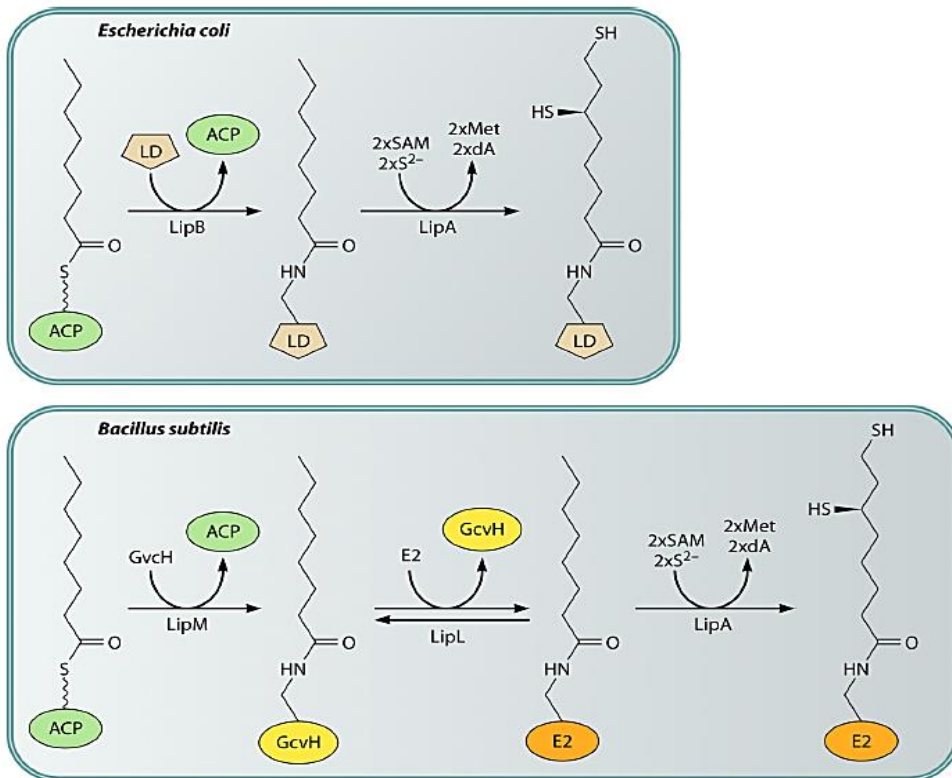
Nonostante la conservazione del pathway di biosintesi tra le specie, solo recentemente ^[30] sono stati compresi tutti i meccanismi di biosintesi (sempre in *E.coli*). Sembrerebbe che il precursore dell'acido lipoico sia l'acido ottanoico (esogeno; figura 6-a) o l'acido ottanoico associato a proteina carrier (derivato dalla sintesi mitocondriale degli acidi grassi di tipo II; figura 6-b), ai quali vengono aggiunti due atomi di zolfo in C-6 e in C-8 con la perdita di due atomi di idrogeno e inversione della stereochimica in C-6, grazie a una sintasi (LipA). Quest'ultima proteina fa parte della famiglia delle SAM, ossia un insieme di enzimi che utilizzano un cluster $[4Fe-4S]^+$ per generare il radicale 5'-deossiadenosile dalla S-adenosil-L-metionina

che a sua volta rimuove gli idrogeni in C-6 e C-8 consentendo l'inserzione dello zolfo.

Studi su *Bacillus subtilis* (figura 6-b) hanno dimostrato che la sintesi avviene in modo simile a quanto appena descritto ma con due ulteriori passaggi intermedi catalizzati da transferasi che potrebbero rassomigliare a quanto avviene in mammifero. In questo caso l'acido ottanoico coniugato alla proteina carrier viene prima trasferito alla proteina H del complesso glicina decarbossilasi e poi alla subunità E2 della piruvato deidrogenasi. Nei mammiferi ciò sembrerebbe avvenire a livello mitocondriale. Le piante invece sembrerebbero seguire un meccanismo più simile a *E. coli* a livello di plastidi e mitocondri.



a.



b.

Figura 6. Biosintesi dell'acido lipoico: a) sintesi dell'acido lipoico a partire da acido ottanoico esogeno in *E. coli*; b) confronto sintesi dell'acido lipoico a partire da acido ottanoico endogeno (in *E. coli* sopra e in *B. subtilis* sotto).^[30]

L'acido lipoico viene somministrato come farmaco antiossidante e la sua azione dipende dalla sua capacità di circolare libero nel sangue; l'enantiomero R può essere introdotto con la dieta assumendo cibi derivati da tessuti con un'alta attività metabolica come cuore di maiale o muscolo di vitello, ma anche spinaci, broccoli e pomodori; oppure può essere somministrato oralmente o per iniezione intravenosa o subcutanea, dimostrando un'alta tollerabilità. In questo caso si somministra un racemo sintetico che ha un'emivita di 30 minuti. [31]

Tra i suoi utilizzi in campo medico vi sono la cura del diabete in cui si è notata la capacità dell'acido lipoico nel prevenire la distruzione delle cellule pancreatiche, aumentare l'uptake del glucosio e rallentare gli effetti avversi quali l'insorgenza della cataratta; la cura del danno da riperfusion; la cura del danno da radiazioni; la cura degli effetti del fumo di sigaretta come enfisema polmonare e cancro [32]; la cura di malattie neurodegenerative quali perdita di memoria per invecchiamento e ischemia. [32, 33]

In tutte le malattie appena citate è apparso chiaramente il ruolo antiossidante dell'acido lipoico: si è visto infatti come riesca ad arginare i danni da stress ossidativo.

2.2. Lo stress ossidativo e l'azione degli antiossidanti

Si definisce radicale libero una specie chimica contenente elettroni non appaiati e tra queste rientra anche l'ossigeno che nella sua configurazione elettronica presenta due elettroni spaiati nell'orbitale molecolare di antilegame π^* . Molti dei radicali, rappresentati in tabella 7, che derivano dall'ossigeno sono instabili, molto reattivi e hanno vita breve.

Molecules	Symbol	Half-lives(s) at 37°C
Molecular oxygen	O ₂	> 10 ²
Lipid peroxide	ROOH	> 10 ²
Semiquinone radical	Q ^{•-}	> 10 ²
Hydrogen peroxide	H ₂ O ₂	10
Peroxyl radical	ROO [•]	1 × 10 ⁻²
Superoxide radical	O ₂ ^{•-}	1 × 10 ⁻⁶
Singlet oxygen	¹ O ₂	1 × 10 ⁻⁶
Alkoxy radical	RO [•]	1 × 10 ⁻⁶
Hydroxyl radical	OH [•]	1 × 10 ⁻⁹

Tabella 7. Radicali derivati dall'ossigeno e tempi di emivita. [34]

La loro elevata reattività può però comportare l'inizio di un danno tissutale a causa di una modifica dei lipidi, delle proteine e del DNA che può alterare il benessere e la vitalità cellulare portando infine alla morte per necrosi o per apoptosi. L'origine dei radicali può essere endogena (catena respiratoria, fagocitosi, infiammazione, citocromo P-450) o esogena (radiazioni, fumo di sigaretta, farmaci, alcol, smog...) e comporta la nascita di uno stress ossidativo quando vi è uno sbilanciamento tra la formazione di radicali e le difese antiossidanti a favore dei primi.

Un antiossidante è una molecola stabile in grado di donare o accettare un elettrone stabilizzando il radicale. Nell'uomo sono presenti diverse molecole antiossidanti (elencate in tabella 8) che possono essere sintetizzate dall'organismo stesso o essere assunte con la dieta. Tra gli enzimi vi sono la superossido dismutasi che scinde l'anione superossido in ossigeno e perossido di idrogeno; la catalasi che decompone il perossido di idrogeno in acqua e ossigeno; il sistema del glutatione (glutazione perossidasi, reductasi e S-transferasi) che decompone il perossido di idrogeno o gli idroperossidi organici.

Tra gli antiossidanti non enzimatici vi sono l'acido ascorbico (da assumere con la dieta) che può ridurre il perossido di idrogeno; il glutatione che grazie al gruppo tiolo della sua cisteina funge da agente riducente e ha ruolo essenziale nel mantenimento dello stato redox cellulare; la melatonina che funge da antiossidante "suicida" e può attraversare le membrane cellulari; la vitamina E che è in grado di neutralizzare i radicali lipidici originati dalla perossidazione lipidica.

Affianco agli antiossidanti appena nominati, esiste una lunga lista di antiossidanti prodotti sinteticamente come additivi alimentari (come il butilidrossitoluene o BHT e il butilidrossianisolo o BHA) o ricavati dalle piante (come da patata, spinaci, pomodori, legumi, ciliegie, olive, prugne, limone...). [34 e 35]

Preventive antioxidants:	
<i>Non-radical decomposition of hydroperoxides and hydrogen peroxide:</i>	
Catalase:	Decomposition of hydrogen peroxide: $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$
Glutathione peroxidase (cellular)	Decomposition of hydrogen peroxide and free fatty acid hydroperoxides: $\text{H}_2\text{O}_2 + 2 \text{GSH} \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{GSSG}$ $\text{LOOH} + 2\text{GS} \rightarrow \text{LOH} + \text{H}_2\text{O} + \text{GSSG}$
Glutathione peroxidase (plasma)	Decomposition of hydrogen peroxide and phospholipid hydroperoxides
Glutathione peroxidase	GSSG
Glutathione-S-transferase	Decomposition of lipid hydroperoxides
<i>Quenching of active oxygens</i>	
Superoxide dismutase (SOD)	Disproportionation of superoxide: $2\text{O}_2^{\cdot-} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$
Carotenoids, vitamin E	Quenching of singlet oxygen
Radicals-scavenging antioxidants: scavenge radicals to inhibit chain initiation and break chain propagation	
Lipophilic:	Vitamin E, ubiquinol, carotenoids
Hydrophilic:	Vitamin C, uric acid, bilirubin, albumin
Repair and de novo enzymes: repair the damage and reconstitute membranes:	
	Lipase, protease, DNA repair enzymes, transferase

Tabella 8. Riassunto dell'azione degli antiossidanti. [34]

L'acido lipoico, quindi, rientra in quest'ultima categoria. Le sue capacità antiossidanti sono dovute alla presenza di un'alta densità elettronica a livello dei due atomi di zolfo che conferisce all'eterociclo un'alta tendenza a ridursi nel relativo ridotto chiamato acido diidrolipoico (DHLA; entrambi raffigurati in figura 7). A sua volta DHLA è più facilmente ossidabile rispetto ai monotioli conferendo così alla molecola un'alta attività nelle reazioni di scambio -SH/S-S-.

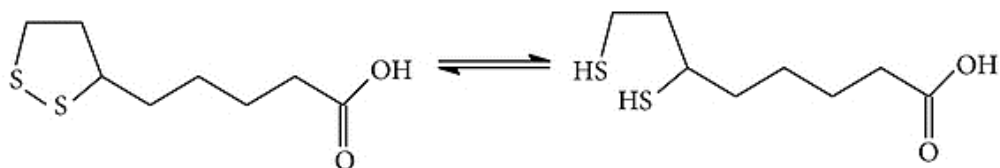


Figura 7. Acido lipoico (a sinistra) e relativo ridotto (DHLA, a destra). [32]

L'acido lipoico assunto esternamente può essere ridotto in DHLA nei mitocondri dalla diidrolipoammide deidrogenasi (che preferisce l'enantiomero R) per mezzo di NADH o nel citosol dalla glutatione reduttasi (che preferisce l'enantiomero S) per mezzo di NADPH.

Diversi studi in vitro e in vivo (riassunti alle tabelle 9 per l'acido lipoico e 10 per DHLA) hanno dimostrato come sia l'acido lipoico che il DHLA siano molto reattivi contro una particolare varietà di specie reattive dell'ossigeno: l'acido lipoico è infatti in grado di neutralizzare il radicale idrossido, l'acido ipocloroso e l'ossigeno singoletto, inoltre crea complessi stabili con Mn^{2+} , Cu^{2+} e Zn^{2+} e chela Fe^{2+} .

DHLA invece è in grado di neutralizzare il radicale idrossido, l'acido ipocloroso, il radicale idroperossido e il radicale superossido, inoltre può chelare sia Fe^{2+} che Fe^{3+} .

Oxidant	Scavenged by α -Lipoate?	Test System
Superoxide radical	No	O_2^- generated by xanthine-xanthine oxidase and detected by ESR using spin traps
	No	O_2^- generated by hypoxanthine-xanthine oxidase and detected by O_2^- dependent cytochrome c reduction
Hydrogen peroxide	No	H_2O_2 added directly and detected by peroxidase-based assay system
Hydroxyl radical	Yes	OH^\cdot generated by $H_2O_2 + FeSO_4$ and detected by ESR using spin traps or by chemiluminescence using luminol
	Yes	OH^\cdot generated by $H_2O_2 + FeCl_3 +$ ascorbate and detected by deoxyribose degradation. Rate constant for reaction = $4.71 \times 10^{10} M^{-1} s^{-1}$
Hypochlorous radical	Yes	HOCl added directly and detected by effect on $\alpha 1$ -antiproteinas activity
	Yes	Same
Peroxyl radical	No	Peroxyl radicals generated in aqueous phase by thermal decomposition of 2,2'-azobis(2-amidinopropane)-dihydrochloride and detected by fluorescence quenching of phycoerythrin. Peroxyl radicals generated in lipids (liposomes or microsomes) by thermal decomposition of 2,2'-azobis (2,4 dimethylvaleronitrile)
	Yes	$CCl_3O_2^\cdot$ generated by linear accelerator and detected spectrophotometrically. Rate constant of reaction $1.8 \times 10^8 M^{-1} s^{-1}$
Singlet oxygen	Yes	1O_2 generated by rubrene autoperoxidation in air-saturated benzene when stimulated at 546 nm and detected by following disappearance of rubrene spectrophotometrically. Rate constant of the reaction = $1 \times 10^8 M^{-1} s^{-1}$. DHLA not tested
	Yes	1O_2 generated by photosensitized oxidation of methylene in chloroform or methanol; reaction detected by analyzing oxidation products of the methyl ester of LA. DHLA not tested
	Yes	1O_2 generated by thermolysis of endoperoxide and detected by infrared chemiluminescence. Rate constant of the reaction = $1.38 \times 10^8 M^{-1} s^{-1}$
	Yes	1O_2 generated by thermolysis of endoperoxide and detected by single strand DNA breaks
Transition metals	Chelator	α -Lipoic acid formed stable complexes with Cu^{2+} , Mn^{2+} , and Zn^{2+} in aqueous solution. Bisnorlipoate and tetranorlipoate formed more stable complexes
	Chelator	Same as system to test 1O_2 . When EDTA was added, the protective effect of LA decreased, suggesting that it was at least partially due to metal chelation
	Possible chelator	LA decreased Cd^{2+} toxicity in hepatocytes, but much less effectively than DHLA. The authors speculate that LA is taken up and converted to DHLA, which is the compound exerting the protective effect
	No chelation	In rat liver microsomes + $FeSO_4 +$ ascorbate, LA had no effect on accumulation of TBARS
	Chelator	LA decreased site-specific iron-induced degradation of deoxyribose, suggesting that it chelated the iron
Chelator	Decreased Cu^{2+} -induced oxidation of ascorbate, increased partitioning of Cu^{2+} into octanol, inhibited Cu^{2+} -induced lipid peroxidation	

Tabella 9. Attività antiossidanti dell'acido lipoico. [32]

Oxidant	Scavenged by DHLA?	Test System
Superoxide radical	Yes	$O_2^{\cdot -}$ generated by xanthine-xanthine oxidase and detected by ESR using spin traps. Sulfhydryl content of DHLA decreased during reaction and $[H_2O_2]$ increased. Rate constant of reaction = $3.3 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$
	Yes	$O_2^{\cdot -}$ generated by xanthine-xanthine oxidase and detected by epinephrine oxidation. Rate constant of reaction = $7.3 \times 10^3 M^{-1} s^{-1}$
	No	$O_2^{\cdot -}$ generated by hypoxanthine-xanthine oxidase and detected by $O_2^{\cdot -}$ -dependent nitro-blue tetrazolium reduction.
Hydrogen peroxide	No	H_2O_2 added directly and detected by iron-thiocyanate.
	No	H_2O_2 added directly. Reaction monitored by measuring thiol content of DHLA
Hydroxyl radical	Yes	OH^{\cdot} generated by $H_2O_2 + FeSO_4$ and detected by ESR using spin traps
	No (promoted oxidation)	OH^{\cdot} generated by $H_2O_2 + FeCl_3 +$ ascorbate and detected by deoxyribose degradation. Prooxidant effect postulated due to reduction of ferrous ion and/or regeneration of ascorbate by DHLA
Hypochlorous radical	Yes	HOCl added directly and detected by effect on α 1-antiproteinase activity
Peroxyl radical	Yes	Same
	Yes	Peroxy radicals generated in aqueous phase by thermal decomposition of 2,2 azobis(2-amidinopropane)-dihydrochloride and detected by fluorescence quenching of phycoerythrin. Peroxyl radicals generated in lipids (liposomes or microsomes) by thermal decomposition of 2,2'-azobis (2,4 dimethylvaleronitrile). Stoichiometry: 1.5 mol peroxy radicals quenched per mol DHLA
	Yes	Same as Kagan et al. 1992. In addition, peroxy radicals generated in liposomes by AMVN and detected by fluorescence decay of parinaric acid.
	Yes	$CCl_3O_2^{\cdot}$ generated by linear accelerator and detected spectrophotometrically. Rate constant of reaction $2.7 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$
Singlet oxygen	No	1O_2 generated by thermolysis of endoperoxide and detected by infrared chemiluminescence.
	Yes (?)	1O_2 generated by thermolysis of endoperoxide and detected by single strand DNA breaks. The protective effect of DHLA may not be due to direct quenching of 1O_2
Transition metals	Chelation	DHLA decreased Cd^{2+} toxicity in isolated hepatocytes. Also decreased TBARS in Cd^{2+} exposed hepatocytes, indicating that, in the absence of added iron, DHLA's activity is overall antioxidant against peroxidation (contrast to Bast and Haenen, and Scott et al.)
	Chelation	DHLA bound iron from ferritin in the ferrous and ferric states.
	Prooxidant	In $FeCl_3$ -EDTA + H_2O_2 system, accelerated deoxyribose degradation Accelerated reaction also when no EDTA in system, suggesting that its iron-binding is not as effective as its iron-reduction However, no prooxidant effect when DHLA was used alone in an Fe (III)-bleomycin-DNA system
	Prooxidant	Rat liver microsomes + $FeSO_4 \pm$ ascorbate. DHLA accelerated peroxidation as measured by TBARS
	No prooxidant effect	No electron transfer from DHLA to Fe^{3+} as measured by Fe^{2+} -phenanthroline complex. Also, DHLA did not potentiate formation of OH^{\cdot} in $Fe SO_4$ - H_2O_2 system, as measured by ESR (DMPO spin trap)
	Some prooxidant effect	In lipid peroxidation in microsomes, induced by AMVN, in the absence of iron (chelated by deferoxamine), DHLA decreased peroxidation (as measured by TBARS) about 50%. In the presence of iron, DHLA did not decrease peroxidation (although there was no pro-oxidant effect; i.e., the antioxidant and pro-oxidant effects of DHLA balanced in this system). In this system Tetranor-DHLA greatly increased (5X) peroxidation in the presence of iron
Prooxidant	Micromolar DHLA, in the presence of Cu^{2+} ions, caused single-strand nicks in pSP64 plasmid DNA. Other ions were tested in the same system and had no effect: Co^{2+} , Cr^{3+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} , and Zn^{2+} . Other thiols also found to cleave DNA in this system in the presence of Cu^{2+} .	

Tabella 10. Attività antiossidante di DHLA. [32]

Accanto all'attività diretta di neutralizzazione dei due antiossidanti, la coppia redox acido lipoico/DHLA sembra essere in grado di rigenerare altri antiossidanti come il glutatione e l'acido ascorbico (direttamente) e la vitamina E (indirettamente). In questo ultimo caso la coppia redox promuove l'aumento dei livelli di ubiquinolo che a sua volta ricicla la vitamina E. [32]

2.3. Nanomateriali già sviluppati allo scopo di sfruttare le proprietà dell'acido lipoico

In letteratura si trovano molti esempi in cui le proprietà dell'acido lipoico appena descritte trovano applicazione in potenziali nanofarmaci.

Per esempio, nel 2002 ^[36] sono state testate nanoparticelle di oro e di argento ricoperte da acido lipoico per verificare la capacità di chelazione degli ioni metallici. In questo lavoro, sfruttando le variazioni nell'assorbimento del plasmon si è potuto dimostrare come, aumentando la concentrazione degli ioni metallici, aumenti anche l'effetto chelante con diminuzione del massimo di assorbimento e confrontando questi dati con quelli ottenuti dalla microscopia elettronica si è potuto correlare ciò ad un aumento anche della precipitazione (figura 8-a).

È del 2008 invece un lavoro ^[37] che focalizzava la propria attenzione sulle capacità antiossidanti dell'acido lipoico e sulla possibilità di veicolare tale antiossidante come un farmaco attraverso biglie di gel basate su un polisaccaride. Lo scopo era quindi un rilascio controllato, pH-indipendente, e una stabilizzazione del farmaco attraverso l'uso di un complesso acido alginico-chitosano in cui il gruppo carbossilico dell'acido lipoico interagisce con l'ammino gruppo del chitosano. Il sistema ha dimostrato l'aumento del tempo richiesto al totale rilascio dell'acido lipoico e si configura come potenziale farmaco per la cura di quelle malattie sopra citate per le quali esiste solo un'assunzione per via orale o parentale di acido lipoico con un'emivita di 30 minuti (figura 8-b).

Sempre basandosi sulle capacità antiossidanti dell'acido lipoico, ma con un approccio del tutto rinnovato, nel 2012 è stato pubblicato un lavoro ^[38] che aveva come obiettivo la coniugazione dell'attività antiossidante dell'acido lipoico e dell'epigallocatechingallato (che ha anche proprietà anticarcinogeniche e rigenerative) con le capacità di penetrazione dello strato corneo della pelle di nanoparticelle di oro, allo scopo di ottenere un potenziale farmaco ad uso topico per la rigenerazione delle ferite (figura 8-c).

Nel 2011 ^[39] è invece stato pubblicato un lavoro volto a coniugare le capacità di neutralizzazione dei radicali da parte dell'acido lipoico e dell'argento per la cura del danno da radiazione da sfruttare come farmaco protettore durante la radioterapia contro il cancro. In questo caso sono state create delle nanoparticelle di argento, stabilizzate con Pluronic F-127 e ricoperte di acido lipoico che hanno dimostrato proprietà antiossidanti in vitro e diminuzione della mortalità e della perdita di peso in vivo (su topi) dopo radiazione (figura 8-d).

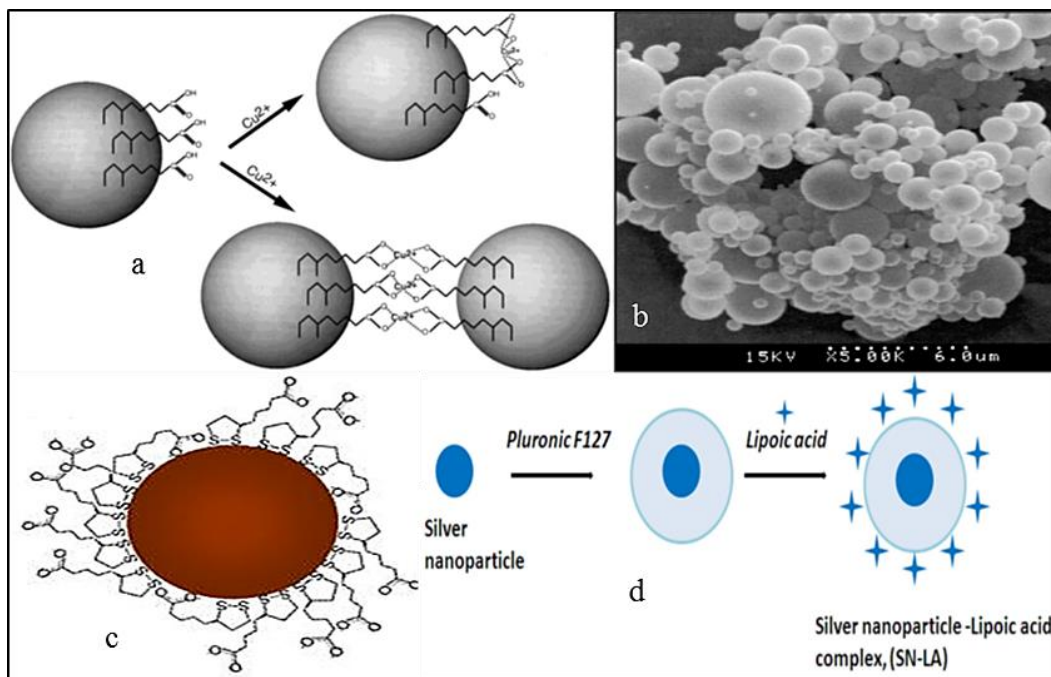


Figura 8. Tipi di nanoparticelle contenenti acido lipoico. In a ^[36], nanoparticelle di argento aventi l'acido lipoico sulla superficie; in b ^[37], immagine TEM delle biglie di chitosano e acido lipoico; in c ^[38], nanoparticelle di oro funzionalizzate con l'acido lipoico; in d ^[39], nanoparticelle di argento stabilizzate con Pluronic F127 e sulla cui superficie si assorbe l'acido lipoico.

Oltre a questi esempi riguardanti l'acido lipoico, in letteratura si possono trovare elenchi ^[40] di possibili applicazioni di innumerevoli tipi di nanoparticelle volti tutti a sfruttare le capacità antiossidanti di materiali diversi.

Da questa breve panoramica, si può quindi facilmente dedurre come, in campo biotecnologico, la necessità di attenuare patologie legate ai radicali liberi stia emergendo. In questo scenario si inserisce anche il mio progetto di tesi.

2.4. Le nanoparticelle utilizzate in questo progetto di tesi

Le nanoparticelle prodotte in collaborazione con il Dipartimento di Scienze Chimiche dell'Università degli Studi di Padova, e già oggetto di studio, per quanto riguarda la parte di sintesi, di un precedente progetto di tesi ^[41], riuniscono le idee riportate in tre articoli apparsi rispettivamente nel 2009 ^[42], nel 2013 ^[43] e nel 2014^[44].

L'articolo di Lee ^[42] aveva come scopo quello di creare una nanoparticella antiossidante costituita dal solo antiossidante in modo tale da modificarne le proprietà bulk aumentandone il rapporto superficie-volume e quindi, di conseguenza, aumentando la sua biodisponibilità e la sua azione antiossidante.

A questo fine, molecole di acido lipoico sono state esterificate con diversi alcoli a creare un'emulsione di nanosfere insolubili in acqua; per preservare le proprietà antiossidanti, l'anello eterociclico dell'acido lipoico è stato lasciato intatto. Delle varie tipologie prodotte (figura 9, 1a-6a) è stata testata la stabilità fisica e chimica nel tempo e l'attività antiossidante.

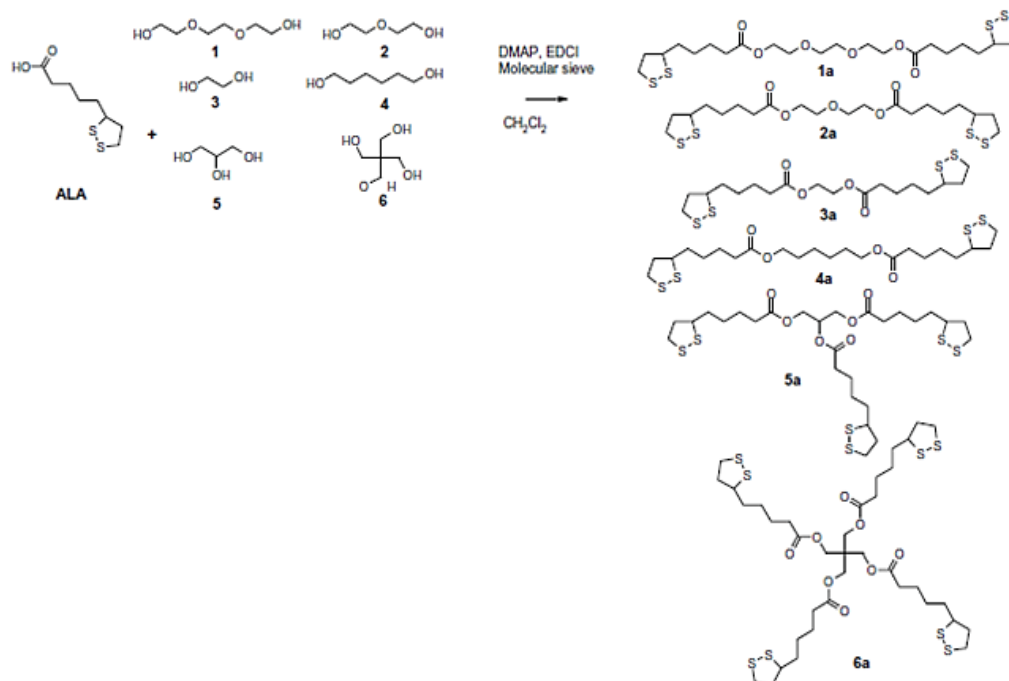


Figura 9. Schema tipologie di composti contenuti multipli di acido lipoico. ^[42]

In base ai risultati ottenuti, riguardanti la stabilità del composto, da questo gruppo di ricerca, il laboratorio del Prof. Fabrizio Mancin ha scelto di sperimentare la classe di molecole appartenente al gruppo 4a (vedi figura 9) e di modificarle attraverso nuove tecniche di polimerizzazione per aumentarne l'uptake cellulare.

2.5. I peptidi cell-penetrating

Negli ultimi dieci anni c'è stato un interesse comune nella ricerca di metodi alternativi per il delivery di molecole attraverso la membrana cellulare rispetto a vettori virali, elettroporazione, microiniezione e liposomi che risultano essere tossici e immunogenici. L'interesse comune si è indirizzato verso peptidi cell-penetrating (riassunti in tabella 11). Questi peptidi (detti anche CPP) sono sequenze di circa 30 aminoacidi che facilitano il trasporto attraverso la membrana senza il dispendio di energia e con la mediazione o meno di uno specifico recettore. All'interno dei CPP si possono distinguere CPP derivati da proteine (che contengono la sequenza fondamentale di una proteina carrier), CPP modello (sequenze disegnate per riprodurre strutture ad alfa elica o strutture trasportatrici già note), CPP progettate (peptidi chimerici con dominio idrofobico e idrofilico di diversa origine).

Name sequence	Class source
Penetratin RQIKIWFQNRRMKWKK ^a	protein derived CPP <i>Drosophila</i> Antennapedia homeodomain (amino acids 43–58)
Tat CGRKKRRQRRRPPQC ^a	protein derived CPP protein from human immunodeficiency virus 1 (amino acids 48–60)
pVEC LLILRRRIRKQAHHSK-amide	protein derived CPP derived from murine vascular endothelial cadherin
MAP KLALKLALKALKAALKLA-amide	model peptide
(Arg)₇ RRRRRRR	model peptide
MPG GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKSKRKV	designed CPP peptide derived from fusion sequence of HIV-1 gp41 protein coupled to peptide derived from the nuclear localization sequence of SV40 T-antigen
Transportan GWTLSAGYLLGKINLKALAALAKISIL-amide	designed CPP minimal active part of galanin (amino acids 1–12) coupled to mastoparan via Lys ¹³

^a These peptides can be amidated at C-terminus or not.

Tabella 11. Esempi di CPP. [45]

L'unico elemento in comune tra i vari CPP è il fatto di essere molecole anfifiliche con una carica netta positiva.

