

POLITECNICO DI TORINO



Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica

Tesi di Laurea Magistrale

**Nanoparticelle *core-shell* di silice fluorescenti:
studi preliminari e valutazione del grado di
uptake da parte di linee cellulari tumorali**

Relatore

Prof. Clara Mattu

Correlatore

Dott. Chiara Barattini

Candidato

Elisa Bendanti

A. A. 2020 - 2021

Indice

Abstract	3
1 Introduzione	5
1.1 Nanotecnologie	5
1.1.1 Definizione e storia delle nanotecnologie	5
1.1.2 Nanotecnologie applicate alla medicina	6
1.1.3 Sistemi per drug delivery	9
1.1.4 Nanoparticelle: caratteristiche generali e classificazione	13
1.1.5 Nanoparticelle core-shell di silice fluorescenti	17
1.2 Analisi in fluorescenza	21
1.2.1 Segnale di fluorescenza	21
1.2.2 Fluorocromi	22
1.2.3 Microscopio a fluorescenza	23
2 Scopo della tesi	26
3 Parte sperimentale	27
3.1 Nanoparticelle	27
3.2 Linee cellulari	27
3.2.1 A375	28
3.2.2 COLO-320	28
3.2.3 MCF7	28
3.2.4 SkBr3	29
3.3 Materiali e metodi	29
3.3.1 Colture cellulari	29
3.3.2 Conta cellulare	30
3.3.3 Applicazione del trattamento	31
3.3.4 Preparazione vetrini per analisi in fluorescenza	33
3.4 Metodi di analisi	33

3.4.1	Analisi in microscopia a fluorescenza	33
3.4.2	Elaborazione dati: ImageJ e Excel	34
4	Risultati e discussione	39
4.1	Microscopia a fluorescenza	39
4.1.1	Acquisizione delle immagini	39
4.1.2	Elaborazione e merge delle immagini	40
4.2	Elaborazione del segnale di fluorescenza	42
4.3	Confronto dei dati ottenuti	44
4.3.1	Analisi delle singole linee cellulari	44
4.3.2	Analisi statistica	45
4.3.3	Grafici di confronto	45
4.3.4	Confronto tra diverse linee cellulari	50
4.4	Discussione	53
5	Conclusioni e prospettive future	55
6	Bibliografia	57

Abstract

Tra i sistemi nanotecnologici studiati e sviluppati negli ultimi decenni, le nanoparticelle rappresentano nanomateriali estremamente versatili e utili, con proprietà uniche e applicazioni ad ampio raggio. Uno dei maggiori utilizzi delle nanoparticelle riguarda il *drug delivery*. Nella fase di sviluppo e progettazione di queste nanotecnologie è necessario prevedere anche una fase di caratterizzazione della loro azione di internalizzazione nelle linee cellulari scelte come *target*.

In questo lavoro di tesi lo scopo principale consiste proprio nel caratterizzare il grado di *uptake* di nanoparticelle in diverse linee cellulari tumorali attraverso la valutazione del segnale di fluorescenza. Le nanoparticelle NF_G575 impiegate in questa ricerca sono *core-shell* di silice fluorescenti, sintetizzate mediante sintesi di Stöber modificata. Il *core* di silice contiene le molecole fluorescenti legate covalentemente mentre lo *shell*, in polietilenglicole (PEG), assicura la loro solubilità in ambiente acquoso e, opportunamente modificato, fornisce gruppi reattivi utili alla coniugazione con biomolecole. Sono state scelte quattro linee cellulari tumorali da sottoporre al trattamento; per ciascuna linea sono stati sottoposti ad analisi quattro campioni di nanoparticelle, un controllo negativo e tre trattati a diverse concentrazioni in terreno di coltura (0,74 mg/ml, 0,148 mg/ml, 0,074 mg/ml). I tempi di incubazione considerati sono 4, 24 e 48 ore. Con il microscopio a fluorescenza si acquisisce il segnale dato dalla Rodamina che rappresenta il fluoroforo contenuto nelle nanoparticelle.

Dalle analisi risulta che l'internalizzazione avviene correttamente in tutte le linee cellulari, marcate anche con Hoechst 33342 per visualizzare i nuclei, e non mostrano effetti di inibizione della crescita o segni di citotossicità (valutazione qualitativa). Si è visto che il grado di *uptake* è fortemente dipendente dalla concentrazione del trattamento, dai tempi di incubazione e dal tipo di cellula. Si ipotizza che anche il parametro del tempo di replicazione cellulare sia influente nel mantenimento della fluorescenza nel tempo, ma non sono stati fatti test specifici a tal proposito.

L'elaborazione dei dati acquisiti consiste nel calcolare un valore medio di fluorescenza per ogni campione considerato, fluorescenza definita attraverso il parametro CTCF (*Corrected Total Cell Fluorescence*). Nel tempo l'andamento del segnale risulta coerente per la maggior parte delle linee cellulari, con rare eccezioni. Si notano anche diverse tipologie di internalizzazione: in alcuni casi risulta più diffusa, mentre in altri casi si evidenziano spot isolati di nanoparticelle nel citoplasma.

Possibili sviluppi futuri riguardanti l'utilizzo di queste nanoparticelle rientrano nell'ambito del *drug delivery*: si può procedere con l'aggraffaggio di molecole terapeutiche per progettare agenti multifunzionali anticorpo-antigene-farmaco con l'obiettivo di ottenere un rilascio del farmaco più localizzato e una cinetica di rilascio più controllata.

1 Introduzione

1.1 Nanotecnologie

1.1.1 Definizione e storia delle nanotecnologie

Il concetto di nanotecnologia è definito come la comprensione e il controllo della materia a dimensioni comprese tra 1 e 100 nm, dimensioni alle quali avvengono fenomeni che sono in grado di conferire ai materiali proprietà fisiche, chimiche e biologiche uniche e completamente diverse da quelle della materia di base e potenzialmente funzionali per nuove applicazioni (1). Il moderno concetto di nanotecnologia è stato coniato da Richard Feynman, premio Nobel per la fisica nel 1965, che nel 1959 presentò un suo lavoro intitolato “*There’s Plenty of Room at the Bottom*”, in cui introdusse il concetto della materia a livello atomico. Dopo 15 anni, nel 1974, lo scienziato giapponese Norio Taniguchi utilizzò per la prima volta il termine “nanotecnologia” per indicare il processo di separazione, consolidamento e deformazione dei materiali su scala atomica o molecolare. Negli anni Ottanta la scienza delle nanotecnologie progredì ulteriormente, quando altri scienziati (Kroto, Smalley e Curl) scoprirono i fullereni, mentre Iijima, scienziato giapponese, sviluppò i nanotubi di carbonio (2).

Secondo la National Nanotechnology Initiative (NNI) la nanotecnologia va intesa come tecnologia condotta su scala nanometrica dove fenomeni unici permettono nuove applicazioni in una vasta gamma di campi, tra cui la chimica, la fisica, la biologia, la medicina e l’elettronica. Questa definizione fa riferimento a tre concetti fondamentali: innanzitutto è necessario sviluppare strumenti speciali per lavorare su scala nanometrica a causa delle dimensioni molto piccole. Inoltre, alla scala nanometrica i materiali possono comportarsi in modi diversi e inaspettati; infine, i ricercatori devono trovare il modo di sfruttare questo diverso funzionamento per creare nuove tecnologie. Ne consegue che la nanotecnologia è altamente interdisciplinare e coinvolge tutti i campi precedentemente elencati (3). Recentemente si è assistito ad un crescente utilizzo delle micro e nanotecnologie per le applicazioni biologiche e biomediche.

Al giorno d’oggi, nonostante non sia un concetto di recente scoperta, la nanotecnologia e i nanomateriali sono affascinanti aree di ricerca con molteplici potenziali di applicazione, specialmente in campi biomedici come la terapia e la diagnostica. Considerando che le macromolecole biologicamente attive sono, per la maggior parte, nanostrutture naturali, operare nella stessa scala delle biomolecole porta il grande vantaggio di migliorare l’interazione con tutti i componenti cellulari (4). Uno dei principali campi in cui le nanotecnologie hanno trovato applicazione è, come già anticipato, quello biomedicale: oltre al rilascio controllato di farmaci, le nanotecnologie vengono ampiamente sfruttate per realizzare biomateriali innovativi, tessuti ingegnerizzati, biosensori e sonde molecolari. Altre applicazioni riguardano l’industria cosmetica e alimentare e molti altri settori manifatturieri (2).

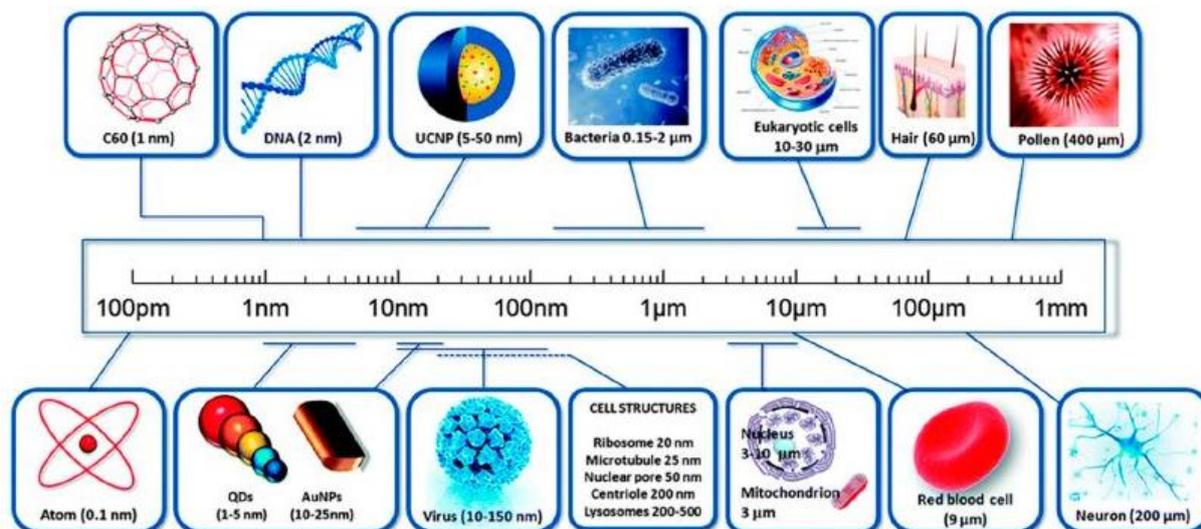


Figura 1.1 Confronto tra diversi nanomateriali, nanostrutture biologiche e organuli cellulari (3).

1.1.2 Nanotecnologie applicate alla medicina

Lo sviluppo delle nanotecnologie ha portato ad un netto cambiamento di prospettiva in campo biomedico, in particolare nel settore della diagnostica, del trattamento e della prevenzione di patologie. Queste innovazioni tecnologiche, denominate “*nanomedicine*” dal National Institutes of Health, hanno il potenziale di trasformare le scoperte molecolari derivanti dalla genomica e dalla proteomica in un evidente beneficio per i pazienti. La nanomedicina è una vasta area tematica che comprende l’uso di nanoparticelle come componenti biomimetici, “nanomacchine” costituite ad esempio da parti intercambiabili di DNA, nanofibre e nanostrutture polimerici utilizzati come biomateriali nell’ambito del *tissue engineering* o, ancora, *microchip* di silicio per il rilascio di farmaci e sensori per la diagnostica di laboratorio (5). Tra i tanti vantaggi vengono riportati i principali: si può avere il *targeting* dei farmaci sfruttando le distinte caratteristiche fisiopatologiche dei tessuti; inoltre, i nanomateriali per *drug delivery* possono essere accumulati a concentrazioni più elevate rispetto ai farmaci normali. A tal proposito, l’aumentata permeabilità vascolare unita a un drenaggio linfatico compromesso nelle masse tumorali o nei tessuti infiammati (il cosiddetto effetto EPR - *Enhanced permeability and retention*) favorisce l’accumulo dei nanosistemi in questi distretti. Si osservano notevoli progressi anche in campo diagnostico: attualmente la maggior parte delle patologie viene scoperta in seguito alla manifestazione di sintomi, cioè quando la cura ha una minor probabilità di essere efficace a causa dello stato già avanzato della malattia. A tal proposito tecniche diagnostiche legate al riconoscimento di sequenze genetiche dei campioni analizzati gioca un ruolo cruciale nel riconoscimento di agenti patogeni o cellule malate in uno stadio precoce e non ancora sintomatico della malattia, quando il trattamento risulta più efficace. Queste tecniche prevedono l’utilizzo di *target probes* che rilevano otticamente la composizione genetica dei campioni biologici; un esempio è dato dalle nanoparticelle d’oro con specifici segmenti di DNA aggraffati sulla loro superficie: tali sistemi formano la base di un *test* di facile lettura per

individuare la presenza di una data sequenza genetica. Si tratta di un'applicazione della nanotecnologia che permette e facilita il rilevamento di organismi patogeni, che ha mostrato risultati promettenti grazie alla sensibilità nettamente maggiore rispetto ai *test* più tradizionali attualmente in uso (6).

I nanomateriali possono essere classificati in base alla loro dimensione, composizione, forma e origine. Riguardo l'origine, essi possono essere naturali o sintetici. Per la loro sintesi sono stati sviluppati molti metodi di fabbricazione suddivisibili in due categorie, di cui viene data una generica rappresentazione grafica in Figura 1.2: approccio *top-down* e *bottom-up*. Il primo approccio consiste nella scomposizione o nell'incisione dei materiali di partenza per ottenere particelle nanometriche sfruttando tecniche di precisione come la litografia. Il secondo approccio, invece, si riferisce alla costruzione di nanostrutture atomo per atomo o molecola per molecola, utilizzando la manipolazione controllata o l'autoassemblaggio spontaneo di atomi o molecole, proprio come accade in natura (7).

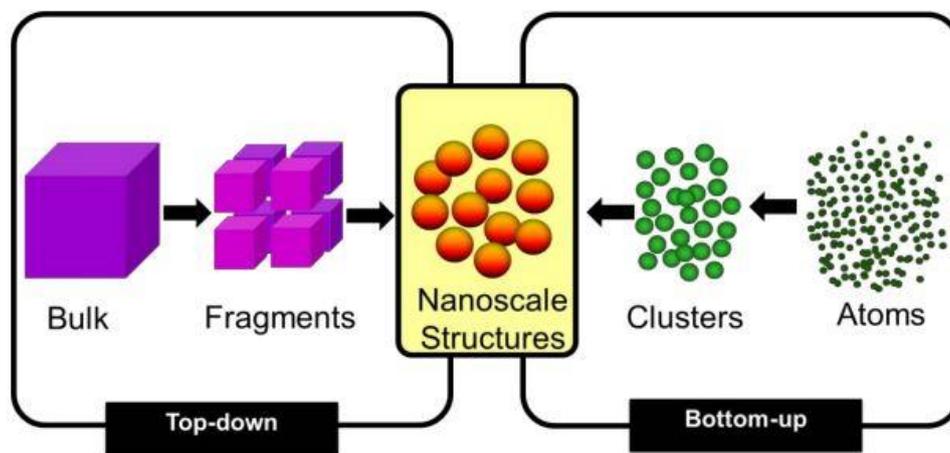


Figura 1.2 Rappresentazione schematica degli approcci *top-down* e *bottom-up* per la fabbricazione di nanomateriali (52).

Una delle maggiori applicazioni di queste tecnologie consiste nel loro utilizzo come nuova strategia non invasiva per la diagnosi e per il trattamento del cancro: si stanno aprendo molte strade riguardo la valutazione e il trattamento del paziente oncologico e la sensibilità delle procedure diagnostiche, insieme alla specificità dei trattamenti antitumorali, sta via via migliorando. Una delle tante frontiere delle nanotecnologie riguarda proprio l'*imaging in vivo* dei tumori, in quanto il loro trattamento ha una maggiore possibilità di successo nelle fasi precoci di stadiazione (8). In studi mirati al miglioramento degli esami diagnostici per il rilevamento precoce del cancro si sta testando l'utilizzo dei *quantum dots*, nanoparticelle in grado di emettere un segnale fluorescente e con la possibilità di essere coniugate a *marker* proteici o a sonde di acidi nucleici. Lo scopo è ottenere una diagnosi precoce e un trattamento più efficace considerando l'elevata sensibilità di tali sistemi. Inoltre, i *quantum dots* necessitano di un contributo energetico minimo per emettere fluorescenza e questo comporta la possibilità di essere eccitati anche all'interno di un organismo. Altra caratteristica molto utile riguarda la possibilità di modulare il range di lunghezza d'onda del segnale di emissione: emettendo la

fluorescenza nel campo degli infrarossi i tessuti e le cellule del paziente non influenzano il segnale emesso. Oltre alle applicazioni di *imaging*, i *quantum dots* sono studiati anche per applicazioni di *drug delivery* per aumentare la specificità di rilascio localizzato (9) e per la diagnostica *in vitro*.

Sempre restando nell'ambito biomedico, diversi nanomateriali sono stati indirizzati all'*imaging* grazie alle loro caratteristiche intrinseche, come le nanoparticelle paramagnetiche utilizzate come mezzo di contrasto per la tomografia assiale computerizzata (TAC). Nel campo della diagnostica, i biosensori integrati con sistemi microfluidici e i *microarray* hanno permesso l'analisi simultanea di molti biomarcatori di patologie tumorali, malattie infettive, morbo di Alzheimer, diabete e molte malattie cardiovascolari (10). Le principali applicazioni dei *microarray* riguardano l'ottenimento di informazioni clinicamente rilevanti dai livelli di espressione genica: vengono utilizzati, ad esempio, per fornire informazioni di prognosi (come la probabilità di recidiva o di metastasi tumorale) e informazioni predittive (come l'efficacia della chemioterapia), oppure per il sequenziamento del DNA al fine di rilevare eventuali mutazioni genetiche (11). Considerando invece il campo della microfluidica, studi e applicazioni sono sempre più frequenti grazie ai numerosi vantaggi che si ricavano da queste tecnologie: biosensori integrati con *chip* microfluidici permettono di lavorare con un flusso laminare, di analizzare più campioni in parallelo e di realizzare un *design* con ottime caratteristiche di portabilità e versatilità, comportando un miglioramento in termini di capacità analitica e un ampliamento delle capacità diagnostiche. Questi sensori sono alla base dei dispositivi *point-of-care* (POC) che giocano un ruolo fondamentale nello sviluppo della diagnosi rapida e nella diminuzione dei costi per *test* di routine anche molto semplici (per cui normalmente servirebbero tecnici competenti e laboratori altamente specializzati) che possono essere eseguiti direttamente al letto del paziente. Diversi studi sullo sviluppo della tecnologia microfluidica condotti negli ultimi anni hanno rivelato numerose opportunità nel campo dell'analisi enzimatica, del DNA e della proteomica; è stato anche dimostrato un grande potenziale nel campo delle applicazioni di colture cellulari, in quanto con queste tecnologie è possibile riprodurre in modo preciso le condizioni *in vivo* (12).

Per completare la panoramica sulle nanotecnologie applicate alla medicina è necessario dedicare un breve paragrafo anche allo sviluppo delle terapie combinate che prevedono l'integrazione di agenti farmacologici con cicli radioterapici o di terapia fototermica. L'ipertermia tradizionale, che rappresenta uno dei possibili trattamenti contro il cancro, è caratterizzata da una notevole invasività e per ottenere una buona efficacia terapeutica senza provocare danni cellulari aspecifici è richiesto un sofisticato controllo della temperatura, che spesso non è possibile attuare. Per superare questo limite sono stati realizzati dei nanomateriali con una sezione trasversale ad altissimo assorbimento che permette di convertire in calore una fonte di energia esterna (ad esempio un campo magnetico, un fascio luminoso o un impulso ad ultrasuoni). Materiali particolarmente efficienti per la terapia fototermica sono l'oro e il carbonio, da cui si ottengono nanoparticelle o, più in generale, nanomateriali che vengono irraggiati con un fascio luminoso nel vicino infrarosso, non invasivo e non penetrante, e trasformano gran parte dell'energia assorbita in calore (13).

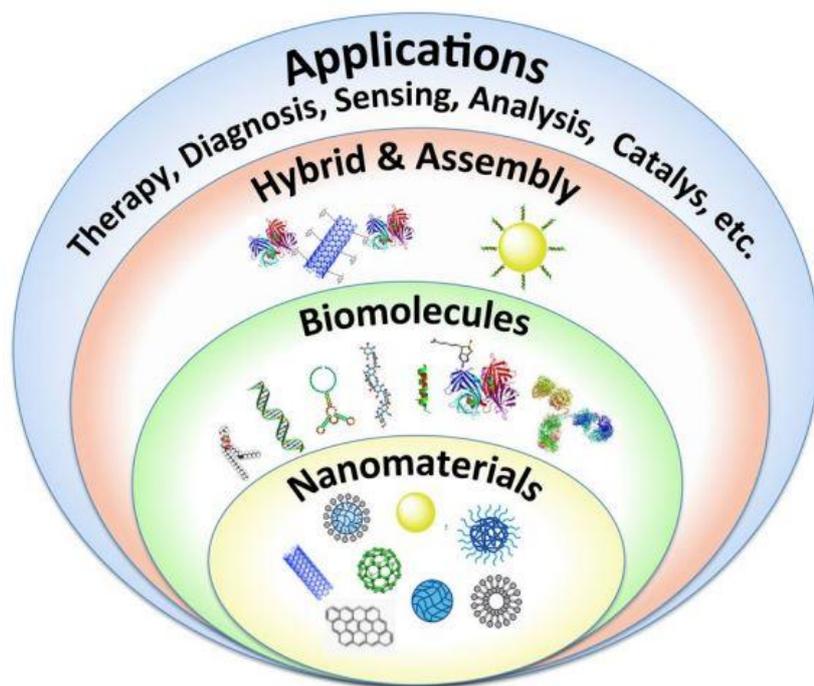


Figura 1.3 Illustrazione dei nanomateriali e delle loro applicazioni (10).

1.1.3 Sistemi per drug delivery

I farmaci tradizionali presentano alcune criticità che ne limitano l'efficacia: la loro scarsa idrofilicità, ad esempio, limita fortemente l'accessibilità del principio attivo poiché l'organismo tende ad eliminarlo velocemente. Lo studio della farmaco-cinetica e della farmaco-dinamica individua alcuni problemi che possono essere ampiamente superati con l'utilizzo di *nanocarriers*: l'assunzione per via orale è caratterizzata da una dispersione più o meno massiccia del farmaco che deve superare un certo numero di barriere biologiche prima di raggiungere il sito *target*. Ne consegue che i tempi di efficacia farmacologica aumentano e l'effettiva concentrazione del farmaco una volta raggiunta la zona di azione è decisamente inferiore rispetto a quella somministrata. La via endovenosa prevede meno passaggi di barriere, quindi è preferibile se è necessaria un'azione rapida. Infine, la somministrazione per via inalatoria è sicuramente la più veloce ed efficace ma non sempre sfruttabile (14).

Grazie allo sviluppo e alla rapida progressione delle nanotecnologie è stato possibile porre particolare attenzione alla progettazione di sistemi *drug delivery* come alternativa ai tradizionali metodi di somministrazione farmacologica. L'obiettivo principale è garantire un'azione mirata del farmaco in distretti anatomici specifici, al fine di ridurre la tossicità sistemica, e mantenere per i tempi necessari un'adeguata concentrazione nel sito biologico di destinazione. La progettazione dei sistemi *drug delivery* è mirata al conseguimento di tre principali scopi: migliorare la stabilità chimica degli agenti attivi, aumentare l'efficacia terapeutica e ridurre al minimo gli effetti collaterali (15). La ricerca rivolge particolare attenzione, nonché una notevole quantità di risorse, allo sviluppo di soluzioni alternative al farmaco tradizionale per la terapia tumorale; i motivi di questa scelta sono due: innanzitutto il cancro

rappresenta una delle principali cause di morte nel mondo, in più non bisogna sottovalutare l'aspetto legato alla resistenza multifarmaco che le cellule tumorali spesso sono in grado di sviluppare. La resistenza multifarmaco gioca un ruolo cruciale nella formazione di metastasi e recidive nei tre anni successivi alla remissione iniziale. I sistemi *drug delivery* basati sulle nanotecnologie rappresentano una strategia rivoluzionaria che può porre rimedio ai problemi elencati: sono stati studiati e progettati dei nanomateriali che migliorano aspetti come la farmacocinetica e la consegna specifica nel sito da trattare, in più alcuni di essi presentano un buon grado di bioattività che mostra un effetto sinergico con i farmaci incapsulati o aggraffati al fine di inibire la proliferazione di tessuto neoplastico (un esempio a questo proposito è dato dalle nanoparticelle di argento) (16).

Un fattore fondamentale per l'efficacia del trattamento terapeutico consiste nel mantenimento del farmaco intatto *in vivo*. I sistemi *drug delivery* basati su nanoparticelle possono rivelarsi utili anche per questo aspetto, in quanto risultano in grado di fornire un meccanismo di protezione del farmaco dalla degradazione e quindi dall'indesiderata inattivazione precoce. L'obiettivo è favorire la protezione e il prolungamento dell'emivita del farmaco all'interno dell'organismo: per raggiungerlo è necessario innanzitutto evitare la rimozione delle nanoparticelle somministrate per via endovenosa mediante opsonine, proteine contenute nel siero del sangue che, tramite un particolare processo di adsorbimento denominato opsonizzazione, favoriscono la fagocitosi ad opera delle cellule appartenenti al sistema reticolo-endoteliale (RES), rappresentato da fegato, milza, polmoni e midollo osseo. Questo processo è influenzato da molteplici fattori quali le dimensioni delle nanoparticelle e le caratteristiche chimiche della superficie: è stato dimostrato che nanoparticelle con diametro inferiore a 80 nm vengono catturate dal fegato e riescono a raggiungere gli epatociti; dimensioni comprese tra 80 e 400 nm consentono un *uptake* da parte di fegato e milza e, infine, vettori con diametro superiore a 400 nm sono filtrati esclusivamente dalla milza. Le principali caratteristiche superficiali comprendono il grado di idrofobicità, che favorisce il riconoscimento delle nanoparticelle da parte del RES, e le forze attrattive e repulsive tra le nanoparticelle e le proteine plasmatiche. Una possibile strategia per evitare la cattura dei *nanocarriers* da parte degli organi del RES consiste nella loro somministrazione locale, in modo da limitare l'attività di fagocitosi. Strategie ancora più promettenti prevedono la modifica superficiale delle nanoparticelle per renderle "invisibili" ai macrofagi (17).