Il meccanismo di internalizzazione dei CPP non è ancora stato completamente risolto, ma quel che è chiaro è che è un processo che si realizza in step (rappresentati in figura 10) e che prevede dapprima l'interazione elettrostatica delle molecole cationiche con i fosfolipidi della superficie cellulare, poi l'internalizzazione per endocitosi e di conseguenza la degradazione peptidolitica all'interno della cellula con il rilascio di prodotti della degradazione. [45]

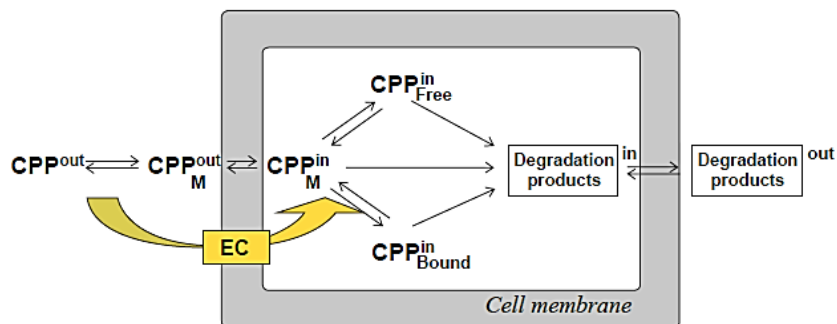


Figura 10. Schema semplificato dell'internalizzazione dei CPP. M sta per legato alla membrana, EC per endocitosi. [45]

Vista la potenziale tossicità dei comuni trasportatori, negli ultimi anni l'attenzione è stata rivolta a una nuova classe di CPP, ossia ai CPP polidissolfuro. In particolare, Matile e collaboratori [43, 44] hanno sviluppato un metodo (rappresentato in figura 11) per consentire l'ingresso di un farmaco o di un fluoroforo nella cellula sfruttando la reazione di rottura del legame S-S indotta da un tiolo libero che funge da iniziatore. L'idea è di indurre una reazione di polimerizzazione che promuove la formazione di nuovi legami S-S fino a che non viene introdotto un terminatore. Sia l'iniziatore che il terminatore possono essere funzionalizzati con la molecola di interesse.

Una volta che questo sistema si trovi sulla superficie cellulare, può andare a interagire con i tioli presenti sulla membrana e legarsi ad essi in modo covalente, aumentando così la concentrazione a livello locale dei CPP. Questo legame consente la successiva internalizzazione della molecola che andrà così a interagire con il glutathione a livello citosolico, determinandone anche il suo destino finale.

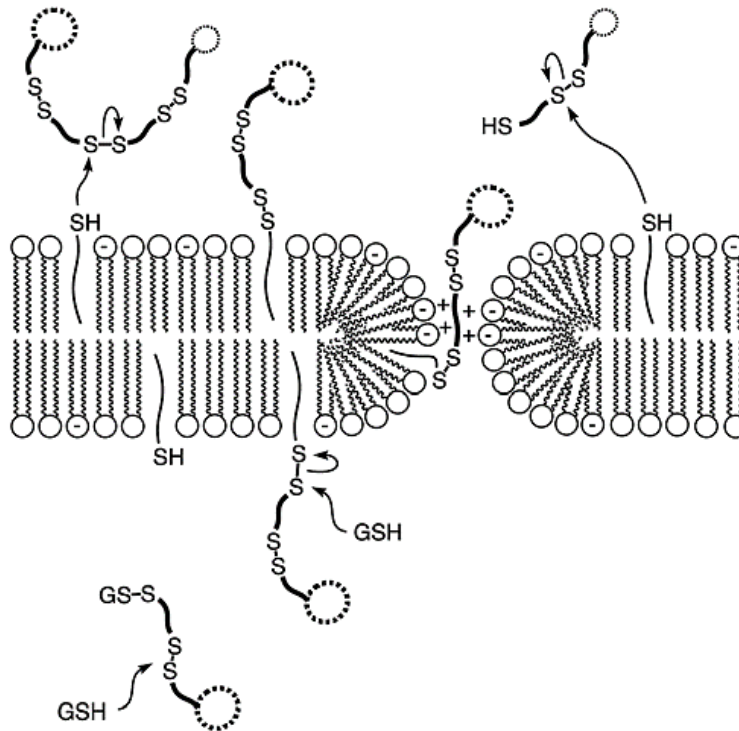


Figura 11. Meccanismo di ingresso di CPP polidissolfuro. [46]

Basandosi proprio su questa particolare reazione chimica dello zolfo, il gruppo di ricerca del professor Fabrizio Mancin ha determinato un metodo (rappresentato in figura 12) per produrre nanoparticelle sferiche contenenti acido lipoico stabilizzate sia dal legame intermolecolare che dalla presenza di Pluronic F127 sulla superficie. [41]

Sfruttando lo stesso tipo di reazione, durante la polimerizzazione è possibile introdurre un fluoroforo per consentire l'imaging e quindi la successiva localizzazione subcellulare delle nanoparticelle.

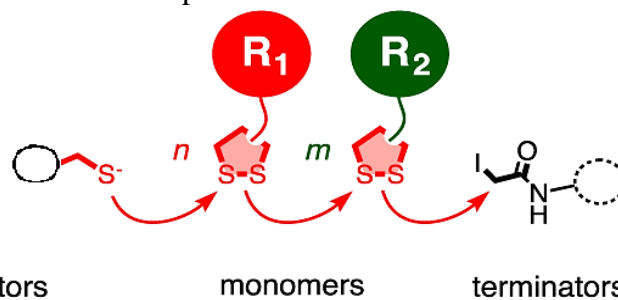


Figura 12. Schema sintetico della produzione delle nanoparticelle. [46]

2.6. Possibile applicazione delle nanoparticelle di acido polilipico

In futuro questo tipo di materiale potrebbe esser usato per applicazioni mediche. In particolare, il mio progetto di tesi si inserisce in un più ampio progetto di ricerca, che ha come scopo l'utilizzo di tali nanoparticelle per la cura del danno da riperfusione.

Tale problematica si verifica dopo un infarto a seguito di una rivascolarizzazione del tessuto interessato che ha come effetti una disfunzione contrattile e la morte cellulare con il rischio di sviluppare pericolose aritmie. L'ischemia infatti porta a una totale assenza di ossigeno a valle del blocco ischemico e a una serie di eventi negativi nella cellula come l'alterazione del potenziale di membrana, l'alterazione nella distribuzione degli ioni, l'aumento dell'ipoxantina, la diminuzione dell'ATP e del glutatione, la produzione di citochine e di altre molecole pro-infiammatorie. Quando l'ostruzione viene liberata e l'ossigeno torna a circolare la presenza dell'ipoxantina e di un tessuto così fortemente danneggiato porta alla produzione di specie reattive dell'ossigeno e alla formazione di un tessuto necrotico non funzionale. ^[47, 48, 49]

Ecco perché diventa di fondamentale importanza supplire alla mancanza dei sistemi di difesa cellulari aggiungendo antiossidanti (come ad esempio le nanoparticelle di acido polilipico), per arginare il danno da radicali liberi.

SCOPO DELLA TESI

Il mio progetto di tesi è nato con lo scopo di analizzare se e in quale misura le nanoparticelle di acido polilipico risultino biocompatibili e siano efficaci nella neutralizzazione dei radicali.

Durante il tirocinio, ho condotto dei saggi per valutare l'efficacia di tale materiale nella neutralizzazione dei radicali, scopo per il quale tali nanoparticelle sono state create. A tal fine, ho valutato la capacità delle nanoparticelle di agire da scavenger per i radicali sia tramite saggi cell free, in cui il radicale è stato creato chimicamente, sia grazie ad esperimenti di neutralizzazione di ROS cellulari. Le conclusioni ottenute da questi esperimenti hanno consentito di determinare l'efficacia della preparazione, e consentiranno di definire se proseguire in questo senso o rivalutare il protocollo di sintesi delle nanoparticelle in modo da aumentarne l'attività antiossidante.

In parallelo agli esperimenti volti a valutare l'attività antiossidante delle nanoparticelle, il mio interesse si è focalizzato sullo studio delle interazioni tra differenti dosi di nanoparticelle di acido polilipico e diversi tipi cellulari (monociti e macrofagi umani, macrofagi murini e cellule HeLa) tramite l'utilizzo della citofluorimetria a flusso e la microscopia confocale. Questa prima analisi è stata utile per capire se vi era interazione tra le nanoparticelle e le cellule e per poter almeno in parte ipotizzare il comportamento cellulare a seguito dell'immissione di tali nanoparticelle nell'organismo. A tale scopo, ho effettuato saggi ELISA per valutare se le nanoparticelle potessero indurre attivazione cellulare e conseguente produzione di citochine da parte di monociti e macrofagi; inoltre, ho testato, attraverso saggi MTS e clonogenici, se le nanoparticelle inducevano la diminuzione della vitalità cellulare.

Ovviamente, come ampiamente descritto nell'introduzione, è di interesse fondamentale non solo capire se le nanoparticelle inducano l'attivazione della risposta cellulare, ma anche comprendere il comportamento dei nanosistemi quando immessi nei fluidi biologici (come il sangue, principale veicolo della disseminazione delle nanoparticelle nell'organismo) e valutare quali proteine del siero si assorbano sulla superficie delle nanoparticelle. A questo scopo, sono stati eseguiti dei saggi per valutare la cinetica di coagulazione del plasma indotta dalle nanoparticelle, l'attività emolitica dei nanosistemi, la loro capacità di indurre l'attivazione del complemento e l'analisi delle proteine di siero o plasma che si associano alle nanoparticelle (corona).

Tutti i dati ottenuti mi hanno consentito di verificare se quello utilizzato era un materiale inerte o meno, di valutare la risposta acuta indotta dalle nanoparticelle e di capire cosa si assorbe sulla loro superficie per comprendere meglio quali meccanismi biologici potrebbero attivarsi e con quali esiti.

In collaborazione con la Dott.ssa Chiara Castellani del Dipartimento di Scienze Cardiologiche, Toraciche e Vascolari dell'Università degli Studi di Padova sono stati anche effettuati esperimenti in vivo per analizzare la risposta di un organismo

intero all'iniezione di nanoparticelle. Lo scopo di tali esperimenti è stato valutare la biodistribuzione delle nanoparticelle, avendo come scopo ultimo l'analisi della clearance e della tossicità per una futura applicazione.

Per il mio progetto di tesi sono stati utilizzati due lotti di nanoparticelle di acido polilipoico (come descritto nella sezione Materiali e Metodi) e nanoparticelle di silice amorfa commerciali (Ludox®), in modo da poter confrontare i risultati sulla tossicità delle nanoparticelle di acido polilipoico con un nanomateriale che è stato dimostrato essere tossico.

Il mio progetto di tesi si è svolto presso il laboratorio del Prof. Emanuele Papini, del Dipartimento di Scienze Biomediche dell'Università degli Studi di Padova, sotto la supervisione della Dott.ssa Regina Tavano e in collaborazione con il laboratorio del Prof. Fabrizio Mancin, del Dipartimento di Scienze Chimiche dell'Università degli Studi di Padova, che si è occupato della sintesi e della caratterizzazione chimica delle nanoparticelle.

MATERIALI E METODI

1. Nanoparticelle

1.1. Sintesi delle nanoparticelle di acido polilipoico

Materiali:

- Acido lipoico (Sigma)
- 1,8-ottandiolo (Sigma)
- 4-dimetilamminopiridina (Sigma)
- 1-etil-3-(3-dimetilamminopropil)carbodiimmide (Sigma)
- Pluronic 127 (Sigma)
- Rodamina (Sigma)
- Trietilammina (Sigma)
- Idrossibenzotriazolo (Sigma)
- Ottantiolo (Sigma)
- Iodo acetammide (Sigma)
- PBS (Sigma)

Procedimento:

Le nanoparticelle di acido polilipoico sono state sintetizzate nel laboratorio del Prof. Fabrizio Mancin del Dipartimento di Scienze Chimiche, Università degli Studi di Padova.

Innanzitutto è stato formato un dimero (riportato in figura 13) facendo reagire due equivalenti di acido lipoico con un equivalente di 1,8-ottandiolo attraverso una reazione di esterificazione catalizzata da due equivalenti di 4-dimetilamminopiridina e due equivalenti di 1-etil-3-(3-dimetilamminopropil)carbodiimmide in solvente organico, in atmosfera di azoto e in agitazione tutta la notte.

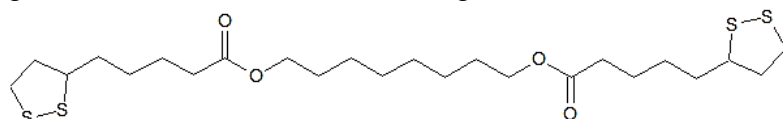


Figura 13. Dimero di acido lipoico.

Come fluoroforo è stata utilizzata la rodamina funzionalizzata con un'unità di acido lipoico (riportato in figura 14). La funzionalizzazione in questo caso prevede il coupling tra 1,2 equivalenti di acido lipoico e 1 equivalente di rodammia, catalizzato da 1,2 equivalenti di una base (trietilammina) in presenza di uguali equivalenti di 1-etil-3-(3-dimetilamminopropil)carbodiimmide e idrossibenzotriazolo in solvente organico.

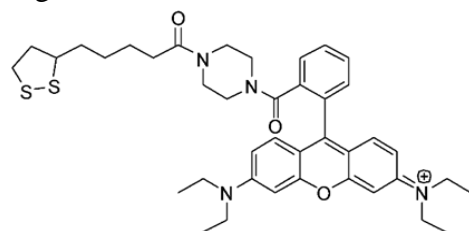


Figura 14. Rodammia funzionalizzata con acido lipoico.

Successivamente, sono state preparate le soluzioni stock in acetone con 5mg/mL di dimero o di fluoroforo funzionalizzato con acido lipoico. In seguito, 20mL di dimero in acetone sono stati mescolati con 1% v/v di una soluzione stock di fluoroforo e la miscela è stata versata goccia a goccia in una soluzione acquosa contenente 100mL di 2mM PBS e 100mL di una soluzione 20mM di Pluronic F127 e sono stati lasciati in agitazione per un'ora e mezzo.

Dopodiché è stato aggiunto un 5% in volume di un iniziatore (ottantiolo) che tramite il gruppo -SH terminale ha dato inizio a una reazione di polimerizzazione che prevedeva l'apertura dell'anello eterociclico dell'acido lipoico a livello del legame S-S e la formazione di un nuovo ponte disolfuro intermolecolare (come descritto in figura 15).

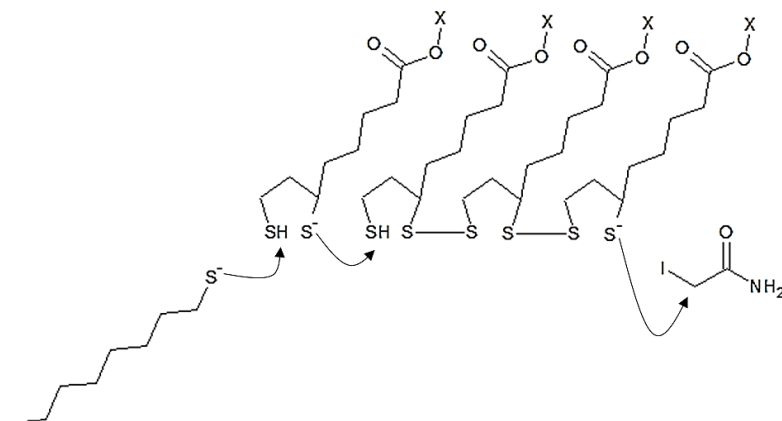


Figura 15. Processo di polimerizzazione.

La reazione è stata lasciata proseguire per 2 ore in agitazione ed è stata terminata con un 5% in volume di un terminatore (iodo acetammide) che a causa del gruppo terminale -NH₂ non era più in grado di far proseguire la polimerizzazione.

La soluzione contenente le nanoparticelle è stata poi concentrata e, infine, le nanoparticelle sono state purificate per centrifugazione (15 minuti, 12000rpm) lavando 3 volte con acqua.

1.2. Caratteristiche delle nanoparticelle utilizzate

Per gli esperimenti descritti si sono utilizzati due diversi lotti di nanoparticelle di acido polilipoico e le nanoparticelle di silice amorfa aventi le caratteristiche descritte in tabella 12.

Nome	Dimensioni	PDI	Potenziale Z	Concentrazione
Lotto 1	110nm	0,057	-0,813mV in PBS	9,02mg/mL
Lotto 2	95nm	0,067	-1,07mV in PBS	6,98mg/mL
Ludox® (TM 40)	22nm	> 0,1	-20mV in PBS	13mg/mL

Tabella 12. Caratteristiche delle nanoparticelle utilizzate.

2. Analisi cell-free dell'attività antiossidante

2.1. Saggio DPPH

Materiali:

- DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazile; pm 394,32 g/mol) (Sigma)
- BHT (butil idrossitoluene; pm 220,36 g/mol) (Sigma)
- Propil gallato (pm 212,2 g/mol) (Sigma)
- Acido ascorbico (pm 176,12 g/mol) (Sigma)
- Acido lipoico (pm 206,33 g/mol) (Sigma)
- Nanoparticelle di acido polilipoico
- Pluronic F127 (pm 12600 g/mol)
- Metanolo (Carlo Erba)
- Buffer acetato (0,1M pH 5,5 acido acetico (Romil) / acetato di sodio (Fluka))
- Acqua MilliQ

Procedimento:

È stata preparata la soluzione di buffer acetato 0,1M e il buffered metanolo (40% buffer acetato / 60% metanolo in volume).

Si sono sciolti tutti i sali in metanolo e si sono diluiti in buffered metanolo alla concentrazione voluta (4 diluizioni seriali 1a2 a partire da 20 μ M; solo DPPH ha concentrazione finale fissa di 50 μ M). F127 è stato sciolto in acqua e diluito in buffered metanolo, mentre le nanoparticelle sono state diluite direttamente in buffered metanolo (a partire da 100 μ g/mL).

I campioni sono stati inseriti in una piastra da 96 pozzetti (Falcon), in triplicato, 100 μ L per pozzetto. A tutti i pozzetti si sono aggiunti rapidamente 100 μ L della soluzione 50 μ M di DPPH. È stato effettuato controllo negativo inserendo 100 μ L di buffered metanolo con 100 μ L di DPPH.

Si è letta la densità ottica a 517nm facendo 21 scansioni a temperatura ambiente, una ogni 5 minuti. Dalle curve ottenute si è calcolata la percentuale di effetto scavenging a 30 minuti.

2.2. Saggio ABTS

Materiali:

- ABTS (acido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonico); pm 548,68 g/mol) (Sigma)
- Potassio persolfato (pm 270,32 g/mol) (Carlo Erba)
- Acqua MilliQ
- PBS
- BHT (butil idrossitoluene; pm 220,36 g/mol)
- Propil gallato (pm 212,2 g/mol)
- Acido ascorbico (pm 176,12 g/mol)
- Acido lipoico (pm 206,33 g/mol)
- Nanoparticelle di acido polilipoico
- Pluronic F127 (pm 12600 g/mol)
- Metanolo

Procedimento:

La soluzione di ABTS è stata preparata sciogliendo i sali di ABTS (concentrazione finale 7mM) e potassio persolfato (concentrazione finale 2,45mM) in acqua e poi unendo le due soluzioni. Si è lasciato reagire per almeno 16 ore al buio a temperatura ambiente.

Il giorno seguente i sali sono stati sciolti in metanolo e diluiti in PBS alla concentrazione voluta (diluizioni a partire da 20 μ M). L'F127 è stato sciolto in acqua e poi diluito in PBS, mentre le nanoparticelle sono state direttamente diluite in PBS (a partire da 100 μ g/mL).

L'ABTS è stato diluito 25 volte in PBS ed è stato mantenuto a 30°C fino a poco prima dell'uso.

I campioni sono stati inseriti in una piastra da 96 pozzetti, in triplicato tecnico, 100 μ L per pozzetto. A tutti i pozzetti si sono aggiunti velocemente 100 μ L della soluzione di ABTS. È stato effettuato un controllo negativo inserendo 100 μ L di ABTS con 100 μ L di PBS.

Si è letta l'OD a 734nm facendo 36 scansioni a 30°C, una ogni minuto e dalle curve ottenute si è ricavata la percentuale di effetto scavenging a 30 minuti.

3. Cellule

3.1. Isolamento di monociti da buffy-coat tramite centrifugazione su gradiente ed eventuale differenziamento in macrofagi

Materiali:

- Buffy-coat (ottenuto da donatori sani, presso il centro trasfusionale dell'Ospedale di Padova)
- PBS 1X (Gibco)
- Ficoll-Plaque™ (GE Healthcare)
- Soluzione A: 180mL RPMI (Gibco) + 20mL FCS (Euroclone) + 0,8mL Hepes® (Gibco)
- Soluzione B: 100mL Percoll™ (GE Healthcare) + 8,10mL PBS 10X
- Soluzione C Percoll al 46%: 15,71mL soluzione A + 15,54mL soluzione B
- Trypan Blue (Sigma)
- Terreno di differenziamento in macrofagi M2: RPMI + 20% FCS + 100ng/mL M-CSF (Peprotech) + Pen/Strep (Gibco)

Procedimento:

Dopo averlo aliquotato in un tubo da 50mL (Falcon), il buffy-coat è stato lavato con PBS in modo tale da eliminare tutto il siero rimanente. Il pellet così ottenuto è stato risospeso in PBS e 30mL di questa soluzione sono stati stratificati su 15mL di Ficoll. I tubi sono stati centrifugati per consentire la separazione cellulare secondo gradiente di densità per 30 minuti a 2000rpm e quindi la banda di linfo-monociti, posta tra il PBS e il Ficoll, è stata prelevata. Le cellule sono state lavate in PBS per eliminare il Ficoll residuo e il pellet è stato risospeso in 30mL di soluzione A; 5mL della soluzione contenente le cellule sono stati stratificati su 5mL di soluzione C, contenente il Percoll, e i tubi sono stati centrifugati a 550g per 30minuti, per consentire la stratificazione su soluzione C per gradiente di densità; infine è stata prelevata la banda dei monociti.

È stato effettuato un ulteriore lavaggio in PBS per eliminare il Percoll residuo e il pellet cellulare è stato risospeso in un adeguato volume di terreno RPMI senza siero tale da consentire la semina di 2 milioni di cellule per pozzetto, in piastre da 24 pozzetti (Falcon).

Le cellule sono state incubate in incubatore per 1 ora a 37°C con 5% CO₂ per consentire l'adesione dei monociti e la successiva rimozione dei linfociti residui.

Nel caso degli esperimenti condotti con i monociti, questi, dopo l'ora di adesione, sono stati direttamente incubati con le nanoparticelle; nel caso degli esperimenti condotti con i macrofagi, è stato necessario indurre il differenziamento: i monociti sono stati incubati per 4-5 giorni con terreno di differenziamento a 37°C con 5% CO₂; al 4° o 5° giorno si è provveduto ad aggiungere un ugual volume di terreno di differenziamento fresco e si è incubato per altri 3-4 giorni.

3.2. Isolamento di neutrofili

Materiali:

- Buffy-coat
- PBS 1X
- Ficoll-Plaque™
- 5% Dextrano (Sigma) in PBS
- Soluzione lisante gli eritrociti 1X:
 - 20mL soluzione lisante 10X:
 - 8,26g NH₄Cl (Sigma)
 - 1g KHCO₃ (Sigma)
 - 0,037g EDTA (Sigma)
 - A 100mL con acqua MilliQ
 - 180mL acqua apirogena (Eurospital)
- PBS 1X
- Trypan blue
- RPMI + 10% FCS

Procedimento:

La prima centrifuga e la stratificazione su gradiente di Ficoll sono state eseguite similmente a quanto effettuato per l'isolamento dei monociti. Successivamente, la banda di neutrofili, posta al di sopra dello strato di eritrociti, è stata prelevata. La sospensione cellulare è stata portata a 40mL con PBS, si sono aggiunti 8mL di dextrano e si è effettuata un'incubazione per 20 minuti a temperatura ambiente affinché gli eritrociti sedimentassero. La fase superiore creatasi è stata prelevata e lavata in PBS centrifugando a 1200rpm per 5 minuti.

Successivamente si sono eliminati gli eritrociti residui incubando per 5 minuti le cellule con la soluzione lisante affinché i sali inducessero la lisi dei globuli rossi. I neutrofili sono stati quindi lavati, centrifugati in modo da eliminare completamente tutti gli eritrociti e il pellet cellulare è stato risospeso in un volume di RPMI + 10% FCS tale da consentire la semina di 200.000 cellule per pozzetto (100µL per pozzetto). Le cellule sono state immediatamente incubate con le nanoparticelle.

3.3. Purificazione dei leucociti totali

Materiali:

- Buffy-coat
- Soluzione lisante 1X:
 - 20mL soluzione lisante gli eritrociti 10X:
 - 8,26g NH₄Cl
 - 1g KHCO₃
 - 0,037g EDTA
 - A 100mL con acqua MilliQ
 - 180mL acqua apirogena
- PBS 1X
- Trypan blue
- RPMI + 10% FCS

Procedimento:

20mL di buffy-coat sono stati portati a volume (50mL) con soluzione lisante e trattati per 5 minuti, similmente a quanto effettuato per i neutrofili. Il buffy-coat è stato quindi lavato, centrifugato e il pellet ottenuto è stato nuovamente incubato in soluzione lisante in modo da eliminare completamente tutti gli eritrociti.

Le cellule sono state nuovamente lavate e il pellet cellulare è stato risospeso in un adeguato volume di RPMI + 10% FCS tale da consentire la semina di 2 milioni di cellule per pozzetto in piastre da 24 pozzetti. Le cellule sono state immediatamente incubate con le nanoparticelle.

3.4. Colture cellulari di HeLa e raw

Materiali:

- Cellule HeLa o raw
- PBS 1X
- Trypan blue
- DMEM (Gibco) + 10% FCS

Procedimento:

Le cellule HeLa (linea tumorale umana da cancro alla cervice) e le cellule raw 246.7 (linea tumorale di macrofagi murini) sono state mantenute in coltura in ambiente umidificato a 37°C con 5% CO₂ e subcoltivate ogni 3 giorni.

4. Analisi della captazione cellulare

4.1 Test di fagocitosi delle nanoparticelle ed analisi della fluorescenza tramite FACS

Materiali:

- PBS
- Nanoparticelle di acido polilipico
- Terreno (RPMI o DMEM con diverse concentrazioni di substrato)
- FACS buffer (PBS + 1% FCS + 0,1% sodio azide (Sigma))

Procedimento:

Le cellule ($2 \cdot 10^6$ per pozzetto per monociti, macrofagi o leucociti totali; $0,15 \cdot 10^6$ per le cellule HeLa e $0,2 \cdot 10^6$ per le cellule raw) sono state incubate con diverse diluizioni di nanoparticelle (fino a $100 \mu\text{g/mL}$) in diverso terreno (RPMI o DMEM + 10 o 20 o 50 % FCS o HS o HP) in duplicato. Come controllo negativo è stato utilizzato il solo terreno.

Il plasma umano è stato donato dal centro trasfusionale di Padova, mentre il siero umano è stato ottenuto da sangue venoso di volontari sani e raccolto in tubi BD Vacutainer clot activator (Becton Dickinson); dopo 10 minuti di incubazione è stato centrifugato a 2500rpm per 5 minuti e il siero è stato recuperato e congelato in azoto liquido.

Le cellule sono state incubate per un tempo variabile (1, 3, 6 o 24 ore), sia a 37°C che a 0°C , sono quindi state staccate mediante scraping, trasferite in eppendorf (Axygen) e centrifugate. Il surnatante è stato recuperato per le analisi tramite saggio ELISA; il pellet è stato lavato in PBS e risospeso in FACS buffer ($300 \mu\text{L}$). I campioni sono stati immediatamente analizzati tramite citofluorimetria a flusso (BD FACSCantoII) e i dati processati con BDFACSDiva Software (BD).

4.2 Analisi al microscopio confocale della fagocitosi delle nanoparticelle da parte di macrofagi

Materiali:

- Macrofagi
- Vetrini per piastra da 24 pozzetti (Cover glass, 15mm)
- Vetrini porta oggetto (Prestige)
- PBS

Procedimento:

I monociti isolati sono stati seminati su opportuni vetrini sterili, in piastra da 24 pozzetti, a una densità di 1,5 milioni di cellule per pozzetto, e solo stati lasciati differenziare in macrofagi per una settimana in ambiente umidificato a 37°C con il 5% di CO_2 . Il giorno prima dell'esperimento le cellule sono state incubate a 37°C

con diluizioni opportune di nanoparticelle (100µg/mL e 25µg/mL) in terreno completo.

Il giorno seguente, le cellule sono quindi state lavate in PBS e direttamente analizzate tramite microscopia confocale (SP Leica); le immagini acquisite sono state poi elaborate con il programma ImageJ per effettuare il merge della trasmissione e della fluorescenza.

5. Studi di tossicità in vitro

5.1. Cinetica di coagulazione

Materiali:

- Nanoparticelle Ludox® (Sigma)
- Nanoparticelle di acido polilipoico
- Plasma umano
- Soluzione salina NaCl 150mM (Sigma)
- Soluzione di CaCl₂ 150mM (Sigma)

Procedimento:

Opportune diluizioni di nanoparticelle di acido polilipoico e Ludox® (8 diluizioni seriali 1a2 a partire da 100µg/mL) sono state preparate in soluzione salina. In una piastra da 96 pozzetti sono stati aggiunti in triplicato 100µL di nanoparticelle per pozzetto, oppure 100µL di sola soluzione salina per i pozzetti di controllo (sia positivo che negativo). Ad ogni pozzetto sono poi stati aggiunti 77,34µL di plasma e 22,66µL di calcio cloruro (ad esclusione del controllo negativo).

La piastra è stata quindi immediatamente posta nel lettore per piastre Multiskan™ Go (Thermo Scientific™) settato a 37°C e l'OD è stata letta a 405nm, ogni minuto per 60 volte, al fine di ottenere delle curve di cinetica da cui è stato possibile ricavare il T_{1/2} (il tempo a cui è avvenuta metà della coagulazione totale, ossia il punto di flesso della curva sigmoidale).

5.2. Test di emolisi

Materiali:

- Buffy-coat
- PBS 1X
- Acqua MilliQ
- Nanoparticelle di acido polilipoico
- Nanoparticelle Ludox®
- Soluzione salina NaCl 150mM

Procedimento:

Il buffy-coat è stato lavato con PBS in modo da eliminare tutto il siero. Dopodiché, i globuli rossi sono stati risospesi in PBS e 250µL di sospensione sono stati posti in eppendorf, a cui sono stati aggiunti 250µL di stimoli.

Gli stimoli sono stati ottenuti diluendo opportunamente in soluzione salina i due tipi di nanoparticelle (a partire da 100µg/mL) ed eseguendo un controllo negativo (solo soluzione salina) ed un controllo positivo (solo acqua).

Le eppendorf sono state mescolate per inversione e quindi incubate per 2 ore a 37°C.

Le eppendorf sono state centrifugate a 1500rpm per 5 minuti e il surnatante è stato prelevato ponendolo in una piastra da 96 pozzetti (Sarstedt) in triplicato.

Il controllo positivo è stato diluito sempre in triplicato in modo da ottenere una retta di calibrazione.

È stata misurata l'OD allo spettrofotometro a 540nm e si è confrontata la quantità di emoglobina rilasciata con la retta di calibrazione.

5.3. Test di formazione della corona

Materiali:

- Terreno RPMI + 10%-20%-50% FCS
- Terreno RPMI + 10%-20%-50% HS
- Terreno RPMI + 10%-20%-50% HP
- PBS 1X
- Nanoparticelle di acido polilipico
- Nanoparticelle Ludox®
- Acqua MilliQ
- Loading buffer 1X:
 - 5,3mL di Sample Buffer (12,5mL di soluzione 0,5M Tris-HCl pH 6,8 (Sigma) con 0,4% SDS (Sigma), 20mL glicerolo (Sigma), 60mL H₂O MilliQ)
 - 0,25mL di 10% Bromofenolo blu (Sigma)
 - 4mL di 10% SDS
 - 9,55mL H₂O MilliQ

Procedimento:

Soluzioni con 50µg/mL di nanoparticelle sono state preparate in ognuno dei tipi di terreno sopra elencati, separatamente. Come controllo negativo è stata utilizzata acqua al posto delle nanoparticelle.

I campioni sono stati incubati per 30 minuti in agitazione a 37°C per consentire la formazione della corona.

Successivamente si sono effettuati 3 lavaggi in PBS a 12000rpm per 30 minuti per consentire il distacco della soft corona. Si è risospeso il pellet in 25µL di loading buffer e si è congelato.

5.4. Test di attivazione del complemento

Materiali:

- Zymosan (Sigma)
- Soluzione salina 150mM
- Siero umano
- PBS
- Nanoparticelle di acido polilipoico
- EDTA 0,5M (Sigma)
- Loading buffer 6X
- Acqua MilliQ

Procedimento:

Lo zymosan è stato attivato sciogliendolo in soluzione salina (in concentrazione 10mg/mL) e ponendolo in termoblocco per 1 ora a 95°C, a cui è seguita centrifuga a 4000rpm per 30 minuti e risospensione in PBS per una concentrazione finale di 25mg/mL.