Per dare una giusta panoramica dei sistemi *drug delivery* non si può tralasciare il concetto di *targeting* che rappresenta la capacità di riconoscere un bersaglio specifico, strettamente legato alla progettazione di terapie innovative contro il cancro. Esistono tre diverse tipologie di *targeting*, di seguito elencate, brevemente descritte e rappresentate graficamente in Figura 1.4.

Targeting passivo: viene sfruttata la biologia e la morfologia del tessuto tumorale. Il tessuto sano presenta una struttura vascolare estremamente organizzata, al contrario il tessuto tumorale ha una vascolarizzazione ramificata in modo irregolare e molto disorganizzata. Inoltre, i tumori sono caratterizzati da una elevata densità vascolare, una maggiore permeabilità dei vasi sanguigni e un sistema linfatico compromesso. Queste caratteristiche, considerate nell'insieme, sono note come effetto

di maggiore permeabilità e ritenzione (effetto EPR), facilmente sfruttabile dalle nanoparticelle per accumularsi, preferenzialmente, nel tessuto tumorale. Alcune proprietà delle nanoparticelle come composizione, dimensione, forma e caratteristiche superficiali mediano questo processo di *targeting* passivo. Ottimizzando in fase di progettazione le caratteristiche chimico-fisiche di questi vettori è possibile ottenere un'azione estremamente mirata al sito *target* (18).

Targeting attivo: comporta l'utilizzo di molecole ligando per ottenere un riconoscimento specifico delle cellule tumorali da parte delle nanoparticelle. Se la superficie della nanoparticella risulta modificabile, si procede con l'inserimento di un ligando che è in grado di riconoscere e legarsi selettivamente a un recettore specifico presente sulla superficie della cellula bersaglio. Tipici ligandi sono peptidi, anticorpi, o loro frammenti, e acidi nucleici. In base al legame che si crea con il recettore, la cellula trasmette al suo interno specifici segnali che innescano una cascata di eventi. In alcuni casi il recettore viene internalizzato dalla cellula in modo che anche il farmaco contenuto delle nanoparticelle sia introdotto; in altri casi il legame recettore-ligando si limita ad inibire il sito attivo di altri recettori cellulari, che così non riescono a captare i vari segnali di proliferazione e stimolazione dell'angiogenesi tumorale. Le cellule tumorali presentano superficialmente molti più recettori rispetto alle cellule sane e proprio per questo il *targeting* attivo risulta molto efficace nella terapia per il cancro (19).

Targeting stimolo-mediato: è un sistema a due *step* che, inizialmente, sfrutta uno degli altri due tipi di *targeting* precedentemente descritti, successivamente si induce una risposta ad uno stimolo esterno (ultrasuoni, campi magnetici, ecc.) o proveniente dall'ambiente tumorale, come variazioni di pH, presenza di enzimi, variazioni di temperatura. Sfruttando, ad esempio un meccanismo di *targeting* passivo le nanoparticelle riescono ad accumularsi nel sito tumorale; una volta raggiunto il bersaglio, il netto cambiamento di pH (tipico del microambiente tumorale) induce una rottura del guscio delle nanoparticelle causando il rilascio del farmaco. È ovviamente necessario progettare la morfologia e la composizione chimico-fisica della nanoparticella in modo da renderla sensibile a tale stimolo (15).

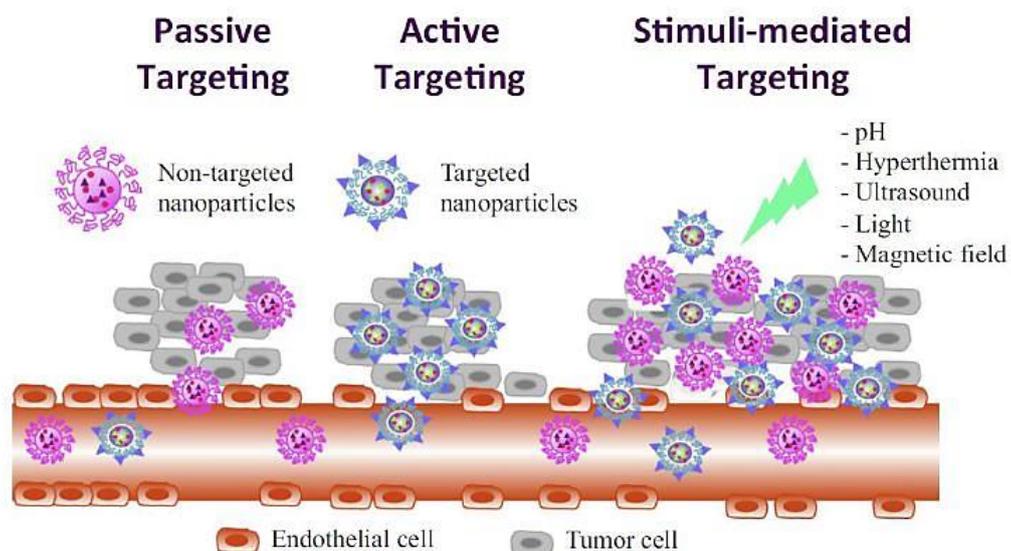


Figura 1.4 Rappresentazione grafica delle tre tipologie di *targeting*: passivo, attivo e stimolo-mediato (53).

Una delle prime applicazioni nel campo della *drug delivery* per incrementare l'efficacia delle terapie antitumorali è rappresentata dai liposomi, la prima forma di nanovettori caricati con farmaci antineoplastici quali Doxorubicina e Paclitaxel. Rispetto alla somministrazione di farmaco libero, l'utilizzo di questi sistemi innovativi comporta un notevole vantaggio che consiste nell'aumento dell'emivita plasmatica della molecola terapeutica, che quindi esplica la sua azione per tempi prolungati. È fondamentale non sottovalutare una serie di caratteristiche che tutti i sistemi *drug delivery* devono possedere per essere utilizzabili: devono infatti risultare biocompatibili, inerti, biodegradabili, non citotossici o immunogenici. Inoltre, i prodotti di degradazione devono essere ben tollerati dall'organismo e facilmente eliminabili. È importante anche considerare che, in generale, la scelta dei *nanocarriers* risulta molto più stringente rispetto alla scelta del farmaco in quanto sono i primi che formano un'interfaccia diretta con l'ambiente biologico.

In fase di ricerca e progettazione nanotecnologica nel campo della *drug delivery* non vanno tralasciati i problemi di tossicità e dell'eventuale pericolosità delle nanoparticelle per la salute dell'organismo. Essi sono fortemente dipendenti da alcuni parametri chimico-fisici quali dimensione, forma, carica e chimica superficiale, composizione e stabilità delle nanoparticelle. L'esatto meccanismo sottostante è ancora sconosciuto, tuttavia la letteratura suggerisce che la citotossicità sia legata allo stress ossidativo e all'attivazione dei geni pro-infiammatori. Oltre ai fattori legati alle particelle, la dose somministrata, la via di somministrazione e la distribuzione dei tessuti sembrano parametri importanti nella citotossicità. Solitamente si eseguono studi di citotossicità su cellule *in vitro* utilizzando dosi crescenti di nanoparticelle per cercare di valutare il rapporto dose terapeutica e dose tossica e determinare i limiti di sicurezza delle concentrazioni di particelle per la somministrazione *in vivo*. Altri studi dimostrano che alcuni sistemi nanotecnologici per *drug delivery* possono causare una compromissione dell'integrità delle membrane cellulari: ad esempio, i mitocondri subiscono evidenti danni da parte di fullereni, nanotubi di carbonio e alcune nanoparticelle (di biossido di titanio o di argento, per citarne alcune). Alcune nanoparticelle, infine, sono in grado di penetrare all'interno del nucleo cellulare, sfruttando i meccanismi di diffusione tramite pori nucleari o il trasporto attivo da parte di recettori di membrana nucleare (20). In prospettiva andrà in ogni caso valutata anche la legislazione in tema di sicurezza che, al momento, risulta essere carente.

Un ulteriore aspetto da considerare in fase di progettazione riguarda la via di somministrazione: i *nanocarriers* possono essere somministrati per via orale, mediante inalazione, penetrazione cutanea o iniezione intravascolare, per poi distribuirsi in organi e tessuti, come avviene per i farmaci tradizionali (20). La Figura 1.5 mostra vantaggi e svantaggi della somministrazione attraverso queste vie.

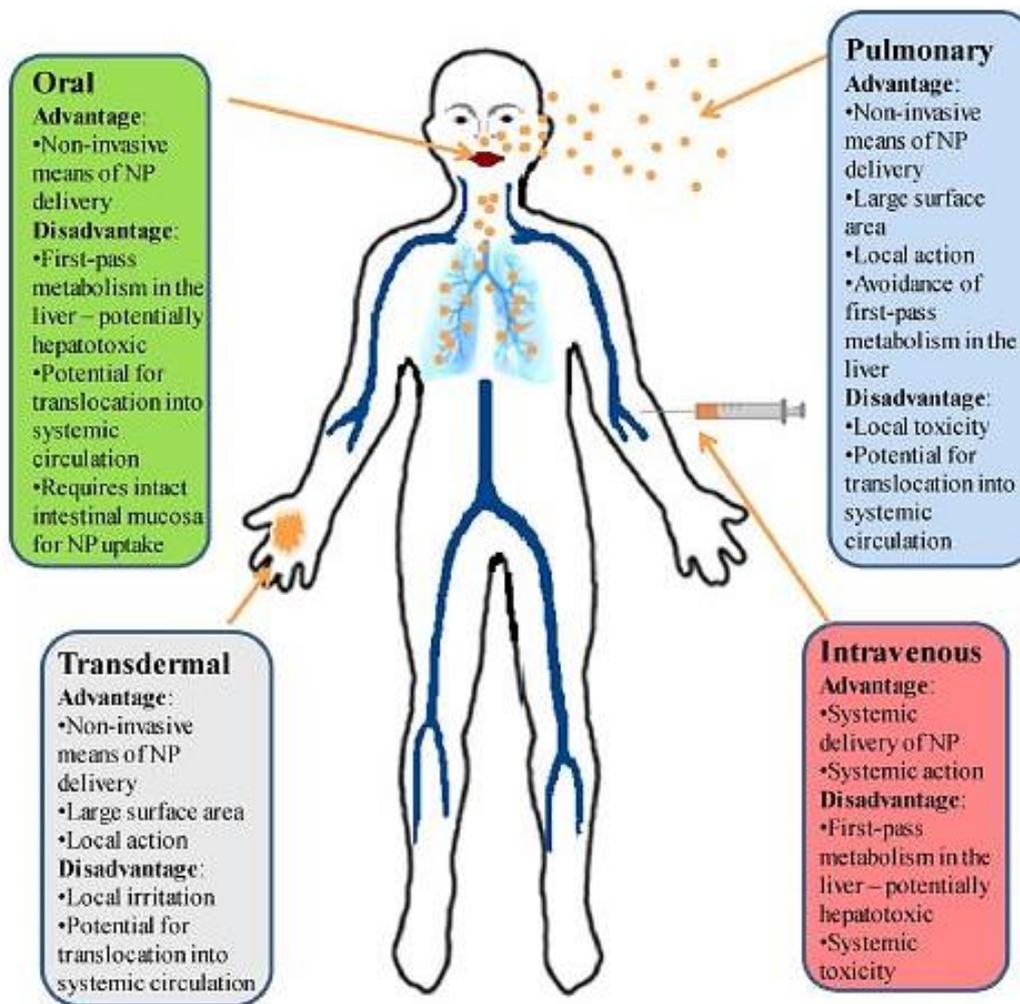


Figura 1.5 Diverse vie di somministrazione dei sistemi *drug delivery*: vantaggi e svantaggi (20).

1.1.4 Nanoparticelle: caratteristiche generali e classificazione

Le nanoparticelle rappresentano una classe di nanomateriali e vengono definite come dispersioni di particelle o particelle solide caratterizzate da almeno una dimensione compresa tra 1 e 100 nm (anche se spesso, tra i ricercatori, si considerano dimensioni fino a 1 μm). La possibilità di ingegnerizzare dimensioni, forma, materiali e proprietà di superficie, unita alla somiglianza a livello dimensionale con le biomolecole, le rendono dei sistemi estremamente versatili e facilmente applicabili in molti ambiti biologici (21). Il principale obiettivo della nanomedicina consiste nel progettare e sintetizzare sistemi che possano trasportare quantità sufficienti di farmaco, attraversare in modo efficiente le barriere fisiologiche per raggiungere i siti di destinazione ed avere un buon grado di efficacia; in generale si vuole avere una finestra terapeutica sufficientemente ampia. Sono state progettate, studiate e analizzate numerose nanoparticelle per *drug delivery*: liposomi, coniugati farmaco-polimero, dendrimeri, micelle polimeriche e nanoparticelle. Ogni tecnologia presenta i propri vantaggi e svantaggi. I sistemi *drug delivery* inorganici come nanoparticelle d'oro, *quantum dots*, nanoparticelle di silice e nanotubi di carbonio si sono dimostrati molto validi e versatili (22).

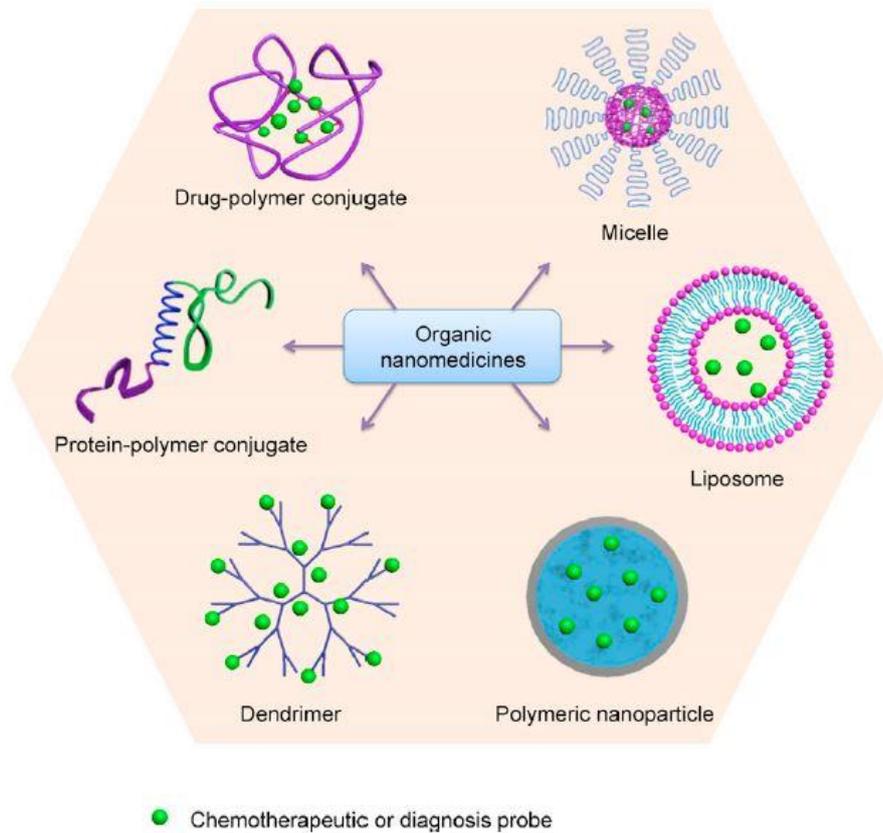


Figura 1.7 Esempi di nanoparticelle organiche per diagnosi e terapia oncologica (22).

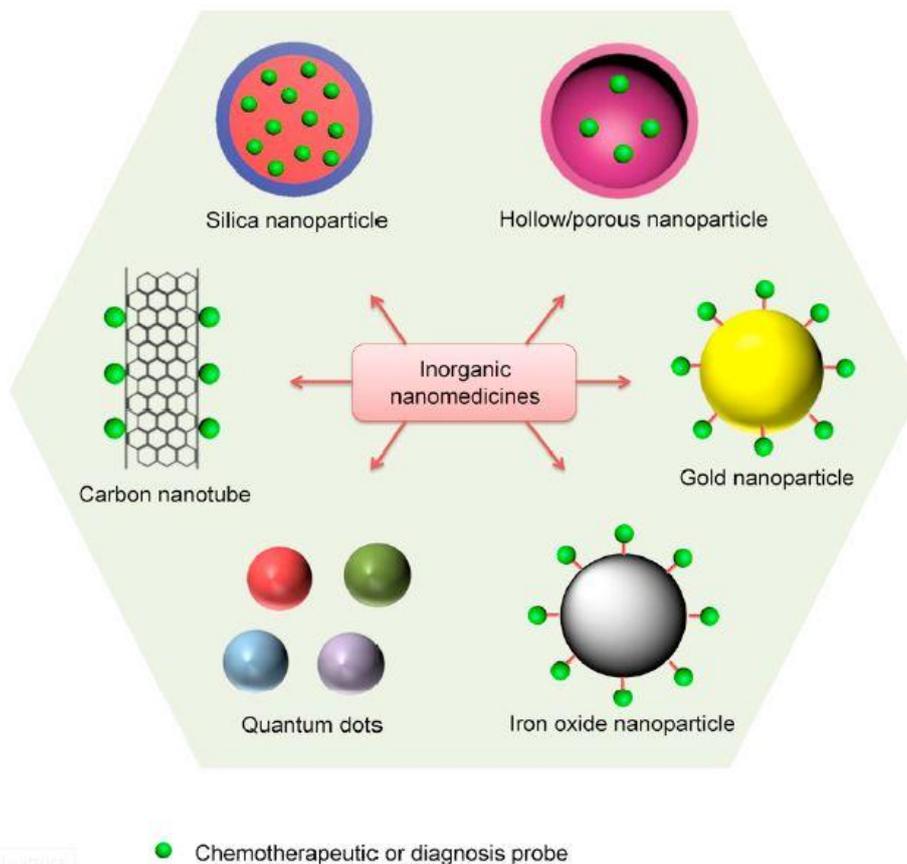


Figura 1.6 Esempi di nanoparticelle inorganiche per diagnosi e terapia oncologica (22).

Di seguito vengono elencate e brevemente descritte le nanoparticelle maggiormente rilevanti in ambito biomedico.

Liposomi: sono vescicole sferiche composte di una struttura lipidica singola o a doppio strato in grado di auto-assemblarsi in sistemi acquosi. Sono facilmente realizzabili in diverse composizioni, possono trasportare molti tipi di biomolecole e sono estremamente biocompatibili e biodegradabili. Il *design* particolare consente l'intrappolamento di molecole idrofiliche all'interno del nucleo e farmaci idrofobici nel *bilayer* lipidico, rendendoli ideali per applicazioni di *drug delivery*. I liposomi possono essere coniugati con polimeri biocompatibili come il polietilenglicole (PEG) per migliorare l'emivita di circolazione e la stabilità in vivo e possono essere funzionalizzati con specifici ligandi che promuovono un meccanismo di *targeting* attivo (19).

Nanoparticelle polimeriche: sono formate da polimeri biocompatibili e biodegradabili e sono state ampiamente studiate come vettori terapeutici in applicazioni di nanomedicina, grazie alle loro tecniche di preparazione semplici e veloci e alla loro sicurezza biologica. Sono costituite da copolimeri a blocchi di diversa idrofobicità che si assemblano spontaneamente in una struttura *core-shell*, in ambiente acquoso. Le nanoparticelle polimeriche sono principalmente nanosfere, la cui massa complessiva è generalmente solida e le altre molecole sono adsorbite sulla superficie sferica, o nanocapsule in cui la massa solida è incapsulata nella particella. Appartengono a due categorie principali: coniugati polimero-farmaco (per aumentare la biodisponibilità del farmaco e l'emivita) e strutture polimeriche degradabili (per formulazioni a rilascio controllato). Di solito migliorano l'efficacia del farmaco che trasportano, grazie al rilascio controllato nel sito bersaglio sfruttando un meccanismo di *targeting* attivo (19).

Dendrimeri: sono una classe di polimeri di dimensioni nanometriche con una struttura ben definita, omogenea e monodispersa, costituita da bracci o rami simili ad alberi le cui dimensioni e forme possono essere controllate con precisione. Presentano un nucleo centrale, strati interni ramificati e una superficie esterna. Caratteristiche come dimensioni, forma e lunghezza o densità delle ramificazioni sono estremamente controllabili e, grazie a questa peculiarità, i dendrimeri risultano molto adatti per applicazioni come sensori o vettori per il rilascio di farmaci. Possono anche instaurare legami di diverso tipo con piccole molecole che si posizionano nelle cavità del nucleo. Infine, la superficie esterna può essere facilmente modificata per produrre gruppi chimici funzionali al *targeting* attivo (23).

Nanogel: sono idrogeli costituiti da *network* polimerici reticolati e rigonfiabili con la capacità di assorbire acqua senza dissolversi nell'ambiente acquoso in cui si trovano. Possono essere costituiti da polimeri naturali o sintetici o da una combinazione dei due. Cambiando la composizione chimica è possibile modulare le dimensioni, la carica, la porosità, il grado di anfifilicità e di biodegradabilità. Un evidente vantaggio rispetto ad altre nanoparticelle è l'ottima capacità di carico di molecole ospiti e l'elevato grado di incapsulamento. Inoltre, le loro dimensioni molecolari (tra i 100 e i 700 nm, che li porta ad essere al limite della definizione di nanomateriali) portano il vantaggio di riuscire a sfuggire alla *clearance* renale prolungando così la loro emivita. Sono candidati ottimi per sistemi *drug delivery*,

ma vengono impiegati anche come strumenti diagnostici e di *imaging in vivo* grazie alle loro proprietà ottiche, elettriche e magnetiche (24).

Nanoparticelle metalliche: i precursori metallici in genere utilizzati sono l'argento, l'oro, il rame, il palladio, il biossido di titanio e l'ossido di zinco. Le applicazioni in campo biomedico sono molteplici grazie all'enorme varietà di proprietà chimiche e fisiche di questi elementi. Le nanoparticelle di ossido di ferro presentano caratteristiche superparamagnetiche e per questo sono studiate in particolare come agenti di *imaging* per indagini di risonanza magnetica e per la terapia di rilascio di farmaci attivati magneticamente. La nanoparticelle d'argento vengono impiegate in applicazioni antibatteriche e antinfiammatorie (25).

Nanoparticelle d'oro: fanno parte delle nanoparticelle metalliche, ma in più presentano eccellenti proprietà ottiche e chimiche dipendenti da forma e dimensione, hanno una buona biocompatibilità e sono facilmente modificabili a livello superficiale. Queste proprietà permettono a tali nanoparticelle di prestarsi per molteplici applicazioni, tra cui il *drug delivery*, il rilevamento di specie biochimiche o di sequenze di DNA, l'*imaging* e le applicazioni terapeutiche come l'ipertermia, grazie al fatto che riescono a trasformare la luce assorbita in calore (più precisamente, hanno un alto potenziale per la terapia fototermica a infrarossi). Vengono anche utilizzate come sonde per rilevare patologie cardiache o marcatori tumorali (17).

Nanoparticelle a base di Carbonio: sono realizzabili in diverse forme e morfologie come tubi cavi, ellissoidi o sfere. Le due principali categorie di queste nanoparticelle sono rappresentate dai fullereni e dai nanotubi di carbonio. I primi presentano unità di carbonio pentagonali ed esagonali e hanno caratteristiche di elevata conducibilità elettrica, buona resistenza e versatilità e per questo sono molto sfruttati commercialmente. I nanotubi di carbonio sono strutture tubulari allungate con un diametro di 1-2 nm, simili a fogli di grafite arrotolati su se stessi per formare, appunto, un cilindro cavo. Si rivelano molto utili come riempitivi e come supporto di catalizzatori inorganici e organici (26).

Nanoparticelle di silice mesopore: sono costituite da silice decorata da pori uniformi e ordinati di dimensioni estremamente controllate (comprese tra 2 e 50 nm), utilizzati per caricare al loro interno farmaci o altre molecole biologiche. Sono in generale sistemi dotati di un'eccellente biocompatibilità, facilità di modifica superficiale e di controllo dimensionale. L'elevata area superficiale specifica e il volume dei pori rendono queste nanoparticelle ideali per caricare al loro interno agenti terapeutici o diagnostici, per questo sono molto versatili dal punto di vista applicativo e si studiano sia nell'ambito dell'*imaging* sia come sistemi *drug delivery*. Grazie alla loro particolare morfologia sono in grado di proteggere il loro carico dal rilascio prematuro e dalla degradazione indesiderata (che può avvenire ad esempio a livello dello stomaco o dell'intestino) prima di raggiungere il sito *target*. Inoltre, modificando le proprietà fisiche e chimiche della superficie si possono conferire alle nanoparticelle specifiche caratteristiche funzionali, tra cui l'inibizione dell'adsorbimento specifico, l'inserimento di gruppi funzionali per coniugare biomolecole e l'introduzione di specie neutre o cariche per controllare il grado di biocompatibilità. Essendo di grande interesse, sono stati condotti molteplici studi di internalizzazione

delle nanoparticelle di silice mesoporose e si è visto che molti parametri (tra cui la morfologia, la dimensione dei pori, le funzionalizzazioni superficiali e le interazioni elettrostatiche tra nanoparticelle e membrane cellulari) influenzano profondamente i meccanismi di *uptake* (27).

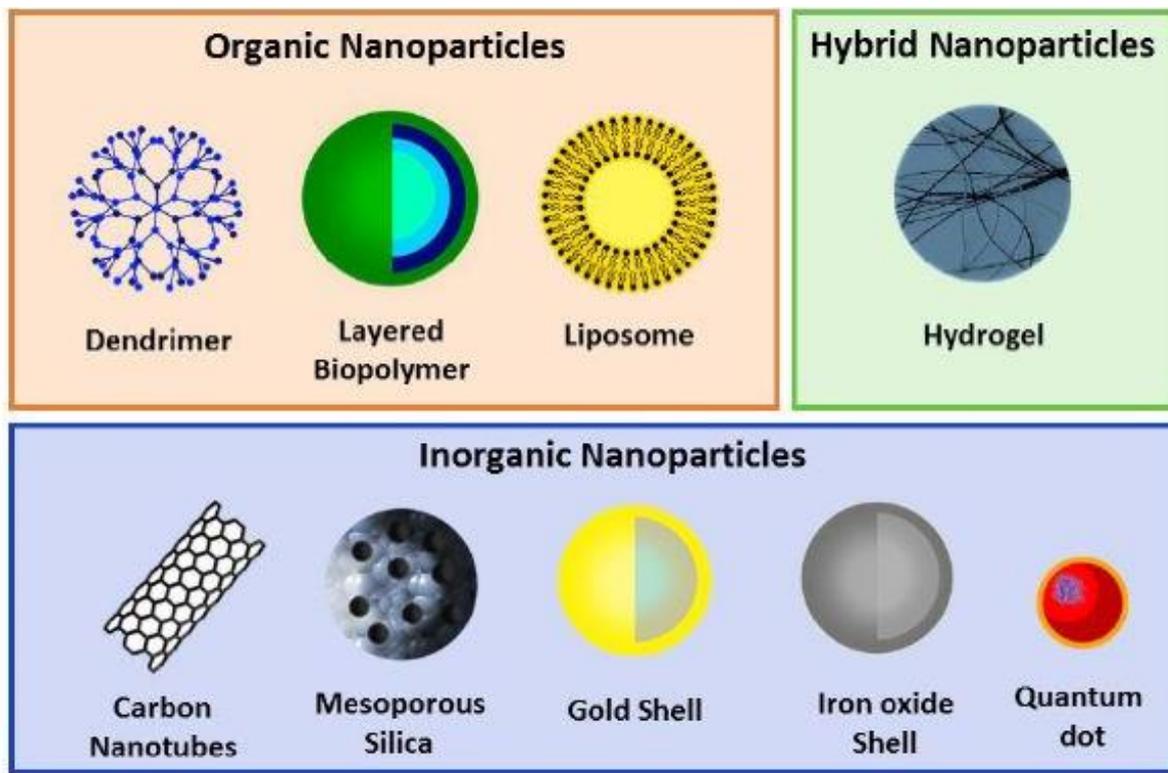


Figura 1.8 Rappresentazione schematica delle diverse tipologie di nanoparticelle (54).

1.1.5 Nanoparticelle core-shell di silice fluorescenti

Le nanoparticelle di silice (SiNPs) sono strutture molecolari caratterizzate da una matrice di silice in grado di delimitare un ambiente interno, nel quale si possono legare molecole fluorescenti. La silice è un materiale relativamente inerte: trasparente alla luce nel visibile, non coinvolta in trasferimenti di energia e di elettroni e non tossica per l'ambiente biologico; è perciò indicata sia per studi *in vitro* che *in vivo*. La matrice di silice, se non presenta pori, è in grado di proteggere il contenuto delle nanoparticelle dall'ambiente esterno, senza alterarne le proprietà chimico-fisiche. Inoltre, queste nanoparticelle possono essere sintetizzate mediante diversi processi caratterizzati dall'impiego di reagenti poco costosi, condizioni operative facilmente ripetibili in laboratorio, possibilità di modificare le caratteristiche chimico-fisiche (dimensioni, porosità e carica superficiale) e procedure di purificazione poco complesse (28).

La sintesi di nanoparticelle di silice in soluzione può avvenire mediante strategie diverse che condividono l'utilizzo di un precursore organo-silano. I principali approcci sintetici sono il metodo classico di Stöber, il metodo assistito da micelle e la microemulsione inversa. Il metodo di Stöber risulta vantaggioso perché richiede la preparazione di una miscela relativamente semplice contenente

precursore, acqua e ammoniaca, non prevede delle condizioni stringenti e permette di ottenere nanoparticelle monodisperse, con dimensioni variabili in base alla concentrazione e al rapporto tra i reagenti. Con questo approccio le nanoparticelle vengono sintetizzate mediante una reazione di idrolisi del precursore, seguita da una fase di condensazione. Queste trasformazioni richiedono l'utilizzo di acqua, etanolo, come co-solvente, e ammoniaca, che rappresenta il catalizzatore (29). Trattandosi di nanoparticelle fluorescenti, la sintesi classica di Stöber è stata ottimizzata per legare covalentemente le molecole organiche fluorescenti alla matrice di silice. La procedura per la realizzazione di nanoparticelle di silice fluorescenti richiede due *step*: il fluorocromo viene legato ad un gruppo amminico di un agente silanizzato che, successivamente, insieme al precursore, subisce idrolisi e condensazione nella soluzione di reazione. Nonostante le nanoparticelle ottenute con questo metodo mostrino già una buona stabilità in solvente acquoso per effetto delle repulsioni elettrostatiche, è comunque consigliabile modificare la superficie delle nanoparticelle in modo da regolarne la solubilità nei fluidi biologici ed evitare la loro aggregazione (30).

AcZon è un'azienda biotecnologica di Bologna che produce *nanoprobes* e nanoparticelle per applicazioni bioanalitiche. Le nanoparticelle sviluppate e commercializzate dall'azienda vengono prodotte mediante una sintesi di Stöber modificata: la reazione rimane invariata, ma avviene all'interno di una micella di surfattante che funge da nanoreattore. In questo caso si sfrutta la tendenza di un surfattante a delimitare un ambiente idrofobico, in cui viene concentrato il solvente organico, in modo tale che il fluorocromo, insolubile in acqua, possa accumularsi all'interno della micella. La reazione richiede quindi l'utilizzo di un surfattante per la formazione della micella e molecole di PEG e di fluoroforo silanizzate, ovvero caratterizzate dalla presenza di un gruppo silano $\text{Si}(\text{OR})_3$. La sintesi modificata di Stöber procede per fasi (31):

1. Il surfattante viene posto in soluzione con acqua, solvente organico, fluoroforo e PEG silanizzati, in modo da ottenere la struttura micellare che contenga al suo interno le specie che devono reagire.
2. Una volta formata la micella, si aggiunge il precursore organosilano, in grado di reagire con i gruppi $\text{Si}(\text{OR})_3$ legati alle catene di PEG e al fluoroforo. Questo passaggio viene favorito dal fatto che i gruppi silano, essendo apolari, tendono a loro volta ad avvicinarsi e ad orientarsi verso l'interno della micella.
3. Si aggiunge l'ammoniaca che rende l'ambiente basico e favorisce la reazione di idrolisi.
4. Una volta che il precursore ha innescato la reazione, questa procede per polimerizzazione, determinando la formazione di legami covalenti tra i gruppi silano del precursore e quelli legati sia al PEG che al fluoroforo.
5. La reazione viene portata a compimento a temperatura controllata.
6. Le specie non reagite vengono eliminate mediante dialisi e successivi step di chiarificazione del prodotto (filtrazioni sequenziali e cicli di centrifugazione).

Il risultato finale è una nanoparticella con struttura *core-shell*, caratterizzata da una matrice di silice che delimita uno spazio interno, in cui sono confinate le molecole di fluoroforo, e che esternamente porta un coating di PEG legato covalentemente al core. Le molecole di PEG silanizzate possono essere modificate con l'aggiunta di gruppi amminici che rendono la nanoparticella idonea alla coniugazione con biomolecole (32).

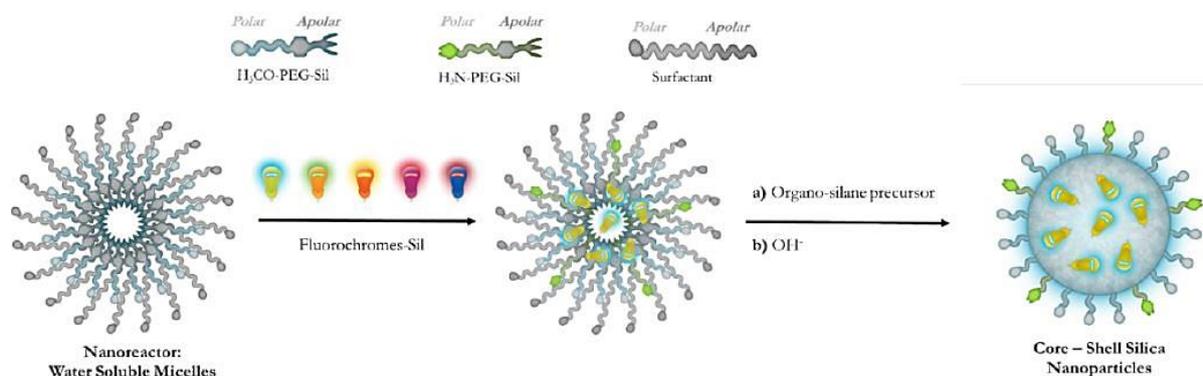


Figura 1.9 Rappresentazione schematica della reazione di sintesi delle nanoparticelle AcZon (31).

Le molecole fluorescenti costituiscono uno strumento indispensabile per lo studio dei fenomeni biochimici, in quanto vengono utilizzate come indicatori di *target* biomolecolari, specie chimiche e cellule. Se da un lato le piccole molecole fluorescenti mostrano una modularità intrinseca (è disponibile un'ampia scelta di *probes* fluorescenti che possono essere modificati mediante il loro legame con gruppi funzionali, consentendo di sviluppare sistemi per applicazioni in campo biochimico e biologico), dall'altro, i fluorofori organici sono caratterizzati da ridotta fotostabilità, bassa resa quantica, insolubilità in acqua e in solventi acquosi, caratteristica che ne rende difficile l'applicazione *in vivo* e *in vitro*. Nonostante le molecole fluorescenti siano versatili e semplici da utilizzare, la loro natura molecolare impone delle limitazioni che possono essere superate mediante l'utilizzo delle nanoparticelle di silice, che si distinguono per essere sistemi efficienti, stabili, biocompatibili e in grado di evidenziare un target specifico (33).

Legando covalentemente il fluoroforo alla matrice di silice, è possibile ottenere un aumento dell'intensità del segnale fluorescente e della fotostabilità della molecola, potendo disporre, allo stesso tempo, di un sistema robusto e idrosolubile. Il miglioramento del segnale si deve al fatto che ogni nanoparticella contiene un elevato numero di fluorocromi e che il suo coefficiente di estinzione molare (ϵ) equivale alla somma dei coefficienti dei singoli fluorofori in essa contenuti. Una diretta conseguenza dell'aumento del coefficiente di estinzione molare e dell'intensità di emissione è il miglioramento della resa quantica, che porta ad una diminuzione dei fenomeni non radiativi. Il *core* di silice, inoltre, protegge il fluorocromo dalle specie chimiche presenti nell'ambiente, come l'ossigeno, diminuendo l'incidenza di fotoreazioni non desiderate e perciò aumentando la fotostabilità del sistema (29).

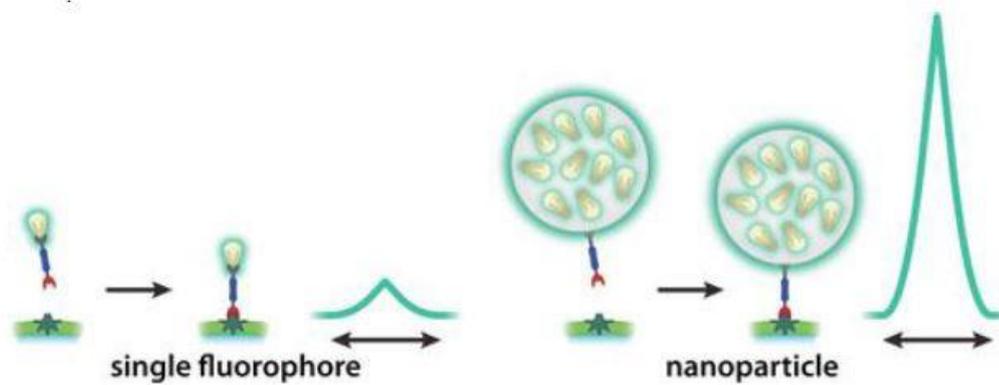


Figura 1.11 Confronto schematico tra l'intensità del segnale derivante dall'utilizzo di una singola molecola fluorescente e quello misurato per una nanoparticella di silice fluorescente (30).

Date le loro proprietà, le nanoparticelle di silice offrono sostanziali vantaggi quando impiegate nell'individuazione di singole molecole, cellule o componenti cellulari e nelle tecniche di *imaging*. Le nanoparticelle di silice coniugate a biomolecole trovano applicazione negli *immunoassay* e come strumenti bioanalitici. È stato dimostrato che tali nanoparticelle sono in grado di migliorare le odierne tecniche di immunocitochimica e immunoistochimica: eseguendo test di localizzazione *in situ* di proteine su cellule e tessuti, sia con coloranti organici che con nanoparticelle fluorescenti, si è potuto osservare un'amplificazione del segnale nei campioni marcati con nanoparticelle di silice fluorescenti. Un'ulteriore prova è data dal fatto che, immobilizzando una sequenza *target* di DNA su una superficie di vetro e ibridizzandola con un filamento di DNA non marcato ma complementare sia alla sequenza *target* che a quella legata alla nanoparticella, l'evento di interazione viene evidenziato da un segnale più intenso (34).

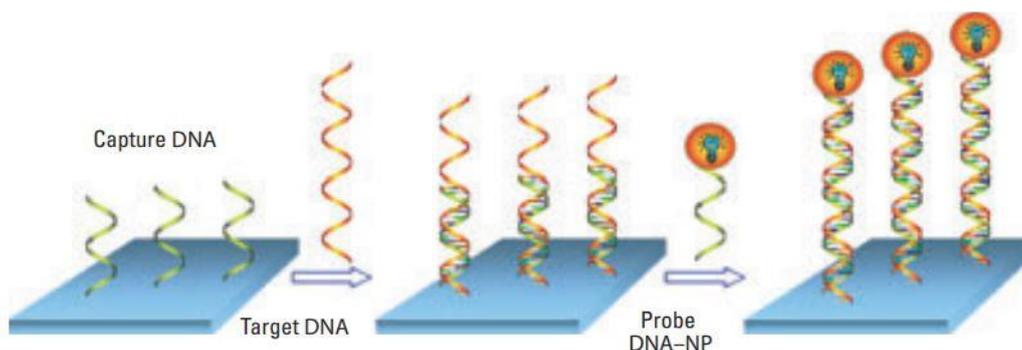


Figura 1.10 Rappresentazione schematica di un DNA *assay* che sfrutta nanoparticelle di silice bioconiugate (34).

Diverse categorie di biomolecole possono essere immobilizzate sulla superficie delle nanoparticelle, come recettori e peptidi. Infatti, legando sulla loro superficie, ad esempio, acido folico, riconosciuto da cellule tumorali, le nanoparticelle possono essere utilizzate per diagnosi oncologiche *in vitro*. Infine, queste nanoparticelle possono anche essere sfruttate per la realizzazione di vettori di geni e farmaci, proponendosi come una valida alternativa ai vettori virali (34).

1.2 *Analisi in fluorescenza*

1.2.1 *Segnale di fluorescenza*

Le radiazioni elettromagnetiche si propagano sotto forma di quantità discrete di energia denominate quanti (fotoni). La quantità di energia E di un quanto è determinata dalla legge di Planck

$$E = h\nu = \frac{hc}{\lambda} \text{ con:}$$

- h costante di Planck ($6,626 \times 10^{-34}$ J·s);
- c velocità della luce ($2,998 \times 10^8$ m·s⁻¹ nel vuoto);
- ν frequenza della radiazione;
- λ lunghezza d'onda della radiazione.

Quando una molecola assorbe un fotone, uno dei suoi elettroni viene trasferito dal suo orbitale molecolare di base (a energia più bassa, che rappresenta lo stato fondamentale) a uno superiore, a maggiore energia. Passato allo stato eccitato, l'elettrone vi rimane per un po' di tempo per poi decadere nuovamente allo stato fondamentale, mediante un processo non radiativo chiamato "conversione interna", nel momento in cui l'elettrone subisce un rilassamento vibrazionale.

La fluorescenza è un fenomeno per il quale la molecola eccitata decade al suo stato energetico fondamentale, emettendo un fotone rilevabile in una scala temporale dell'ordine di grandezza di 10^{-9} s. Come si può osservare dalla Figura 1.12, esistono diversi fenomeni di luminescenza che si verificano nei vari livelli energetici che caratterizzano le molecole. L'emissione di fluorescenza avviene dal livello elettronico eccitato più basso (S1) e questo assicura che lo spettro di emissione rimanga sempre lo stesso, indipendentemente dalla lunghezza d'onda di eccitazione. L'energia del fotone emesso è quindi inferiore rispetto all'energia corrispondente utilizzata per l'eccitazione, cioè l'emissione avviene ad una lunghezza d'onda maggiore rispetto a quella dell'eccitazione, a causa della perdita di energia che si ha durante la fase di conversioni interne e di rilassamento vibrazionale. Lo spostamento della lunghezza d'onda di emissione rispetto alla lunghezza d'onda di eccitazione è chiamato "*Stokes shift*". Un altro processo di luminescenza predominante è rappresentato dalla fosforescenza: essa si verifica quando l'elettrone eccitato passa ad un livello energetico di "tripletto" (attraverso un processo noto come *intersystem crossing* – ISC) a cui corrisponde un valore energetico inferiore rispetto al corrispondente stato di "singoletto": tale differenza è dovuta al fatto che gli elettroni nello stato di "tripletto" presentano *spin* paralleli che provocano una repulsione tale per cui, secondo il principio di Pauli, gli elettroni non possono occupare simultaneamente lo stesso orbitale. Il principio di esclusione di Pauli implica che, in seguito ad una eccitazione, è favorita la formazione di uno stato di "singoletto" rispetto a quello di "tripletto", per cui è necessaria un'ulteriore transizione di *spin* per formarsi. Gli elettroni con *spin* paralleli eseguono una transizione lenta per ritornare allo stato fondamentale dallo stato di "tripletto" e tale passaggio avviene tramite l'emissione di un fotone di fosforescenza, l'inversione del processo ISC,

oppure l'emissione di un fotone di fluorescenza ritardato. La fosforescenza è un fenomeno che si verifica su scale temporali dell'ordine di grandezza compreso tra i millisecondi e le centinaia di secondi (35).

In diversi ambiti scientifici, si ricorre ormai al fenomeno della fluorescenza come metodo non distruttivo per tener traccia o analizzare molecole biologiche attraverso un'emissione fluorescente associata.

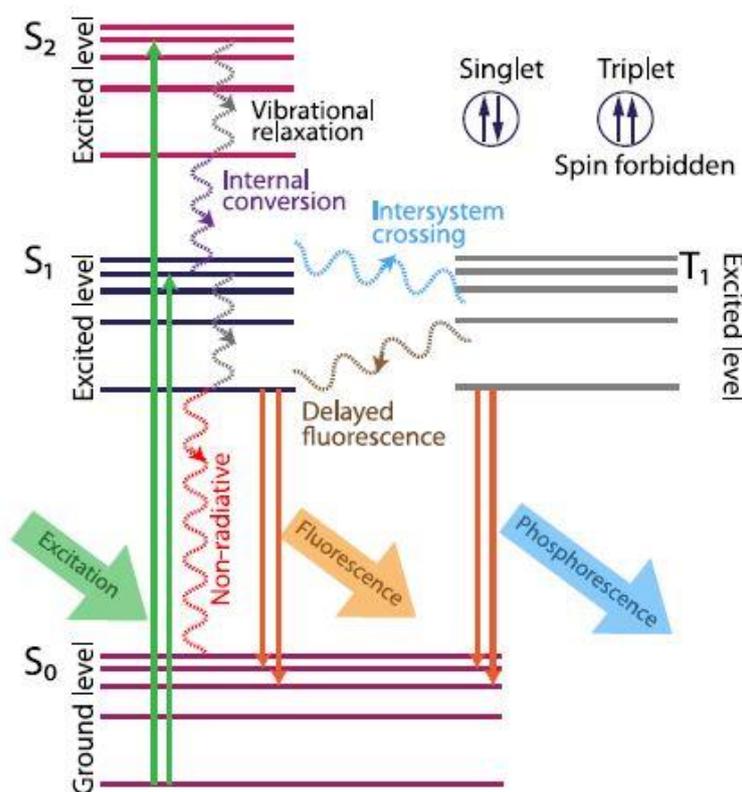


Figura 1.12 Rappresentazione schematica del diagramma di Jablonski che riassume i vari tipi di transizioni (radiative e non) tra i livelli energetici a cui possono dare luogo le molecole (35).

1.2.2 Fluorocromi

Un fluorocromo è una molecola, naturale o artificiale che, eccitata da un fascio di luce ad una specifica lunghezza d'onda, è in grado di emettere una luce di energia inferiore. Le lunghezze d'onda alle quali un fluorocromo è eccitato e lo spettro luminoso di emissione sono caratteristiche distinte di ogni molecola fluorescente. Si può considerare una suddivisione dei fluorocromi in tre diversi gruppi, in base alla loro natura: piccole molecole, come l'isotiocianato di fluoresceina (FITC) e le cianine (Cy), grandi molecole a base proteica, ad esempio la ficoeritrina (PE), l'alofocianina (APC) e la *Green Fluorescence Protein* (GFP), oppure nanocristalli inorganici fluorescenti, come i *quantum dots* (36). La GFP è particolarmente interessante perché può essere fatta esprimere, o sovraesprimere, in tantissimi diversi organismi (batteri, lieviti, funghi) ma anche in cellule umane, sfruttando l'uso delle moderne tecniche di biologia molecolare. Essa emette una fluorescenza verde molto stabile grazie alla sua struttura e, negli ultimi anni, è stata utilizzata moltissimo per visualizzare dei prodotti genici all'interno

delle cellule. La GFP rappresenta solo il capostipite di una serie di proteine fluorescenti; ad oggi se ne conoscono più di 57 con diversi colori di emissione e questo permette di marcare contemporaneamente più proteine target (37). Quelli citati finora sono fluorocromi singoli, ma esiste anche un'altra tipologia di fluorocromi, chiamati "fluorocromi tandem", costituiti da due fluorocromi accoppiati tra loro, di diverse dimensioni: quello che viene eccitato da un impulso luminoso rappresenta il donatore, il quale a sua volta trasmette l'eccitazione alla seconda molecola fluorescente, chiamata accettore, che emette la sua fluorescenza. Il meccanismo appena descritto prende il nome di trasferimento di energia per risonanza (abbreviato in FRET – *Förster Resonance Energy Transfer*, da *Theodor Förster*, colui che descrisse per primo questo fenomeno, nel 1959). I coloranti tandem sono stati realizzati soprattutto con l'obiettivo di aumentare il numero di fluorocromi disponibili per eseguire studi di ricerca e analisi, sfruttando un'unica lunghezza d'onda di eccitazione, anche se risultano più inclini al *photobleaching* (ovvero alla dissolvenza o degradazione con l'esposizione prolungata alla luce) rispetto ai fluorocromi singoli (36). Al contrario della GFP, utilizzata soprattutto nelle tecniche di biologia molecolare, gli altri fluorocromi citati vengono utilizzati coniugati ad anticorpi o ad altre proteine di *targeting*. Questi anticorpi coniugati con fluorocromi sono utilizzati nelle tecniche di immunofluorescenza come, ad esempio, la citometria a flusso. L'obiettivo di questi reagenti è quello di rendere visibile il grado di espressione di un determinante antigene (espresso dalle cellule presenti nel campione in analisi) mediante il legame antigene-anticorpo fluorescente.

La selezione dei diversi fluorocromi per eseguire una particolare analisi è guidata da diversi criteri: si studiano i profili di fluorescenza (eccitazione ed emissione), la luminosità relativa, l'eventuale sovrapposizione della fluorescenza se è necessario utilizzare più di una molecola fluorescente, la densità antigenica dell'antigene da ricercare e, infine, la stabilità del fluorocromo considerato (38).

1.2.3 Microscopio a fluorescenza

La microscopia a fluorescenza è uno strumento di *imaging* biomedico di base che fornisce immagini ad alta risoluzione con contrasto molecolare in campioni viventi. Il campione da analizzare, costituito principalmente da organismi come cellule, batteri o tessuti, contiene un fluorocromo che può essere già presente nel campione da analizzare oppure venire immesso dall'esterno.

Diversamente dal microscopio ottico, che utilizza la luce visibile per catturare l'immagine del campione posto sotto l'obiettivo e trasmetterla all'oculare, il microscopio a fluorescenza utilizza come sorgente luminosa una lampada ad arco a vapori di mercurio che emette una luce nel campo dell'ultravioletto. L'efficienza della luce viene amplificata grazie alle proprietà fluorescenti dei fluorocromi che vengono aggiunti al campione. Va precisato che, l'osservatore che utilizza questo microscopio analizza la luce emessa dal campione e non la luce che attraversa il campione (come invece avviene con il microscopio ottico tradizionale). Secondo lo schema generale mostrato qui di seguito in figura 1.13, la luce utilizzata per l'eccitazione viene isolata mediante l'uso di un filtro d'eccitazione e in seguito indirizzata al campione. Successivamente, la fluorescenza emessa dal campione in analisi

passa attraverso un filtro di emissione, il quale blocca tutte le lunghezze d'onda da eliminare poiché non determinate dal fluorocromo utilizzato. Al fine di permettere l'utilizzo di più fluorocromi i microscopi a fluorescenza prevedono varie unità filtranti, sia di eccitazione sia di emissione (39).