25µL di siero umano sono stati mescolati a 6,25µL di zymosan (controllo positivo) o PBS (controllo negativo) o di un'opportuna diluizione di nanoparticelle (25-50-100µg/mL) in eppendorf. La soluzione è stata posta per 30 minuti a 37°C e successivamente la reazione è stata bloccata con 1,6µL di EDTA.

Dai campioni si sono prelevati 1,6µL a cui si sono aggiunti 38,4µL di acqua e 6,7µL di loading buffer. 15µL di questa nuova soluzione sono stati caricati in un gel al 12% e si è poi proceduto con western blot e sviluppo con anticorpo anti-C3a.

5.5. Gel di poliacrilammide al 12%

Materiali:

- Separating gel:
 - 2,46mL H₂O MilliQ
 - 1,95mL Resolving buffer (National Diagnostic)
 - 3mL acrilammide (National Diagnostic)
 - 75µL APS 10% (Sigma)
 - 7,5µL TEMED (Fluka)
- Stacking gel:
 - 1mL H₂O MilliQ
 - 416,9µL Stacking buffer (National Diagnostic)
 - 215µL acrilammide
 - 7,5µL APS 10%
 - 6µL TEMED
- Running buffer (400mL):
 - 40mL Running buffer 10X (30g Tris (Sigma) e 144g Glicina (Sigma) in 1L di H₂O MilliQ)
 - In 400mL H₂O MilliQ

- Aggiunta di 4mL 10% SDS
- 7μL Marcatore di peso molecolare (Sigma)
- Campioni in loading buffer 1X senza β-mercapto etanolo

Procedimento:

Si è preparato il separating gel come da ricetta e lo si è inserito in un vetro da gel verticale di spessore 1mm. Dopodiché è stato aggiunto lo stacking gel, preparato come da ricetta. Si è proceduto al caricamento del marker e dei campioni dopo averli fatti bollire per 5 minuti e spinnati.

Il gel è stato fatto correre a 200V e 15mA (per gel) fino al superamento dello stacking gel e poi a 200V e 30mA (per gel).

5.6. Silver staining

Materiali:

- Soluzione 1 di fissaggio: 50% metanolo / 10% acido acetico
- Soluzione 2 di fissaggio: 5% metanolo / 1% acido acetico
- Acqua MilliQ
- Soluzione di tiosolfato: 0,2g/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ (AppliChem)
- Soluzione di argento nitrato: 0,2g/100mL AgNO_3 (AppliChem)
- Soluzione di sviluppo: 3g Na_2CO_3 (Sigma), 25μL formaldeide (Labscan), 1mL soluzione tiosolfato a 50mL con acqua MilliQ
- Soluzione di bloccaggio: 6% acido acetico

Procedimento:

Il gel di poliacrilammide è stato trasferito in una vaschetta con un adeguato volume di soluzione 1 tale da ricoprirlo, per 30 minuti. Poi, si è eliminata la soluzione 1 e il gel è stato incubato con la soluzione 2 per 15minuti. Dopodiché si sono effettuati 3 lavaggi in acqua (5 minuti ogni lavaggio) e il gel è stato incubato con la soluzione di tiosolfato per 90 secondi.

Dopo 3 lavaggi da 30 secondi con acqua, il gel è stato incubato con la soluzione di nitrato d'argento per 30 minuti; infine, eliminata la soluzione, la colorazione è stata sviluppata con la soluzione di sviluppo per un tempo variabile e poi bloccata con la soluzione contenente acido acetico per qualche minuto. Il gel è quindi stato mantenuto in acqua MilliQ.

5.7. Western Blot

Materiali:

- Gel di poliacrilammide
- 4 fogli di carta 8×10 cm
- 1 foglio di PVDF 9×7 cm (Biorad)
- 2 spugnette
- Metanolo
- Transfer buffer:
 - 10% running buffer 1X
 - 20% metanolo
- Acqua MilliQ
- Soluzione di bloccaggio:
 - 3% latte
 - 0,1% Tween-20 (Sigma)
 - In TBS 1X
- Anticorpo primario anti-apolipoproteina A1 1:2000 (Calbiochem)
- Anticorpo primario anti-HRG 1:2000 (Calbiochem)
- Anticorpo primario anti-HSA 1:2000 (Calbiochem)
- Anticorpo primario Anti-C3a 1:500 (Calbiochem)
- TBS-Tween-20 (0,1%)
- Anticorpo secondario coniugato a HRP 1:2000 (Calbiochem)
- Soluzione A:
 - 5mL Tris pH 8,5 100mM (Sigma)
 - 22μL acido p-cumarico (Sigma)
 - 50μL luminolo (Sigma)
- Soluzione B:
 - 5mL Tris pH 8,5 100mM
 - 3μL H₂O₂ (AppliChem)

Procedimento:

Prima di effettuare il western blot, la membrana di PVDF è stata attivata incubandola in metanolo per 1 minuto per poi esser lavata con acqua. Il sandwich è stato preparato ed il trasferimento è avvenuto a 100V e 200mA per un'ora in agitazione. Dopo il trasferimento, la membrana è stata recuperata ed è stata incubata per un'ora con 10mL di soluzione di bloccaggio. Dopodiché si è eliminata la soluzione di bloccaggio e si è proceduto all'incubazione della membrana con l'anticorpo primario diluito in 10mL di soluzione di bloccaggio, tutta la notte, a 4°C, sotto agitazione. Il giorno seguente, dopo 3 lavaggi da 5 minuti con TBS-Tween-20 (0,1%), la membrana è stata incubata con l'anticorpo secondario diluito in 10mL di soluzione di bloccaggio per un'ora a temperatura ambiente e in agitazione. Dopo 3 lavaggi con TBS-Tween-20 (0,1%) si è proceduto alla rilevazione per chemiluminescenza: la

soluzione A e la soluzione B sono state mescolate, aggiunte alla membrana per 1 minuto e quindi si è proceduto all'acquisizione dell'immagine (Uvitec, eppendorf).

5.8. Saggio MTS per l'analisi della vitalità cellulare

Materiali:

- Leucociti totali, cellule HeLa, raw, macrofagi
- MTS (Promega)
- Nanoparticelle acido polilipoico
- Acqua MilliQ
- Terreno

Procedimento:

Le cellule sono state seminate in piastre da 96 pozzetti a fondo piatto (Falcon). Sono state seminate 200.000 cellule per pozzetto nel caso dei leucociti totali, 50.000 cellule per pozzetto nel caso delle cellule raw, 10.000 cellule per pozzetto nel caso delle cellule HeLa, 100.000 cellule per pozzetto nel caso dei macrofagi.

Le cellule sono state incubate per tempi variabili (1, 3 o 6 giorni) in ambiente umidificato a 37°C con 5% CO₂ con opportune diluizioni delle nanoparticelle (a partire da 100µg/mL) in opportuno terreno con la presenza del 10% di siero fetale bovino. Il giorno dell'esperimento, la piastra è stata centrifugata (per cellule in sospensione) e si sono aspirati i pozzetti per il controllo positivo a cui si sono aggiunti 200µL di acqua MilliQ per 10 minuti a 37°C affinché tutte le cellule morissero.

Tutti i pozzetti sono stati poi aspirati e in ognuno sono stati aggiunti velocemente 100µL di terreno di crescita senza siero e 10µL di MTS. Si è lasciato metabolizzare il colorante fino all'assunzione di una colorazione marroncina, al buio a 37°C.

Si è effettuata lettura allo spettrofotometro a 492nm e si sono elaborati i dati ottenuti in termini di vitalità cellulare.

5.9. Test clonogenico

Materiali:

- Cellule raw e HeLa
- DMEM + 10% FCS
- Nanoparticelle di acido polilipoico
- Piastre Petri (TC dish 60, Sarstedt)
- PBS 1X
- Cristal violetto (Sigma)
- Acqua MilliQ

Procedimento:

Il giorno prima dell'esperimento sono state seminate le cellule e sono state incubate, per 24ore in ambiente umidificato a 37°C con 5% di CO₂, con opportune diluizioni di nanoparticelle (0µg/mL, 12,5µg/mL e 100µg/mL).

Il giorno dell'esperimento si sono contate le cellule contenute in ogni campione e si sono seminate 400 cellule in 3mL per ogni Petri per ogni campione, in sei repliche.

Si è lasciato in incubazione in ambiente umidificato a 37°C con 5% di CO₂ per 10 giorni per consentire la crescita delle colonie.

Dopodiché si è lavata la piastra con PBS e si è aggiunto il cristal violetto per 5 minuti. Si sono effettuati almeno due lavaggi con acqua MilliQ e si sono contate le colonie.

5.10. Analisi dell'espressione di marker di superficie

Materiali:

- Monociti
- PBS 1X
- FACS buffer
- Anticorpi primari per marker di superficie: anti-MHC II, anti-CD86 e anti-CD54 (BD Pharmingen™ e Biolegend) coniugati a APC-H7 (coniugato alloficocianina e cianina), PerCP-Cy™5.5 (coniugato di PerCP e cianina) e APC (alloficocianina) rispettivamente

Procedimento:

I monociti incubati con 50µg/mL di nanoparticelle per 24 ore, sono stati staccati, lavati con PBS e risospesi in FACS buffer. La sospensione cellulare è stata suddivisa in 4 eppendorf (in duplicato, 50µL in ognuna) e ciascun campione è stato incubato con 0,6µL di anticorpo per 30 minuti in ghiaccio, al buio.

Le cellule sono state poi lavate per 2 volte in PBS. Il pellet è stato risospeso in FACS buffer (300µL), le cellule sono state trasferite in opportuni tubini da FACS (Falcon) e analizzate mediante citofluorimetria a flusso.

5.11. ELISA per IL-1β (eBioscience)

Materiali:

- Anticorpo di cattura (250X)
- Anticorpo di detection (250X)
- Standard per IL-1β (1µg/mL)
- Perossidasi di rafano coniugata all'avidina (250X)
- PBS 1X
- Buffer di lavaggio: 0,05% Tween-20 in PBS
- Coating buffer (10X)
- Elisa/Elispot diluent (5X)
- Soluzione TMB
- Terreno di coltura dei campioni

Procedimento:

Il giorno prima del saggio, i pozzetti di un'apposita piastra per test ELISA (Nunc®) sono stati rivestiti con l'anticorpo di cattura (1X in coating buffer) e incubati per tutta la notte a 4°C.

Dopo aver effettuato 3-5 lavaggi con buffer di lavaggio, i pozzetti sono stati incubati per un'ora con il diluente 1X per bloccare tutti i siti o eventuali siti aspecifici.

Dopo 3-5 lavaggi sono stati piastrati i campioni e lo standard per la curva di taratura in duplicato. Lo standard è stato diluito 7 volte serialmente 1a2 a partire da una concentrazione di 4000pg/mL nello stesso terreno in cui si trovavano i campioni. Il punto della retta a 0pg/mL è stato ottenuto caricando nel pozzetto il solo terreno. Si è quindi lasciato in incubazione per 2 ore a temperatura ambiente.

Successivamente, dopo 3-5 lavaggi, i pozzetti sono stati incubati con l'anticorpo di detection (1X in diluente). Si è lasciato in incubazione per 1 ora a temperatura ambiente.

Dopo 3-5 lavaggi, i pozzetti sono stati incubati con la perossidasi di rafano coniugata all'avidina (1X in diluente). Si è lasciato incubare per 30 minuti a temperatura ambiente. Dopo 5-7 lavaggi è stata aggiunta la soluzione TMB, è stata fatta avvenire la reazione colorimetrica e l'OD è stata letta a 405nm tramite spettrometro per piastre Multiskan™ Go (Thermo Scientific™).

Tramite il software Excel, è stata ottenuta la curva di taratura con gli standard da cui è stata ricavata la concentrazione in pg/mL di IL-1β per ogni campione.

5.12. ELISA per IL-6 (Peprotech)

Materiali:

- Anticorpo di cattura (100µg/mL)
- Anticorpo di detection (100µg/mL)
- Standard per IL-6 (1µg/mL)
- Perossidasi di rafano coniugata all'avidina (100µg/mL)
- PBS
- Buffer di lavaggio: 0,05% Tween-20 (Sigma) in PBS
- Buffer di bloccaggio: 1% BSA (Roche) in PBS
- Diluente: 0,05% Tween-20, 0,1% BSA in PBS
- Soluzione TMB
- Terreno di coltura dei campioni

Procedimento:

Il giorno prima del saggio, i pozzetti di un'apposita piastra per test ELISA (Nunc®) sono stati rivestiti con l'anticorpo di cattura (0,05µg/mL in PBS) e incubati per tutta la notte in PBS.

Dopo aver effettuato 4 lavaggi con buffer di lavaggio, i pozzetti sono stati incubati per un'ora con il buffer di bloccaggio per bloccare tutti i siti o gli eventuali siti aspecifici.

Dopo 4 lavaggi sono stati piastrati i campioni e lo standard per la curva di taratura in duplicato. Lo standard è stato diluito 7 volte serialmente 1a2 a partire da una concentrazione di 4000pg/mL nello stesso terreno in cui si trovavano i campioni. Il punto della retta a 0pg/mL è stato ottenuto caricando nel pozzetto il solo terreno. Si è quindi lasciato in incubazione per 2 ore a temperatura ambiente.

Successivamente, dopo 4 lavaggi, i pozzetti sono stati incubati con l'anticorpo di detection (0,1µg/mL in diluente). Si è lasciato in incubazione per 2 ore a temperatura ambiente.

Dopo 4 lavaggi, i pozzetti sono stati incubati con la perossidasi di rafano coniugata all'avidina (0,05µg/mL in diluente). Si è lasciato incubare per 30 minuti a temperatura ambiente.

Dopo 4 lavaggi è stata aggiunta la soluzione TMB, è stata fatta avvenire la reazione colorimetrica e l'OD è stata letta a 405nm tramite spettrometro per piastre Multiskan™ Go (Thermo Scientific™).

Tramite il software Excel è stata ottenuta la curva di taratura con gli standard da cui è stata ricavata la concentrazione in pg/mL di IL-6 per ogni campione.

6. Analisi dell'attività antiossidante in un sistema cellulare

6.1. Saggio con fluoresceina

Materiali:

- Macrofagi
- t-BHP (*tert*-butil idrossiperossido; Sigma)
- Carbossi-H₂DCFDA (Molecular Probes)
- BHT (butil idrossitoluene; pm 220,36 g/mol)
- Propil gallato (pm 212,2 g/mol)
- Acido lipoico (pm 206,33 g/mol)
- Nanoparticelle di acido polilipoico
- Pluronic F127 (pm 12600 g/mol)
- PBS
- FACS buffer

Procedimento:

I monociti sono stati purificati e si sono piastrati 2 milioni di cellule per pozzetto in una piastra da 24 pozzetti e sono stati posti a differenziare in macrofagi per una settimana in ambiente umidificato, a 37°C con il 5% di CO₂.

Il giorno prima dell'esperimento, le cellule sono state trattate con due diluizioni di nanoparticelle di acido polilipoico (50 e 100µg/mL).

Il giorno seguente le cellule sono state trattate per un'ora a 37°C con solo terreno o con i diversi tipi di antiossidante (in concentrazione finale 20µM per BHT e propil gallato; 100µg/mL per acido lipoico e F127) in presenza di t-BHP (0,5mM). Successivamente, dopo un lavaggio in PBS, alle cellule è stata aggiunta la sonda (25µM in PBS) e si è incubato per 30minuti a 37°C.

Infine, dopo 2 lavaggi in PBS e risospensione in FACS buffer, i campioni sono stati analizzati tramite citofluorimetria a flusso.

6.2. Saggio con citocromo c

Materiali:

- Neutrofili
- Nanoparticelle di acido polilipoico
- PMA (forbolo 12-miristato 13-acetato; Co: 1mM in DMSO) (Sigma)
- Citocromo c (Sigma)
- RPMI + 10% FCS

Procedimento:

Subito dopo essere stati purificati, i neutrofili sono stati preincubati per 30 minuti con diverse diluizioni di nanoparticelle (a partire da 200µg/mL) e piastrati (200.000 cellule) in una piastra da 96 pozzetti (100µL per pozzetto) in presenza o meno di

0,1 μ M PMA in triplicato (50 μ L per pozzetto) a cui sono stati aggiunti 50 μ L di citocromo c (concentrazione finale nel saggio 80nM). Si sono effettuati anche un controllo negativo (solo citocromo c) e un controllo positivo (citocromo c e PMA). Si è letta l'OD a 550nm facendo 60 scansioni, una ogni minuto e dalle curve ottenute si è calcolata la quantità di radicale superossido prodotta.

7. Studi di biodistribuzione delle nanoparticelle in vivo

Tutti i saggi descritti in questa sezione sono stati eseguiti in collaborazione con la Dott.ssa Chiara Castellani del Dipartimento di Scienze Cardiologiche, Toraciche e Vascolari dell'Università degli Studi di Padova.

7.1. Iniezione delle nanoparticelle di acido polilipoico in ratto

Materiali:

- Ratti maschi di peso intorno ai 200g, anestetizzati con isoflurano
- Nanoparticelle di acido polilipoico

Procedimento:

I ratti, dopo anestesia, sono stati trattati con 10mg/kg di nanoparticelle di acido polilipoico attraverso iniezione tramite la vena caudale con ago 27g. Dopo 1 e 3 ore i ratti sono stati sacrificati e si sono prelevati il sangue, i polmoni, il cuore, la milza, il fegato, la vescica, i reni e l'urina. Ogni organo è stato pesato e congelato in azoto liquido oppure posto in soluzione di formalina al 10%.

7.2. Rilevazione della fluorescenza associata alle nanoparticelle negli organi prelevati

Materiali:

- Polmone, rene, cuore, fegato e milza di ratti trattati e non
- 10% formalina (Diapath) in 0,1mol/L PBS

Procedimento:

Gli organi sono stati fissati in formalina e immediatamente è stata analizzata la fluorescenza associata alle nanoparticelle con Alliance 2.7 (Uvitec, Eppendorf, Milano).

Ciascun organo è stato posizionato su un piatto nero ed introdotto nel sistema, opportunamente equipaggiato con il filtro di interesse per la rilevazione della fluorescenza delle nanoparticelle (CHROMA EPI GREEN). Le immagini sono state direttamente acquisite in tempo reale in scala di grigi (16 bit, 65536 livelli di grigio). Il software di acquisizione e di analisi utilizzato è Alliance 1D.

7.3. Analisi confocale degli organi prelevati

Materiali:

- Sezioni di polmone, rene, cuore, fegato e milza di ratti trattati e non
- Etanolo (Diapath)
- Paraffina (Diapath)
- Xilolo (Diapath)
- PBS
- TO-PRO-3 (1:2000) (Invitrogen)

Procedimento:

Sezioni di 4-5 μ m degli organi inclusi in paraffina sono state tagliate e idratate attraverso passaggi a concentrazioni scalari di xilolo e etanolo e portate fino all'acqua e poi immerse in PBS 1X.

I nuclei sono stati evidenziati attraverso il colorante TO-PRO-3 e i campioni sono stati analizzati al microscopio confocale TCS-SL (Leica).

RISULTATI E DISCUSSIONI

1. Analisi cell-free dell'attività antiossidante

1.1. Saggio DPPH

Il saggio utilizza un radicale libero stabile, il 2,2-difenil-1-picrilidrazile (DPPH), per andare a valutare la capacità antiossidante totale di un composto. Questa sostanza presenta un elettrone spaiato (mostrato in figura 16) su un atomo di azoto e appare di un intenso colore viola con forte assorbimento a 517nm. ^[50]

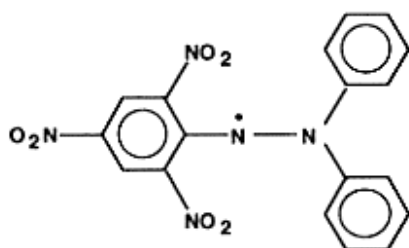


Figura 16. DPPH in forma di radicale. ^[51]

Quando il radicale si trova in presenza di un antiossidante in grado di donargli un elettrone, la soluzione si decolora e si registra un calo dell'OD in base al numero di elettroni presi. ^[50]

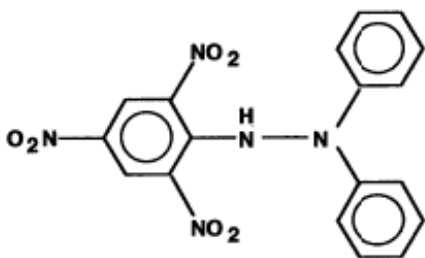


Figura 17. DPPH neutralizzato. ^[51]

Il DPPH dà ottimi risultati per quelle sostanze antiossidanti che presentano i seguenti gruppi ossidabili:

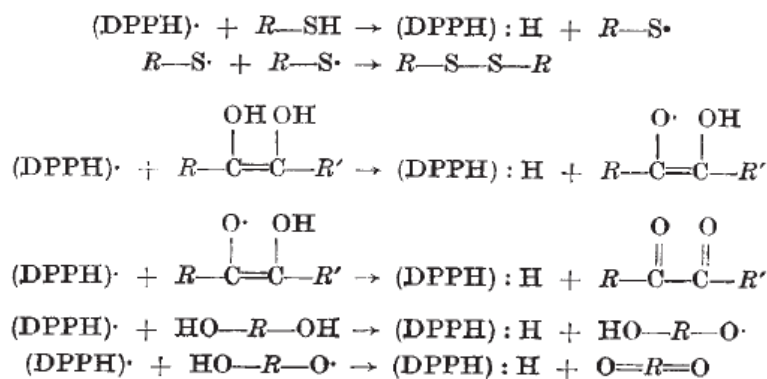


Figura 18. Schema di reazioni proposte da ^[50].

In letteratura è possibile rintracciare diversi protocolli basati su questo radicale che differiscono principalmente per due caratteristiche: il solvente utilizzato (metanolo [52, 53, 54, 55], etanolo [56, 57, 58], buffered metanolo [59]) e l'analisi dopo 30 minuti di incubazione o a stato stazionario [55].

Nel mio progetto di tesi mi sono basata sul protocollo impostato da Sharma *et al.* [59]: il DPPH è stato utilizzato alla concentrazione di 50 μ M e il propil gallato, il BHT (butilidrossitoluene) e l'acido ascorbico sono stati utilizzati come controllo alle concentrazioni di 2,5, 5, 10 e 20 μ M; inoltre sono state testate 4 diverse concentrazioni di nanoparticelle di acido polilipoico, di acido lipoico e di Pluronic F127 (12,5, 25, 50, 100 μ g/mL).

È risaputo che il test con il DPPH non è il test corretto per andare ad analizzare le proprietà antiossidanti dell'acido lipoico visto che non presenta dei gruppi aromatici sostituiti con gruppi ossidrilici [55]. Tuttavia risultava interessante andare ad analizzare se in qualche modo le nanoparticelle potevano produrre un qualche effetto sfruttando la prima reazione riportata in figura 18.

Quella che si è ottenuta è una cinetica nel tempo di neutralizzazione del radicale da parte dei diversi campioni testati, come rappresentato in figura 19.

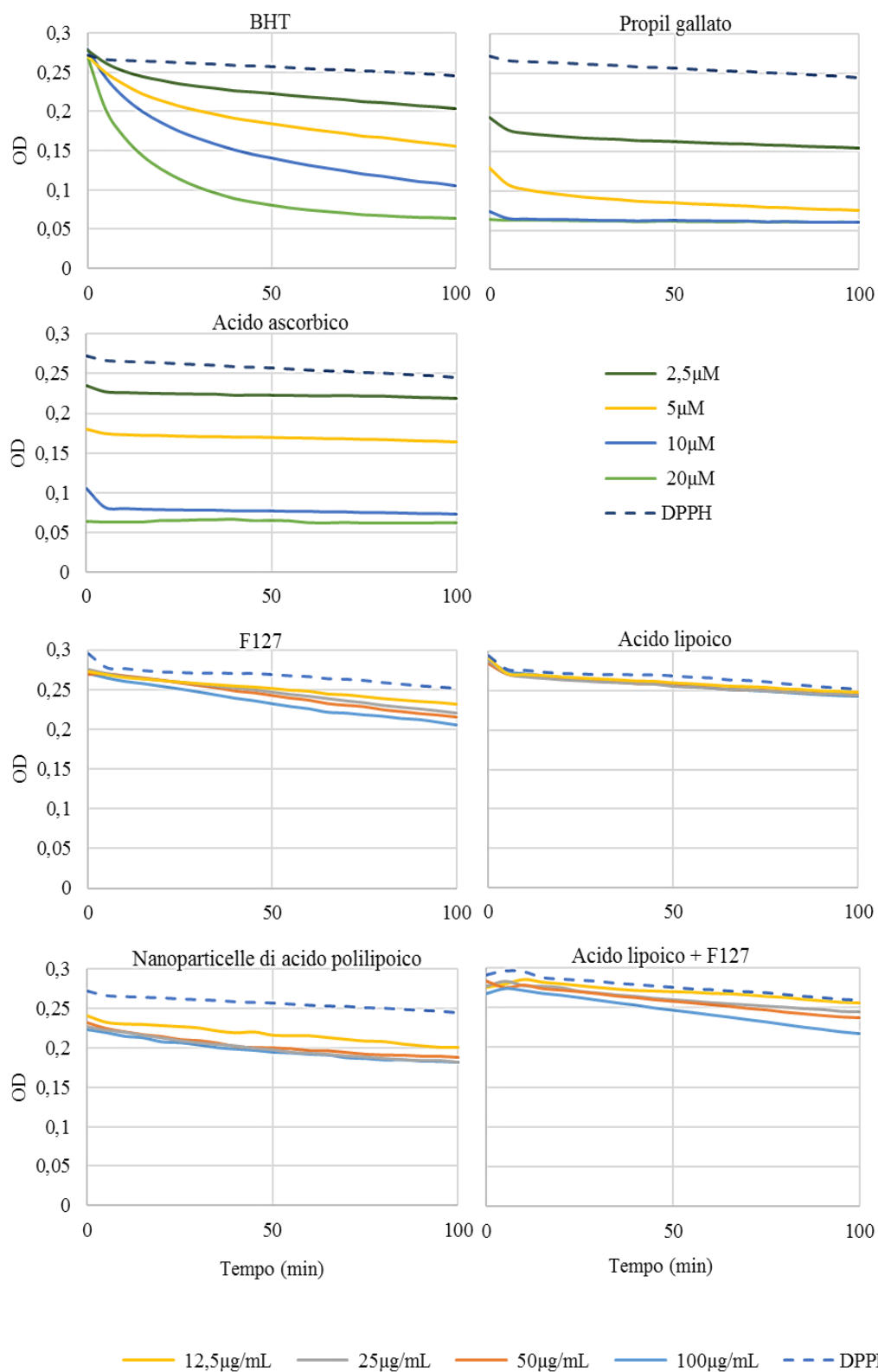


Figura 19. Cinetiche ottenute per i diversi campioni. Nel grafico si riporta un esperimento rappresentativo di 6 condotti in triplicato.

Dal momento che l'instabilità del radicale nel tempo non consentiva di eseguire un'analisi a stato stazionario, si è preferito calcolare la percentuale di effetto di scavenging a 30 minuti secondo la formula riportata in letteratura [60]:

$$\text{Percentuale effetto (\%)} = \left(\frac{Abs_{controllo} - Abs_{campiono}}{Abs_{campiono}} \right) \cdot 100$$

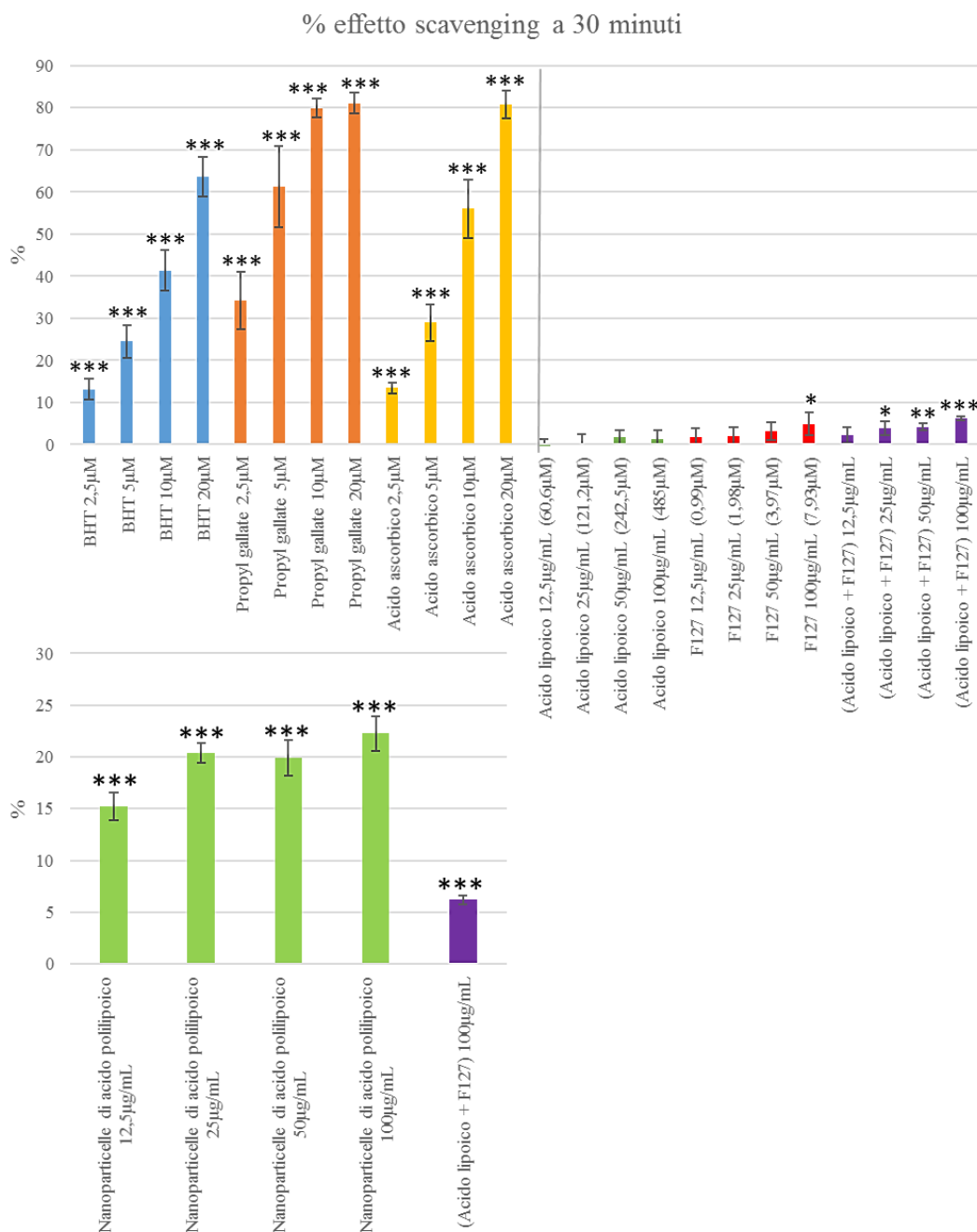


Figura 20. Percentuale di effetto scavenging registrata dopo 30 minuti per ogni campione. I dati sono la media di 6 esperimenti condotti in triplicato. * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001 rispetto al campione non trattato con antiossidanti.

I dati ottenuti utilizzando BHT, acido ascorbico e propil gallato consentono di confermare la bontà del saggio in quanto i valori di percentuale di scavenging ottenuti e la forma delle curve concorda con quanto riportato in letteratura^[59]. Si può quindi notare come l'effetto dell'acido lipoico libero sia per lo più nullo, mentre l'effetto del surfactante risulta essere molto basso e la combinazione delle due soluzioni è additiva.

Le nanoparticelle invece hanno un effetto nettamente maggiore rispetto ai loro componenti presi singolarmente o in combinazione. Ciò potrebbe significare che la struttura della nanoparticella di acido polilipoico è in grado di esaltare le proprietà antiossidanti di tale composto che con questo saggio non sono evidenziabili. Per cui il 20% di effetto registrato permette di dire che alle nanoparticelle di acido polilipoico è associata un'attività antiossidante che risulta debole ma non trascurabile.