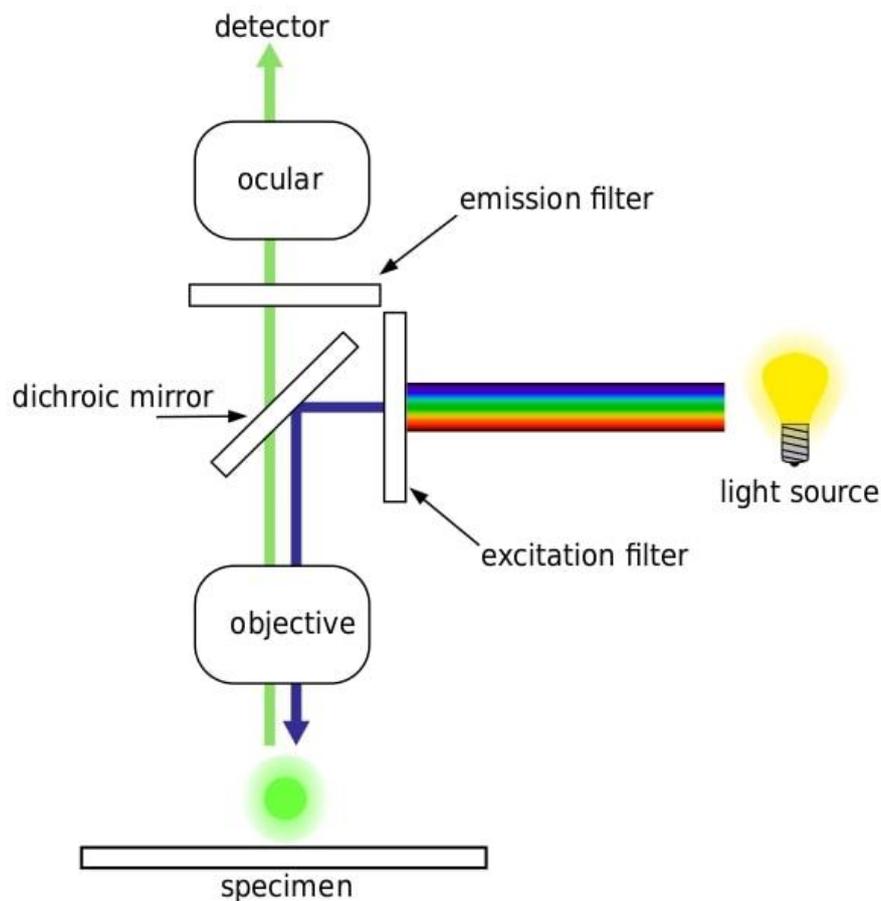


Figura 1.13 Schema generale di un microscopio a fluorescenza in cui la sorgente luminosa può essere rappresentata da una lampada o da un laser (39).

I microscopi a fluorescenza maggiormente utilizzati sono quelli ad epifluorescenza, caratterizzati da un'illuminazione dall'alto. Tra i principali elementi che costituiscono questo strumento, oltre alla lampada a vapori di mercurio già citata, sono il filtro di eccitazione, lo specchio dicroico e il filtro di sbarramento. Il filtro di eccitazione viene utilizzato dall'osservatore per regolare la lunghezza d'onda della luce ultravioletta, la quale determina il colore con cui si presenta il campione (verde, rosso o blu). Il filtro di sbarramento è un accessorio indispensabile per la sicurezza dell'operatore: si tratta di un filtro giallo, realizzato in plexiglass o in altro materiale trasparente, appositamente trattato per proteggere gli occhi dalla luce ultravioletta, in quanto un contatto, anche minimo, con questi raggi potrebbe danneggiare la vista in modo irreversibile. Lo specchio dicroico, invece, è un vetro contenente microstrati di ossidi metallici che conferiscono particolari proprietà ottiche: la principale caratteristica è il colore della luce riflessa che risulta cangiante, cioè cambia il colore con il variare dell'incidenza della luce. Sebbene non venga mostrato nello schema di Figura 1.13, è importante citare anche il

condensatore a campo scuro: si tratta di un sistema di lenti che convoglia la luce verso l'obiettivo e dall'obiettivo verso l'oculare. Nel microscopio ottico tradizionale questo elemento è a sfondo bianco; nel microscopio a fluorescenza, invece, si preferisce un campo scuro per favorire il contrasto con il campione da analizzare (40).

Nelle analisi di microscopia a fluorescenza non va assolutamente sottovalutata la fase di preparazione del campione: l'uso di fluorocromi, infatti, rende necessarie alcune modalità di allestimento particolari, in quanto le molecole fluorescenti possono essere soggette al fenomeno di *photobleaching* che consiste nella riduzione dell'intensità del segnale fluorescente. Questo fenomeno è particolarmente evidente quando i campioni sono esposti alla luce ambientale (bianca), per questo nella fase di preparazione dei campioni, così come nella fase di osservazione al microscopio, è indispensabile lavorare in condizioni di minima illuminazione.

Per completezza, va citato anche il microscopio confocale a scansione laser: si tratta di una modificazione del microscopio ad epifluorescenza che permette di ottenere delle immagini fluorescenti con un'elevatissima risoluzione ed un maggiore contrasto. La differenza maggiore rispetto al microscopio ottico a fluorescenza è la sorgente luminosa, rappresentata da un laser. Questo comporta una serie di vantaggi: i fotoni sono paralleli e monocromatici per le caratteristiche intrinseche del laser (che emette fotoni ad una singola lunghezza d'onda) evitando così la formazione di interferenze o aloni che limitano la qualità dell'immagine; inoltre, è possibile ottenere immagini tridimensionali variando il piano di messa a fuoco del campione per acquisire più sezioni ottiche successive. (41).

In questo lavoro di tesi le analisi in fluorescenza vengono eseguite su un microscopio a epifluorescenza in cui la sorgente luminosa è fornita da una lampada a vapori di mercurio.

2 Scopo della tesi

Le nanoparticelle di silice fluorescenti rappresentano un interessante strumento per la ricerca in campo biomedico. Tra le tante applicazioni possibili è compreso anche il loro utilizzo come sistemi per *drug delivery*, progettati per ottenere un miglioramento delle terapie attuali. La forma sferica consente di concentrare il principio attivo che viene quindi recapitato, grazie a specifiche molecole di *targeting*, solo nel sito dove deve esercitare la sua azione.

Lo scopo di questo lavoro di tesi è analizzare, attraverso la valutazione dell'intensità di fluorescenza, il grado di *uptake* di quattro diverse linee cellulari tumorali a cui viene applicato un trattamento a base di nanoparticelle di silice. I parametri considerati sono il tempo di applicazione del trattamento e la concentrazione della sospensione nanoparticellare. L'ottimizzazione di tali parametri permette di comprendere le caratteristiche del *tool* "nanoparticella" con l'obiettivo di modificarne le caratteristiche per renderlo uno strumento utile in una svariata moltitudine di applicazioni biomedicali.

Il protocollo applicato ad ogni linea cellulare presa in esame è il medesimo: dopo la conta delle cellule sono state seminate in piastre a 6 pozzetti, mantenute in coltura per 24 ore, al termine delle quali è stato applicato il trattamento a base di nanoparticelle. Sono state utilizzate tre diverse concentrazioni di nanoparticelle e le analisi al microscopio a fluorescenza sono state eseguite dopo 4, 24 e 48 ore di incubazione. Il segnale della fluorescenza mostra una correlazione in funzione sia della concentrazione del trattamento sia del periodo di incubazione. Si ipotizza anche una correlazione della fluorescenza con il tempo di replicazione delle cellule (diverso a seconda della linea cellulare presa in esame).

3 Parte sperimentale

3.1 Nanoparticelle

Per il trattamento da somministrare alle linee cellulari analizzate sono state scelte nanoparticelle di silice fluorescenti con struttura *core-shell*, precedentemente sintetizzate presso i laboratori AcZon mediante sintesi di Stöber modificata. Si tratta di nanoparticelle NF_G575 contenenti Rodamina isotiocianato come fluoroforo e con le seguenti caratteristiche:

Dimensioni [nm]	17.0±1.0
Indice di polidispersione	0.237
Residuo fisso [mg/mL]	7.4
Concentrazione di fluoroforo [μ M]	147
Coefficiente di estinzione molare [$\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$]	54600
Potenziale ζ [mV]	-6.3±1.3
Funzionalizzazione	Assente
Massimo di assorbimento [nm]	557
Massimo di emissione [nm]	578

Tabella 3.1 Caratteristiche delle nanoparticelle NF_G575.

Dopo la sintesi (dettagliata nel paragrafo 1.1.5) si procede con un trattamento di dialisi: le nanoparticelle vengono poste dentro una membrana da dialisi che presenta dei pori di dimensione pari a 30 kDa, la quale viene completamente immersa in una soluzione acquosa. La porosità della membrana è progettata appositamente per permettere lo spostamento esclusivo del solvente, il soluto non riesce a passare. Dopo 96 ore, durante le quali si procede con almeno una sostituzione della soluzione acquosa, si ottengono nanoparticelle in sospensione di ddH₂O. L'obiettivo della dialisi è quello di eliminare l'agente preservante Proclin™ 950 che viene utilizzato per inibire la crescita batterica durante lo stoccaggio delle nanoparticelle e che, però, esercita un effetto citotossico sulle colture cellulari.

Post dialisi si procede con una filtrazione della soluzione utilizzando filtri in PES (0.22 μ m) a siringa, in ambiente sterile, per eliminare eventuali contaminanti. A questo punto le nanoparticelle sono pronte per essere utilizzate sulle linee cellulari.

3.2 Linee cellulari

Tutte le linee cellulari scelte per questi esperimenti crescono in adesione in condizioni standard (incubatore a 37°C con il 5% di CO₂), in un terreno costituito dal mezzo base RPMI 1640 con

glutammina, arricchito con il 10% di siero fetale bovino (FBS) e l'1% di penicillina/ streptomicina (10000U – 10mg/mL).

3.2.1 A375

Si tratta di una linea di cellule di melanoma cutaneo umano caratterizzata da un tempo di duplicazione di 6 – 12 ore e da una forma allungata fibroblastoide (42). La tabella 3.2 riassume le caratteristiche di questa linea cellulare.

Organismo	<i>Homo sapiens</i>
Organo	Pelle
Provenienza	Melanoma
Tempi di replicazione	6 – 12 ore
Coltura	In adesione

Tabella 3.2 Caratteristiche della linea cellulare A375.

3.2.2 COLO-320

È una linea cellulare isolata da un adenocarcinoma moderatamente indifferenziato del sigma, il segmento del colon più variabile per lunghezza e conformazione. Le cellule della linea stabilizzata crescono in adesione e hanno un caratteristico aspetto rotondeggiante. Il loro tempo di duplicazione si aggira intorno alle 26 ore (43). La tabella 3.3 riassume le caratteristiche di questa linea cellulare.

Organismo	<i>Homo sapiens</i>
Organo	Colon
Provenienza	Adenocarcinoma colon-retto
Tempi di replicazione	26 – 30 ore
Coltura	In adesione

Tabella 3.3 Caratteristiche della linea cellulare COLO-320.

3.2.3 MCF7

Questa linea cellulare proviene da un adenocarcinoma mammario ed è comunemente usata come modello in vitro per gli studi sul cancro della mammella umano. La principale caratteristica è attribuita all'espressione di particolari recettori in grado di riconoscere gli estrogeni; i tempi di duplicazione, secondo la letteratura, si aggirano intorno alle 30 ore (44). La tabella 3.4 riassume le sue caratteristiche.

Organismo	<i>Homo sapiens</i>
Organo	Mammella
Provenienza	Adenocarcinoma mammario
Tempi di replicazione	30 ore
Coltura	In adesione

Tabella 3.4 Caratteristiche della linea cellulare MCF7.

3.2.4 *SkBr3*

Come le MCF7, si tratta di cellule provenienti da un adenocarcinoma mammario. Questa linea è caratterizzata da una overespressione del gene HER2, implicato in diversi *pathways* di proliferazione del cancro al seno (45). I tempi di replicazione stimati variano molto e sono compresi tra le 30 e le 48 ore (46). La tabella 3.5 riassume le caratteristiche di questa linea cellulare.

Organismo	<i>Homo sapiens</i>
Organo	Mammella
Provenienza	Adenocarcinoma mammario
Tempi di replicazione	30 – 48 ore
Coltura	In adesione

Tabella 3.5 Caratteristiche della linea cellulare SkBr3.

3.3 *Materiali e metodi*

3.3.1 *Colture cellulari*

Per la preparazione delle colture cellulari sono stati utilizzati i seguenti materiali:

- Terreno RPMI 1640 con Glutamina (Sigma Aldrich) addizionato con il 10% di FBS (*Foetal Bovine Serum*) (GIBCO) e l'1% di Streptomicina/Penicillina (Sigma Aldrich);
- Tripsina/EDTA 1X (Sigma Aldrich);
- PBS 1X (tampono fosfato salino 0,01 NaPi/0,15NaCl);
- Trypan Blue 0,4% (Invitrogen);
- Hoechst 33342 (Invitrogen);
- Fiasche T25;
- Piastre *multiwell* 6 pozzetti;
- Vetrini coprioggetto 22x22 mm (Thermofisher);
- Camera di Neubauer.

Tutte le linee cellulari vengono conservate in azoto liquido; per ogni linea cellulare si esegue lo stesso protocollo. Si preleva la *vial* dal contenitore di azoto liquido e si procede con lo scongelamento in un bagnetto termostato a 37°C tramite agitazione manuale. Il contenuto della *vial* viene trasferito in un tubo da centrifuga da 15 mL precedentemente riempito con 11 mL di terreno completo al 10% di FBS. È importante trasferire la sospensione cellulare goccia a goccia per evitare lo shock termico causato dal repentino cambio di temperatura ma è altrettanto importante agire rapidamente per limitare il contatto delle cellule con DMSO (dimetilsolfossido, C₂H₆SO) in forma liquida, agente di crioprotezione che risulta citotossico a temperature vicine a 37°C. Si procede con la centrifugazione a 1100 rpm per 5 minuti a temperatura ambiente. Successivamente il terreno viene eliminato per inversione e il pellet risospeso in 1 mL di terreno completo. Si preparano 2 fiasche T25 con 4 mL di terreno completo al 10% e si aggiungono 0.5 mL di sospensione cellulare per ogni fiasca. Viene fatto un ulteriore lavaggio del tubo da centrifuga con 1 mL di terreno, poi suddiviso nelle due T25, per recuperare tutte le cellule. Si lavora in camera colture, sotto cappa a flusso laminare. Le due fiasche vengono depositate in incubatore per mantenere la coltura in condizioni standard (37°C, CO₂ al 5%). È necessario monitorare la coltura tramite osservazione al microscopio ottico e *splittare* (suddividere) il contenuto delle fiasche quando si raggiunge una confluenza del 80-90%. Si mantiene la coltura fino al raggiungimento di un numero di cellule sufficiente per applicare il trattamento con le nanoparticelle.

Le tempistiche utilizzate sono state mantenute le stesse per ogni coltura cellulare: considerando il tempo 0 il momento dell'avvio della coltura cellulare, dopo 48 ore il contenuto delle due fiasche veniva suddiviso in quattro T25 affinché le cellule continuassero a proliferare. Questa operazione era prevista nuovamente dopo altre 48 ore. Successivamente, dopo 72 ore, si procedeva con la conta cellulare e, in seguito, si seminavano le piastre *multiwell* utilizzate per l'applicazione del trattamento. Infine, il trattamento veniva somministrato dopo 24 ore dalla semina in piastra.

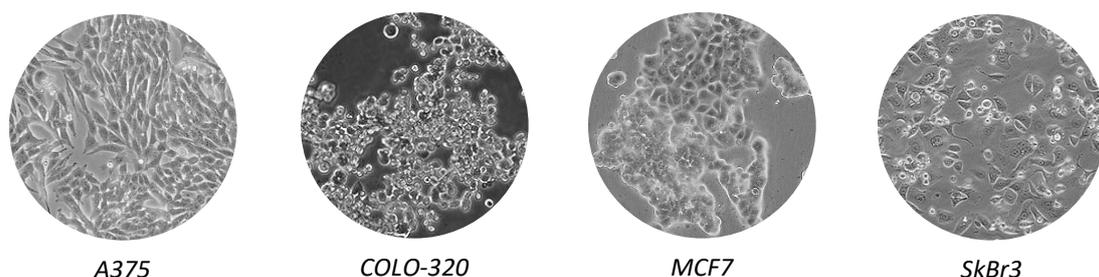


Figura 3.1 Analisi delle linee cellulari al microscopio ottico

3.3.2 Conta cellulare

Prima della semina nelle piastre *multiwell* le cellule vengono contate con l'utilizzo della camera di Neubauer: si rimuove il terreno esausto dalle fiasche, si aggiungono 3 mL di Tripsina/EDTA per staccare le cellule, si lascia agire per 5 minuti in incubatore. Una volta accertato il distacco, si

aggiungono 6 mL di terreno completo al 10% di FBS per disattivare la tripsina, si trasferisce la sospensione in un tubo da centrifuga da 15 mL e si procede con la centrifugazione (1100 rpm per 5 min). Il pellet ottenuto viene risospeso in 10 mL di terreno completo.

In un tubo da centrifuga da 1,5 mL vengono aggiunti 90 µl di Trypan Blue e 10 µl di sospensione cellulare (diluizione 1:10). Si procede con l'inserimento di tale soluzione nella camera di Neubauer precedentemente montata. Al microscopio ottico, con l'ingrandimento 10X, si contano le cellule presenti nei 4 quadranti delle due camere. Il numero di cellule presenti in 1 mL è calcolato con la seguente formula:

$$\frac{n^{\circ} \text{ cellule contate}}{n^{\circ} \text{ quadranti}} \cdot \text{fattore di diluizione (10)} \cdot \text{fattore di conversione di Neubauer (10.000)}$$

Moltiplicando il risultato per il volume di terreno in cui le cellule sono state risospese si ottiene il numero totale di cellule.



Figura 3.2 Camera di Neubauer

Seguendo il procedimento appena descritto, i calcoli delle concentrazioni relative alle quattro linee cellulari prese in esame hanno prodotto i seguenti risultati:

- A375 = 1.250.000 cellule/mL
- COLO-320 = 1.241.600 cellule/mL
- MCF7 = 1.164.000 cellule/mL
- SkBr3 = 937.500 cellule/mL

3.3.3 Applicazione del trattamento

La piastra *multiwell* a 6 pozzetti viene preparata aggiungendo un vetrino coprioggetto 22x22 mm. Si procede con la semina di 1 mL di sospensione cellulare in ogni pozzetto, lavorando sempre sotto cappa a flusso laminare. Per ogni linea cellulare vengono seminati 4 pozzetti di 3 piastre *multiwell* (una piastra per ogni tempo di incubazione considerato nelle analisi) secondo il seguente schema:

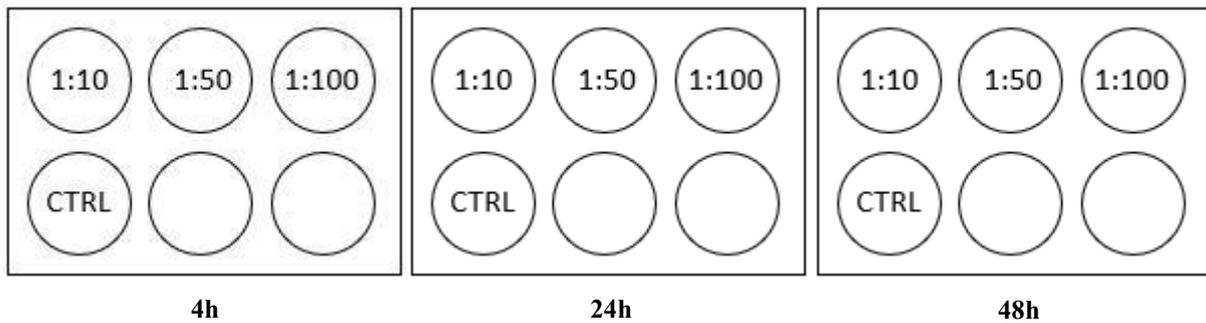


Figura 3.3 Schema piastre multiwell per l'applicazione del trattamento con nanoparticelle

Le cellule seminate vengono lasciate in incubatore per un *overnight*, tempo necessario per aderire e per superare lo *shock* dovuto al distacco enzimatico con tripsina. A questo punto si parte con l'applicazione del trattamento con nanoparticelle. Si preparano le 3 diluizioni con terreno di coltura completo al 10% di FBS. Per ogni diluizione è necessario prevedere 3 mL di sospensione totale in modo da applicare 1 mL di trattamento al corrispondente pozzetto di ogni piastra, considerando che in totale si avranno 3 piastre *multiwell*, una per ogni tempo di incubazione. Per il campione di controllo negativo si utilizza 1 mL di terreno di coltura.

Infine, considerando il residuo fisso (pari a 7,4 mg/mL), per ogni diluizione considerata si calcolano le rispettive concentrazioni di nanoparticelle:

- Diluizione 1:10 – Preparazione della soluzione: 300 μ L di sospensione nanoparticelle/H₂O + 2700 μ L terreno – Concentrazione nanoparticelle = 0,74 mg/mL
- Diluizione 1:50 – Preparazione della soluzione: 60 μ L di sospensione nanoparticelle/H₂O + 2940 μ L terreno – Concentrazione nanoparticelle = 0,148 mg/mL
- Diluizione 1:100 – Preparazione della soluzione: 30 μ L di sospensione nanoparticelle/H₂O + 2970 μ L terreno – Concentrazione nanoparticelle = 0,074 mg/mL



Figura 3.4 Applicazione del trattamento con nanoparticelle sotto cappa

3.3.4 Preparazione vetrini per analisi in fluorescenza

Prima di procedere con le operazioni di preparazione del vetrino, si prende un tubo da centrifuga da 15 mL e si riempie con 4 mL di PBS, a cui si aggiungono 4 μ l (per una diluizione 1:10) di Hoechst 33342, un composto organico usato come colorante fluorescente per il DNA e che quindi, intercalandosi all'acido nucleico, rende evidenti i nuclei cellulari. Il volume considerato serve per aggiungere 1 mL in ogni pozzetto seminato. Tale operazione va eseguita ogni volta che si procede con l'analisi dei quattro vetrini di una piastra *multiwell*.

Le analisi vengono fatte dopo 4, 24 e 48 ore dall'applicazione del trattamento. Si procede con le seguenti operazioni: si rimuove il terreno di coltura con il trattamento dai pozzetti, facendo particolare attenzione a non toccare il vetrino presente in ogni pozzetto (su cui sono adese le cellule) con la punta della pipetta. Si esegue un lavaggio con PBS (1 mL per ogni pozzetto), che poi viene rimosso subito dopo. Quest'ultima operazione va fatta per due volte consecutive per garantire l'eliminazione delle nanoparticelle ancora presenti nel *medium* e di quelle adsorbite blandamente alla membrana cellulare. In ogni pozzetto si aggiunge 1 mL di soluzione Hoechst/PBS e si lascia in incubazione per 10 minuti al buio a temperatura ambiente. Successivamente il trattamento con Hoechst viene rimosso e si ripete un terzo lavaggio con PBS (sempre 1 mL per ogni pozzetto). A questo punto i vetrini possono essere staccati delicatamente con delle pinzette e asciugati con carta assorbente, preservando il più possibile il lato con le cellule. Infine, questi vetrini vengono fissati su vetrini portaoggetti più grandi, posizionando il lato con le cellule a contatto col vetrino. In questo modo i campioni sono pronti per procedere con l'analisi al microscopio a fluorescenza.

3.4 Metodi di analisi

3.4.1 Analisi in microscopia a fluorescenza

Si utilizza un microscopio NIKON Optiphot2 con opportuni filtri: NIKON DM580 per la visualizzazione di nanoparticelle, Omega optical INC. XF 1009/25 per il colorante nucleare. L'acquisizione delle immagini viene eseguita tramite il software NIS-Elements e la CCD camera collegata NIKON Digital Sight DS-Fi1. Si utilizzano 2 obiettivi: 40X e 100X (a immersione). Per ogni campione viene fatta una doppia acquisizione, in modo da avere un'immagine che mostra i nuclei cellulari grazie alla fluorescenza del Hoechst e un'immagine che evidenzia la presenza delle nanoparticelle attraverso la fluorescenza espressa dalla Rodamina contenuta al loro interno per entrambi gli ingrandimenti. Il software permette anche di fare una *merge* delle due immagini, per assicurarsi della loro corretta sovrapposizione (durante il cambio di filtro c'è un minimo rischio che il fuoco venga meno o il tavolo porta-campioni si sposti) e per valutare la localizzazione della fluorescenza dovuta alle nanoparticelle.

Per l'acquisizione di un campione sono previsti i seguenti passaggi: si posiziona il vetrino da osservare sul tavolo porta-campioni; si procede con un'operazione di messa a fuoco del campione di controllo, in modo da non stimolare eccessivamente i campioni trattati, comportando una diminuzione della fluorescenza della Rodamina (che rappresenta il segnale da analizzare). Inserendo i filtri si passa alla modalità in fluorescenza; si perfeziona la messa a fuoco e si sceglie il campo di acquisizione. Il procedimento prosegue con l'acquisizione delle immagini attraverso il sistema di fotocamera digitale. L'ultimo passaggio prevede il salvataggio dell'immagine e una pre-elaborazione dei dati (ad esempio la *merge* per assicurarsi la corretta sovrapposizione delle immagini acquisite con i due diversi filtri).

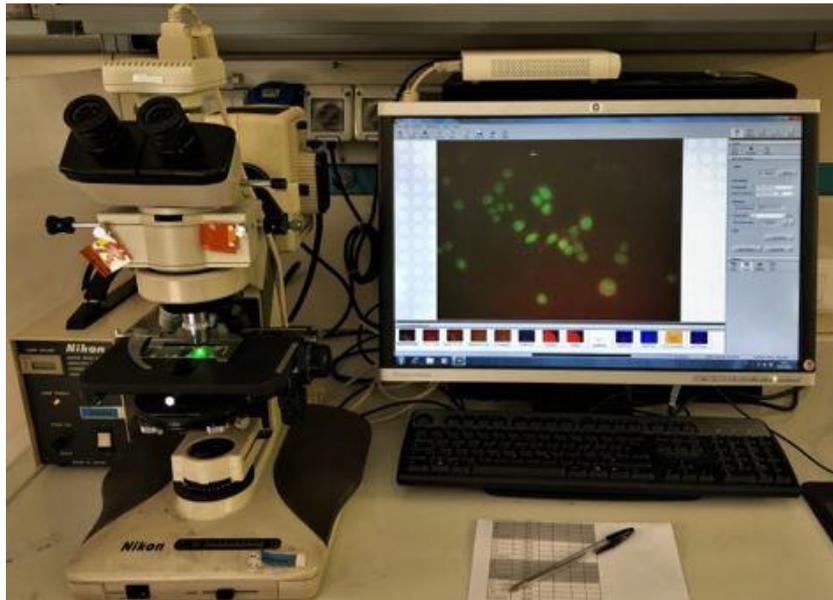


Figura 3.5 Microscopio a fluorescenza del laboratorio AcZon

3.4.2 *Elaborazione dati: ImageJ e Excel*

Le immagini acquisite vengono analizzate ed elaborate con il software ImageJ 1.52v. Come prima operazione si effettua un filtraggio delle immagini per eliminare eventuali disturbi: partendo da un'immagine RGB, si dividono i tre canali di colore in tre immagini separate. Il canale verde corrisponde alla fluorescenza espressa dai nuclei cellulari, il canale rosso invece mostra la fluorescenza espressa dalle nanoparticelle. Il canale blu può essere eliminato in quanto non preso in considerazione in questi esperimenti. Le due immagini corrispondenti ai due canali (rosso e verde) vengono salvate e convertite in immagini a 8 bit. Per ogni immagine si apre l'istogramma che mostra la distribuzione dei pixel in funzione della loro intensità. Se i pixel non sono distribuiti su tutti i valori compresi tra 0 e 255, è possibile migliorare il contrasto dell'immagine modificando i valori di massimo e minimo di intensità coerentemente con quanto riportato sull'istogramma.

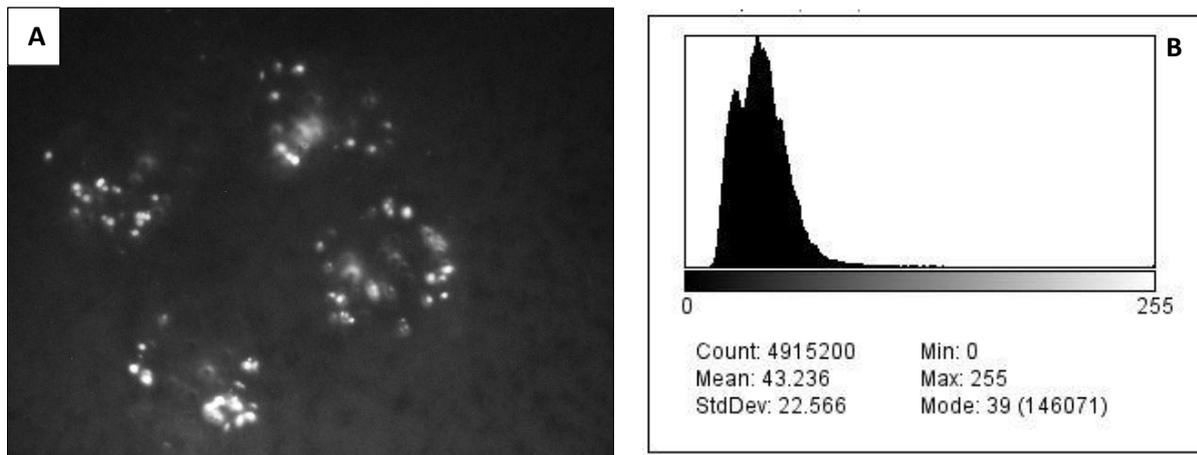


Figura 3.6 (A) Immagine relativa al canale rosso della linea cellulare SkBr3 sottoposta al trattamento di nanoparticelle (diluizione 1:10), dopo un tempo di incubazione di 24 ore (ingrandimento 100X). (B) Istogramma dell'immagine A: il picco più a sinistra è rumore riferito al *background* e va rimosso per avere un'immagine più pulita. Per farlo bisogna settare come intensità minima il valore corrispondente alla moda dei pixel (in questo caso corrispondente al valore 39) e come intensità massima il valore corrispondente al massimo (255).

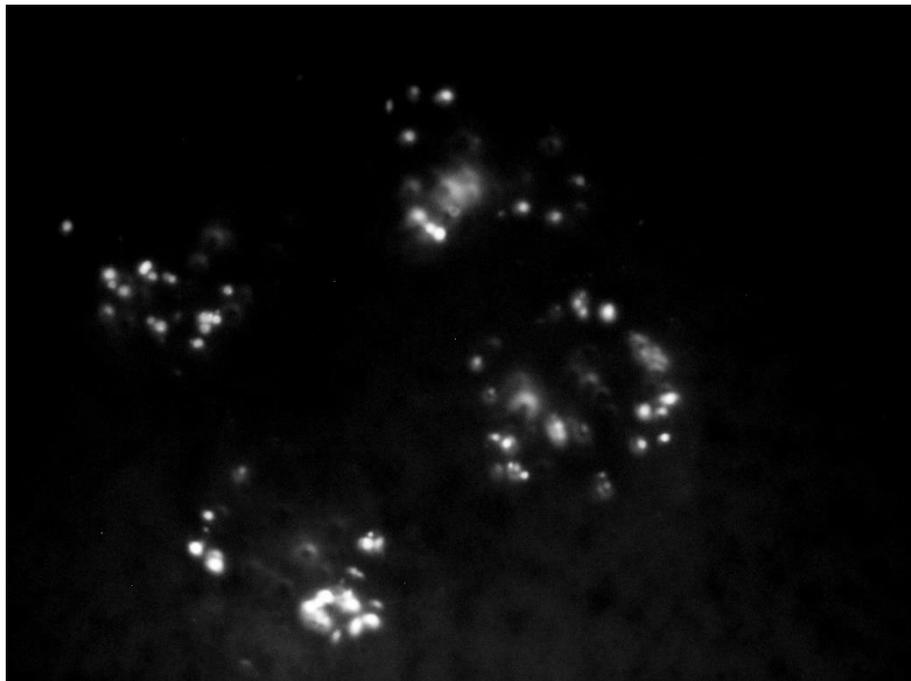


Figura 3.7 Stesso campo analizzato in Figura 3.6 con il contrasto modificato. È evidente la maggiore nitidezza.

In questo modo si eliminano gli eventuali disturbi causati dallo sfondo o da una eccessiva illuminazione esterna. Questa prima operazione viene fatta per ridurre il segnale di *background* visivamente. Infine, si fa una merge dei due canali (rosso e verde) e si salva l'immagine ottenuta.

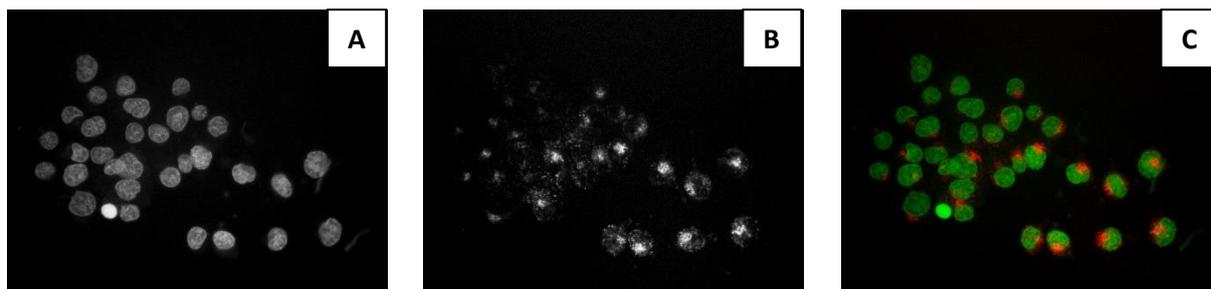


Figura 3.8 Immagini relative alla linea cellulare A375 trattata con sospensione nanoparticellare diluita 1:10 per un tempo di incubazione di 24 ore (ingrandimento 40X). (A) Canale verde che esprime la fluorescenza dei nuclei delle cellule. (B) Canale rosso che esprime la fluorescenza delle nanoparticelle. (C) Merge delle immagini A e B.

Per analizzare l'intensità della fluorescenza espressa dalle nanoparticelle si lavora esclusivamente sulle immagini native del canale rosso (ovvero le immagini non ancora filtrate attraverso l'operazione appena descritta). Da ogni immagine si selezionano 15 aree in cui è presente la fluorescenza e 5 aree corrispondenti al *background*, per determinare la fluorescenza aspecifica, non dovuta alle nanoparticelle. Questa operazione è fortemente operatore – dipendente perché le aree selezionate vengono scelte in modo arbitrario. A differenza del filtraggio eseguito in precedenza, in questo caso si sta eseguendo una rimozione numerica dello sfondo, in modo da procedere con un'analisi dettagliata della fluorescenza. Per evitare di aumentare il numero di variabili da considerare nell'analisi, si è deciso di mantenere costante, per tutte le immagini analizzate, l'area di selezione per valutare la fluorescenza e il *background* da sottrarre.

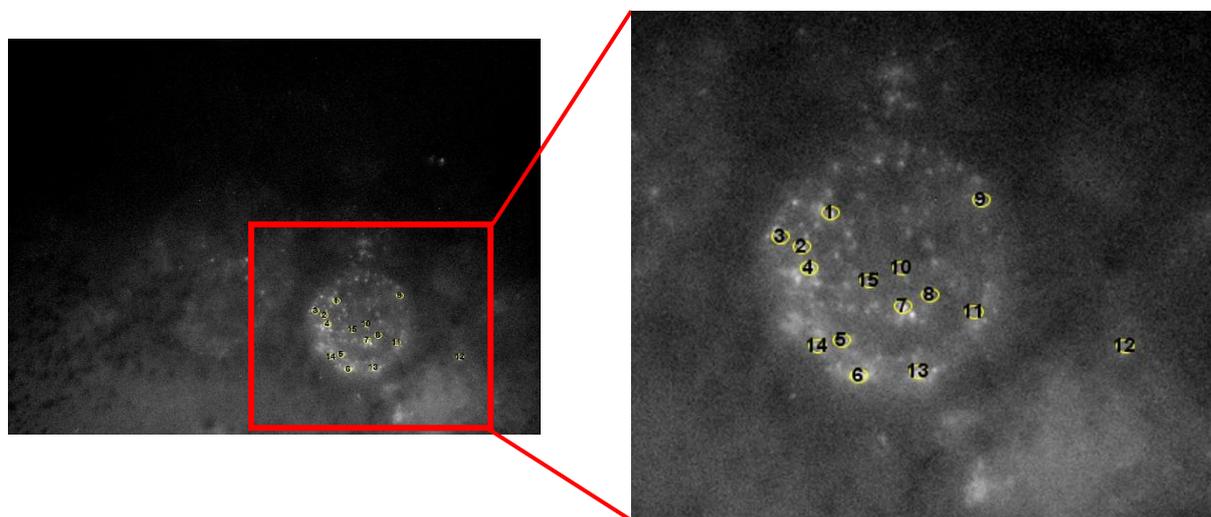


Figura 3.9 Esempio di una selezione delle 15 aree della fluorescenza relative all'immagine della linea cellulare COLO-320 trattata con sospensione nanoparticellare (diluizione 1:10) e mantenuta in incubazione per 48 ore.

I parametri calcolati da ImageJ sono:

- *Area*;
- *Mean Gray value*, cioè il valore medio di intensità dei pixel inclusi nell'area selezionata;

- *StdDev* (deviazione standard dell'intensità dei pixel);
- *Max* e *Min*, ovvero i valori massimo e minimo di intensità dei pixel inclusi;
- *Integrated Density*, cioè il prodotto tra area considerata e Mean Gray value.

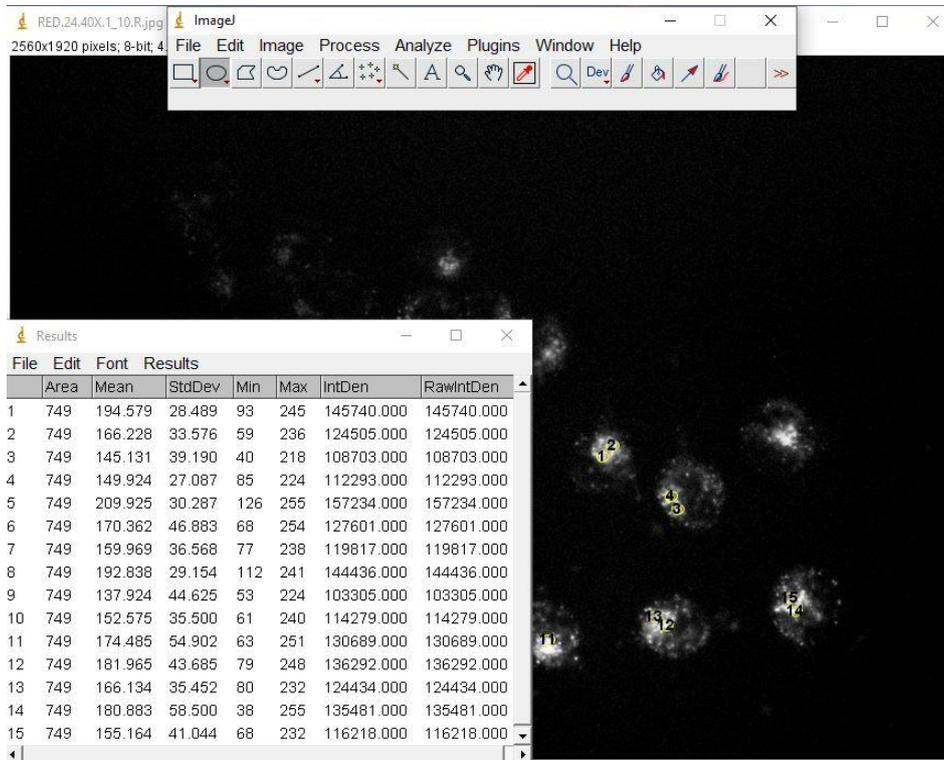


Figura 3.10 Esempio di analisi delle 15 aree selezionate per valutare la fluorescenza delle nanoparticelle.

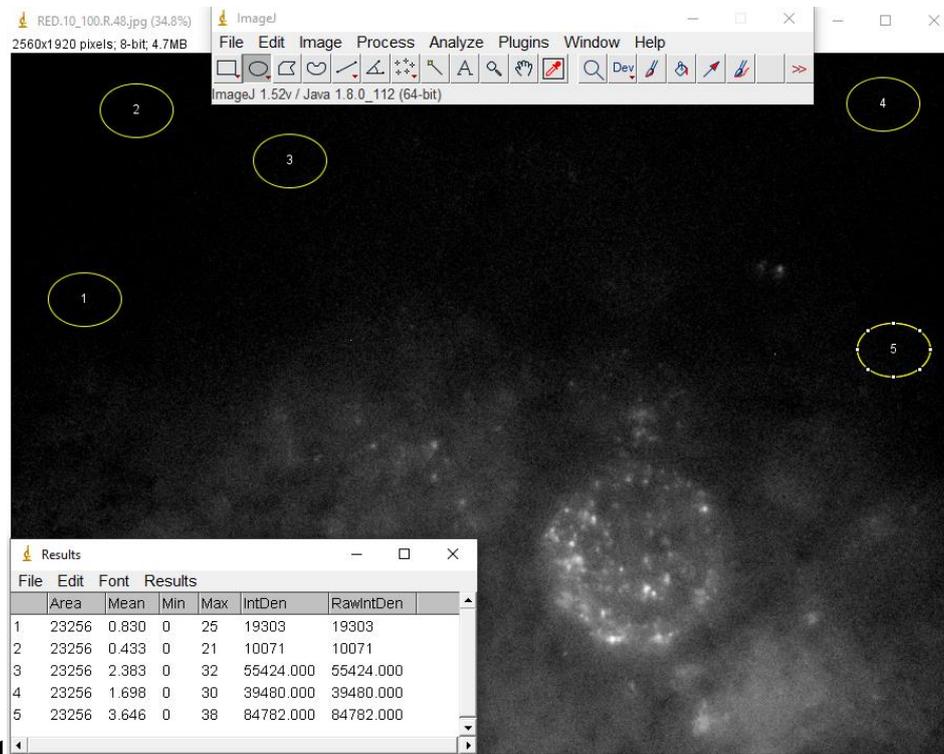


Figura 3.11 selezionati per eliminare la componente di rumore

I dati vengono esportati su Excel per eseguire i calcoli successivi. La fluorescenza totale viene indicata come CTCF (*Corrected Total Cell Fluorescence*) e calcolata con la seguente formula:

$$CTCF = IntDen - (Area\ of\ selected\ cells \cdot Mean\ of\ background)$$

Le analisi vengono fatte su tutti i campioni, compresi quelli di controllo. Si crea un istogramma per ogni campione, da cui si ricava il valore medio e la corrispondente deviazione standard. Infine, i dati ottenuti vengono interpolati tra loro: per ogni linea cellulare si analizza il comportamento di tutte le diluizioni nei diversi tempi di incubazione e ad ogni tempo di incubazione si confrontano le diverse linee cellulari in funzione delle diverse concentrazioni di nanoparticelle.

4 Risultati e discussione

4.1 Microscopia a fluorescenza

4.1.1 Acquisizione delle immagini

Le immagini vengono acquisite al microscopio a fluorescenza. Rispetto al controllo, i campioni con le nanoparticelle non mostrano differenze morfologiche (ovvero forma della cellula e del suo nucleo) e questo porta ad escludere eventuali effetti negativi sulla vitalità delle cellule in seguito all'*uptake* nanoparticellare. La *merge* delle due immagini acquisite utilizzando i due filtri (uno per visualizzare l'Hoechst 33342 e uno per visualizzare la Rodamina) evidenzia il posizionamento delle nanoparticelle principalmente a livello citoplasmatico. Solo in rari casi sembra che le nanoparticelle siano state internalizzate nel nucleo, ma è molto probabile che si tratti di un effetto ottico dovuto al fatto che la coltura cellulare tridimensionale viene trasposta in un'immagine bidimensionale; in realtà le nanoparticelle si trovano in una porzione citoplasmatica che nella terza dimensione si sovrappone al nucleo. Un'analisi in microscopia confocale sarebbe utile per definire l'effettiva localizzazione delle nanoparticelle internalizzate.

Per la fluorescenza della Rodamina si nota una varietà morfologica in funzione della linea cellulare: in alcuni casi si evidenzia una colorazione più diffusa, in contrapposizione con la presenza di *spot* puntiformi ben separati gli uni dagli altri. Questo diverso comportamento potrebbe essere associato alla formazione di aggregazioni nanoparticellari; si potrebbe ipotizzare che in un caso l'*uptake* sia maggiore, ma i valori di fluorescenza associati ai due casi non mostrano differenze significative. Una teoria alternativa riguarda il posizionamento delle nanoparticelle: si pensa che in alcuni casi esse siano confinate all'interno delle vescicole extracellulari (fluorescenza puntiforme) e in altri casi vengano rilasciate da queste ultime (fluorescenza diffusa). Non è escluso inoltre che tale comportamento possa essere dovuto a diversi stati di salute della cellula.

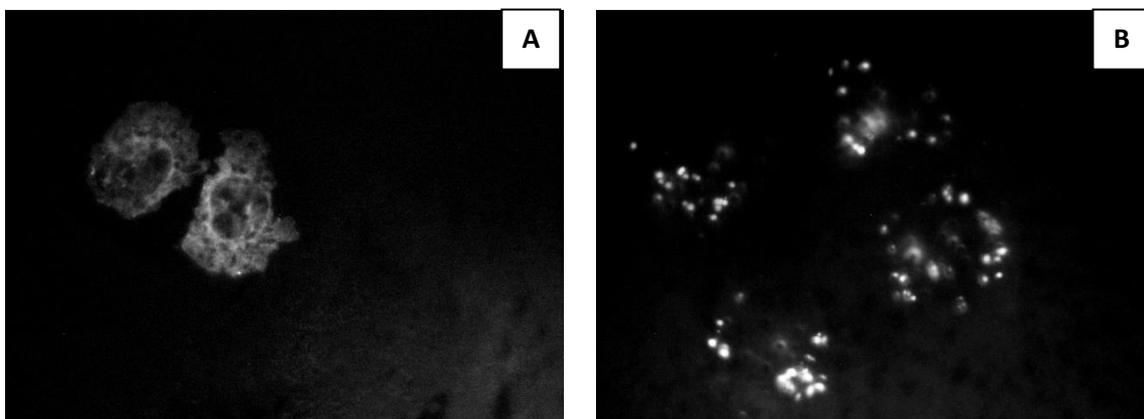


Figura 4.1 Immagini ottenute al microscopio a fluorescenza (ingrandimento 100X) ed elaborate con ImageJ per ottimizzare il contrasto e isolare il canale rosso. (A) La linea cellulare A375 mostra una fluorescenza più diffusa (B) La linea cellulare SkBr3 mostra una fluorescenza più puntiforme.

4.1.2 Elaborazione e merge delle immagini

Dopo aver eseguito l'operazione di *Split Channel* con il software ImageJ, si salvano le due immagini relative al canale rosso e al canale verde e si procede con la loro sovrapposizione (*merge*) sempre utilizzando ImageJ: l'immagine relativa al canale verde esprime la fluorescenza del Hoechst 33342 per visualizzare i nuclei delle cellule, l'immagine associata al canale rosso mette in evidenza la fluorescenza della Rodamina per tenere traccia del posizionamento delle nanoparticelle. L'operazione di *merge* era già stata fatta in fase di acquisizione delle immagini con il software NIS-Elements per assicurarsi della corretta sovrapposizione delle immagini corrispondenti ai due canali di fluorescenza (o più precisamente, per assicurarsi che il tavolo porta-oggetti non avesse subito spostamenti durante il cambio di filtro). Questo passaggio viene ripetuto su ImageJ una volta modificato il contrasto, con il solo scopo di ottenere immagini più nitide.

In tutte le linee cellulari il trattamento effettuato con la sospensione di nanoparticelle alla massima concentrazione (0,74 mg/ml) assicura un buon grado di *uptake* dimostrato dalla presenza della fluorescenza rossa già nelle immagini acquisite dopo 4 ore di incubazione. Con le concentrazioni minori l'internalizzazione avviene in maniera diversificata in funzione della linea cellulare e questo porta a ipotizzare una dipendenza dai tempi di replicazione e dai sistemi di internalizzazione che possono essere diversi a seconda della linea esaminata, anche se non sono stati eseguiti esperimenti mirati a dimostrare tali correlazioni. Il risultato è osservabile nelle seguenti immagini.

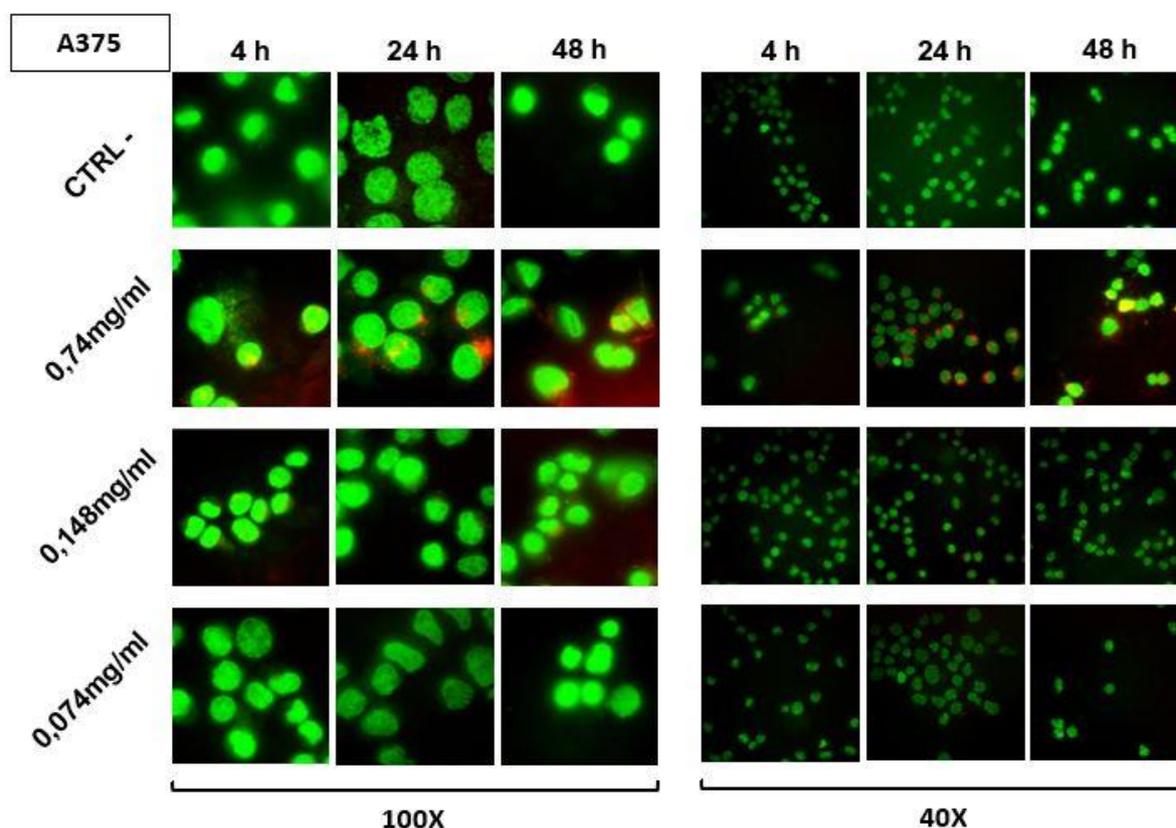


Figura 4.2 Immagini ottenute al microscopio a fluorescenza con obiettivi 100X e 40X della linea cellulare A375.