1.2. Saggio ABTS

Tale saggio è molto simile a quello descritto sopra e utilizza un radicale libero stabile, l'acido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonico) (ABTS), per andare a valutare la capacità antiossidante totale di un composto. Questa sostanza presenta un elettrone spaiato (mostrato in figura 21) su un atomo di azoto e appare di un intenso colore verde con forte assorbimento a 734nm.^[61]

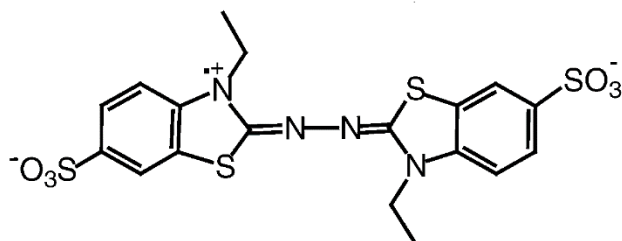


Figura 21. ABTS in forma di radicale.^[62]

Quando il radicale si trova in presenza di un antiossidante in grado di donargli un elettrone, la soluzione si decolora e si registra un calo dell'OD in base al numero di elettroni presi.^[61]

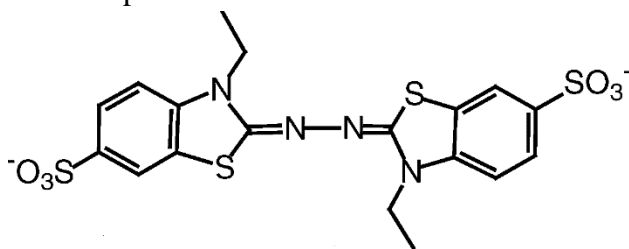


Figura 22. ABTS neutralizzato.^[62]

In letteratura si incontrano molti articoli, incentrati soprattutto sullo studio delle capacità antiossidanti di estratti di pianta, che differiscono molto sulla conduzione generale dell'esperimento^[63, 64, 65]. Dal momento che concettualmente il saggio risulta essere molto simile al saggio DPPH, nel mio progetto di tesi mi sono basata sullo studio di Re *et al.*^[61] per creare e ottimizzare un protocollo da applicare agli stessi campioni analizzati nel saggio precedente.

A tale scopo, sono state ottenute anche in questo caso delle cinetiche del tempo di neutralizzazione del radicale da parte dei diversi campioni testati, come rappresentato in figura 23.

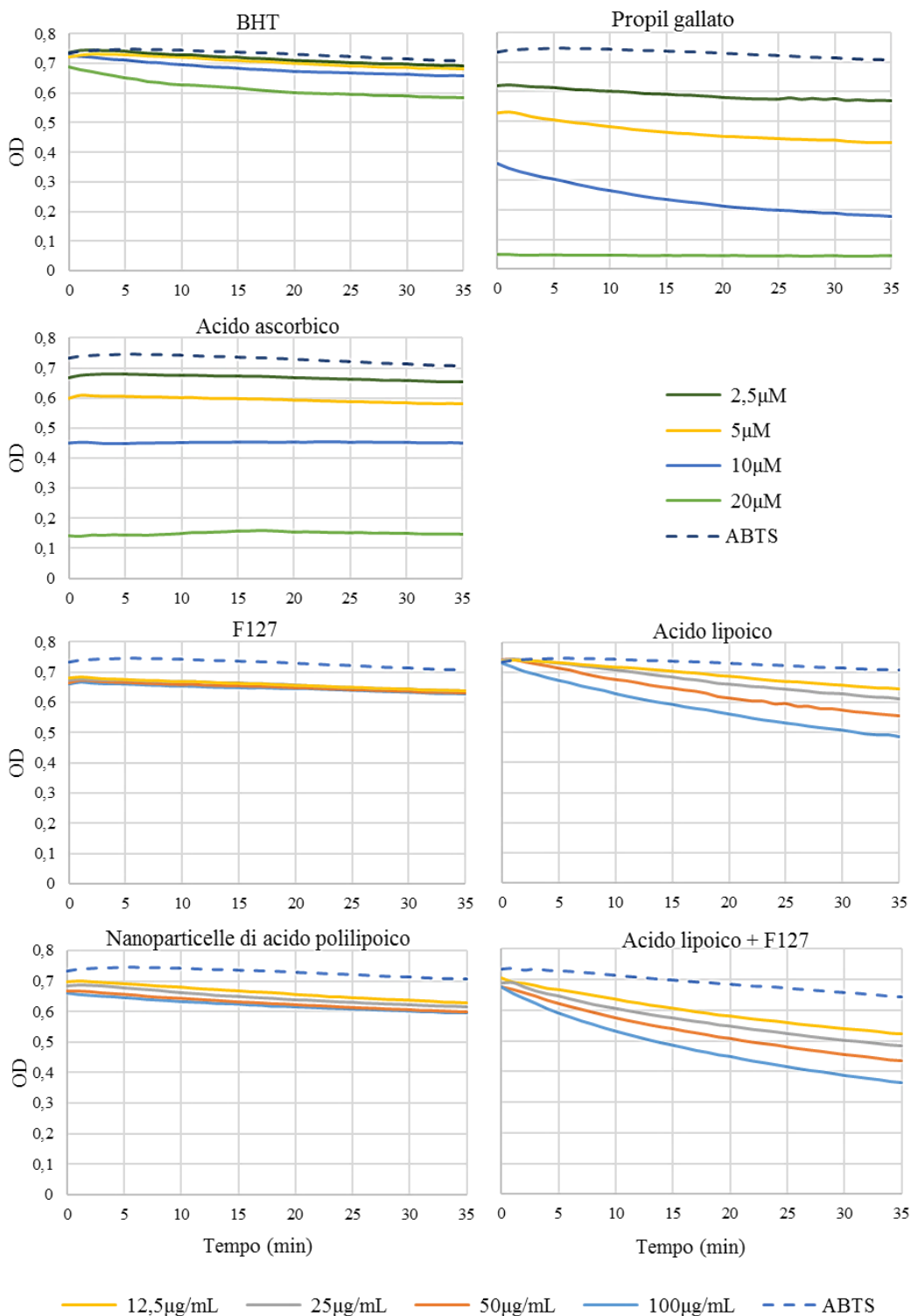


Figura 23. Cinetiche ottenute per i diversi campioni. Nel grafico si riporta un esperimento rappresentativo di 6 condotti in triplicato.

Dal momento che l'instabilità del radicale nel tempo non consentiva di eseguire un'analisi a stato stazionario, si è preferito calcolare la percentuale di effetto di scavenging a 30 minuti secondo la stessa formula utilizzata per il saggio DPPH.

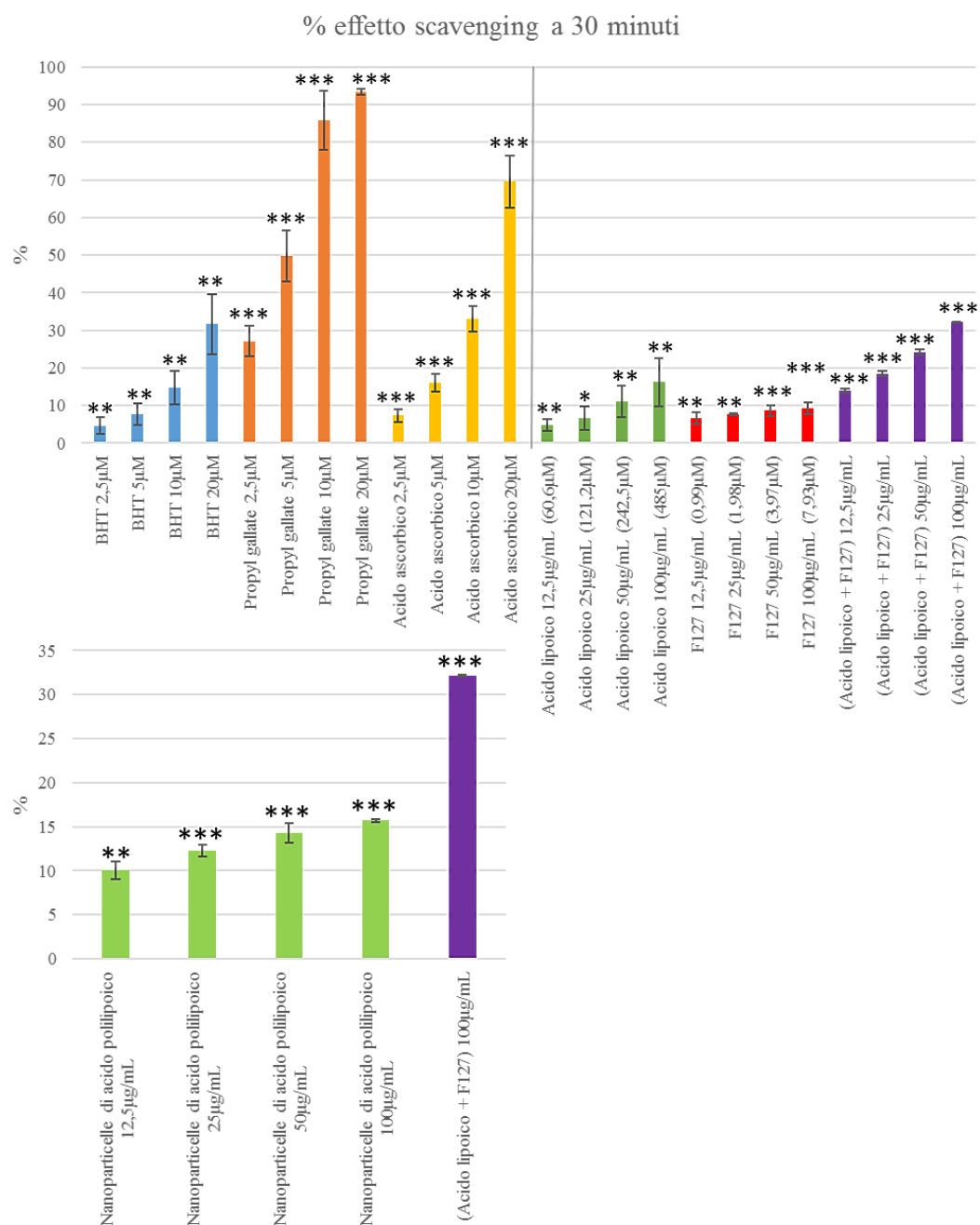


Figura 24. Percentuale di effetto scavenging registrata dopo 30 minuti per ogni campione. I dati sono la media di 6 esperimenti condotti in triplicato. * p<0,05; **p<0,01; *** p<0,001 rispetto al campione non trattato con antiossidanti.

Differentemente da quanto visto per il saggio DPPH, i dati relativi a BHT, propil gallato e acido ascorbico non sono disponibili in letteratura, ma la loro applicazione in questo saggio è utile per effettuare un controllo tra i due saggi.

Da entrambi i grafici si nota che l'acido lipoico e il surfactante hanno un effetto maggiore rispetto al precedente saggio, e che tale effetto risulta essere sempre additivo quando le due soluzioni vengono unite.

Anche in questo caso le nanoparticelle di acido polilipoico dimostrano un'attività antiossidante che è però inferiore alla combinazione di acido lipoico e surfactante.

Questo potrebbe essere dovuto al fatto che, avendo condotto il saggio in acqua, combinando le due soluzioni di acido lipoico e surfactante si sono create delle micelle che sono formate da un quantitativo di acido lipoico e surfactante che è sicuramente maggiore rispetto a quanto contenuto nelle nanoparticelle (in quanto l'acido lipoico utilizzato per la sintesi delle nanoparticelle è un derivato in cui è presente anche l'ottandiolo e in quanto ci si aspetta che non tutto il surfactante si assorba su di esse) e, in cui il radicale si è ben ripartito al loro interno aumentando l'effetto di scavenging.

Dal momento che il saggio DPPH e il saggio ABTS hanno un approccio teorico e uno sviluppo simile, può risultare interessante andare a confrontare i risultati ottenuti dai due esperimenti, come riportato in figura 25.

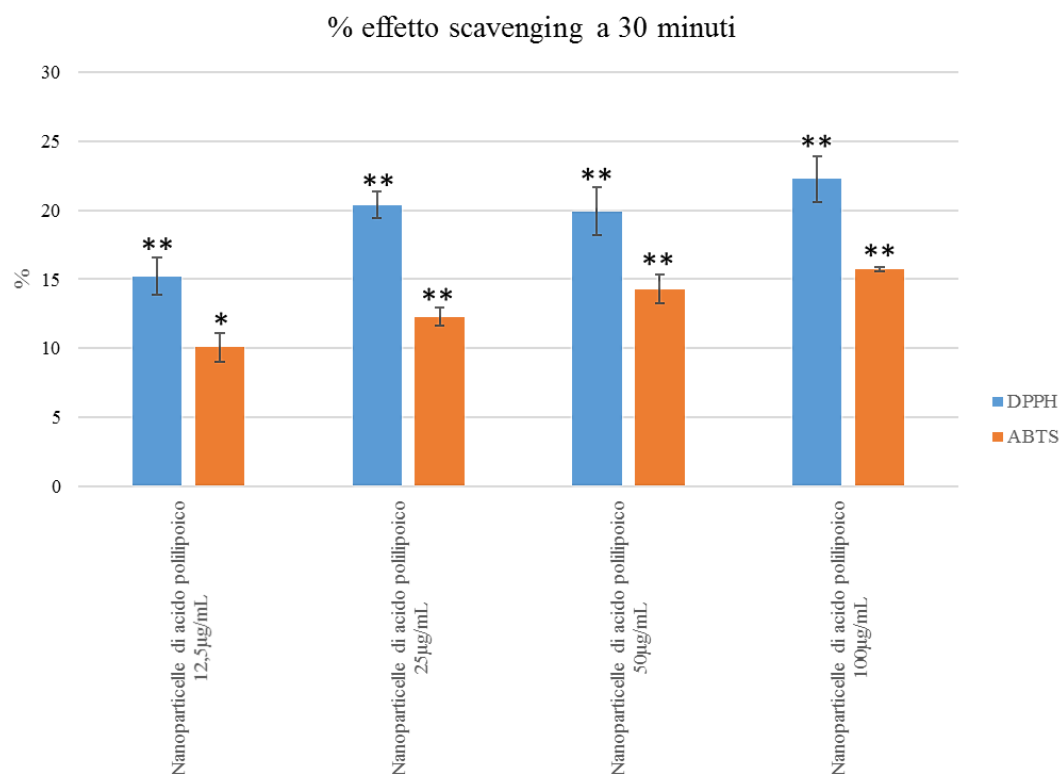


Figura 25. Confronto della percentuale di effetto scavenging registrata dopo 30 minuti per ogni saggio. * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$ rispetto al campione non trattato con antiossidanti.

Dal grafico si nota che l'attività antiossidante delle nanoparticelle di acido polilipoico è riscontrabile in entrambi i saggi e si attesta intorno al 15-20% per la dose maggiore e 10-15% per la dose inferiore. Quindi le nanoparticelle sono efficaci

nello scavenging dei radicali ma hanno un'azione inferiore rispetto agli antiossidanti di controllo (BHT, propil gallato e acido ascorbico). Inoltre entrambi i saggi si basano su un radicale stabile che presenta l'elettrone spaiato sull'azoto e quindi sono molecole diverse dai ROS contro cui si stanno progettando le nanoparticelle. Per cui un saggio eseguito all'interno di un sistema cellulare oppure condotto verso specifici radicali potrebbe meglio evidenziare le capacità di questo nanomateriale.

2. Analisi della captazione cellulare

2.1. Test di fagocitosi delle nanoparticelle ed analisi della fluorescenza tramite FACS

Il FACS è uno strumento utilissimo per le analisi di tipo biologico poiché consente di analizzare contemporaneamente diverse caratteristiche cellulari quali dimensioni, complessità e fluorescenza, rilevando le proprietà di ogni singola cellula.

L'analisi si effettua grazie all'entrata del campione nella camera di flusso attraverso un flusso laminare che consente il passaggio delle cellule singolarmente davanti a un laser. La rilevazione della fluorescenza e dello scattering (evidenziato in figura 26) avviene tramite particolari rilevatori geometricamente disposti in modo da rilevare fluorescenza e complessità (a 90°C) o dimensione (frontalmente).

L'analisi FACS consente in questo modo di riconoscere diversi tipi cellulari, distinguere cellule vive da cellule morte ^[66] ed evidenziare l'uptake di materiale fluorescente quali ad esempio le nanoparticelle funzionalizzate.

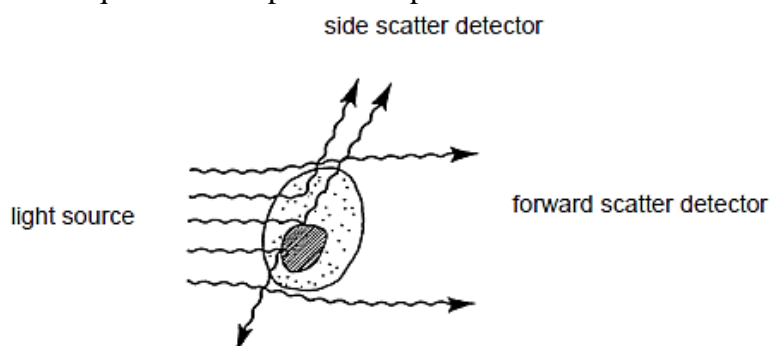


Figura 26. Side e forward scatter. ^[67]

Nel mio progetto di tesi, il FACS è stato utilissimo non solo per studiare come diversi tipi cellulari fagocitavano in quantità differenti le nanoparticelle (basandosi sulla fluorescenza della rodamina), ma è stato utile anche per evidenziare marcatori di superficie espressi dalle cellule trattate con le nanoparticelle e rilevabili grazie ad anticorpi primari funzionalizzati con diverso fluoroforo. Inoltre lo strumento è stato sfruttato anche per analisi di attività antiossidante su cellule.

In questo esperimento si sono volute analizzare le diverse capacità di captazione di differenti tipi cellulari. Per questo i campioni sono stati inizialmente incubati per 24 ore con concentrazioni crescenti di nanoparticelle di acido polilipoico. Al fine di poter confrontare i dati di fluorescenza ottenuti e poter quindi quantificare qua-

litativamente le capacità endocitiche di ogni tipo cellulare, i parametri di acquisizione dello strumento sono stati mantenuti identici per ogni esperimento. Successivamente, si è voluto verificare se vi era una diversa capacità endocitica nel tempo e a temperature differenti e infine si sono voluti confrontare diversi terreni di crescita per verificare se una diversa tipologia e concentrazione di proteine disciolte poteva modificare il dato ottenuto nelle 24 ore.

Come mostrato in figura 27, le cellule che fagocitano maggiormente le nanoparticelle sono macrofagi e monociti; mentre la fluorescenza associata alla captazione in HeLa, raw, linfociti e granulociti risulta essere nettamente inferiore. Ciò trova conferma con il ruolo biologico e immunitario di macrofagi e monociti e può determinare una bassa emivita e biodisponibilità delle nanoparticelle.

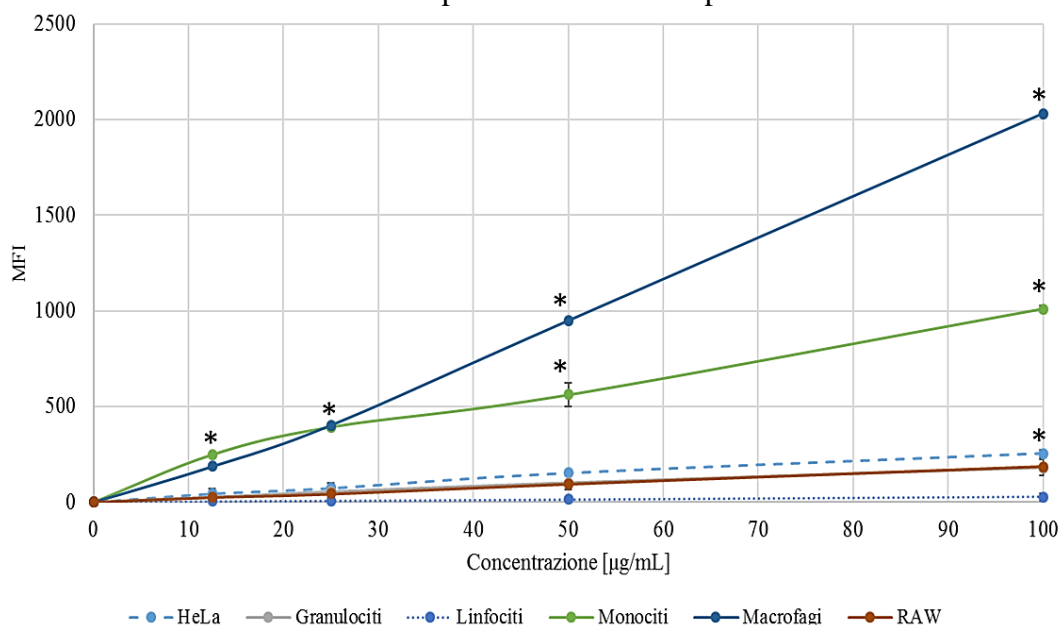
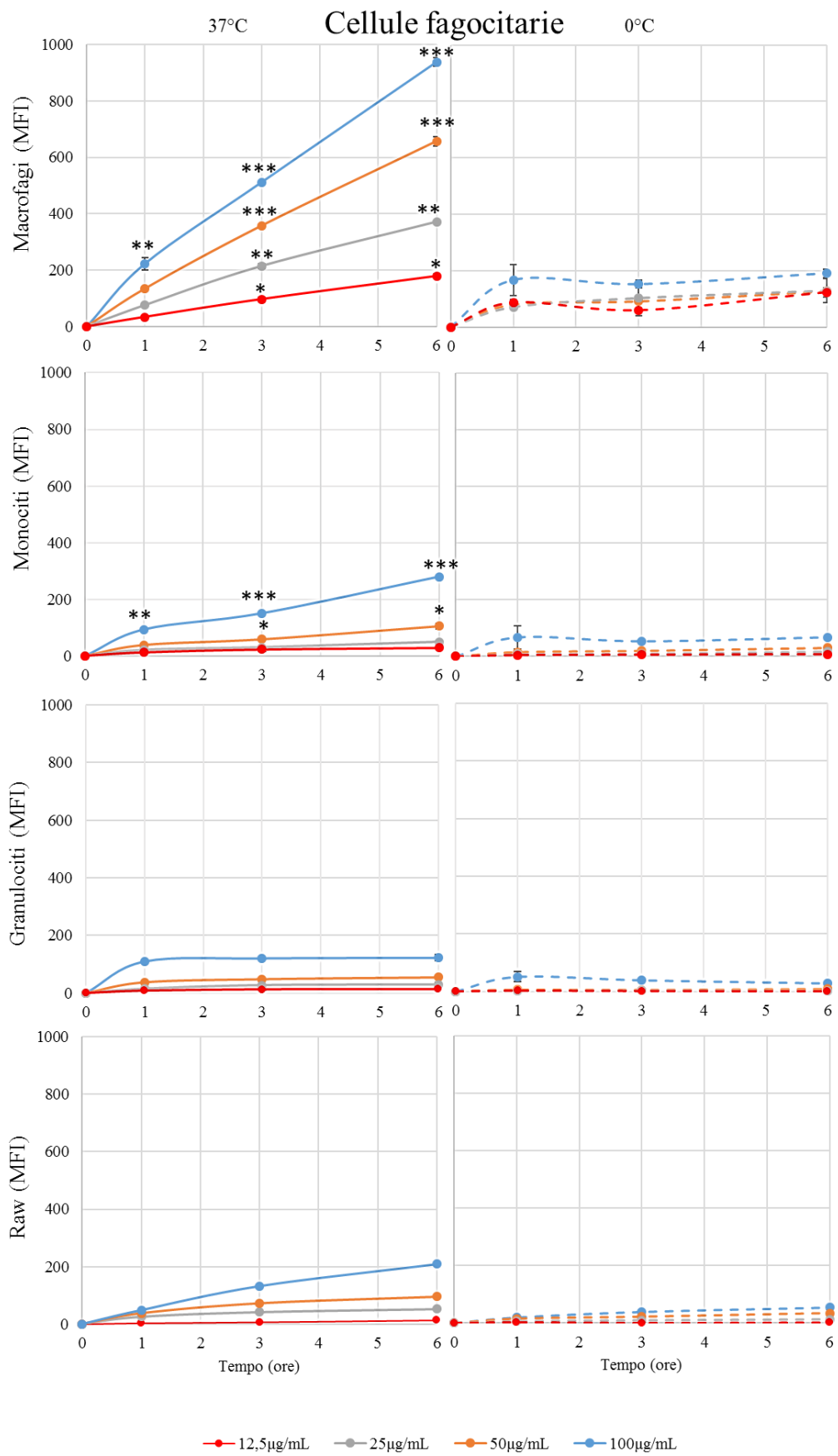


Figura 27. Intensità di fluorescenza registrata (MFI, mean fluorescence intensity) dopo 24 ore di incubazione a diverse concentrazioni di nanoparticelle in diversi tipi cellulari, in 10% FCS. I dati sono la media di 4 esperimenti condotti in duplicato. * $p < 0,05$ rispetto alle cellule non trattate con le nanoparticelle.

I dati ottenuti trovano consenso anche con i dati ottenuti nel tempo (figura 28) per i quali si dimostra che la captazione avviene a 37°C e soprattutto attraverso un processo che risulta, ancora una volta, maggiore in monociti e macrofagi.



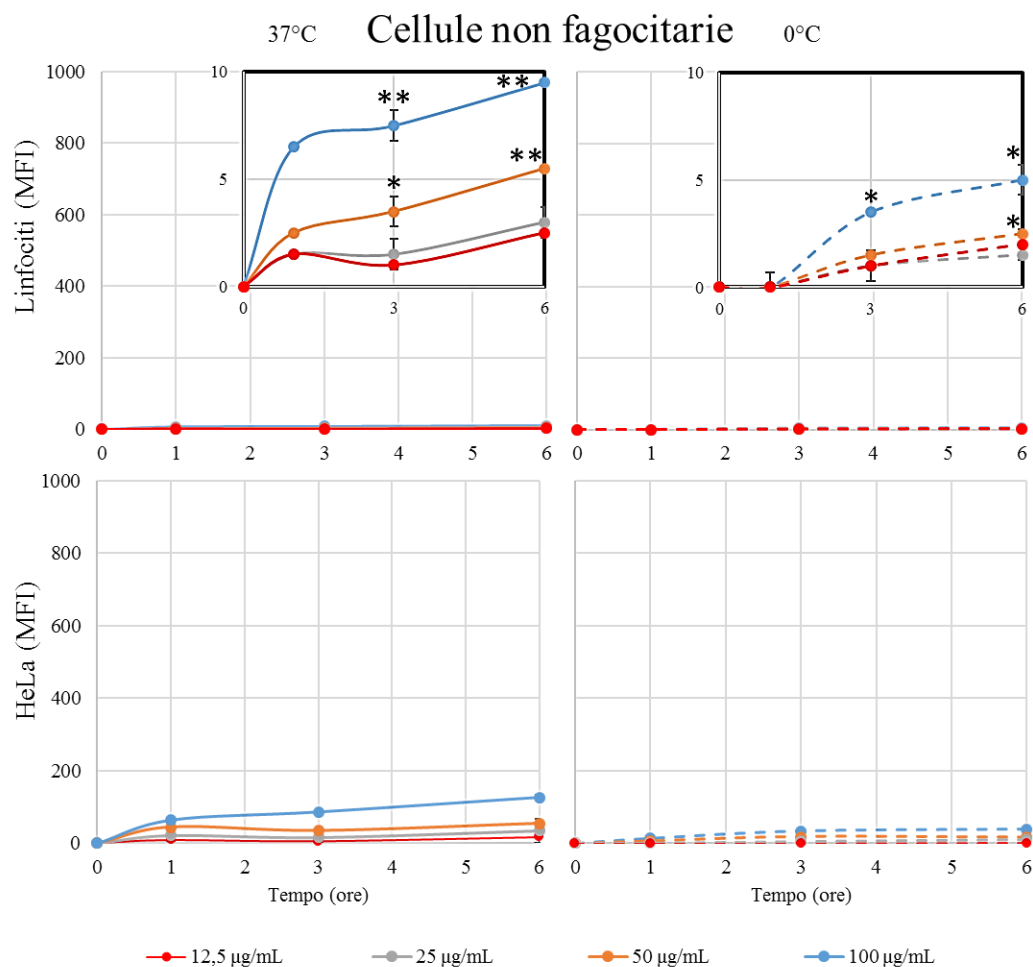


Figura 28. Intensità di fluorescenza registrata dopo diversi tempi e temperature di incubazione a concentrazioni differenti di nanoparticelle in diversi tipi cellulari, in 10% FCS. Per i linfociti si è preferito aumentare la scala per meglio evidenziare le differenze. Esperimento rappresentativo di 2 condotti in duplicato. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ rispetto alle cellule non trattate con le nanoparticelle.

Si è quindi voluto studiare la captazione in terreni diversi, contenenti percentuali differenti di siero bovino oppure siero umano o plasma umano (figura 29).

Nei monociti non si notano notevoli differenze di uptake utilizzando siero fetale bovino o plasma umano, mentre c'è un aumento di efficienza di captazione in siero umano. Questo andamento è presente (anche se in maniera meno evidente) anche nei macrofagi mentre non appare nei linfociti. In questi ultimi infatti la quantità di nanoparticelle endocitate è talmente bassa (MFI di più di due ordini di grandezza inferiore a monociti e macrofagi) che le possibili differenze non sono così rilevanti. Ciò che risulta più interessante dall'analisi globale è l'osservazione che non ci sono differenze significative di captazione in presenza dei sieri (FCS, HS e HP) e l'assenza degli stessi (0%) con l'eccezione dei macrofagi trattati con la più alta concentrazione di nanoparticelle; questo potrebbe indicare che non ci sono particolari proteine che si assorbono sulla superficie delle nanoparticelle inducendo una diversa mediazione nell'endocitosi.

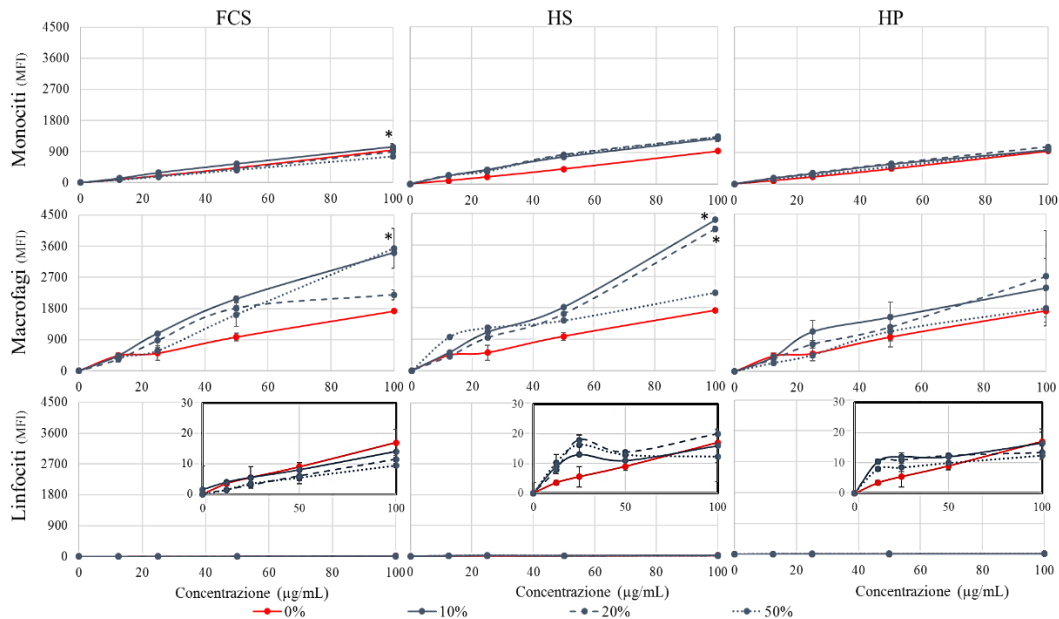


Figura 29. Intensità di fluorescenza registrata dopo 24 ore di incubazione a diverse concentrazioni di nanoparticelle in diverso terreno in diversi tipi cellulari. Esperimento rappresentativo di 3 condotti in duplicato. * $p < 0,05$ rispetto al campione trattato con stessa concentrazione di nanoparticelle ma in assenza di siero o plasma.