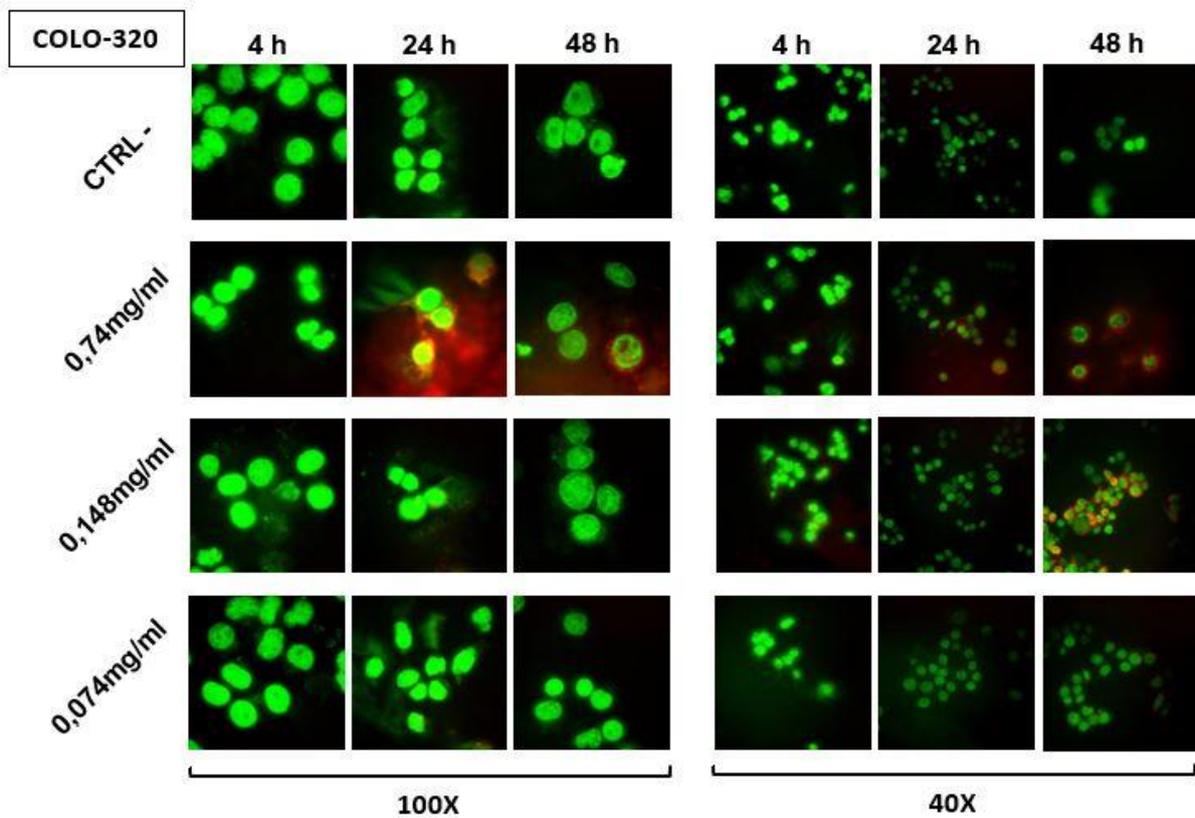


Figura 4.3 Immagini ottenute al microscopio a fluorescenza con obiettivi 100X e 40X della linea cellulare COLO-320.

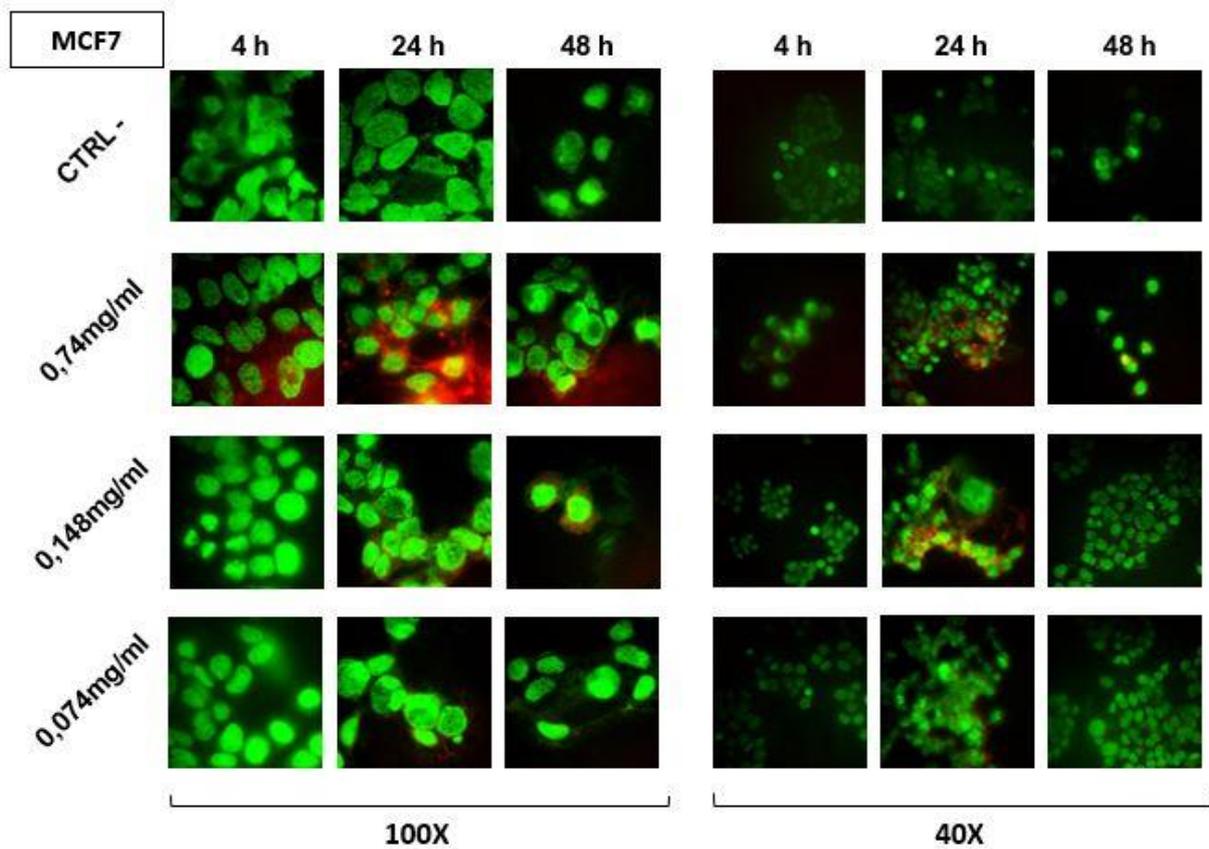


Figura 4.4 Immagini ottenute al microscopio a fluorescenza con obiettivi 100X e 40X della linea cellulare MCF7.

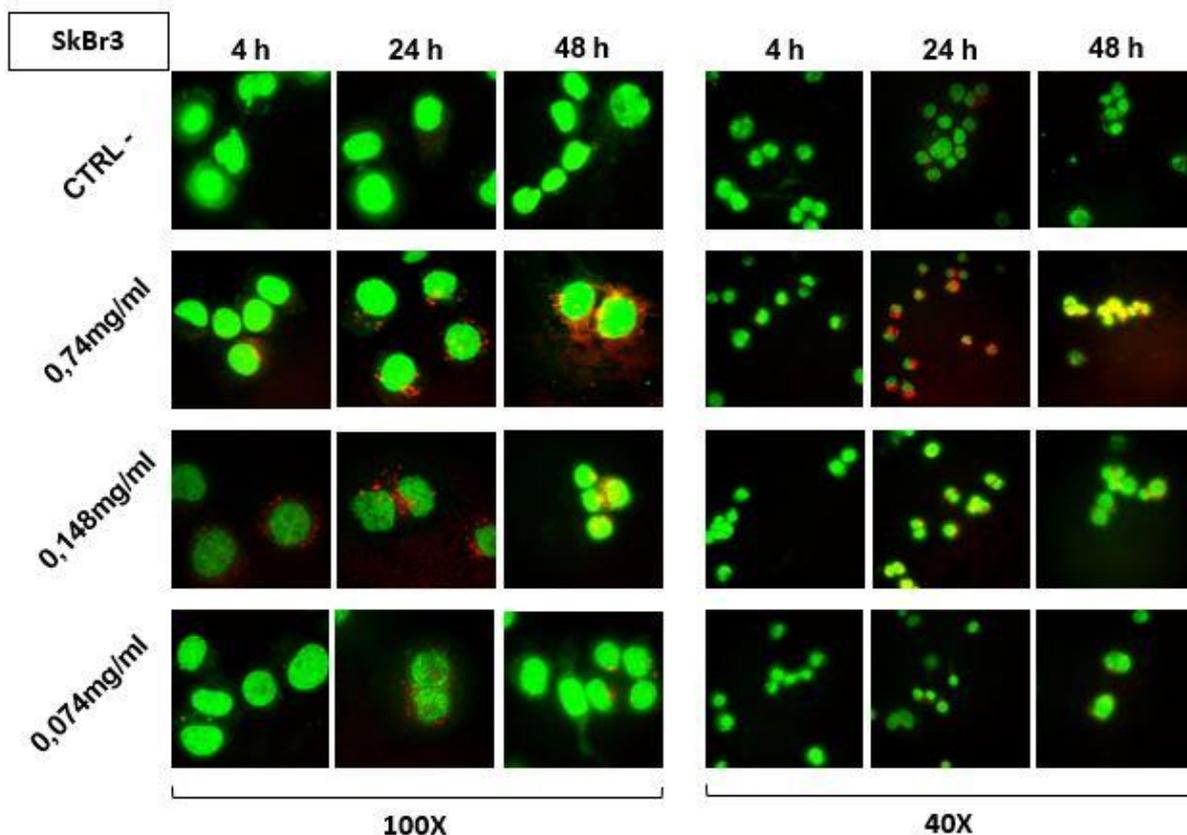


Figura 4.5 Immagini ottenute al microscopio a fluorescenza con obiettivi 100X e 40X della linea cellulare SkBr3.

4.2 Elaborazione del segnale di fluorescenza

Per la valutazione della fluorescenza si applica il metodo descritto in dettaglio nel paragrafo 3.4.2. L'elaborazione viene eseguita solo sulle immagini ottenute dal segnale della Rodamina (relativo alle nanoparticelle) con ingrandimento 100X. Per ogni linea cellulare si considerano 3 campioni trattati con diverse concentrazioni di nanoparticelle e un controllo negativo; le analisi vengono ripetute dopo 4, 24 e 48 ore. Per ogni linea cellulare, quindi, si analizzano 12 diverse immagini. Per ogni immagine si scelgono 15 aree interne alle cellule in analisi, tutte della stessa forma e dimensione, che comprendano nanoparticelle al loro interno. Se non viene prima settata un'unità di misura dall'operatore (come in questo caso), il parametro "Area" visualizzato su ImageJ corrisponde al numero dei pixel racchiusi nello spazio selezionato per l'analisi. Segue un'ulteriore selezione di 5 aree (sempre di uguale forma e dimensione) appartenenti al *background* e, per questo, prese al di fuori delle cellule, per andare a sottrarlo al valore di *Integrated Density* in modo da rimuovere eventuale rumore di fondo dovuto a una fluorescenza aspecifica. I dati vengono esportati da ImageJ a Excel e con la formula espressa nel paragrafo 3.4.2 si ricava il valore di CTCF relativo a ciascuna sezione scelta per l'analisi. Dei 15 valori di CTCF si calcola il valore medio e la relativa deviazione standard per procedere con la realizzazione di grafici che aiutano a eseguire un'analisi più generale. Con i dati acquisiti dall'analisi con ImageJ si

crea una tabella per ogni linea cellulare (A375, Colo-320, MCF7, SkBr3), tempo di incubazione (4, 24, 48 ore) e concentrazione del trattamento (3 diluizioni e 1 controllo negativo). Alla fine delle analisi si ottengono 48 tabelle. Di seguito viene riportato, a titolo meramente esemplificativo, un saggio dei dati estrapolati da ImageJ ed elaborati con Excel, dopo l'operazione di selezione delle 15 aree di fluorescenza e delle 5 aree di *background*.

N° campione	Area	Mean	StdDev	Min	Max	IntDen	CTCF
1	749	147	25	78	216	110405	108790
2	749	129	31	53	225	96582	94967
3	749	77	11	31	145	57866	56251
4	749	65	14	26	105	48651	47036
5	749	114	19	64	164	85743	84128
6	749	113	27	64	157	84962	83347
7	749	100	16	67	133	75232	73617
8	749	100	21	41	167	74721	73106
9	749	99	23	47	168	74254	72639
10	749	175	40	91	237	131381	129766
11	749	168	33	102	220	125585	123970
12	749	103	21	24	179	76884	75269
13	749	90	16	32	175	67330	65715
14	749	163	33	96	229	122188	120573
15	749	118	19	66	179	88563	86948
Valori medi	749	118	23	59	180	88023	86408
Dev Std	0	33,1	8,2	25,5	38,5	24769,2	24769

Tabella 4.1 Dati ottenuti dall'elaborazione con il programma ImageJ con cui è stato calcolato il CTCF per ogni campione analizzato e la relativa media e deviazione standard. Questi valori si riferiscono alla linea cellulare A375 trattata con sospensione di nanoparticelle ad una concentrazione pari a 0,74 mg/ml, analizzata dopo 4 ore.

Background	Area	Mean	Min	Max	IntDen
<i>bk</i>	23256	1,011	0	20	23504
<i>bk</i>	23256	2,070	0	27	48134
<i>bk</i>	23256	1,545	0	20	35930
<i>bk</i>	23256	1,422	0	23	33069
<i>bk</i>	23256	4,736	0	34	110134
Valori medi	23256	2,157	0	24,8	50154

Tabella 4.2 Dati ottenuti dalla selezione delle 5 aree del *background*. Questi valori si riferiscono alla linea cellulare A375 trattata con sospensione di nanoparticelle ad una concentrazione pari a 0,74 mg/ml, analizzata dopo 4 ore.

4.3 Confronto dei dati ottenuti

4.3.1 Analisi delle singole linee cellulari

Da tutte le tabelle ottenute come la 4.1 si ricavano i valori di media e deviazione standard relativi al parametro CTCF e vengono raggruppati in una tabella per confrontare i diversi gradi di *uptake* in funzione dei tempi di incubazione e delle linee cellulari scelte.

A375						
	4 h		24 h		48 h	
	CTCF	Dev St	CTCF	Dev St	CTCF	Dev St
0,74 mg/ml	86407,7	24769,2	97406,1	34300,9	126852,8	22278,4
0,148 mg/ml	15067,1	10501,7	26339,0	3300,4	24288,5	8309,7
0,074 mg/ml	8412,1	2178,5	10494,2	7788,5	7121,6	2975,0
CTRL -	2471,6	2342,3	5251,6	1752,3	3620,6	2468,5

COLO-320						
	4 h		24 h		48 h	
	CTCF	Dev St	CTCF	Dev St	CTCF	Dev St
0,74 mg/ml	13668,7	6072,2	152436,5	22101,6	103469,9	19192,5
0,148 mg/ml	9197,7	3184,4	33226,7	11499,2	8635,1	3161,7
0,074 mg/ml	2872,9	1045,0	26098,7	9402,2	6906,2	3123,5
CTRL -	1385,9	492,5	16855,9	6140,1	6014,6	4844,0

MCF7						
	4 h		24 h		48 h	
	CTCF	Dev St	CTCF	Dev St	CTCF	Dev St
0,74 mg/ml	97680,0	25676,6	141617,9	25174,5	88675,2	19037,3
0,148 mg/ml	10654,6	4291,2	77150,8	15295,1	75003,6	30685,7
0,074 mg/ml	2694,4	838,2	49203,2	13126,6	25051,6	8584,4
CTRL -	2325,2	1257,4	5837,4	1948,3	10022,9	6552,0

SkBr3						
	4 h		24 h		48 h	
	CTCF	Dev St	CTCF	Dev St	CTCF	Dev St
0,74 mg/ml	93606,8	35529,2	146767,3	25138,5	157249,2	20047,8
0,148 mg/ml	74984,2	24021,1	119416,3	24206,2	154977,2	25951,8
0,074 mg/ml	13359,4	81263,0	88826,9	22961,8	81905,2	22934,7
CTRL -	839,1	577,6	16906,6	6401,0	22659,1	5664,2

Tabella 4.3 Valori medi del parametro CTCF e relativa deviazione standard di tutti i campioni analizzati.

Dai dati riportati in tabella emerge che la deviazione standard risulta sempre piuttosto elevata a causa della forte dipendenza della componente umana in fase di analisi con ImageJ: le misure effettuate risentono della variabile operatore in fase di selezione delle ROI (*region of interest*, ovvero delle aree) di cui si vuole valutare la fluorescenza. Questa caratteristica non è da considerarsi un ostacolo per la valutazione, in quanto l'obiettivo finale è capire se il grado di *uptake* risulta sufficiente in tutte le linee cellulari trattate, in modo da procedere con ulteriori sviluppi nell'ambito del *drug delivery* o dell'*imaging*. Inoltre, come detto nel paragrafo 4.1.1, l'internalizzazione può essere più diffusa o puntiforme e anche questa differenza è una possibile spiegazione dei valori elevati della deviazione standard. Infine, va specificato che i valori medi di fluorescenza associati ai campioni di controllo sono sempre molto bassi, ma non nulli, a causa della presenza del rumore dello sfondo.

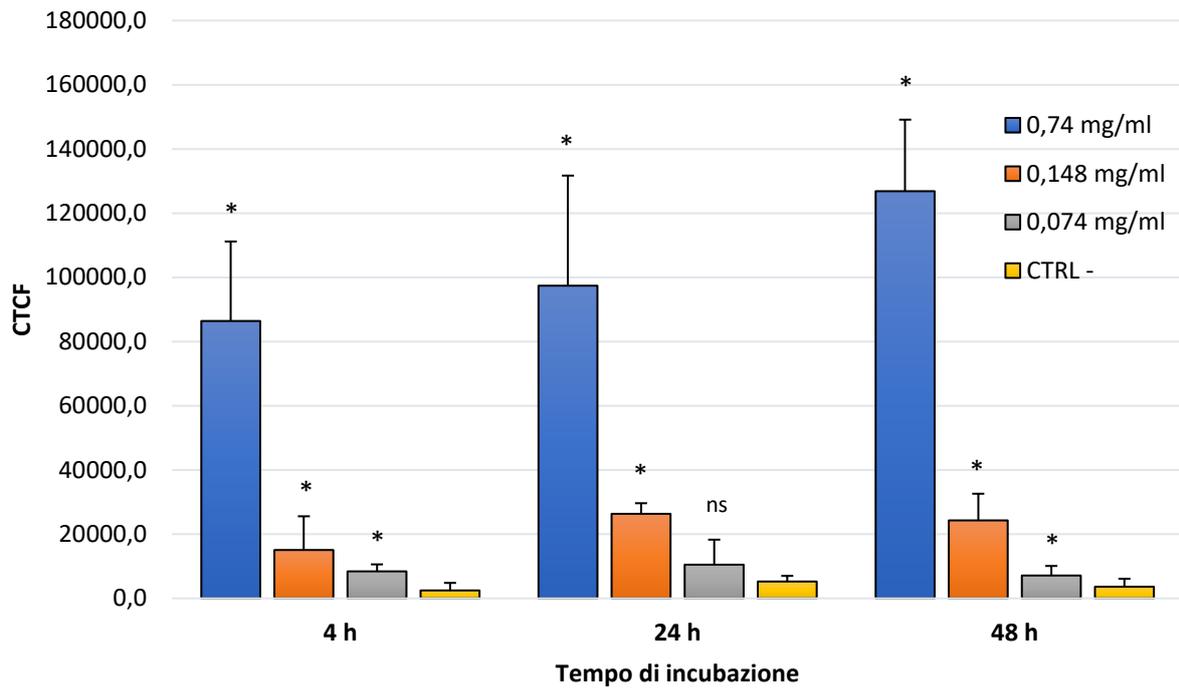
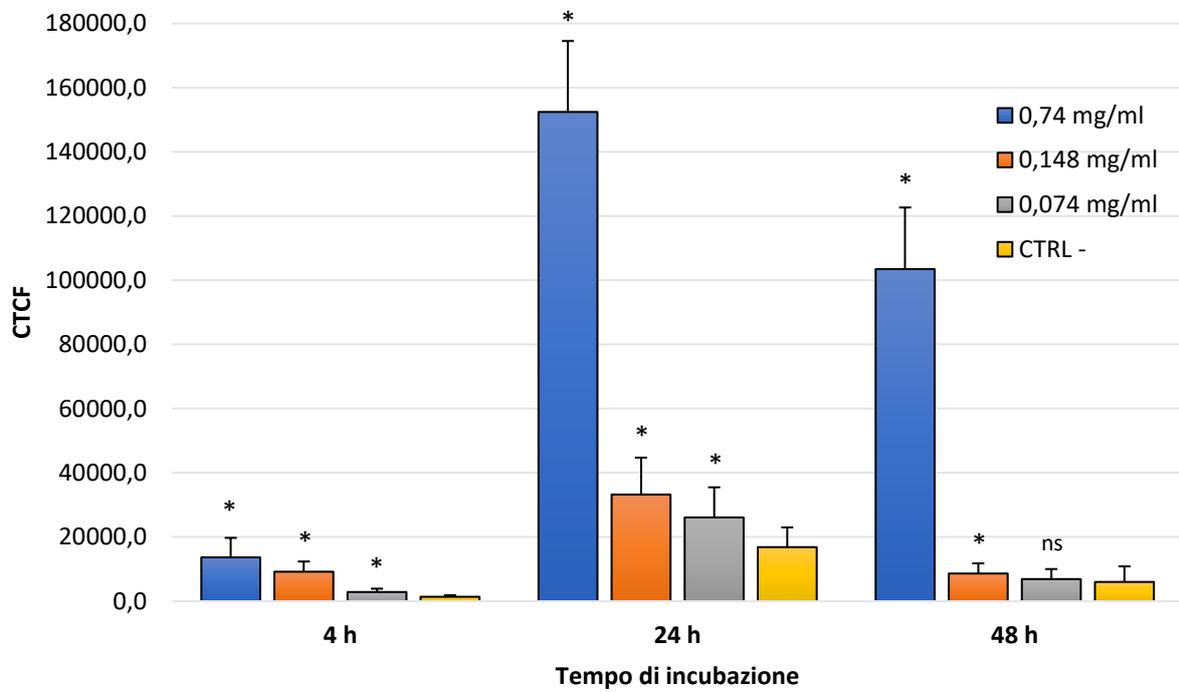
4.3.2 *Analisi statistica*

I dati ottenuti dalle analisi e riuniti nelle tabelle precedenti devono necessariamente essere sottoposti a un test statistico al fine di valutare i livelli di significatività. In questo caso particolare, al fine di valutare il grado di *uptake*, si vuole confrontare un campione sottoposto al trattamento con nanoparticelle e il relativo controllo negativo: i dati sottoposti al confronto sono le medie dei valori di fluorescenza ottenuti. Per capire se la differenza osservata tra le medie dei due campioni non è dovuta al caso si ricorre al *test t* di *Student*, un *test* statistico di tipo parametrico con cui si verifica se il valore medio di una distribuzione si discosta significativamente da un certo valore di riferimento. Si parte da un'ipotesi nulla (in genere chiamata H_0) che afferma che la differenza è dovuta al caso e si calcola il valore t considerando media e deviazione standard dei due campioni in esame. Da un confronto tra valore t empirico e valore t teorico si può concludere se i risultati sono statisticamente significativi o meno. In questo studio è stato considerato un livello di significatività $\alpha=0,01$ (1%): se dal test di verifica d'ipotesi si ottiene un valore $p<0,01$, l'ipotesi nulla H_0 è rifiutata e i risultati delle analisi effettuate possono essere considerati statisticamente significativi. Per questo studio l'ipotesi nulla considerata è la seguente: la fluorescenza non è dovuta alle nanoparticelle.

Negli istogrammi riportati nei successivi paragrafi, se il confronto tra campione e relativo controllo presenta una differenza statisticamente significativa, il campione è contrassegnato con *, viceversa se il confronto non presenta un adeguato livello di significatività (cioè se $p>0,01$) il campione viene segnato con la sigla *ns*.

4.3.3 *Grafici di confronto*

Con i dati ottenuti si costruiscono dei grafici che consentono di apprezzare al meglio il confronto tra i parametri di influenza (concentrazione del trattamento, tempi di incubazione). Ogni linea cellulare viene analizzata in modo indipendente. Nei paragrafi successivi si eseguiranno anche confronti tra le diverse linee cellulari.