2.2. Analisi al microscopio confocale della fagocitosi delle nanoparticelle da parte dei macrofagi

La microscopia confocale è una tecnica utilizzata per aumentare la risoluzione delle immagini visualizzate. A questo scopo, invece di illuminare tutto il campione come nella microscopia tradizionale, un fascio laser viene focalizzato in un punto preciso del campione e la luce diffusa raggiunge un rilevatore. Prima del rilevatore viene posto un pinhole con una stretta apertura che fa passare solamente la luce a fuoco e non quella fuori fuoco.^[68] Lo schema del meccanismo è rappresentato in figura 30.

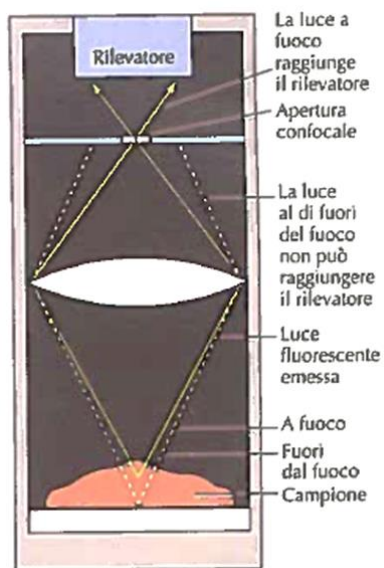


Figura 30. Meccanismo di funzionamento del microscopio confocale. ^[69]

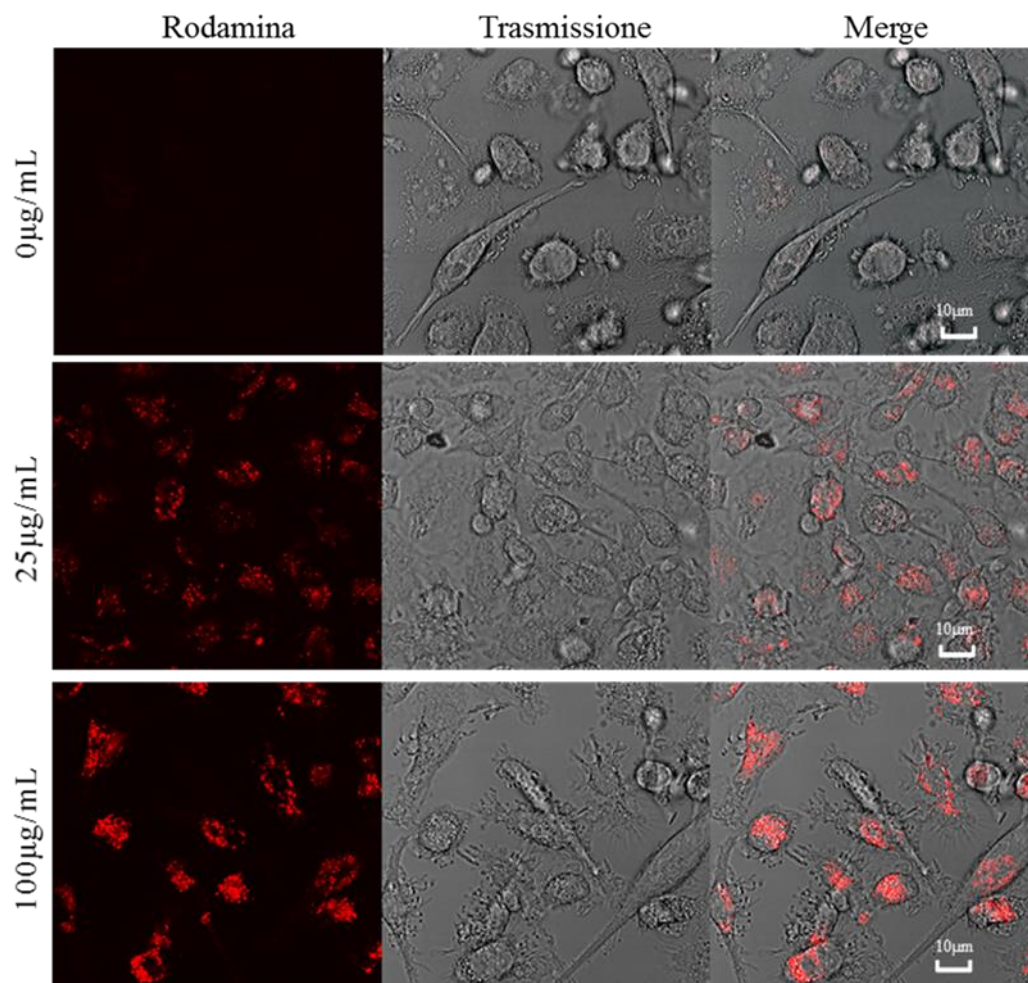


Figura 31. Immagini di microscopia confocale di macrofagi trattati con diverse concentrazioni di nanoparticelle in 10% FCS.

Dalle immagini si nota chiaramente che le nanoparticelle vengono endocitate dalle cellule e si distribuiscono nel citosol. Le immagini ottenute consentono di affermare che effettivamente le nanoparticelle sono internalizzate dalle cellule, e quindi quella che si crea non è solamente una interazione con la membrana plasmatica.

3. Studi di tossicità in vitro

3.1. Cinetica di coagulazione

L'emostasi è un importante meccanismo di difesa dei vertebrati che prevede l'iniziale step di coagulazione e il successivo stadio di fibrinolisi. Le proteine del plasma deputate alla coagulazione (nominate fattori) circolano in forma inattiva (o zimogeno) e vengono attivate in seguito a un danno all'endotelio [70].

La cascata di coagulazione avviene con una serie di conversioni auto-amplificanti degli zimogeni in enzimi attivi con scopo finale l'attivazione della fibrina.

La cascata di coagulazione viene solitamente divisa in due: la via intrinseca e la via estrinseca. Come si nota in figura 32, in entrambe il calcio è un cofattore essenziale. [71]

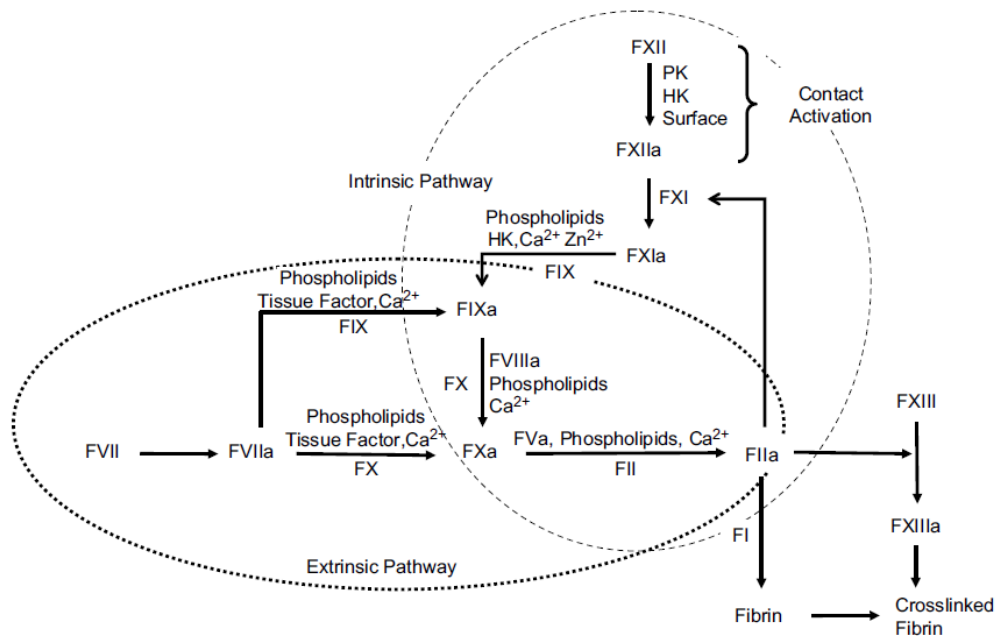


Figura 32. Cascata di coagulazione. [71]

L'esperimento di cinetica di coagulazione eseguito si focalizza sulla via di tipo intrinseca. Il primo stadio di questa via è l'attivazione da contatto con una superficie del fattore di Hageman (o fattore XII). Il legame di questo fattore con una superficie attivante sembra portare alla formazione di un complesso che porta ad una amplificazione del fattore XII attivo. Questo meccanismo complesso è solo parzialmente compreso ed è oggetto di studio nelle scienze delle superfici dei biomateriali. Ciò che è evidente è che la coagulazione del plasma si attiva più efficacemente su superfici anioniche. [71]

Questo sembra essere dovuto al fatto che normalmente l'Hageman factor è in grado di riconoscere un danno all'endotelio interagendo con il sottostante strato di collagene più negativo. Questa interazione provocherebbe un cambio conformazionale nella proteina che così si auto-attiverebbe. Altra ipotesi teorizza che un'alta densità di carica negativa sulla superficie dei materiali porti al caricamento positivo degli amminoacidi del fattore XII con un aumento della sua attivazione.

Tuttavia, nuovi studi sembrano suggerire che non sia tanto la carica negativa a promuovere la cascata di coagulazione, quanto una competizione tra le proteine che si assorbono sul materiale. [72]

Secondo Zhou *et al.* l'ipotesi, finora sempre accettata, di una auto-attivazione su superfici anioniche deve essere rivista alla luce del fatto che la presenza di una corona proteica sembra influenzare in maniera diversa, e talvolta non ancora compresa, le capacità auto-attivanti del fattore XII. [73]

Il test di coagulazione diventa quindi indispensabile per simulare e comprendere, almeno parzialmente, ciò che avviene in seguito all'iniezione di un materiale.

Nell'esperimento sotto riportato sono state confrontate le capacità pro-coagulanti della silice amorfa (Ludox®) e delle nanoparticelle di acido polilipico.

Le nanoparticelle Ludox® sono ben note per la loro attività pro-coagulante [74], e quindi risultano un utile strumento per valutare l'effetto delle nanoparticelle di acido polilipico sul plasma umano.

Il confronto del $T_{1/2}$, ossia del tempo necessario perché avvenga metà della coagulazione, consente di capire se i nanomateriali possiedono un'attività pro-coagulante, ossia inducono una coagulazione veloce del plasma con un $T_{1/2}$ nettamente inferiore a quello fisiologico, o se invece non lo sono, poiché hanno un $T_{1/2}$ più simile a quello fisiologico.

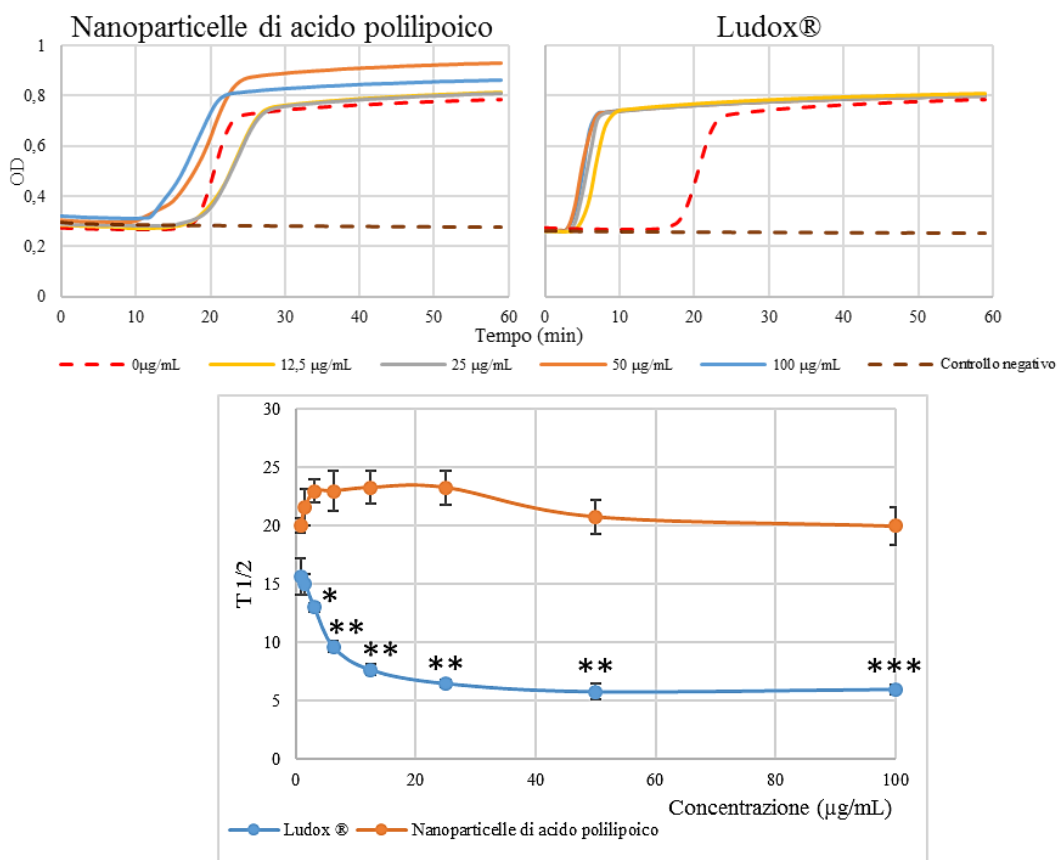


Figura 33. Cinetiche di coagulazione a diverse concentrazioni di nanoparticelle di acido polilipico e Ludox®, e $T_{1/2}$ calcolato dalle curve. Nel grafico si riporta un esperimento rappresentativo di 4 condotti in triplicato. Per chiarezza rappresentativa si riportano solo le curve a dosi più elevate di nanoparticelle. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ rispetto alla coagulazione spontanea.

Come si nota dalla figura 33, le curve sigmoidali delle nanoparticelle di acido polilipico a diverse concentrazioni tendono a disporsi attorno alla curva del controllo (coagulazione spontanea). Questo si riscontra anche nel calcolo del $T_{1/2}$, in cui si osserva che i valori calcolati si attestano intorno ai 20 minuti registrati per la coagulazione spontanea; per cui si può affermare che in vitro le nanoparticelle di acido polilipico non sono in grado di indurre la coagulazione. Questa affermazione trova conferma anche nel confronto con le nanoparticelle di silice amorfa (Ludox®). Tali nanoparticelle infatti presentano delle curve di cinetica che si dispongono nettamente più a sinistra rispetto alla curva della coagulazione spontanea. Ciò poi trova corrispondenza nei valori di $T_{1/2}$ che dimostrano, a tutte le concentrazioni testate, una netta capacità pro-coagulante.^[75] Questo diverso comportamento delle due tipologie di nanoparticelle dipende dal loro diverso potenziale Z come evidenziato in tabella 12, per cui a superfici più negative è associato un maggior effetto pro-coagulante.

Si può quindi affermare che, in una successiva applicazione clinica, ci si potrà aspettare una reazione pressoché fisiologica dell'Hageman factor una volta a contatto con le nanoparticelle di acido polilipico.

3.2. Test di emolisi

Il test emolitico prevede di valutare l'effetto delle nanoparticelle sui globuli rossi per stabilire se viene indotta la lisi degli stessi con rilascio di emoglobina. L'evento di lisi è facilmente rilevabile registrando l'aumento nel valore di assorbanza dovuto, appunto, al rilascio nella soluzione dell'emoglobina che dona al tutto una colorazione dal rosso intenso al meno intenso a seconda della quantità rilasciata. Il test è fondamentale per simulare in vitro l'effetto dell'iniezione delle nanoparticelle di acido polilipico in un organismo.

Da alcuni anni si è scoperto che alcune nanoparticelle (come le nanoparticelle di silice, di tricalciofosfato, di idrossiapatite, di ossido di ferro, di ossido di zinco e i nanotubi di carbonio), per le loro dimensioni e/o per il loro contenuto metallico, sono in grado di provocare la lisi dei globuli rossi. Questo sembra essere dovuto o all'interazione tra la carica superficiale della nanoparticella e della cellula comportando una destabilizzazione della stessa nella cellula e quindi una perdita delle proprietà di membrana, oppure alla degradazione dei fosfolipidi da parte delle componenti metalliche delle nanoparticelle o per l'attivazione di ROS.^[76, 77, 78] L'effetto finale è in ogni caso il rilascio del contenuto cellulare dei globuli rossi e la morte degli stessi.

Nell'esperimento si vogliono quindi testare le nanoparticelle di acido polilipico in confronto con le nanoparticelle di silice amorfa e al trattamento con acqua MilliQ, che induce la lisi completa dei globuli rossi.

Come dimostrato^[76] le nanoparticelle di silice amorfa non PEGilate sono tossiche e danno un forte effetto emolitico. L'acqua invece produce uno squilibrio osmotico all'interno del globulo rosso: esso trovandosi in una soluzione ipotonica tenderà ad assumere acqua fino ad esplodere per bilanciare il gradiente salino.

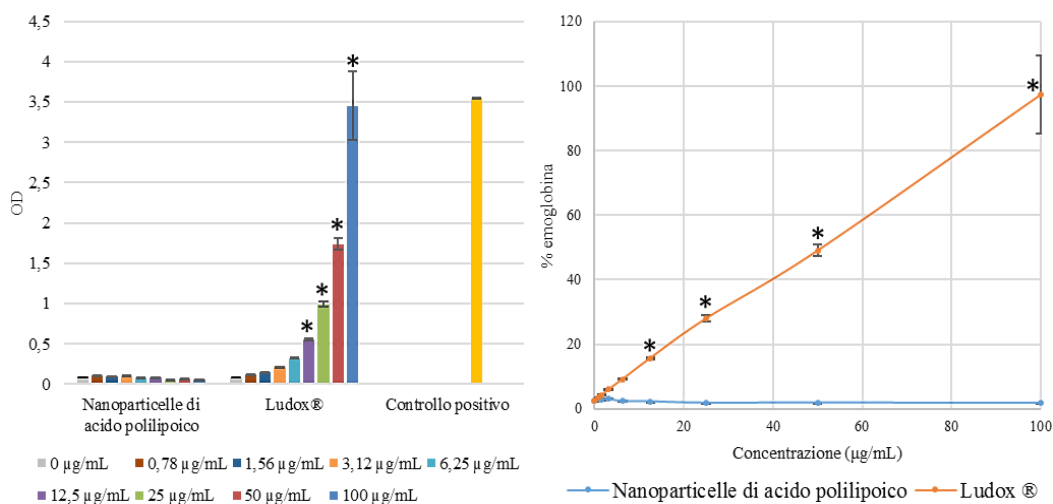


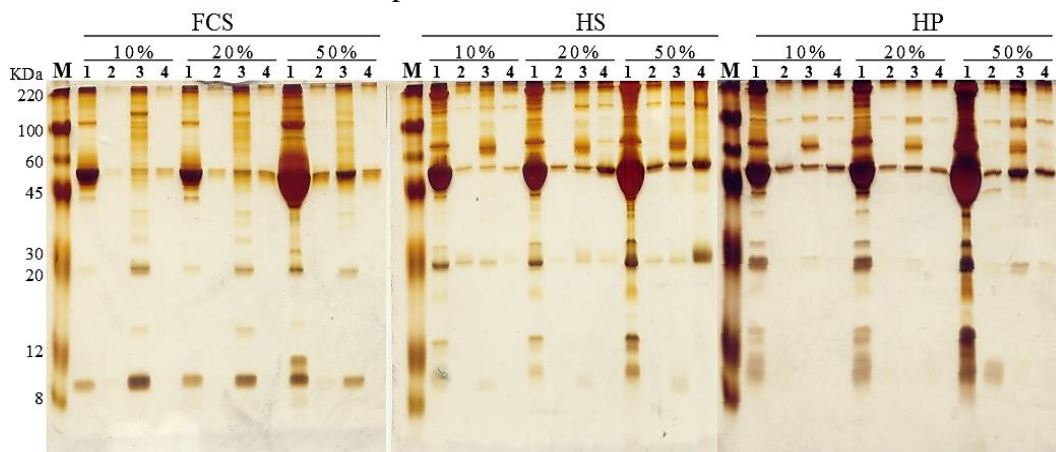
Figura 34. Istogramma dei valori di assorbanza dell'emoglobina rilasciata e percentuale di emoglobina rilasciata dall'azione delle nanoparticelle in rapporto percentuale con il controllo positivo. Esperimento rappresentativo di 3 condotti in triplicato. * $p < 0,05$ rispetto alle cellule non trattate con le nanoparticelle.

Come si nota dalla figura 34, la quantità di emoglobina rilasciata dai globuli rossi trattati con le nanoparticelle di acido polilipico è nettamente inferiore all'effetto provocato dalle nanoparticelle di silice, anche a dosi più alte si ha solo il 3% di effetto. Per cui le nanoparticelle di acido polilipico anche a dosi più alte utilizzate non risultano avere proprietà emolitiche.

3.3. Test di formazione della corona

Nel mio progetto di tesi si è utilizzata la gel elettroforesi per andare a separare e quindi analizzare le diverse proteine interagenti con le nanoparticelle di interesse. Queste proteine vengono definite corona in quanto si assorbono sulla superficie della nanoparticella a formare, appunto, una corona. Le proprietà chimiche e fisiche della nanoparticella influenzano in modo diverso l'assorbimento delle migliaia di proteine del plasma per cui ci saranno proteine interagenti a più alta e a più bassa affinità. Secondo l'effetto Vroman è plausibile che una nanoparticella in un fluido biologico venga prima di tutto ricoperta dalle proteine a più alta concentrazione. Col passare del tempo però si creerà uno scambio tra le proteine a maggiore concentrazione ma a bassa affinità e le proteine a minore concentrazione ma a più alta affinità. Quello che si può quindi chiamare uno scambio tra una "soft" corona e una "hard" corona. La corona che così si forma ha un ruolo biologico importante: a seconda delle proteine che si legano, queste possono interagire con loro specifici recettori e agire sul trasporto, emivita e distribuzione delle nanoparticelle. ^[79, 80, 81, 82] È quindi molto importante capire cosa si lega per capire (o quantomeno ipotizzare) quale sarà il destino della nanoparticella ed è quindi molto importante ricreare in vitro i fluidi biologici con il relativo corredo proteico per simulare con migliori risultati le condizioni in vivo.

In figura 35 sono riportati dei gel rappresentativi delle proteine della corona ottenuta incubando le nanoparticelle per 30 minuti a 37°C in RPMI contenente diverse concentrazioni di FCS, HS o HP; per eliminare la soft corona sono stati effettuati uno o tre lavaggi in PBS. Per confronto con delle nanoparticelle già note, sono state nuovamente utilizzate le nanoparticelle di silice amorfa Ludox®.



M. Marcatore

1. Nanoparticelle di acido polilipoico in concentrazione 50µg/mL dopo 1 lavaggio
2. Nanoparticelle di acido polilipoico in concentrazione 50µg/mL dopo 3 lavaggi
3. Nanoparticelle Ludox® in concentrazione 50µg/mL dopo 3 lavaggi
4. Controllo dopo 3 lavaggi

Figura 35. Silver staining di gel di poliaccrilammide delle proteine interagenti con la superficie delle nanoparticelle. In figura si riporta un esperimento rappresentativo di 4 effettuati.

Ciò che si nota confrontando i 3 gel è come tramite i lavaggi si vadano a rimuovere quasi tutte le proteine depositate e che quindi non ci sia una vera e propria hard corona poiché (esclusa la proteina a peso molecolare 50KDa, probabilmente albumina) nessuna proteina è in grado di interagire ad alta affinità con la superficie delle nanoparticelle di acido polilipoico.

Non essendoci quindi un'alta affinità di legame di particolari proteine si conferma quanto osservato con le analisi di captazione: tra i diversi fluidi (siero umano, plasma umano, siero fetale bovino) non c'è una significativa diversità nell'endocitosi delle nanoparticelle.

Dalla figura 35 si nota inoltre la presenza di tre principali bande (e quindi proteine) localizzate tra 60 e 45 KDa, 100 e 60 KDa e 30 e 20 KDa. Nel primo intervallo molto probabilmente ricade l'albumina, nel secondo la proteina HRG (Histidine-rich glycoprotein) e nel terzo l'apolipoproteina A1. Per trovare conferma a quanto ipotizzato, sono stati messi appunto dei Western blot.

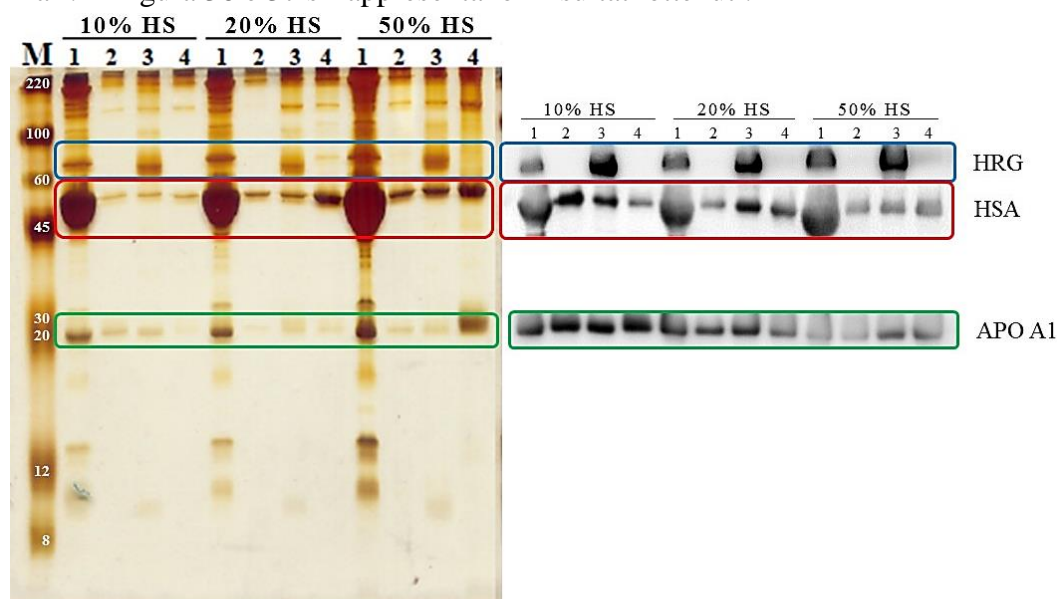
L'albumina è la proteina più abbondante nel sangue e svolge un importante ruolo nel trasporto e nel metabolismo di ligandi endogeni ed esogeni come acidi grassi, amminoacidi, steroidi, metalli (calcio, rame, zinco) e farmaci. ^[83]

Alcuni studi ^[84, 85] hanno dimostrato che il legame di questa proteina può comportare un aumento del tempo di circolazione delle nanoparticelle e una diminuzione della loro tossicità.

L'HRG è una proteina del sangue che presenta un dominio ricco in istidine che è responsabile del legame a particolari ligandi come eparina, fibrinogeno, plasminogeno, proteine del complemento, ioni metallici, immunoglobuline. Questo comporta l'interazione della proteina con diversi tipi cellulari come fibroblasti, linfociti T, macrofagi, eritrociti, monociti, piastrine, per modulare la fibrinogenesi, inibire l'attivazione del complemento, aumentare la clearance delle cellule apoptotiche da parte dei macrofagi e per l'attività antibatterica. ^[86] Studi sulle nanoparticelle di silice hanno dimostrato che il legame di questa proteina sulla superficie può prevenire la cattura da parte dei macrofagi. ^[87]

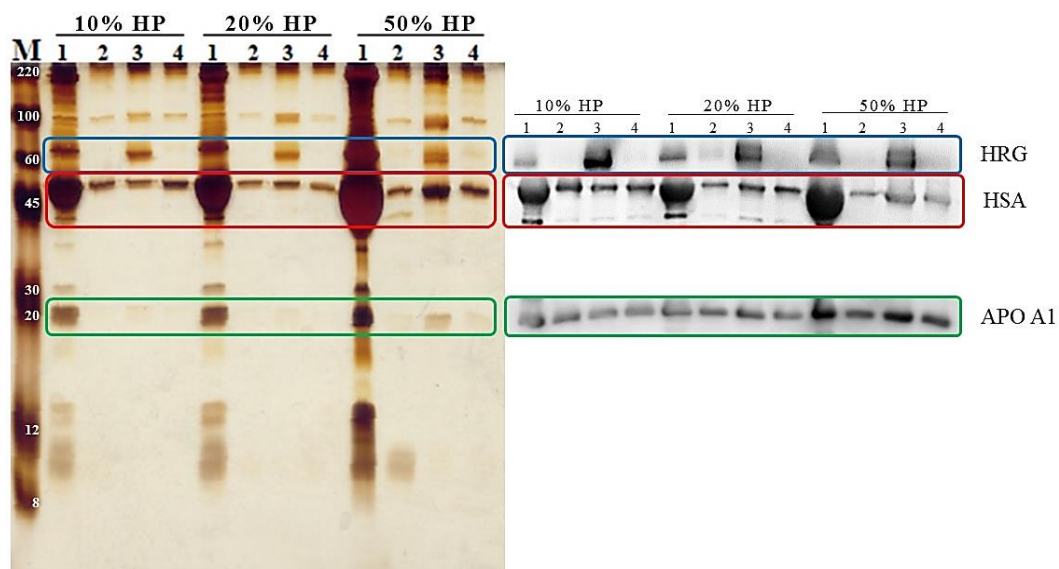
L'apolipoproteina A1 è la principale proteina delle HDL (high density lipoprotein) ossia una classe di proteine aventi ruolo nella rimozione del colesterolo in eccesso nei tessuti, nell'attività antiossidante e anti-infiammatoria. ^[88] Questa proteina interagisce con uno specifico recettore che viene espresso dalla superficie cellulare di cellule renali e di cellule dell'epitelio intestinale e che consente l'endocitosi della proteina stessa. La formazione di una corona ricca in apolipoproteina A1 potrebbe quindi favorire l'endocitosi delle nanoparticelle tramite specifico recettore. ^[89]

Per dimostrare la presenza di queste tre proteine si è quindi trasferito il profilo elettroforetico su una membrana PVDF che è stata incubata con i diversi anticorpi primari. In figura 36 e 37 si rappresentano i risultati ottenuti.



1. Nanoparticelle di acido polilipoico in concentrazione 50µg/mL dopo 1 lavaggio.
2. Nanoparticelle di acido polilipoico in concentrazione 50µg/mL dopo 3 lavaggi.
3. Nanoparticelle Ludox® in concentrazione 50µg/mL dopo 3 lavaggi.
4. Controllo dopo 3 lavaggi.

Figura 36. Western blot per HRG, HSA e ApoA1 dei campioni trattati con siero umano e confronto con gel di poliaccrilammide.



1. Nanoparticelle di acido polilipoico in concentrazione 50µg/mL dopo 1 lavaggio.
2. Nanoparticelle di acido polilipoico in concentrazione 50µg/mL dopo 3 lavaggi.
3. Nanoparticelle Ludox® in concentrazione 50µg/mL dopo 3 lavaggi.
4. Controllo dopo 3 lavaggi.

Figura 37. Western blot per HRG, HSA e ApoA1 dei campioni trattati con plasma umano e confronto con gel di poliaccrilammide.

Dalle due figure si nota subito che l'ipotesi fatta sulla tipologia di proteine assorbite è corretta. Si nota inoltre che nelle nanoparticelle oggetto di studio solo al primo lavaggio l'albumina è fortemente presente, poi la sua concentrazione cala anche se rimane presente in maniera simile a quanto avviene per le Ludox®. L'HRG invece lega ad alta affinità le nanoparticelle di silice ma viene totalmente eliminata dopo tre lavaggi in quelle di acido polilipoico per cui non ha un'alta affinità per questa superficie. Interessante è invece notare come l'apolipoproteina A1 non risulti nel silver staining mentre sia presente in tutti i campioni anche dopo tre lavaggi. Questo significa quindi che tale proteina è in grado di legarsi ad alta affinità con le superfici testate ma la rilevazione con gli ioni d'argento non è abbastanza sensibile.

Dal confronto del gel con la membrana risultano evidenti altre bande che non sono state analizzate, ma che in futuro potrebbero essere studiate tramite tecniche di spettrometria di massa o di analisi proteomica shotgun.

3.4. Test di attivazione del complemento

Il sistema del complemento è costituito da una rete di proteine che giocano un ruolo importante nella difesa dell'ospite e nell'infiammazione. Il suo nome deriva dal fatto che quando venne scoperto (negli anni Novanta dell'Ottocento) come un fattore termo-sensibile del siero si notò la sua azione nella lisi dei batteri "complementare" a quella di anticorpi specifici.^[90]

Il sistema del complemento viene considerato un aspetto chiave dell'immunità innata e si esplica in tre differenti vie di azione riassunte in figura 38: la via classica, la via alternativa e la via delle lectine. La prima via di attivazione prevede il riconoscimento della porzione Fc di un anticorpo (solitamente IgG o IgM) legato su uno specifico antigene di un patogeno da parte di C1q che forma un complesso con

C1r e C1s. L'attivazione autocatalitica di C1s e C1r provoca il taglio di C4 e C2 nei frammenti C2a, C4a, C2b e C4b. C4b e C2a si associano sulla superficie del patogeno dando origine alla C3 convertasi che scinde C3 in C3a e C3b.