A**A375****B****COLO-320**

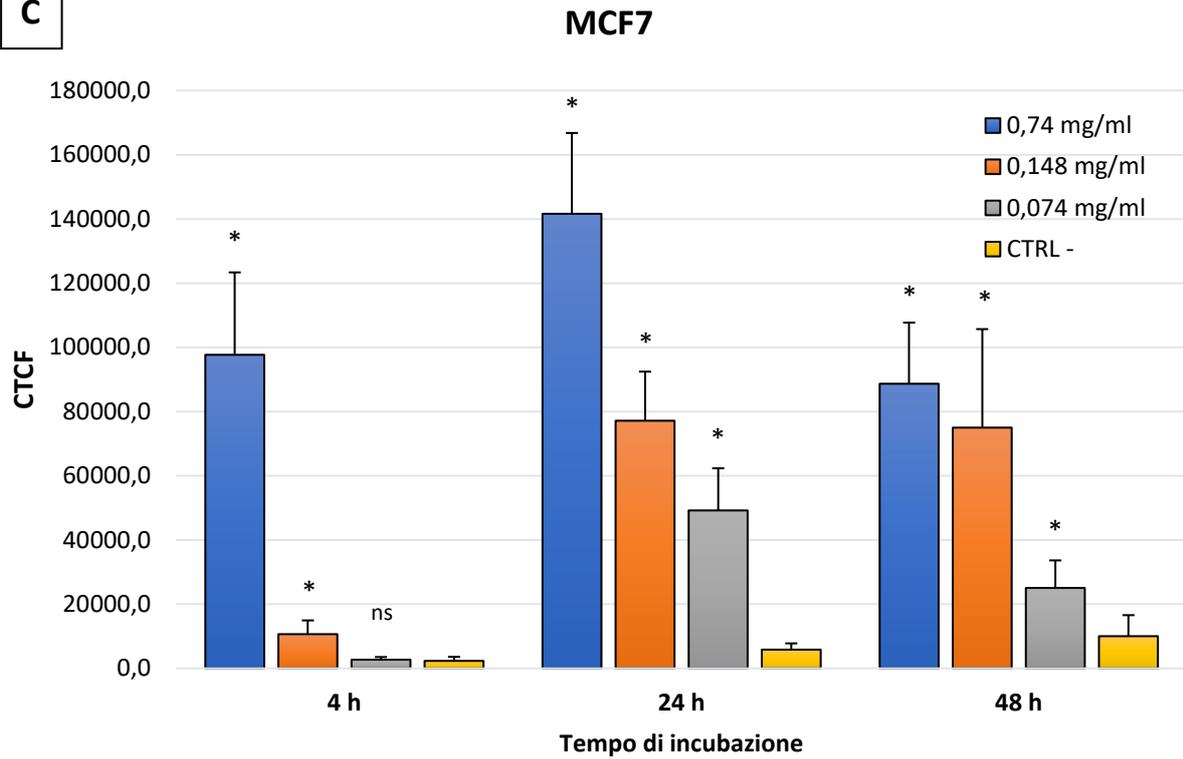
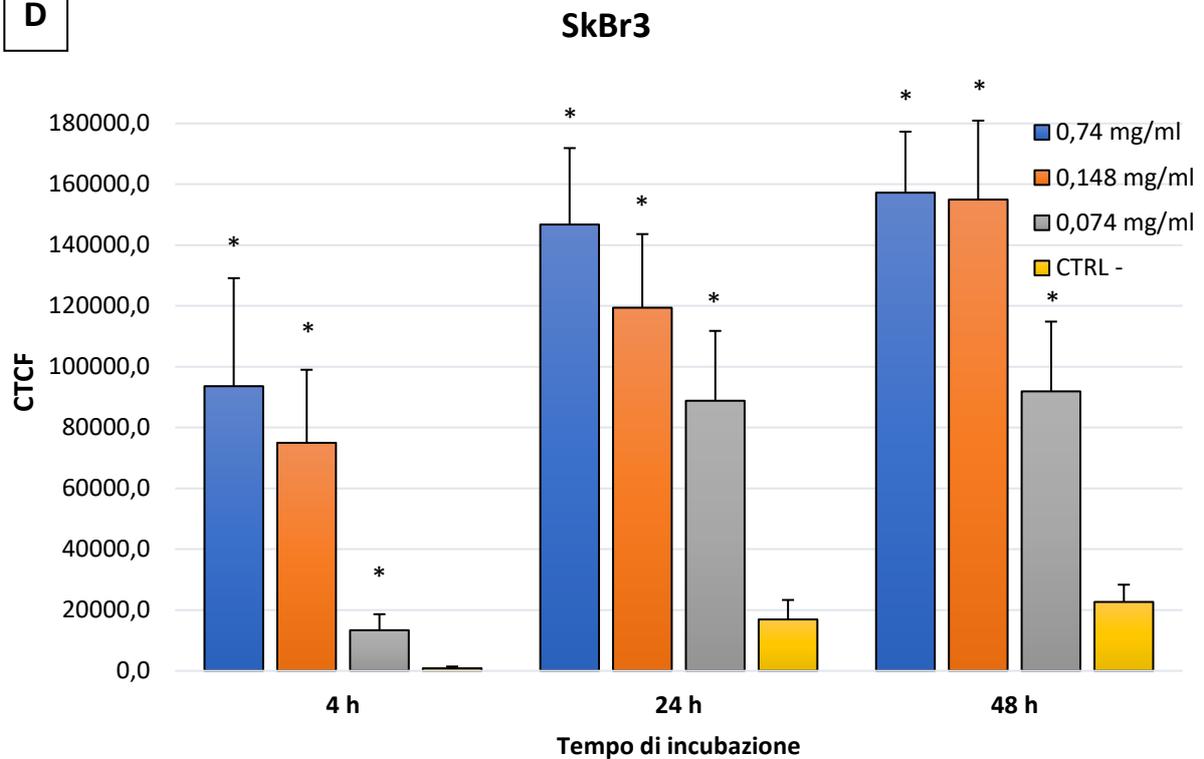
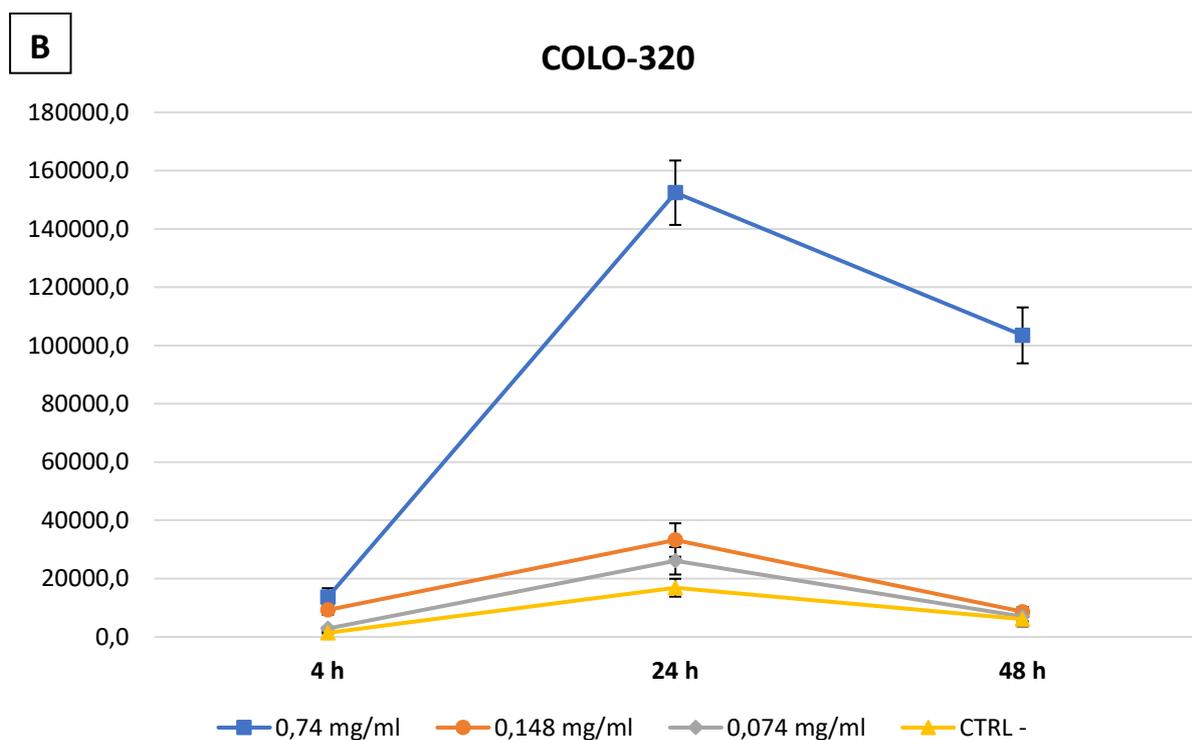
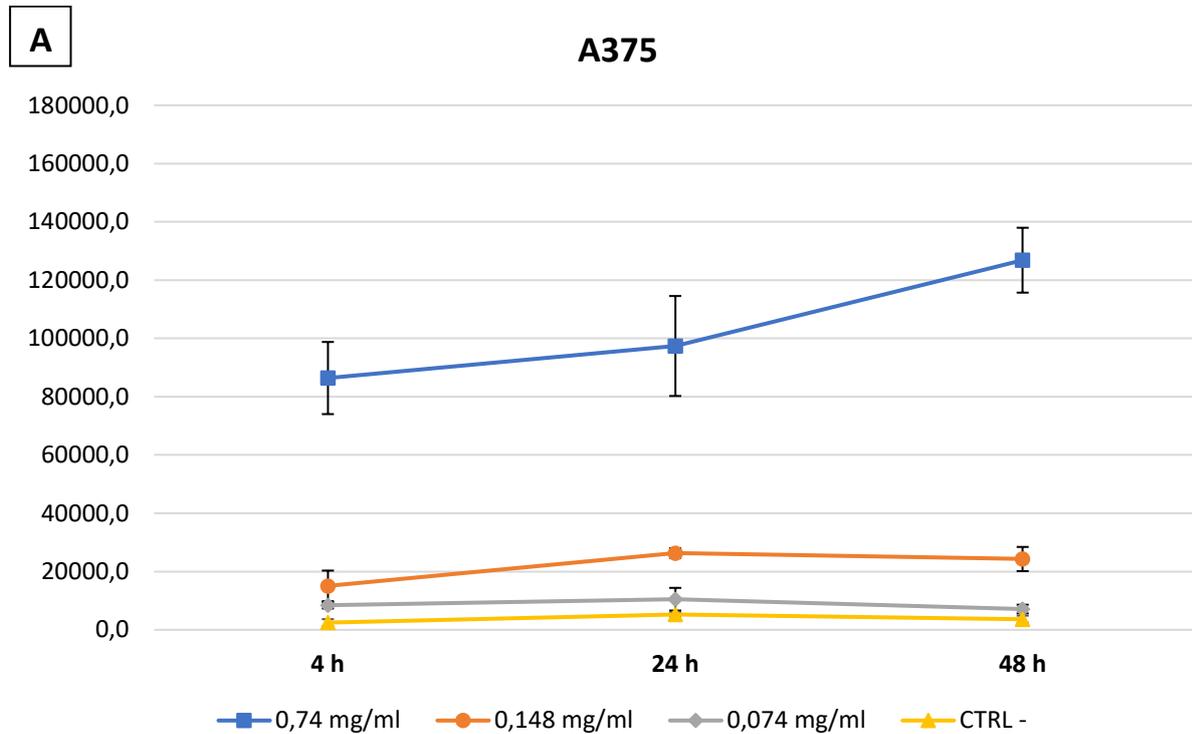
C**D**

Figura 4.6 Istogrammi per confrontare la fluorescenza. Vengono messi a confronto i valori di CTCF in funzione della concentrazione del trattamento con nanoparticelle e del tempo di incubazione. Si costruisce un grafico per ogni linea cellulare. (A) Linea A375 (B) Linea COLO-320 (C) Linea MCF7 (D) Linea SkBr3.

I grafici in Figura 4.6 sono molto utili per eseguire osservazioni di tipo quantitativo sulle variazioni di fluorescenza in funzione della concentrazione del trattamento e dei tempi di incubazione. Si nota subito come all'aumentare del parametro della concentrazione corrisponda un aumento dei valori di fluorescenza e questo accade in modo coerente per tutte le linee cellulari e per ogni tempo di incubazione. Per meglio apprezzare l'andamento temporale della fluorescenza in ogni linea cellulare, si riportano i seguenti grafici.



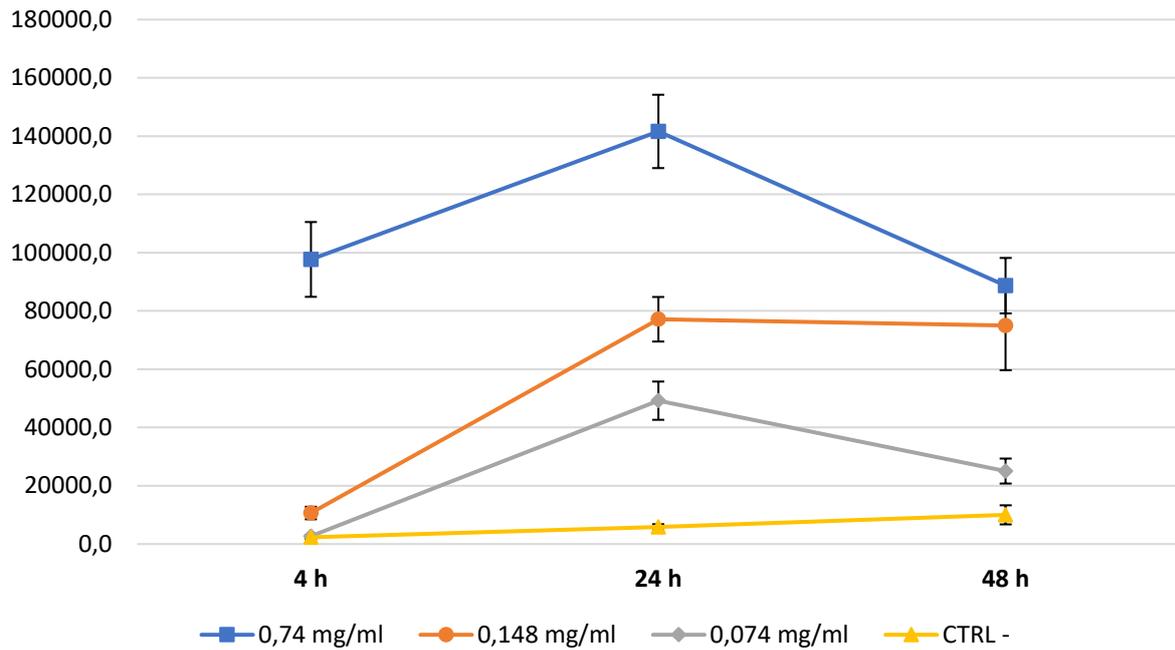
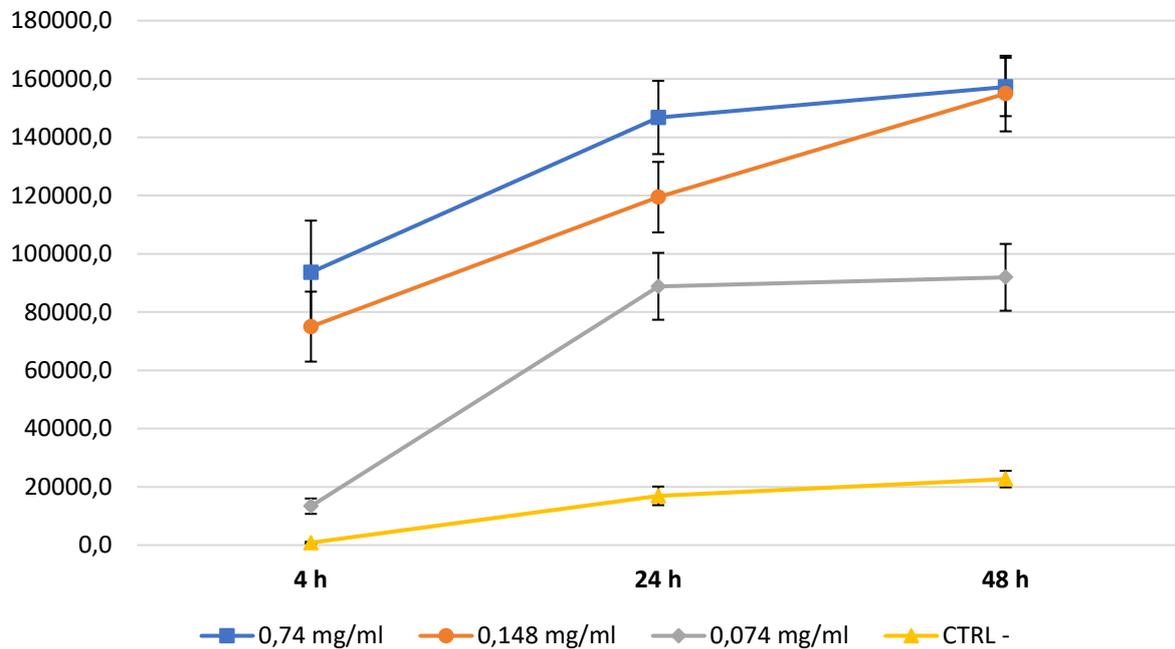
C**MCF7****D****SkBr3**

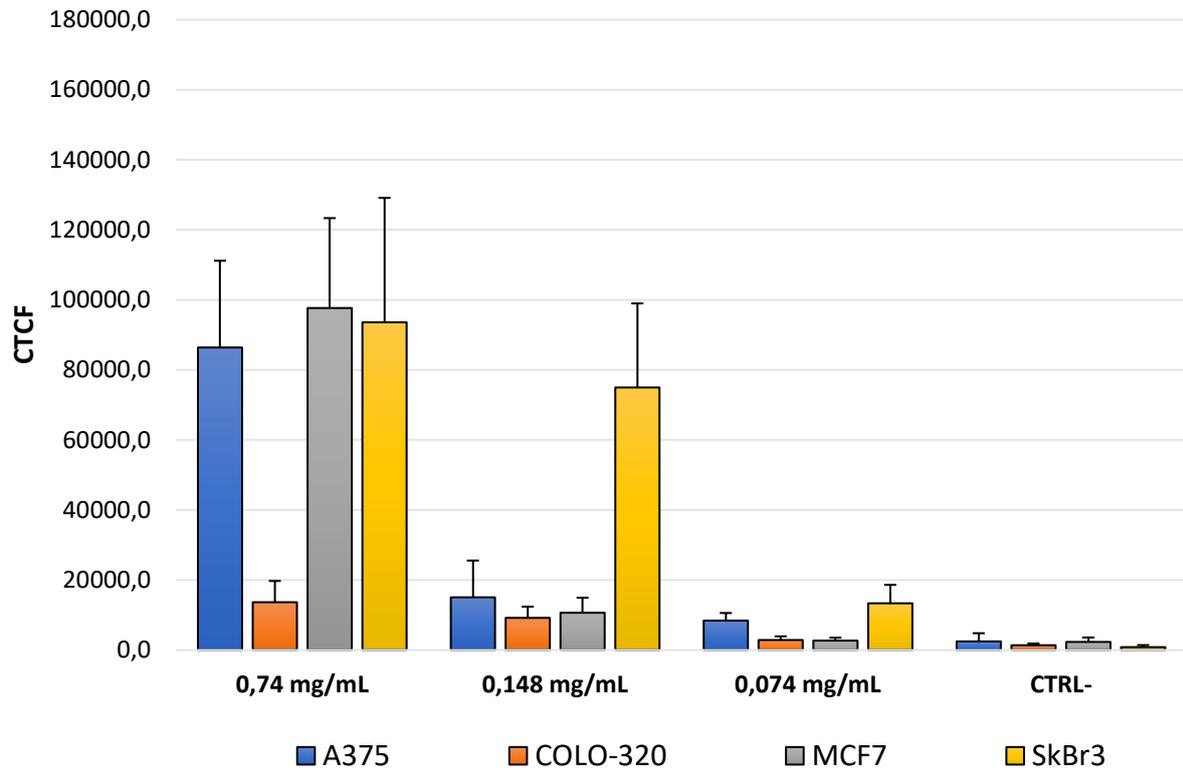
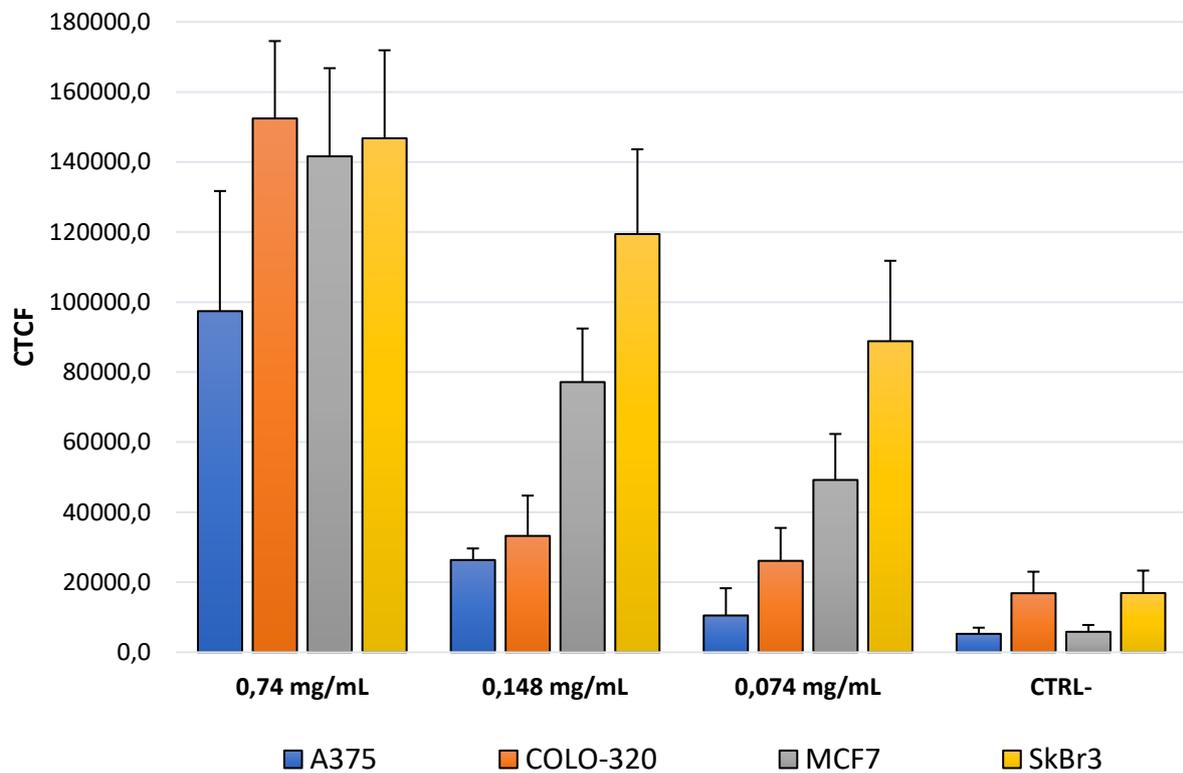
Figura 4.7 Grafici per confrontare la variazione di fluorescenza nel tempo per i campioni analizzati di ogni linea cellulare. Nell'asse delle ordinate viene sempre riportato il valore di CTCF. (A) Linea A375 (B) Linea COLO-320 (C) Linea MCF7 (D) Linea SkBr3.

Si nota subito come l'andamento della fluorescenza nel tempo sia abbastanza ricorrente: nella maggior parte dei casi si ha un forte incremento nelle prime 24 ore e un decremento meno critico nelle 24 ore successive. Fa eccezione la linea cellulare SkBr3, in cui l'incremento persiste anche nelle 24 ore successive. Si deve comunque considerare il fatto che le cellule in coltura mettono in atto meccanismi di replicazione, perciò è possibile che, durante l'analisi della fluorescenza, si stia esaminando una cellula che ha appena completato il processo di divisione, durante il quale il quantitativo di nanoparticelle già internalizzate viene diviso equamente. Successivamente le cellule figlie inizieranno a partecipare attivamente all'*uptake* di altre nanoparticelle.

Un'altra considerazione da non sottovalutare riguarda lo stato di salute delle cellule: prima di procedere con la somministrazione del trattamento, le cellule vengono osservate al microscopio ottico e viene fatta una conta cellulare per ogni linea. Queste operazioni vengono fatte per accertarsi che la coltura cellulare non abbia dei problemi particolarmente evidenti: con la conta cellulare si riesce a stabilire il grado di proliferazione confrontando i dati ottenuti con i tempi di duplicazione riportati in letteratura, al microscopio ottico si riconosce facilmente la presenza di eventuali batteri o altri agenti contaminanti (grazie alle loro caratteristiche morfologiche molto diverse) e si osserva il grado di *spreading* della cellula. Essendo tutte linee cellulari che crescono in adesione, se si osservano molte cellule in sospensione o con una morfologia particolarmente rotondeggiante significa che le cellule sono in sofferenza. Queste operazioni di controllo, sebbene aiutino molto, non consentono di avere un quadro completo sullo stato di salute delle cellule, poiché l'avanzamento della coltura può essere molto variabile tra linee diverse e i problemi che possono sorgere sono molteplici. Non bisogna dimenticare che le differenze di comportamento delle linee cellulari in coltura vanno associate anche ai diversi tempi di replicazione delle cellule: la linea A375 ha tempi molto più brevi rispetto alle altre tre, ma tutte le colture sono state portate avanti mantenendo gli stessi tempi per lo *split* e per la semina nelle piastre *multiwell*. In generale, l'andamento piuttosto variabile dei valori di fluorescenza tra le diverse linee cellulari può essere associato sia al loro stato di salute sia ai loro diversi tempi di duplicazione.

4.3.4 Confronto tra diverse linee cellulari

Per capire se le nanoparticelle considerate sono ottimali per tutte le linee cellulari tumorali prese in considerazione, in modo che questa tecnologia possa raggiungere un certo grado di universalità, risulta indispensabile comparare il comportamento delle diverse linee cellulari nella fase di *uptake*. A tal proposito vengono presentati degli istogrammi di confronto tra le quattro linee cellulari, in cui i rispettivi valori di fluorescenza vengono raggruppati in base alla concentrazione del trattamento. Si esclude dal confronto il parametro dei tempi di incubazione, cioè ogni grafico presentato si riferisce ad uno dei tre tempi considerati per le analisi. Si decide inoltre di considerare uniforme il numero di cellule seminate in ogni pozzetto. Sebbene, dalla conta, il numero di cellule per pozzetto risulti diverso a seconda della linea, si ritiene di far ricadere questa differenza nell'ambito della caratteristica probabilistica che il metodo di conta cellulare in camera conta globuli ha intrinseco.

A**4 h****B****24 h**

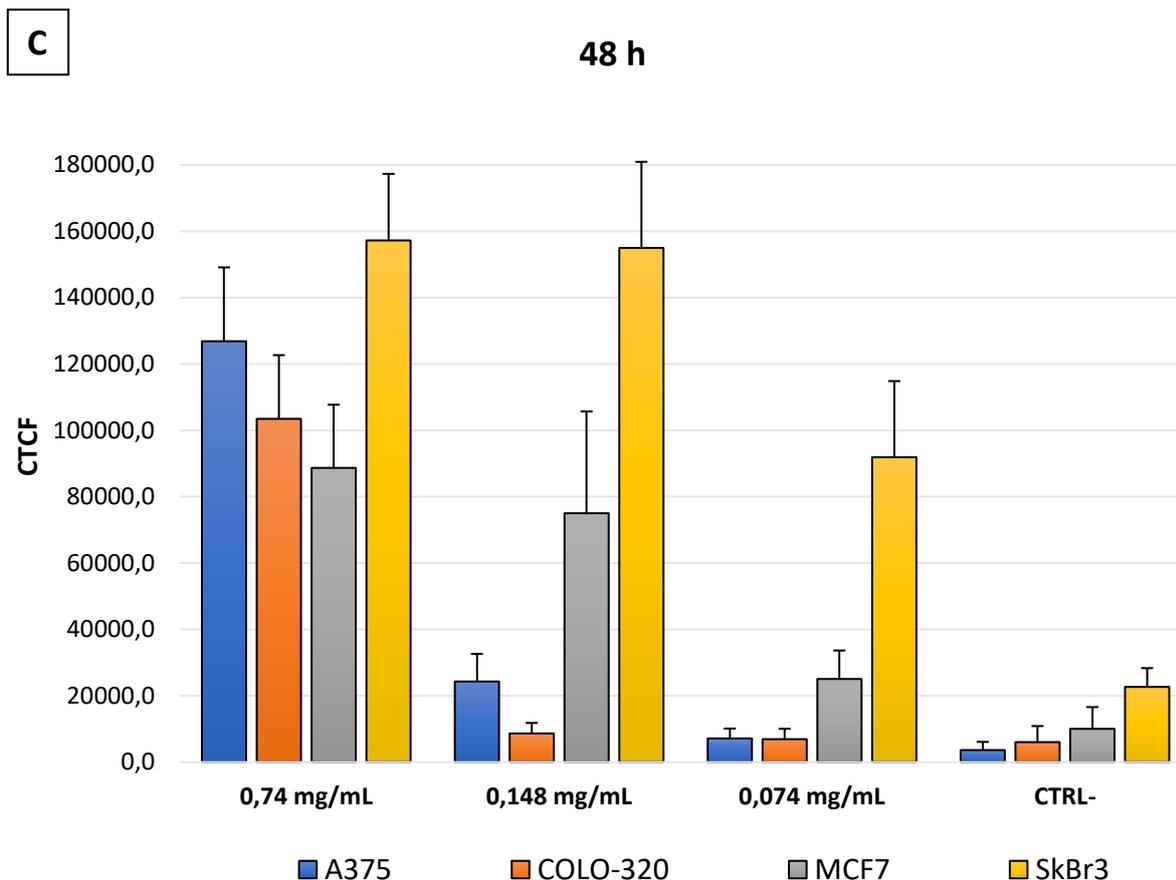


Figura 4.8 Istogrammi di confronto del segnale di fluorescenza in funzione delle diverse linee cellulari. (A) Analisi a 4 ore; (B) analisi a 24 ore; (C) analisi a 48 ore.