Nella via alternativa, C3b si forma per idrolisi spontanea sulla superficie microbica e recluta i fattori B e D. Il fattore D promuove il taglio del fattore B a creare la C3 convertasi che viene stabilizzata dalla properdina (prodotta dai neutrofili) che previene l'inibizione da parte dei fattori H e I.

Nella via delle lectine, lectine leganti il mannosio (MBL) o ficoline riconoscono un motivo strutturale costituito da carboidrati sulla superficie dei patogeni (batteri e lieviti) e tramite le MASP (MBL-associated protein) si legano sulla superficie del patogeno. Il legame provoca un'autoattivazione di MASP2 che taglia C4 nei frammenti C4a e C4b. C4b lega C2 che a sua volta viene tagliato da MASP2 nei frammenti C2a e C2b. Come per la via classica, C4b e C2a si associano a dare la C3 convertasi che scinde C3 in C3b e C3a.

Tutte e tre le vie hanno quindi come risultato finale l'attivazione della C3 convertasi. Una volta che il C3 è stato tagliato, diversi sono i destini possibili: il C3b può agire come opsonina promuovendo l'ingestione da parte di fagociti, oppure può legarsi alla C3 convertasi creando la C5 convertasi che taglia il C5 in C5b che a sua volta attiva altri elementi da C6 a C9 che si assemblano a formare un poro sulla superficie del patogeno; in contemporanea i fattori C3a, C4a e C5a promuovono l'infiammazione reclutando le cellule del sistema immunitario. [91, 92]

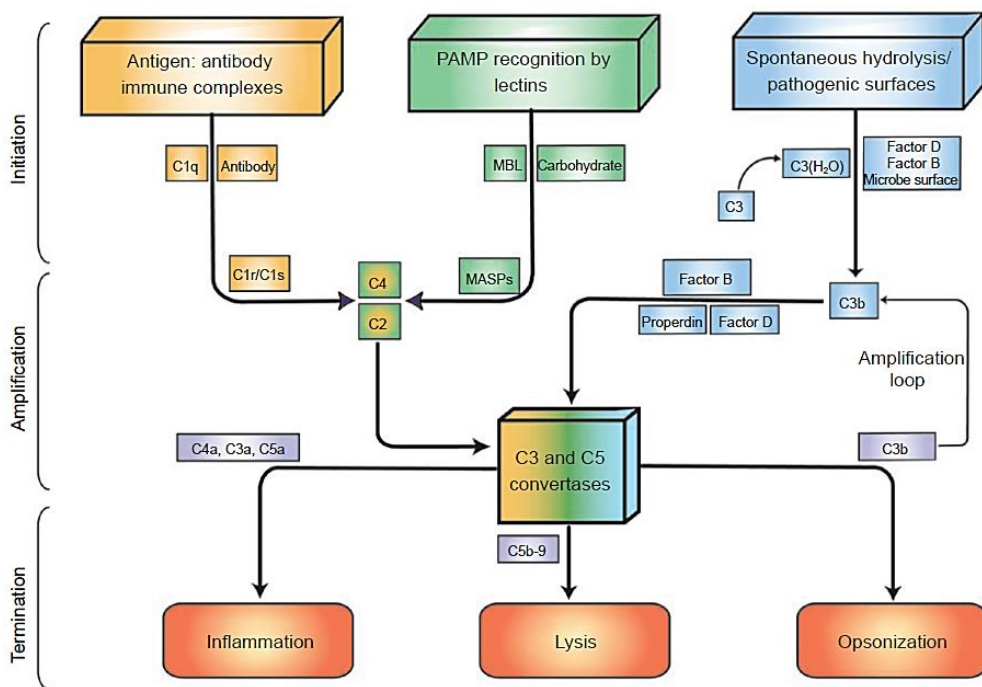


Figura 38. Schema riassuntivo delle tre vie del complemento. [91]

Visto che l'elemento C3 rappresenta il punto di raccordo tra le tre vie, indagare la presenza del suo frammento solubile (ossia C3a) può stabilire in maniera generale se vi sia o meno attivazione del complemento in risposta al nanomateriale.

Per questo, le nanoparticelle di acido polilipoico sono state incubate con siero umano e, con uno specifico anticorpo, si è analizzata la presenza della banda del C3a dopo corsa elettroforetica e Western blot. Di seguito viene riportato il risultato ottenuto incubando tre diverse diluizioni di nanoparticelle con siero umano, in confronto con il controllo positivo (incubazione con zymosan, ossia un glucano che si trova sulla superficie dei lieviti e che è in grado di attivare il complemento attraverso la via delle lectine ^[93]) e con il controllo negativo.

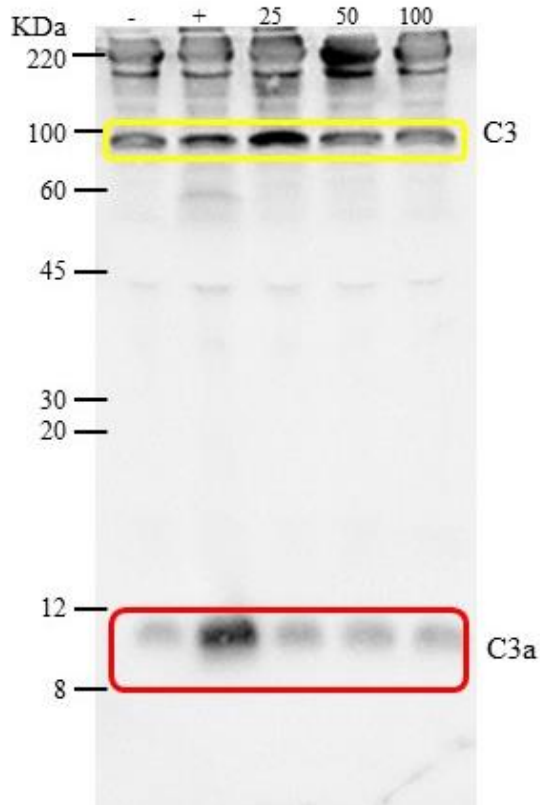


Figura 39. Western blot contro il frammento C3a. I controlli positivo e negativo vengono evidenziati rispettivamente con i simboli + e - mentre 25, 50 e 100 fanno riferimento alla concentrazione espressa in $\mu\text{g}/\text{mL}$ delle nanoparticelle di acido polilipoico. In figura si riporta un esperimento rappresentativo di 2 effettuati.

Dalla figura 39 si indentificano chiaramente la banda corrispondente alla proteina C3 intera a circa 100KDa (riquadro giallo) e la banda corrispondente al suo frammento C3a a circa 12KDa (riquadro rosso). Quello che è interessante notare è che da un lato C3 è presente in tutti i campioni, mentre solo nel controllo positivo il complemento risulta attivato e dunque la presenza di C3a è significativa, per cui si può escludere qualsiasi capacità da parte delle nanoparticelle di acido polilipoico di attivare il complemento.

3.5. Saggio MTS per l'analisi della vitalità cellulare

Il saggio MTS si basa sulla conversione (rappresentato in figura 40) di un sale di tetrazolio in un formazano colorato e solubile, prodotto dall'attività mitocondriale delle cellule vitali. La quantità di formazano prodotta dalle deidrogenasi è quindi direttamente proporzionale al numero di cellule vive nella coltura. ^[94]

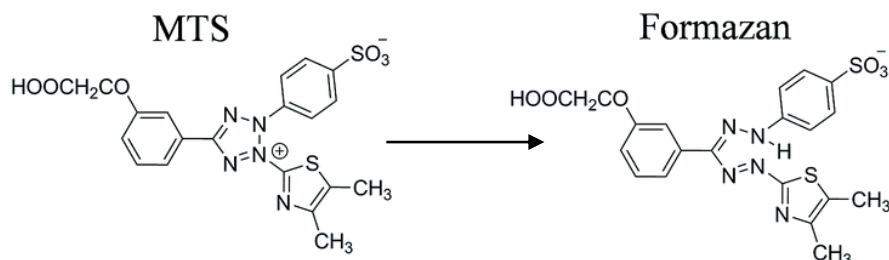


Figura 40. Trasformazione dell'MTS in formazano. Immagine adatta da ^[95].

Di seguito si riportano i risultati ottenuti dopo un giorno di incubazione per diversi tipi cellulari.

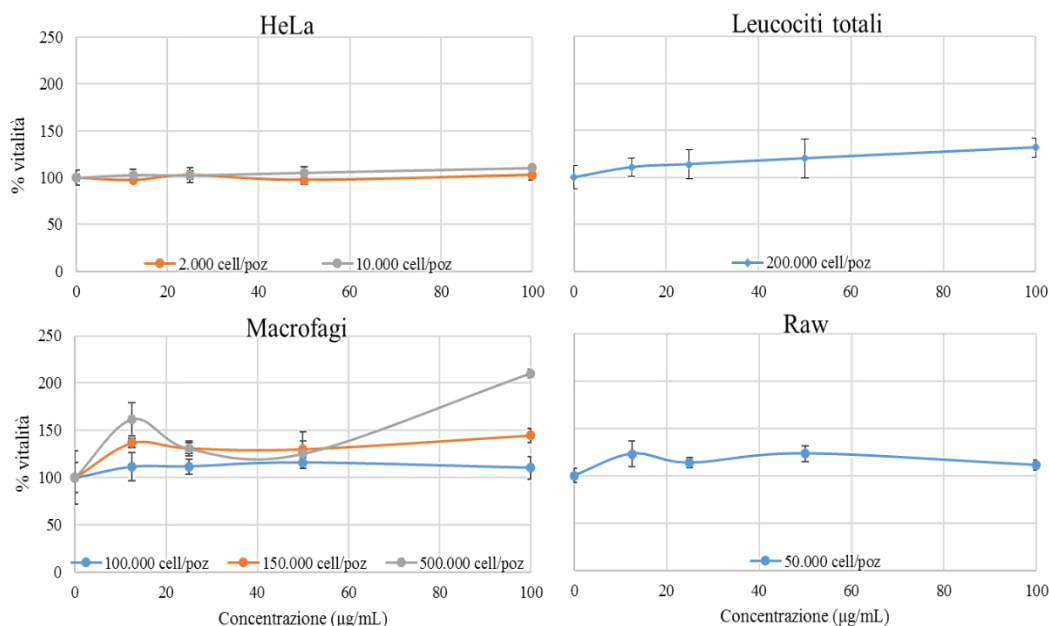


Figura 41. Percentuale di vitalità calcolata dopo un giorno in rapporto al controllo positivo (cellule non trattate con le nanoparticelle) e al controllo negativo (acqua). Esperimento rappresentativo di 2 condotti in triplicato.

Da tutti gli esperimenti condotti non risulta un calo nella vitalità cellulare e quindi le nanoparticelle di acido polilipoico non inducono tossicità. Anche a dosi più elevate la percentuale di vitalità cellulare si attesta attorno al 100%. Addirittura sembra esserci un effetto “protettivo” quando la densità cellulare aumenta come dimostrano i grafici relativi a HeLa e ai macrofagi.

Per meglio valutare il fenomeno, lo stesso tipo di esperimento è stato condotto in HeLa prolungando i tempi di incubazione come riportato in figura 42.

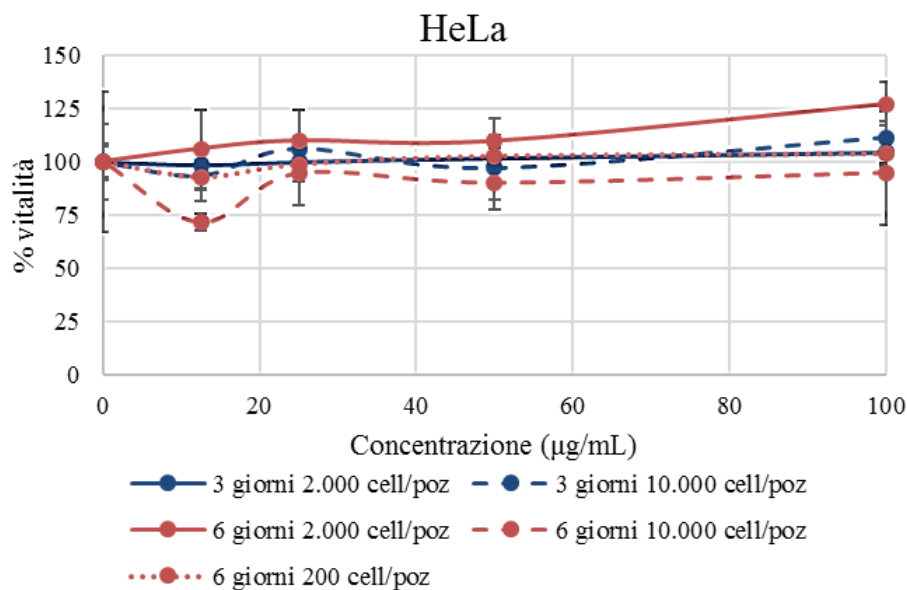


Figura 42. Percentuale di vitalità calcolata a 3 e 6 giorni e a diverse densità cellulari in rapporto al controllo positivo (cellule non trattate con le nanoparticelle) e al controllo negativo (acqua).

Dalla figura si nota come non vi sia l'induzione di un effetto tossico nemmeno dopo 6 giorni di incubazione, poiché i valori di vitalità registrati anche a dosi più elevate si attestano intorno al 100%.

Tuttavia questo test non è in grado di quantificare la reale densità cellulare, per cui se anche ci fosse un effetto tossico parziale e dunque solo una parte delle cellule risultassero morte, il metabolismo delle cellule superstiti potrebbe andare a falsare la rilevazione, facendo ipotizzare che le cellule siano tutte vitali.

3.6. Test clonogenico

Il test clonogenico è un esperimento che serve a stabilire la tossicità di una certa sostanza misurando l'effetto dose-dipendente che essa ha sulla crescita cellulare. Questo test, elaborato inizialmente per testare la tossicità delle radiazioni ^[96], è a tutt'oggi ancora molto sfruttato per l'analisi dell'effetto di moltissime sostanze, in particolare nanomateriali. ^[97]

Il metodo prevede di piastrare una bassa quantità di cellule e di lasciare che esse crescano formando dei cloni dopo esser state incubate con diverse dosi della sostanza in analisi. Un clone è essenzialmente un agglomerato di cellule tutte originate da una cellula "madre" e per definirsi tale deve contenere almeno 50 elementi. Dal momento che le cellule crescono adese alla piastra, una volta colorate, si può semplicemente contare il numero di cloni che si sono formati e rapportarlo al numero iniziale di cellule seminate per calcolare la percentuale di clonogenicità. Questo valore consentirà di analizzare se vi siano differenze tra le colture trattate e quindi di verificare se vi sia una risposta dose-dipendente alla sostanza in analisi. Se la sostanza è tossica è prevedibile che maggiore sarà la dose minore sarà la crescita cellulare e quindi più bassa sarà la percentuale di clonogenicità. ^[98]

Di seguito si riportano i risultati ottenuti.

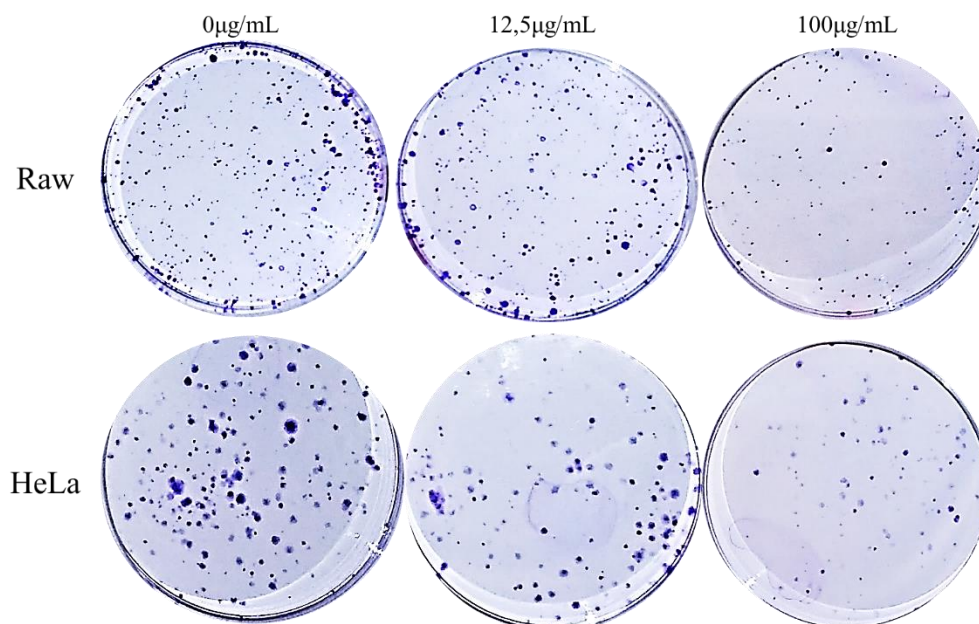


Figura 43. Immagini delle piastre contenenti i cloni di cellule del test clonogenico. In figura si riporta un esperimento rappresentativo di 3 effettuati.

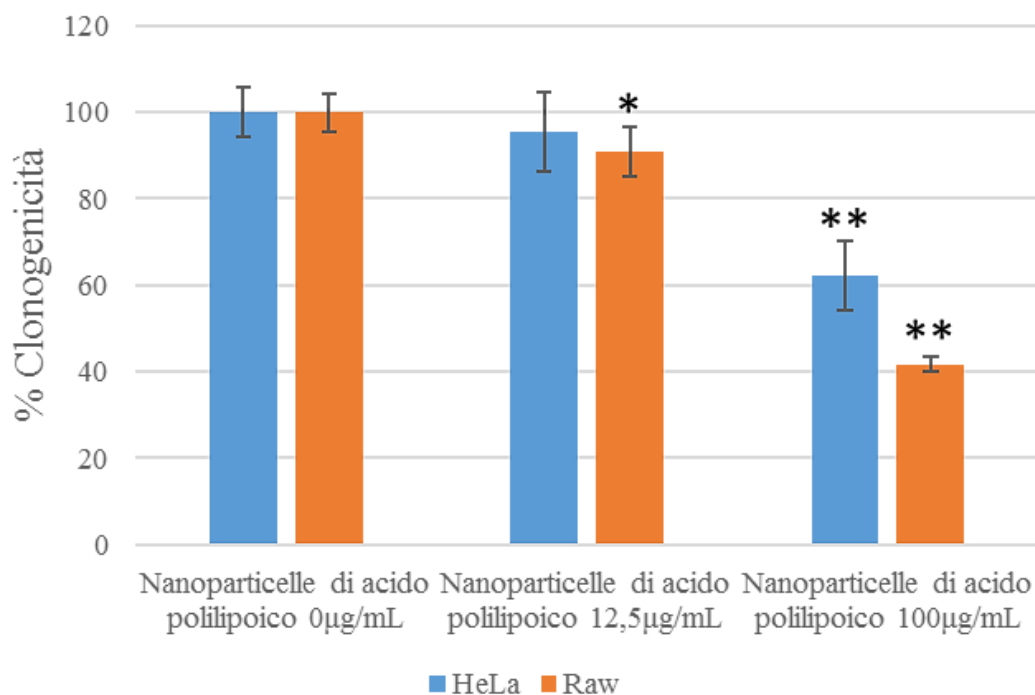


Figura 44. Percentuale di clonogenicità ricavata dalla conta delle piastre e rapportata al controllo negativo. Nel grafico si riporta un esperimento rappresentativo di 3 condotti in sei repliche. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ rispetto alle cellule non trattate.

Come si nota, l'aumento della dose di nanoparticelle di acido polilipoico sembra avere un effetto tossico, portando a un rallentamento della crescita cellulare sia nelle cellule raw che HeLa. Inoltre, durante l'incubazione con le nanoparticelle in raw, si è notata stimolazione del metabolismo glicolitico delle stesse con acidificazione del medium a più alte dosi di trattamento, come rappresentato in figura 45.

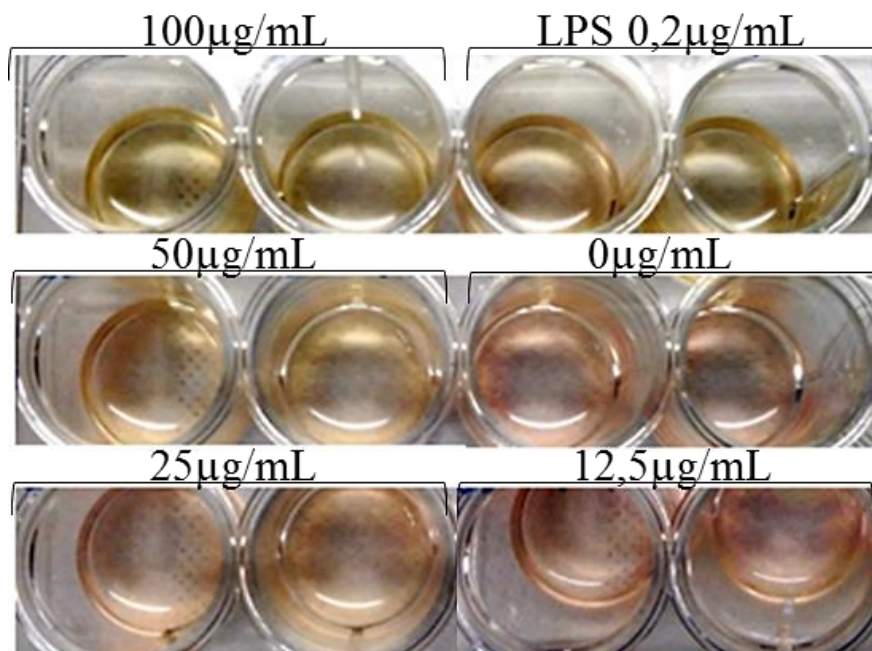


Figura 45. Cellule raw trattate con (dall'alto al basso, da sinistra a destra, in duplicato tecnico): 100µg/mL di nanoparticelle; 0,2µg/mL di LPS; 50µg/mL di nanoparticelle; 0µg/mL di nanoparticelle; 25µg/mL di nanoparticelle; 12,5µg/mL di nanoparticelle. In figura si riporta un'osservazione rappresentativa di 5 effettuate.

3.7. Analisi dell'espressione di marker di superficie

I monociti, precedentemente incubati con le nanoparticelle, sono stati trattati con anticorpi diretti contro alcuni marker di superficie quali CD86, CD54 e MHC II.

Questi marker vengono espressi durante un'infezione e sono essenziali per il riconoscimento di un patogeno e l'attivazione della risposta immunitaria.

Quando, infatti, una cellula riconosce la presenza di un patogeno perché ne ha endocitato dei componenti o perché è stata infettata, gli antigeni ad esso associati vengono internalizzati in compartimenti cellulari dove sono degradati (questa fase prende anche il nome di processamento dell'antigene). I peptidi vengono poi caricati su proteine del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) che si differenziano in MHC I (esprese da tutte le cellule; trasportano antigeni da patogeni intracellulari) e in MHC II (esprese solo da cellule dendritiche, macrofagi e linfociti B e T; trasportano antigeni da patogeni extracellulari), ed esposti sulla superficie cellulare. L'esposizione consente il successivo riconoscimento da parte del recettore (TCR) di un linfocita T citotossico (riconosce MHC I) o effetore (riconosce MHC II). Perché avvenga l'attivazione del linfocita naïve, la semplice interazione tra TCR e MHC riconoscenti lo stesso antigene non è sufficiente, ma sono necessarie molecole co-stimolatorie. In particolare tre sono i segnali necessari: presentazione dell'antigene, interazione tra recettori co-stimolatori e secrezione di citochine. ^[90]

Il tipo di MHC esposto e di citochine secrete determinerà la tipologia di linfocita che si andrà a differenziare, mentre il riconoscimento di recettori co-stimolatori

consente di avere un segnale aggiuntivo dell'avvenuto riconoscimento dell'antigene e di stabilizzare l'interazione tra cellula APC e linfocita T.

Il recettore co-stimolatorio del linfocita T è la proteina CD28 che interagisce con i ligandi dell'APC CD80 e CD86. [90]

Quindi analizzando l'espressione di MHC II e di CD86 si vuole andare a verificare se vi sarà l'attivazione di una risposta immunitaria dopo stimolazione con le nanoparticelle di acido polilipico.

CD54, invece, appartiene alla famiglia delle ICAM-1 (molecole di adesione intracellulari) ed è espresso sulla superficie di tutte le APC. Questa proteina interagisce con le integrine dei leucociti e facilita il contatto cellula-cellula, aumentando la forza della sinapsi immunologica. Inoltre recenti studi hanno evidenziato come questa proteina potrebbe fungere da molecola co-stimolatoria (al pari di CD86) durante la presentazione di tipo MHC I. [99]

Tutti questi marker si trovano costitutivamente espressi a bassi livelli sulla superficie cellulare, ma solo dopo attivazione vengono sovraespressi. [90]

È quindi stato valutato se le nanoparticelle inducano attivazione dei monociti, confrontando l'espressione dei marcatori di superficie con quella indotta da LPS, endotossina ben conosciuta come attivatore della risposta immunitaria. [100]

Di seguito sono riportati i risultati ottenuti trattando le cellule con un'unica dose di nanoparticelle di acido polilipico (50µg/mL) in terreno contenente 10% FCS.

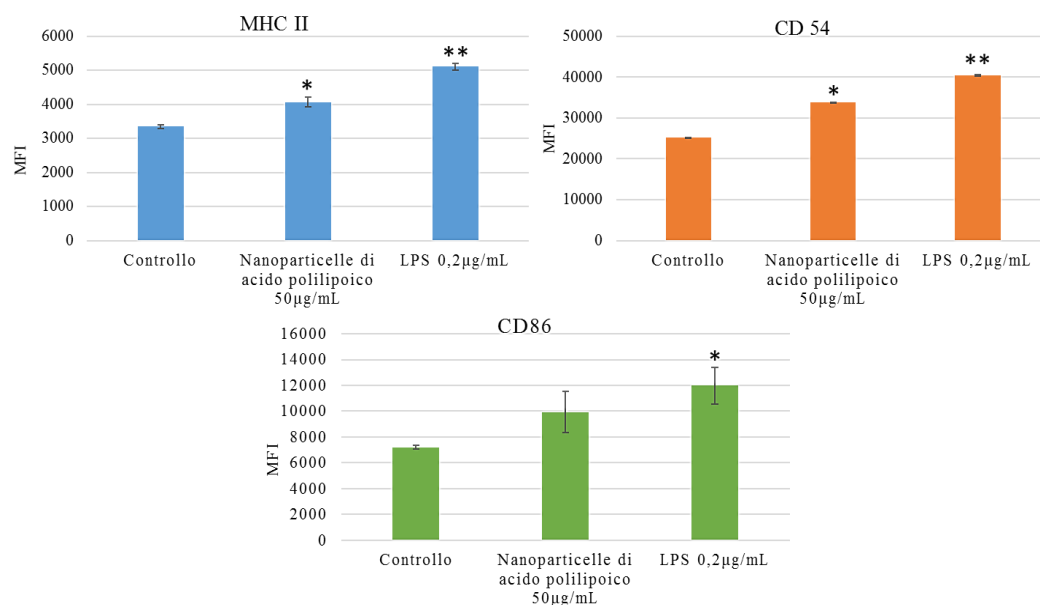


Figura 46. Istogramma delle intensità di fluorescenza relative ai diversi anticorpi primari utilizzati. Nel grafico si riporta un esperimento rappresentativo di 5 condotti in duplicato. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ rispetto al controllo.

Come si può notare, per tutti i marker i valori di fluorescenza relativi alle nanoparticelle sono inferiori a quelli indotti da trattamento con LPS. Ciò significa che le nanoparticelle di acido polilipico non inducono una risposta immunitaria paragonabile a quella indotta dall'endotossina. È comunque presente una sovraespressione, anche se non significativa, dei marcatori in esame, di cui si deve tener conto;

è probabile che tale induzione sia dovuta alla presenza di LPS nella preparazione delle nanoparticelle, come discusso nel seguente paragrafo sull'induzione dell'espressione di alcune citochine pro-infiammatorie.

3.8. ELISA per IL-1 β e IL-6

Lo scopo di questa tecnica (schematizzata in figura 47) è essenzialmente quello di identificare la quantità di una determinata proteina nel campione di interesse correlando la sua assorbanza a quella di uno standard a concentrazione nota. Per far ciò è necessaria una piastra con un'alta capacità di legame delle proteine in cui far aderire un primo anticorpo capace di riconoscere un epitopo specifico della proteina che si vuole rilevare nel saggio.

Per evitare un legame aspecifico delle proteine del campione con la piastra, è necessario occupare tutti i siti lasciati vuoti dall'anticorpo con la BSA (bovine serum albumin).

Successivamente un secondo anticorpo biotilato, diretto contro lo stesso antigene ma che riconosce un epitopo diverso della stessa proteina, viene aggiunto. ^[101]

Infine un enzima, la perossidasi di rafano, coniugato all'avidina viene aggiunto in modo tale da andare a legarsi alla biotina del secondo anticorpo.

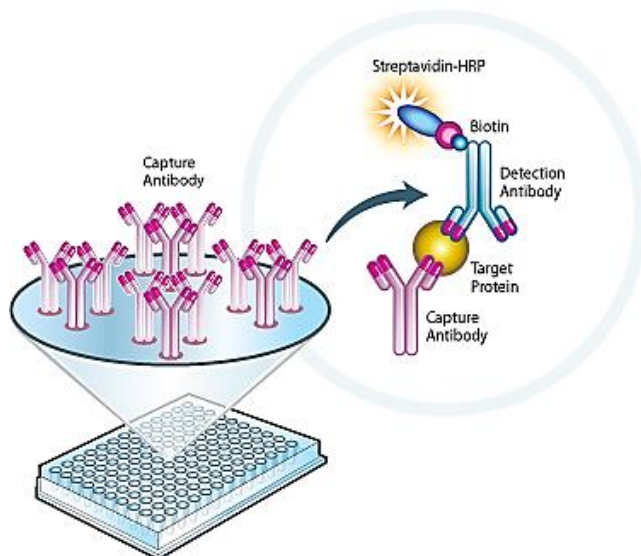


Figura 47. Rappresentazione schematica di un sandwich ELISA. ^[102]

L'attività perossidasi associata all'avidina consente la rilevazione della quantità di proteina di interesse in seguito all'aggiunta di TMB (tetrametilbenzidina). In questo caso la perossidasi ossida il TMB durante la reazione di riduzione dell'acqua ossigenata in acqua. Il TMB ossidato (rappresentato in figura 48) diventa invece un cromogeno che precipita, donando alla soluzione una colorazione blu che è rilevabile allo spettrofotometro. ^[103] Più è blu, più anticorpo si è legato al campione e quindi più quella specifica proteina è presente. Facendo una retta di taratura con lo standard a determinate concentrazioni è possibile correlare la quantità di OD alla quantità di proteina nel campione.

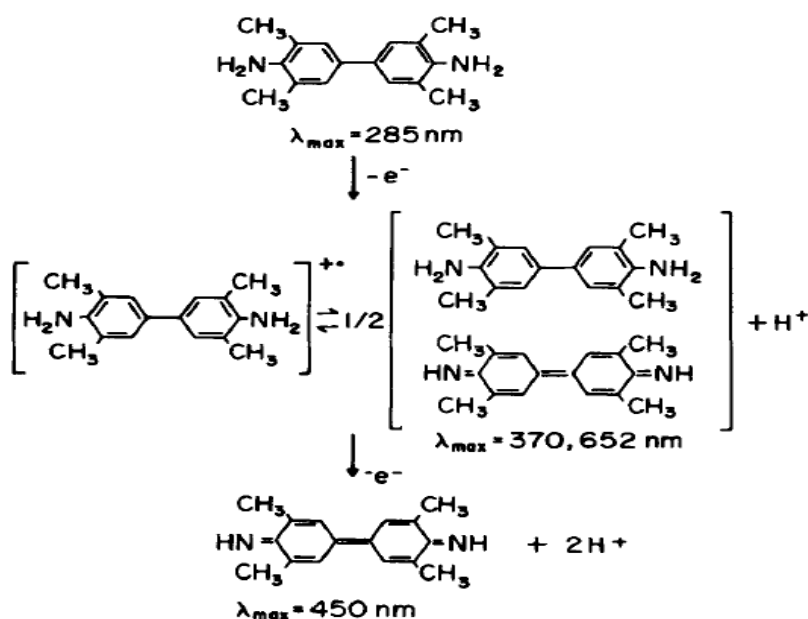


Figura 48. Reazione di ossidazione di TMB. ^[104]

Il sandwich ELISA è stato utilizzato nel mio progetto di tesi per andare ad analizzare la quantità di citochine prodotte da diversi tipi cellulari incubati con diverse concentrazioni di nanoparticelle di acido polilipoico e di LPS, utilizzato come controllo positivo data la sua capacità di indurre una risposta pro-infiammatoria.

Citochine è un nome generico per indicare piccole proteine secrete dalle cellule che hanno ruolo di interazione e comunicazione tra cellule e che possono svolgere la propria funzione in modo autocrino, paracrino o endocrino.

Lo stesso tipo di citochina può essere prodotto da diversi tipi cellulari o può andare ad interagire con diversi tipi cellulari (pleiotropia). Inoltre diverse citochine possono promuovere la stessa risposta cellulare (ridondanza) o essere in agonismo o in antagonismo tra loro. ^[105]

Le citochine esistenti sono molteplici e il loro ruolo complesso, per cui, allo scopo di analizzare la tossicità delle nanoparticelle di acido polilipoico, nel mio progetto di tesi mi sono concentrata su due principali citochine pro-infiammatorie: IL-1 β e IL-6.

IL-1 β è una citochina che viene sintetizzata da diversi tipi cellulari come precursore. Viene attivata in seguito al taglio proteolitico effettuato dalla caspasi 1 (a sua volta attivata dall'inflammosoma) e ha un effetto pro-infiammatorio pleiotropico: può infatti indurre una risposta infiammatoria sia acuta che cronica in diversi tipi cellulari che si espleta a seguito del legame al proprio recettore IL-1RI (per il quale compete con un antagonista). ^[106]

Il legame al recettore recluta MyD88 che a sua volta promuove l'attivazione di chinasi tramite fosforilazione che dà inizio ad una cascata di fosforilazioni che ha come fine l'attivazione di attivatori della trascrizione che migrano al nucleo promuovendo la trascrizione di geni necessari alla risposta infiammatoria, come descritto in figura 49. ^[107, 108]

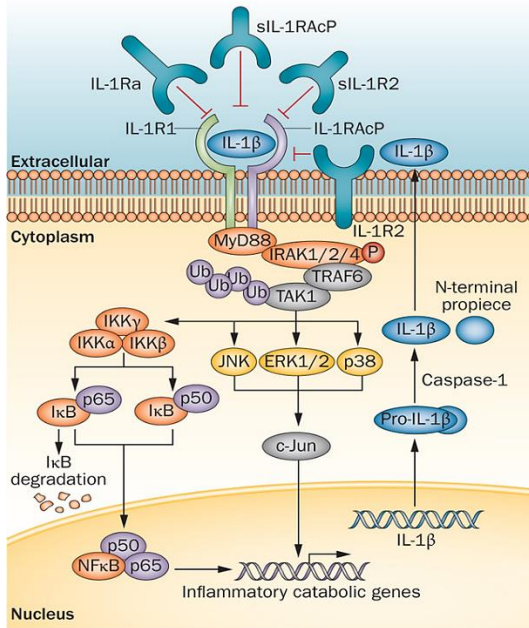


Figura 49. Attivazione e ruolo di IL-1 β . [109]

IL-6 è una citochina pro-infiammatoria prodotta da diversi tipi cellulari in risposta ad uno stimolo microbico tramite TLR o grazie a stimolazione da parte di altre citochine. In entrambi i casi si attiva un fattore di trascrizione grazie a cui si ha la sintesi della citochina in forma già solubile. [110]

Una volta secreta, la citochina si lega a specifico recettore sito sulla superficie di una cellula target. Il recettore lega due modulatori (gp130) a cui sono associate due proteine Jak che entrando in prossimità si autofosforilano attivandosi e dando inizio alla cascata Jak/Stat, che promuove la trascrizione di geni necessari alla risposta infiammatoria, come descritto in figura 50. [111, 112, 113]

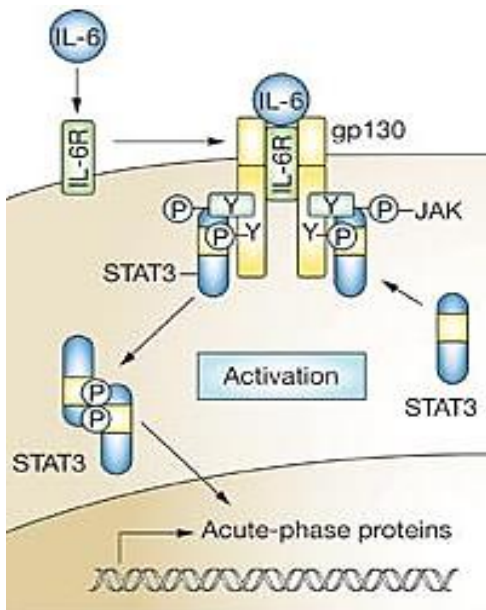


Figura 50. Ruolo di IL-6. [114]

Di seguito si riportano i risultati ottenuti.

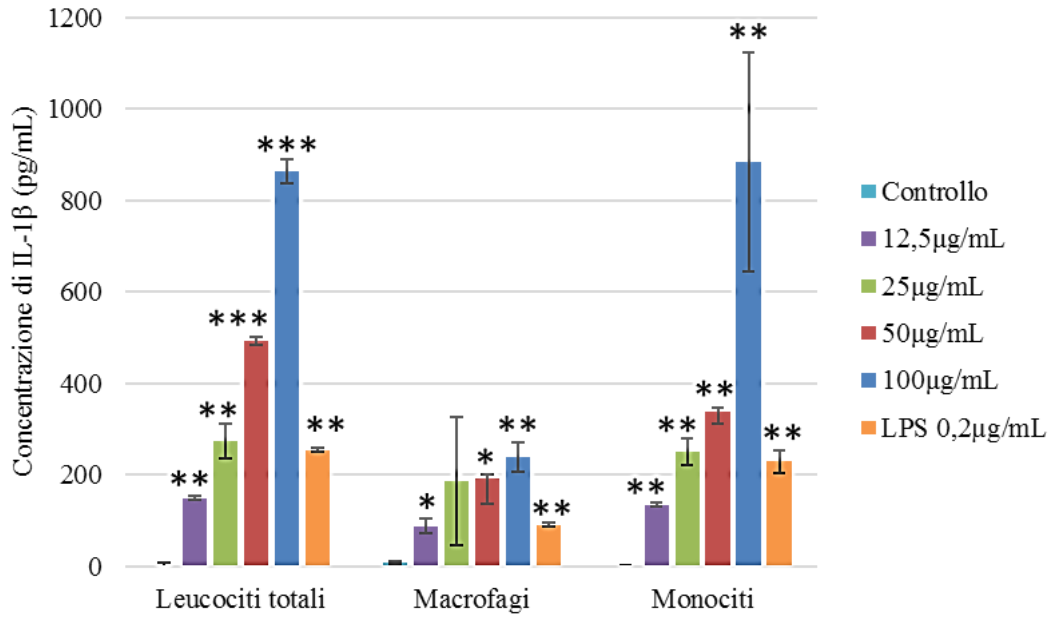


Figura 51. Istogramma relativo alla concentrazione di IL-1 β nei diversi tipi cellulari trattati con 4 dosi di nanoparticelle, in confronto con LPS, in 10% FCS. Nel grafico si riporta un esperimento rappresentativo di 3 condotti in duplicato. * p<0,05; **p<0,01; *** p<0,001 rispetto al controllo.

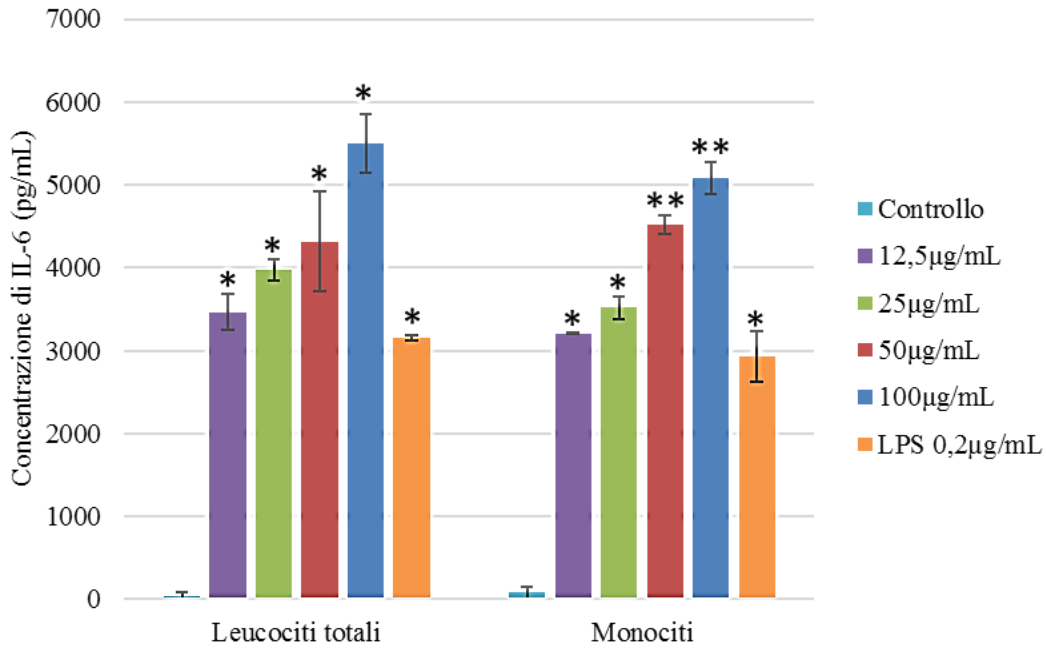


Figura 52. Istogramma relativo alla concentrazione di IL-6 in diversi tipi cellulari trattati con 4 dosi di nanoparticelle, in confronto con LPS, in 10% FCS. Nel grafico si riporta un esperimento rappresentativo di 3 condotti in duplicato. * p<0,01; **p<0,001 rispetto al controllo.

Monociti

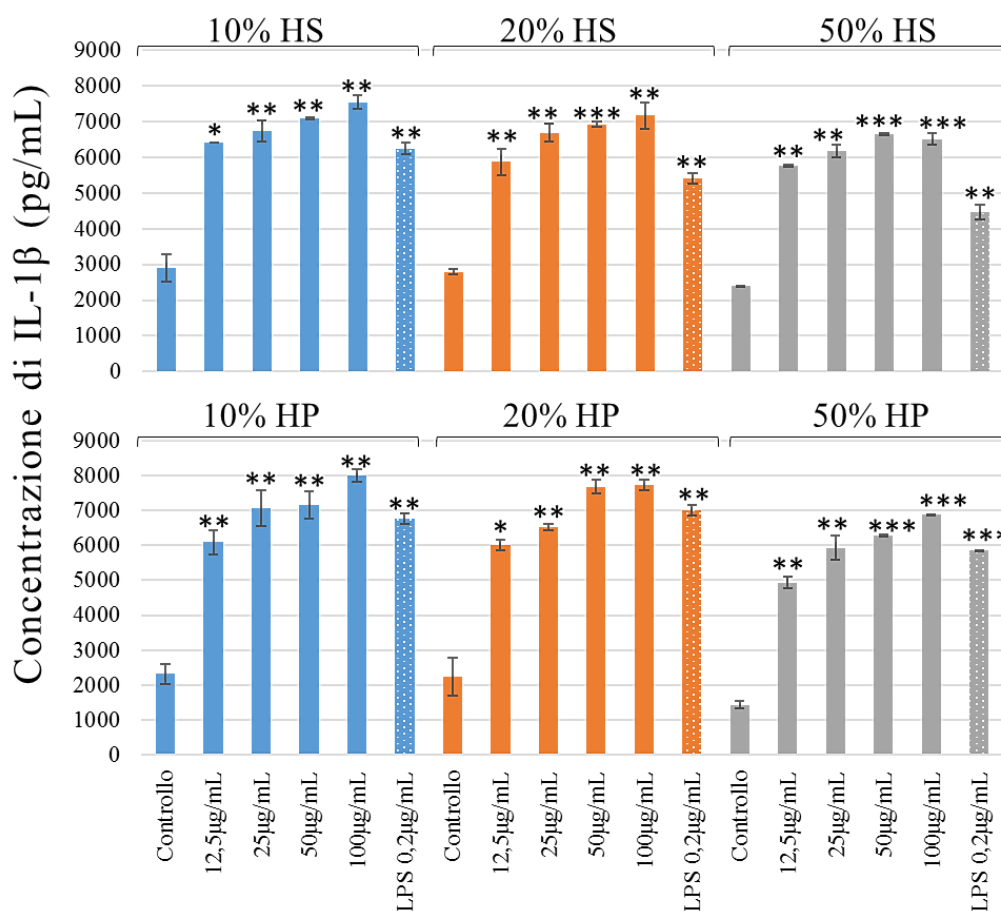


Figura 53. Istogrammi relativi alla concentrazione di IL-1 β in monociti trattati con 4 dosi di nanoparticelle, in confronto con LPS, in terreno a diverse concentrazioni di plasma o siero. * p<0,05; **p<0,01; *** p<0,001 rispetto al controllo.

Nelle figure 51 e 52 si osserva che le nanoparticelle di acido polilipoico inducono una risposta infiammatoria in diversi tipi cellulari e con un effetto maggiore rispetto alla dose di endotossina confrontata.

È interessante notare come vi sia un'alta produzione di IL-1 β nei campioni trattati con dosi maggiori di nanoparticelle. Questa citochina infatti ha la particolarità che, essendo prodotta come proteina inattiva, necessita di due segnali per l'attivazione: uno, dato dal riconoscimento di un patogeno attraverso TLR (Toll-like receptor) o da stimoli endogeni come TNF- α e la stessa IL-1 β , che induce la produzione NF- κ B dipendente della citochina in forma di pro-proteina; e l'altro, generato da un danno cellulare (con rilascio di ATP e acido urico) o da tossine batteriche, che induce l'attivazione dell'inflammosoma NLRP3 con attivazione della caspasi-1 che taglia la pro-IL-1 β nella forma attiva. ^[115, 116]

Quindi, per esserci una così grande produzione di IL-1 β nei campioni trattati con le nanoparticelle significa che queste devono necessariamente dare sia uno stimolo da PAMP (e quindi potrebbero essere in parte contaminate) che uno stimolo tossico.

Dal momento che non era disponibile un metodo di misurazione diretta della quantità di LPS, il livello di contaminazione può essere qualitativamente apprezzato in figura 53. Infatti aumentando la dose di siero ci si aspetta un aumento della quantità di lipoproteine disciolte nel terreno di crescita e quindi un effetto detossificante dello stesso con una diminuzione delle citochine prodotte.^[117] Confrontando i valori di citochina indotta da LPS a diverse concentrazioni di siero o plasma si può notare l'effetto appena descritto che è maggiormente apprezzabile in siero umano. Confrontando, invece, i valori di citochina indotta dalle nanoparticelle (come rappresentato in figura 54) a concentrazioni crescenti di siero umano non si nota tale effetto. Quindi si ipotizza una possibile contaminazione da LPS e un chiaro effetto tossico e pro-infiammatorio delle nanoparticelle di acido polilipico.

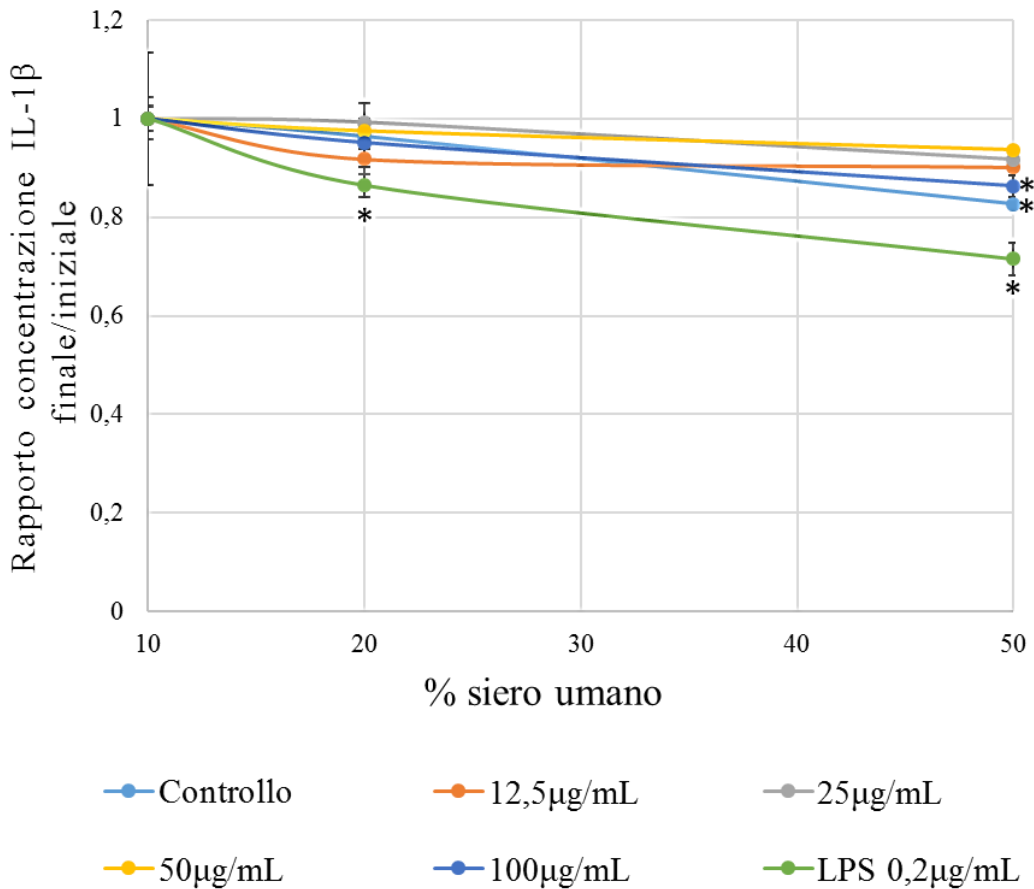


Figura 54. Andamento dei rapporti di quantità di IL-1 β registrati a diversa concentrazione di siero.
* p<0,05 rispetto al controllo.

4. Analisi dell'attività antiossidante in un sistema cellulare

4.1. Saggio con fluoresceina

Il saggio con la fluoresceina si basa sull'utilizzo di una sonda, un derivato carbossilato della fluoresceina (o carbossi-H₂DCFDA; rappresentato in figura 55), che non è fluorescente ma che può essere deacetilato dalle esterasi citosoliche e convertito nel relativo composto fluorescente dall'ossidazione promossa da specie reattive dell'ossigeno presenti nella cellula. ^[118]

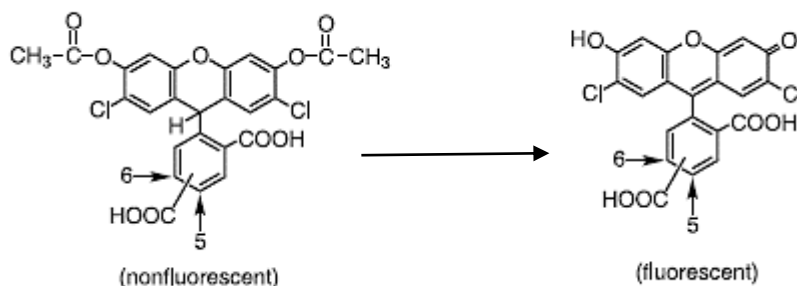


Figura 55. Conversione della sonda non fluorescente nel relativo fluorescente. ^[118]

Lo scopo del saggio è quindi quello di misurare qualitativamente la quantità di specie reattive dell'ossigeno presenti nelle cellule. Per far ciò, è necessario stimolare uno stress ossidativo introducendo un forte ossidante come il t-BHP (tert-butil idrossiperoxido). Alcuni studi ^[119, 120] hanno dimostrato che tale molecola è in grado di indurre un forte stress ossidativo portando alla produzione di ROS che provocano perossidazione lipidica, deplezione del glutathione e danno al DNA.

Una produzione massiva di ROS provocherà anche un'ossidazione della sonda che quindi potrà essere rilevabile eccitando a 498nm. ^[118]

Qualora fosse introdotto nel sistema un antiossidante, si potrebbe verificare la sua azione andando a misurare un calo nell'intensità di fluorescenza. ^[121]

Poiché dai dati ottenuti in citofluorimetria a flusso (vedi figura 27) è risultato evidente che l'endocitosi delle nanoparticelle di acido polilipico è un processo lento, per poter registrare un'attività antiossidante legata alle nanoparticelle si è preferito preincubare le cellule con le nanoparticelle per 24 ore e successivamente aggiungere il t-BHP e la sonda.

Di seguito si riporta il risultato ottenuto.

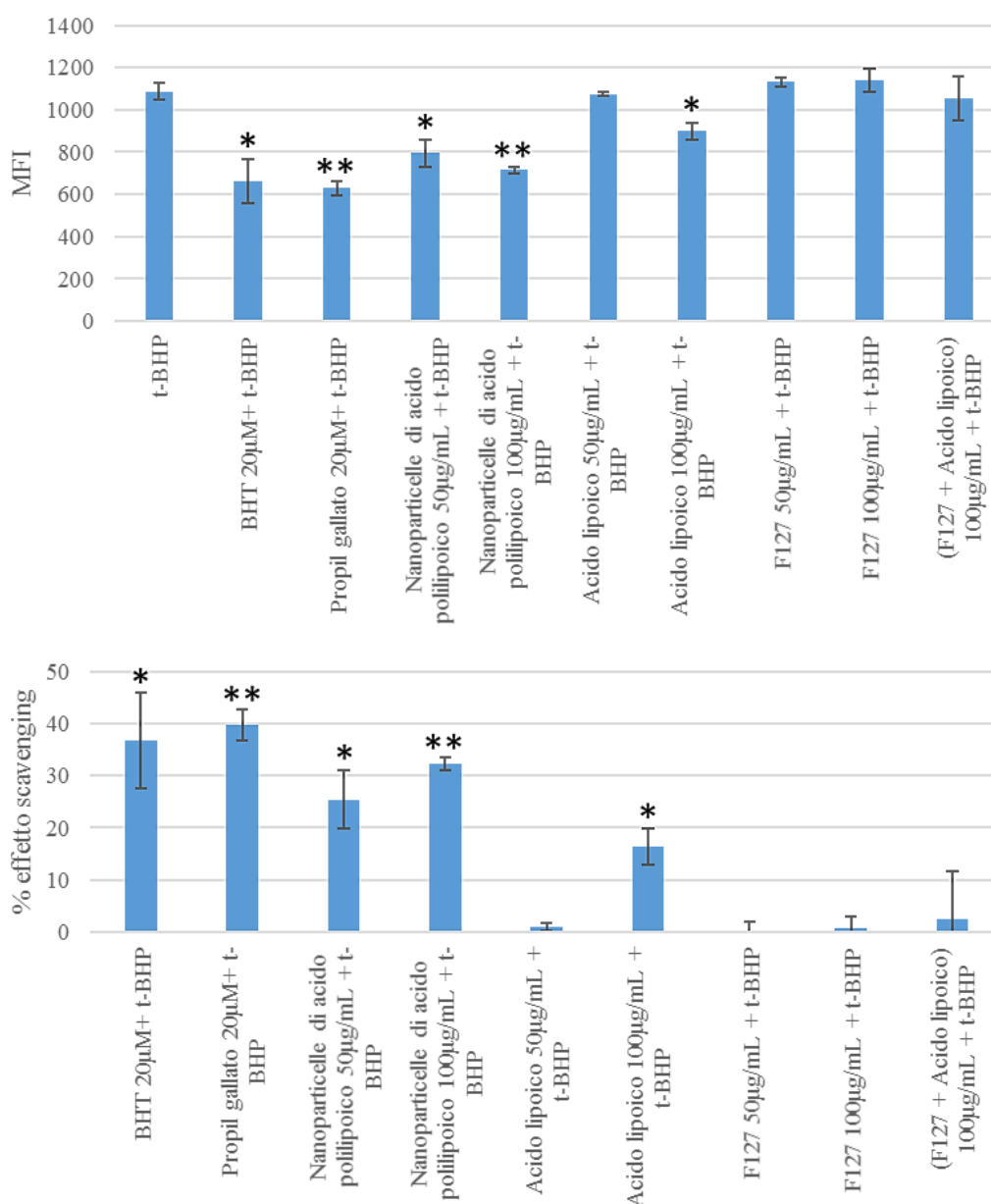


Figura 56. Valori di fluorescenza relativi alla quantità di ROS prodotti dai macrofagi dopo trattamento con diversi antiossidanti e percentuale di effetto scavenging. In figura si riporta un esperimento rappresentativo di 3 condotti in duplicato. *p<0,05; ** p<0,01 rispetto al non trattato.

Dal grafico si nota chiaramente che il surfactante e l'acido lipoico a dose inferiore hanno poco o nessun effetto, mentre le nanoparticelle di acido polilipoico, contrariamente a quanto ottenuto con i saggi cell-free, hanno un effetto che è comparabile ai più potenti antiossidanti (BHT e propil gallato) e maggiore del solo acido lipoico, attestando un'attività di scavenging del 25-30%, calcolata con la stessa formula utilizzata per i precedenti saggi.

I risultati ottenuti sono quindi in accordo con quanto osservato nei saggi cell-free, per cui si dimostra la capacità delle nanoparticelle di amplificare le proprietà antiossidanti dell'acido lipoico.

4.2. Saggio con citocromo c

Il saggio si basa sull'utilizzo del citocromo c acetilato per rilevare la presenza del radicale superossido (O_2^-) come descritto da O'Neill *et al.* [122]. Questo tipo di radicale viene prodotto dai neutrofili durante un burst respiratorio che prevede un rapido rilascio di specie reattive dell'ossigeno prodotte dall'attività della NADPH ossidasi a seguito della fagocitosi di un microbo e che ha quindi un ruolo antimicrobico di difesa nell'immunità innata. [123]

Il citocromo c (rappresentato in figura 57) è una piccola proteina contenente un gruppo eme che svolge un ruolo fondamentale nella respirazione mitocondriale nel trasporto di elettroni. Solitamente si trova nello stato ossidato ma in presenza di un ossidante (nel caso specifico del saggio, in presenza di ROS) può essere ridotto da Fe^{3+} a Fe^{2+} portando ad un aumento dell'assorbanza a 550nm. [124]

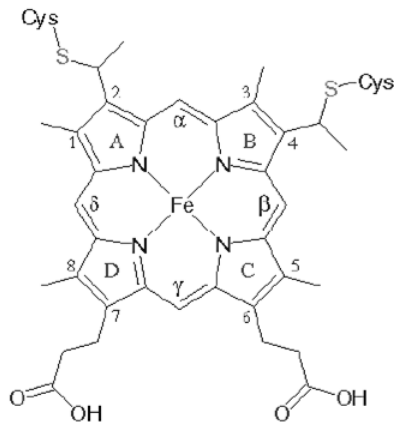


Figura 57. Struttura molecolare del citocromo c. [125]

Per indurre il burst viene utilizzata la PMA (forbolo 12-miristato 13-acetato) che è un forte stimolatore in grado di attivare la NADPH ossidasi portando alla produzione di ROS in maniera simile a quanto avviene durante lo svolgimento dell'azione antimicrobica dei neutrofili. [126]

Similmente a quanto ottenuto nei precedenti saggi, ci si aspetta che trattando le cellule con la PMA e con l'antiossidante si abbia un calo dell'assorbanza proporzionale all'attività antiossidante dei composti testati.

L'attività antiossidante viene in questo caso calcolata secondo la formula elaborata dal laboratorio presso cui ho svolto l'internato di tesi e riportata di seguito:

$$\text{Concentrazione } O_2^- = \frac{\text{Assorbanza} \cdot 1000}{\epsilon \cdot b} \cdot 1,7$$

In cui l'assorbanza si riferisce al valore del campione a cui è stato sottratto l'assorbimento di background del citocromo c; 1,7 è un fattore di correzione; 1000 consente di esprimere la concentrazione in nmol/mL; ϵ è il coefficiente di estinzione molare ed è pari a 24,5mM; b è il cammino ottico e per la piastra utilizzata è pari a 0,71cm.

Di seguito si riporta il risultato ottenuto.

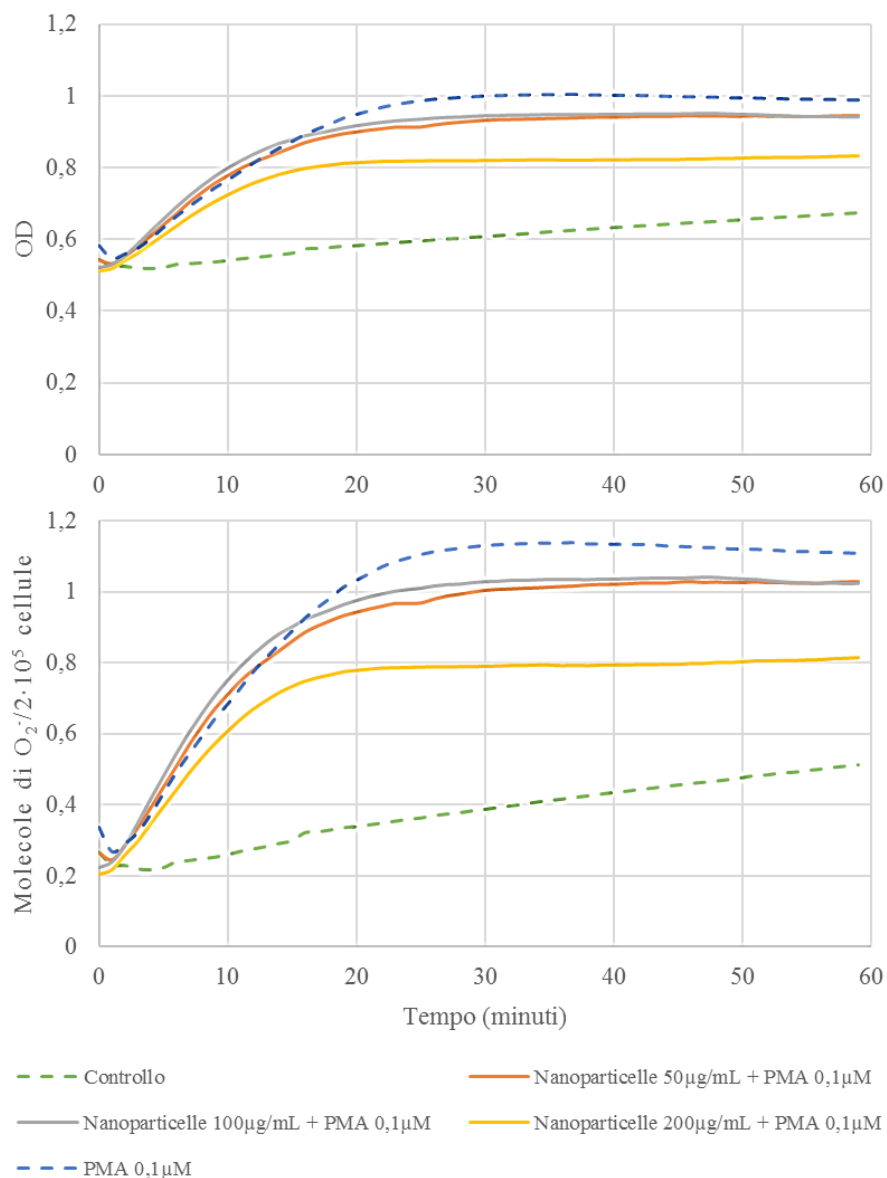


Figura 58. Burst ossidativo dei neutrofilo registrato a diverse concentrazioni di nanoparticelle. In figura si riporta un esperimento rappresentativo di 5 condotti in triplicato.

Come si nota dalla figura 58, le nanoparticelle di acido polilipoico sono in grado di neutralizzare i radicali superossido prodotti dai neutrofilo. Tuttavia l'azione è debole e non è dose-dipendente ma comunque conferma quanto osservato negli esperimenti precedenti: alle nanoparticelle testate può essere associata un'attività antiossidante.