La linea A375 presenta tempi di replicazione compresi tra le 6 e le 12 ore, molto più brevi rispetto alle altre linee analizzate. Dai grafici A e B della Figura 4.8 risulta evidente che i valori di fluorescenza associati alla linea A375 sono nettamente inferiori e questo comportamento può essere spiegato riprendendo le considerazioni fatte nel paragrafo 4.3.3: tempi di replicazione più veloci implicano una divisione cellulare più rapida e ad ogni divisione le nanoparticelle vengono equamente suddivise tra le cellule figlie, suddividendo quindi anche la fluorescenza. Nel grafico C della Figura 4.8, invece, i valori di fluorescenza della linea A375 sono più paragonabili (in alcuni casi anche maggiori) ai valori associati agli stessi campioni delle altre linee cellulari: una possibile spiegazione è che le cellule, una volta completato il processo di duplicazione, hanno più tempo per internalizzare le nanoparticelle ancora presenti nel mezzo extracellulare e questo comporta un netto aumento della fluorescenza. Va precisato che saranno presenti cellule appena divise anche nei campioni delle 48 ore, ma quelle che hanno completato sia il processo di replicazione sia l'internalizzazione delle nanoparticelle saranno numericamente di più e questo comporta una probabilità maggiore di incorrere in cellule che esprimono un segnale di fluorescenza più intenso. Al contrario, la linea SkBr3 presenta tempi di replicazione superiori, impiegando fino a 48 ore per completare la fase di duplicazione cellulare: i valori medi di fluorescenza associati a questa linea sono quasi sempre i maggiori e, in

particolare nell'analisi eseguita dopo 48 ore di incubazione, la differenza rispetto alle linee A375, COLO-320 e MCF7 è netta. Anche nel campione SkBr3 con trattamento a concentrazione 0,148 mg/mL e tempo di incubazione di 4 ore si osserva un discostamento netto rispetto alle altre linee sottoposte allo stesso trattamento; si può affermare che c'è una certa ripetibilità a livello generale sia nel comportamento delle singole linee cellulari in funzione dei tempi di incubazione, sia negli scostamenti dei valori di fluorescenza delle linee cellulari considerando i campioni con la stessa concentrazione del trattamento e con gli stessi tempi di incubazione.

La linea COLO-320 mostra un comportamento coerente con quanto appena detto, ad eccezione del campione con trattamento a concentrazione 0,74 mg/mL: il corrispondente valore di fluorescenza CTCF=13668,7 è nettamente inferiore rispetto agli altri tre valori. Per la linea A375 è calcolato un valore CTCF=86407,7, la fluorescenza delle MCF7 è pari a 97680,0 e il CTCF delle SkBr3 ha un valore di 93606,8. Calcolando la media di questi tre valori si ottiene un $\overline{\text{CTCF}}=92564,8$; si conclude che per il valore associato alla linea COLO-320 si verifica una diminuzione media del 86% rispetto agli altri tre valori. Una differenza così significativa fa pensare ad un problema di salute delle cellule in coltura presenti in quello specifico pozzetto, non sono però state condotte ulteriori indagini a riguardo.

4.4 *Discussione*

L'internalizzazione di nanomateriali da parte di linee cellulari è noto, in letteratura, come un fenomeno altamente variabile e influenzato da una moltitudine di fattori, tra i quali la dimensione e la forma del nanomateriale, la funzionalizzazione esterna dello stesso, la carica superficiale ma anche dalla tipologia di linea cellulare impiegata per lo studio. Andando più nel dettaglio, la consegna delle nanoparticelle alle cellule è un processo molto complicato che coinvolge la diffusione o la sedimentazione delle nanoparticelle stesse nel terreno di coltura. Inoltre, anche l'aggregazione delle nanoparticelle in *cluster* dipende da molteplici fattori, tra cui il rivestimento funzionale sulla superficie nanoparticellare, che può anche alterare le dinamiche di assorbimento cellulare. L'internalizzazione vera e propria può avvenire attraverso diversi processi: si può avere un *uptake* per fagocitosi, per endocitosi, per trasporto transmembrana diretta ecc. Infine, va precisato anche che, una volta all'interno della cellula, ci sono molti luoghi in cui le nanoparticelle vengono indirizzate (47).

L'*uptake* delle nanoparticelle di silice fluorescenti AcZon, come determinato da studi precedenti svolti in azienda, è un processo attivo (inteso come richiedente energia e quindi, quasi totalmente, inibito a 4°C) e rapido. I risultati ottenuti in questo studio sono per lo più concordi con quanto ipotizzato inizialmente: la fluorescenza aumenta nel tempo e all'aumentare della concentrazione nanoparticellare del trattamento somministrato.

Per quanto affermato poco sopra è interessante anche mettere in relazione questi risultati con il tempo di replicazione di ciascuna linea cellulare, caratteristica identificata come distintiva di ciascuna linea: sono state scelte linee cellulari con tempi di replicazione piuttosto simili eccetto la linea A375,

che ha tempi di duplicazione inferiori. Sicuramente questo spiega in parte i valori di fluorescenza generalmente più bassi rispetto alle altre linee cellulari, in quanto le nanoparticelle hanno la possibilità di essere ripartite in più cellule e, come detto precedentemente, post replicazione la quantità di nanoparticelle internalizzata viene suddivisa tra le due cellule figlie, comportando una diminuzione del segnale di fluorescenza attribuito ad ogni singola cellula. Inoltre, non è da sottovalutare il fatto che l'internalizzazione delle nanoparticelle non abbia causato variazioni morfologiche: sia al microscopio ottico invertito a contrasto di fase, sia al microscopio a fluorescenza, le cellule dei campioni trattati con nanoparticelle non hanno mostrato variazioni evidenti della membrana cellulare esterna (es. presenza di *blebs*) o di morfologia del nucleo rispetto ai controlli negativi. Questo permette di avere una conferma sull'ipotesi di non tossicità delle nanoparticelle utilizzate in questi esperimenti sulle quattro linee cellulari tumorali analizzate (ipotesi peraltro già avvalorata da esperimenti precedenti a questo studio).

In letteratura sono presenti molti studi sull'*uptake* di nanoparticelle di silice fluorescenti che mostrano come questo sia un processo attivo dipendente dal tempo di incubazione e dalla concentrazione del trattamento somministrato, ma anche dal tipo di linea cellulare e anche dalla grandezza delle cellule (48). Dai valori medi di CTCF ottenuti, infatti, si vede come ogni linea mostri diversi valori di internalizzazione delle nanoparticelle.

Dalle immagini riportate nel paragrafo 4.1.2 si nota che il segnale della fluorescenza dato dalla Rodamina non si sovrappone quasi mai alla fluorescenza data dal Hoechst, corrispondente ai nuclei delle cellule. Nei rari casi in cui questa sovrapposizione si verifici, si pensa ad un effetto ottico dato dalla trasposizione della tridimensionalità in un'immagine bidimensionale: le nanoparticelle internalizzate restano comunque nell'ambiente citoplasmatico, senza raggiungere il nucleo. In alcuni campioni si osservano agglomerati citoplasmatici di nanoparticelle; l'ipotesi della presenza di vescicole che racchiudono tali nanoparticelle è confermato in letteratura (49) e da indagini precedenti svolte dall'azienda, in cui è stato dimostrato che l'*uptake* di nanoparticelle attiva *pathways* di endocitosi che portano alla formazione di vescicole citoplasmatiche nelle quali le nanoparticelle rimangono confinate.

5 Conclusioni e prospettive future

L'*uptake* di nanoparticelle di silice fluorescenti è stato confermato essere un processo attivo dipendente da diversi parametri, alcuni dei quali presi in esame (come i tempi di incubazione, la linea cellulare e la concentrazione del trattamento somministrato). L'assenza di comportamenti estremamente differenti tra le linee analizzate permette di raggiungere la conclusione che queste nanoparticelle sono applicabili a tutte le linee cellulari considerate, senza che queste subiscano effetti citotossici e negativi come, ad esempio, l'inibizione della crescita. Infatti, nonostante in letteratura venga riportato che l'*uptake* delle nanoparticelle risulta fortemente dipendente da diversi fattori, tra cui le caratteristiche delle nanoparticelle stesse e la tipologia delle linee cellulari (50), in questo specifico lavoro tutte le linee cellulari analizzate hanno mostrato lo stesso comportamento. Da questo si può raggiungere la conclusione che il costrutto nanoparticellare utilizzato in questo studio risulta sufficientemente universale per le linee cellulari tumorali umane, anche se sono sicuramente necessari ulteriori studi ed approfondimenti a supporto di questa tesi come, ad esempio, lo studio degli effetti delle nanoparticelle su colture cellulari tridimensionali e sfruttando la tecnologia del *lab on a chip* grazie alla quale è possibile mimare, *in vitro*, un ambiente simile a quello *in vivo*. La permanenza della fluorescenza per i tempi considerati per l'analisi, inoltre, è funzionale a eventuali applicazioni di *drug delivery* o di *imaging*. Lo sviluppo dei farmaci richiede una valutazione degli effetti fisiologici e tossicologici che provoca nell'organismo: per moltissimo tempo i tradizionali sistemi di coltura cellulare bidimensionale hanno costituito un'importante piattaforma per la ricerca in campo biomedico, sebbene questi non riuscissero a simulare accuratamente le reali interazioni organiche e i fattori microambientali. L'alternativa alle colture 2D è data dai modelli animali in vivo: anche in questo caso ci sono problematiche legate all'etica, alle differenze fisiologiche di specie (rispetto all'uomo) e ai costi elevati. Nella fase dei *test* preclinici una descrizione inadeguata del microambiente tissutale umano può portare a previsioni imprecise sugli effetti dei farmaci da validare. Per questo, negli ultimi anni, l'interesse nei confronti della tecnologia degli *organ on a chip* si sta sempre più intensificando: si tratta di un sistema biomimetico in grado di imitare l'ambiente fisiologico di un organo e di regolare i parametri chiave, tra cui i gradienti di concentrazione, gli sforzi di taglio, i confini e le interazioni organo-tessuto (51).

Il metodo di analisi utilizzato è affidabile, anche se bisogna porre particolare attenzione durante la fase di scelta delle ROI da valutare per ricavare il valore relativo di CTCF, essendo questa azione fortemente operatore-dipendente. A tal proposito, uno *step* successivo per ottimizzare questa fase potrebbe essere quello di acquisire più immagini dello stesso campione, elaborarle come fatto in questo studio e alla fine fare una media dei valori di CTCF calcolati per ogni immagine. In questo modo si ottiene una generalizzazione nella valutazione della fluorescenza, anche se non è da sottovalutare il costo di tale operazione in termini di tempo, ma anche negli effetti che un'operazione così complessa e ripetitiva può portare alla criticità della selezione da parte dell'operatore. Per eliminare l'incertezza data

dalla componente umana si può ricorrere all'analisi in citofluorimetria, in cui si considera un numero maggiore di cellule (nell'ordine delle decine di migliaia) e si evita la selezione da parte dell'operatore. Il controllo dell'utilizzo, in questi studi, di una tecnica come la citometria a flusso è la totale mancanza dell'immagine a supporto del dato. È quindi corretto ritenere che, per uno studio completo e ottimale, le due tecniche possano essere entrambe utilizzate e combinate tra loro.

Questo lavoro ha portato risultati promettenti per proseguire con studi successivi di aggraffaggio di una o più molecole terapeutiche e di *targeting* allo *shell* delle nanoparticelle per realizzare agenti multifunzionali: alla nanoparticella fluorescente (utile per l'*imaging*) viene coniugato un anticorpo monoclonale (molecola di *targeting*), a sua volta coniugato ad un farmaco (molecola effettrice). In Figura 5.1 è raffigurato, a titolo esemplificativo, il sistema appena descritto.

Per concludere la trattazione si può considerare la seguente previsione: essendo il comportamento osservato condiviso da linee cellulari di natura diversa, è auspicabile che esso sia comune alla maggior parte di cellule tumorali.

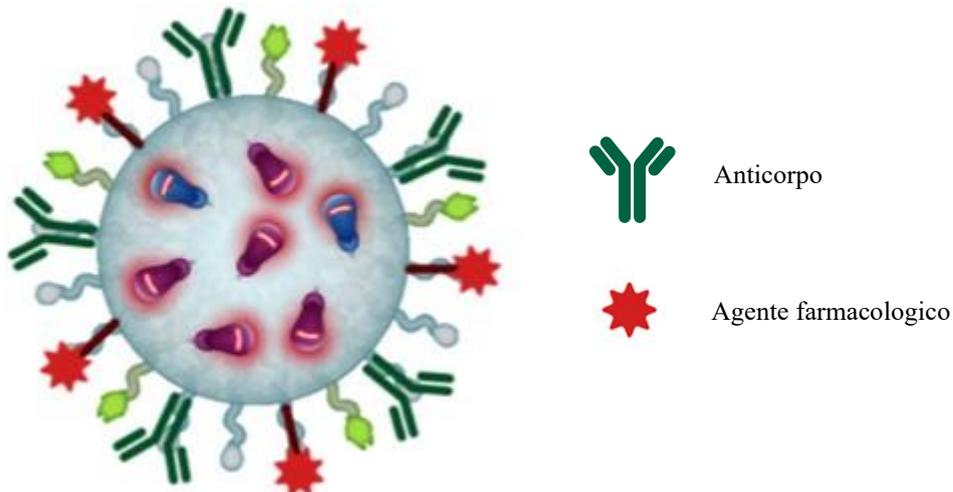


Figura 5.1 Raffigurazione del tool ipotetico costituito da una nanoparticella superficialmente funzionalizzata con un anticorpo monoclonale e un farmaco.

6 Bibliografia

1. Arcangeli, A. *Le Nanotecnologie applicate alla medicina*. 2013. p. 4: 6-7.
2. JE Hulla, SC Sahu and AW Hayes. *Nanotechnology: History and future*. 2015. p. Vol. 34(12) 1318–1321.
3. Bayda, S., Adeel, M., Tuccinardi, T., Cordani, M., and Rizzolio, F. *The history of nanoscience and nanotechnology: From chemical-physical applications to nanomedicine*. *Molecules*. 2020, Vol. Vol. 25, p. 112.
4. McNeil, S. E. *Nanotechnology for the biologist*. *Journal of Leukocyte Biology*. (2005), Vol. 78(3), 585–594, p. 78(3), 585–594.
5. S. Moein Moghimi, A. Christy Hunter, and J. Clifford Murray. *Nanomedicine: current status and future prospects*. *The FASEB Journal*. 2005, Vol. Vol. 19, 311-330.
6. Md Fakruddin, Zakir Hossain, Hafsa Afroz. *Prospects and applications of nanobiotechnology*. *Journal of Nanobiotechnology*. 2012, 10:31.
7. Mendes, P. M. *Cellular nanotechnology: Making biological interfaces smarter*. *Chemical Society Reviews*, 2013, Vol. Vol. 42, pp. 9207–9218. Royal Society of Chemistry.
8. Beverly C, Handy MS. *Applicazioni cliniche delle nanotecnologie alla diagnostica e alla terapia dei tumori*. *J Clin Ligand Assay (ed Italiana)*. 2006; 29(3): 137-142.
9. Gao X, Cui Y, Levenson RM, Chung LW, Nie S. *In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots*. *Nature Biotechnol*. 22(8): 979-976, 2004.
10. Nagamune, T. *Biomolecular engineering for nanobio/bionanotechnology*. *Nano Convergence*, . Vol. 4, p. 9. Korea Nano Technology Research Society, 2017.
11. Mahsa Gharibi Marzancola, Abootaleb Sedighi, Paul C. H. Li. *DNA Microarray-Based Diagnostics. Microarray Technology: Methods and Applications* . 2016
12. Suveen Kumar, Saurabh K., Md. Azahar A., Pinki A., Ved Varun A., Renu J., Sagar M., Bansil D. M. *Microfluidic-integrated biosensors: Prospects for point-of-care diagnostics*. *Biothechnology Journal*. 8, 1267-1279, 2013.

13. Kemp J. A., Shimb M. S., Chan Yeong Heo, Young Jik Kwon. “Combo” nanomedicine: Co-delivery of multi-modal therapeutics for efficient, targeted, and safe cancer therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2015.
14. J. K. Patra et. al, *Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects*. *Journal of Nanobiotechnology*. 16:71, 2018.
15. C. Li, J. Wang, Y. Wang, H. Gao, G. Wei, Y. Huang, H. Yu, Y. Gan, Y. Wang, L. Mei, H. Chen, H. Hu, Z. Zhang, Y. Jin. *Recent progress in drug delivery*. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 9(6): 1145-1162, 2019.
16. Meng Z., Ergang L., Yanna C., Yongzhuo H. *Nanotechnology-based combination therapy for overcoming multidrug-resistant cancer*. *Cancer Biology & Medicine*, 2017.
17. Barreto J A, O' Malley W, Kubeil M, Graham B, Stephan H, Spiccia L. *Nanomaterials: Applications in Cancer Imaging and Therapy*. *Advanced Healthcare Materials* . 23: 18-40, 2011.
18. Pietersz, Wang, Yao, Lim & Peter. *Therapeutic targeting in nanomedicine: the future lies in recombinant antibodies*. 2017.
19. Wang, Edina C. Wang & Andrew Z. *Targeted nanoparticles and their applications in biology*. *Integrative Biology*. 2013.
20. Yildirim L, Thanh NTK, Loizidou M, Seifalian AM. *Toxicological consideration of clinically applicable nanoparticles*. *Nano Today*. 2011, Vol. 6: 585-607.
21. Wang, E. C., and Wang, A. Z. *Nanoparticles and their applications in cell and molecular biology*. *Integrative Biology (United Kingdom)*. 2014, Vol. Vol. 6, pp. 9–26. *Integr Biol (Camb)*.
22. Li Tang, Jianjun Cheng. *Nonporous silica nanoparticles for nanomedicine application*. *Nano Today*. 8, 290-312, 2013.
23. Abbasi E., Aval S. F., Akbarzadeh A., Milani M., Nasrabadi H. T., Joo S. W., Pashaei-Asl R. *Dendrimers: Synthesis, applications, and properties*. *Nanoscale Research Letters* . 2014, Vol. Vol. 9, pp. 1–10. Springer New York LLC.
24. Soni K. S., Desale S. S., Bronich T. K. *Nanogels: An overview of properties, biomedical applications and obstacles to clinical translation*. *Journal of Controlled Release*. 2016, Vol. 240, 109–126.

25. Sharma V. K., Sayes C. M., Guo B., Pillai S., Parsons J. G., Wang C., Ma X. *Interactions between silver nanoparticles and other metal nanoparticles under environmentally relevant conditions: A review*. Science of the Total Environment. 2019, Vol. 653, 1042-1051.
26. Khan I., Saeed K., and Khan I. *Nanoparticles: Properties, applications and toxicities*. Arabian Journal of Chemistry. 2019, Vol. Vol. 12, pp. 908–931.
27. Jafari S., Derakhshankhah H., Alaei L., Fattahi A., Varnamkhasti B. S., Saboury A. A. *Mesoporous silica nanoparticles for therapeutic/diagnostic applications*. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2019, Vol. Vol. 109, 1100-1111.
28. Wen-Han Zhang, Xiao-Xiao Hu, Xiao-Bing Zhang. *Dye-doped Fluorescent Silica Nanoparticles for Live Cell and In Vivo Bioimaging*. Nanomaterials. 2016, Vol. Vol. 6.
29. M. Montalti, L. Prodi, E. rampazzo, N. Zaccheroni. *Dye-doped silica nanoparticles as luminescent organized systems for nanomedicine*. The royal Society of Chemistry, . 2014, Vol. Vol. 10.
30. Bonacchi S., Genovese D. e Juris R., Montalti M., Prodi L., Rampazzo E., Sgarzi M., Zaccheroni N. *Luminescent Chemosensor based on Silica Nanoparticles*. Top Curr Chem. 2011, Vol. Vol. 300.
31. Pellegrino C., Volpe A., Juris R., Menna M., Calabrese V., Sola F., Barattini C., Ventola A. *Multiple Dye Doped Core-Shell Silica Nanoparticles: Outstanding Stability and Signal Intensity Exploiting FRET Phenomenon for Biomedical Applications*. Journal of Nanomaterials & Molecular Nanotechnology. 2018.
32. Sola F., Canonico B., Montanari M., Volpe A., Barattini C., Pellegrino C., Cesarini E., Guescini M., Battistelli M., Ortolani C., Ventola A., Papa S. *Uptake and Intracellular Trafficking Studies of Multiple Dye-Doped Core-Shell Silica Nanoparticles in Lymphoid and Myeloid Cells*. Nanotechnology, Science and Applications. 14: 29-48, 2021.
33. Nianchun Zhang, Enyoung Ding, Xue Feng, Yang Xu, huaihong Cai. *Synthesis, characterization of dye-doped silica nanoparticles and their application in labelin cells*. Colloids and Surfaces B. 2012, Vol. Vol. 89.
34. Lin Wang, Kemin Wang, Swadeshmukul Santra, Xiaojun Zhao, Lisa R. Hilliard, Joshua E. Smith, Yanrong Wu, Weihong Tan. *Watching Silica Nanoparticles*. Analytical Chemistry. 2006.
35. Datta R., Heaster T.M., Sharick J.T., Gillette A.A., Skala M.C. *Fluroescence lifetime imaging microscopy: fundamentals and advances in instrumentation, analysis and applications*. Journal of Biomedical Optics. 25(7), 2020.

36. Goetz C., Hammerbeck C. *Fluorochrome Choices for Flow Cytometry*. [aut. libro] Hammerbeck C., Bonnevier J. Goetz C. Techniques in Life Science and Biomedicine for the Non-Expert. 2018.
37. R., Masters B. *The Development of Fluorescence Microscopy*. Encyclopedia of Life Sciences. 2010.
38. Flores-Montero J, Kalina T., Orfao A. et al. *Fluorochrome choices for multi-color flow cytometry*. Journal of Immunological Methods. 2019.
39. Lombardi D., Sabatini A. *Microscopia Confocale a Fluorescenza nella localizzazione di Progenitori Staminali Renali*. Biotecnologia applicata. 26, 2010.
40. M., Vascon. *Microscopio a fluorescenza: utilizzo, informazioni, prezzi, recensioni*. <https://microscopiomigliore.it/guida/microscopio-a-fluorescenza/>. [Online]
41. Università degli studi del Sannio - Dipartimento di scienze e tecnologie. *Microscopia a fluorescenza e microscopia confocale*. Benevento : s.n.
42. G., Prof. Benga. *Basic studies on gene therapy of human malignant melanoma by use of the human interferon β entrapped in cationic multilamellar liposomes*. J.Cell.Mol.Med. 2001, Vol. Vol. 5, No 4, pp. 402-408.
43. *Biological characterization and oncogene expression in human colorectal carcinoma cell lines*. Trainer, Deborah L., et al. s.l. : International Union Against Cancer, 1988, Vol. 41(2), 287-296.
44. Wei, Hsiu-Chuan. *Mathematical modeling of tumor growth: the MCF-7 breast cancer cell line*. Mathematical Biosciences and Engineering. 2019, Vol. Volume 16, Issue 6, 6512-6535.
45. "SK-BR-3 cells". Addex Bio. <https://www.addexbio.com/productdetail?pid=65>. [Online] 2018.
46. *Cellosaurus - a knowledge resource on cell lines*. https://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL_0033. [Online] Version 38 (May 2021).
47. Rees P., Wills J. W., Rowan Brown M., Barnes C. M., Summers H. D. *The origin of heterogeneous nanoparticle uptake by cells*. Nature Communications. 2019.
48. Peñaloza J. P., Márquez-Miranda V., Cabaña-Brunod M., Reyes-Ramírez R., Llancalahuen F. M., Vilos C., Maldonado-Biermann F., Velásquez L. A., Fuentes J. A., González-Nilo F. D., Rodríguez-Díaz M., Otero C. *Intracellular trafficking and cellular uptake mechanism of PHBV nanoparticles for targeted delivery in epithelial cell lines*. Journal of Nanobiotechnology. 2017, Vol. 15:1.

49. Haw D. Summers, Martyn R. Brown, Mark D. Holton, James A. Tonkin, Nicole Hondow, Andrew P. Brown, Rik Brydson, and Paul Rees. *Quantification of nanoparticles Dose and Vesicular Inheritance in Proliferating Cells*. ACSNANO. 2013, Vol. Vol. 7, No. 7, 6129-6137.
50. Hsiao I.-L., Gramatke A. M., Joksimovic R., Sokolowski M., Gradzielski M., Haase A. *Size and Cell Type Dependent Uptake of Silica Nanoparticles*. Journal of Nanomedicine & Nanotechnology. 2014, Vol. Vol 5.
51. Wu Q., Wang X., Feng L., Wu J., Zhu X., Wen W., Gong X. *Organ-on-a-chip: recent breakthroughs and future prospects*. BioMedical Engineering OnLine. 19:9, 2020.
52. Rawat, R. S. *Dense Plasma Focus - From Alternative Fusion Source to Versatile High Energy Density Plasma Source for Plasma Nanotechnology*. Journal of Physics: Conference Series,. 591(1), 012021. Institute of Physics Publishing, 2015.
53. N. Schleich, F. Danhier, V. Pr at. *Iron oxide-loaded nanotheranostics: Major obstacles to in vivo studies and clinical translation*. Journal of Controlled Release. 2014.
54. Silva S., Almeida A. J., and Vale N. *Combination of cell-penetrating peptides with nanoparticles for therapeutic application: A review*. Biomolecules. 2019, Vol. 9(1), 1–24.