5. Studi di biodistribuzione delle nanoparticelle in vivo

5.1. Rilevazione della fluorescenza associata alle nanoparticelle negli organi prelevati

L'analisi della fluorescenza degli organi di ratti trattati e non trattati con le nanoparticelle di acido polilipico tramite iniezione intravenosa (I.V.) consente di ottenere, in prima analisi, una stima qualitativa della distribuzione delle nanoparticelle nei principali organi implicati nella clearance e nel sistema reticolo endoteliale.

Questa analisi è stata realizzata in collaborazione con la Dott.ssa Chiara Castellani del Dipartimento Scienze Cardiologiche, Toraciche e Vascolari (Università degli Studi di Padova).

Di seguito si riportano i risultati ottenuti dopo fissaggio del campione in formalina.

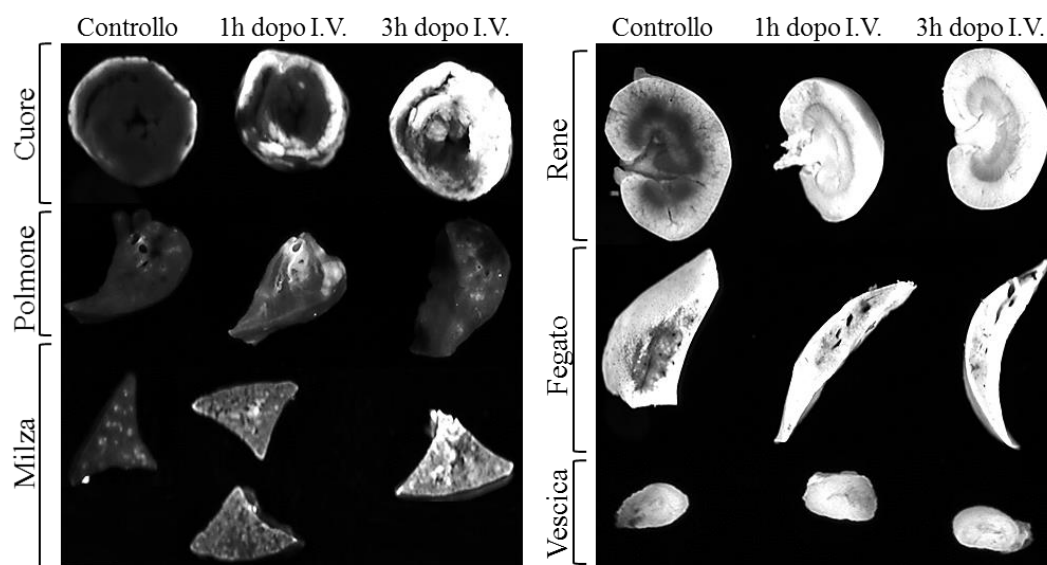


Figura 59. Immagini di fluorescenza di diversi organi prelevati da ratti sottoposti ad iniezione delle nanoparticelle e sacrificati dopo 1 o 3 ore.

Dalla figura 59 si nota chiaramente che tutti gli organi analizzati sono interessati dalla captazione delle nanoparticelle di acido polilipico. In particolare gli organi in cui sembra si sia concentrata una maggior quantità di nanoparticelle sono il fegato e la vescica (in cui però l'autofluorescenza è significativa), il cuore e il rene. L'accumulo nel fegato, nella vescica e nel rene è legato ai sistemi di clearance dell'organismo per cui la presenza di un endotelio fenestrato (rene) o discontinuo (fegato) consente all'organismo di filtrare tutto ciò che è presente nel sangue e di eliminarlo.^[127] Di conseguenza, visto che sembra esserci un forte accumulo in questi organi già dopo 1 ora, è presumibile che l'emivita delle nanoparticelle sarà bassa. Interessante è invece notare l'accumulo a livello del cuore: in questo caso il sistema vascolare non è fenestrato per cui la filtrazione delle nanoparticelle di acido polilipico è più difficile; la fenestrazione può però avvenire in caso di un danno come un infarto, aumentando così la ritenzione di nanoparticelle a livello del cuore.^[128] Dunque, questa naturale localizzazione delle nanoparticelle potrebbe essere utile

per lo scopo per cui nasce questo progetto. Potrebbe essere quindi interessante confrontare il cuore di un ratto trattato e sano con quello di un ratto trattato e in cui è stato indotto un infarto per verificare un eventuale aumento della concentrazione di nanoparticelle.

5.2. Analisi confocale degli organi prelevati

Attraverso un'analisi di microscopia confocale sono stati analizzati i tessuti provenienti dagli stessi organi analizzati precedentemente. Questo tipo di analisi consente di visualizzare porzioni sottili di tessuto per comprendere come avviene la biodistribuzione osservata nell'esperimento precedente a livello cellulare. Anche quest'analisi è stata realizzata in collaborazione con la Dott.ssa Chiara Castellani del Dipartimento Scienze Cardiologiche, Toraciche e Vascolari (Università degli Studi di Padova).

Nella pagina successiva si riporta il risultato ottenuto.

Le immagini confermano quanto osservato in precedenza a livello di intero organo: le nanoparticelle sono ritenute in maggior quantità da fegato, cuore e rene. Si nota inoltre una localizzazione a livello alveolare e splenico che dalla figura 59 non era emersa. La ritenzione in questi due organi avviene grazie alla presenza di macrofagi che svolgono un importante ruolo nell'omeostasi dei tessuti e nella clearance di microrganismi e virus. ^[129, 130]

Nel polmone l'accumulo di nanoparticelle non è significativo poiché potrebbero essersi già attivati i meccanismi di clearance. Nella milza invece si può osservare come le nanoparticelle vadano a localizzarsi sia all'interno che all'esterno del vaso e nelle cellule endoteliali della polpa. Questo perché la milza svolge due importanti ruoli fisiologici: la filtrazione del sangue da materiale estraneo o da eritrociti danneggiati (polpa rossa) e l'attività come organo linfoide secondario importante nella risposta immunitaria (polpa bianca). Di conseguenza il microcircolo consente l'extravasazione di materiale e la captazione dello stesso dalle cellule circostanti. ^[129]

Risulta nuovamente rilevante notare come vi sia localizzazione delle nanoparticelle a livello del miocardio. Esse si rintracciano lungo tutta la porzione di tessuto analizzato, e, come evidenziato poco fa, questo fenomeno potrebbe rivelarsi utile allo scopo del progetto.

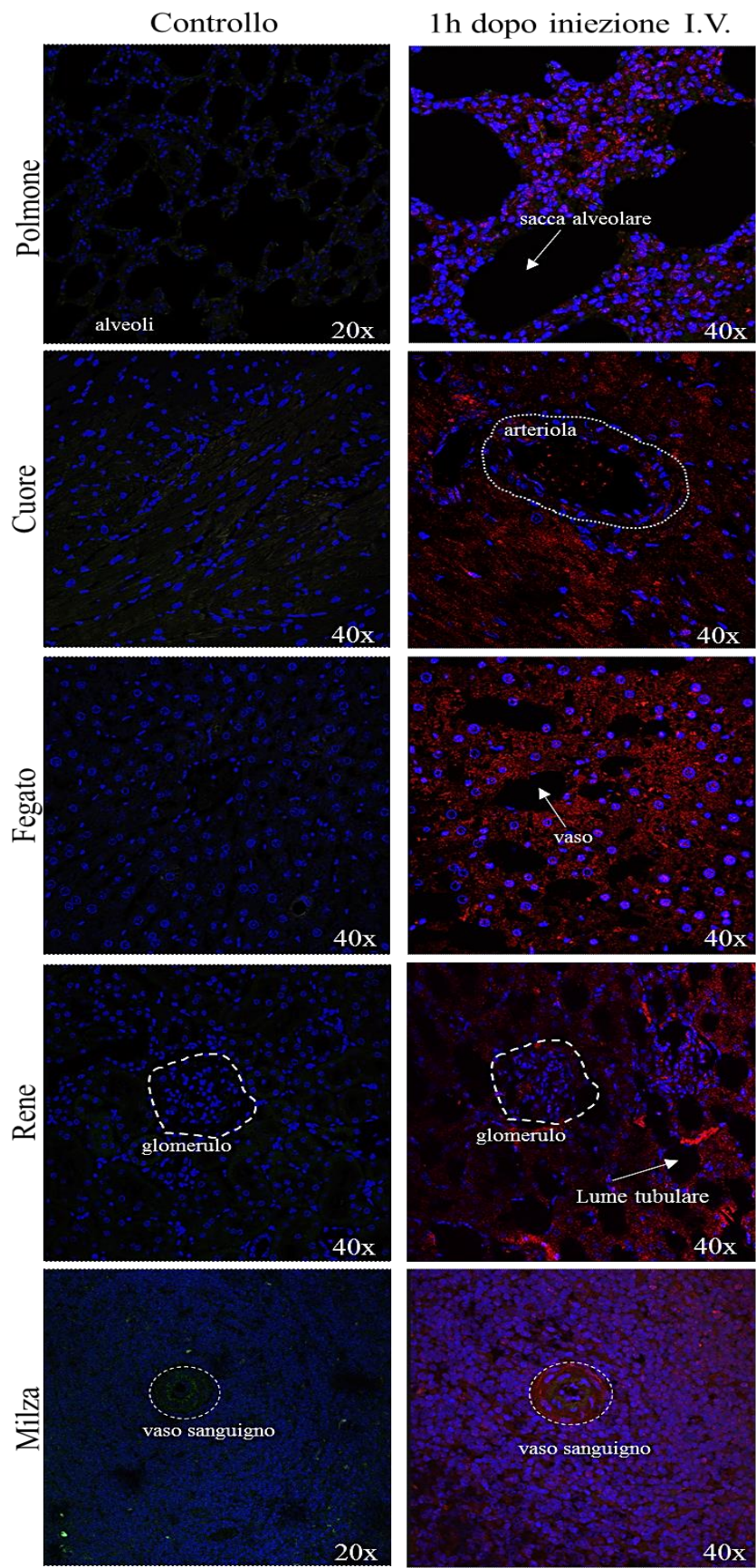


Figura 60. Immagini di microscopia confocale ottenute da sezioni degli organi rappresentati. In blu sono evidenziati i nuclei, in rosso le nanoparticelle di acido polilipico.

CONCLUSIONE

In base ai risultati ottenuti dagli esperimenti appena descritti, si può concludere che le nanoparticelle di acido polilipico sono un materiale inerte che non è in grado di attivare una cascata coagulativa o un'azione emolitica; si è inoltre dimostrato non essere tossico. Tuttavia gli esperimenti di clonogenicità, i saggi ELISA e gli esperimenti di analisi di espressione dei marcatori hanno dimostrato che esso è in grado di diminuire la proliferazione cellulare e di indurre una risposta pro-infiammatoria. I tre elementi potrebbero essere correlabili: le nanoparticelle potrebbero infatti scatenare una risposta infiammatoria dovuta al loro accumulo nei lisosomi e all'incapacità della cellula di eliminarli oppure a causa di una deplezione del glutathione intracellulare. Quel che si produce è quindi uno stress ossidativo che potrebbe indurre la cellula in apoptosi o in necrosi a seconda del meccanismo attivato.

Inoltre, quel che emerge dall'analisi globale è che le nanoparticelle sono rapidamente e massivamente endocitate dai fagociti professionali. Questo elemento assieme alle analisi effettuate in vitro potrebbe indicare che l'emivita del materiale sarà bassa, e quindi potrebbe essere necessario rivestire le nanoparticelle con un apposito coating per prevenire la fagocitosi. Questa previsione trova conferma con le analisi di biodistribuzione in vivo in cui si nota chiaramente come le nanoparticelle vengano velocemente distribuite agli organi deputati alla clearance; tuttavia è anche interessante notare come esse si localizzino a livello del cuore. Avendo dimostrato la loro attività antiossidante, la loro localizzazione consente di ipotizzare un ruolo efficace del materiale nella cura del danno da ri-perfusione.

Alla luce di queste analisi, confido che ulteriori esperimenti volti a chiarire la tossicità cellulare e a simulare un danno da infarto in vivo potranno eleggere le nanoparticelle di acido polilipico a potenziale farmaco.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Williams D.F., *Biomaterials*, **2008**, 29, 2941-2953.
- [2] Williams D.F., *Biomaterials*, **2009**, 30, 5897-5909.
- [3] ISO 10993-1, *Biological evaluation of medical devices Part 1: Evaluation and testing in the risk management process*, **2009**.
- [4] Anderson J.M., Rodriguez A., Chang D.T., *Seminars in Immunology*, **2008**, 20, 86-100.
- [5] Roach P., Farrar D., Perry C., *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 8168-8173.
- [6] Rauscher H., *Nanotoxicology*, **2012**, 7, 1195-1197.
- [7] Ai J., Biazar E., Jafarpour M., Montazeri M., Majdi A., Aminifard S., Zafari M., Akbari H.R., Rad H.G., *International Journal of Nanomedicine*, **2011**, 6, 1117-1127.
- [8] Arora S., Rajwade J.M., Paknikar K.M., *Toxicology and Applied Pharmacology*, **2012**, 258, 151-165.
- [9] Peynshaert K., Manshian B.B., Joris F., Braeckmans K., Smedt S.C., Demeester J., Soenen S.J., *Chem.Rev.*, **2014**, 114, 7581-7609.
- [10] Oberdörster G., *J. Intern. Med.*, **2010**, 267, 89-105.
- [11] Zhang Y., Bai Y., Jia J., Gao N., Li Y., Zhang R., Jiang G., Yan B., *Chem. Soc. Rev.*, **2014**, 43, 3762-3809.
- [12] Stern S.T., Adiseshaiah P.P., Crist R.M., *Particle and Fiber Toxicology*, **2012**, 9, 20.
- [13] Li X., Wang L., Fan Y., Feng Q., Cui F., *Journal of Nanomaterials*, **2012**, 10.
- [14] Lazarovits J., Chen Y.Y., Sykes E.A., Chan W.C.W., *Chem. Commun.*, **2015**, 51, 2756-2767.
- [15] Cohignac V., Landry M.J., Boczkowski J., Lanone S., *Nanomaterials*, **2014**, 4, 548-582.
- [16] De Duve C., *Sci. Am.*, **1963**, 208, 64-72.
- [17] Abuchowski A., McCoy J.R., Palczuk N.C., van Es T., Davis F.F., *J Biol Chem*, **1977**, 252, 3582-3586.
- [18] Amoozgar Z., Yeo Y., *WIREs Nanomed. Nanobiotechnol.*, **2012**, 4, 219-233.
- [19] Du H., Chandaroy P., Hui S.W., *Biochim Biophys Acta (BBA)-Biomembr*, **1997**, 1326, 236-248.
- [20] Ishida T., Ichihara M., Wang X., Yamamoto K., Kimura J., Majima E., Kiwada H., *J Control Release*, **2006**, 112, 15-25.
- [21] Takhar P., Mahant S., *Arch. Appl. Sci. Res.*, **2011**, 3, 389-403.
- [22] Hirsch C., Roesslein M., Krug H.F., Wick P., *Nanomedicine*, **2011**, 6, 837-847.
- [23] Snell E.E., Strong F.M., Peterson W.H., *Biochem. J.*, **1937**, 31, 1789-1799.
- [24] Reed L.J., *Adv. Enzymol.*, **1957**, 18, 319-347.
- [25] Carreau J.P., *Methods Enzymol.*, **1979**, 62, 152-158.
- [26] Packer L., *Drug Metabolism Reviews*, **1998**, 30, 245-275.
- [27] Reed L.J., *Acc. Chem. Res.*, **1974**, 7, 40-46.
- [28] Berg J., Tymoczko J.L., Stryer L., *Biochimica*, **VI Ed.**, Zanichelli, cap. 17.
- [29] Booker S.J., *Chemistry & Biology*, **2004**, 11, 10-12.
- [30] Cronan J.E., *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **2016**, 80, 429-450.
- [31] Biewenga G.P., G. Haenen, Bast A., *Gen. Pharmac.*, **1997**, 29, 315-331.

- [32] Packer L., Witt E.H., Tritschler H.J., *Free Radical Biology & Medicine*, **1995**, 19, 227-250.
- [33] Packer L., Tritschler H.J., Wessel K., *Free Radical Biology & Medicine*, **1997**, 22, 359-378.
- [34] Palmieri B., Sblendorio V., *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, **2007**, 11, 309-342.
- [35] Lobo V., Patil A., Phatak A., Chandra N., *Pharmacogn. Rev.*, **2010**, 4, 118-126.
- [36] Berchmans S., Thomas J., Rao C.N.R., *J. Phys. Chem. B.*, **2002**, 106, 4647-4651.
- [37] Kofuji K., Isobe T., Murata Y., *Food Chemistry*, **2009**, 115, 483-487.
- [38] Leu J., Chen S., Chen H., Wu W., Hung C., Yao Y., Tu C., Liang Y., *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, **2012**, 8, 767-775.
- [39] Ramachandran L., Nair C., *Nanomater. Nanotechnol.*, **2011**, 1, 17-24.
- [40] Narayanan K.B., Park H.H., *Advances in Colloid and Interface Science*, **2013**, 201, 30-42.
- [41] Tannorella M., *Sintesi di nanoparticelle di polidisolfuri come potenziali vettori per il rilascio controllato di farmaci*, **2014-2015**, Tesi Magistrale in Biotecnologie Industriali.
- [42] Lee B.S., Yuan X., Xu Q., McLafferty F., Petersen B.A., Collette J.C., Black K.L., Yu J.S., *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2009**, 19, 1678-1681.
- [43] Bang E., Gasparini G., Molinard G., Roux A., Sakai N., Matile S., *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, 135, 2088-2091.
- [44] Gasparini G., Bang E., Molinard G., Tulumello D.V., Ward S., Kelley S.O., Roux A., Sakai N., Matile S., *J. Am. Chem. Soc.*, **2014**, 136, 6069-6074.
- [45] Zorko M., Langel Ü., *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2005**, 57, 529-545.
- [46] Chuard N., Gasparini G., Roux A., Sakai N., Matile S., *Org. Biomol. Chem.*, **2015**, 13, 64-67.
- [47] Zweier J.L., Talukder H., *Cardiovascular Research*, **2006**, 70, 181-190.
- [48] Eltzschig H.K., Collard C.D., *British Medical Bulletin*, **2004**, 70, 71-86.
- [49] Kalogeris T., Baines C.P., Krenz M., Korthuis R.J., *Int. Rev. Cell. Mol. Biol.*, **2012**, 298, 229-317.
- [50] Blois M. S., *Nature*, **1958**, 181, 1199-1200.
- [51] Molyneux P., *Songklanakarín J. Sci. Technol.*, **2004**, 26, 211-219.
- [52] Bondet V., Brand-Williams W., Berset C., *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, **1997**, 30, 609-615.
- [53] Brand-Williams W., Cuvelier M. E., Berset C., *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, **1995**, 28, 25-30.
- [54] Bortolomeazzi R., Sebastianuto N., Toniolo R., Pizzariello A., *Food Chemistry*, **2007**, 100, 1481-1489.
- [55] Mishra K., Ojha H., Chaudhury N. K., *Food Chemistry*, **2012**, 130, 1036-1043.
- [56] Villaña D., Fernández-Pachón M. S., Moyá M. L., Troncoso A. M., Garcia-Parilla M. C., *Talanta*, **2007**, 7, 230-235.
- [57] Cheng Z., Moore J., Yu L., *J. Agric. Food Chem.*, **2006**, 54, 7429-7436.
- [58] Bhuiyan M. A. R., Hoque M. Z., Hossain S. J., *World Journal of Agricultural Sciences*, **2009**, 5, 318-322.
- [59] Sharma O. P., Bhat T. K., *Food Chemistry*, **2009**, 113, 1202-1205.
- [60] Chen Z., Bertin R., Frolidi G., *Food Chemistry*, **2013**, 138, 414-420.

- [61] Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C., *Free Radical Biology & Medicine*, **1999**, 26, 1231-1237.
- [62] Branchi B., Galli C., Gentili P., *Org. Biomol. Chem.*, **2005**, 3, 2604-2614.
- [63] Cano A., Acosta M., Arnao M. B., *Redox Report*, **2000**, 5, 365-370.
- [64] Thaipong K., Boonprakob U., Crosby K., Zevallos L., Byrne D. H., *Journal of Food Composition and Analysis*, **2006**, 19, 669-675.
- [65] Adedapo A. A., Jimoh F. O., Koduru S., Afolayan A. J., Masika P. J., *BMC Complementary and Alternative Medicine*, **2008**, 8, 53-58.
- [66] Vermes I., Haanen C., Reutelingsperger C., *Journal of Immunological Methods*, **2000**, 243, 167-190.
- [67] BD Biosciences, *Introduction to Flow Cytometry: A Learning Guide*, **2000**, Manual Part Number: 11-11032-01.
- [68] Webb R.H., *Rep. Prog. Phys.*, **1996**, 59, 427-471.
- [69] Cooper G. M., Hausman R. E., *La cellula. Un approccio molecolare*, **III Ed.**, Piccin, pag. 27.
- [70] Gentry P. A., *The Veterinary Journal*, **2004**, 168, 238-251.
- [71] Vogler E. A., Siedlecki C. A., *Biomaterials*, **2009**, 30, 1857-1869.
- [72] Sperling C., Fischer M., Maitz M. F., Werner C., *Biomaterials*, **2009**, 30, 4447-4456.
- [73] Zhuo R., Siedlecki C. A., Vogler E. A., *Biomaterials*, **2006**, 27, 4325-4332.
- [74] Ilinskaya A. N., Dobrovolskaia M. A., *Nanomedicine (Lond.)*, **2013**, 8, 969-981.
- [75] Tavano R., Segat D., Reddi E., Kos J., Rojnik M., Kocbek P., Iratni S., Scheglmann D., Colucci M., Echevarria I. M., Selvestrel F., Mancin F., Papini E., *Nanomedicine (Lond)*, **2010**, 5, 881-896.
- [76] Chen L. Q., Fang L., Ling J., Ding C. Z., Kang B., Huang C. Z., *Chem. Res. Toxicol.*, **2015**, 28, 501-509.
- [77] Mocan T., *Biotechnology, Molecular Biology and Nanomedicine*, **2013**, 1, 1-7.
- [78] Lin Y., Haynes C. L., *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, 132, 4834-4842.
- [79] Tenzer S., Docter D., Kuharev J., Musyanovych A., Fetz V., Hecht R., Schlenk F., Fischer D., Kiouptsi K., Reinhardt C., Landfester K., Schild H., Maskos M., Knauer K., Stauber R. H., *Nature Nanotechnology*, **2013**, 8, 772-781.
- [80] Monopoli M. P., Walczyk D., Campbell A., Elia G., Lynch I., Bombelli F. B., Dawson K. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, 133, 2525-2534.
- [81] Jung S., Lim S., Albertorio F., Kim G., Gurau M. C., Yang R. D., Holden M. A., Cremer P. S., *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 12782-12786.
- [82] Casals E., Pfaller T., Duschl A., Oostingh G. J., Puntès V., *ACS Nano*, **2010**, 4, 3623-3632.
- [83] He X. M., Carter D. C., *Nature*, **1992**, 358, 209-215.
- [84] Peng Q., Zhang S., Yang Q., Zhang T., Wei X., Jiang L., Zhang C., Chen Q., Zhang Z., Lin Y., *Biomaterials*, **2013**, 34, 8521-8530.
- [85] Mariam J., Sivakami S., Dongre P. M., *Drug Delivery*, **2015**, 1-9.
- [86] Blank M., Shoenfeld Y., *Clinic Rev. Allerg. Immunol.*, **2008**, 34, 307-312.
- [87] Fedeli C., Segat D., Tavano R., Bubacco L., De Franceschi G., Polverino de Laureto P., Lubian E., Selvestrel F., Mancin F., Papini E., *Nanoscale*, **2015**, 7, 17710-17728.

- [88] Ansell B. J., Watson K. E., Fogelman A. M., Navab M., Fonarow G. C., *Journal of the American College of Cardiology*, **2005**, 46, 1792-1798.
- [89] Hellstrand E., Lynch I., Andersson A., Drakenberg T., Dahlbäck B., Dawson K. A., Linse S., Cedervall T., *FEBS Journal*, **2009**, 276, 3372-3381.
- [90] Murphy K., *Immunobiologia di Janeway*, **VIII Ed.**, Piccin, cap 2 e 6.
- [91] Dunkelberger J. R., Song W., *Cell Research*, **2010**, 20, 34-50.
- [92] Sarma J. V., Ward P. A., *Cell Tissue Res.*, **2011**, 343, 227-235.
- [93] Fujita T., *Nat. Rev. Immunol.*, **2002**, 2, 346-352.
- [94] Malich G., Markovic B., Winder C., *Toxicology*, **1997**, 124, 179-192.
- [95] Liang L., Cui M., Zhang M., Zheng P., Deng Z., Gao S., Wang X., Zhang X., Wang C., Liu Y., Xie L., *RSC Adv.*, **2015**, 5, 67327-67334.
- [96] Puck T., Marcus P., *J. Exp. Med.*, **1956**, 103, 653-666.
- [97] Herzog E., Casey A., Lyng F., Chambers G., Byrne H. J., Davoren M., *Toxicology Letters*, **2007**, 174, 49-60.
- [98] Franken N., Rodermond H. M., Stap J., Haveman J., van Bree C., *Nat. Protoc.*, **2006**, 1, 2315-2319.
- [99] Sheikh N. A., Jones L. A., *Cancer Immunol. Immunother*, **2008**, 57, 1381-1390.
- [100] Rudbach J. A., *J. Immunol.*, **1971**, 106, 993-1001.
- [101] <http://www.elisa-antibody.com/ELISA-Introduction/ELISA-types/sandwich-elisa>
- [102] http://www.mitosciences.com/sandwich_elisa_assay_overview.html
- [103] Martin T. L., Mufson E. J., Mesulam M. M., *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, **1984**, 32, 793.
- [104] Josephy P. D., Eling T., Mason R. P., *The Journal of Biological Chemistry*, **1982**, 257, 3669-3675.
- [105] Zhang J., An J., *Int. Anesthesiol. Clin.*, **2007**, 45, 27-37.
- [106] Ren K., Torres R., *Brain Research Reviews*, **2009**, 60, 57-64.
- [107] Dinarello C. A., *Blood*, **1996**, 2095-2147.
- [108] Dinarello C. A., *Annual. Rev. Immunol.*, **2009**, 27, 519-550.
- [109] Risbud M. V., Shapiro I. M., *Nat. Rev. Rheumatol.*, **2014**, 10, 44-56.
- [110] Kishimoto T., *Blood*, **1989**, 74, 1-10.
- [111] Scheller J., Chalaris A., Schmidt-Arras D., Rose-John S., *Biochimica et Biophysica Acta*, **2011**, 1813, 878-888.
- [112] Heinrich P. C., Behrmann I., Müller-Newen G., Schaper F., Graeve L., *Biochem. J.*, **1998**, 334, 297-314.
- [113] Heinrich P. C., Behrmann I., Haan S., Hermanns H. M., Müller-Newen G., Schaper F., *Biochem. J.*, **2003**, 374, 1-20.
- [114] Nishimoto N. and Kishimoto T., *Nature Clinical Practice Rheumatology*, **2006**, 2, 619-626.
- [115] Cullen S. P., Kearney C. J., Clancy D. M., Martin S. J., *Cell Reports*, **2015**, 11, 1535-1548.
- [116] He Y., Franchi L., Nùñez G., *J. Immunol.*, **2012**, 1-6.
- [117] Ulevitch R. J., Johnston A. R., Weinstein D. B., *J. Clin. Invest.*, **1981**, 67, 827-837.
- [118] Gomes A., Fernandes E., Lima J., *J. Biochem. Biophys. Methods*, **2005**, 65, 45-80.

- [119] Kučera O., Endlicher R., Roušar H., Lotková H., Garnol T., Drahota Z., Červinková Z., *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2014**, 1-14.
- [120] Lin W., Wang C., Tsai Y., Liu C., Hwang J., Tseng T., *Arch. Toxicol.*, **2000**, 74, 467-472.
- [121] <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/mp36103.pdf>
- [122] O'Neill H. C., Rancourt R. C., White C. W., *Antioxidant and redox signaling*, **2008**, 10, 277-285.
- [123] Dahlgren C., Karlsson A., *Journal of Immunological Methods*, **1999**, 232, 3-14.
- [124] Wang L., Santos E., Schenk D., Rabago M., *Antioxidants*, **2014**, 3, 559-568.
- [125] Mohseni G., Negahdary M., Malekzadeh R., Manoochehri J., Hadaegh A., Sayad A., Akbari H., Fazilati M., Razaeei S., *Int. J. Electrochem. Sci.*, **2012**, 7, 7033-7044.
- [126] Keshari R. S., Verma A., Barthwal M. K., Dikshit M., *Journal of Cellular Biochemistry*, **2013**, 114, 512-540.
- [127] Alexis F., Pridgen E., Molnar L. K., Farokhzad O. C., *Mol. Pharm.*, **2008**, 5, 505-515.
- [128] Dvir T., Bauer M., Schroeder A., Tsui J. H., Anderson D. G., Langer R., Liao R., Kohane D. S., *Nano lett.*, **2011**, 11, 4411-4414.
- [129] Cesta M. F., *Toxicologic. Pathology*, **2006**, 34, 455-465.
- [130] Rubins J. B., *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **2003**, 167, 103-104.

RINGRAZIAMENTI

Giunta alla fine di questo percorso, voglio qui cogliere l'occasione di esprimere i miei sinceri ringraziamenti a chi ha consentito il compiersi di tutto ciò.

Innanzitutto quindi voglio ringraziare il Prof. Emanuele Papini e la Dott.ssa Regina Tavano per avermi ospitato presso il loro laboratorio e avermi dato la fiducia e la libertà necessarie ad accrescermi sia professionalmente che come persona, e di esser sempre stati disponibili a chiarire i miei dubbi e a rispondere alle mie domande, rappresentando una guida importante per tutti questi mesi passati assieme.

Grazie a voi ho avuto la possibilità di seguire un nuovo progetto e di programmare giorno per giorno la mia attività in laboratorio facendo fronte alle piccole difficoltà e migliorando sempre più la tecnica e le mie capacità.

Ringrazio inoltre la Dott.ssa Chiara Castellani per esser stata un aiuto fondamentale nello svolgimento e nell'elaborazione degli esperimenti in vivo e il Prof. Fabrizio Mancin con tutto il suo laboratorio, in particolare il Dott. Jakub Waldemar Trzcinski, per aver sintetizzato le nanoparticelle utilizzate nel progetto e senza il quale tutto ciò non avrebbe avuto inizio.

Voglio poi ringraziare il Prof. Alessandro Moretto che si è dimostrato sempre cordiale nell'ascoltare le esposizioni dei risultati da me ottenuti e che mi ha permesso di ragionare sugli aspetti più chimici di tutto il progetto.

Infine ringrazio tutti i docenti che mi hanno accompagnata e istruita in questi lunghi cinque anni lasciando in me un ricordo indelebile.

Affettuosamente ringrazio anche Alessandra, compagna di banco in questi mesi di tirocinio, che mi ha offerto ogni tanto una pausa gioviale dalla quotidianità degli esperimenti.

Non posso però non ringraziare i miei genitori che mi hanno sempre sostenuta, sia economicamente che con l'affetto, in tutte le mie scelte. Non mi hanno mai fatto mancare nulla e ho sempre saputo che in loro, in qualsiasi situazione, sia essa spiacevole o no, avrei trovato un riparo o un consiglio fidato. Spero con questo traguardo di averli ripagati di tutto quello che hanno fatto per me e di averli resi fieri, tanto quanto lo sono io di avere dei genitori così speciali.

Voglio poi ringraziare Martina per essere sempre stata un'amica fidata e una compagna di banco e di laboratorio preziosa in questi cinque anni di università. Con la sua allegria e il suo spirito giocoso ha sempre allietato le giornate accademiche passate assieme.

Ringrazio anche Rosy, Betty, Maria e Mario e tutti gli amici e i parenti più cari per essermi sempre stati vicini e avermi sempre sostenuto.

Infine, ma non per questo meno importante, voglio ringraziare Mattia per esser sempre stato al mio fianco in ogni situazione. Abbiamo iniziato assieme questo percorso, due anni fa ne abbiamo concluso la prima parte quando abbiamo conseguito

la laurea triennale lo stesso giorno e ora ci accingiamo a raggiungere anche questo traguardo assieme. Insieme abbiamo passato ogni esame e ogni pomeriggio di studio, per cui voglio dirti grazie di esser sempre stato il mio "piccolo chimico", il mio compagno e la mia spalla.

Sinceramente, grazie a tutti.